

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOKTORA TEZİ**

**RAPD ANALİZİ İLE GÜLLERDE (*Rosa sp.*) GENETİK TANIMLAMA**

**Mikail ÇALIŞKAN**

**BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI**

**ANKARA**

**2005**

**Her Hakkı Saklıdır**

Prof. Dr. Y. Sabit AĞAOĞLU danışmanlığında, Ziraat Yüksek Mühendisi Mikail ÇALIşKAN tarafından hazırlanan bu çalışma 21/10/2005 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oybirliği ile Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı'nda Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Y. Sabit AĞAOĞLU

İmza:

ye : Prof. Dr. Birhan KUNTER

İmza:

ye : Prof. Dr. Sebahattin ÖZCAN

İmza:

ye : Prof. Dr. Ferhat ODABAş

İmza:

ye : Prof. Dr. Gökhan SÖYLEMEZOĞLU

İmza:

**Yukarıdaki sonucu onaylarım**

**Prof. Dr. Ülkü MEHMETOĞLU**

**Enstitü Müdürü**

## ÖZET

Doktora Tezi

### **RAPD ANALİZİ İLE GÜLLERDE (*Rosa sp.*) GENETİK TANIMLAMA**

**Mikail ÇALIŞKAN**

Ankara Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Bahçe Bitkileri Ana Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Y. Sabit AĞAOĞLU

Aralarındaki genetik varyasyonun belirlenmesine yönelik, 28 bahçe tipi gül, 15 kesme gül ve 4 yabancı tür veya çeşidi, RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) tekniği kullanılarak moleküler seviyede tanımlanmıştır. Analizler için seçilen 19 primer (10-mer), 133 polimorfik bant üretmiştir. En fazla sayıda bant (15), OP-T-19 ve OP-E-04 primerlerinden elde edilirken, en az sayıda bant (5) OP-E-14 primerinden elde edilmiştir. Primer başına ortalama polimorfik bant sayısı 7.0'tür. OP-A-01, OP-E-04, OP-F-01, OP-F-06, OP-F-14, OP-G-11, OP-G-19 ve OP-T-19 primerlerinde yüksek bant sayısı ve polimorfizm oranı bulunmuş, böylece gül çeşit ve türlerinin genetik tanımlaması yapılarak, aralarındaki genetik ilişkiler ortaya konmuştur.

Elde edilen dendrogram ile güllerin yetiştiricilik grupları arasında bir korelasyon tespit edilmiştir. Aynı genetik havuzdan alınmalarına karşın, modern bahçe gülleri ile kesme gül grupları arasında, bu iki grup ile doğada yetişen türler ve eski bahçe gülleri arasında önemli genetik farklılıklar bulunmuştur. Gruplar içerisinde yer alan genotipler ise, birbirleri ile genetik farklılıklar göstermişlerdir. Tüm genotipler arasında, en yüksek benzerlik indeksi değeri (0.96) Dallas ve Dallas TM arasında görülürken, en düşük oran (0.59) Texas çeşidi ile Kışmır Gülü arasında tespit edilmiştir.

**2005, 81 Sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** *Rosa sp.*, RAPD, DNA İzolasyonu, Genetik Tanımlama

## ABSTRACT

Ph. D. Thesis

### **RAPD BASED GENETIC ANALYSIS IN ROSES (*Rosa sp.*)**

**Mikail ÇALIŞKAN**

University of Ankara

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Horticulture

Supervisor: Prof. Dr. Y. Sabit AĞAOĞLU

To identify the genetic variation among rose accessions, 28 garden types, 15 cut and 4 wild type rose varieties/species were analyzed at molecular level using RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) technique. The 19 selective primers (10-mers) produced 133 polymorphic bands. The highest number of bands (15) with primers OP-T-19 and OP-E-04 and the lowest number of bands (5) with primer OP-E-14 were obtained. The average polymorphism rate was 7.0 bands/primer. Furthermore, OP-A-01, OP-E-04, OP-F-01, OP-F-06, OP-F-14, OP-G-11, OP-G-19 and OP-T-19 primers generated higher number of bands and polymorphism rates, so that, they assisted to better characterization of roses and genetic relation among the accessions.

A correlation was established between horticultural groups and dendrogram. Even though rose groups were sampled from the same genetic pool there were genotypical differences between modern garden roses and cut-roses, and significant differences between old-garden roses and wild type roses group. Further genetic differences were also identified among the accessions placed within the same groups. Among all the genotypes analyzed, the highest similarity index was identified between accessions Dallas and Dallas TM (0.96) and the lowest was identified between accessions Texas and Kismir (0.59).

**2005, 81 pages**

**Key Words:** *Rosa sp.*, RAPD, DNA Isolation, Genetic Identification

## ÖNSÖZ

Yüksek lisans ve Doktora öğrenimi süresince, benden ilgi ve desteğini esirgemeyen, yetişmem için üzerine düşen görevleri sevgiyle yerine getiren, danışmanım Sayın Prof. Dr. Y. Sabit AĞAOĞLU'na sonsuz şükranlarımı sunarım.

Doktora tezimin hazırlanması sürecinde, benden bilgi ve sıcak ilgilerini eksik etmeyen, Sayın Prof. Dr. Birhan KUNTER'e ve Prof. Dr. Gökhan SÖYLEMEZOĞLU'na, tüm destekleri için Prof. Dr. Sabahattin ÖZCAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Doktora tez aşamasında benden hiçbir teknik ve idari desteği esirgemeyen Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitü Müdürü Dr. Hüseyin TOSUN'a; Islah ve Genetik Bölüm Başkanı Sayın Dr. Taner AKAR'a; Ziraat Yük. Müh. Selami YAZAR'a ve Doç. Dr. Serkan URANBEY'e; Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü çalışanlarına minnetlerimi sunarım.

Gül materyalinin teminindeki yardımları için, Yalova Atatürk Bahçe Kùltürleri Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürü Sayın Yavuz AĞI ve Ziraat Yüksek Mühendisi Kamil GÜRSAN'a, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Rektör Yardımcısı, Sayın Prof. Dr. Mehmet KOYUNCU'ya, Prof. Dr. Neşet ARSLAN'a ve yürekli doğasever İlhan ASLANYÜREK'e; tezimin istatistik analizlerindeki yardımı için Doç. Dr. Mehmet Ali YILDIZ'a teşekkür etmeyi borç bilirim.

Projeme verdiği maddi destek için Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü'ne teşekkürlerimi sunarım.

Beni yetiştiren Sevgili, Fedakâr Anne ve Babama,  
*Tatlı anlayışsızlıkları için 12 aylık oğluma,*  
ve eşime, kalpten teşekkür ederim.

**Mikail ÇALIŞKAN**  
**Ankara, Ekim 2005**

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ.....	iii
SİMGELER DİZİNİ .....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ .....	3
2.1 Güllerin Yeryüzünde Yayılışı ve Tarihçesi.....	3
2.1.1 Kromozom yapısı.....	5
2.1.2 Botanik yapısı ve güllerin sınıflandırılması.....	5
2.3 Moleküler Markör Teknikleri .....	8
2.4 Moleküler Markörlerin Uygulama Alanları.....	15
2.4.1 Genotipik tanımlama.....	15
2.4.2 Çeşit tescili.....	16
2.4.3 Islah hatlarının tanımlanması ve tohum saflık testleri.....	18
2.4.4 Hibrit çeşit saflık testleri.....	18
2.4.5 Cinsiyet belirleme.....	19
2.4.6 Genetik çeşitliliğin belirlenmesi.....	19
2.4.7 Gen kaynaklarının genetik kökeni.....	19
2.4.8 Tarımsal performansın ve adaptasyon yeteneğinin tahmini .....	20
2.5 RAPD Analizlerinin Uygulama Alanları .....	20
2.5.1 Genotipik Tanımlama.....	20
2.5.2 Genetik haritalama.....	21
2.5.3 Bir özellekle ilişkili genetik markörlerin geliştirilmesi.....	22
2.5.4 Popülasyon ve evrim genetiği.....	24
2.5.5 Bitki ıslahı.....	25
2.6 Moleküler Markör Tekniklerinin Güllerde Kullanımı.....	26

<b>3. MATERYAL ve YÖNTEM .....</b>	<b>29</b>
<b>3.1 Materyal .....</b>	<b>29</b>
<b>3.2 Yöntem .....</b>	<b>34</b>
<b>3.2.1 DNA izolasyonu.....</b>	<b>35</b>
<b>3.2.2 RAPD-PCR analizleri.....</b>	<b>38</b>
<b>3.2.3 Veri analizleri .....</b>	<b>41</b>
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>43</b>
<b>4.1 DNA İzolasyonu.....</b>	<b>43</b>
<b>4.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ve RAPD Analizleri.....</b>	<b>44</b>
<b>4.3 Benzerlik İndeksi ve Dendrogram.....</b>	<b>57</b>
<b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ .....</b>	<b>61</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>68</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>79</b>

## SİMGELER DİZİNİ

AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism Çoğaltılmış DNA Parçacık Uzunluğu Polimorfizmi (Markör)
AP-PCR	Arbitrarily Primed-PCR Rasgele Primerle Yapılan PCR (Markör)
CTAB	Cetyltrimmoniumbromide Kimyasal Madde
DAF	DNA Amplification Fingerprinting Çoğaltılmış DNA Parmak İzi (Markör)
ddH <sub>2</sub> O	Çift Distile Su
DNA	Deoksiribonucleicacid Deoksi Ribonükleik Asit
NILs	Near Isogenic Lines Yakın İzogenik Hatlar
PCR	Polymerase Chain Reaction Polimeraz Zincir Tepkimesi
PVP	Polyvinylprovilidone Kimyasal Madde
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA Rasgele Çoğaltılmış DNA Polimorfizmi (Markör)
RFLPs	Restriction Fragment Length Polymorphisms Restriksiyon Parçacık Uzunlukları Polimorfizmi (Markör)



RILs	Recombinant Inbred Lines Rekombinant Melez Hatları
RNase	Ribonükleaz Enzim
SCARs	Sequence Characterised Amplified Regions Dizisi Tanımlanmış Bölgelerin Çoğaltımı (Markör)
SSR	Simple Sequence Repeat Basit Dizi Tekrarları (Markör)
STMS	Sequence Tagged Mini Satellites Dizi Tanımlı Mini Satelitler (Markör)
STS	Sequence Tagged Site Hedef Dizilimli DNA Bölgeleri (Markör)
VNTR	Variable Number Tandem Repeats Değişken Sayılı Rasgele Tekrarlar (Markör)

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. Kesme gül çeşitleri .....	31
Şekil 3.2 Bahçe gül çeşitleri .....	32
Şekil 3.2 Bahçe gül çeşitleri (devam).....	33
Şekil 3.3 OP-H-06 primeri ile birbirinden bağımsız 3 farklı PCR ürününün agaroz jeldeki görünüşleri.....	40
Şekil 4.1 Gül genotiplerine ait DNA'ların % 0.8'lik agaroz jel üzerindeki görünüşleri.....	45
Şekil 4.2 OP-A-01 primeri ile PCR'da oluşan bantların agaroz jeldeki görünüşü.....	47
Şekil 4.3 OP-A-09 primeri ile PCR'da oluşan bantların agaroz jeldeki görünüşü.....	47
Şekil 4.4 OP-A-11 primeri ile PCR'da oluşan bantların agaroz jeldeki görünüşü.....	48
Şekil 4.5 OP-A-18 primeri ile PCR'da oluşan bantların agaroz jeldeki görünüşü.....	48
Şekil 4.6 OP-E-04 primeri ile PCR'da oluşan bantların agaroz jeldeki görünüşü.....	49
Şekil 4.7 OP-E-14 primeri ile PCR'da oluşan bantların agaroz jeldeki görünüşü.....	49
Şekil 4.8 OP-E-19 primeri ile PCR'da oluşan bantların agaroz jeldeki görünüşü.....	50
Şekil 4.9 OP-F-01 primeri ile PCR'da oluşan bantların agaroz jeldeki görünüşü.....	50
Şekil 4.10 OP-F-06 primeri ile PCR'da oluşan bantların agaroz jeldeki görünüşü.....	51
Şekil 4.11 OP-F-14 primeri ile PCR'da oluşan bantların agaroz jeldeki görünüşü.....	51
Şekil 4.12 OP-G-11 primeri ile PCR'da oluşan bantların agaroz jeldeki görünüşü.....	52
Şekil 4.13 OP-G-19 primeri ile PCR'da oluşan bantların agaroz jeldeki görünüşü.....	52
Şekil 4.14 OP-H-06 primeri ile PCR'da oluşan bantların agaroz jeldeki görünüşü.....	53
Şekil 4.15 OP-H-12 primeri ile PCR'da oluşan bantların agaroz jeldeki görünüşü.....	53
Şekil 4.16 OP-H-15 primeri ile PCR'da oluşan bantların agaroz jeldeki görünüşü.....	54
Şekil 4.17 OP-H-19 primeri ile PCR'da oluşan bantların agaroz jeldeki görünüşü.....	54
Şekil 4.18 OP-J-04 primeri ile PCR'da oluşan bantların agaroz jeldeki görünüşü.....	55
Şekil 4.19 OP-T-04 primeri ile PCR'da oluşan bantların agaroz jeldeki görünüşü.....	55
Şekil 4.20 OP-T-19 primeri ile PCR'da oluşan bantların agaroz jeldeki görünüşü.....	56
Şekil 4.21 Son 5 genotipe ait PCR'da oluşan bantların agaroz jeldeki görünüşü.....	56
Şekil 4.22 Genetik ilişki dendrogramı.....	60

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. DNA markör tekniklerinin uygulama aşamaları .....	15
Çizelge 2.2 Yaygın olarak kullanılan DNA markör tekniklerinin karşılaştırılması.....	17
Çizelge 3.1 RAPD analizlerinde kullanılan primerler ve baz dizilişleri.....	39
Çizelge 3.2 Gül genotipleri yerine kullanılan kod numaraları.....	42
Çizelge 4.1 Araştırmada kullanılan gül çeşitlerinin DNA miktar ve saflık değerleri...	43
Çizelge 4.2 PCR amplifikasyonları sonucu elde edilen bant sayıları, polimorfizm oranları ve yaklaşık bant büyüklükleri.....	46
Çizelge 4.3 Gül genotiplerine ait benzerlik indeksi tablosu.....	58

## 1. GİRİŞ

1960'lı yıllardan sonra DNA yapı ve işleyişinin ortaya çıkarılmasıyla hızla gelişmeye başlayan moleküler biyoloji ve moleküler markör teknolojileri, bitkilerin genetik yapılarının aydınlatılması, moleküler karakterizasyon, filogenetik çalışmalar, gen haritalamaları ve markör destekli seleksiyon teknikleriyle, diğer alanlarda olduğu gibi tarımda da yeni bir dönem başlatmıştır. Ayrıca canlıların genetik yapısında, geleneksel ıslah metotlarıyla ve doğal üreme-çoğalma süreçleriyle elde edilemeyen değişiklikler yapılması da mümkün hale gelmiştir.

Moleküler biyoloji tekniklerinin sahip olduğu avantajlar, birçok DNA markörünün ortaya çıkmasında büyük rol oynamıştır. Genellikle, enzimlerle kesilen DNA parçacık uzunluğu polimorfizmi (Restriction Fragment Length Polymorphism-RFLP), türlerin genetik farklılığını belirlemede ve genetik bağlantı haritaları tasarlamada kullanılmaktadır. Bunun yanında RFLP tekniği uygulamasının zor olması, DNA hibridizasyonunun radyoaktif maddelerle yapılması, yüksek miktar ve kalitede DNA gerektirmesi, son on yılda geliştirilen polimeraz zincir reaksiyonunun (PCR) keşfinde büyük rol oynamıştır. DNA'nın seçilebilir çoğaltılmasına olanak veren PCR tekniği, birçok yeni genetik analiz metodunun ortaya çıkmasına neden olmuştur. Polimeraz zincir reaksiyonunun yaygınlaşmasında, yöntemin basitliği ve başarısının yüksekliği büyük rol oynamaktadır.

Morfolojik markörler, genotipik tanımlama amacıyla kullanılabilir. Morfolojik markörler, kolay elde edilebilmeleri ve bazı durumlarda kullanımlarının mutlak gerekli olmasına rağmen, çevresel faktörlerden etkilenebilmektedir. Fenotipik özelliklerin genetik kontrol mekanizmasının tam bilinmemesi, yetersiz varyasyon ve bitkilerde aranan bazı fenotipik özelliklerin ortaya çıkışının uzun zaman alması, bitki ıslahçıları daha hızlı ve doğru karar vermekte yardımcı olan, DNA markör sistemlerine yönelten diğer sınırlayıcı etkenlerdir.

Gül (*Rosa*), yeryüzünde yaklaşık 35 milyon yıldan beri varlığını sürdürmektedir. Çok yaygın olarak kuzey yarıkürede yetişen güllerin, yaklaşık 250 kadar yabani türü bilinmektedir (Baytop 2001). Bu türlerden doğal ve yapay melezlemeler ve mutasyonlarla binlerce çeşit meydana gelirken, zamanla ilk olarak ıslah edilen çeşitlerin çoğu kaybolmuş, yerine yeni çeşitler geliştirilmiştir.

Yeryüzünde doğal olarak yetişen güllerle birlikte, eski çağlardan beri doğal ve yapay melezlemeler sonucu, onbinlerce gül çeşidi meydana gelmiştir. Yeni çeşit geliştirme yönündeki ıslah çalışmaları da artarak devam etmektedir. Bununla birlikte, gül yetiştiriciliğinde ilerlemiş olan ülkeler pazarlardaki paylarını, farklı özelliklere sahip birçok gül çeşidini hızlı olarak ıslah ederek korumaktadırlar. Bu nedenle, her yıl farklı özelliklere sahip yeni çeşitler ıslah edilmekte ve pazara sunulmaktadır.

Güllerin coğrafi dağılımı, poliploidi ve sık olarak yapılan tür içi ve türler arası melezlemeler nedeniyle, çeşitlerin ayrılması ve sınıflandırılması zorlaşmaktadır. Halen geliştirilen güllerin tanımlama ve sınıflandırılması morfolojik karakterlere göre yapılmaktadır.

Bitki ıslahçı hakları ve patent koruma çalışmaları için, bir zorunluluk haline gelen güllerin doğru olarak tanımlanması, morfolojik karakterler, fizyolojik metotlar veya izoenzim analizleriyle oldukça güç olmaktadır. Ayrıca morfolojik karakterlere bağlı sınıflandırma, *Rosa* cinsi içerisindeki türlerin çok sayıda ve birbirine benzeşen yapıda oluşu ve morfolojik karakterlerinin çevresel şartlara göre değişkenliği nedenleriyle uygun değildir. Bunun aksine, RFLP gibi hibridizasyon esaslı, RAPD, SSR, AFLP gibi PCR esaslı geliştirilmiş DNA teknikleriyle, güllerin doğru olarak tanımlanabileceği gösterilmiştir. Üretim materyallerinin DNA düzeyinde hızlı ve kesin tanımlamalarının yapılması, üretim aşamalarında, sertifikalandırmada ve pazarlamada ortaya çıkabilecek karışıklıkları önleme bakımından son derece önemlidir.

Bu araştırmada, gül üretimimizin temelini oluşturan bazı gül genotiplerinin, RAPD moleküler markörü kullanılarak, DNA düzeyinde tanımlamalarının yapılması ve aralarındaki genetik ilişkilerin (benzerlik veya farklılıkların) ortaya çıkarılması amaçlanmıştır.

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

### 2.1 Güllerin Yeryüzünde Yayılışı ve Tarihçesi

*Rosa* cinsi (*Rosaceae* ailesi) oldukça büyüktür. Melezleme ve doğal mutasyonlarla gelişmiş olan bugünkü bahçe gül türlerinin kesin sayısı bilinmemektedir. Güllerin çoğu, kuzey yarıkürenin ılıman bölgelerinde yetişmekte ve çoğu türün bulunduğu Asya kıtası gen merkezi kabul edilmektedir (Broertjes and Van Harten 1988). Güllerde yüksek miktarda mutasyonun olduğu ıslahçılar tarafından gösterilmiştir. Doğal mutasyonlar yaygın olarak görülmekte ve genetik tabanı genişletmektedirler (Ma *et al.* 1997).

Yokoya *et al.* (2000), yediveren özelliğini oluşturan resesif genleri taşıyan, *Rosa chinensis* Jacq. ve *R. chinensis gigantea* Coll. (*Indicae*) çeşitlerinin, yaklaşık 1800'lü yıllarda Avrupa'ya getirildiğini bildirmekte; bu çeşitlerin, *R. damascena* Mill. (*Gallicanae*), *R. moschata* Herrm. ve *R. multiflora* Thunb. (*Synstylae*) gibi kısa süreli çiçeklenen çeşitlerle melezlendiğini, yediveren özelliği gösteren modern güllerin, melezlenen bu güllerden oluştuğunu ifade etmektedir.

Modern güller, melezlemeler nedeniyle genetik orijini oldukça karışık olan, Polyant Güller  $2n (2x)=14$ , Hibrit Çay Gülleri ( $2n=3x, 4x$ ), Floribunda'lar ( $2n=3x, 4x$ ) ve Minyatür Güller ( $2n=2x, 3x, 4x$ ) olmak üzere tarımsal sınıflara ayrılmışlardır. Cairns (1993), kültürü yapılan güllerin, ev ve bahçe gülleri olarak yaygın kullanıldıklarını ifade etmekte ve listelediği 18.000'den fazla kesme gül çeşidinin ticaretinin yapıldığını bildirmektedir.

1700'lü yıllarda yapılan araştırmalara göre, Anadolu florasında 35–40 yabancı gül türü kaydedilmiştir (Boissier 1872, 1888, Crist 1888, Davis 1972). Ancak bu sayının, bazı tür ve alt türlerin, araştırmacılar tarafından farklı isimlendirilmesi nedeniyle, gerçeği yansıtmadığı, Türkiye'de 25 kadar yabancı gül türünün olduğu bildirilmektedir (Baytop 2001).

Türkiye’ de yetişen en yaygın yabancı gül türleri aşağıda verilmiştir:

- R. canina*, Kuşburnu, Köpek gülü  
*R. foetida*, Kokarca gül, Sarı gül  
*R. centifolia*, Okka gülü, Van gülü  
*R. hemisphaerica*, Sarı çiçekli yaban gülü  
*R. x damascena*, Şam gülü  
*R. x damascena var. trigintipetala*, Isparta gülü, Yağ gülü  
*R. banksiae*, Beyaz menekşe gülü  
*R. gallica*, Frenk gülü  
*R. alba*, Beyaz gül, Sakız gülü  
*R. moshata*, Misk gülü  
*R. phoenicia*, Zeybek gülü  
*R. rapinii*, Çit gülü  
*R. sempervirens*, Lâyemut gül  
*R. sulphurea* (Kükürt gülü),

Çoğu türde olduğu gibi, 1500’lü yıllardan beri, başta *R. foetida* ve *R. hemisphaerica* olmak üzere, birçok yabancı Anadolu gülünün de Avrupa’ya götürülerek, orada yaygın olarak üretildiği veya ıslah çalışmalarında kullanıldığı bilinmektedir (Baytop 2001).

Osmanlı döneminde, bazı yabancı türleri kültüre alınmış ve melezlemelerle yeni çeşitler elde edilmiştir (Baytop 2001). Bu dönemde kültürü yapılan eski bahçe gülleri şunlardır:

Acem sarısı,	Hoşab gülü	Okka gülü,
Ahmediyye gülü	Katmerli sarı,	Parlak gül
Boşnak dede gülü,	Kızanlık gülü,	Rana gül
Çardak gülü	Köpek gülü,	Sakız gülü
Fenike gülü,	Menekşe gülü	Tarçın gülü
Frenk gülü	Misk gülü	Tevrizi gül
Gül-i Sadberk	Muhammediye gülü	Van gülü
Hafız gülü	Muska gülü	Yediveren Şam gülü,
Hekimbaşı sarısı,	Nasır gülü	Ziba gülü

Güller çok eski zamanlardan beri yetiştirilmelerine rağmen, gerçek modern gülleri ortaya çıkaracak melezlemeler 19. yy'da başlamıştır. Günümüzde, dünyada en yaygın dış mekân bitkisi olan ve 35.000 kadar çeşidi bulunan modern güller, *Rosa* cinsi içindeki 120'den fazla türden, yalnızca 7 veya 8 türünün melezlenmesiyle oluşmuşlardır. Gül seleksiyonunda soğuk ve hastalıklara dayanıklılık, çiçek şekli, yediverenlik ve yaşlanma süresi gibi faktörler dikkate alınırken, yapılan melezlemeler sonucu birçok çeşitte, özellikle de çiçek şekli ve vazo ömrü özelliklerinin ön plana çıktığı, kesme çiçek üretimi için geliştirilen hibrit çay güllerinde, koku özelliğinin kaybedildiği görülmektedir.

### 2.2.1 Kromozom yapısı

Martin *et al.* (2001), *Rosa* cinsinde kromozom sayısının, ploidi düzeyine bağlı olarak *Banksianae*, *Bracteatae*, *Indicae*, *Laevigatae* ve *Synstylae* sınıflarında  $2n (2x)=14$ ; *Gallicanae*'de  $2n (4x)=28$ ; *Carolinae* ve *Pimpinellifoliae*'da  $2n (4x)=28$ ; *Caninae*'da  $2n=4x$ ,  $5x$ ,  $6x$  ve *Cinnamomeae*'da  $2n=2x$ ,  $4x$ ,  $6x$  ve  $8x$  kromozom bulunduğunu, ticari olarak yetiştirilen çoğu gül türünün ise diploid veya tetraploid yapıda olduğunu bildirmektedir.

Millan *et al.* (1996), aneuploid yapının nadir olarak görüldüğünü; *Hulthemia*, *Platyrrhodon* ve *Hesperodos* alt cinslerinin,  $2n=2x$  yapıda sadece birer türe sahip olduklarını belirtmektedir. Fernandez-Romero *et al.* (2001), *Rosa gigantea* Coll., *Rosa moschata* Herm., *Rosa multiflora* Thunb., *Rosa rugosa* Thunb. ve *Rosa sempervirens* L. türlerinin  $2n (2x=14)$ ; *Rosa chinensis* Koehne. türünün  $2n (3x=21)$ ; *Rosa gallica* L. türünün  $2n (4x=28)$  kromozom sayısına sahip olduğunu bildirmektedir.

### 2.1.2 Botanik yapısı ve güllerin sınıflandırılması

Ilıman iklim bitkileri olan gül türleri, çalimsı veya tırmanıcı yapıda ve genellikle dikenli ağaççıklardır. Alçak ve yüksek boylu türleri vardır. Yapraklar tüylü ve 3–9 yaprakçıktan oluşan bileşik yaprak şeklindedir. Çiçekler yabani türlerde genellikle yalınkat, kültür türlerinde katmerli, tek çiçekli veya salkım halinde bir arada bulunabilir. Çiçekler, beyaz, pembe, sarı veya kırmızı ana renklerden oluşmakla birlikte genellikle kokuludur.



Meyveler, açık turuncudan, turuncu, kırmızı ve bordaya kadar değişen renkte ve etli yapıda bulunmaktadır.

Türkiye’de bahçe gülü olarak yetiştirilen türler üç grup altında sınıflandırılabilir.

### **Yabani Güller**

Türkiye’de doğal olarak yetişen 25 kadar yabani tür bilinmektedir. Bunlardan bazıları çok eski zamanlardan beri kültüre alınmış, bahçelerde süs bitkisi veya çit olarak yetiştirilmiştir. Bu türlerden en yaygınları, *R. canina*, *R. foetida*, *R. heckeliana*, *R. psiformis*, *R. sempervirens* ve *R. sulphurea*’dır. Yabani türlerden bazıları ise modern yetiştiricilikte anaç olarak önemini sürdürmektedir.

### **Eski Bahçe Gülleri**

Daha önce ismini belirttiğimiz, çoğu Osmanlı ve daha önceki medeniyetler tarafından yetiştirilen bahçe gülleri, çoğunlukla yabani güller arasında yapılan melezlemelerle veya mutasyonlarla meydana gelmiş çeşitlerden oluşmaktadır.

### **Modern Güller**

Bugün yetiştiriciliği yapılan bahçe güllerinin hemen hemen hepsi, modern güller sınıfındadır. Modern güllerin çoğunu çay gülü (*R. odorata*) melezleri oluşturmaktadır. İlk çay gülü melezi, 1867 yılında Fransa’da elde edilmiş, sonraları bir çok melezlemeyle Avrupa güllerinin kışa dayanıklılık, pestisitlere dayanım, katmerli çiçek özellikleri ile Çin orijinli güllerin yediverenlik ve renk parlaklığı özellikleri modern güllere aktarılmıştır (Martin *et al.* 2001). Modern güller arasında yapılan melezlemelerle elde edilen modern güllerin sayısı 10.000’lerle ifade edilecek kadar artmıştır. Modern güller 5 grupta sınıflandırılmakla birlikte (Baytop 2001), ülkemiz açısından önemli bir yer tutan yağ gülleri de bu sınıflandırmada ayrı bir grup içine alınmıştır.

**a. Çay gülleri (Odorata melezleri):** Yetiştiriciliği yapılan bahçe güllerinin büyük bir kısmı bu grupta yer almaktadır. Çiçekleri büyük, tekli veya salkım yapılı, kokulu farklı renklerde olup yediveren (sezon boyunca çiçek açan) yapıdadırlar. Yapılan

melezlemelerle sayıları 6.000 civarına ulaşmıştır. Seralarda kesme çiçek çeşitlerini oluştururlar.

**b. Kırk Kandil gülleri (Polyant güller):** Bir çay gülünün, *R. multiflora* türü ile melezlenmesinden elde edilmişlerdir. Çok renkli çiçekli çeşitlere sahip olan polyant güllerinin çiçekleri küçük fakat salkımdaki sayıları oldukça fazladır. Güller yalınkat veya katmerlidir. Hem çalimsı hem de sarmaşık formunda olabilirler. Sarmaşık formu güller özellikle çok gösterişlidir. Bahçe düzenlemede kullanılan çeşitleri oluştururlar.

**c. Ortanca güller (Floribunda melezleri):** Bir çay gülü melezi dirler. Çiçekler çoklu yapıda, orta boyda ve farklı renktedirler. Bahçe düzenlemede kullanılan çeşitleri oluştururlar.

**d. Grandiflora melezleri:** Floribunda ile bir çay gülü melezi dirler. Çiçek ve bitki formu bakımından çay güllerine oldukça benzeyen çeşitleri, bol miktarda devamlı ve çok sayıda çiçek açarlar. Orta boylu çeşitlerin çiçekleri büyük, katmerli ve kokusuzdur. Seralarda yetiştirilen kesme çiçek çeşitlerini oluştururlar.

**e. Japon (Minyatür) güller:** Çok küçük boylarda ve küçük çiçekli çeşitlerin, *R. chinensis* var. *minima* türünden ıslah edildiği düşünülmektedir. Daha çok saksılarda, iç mekânlarda yetiştirilirler.

**f. Yağ gülleri:** Gül suyu ve gül yağı üretiminin çok eski çağlardan beri yapıldığı bilinmektedir. Gül suyunun 8. yüzyılda İran'dan Hindistan ve Çin'e ihraç edilen mallar arasında olduğu İbn-i Haldun tarafından bildirilmektedir. Gül yağı üretiminin ise ilk kez Şam'da yapıldığı ve buradan Hindistan, Cezayir, Tunus, İtalya, Fransa ve Bulgaristan'a yayıldığı, ancak sanayi olarak Bulgaristan'da geliştiği görülmektedir. Osmanlılar zamanında Suriye ve Bulgaristan birer eyaleti iken, gül yağı üreticiliği Şam'dan Bulgaristan'ın yetiştiriciliğe uygun olan Kızanlık yöresine taşınmıştır. Isparta gülü, literatürde halen Kızanlık gülü olarak geçmektedir. Ülkemizde ilk kez Bursa, Denizli (Çal) ve Manisa yörelerinde yetiştirilmiş, Isparta'ya ise 1888 yılında getirilerek bugün yetiştiriciliği yapılan alanlara dikilmiştir. *Rosa alba* (Sakız gülü, Beyaz gül) ve *R. x damascena* var. *trigintipetala* (Isparta gülü) gül yağı üretiminde kullanılmaktadır. Sakız gülünün yağ verimi az olmasına rağmen, yağı dayanıklı, fermantasyonu ve ekşimeyi

önleyici yoğunlukta ve donma derecesi üzerine etkili olması nedenleriyle, gül yağına karıştırılmak üzere az miktarda üretilmektedir (TKB 1987).

Ticari sınıflandırma, güllerin kullanım biçimlerine göre yapılmaktadır. Genellikle kesme güller, yağ gülleri, bahçe gülleri ve saksı gülleri olarak ayrılırlar.

Önemli bir gen merkezi olan ülkemizde doğal olarak yetişen, tür içi ve türler arası yapay ve doğal melezlemelerle oluşmuş çeşitlerle birlikte, çeşitli amaçlarla yurtdışından getirilmiş birçok gül tür ve çeşidi bulunmaktadır. Yüzyıllardır beğenilerek yetiştirilen güllere ait koleksiyon bahçelerinin kurulmaması, tanımlama ve ıslah çalışmalarının eksikliği nedenleriyle, elimizde bulunan gül popülasyonu hakkındaki bilgimiz çok sınırlıdır.

### **2.3 Moleküler Markör Teknikleri**

Bitkilerden DNA izolasyonu, moleküler düzeyde yapılacak analizlerin başlangıç noktasıdır. Bitkilerden DNA hazırlığı bitki türleri, doku tipi veya kullanılacak örnek tarafından belirlenmektedir. Örneğin tahıl yapraklarından yapılacak DNA ekstraksiyonu ile ağaç kabuklarından yapılacak ekstraksiyonlar, farklı izolasyon tekniklerinin kullanımını gerektirmektedir.

Genom haritalama çalışmalarında moleküler markörlerin kullanılması, çeşit geliştirme ve ıslahta hızın ve etkinliğin artmasına neden olmuştur. Moleküler markör metotlarının uygulanabilmesi için, uygun miktar ve kalitede DNA izolasyonunun yapılmış olması mutlak gereklidir. Bununla birlikte, yüksek polisakkarit içeriğine sahip bitki türlerinde bu temel gereksinimin sağlanması oldukça güç olmaktadır (Do and Adams 1991, Fang *et al.* 1992).

Moleküler çalışmalar için gerekli yüksek kalite ve miktardaki DNA elde edilmesi genellikle zordur. DNA izolasyonundaki başarı, elde edilen DNA miktarı ve kullanılabilirliğine (restriksiyon, polimeraz ve ligaz gibi enzimlerle kullanım kolaylığına) bağlıdır. Bitki organlarının farklılığı; farklı yaprak dokusu ve yaprak yaşı; doku bileşiminde bulunan, nükleik asitlerin yapısını ve saflığını etkileyen, organik kökenli kimyasallar nedeniyle her zaman iyi bir nükleik ait izolasyonu mümkün

olamamaktadır (Doyle and Doyle 1988). Bu ikincil bileşikler, DNA'nın çözülmesini engelleyerek büyük miktarda DNA kayıplarına ve sıklıkla analizlerde kullanılan enzimlerin (restriksiyon enzimleri, modifikasyon enzimleri ve DNA polimeraz enzimi gibi) çalışmamasına neden olmaktadır (Scarafani and Duranti 2001). Kimi zaman bir DNA izolasyon yöntemi, bitkiden bitkiye göre farklı izolasyon sonuçları vermekte, hatta başka türlerle çalışmaya olanak vermemektedir. Başarılı bir izolasyonunun aşamaları şöyledir:

- Hücre duvarları, hücre içi madde ve organellerin uzaklaştırılması için parçalanması. Bu genellikle kuru buz içerisinde veya sıvı azot yardımıyla dondurarak yada sıcak tampon izolasyon çözeltisiyle havan içerisinde ezmeyle yapılmaktadır.
- DNA'nın izolasyon tamponuna geçmesi için hücre duvarlarının parçalanması işlemi genellikle SDS (Sodyum Dodezil Sülfat) veya CTAB (Cetyl methyl tri-ammonium bromide) gibi deterjanlar kullanılarak yapılmaktadır.
- DNA içsel nükleazlardan korunması. Bu amaçla EDTA (Ethylene di-amin tetra acetic acid) gibi deterjanlardan yararlanılmaktadır. EDTA, nükleazların çalışmasında ko-faktör olan  $MgCl_2$  iyonlarını ( $Mg^{+2}$ ) bağlayan şelatlaştırıcı bir maddedir. Daha sonra DNA'dan proteinlerin ayrılması ve parçalanması için fenol veya kloroform çözeltisi içerisinde muamele edilir.
- DNA kırılmalarının azaltılması. Çözelti içerisindeki DNA kuvvetli çalkalanmalar veya karışırtmalar nedeniyle kırılabilir. Çok hassas yürütülmeyen bir DNA izolasyonu işlemi sonunda 50–150 kb'lik uzunlukta DNA'lar elde edilebilmektedir.

Çoğu bitki yaprağında bulunan polifenoller, polisakkaritler, tanenler ve reçineler, DNA izolasyonunda saf bir DNA elde edilmesini olumsuz etkileyen ikincil bileşiklerdir. Enzim çalışmalarını baskılayan polisakkaritler, genellikle DNA ile birlikte bulunurlar. Özellikle, sıvı azot yardımıyla dondurulmuş yaprakların parçalanması aşamasında, izolasyon tampon çözeltisi içerisinde bulunan yüksek oranda polisakkarit tarafından jelatinimsi, yapışkan ve koyu kıvamlı bir çözelti oluşturulmaktadır. Bu çözelti içerisinden DNA'ların temizlenmesi oldukça güç olmakla birlikte, polisakkaritleri temizlemede kullanılan  $CsCl_2$  (Sezyum klorit) gibi izolasyon metotları da pahalı ve zaman alıcıdır.

Kaufman *et al.* (1999), DNA izolasyonu aşamasında karbonhidratlar ve nükleik asitlerin birlikte çökerek, DNA'yı yapışkan bir eriyik içerisine hapsettiğini, bunun ise DNA'nın tekrar temizlenmesini zorlaştırdığını ifade etmektedirler. Araştırmacılar moleküler analizler için gerekli temizlikteki DNA'yı elde edebilmek için bir yöntem geliştirmişlerdir. Bu yöntemde DNA, hücre duvarlarının parçalanması aşamasının ardından, hücreler arası ve sitoplazmik kökenli akışkanların oluşturduğu viskoz ortamdan, santrifüjlemeyle ayrılarak, problem oluşturan karbonhidratlardan temizlenmektedir. Böylece, çekirdekten herhangi bir kirlenme olmadan izole edilen DNA, kesim enzimleriyle (restriction endonuclease digestion) yapılan veya polimeraz zincir reaksiyonu çoğaltması çalışmalarında başarıyla kullanılmıştır.

DNA izolasyonunda kalite miktarı etkileyen diğer önemli faktörler ise; DNA iplikçiklerinin istenmeyen kırılmaları, ikincil bileşiklerin (polifenoller gibi) *de novo* oluşumu ve araştırmacının el yatkınlığıdır (Scarafani and Duranti 2001). DNA kalite ve miktarını etkileyen başka bir faktör de bitki dokusunun yaşıdır. Büyüme sezonunun sonlarına doğru, olgun yapraklardan elde edilen DNA'nın saflaştırılması, kalın hücre duvarı, yüksek oranda endonükleaz, polisakkarit, fenolik bileşik içeriği nedenleriyle zordur. Baklagil bitkilerinin yaprakları, izolasyon işleminde özellikle polifenolik bileşiklerin *de novo* oluşumuna neden olmaktadır. Bu nedenle baklagil bitkilerinde, özellikle genç yaprakların kullanılması önerilmektedir (Scarafani and Duranti 2001).

Gül yapraklarında DNA'yı degrade eden birçok makro molekül bulunmaktadır. Bu durumda bir antioksidant olan 2-mercaptoethanol, fenolik bileşikleri bağlayan PVP kullanılması, santrifüjleme ile bunların ortamdan uzaklaştırılması (Kuhns and Fretz 1978) ve devamında yapılacak olan fenol ekstraksiyonu ve jel filtrasyonu gibi saflaştırma işlemleri gereklidir. Okuda (1992), fenolik bileşik çeşidi ve miktarlarının gül türleri arasında farklılık gösterdiğini, bunun ise elde edilecek DNA miktarlarını etkilediğini bildirmekte, tanen içermeyen *R. wichuraiana* Crep türünden iyi miktarda DNA elde edilmesinin çok kolay; yüksek düzeyde tanen içeren *R. rugosa* Thumb. türünde ise oldukça zor olduğunu ifade etmektedir. Araştırmacılar bu durumda, bir antioksidant olan merkaptoetanol, fenolik bileşikleri bağlayan PVP kullanılması, bunların daha sonra santrifüjleme ile ortamdan uzaklaştırılması ve fenol ekstraksiyonu yapılması gerektiğini belirtmişlerdir.

Bitki DNA'ları farklı izolasyon işlemleri sırasında farklı etkileşimler içerisinde olabilmekte bu nedenle bir bitki grubunda çalışan bir yöntem, diğer bitki gruplarında çoğunlukla başarısızlığa uğramakta, bitki ve bitkinin ikincil bileşenlerinin farklılığı nedeniyle beklenen sonuç her zaman alınamamaktadır (Doyle and Doyle 1988). DNA izolasyonunda kullanılan eski metotlarda, kullanılan yüksek doku miktarı, değerli olan (özellikle doku kültürü materyalleri) dokuların kaybına neden olmakla birlikte, düşük miktarda DNA elde edilmesiyle sonuçlanmaktadır. Ayrıca sezyum klorür metodunda olduğu gibi, DNA izolasyonu için bazı metotların oldukça pahalı ve uzun süreç gerektirdiğini ifade eden Doyle and Doyle (1988), küçük miktarlardaki dokulardan yüksek miktarda DNA elde edilmesine olanak veren, nispeten daha ucuz ve uygulaması kolay olan CTAB esaslı izolasyon tekniğini geliştirmişlerdir. Geliştirdikleri yöntem genel bir nükleik asit izolasyon tekniği olup, ceviz, meşe, kayın ağacı, eğrelti otları ve çamgiller gibi çok yıllık bitkilerde; lahanagiller, semizotu gibi tek veya iki yıllık bitkilerde; bitki alemi dışında böceklerde de DNA izolasyonuna olanak vermektedir. Araştırmacılar, ceviz ve meşe ağacı gibi yüksek oranda polifenol içeren dokulardan izolasyonda, % 1 oranında PVP kullanımının; yoğun ve yapışkan bir yapı oluşturan polisakkaritlerin ortadan kaldırılması için, kullanılan CTAB oranının artırılmasının başarılı sonuç verdiğini bildirmektedirler.

Gül yapraklarından DNA izolasyonunda karşılaşılan en önemli sorun, saf bir DNA elde edilmesini engelleyen birçok sekonder kimyasal bileşiğin bulunmasıdır. Bunlar içerisinde en önemlileri polifenoller ve polisakkaritlerdir. Polifenoller ekstraksiyondan sonra DNA'nın saklanması aşamasında okside olarak DNA'yı parçalamaktadırlar. Polisakkaritler, DNA ile birlikte çökerler ve DNA'nın çözünmesini tamamen engellerler. DNA çözünse bile, diğer aşamalarda enzim aktivitesini engellemektedirler. Polisakkaritlerin bu olumsuz etkileri;

- Doğrudan kirletici bir madde oluşu,
- DNA'nın çökmesini engeller veya onunla birlikte çökmesi,
- Kirletici diğer maddeleri de bünyesine bağlayarak dolaylı olarak DNA'nın temizlenmesine engel olması,
- Yapılan analizler sırasında kullanılan enzimlerin aktivitesine engel olması veya tamamen durdurmasıdır.

Moleküler biyoloji tekniklerinin sahip olduğu avantajlar, çok sayıda DNA markörünün ortaya çıkmasında büyük rol oynamıştır. Genellikle, enzimlerle kesilen DNA parçacık uzunluğu polimorfizmi (Restriction Fragment Length Polymorphism-RFLP), birçok türün genetik farklılığını belirlemede ve genetik bağlantı haritaları tasarlamada kullanılmaktadır (Botstein *et al.* 1980). Bunun yanında RFLP zor bir teknik olup, DNA hibridizasyonu gerektirmektedir. Son on yıl içerisinde, polimeraz zincir reaksiyonunun keşfedilmesi, DNA'nın seçilebilir çoğaltılmasına olanak veren, birçok yeni genetik analiz metodunun ortaya çıkmasına neden olmuştur (Erlich 1989). Polimeraz zincir reaksiyonunun yaygınlaşmasında, yöntemin basitliği ve başarısının yüksekliği büyük rol oynamaktadır. Fakat DNA zincirinin sırasına ait ön bilgi gerektirmesi, yöntemi uygulamada kısıtlayan en önemli faktördür. Bu sorun, herhangi bir genomda DNA'nın, rasgele primerlerle analiz yöntemlerinin geliştirilmesi için itici faktör olmuştur (Welsh and McClelland 1990, Williams *et al.* 1990).

DNA sıralamasını belirlemede ve moleküler tanımlamada kullanılan RAPD yönteminin başarısını, az miktardaki DNA ile yüksek oranda polimorfizm yakalaması oluşturmaktadır (Williams *et al.* 1990).

Jeffreys *et al.* (1985), tarafından geliştirilen metot, ilk olarak DNA parmak izi terimini ve orijinal anlamını ortaya çıkarmıştır. Tanımlanan bu teknik, yüksek polimorfizme sahip DNA parçacıklarının, çoklu lokuslar için spesifik, rasgele problemlerle hibridizasyonu ve enzim kesimi sonucu oluşan parçacıkların elektroforez ile ayrılmasıyla tanımlama esasına dayanmaktadır. DNA parmak izi yöntemleri çoğunlukla, minisatellit ve mikrosatellitler gibi yüksek değişkenliğe sahip, arka arkaya tekrar eden DNA dizilimlerini hedef almaktadırlar. 9–100 baz çifti uzunluğundaki bu dizilimler, bir lokusta yüzlerce kez tekrar etmektedirler. Genomun herhangi bir yerindeki telomerik bölgesinde binlerce minisatellit lokusu bulunmaktadır. 1-6 baz uzunluğuna sahip mikrosatellitler veya basit sıra tekrarları (Simple Sequence Repeat, SSR), her lokusta birkaç kez veya birkaç yüz kadar tekrar etmektedir. Genom içerisinde, transkripsiyon üniteleri içeren  $10^5$  kadar lokus, dağınık olarak bulunmaktadır. Son yıllarda, genotip belirlemedeki yüksek kapasitesi nedeniyle, tek nükleotid polimorfizmine yönelik tekniklerde önem kazanmaktadır.

Farklı birçok moleküler markör tekniği olmasına rağmen, Karp *et al.* (1998) ve Henry (2001) bunları başlıca üç temel teknik grup altında toplamışlardır:

1. RFLP (Kesim enzimlerince oluşturulan DNA parçacık polimorfizmi)
2. PCR (Polimeraz Zincir Tepkimesi)
3. Dizi Analizi

DNA'nın kesim enzimlerince kesilerek, oluşan DNA parçacıklarının elektroforezle ayrılması ve parçacıkları ayıran hibridizasyon problemleriyle muamelesi aşamalarını içeren Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), klasik DNA parmak izinin temel tekniğidir. Spesifik enzim-prob bileşiminin yüksek oranda polimorfik bant deseni oluşturması ve RFLP'nin kodaminant bir markör olması, genetik analizlerde oldukça doğru ve kesin sonuçlar vermektedir. Polimorfizm genellikle, basit tekrarların kopya sayılarındaki değişimlerden (Variable Numbers of Tandem Repeats-VNTRs) kaynaklanmaktadır. Oluşturduğu yüksek orandaki polimorfizm, karakterizasyon çalışmalarında VNTR'leri güçlü bir teknik yapmaktadır. Polimeraz zincir tepkimesi teknolojisinin geliştirilmesi (Saiki *et al.* 1988), moleküler tanımlamada kullanılacak birçok yeni tekniğin ortaya çıkışına sebep olmuştur. Bunlar içerisinde en fazla kullanılan teknik, RAPD ve bunun benzerleri olan tekniklerdir (Williams *et al.* 1990, Welsh and McClelland 1990). RAPD tekniği, çoğunlukla 10 veya 20 baz uzunluğuna sahip tek ve rasgele seçilmiş bir primerle, rasgele genomik DNA sıralarının binlerce kez kopyalanması esasına dayanmaktadır. Üretilen parçacıklar, DNA'nın karşılıklı kolları üzerindeki, kopyalanabilecek kadar birbirine yeterli uzaklıkta ve primerle uyumlu olan kısa genom bölgelerinden kaynaklanmaktadır. RAPD çalışması için fazladan hibridizasyona veya DNA sırasının bilinmesine ihtiyaç bulunmamaktadır. Yöntem, karmaşık bir laboratuvar gerektirmediği gibi, otomasyon için de uygundur. Bunun yanında RAPD tekniği, tekrarlanabilirlik problemleri olan dominant markörlerle çalışmaktadır

Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP), özellikle RFLP ve RAPD arasında yer alan bir tekniktir (Zabeau and Vos 1993, Vos *et al.* 1995). AFLP'nin ilk basamağı, genomik DNA'nın enzimlerce kesilmesidir. Bunu, kesilmiş parçacıkların PCR'la bilinçli çoğaltılması takip etmektedir. Son olarak geliştirilen flüoresan işaretli



primerlerin kullanımıyla, AFLP tekniği otomasyona uygun hale getirilmiştir. AFLP tek bir seferde genomun büyük kısmının analizi için etkili ve RFLP'de olduğu gibi tekrarlanabilirliği yüksek bir metottur.

PCR basit sıra dizilimlerini tespit etmek amacıyla da kullanılmaktadır. Lokusların her birindeki tekrarlanan sıraların benzer olduğu durumlarda, bunlara uygun primerler tasarlanabilmekte ve SSR'ları içeren hedef bölgeler çoğaltılabilmektedir. Sequence Tagged Microsatellit (STMS) yüksek tekrarlanabilirliğe ve seçiciliğe sahip, tek veya çok lokuslu kodominant markrdr (Akkaya *et al* 1992, Wu and Tanksley 1993).

RFLP, RAPD, AFLP ve SSR, DNA parçacıklarının byklğne dayalı polimorfizmin belirlenmesinde kullanılmakla birlikte, DNA parçacıklarının dizi analizlerine tabi tutulmadan, nükleotid polimorfizmini ortaya çıkarmak amacıyla geliştirilmişlerdir.

DNA dizileri, temel olarak filogenetik çalışmalarda, örnekler arasındaki ilişkileri incelemek amacıyla çoğaltılmaktadır. Yöntem, tanımlanmış kısa bölgelerin nükleotid dizilimini belirlemeyi ve bu dizilimlerin başka bir sistematik grupta yer alan örneklerdeki değişimine bağlı, sistematik analizlerini içermektedir. Son yıllarda dizi analizlerinde, spesifik DNA kısımlarının oğaltılmasında PCR tekniğinin ve dizi analizlerinde otomasyonun sağlanması nedenleriyle büyük ilerlemeler olmuştur.

DNA markör teknikleri genotipik tanımlamalarda, kültüre alınmış ve yabani bitkilerin genetik farklılık analizlerinde, yaygın uygulama alanı bulmaktadır. Çizelge 2.1'de DNA markör tekniklerinin uygulama aşamaları görülmektedir.

Çizelge 2.1 DNA markör tekniklerinin uygulama aşamaları

<b>RFLP</b>	<b>RAPD</b>	<b>STMS</b>	<b>AFLP</b>
Prob tanımlama ↓ Enzimle kesim ↓ Southern blotting ↓ Probla işaretleme ↓ Hibridizasyon ↓ Markör taraması	PCR çoğaltması ↓ Elektroforez ↓ Markör taraması	Genom bilgisi ↓ SSR dizisi tanımlanma ↓ Dizi analizi ↓ Primerlerin sentezi	Çift enzimle kesim ↓ Adaptör bağlanması ↓ 2 seçici primer ↓ PCR çoğaltması ↓ Uygun primerlerin tasarımı

## 2.4 Moleküler Markörlerin Uygulama Alanları

### 2.4.1 Genotipik tanımlama

Klasik morfolojik markörler, genotipik tanımlama amacıyla kullanılabilir. Morfolojik markörler, kolay elde edilebilmeleri ve bazı durumlarda kullanımları mutlak gerekli olmasına rağmen, çevresel faktörlerden etkilenebilmekte ve yanlış kararlara yol açabilmektedirler. Fenotipik özelliklerin genetik kontrol mekanizmasının tam bilinmemesi, yetersiz varyasyon ve aranılan fenotipik özelliklerin, uygun büyüme aşamasında ortaya çıkışının uzun zaman alması, bitki ıslahçıları daha hızlı ve doğru karar vermekte yardımcı olan, markör sistemlerine yönelten diğer sınırlayıcı etkenlerdir. Moleküler markörlerin, morfolojik karakterlere göre avantajları şunlardır:

1. Dokuya bağlı olmayan yüksek polimorfizm düzeyi,
2. Çevresel faktörlerden en az etkilenme,
3. Basit kalıtsal yapıya sahip olmaları.

DNA markör teknikleri birçok türde çeşit tanımlamak amacıyla kullanılmaktadır. Bunlar, tahıl ve yalancı tahıl (*Echinochloa* spp., *Hordeum* spp., *Oryza* spp., *Secale cereale*, *Triticum* spp. ve *Zea mays*), yağlı tohumlu (*Arachis* spp., *Brassica* spp. ve *Glycine* spp.), baklagil (*Cicer* spp., *Lens culinaris*, *Pisum sativum*, *Phaseolus* spp. ve

*Vigna* spp.), şeker (*Beta* spp. ve *Sacchaum* spp.), sebze (*Capsicum* spp., *Cucumis sativus*, *Lycopersicon esculentum*, *Solanum* spp.ve *Raphanus* spp.) ve meyve ağacı (*Anacardium occidentale*, *Citrus* spp., *Mangifera indica*, *Malus* spp., *Musa* spp., *Prunus* spp., *Pyrus* spp., *Rubus* spp. ve *Vitis* spp.) gibi bitki türlerini içermektedirler. Weising *et al.* (1995), Ayad *et al.* (1997), Karp and Edwards (1997), Karp *et al.* (1998) ve Henry (2001), bitkilerde genetik tanımlama amaçlı olarak kullanılan moleküler tekniklere ait detaylı bilgiler vermektedirler.

#### **2.4.2 Çeşit tescili**

DNA markör tekniklerinin diğer önemli bir uygulaması, yeni bitki çeşitleri için destek bir tescil sistemi olarak kullanılmasıdır. Tescile önerilen çeşidin, diğer çeşitlerden farklılığı, birörnekliliği ve genetik olarak durulmuşluğu tanımlanmalıdır. Bu ölçütlerin test edilebilmesi için, morfolojik veriler temel alınmaktadır. Şu an için DNA markör sistemleri, bitki çeşitlerinin tescilinde tek başına bir tanımlama aracı olmamakla birlikte, ıslahçılar kendi çeşitlerini korumak için, destek bir sistem olarak moleküler markör tekniklerinden yararlanmaya başlamışlardır. Moleküler teknikler, özellikle yeni bir çeşidin var olan başka bir çeşitle arasında morfolojik olarak çok az farklılığın bulunduğu durumlarda kullanılmaktadır.

DNA markör teknikleri, tohumluk ticaretinde ve ıslahçı haklarında ortaya çıkan, bazı problemlerin kesin olarak çözümlenmesinde de kullanılabilir.

Budak *et al.* (2004), yaygın olarak kullanılan moleküler markör tekniklerinin avantaj ve dezavantajlarını karşılaştırmalı olarak vermektedir (Çizelge 2.2).

Çizelge 2.2 Yaygın olarak kullanılan DNA markör tekniklerinin karşılaştırılması

Markör Adı	Avantajları	Dezavantajları
<b>Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Yüksek genetik bilgi</li> <li>2. Ko-dominant markör</li> <li>3. Yüksek tekrarlanabilirlik</li> <li>4. Filtreler çok kez kullanılabilir</li> <li>5. Genomu iyi ifade eder</li> <li>6. Bütün türlerde uygulanabilir</li> <li>7. DNA dizi bilgisi gerektirmez</li> <li>8. Güvenli</li> <li>9. Harita tabanlı klonlama için gerekli</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Yüksek kalite ve miktarda DNA gerektirir</li> <li>2. RAPD’de göre zor</li> <li>3. Otomasyonu zor</li> <li>4. Radyoaktif etiketleme gerektirir</li> <li>5. Problemlerin klonlanması ve tanımlanması gerekir</li> </ol>
<b>Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Yüksek genetik bilgi verir</li> <li>2. Genomu iyi ifade eder</li> <li>3. DNA dizi bilgisi gerektirmez</li> <li>4. Otomasyon için uygun</li> <li>5. Az miktar ve orta kalitede DNA gerektirir</li> <li>6. Radyoaktif işaretleme gerektirmez</li> <li>7. Göreceli olarak kolay</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Dominant markör</li> <li>2. Düşük tekrarlanabilirlik</li> <li>4. Bütün türlerde uygulanamaz</li> </ol>
<b>Simple Sequence Repeat (SSR)</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Yüksek genetik bilgi verir</li> <li>2. Genomu çok iyi ifade eder</li> <li>3. Yüksek tekrarlanabilirlik</li> <li>4. Yüksek polimorfizm</li> <li>5. Otomasyonu kolay</li> <li>6. Radyoaktif işaretleme gerektirmez</li> <li>7. Çoklu allellerle çalışılabilir</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. DNA dizi bilgisi gerektirir</li> <li>2. Çok güvenli değil</li> <li>3. Bütün türlerde uygulanamaz</li> </ol>
<b>Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Yüksek genetik bilgi verir</li> <li>2. Yüksek polimorfizm</li> <li>3. DNA dizi bilgisi gerektirmez</li> <li>4. Bütün türlerde uygulanabilir</li> <li>5. Küçük RFLP parçacıkları ile çalışabilir</li> <li>6. Kontig haritaları hazırlamaya uygun</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Çok hassas olması, bant desenlerini etkileyebilir</li> <li>2. Kararlı haritalar oluşturamaz</li> <li>3. İyi seçilmiş primerler gerektirir</li> </ol>
<b>Sequence Tagged Site (STS)</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Kontig haritaları hazırlamaya uygun</li> <li>2. Radyoaktif işaretleme gerektirmez</li> <li>3. Genomu çok iyi ifade eder</li> <li>4. Yüksek polimorfizm</li> <li>5. Filtreler çok kez kullanılabilir</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Zor bir tekniktir</li> <li>2. Hedef bölgelerdeki mutasyonu belirleyemez</li> <li>3. DNA dizi bilgisi gerektirir</li> <li>4. Primerlerin klonlanması ve tanımlanmasını gerektirir.</li> </ol>
<b>Izo Enzimler</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Evrim çalışmaları için uygun</li> <li>2. İzolasyonu, DNA izolasyonundan kolay</li> <li>3. Bütün türlerde uygulanabilir</li> <li>4. Radyoaktif işaretleme gerektirmez</li> <li>5. DNA dizi bilgisi gerektirmez</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Tekniğin uygulaması zor</li> <li>2. Polimorfizm sınırlı</li> <li>3. Dokunun lokasyonu bilinmeli</li> <li>4. Pahalı otomasyonu kolay değil</li> </ol>

### 2.4.3 Islah hatlarının tanımlanması ve tohum saflık testleri

Islah programlarının yürütülmesi aşamasında, ortaya çıkan birçok durum nedeniyle, melez hatlarının tanımlanmasını gerektirmektedir (Henry 1997). Islah çalışmalarında etiketlemeden dolayı ortaya çıkan karışıklıklar nedeniyle, büyük miktarlarda ıslah hattı kaybedilebilmektedir. Islah hatları ve ticari çeşitlerin, tohum örneklerinin karıştırılması veya arazide meydana gelen karşılıklar nedeniyle saflıkları bozulabilmektedir.

Stockton and Gepts (1994), insan minisatellit problemlerinden 33.15 ve M13 tekrar dizilimlerini, fasulyede iki F<sub>6</sub> geri melezine ait hatları ayırmada kullanmışlardır. Waycott and Fort (1994), RAPD markörleri kullanarak, marula ait yakın ıslah hatlarının tanımlanmasını yapabilmışlardır. Kaemmer *et al.* (1995), domates ıslah hatlarının saflık testlerinde, SSR markörlerinin kullanılabilirliğini ispatlamışlardır. Tivang *et al.* (1996), RAPD tekniğini kullanarak enginar ıslah popülasyonları içerisinde ve popülasyonlar arasındaki varyasyonu göstermişlerdir. Roose and Stone (1996), RAPD ve RFLP markörlerinin, kuşkonmazda F<sub>2</sub> tohumlarından F<sub>1</sub>'leri ayırmada kullanılabileceğini kaydetmiştir. Phippen *et al.* (1997), fenotipik olarak ayrılamayan "Golden Acre" lahanaya ait hatları ayırmada moleküler markörleri kullanmıştır.

### 2.4.4 Hibrit çeşit saflık testleri

F<sub>1</sub> hibrit çeşit üretimi, birçok ticari üründe başarıyla yapılabilmektedir. Hibrit geliştirilmesi aşamalarında, istenmeyen polen bulaşmaları ve dişi hatların kendine tozlanması nedenleriyle saflık bozulabilmektedir. Bir hibridin geliştirilmesi için yapılan melezleme işleminin başarısını ve hibrit saflığını belirlemek amacıyla moleküler markörler kullanılmaktadır. Birçok çeşitte, erkek ebeveyne özel moleküler markörler kullanılarak, erken fide aşamasındaki gerçek hibritlerle, saf olmayan hatlar ayrılabilir (Hashizume *et al.* 1993, Crockett *et al.* 2000).

#### **2.4.5 Cinsiyet belirleme**

Erkek ve dişi bitkilerin erken aşamada tanımlanması, dioik türlerin ıslah programlarının etkili bir şekilde yürütülmesini sağlamaktadır. Jiang and Sink (1997) kuşkonmazda, cinsiyet lokuslarına 1.6 cM uzaklıkla bağlı olan SCAR markörleri geliştirmişlerdir. Reamon Buttner and Jung (2000), dişi kuşkonmaz kromozomlarını, erkeklerden ayırabilen ko-dominant STS markörü geliştirmişlerdir.

#### **2.4.6 Genetik çeşitliliğin belirlenmesi**

Moleküler markörlerin, bitki türlerinin genetik çeşitliliğini belirlemede iyi bir teknik olduğu kanıtlanmıştır (Karp *et al.* 1998). Gen kaynaklarının tarımsal değeri, adaptasyonu ve performansını belirlemede markör tekniklerinin kullanılması, bitki ıslahçılarına doğrudan yararlı bilgiler sunmaktadır.

#### **2.4.7 Gen kaynaklarının genetik kökeni**

Moleküler markörler, gen kaynaklarının tüm genetik kökenleri hakkında oldukça yararlı bilgiler sağlamaktadırlar. Bu bilgiler ıslahçılar için, özellikle nadir bulunan genleri içeren, gen kaynaklarının kullanılabilirliğine karar vermede önemlidir.

Las Heras Vazquez *et al.* (1996), RAPD analizleri sonucunda, DNA bantlarının % 50'sinden fazlasını tüm hatlar arasında benzer olarak bulmuş ve biber ıslah hatlarının oldukça dar bir genetik tabana sahip olduğunu ortaya çıkarmıştır. Villand *et al.* (1998), tüm dünya çeşitlerinin oluşturduğu bir domates koleksiyonunda, güney Amerika kökenli örneklerin, eski dünya çeşitlerinden daha fazla genetik çeşitliliğe sahip olduğunu bulmuştur. Horejsi and Staub (1996), RAPD analizlerini kullanarak, hıyar elit hatlarında ve 118 çeşitte sınırlı genetik çeşitliliği kaydetmiştir. Shim and Jorgensen (2000), yürüttükleri AFLP analizleri ile 1974–1976 yıllarında var olan, kültüre alınmış eski ve yabancı havuç çeşitlerinin, yeni ıslah edilen F<sub>1</sub> hibrit çeşitlerinden daha fazla heterojen yapıya sahip olduklarını belirlemişlerdir.

#### 2.4.8 Tarımsal performansın ve adaptasyon yeteneğinin tahmini

Moleküler çeşitlilik analizlerine dayalı olarak geliştirilen, çeşitlere ait sınıflandırmalar, bazı yaygın tarımsal ve fizyolojik özellikler hakkında önemli bilgiler verebilmektedir. Kimi zaman genetik çeşitlilik analizleri, bazı özellikler için tarama yapılmadan da, çeşitlerin adaptasyon yeteneklerini belirlemede kullanılabilirler.

Bradley *et al.* (1996), markör tekniği yardımıyla, Avustralya sarımsak çeşitlerini erkenci ve erkenci olmayan çeşitler olarak gruplamış ve gruplar içerisinde büyüme sezonuna bağlı farklılıklar olduğunu göstermiştir. Al Zahim *et al.* (1997), 27 sarımsak çeşidini, RAPD analizleri ile erkenci ve erkenci olmayanlar olarak gruplayabilmiştir. D' La Thierry *et al.* (1997), soğan çeşitlerini coğrafi kökenlerine bağlı olarak sınıflandırmada RAPD analizlerini kullanmıştır. Dubreuil and Charcosset (1999), mısırdaki melezleme için uygun ebeveyn seçiminde, RFLP tekniğinin yararlı olduğunu göstermişlerdir. Skot *et al.* (2002) tarafından yürütülen AFLP analizleri, soğuk toleransına sahip, *Lolium perenne* popülasyonunu diğer popülasyonlardan bariz olarak ayırabilmiştir.

#### 2.5 RAPD Analizlerinin Uygulama Alanları

Ucuz ve kısmen basit olması nedeniyle, RAPD tekniği biyolojinin birçok alanında yaygın kullanım alanı bulmuştur.

##### 2.5.1 Genotipik Tanımlama

Takashi *et al.* (1997), 14 *Paeonia suffruticosa*, 1 sarı çiçekli *Paeonia lutea*, 1 *Paeonia lactiflora*, 4 sarı çiçekli *Paeonia lutea x Paeonia suffruticosa* melez çeşidini ve 1 *Paeonia lactiflora x (Paeonia lutea x Paeonia suffruticosa)* melezi ağaç türünü tanımlamak amacıyla, RAPD analizleri yapmışlardır. Araştırmacılar, daha önceden peroksidaz ve asit fosfataz izoenzim bant desenlerini kullanarak tanımlayamadıkları tür ve çeşitlerin, polimorfizm düzeyi yüksek 14 adet dekamerlik RAPD primer yardımıyla, genetik ayrımını yapmışlardır. Sonuçta, *Paeonia suffruticosa* türüne ait çeşitler arasında yüksek benzerlik bulunmasına rağmen, *Paeonia suffruticosa* çeşitlerinin *Paeonia lutea* ve *Paeonia lactiflora* türlerden bariz olarak ayrıldığı, *Paeonia suffruticosa* ve *Paeonia lutea* melezi ağaç çeşitlerinin ise her iki ebeveynle benzerlikler taşıdıkları

kaydedilmiştir. RAPD markörlerinden elde edilen bulgular morfolojik verilerle kısmen uyumlu olmasına rağmen, taç yapraklardaki antosiyanin miktarı ile ilişkili bulunmamıştır.

Vorster *et al.* (2002), genetik yapıları birbirine çok yakın olan bitki tür veya çeşitlerinin, çok az sayıda bulunan, farklı gen kodlayıcı bölgelere veya genomun tekrarlı olarak düzenlendiği bölgelerdeki değişikliklere bakılarak tanımlanabileceğini belirtmektedirler. Scribner and Pearce (2000), bu tekniklerden bağlı gen bölgelerindeki (rDNA intergenic regions) ve mikro satellitler olarak bilinen (SSR), basit sıra dizilimlerdeki farklılıkları kullanarak, Kasımpatı ve *Citrus* çeşitlerinin tanımlamasını yapmışlardır. Bununla birlikte, Welsh and McClelland (1990), Williams *et al.* (1990), Vos *et al.* (1995), O'Hanlon *et al.* (2000), bitki farklılıklarını belirlemede en fazla kullanılan tekniklerin RAPD ve AFLP markör teknikleri olduğunu bildirmektedirler.

Kısa bir süre önce, çeşitlerin kesin olarak tanımlanması amacıyla DNA analizleri geliştirilmiştir. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)'nin kullanıldığı (Williams *et al.* 1990) Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) analizleri, morfolojik karakterlerle kısmen yapılabilen tanımlamalara karşın, çeşitlerin ve klon bitkilerin tanımlanmasında başarıyla kullanılmaktadır (Mori *et al.* 1993, Wolff and Van-Rijin 1993, Villordon and LaBonte 1995). Porsuk ağaçlarının RAPD markörleri kullanılarak tanımlanması ve orijinlerinin araştırılması üzerine birçok yayın bulunmakla beraber (Aruna *et al.* 1995, Fabbri *et al.* 1995, Luo et al. 1995, Ozaki *et al.* 1995), dış mekân ağaçları üzerinde yapılan çalışmalar sınırlıdır. RAPD markörleri yardımıyla, Ormangülü (Iqbal *et al.* 1995, Kobayashi *et al.* 1995), Gül (Torres *et al.* 1993b) ve Kızıl Akçaağaç (Krahi *et al.* 1993) tür ve çeşitlerinin ilişkileri araştırılmıştır.

### **2.5.2 Genetik haritalama**

RFLP (Restriction fragment length polymorphism) tekniği, gen haritaları oluşturmada yaygın olarak kullanılmaktadır (Botstein *et al.* 1980). Bu teknik restriksiyon enzimleriyle kesilen DNA parçacıklarının, radyoaktif problemlerle hibridizasyonu (southern blot) esasına dayanmaktadır. İyi seçilmiş bir problemlerle, kesilen DNA parçacıkları üzerindeki, kazanılmış veya kaybedilmiş baz dizilimleri arasındaki farklılıkları belirlemek mümkün olmaktadır (White *et al.* 1985, White and Lalouel 1988). RFLP



teknığının, uygulamasındaki zaman kayıpları, radyoaktif malzeme kullanımının getirdiği zorluklar, yüksek miktar ve kalitede DNA gerektirmesi nedenleriyle, nanogram miktarlarda DNA'ya ihtiyaç duyulan, üretilen parçacıkların doğrudan görüntülenebildiği, PCR teknolojisi üzerine dikkatler yoğunlaşmaktadır. PCR, minisatellit, makrosatellitler ve STS (Sequence Tagged Site) lokusları kullanılarak, genetik haritalamaya olanak vermesine rağmen, seçici primer dizaynı için, başlangıç baz dizilimi bilgisine ihtiyaç göstermesi, herhangi bir organizmada fazla miktarda genetik markör geliştirilmesini sınırlamaktadır (Goodier and Davidson 1993).

DNA parçalarını çoğaltmada kullanılan rasgele dizilimler yani RAPD kullanılarak, PCR analizlerinde başlangıç DNA dizilimi bilgisinin gerekliliği ortadan kaldırılmıştır. RAPD tekniği yonca (Kiss *et al.* 1993), soya fasulyesi (Torres *et al.* 1993a) ve elma gibi birçok bitkide (Hemmat *et al.* 1994), yüksek duyarlı genetik haritalama çalışmalarının, göreceli olarak kısa bir sürede yapılmasını teşvik etmiştir. RAPD markörlerinin dominant karakterli olması, haritalama çalışmalarında dezavantajlarından birisini oluşturmaktadır. Bu nedenle, F<sub>2</sub> popülasyonlarında her markör için daha az miktarda istatistik bilgi elde edilebilmektedir. Sonuçta dominant markörlerle genetik haritalamada, geri melez veya rekombinant melez hatlara (Recombinant Inbred Lines, RILs); haploid veya gametofitik dokulara ihtiyaç duyulmaktadır. Tek bir ebeveyne ait, F<sub>2</sub> popülasyonlarında sadece RAPD markörlerinin kullanılması, haritalama çalışmalarında diğer bir alternatifi oluşturmaktadır (Williams *et al.* 1993).

Jel üzerindeki RAPD bantlarının izolasyonu, southern blot analizlerinde RFLP bölgelerini belirleyen, hibridizasyon problemlerinin elde edilmesi, tekniğin başka bir avantajını oluşturmaktadır. Bununla birlikte, bazı polimorfik RAPD bantlarının RFLP probu olarak kullanılması, tekrarlanan DNA sıralarıyla eşleşmesi (hibridizasyonu) nedeniyle uygun olmamaktadır (Williams *et al.* 1990, 1993).

### **2.5.3 Bir özellikle ilişkili genetik markörlerin geliştirilmesi**

RAPD tekniğinin en yaygın uygulamalarından birisini, genomda haritalamaya gerek duyulmadan, istenilen bir özellikle (morfolojik, fizyolojik veya biyokimyasal) ilişkili markörlerin tanımlanması oluşturmaktadır. Martin *et al.* (1991), bir özellikle ilişkili olan DNA kısımlarının izolasyonunda kullanılmak üzere, RAPD tekniğine dayalı etkili bir

metot tanımlamışlardır. Bu metot, istenilen bir özelliği kodlayan genleri taşıyan bir hatla (donör ebeveyn), bu genleri taşımayan aynı hattın kültür formunun (yinelenen ebeveyn), defalarca geri melezi yapılarak oluşturulmuş yakın izogenik hatların (Near Isogenic Lines, NILs) analizlerine dayanmaktadır. Analizlerde, donör ebeveyne ait genomun bir parçası, kültür formundan farklı olarak, hedef gene ait bir markör parçacık üretmektedir. Yüksek olasılıkla, bu iki hat arasında polimorfizm gösteren bu genetik markörler, aranan özelliği kodlayan gen bölgesini taşımaktadırlar. Yakın izogenik hatların RAPD yardımıyla analizi, domates (Martin *et al.* 1991), marul (Paran *et al.* 1991) ve fasulyede (Adam-Blondon *et al.* 1994), hastalık dayanım genlerini tanımlayan markörlerin geliştirilmesinde başarıyla kullanılmıştır. Klein-Lankhorst *et al.* (1991), domatese ait bir yakın izogenik hattı kullanarak, kromozom spesifik RAPD markörlerini tanımlamışlardır.

Aranılan özelliği kodlayan gen dışında, tüm genetik yapısı aynı olan, yakın izogenik hatların birçok kez melezlemeyle uzun zamanda geliştirilebilmesi, analizleri sınırlayan en önemli faktör olmaktadır. Ek olarak, donör genomun birçok bölgesi, yakın izogenik hatlarda aranan özelliğe ait gen bölgesi ile ilişkili olabilmektedir. Sonuçta, bazı polimorfik markörler, aranan özelliğe ait gen bölgesi ile ilişkili olmamaktadır (Tingey and del Tufo 1993).

Michelmore *et al.* (1991), tarafından tanımlanan Bulk Segregant analizi, RAPD'e dayalı diğer bir tekniği oluşturmaktadır. Saiki *et al.* (1985) daha önceleri, aranan genom bölgesiyle tam bir bağlantısı bulunmayan RFLP markörleri için, bir gen havuzu stratejisi geliştirmiştir. Bulk Segregant analizi, tek bir popülasyonda açılım gösteren örneklerin, DNA'larının birleştirilmesi prensibine dayanmaktadır. Aranan özelliği veya geni taşıyan örneklerin birleştirilmiş DNA'ları, aranan özelliği taşımayan birleştirilmiş DNA örnekleri ile karşılaştırılmaktadır. Gen havuzları arasında polimorfizm gösteren markörlerin, aranan özelliği taşıyan lokuslarla genetik olarak bağlı olmasından yararlanılarak, yeni bir genetik havuz oluşturulmaktadır. Bu teknik, marul (Michelmore *et al.* 1991) ve arpada (Barua *et al.* 1993), hastalık dayanım genleriyle bağlı RAPD markörlerini tanımlamada başarıyla kullanılmıştır. Bu havuz stratejisi ayrıca, antepfıstığı (Hormaza *et al.* 1994) ve *Silene latifolia*'da (Mulcahy *et al.* 1992), eşeye bağlı RAPD markörlerinin tanımlanmasında da yararlı bulunmuştur. Yakın izogenik

hatların DNA havuzundaki RAPD analizleri, genlerin izlenebilme etkinliğini daha çok arttırmıştır (Barua *et al.* 1993).

#### **2.5.4 Popülasyon ve evrim genetiği**

DNA tekniklerindeki avantajlar, biyolojinin birçok konudaki problemlerini çözmeye büyük etkiye sahip bulunmaktadır. Genotip frekansının ve allellerin kesin bir değerlendirilmesinin yapılmasında çok sayıda örneğe ihtiyaç duyulması, DNA tekniklerinin popülasyon genetiği çalışmalarında uygulanmasını sınırlamaktadır. Popülasyon genetiği çalışmalarını sınırlayan diğer faktörler, göreceli olarak yüksek maliyet, karmaşık cihazlara, iyi eğitilmiş personele ve uzun zamana duyulan ihtiyaçtır. RAPD tekniğinin basitliği ve DNA seviyesindeki genetik farklılıkları ortaya çıkarmadaki hızlılığı, popülasyon genetiği çalışmalarında büyük öneme sahiptir (Hedrick 1992). Popülasyon genetiği çalışmalarında, RAPD markörlerinin kullanımındaki en önemli dezavantaj, ıslah edilmiş çeşitlerin dominant karakterli olmasıdır. Bu nedenle RAPD markörlerinde, allozim ve RFLP gibi ko-dominant markörlerle elde edilebilen gen frekansından daha az bir bilgi elde edilebilmektedir. Lynch and Milligan (1994), RAPD markörlerinin allozim ve RFLP gibi ko-dominant markörlerle aynı seviyede istatistik derece elde edebilmek için 2 veya 10 katı daha fazla örnekle çalışılması gerektiğini bildirmektedirler. Aynı primerden elde edilen, görünüşte aynı moleküler ağırlığa sahip bantlar arasındaki benzeşmeler de, RAPD çalışmaları için diğer bir sorunu oluşturmaktadır. Aynı popülasyona ait farklı bireylerde rastlanan, bağlı genler nedeniyle elde edilen bantlar arasındaki uyum, RAPD çalışmaları açısından büyük öneme sahip bulunmaktadır. Fakat farklı türler veya büyük genetik açılım gösteren popülasyonlardan alınan örnekler söz konusu olduğunda, elde edilecek bilgilerin güvenilirliği azalmaktadır (Smith and Williams 1994, Allegrucci *et al.* 1995). Bu nedenle, RAPD verileri sistematikte yararlanılmakla birlikte, genellikle morfolojik, izoenzim ve RFLP markörleri ile oluşturulmuş taksonomik çalışmalarla da desteklenmektedir.

RAPD markörlerinin kullanımı, klonal olarak çoğaltılan organizmalarda, seksüel yolla çoğalanlarda kullanımından daha uygun olmaktadır. Aseksüel olarak çoğalan bireyler arasındaki polimorfik bant desenleri, klonal tanımlamada kullanılmaktadır (Williams *et*

*al.* 1990). Türe özgü markörler, türler arasındaki gen değişiminin ve melez bireylerin tanımlanmasında kullanılabilir. Yine popülasyona özgü markörler, melez popülasyonların tanımlanmasında kullanılmaktadır (Arnold *et al.* 1991). Mısır bitkisinin farklı melez hatlarından elde edilen F<sub>1</sub> hibritleri, AP-PCR kullanılarak başarıyla tanımlanmışlardır (Welsh *et al.* 1991).

### **2.5.5 Bitki ıslahı**

Ekonomik olarak önemli birçok özelliğin, birçok gen tarafından idare edilmesi, içsel ve dışsal çevresel faktörlerden etkilenmesi nedenleri, bitki ıslahını sınırlamaktadır. Bazı özellikler, kantitatif özellikler olarak adlandırılmakta, bunlar kantitatif özellik lokuslarının (Quantitative Trait Loci, QTL), ifadesi sonucunda ortaya çıkmaktadırlar. RFLP markörleri, ıslah programlarında yararlı QTL allellerinin nesilden nesle geçişini belirlemek için kullanılmaktadırlar (Beckmann and Soller 1983, Soller and Beckmann 1983). RAPD tekniği, çok miktarda genetik markör geliştirilmesine olanak sağlaması nedeniyle, karmaşık genoma sahip bitkileri haritalamada, RFLP esaslı tekniklerden daha etkin olmaktadır. RAPD markörleri, adaptasyon ve seleksiyon programlarında bu lokusların gözlenmesinde kullanılmaktadır. Markörler, hastalıklara dayanım gibi ticari öneme sahip tek genle idare edilen genetik özelliklerle ilişkili olmakta ve bu genetik özelliklerin doğal gen kaynaklarında, adapte olmuş yerli hat veya çeşitlerden tanımlanmasında kullanılmaktadır. RAPD tekniğinin türler arasındaki genetik varyasyonu belirlemedeki yeteneği, popülasyondaki istenmeyen çekinik allellerin frekansının yükselmesini engellemek amacıyla, ticari bitki türlerindeki melezleme derecesini belirlemede kullanılabilir. Polimorfik RAPD markörleri, ticari melezleme programlarında daha avantajlı olan, SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions) markörlerine de dönüştürülebilmektedir (Paran and Michelmore 1993).

## 2.6 Moleküler Markör Tekniklerinin Güllerde Kullanımı

Birçok araştırmacı, gül ıslahçıları için moleküler tekniklere ait yeni yöntemler geliştirilmesi üzerine çalışmaktadır. Gül, dış mekân bitkileri içerisinde, ekonomik olarak en önemli tür, *Arabidopsis* genomunun 4 katı olan (560 Mb), küçük bir genoma sahip, gen aktarımına uygun olması nedenleriyle, model bitki olarak seçilmektedir (Debener and Mattiesch 1999, Rajapakse *et al.* 2001).

Güllerin coğrafi dağılımı, poliploidi ve sık olarak yapılan tür içi ve türler arası melezlemeler nedeniyle, çeşitlerin ayrılması ve sınıflandırılması zorlaşmaktadır (Jan *et al.* 1999). Ticari tanımlama ve sınıflandırma, morfolojik karakterlere göre yapılmaktadır (Allen 1973, Debener *et al.* 1996). Morfolojik karakterlere bağlı sınıflandırma, *Rosa* cinsi içerisindeki türlerin bile çok geniş ve birbirine benzeşen yapıda oluşu, çevresel şartlara göre değişkenliği nedeniyle uygun değildir.

Yabani ve kültüre alınmış gülleri, Rajapakse *et al.* (1992), Matsumoto *et al.* (1997), Walker and Werner (1997) RFLP ve RAPD teknikleri ile, Kuhns and Fretz (1978), Grossi *et al.* (1997), izoenzim markörleri kullanarak tanımlamışlardır.

Son yüzyıl içerisinde kesme çiçek endüstrisinin ihtiyaçlarını karşılamak amacıyla modern teknikler geliştirilmiştir. Gen transferindeki yeni teknikler, klasik ıslah metotlarında yapılması uzun süren, tarımsal çevresel problemlerin sık sık görüldüğü ıslah işlemlerini önemli ölçüde azaltmıştır. En son tekniklerle güllerdeki somaklonal varyasyonu ve gen aktarım tekniklerini kullanarak gül genomunun zenginliğini arttırmada başarılı olmuştur (Rout *et al.* 1999).

Mikanagi *et al.* (2000), *Rosa* cinsinin *Cinnamoneae* (*Rosa*), *Chinensis* ve *Gallicanae* alt cinslerine ait 44 türün ve *Rosa* cinsine ait 8 modern bahçe gülünün çiçeklerinden, kimyasal ve spektroskopik yöntemlerle, izole ettikleri 11 farklı antosiyaninin, tür ve miktar farklılıklarını incelemişlerdir. 4 antosiyanini güllerde ilk olarak tanımlayan araştırmacılar, antosiyanin tür ve miktarlarının güller arasında karakteristik dağılım gösterdiğini belirlemişlerdir. Antosiyanin dağılım desenlerine bağlı olarak, *Rosa* cinsine ait olan tüm örnekler tanımlanmış ve 8 grup içerisinde sınıflandırılmıştır.

Werlemark (2000), kuzey yarı küre kuşburnu türleri (*Caninae* alt cinsi) arasındaki morfolojik farklılıkları ve tür içinde morfolojik karakterlerle RAPD ve SSR moleküler markörlerinin ilişkilerini incelemiştir.

Son yıllarda *Rosa* cinsi içerisindeki genetik farklılıkların incelendiği çalışmalarda, kuşburnu türleri de yer almaktadır. Debener *et al.* (1996) tarafından yapılan çalışmada, RAPD markörlerinin *Caninae* türlerinin, *Cinnamomeae* alt cinsine ait türlerinden ayrılabilirdiği gösterilmiştir. Özellikle *R. sherardii* ve *R. villosa* kuşburnu türlerinin, bazı gül çeşitleri ve yabani güllerle yapılan analizlerde, birbiri ile kuvvetli yakınlık gösteren iki tür oldukları kaydedilmiştir.

Debener *et al.* (1997), *R. sherardii*'nin baba çeşit olarak kullanıldığı, *R. obtusifolia* gibi, *Caninae* alt cinsine ait diğer türlerle yapılan melezlemelerde, bitkiler arasındaki varyasyonun kalıtımını açıklamak için moleküler markörleri kullanmışlardır.

Matsumoto and Fukui (1996), gül çeşitleri ve klonal olarak çoğaltılmış güllerin genetik olarak ayrılması ve tanımlanması üzerinde, 3 adet 10 baz çifti ve 10 adet 12 baz çifti uzunluğundaki RAPD primerlerinin kullanılabilirliğini test etmişlerdir. Araştırmacılar, kullandıkları primerlerden bazılarının, çeşitlere ve klonlara özel RAPD bant desenleri oluşturduğunu, bazı çeşitlerin ve klonların ayırımında kolaylıkla kullanılabileceğini, tüm çeşit ve klonları ayırmada ise bu primerler kombinasyonlarının birlikte kullanımının yeterli olduğunu kaydetmişlerdir.

Gül çeşitlerinin tanımlanması amacıyla, mikrosatellite (SSR bölgelerinin) farklılığına dayalı bir DNA parmak izi metodu da geliştirilmiştir (Esselink *et al.* 2003). Araştırmacılar, SSR markörlerini *Rosa hybrida* L. gül türünden geliştirilmiştir. Çalışmada kullanılan toplam 24 polimorfik STMS (Sequence Tagged Mikrosatellite Site) markörü, 6 farklı bağlantı (linkage) grubu oluşturmuş, 46 hibrit çay gülünün ve *Rosa canina*, L., *Rosa indica* Thory., *Rosa chinensis* Jacq., *Rosa rubiginosa* L., ve *Rosa rubrifolia glauca* Pour. türlerine ait 30 farklı gül anacının genetik tanımlanmasını sağlamıştır. Araştırmacılar, klonal olarak çoğaltılmış güller ve renk mutanti olarak bilinen gülleri tam olarak tanımlanmakla birlikte, diğer tüm çeşitlerde benzer bant desenleri elde etmelerine rağmen, birkaç STMS markör grubuna ayırabilmişlerdir. STMS markörlerinin yüksek ayırım gücü sayesinde, mutantlar hariç, hibrit çay gülleri veya anaç bitkilerden herhangi

iki örnek arasındaki farklılığı belirleyebildiği tespit edilmiştir. STMS markörleri kullanılarak yapılan analizlerin referans bir yöntem, ıslahçı haklarını korumada ve yasal olmayan çoğaltımlarda önemli bir belirleme tekniği olduğu ortaya konulmuştur.

Shoyama *et al.* (1997), gen aktarılmış güllerin somatik embriyolarında, herhangi bir genetik değişikliğin olup olmadığını belirlemede ve genetik yakınlığını hesaplamada RAPD, AFLP ve RFLP tekniklerinin, gelişmenin erken aşamalarında kullanılabileceğini ifade etmektedirler.

Gül yetiştiriciliğinde, ülkemizin genetik çeşitliliği ve ekolojik avantajları azımsanmayacak düzeydedir. Ancak çeşitli amaçlarla gül yetiştiriciliği alandaki tüm ilerlemeler, mevcut çeşitlerimizin tanımlanması, koruma amaçlı koleksiyon bahçelerinin kurulmasına ve bu genetik çeşitlilikten hedefler doğrultusunda uygun yararlanılmasına bağlıdır. Bu nedenle, genetik ve ticari çeşitliliği açığa çıkaracak, kesin ve hızlı çalışılabilen moleküler tekniklerin kullanılması önem kazanmaktadır. Bu hedefe yönelik olarak Ağaoğlu vd. (2000), Isparta bölgesinde yetiştirilen yağ gülleri üzerinde temel bir araştırma yapmışlardır.

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1 Materyal

Bu araştırma 2002–2005 yılları arasında, Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü'ne bağlı, Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Bitki Biyoteknolojisi Laboratuvarı'nda yürütülmüştür.

Araştırmada toplam 47 gül genotipi kullanılmıştır. Analizlerde kullanılan 28 adet bahçe gül çeşidine ait materyal, 2003 yılında Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü'ne bağlı, Atatürk Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü'ndeki, gül koleksiyon bahçesinden alınmıştır. Ayrıca Yalova merkez ve merkeze bağlı ilçelerinde, kesme gül üretimi yapan ticari seralar gezilerek, yaygın olarak yetiştirilen 15 gül çeşidi belirlenmiş, Türkiye kesme çiçek üretiminin % 80-90'ını oluşturan bu çeşitlerden, genç sürgün ve yaprak örnekleri alınmıştır. Araştırmada kullanılan gül çeşitleri aşağıda belirtilmiştir:

#### Bahçe gül çeşitleri:

- |                       |                   |                       |
|-----------------------|-------------------|-----------------------|
| 1. Americane          | 11. Diamond       | 21. Princess Margaret |
| 2. Antigone           | 12. Dr. Verhage   | 22. Queen Elizabeth   |
| 3. Ariane             | 13. Inter Flora   | 23. Salmon Perfection |
| 4. Ariosa             | 14. Isparta Gülü  | 24. Sophia Loren      |
| 5. Baby Baccara       | 15. Jaguar        | 25. Soraya            |
| 6. Baccara            | 16. Kabuki        | 26. Super Star        |
| 7. Cameo              | 17. Keberg        | 27. Sympathy          |
| 8. Carina             | 18. Laynd         | 28. Violeine          |
| 9. Cleo               | 19. Maria Callas  |                       |
| 10. Chrysler Imperial | 20. Papa Meilland |                       |



### Kesme gül çeşitleri:

- |                |                   |                    |
|----------------|-------------------|--------------------|
| 1. Akito       | 6. Dallas         | 11. Marilyn Monroe |
| 2. Arifa       | 7. Dallas TM      | 12. Osiana         |
| 3. Atache      | 8. Grand Gala     | 13. Pirol          |
| 4. Athena      | 9. Helmut Schmidh | 14. Texas          |
| 5. Black Magic | 10. Jacarantha    | 15. Vandela        |

Dallas TM genotipinin yetiştiricisi, bu gülün Dallas çeşidinden bir tomurcuk mutasyonu sonucu meydana geldiğini, kırmızı çiçek rengine sahip orijinal Dallas çeşidinden yalnızca pembe olan çiçek rengi ile ayrıldığını ve diğer tüm morfolojik özelliklerinin aynı olduğunu ifade etmiştir.

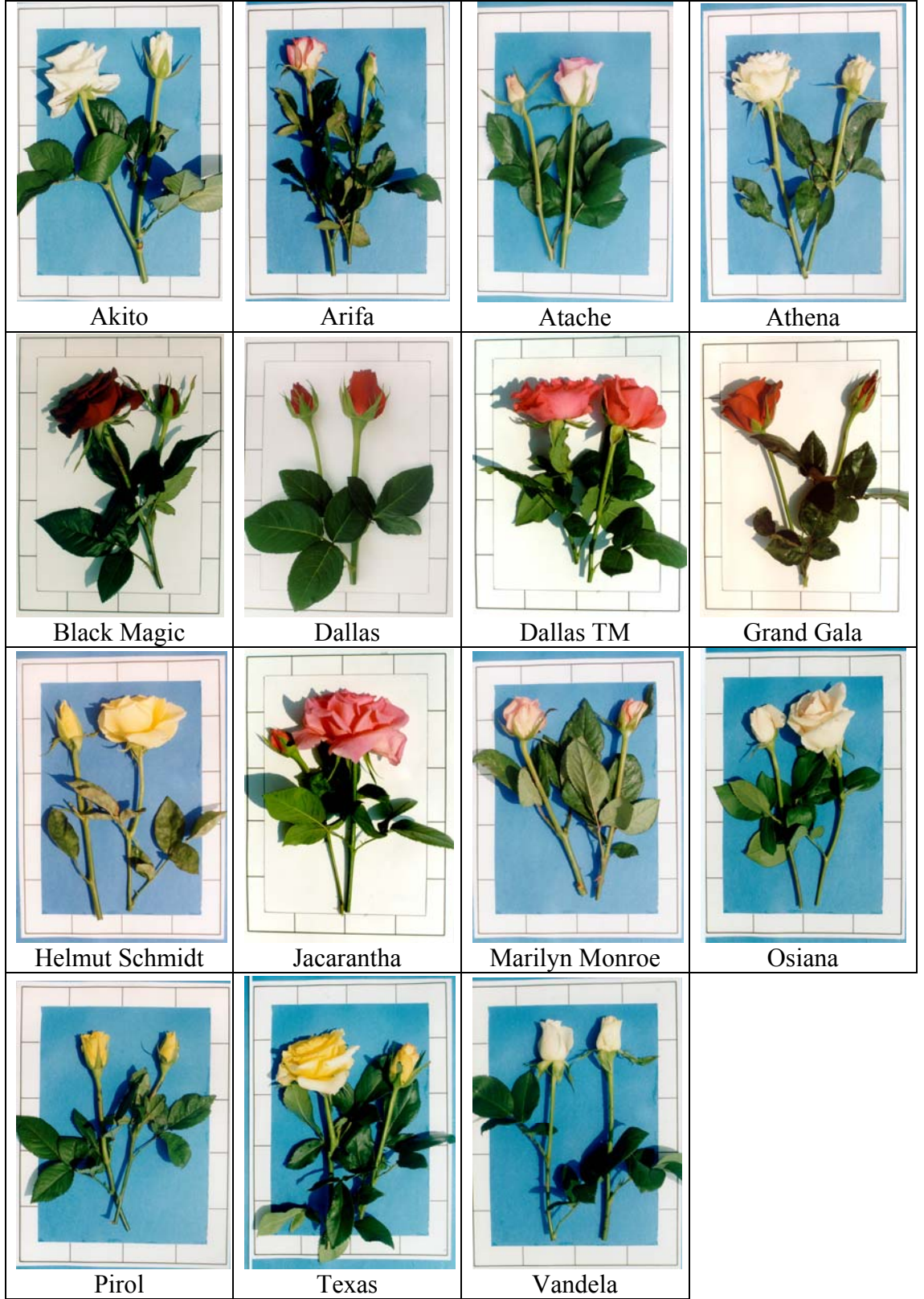
Kesme güllere ve bahçe güllerine ek olarak, Van ili civarında bahçe gülü olarak yetiştiriciliği yapılan güllere ait yapraklı sürgünler temin edilmiştir. Bunlar içerisinde yer alan *Rosa foetida* anavatanı Anadolu olan ve bu bölgede çok eski zamanlardan beri yetiştirildiği bilinen bir gül türüdür. Baytop (2000), Van gülünün *R. centifolia* türü içerisinde yer aldığını belirtmektedir.

Bu çeşitler;

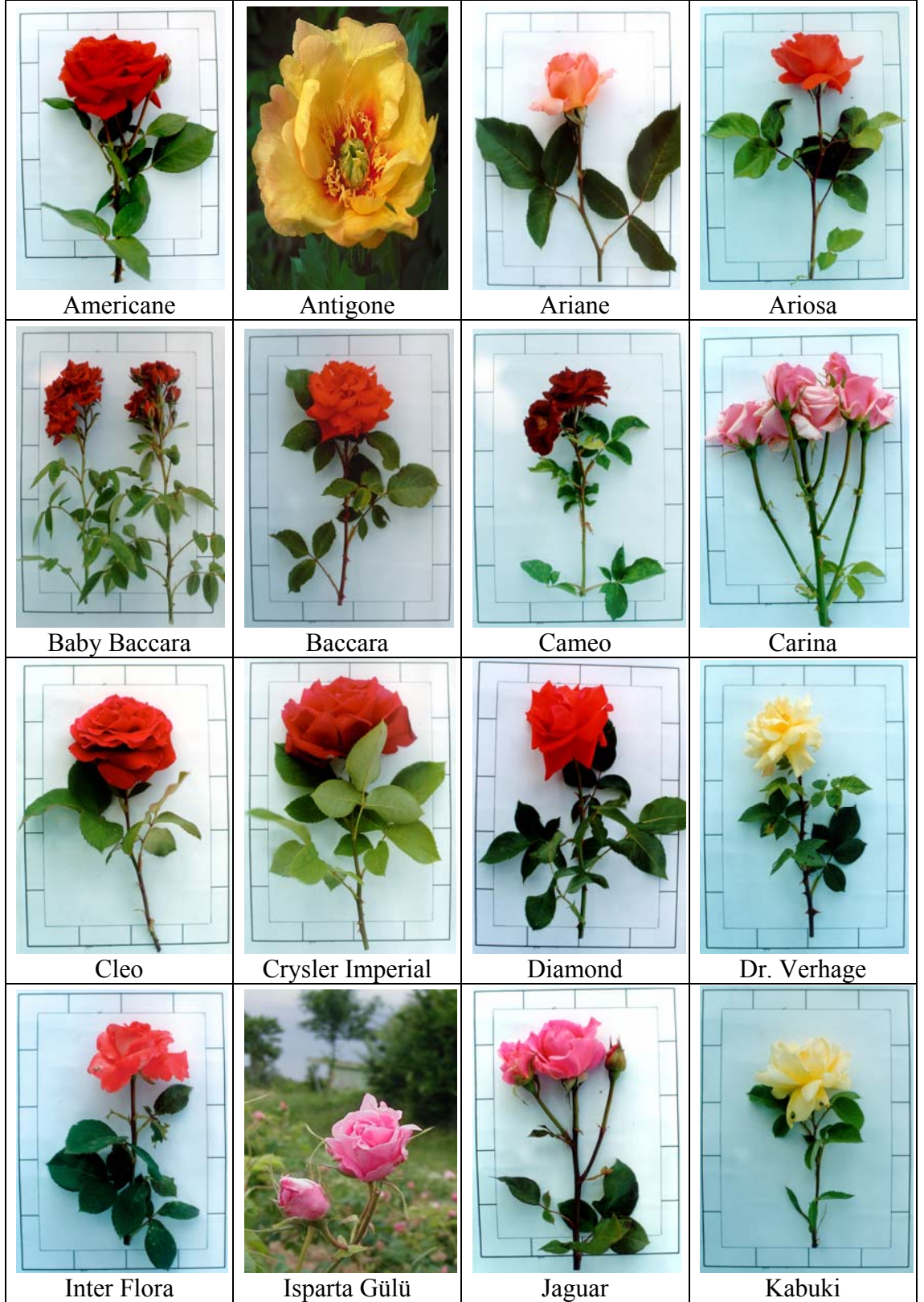
1. Van Gülü
2. Kışmir Gülü
3. Minyatür Gül
4. *Rosa foetida*'dır.

Seralarda veya arazideki sağlıklı ve ismine doğruluğu belirlenen güllerden, genç yaprakları içeren 30–40 cm uzunluğundaki sürgünler alınmış, etiketlenerek zaman kaybedilmeden buz kapları içinde laboratuvara taşınmıştır. DNA ekstraksiyonu yapıncaya kadar laboratuvarında –20 °C sıcaklıktaki derin dondurucuda saklanmıştır.

Şekil 3.1'de kesme gül çeşitlerinin, Şekil 3.2'de ise bahçe güllerinin isim ve resimleri görülmektedir. Van ilinden temin edilen güllerin çiçeksiz sürgün olarak getirilmesi nedeniyle resimleri verilmemiştir. Ayrıca örnek alınma zamanında çiçeklenmesi durmuş olan Antigone, Isparta ve Papa Meilland güllerine ait çiçek resimleri internetten temin edilmiştir.

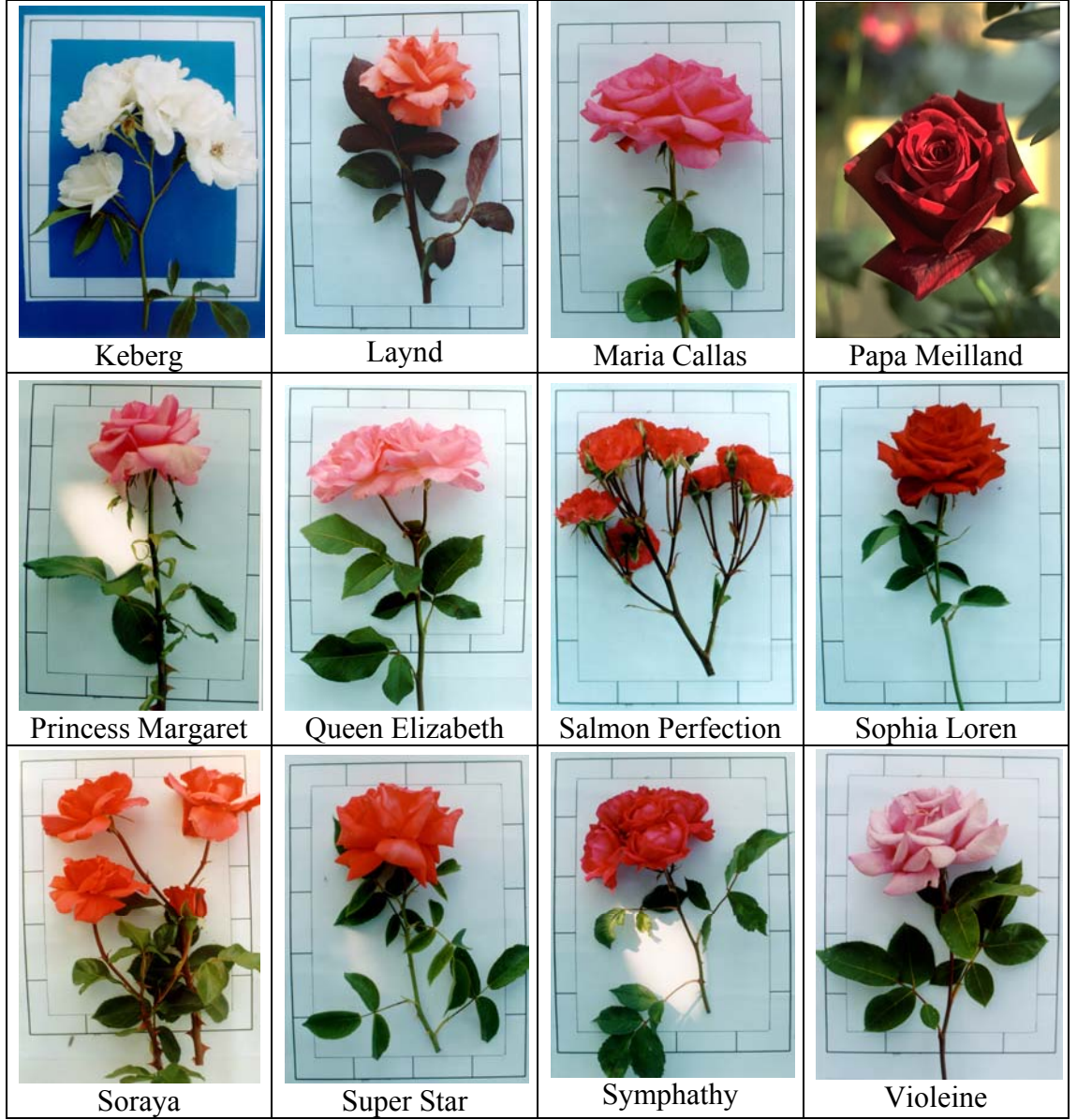


Şekil 3.1 Kesme gül çeşitleri



Şekil 3.2 Bahçe gül çeşitleri





Şekil 3.2 Bahçe gül çeşitleri (devam)

### 3.2 Yöntem

Standart RAPD tekniği, primer olarak rasgele seçilmiş 10 baz uzunluğunda kısa sentetik oligonükleotidlerle, nanogram miktarlardaki genomik DNA'nın, polimeraz zincir reaksiyonu yardımıyla çoğaltılması esasına dayanmaktadır. Amplifikasyon ürünleri genellikle agaroz jel üzerinde ayrılmakta ve etidiyum bromidle boyanmaktadır.

Welsh and McClelland (1990), farklı amplifikasyon ve elektroforezis koşullarına sahip 15 baz uzunluğundaki RAPD markörlerini kullanarak, rasgele seçilmiş primer (Arbitrarily primed-PCR, AP-PCR), adını verdikleri benzer bir yöntem geliştirmişlerdir. 10 nükleotid uzunluğundan daha kısa primerler kullanılarak yapılan polimeraz zincir reaksiyonu çoğaltması (DNA amplification fingerprinting-DAF), daha karmaşık DNA parmak izi profillerinin elde edilmesinde kullanılmıştır (Caetano-Annoles *et al.* 1991). Bu üç temel yöntem, primer uzunluklarının ve parçacık üretme koşullarının farklılığına rağmen, başlangıçta rasgele seçilen primer dizilimleri nedeniyle, diğer genom analiz yöntemlerinden ayrılmaktadırlar.

Isınsal döngü (Thermal Cycler) cihazı içinde, uygun bir çoğaltma sıcaklığında, oligonükleotidler kalıp DNA üzerindeki primer bağlanma noktalarına yapışarak, eğer bu noktalar birbirinden çoğaltılabilir uzaklıklarda bulunuyorlar ise, kısmen kısa DNA parçacıkları üretmektedirler. Farklı örneklerin DNA'lardaki, primer bağlanma bölgelerindeki değişimler nedeniyle, üretilen nükleotidlerin sayısı ve miktarında farklılıklar bulunmaktadır. Son yıllarda geliştirilen, "Sıraları tanımlanarak üretilen DNA bölgeleri" (Sequence characterised amplified regions-SCAR) tekniğine dayanılarak RAPD polimorfizminin, kromozom üzerinde meydana gelen eklenme veya silinmeler (insertions/deletions) gibi değişimlerden kaynaklandığı ifade edilmektedir (Paran and Michelmore 1993, Bardakçı and Skibinski 1999). RAPD bant desenleri incelendiğinde, heterozigot yapıdaki örneklerin, aynı allellerinden üretilen çoğaltım ürünleri arasında, uzunluk bakımından farklılıklar bulunmakta ve parçacıklar oluşan profilde var/yok şeklinde görülmektedir. RAPD'in dominant markör olması nedeniyle, heterozigot veya homozigot lokuslardan üretilen DNA parçacıklarını birbirinden ayırmak mümkün olmamaktadır.

Bardakçı (2001), moleküler biyoloji tekniklerindeki ilerlemeler sayesinde, genetik polimorfizmi saptamak için oldukça yararlı çok sayıda DNA işaretleyiciler geliştirildiğini ve son on yılda, DNA işaretleyicileri geliştirmek için en sık kullanılan moleküler tekniğin, Polimeraz Zincir Reaksiyonuna dayalı olan, Rasgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD) tekniği olduğunu bildirmektedir. Araştırmacı, RAPD işaretleyicilerinin, tek bir kısa ve rasgele oligonükleotit primer kullanılarak, bilinmeyen DNA dizilerinin çoğaltılmış ürünleri olduklarını, önceden DNA baz dizisinin bilinmesi gerekmediğini, RAPD tekniğinin ucuz, kısa sürede çok sayıda DNA işaretleyicisi geliştirmedeki etkin olduğunu ve çok gelişmiş aletlere daha az gereksinim gösterdiğini ifade etmektedir.

Araştırma DNA izolasyonu, RAPD-PCR analizleri ve elde edilen verilerin değerlendirilmesi aşamalarından oluşmaktadır.

### **3.2.1 DNA izolasyonu**

Moleküler markör tekniklerinin uygulanabilmesi, uygun miktar ve kalitede DNA'nın izole edilmesiyle mümkün olmaktadır. Ancak yüksek polisakkarit içeriğine sahip bitki türlerinde kaliteli DNA elde edilmesi oldukça zordur. Bitki yapraklarında bulunan müsilaj maddeleri (polisakkaritler), DNA izolasyonu anında DNA sarmalına yapışarak, DNA ile birlikte çökmekte ve DNA'nın çözünmesini tamamen engellemektedir (Kaufman *et al.* 1999). DNA çözünse dahi, polisakkaritlerin enzim aktivitesini durdurmaları nedeniyle, sonraki aşamalarda, DNA'ların enzimlerce işlenmesine engellenmektedir. DNA'nın polisakkaritlerle birlikte çökmesinin engellenmesinde kullanılan en yaygın metot, DNA hazırlığı aşamasında CTAB kullanılmasıdır. CTAB, özellikle nükleik asitlerin seçici çökmesini sağlamaktadır.

Gül yapraklarında, temiz bir DNA elde edilmesini engelleyen ve DNA'yı parçalayan birçok ikincil bileşik (polifenol, polisakkarit, tanen ve reçineler gibi) bulunmaktadır. Özellikle, sıvı azot yardımıyla yaprakların parçalanması aşamasında, izolasyon tampon çözeltisi yüksek oranda polisakkarit içeriği nedeniyle jelatinimsi, yapışkan ve koyu kıvamlı bir çözelti oluşturmakta, bu çözelti içerisinden DNA'ların temizlenmesi ise oldukça güç olmaktadır. Antioksidant olan 2-mercaptoethanol ve fenolik bileşikleri

bağlayan PVP kullanılması, santrifüjleme ile bunların ortamdaki uzaklaştırılması (Kuhns and Fretz 1978), devamında yapılacak olan fenol izolasyonu ve jel filtrasyonu gibi saflaştırma işlemlerini gerektirmektedir.

RAPD analizlerine uygun miktar ve saflıkta DNA elde edebilmek amacıyla Doyle and Doyle (1988), Barnwell *et al.* (1998), Jan *et al.* (1999) tarafından geliştirilen izolasyon yöntemleri ön çalışmalarda denenmiştir. Barnwell *et al.* (1998) yönteminin saflığı düşük DNA vermesi, Jan *et al.* (1999) metodunda ise nispeten az miktarda DNA elde edilmesi nedeniyle, gül yapraklarından DNA izolasyonu için Doyle and Doyle (1988) yöntemi değiştirilerek kullanılmıştır. Yöntemde yapılan değişiklikler, elde edilen DNA miktarının korunarak, PCR aşamasında enzim ve primer aktivitesini engelleyen ikincil bileşiklerin ve kimyasalların temizlenmesi amacıyla yapılmıştır. 2 aşamalı yürütülen izolasyonun aşamaları aşağıda ayrıntıları ile verilmiştir.

### **I. Aşama**

1. -20 °C'de muhafaza edilen dondurulmuş gül yaprağından 500 mg tartılarak, havan içerisinde sıvı azot yardımıyla öğütülür,
2. Öğütülen yaprak üzerine 1.5 ml, 1x CTAB (% 1) izolasyon tamponu eklenir, oluşan çözeltinin 1 ml'si, 2 ml'lik tüplere alınır ve üzerine 3 µl 2-mercaptoethanol eklenir,
3. Tüp, 65°C su banyosunda periyodik karıştırılarak 1-2 saat beklemeye bırakılır,
4. Bu süre sonunda su banyosundan çıkarılan çözelti içerisine, 1 ml kloroform: izoamilalkol (24 v:1v), eklenir ve 50-100 kez çalkalanarak 11000 rpm hızda, 8 dakika santrifüjlenir,
5. Üst faz yeni tüpe alınır 1 ml 2-propanol (-20 °C) eklenerek DNA'nın çökmesi sağlanır,
6. 11000 rpm hızda, 5 dakika santrifüjlenir ve içerisindeki alkol dökülür. Alkol tamamen uçuncaya kadar tüp kurumaya bırakılır. Kurumanın ardından, tüpün dibinde kalan DNA, 0.5 ml TE içerisinde çözülür.

## II. Aşama

1. TE'de üzerine tekrar 0.5 ml, 1x CTAB izolasyon tamponu eklenir ve 65°C su banyosunda periyodik karıştırılarak, 30 dakika beklemeye bırakılır,
2. Su banyosundan alınan tüplerin içerisine 0.5 ml kloroform: izoamilalkol (24:1) eklenir ve 50-100 kez çalkalanarak 13500 rpm hızda 5 dakika santrifüjlenir,
3. DNA içeren üst faz yeni tüpe alınır, 1 ml 2-propanol eklenerek DNA çöktürülür,
4. 11000 rpm hızda, 5 dakika santrifüjlenir ve alkol dökülerek tüp kurumaya bırakılır.
5. Kurumanın ardından tüp dibinde kalan DNA önce 0.7 ml, % 70'lik soğuk (-20 °C) etil alkolle yıkanır ve 13500 rpm hızda, 5 dakika santrifüjlenir,
6. Alkol dökülerek ikinci kez 0.7 ml, % 96'lık soğuk (-20 °C) etil alkol eklenir ve 13500 rpm hızda, 5 dakika santrifüjlenir. Alkol dökülerek tüp kurumaya bırakılır.
7. Alkol tamamen uçtuktan sonra, DNA 200-300 µl TE içerisinde çözündürülür ve DNA üzerinde kalan RNA'ları elimine etmek amacıyla 4 µl RNase (20 µg/ml, stok) eklenerek tüpler -20 °C'de saklanır.

### Ekstraksiyon Tampon Çözeltisi:

% 1 CTAB (w/v), 100 mM Tris-HCl, (pH 8.0), 20 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 1.4 M NaCl, % 1 PVP (w/v), (kullanımdan hemen önce % 0.3 β-mercaptoethanol eklenmektedir).

### TE (pH 7.5–8.0):

10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA

## **DNA konsantrasyonu ve saflığının belirlenmesi**

İzolasyon sonucu elde edilen DNA'ların miktar ve kalitesi, % 0.8'lik agaroz jel ile belirlenmiştir. DNA'ların miktar ve kalitesi ayrıca optik densite (OD) yardımıyla da kontrol edilmiştir. 260 (OD<sub>260</sub>), 280 nanometre optik densitedeki (OD<sub>280</sub>) spektrofotometre okumaları ile elde edilen değerler ve bunların birbirine oranları kullanılarak, DNA miktar ve saflıkları belirlenmiştir. DNA'nın saflığını gösteren bu değer 1.8 ile 2.0 arasında olması istenmektedir.



Agaroz jel ve spektrofotometre okumaları sonucunda elde edilen verilerden yararlanılarak, DNA izolatlarının son konsantrasyonu 50 ng/ $\mu$ l olacak şekilde TE ile seyreltilmiş ve daha sonraki analizler için  $-20^{\circ}\text{C}$ 'lik derin dondurucularda kullanım zamanına kadar saklanmıştır.

### 3.2.2 RAPD-PCR analizleri

#### DNA amplifikasyon koşulları

DNA amplifikasyonu, Williams *et al.*, (1990)' a ait metot kullanılarak yapılmıştır. PCR reaksiyonu için hazırlanan çözeltinin içeriği aşağıda verilmiştir:

1.5 mM 10x PCR tamponu  
2.5 mM  $\text{MgCl}_2$ ,  
0.2 mM (her biri) dATP, dGTP, dCTP, ve dTTP,  
50 ng primer,  
5 ünite *Taq* DNA polimeraz'dan 0.2  $\mu$ l  
50 ng kalıp DNA  
ddH<sub>2</sub>O

Çözelti ddH<sub>2</sub>O ile 25  $\mu$ l'ye tamamlanarak, PCR işlemi sırasında çözülden buharlaşma olmaması için, her reaksiyon tüpünün üzeri mineral yağla kapatılmıştır. PCR döngü programı aşağıdaki gibidir:

Ön denatürasyon	94°C'de	4 dk	} 45 Döngü
DNA sarmalının açılması	94°C'de	1 dk	
Primer bağlanması	34°C'de	1 dk	
Yeni DNA yazılımı	74°C'de	2 dk	
Bitiş yazılımı	72°C'de	5 dk	

PCR reaksiyonu, Appligene-Oncor Crocodile III model ısınsal döngü (Thermal-Cycler) makinesinde yapılmıştır.

## Primerler

RAPD analizlerinde, 19 adet sentetik oligonükleotid (kit A, E, F, G, H, J, ve T, Operon Technologies, Alameda, Calif. USA) kullanılmıştır. Bu primerlerin adları ve baz dizilişleri Çizelge 3.5'te verilmiştir.

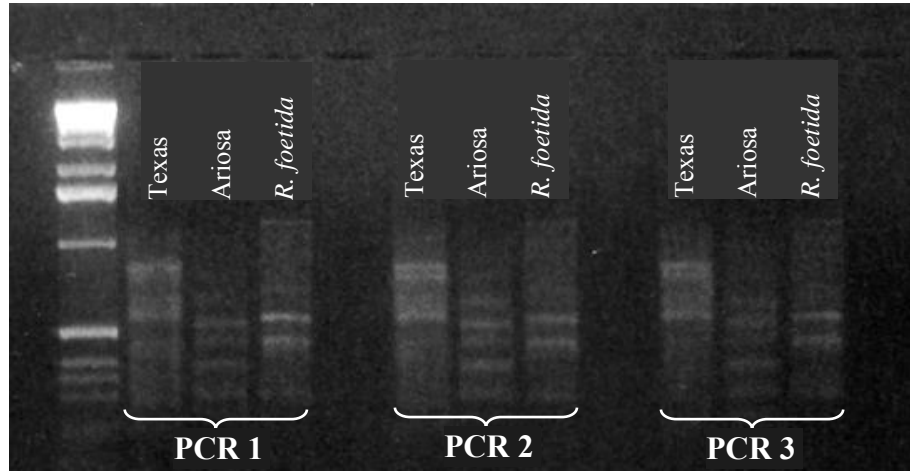
Çizelge 3.1 RAPD analizlerinde kullanılan primerler ve baz dizilişleri

	<b>Primer Adı</b>	<b>Baz Dizilimi</b>
1	OP-A-01	5'-CAGGCCCTTC-3'
2	OP-A-09	5'-GGGTAACGCC-3'
3	OP-A-11	5'-CAATCGCCGT-3'
4	OP-A-18	5'-AGGTGACCGT-3'
5	OP-E-04	5'-GTGACATGCC-3'
6	OP-E-14	5'-TGCGGCTGAG-3'
7	OP-E-19	5'-ACGGCGTATG-3'
8	OP-F-01	5'-ACGGATCCTG-3'
9	OP-F-06	5'-GGGAATTCGG-3'
10	OP-F-14	5'-TGCTGCAGGT-3'
11	OP-G-11	5'-TGCCCGTCGT-3'
12	OP-G-19	5'-GTCAGGGCAA-3'
13	OP-H-06	5'-ACGCATCGCA-3'
14	OP-H-12	5'-ACGCGCATGT-3'
15	OP-H-15	5'-AATGGCGCAG-3'
16	OP-H-19	5'-CTGACCAGCC-3'
17	OP-J-04	5'-CCGAACACGG-3'
18	OP-T-04	5'-CACAGAGGGA-3'
19	OP-T-19	5'-GTCCGTATGG-3'

### RAPD tekniğinin tekrarlanabilirliği

RAPD markörleri, diğer DNA markör sistemleriyle karşılaştırıldığında kısmen hızlı, ucuz ve kolay bir yöntem olmakla birlikte, primerlerin bağlanma bölgelerine doğru olarak bağlanamaması sonucu, bazı düşük yoğunluklu bantların farklı PCR reaksiyonlarında oluşmadığı görülebilmektedir. Kullanılan kalıp DNA'nın yetersiz olarak hazırlanmış olması, RAPD markörlerinin tekrarlanabilirliğindeki aksamaların diğer önemli sebebidir (Welch and McClelland 1994). Bu problem, PCR koşullarının doğru olarak ayarlanması, dolayısıyla primerlerin bağlanma bölgeleriyle doğru olarak eşleştirilmesi ve iyi bir saflıkta, uygun konsantrasyonda DNA kullanılmasıyla ortadan kaldırılabilmektedir.

Yürütülen RAPD-PCR analizlerinin tekrarlanabilirliğini araştırmak amacıyla Texas, Ariosa ve *R. foetida* genotiplerinde, birbirinden bağımsız üç PCR işlemi yapılmış ve sonuçta oluşan bantların tekrarlanabilir oldukları belirlenmiştir (Şekil 3.3).



Şekil 3.3 OP-H-06 primeri ile birbirinden bağımsız 3 farklı PCR ürününün agaroz jeldeki görünüşleri

### **Agaroz Jel Elektroforezi**

PCR sonucu elde edilen ürünler % 1.5'lik agaroz jelde elektroforeze tabi tutulmuştur. Her bir PCR ürünü, 3 µl yükleme çözeltisi (% 40 Sukroz, % 0.25 Bromofenol Mavisini) eklenerek jel kuyucuklarına yüklenmiştir. Moleküler büyüklüğü belirlemek için 1 kb'lik DNA ladder (GIBCO BRL) belirteç olarak kullanılmıştır. Jel, 3 saat süre ile 100 V elektrik akımında elektroforez yapılarak, UV ışık altında Polaroid film kullanılarak fotoğraflanmıştır.

### **3.2.3 Veri analizleri**

Agaroz jel elektroforezi sonunda elde edilen bant desenleri, polaroid film üzerinde görüntülenerek kuvvetli ve tekrarlanabilir ve polimorfik olan bantlar değerlendirilmeye alınmıştır. Çeşitlerin karşılaştırılmasında, bantlar var (1) veya yok (0) olarak değerlendirilmiş, Sokal and Sneath (1963) tarafından geliştirilen "Benzerlik İndeksi" formülü kullanılarak benzerlik indeksi oluşturulmuştur.

Benzerlik İndeksi =  $a / a + b$

a: İki gül çeşidi arasındaki homolog bant sayısı

b: İki gül çeşidi arasındaki homolog olmayan bant sayısı

Genotipler arasındaki genetik uzaklıkları ifade eden dendrogram, Rholf (1990), tarafından geliştirilen NTSYS-pc (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Version 1.8) programı kullanılarak "UPGMA cluster analizi" ile oluşturulmuştur.

Metin içerisinde yer alan tablo ve çizelgelerde, çeşit isimleri yerine, karışıklıkları önlemek ve daha fazla görsel alan oluşturabilmek amacıyla, kod numaraları kullanılmıştır. Çizelge ve şekillerde kullanılan genotiplere ait kod numaraları Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2 Gül genotipleri yerine kullanılan kod numaraları

Kesme Güller	Modern Bahçe Gülleri		Eski Bahçe Gülleri ve Yabani Güller
1. Akito	16. Americane	31. Keberg	43. Isparta Gülü
2. Arifa	17. Antigone	32. Laynd	44. Van Gülü
3. Atache	18. Ariane	33. Maria Callas	45. Kışmir Gül
4. Athena	19. Ariosa	34. Papa Mailland	46. Minyatür Gül
5. Black Magic	20. Baby Baccara	35. Princess Margaret	47. <i>Rosa foetida</i>
6. Dallas	21. Baccara	36. Queen Elizabeth	
7. Dallas TM	22. Cameo	37. Salmon Perfection	
8. Grand Gala	23. Carina	38. Sophia Loren	
9. Helmut Schmidt	24. Cleo	39. Soraya	
10. Jacarantha	25. Crysler Imperial	40. Super Star	
11. Marilyn Monroe	26. Diamond	41. Symphathy	
12. Osiana	27. Dr. Verhage	42. Violeine	
13. Pirol	28. Inter Flora		
14. Texas	29. Jaguar		
15. Vandela	30. Kabuki		

## 4. BULGULAR

### 4.1 DNA İzolasyonu

DNA izolasyonunda, Doyle and Doyle (1988) tarafından geliştirilen yöntem güller için uyarlanarak kullanılmıştır. Elde edilen DNA'ların miktar ve saflıkları, Biowave S2100 Diode Array marka spektrofotometre ile ölçülmüştür (Çizelge 4.1). Şekil 4.1'de, izolasyonu yapılan DNA'ların % 0.8'lik agaroz jel üzerindeki görünüşleri verilmektedir.

Çizelge 4.1 Araştırmada kullanılan gül çeşitlerinin DNA miktar ve saflık değerleri

No	Çeşit Adı	DNA ng/µl	OD 260/280
1	Akito	112	2.10
2	Arifa	168	2.05
3	Atache	174	1.95
4	Athena	329	2.11
5	Black Magic	219	2.08
6	Dallas	148	2.02
7	Dallas (TM)	196	1.76
8	Grand Gala	272	1.89
9	Helmut Schmidt	180	2.13
10	Jacarantha	154	2.14
11	Marilyn Monroe	182	2.08
12	Osiana	168	2.04
13	Pirol	130	2,12
14	Texas	304	2.03
15	Vandela	241	2.15
16	Americane	233	2.17
17	Antigone	189	1.76
18	Ariane	223	2.06
19	Ariosa	105	2.13
20	Baby Baccara	170	1.93
21	Baccara	159	1.68
22	Cameo	121	1.82
23	Carina	127	1.89
24	Cleo	208	1.87

No	Çeşit Adı	DNA ng/µl	OD 260/280
25	Crysler Imperial	132	1.96
26	Diamond	252	2.15
27	Dr. Verhage	134	1.77
28	Inter Flora	255	2.10
29	Jaguar	178	1.90
30	Kabuki	215	2.02
31	Keberg	227	1.70
32	Laynd	235	2.14
33	Maria Callas	257	2.05
34	Papa Meilland	232	1.60
35	P. Margaret	176	1.69
36	Queen Elizabeth	181	2.21
37	S. Perfection	172	2.11
38	Sophia Loren	259	1.85
39	Soraya	253	1.85
40	Super Star	209	1.94
41	Symphathy	113	1.96
42	Violeine	198	2.10
43	Isparta Gülü	320	1.86
44	Van Gülü	407	1.87
45	Kışmır Gülü	343	2.02
46	Minyatür Gül	110	1.85
47	<i>Rosa foetida</i>	184	1.77

İzolasyon sonucu elde edilen DNA miktarları arasında farklılıklar olduğu görülmektedir (Çizelge 4.1). Genomik DNA tek bir bant halinde görülürken, çok az miktarda mitekondriyal DNA'ya ve RNA'ya rastlanmış ve izolasyonun son aşamasında kullanılan RNase yardımıyla, RNA'lar ortamdaki uzaklaştırılmıştır. Yükleme kuyucuklarında, TE tampon çözeltisi içerisinde erimeden kalan DNA'ların oluşturduğu aydınlanmalar görülmekte; DNA kırılmalarının önemsiz miktarda olduğu izlenebilmektedir. DNA miktarları 105 ile 407 ng/µl arasında değişim göstermiş, en düşük miktarda DNA *Ariosa* çeşidinde belirlenirken, en yüksek DNA miktarı Van Gülünde tespit edilmiştir. DNA saflığının bir ifadesi olan OD<sub>260/280</sub> oranlarının ise, 1.60 ile 2.21 (Papa Meilland ve Queen Elizabeth) arasında değiştiği belirlenmiştir.

Spektrofotometre verileri ve Agaroz jel görüntülerine değerlendirilerek, genotiplere ait DNA'ların RAPD-PCR uygulamaları için yeterli miktar ve saflıkta olduğuna karar verilmiştir.

#### **4.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ve RAPD Analizleri**

Elde edilen DNA izolatlarında, 10 baz uzunluğundaki RAPD primerleri kullanılarak PCR işlemleri yürütülmüştür. Yapılan PCR amplifikasyonları sonucu elde edilen bant sayıları, polimorfizm oranları ve yaklaşık bant büyüklükleri Çizelge 4.2'te verilmiştir. RAPD analizleri için seçilen 19 primerle yürütülen PCR işlemleri sonucunda, toplam 176 adet bant oluştuğu tespit edilmiştir. Bu bantlardan 133 adedi genotipler arasında polimorfizm göstermiştir (Çizelge 4.2).

En fazla bant sayısı OP-E-04 ve OP-T-19 primerlerinden elde edilirken (15), en az bant sayısı (5) OP-E-14 ve OP-H-12 primerlerinden elde edilmiştir. Polimorfik bant sayısı bakımından OP-E-04 ve OP-T-19 primerleri en fazla sayıya sahipken (13), OP-H-12 primeri 2 adet polimorfik bantla en az polimorfik bant oluşturan primerler olarak belirlenmişlerdir.

Elde edilen bantların polimorfizm düzeyi, % 40 (OP-H-12) ile % 87.5 (OP-H-19) arasında değişim göstermiş, tüm bantlar değerlendirildiğinde ise polimorfik olanların yüzdesinin 75.6 olduğu bulunmuştur. Kullanılan primer başına ortalama 7.0 polimorfik bant tespit edilmiştir.



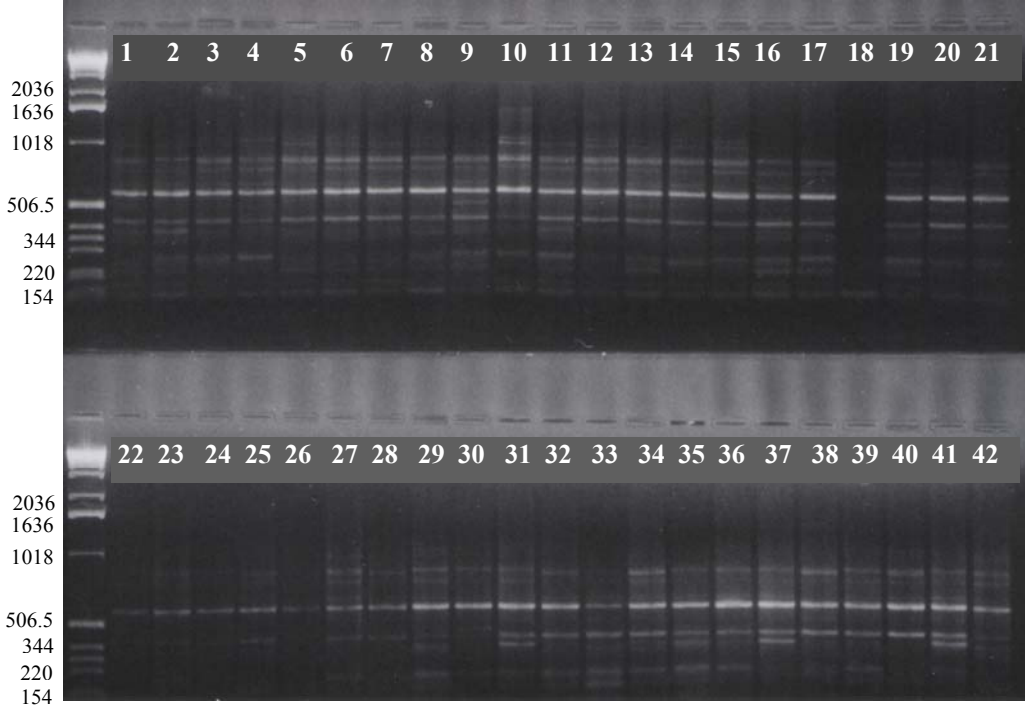
Şekil 4.1 Gül genotiplerine ait DNA'ların % 0.8'lik agaroz jel üzerindeki görüntüleri



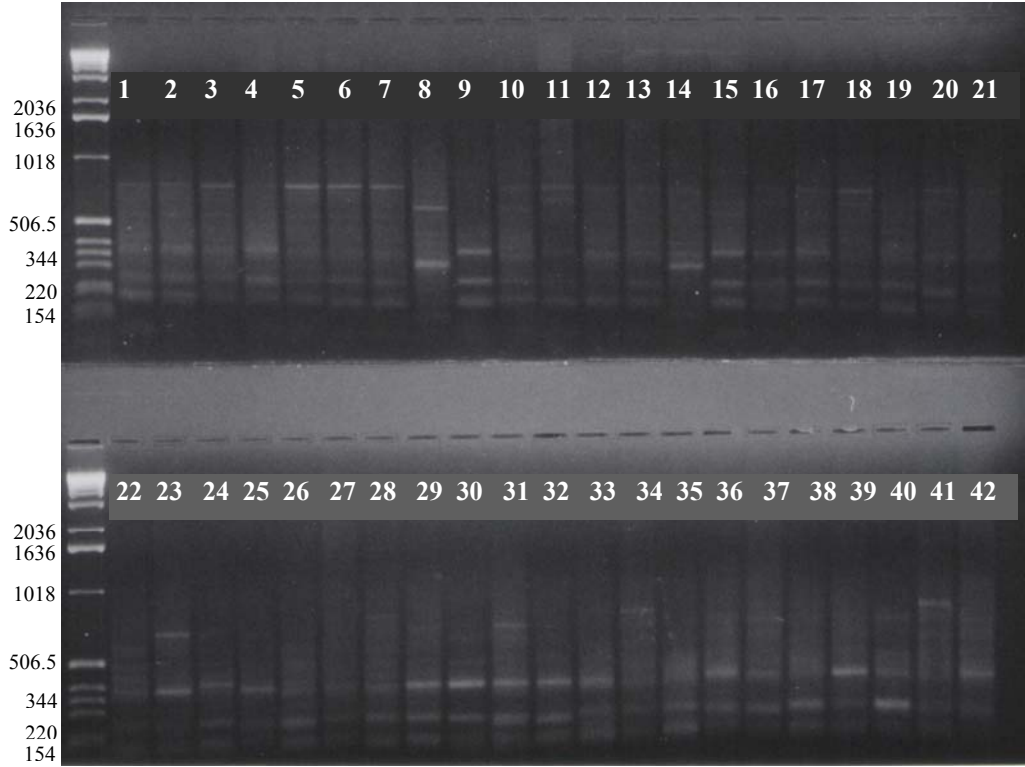
Çizelge 4.2 PCR amplifikasyonları sonucu elde edilen bant sayıları, polimorfizm oranları ve yaklaşık bant büyüklükleri

Primer Adı	Elde edilen bant sayısı	Polimorfik bant sayısı	Polimorfik bant oranı %	Yaklaşık bant büyüklüğü bp
OP-A-01	11	8	72.7	240-1630
OP-A-09	7	4	57.1	200-800
OP-A-11	8	6	75.0	200-800
OP-A-18	8	6	75.0	170-700
OP-E-04	15	13	86.6	295-950
OP-E-14	5	3	60.0	1500-2020
OP-E-19	9	7	77.8	520-2070
OP-F-01	10	8	80.0	150-860
OP-F-06	13	10	76.7	210-1600
OP-F-14	12	10	83.3	350-1420
OP-G-11	7	6	85.7	310-900
OP-G-19	11	9	81.8	130-1020
OP-H-06	10	7	70.0	200-1030
OP-H-12	5	2	40.0	300-700
OP-H-15	8	6	75.0	200-800
OP-H-19	8	7	87.5	150-800
OP-J-04	7	3	42.9	130-600
OP-T-04	7	4	57.1	210-1020
OP-T-19	15	13	86.7	130-2010
<b>Toplam</b>	<b>176</b>	<b>133</b>	<b>75.4</b>	

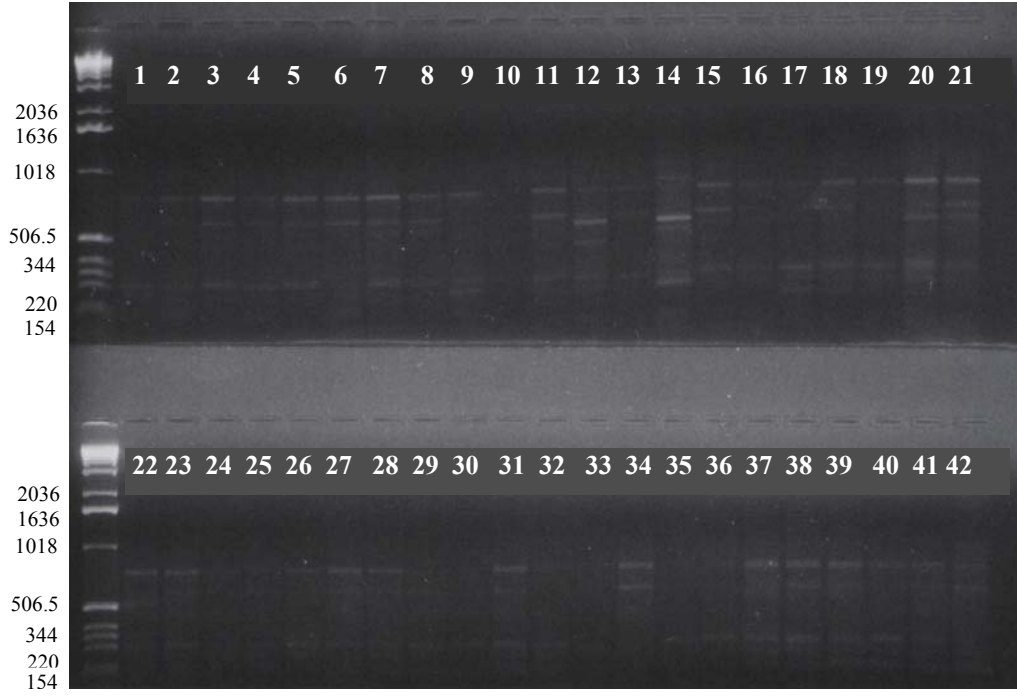
Şekil 4.2'ten, Şekil 4.20'ye kadar, ilk 42 genotipe ait RAPD-PCR ürünlerinin, agaroz jeldeki görünümüne ait resimler verilmiştir. Şekil 4.21'de son 5 genotipe ait, farklı RAPD primerleri ile elde edilmiş, PCR ürünlerinin bir jelde üzerindeki görünümüleri verilmiştir.



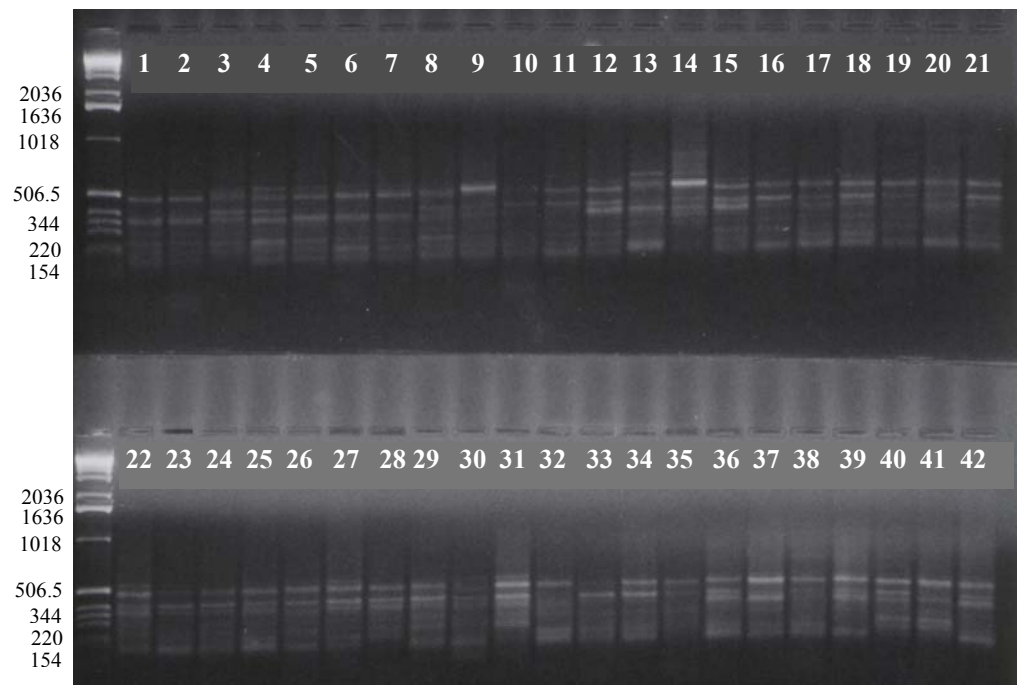
Şekil 4.2 OP-A-01 primeri ile PCR' da oluşan bantların agaroz jeldeki görünümü



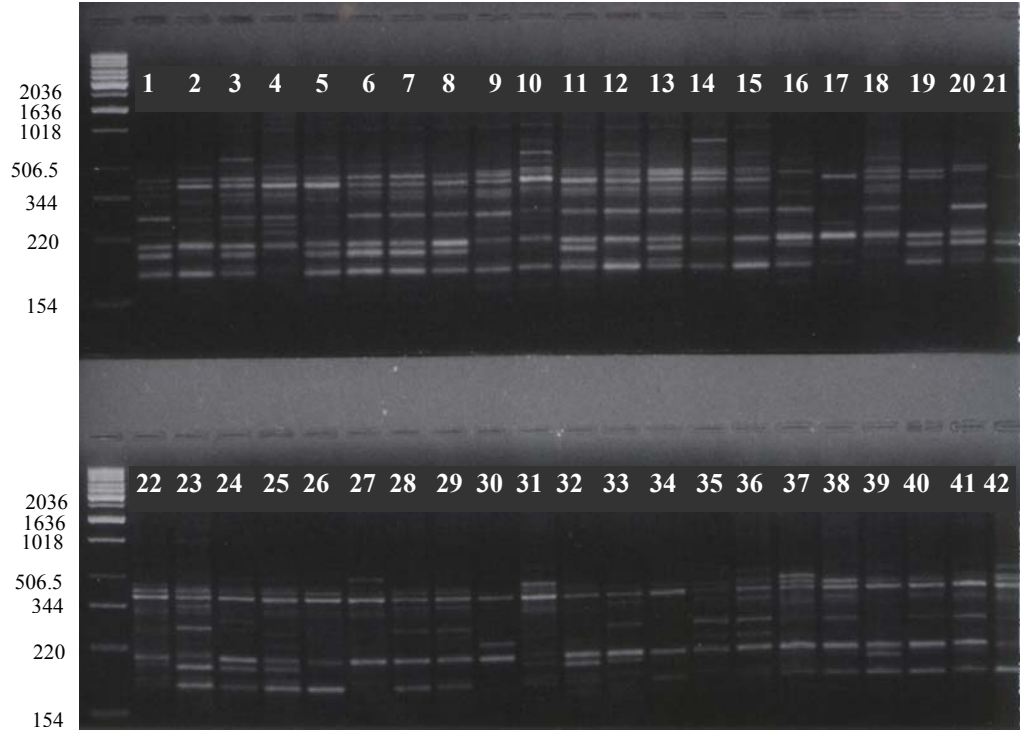
Şekil 4.3 OP-A-09 primeri ile PCR' da oluşan bantların agaroz jeldeki görünümü



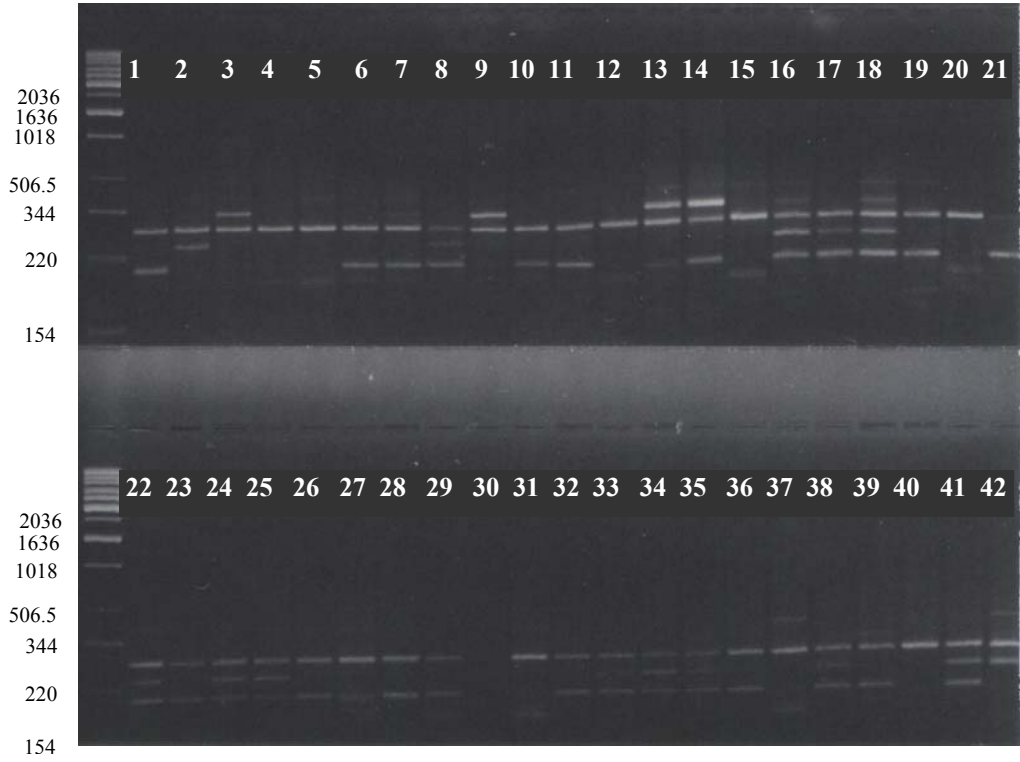
Şekil 4.4 OP-A-11 primeri ile PCR' da oluşan bantların agaroz jeldeki görünümü



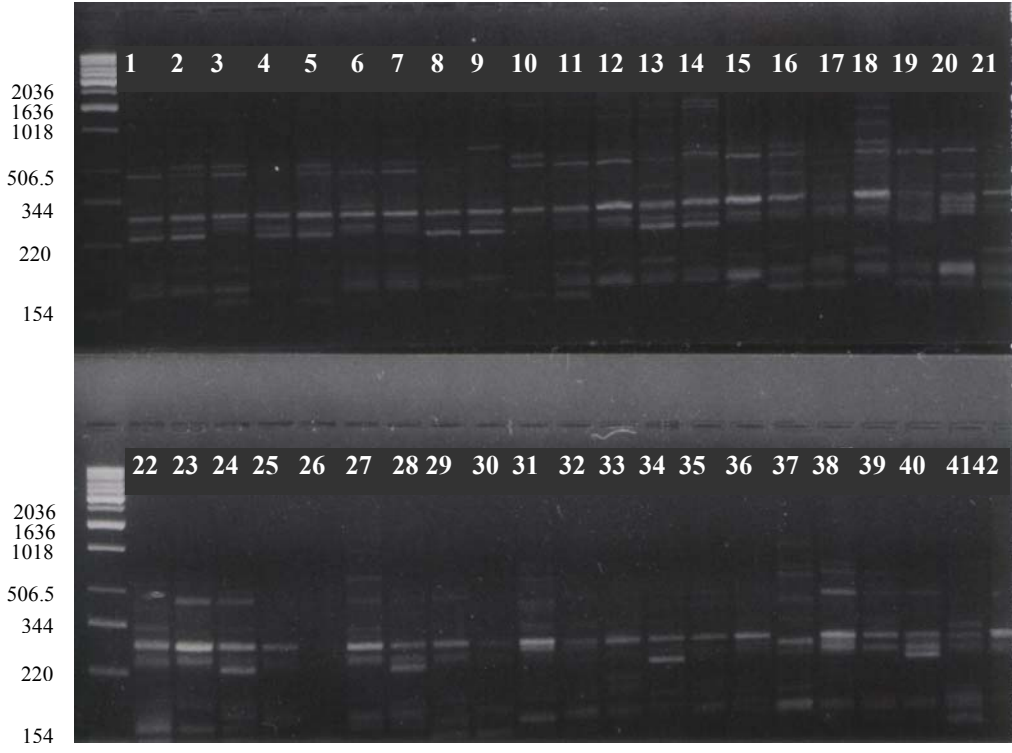
Şekil 4.5 OP-A-18 primeri ile PCR' da oluşan bantların agaroz jeldeki görünümü



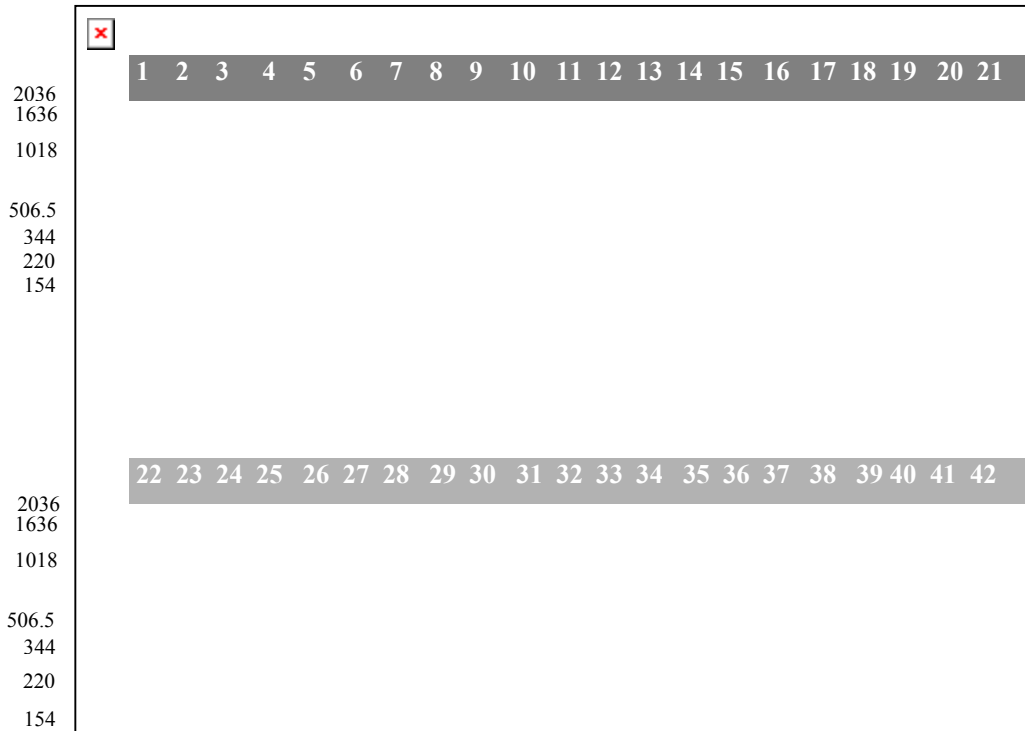
Şekil 4.6 OP-E-04 primeri ile PCR' da oluşan bantların agaroz jeldeki görünümü



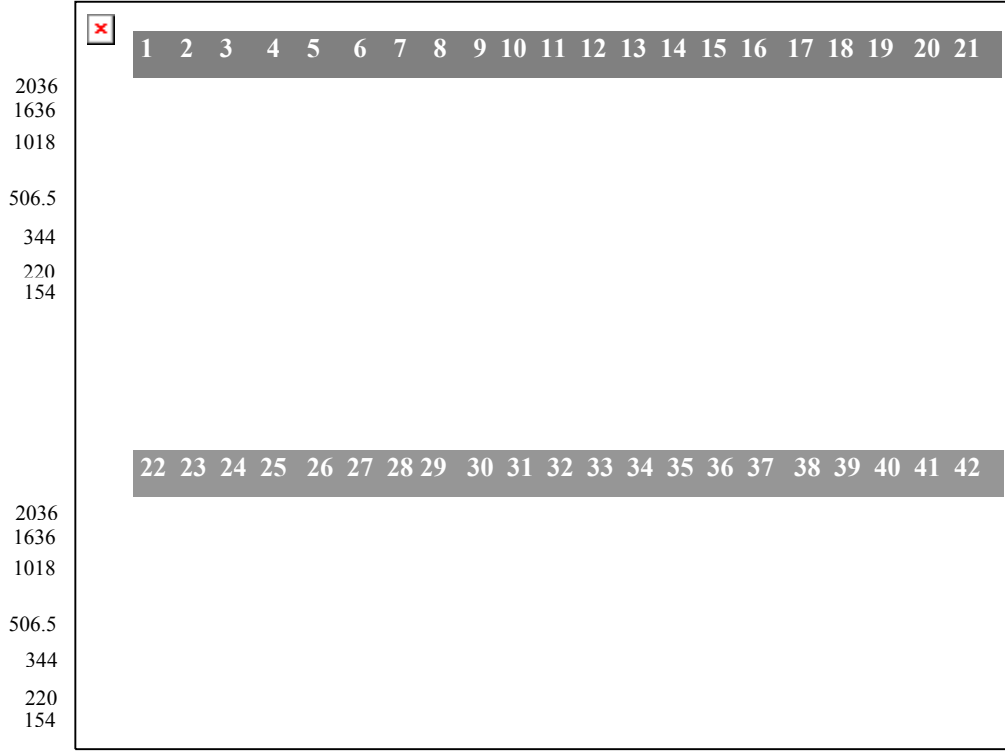
Şekil 4.7 OP-E-14 primeri ile PCR' da oluşan bantların agaroz jeldeki görünümü



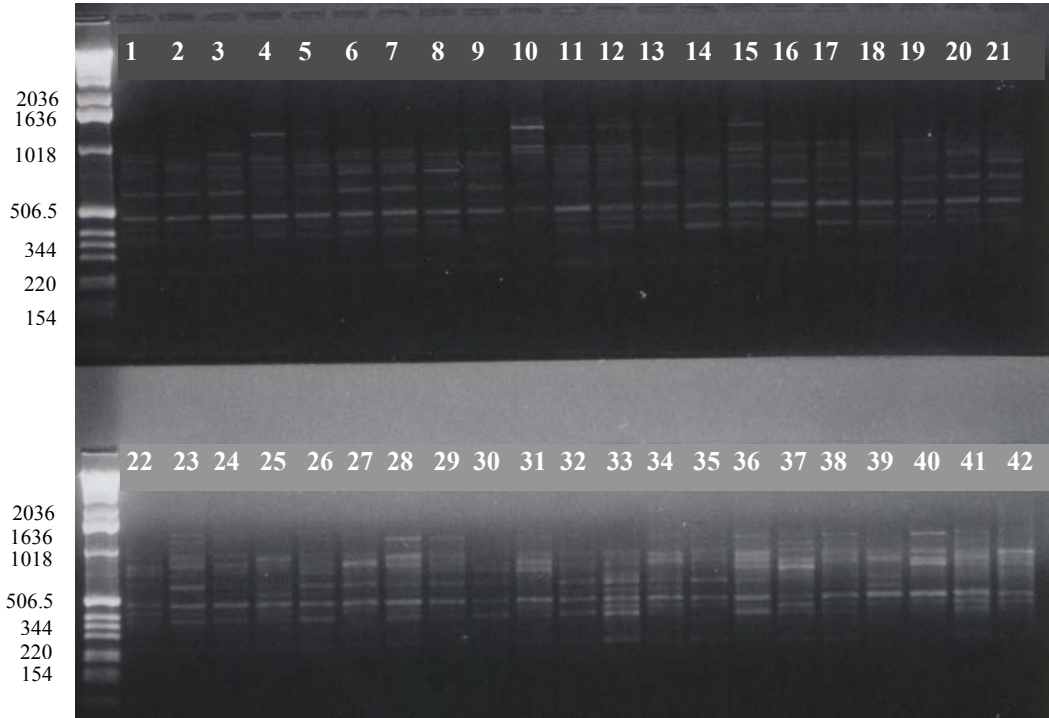
Şekil 4.8 OP-E-19 primeri ile PCR' da oluşan bantların agaroz jeldeki görünümü



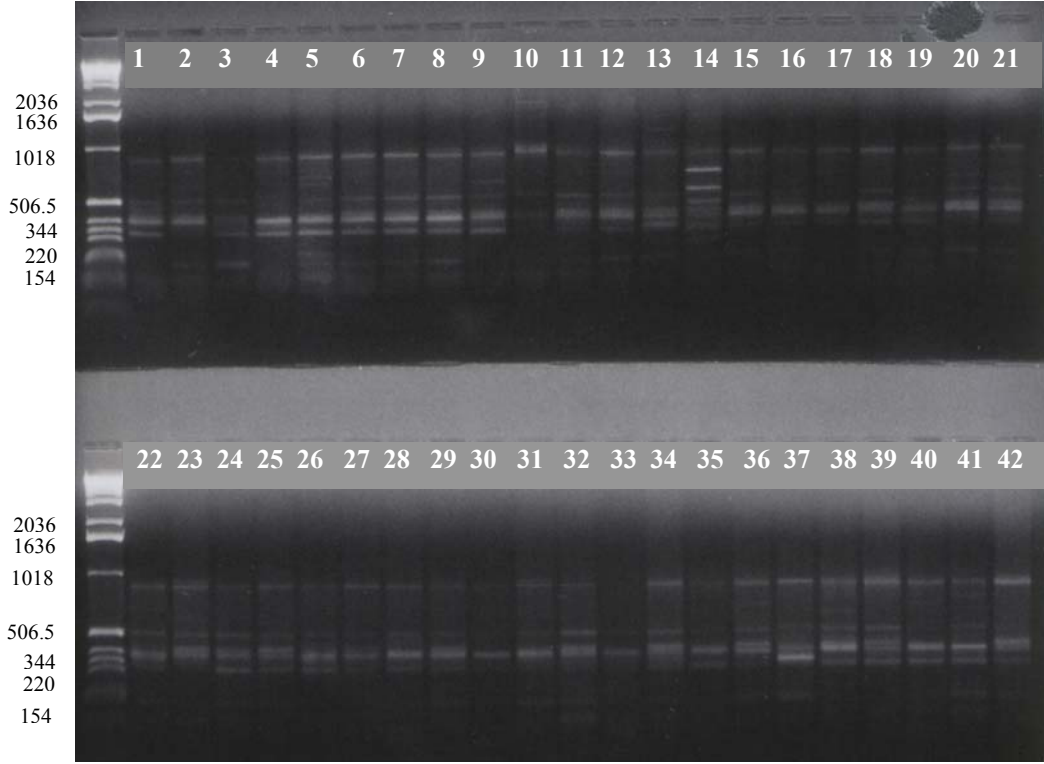
Şekil 4.9 OP-F-01 primeri ile PCR' da oluşan bantların agaroz jeldeki görünümü



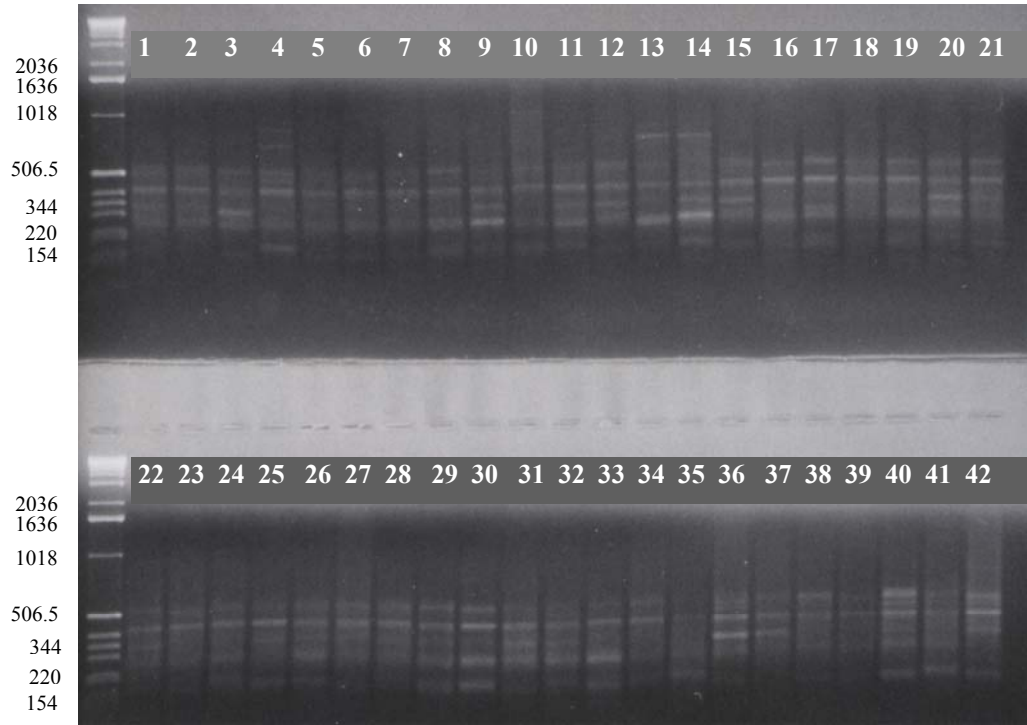
Şekil 4.10 OP-F-06 primeri ile PCR' da oluşan bantların agaroz jeldeki görünümü



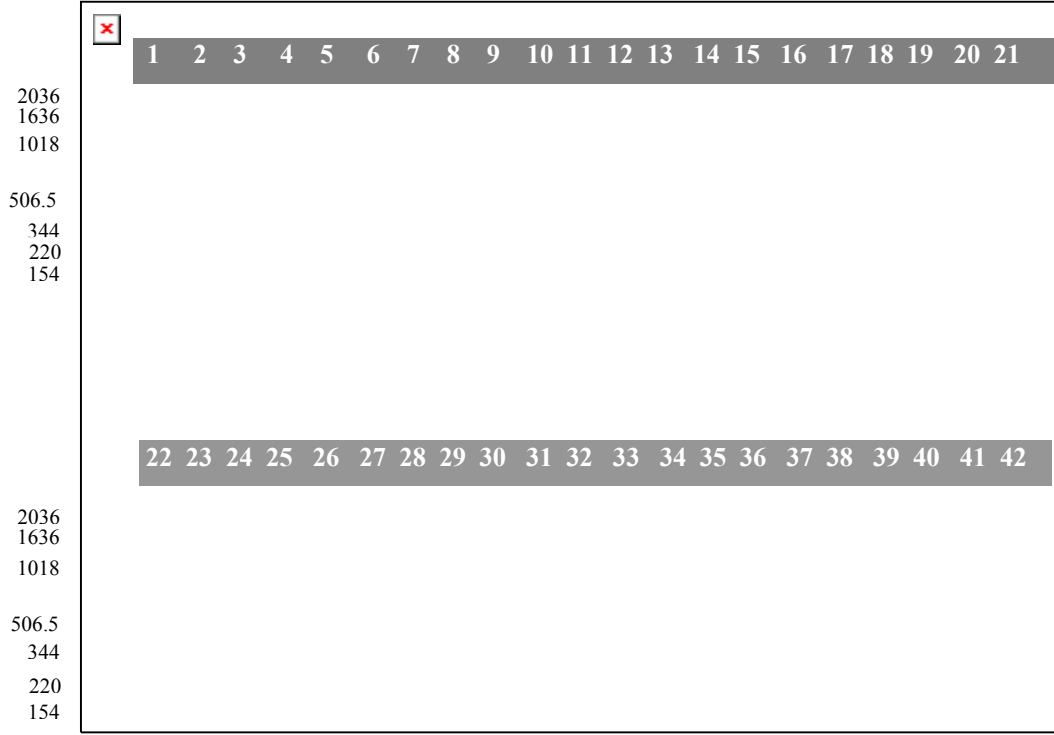
Şekil 4.11 OP-F-14 primeri ile PCR' da oluşan bantların agaroz jeldeki görünümü



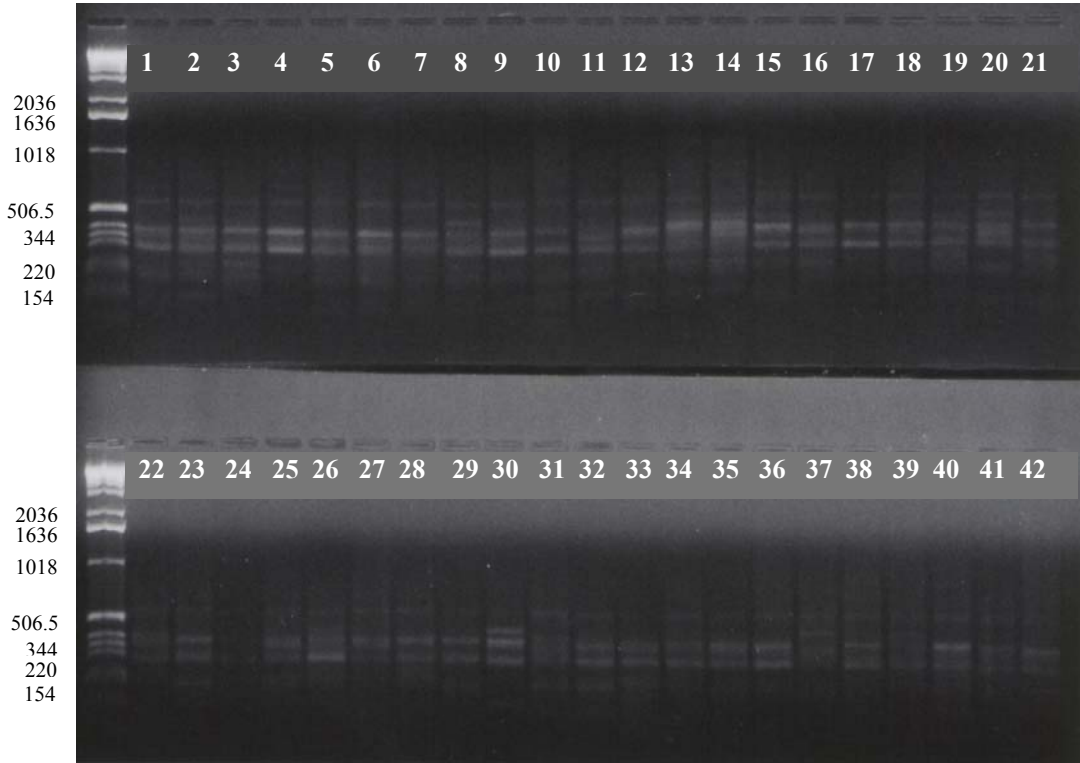
Şekil 4.12 OP-G-11 primeri ile PCR’ da oluşan bantların agaroz jeldeki görünümü



Şekil 4.13 OP-G-19 primeri ile PCR’ da oluşan bantların agaroz jeldeki görünümü

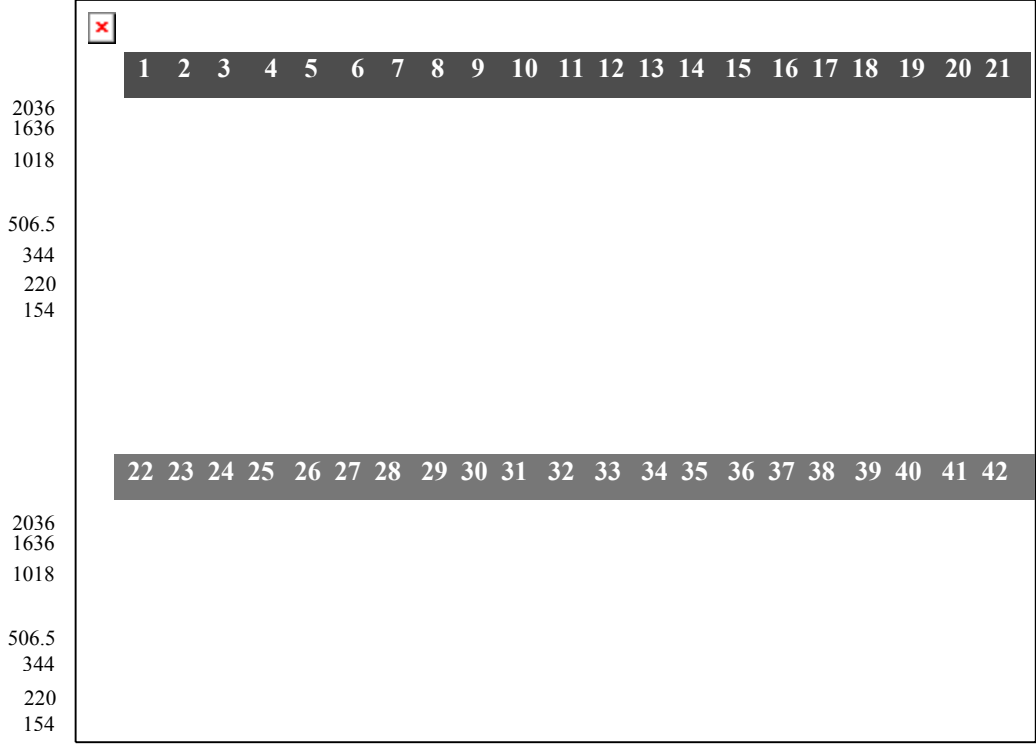


Şekil 4.14 OP-H-06 primeri ile PCR' da oluşan bantların agaroz jeldeki görünümü

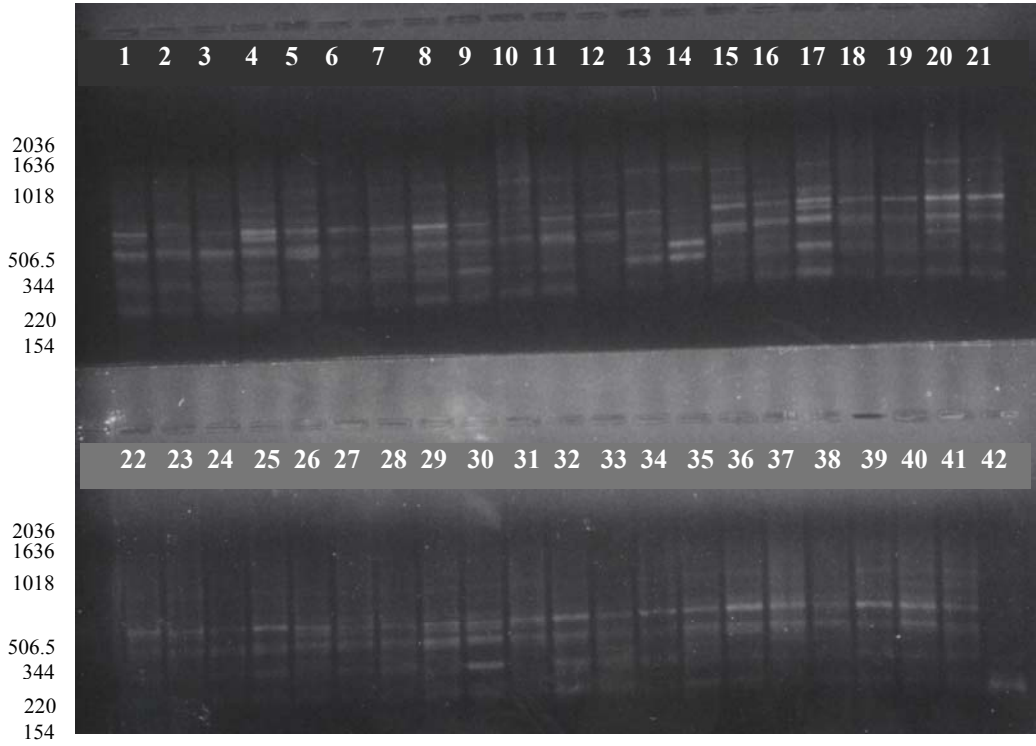


Şekil 4.15 OP-H-12 primeri ile PCR' da oluşan bantların agaroz jeldeki görünümü

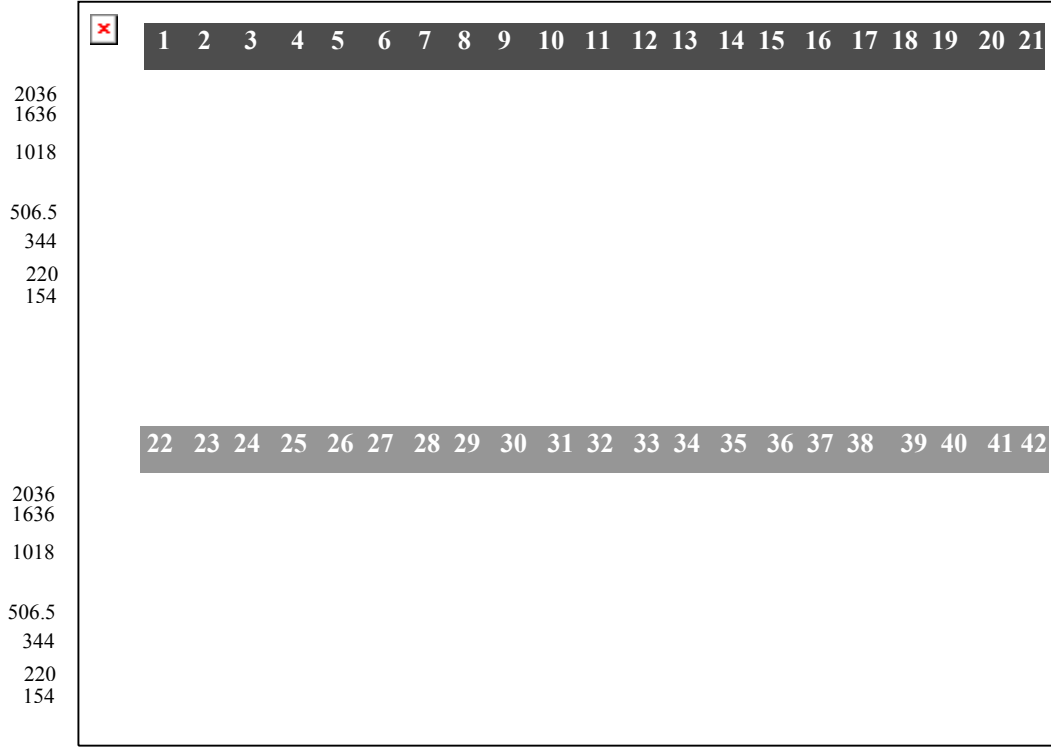




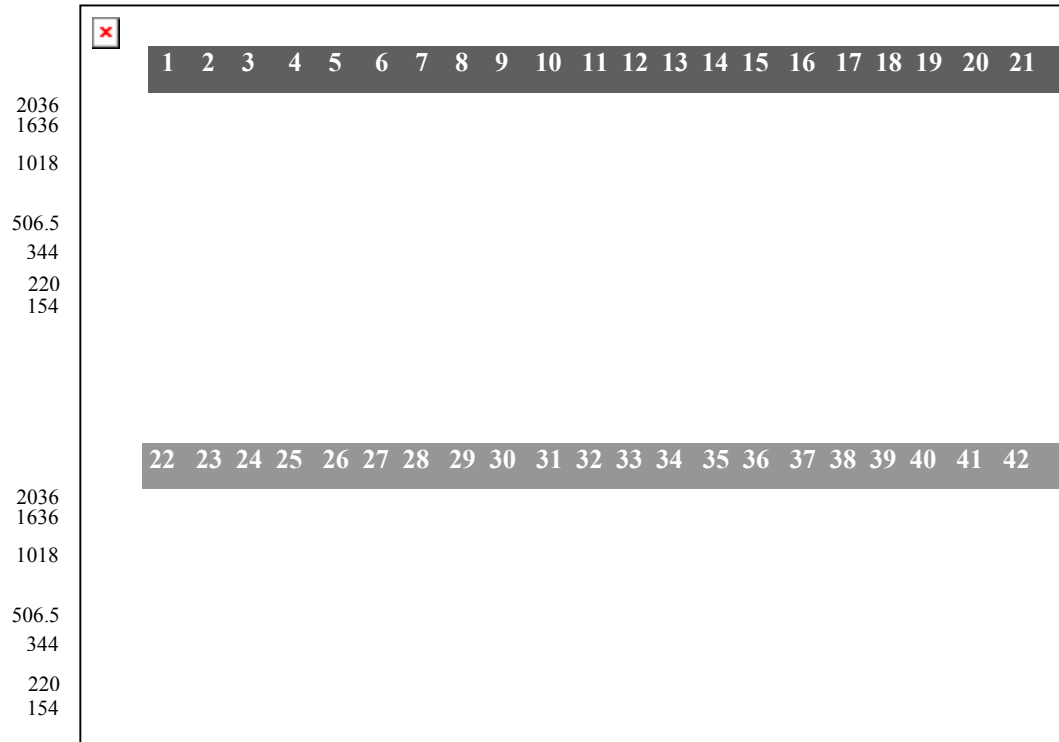
Şekil 4.16 OP-H-15 primeri ile PCR' da oluşan bantların agaroz jeldeki görünümü



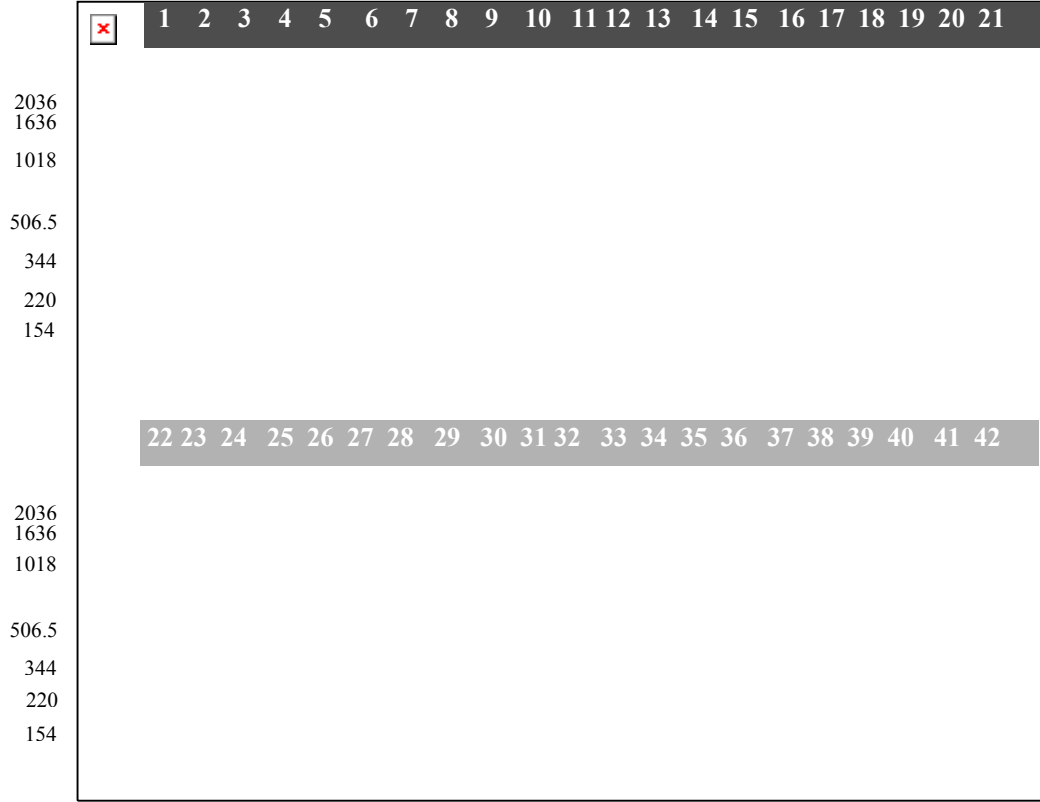
Şekil 4.17 OP-H-19 primeri ile PCR' da oluşan bantların agaroz jeldeki görünümü



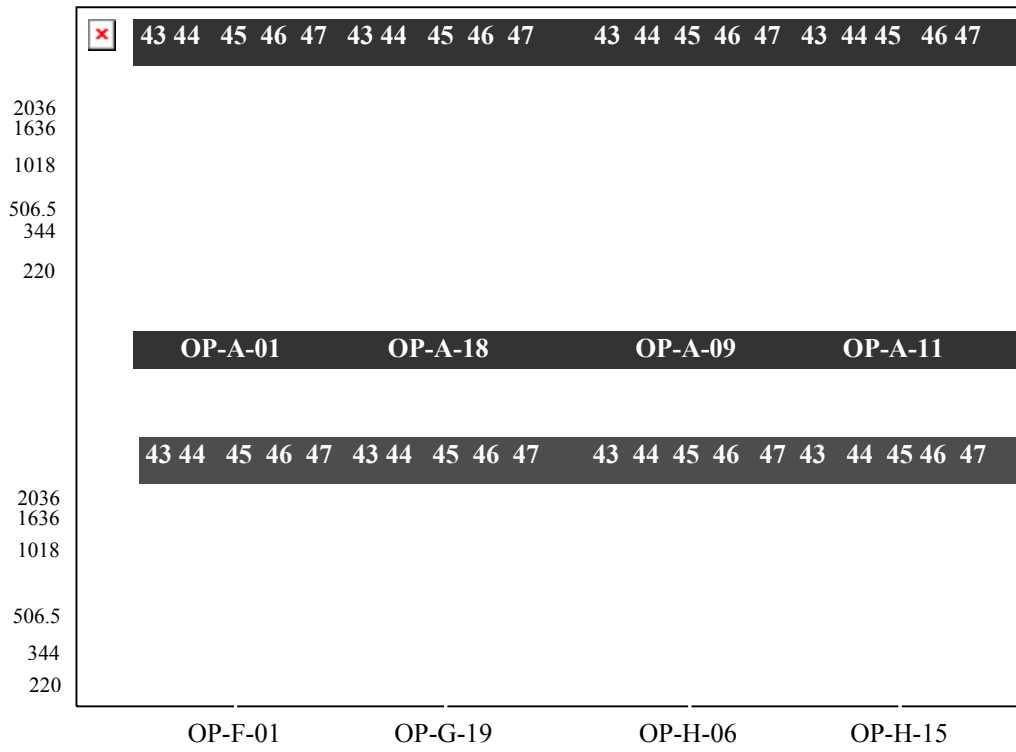
Şekil 4.18 OP-J-04 primeri ile PCR’ da oluşan bantların agaroz jeldeki görünümü



Şekil 4.19 OP-T-04 primeri ile PCR’ da oluşan bantların agaroz jeldeki görünümü



Şekil 4.20 OP-T-19 primeri ile PCR’ da oluşan bantların agaroz jeldeki görünümü



Şekil 4.21 Son 5 genotipe ait PCR’ da oluşan bantların agaroz jeldeki görünümü

### 4.3 Benzerlik İndeksi ve Dendrogram

Benzerlik İndeksi formülü ile hesaplanarak oluşturulan benzerlik indeksi tablosu Çizelge 4.3'te verilmiştir. Çizelge incelendiğinde en düşük oran (0.59) Texas çeşidi ile Kışmir Gülü arasında tespit edilmiştir. En yüksek benzerlik indeksi oranı ise 0.96 ile Dallas ve bu çeşidin tomurcuk mutasyonu olan genotip (Dallas TM) arasında olduğu görülmektedir. Black Magic-Dallas TM ve Osiana-Vandela çeşitleri 0.91 oranı ile bunu takip etmektedirler. Benzerlik indeksi üzerinde genotiplerin karşılaştırıldığı toplam 1081 kombinasyondan 249'u, 0.80 ile 0.90 arasında; 599 kombinasyon 0.70 ile 0.80; 229 kombinasyon ise 0.60 ile 0.70 arasında bir oran göstermiştir.

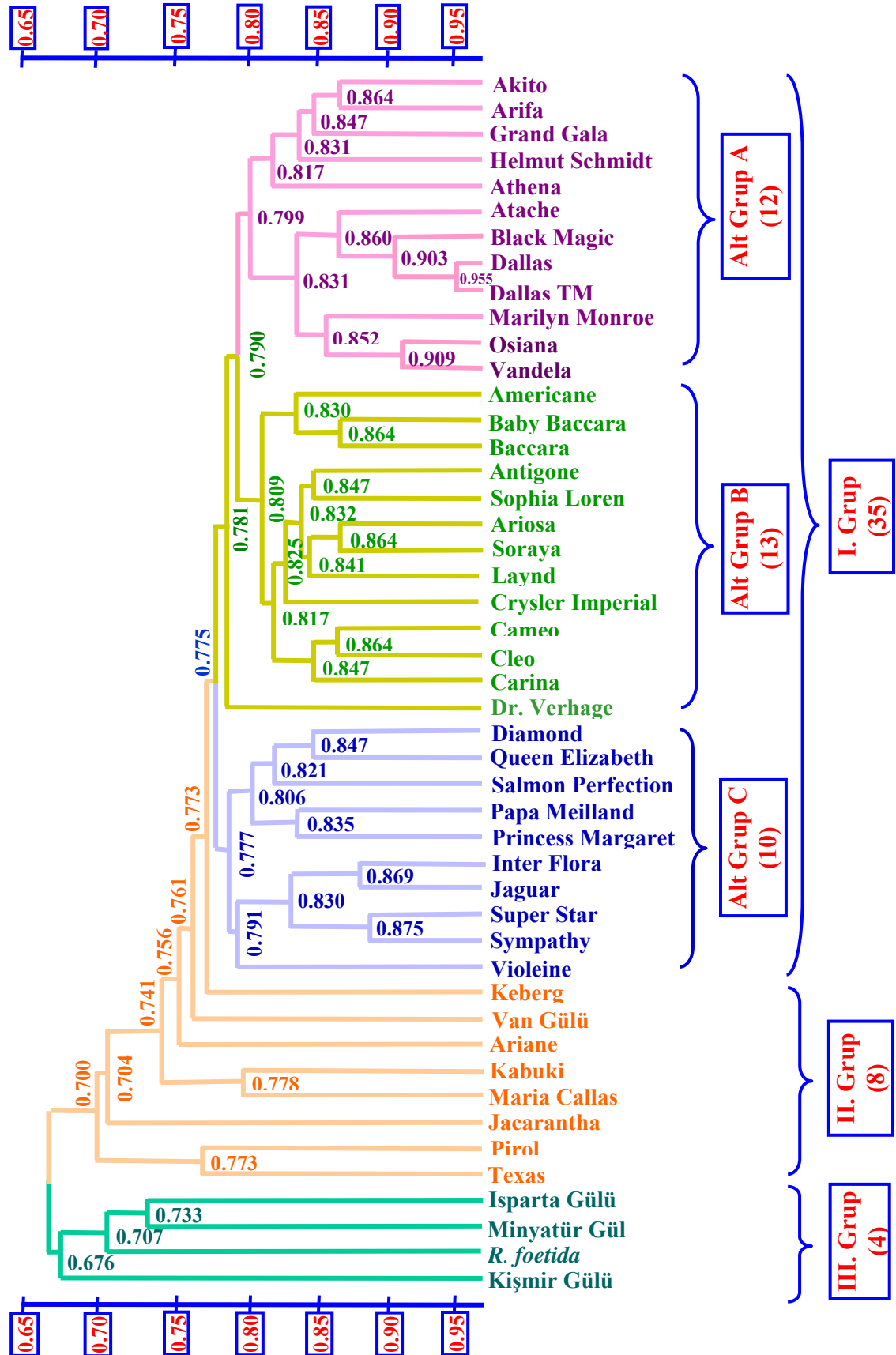
Çizelge 4.3 Gül genotiplerine ait benzerlik indeksi tablosu

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47										
1	100																																																								
2	0.86	100																																																							
3	0.82	0.80	100																																																						
4	0.82	0.81	0.76	100																																																					
5	0.85	0.85	0.85	0.82	100																																																				
6	0.85	0.81	0.88	0.80	0.90	100																																																			
7	0.87	0.82	0.85	0.80	0.91	0.96	100																																																		
8	0.86	0.84	0.77	0.82	0.82	0.83	0.86	100																																																	
9	0.85	0.81	0.78	0.82	0.77	0.76	0.79	0.84	100																																																
10	0.73	0.72	0.73	0.69	0.75	0.75	0.73	0.72	0.69	100																																															
11	0.81	0.78	0.82	0.73	0.80	0.83	0.83	0.81	0.76	0.71	100																																														
12	0.81	0.81	0.82	0.78	0.86	0.87	0.88	0.81	0.80	0.73	0.87	100																																													
13	0.79	0.73	0.76	0.72	0.75	0.77	0.78	0.77	0.74	0.66	0.78	0.76	100																																												
14	0.71	0.71	0.71	0.68	0.69	0.68	0.71	0.73	0.72	0.66	0.68	0.72	0.77	100																																											
15	0.76	0.76	0.78	0.77	0.81	0.84	0.85	0.79	0.76	0.72	0.84	0.91	0.72	0.69	100																																										
16	0.74	0.76	0.80	0.75	0.80	0.82	0.84	0.79	0.72	0.68	0.79	0.78	0.72	0.65	0.75	100																																									
17	0.81	0.80	0.79	0.78	0.76	0.80	0.82	0.82	0.81	0.69	0.78	0.77	0.72	0.70	0.75	0.83	100																																								
18	0.72	0.76	0.74	0.71	0.73	0.78	0.78	0.77	0.71	0.69	0.74	0.77	0.69	0.71	0.76	0.80	0.79	100																																							
19	0.81	0.77	0.78	0.76	0.77	0.81	0.84	0.82	0.74	0.69	0.82	0.78	0.72	0.67	0.80	0.85	0.84	0.80	100																																						
20	0.77	0.78	0.80	0.76	0.79	0.81	0.81	0.78	0.78	0.67	0.78	0.81	0.76	0.69	0.77	0.84	0.82	0.73	0.82	100																																					
21	0.80	0.74	0.78	0.75	0.76	0.81	0.81	0.78	0.75	0.67	0.78	0.77	0.70	0.67	0.76	0.82	0.85	0.74	0.84	0.86	100																																				
22	0.77	0.80	0.80	0.73	0.79	0.81	0.82	0.79	0.76	0.71	0.80	0.83	0.71	0.68	0.77	0.84	0.84	0.79	0.83	0.84	0.82	100																																			
23	0.81	0.80	0.82	0.74	0.81	0.84	0.82	0.79	0.78	0.78	0.81	0.81	0.74	0.68	0.77	0.77	0.77	0.77	0.81	0.80	0.80	0.83	100																																		
24	0.82	0.84	0.81	0.80	0.82	0.85	0.85	0.86	0.80	0.73	0.81	0.83	0.76	0.69	0.80	0.82	0.82	0.79	0.83	0.80	0.81	0.86	0.86	100																																	
25	0.81	0.78	0.77	0.80	0.74	0.80	0.80	0.82	0.80	0.68	0.77	0.78	0.72	0.63	0.73	0.77	0.82	0.76	0.80	0.78	0.78	0.84	0.78	0.85	100																																
26	0.82	0.77	0.74	0.77	0.74	0.77	0.78	0.80	0.78	0.71	0.77	0.77	0.70	0.68	0.76	0.71	0.80	0.73	0.78	0.74	0.77	0.77	0.76	0.78	0.81	100																															
27	0.80	0.75	0.78	0.78	0.78	0.81	0.82	0.78	0.78	0.74	0.77	0.78	0.72	0.69	0.77	0.76	0.82	0.77	0.78	0.74	0.77	0.78	0.76	0.78	0.79	0.75	100																														
28	0.85	0.79	0.80	0.79	0.78	0.84	0.83	0.83	0.77	0.73	0.82	0.82	0.74	0.68	0.84	0.77	0.81	0.77	0.80	0.77	0.80	0.80	0.84	0.80	0.81	0.78	100																														
29	0.81	0.77	0.80	0.76	0.79	0.81	0.80	0.79	0.74	0.73	0.84	0.81	0.72	0.69	0.78	0.77	0.78	0.73	0.78	0.77	0.77	0.78	0.77	0.82	0.74	0.80	0.77	0.87	100																												
30	0.73	0.74	0.73	0.75	0.70	0.72	0.72	0.76	0.74	0.67	0.71	0.68	0.63	0.64	0.71	0.74	0.81	0.74	0.78	0.75	0.80	0.77	0.73	0.76	0.79	0.76	0.76	0.74	0.78	100																											
31	0.80	0.77	0.77	0.77	0.78	0.80	0.81	0.78	0.74	0.69	0.80	0.78	0.72	0.63	0.77	0.76	0.76	0.71	0.76	0.78	0.77	0.78	0.77	0.78	0.78	0.79	0.76	0.82	0.80	0.76	100																										
32	0.83	0.77	0.78	0.74	0.77	0.80	0.80	0.80	0.76	0.71	0.80	0.78	0.74	0.64	0.75	0.81	0.83	0.76	0.85	0.82	0.81	0.84	0.81	0.80	0.84	0.80	0.77	0.81	0.80	0.80	0.77	100																									
33	0.72	0.72	0.73	0.71	0.69	0.72	0.73	0.75	0.69	0.66	0.72	0.70	0.67	0.63	0.68	0.79	0.77	0.71	0.79	0.74	0.77	0.77	0.73	0.78	0.75	0.72	0.70	0.74	0.76	0.78	0.72	0.84	100																								
34	0.81	0.77	0.73	0.76	0.76	0.77	0.78	0.83	0.74	0.69	0.76	0.78	0.72	0.68	0.78	0.79	0.79	0.80	0.82	0.77	0.80	0.79	0.77	0.82	0.82	0.82	0.74	0.83	0.79	0.77	0.75	0.84	0.80	100																							
35	0.76	0.75	0.73	0.74	0.73	0.76	0.76	0.79	0.72	0.72	0.73	0.74	0.69	0.67	0.72	0.77	0.75	0.77	0.77	0.71	0.74	0.77	0.78	0.80	0.77	0.77	0.75	0.79	0.77	0.77	0.74	0.81	0.80	0.84	100																						
36	0.84	0.79	0.74	0.79	0.77	0.77	0.80	0.80	0.78	0.71	0.76	0.81	0.72	0.68	0.78	0.73	0.81	0.74	0.79	0.72	0.74	0.79	0.79	0.81	0.83	0.85	0.77	0.83	0.79	0.76	0.78	0.85	0.74	0.84	0.82	100																					
37	0.79	0.76	0.76	0.72	0.72	0.76	0.77	0.76	0.78	0.68	0.75	0.77	0.69	0.65	0.77	0.72	0.77	0.73	0.77	0.76	0.73	0.77	0.76	0.78	0																																

Genotipler arasındaki genetik uzaklıkları gösteren dendrogram, farklı sayıda genotip içeren 3 ana gruptan oluşmaktadır (Şekil 4.21). 1. ana grup 35 genotiple en büyük grubu oluştururken, 2. ve 3. ana grup sırasıyla 8 ve 4 genotip içermektedir. En çok genotip içeren 1. ana grup, kendi içerisinde 3 alt gruba (A, B ve C) ayrılmıştır. A alt grubu 12; B alt grubu 13; C alt grubu ise 10 genotipe sahiptir. Alt gruplar içerisinde, farklı sayıda genotip bir araya gelerek üçüncül gruplar da oluşturmaktadırlar.

1. ana gruba ait olan A alt grubundaki genotiplerin tamamı kesme gül çeşitlerinden oluşmaktadır. Bu grup içerisinde, ayrıca da tüm genotipler arasında en yüksek yakınlığa, 0.955 oran ile Dallas ve Dallas TM arasında rastlanmıştır. B alt grubu içerisinde yer alan Ariosa ve Soraya, 0.864'lük oranla en yakın grubu oluştururken, bu alt grup içerisinde değerlendirilen Dr. Verhage çeşidi, A ve B alt gruplarında bulunan genotiplere, 0.781 oranında bağlılık göstermiştir. B alt grubu, tamamıyla modern bahçe gülleri tarafından oluşturulmuştur. C alt grubu içerisinde, farklı genotiplerin oluşturduğu iki grup tespit edilmiştir. Bu alt grup içerisinde en yakın oran 0.875 ile Super Star ve Symphathy çeşitleri arasındadır. B grubunda olduğu gibi C grubunu oluşturan genotiplerin tamamı da modern bahçe tipi güllerdir.

2. ana grubun bahçe gülleri (Keberg, Van Gülü, Kabuki, Maria Callas, Ariane) ve kesme güllerinden (Jacarantha, Pirol ve Texas) oluştuğu görülmektedir. Bu grup içerisinde en yüksek genetik bağlılık 0.778 oranı ile Kabuki ve Maria Callas çeşitleri arasında tespit edilmiştir. Dendrogramda görülen 3. ana grup 4 genotipten oluşmaktadır. Çeşitler arasındaki bağlılıkları oluşturan dallanmalar 0.733 oranında daha düşük oranlarda gerçekleşmiştir. Bu grubu oluşturan genotipler Türkiye'de yetişen, yabani veya buna yakın formda ve muhtemelen de diploid gül türü veya çeşitleridir.



Şekil 4.22 Genetik ilişki dendrogramı

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Morfolojik markörler, genotipik tanımlama amacıyla kullanılabilir. Morfolojik markörler, kolay elde edilebilmeleri ve bazı durumlarda kullanımları mutlak gerekli olmaları yanında, çevresel faktörlerden de etkilenebilmektedir. Fenotipik özelliklerin genetik kontrol mekanizmasının tam bilinmemesi, yetersiz varyasyon ve aranılan fenotipik özelliklerin, uygun büyüme aşamasında ortaya çıkışının uzun zaman alması, bitki ıslahçıları daha hızlı ve doğru karar vermekte yardımcı olan, DNA markör sistemlerine yönelen diğer sınırlayıcı etkenlerdir.

Morfolojik karakterlere bağlı sınıflandırma, *Rosa* cinsi içerisindeki çok sayıda türün bulunması, güllerin coğrafi dağılımı, poliploidi ve sık olarak yapılan tür içi ve türler arası melezlemeler on binlerce gül çeşidinin ortaya çıkmasına neden olmuştur. Halen geliştirilen güllerin tanımlama ve sınıflandırılmada morfolojik karakterler kullanılmasına rağmen, gül ıslahçıları ıslah edilen modern gül çeşitleri arasında, çiçek rengi gibi önemli birçok morfolojik karakterin varyasyonunun sınırlı olduğunu ifade etmektedirler.

Bununla birlikte, genetik kaynakların tespiti, genetik ilişkilerin ortaya çıkarılması, bitki ıslahçı hakları ve patent koruma çalışmaları için, güllerin hızlı ve doğru olarak tanımlanması gerekmektedir. RFLP gibi hibridizasyon esaslı, RAPD, SSR, AFLP gibi PCR esaslı geliştirilmiş DNA tekniklerin bu amaçla kullanılabileceği farklı araştırmacılar tarafından gösterilmiştir.

Bitkilerden DNA izolasyonu, moleküler analizlerin başlangıç noktasıdır. Diğer yandan, moleküler markör tekniklerinin uygulanabilmesi için, uygun miktar ve kalitede DNA izolasyonunun yapılmış olması mutlak gereklidir. Yüksek polisakkarit içeriğine sahip bitki türlerinde bu temel gereksinimin sağlanması oldukça güç olmaktadır (Do and Adams 1991, Fang *et al.* 1992).

Bitki organlarının farklılığı; farklı yaprak dokusu ve yaprak yaşı; doku bileşiminde bulunan, nükleik asitlerin yapısını ve saflığını etkileyen organik kökenli kimyasallar (polifenoller, polisakkaritler, tanenler ve reçineler vb.) nedeniyle her zaman iyi bir nükleik ait izolasyonu mümkün olamamaktadır (Doyle and Doyle 1988). İkincil



bileşikler DNA'nın çözülmesini engelleyerek büyük miktarda DNA kayıplarına ve sıklıkla analizlerde kullanılan enzimlerin (restriksiyon enzimleri, modifikasyon enzimleri ve DNA polimeraz enzimi gibi) çalışmamasına neden olmaktadır (Scarafani and Duranti 2001). Kaufman *et al.* (1999), DNA izolasyonu aşamasında karbonhidratlar ve nükleik asitlerin birlikte çökerek, DNA'yı yapışkan bir eriyik içerisine hapsedtiğini, bunun ise DNA'nın tekrar temizlenmesini zorlaştırdığını ifade etmektedirler.

RAPD-PCR tekniği ile güllerin genetik tanımlamasını ve aralarındaki genetik ilişkilerin aydınlatılmasını amaçlayan bu çalışmadan elde edilen sonuçlar aşağıda detay ile açıklanmıştır.

Gül türleri gibi ikincil bileşikler bakımından zengin bitki türlerinde saf bir DNA izolasyonu yapabilmek için çoğunlukla yüksek CTAB oranlı veya fenol yıkama aşamalarını içeren izolasyon teknikleri kullanılmaktadır. Ancak yüksek oranda CTAB kullanımında, elde edilen DNA miktarında azalmalar meydana gelirken, fenol yıkaması aşamalarını içeren yöntemlerde az miktarda DNA elde edilmesinin yanında, bu kimyasal maddenin daha sonra ortamdan tamamen uzaklaştırılmaması enzim çalışmasını engellemektedir.

Yüksek polisakkarit içeriğine sahip olan güllerde başarılı bir DNA izolasyonu için Doyle and Doyle (1988) izolasyon tekniği uyarlanarak kullanılmıştır. Yöntemde yapılan değişiklikler düşük CTAB oranlı (% 1) ekstraksiyon tamponu ve fazladan izolasyon aşamaları kullanılarak, DNA miktarının korunması yanında, yüksek saflıkta DNA elde edilmesi amacıyla yapılmıştır. Orijinal yöntemle oranda daha az miktarda DNA elde edilmesine rağmen, elde edilen DNA miktar ve saflığı RAPD analizleri için yeterli düzeyde bulunmuştur.

Analizlerde kullanılan primerler, farklı araştırmacılarca (Debener *et al.* 1996, Jan *et al.* 1999) güllerde çalıştığı tespit edilenlerle birlikte, toplam rasgele seçilmiş 50 dekamer primerin taranmasıyla belirlenmiş ve bunlar arasından, en iyi bant deseni ve polimorfizmini oluşturan 19 primer analizlerde kullanılmıştır. Kullanılan primerler 5 ile 15 arasında bant oluştururken, polimorfik bant sayısı da, 2 ile 13 arasında değişim göstermiştir. Bantların polimorfizm oranları, % 40 (OP-H-12) ile % 87.5 (OP-H-19) arasında değişmektedir (Çizelge 4.2). Bant sayıları ve polimorfizm düzeyleri birlikte

değerlendirildiğinde, OP-A-01, OP-E-04, OP-F-01, OP-F-06, OP-F-14, OP-G-11, OP-G-19 ve OP-T-19 primerleri, araştırma için en iyi sonucu vermişlerdir.

Genotipler arasındaki genetik ilişkileri gösteren dendrogram, farklı sayıda genotip içeren 3 ana gruptan oluşmaktadır (Şekil 4.22). I. ana gruba ait olan A alt grubundaki genotiplerin tamamı kesme gül çeşitlerinden oluşmaktadır. Bu grup içerisinde ayrıca da tüm genotipler arasında, en yüksek yakınlığa 0.955 ile Dallas ve bu çeşidin tomurcuk mutasyonu olan çeşit (Dallas TM) arasında rastlanılmaktadır. Black Magic 0.903'lük; Atache ise 0.860'lık bir yakınlıkla Dallas ve Dallas TM'nun oluşturduğu gruba bağlanmaktadır. Osiana ve Vandela çeşitleri 0.909'luk oranla diğer bir grubu oluştururken bu ikiliye 0.852'lik yakınlıkla Marilyn Monroe çeşidi katılmaktadır. Akito, Arifa, Grand Gala, Helmut Schmidt ve Athena ise kendi aralarında diğer bir grubu oluşturmaktadırlar.

Dallas tüm kesme güller içerisinde en fazla üretim payına sahiptir (% 70-80). Ayrıca kırmızı kesme güller arasında da % 85-90 üretim payı bulunmaktadır. Kırmızı güller arasında geri kalan % 10'luk üretim payının büyük kısmını ise Black Magic çeşidi oluşturmaktadır. Bu iki gülün kullanım amaçlarının aynı oluşu yanında, Black Magic çeşidinin daha koyu (bordo-kırmızı) gül rengi dışında, morfolojik olarak da büyük benzerlikler göstermektedirler. Dallas ve Black Magic gül çeşitleri, dendrogram üzerinde % 90.3 oranda birbiri ile yakın ilişkili olarak bulunmuştur. Bu sonuç, çeşitlerin ıslah programlarında aynı veya benzer gen havuzlarından seçilerek alınmalarından kaynaklanabilir.

Dallas TM genotipinin, Dallas çeşidinin tomurcuk mutasyonu olduğu ifade edilmektedir. Bu sav doğrultusunda denemeye alınan Dallas TM, bütün genotipler arasında en yüksek genetik benzerlik oranı göstererek (% 95.5) Dallas çeşidine yakın bulunmuştur. Elde edilen bu sonuç, gerçekte, bu çeşidin orijinal Dallas çeşidinden tomurcuk mutasyonu sonucu oluştuğu savını güçlendirmektedir.

A alt grubu içerisindeki diğer kesme güller arasında görülen gruplaşmalar ve çeşitler arasındaki genetik (en düşük % 79.9 ve en yüksek % 90.9) dağılımlar, bu çeşitlerin ıslah sahibi/ticari firmalarının farklı oluşundan kaynaklanabilir. Başka bir ifade ile ıslah süreçlerinde genetik olarak birbirinden uzak ebeynlerin kullanılması bu sonuca neden

olabilir. Grubun tamamının kesme güllerden oluşması ve aralarındaki genetik yakınlığın % 79.9 oranından fazla oluşu, görülen farklılıkların ıslah süreçlerinde aynı ebeveynler kullanılsa dahi, melezlemeler sonucu doğal olan genetik açılmaların da, bu düzeyde bir farklılık yapması mümkün görülmektedir.

B alt grubu içerisinde en yüksek genetik yakınlık 0.864 olarak tespit edilmiştir. Ariosa ve Soraya çeşitleri; Baby Baccara ve Baccara çeşitleri ile Cameo ve Cleo çeşitleri 0.864'lük oranla birbirine bağlı bulunmuş, ilk gruba Laynd 0.841; Chrysler Imperial çeşidi ise 0.825 oranla eklenmiştir. Ayrıca birbirine 0.847 oranında bağlı Antigone ve Sophia Loren çeşitleri de 0.832'lik oranla bu gruba dâhil olmuşlardır. Diğer taraftan Baby Baccara ve Baccara grubuna (0.864 oranla bağlı), Americane çeşidi 0.830'lük oranla bağlanmıştır. Bu alt grup içerisinde Carina 0.847 oranla, birbirine 0.864 oranda yakın bulunan Cameo ve Cleo çeşitlerine bağlanmıştır. B alt grubu içerisinde değerlendirilen Dr. Verhage çeşidinin esasında, A ve B alt gruplarına eşit yakınlık oranına sahip (0.781) olduğu bulunmuştur. I. ana grubun içerisinde yer alan B alt grubu tamamıyla modern bahçe gülleri tarafından oluşturulmuştur.

C alt grubu içerisinde Diamond, Queen Elizabeth, Salmon Perfection, Papa Meilland, Princess Margaret ve Inter Flora, Jaguar, Super Star, Symphathy, Violeine çeşitlerinin oluşturduğu iki grup tespit edilmiştir. Bu alt grup içerisinde en yakın oran 0.875 ile Super Star ve Symphathy çeşitleri arasında bulunurken, diğer çeşitler bu değer altına olmak üzere kendi aralarında dallanmalar göstermektedirler. B grubunda olduğu gibi, C grubunu oluşturan genotiplerin tamamı da modern bahçe tipi güllerdir.

B ve C alt grupları birlikte değerlendirildiğinde;

Her iki grup da, kesme gül çeşitlerinden oluşan A alt grubunun da içerisinde olduğu, I. ana grupta yer almaktadır. Ancak A grubundan farklı olarak bu iki alt grup (B ve C) tamamen modern bahçe güllerinden oluşmaktadır. Dendrogramdaki genetik yakınlık oranları incelenecek olursa, nispi olarak A alt grubunun en yüksek, B alt grubunun ortada ve C alt grubunun da en düşük değerler aldığı görülmektedir. I. ana grup içerisinde 3 alt gruba dağılmış bu genotipler, modern güller sınıfında yer almaktadırlar. Modern güllerin ıslah geçmişleri ise ortak bir gen havuzuna dayanmaktadır. Buradan yola çıkılarak, ortak bir gen havuzundan meydana gelen genetik varyasyon içerisinde,

bahçe ve kesme tipi olmak üzere, iki farklı yetiştiricilik grubu için de kullanılabilir genotiplerin oluştuğu düşünülebilir. Araştırmada kullanılan RAPD markörleri, aynı genetik tabandan gelen, ancak farklı amaçlar için ıslah edilmiş genotipleri ayırmada ve gruplandırmada büyük oranda başarı sağlamıştır.

II. ana grubun, bahçe gülleri (Keberg, Van Gülü, Kabuki, Maria Callas, Ariane) ve kesme güllerden (Jacarantha, Pirol ve Texas) oluştuğu görülmektedir. Bu grup içerisinde Kabuki ve Maria Callas çeşitleri birbirine 0.778; Pirol ve Texas çeşitleri 0.773 oranında bağlı bulunmuşlar, diğer çeşitlerde bu değerlerden daha yüksek olmamak üzere bu iki gruptan birisine bağlanmışlardır.

Her iki yetiştiricilik amacı için ıslah edilmiş (kesme ve bahçe tipi gül) genotiplerini bir arada bulduran II. ana grup için, I. ana gruptaki değerlendirmeleri yapmak mümkün olmamakla birlikte, çelişkili de görülmektedir. Ancak grubu oluşturan genotiplerin birbiri ile ve diğer gruplarla oluşturduğu genetik yakınlık oranlarına bakıldığında nispeten düşüklüğü dikkat çekmektedir. Grupta yer alan 3 kesme gül çeşidinden birisi olan, Jacarantha çeşidi ve bahçe gülü olan Ariane (1818), erken ıslah edilen gül çeşitlerindedir. Pirol ve Texas, kesme gül tipinde olmalarına rağmen, bitki habitüsleri çiçeklenmeleri bakımından erken dönem ıslahı edilen eski gülleri andırmaktadırlar. Yine bu grupta yer alan Van gülü, Van ili civarında çok eski zamanlardan beri doğal olarak yetişmekte veya yetiştirilmektedir. Ancak çiçeklerinin iriliği, katmerliliği ve aynı zamanda Isparta gülüne benzer kokusunun oluşu, bu çeşidi yabancı türlerden ayırmakta ve eski dönemlerde bir ıslah sürecinden geçmiş olabileceği ihtimalini arttırmaktadır. Grupta yer alan diğer bahçe güllerinin, bu araştırma kapsamında orijin, pedigri ve ıslah süreçlerine ait bir veri bulunmamaktadır. Var olan bilgilerin ışığı altında, bu grubu oluşturan güllerin ıslah süreçleri içerisinde modern bahçe gülleri ile yabancı tür/tipler arasında kalan eski ıslah güllerinden oluştuğu düşünülmektedir.

Dendrogramda görülen III. ana grup 4 genotipten oluşmaktadır. Çeşitler arasındaki bağıllık oranları 0.733'ten daha düşük oranlarda gerçekleşmiştir. Bu grubu oluşturan genotipler, Türkiye'de doğal olarak yetişen yabancı tür ve çok erken dönem ıslah edilen, modern güller sınıfında yer almayan, eski bahçe güllerinden oluşmaktadır. *R. foetida* Türkiye'de yetişen yabancı türlerden birisi olup, Avrupa'da modern güllerin

oluşturulmasında kullanılmış bir türdür. Minyatür Gl ve Kişmir Gl, Van civarındaki bahçelerde doğal olarak yetişmekte ancak ışlah geçmişleri hakkında bir bilgi bulunmamaktadır. Isparta Gl ile birlikte, bu grubu oluşturan diğer güller kendi aralarında ve diğer iki grupla en düşük genetik yakınlık oranını göstermektedirler.

Debener *et al.* (1996), RAPD markörlerinin, *Rosa* alt cinsi içerisindeki farklı bölümlerde (*Caninae* ve *Cinnamomeae*) yer alan türleri ayırmada kullanılabileceğini göstermiştir ki, bu da III. grup ile diğer iki grup arasında belirlenen farklılıkları açıklamaktadır.

Sonuçlar maddeler halinde verilecek olursa;

- Araştırmada uyarlanarak kullanılan Doyle and Doyle (1988) DNA izolasyon yöntemi, gllerde RAPD analizleri için uygun miktar ve saflıkta DNA vermiştir.
- 19 primerle yürütülen RAPD-PCR analizlerinde, toplam 176 ve 133 polimorfik bant elde edilmiş, analizlere alınan genotiplerin tamamı tanımlanmış ve aralarındaki genetik ilişkiler ortaya çıkarılmıştır.

Buna göre;

- Aynı genetik havuzdan gelmelerine rağmen, yetiştiricilik amaçları ayrı olan kesme güller ile bahçe tipi gl grupları arasında bulunan genetik farklılıklar, ticari sınıflandırma ile ilişki bulunmuştur.
- Dallas TM genotipi, Dallas eşidi ile yüksek genetik yakınlık göstermekte bu ise bu genotipin tomurcuk mutasyonu sonucu oluştuğu savını güçlendirmektedir.
- Bahçe gülleri arasında tespit edilen farklı gruplaşmalar, bu grupların farklı genetik karakterler taşıdığını göstermektedir.
- ışlah edilmiş modern gl eşitleri ile yabancı tür veya yerel popülasyonlar arasında; yabancı tür veya yerel popülasyonlara ait genotipler arasında önemli genetik farklılaşmalar tespit edilmiştir. Buradan hareketle, gerek bu

genotiplerin özgün genetik yapıları, gerekse de ıslah sürecinden geçerken genetik yapılarında olan farklılaşmaların, bu sonuca neden olabileceği söylenebilir.

RAPD tekniğinin;

- Güller arasındaki yakın genetik ilişkileri (tomurcuk mutasyonu gibi),
- Aynı genetik kökene ve farklı agronomik özelliklere sahip gül çeşitleri arasındaki genetik ilişkileri,
- Farklı genetik kökene sahip gül çeşitleri arasındaki genetik ilişkileri,
- Islah edilmiş gül çeşitleri ile yabani türler arasındaki genetik ilişkileri açıklamada yardımcı bir moleküler teknik olduğu sonucuna varılmıştır.

Birçok farklı DNA markör tekniği içerisinde yöntem seçiminde araştırmanın hedefi, yöntemin ekonomikliği, uygulamadaki kolaylıkları gibi birçok etken bulunmaktadır (bk. Çizelge 2.2). Gül genotiplerinin tanımlanması ve genetik ilişkilerinin ortaya çıkarılmasında, RAPD-PCR tekniğinin kullanıldığı bu araştırma, kendi alanında ülkemizde bir ilk olup, içerdiği yöntemler daha sonraki araştırmalar için de optimize edilmiştir.

## KAYNAKLAR

- Adam-Blondon, A.F., Seignac, M., Bannerot, H. and Dron, M. 1994. SCAR, RAPD and RFLP markers linked to a dominant gene (Are) conferring resistance to anthracnose in common bean. *Theor. Appl. Genet.* 88; 865-870.
- Ağaoğlu, Y.S., Ergül, A. and Baydar, N. 2000. Molecular analysis of genetic diversity oil roses (*Rosa damascena* Mill.) grown Isparta (Turkey) region. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 16-18.
- Akkaya, M.S., Bhagwat, A.A. and Cregan, P.B. 1992. Length polymorphism of simple sequence repeat DNA in soybean. *Genetics* 132; 1131-1139.
- Al Zahim, M., Newbury, H.J. and Ford Lloyd, B.V. 1997. Classification of genetic variation in garlic (*Allium sativum* L.) revealed by RAPD. *Hort. Sci.* 32; 1102-1104.
- Allegrucci, G., Caccone, A., Cataudella, S., Powell, J.R. and Sbordoni, V. 1995. Acclimation of the European sea bass to freshwater: monitoring genetic changes by RAPD polymerase chain reaction to detect DNA polymorphisms. *Marine Biology* 121; 591-559.
- Allen, E.F. 1973. A simplified rose classification for gardeners. *The Rose Annu.* 133-139.
- Arnold, M.L., Buckner, C.M. and Robinson, J.J. 1991. Pollen mediated introgression and hybrid speciation in *Louisiana irises*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88; 1398-1402.
- Aruna, M., Austin, A. and Ozias-Akins, P. 1995. Randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting for identifying rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei* Reade) cultivars. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 120; 710-713.
- Ayad, W.G., Hodgkin, T., Jaradat, A. and Rao, V.R. 1997. *Molecular Genetic Techniques for Plant Genetic Resources*. IPGRI, Rome.
- Bardakçı, F. 2001. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) markers. *Turk J. Biol.* 25; 185-196.
- Bardakçı, F. and Skibinski, D.O.F. 1999. A polymorphic SCAR-RAPD marker between species of tilapia. *Animal Genetics* 30; 78-79.

- Barnwell, P., Blanchard, A. N., Bryant, J. A., Smirnov, N. and Weir, F. 1998. Isolation of DNA from the highly mucilaginous succulent plant *Sedum telephium*. Plant Molecular Biology Reporter 16; 133-138.
- Barua, U.M., Chalmers, K.J., Hackett, C.A., Thomas, W.T.B., Powell, W. and Waugh, R. 1993. Identification of RAPD markers linked to a *Rhynchosporium secalis* resistance locus in barley using near-isogenic lines and bulked segregant analysis. Heredity 71; 177-184.
- Baytop, T. 2001. Türkiye’de Eski Bahçe Gülleri. T.C. Kültür Bakanlığı Yayınları 2593, Yayın Dairesi Başkanlığı, Sanat Eserleri Dizisi 319, Ankara.
- Beckmann, J.S. and Soller, M. 1983. Restriction fragment length polymorphisms in genetic improvement: methodologies, mapping and costs. Theor. Appl. Genet. 67; 35-43.
- Boissier, E. 1872. Flora Orientalis. 2; 669-689. Genevae et Basileae.
- Boissier, E. 1888. Flora Orientalis (Supplementum); 201-232. Genevae et Basileae.
- Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M. and Davis, R.W. 1980. Construction of a genetic linkage map using restriction fragment length polymorphisms. Amer. J. Human Genet. 32; 314-331.
- Bradley, K.F., Rieger, M.A. and Collins, G.G. 1996. Classification of Australian garlic cultivars by DNA fingerprinting. Australian Journal of Experimental Agriculture 36; 613-618.
- Broertjes, C. and Van Harten, A.M. 1988. Applied mutation breeding for vegetatively propagated crops. In: Developments in Crop Science, vol. 12. Elsevier, Amsterdam, pp. 197-204.
- Budak, H., Bölek, Y., Dokuyucu, T. and Akkaya, A. 2004. Potential uses of molecular markers in crop improvement. KSU Journal of Science and Engineering 7(1); 75–79.
- Caetano-Annoles, G., Bassam, B.J and Gresshoff, P.M. 1991. High resolution DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. Bio/Technology 9; 553-557.
- Cairns, T. 1993. Modern roses 10. Shreveport: American Rose Society.
- Crist, H. 1888. Rosa L. Flora Orientalis, supplementum. 201, Genevae et Basileae.



- Crockett, P.A., Bhalla, P.L., Lee, C.K. and Singh, M.B. 2000. RAPD analysis of seed purity in a commercial hybrid cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*) cultivar. *Genome* 43; 317-332.
- D' La Thierry, E.M., Panaud, O., Robert, T. and Ricroch, A. 1997. Assessment of genetic relationships among sexual and asexual forms of *Allium cepa* using morphological traits and RAPD markers. *Heredity* 78; 403-409.
- Davis, P.H. 1972. *Flora of Turkey*. Volume 4; 106–128. Edinburgh, at the University Press.
- Debener, T. and Mattiesch, L. 1996. Genetic analysis of molecular markers in crosses between diploid roses. *Acta Hort.* 424; 249-252.
- Debener, T. and Mattiesch, L. 1999. Construction of a genetic linkage map for roses using RAPD and AFLP markers. *Theor Appl. Genet* 99; 891–899.
- Debener, T., Bartels, C. and Mattiesch, L. 1996. RAPD analysis of genetic variation between a group of rose cultivars and selected wild rose species. *Mol. Breeding* 2; 321–327.
- Debener, T., Bartels, C. and Spehniain, W. 1997. Parentage analysis in interspecific crosses between rose species with RAPD markers. *Gartenbauwissenschaft* 62; 180-184.
- Do, N. and Adams, R.P. 1991. A simple technique for removing plant polysaccharides contaminants from DNA. *BioTechniques* 10; 162–166.
- Doyle, J.J. and Doyle, L.H. 1988. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12 (1); 13-15.
- Dubreuil, P. and Charcosset, A. 1999. Relationships among maize inbred lines and populations from European and North-American origins as estimated using RFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics* 99; 473-480.
- Erlich, H.A. 1989. *PCR Technology Principles and Applications for DNA Amplification*. Stockton Press, New York.
- Esselink, G., Smulders, M. and Vosman, B. 2003. Identification of cut rose (*Rosa hybrida*) and rootstock varieties using robust sequence tagged microsatellite site markers. *Theoretical and Applied Genetics* 106 (2); 277-286.

- Fabbri, A., Hormaza J.I. and Polito V.S. 1995. Random amplified polymorphic DNA analysis of olive (*Olea europaea* L.) cultivars. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 120; 538-542.
- Fang, G., Hammer, S. and Grumet, R. 1992. A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA. BioTechniques 13 (1); 52-56.
- Fernandez-Romero, M.D., Torres, A.M. and Millan, T. 2001. Physical mapping of ribosomal DNA on several species of subgenus Rosa. Theor. Appl. Genet. 103; 835-838.
- Goodier, J.L. and Davidson, W.S. 1993. Gene mapping in fish. In: Hochachka and Mommsen (eds) Biochemistry and Molecular Biology of Fishes 2; 93-112, Elsevier Science Publishers B.V.
- Grossi, C., Raymond, O. and Jay, M. 1997. Isozyme polymorphism of Rosa spp. and cultivar identification. Euphytica 98; 11-19.
- Hashizume, T., Sato, T. and Hirai, M. 1993. Determination of genetic purity of hybrid seed in watermelon (*Citrullus lanatus*) and tomato (*Lycopersicon esculentum*) using random amplified polymorphic DNA (RAPD). Japanese J. of Breeding 43; 367- 375.
- Hedrick, P. 1992. Shooting the RAPDs. Nature 355; 679-680.
- Hemmat, M., Weeden, N.F., Manganaris, A.G. and Lawson, D.M. 1994. Molecular marker linkage map for apple. J. Heredity 85; 4-11.
- Henry, R.J. 1997. Practical applications of plant molecular biology. Chapman & Hall, London.
- Henry, R.J. 2001. Plant genotyping- The DNA fingerprinting of plants. CABI Publishing, UK.
- Horejsi, T. and Staub, J.E. 1996. Genetic variation in cucumber (*Cucumis sativus* L.) as assessed by random amplified polymorphic DNA. Genetic Resources and Crop Evolution 46; 337-350.
- Hormaza, J.L., Dollo, L. and Polito, V.S. 1994. Identification of a RAPD marker linked to sex determination in *Pistacia vera* using bulked segregant analysis. Theor. Appl. Genet. 89; 9-13.

- Iqbal, M.J., Paden, D.W. and Rayburn, A.L. 1995. Assessment of genetic relationships among rhododendron species, varieties and hybrids by RAPD analysis. *Sci. Hort.* 63; 215-223.
- Jan, C.H., Byrne, D.H., Manhart, J. and Wilson, H. 1999. Rose germplasm analysis with RAPD markers. *HortScience* 34(2); 341–345.
- Jeffreys, A.J., Wilson, V. and Thein, S.L. 1985. Individual specific fingerprints of human DNA. *Nature* 316; 76-79.
- Jiang, C. and Sink, K.C. 1997. RAPD and SCAR markers linked to the sex expression locus M in asparagus. *Euphytica* 94; 329-333.
- Kaemmer, D., Weising, K., Beyermann, B., Borner, T., Epplen, J.T. and Kahl, G. 1995. Oligonucleotide fingerprinting of tomato DNA. *Plant Breeding* 114; 12-17.
- Karp, A. and Edwards, K.J. 1997. Molecular techniques in the analysis of the extent and distribution of genetic diversity. In Ayad, W.G., Hodgkin, T., Jaradat, A. and Rao V.R. (Eds.), *Molecular genetic techniques for plant genetic resources. Report of an IPGRI Workshop, 9-11 October 1995, Rome*, pp. 11-38. International Plant Genetic Resources Institute, Rome.
- Karp, A., Issar, P.G. and Ingram, D.S. 1998. *Molecular tools for screening biodiversity*. Chapman & Hall, London.
- Kaufman, B., Richards, S. and Diering, D.A. 1999. DNA isolation method for high polysaccharide *Lesquerella* species. *Industrial Crops and Products* 9; 111-114.
- Kiss, G.B., Csanadi, G., Kalman, K., Kalo, P. and Okresz, L. 1993. Construction of a basic linkage map for alfalfa using RFLP, RAPD, isozyme and morphological markers. *Mol. Genet.* 238; 129-137.
- Klein-Lankhorst, R.M., Vermut, A., Weide, R., Liharska, T. and Zabel, P. 1991. Isolation of molecular markers for tomato (*L. esculentum*) using random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Theor. Appl. Genet.* 83; 108-114.
- Kobayashi, N., Takeuchi, R., Handa, T. and Takayanagi, K. 1995. Cultivar identification of evergreen azalea with RAPD method. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 64; 611-616.
- Krahi, K.H., Dirr, M.A., Halward, T.M., Kochart, G.D. and Randle, W.M. 1993. Use of single-primer DNA for the identification red maple (*Acer rubrum* L.) cultivars. *J. Environ. Hort.* 11; 89-92.

- Kuhns, L.J. and Fretz, T.A. 1978. Distinguishing rose cultivars by polyacrylamide gel electrophoresis II. Isozyme variation among cultivars. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 103; 509-516.
- Las Heras Vazquez, F.J., Jimenez, J.M.C. and Vico, F.R. 1996. RAPD fingerprinting of pepper (*Capsicum annuum* L.) breeding lines. *Capsicum and Eggplant Newsletter* 15; 37-40.
- Luo, Z.R., Yonemori, K. and Sugiura, A. 1995. Evaluation of RAPD analysis for cultivar identification of persimmons. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 64; 535-541.
- Lynch, M. and Milligan, B.G. 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology* 3; 91-99.
- Ma, Y., Crane, C.F. and Byrne, D. H. 1997. Karyotypic relationships among some *Rosa* species. *Caryologia*, 50 (3-4); 317-326.
- Martin, G.B., Williams, J.G.K. and Tanksley, S.D. 1991. Rapid identification of markers linked to a *Pseudomonas* resistance gene in tomato by using random primers and near-isogenic lines. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88; 2336-2340.
- Martin, M., Piola, F., Chessel M. and Heizmann, P. 2001. The domestication process of Modern Rose: genetic structure and allelic composition of rose complex. *Theor. Appl. Genet.* 102; 398-404.
- Matsumoto, S. and Fukui, H. 1996. Identification of rose cultivars and clonal plants by random amplified polymorphic DNA. *Scientia Horticulturae* 67; 49-54.
- Matsumoto, S., Wakita, H. and Fukui, H. 1997. Molecular classification of wild roses using organelle DNA probes. *Sci. Hortic.* 68; 191-196.
- Michelmore, R.W., Paran, I. and Keselsi, R.V. 1991. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc Natl Acad Sci*, 88 (21): 9828-9832.
- Mikanagi, Y., Saito, N., Yokoi, M. and Tatsuzawa, F. 2000. Anthocyanins in flowers of genus *Rosa*, sections *Cinnamomeae* (*Rosa*), *Chinenses*, *Gallicanae* and some modern garden roses. *Biochemical Systematics and Ecology* 28; 887-902.
- Millan, T., Osuna, F., Cobos, S., Torres, A.M. and Cubero, J.I. 1996. Using RAPDs to study phylogenetic relationships in *Rosa*. *Theor. Appl. Genet.* 92; 273-277.

- Mori, M., Hosaka, K., Uemura, Y. and Kaneda, C. 1993. Rapid identification of potato cultivars by RAPDs. *Japan J. Genet.* 68; 167-174.
- Mulcahy, D.L., Weeden, N.F., Kesseli, R. and Carroll, S.B. 1992. DNA probes for the Y chromosome of *Silene latifolia*, a dioecious angiosperm. *Sex Plant Report.* 5; 86-88.
- O'Hanlon, P.C., Peakall, R. and Briese, D.T. 2000. A review of new PCR based genetic markers and their utility to weed ecology. *Weed Res.* 40; 239–254.
- Okuda, T., Yoshida, T., Hatano, T., Iwasaki, M., Kubo, M. and Orime, T. 1992. Hydrolysable tannins as chemotaxonomic markers in the *Rosaceae*. *Phytochemistry* 31; 3091-3096.
- Ozaki, T., Shimada, T., Nakanishi, T., Yamamoto, J. and Yoshida, M. 1995. RAPD analysis for parentage determination in *Prunus mume*. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 64; 235-242.
- Paran, I. Kesseli, R. and Michelmore, R. 1991. Identification of restriction fragment length polymorphism and random amplified polymorphic DNA markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce, using near isogenic lines. *Genome*, 34; 1021-1027.
- Paran, I. and Michelmore, R.W. 1993. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theor. Appl. Genet.* 85; 985-993.
- Phippen, W.B., Kresovich, S., Candelas, F.G. and McFerson, J.R. 1997. Molecular characterisation can quantify and partition variation among genebank holdings; a case study with phenotypically similar accessions of *Brassica oleracea* var *capitata* L. (cabbage) 'Golden Acre'. *Theoretical and Applied Genetics* 94; 227-234.
- Rajapakse, S., Hubbard, M., Kelly, J.W., Abbott, A.G. and Ballard, R.E. 1992. Identification of rose cultivars by restriction fragment length polymorphism. *Sci. Hortic.* 52; 237-245.
- Rajapakse, S., Byrne, D.H., Zhang, L., Anderson, N., Arumuganathan, K. and Ballard, R.E. 2001. Two genetic linkage maps of tetraploid roses. *Theor. Appl. Genet.* 103; 575–583.

- Reamon Buttner, S.M. and Jung, C. 2000. AFLP-derived STS markers for the identification of sex in *Asparagus officinalis* L. *Theoretical and Applied Genetics* 100; 432-438.
- Rholf, F.J. 1990. NTSYS-pc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Version 1.8. Applied Biostatistics, New York.
- Roose, M.L. and Stone, N.K. 1996. Development of genetic markers to identify two asparagus cultivars. *Acta Hort.* 415; 129-135.
- Rout, G.R., Samantaray, S., Mottley, J. and Das, P. 1999. Biotechnology of the rose: a review of recent progress. *Scientia Horticulturae* 81; 201-228.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. and Arnheim, N. 1985. Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230; 1350-1354.
- Saiki, R., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. and Erlich, H.A. 1988. Prime-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239; 487-491.
- Scarafani, A. and Duranti, M. 2001. An approach to critical assessment of the experimental conditions in practical molecular biology: isolation of plant DNA. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 29; 21–23.
- Scribner, K.T. and Pearce, J.M. 2000. Microsatellites: evolutionary and methodological background and empirical applications at individual, population, and phylogenetic levels. In; Baker, A. (ed): *Molecular Methods in Ecology*. Blackwell, London, pp. 235–271.
- Shim, S.I. and Jorgensen, R.B. 2000. Genetic structure in cultivated and wild carrots (*Daucus carota* L.) revealed by AFLP analysis. *Theoretical and Applied Genetics* 101; 227-233.
- Shoyama, Y., Zhu, X.X., Nakai, R., Shiraishi, S. and Kohda, H. 1997. Micropropagation of *Panax notoginseng* by somatic embryogenesis and RAPD analysis of regenerated plantlets. *Plant Cell Rep.* 16; 450-453.
- Skot, L., Hamilton, N.R.S., Mizen, S., Chorlton, K.H. and Thomas, I.D. 2002. Molecular genealogy of temperature response in *Lolium perenne*; 2. Association of AFLP markers with ecogeography. *Molecular Ecology* 11; 1865-1876.

- Smith, J.S.C. and Williams, J.G.K. 1994. Arbitrary primer mediated fingerprinting in plants: case studies in plant breeding, taxonomy and phylogeny. In: Schierwater, B., Streit, B, Wagner, G.P. and DeSalle, R. (eds): Molecular Ecology and Evolution: Approaches and Applications, pp. 5-15. Birkhauser Verlag Basel, Switzerland.
- Sokal, R.R. and Sneath, P.N.A. 1963. Principles of Numerical Taxonomy. Freeman, San Francisco.
- Soller, M. and Beckmann, J.S. 1983. Genetic polymorphism in varietal identification and genetic improvement. Theor. Appl. Genet. 67; 25-33.
- Stockton, T. and Gepts, P. 1994. Identification of DNA probes that reveal polymorphisms among closely related *Phaseolus vulgaris* lines. Euphytica 76; 177-183.
- Takashi, H., Kimura, D., Hasegawa, R., Nagasako, T., Nishimoto, K., Ohta, K., Sugiyama, M. and Haruki, K. 1997. Comparative study of tree peony (*Paeonia suffruticosa* Andr.) cultivars and hybrids by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 66 (2); 393-400.
- Tingey, S.V. and del Tufo, J.P. 1993. Genetic analysis with random amplified polymorphic DNA markers. Plant Physiol. 101; 394-352.
- Tivang, J., Skroch, P.W., Nienhuis, J. and De Vos, N. 1996. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) variation among and within artichoke (*Cynara scolymus* L.) cultivars and breeding populations. Journal of the American Society for Horticultural Science 121; 783-788.
- TKB, 1987. Gülcülük. T.C. Tarım Orman ve Köyişleri Bakanlığı, Isparta İl Müdürlüğü Yayını.
- Torres, A.M., Weeden, N.F. and Martin, A. 1993a. Linkage among isozyme, RFLP, and RAPD markers. Plant physiol. 101; 394-352.
- Torres, A.M., Millian, T. and Cubero, J.I. 1993b. Identifying rose cultivars using random amplified polymorphic DNA markers. HortScience 28; 333-334.
- Villand, J., Skroch, P.W., Lai, T., Hanson, P., Kuo, C.G. and Nienhuis, J. 1998. Genetic variation among tomato accessions from primary and secondary centers of diversity. Crop Science 38; 1339-1347.

- Villordon, A.Q. and LaBonte, D.R. 1995. Variation in randomly amplified DNA markers and storage root yield in 'Jewel' sweet potato clones. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 120; 734-740.
- Vorster, B.J., Kunert, K.J. and Cullis, C.A. 2002. Use of representational difference analysis for the characterization of sequence differences between date palm varieties. *Plant Cell Rep.* 21; 271-275
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. and Zabeau, M. 1995. AFLP; a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23; 4407-4414.
- Walker, C.A. and Werner, D.J. 1997. Isozyme and randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of Cherokee rose and its putative hybrids 'Silver Moon' and 'Anemone'. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 122; 659-664.
- Waycott, W. and Fort, S.B. 1994. Differentiation of nearly identical germplasm accessions by a combination of molecular and morphologic analyses. *Genome* 37; 577-583.
- Weising, K., Nybom, H., Wolff, K. and Mayer, W. 1995. DNA fingerprinting in plants and fungi. CRC Press, Boca Raton.
- Welsh, J. and McClelland, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research* 18; 7213-7218.
- Welsh, J., Honeycutt, R.S., McClelland, M. and Sobral, B.W.S. 1991. Parentage determination in maize hybrids using the arbitrarily primed polymerase chain reaction (AP-PCR). *Theor. Appl. Genet.* 82; 473-476.
- Werlemark, G. 2000. Genetic variability and reproductive strategies in Nordic dogroses, *Rosa* section *Caninae*. Doctoral Thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Alpnarp. 34 pages.
- White, R. and Lalouel, J.M. 1988. Chromosome mapping with DNA markers. *Scientific American* 258; 20-28.
- White, R., Leppert, M., Bishop, D.T., Barker, D., Berkowitz, J., Brown, C., Callahan, P., Holm, T. and Jerominski, L. 1985. Construction of linkage maps with DNA markers for human chromosomes. *Nature* 313; 101-105.



- Williams, J.G.K., Kubelik, 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 Res.* 18; 6531-6535.
- Williams, J.G.K., Hanafey, M.K., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V. 1993. Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. *Methods in Enzymology* 218; 704-740.
- Wolff, K. and Peters-Van Rijn, J. 1993. Rapid detection of genetic variability in chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev.) using random primers. *Heredity* 71; 335-341.
- Wu, K.S. and Tanksley, S.D. 1993. Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in rice. *Molecular and General Genetics* 24; 225-235.
- Yokoya, K., Roberts, A.V., Mottley, J., Lewis, R. and Brandham, P.E. 2000. Nuclear DNA amounts in roses. *Annals of Botany* 85; 557-561.
- Zabeau, M. and Vos, P. 1993. Selective restriction fragment amplification; a general method for DNA fingerprinting. EPO Patent No. 0534858A1.

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Mikail ÇALIŞKAN

Doğum Yeri : Kayseri

Doğum Tarihi : 1971

Medeni Hali : Evli

Yabancı Dili : İngilizce

### Eğitim Durumu

Lise : Yenimahalle Mustafa Kemal Lisesi, 1985-1988

Lisans : Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi,  
Bahçe Bitkileri Bölümü, 1989-1993

Yüksek Lisans: Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 1994-1997

### Çalıştığı Kurumlar ve Yılları

Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, 1994-1999.

Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü, 1999-

### Yayımları

Ağaoğlu, Y.S., Söylemezoğlu, G., Ergül, A. ve Çalışkan, M. 1995. Kalecik Karası üzüm çeşidi klonlarının kateşol oksidaz enziminden yararlanılarak SDS-PAGE tekniği ile ayrımları . II. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi. 3-6 Ekim 1995 Adana, Cilt II, S:564-566.

Ağaoğlu, Y.S., Söylemezoğlu, G., Ergül, A. ve Çalışkan, M. 1995. Ülkemizde yetiştirilen bazı sofralık ve şaraplık üzüm çeşitlerinin izoenzim bantlarından yararlanılarak elektroforezis tekniği ile tanımlanmaları. II. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi. 3-6 Ekim 1995 Adana, Cilt II, S:567-571.

Çalışkan, M. 1997. Türkiye’de Yetiştirilen Bazı Çavuş Üzümü Tiplerinin Poliakrilamid Jel Elektroforez Yöntemi İle Tanımlanmaları Üzerinde Bir Araştırma. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.

- Çalışkan, M. ve Ağaoğlu, Y.S. 1998. Türkiye’de yetiştirilen bazı çavuş üzümü tiplerinin poliakrilamid jel elektroforez yöntemi ile tanımlanmaları üzerinde bir araştırma. 4. Bağcılık Sempozyumu 20-23 Ekim 1998. S:152-157., Yalova.
- Çelik, H., Göktürk, N., Marasalı, B., Söylemezoğlu, G., Patlak, H. ve Çalışkan, M. 1998. Bazı Amerikan asma anaçlarının Ankara koşullarına adaptasyon yeteneklerinin belirlenmesi. 4. Bağcılık Sempozyumu 20-23 Ekim 1998, Yalova. S:199-205.
- Söylemezoğlu, G., Ağaoğlu, Y.S., Marasalı, B., Ergül, A., Çalışkan, M. ve Türkben, C. 1998. Üzüm çeşitlerinin yaprak kökenli kateşol oksidaz (CO), peroksidaz (PER) ve esteraz (EST) izoenzimlerinden yararlanılarak tanımlanmaları. 4. Bağcılık Sempozyumu 20-23 Ekim 1998, Yalova. S:138-144.
- Ağaoğlu, Y.S., Söylemezoğlu, G., Marasalı, B., Çalışkan, M., Ergül, A. ve Türkben, C. 1998. Bazı yerli ve yabancı üzüm çeşitlerinin poliakrilamid jel elektroforez tekniği ile tane kökenli izoenzimlerden yararlanılarak ayrımları. 4. Bağcılık Sempozyumu 20-23 Ekim 1998, Yalova. S:145-151.
- Ağaoğlu, Y.S., Söylemezoğlu, G., Çalışkan, M. ve Ergül, A. 1999. Türkiye’de yetiştirilen bazı Razakı grubu üzüm çeşitlerinin elektroforetik tanımlanmaları üzerinde bir araştırma. Türkiye III. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi Bildirileri. 14-17 Eylül 1999 Kızılcahamam-Ankara Cilt II.
- Onur, C., Türemiş, N., Derin, K., Çincaner, T., Ağaoğlu, Y.S., Çelik, M., Çalışkan, M., Kepenek, K., Polat, İ., Ataseven, I.E., Barut, E., Gülyüz, M., Eşitken, Okay, N., Ayanoğlu, H., Demirtaş, İ., Şevik, İ., Atasay, A., Kaşka, N., Ilgın, M., Çolak, A., Ünal, M.S., Şahin, M., Cangı, R., Kaplan, N., Çakır, O., Apaydın, A., Bilgener, Ş., Demirsoy, L., Gerçekçioğlu, R., Güneş, M., Türkoğlu, N., Kazankaya, A., Gazioğlu, İ., Yılmaz, H. ve Erenoğlu, B. 1999. Bazı Frenküzümü (*Ribes spp.*), Ahududu ve Böğürtlen (*Rubus spp.*) çeşitlerinin evaluasyonu. Türkiye III. Ulusal

Bahçe Bitkileri Kongresi Bildirileri. 14-17 Eylül 1999 Kızılcahamam-Ankara  
Cilt II:772-775.

Çalışkan, M. ve Yıldırımkaaya, E. 2000. Karadeniz bölgesinde fındık tarımı ve sorunları.  
Ziraat Mühendisliği Dergisi, Sayı:37, S:43-45.

Çelik, H., Söylemezoğlu, G., Çetiner H., Yaşa, Z., Ergül, A. ve Çalışkan, M. 2002.  
Alphonse Lavallee, Amasya, Çavuş, Gülüzümü ve Hafızali üzüm çeşitleri için  
Kalecik (Ankara) koşullarında uygun anaç seçimi-1. Türkiye V. Bağcılık ve  
şarapçılık Sempozyumu. 5-9 Ekim 2002. Kapadokya/ Nevşehir.

Ağaoğlu, Y.S., Aras, E.S., Ergül, A. ve Çalışkan, M. 2002. GAP bölgesi bağcılığında  
kuraklık ve tuz stresine dayanıklılığın moleküler biyolojik yöntemlerle  
tanımlanması üzerinde araştırmalar. TÜBİTAK Proje No: TARP-2059 Kesin  
Rapor.

Çelik, H., Söylemezoğlu, G., Çetiner H., Yaşa, Z. Ergül, A. ve Çalışkan, M. 2002.  
Alphonse Lavallee, Amasya, Çavuş, Gülüzümü ve Hafızali Üzüm Çeşitleri İçin  
Kalecik (Ankara) Koşullarında Uygun Anaç Seçimi-1. Türkiye V. Bağcılık ve  
şarapçılık Sempozyumu. 5-9 Ekim 2002. Kapadokya/Nevşehir.

Çalışkan, M. ve Ağaoğlu, Y.S. 2004. Transgenik süs bitkileri. Türktarım Dergisi, Sayı  
159, Eylül-Ekim 2004.