

Asmalarda (*Vitis vinifera* L.) Farklı Dokulardan İzole Edilen DNA'ların RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) Tekniğinde Kullanımı Üzerinde Bir Araştırma

Y.Sabit AĞAOĞLU¹ Birhan MARASALI¹ Ali ERGÜL²

Geliş Tarihi : 23.05.2001

Özet: Asmaların vejetatif otsu dokuları (sürgün ucu-geç yapraklar, sülükler) ve bir yaşlı dallarından DNA izolasyonu için kullanılan, sırasıyla Lodhi ve ark. (1994) ve Lin ve Walker(1997) tarafından geliştirilen yöntemlerin, dokuların farklı yetiştirme koşullarından (bağ, sera, doku kültürü bitkileri) alınması durumunda DNA verimlilikleri ve RAPD tekniğinde kullanılabilirlikleri incelenmiştir.

Lodhi ve ark. (1994)'na ait yöntemde, bağdan alınan ancak bekletildikten sonra kullanılan sürgün ucu-geç yapraklar örnekleri ile, sülüklerin kullanıldığı durumlarda $10 \mu\text{g DNA/g doku}$ düzeyinden daha az (yetersiz) DNA elde edilirken; yetersiz düzeyde olmamakla beraber, doku kültürü ve sera bitkilerinden de $20-53 \mu\text{g DNA/g doku}$ düzeyinde düşük DNA miktarı elde edilmiştir. Yöntemde, soğuk etanol ilavesi ve 4°C 'de DNA iplikçiklerinin oluşmadığı aşamadan sonra gerçekleştirilen modifikasyon sonucunda, her dört koşulda da tatmin edici DNA miktarlarına ulaşılmıştır.

Bir yaşlı dallardan Lin ve Walker(1997)'a göre izole edilen DNA miktarları ($28-40 \mu\text{g DNA/g doku}$) araştırmacıların bulguları ile uyumlu bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: *Vitis vinifera* L., DNA izolasyonu, RAPD

A Research on the RAPD Assay of DNA Isolation from Different Tissues of Grapevine (*Vitis vinifera* L.)

Abstract: The DNA yields of two grape DNA isolation methods that of Lodhi et al. (1994) and Lin and Walker (1997) which are suitable for young vegetative tissues and one year old canes respectively, were determined in the tissue were obtained from different growing conditions (vineyard, tissue culture and greenhouse plants). Isolated DNA was also tested for RAPD procedure.

Insufficient DNA quantity which is less than $10 \mu\text{g DNA/g tissue}$ was obtained when the stored shoot tips-young leaves tissue were used for DNA isolation in Lodhi et al.(1994) method. Also, small quantities of DNA, $20-53 \mu\text{g DNA/g tissue}$ were extracted from the shoot tips-young leaves of tissue culture and greenhouse plants. Therefore, a few modification was carried out in the protocol beginning from the stage of DNA was not visible in ice-cold ethanol. Our modification of Lodhi et al. (1994) method produced good DNA yield in every conditions.

The amount of DNA ($28-40 \mu\text{g DNA/g tissue}$) from one year old cane, according to Lin and Walker (1997) was found to be very similar compared by that protocol.

Key Words: *Vitis vinifera* L., DNA isolation, RAPD

Giriş

Moleküler biyolojik tekniklerin son yıllarda bitki ıslah çalışmalarını tamamlayıcı nitelikte kullanılmaya başladığı görülmektedir. Birçok bitki türünde tanımlama amaçlı "DNA testi" ve "transgenik genotiplerin geliştirilmesi" bu kapsamdaki çalışmaların başlıca örnekleridir. Hiç şüphesiz, yürütülen bu çalışmaların temelini canlılarda kalıtsal yapının esasını oluşturan nükleik asitlerin (DNA, RNA) izolasyonu oluşturmaktadır. Kullanılan nükleik asit miktarı ve saflığı, Polimeraz Zincir Reaksiyonuna (PCR) dayanan yöntemlerde başarıyı önemli ölçüde etkilemektedir. Bu nedenle, bitki moleküler biyolojisi çalışmalarının yoğun olarak yürütüldüğü değişik laboratuvarlarda etkili sonuçlar veren DNA ve RNA ekstraksiyon yöntemleri geliştirilmiştir (Doyle ve Doyle 1990, Maliyakal 1992, Lodhi ve ark. 1994).

Sözü edilen yöntemlerde bitki türüne göre değişmekle birlikte, genel olarak sürgün ucu, genç

yapraklar gibi hücre bölünmesinin hızlı, DNA-RNA miktarının fazla olduğu vejetatif dokular kullanılmaktadır. Bununla birlikte, materyal toplama sırasında genç yapraklar ve sürgün uçlarının uzun süreli taşınmaları sırasında ortaya çıkan bozulmalar, çok yıllık bitkilerin (asma, elma, şeftali vb.) belirli dönemlerde zorunlu dinlenmeye girmesi, aşılı bitkilerde anaçlardan vejetasyon döneminde sürgün elde edilememesi gibi nedenler, ekstraksiyonda değişik bitki dokularının kullanımını zorunlu hale getirmektedir (Cheng ve ark. 1997, Lin ve Walker 1997).

Bu araştırma ile asmalarda DNA izolasyonunda kullanılan başlıca dokuların DNA verimlilikleri yetiştirme koşullarına bağlı olarak incelenmiş, ayrıca uzak mesafelerden taşınma sırasında meydana gelen değişimler ortaya konulmuştur. Elde edilen DNA'ların RAPD tekniğinde kullanılabilirlikleri araştırılmıştır.

¹ Ankara Üniv. Ziraat Fak. Bahçe Bitkileri Bölümü-Ankara

² T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü-Ankara

Materyal ve Yöntem

Araştırmada DNA ekstraksiyon kaynağı olarak sürgün ucu-geç yapraklar, sülükler ve bir yaşlı dallar kullanılmıştır. Bu dokulardan sürgün uçları üç farklı yetiştirme ortamından (bağ koşullarında yetiştirilen bitkiler, sera bitkileri ve doku kültürü bitkileri) elde edilirken, sülükler ve bir yaşlı dallar yalnız bağ koşullarında yetiştirilen bitkilerden elde edilmiştir. Bağ koşullarında yetiştirilen bitkilerden sürgün ucu-geç yapraklar ve sülükler çiçeklenme zamanı toplanırken, bir yaşlı dallar yaprak dökümünden sonra odunlaşmanın tamamlandığı bitkilerden alınmıştır.

Sürgün ucu-geç yapraklar ve sülüklerden izolasyon yeşil dokuların kullanımını esas alan Lodhi ve ark. (1994) 'a ait yöntem ile gerçekleştirilmiştir. Bir yaşlı dal dokularında ise, odun dokularına uygulanan bir teknik olması nedeni ile Lin ve Walker (1997) yöntemi seçilmiştir.

DNA ekstraksiyonu

Kullanılan materyallere bağlı olarak iki farklı DNA ekstraksiyon yöntemi uygulanmıştır.

(i) Sürgün ucu-geç yapraklar ve sülüklerde DNA ekstraksiyonu Lodhi ve ark. (1994)'na göre gerçekleştirilmiştir. Buna göre; 0,5 g yaprak örneğine 50 mg polivinylpyrrolidone (PVP) (Sigma, P6755) ve 6 ml ekstraksiyon buffer [20 mM sodium EDTA-10 mM Tris-HCL (pH 8); 1.4 M NaCl, %2 CTAB karışımına kullanım öncesi %0,1'lik β -mercapto-ethanol] eklenerek 60°C'de 25 dk bekletilmiştir. Örnek karışımına 6 ml chloroform:octanol (24:1) eklenerek 6000 rpm'de 15 dakika santrifüj yapılmıştır. Üst sıvı faz alınarak chloroform:octanol (24:1) ekstraksiyonu tekrarlanmıştır. Üst sıvı faz alınarak üzerine 1/2 hacim 4 M NaCl ve 2 hacim %95'lik soğuk (-20°C) etanol ilave edilmiştir. 0,5-18 saat süre ile +4°C'de DNA iplikçiklerinin toplanması sağlandıktan sonra, DNA %70'lik etanole aktarılmış ve oda koşullarında 3'er dk 3000 ve 5000 rpm'de santrifüj edilerek çöktürülmüş, etanol yıkamasından sonra 37°C'de 20-30 dk bekletilmiştir. DNA, 200 μ l TE [10 mM Tris-HCL ve 1 mM EDTA (pH:8)] karışımı içerisinde çözülmüş ve 2 μ l RNAase eklenerek 37°C'de 15 dk bekletilmiştir.

(ii) Bir yaşlı dallardan DNA ekstraksiyonu Lin ve Walker (1997)'a göre yapılmıştır. Buna göre; 0,5 g doku (odun ve kambiyum dokusu) sıvı azotla ezilerek üzerine 3 ml ekstraksiyon çözeltisi [20 mM EDTA ve 350 mM sorbitol 100mM Tris aminomethane (pH 7.5)'de çözülerek üzerine kullanım öncesi %2'lik (ağırlık/hacim) PVP ve %0,2'lik (hacim/hacim) β -mercapto ethanol eklenmiştir] eklenerek 5-10 sn süre ile homojenize edilmiştir. Karışım

5 dk süre ile 8000g de santrifüj edilerek üst sıvı uzaklaştırılmıştır. Oluşan katı faz 0.6ml PVP içermeyen ekstraksiyon çözeltisinde çözülerek üzerine 0.8 ml DNA lysis çözeltisi [50 mM EDTA, 2M NaCl ve %2'lik CTAB (ağırlık/hacim) 200 mM Tris-HCl (pH 7.5)'de çözülmüştür] ve 0.6 ml %5 lik sarkosyl eklenmiştir. 65°C'de 45 dk süre ile bekletilen çözelti, 2 hacim chloroform:octanol (24:1) eklenerek 5000g'de 10 dk santrifüj edilmiş, üst sıvı alınarak chloroform:octanol (24:1) ekstraksiyonu tekrar edilmiştir. Üst faz alınarak eşit hacimde isopropanol eklenmiş, -20°C'de 30 dk bekletilmiş ve 12000g de 10 dk santrifüj yapılmıştır. Üst sıvı uzaklaştırılarak, katı faz etanolle yıkayıp kurutulmuş ve 200 μ l TE'de çözülerek RNase uygulaması yapılmıştır. Daha sonra aynı hacim chloroform:octanol (24:1) karıştırılan DNA solusyonuna 40 μ l 5M NaCl ve 200 μ l isopropanol eklenerek yukarıda açıklandığı şekilde tekrar çöktürme yapılmış ve DNA 200 μ l TE'de çözülmüştür.

DNA miktar ve saflılığının belirlenmesi

DNA miktarları spektrofotometrik olarak 260nm dalga boyunda saflık değerleri ise 260/280 absorbans oranlarından elde edilen 1.80 ve 2.0 sınırları baz alınarak değerlendirilmiştir (Sambrook ve ark.1989). Araştırmada literatürde belirtilen çalışmalarda olduğu gibi herhangi bir istatistikî değerlendirme uygulanmamıştır (Maliyakal 1992, Lodhi ve ark.1994, Cheng ve ark. 1997, Lin ve Walker 1997).

RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) analizi

Araştırmalarda farklı kaynaklardan elde edilen genomik DNA'ların kullanılabilirliğini belirlemek amacıyla OPA-1 "5' CAG GCC CTT C 3' " primeri kullanılarak 3 tekrarlı RAPD analizi yapılmıştır. "M.J. Research Minicycler" PCR makinasının kullanıldığı araştırmada amplifikasyon 25 μ l toplam hacimde, 200 ng genomik DNA, 1x reaksiyon buffer, 2,5 mM MgCl₂, 50 ng primer, 5mM toplam dNTP, 1 unite Taq polimeraz (Promega) olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. PCR programı; 94°C 5 dk denatürasyondan sonra, 94°C'de 30 sn, 35°C'de 1 dk ve 72°C'de 1 dk 45 sn olarak 35 döngüde yürütülmüştür.

PCR ürünleri; 1x TAE bufferde %2'lik agaroz (%1 agaroz + %1 FMC Nusieve agaroz) jel kullanılarak 2 saat süre ile yürütülmüş ve ethidium bromide ile boyanarak görüntülenmiştir.

Bulgular ve Tartışma

Araştırmada Lodhi ve ark. (1994) ve Lin ve Walker (1997) yöntemlerine göre asmaların farklı dokularından elde edilen DNA miktarları Çizelge 1'de verilmiştir.

Çizelge 1. Asmaların farklı dokularından elde edilen DNA miktarları

Çeşitler	İzolasyonda kullanılan dokulara göre DNA miktarları (μ g DNA/g doku)					
	Sürgün ucu-geç yapraklar		Doku kültürü bitkileri	Sera bitkileri	Sülük	Bir yaşlı dal
	Bağda yetiştirilen bitkiler	Taze				
Kalecik karası	500	Yetersiz*	20		Yetersiz*	40
Sultani Çekirdeksiz			22	53		
Riesling	400	Yetersiz*			Yetersiz*	28

*DNA miktarı 10 μ g DNA/g doku'dan daha az elde edilmiştir.

Sürgün ucu-geç yapraklardan DNA izolasyonu

Lodhi ve ark. (1994)'a göre yapılan DNA ekstraksiyonu, dokuların alındığı kaynağa (bağ koşullarında yetiştirilen bitkiler, sera bitkileri ve doku kültürü bitkileri) bağlı olarak farklılık göstermiştir. Çizelge 1'den izlenebileceği gibi en yüksek DNA miktarına bağ koşullarında yetiştirilen bitkilerin taze sürgün ucu-geç yapraklarının izolasyonda kullanıldığı koşullarda ulaşılmıştır. Bu koşullarda Kalecik karası çeşidinde 500 $\mu\text{g DNA/g doku}$, Riesling çeşidinde ise benzer şekilde 400 $\mu\text{g DNA/g doku}$ elde edilmiştir. Bu değerler izolasyonun, Lodhi ve ark. (1994) tarafından bildirilen verimlilik sınırlarına (500-1000 $\mu\text{g DNA/g doku}$) yakın gerçekleştiğini göstermektedir.

Bağ koşullarından alınan dokuların her zaman taze olarak laboratuvara getirilmesi mümkün olamamaktadır. Bu koşullarda, bekletme veya taşımının DNA verimine etkisinin belirlenmesi için, yine bağ koşullarından alınan, ancak 2 gün buzdolabında (+4 °C) bekletilen sürgün ucu-geç yapraklar ekstraksiyonda kullanılmıştır. Bekletilmiş dokulardan elde edilen DNA miktarı 10 $\mu\text{g DNA/g doku}$ 'dan az olması nedeni ile yetersiz olarak kabul edilmiştir (Çizelge 1).

Doku kültürü ve sera bitkilerinden de yukarıda bildirilen verimlilik sınırlarının çok altında kalan değerlere ulaşılmıştır. Buna göre, doku kültürü bitkilerinde Kalecik karası çeşidi için 20 $\mu\text{g DNA/g doku}$, Sultani Çekirdeksiz için 22 $\mu\text{g DNA/g doku}$ elde edilirken; Sultani Çekirdeksiz'in sera bitkilerinde 53 $\mu\text{g /g doku DNA}$ ekstrakte edilmiştir. Lin ve Walker (1997), kendi geliştirdikleri yöntemle doku kültürü bitkilerinde 120-160 $\mu\text{g /g doku}$ düzeyinde DNA elde ettiklerini bildirmektedirler.

Sülüklerden DNA izolasyonu

Lodhi ve ark (1994)'e ait DNA izolasyon yönteminin kullanıldığı diğer yeşil dokular olan sülüklerden, yetersiz DNA (10 $\mu\text{g DNA/g doku}$ ' dan az) elde edilebilmiştir (Çizelge 1). Sülükler, DNA izolasyonunda yaygın olarak kullanılan dokular olmamakla birlikte, bu araştırmada sürgün ucu-geç yaprak döneminin aşılmasından sonra, Temmuz ayı ortalarından itibaren sürgün aktivitesinin yavaşlamasının ardından, ekstraksiyon kaynağı olarak önem kazanabilecek dokular olarak değerlendirilmiştir.

İzolasyon yönteminde modifikasyon

DNA veriminin yetersiz olduğu örnekler (bekletilen sürgün ucu-geç yapraklar ve sülükler) ile düşük olduğu doku kültürü ve sera bitkilerinde, Lodhi ve ark. (1994)'ün yöntemi modifiye edilmiştir. Modifikasyon +4°C'de DNA iplikçiklerinin hiç oluşmadığı veya çok az oluştuğu safhadan başlayarak gerçekleştirilmiştir. Buna göre yapılan uygulama aşağıda açıklanmıştır:

- Iplikçik oluşmayan veya çok az oluşan örnekler 25-30 dk süreyle 4000 rpm'de oda koşullarında santrifüj edilmiş;
- Santrifüj sonunda oluşan katı faz (pellet) pipet yardımı ile yerinden oynatılarak bir lup (halkalı plastik çubuk) yardımıyla alınarak ve 1.5 ml'lik ependorf tüpünde 200 $\mu\text{l TE}$ içinde çözündürülmüştür

- Örnek hacminin iki katı kadar octanol:chloroform eklenerek karışım 5-10 sn süreyle vortekslenmiş;
- Oda koşullarında masa santrifüjünde 12000 rpm'de 2 dk santrifüj yapılmış;
- Santrifüj sonunda oluşan üst faz yeni bir tüpe alınarak üzerine örnek hacminin 1/10'u kadar 5 M NaCl eklenmiş ve 5-10 sn vortekslenmiş;
- Karışım üzerine örnek hacminin 2,5 katı %96'lık soğuk (-20°C) ethanol eklenerek vortekslenmiş ve DNA iplikçiklerinin oluşumu izlenmiştir.
- Oluşan DNA'ların çöktürülmesi amacıyla 15 dk 12000 rpm'de santrifüj yapılmış;
- Süpernatant dökülerek DNA 300 μl %70 ethanol (+4°C) ile iki kez yıkanmış;
- %70'lik alkol içerisinde 5 dk 12000 rpm'de santrifüj edilmiş;
- Alkolü dökülen pellet ethanol iyice uzaklaştırılana kadar 37°C'de 20-30 dk bekletilmiş;
- DNA 100-300 $\mu\text{l dH}_2\text{O}$ veya 1X TE içerisinde 1 gece süreyle +4°C'de bekletilerek çözülmüş;
- Her 100 $\mu\text{l DNA}$ solusyonu için 1 $\mu\text{l RNAase}$ (Sigma: R9009) katılarak 37°C'de 15 dk süreyle RNA'lar uzaklaştırılmıştır.

Bu uygulama sonucunda, belirtilen tüm örnek gruplarında ekstraksiyon başarısı kabul edilebilir sınırlara yükseltilmiştir. Çizelge 2'den görülebileceği gibi, bekletildikten sonra ekstraksiyonda kullanılan sürgün ucu-geç yapraklarda, Kalecik karası'nda 350 $\mu\text{g DNA/g doku}$, Riesling'de 290 $\mu\text{g DNA/g doku}$ 'ya ulaşan miktarlarda DNA elde edilmiştir.

Modifikasyon uygulaması sülüklerin kullanıldığı koşullarda da etkili olmuş, DNA miktarı Kalecik karası'nda 345 $\mu\text{g DNA/g doku}$, Riesling' de 480 $\mu\text{g DNA/g doku}$ ya ulaşmıştır.

Düşük oranda DNA'nın elde edilebildiği doku kültürü ve sera bitkilerinden alınan sürgün ucu-geç yapraklarda, modifikasyon uygulaması ile Kalecik karası'nın doku kültürü bitkilerinde 204 $\mu\text{g DNA /g doku}$, Sultani Çekirdeksiz'in doku kültürü bitkilerinde 175 $\mu\text{g DNA /g doku}$, sera bitkilerinde ise 215 $\mu\text{g /g doku}$ 'ya ulaşan DNA miktarları elde edilmiştir.

Bir yaşlı dallardan DNA izolasyonu

Dinlenme halindeki asmalar için DNA kaynağı olarak kullanılacak dokulardan birini bir yaşlı dallar oluşturmaktadır. Bir yaşlı dalların odun, kabuk ve kambiyum dokularının birlikte kullanıldığı Lin ve Walker (1997) yöntemine göre Riesling ve Kalecik karası çeşitlerinde sırası ile 28 $\mu\text{g /g doku}$ ile 40 $\mu\text{g /g doku DNA}$ elde edilmiştir (Çizelge 1). Ulaşılan sonuçlar araştırmacılar tarafından 28-47 $\mu\text{g /g doku}$ olarak bildirilen DNA verimlilik sınırları içinde gerçekleşmiştir. Lin ve Walker (1997) ile uyum içerisinde olan bu bulgular, Cheng ve ark. (1997)'nin bir yaşlı dokulardan elde ettiği 10-35 $\mu\text{g DNA /g doku}$ 'luk değerlere göre daha verimli bir sonuç ortaya koymuştur.

Çizelge 2. Modifiye edilmiş yöntemle asma dokularından elde edilen DNA miktarları

Çeşitler	İzolasyonda kullanılan dokulara göre DNA miktarları ($\mu\text{g DNA/g doku}$)				Sülük
	Sürgün ucu-geç yapraklar		Doku kültürü bitkileri	Sera bitkileri	
	Bağda yetiştirilen bitkiler	Bekletilmiş			
Kalecik karası	500	350	204		345
Sultani Çekirdeksiz			175	215	
Riesling	400	290			480

Çizelge 3. Modifiye edilmiş yöntemle asma dokularından elde edilen DNA'ların saflık oranları

Çeşitler	İzolasyonda kullanılan dokulara göre DNA saflıkları (260/280 absorpsan oranı)				Sülük
	Sürgün ucu-geç yapraklar		Doku kültürü bitkileri	Sera bitkileri	
	Bağda yetiştirilen bitkiler	Bekletilmiş			
Kalecik karası	1.86	1.80	1.80		1.78
Sultani Çekirdeksiz			1.84	1.75	
Riesling	1.80	1.87			1.80

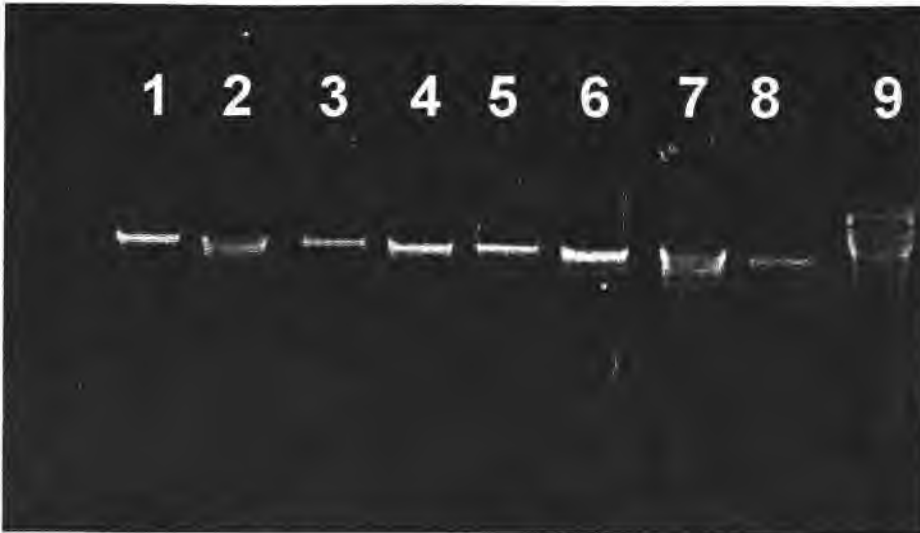
Modifiye yöntemin uygulandığı dokularda elde edilen DNA'ların saflık oranları Çizelge 3'de sunulmuştur. Araştırmada ulaşılan saflık oranları 1.75 ile 1.87 arasında değişmekte olup, bu değerler saf DNA için 260/280 okuma oranı kabul edilen 1.80-2.0 değerleri arasında bulunmuştur (Sambrook ve ark.1989).

DNA miktar ve saflıkları spektrofotometrik olarak belirlenirken, ekstraksiyon sırasında genomik DNA'nın ipliksi yapısını koruyup korumadığını belirlemek amacı ile agaroz jel üzerinde de gözlemler yapılmıştır. Elde edilen DNA'ların agaroz jel üzerinde yapılan görüntü analizlerinde ipliksi yapının korunduğu ve DNA'ların tek bant oluşturduğu (Şekil 1) görülmüştür (1-2-7-8 no'lu kuyulara: 2 μl , 5-6-9 no' lu kuyulara: 4 μl , 3-4 no'lu kuyulara 8 μl örnek yüklenmiştir).

DNA ekstraksiyonlarında önemle üzerinde durulan bir diğer konu, genomik DNA'da ortaya çıkacak kayıpların önlenmesi yani izolasyon stabilitesidir. Dolayısıyla izole edilen DNA'ların moleküler biyolojik tekniklerde kullanılabilirliği ve deneysel sonuçların tekrar edilebilirliği üzerinde durulmaktadır.

Bu amaçla izole edilen DNA'lar RAPD tekniği ile test edilmişlerdir (Şekil 2).

DNA ekstraksiyonunda kullanılan doku farklılıklarına rağmen, çeşitlere ait bant profillerinin tekrar edilebilir olduğu ortaya çıkarılmıştır (Şekil 2). Sadece, Kalecik karası çeşidinin doku kültürü bitkilerinde, bir bantta (5 nolu profil) farklılık bulunmuştur. Bu farklılık, ana bantı oluşturan DNA bölgesinde, kültür ortamında gerçekleşen bir mutasyona bağlanabilir ki, yapılan RAPD analizi tekrarları aynı sonuçları vermiştir.



Şekil 1. Ekstrakte edilen DNA'ların agaroz jel üzerindeki görünümü

[1:Bağda yetiştirilen bitkiler (Riesling), 2: Bağda yetiştirilen bitkiler (Kalecik karası), 3: Bir yaşlı dal (Riesling), 4: Bir yaşlı dal (Kalecik karası), 5:Doku kültürü bitkisi (Kalecik karası), 6:Doku kültürü bitkisi (Sultani Çekirdeksiz), 7:Sülük (Riesling), 8:Sülük (Kalecik karası), 9:Sera bitkisi (Sultani Çekirdeksiz)]



Şekil 2. RAPD tekniğinde kullanılan DNA'lardan elde edilen bant profillerinin agaroz jel üzerindeki görünümü
 [1:Bağda yetiştirilen bitkiler (Riesling), 2: Bağda yetiştirilen bitkiler (Kalecik karası), 3: Bir yaşlı dal (Riesling), 4: Bir yaşlı dal (Kalecik karası), 5: Doku kültürü bitkisi (Kalecik karası), 6: Doku kültürü bitkisi (Sultani Çekirdeksiz), 7: Sülük (Riesling), 8: Sülük (Kalecik karası), 9: Sera bitkisi (Sultani Çekirdeksiz), 10: negatif kontrol, 11: DNA ladder]

Sonuç

Farklı kaynaklardan izole edilen DNA'lar kullanılarak yapılan RAPD analizlerinde çeşitlere özgün bant profillerinin korunması, izolasyonlarda doğal olarak ortaya çıkan DNA miktarlarındaki farklılıklara karşın, çeşit genomlarındaki baz dizilerinin değişmediğini göstermektedir.

Ayrıca elde edilen DNA'ların gerek miktar gerekse saflık oranları açısından RFLP, mikrosatellit teknikleri için de kullanılabileceği görülmektedir.

Bu çalışmada, bitki dokularından DNA ekstraksiyonuna yönelik bir yöntem olan Doyle ve Doyle (1990)'a göre geliştirilen Lodhi ve ark. (1994)'e ait metotta yapılan modifikasyonlarla, asmada farklı dokulardan yüksek miktarlarda ve saf DNA'lar elde edilmiştir. Ayrıca ulaşılan önemli bir bulgu, sözkonusu modifikasyonlar ile uzun süreli taşınmalara maruz kalmış dokulardan saflık değeri yüksek DNA ekstraksiyonlarının gerçekleştirilmiş olmasıdır.

Kaynaklar

- Cheng, F.S., S. K. Brown and N. F. Weeden, 1997. A DNA extraction protocol from various tissues in woody species. *HortScience*, 32 (5) 921-922.
- Doyle, J. J. and J. L. Doyle, 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12, 13-15.
- Lin, H. and M. A Walker, 1997. Extracting DNA from cambium tissue for analysis of grape rootstocks. *HortScience*, 32 (7) 1264-1266.
- Lodhi, M. A., G. N. Ye, N. F. Weeden and B. A. Reisch, 1994. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* species. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 12 (1) 6-13.
- Maliyakal, E. J. 1992. An efficient method for isolation of RNA and DNA from plants containing polyphenolics. *Nucleic Acids Res.*, 20, 23-81.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis, 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA