

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

**MARMARA BÖLGESİNDE YETİŞTİRİLEN BAZI ZEYTİN (*OLEA EUROPAEA*
L.) KÜLTİVARLARININ MOLEKÜLER SİSTEMATİK ANALİZİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Sabiha PARLAK

Balıkesir, Haziran-2007

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

MARMARA BÖLGESİNDE YETİŞTİRİLEN BAZI ZEYTİN (*OLEA
EUROPAEA* L.) KÜLTİVARLARININ MOLEKÜLER SİSTEMATİK
ANALİZİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Sabiha PARLAK

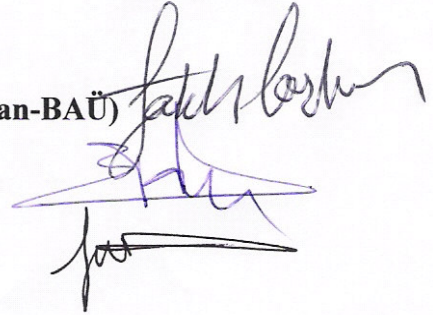
Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Fatih COŞKUN

Sınav Tarihi: 20.06.2007

Jüri Üyeleri: Yrd. Doç. Dr. Fatih COŞKUN (Danışman-BAÜ)

Yrd. Doç. Dr. Ekrem DÜNDAR (BAÜ)

Yrd. Doç. Dr. Funda YÜKRÜK (BAÜ)



ÖZET

MARMARA BÖLGESİNDE YETİŞTİRİLEN BAZI ZEYTİN (*OLEA EUROPAEA* L). KÜLTİVARLARININ MOLEKÜLER SİSTEMATİK ANALİZİ

Sabiha PARLAK

Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı

(Yüksek Lisans Tezi / Tez Danışmanı: Yard. Doç. Dr. Fatih COŞKUN)

Balıkesir, 2007

Yapılan incelemeler sonucu PCR (Polymerase Chain Reaction)'a dayalı DNA markırların günümüzde ön plana çıkmış oldukları, bunlardan da RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) polimorfizm belirleme yaklaşımının bugün en çok kullanılan yöntemler arasında yer aldığını görüldü. RAPD markırlar taksonomik sınıflandırmada, sistematik ilişkilerin belirlenmesinde ve populasyon genetiği çalışmalarında, kullanılabilirlikindedir.

Bu çalışmada, Marmara Bölgesinde yetiştirilen bazı zeytin (*Olea europaea* L.) kùltivarlarının DNA markırları kullanılarak moleküler sistematüğının yapılması hedeflenmiştir. Bu amaçla, RAPD-PCR tekniğı kullanılarak kùltivarlar arasında genetik benzerlik ya da farklılıkların belirlenmesine çalışılmıştır.

RAPD-PCR sonuçlarına göre; kullanılan 10 baz uzunluğunda 7 farklı primer amplifikasyon göstermiş ve çalışılan 12 kùltivar arasında % 46,42 oranında polimorfizm elde edilmiştir. Primerlerden toplam 84 karakter elde edilmiş ve bu karakterlerin 39 tanesi polimorfik bulunmuştur. PAUP* (Phylogenetic Analysis Using Parsimony and Other Methods) filogenetik analiz programı kullanılarak kùltivarlar arasındaki akrabalık ilişkileri ve genetik uzaklıkları belirlenmiştir. PAUP verilerine göre birbirine en yakın genetik uzaklık 0,03571 ile Gordal ve Karamürsel su kùltivarları arasında iken, en uzak genetik uzaklık 0,17857 ile Arbequina ile Ascolana, Manzanilla hermandos, Gemlik, Verdial ve Vegral kùltivarları arasında tespit edilmiştir.

Anahtar sözcükler: Zeytin (*Olea europaea* L.), RAPD-PCR, Filogenetik Analiz, PAUP*.

ABSTRACT

MOLECULAR SYSTEMATIC ANALYSIS OF SOME OLIVE CULTIVARS (*OLEA EUROPAEA* L.) GROWN IN MARMARA REGION

Sabiha PARLAK

Balikesir University, Institute of Science, Department of Biology

(Msc. Thesis / Supervisor: Dr. Fatih Coşkun)

Balikesir-Turkey, 2007

Based on our literature research, it is noticed that DNA markers based on PCR (Polymerase Chain Reaction) techniques are widely used in recent days. Depending on our observation, RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) was found one of the most commonly used applications for determining the polymorphisms. RAPD markers can be used in population genetics studies, in systematic analyses, and in taxonomic classification studies.

In this research, it is intended to perform a molecular systematic analysis using DNA markers for some olive cultivars (*Olea europaea* L.) grown in the Marmara Region. Thus using RAPD-PCR techniques, it was attempted to determine the genetic relationships, including similarities and differences, among the ingroup taxa.

Based on the RAPD-PCR techniques; seven different primers with 10 base-pair long sequence showed amplification and 46.42 % polymorphism was found between the studied 12 cultivars. 84 characters were derived from the primers in total and 39 of these were found to be polymorphic. Relationships and genetic distances between the cultivars were calculated by using the PAUP* (Phylogenetic Analysis Using Parsimony and Other Methods phylogenetic) analysis program. Based on the PAUP analyses, the closest genetic distance was found between Gordal and Karamursel su cultivars as 0.03571 whereas the most distant values were found between Arbequina and, respectively, Ascolana, Manzanilla hermandos, Gemlik, Verdial, and Vegral cultivars.

Key words: Olive (*Olea europaea* L.), RAPD-PCR, Phylogenetic Analysis, PAUP*.

İÇİNDEKİLER

ÖZET, ANAHTAR SÖZCÜKLER.....	ii
ABSTRACT, KEY WORDS	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
KISALTMALAR	vi
ŞEKİL LİSTESİ	vii
ÇİZELGE LİSTESİ.....	viii
ÖNSÖZ.....	ix

1. GİRİŞ	1
1.1 Zeytin (<i>Olea europaea</i> L.)	1
1.1.2 <i>O. europaea</i> 'nın Bitki Sistematikteki Yeri	1
1.1.3 <i>O. europaea</i> 'nın Morfolojisi	2
1.1.4 <i>O. europaea</i> 'nın Dünyadaki ve Türkiye'deki Yayılışı	3
1.1.5 <i>O. europaea</i> 'nın Kullanım Alanları ve Ekonomik Önemi	4
1.1.6 <i>O. europaea</i> 'nın Moleküler Sistematikte Üzerine Yapılan Çalışmaları	5
1.2 Moleküler Markırlar	6
1.2.1 Moleküler Markırların Özellikleri	7
1.2.2 Protein Markırlar	8
1.2.3 DNA'ya Dayalı Markırlar	9
1.3 Genetik Çeşitliliğin Belirlenmesinde Kullanılan Temel Moleküler Yöntemler	10
1.3.1 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)	10
1.3.1.1 RFLP Tekniğinin Avantajları	11
1.3.1.2 RFLP Tekniğinin Dezavantajları	11
1.3.2 AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)	11
1.3.2.1 AFLP Tekniğinin Avantajları	12
1.3.2.2 AFLP Tekniğinin Dezavantajları	12
1.3.3 SSR (Simple Sequence Repeat)	13
1.3.3.1 SSR Tekniğinin Avantajları	13
1.3.3.2 SSR Tekniğinin Dezavantajları	14
1.3.4 SSCP (Single-Strand Conformation Polymorphism)	14
1.3.5 RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA)	14
1.3.5.1 RAPD Tekniğinin Avantajları ve Dezavantajları	16
1.3.5.2 RAPD Tekniğinin Uygulama Alanları	17
1.4 Filogenetik Sistemik	18
1.5 Çalışmanın Kapsamı, Amacı ve Önemi	18
2. MATERYAL ve METOT	20
2.1 Kullanılan Cam Malzeme ve Plastik Malzemelerin Hazırlanması	20
2.2 Bitki Materyalinin Toplanması ve Saklanması	20
2.3 Genomik DNA İzolasyonu	21
2.4 Agaroz Jel Elektrofrezisi	22
2.5 DNA Miktar Tayini	23
2.6 RAPD-PCR Primerlerinin Seçimi ve Sulandırılması	24
2.7 PCR Koşullarının Optimizasyonu	24

2.8 RAPD-PCR Reaksiyonları	25
2.9 Agaroz Jel Elektrofrezisi ve Fotoğraflama	27
2.10 Verilerin Toplanması ve Analizi	28
3. BULGULAR	29
3.1 Genomik DNA (gDNA)	29
3.2 RAPD Profilleri	30
3.3 Verilerin Analizi ve Değerlendirilmesi	33
4. SONUÇ ve TARTIŞMA	35
5. KAYNAKLAR	49

KISALTMALAR

AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
AP-PCR	Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction
bp	Base Pair (baz çifti)
cpDNA	Chloroplast DNA
CDNA	DNA (Deoxyribonucleic Acid) Concentration
DNA	Deoxyribonucleic Acid
DAF	DNA Amplification Fingerprinting
dH₂O	Distile Su
dNTP	Deoksiribonükleosid trifosfat
EDTA	Etilendiamintetraasetikasit
EtBr	Etidyumbromid
gDNA	Genomik DNA
OD	Optik Densite (Absorbans Değeri)
PAUP*	Phylogenetic Analysis Using Parsimony and Other Methods
PCR	Polimerase Chain Reaction
RAPD	Randomly Amplified Polymorphic DNA
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SSCP	Single-Strand Conformation Polymorphism
SSR	Simple Sequence Repeat
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Trisborateetilendiamintetraasetikasit
UPGMA	Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages
UV	Ultraviyole
VNTR	Variable Number of Tandem Repeat

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil Numarası	Adı	Sayfa
Şekil 1.1	Zeytinin Çiçek ve Meyve Genel Görünümü	3
Şekil 1.2	Zeytinin Anavatanı ve Yayılış Yolları	4
Şekil 2.1	RAPD Bant Profillerini Belirlemede Kullanılan DNA Markırı	28
Şekil 3.1	OPC-01 RAPD-PCR Elektroforez Görüntüsü	30
Şekil 3.2	OPA-10 RAPD-PCR Elektroforez Görüntüsü	31
Şekil 3.3	OPA-12 RAPD-PCR Elektroforez Görüntüsü	31
Şekil 3.4	OPC-11 RAPD-PCR Elektroforez Görüntüsü	31
Şekil 3.5	OPC-02 ve OPA-13 RAPD-PCR Elektroforez Görüntüsü	32
Şekil 3.6	OPB-12 RAPD-PCR Elektroforez Görüntüsü	32
Şekil 3.7	Delice (Dış Grup) RAPD-PCR Elektroforez Görüntüsü	33
Şekil 3.8	RAPD-PCR Analizinde Kullanılan Veri Matrisi	34
Şekil 4.1	Parsimoni Sonucunda Elde Edilen 1 Numaralı Ağaç	37
Şekil 4.2	Parsimoni Sonucunda Elde Edilen 2 Numaralı Ağaç	38
Şekil 4.3	Parsimoni Sonucunda Elde Edilen 3 Numaralı Ağaç	38
Şekil 4.4	Parsimoni Sonucunda Elde Edilen 4 Numaralı Ağaç	39
Şekil 4.5	Parsimoni Sonucunda Elde Edilen 5 Numaralı Ağaç	39
Şekil 4.6	Parsimoni Sonucunda Elde Edilen 6 Numaralı Ağaç	40
Şekil 4.7	Parsimoni Sonucunda Elde Edilen 7 Numaralı Ağaç	40
Şekil 4.8	Parsimoni Sonucunda Elde Edilen 8 Numaralı Ağaç	41
Şekil 4.9	BOOTSTRAP Analizi	42
Şekil 4.10	BOOTSTRAP Analizi(<%50)	43
Şekil 4.11	UPGMA Analizi Sonucu Oluşan Ağaç	46

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge Numarası	Adı	Sayfa
Çizelge 2.1	Zeytin Kültivarları ve Toplanma Zamanları	21
Çizelge 2.2	Agaroz Jel Elektroforezinde Kullanılan Çözeltiler ve Özellikleri	23
Çizelge 2.3	RAPD-PCR Reaksiyonunda Kullanılan Primerler ve Tm Değerleri	24
Çizelge 2.4	RAPD-PCR Şartları	26
Çizelge 2.5	PCR Döngü Koşulları	26
Çizelge 3.1	gDNA'ların Saflığı ve Miktarı	29
Çizelge 4.1	Kültivarlar Arasındaki Genetik Farklılığı Gösteren Genetik Uzaklık (Pairwise Distance) Analizi	44-45

ÖNSÖZ

Çalışmalarımı yönlendiren, araştırmalarımın her aşamasında bilgi, öneri ve yardımlarını esirgemeyerek akademik ortamda olduğu kadar beşeri ilişkilerde de engin fikirleriyle yetişme ve gelişme katkıda bulunan danışman hocam Sayın Yard. Doç. Dr. Fatih COŞKUN 'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmam için gerekli laboratuvar imkanlarını sağlayan BÜTAM Müdürlüğü'ne, bu merkezde çalışan Ferit KARANFİL'e ve diğer çalışanlarına teşekkür ederim.

2005/23 no'lu projeye tezime maddi destek sağlayan Balıkesir Üniversitesi Araştırma Fonu'na teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmada kullanılan zeytinlerin temin edilmesini sağlayan, Edremit Zeytincilik Fidan Üretme İstasyonu Müdürü Sayın Mehmet BALCI başta olmak üzere tüm çalışanlarına teşekkürlerimi sunarım.

Ders ve laboratuvar aşamasında deneyimlerinden ve bilgilerinden yararlandığım değerli hocalarım, Doç. Dr. Feray KÖÇKAR, Doç. Dr. Süphan KARAYTUĞ ve Yard. Doç. Dr. Ekrem DÜNDAR'a teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarım boyunca kimyasal ve sarf malzeme sıkıntısı çektiğim zamanlarda desteğini esirgemeyen değerli hocam Yard. Doç. Dr. Ekrem DÜNDAR'a tekrar teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarımız boyunca bir arada hoş vakit geçirdiğimiz, beni her konuda destekleyen ve çalışmalarımda yardımcı olan arkadaşlarım Görkem DENİZ, Meltem AYDIN, Nurten ÇANAKÇI ve Özlem KIZILKEÇİLİ' ye teşekkür ederim.

Yaşamımın her anında maddi ve manevi olarak beni destekleyen, her zaman yanımda olduklarını bildiğim, beni bugünlere getiren sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimle...

1. GİRİŞ

1.1 Zeytin (*Olea europaea* L.)

Dünyanın en sağlıklı ve doğal bitkisel yağ kaynağı olarak bilinen zeytinin tarihi, günümüzden 10 bin yıl öncesine kadar dayanır. Tarih boyunca, değişik kültürlerde zeytin barışın ve umudun temsilcisi ve yunanlı sporculardan, azizlere ve ilk hekimlere kadar eski tarihin tanrı ve tanrıçaları tarafından kutsal sayılmak suretiyle birçok efsanenin de kaynağı olmuştur. Bu nedenle insan yaşamının ilgisini çok az şey zeytin kadar çekebilmiştir. Ayrıca, beyaz bir güvercinin Nuh'un gemisine tufan sonrası canlılık belirtisi olarak, ağzında zeytin dalı ile dönmesi nedeniyle, zeytin yüzyıllardır barışın simgesi kabul edilir.

1.1.2 *O. europaea*'nın Bitki Sistematığındeki Yeri

Günümüzde kullanılan sınıflandırma sistemlerine göre zeytin, 20-29 cinse sahip olan Oleaceae familyasına dahildir [1, 2]. *Olea* cinsi, nispeten güç yetiştirme şartlarına sahip sahalardan çıkan çeşitli tür ve alt türleri içermektedir [3]. Bunların çoğu çalılar ve ağaçlardır. Yenilebilir meyvesi olan tek tür, kültür zeytininin de dahil olduğu *Olea europaea* L.'dir ve sınıflandırması aşağıdaki şekilde yapılmıştır [3].

Alem	:	Yeşil bitkiler
Alt alem	:	Tracheobionta
Superdivision	:	Spermatophyta
Division	:	Magnoliophyta
Sınıf	:	Magnoliopsida
Alt sınıf	:	Asteridae
Ordo	:	Lamiales
Aile	:	Oleacea
Cins	:	<i>Olea</i>
Tür	:	<i>Olea europaea</i> L.

1.1.3 *O. europaea*'nın Morfolojisi

Zeytin boylu bir çalı veya 10 metreye kadar boylanabilen, sık dallı, yayvan tepeli, her dem yeşil yapraklı bir ağaçtır. Geniş, kıvrımlı, yamru yumru bir gövdesi vardır. Ağaç yaşlandıkça, düzgün gri renkli gövde kabuğu giderek çatlar. Ağacın tacı (tepesi), yaklaşık olarak artan boy kadar her sene genişler. Verimli topraklarda taç açık ve asimetrik, verimsiz topraklarda ise daha yoğun ve yuvarlaktır. Sürgünleri gri renkli, dikensiz ve hemen hemen üç köşelidir.

Mızraksı, çok kısa saplı, deri gibi sert yaprakları sürgünlere karşılıklı çiftler halinde dizilmiştir. Yaprakları basit, tam kenarlı ve kenarlar alt yüze doğru hafif kıvrıktır. Yaprığın boyu 20–86 mm, genişliği de 5–17 mm'dir. Yaprakların ucunda sivri bir çıkıntı bulunur. Yaprığın üst yüzü koyu gri-yeşil ve tüysüz, alt yüzü mavimsi gümüşü renkte ve beyaz sık ipeksi tüylerle kaplıdır.

Baharın sonlarına doğru yaprakların koltuğunda seyrek salkımlar halinde açan, küçük beyazımsı-sarı renkli, kokulu çiçekleri vardır. Rüzgârların taşıdığı çiçek tozlarıyla döllenmiş çiçekler etli ve yağlı meyve verir. Meyve önce yeşil, olgunlaştıktan sonra da parlak siyah bir renk alır. Etli meyvenin içinde sert bir çekirdek vardır. Meyvenin etli kısmından ve çekirdeğinden elde edilen yağı

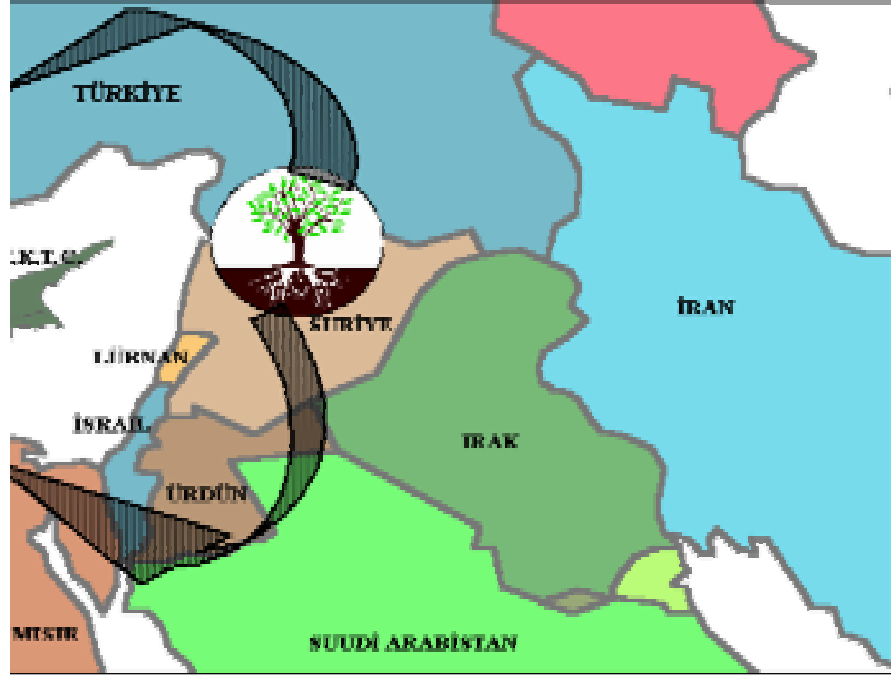
bakımından çok değerli bir ağaçtır. Aynı zamanda ağacının çok heybetli ve estetik bir görünümü vardır. Odunu çürümeye karşı son derece dayanıklıdır [4].



Şekil 1.1 Zeytin Çiçek [5] ve Meyve Genel Görünümü [6]

1.1.4 *O. europaea*'nın Dünyadaki ve Türkiye'deki Yayılışı

Oleacea familyasının bir üyesi olan zeytinin (*Olea europaea* L.) anavatanı, Güneydoğu Anadolu Bölgesi ve Suriye'yi de içine alan Yukarı Mezopotamya ve Güney Ön Asya'dır. Yayılışı iki yoldan olmuştur (Şekil 1.2). Birincisi Mısır üzerinden Tunus ve Fas'a, diğeri ise Anadolu boyunca Ege adaları, Yunanistan, İtalya ve İspanya'ya doğrudur. İlk kültüre alınışı ve ıslahı Samiler tarafından olmuştur [7-10].



Şekil 1.2 Zeytinin Anavatanı ve Yayılış Yolları [11]

1.1.5 *O. europaea*'nın Kullanım Alanları ve Ekonomik Önemi

Zeytin meyvesi çeşitli şekillerde işlenmek suretiyle tüketilir. Bu işlem, basit bir salamuraya yatırmaktan, acılığın fermantasyon yoluyla giderilmesine veya kimyasal bileşiklerle tatlandırmaya kadar uzanır [12].

İnsanlar bu bitkinin odunu ve meyvelerinin yanı sıra, yağından kozmetik sanayisinde ve tıp alanında da yüzyıllardan beri faydalanmaktadırlar. Zeytinin insan sağlığına ve beslenmesine olan öneminin yanında doğal hayata olan faydaları da dikkate alınarak zeytin yetiştiriciliğine büyük bir ivme kazandırılarak günümüze kadar gelmesi sağlanmıştır [12].

Akdeniz havzasındaki alanlardan elde edilen zeytinyağı, dünya zeytinyağı üretiminin % 90'ından fazlasını karşılamaktadır. Bu nedenle zeytin yetiştiriciliği, hala modern yaşamın sağlık ve ekonomisi için önemlidir [13].

Dünyada 37 ülkede ekonomik anlamda zeytin üretimi yapılmaktadır. 9,8 milyon hektar dünya zeytin üretim alanlarının % 95'i kuzeyde Akdeniz bölgesinde yer aldığı görülmektedir. Yaklaşık 13 milyon ton olan dünya dane zeytin üretiminin % 86'sı, altı tipik Akdeniz ülkesinde yoğunlaşmıştır. Sırasıyla, üretiminin % 26'sı İspanya, % 23'ü İtalya, % 15'i Yunanistan, % 9'u Türkiye, % 8'i Tunus ve % 5'i Fas tarafından sağlanmaktadır. Görüldüğü gibi Türkiye, ortalama 1 milyon tonu aşan dane zeytin üretimi ile dünyada üretici ülkeler arasında 4. sırada yer almaktadır [14].

Türkiye'de toplam 81 ilimizin % 45'inde (36 il) zeytin üretimine rastlanmaktadır. 595000 hektar olan Türkiye zeytin alanları, toplam tarım alanlarının % 2'sini ve bağ-bahçe alanlarının ise % 22'sini oluşturmaktadır. Zeytinliklerin yaklaşık % 75'i dağlık kır arazilerde olup ancak % 8'i sulanmaktadır. Sulanan zeytinliklerin çoğunda sofralık üretim hakimdir. 2000 yılı itibariyle 1800000 ton olan Türkiye dane zeytin üretiminin yarısından fazlası (% 55), sırasıyla Aydın (% 24), Balıkesir (% 17) ve İzmir (% 14) illerinde yapılmaktadır. Yaklaşık 98 milyon olan ağaç sayısı giderek artmaktadır [15].

1.1.6 *O. europaea*'nın Moleküler Sistematiği Üzerine Yapılan Çalışmalar

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

Geleneksel olarak *O. europaea* L. kültürleri morfolojik metotlar kullanılarak değerlendirilmiştir [16]. Zeytin kültürleri, yabani zeytin ve yakın türler arasındaki genetik akrabalıkları belirlemek için Loukas ve Krimbas (1983); Ouazzani ve ark., (1993) ve Trujillo ve ark., (1995) tarafından enzimlerle yapılan çalışmalar [17-19]; Fabbri ve ark., (1995); Mekuria ve ark., (1999); Besnard ve Berville (2000); Belaj ve ark., (2001); Besnard ve ark., (2001); Snaz-Cortes ve ark., (2001); Kockar ve Ilikeci (2003) ve Ozkaya ve ark., (2006) tarafından yapılan RAPD markırlarına dayalı

çalışmalar [20-27]; Angiolillo ve ark., (1999)'nın yaptığı AFLP [28] ve Amane ve ark., (1999-2000) ve Lumaret ve ark., (2000) tarafından çalışılan kloroplast DNA markırları [29, 30] kullanılmıştır. Son yıllarda SSR markırları da Rallo ve ark., (2000) ile Cipriani ve ark., (2002) tarafından zeytin kültürlerinin tanımlanmasında kullanılmaya başlanmıştır [31, 32].

1.2 Moleküler Markırlar

Polimorfizm, DNA'daki yer değiştirmeler, ters dönmeler, parça eksilmeleri ve parça yerleşmeleri ile meydana gelir ve genleri, onların düzenlenmelerini, biyokimyayı, gelişmeyi, morfolojiyi, davranışı etkileyeceğinden evrim sürecinde fenotipik varyasyonun da kaynağıdır [33]. Bu varyasyonları tespit amacıyla, sitolojik veriler, izoenzimler, tohum depo proteinleri gibi biyokimyasal işaretleyiciler ve Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLP), Rasgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD-PCR), Basit Dizi Tekrarları (SSR), Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi (AFLP) gibi moleküler işaretleyiciler başarıyla kullanılmaktadır [34].

Biyokimyasal teknikler arasında yer alan Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi (SDS-PAGE) bitki koleksiyonlarının genetik yapısını tanımlamadaki kolaylığı ve geçerliliği nedeniyle oldukça geniş bir kullanım alanına sahiptir. Tohum depo proteinleri tür içi ve türler arası genetik çeşitliliğin analizinde, genetik kaynakların korunması ve ıslah çalışmalarında, genom ilişkilerinin belirlenmesinde, mahsullerin geliştirilmesinde genetik işaretleyici olarak kullanılmaktadır. Elektrofrezle elde edilen tohum depo protein profilleri pek çok türün taksonomik ve evrimsel problemlerini çözmekte kullanılmaktadır. Çünkü elde edilen bant desenleri her tür için özel ve doğrudan doğruya genotipe bağlıdır [35]. Tohum depo proteinlerinin elektrofrezinin geleneksel morfolojik yaklaşımlara göre avantajı, gelişme mevsimlerinden bağımsız olması, bitkilerin yetiştirilmesine gerek olmaması, materyalin tüm yıl boyunca elde edilebilir olması, hızlı analiz edilebilmesi, saklanmasıdaki kolaylıklar ve ihtiyaç duyulan örneğin az olmasıdır [36].

Moleküler sistematik ve bitki genom haritalarının çıkartılmasında rasgele çoğaltılmış polimorfik DNA polimeraz zincir reaksiyonu (RAPD-PCR) başarıyla kullanılmaktadır [37-39]. RAPD yöntemi, tek, kısa ve rasgele oligonükleotid primerler kullanarak DNA dizilerinin çoğaltılması esasına dayanır. Bu yöntem duyarlı, hızlı ve çok sayıdaki örneğe uygulanabilen bir tekniktir. Bu primerler genetik işaretleyici olarak ve özgün nükleotid dizi bilgilerine gerek duymadan polimorfizmi belirlemede kullanılabilir [40]. RAPD yönteminin RFLP ve izozimlere göre birçok avantajları vardır. Bu yöntem yoğun laboratuvar çalışmaları ve Southern transferler, filtre hibridizasyonları, otoradyografi gibi pahalı yöntemler gerektirmez. Herhangi bir genomik kütüphane oluşturulmasına gerek duymaz. RFLP analizlerinde olduğundan çok daha az miktarda genomik DNA'ya ihtiyaç duyulur. RAPD yöntemi izozimlerden farklı olarak genom boyunca sınırsız sayıda işaretleyici elde edilmesini sağlar. Ayrıca türler arası ve tür içinde, RFLP ve izozimlerin sağladığından çok daha fazla polimorfizm belirler [41].

1.2.1 Moleküler Markırların Özellikleri

Bir moleküler markır için istenilen özellikler şu şekilde sıralanabilir [13]:

- 1- Polimorfik olmalı,
- 2- Kodominant olmalı,
- 3- Genom boyunca dağılım göstermeli,
- 4- Kolay uygulanabilir olmalı,
- 5- Kolay ve hızlı analiz edilebilmeli,
- 6- Güvenilir olmalı,
- 7- Tekrar edilebilmeli,
- 8- Çevre ve diğer lokuslardan etkilenmemeli,
- 9- Elde edilen veriler laboratuvarlar arasında kolayca değiştirilebilmelidir

1.2.2 Protein Markırlar

Proteinlerin elektroforezi makro moleküllerden sistematik veri oluşturmak için çok etkili bir tekniktir. Bu metot sistematikçiler arasında gittikçe popüler hale gelmiştir [42].

Genel olarak elektroforetik metotlar protein bilgilerinin iki temel formu, izoenzimler (izozimler) ve allozimler üzerine odaklanır. İzozimler aynı reaksiyonu katalizleyen, fakat birbirinden aminoasit dizisi, substrat afinitesi veya düzenleme özellikleri bakımından farklılık gösteren bir enzimin çoklu formlarıdır. Farklı genler tarafından kodlanan farklı moleküler formlar içerirler [43-45]. Allozimler aynı gen lokusunun farklı allelleridir. Allozimler için izozimlerin bir alt kümesidir diyebiliriz [46]. Bu proteinler şekil, büyüklük veya bu gibi faktörlerin bir kombinasyonundan dolayı jelde farklı şekilde göç ederler. Böylece her iki form da bitkilerde sistematik ve filogenetik çalışmalar için kullanılabilir [47-51].

Heterozigotlar homozigotlara göre farklı fenotipe sahiplerdir ve dolayısıyla bitkileri bir gen lokusunda homozigot ve heterozigot olarak ayırmak mümkündür. Gen sıklıkları homozigot ve heterozigotları belirleyerek hesaplanabilir ve bu hesaplamalar filogenetik amaçlar için populasyonların kıyaslanmalarında kullanılabilir [42, 52].

Elektroforezden elde edilen genetik data iki sorunun cevaplanmasında kullanılabilir: 1- Genlerin kıyaslandığı örnekler aynı gen havuzunda mı? Yoksa farklı gen havuzlarında mı? 2- Kıyaslanan bu gen havuzları birbirinden ne kadar farklı?

Farklı fenotiplere sahip normal ve anormal proteinler jelde farklı yürürler. Eğer bir protein molekülünde bir aminoasit yer değiştirmişse, bu değişim onun net yükünü etkileyeceğinden veya da konformasyonel değişime neden olabileceğinden elektroforetik hızda değişime neden olur. Belirli bir enzimi kodlayan DNA bölgesindeki bazı mutasyonlar, genellikle nokta mutasyonları bir allozim alleli ile sonuçlanabilir. Bu yeni allel ilk başta populasyonda çok düşük bir frekansta görülür.

Bu allelin evrimsel kaderi gelecek nesile geçme sıklığına ve fizyolojik performansına bağlıdır. Populasyonlarda yeni rasgele oluşan veya kaybolan alleleler bize bu populasyonların ne kadar çeşitlilik gösterdiğini belirtir [46]. Elektroforez iki proteinin kimliğinden çok bize ikisi arasındaki farklılıkları gösterir. Aynı elektroforez koşulları altında beraber hareket eden proteinler büyük olasılıkla benzerdir.

Elektroforetik metodlar moleküler büyüklük, net yük, alt ünitelerinin sayısı, alt ünitelerinin moleküler büyüklükleri, moleküler şekilleri, izoelektrik noktaları veya bu faktörlerin kombinasyonları açısından ayrılmalarını sağlar. Farklı tipte proteinlerle çalışmak için farklı elektroforetik metotlar geliştirilmiştir.

1.2.3 DNA'ya Dayalı Markırlar

DNA dizinindeki polimorfizmin belirlenebilmesi için son yıllarda RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), SSR (Simple Sequence Repeat) ve RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) gibi moleküler markır teknikleri geliştirilmiştir. Tesadüfi olarak bazı primerlerin kullanılması ile elde edilen markırlar, Rastgele oğaltılmış Polimorfik DNA'lar (RAPD) olarak isimlendirilmektedir. Bu markırlarda herhangi bir spesifik DNA dizin bilgisine ya da spesifik primerlerin sentezine ihtiyaç yoktur. Fragmentler PCR'da primer olarak kullanılan rasgele ve çok kısa DNA parçacıklarından oğaltılmaktadırlar. Böylece farklı bir lokusu temsil eden her bir PCR ürünü ile DNA düzeyindeki farklılık tahmin edilebilmektedir [53]. Ancak, yine de farklı genotiplerden gelen parçacıkların genetik akrabalığı ve genom orijini hakkında bazı şüpheler vardır. Çünkü RAPD'ler aynı zamanda dominant genetik markırlar olarak davranırlar yani, dominant RAPD markırları ile bir DNA segmentinin heterozigot veya homozigot bir lokusdan mı çoğaldığını ayırt etmek mümkün değildir. Kodominant (heterozigot) RAPD markırları, aynı lokusdan çoğalmış farklı büyüklükte DNA segmentleri olup, çok az sayıda belirlenebilmektedir

1.3 Genetik Çeşitliliğin Belirlenmesinde Kullanılan Temel Moleküler Yöntemler

1.3.1 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

Restriksiyon enzimleri çift zincirli DNA'yı kesen endonükleazlardır. Tip-II restriksiyon endonükleazlar genellikle filogenetik amaçlar için kullanılır. Restriksiyon endonükleazlarla oluşan parçaların sayısı mevcut moleküldeki tanıma bölgelerinin sayısına dayanır. Nükleotid dizilerindeki bazı değişimler restriksiyon enzimlerinin tanıma bölgelerini etkiler. Farklı sayıda tanıma bölgesinin olması farklı türleri kıyaslamak açısından oldukça kullanışlı bir bilgi oluşturur [54, 55].

Kıyaslama amacıyla, farklı organizmalara ait cpDNA (chloroplast DNA)'lar birçok restriksiyon endonükleazlarla kesilir. DNA parçaları agaroz veya poliakrilamid jel elektroforezinde büyüklük esasına göre ayrılır. Jeldeki örnekler uygun bir boyama tekniğiyle görünür hale getirilir. Genellikle jellerdeki DNA nitro-selüloz veya naylon membranlar üzerine transfer edilir. DNA parçaları, jelin alkali ortamda ısıtılmasıyla denature edilir ve nitro-selüloz kağıt üzerine transfer edilerek radyoaktif olarak işaretlenmiş DNA probunun bulunduğu solüsyona daldırılır. Parçalarla probun hibridizasyonu otoradyografi ile açığa çıkartılır [56-58].

Kodominant markırlar olarak kalıtıldıklarından RFLP kullanarak linkaj haritası oluşturmakta mümkün olabilir [59-62]. Böylece farklı türlerin kromozomlarında aynı sırada genlere sahip olup olmadıkları belirlenir. RFLP kullanarak genetik harita oluşturmak mümkündür [63, 64]. Bunun sonucunda populasyon içinde veya populasyonlar arasında oluşan varyasyonlar filogeni oluşturmak için kullanılır. Restriksiyon bölge haritaları birçok avantaja sahiptir. Bu metot oldukça sadedir ve moleküler biyolojideki diğer metotlara bakıldığında çok daha ucuzdur. İnversiyon, insersiyon, delesyon ve translokasyon gibi birçok filogenetik açıdan bilgi verici DNA yeniden organizasyonu kodlanmayan bölgelerdeki restriksiyon bölgelerinde meydana gelir [61, 65, 66].

1.3.1.1 RFLP Tekniğinin Avantajları:

- 1- Güvenilirdir. Farklı laboratuvarlarda ve farklı araştırıcılar tarafından aynı sonuçlara ulaşılabilmektedir.
- 2- RFLP markırları kodominant özellikte oldukları için heterozigotların belirlenmesinde ve karakterizasyonlarında kullanılmaktadırlar [67].
- 3- Orta düzeyde polimorfizm göstermektedirler [67].

1.3.1.2 RFLP Tekniğinin Dezavantajları:

- 1- Analizleri pahalı, fazla zaman alıcı ve çok fazla iş gücü gerektirmektedir.
- 2- Çoğú durumlarda yaygın olarak radyoaktif etiketleme yöntemi kullanılmaktadır.
- 3- Yüksek kalitede DNA'ya ihtiyaç vardır (10-20 µM).
- 4- Az kopya edilen dizilişlerin genomlarda belli noktalarda kümelenmelerinden dolayı RFLP markırları genom üzerinde rasgele dağılım göstermezler. Buda haritalamayı olumsuz yönde etkilemektedir. Çünkü haritalarda büyük boşluklar görülebilir [68].

1.3.2 AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)

Restriksiyon enzimleri ile kesilmiş DNA fragmentlerinin seçici amplifikasyonu temeline dayanır. Çoklu bantlar, tesadüfi bölgelerde DNA markırları içeren amplifikasyon reaksiyonunda oluşturulur. DNA analizleri, her örnekten 50 ile 100 bant elde edilecek şekilde sonuçlanır. AFLP analizleri ile heterozigot ve homozigot bireyler arasındaki farklılık tespit edilebilmektedir [69].

Ergül (2000)'e göre, AFLP tekniğı RAPD tekniğinin dezavantajlarını gidermek üzere geliştirilmiştir. Bu teknikte DNA önce birisi 6, diğeri 4 taban taşıyan iki kesim enzimi tarafından kesilir. Kesilen parçaların ucuna nükleotid dizilişi bilinen sentetik DNA'lar eklenir. Bu sentetik DNA'nın nükleotid dizilişini de

taşıyan başlatıcı DNA'ların kullanımı ile kısmen spesifik olan DNA çoğaltılır. Bu çoğaltma işlemi iki aşamada gerçekleşir. I: Her iki uçtan DNA kesim enzimlerinin tanıdığı diziden sonraki ilk nükleotide göre seçici çoğaltımın yapıldığı ön üretim. II: Asıl üretimde ön üretimden elde edilen parçaların kullanımı ile kesim enzimi tanıma yerinden sonraki 2. ve 3. nükleotidler için seçici üretim yapılır. Bütün başlatıcılar sentetik uçların nükleotid dizisini de taşıdığı için üretim oldukça spesifik şartlarda gerçekleşmiş olur. Üretilen parçacıklar bir baz uzunluğunun farkını dahi ayırt edebilen poliakrilamid jelde yürütülerek farklılık gösteren parçacıklar tespit edilmiş olur [70].

1.3.2.1 AFLP Tekniğinin Avantajları:

- 1- RAPD'den yavaş RFLP'den hızlıdır.
- 2- Masraf, iş gücü ve güvenilirlik açısından RAPD ve RFLP arasındadır.
- 3- Çok sayıda ve aynı anda etkili bir şekilde tarama yapması nedeni ile parmak izi analizine çok uygundur.
- 4- Sayıları RAPD ve RFLP'den daha fazladır.
- 5- Genomik DNA'nın bilinmesine gerek yoktur.
- 6- Polimorfizm oranı çok yüksektir.
- 7- Bu özelliklerinden dolayı otomasyona uygundur.

1.3.2.2 AFLP Tekniğinin Dezavantajları:

Çoğunlukla dominant markır verirler. Ancak son zamanlarda kodominant markırda verdiği bildirilmiştir.

1.3.3 SSR (Simple Sequence Repeat)

Ökaryotik genomlarda bulunan ardışık tekrarlanan 2-6 nükleotitli gruplara mikrosatellit denir. (AT)_n, (GT)_n, (ATT)_n ve (GACA)_n gibi. Burada n ardışık tekrar sayısıdır.

SSR primerlerinin üretiminde genel olarak 3 farklı yaklaşım tercih edilmektedir. Bunlar; I. Genomik DNA kütüphanelerinin SSR oligonükleotidlerinin hibridizasyonu yolu ile gözlemlenmesi, II. DNA veri bankalarında SSR'ların araştırılması, III. Akraba bitki türlerinde geliştirilmiş olan SSR'da spesifik primerlerin kullanımınıdır.

Tekrarlanan bir dizi klonlanır ve bu tekrarlanan diziyi çevreleyen nükleotidler belirlenir. Bu bölgelere uygun primerler yapılır. 11-60 bazlık tekrarlara VNTR'lar da denir. Basit dizi tekrarları kodominant markırlar olup her bir lokusta çok sayıda allel bulunur. Dizi analizi gerektirir, ancak birçok türün gen bankalarında türlerin belirlenen dizi tespitleri gün geçtikçe artmaktadır.

Bitkiler aleminde ilk çalışmalar tarla bitkileri ile olmuş; soya [71, 72], pirinç [73, 74], arpa [75] ve buğday [76] gibi bitkiler ile oldukça yakın zamanda SSR'ların karakterizasyonu bahçe bitkileri türlerinde üzüm [77] ile meşe [78], okalüptüs [79] gibi orman ağaçlarında başlamıştır.

1.3.3.1 SSR Tekniğinin Avantajları:

- 1- Oldukça polimorfiktirler. Bundan dolayı bitkilerde yüksek oranda bilgi vermektedirler.
- 2- Bitki genomunda oldukça bol olup uniform bir dağılım gösterirler.

1.3.3.2 SSR Tekniğinin Dezavantajları:

Yeni markır geliştirilmesi için genomik DNA klonlarının tekrarlanan oligonükleotid içeren problarla hibridizasyon yolu ile bulunması, nükleotid dizilerinin belirlenmesi ve yan yana tekrarlanan yapıların başlangıç ve bitiş yerlerinden özel başlatıcı DNA'lar geliştirilmesi gerekmektedir. Buda oldukça fazla iş gücü gerektiren pahalı bir işlemdir [31].

1.3.4 SSCP (Single-Strand Conformation Polymorphism)

SSCP tek zincirli DNA'nın molekül içi etkileşimi sonucu her zincirin farklı formda katlanıp kıvrılmasıyla değişik konformasyonların oluşmasına ve poliakrilamid jelde farklı hızda hareket etmesi üzerine kurulmuş bir yöntemdir.

Mutasyon içeren DNA molekülü tek baz bile farklı olsa normal dizide değişik bir yapı oluşturacağından farklı yerlerde bantlaşma gözlenmektedir. Normal ve incelenen örnek arasında fark olması mutasyonun varlığını göstermektedir.

Nokta mutasyonlarının DNA dizi analizi ile kesin olarak teşhis edilebilmesine rağmen taranacak DNA fragmenti büyüdükçe teşhis süresi ve analiz maliyeti artmaktadır. Bunu önlemek amacıyla mutasyon içeren gen, kısa DNA parçacıkları (200 bp) halinde amplifiye edilip SSCP yöntemiyle taranarak mutasyonun bulunduğu fragment belirlenir. Böylece, büyük bir genin tümünü analiz etmek yerine sadece mutasyon içeren parçanın incelenme sürecini kısalttığı gibi maliyeti de azaltmaktadır. Burada asıl amaç mutasyonun bulunduğu bölgeyi belirlemektir.

1.3.5 RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA)

RAPD tekniği, ilk defa 1990 yılında Williams ve arkadaşları tarafından uygulanan, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)'nu temel alan, rasgele seçilmiş primerlerin kullanıldığı bir metottur [38]. Aynı yıllarda Welsh ve McClelland 20

nükleotid primer geliştirdikleri benzer bir yöntemi rasgele primerli polimeraz zincir reaksiyonu, AP-PCR (Arbitrarily Primed PCR) olarak isimlendirmişlerdir [39]. Bu metotla aynı temele dayanan, ancak farklı olarak daha kısa primerlerle daha kompleks DNA parmak izi profili elde edilen bir yöntem de 1991 yılında Caetano-Anoles ve ark., tarafından DAF (DNA Amplification Fingerprinting) olarak yayınlanmıştır. Bu uygulamalarda rasgele dizili primerlerin uzunlukları, amplifikasyon şartları ve görüntüleme metodu standart PCR şartlarından farklıdır [80, 81].

RAPD amplifikasyon prosedürü, esnek koşullar altında, rasgele bir primerle başlatılan genomik bir kalıbın analizine dayalı bir PCR reaksiyonudur [38, 39]. Yöntemin temel standartları PCR'da olduğu gibidir. Ancak, kullanılan DNA kaynağı, ilgili türe ait olan genomik DNA'dır. Ayrıca PCR'dan farklı olarak RAPD tekniğinde rasgele seçilmiş 9-10 bp uzunluğunda tek bir oligonükleotid kullanılır ve bu primer düşük bağlanma sıcaklığında kalıp DNA'daki komplementer dizili bölgelere bağlanır. Bu profil, primer ile kalıp DNA arasındaki nükleotid dizisinin homolojisine bağlıdır. Elde edilen çok sayıda amplifikasyon ürünü agaroz jel elektroforezinde ayrılır ve EtBr boyaması ile UV ilüminatörde gözlenir. Kalıp DNA sonuçlarında mevcut olan ve olmayan bantlar, primer bağlanma bölgelerinin değişmesi nedeni ile açığa çıkan nükleotidler arasındaki çeşitliliği ortaya koyar. Ayrıca, primer bağlanma bölgelerinde indel (insersiyonlar ya da delesyonlar) varsa, bunların sonuçları primerin bağlanıp bağlanmama durumundan anlaşılabilir [38, 39].

RAPD primerleri genomda kendisine komplementer olan bölgelerle eşleşirler. Farklı genomlar karşılaştırıldığında, aralarında nükleotid farklılıkları varsa, primer bağlanma yeri değişebilir. Bu yüzden amplifiye edilen DNA parçalarının uzunlukları farklı olmakta ve elektroforez yapıldığında, bu polimorfiz, ilgili lokusta bantın bulunması ya da bulunmaması şeklinde ortaya çıkmaktadır. Aynı anda genomun çok sayıda farklı bölgesinde amplifikasyon olduğu için, oluşan bant kalıbından allelleri ayırmak mümkün değildir. Bu yüzden RAPD belirteçleri dominant özelliktedir [81].

RAPD tekniğinin reaksiyon koşulları son derece hassastır. Metodun güvenilirliğini ve tekrarlanabilirliğini etkileyen çok sayıda farklı parametre vardır

[38, 39, 82, 83]. Kullanılan kalıp DNA'nın konsantrasyonu en önemli değişkenlerden biridir [84-86]. Ayrıca primer konsantrasyonu [38, 87]; MgCl₂ konsantrasyonu [88, 89]; DNA polimeraz enzimi konsantrasyonu [82, 90]; bağlanma sıcaklığı [83]; erime ve bağlanma sıcaklıkları arasındaki geçiş [91] ve denaturasyon, bağlanma, uzama zamanları [92] da reaksiyon sonucunda elde edilecek ürünleri etkiler. Bu parametrelerin çoğu birbirine bağlı olduğu için RAPD tekniğinin optimizasyonu oldukça zordur. Bu yüzden, bir bandın varlığı ancak kesin olarak belirlendikten sonra karşılaştırmada kullanılmalıdır [39].

1.3.5.1 RAPD Tekniğinin Avantajları ve Dezavantajları

RAPD yönteminin avantajlarını şöyle sıralayabiliriz:

1. RAPD yönteminin en önemli avantajı, araştırılacak taksonun genomik DNA dizisi ile ilgili herhangi bir ön bilgi gerektirmemesidir [38, 39, 81, 93].
2. Amplifikasyonda tek bir primer seti kullanılır ve bu oligonükleotid, özgün bölgelere rasgele bağlanarak çoğaltma yapar [38, 39, 93]. Kullanılan primerler, bütün türler için kullanılabilen evrensel primer setleridir.
3. Çoğalacak DNA, primer ile kalıp DNA arasındaki nükleotid dizinin homolojisine bağlıdır. Genomun kompleks yapısından çok fazla etkilenmez.
4. Bu yöntem sayesinde tek bir primerle dahi farklı organizmaların karşılaştırılması mümkündür.
5. Kullanılan primer sayısı arttırıldıkça elde edilen bant sayısı da artacağından, yakın türleri ayırma konusunda birçok yöntemden daha duyarlıdır.
6. RAPD tekniği, uygulanabilirliği nedeni ile pek çok örnekte karakterize edilebilir. Ayrıca radyoaktiviteye ve DNA hibridizasyonuna gerek duyulmamaktadır.
7. Kullanımı hızlı ve kolaydır. Kullanılan teçhizat ve malzemeler, diğer tekniklere göre daha ucuzdur [40, 94].
8. Otomasyona açık bir tekniktir.
9. Diğer yöntemlere göre reaksiyon başına daha az miktarda kalıp DNA gerektirir (10-25 ng) [40, 95, 96].

10. Polimorfizm derecesi oldukça yüksektir [95, 97].

11. DNA'ya dayalı bir markır sistemi olduğu için, çevresel varyasyonlardan, morfolojik ve izozim markırlardan doğan problemleri ortadan kaldırmaktadır [38, 98].

RAPD yönteminin en önemli dezavantajı, belirteçlerinin dominant olması sebebiyle heterozigotları teşhis etmenin zor olmasıdır. Reaksiyon birçok hassas değişkenle birbirine bağlı olduğu için, elde edilen verilerin tekrarlanabilirliği düşüktür [83, 99].

1.3.5.2 RAPD Tekniğinin Uygulama Alanları

RAPD tekniği sadeliği, kullanılabilirliği ve getirdiği diğer pek çok avantaj nedeniyle büyük ilgi görmüş ve çok sayıda araştırmacı grup tarafından kullanılmaya başlanmıştır. RAPD yöntemi, polimorfizm sayısının sınırsızlığı nedeni ile çok sayıda karakterin belirlenmesine olanak sağlamaktadır. RAPD belirteçleri; genetik haritaların yapımı, populasyon yapısının genetik analizi, bireylerin parmak izi, ayırt edici özelliklerin haritasının yapımı, genomun özel bölgesi için hedef belirteç belirlemesi gibi değişik alanlarda başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Aynı zamanda, ekoloji ve populasyon biyolojisinde de yaygın kullanım alanı bulmaktadır [82].

RAPD metodu prokaryotik ve ökaryotik türler gibi pek çok farklı yapının DNA parmak izini belirlemek amacıyla yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Belirlenen parmak izleri, genotipin belirlenmesi, genom yapısının araştırılması, prenatal tanı, ebeveyn belirlenmesi, kültür ve ırk belirlenmesi, adli tıp, klinik tanı, evrimsel sorunlar, populasyon biyolojisi, salgınlar ve ekoloji gibi alanlarda yoğun bir şekilde kullanılmaktadır [82]. Ayrıca bu yöntem, klinik mikrobiyolojide, özellikle ayırt edilmesi çok zor olan alt türlerin belirlenmesinde kullanılır.

RAPD metodunun bitkiler için son derece geniş bir kullanım alanı vardır. Botanikte, pek çok tür için bilgi verici sistemlere gereksinim duyulduğundan,

özellikle genetik varyasyon çalışmalarında başvurulan bir yöntemdir [82]. Türlerin genetik haritalarının hazırlanmasında bazen tek başına, bazen de RFLP, AFLP ve mikrosatellit gibi diğer tekniklerle birlikte kullanılmaktadır [100].

1.4 Filogenetik Sistematik

Taksonomi yeni taksonların tanımlanması, adlandırılması ve organizmaların uygun bir sınıflandırma sistemi içerisinde düzenlenmesi gibi bir dizi alanı kapsar [101-103]. Sistematik, biyolojik çeşitliliği sınıflandırmakla yetinmez “neden” ve “nasıl” sorularını cevaplayabilmek için organizmaların evrimi, özellikle türleşme olgusunu teorik ve pratik yönleri ile ele alır. Bu yönüyle sistematik taksonomiye de içine alan bir alandır. İlk defa Willi Hennig (1950) tarafından formüle edilen Filogenetik Sistematik taksonomiye filogenetik yönüyle inceleyen alandır.

Bir takson ya da takson grubunun filogenilerinin belirlenmesi demek, zamansal olarak (önce-sonra) onların birbiri ile ve diğer taksonlarla ortak ata temelinde durumlarının ortaya konması demektir.

Günümüzde filogeninin taksonomi açısından zorunluluğu hemen hemen tüm sistematikçilerce kabul edilmektedir.

1.5 Çalışmanın Kapsamı, Amacı ve Önemi

Özkaya ve arkadaşları (2004) Anadolu'da yetiştiriciliği yapılan birçok zeytin (*Olea europaea* L.) kültivarı bulunduğu halde bunların morfolojik ve biyolojik özelliklerinin henüz tam olarak belirlenmediğini ifade etmektedir. Bunlardan çok az bir kısmının özellikleri belirlenmiş olduğu halde, bunların da içlerinde genotipik veya fenotipik nedenlere bağlı varyasyonların olduğu gözlenmektedir [104]. Moleküler markırlar kullanılarak zeytin kültivarlarının tanımlanması çalışmaları 1995 yılında başlamıştır. Akdeniz Bölgesinden alınan 17 yağlık ve sofralık zeytin

kültürü RAPD markırları kullanılarak taranmıştır. Elde edilen sonuçlar zeytin genomunun oldukça polimorfik olduğunu göstermiştir. Bu çalışmaya göre zeytin kültürleri iki ana gruba ayrılmıştır. İlk grup, başta yağ üretimi için yetiştirilen küçük meyveli kültürlerin, ikinci grup ise, büyük meyveli kültürlerin bulunduğu gruptur. Ancak, zeytin kültürlerinin bu gruplandırılmasında onların coğrafik orijinleri göz önüne alınmamıştır [20].

Bu çalışma RAPD-PCR tekniği ile Marmara Bölgesinde yetiştirilmekte olan zeytin kültürlerinin genetik farklılıklarının belirlenmesi amacıyla yapılmıştır. Çalışmada Edremit Zeytincilik Üretim İstasyonu'nun zeytin bahçesinden temin edilen 12 zeytin kültürü (Samanlı, Edincik su, Vedral, Domat, Manzanilla, Gordales, Verdial, Karamürselsu, Ascolana, Hermandos, Gemlik ve Arbequina) kullanılmıştır.

2. MATERYAL VE METOT

2.1 Kullanılan Cam Malzeme ve Plastik Malzemelerin Hazırlanması

Bu çalışmada kullanılan pipet uçları, ependorf tüpleri, PCR tüpleri, çözeltiler, cam malzemeler ve ısıya dayanıklı diğer malzemeler çalışmaya başlamadan önce 121 °C de 20 dakika süreyle 1 atmosfer basınçta otoklavlanarak sterilize edildi.

2.2 Bitki Materyalinin Toplanması ve Saklanması

Bu çalışmanın materyalini oluşturan, zeytin (*Olea europaea* L.) yaprak örnekleri Edremit Zeytincilik Üretim İstasyonu'nun zeytin bahçesinden temin edildi. Bu çalışmada 12 farklı zeytin kültürüne ait yaprak örnekleri DNA izole etmek üzere kuru buz içerisinde bölgeden getirilip, izolasyon yapılana kadar -80 °C de buzdolabında muhafaza edildi. Kullanılan zeytin kültürleri ve örnek toplama zamanı Çizelge 2.1'de verilmektedir.

Çizelge 2.1 Zeytin Kültivarları ve Toplanma Zamanları

Zeytin Kültivarları	Toplanma Zamanı
Samanlı	13.07.2005
Edincik su	13.07.2005
Vegral	13.07.2005
Domat	13.07.2005
Manzanilla	13.07.2005
Arbequina	13.07.2005
Gordales	13.07.2005
Karamürsel su	13.07.2005
Ascolana	13.07.2005
Hermandos	13.07.2005
Gemlik	13.07.2005
Verdial	13.07.2005

2.3 Genomik DNA İzolasyonu

Genomik DNA izolasyonu yöntemi olarak Qiagen firması tarafından üretilen DNeasy Plant Mini Kit (Katalog No: 69104) seçildi ve izolasyon işlemi sırasında kitle verilen protokol takip edildi. Bu protokole göre genomik DNA izolasyonu aşağıdaki şekilde yapıldı.

1- -80 °C buzdolabından çıkarılan yaprak örneklerinden 100 mg tartılarak erimesine izin verilmeksizin havan içerisinde sıvı azotla toz haline gelinceye kadar ezildi ve 1.5 ml'lik ependorf tüpe aktarıldı.

2- Sıvı azot uçar uçmaz üzerine 400 µl buffer AP1 ve 4 µl RNase A (100 mg/ µl) eklendi ve sertçe vorteks yapıldı.

- 3- Tüp 65 °C' de 10 dk inkübe edildi. İnkübasyon esnasında tüp 2-3 kez alt üst edildi.
- 4- 130 µl buffer AP2 eklendi ve 5 dk buz üzerinde bekletildi. Daha sonra 14000 rpm'de 5 dk santrifüj yapıldı.
- 5- Santrifüj sonrası çöken pellete dokunmadan temiz lizat spin kolona aktarıldı. Spin kolon 2 dk 14000 rpm'de santrifüj edildi.
- 6- Santrifüj sonrası spin kolondan alt kısma inen süpernatant yine pellete değmeden yeni bir ependorfa aktarıldı ve miktarı belirlendi.
- 7- Süpernatantın 1.5 katı buffer AP3/E eklendive yavaşça pipetaj yapıldı.
- 8- Süpernatantın presipitasyon içermeyen kısmından 650 µl alınarak mini spin kolona aktarıldı. 8000 rpm'de 1 dk santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrası toplama kabına inen süzüntü atıldı.
- 9- Süpernatantın kalan kısmı aynı spin kolona kondu ve 8000 rpm'de 1 dk santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrası toplama kabı atıldı.
- 10- Spin kolon yeni bir 2 ml'lik koleksiyon tüpüne kondu. Daha sonra kolonun içerisine 500 µl buffer AW eklendi ve 8000 rpm'de 1 dk santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrası süzüntü atıldı.
- 11- Spin kolon içerisine tekrar 500 µl buffer AW eklendi ve 14000 rpm'de 2 dk santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrası kolon toplama kabından ayrıldı ve yeni bir 1.5 ml'lik ependorf içerisine kondu.
- 12- Kolon içerisine 100 µl buffer AE eklendi ve 5 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra 8000 rpm'de 1 dk santrifüj sonrası DNA kolondan ayrıldı.

İzole edilen genomik DNA, kullanılacağı zamana kadar -20 °C'de muhafaza edildi.

2.4 Agaroz Jel Elektrofözezi

İzole edilen genomik DNA'ların gözlenmesi için % 0,8'lik agaroz jel elektrofözezi yapıldı. Bunun için 0,4 gr agaroz tartıldı ve 50 ml 0,5 X TBE tamponu içinde, mikrodalga fırında kaynatılarak çözüldü. Karışım 60 °C'ye soğutularak içerisine 2 µl EtBr (Etidyum Bromid) ilave edildi. Önceden tarakları yerleştirilmiş

jel kasetine döküldü ve polimerleşmesi beklendi. Jel polimerleştikten sonra kasetten taraklar çekilerek çıkartıldı. Hazırlanan jel elektroforez tankına yerleştirilip üzeri kaplanıncaya kadar 0.5 X TBE tamponu ile dolduruldu (Çizelge 2.2).

5 µl gDNA ve 3 µl yükleme boyası karıştırılarak jelde oluşturulan kuyucuklara otomatik pipet yardımı ile yüklendi. İlk kuyucuğa moleküler büyüklüğü belli olan bir DNA standardı yüklendi. Örnekler 100 voltta yaklaşık 1 saat yürütüldü. Elektroforez sonucunda oluşan bantlar UV trasillüminatörde gözlendi ve fotoğrafları çekildi.

Çizelge 2.2 Agaroz Jel Elektroforezinde Kullanılan Çözeltiler ve Özellikleri

Çözelti	Kompozisyonu (1L için)
TBE (5X)	54 gr Tris-Base 27,5 gr Borik Asit 20 ml 0,5 M EDTA (pH:8)
Yükleme boyası	0,05 bromfenol blue 1 ml distile su 1 ml gliserol 1ml 0,5 M EDTA (pH:8)
DNA standardı	DNA molecular weight marker III (0.12-21.2 kbp) Roche (Katalog No: 10528552001)

2.5 DNA Miktar Tayini

İzole edilen genomik DNA örneklerinin UV spektrometrede 260 nm ve 280 nm dalga boyundaki absorpsiyon değerleri ölçülmüştür. Ölçüm işlemi kuvars küvetlerle yapılmıştır. Spektrometrik sonuçlara göre çift zincirli DNA molekülünün miktar tayini, aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\text{CDNA} = \text{OD (Absorbans değeri)} \times 50 \times \text{seyreltme katsayısı}$$

DNA'nın saflığı ise, OD260/OD280 oranı ile hesaplanmıştır. Saf DNA için bu değer 1,8'dir.

2.6 RAPD-PCR Primerlerinin Seçimi ve Sulandırılması

RAPD-PCR reaksiyonlarında kullanılan primerler Integrated DNA Technologies (A.B.D.) firmasından temin edildi. Primerler laboratuara gelir gelmez veya -20 °C buzdolabından çıkarıldıktan sonra yaklaşık 15 sn 12000 rpm'de sentrifüj yapılarak kuru çökeltinin tüpün dibinde toplanması sağlandı ve 1 ml dH₂O içerisinde çözülerek stok hazırlandı. Her bir primerin son konsantrasyonu 50 nmol olacak şekilde sulandırıldı. Çalışmada kullanılan primerlerin DNA dizileri, erime sıcaklıkları (T_m) ve % GC oranları Çizelge 2.3'de verilmektedir.

Çizelge 2.3 RAPD-PCR Reaksiyonunda Kullanılan Primerler ve T_m Değerleri

Primer	DNA dizileri	T _m	% GC
OPC-01	TTC GAG CCA G	34 °C	% 60
OPC-02	GTG AGG CGT C	37 °C	% 70
OPC-11	AAA GCT GCG G	36 °C	% 60
OPA-10	GTG ATC GCA G	33 °C	% 60
OPA-12	TCG GCG ATA G	34 °C	% 60
OPA-13	CAG CAC CCA C	37 °C	% 70
OPB-12	CCT TGA CGC A	35 °C	% 60

2.7 PCR Koşullarının Optimizasyonu

Genomik DNA'nın kısa oligonükleotid primerler kullanılarak amplifikasyonu, amplifikasyon protokolü ve reaksiyon koşullarına karşı duyarlıdır. Hedef DNA'nın konsantrasyonu, primer, Mg^{+2} , DNA polimeraz miktarı, DNA kalitesi ile "yapışma-annealing" sıcaklığı gibi termalcyclus parametreleri DNA amplifikasyonunu etkiler. Bundan dolayı kritik parametreler RAPD çalışmaları için başlamadan önce optimize edilmelidir.

Çalışmada, RAPD-PCR reaksiyonlarının PCR Master Mix Kit ile gerçekleştirilmesi PCR optimizasyonunun yapılığını sınırlamıştır. Yani; Mg^{+2} , DNA polimeraz miktarı gibi parametreler üzerinde değişiklikler yapılmasına olanak tanımamıştır. Bunun dışındaki parametreler ise PCR amplifikasyonunu arttıracak şekilde optimize edildi.

2.8 RAPD-PCR Reaksiyonları

Çalışmada Williams ve ark. tarafından geliştirilen RAPD-PCR yöntemi kullanıldı [38]. Bitkiden izole edilen saf genomik DNA kullanılarak yapılan RAPD-PCR reaksiyonları toplam hacim 25 μ l olacak şekilde düzenlendi.

PCR reaksiyonlarını gerçekleştirmek için Gene Mark firmasına ait PCR Master Mix Kit (Katalog No: RP02) kullanıldı. Kitin içeriğinde 1.25 u Taq DNA polimeraz, reaksiyon tamponu, $MgCl_2$ (final konsantrasyonu 1.75 mM), 200 μ M dNTP bulunmaktadır.

Çizelge 2.4 RAPD-PCR Şartları

Tampon MgCl ₂ dNTP Taq Polimeraz	5 µl (5 X PCR Master Mix Kit)
Primer	1 µl
gDNA	2.5 µl
Distile su	16.5 µl

Çizelge 2.5 PCR Döngü Koşulları

Ön ısıtma	94 °C	5 dk	1 devir
1. basamak	94 °C	45 sn	35 devir
2. basamak	37 °C	45 sn	
3. basamak	72 °C	2 dk	
4. basamak	72 °C	10 dk	1 devir
5. basamak	4 °C	25 sa	

RAPD-PCR koşullarının tekrarlanabilirliğini kontrol etmek amacıyla, örneklere ait amplifikasyonlar birbirinden bağımsız olarak üç kez tekrar edildi. Uygulamada olası bir DNA kontaminasyonunu belirlemek amacıyla, her uygulamada genomik DNA içermeyen negatif kontrol kullanıldı. Bant büyüklüklerinin belirlenmesi amacıyla, her kültüvare ait elektroforez işlemlerinde moleküler büyüklüğü bilinen bir DNA standardı kullanıldı.

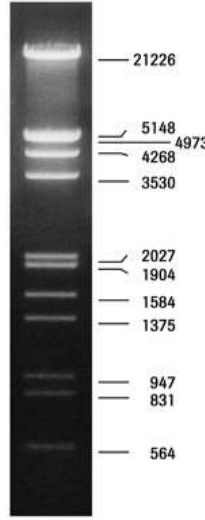
2.9 Agaroz Jel Elektroforezi ve Fotoğraflama

RAPD-PCR sonucunda oluşan bantların gözlenmesi için % 0,8'lik agaroz jel elektroforezi yapıldı. Bunun için 0,4 gr agaroz tartıldı ve 50 ml 0,5 X TBE taponu içinde, mikrodalga fırında kaynatılarak çözüldü. Karışım 60 °C'ye soğutularak içerisine 2 µl EtBr ilave edildi. Önceden tarakları yerleştirilmiş jel kasetine döküldü ve polimerleşmesi beklendi. Jel polimerleştikten sonra kasetten taraklar çekilerek çıkartıldı. Hazırlanan jel elektroforez tankına yerleştirilip üzeri kaplanıncaya kadar 0.5 X TBE tamponu ile dolduruldu.

20 µl örnek için 4 µl yükleme boyası karıştırılarak jelde oluşturulan kuyucuklara otomatik pipet yardımı ile yüklendi. İlk kuyucuğa moleküler büyüklüğü belli olan bir DNA standardı yüklendi. Örnekler 100 voltta yaklaşık 1,5 saat yürütüldü.

Yürütme tamamlandıktan sonra DNA bantları UV translimünatörü altında gözlenerek RAPD profillerinin fotoğraflanması ile sonuçların alınması sağlandı. Fotoğraf çekimleri görüntüleme sisteminde (UVP GelDoc-It Imaging System) gerçekleştirildi.

RAPD bantlarının büyüklüklerini belirlemek için 13 fragment içeren (DNA molecular weight marker III) DNA markırı kullanıldı (Şekil 2.1). Bu fragmentler 564-21226 baz çifti arasındadır. Bu markır jelde yürütüldüğünde yukarıdan aşağıya doğru sırasıyla; 21226, 5148, 4973, 4268, 3530, 2027, 1904, 1584, 1375, 947, 831, 564 ve 125 baz çifti (bp) verecek şekilde fragmentlere ayrılmaktadır. Amplifikasyon sonucu oluşan RAPD bantlarının büyüklükleri DNA markırlarındaki bantların büyüklükleri ile kıyaslanarak yapıldı.



Şekil 2.1 RAPD Bant Profillerini Belirlemede Kullanılan “DNA molecular weight marker III” DNA Markırı (Roche)

2.10 Verilerin Toplanması ve Analizi

RAPD-PCR sonucunda elde edilen verilerin analizi filogenetik analiz programı olan PAUP* (Phylogenetic Analysis Using Parsimony and Other Methods) Version 4.0b10 kullanılarak yapıldı.

RAPD markırlarından elde edilen veri seti ile zeytin kültürlerinin filogenetik analizi (genetik akrabalıkları) esnasında Parsimoni ve Genetik Uzaklık (minimum evrim) kriterleri kullanıldı. Analiz için Parsimoni kriteri seçilerek, Branch-and-Bound araştırmasında varsayılan parametreler kullanıldı. Ayrıca ağaç dallarının güvenilirliği için istatistiksel destek amacıyla Bootstrap analizi de yapıldı. Diğer bir kriter olan UPGMA (Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages) analizi için ise “minimum evrim” parametreleri kullanılarak taksonların genetik uzaklıkları hesaplandı ve tabloya dönüştürüldü. Konuyla ilgili bilginin devamı “Sonuç ve Tartışma” kısmında verilmiştir.

3. BULGULAR

3.1 Genomik DNA (gDNA)

Bu çalışmada DNA izolasyonu Qiagen firması tarafından üretilen DNeasy Plant Mini Kit kullanılarak yapıldı. İzolasyon sonucunda elde edilen gDNA'ların saflığı ve miktarı Çizelge 3.1'de gösterilmektedir.

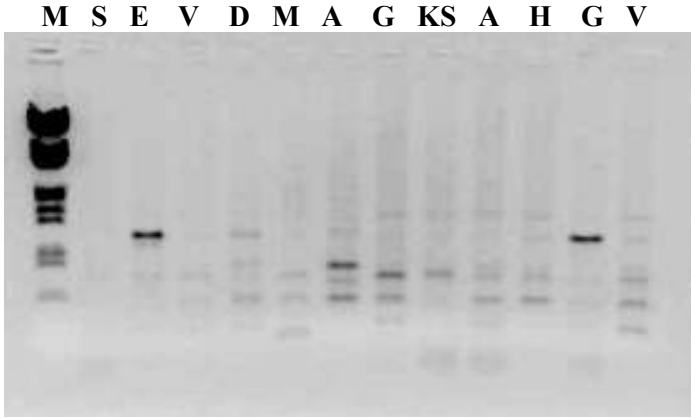
Çizelge 3.1 gDNA'ların Saflığı ve Miktarı

Zeytin kültivarları	gDNA'ların Saflığı	gDNA'ların Miktarı
Samanlı	2	24 ng/ µl
Edincik su	1,8	18 ng/ µl
Vegral	1,5	24 ng/ µl
Domat	1,5	18 ng/ µl
Manzanilla	1,8	30 ng/ µl
Arbequina	2	58 ng/ µl
Gordales	1,5	18 ng/ µl
Karamürsel su	2	16 ng/ µl
Ascolana	1,8	30 ng/ µl
Hemandos	1,8	26 ng/ µl
Gemlik	1,4	14 ng/ µl
Verdial	2	26 ng/ µl

3.2 RAPD Profilleri

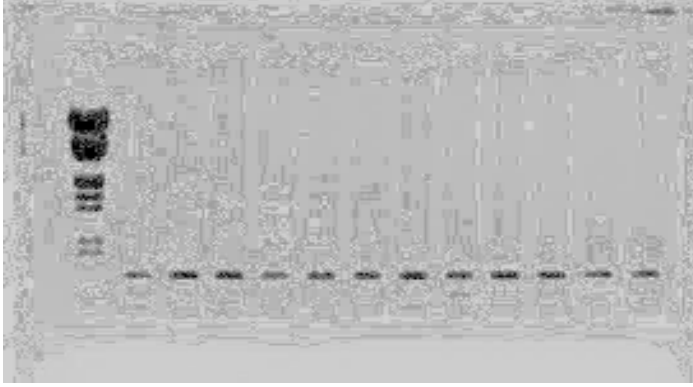
Balıkesir Edremit Zeytincilik Üretim İstasyonu'nun zeytin bahçesinden toplanan zeytin kültürlerinden ve yine aynı istasyondan alınan ve dış grup olarak seçilen delice adı verilen aşılammamış zeytin ağacı yaprak örneklerinden genomik DNA izolasyonları yapıldı. Analiz için 10 baz uzunluğunda 7 adet primerden gerçekleştirilen RAPD-PCR sonucunda elde edilen amplifikasyon ürünleri değerlendirmeye tabii tutuldu ve hepsinin tekrarlanabilir ve güvenilir PCR ürünleri verdiği tespit edildi. Elde edilen amplifikasyon ürünleri % 0,8'lik agaroz jel elektroforezinde yürütüldü. Sonuçlar UV ilüminatörde incelenerek fotoğrafları çekildi.

RAPD-PCR analizi sonucunda elde edilen amplifikasyon ürünleri sırasıyla Şekil 3.1 (OPC-01 primeri), Şekil 3.2 (OPA-10 primeri), Şekil 3.3 (OPA-12 primeri), Şekil 3.4 (OPC-11 primeri), Şekil 3.5 (OPC-02 ve OPA-13 primeri), Şekil 3.6 (OPB-12 primeri) ve Şekil 3.7 (Delice RAPD-PCR)' de gösterilmektedir.



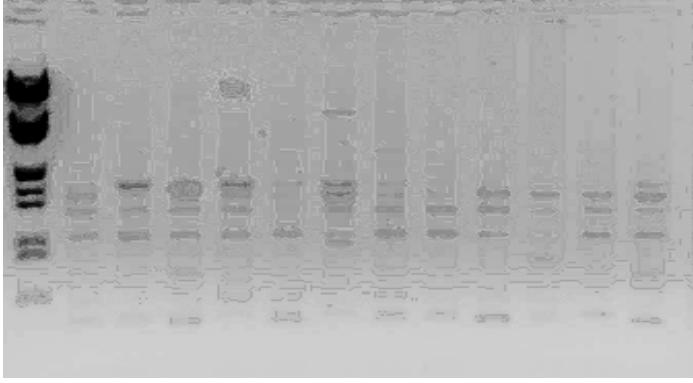
Şekil 3.1 OPC-01 RAPD-PCR Elektroforez Görüntüsü

M S E V D M A G K S A H G V



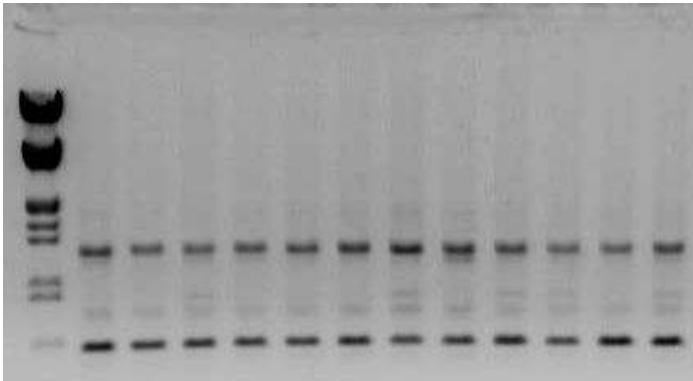
Şekil 3.2 OPA-10 RAPD-PCR Elektrofrez Görüntüsü

M S E V D M A G K S A H G V



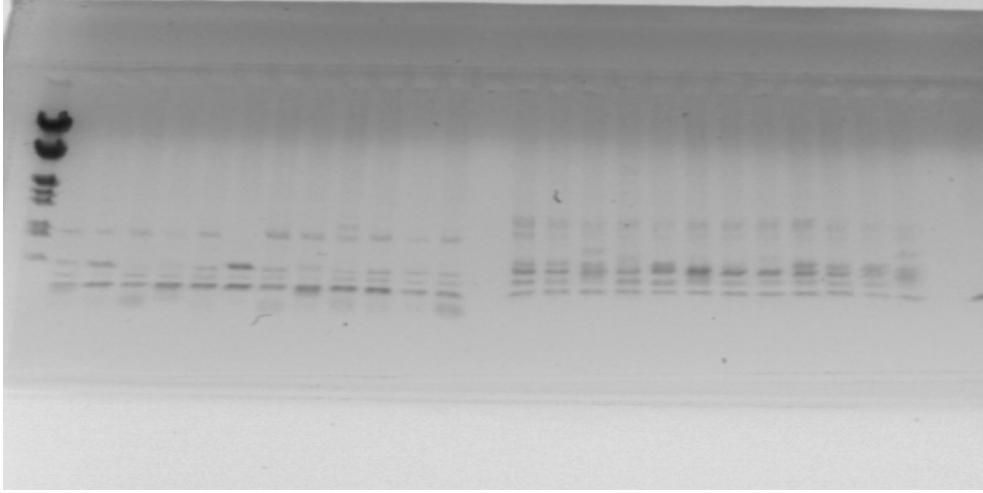
Şekil 3.3 OPA-12 RAPD-PCR Elektrofrez Görüntüsü

M S E V D M A G K S A H G V



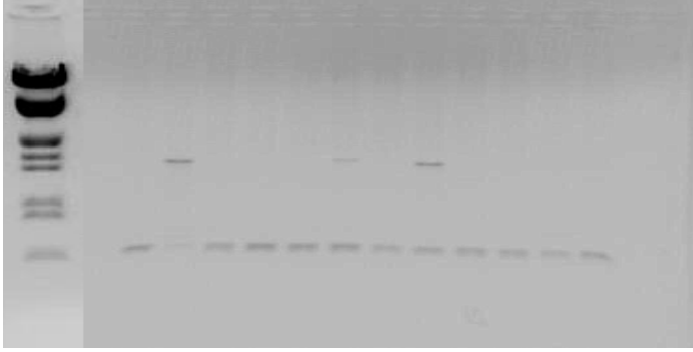
Şekil 3.4 OPC-11 RAPD-PCR Elektrofrez Görüntüsü

M S E V D M A G K S A H G V S E V D M A G K S A H G V

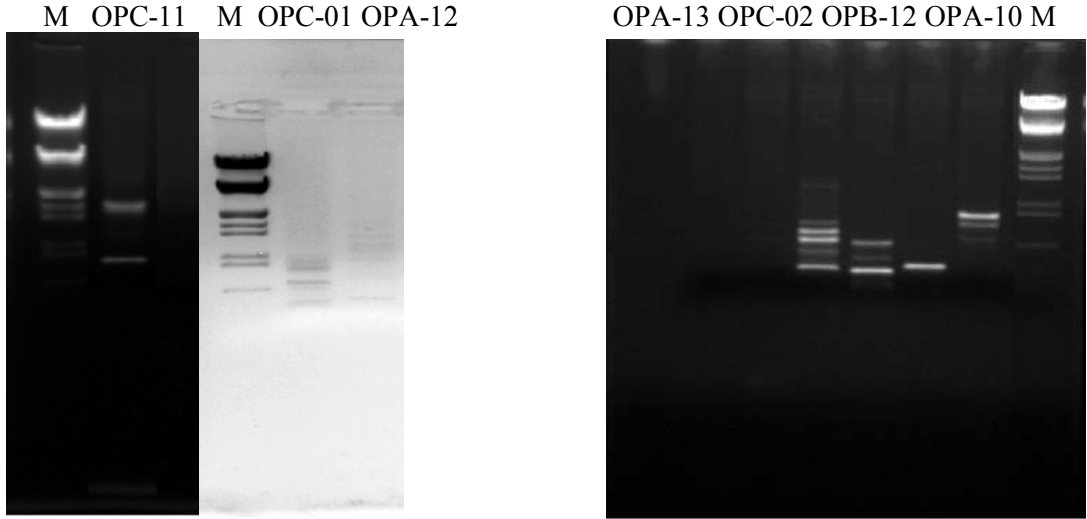


Şekil 3.5 OPC-02 ve OPA-13 RAPD-PCR Elektroforez Görüntüsü

M S E V D M A G K S A H G V



Şekil 3.6 OPB-12 RAPD-PCR Elektroforez Görüntüsü



Şekil 3.7 Delice (Dış Grup) RAPD-PCR

3.3 Verilerin Analizi ve Değerlendirilmesi

RAPD-PCR sonuçlarının analizinde, sonuçların değerlendirilmesi çekilen fotoğraflar üzerinde yapıldı. Amplifikasyon sonucunda oluşan bantların okunmasında sadece kuvvetli bantlar değerlendirmeye alındı. Veriler oluşturulurken, bantların varlığı (1), yokluğu ise (0) ile belirtildi. Elde edilen veri matrisi Şekil 3.8’ de görülmektedir. Veri matrisi bilgisayar ortamına aktarıldıktan sonra PAUP* Version 4.0b10 programı kullanılarak analizler gerçekleştirildi.

Analiz için toplam 7 primer değerlendirildi ve 84 karakter elde edildi. Kullanılan her bir primer bize 12 karakter verdi. Veri matrisine bakıldığında bütün kültürlerde 1 ile 12 arası karakterler OPA-10 primerinden, 13 ile 24 arası OPA-12, 25 ile 36 arası OPA-13, 37 ile 48 arası OPC-02, 49 ile 60 arası OPC-01, 61 ile 72 arası OPC-11 ve 73 ile 84 arası karakterler OPB-12 primerinden elde edilen karakterleri göstermektedir.

DELICE

0000001110000001110000000000100111110000000001110000001110001000010000000000000001

SAMANLI

00000000110000011100000000000111000100000010011100000000000000010010100000000001000

EDINCIK SU

000000001100010011000000000001100001000000100111000010010000000010010100001000010000

VEGRAL

000000001100010111000000000001100101000000100011000000010000000010110100000000001000

DOMAT

000000001100010111000000000001100010000000000011000010100100000010010100000000001000

MANZANILLA

010101001100000001000000000001100001000000100111000000010100010010010100000000001000

ARBEGUINA

000000001100010100100000000001110010000000000111000010110100010010010100001000001000

GORDALES

000000001100000011000000000001110010000000100111010000010100010010110100000000001000

KARAMURSEL SU

000000001100000011000000000001110010000000100111010000010000010010010100001000001000

ASCOLANA

000000001100000111000000000001100001000001100111010000010100000010110100000000001000

HERMANDOS

000000001100000101010000000001100001000000100111010001010100000010110100000000001000

GEMLIK

000000001100000111000000000001100001000000000111000001000000000010110100000000001000

VERDIAL

000000001100010111000000000001100101000000100111010001010100000010110100000000001000

Şekil 3.8 RAPD-PCR Analizinde Kullanılan Veri Matrisi

4. SONUÇ ve TARTIŞMA

RAPD markırlarından elde edilen veri seti ile zeytin kùltivarlarının filogenetik analizi (genetik akrabalıkları) PAUP* (Phylogenetic Analysis Using Parsimony and Other Methods) 4.0b10 (Swofford, 2002) programı kullanılarak yapıldı. Analiz esnasında Parsimoni ve Genetik Uzaklık (minimum evrim) kriterleri kullanıldı.

Parsimoni kriteri, olası birçok filogenetik ağaç arasından hangi dallanma modelinin en kısa ve tutarlı olduğunu (en doğru biçimde yansıttığını) ifade eden bir yaklaşımdır. Parsimoniye göre tercih edilen ağaç, açığa çıkmış olan evrimsel değişimin toplam miktarını en aza indirgeyen ağaçtır. Genetik uzaklık kriteri ise, aynı karakterler matrisinin (morfolojik özelliğın varlığı veya yokluğu ya da bir genin homolog bir bölgesinden bir nükleotidin kimliği gibi) bir uzaklık tablosuna dönüştürerek filogenetik ağaç oluşturmada kullanılır. Her bir ağaç bir filogenetik hipotezi ifade eder.

Bunun yanı sıra taksonları kümeleyen çeşitli, ilave analizler de kullanılır; yani benzer topolojiye sahip ağaçlar arasından biri belirli kriterlere göre, diğer/diğerlerine göre daha tutarlı ve taksonların gerçek genetik tarihini yansıtan bir hipotez olduğu düşüncesine dayalıdır. Bu analizlerde bizimde kullandığımız UPGMA (Sneath and Sokal, 1973) (Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages) Tartmadan İkili Grup Oluşturma Analizi bir takson için uzaklık matrisini gözden geçirirken, en küçük uzaklık matrisini baz alır [105]. Neighbour -Joining Analizi de (Saitou and Nei, 1987) içerik olarak UPGMA kümeleme analiziyle benzer şekilde fakat başka bir genetik uzaklık mantığına (algoritmasına) dayalıdır. Ancak, bu metot ağaçların oluşturulmasında benzer verilere sahip taksonların komşu olmasına ve diğer taksonlardan ayrılmasına sonunda da komşuların birbirleriyle birleştirilmesi esasına dayanır.

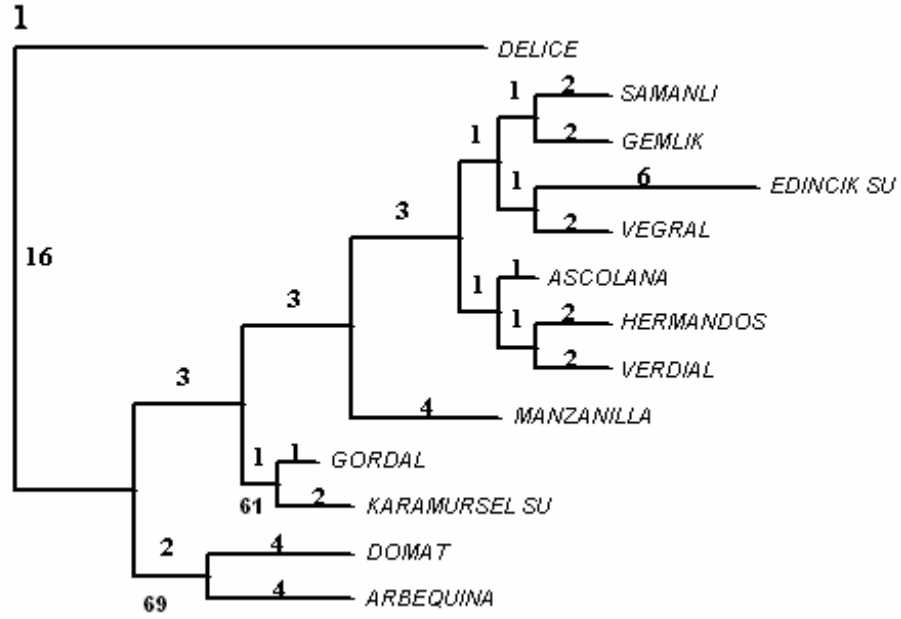
Kullanılan kriterlerin yanı sıra en uygun filogenetik ağacın bulunması için de değişik algoritmeler kullanıldı. Bunlardan Branch-and-Bound algoritması, optimizasyonları birbirine çok yakın olan ağaç topolojileri arasından gerçeği en doğru yansıtan dallanmayı bulmaya çalışır. Türkçe karşılığı kesin metot anlamına gelen Exhaustive algoritması da köksüz olan ağaçların hepsini değerlendirmeye alır ve sonuçta kesin olan ağaç topolojisini verir, ancak burada kullanılan takson sayısı bu araştırma algoritmasının sınırlarının üzerinde olduğu için yerine Branch-and-Bound algoritması kullanılmıştır.

Bootstrap (Felsenstein, 1985) araştırması elde edilen ağaçların dallarının parsimoni kriterini kullanarak istatistiksel yönden en güvenilir olan dalları belirlemede kullanılır[106]. Burada veri setinden bazı replikasyonlar üretilerek her bir dalın yüzdelik olarak ne oranda desteklendiğini gösterir. Bootstrap değeri % 0 ile % 100 arasında değişir. Kress ve arkadaşlarının karakterize ettiği bootstrap destek değerlerine göre, > % 85 çok güçlü, % 70-85 arası güçlü, %50-70 arası zayıf ve < % 50 çok zayıf şeklinde tanımlanmıştır [107]. Bootstrap desteğinin % 70 ya da daha büyük oluşu genellikle doğru filogeninin tanımlanması ile ilişkilendirilir. Eğer, belli bir dal için bootstrap desteği % 50'nin altında ise; araştırmacı ağacın bu kısmındaki dallanma modelini belirleyemediği veya aradaki ilişkinin tam netleştirilemediği sonucuna varacak ve bunun sonucunda yayınladığı ağaçta, bu dalı tek düğümden çok çatallı olarak verecektir.

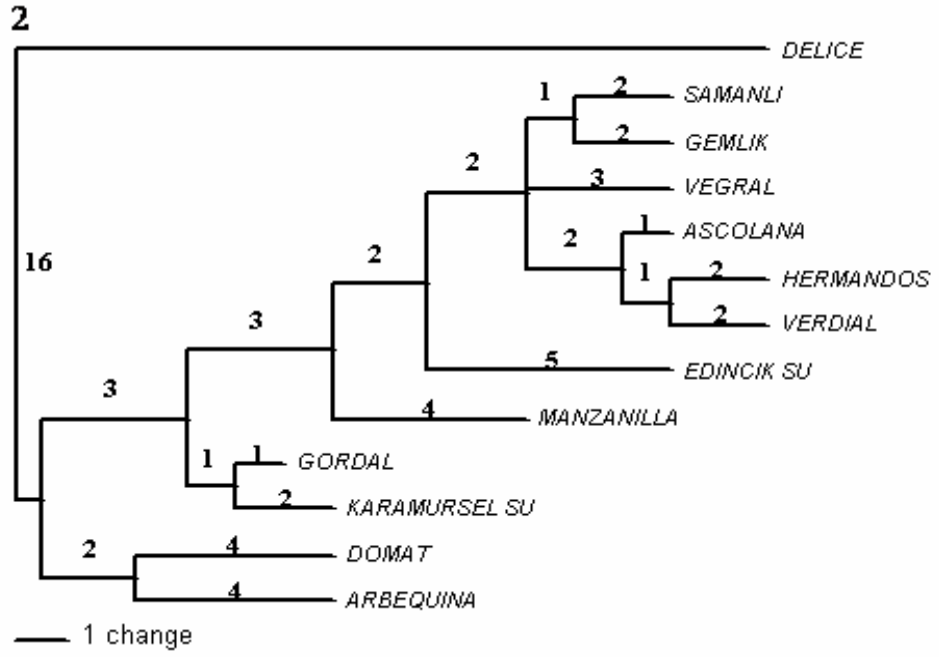
Yaptığımız çalışmada, RAPD-PCR reaksiyonunda tekrarlanabilir bant veren 7 farklı primer denendi. Kullanılan primerler *O.europaea*'nın incelenen 12 farklı kültüründe ortak bantlar verdiği gibi, polimorfik bantlar da verdi. Elde edilen bantlardan parlak ve tekrarlanabilirliği olan amplifikasyon ürünleri değerlendirmeye alındı. Verilerin değerlendirilmesinde var olan bantlar (1), olmayan bantlar (0) olarak belirtildi. Oluşturulan veri matrisi bilgisayar ortamına aktarıldıktan sonra PAUP*4.0b10 (Swofford, 2002) programı kullanılarak verilerin analizi gerçekleştirildi.

Parsimoni kriteri ve Branch-and-Bound algoritması seçilerek yapılan analizde toplam 84 karakter kullanıldı. Bu karakterlerin 45 tanesi sabit, 20 tanesi değişken,

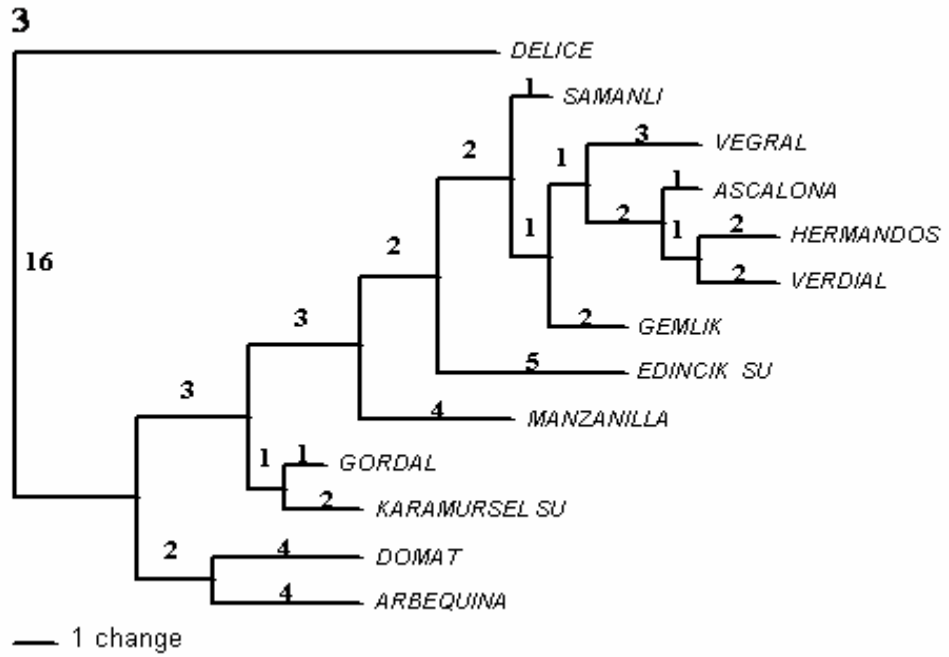
fakat parsimonik açıdan anlamlı olmayan, geriye kalan 19 tanesi ise parsimoni yönünden anlamlı karakterlerdir. Bu karakterlerin hepsi analizde eşit ağırlık verilerek kullanıldı. Analizde hafızada tutulması gereken ağaç sayısı 10000 olarak seçildi ve analiz yaparken birçok ağaç topolojisi değerlendirildi. Ağaçlar elde edilirken bir takım topolojik zorlamalar uygulanmadı. Analiz sonucunda 65 basamaklı ağaçlar bulundu ve bunlardan 8 tanesi parsimoni yönüyle eşit uzunlukta idi. Parsimoni kriteri sonucunda ortaya çıkan 8 ağaç topolojisi Şekil: 4.1, Şekil: 4.2, Şekil: 4.3, Şekil: 4.4, Şekil: 4.5, Şekil: 4.6, Şekil: 4.7 ve Şekil: 4.8'de gösterilmektedir. Bu ağaçların topolojileri farklı olmasına rağmen hepsi parsimoni yönünden eşit uzunluktadır. Ancak burada çözünürlüğünün iyi olması ve genetik uzaklık ağacına benzerlik göstermesi yönünden 1 numaralı parsimoni ağacı ele alınarak Bootstrap değerleri bu ağaç üzerine yansıtıldı ve diğer ağaç topolojileri üzerinde fazla durulmadı.



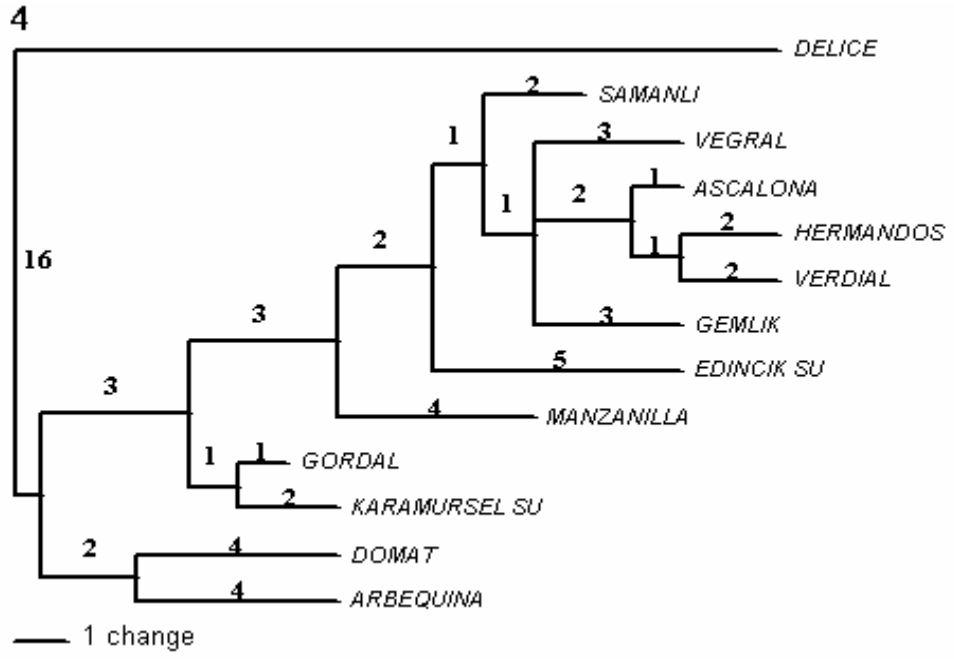
Şekil 4.1 Parsimoni Sonucunda Elde Edilen 1 Numaralı Ağaç (Dalların üstündeki değerler dal uzunluklarını, altındaki değerler ise Bootstrap desteklerini göstermektedir.)



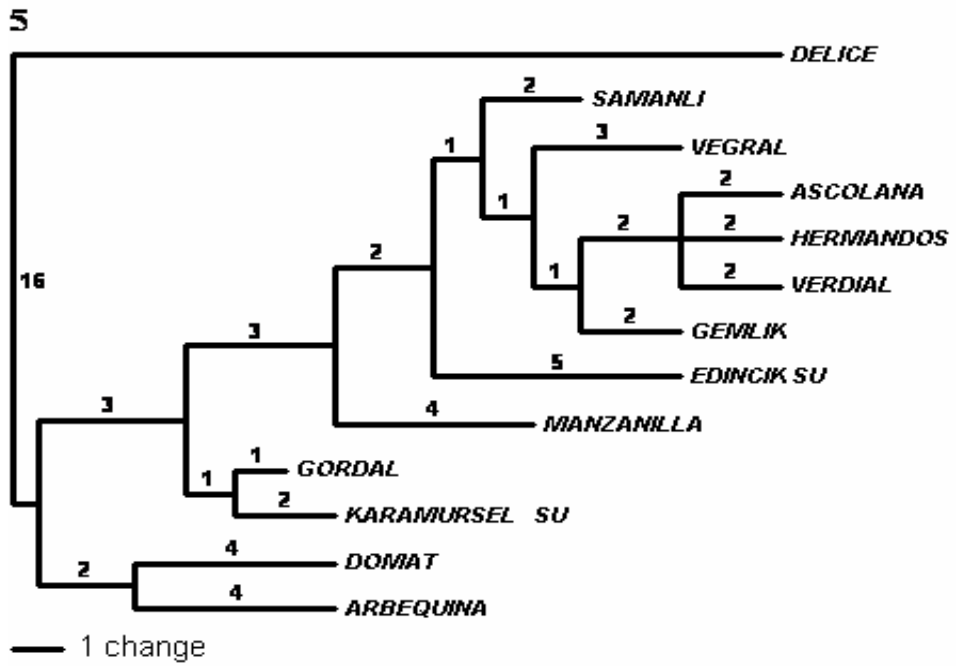
Şekil 4.2 Parsimoni Sonucunda Elde Edilen 2 Numaralı Ağaç



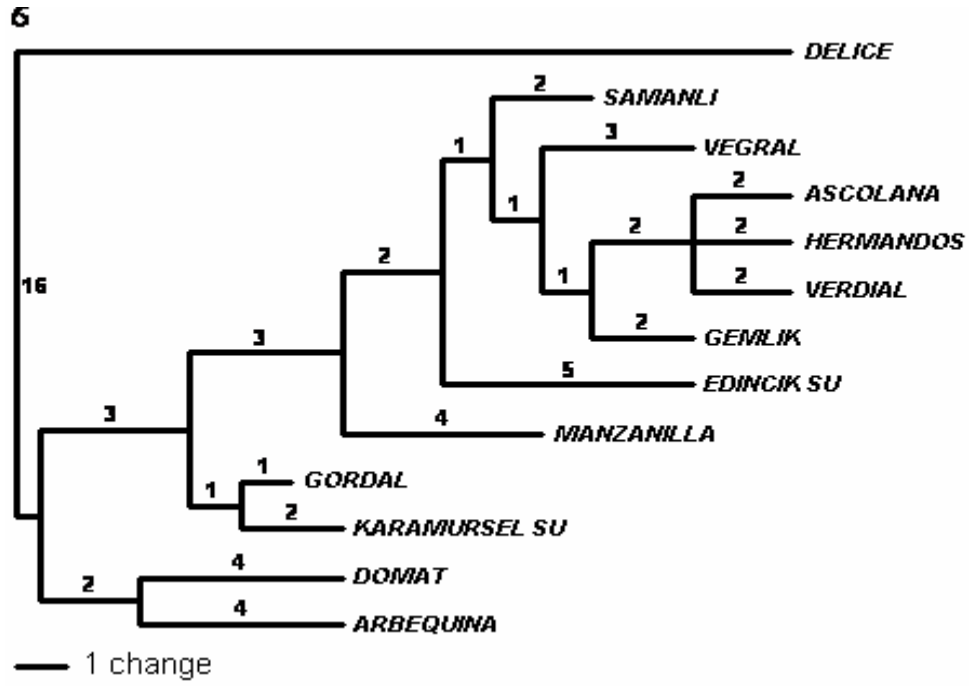
Şekil 4.3 Parsimoni Sonucunda Elde Edilen 3 Numaralı Ağaç



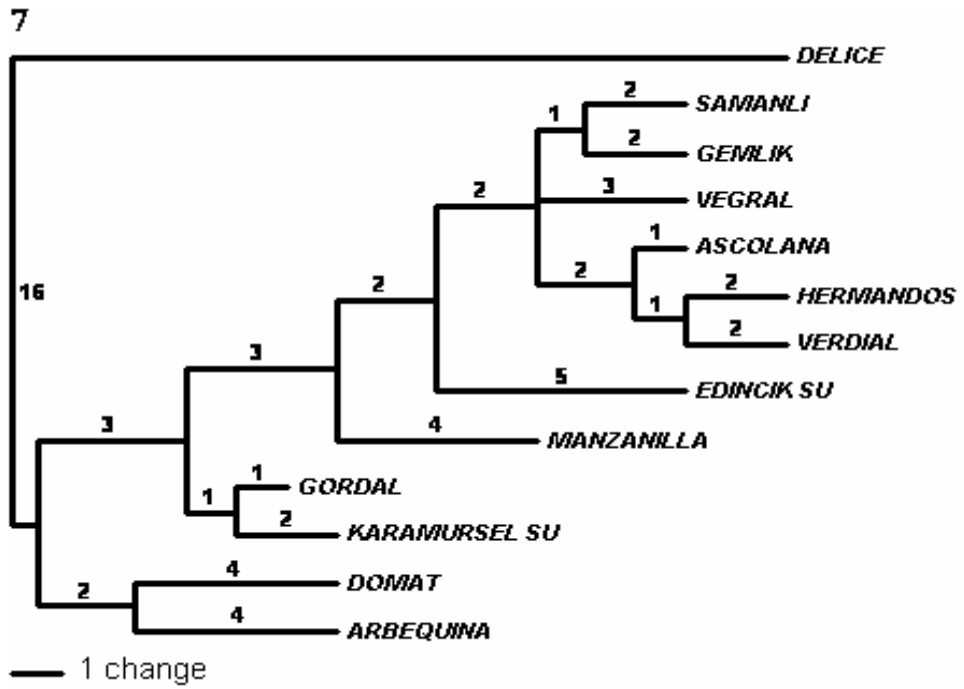
Şekil 4.4 Parsimoni Sonucunda Elde Edilen 4 Numaralı Ağaç



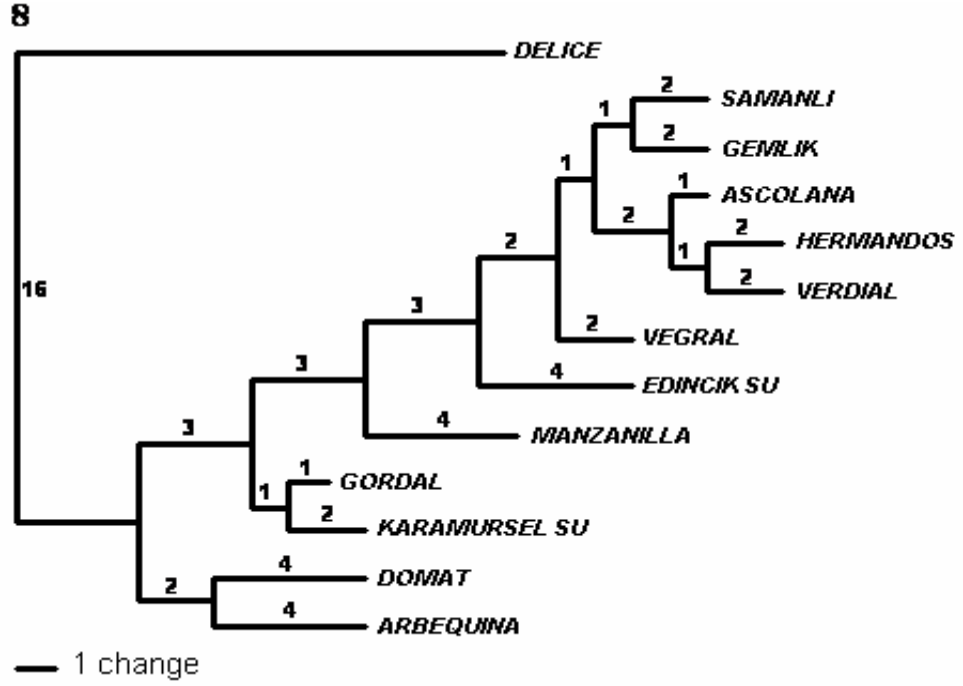
Şekil 4.5 Parsimoni Sonucunda Elde Edilen 5 Numaralı Ağaç



Şekil 4.6 Parsimoni Sonucunda Elde Edilen 6 Numaralı Ağaç

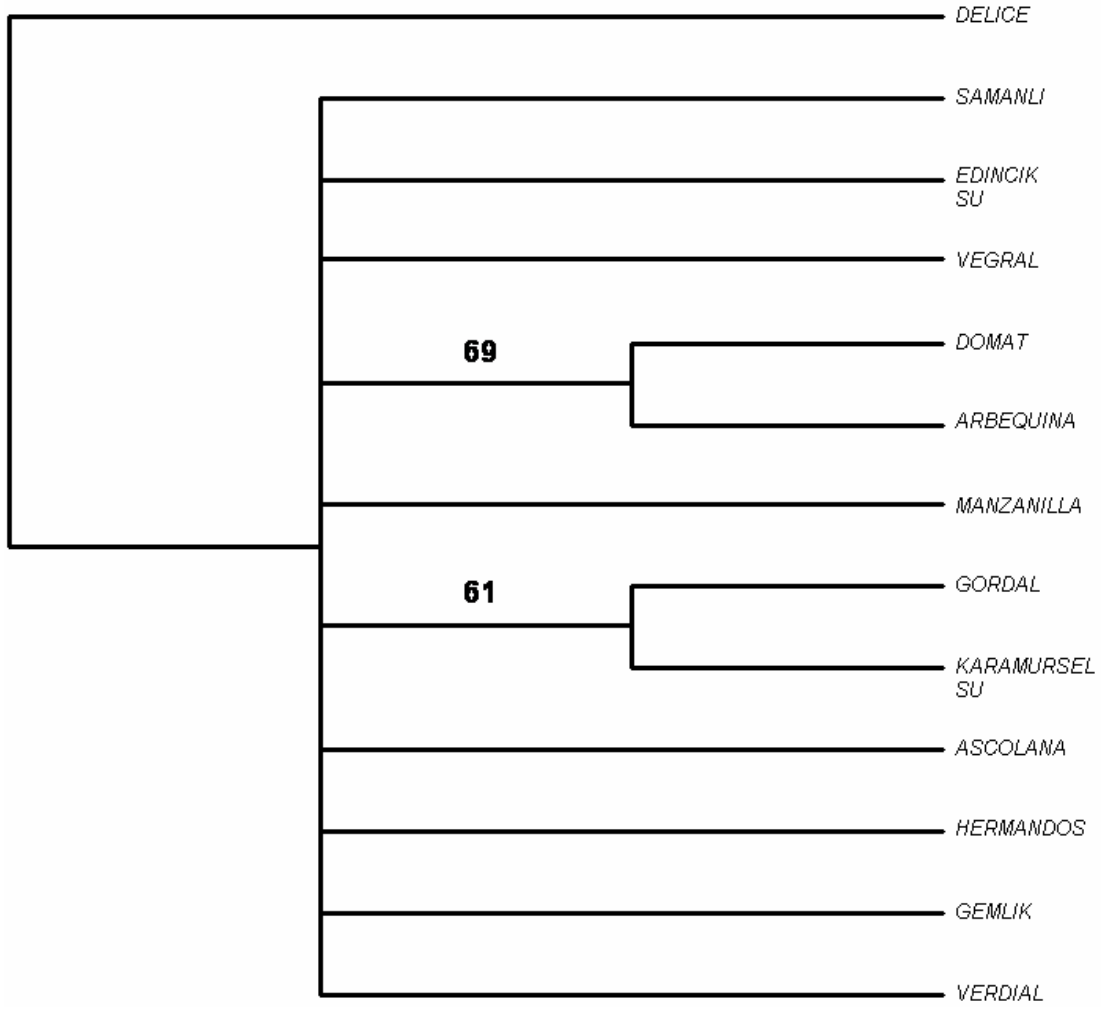


Şekil 4.7 Parsimoni Sonucunda Elde Edilen 7 Numaralı Ağaç



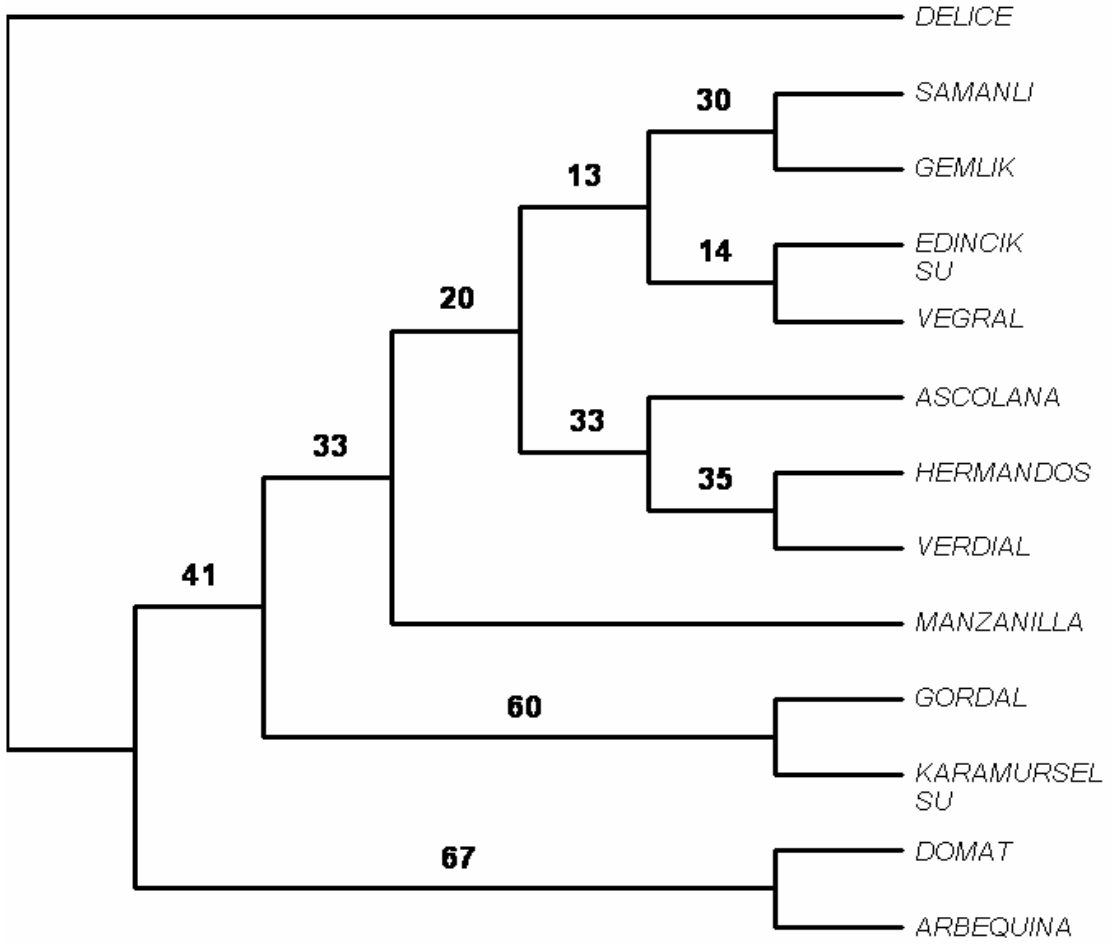
Şekil 4.8 Parsimoni Sonucunda Elde Edilen 8 Numaralı Ağaç

Parsimoni analizi sonucunda elde edilen ağaçlar arasında en parsimonik ağacı bulmak ve mevcut dallarımızın ne kadar destek aldığını görmek amacıyla Bootstrap (Felsenstein, 1985) analizi uygulandı [106]. Analiz sonucu elde edilen destek Şekil: 4.9’da gösterilmektedir.



Şekil 4.9 BOOTSTRAP Analizi

Bootstrap analizi bize Domat ve Arbequina dalının % 69, Gordales ve Karamürsel su dalının da % 61 desteklendiğini gösterdi. Bu sonuçların ışığında biz bootstrap analizini bir kez daha denemeye karar verdik. Ancak bu sefer % 50'nin altında destek alan dalları belirledik. Analiz sonucu elde edilen destek Şekil: 4.10'da gösterilmektedir.



Şekil 4.10 BOOTSTRAP Analizi(<%50)

Yaptığımız analizde parsimoni kriterinden başka bir de genetik uzaklık kriterini denedik. Bu kriterde de yine aynı veri seti kullanıldı. Ancak bu sefer veri setindeki karakterlerimiz bir uzaklık verisine dönüştürüldü.

Çizelge 4.1 Kültivarlar Arasındaki Genetik Farklılığı Gösteren Genetik Uzaklık (Pairwise Distance) Analizi: Çizelgede yukarıda bulunan üçgen ortalama karakter farklılığını, aşağı pozisyondaki üçgende toplam karakter içinde farklılık gösteren karakter sayısını göstermektedir.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1 DELICE	-	0.25000	0.29762	0.25000	0.26190	0.28571	0.26190	0.22619	0.26190
2 SAMANLI	21	-	0.09524	0.07143	0.10714	0.10714	0.15476	0.09524	0.08333
3 EDINCIK	25	8	-	0.09524	0.13095	0.13095	0.15476	0.14286	0.10714
4 VEGRAL	21	6	8	-	0.10714	0.13095	0.17857	0.11905	0.13095
5 DOMAT	22	9	11	9	-	0.16667	0.09524	0.13095	0.14286
6 MANZANILLA	24	9	11	11	14	-	0.16667	0.10714	0.11905
7 ARBEQUIN	22	13	13	15	8	14	-	0.13095	0.11905
8 GORDAL	19	8	12	10	11	9	11	-	0.03571
9 KARAMURSEL	22	7	9	11	12	10	10	3	-
10 ASCALONA	21	6	10	6	11	9	15	6	9
11 HERMANDOS	23	8	12	8	13	9	15	8	11
12 GEMLIK	21	4	10	6	9	11	15	10	11
13 VERDIAL	21	8	10	4	11	11	15	8	11

Çizelge 4.1'in Devamı Kültivarlar Arasındaki Genetik Farklılığı Gösteren Genetik Uzaklık (Pairwise Distance) Analizi: Çizelgede yukarıda bulunan üçgen ortalama karakter farklılığını, aşağı pozisyondaki üçgende toplam karakter içinde farklılık gösteren karakter sayısını göstermektedir.

	10	11	12	13
1 DELICE	0.25000	0.27381	0.25000	0.25000
2 SAMANLI	0.07143	0.09524	0.04762	0.09524
3 EDINCIK	0.11905	0.14286	0.11905	0.11905
4 VEGRAL	0.07143	0.09524	0.07143	0.04762
5 DOMAT	0.13095	0.15476	0.10714	0.13095
6 MANZANILLA	0.10714	0.10714	0.13095	0.13095
7 ARBEQUIN	0.17857	0.17857	0.17857	0.17857
8 GORDAL	0.07143	0.09524	0.11905	0.09524
9 KARAMURSEL	0.10714	0.13095	0.13095	0.13095
10 ASCALONA	-	0.04762	0.07143	0.04762
11 HERMANDOS	4	-	0.07143	0.04762
12 GEMLIK	6	6	-	0.07143
13 VERDIAL	4	4	6	-

Çok sayıda primer kullanılması genetik haritalamanın yapılmasında etkili olmaktadır. Diğer taraftan Li ve Midmore (1999)'a göre de çeşitler arasındaki varyasyon, yüksek düzeyde bulunmuş ise az sayıda primerin kullanılmasının yeterli olabileceğini ifade etmişlerdir [108].

Çalışmamızda dış grup olarak seçtiğimiz Delice'ye en yakın olan grup Domat-Arbequina kültürlerinin oluşturduğu gruptur. Bu iki kültür arasındaki genetik uzaklık verisi çok düşük olmasına rağmen çok az da olsa aralarında bir genetik farklılık var demektir. Yapılan Bootstrap analizinde bu iki kültürü bağlayan dalı % 69 desteklemektedir. Yani; bu destekle bu dalın güvenilirlik derecesinin yüksek olduğu anlaşılmaktadır. Akhisar orijinli Domat ile İspanya orijinli Arbequina kültürü birbirlerine genetik olarak ağaçta yakın konumdadırlar. Bir diğer taraftan İspanya orijinli Gordal ve Kocaeli/Karamürsel orijinli Karamürsel su kültürlerinin ayrı bir grup oluşturduğu ve filogenetik ağacın tabanına yakın yani atasal olduğu görülmektedir. Yine bu dalın da gerçeği yansıttığı % 61'lik Bootstrap değeri ile desteklenmektedir (Şekil 4.11).

Maksimum Parsimony filogenetik ağacında (Şekil 4.1), Domat, Karamürsel su, Arbequina ve Gordal kültürlerinden sonra günümüze daha yakın ayrılma gösteren takson Manzanilla cormona'dır. Ağacın geriye kalan kısmı incelendiğinde 2 kardeş monofiletik gruba ayrıldığı görülmektedir. İlk monofiletik grup; Ascolana, Manzanilla hermandos ve Verdial kültürlerinden oluşmaktadır. İtalya orijinli Ascolana'nın İspanya orijinli Manzanilla hermandos ve Verdial kültürleri ile ilişkisi bu analizde tam netleşmemiştir. Çünkü bu dallarla ilgili ciddi bir Bootstrap desteği bulunmayıp (% 35), tam oy birliği (Strict consensus) ağacında da (buraya alınmamıştır) bu dallar çökmektedir. İkinci monofiletik grup ise, yine kendi içinde ikiye ayrılmış ve Samanlı-Gemlik ve Edincik su-Vegral monofiletik gruplarından oluşmuştur. Ancak bunlar içinde Bootstrap destekleri çok zayıf olduğundan bu dalların varlığı, aralarındaki genetik ilişkinin bu şekilde olup olmadığı hakkında kesin bir şey söylenememektedir.

Tez çalışması kapsamında sınırlı sayıda RAPD markırı ile elde edilen verilerle incelenen ve bazı zeytin kültürü arasındaki çözümlenemeyen genetik

ilişkiler, ileride yapılacak olan çalışmalarla daha farklı RAPD markırlarının, RAPD'den farklı polimorfizm belirleyici moleküler tekniklerin ya da morfolojik veya biyokimyasal verilerin birlikte kullanılmasıyla aydınlatılabilir.

5. KAYNAKLAR

- [1] Altamura Betti, M.M., Pasqua, G., Mazzolani, G., "Embryogenesis in *Olea europaea* L." *Annali di Botanica*, 40: 141-152 (1982).
- [2] Ouazzani, N., Lumaret, R., Villemur, P., "Genetic variation in the olive tree (*Olea europaea* L.) cultivated in Morocco" *Euphytica*, 91: 9-20 (1996).
- [3] Zohary, D., "Centers of Diversity and Centers of Origin", *Genetic Resources in Plant, Oxford s* 554: (1973).
- [4] <http://tr.wikipedia.org/w/index.php?title=Zeytin&oldid=1379561> (10/07/2007)
- [5] www.zeytindostu.org (10/07/2007)
- [6] <http://fi.wikipedia.org/wiki/Oliivi> (10/07/2007)
- [7] Ertem, H., "Boğazköy Metinlerine Göre Hititler Devri Anadolu'sunun Florası" Türk Tarih Kurumu Basımevi ed. Vol. VII. Dizi, Türk Tarih Kurumu Yayınları: Ankara. 181. (1987).
- [8] Anonim, "8000 Yıllık Müthiş Bir Serüven", Komili Zeytinyağı Kitapçığı İstanbul, 23: (1996).
- [9] Garibanoğlu, M., Baysal, A., "Kırlangıç Zeytinyağı Tanıtım Kitapçığı" İstanbul: 32: (1998).
- [10] Hehn, V., "Zeytin, Üzüm ve İncir" Dost Kitabevi Yayınları Ankara: (1998).
- [11] <http://www.agri.ankara.edu.tr/bahce/pratikbilgiler/meyve/zeytin/genel.htm> (10/07/2007)
- [12] Vergara, P., "Dünya Zeytin Ansiklopedisi", Uluslararası Zeytinyağı Konseyi Madrid (İspanya): (1997).

- [13] Hatozpoulos, P., et al., "Breeding, Molecular Markers and Molecular Biology of the Olive Tree" *European Journal Of Lipid Science Technology*, 104: 574-586 (2002).
- [14] <http://www.zae.gov.tr/ekonomi/1.asp> (10/07/2007)
- [15] <http://www.zae.gov.tr/ekonomi/2.asp> (10/07/2007)
- [16] Belaj, A., Satovic, Z., Rallo, L., Trujillo, I., "Genetic Diversity and Relationships in Olive (*Olea europaea* L.) Germplasm Collections as Determined by Randomly Amplified Polymorphic DNA", *Theor Appl Genet*, 105: 638-644 (2002).
- [17] Loukas, M., Krimbas, CB., "History of Olive Cultivars Based on Their Genetic Distances", *J Hort Sci*, 58: 121-127 (1983).
- [18] Ouzzani, N., Lumaret, R., Villemur. P., "Leaf Allozyme Variation in Cultivated and Wild Olive Trees (*Olea europaea* L.)", *J Hered*, 84: 34-42 (1993).
- [19] Trujillo, I., Rallo, L., Arus, P., "Identifying Olive Cultivars by Isozyme Analysis", *J Am Soc Hort Sci*, 120: 318-324 (1995).
- [20] Fabbri, A., Hormaza, J.I., Polito, V.S., "Random Amplified Polymorphic DNA Analysis of Olive (*Olea europaea* L.) Cultivars", *J Am Soc Hort Sci*, 120: 538-542 (1995).
- [21] Mekuria, G., Collins, G.G., Sedgley, M., "Genetic Variability Between Different Accessions of Some Common Commercial Olive Cultivars", *J Hort Sci Biotechnol*, 74: 309-314 (1999).
- [22] Besnard, G., Bervillé, A., "Multiple Origins for Mediterranean Olive (*Olea europaea* L. ssp. *europaea*) Based upon Mitochondrial DNA Polymorphisms", *Life Sciences*, 323: 173-181 (2000).
- [23] Belaj, A., Trujillo, I., Rallo, L., "Polymorphism and Discriminating Capacity of Randomly Amplified Polymorphic Markers in an Olive Germplasm Bank", *J Am Soc Hort Sci*, 126: 64-71 (2001).
- [24] Besnard, G., Baradat, P., Berville, A., "Genetic Relationships in the Olive (*Olea europaea* L.) Reflect Multilocal Selection of Cultivars", *Theor Appl Genet*, 102: 251-258 (2001).

- [25] Sanz-Cortes, F., Badenes, M.L., et. al., "Molecular Characterization of Olive Cultivars Using RAPD Markers", *J Am Soc Hort Sci*, 126: 7-12 (2001).
- [26] Kockar, F., Ilikci, R., "Investigations of Genetic Variation between Olive (*Olea europaea* L.) Cultivars Using Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction (AP-PCR)", *Z. Naturforsch*, 58c: 837-842 (2003).
- [27] Ozkaya, M.T., Cakir, E., Gokbayrak, Z., Ercan, H., Taskin, N., "Morphological and Molecular Characterization of Derik-Halhali Olive (*Olea europaea* L.) Accessions Grown in Derik-Mardin Province of Turkey", *Scientia Horticulturae*, 108: 205-209 (2006).
- [28] Angiolillo, A., Mencuccini, M., Baldoni, L., "Olive Genetic Diversity Assessed Using Amplified Fragment Length Polymorphisms", *Theor Appl Genet*, 98: 411-421 (1999).
- [29] Amane, M., Lumaret, R., Hany, V., Ouazzani, N., Debain, C., Vivier, G., Deguilloux, M. F., "Chloroplast-DNA Variation in Cultivated and Wild Olive (*Olea europaea* L.)", *Theor Appl Genet*, 99: 133-139 (1999).
- [30] Lumaret, R., Amane, M., Ouazzani, N., Baldoni, L., Debain, C., "Chloroplast DNA Variation in the Cultivated and Wild Olive Taxa of the Genus *Olea*" *Theor Appl Genet*, 101: 547-553 (2000).
- [31] Rallo, P., Dorado, G., Martin, A., "Development of Simple Sequence Repeats (SSRs) in Olive Tree (*Olea europaea* L.)", *Theor Appl Genet*, 101: 984-989 (2000).
- [32] Cipriani, G., Marrazzo, M.T., Marconi, R., Cimato, A., Testolin, R., "Microsatellite Markers Isolated in Olive (*Olea europaea* L.) are Suitable for Individual Fingerprinting and Reveal Polymorphism with in Ancient Cultivars", *Theor Appl Genet*, 104: 223-228 (2002).
- [33] Britten, R.J., "Rates of DNA Sequence Evolution Differ Between Taxonomic Groups", *Science*, 231: 1393-1398 (1986).
- [34] Stuber, W.C., "Biochemical and Molecular Markers in Plant Breeding", *Plant Breeding News*, 9: 36-31 (1992).
- [35] Ghafoor, A., Ahmad, Z., Qureshi, A.S., Bashir, M., "Genetic Relationship in *Vigna mungo* (L.) Hepper and *V. radiata* (L.) Wilczek Based on Morphological Traits and SDS-PAGE", *Euphytica*, 123 (3): 367-368 (2000).

- [36] Dinelli, G., Lucchese, C., "Comparison Between Capillary and Polyacrylamide Gel Electrophoresis for Identification of Lolium Species and Cultivars", *Electrophoresis*, 20: 2524-2532 (1999).
- [37] Burr, B., "DNA-Based Markers in Plants", R.L., Phillips, I.K., Vasil, *Kluwer Academic Publishers, Netherlands*, 1: (1994).
- [38] Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, R.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V., "DNA Polimorphisms Amplified by Arbitrary Primers are Useful as Genetic Markers", *Nucl. Acids. Res.*, 18: 6531-6535 (1990).
- [39] Welsh, J., McClelland, M., "Fingerprinting Genomes Using PCR with Arbitrary Primers", *Nucleic Acids Research*, 18: 7213-7218 (1990).
- [40] Wough, R., Powell, W., "Using RAPD Markers for Crop Improvement", *TIBTECH*, 101: 186-191 (1992).
- [41] Whitkus, R., Doebley, J., Wendel, J.F., "DNA- Based Markers in Plants", *Kluwer Academic Publishers, Netherlands*, (1994).
- [42] Crawford, D.J., Ornduff, R., "Enzyme Electrophoresis and Evolutionary Relationships among Three Species of Lasthenia (*Astraceae:Heliantheae*)", *Am J Bot*, 76(2): 289-296 (1989).
- [43] Lehninger, A., Nelson, D.L., Cox, M., "Principles of Biochemistry", New York Worth Publishers (1993).
- [44] Matus, M., Hucl, P., "Isosyme Variation within and among Accession of Annual Phalaris Species in North American Germplasm Collections", *Crop Sci*, 39(4): 1222-1228 (1999).
- [45] Nelson, A.D., Elisens, W., "Polyploid Evolution and Biogewography in Chelone (Scrophulariaceae): Morphological and Isozyme Evidence", *Am J Bot*, 86(10): 1487-1501 (1999).
- [46] Buth, D.G., "The Application of Electrophoretic Data in Systematic Studies", *Annu Rev Ecol Syst*, 15: 501-22 (1984).
- [47] Carey, K., Ganders, F.R., "Patterns of Isoenzyme Variation in Plectritis (Valerianaceae)", *Syst Bot*, 12(1): 125-132 (1987).

- [48] Chase, M.W., Olmstead, R.G., "Isozyme Number in Subtribe Oncidiinae (Orchidaceae): and Evaluation of Polyploidy", *Am J Bot*, 75(7): 1080-1085 (1988).
- [49] Dje, Y., Forcioli, D., Ater, M., Lefebvre, C., Vekemans, X., "Assessing Population Genetic Structure of Sorghum Land Races from North-Western Morocco Using Allozyme and Microsatellite Markers", *Theor Appl Genet*, 99: 157-163 (1999).
- [50] Furnier, G.R., Adams, W.T., "Geographic Patterns of Allozyme Variation in Jeffrey Pine", *Am J Bot*, 73(7): 1009-1015 (1986).
- [51] Max, K.N., Mouchaty, S.K., Schwaegerle, K.E., "Allozyme and Morphological Variation in Two Supspecies of *Dryas Octopetala* (Rosaceae) in Alaska", *Am J Bot*, 86(11): 1637-1644 (1999).
- [52] Gottlieb, L.D., Warwick, S.I., Ford, V.S., "Morphological and Electrophoretic Divergence between *Layia discoidea* and *L. glandulosa*", *Syst Bot*, 10(4): 484-495 (1985).
- [53] Reiter, S.R., Young, M., Scolnik, P.A., "Genetic Linkage of the Arabidopsis Genome: Methods for Mapping with Recombinant Inbreds and Raps. Methods in Arabidopsis Research", *World Scientific Publishing Singapore*: (1993).
- [54] Resta, P., Zhang, H., Dubcovsky, B., Dvorak, J., "The Origins of the Genomes of Triticum Biunciale, *T.ovatum*, *T.neglectum*, *T.columnare* and *T.rectum* (Poaceae) Based on Variation in Repeated Nucleotide Sequences", *Am J Bot*, 83(12): 1556-1565 (1996).
- [55] Xu, D.H., Abe, J., Kanazawa, A., Gai, J.Y., Shimamoto, Y., "Identification Sequence Variations by PCR-RFLP and ITS Application to the Evaluation of cpDNA Diversity in Wild and Cultivated Soybeans", *Theor Appl Genet*, 102: 683-688 (2001).
- [56] Mori, N., Moriguchi, T., Nakamura, C., "RFLP Analysis of Nuclear DNA for Study of Phylogeny and Domestication of Tetraploid Wheat", *Genes Genet Syst*, 12: 153-161 (1997).
- [57] Mummenhof, K., Koch, M., "Chloroplast DNA Restriction Site Variation and Phlogenetic Relationships in the Genus *Thylaspi Sensulato* (Brassicaceae)", *Syst Bot*, 19(1): 73-88 (1994).

- [58] Southern, E.M., "Detection of Specific Sequences among DNA Fragments Separated by Gel Electrophoresis", *J Mol Biol*, 98: 503-517 (1975).
- [59] Dubreuil, P., Charcosset, A., "Relationship among Maize Inbred Lines and Populations from European and North-American Origins as Estimated Using RFLP Markers", *Theor Appl Genet*, 99: 473-481 (1999).
- [60] Kang, B.C., Nahm, S.H., Huh, J.H., Yoo, H.S., Yu, J.W., Lee, M.H., Kim, B.D., "An Interspecific (*Capsicum annuum* X *C.Chinese*) F2 Linkage Map in Pepper Using RFLP and AFLP Markers", *Theor Appl Genet*, 102: 531-539 (2001).
- [61] Kochert, G., "Restriction Fragment Length Polymorphism in Plants and Its Implications", *Subcellular Biochem*, 17: 167-190 (1997).
- [62] Liu, C.J., Musial, J.M., Thomas, B.D., "Genetic Relationships among *Stylosanthes* Species Revealed by RFLP and STS Analyses", *Theor Appl Genet*, 99: 1179-1186 (1999).
- [63] Devey, M.E., Sewell, M.M., Uren, T.L., Neale, D.B., "Comparative Mapping in Loblolly and Radiata Pine Using RFLP and Microsatellite Markers", *Theor Appl Genet*, 99: 445-452 (1999).
- [64] Kurth, J., Kolsch, R., Simons, V.V., Schulze-Lefert, P., "A High Resolutions Genetic Map and a Diagnostic RFLP Marker for the Mig Resistance Locus to Powdery Mildew in Barley", *Theor Appl Genet*, 102: 53-60 (2001).
- [65] Mustermann, L.E., Conn, J.E., "Systematics of Mosquito Disease Vector (Diptera, Culicidae): impact of Molecular Biology and Cladistic Analysis", *Annu Rev Entomol*, 42: 351-369 (1997).
- [66] Olmstead, R.G., Palmer, J.D., "Chloroplast DNA Systematics: a Review of Methods and Data Analysis", *Am J Bot*, 81(9): 1205-1224 (1994).
- [67] Rosa, R.I., Angiolillo, A., Guerrero, C., Pellegrini, M., Rallo, L., Besnard, G., Berville, A., Martin, A., "A First Linkage Map of Olive (*Olea europaea* L.) Cultivars Using RAPD, AFLP, RFLP and SSR Markers", *Theor Appl Genet*, 106: 1273-1282 (2003).
- [68] Yıldırım, A., Kandemir, N., Genetik Markörler ve Analiz Metodları, Konya. Selçuk Üniv. Vakıf Yayınları, Bölüm 23: 112-159 (2001).

- [69] Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., Zabeau, M., "AFLP: A New Technique for DNA Fingerprinting", *Nucl. Acid. Res.*, 23: 4407-4414 (1995).
- [70] Ergül, A., "Asmalarda (*Vitis Vinifera* L. cvs.) Genomik DNA Parmakizi Analizleri ile Moleküler Karakterizasyon", *Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı*: (2000).
- [71] Akkaya, M.S., Bhagwat, A.A., Cregan, P. B., "Length Polymorphisms of Simple Sequence Repeat DNA in Soybean", *Genetics*, 134: 1131-1139 (1992).
- [72] Morgante, M.a.O., A.M., "PCR-Amplified Microsatellites as Markers in Plant Genetics", *Plant J.*, 3(1): 175-182 (1993).
- [73] Wu, K.S., Tanksley, S. D., "Abundance, Polymorphism and Genetic Mapping of Microsatellites in Rice", *Mol. Gen. Genet.*, 241: 225-235 (1993).
- [74] Zhao, X., Kochert, G., "Phylogenetic Distribution and Genetic Mapping of a (GGC)_n Microsatellite from Rice (*Oryza sativa* L.)", *Plant Mol. Biol*, 21: 607-614 (1993).
- [75] Saghai-Marooif, M.A., Biyashev, R.M., Yang, G.P., Zang, Q., Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A., "Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase", *Science*, 239: 937-945 (1994).
- [76] Roder, M.S., Plaschke, J., König, S.U., Börner, A., Sorrels, M.E., Tanksley, S.D. and Ganai, M.W., "Abundance, Variability and Chromosomal Location of Microsatellites in Wheat." *Mol. Gen. Genet.*, 246: 327-333 (1995).
- [77] Thomas, M.R., Scott, N.S., "Microsatellite Repeats in Grapevine Reveal DNA Polymorphisms When Analysed as Sequence-Tagged Sites (STSs)", *Theor. Appl. Genet.*, 86: 985-990 (1993).
- [78] Dow, B.D., Asley, M.V. and Howe, H.F., "Characterization of Highly Variable (GA/CT)_n Microsatellites in the Bur Oak (*Quercus macrocarpa*)", *Theor Appl Genet*, 91: 137-141 (1995).
- [79] Byrne, M., Marquez-Garcia M. I., Üren, T., Smith, D.S. and Moran, G.F., "Conservation and Genetic Diversity of Microsatellite Loci the Genus", *Eucalyptus. Aust. J. Bot*, 44: 331-341 (1996).

- [80] Caetano-Anoles, G., Bassam, B.J., Gresshoff, P.M., "High Resolution DNA Amplification Fingerprinting Using Very Short Arbitrary Oligonucleotide Primers", *Biotechnology*, 9: 553-557 (1991).
- [81] Başbüyük, H.H., Bardakçı, F., Belshaw, R., Quicke, D.L.J., "Phylogenetic Systematics, "A Practical Guide to Theory and Practise". Önder Matbaa Sivas (2000).
- [82] Rafalski, A., Tingey, S.V., Williams, J.G.K., "RAPD Markers", *Plant Molecular Biology Manual*, 114: 1-8 (1994).
- [83] Tingey, S.V., Del Tufa, J.P., "Genetic Analyses with Random Amplified Polymorphic DNA Markers", *Plant Physiol*, 101: 349-352 (1993).
- [84] Halden, C., "Characterization and Use of a Multiplex PCR-Based System: Random Amplified Polymorphic DNA", Lund. Departments of Genetics Lund University (1998).
- [85] Atienzar, F., Evenden, A., Jha, A., Sava, D., Depledge, M., "Optimized RAPD Analysis Generates High-Quality Genomic DNA Profiles at High Annealing Temperature", *BioTechniques*, 28: 52-54 (2000).
- [86] Aljanabi, S.M., Forget, L., Dookun, A., "An Improved and Rapid Protocol for the Isolation of Polysaccharide and Polyphenol-Free Sugarcane", *Plant Molecular Biology Reporter*, 17: 1-8 (1999).
- [87] Muralidharan, K., Wakeland, E.K., "Concentration of Primer and Template Qualitatively Affects Product in Random Amplified Polymorphic DNA PCR", *BioTechniques*, 14: 362-364 (1993).
- [88] Ellsworth, D.L., Rittenhouse, K.D., Honeycutt, R.L., "Artifactual Variation in Randomly Amplified Polymorphic DNA in Banding Patterns", *BioTechniques*, 14: 214-217 (1993).
- [89] Park, Y.H., Kohel, R.J., "Effect of Concentration of MgCl₂ on Random Amplified DNA Polymorphisms", *BioTechniques*, 16: 652-655 (1994).
- [90] Khadanha, D.K., Tuna, M., Tal, M., Nejidat, A., Goldrith, A.G., "Variability in the Pattern of Random Amplified Polymorphic DNA", *Electrophoresis*, 18: 2852-2856 (1997).
- [91] Schweder, M.E., Shatters, R.G., West, S.H., Smith, R.L., "Effect of Transition Interval between Melting and Annealing Temperatures on RAPD Analyses", *BioTechniques*, 19: 38-42 (1995).

- [92] Bielawski, J.P., Noack, K., Pumo, D.E., "Reproducible Amplification of RAPD Markers from Vertebrate DNA", *BioTechniques*, 18: 856-860 (1995).
- [93] Hillis, D.M., Mortiz, C., Molecular Systematics, USA. Sinauer Associates Inc. Publishers (1990).
- [94] Rafalski, A., Tingey, S.V., Williams, J.G.K., "RAPD Markers: A New Technology for Genetic Mapping and Plant Breeding", *AgBiotech News and Information*, 3: 645-648 (1991).
- [95] Rafalski, A., Tingey, S.V., "Genetics Diagnostics in Plant Breeding: RAPDs Microsatellites and Machines", *Trend Genet*, 93(8): 275-280 (1993).
- [96] Beamont, V.H., Mantet, J., Rocheford, T.R., Widholm, J.M., "Comparision of RAPD and RFLP Markers for F2 Generations in Maize (*Zea mays* L.)", *Theor Appl Genet*, 93: 606-612 (1996).
- [97] Waugh, R., Poweil, W., "Using RAPD Markers for Crop Improvement", *Focus*, 10: 186-191 (1992).
- [98] Williams, J.G.K., Hanafey, M.K., Rafalski, J.A., Tingey, S.V., "Genetic Analysis Using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers", *Methods in Enzymology*, 218: 704-741 (1993).
- [99] Bardakçı, F., "Genetic Analyses with Random Amlified Polymorphic DNA (RAPD) Markers", *Turk J Biol*, 25: 185-196 (2001).
- [100] Saliba-Colombani, V., Causse, M., Gervais, L., Philouze, J., "Efficiency of RFLP, RAPD and AFLP Markers for the Construction of an Intraspecific Map of the Tomato Genome", *Genome*, 43: 29-40 (2000).
- [101] Simpson, G.G., Principles of Animal Taxonomy, New York., Columbia Universty Press (1961).
- [102] Mayr, E. and Ashlock, P.D., Principles of Systematic Zoology, New York. McGraw-Hill (1991).
- [103] Quicke, D.L.J., Principles and Techniques of Contemporary Taksonomy, *Blackie Academic and Professional, London*: 311 (1993).

- [104] Ozkaya, M.T., Ergulen, E., Ulger, S., Ozilbey, N., "Türkiye'de Yetiştirilen Bazı Zeytin Çeşitlerinin Genetik ve Biyolojik Özelliklerinin Karşılaştırılması", *Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 10(2): 231-236 (2004).
- [105] Sneath, P.H.A. and Sokal, R.R., Numerical Taxonomy, San Francisco. W.H. Freeman and Company (1973).
- [106] Felsenstein, J., "Confidence Limits on Phylogenies: an Approach using the Bootstrap", *Evolution*, 39: 783-791 (1985).
- [107] Kress, W.J., et. al., "The Molecular Phylogeny of *Alpinia* (Zingiberaceae): A Complex and Polyphyletic Genus of Gingers", *American Journal of Botany*, 92(1): 167-178 (2005).
- [108] Li, M.a.M., D.J., "Estimating the Genetic Relationships of Chinese Water Chestnut Cultivated in Australia, using Random Amplified Polymorphic DNAs (RAPDs)", *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 74(2): 224-231 (1999).