

Araştırma Makalesi

Farklı Zamanlarda Örneklenen Bademlerden ve Farklı Ekstraksiyon Yöntemleri ile Ceviz Örneklerinden Elde Edilen Total Nükleik Asitlerde RNA Miktarı ve Parametrelerinin Karşılaştırılması

Mahmut YEGÜL^{1*}, Saadettin BALOĞLU²

¹Biyolojik Mücadele Araştırma Enstitüsü, ADANA

²Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü, ADANA

*Sorumlu yazar: yegulmahmut@gmail.com

Geliş Tarihi: 28.11.2018

Düzeltilme Geliş Tarihi: 22.10.2019

Kabul Tarihi: 06.11.2019

Özet

Bitkilerde hastalıkların zamanında ve doğru teşhis edilmesi için yapılan moleküler analizlerde yüksek kalitede nükleik asit elde etmek çok önemlidir. Bu çalışmada badem örneklerinden farklı zamanlarda ve ceviz örneklerinden de farklı ekstraksiyon yöntemleriyle elde edilen nükleik asitlerde, RNA miktarı, 260/280 ve 260/230 oranları ölçülerek bademlerde örnek almak için en uygun dönem ve cevizlerde de en uygun ekstraksiyon yöntemi belirlenmiştir. Badem RNA konsantrasyonu, 260/280 ve 260/230 oranları ilkbaharda sırasıyla 286.6 ng/μl, 1.72, ve 1.55, sonbaharda ise, 122.32 ng/μl, 0.832 ve 0.97 olarak ölçülmüş ve moleküler çalışmalarda ilkbaharda örnek alınması daha uygun bulunmuştur. Ceviz izolatlarından, modifiye edilmiş Dellaporta yöntemi ile elde edilen nükleik asitlerde RNA konsantrasyonu, 260/280 ve 260/230 oranı sırasıyla 1016.17 ng/μl, 1.329 ve 1.365, ticari ekstraksiyon kiti ile elde edilen nükleik asitlerde ise 7.678 ng/μl, 1.017 ve 0.456 olarak bulunmuştur. Sonuç olarak yüksek kalitede ve miktarda RNA elde etmek için bademlerde en uygun dönemin ilkbahar ve cevizlerde ise en uygun yöntemin ise modifiye edilmiş Dellaporta yöntemi olduğu belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Ceviz, badem, RNA, örnekleme zamanı.

Comparison of RNA Concentration and Parameters of Total Nucleic Acids Extracted from Almond at Different Times and From Walnut by Different Methods

Abstract

It is very important for diagnosing diseases in a timely and obtain high quality nucleic acid. In this study, total RNA quantities obtained from almond in spring and autumn and by different methods from walnut samples to determined optimal period for almond and better extraction method for walnut. RNA concentration was 286.6 ng/μl with 1.72 in 260/280 ratio and 1.55 in 260/230 ratio in spring, and RNA concentration was 122.32 ng/μl with 0.832 in 260/280 ratio and 0.97 in 260/230 ratio in fall samples from almond trees. Results of walnut isolates using modified Dellaporta total nucleic acid extraction were 1016.17 ng/μl as RNA concentration; the 260/230 ratio was 1.365; the 260/280 ratio was 1.329; and the total RNA amount obtained using the extraction kit was 7.678 ng/μl; 260/230 ratio was 0.456; 260/280 ratio was 1.017. As a result of this study, spring is the best sampling time for almond and modified Dellaporta total nucleic acid extraction method is better than using the extraction kit for walnut to obtain high quality and concentration of RNA.

Key words: Walnut, almond, RNA, sampling time.

Giriş

Sert kabuklu meyve grubunda yer alan ceviz ve bademde zarar yapan birçok biyotik ve abiyotik faktör vardır. Biyotik faktörlerden olan hastalıklar

meyve yetiştiriciliği yapılan her yerde verimi ve kaliteyi etkileyen önemli faktörlerdendir. Hastalıklarla mücadele zor olmasına rağmen mücadelenin en önemli aşamasını hastalıkların

zamanında ve doğru olarak teşhis edilmesi oluşturmaktadır. Her geçen gün gelişen teknolojiyle, çok fazla sayıdaki bitki örneklerinde hastalık etmenlerinin teşhislerinin yapılabileceği test yöntemleri kullanılmaya başlanmıştır. Günümüzde yaygın şekilde biyolojik indeksleme, serolojik testler ve elektron mikroskobu yöntemlerinin yanında son yıllarda gelişen moleküler analizlerle daha kesin ve net sonuçların alındığı biyoteknolojik teknikler kullanılmaktadır (Uyemoto ve Scott, 1992; Koç, 2010; Milne, 1993).

Nükleik asit ekstraksiyonu çoğu moleküler çalışmalarda ilk adımdır. Bunun için öncelikli olarak çalışmalarda kullanılacak olan nükleik asitlerin kısa sürede ve saf olarak elde edilmesi son derece önemlidir. Badem, ceviz, çilek ve biber gibi türlerde yüksek oranlarda bulunan fenolik bileşikler ekstraksiyon esnasında nükleik asitlerin kalitesini

bozmaktadır. Bitkilerde yapılan moleküler analizlerde başarılı sonuçlar elde etmek için yüksek kalitede nükleik asit elde etmek çok önemlidir. Bu amaçla bitki dokularından yüksek miktarda ve kalitede nükleik asit elde etmek amacıyla birçok izolasyon yöntemi geliştirilmiştir (Dellaporta ve ark, 1983, Doyle ve Doyle, 1991, Thomas ve ark. 1993, Lodhi ve ark, 1994, Lefort ve ark, 1998, Aka Kaçar, 2003). Bitkilerde moleküler çalışmalar yüksek kalitede DNA ve RNA gerektirmektedir. PCR analizleri için nükleik asitlerin kalitesi ve saflığı en önemli faktörlerden bazılarıdır. Yüksek saflıkta, inhibisyon bulaşmalarından arındırılmış nükleik asitleri elde etmek için, çalışılan ürüne ve çalışma amacına uygun ekstraksiyon yöntemleri uygulanmalıdır. Birtakım bileşenler aşağıda Çizelge 1’de özetlendiği gibi PCR analizlerini inhibe edebilmektedir (Aka Kaçar, 2003).

Çizelge 1. PCR analizlerini inhibe eden bileşenler.

Inhibitör	Inhibisyon konsantrasyonu	Inhibitör	Inhibisyon konsantrasyonu
Sodium Dodecyl Sulphate (SDS)	> %0.005	EDTA	> %0.5 mM
Fenol	> %0.2	Sodyum Klorit	> 25 mM
Ethanol	> %1	Hemogloblin	> %1 mg/ml
İsopropanol	> %1	Heparin	> 0.15 u/ml
Sodyum asetat	> 5 mM	Üre	> 20 mM
		Reaksiyon karışımı	> %15

En uygun tekniğin seçimi bazı kriterlere bağlıdır. Bunlar arasında hedef nükleik asit (DNA veya RNA), kaynak organizma, çalışma materyali (yaprak, tohum, kabuk dokusu vb.), istenilen sonuçlar (verim, saflık, saflaştırma için gereken süre vs.), ekstraksiyondan sonraki uygulamalar (PCR, klonlama, işaretleme, blotlama, RT-PCR, cDNA sentezi vs.) ve bitkisel dokuların uygun ortamlarda korunması izolasyon sonrası elde edilen DNA’nın miktar ve kalitesini olumlu şekilde etkilediği Aka Kaçar (2003) tarafından rapor edilmiştir.

Yüksek veya düşük 260/230 oranı örnekte veya ekstraksiyon yöntemindeki bir sorunu işaret etmektedir. Düşük 260/230 oranının; karbonhidrat bulaşıklığından (genellikle bitkilerden gelen bir sorundur), nükleik asit ekstraksiyonundan taşınmış olan fenol kalıntısından, ticari ekstraksiyon kiti kullanımı nedeniyle guanidin kalıntısı ve nükleik asit çökeltmede kullanılan glikojenden kaynaklanmış olabileceği bildirilirken yüksek 260/230 oranının ise bulaşık veya kirlenmiş kör (blank) kullanılmasından ve örnek ölçümü için uygun olmayan kör kullanımından kaynaklanabileceği öne sürülmüştür. Kör (blank) solüsyonu örnek sulandırmasında kullanılan solüsyon ile aynı içerikte ve aynı pH’da olmalıdır. Örneğin nükleik asit sulandırılmasında TE çözeltisi kullanılırken ölçümlerde suyun kör olarak kullanılmış olmasının 260/230 oranı düşük

çıkmasına neden olabileceği öne sürülmüştür (Wilfinger ve ark., 1997). Spittle ve ark. (2010), kontaminantların nükleik asit konsantrasyonunun ölçümünde hatalara neden olduğunu ve PCR’da (template) DNA’ya bağlanarak yanlış sonuçlar doğurduğunu bildirmiştir. Örneğin %1 SDS bulaşıklığında 260/230 oranı 2.20 ve N.A. konsantrasyonu 92.15 ng/μl, %10 bulaşıklıkta 260/230 oranı 1.51 ve N.A. konsantrasyonu 71.84 ng/μl olarak ölçüldüğünü belirtmiştir.

Bu çalışmada, badem ağaçlarından farklı örnekleme zamanlarında ve ceviz ağaçlarından ise farklı ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen nükleik asitlere ait kalite ve kantite kriterleri karşılaştırılmış ve moleküler çalışmalar için bademde en uygun örnek alma zamanı ve cevizde de en uygun nükleik asit ekstraksiyon yöntemleri belirlenmeye çalışılmıştır.

Materyal ve Yöntem

Bu çalışma Biyolojik Mücadele Araştırma Enstitüsü Bitki Biyoteknolojisi Laboratuvarında yürütülmüştür. Çalışmanın bitkisel materyalini ilkbahar (Nisan) ve sonbahar (Ekim) dönemlerinde badem ve ceviz bahçelerinden survey amaçlı toplanan yaprak örnekleri oluşturmuştur. Örnekler ağaçların dört yanından ve taze sürgünleri içerecek şekilde 5-6 yapraklı uç sürgünlerinden alınmıştır.

Bitki dokularından total nükleik asit ekstraksiyonu

Araziden toplanan ceviz ve badem ağaçlarına ait yaprak örneklerinden moleküler çalışmalarda kullanılmak üzere nükleik asit izolasyonu yapılmıştır. Bu amaçla iki farklı ekstraksiyon yöntemi kullanılmıştır.

“Dellaporta Nükleik Asit Ekstraksiyon” metodu Presting ve ark. (1995)’nin bildirdiği yöntemde bazı modifikasyonlar yapılarak aşağıdaki gibi uygulanmıştır.

1. 100-400 mg örnek 1.2 ml ekstraksiyon tampon çözeltisinde (100 mM Tris, pH 8.0, 50 mM EDTA, 500 mM NaCl, 10 mM 2-mercaptoethanol) ezilmiştir,
2. 600 µl ezilmiş yaprak örneğinden alınıp 1.5 ml’lik tüplere konmuş ve üzerine %10’luk SDS’den 70 µl eklenerek 65°C’de 10 dk. bekletilmiştir. Bekleme esnasında tüpler bir veya iki kez alt üst edilmiştir.
3. 200 µl 5 M potasyum acetate tüplere eklenmiş ve buzda 10-15 dk. bekletilmiştir.
4. Buzdan alınan örnekler 10 dk. santrifüj edilmiş ve sıvı kısımdan 600 µl alınarak yeni bir 1.5 ml’lik tüpe konulmuştur.
5. 300 µl soğuk isopropanol eklenerek 25-30 dk. buzda bekletilmiştir.
6. 10 dk. 10.000 rpm de santrifüj edilmiş ve süpernatant (sıvı) dikkatlice ortamdan uzaklaştırılmıştır.
7. -20 °C’de saklanan soğuk %70’lik ethanolde 600 µl bu sıvıya eklenip karıştırıldıktan sonra 2 dk. santrifüj yapılmıştır
8. Üstte kalan sıvı tüplerden dikkatlice uzaklaştırıldıktan sonra 15 sn’lik kısa bir santrifüj daha yapıp alkol pipetle çekilmiştir.
9. Pellet 10 dk. kurutulup üzerine 400 µl steril distile su eklenip karıştırılmıştır.
10. Bu karışım 37 °C’de 15 dk. inkübe edildikten sonra bir iki kez hafifçe karıştırılmıştır.
11. 5-10 µl alınıp elektroforezde sonuç kontrolünden sonra -20 °C ya da -70 °C’de saklanmıştır.
12. Not: Orijinal yöntemde 2. aşamada kullanılan %10’luk 70 µl SDS yerine %20’lik 35 µl SDS, 5. aşamada ise isopropanol yerine ethanol kullanılarak modifikasyon yapılmıştır.

İkinci yöntem ise “Thermo Scientific Plant RNA Purifikasyon Kiti” ile RNA izolasyonudur. Firmanın önerdiği protokole göre yapılan izolasyon aşağıda verilen aşamalar takip edilerek yürütülmüştür.

1. 100 mg taze veya donmuş bitki örneği veya 20 mg liyofize doku ezilerek kullanılmıştır.

2. 1.5 ml’lik mikrosantrifüj tüpüne Plant RNA Lysis Solution’dan 500 µl eklenmiştir.
3. Üzerine ezilmiş bitki örneği eklenerek 10-20 sn. vortekslenmiştir.
4. Örnekler 56 °C’de 3 dk. inkübe edilip ve sonra 5 dk. 20.000 g (14.000 rpm)’de santrifüj edilmiştir.
5. 450-550 µl süpernatant temiz mikrosantrifüj tüpüne alınarak ve 250 µl %96’lık etanol eklenerek pipetle yavaşça karıştırılmıştır.
6. Hazırlanan karışım purifikasyon kolonu içeren toplama tüpüne aktarılarak 1 dk 12.000 g (11.000 rpm)’de santrifüj edilmiş ve içine çözelti akan tüp atılarak kolon yeni tüpe aktarılmıştır.
7. 700 µl yıkama tamponu (wash buffer 1;WB 1) (etanol eklenmiş) purifikasyon kolonuna eklenmiştir.
8. 1 dk. 12.000 g (11.000 rpm)’de santrifüj edilerek alta geçen kısım atılmış ve saflaştırma kolonu 2 ml’lik toplama tüpüne yerleştirilmiştir.
9. 500 µl yıkama tamponu II (Wash buffer II;WB II) (etanol eklenmiş) purifikasyon kolonuna eklenmiştir.
10. Tekrar 1 dk. 12.000 g (11.000 rpm)’de santrifüj edilir ve alta geçen kısım atılarak ve yeniden mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilmiştir.
11. Bir önceki aşama tekrar edildikten sonra kolon 1 dk. maksimum hızda 20.000 g (14.000 rpm)’de yeniden santrifüj edilmiş ve alt tüpe geçen kısım atılmış ve saflaştırma kolonu 1,5 ml’lik RNase içermeyen (free) boş ependorf tüplerine aktarılmıştır.
12. RNA’yı kolondan uzaklaştırmak için purifikasyon kolonunun membranının merkezine 50 µl nükleaz içermeyen (Nucelase free) su ilave edilerek 1 dk. 12.000 g (11.000 rpm)’de santrifüj edilmiştir.
13. 30 µg’dan daha yüksek miktar RNA beklendiği zaman elution aşaması yani bir önceki aşama tekrarlanmıştır.
14. Purifikasyon kolonu atılmış, saflaştırılmış RNA kullanılıncaya kadar -20 °C’de muhafaza edilmiştir.

Total nükleik asit miktarı ve kalitesinin hesaplanması

Bu çalışmada ilkbahar ve sonbahar dönemi olmak üzere farklı zamanlarda bademlerden alınan yaprak örneklerinden elde edilen total RNA miktarları ve A 260/280 oranları ile A 260/230 oranları nanodrop cihazında ölçülerek en uygun dönem belirlenmiştir. Ayrıca farklı bölgelerden alınan ceviz izolatları, modifiye edilmiş Dellaporta total nükleik asit ekstraksiyonu ve Total RNA ticari

ekstraksiyon kiti kullanılarak nükleik asit ekstraksiyonu yapılmış, elde edilen nükleik asitlerin RNA miktarı ve kalite parametreleri nanodrop cihazında ölçülmüş ve bulunan değerler JMP istatistik programında Oneway-Anova testi uygulanarak karşılaştırılmıştır.

Bulgular ve Tartışma

Farklı zamanlarda alınan badem örneklerinden

elde edilen total nükleik asit miktarı ve kalitesi

Badem örneklerinden ilkbahar ve sonbahar olmak üzere farklı zamanlarda alınan 9 adet badem örneğinden, modifiye edilmiş Dellaporta total nükleik asit ekstraksiyonu yöntemi ile elde edilen nükleik asitlerin total RNA konsantrasyonu (ng/μl), 260/280 ve 260/230 oranları nanodrop cihazında ölçülerek karşılaştırılmıştır (Çizelge 2).

Çizelge 2. Farklı zamanlarda alınan badem örneklerinden elde edilen total RNA miktarları ile 260/230 ve 260/280 oranları.

Örnek no	İlkbahar			Sonbahar		
	Total RNA miktarı (ng/μl)	260/230 oranı	260/280 oranı	Total RNA miktarı (ng/μl)	260/230 oranı	260/280 oranı
1	673.57	1.583	1.805	210.92	1.408	0.847
2	550.12	1.853	1.908	95.37	0.517	0.953
3	360.12	2.059	1.950	245.67	1.291	0.760
4	327.92	1.690	1.945	158.79	1.274	0.816
5	17.34	1.753	1.861	99.84	1.254	0.922
6	380.63	2.032	1.936	0.97	0.895	0.544
7	60.96	1.447	1.998	82.33	0.275	1.019
8	108.97	0.259	0.928	86.85	0.810	0.822
9	99.76	1.274	1.149	120.13	1.010	0.801
Ort.	286.6	1.55	1.72	122.32	0.97	0.832

Çizelge 2'ye göre total RNA konsantrasyonu ilkbaharda alınan örneklerde ortalama 286.6 ng/μl, sonbaharda alınan örneklerde ise ortalama 122.32 ng/μl olarak ölçülmüştür. Yine ilkbaharda alınan örneklerden elde edilen nükleik asitlerin 260/280 oranı ortalama 1.72, 260/230 oranı 1.55 ve sonbaharda alınan örneklerde 260/280 oranı 0.832 ve 260/230 oranı ise 0.97 olarak ölçülmüştür.

Bu sonuçlar göz önüne alındığında, sonbaharda bitki dokularının yaşlanmaya başlamasıyla ölü dokuların fazla olmasından dolayı ilkbaharda toplanan örneklerde gerek kalite ve gerekse kantite olarak daha kaliteli ve fazla nükleik asit elde edildiği görülmektedir. Kaçar (2003) genel olarak en kaliteli DNA'nın en taze olan dokudan elde edildiğini bildirmiştir. Bu parametreler PCR çalışmalarında ve

elde edilen nükleik asitlerin muhafazasında önemli kriterlerdir. Buna göre moleküler çalışmalarda ilkbaharda örnek alınmasının daha uygun olacağı kanaatine varılmıştır.

Farklı ekstraksiyon yöntemleri ile ceviz örneklerinden elde edilen total RNA miktarı ve parametrelerinin karşılaştırılması

Farklı bölgelerden alınan ceviz örnekleri modifiye edilmiş Dellaporta total nükleik asit ekstraksiyonu ve Total RNA ticari ekstraksiyon kiti kullanılarak nükleik asit ekstraksiyonu yapılmış ve elde edilen nükleik asitlerin miktarı ve kalite parametreleri nanodrop cihazında ölçülerek karşılaştırılmıştır (Çizelge 3).

Çizelge 3. Farklı ekstraksiyon yöntemleri ile ceviz örneklerinden elde edilen Total RNA'nın miktarı ve parametreleri.

	Total RNA miktarı (ng/μl)		260/280 oranı		260/230 oranı	
	Modifiye edilmiş Dellaporta yöntemi	Ekst. Kiti	Modifiye edilmiş Dellaporta yöntemi	Ekst. Kiti	Modifiye edilmiş Dellaporta yöntemi	Ekst. Kiti
1	1280.34	4.32	1.312	0.913	1.554	0.240
2	1160.01	5.12	1.482	0.795	1.469	0.346
3	301.02	15.53	1.008	0.878	0.779	0.699
4	441.27	3.41	0.990	0.954	0.743	0.626
5	1209.2	16.44	1.608	2.95	1.835	0.524
6	1705.2	1.25	1.572	0.158	1.807	0.304
Ort.	1016.17	7.678	1.329	1.017	1.365	0.456

Bu çalışmada modifiye edilmiş Dellaporta yöntemi sonucu total nükleik asit konsantrasyonu ortalama 1016.17 ng/μl, ekstraksiyon kiti

kullanılarak elde edilen total RNA miktarı ise 7.678 ng/μl bulunmuş ve aradaki fark istatistiki açıdan önemli bulunmuştur (Çizelge 4).

Çizelge 4. Farklı ekstraksiyon yöntemleri ile ceviz örneklerinden elde edilen Total RNA miktarına ait varyans analiz tablosu.

Yöntem	Ort.	Standart Hata	Konsantrasyon(ng/μl)
Modifiye edilmiş Dellaporta yöntemi	1016.17	109.7218	1016.17±109.7218 a
Ekst. Kiti	7.678	2.6819	7.678±2.6819 b

*P<0.05'ten küçük olduğu için konsantrasyon değerlerinde yöntemler arasında istatistiki açıdan fark önemli bulunmuştur.

Modifiye edilmiş Dellaporta yöntemi sonucu 260/280 oranı ortalama 1.329 ekstraksiyon kiti kullanılarak elde edilen total RNA 260/280 oranı ise 1.017 bulunmuş ve yapılan istatistiksel değerlendirmeye göre aradaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır (Çizelge 5).

Modifiye edilmiş Dellaporta yöntemi sonucu 260/230 oranı ortalama 1.365 ekstraksiyon kiti kullanılarak elde edilen total RNA 260/230 oranı ise 0.456 bulunmuş ve aradaki fark yapılan istatistiksel analizlerin sonucuna göre önemli bulunmuştur (Çizelge 6).

Çizelge 5. Farklı ekstraksiyon yöntemleri ile ceviz örneklerinden elde edilen Total RNA'nın 260/280 oranına ait varyans analiz tablosu.

Yöntem	Ort.	Standart Hata	260/230
Modifiye edilmiş Dellaporta yöntemi	1.329	0.1123	1.329±0.1123 a
Ekst. Kiti	1.017	0.3876	1.017±0.3876 b

*P>0.05'ten büyük olduğu için 260/280 oranı yöntemler arasında istatistiki açıdan önemli değildir.

Çizelge 6. Farklı Ekstraksiyon Yöntemleri ile ceviz yapraklarından elde edilen Total RNA'nın 260/230 oranına ait varyans analiz tablosu.

Yöntem	Ort.	Standart Hata	260/230
Modifiye edilmiş Dellaporta yöntemi	1.365	0.1994	1.365±0.1994 a
Ekst. Kiti	0.456	0.0762	0.456±0.0762 b

*P<0.05'ten küçük olduğu için 260/230 oranı yöntemler arasında istatistiki açıdan fark önemli bulunmuştur.

Proteinler 280 nm'de absorpslandığı için A₂₆₀/A₂₈₀ oranı nükleik asitin saflığını hesaplamak için kullanılan değerdir. Saf DNA yaklaşık olarak 1.8, saf RNA ise yaklaşık 2.0 değerini vermelidir. 260/280 >1.8 ise RNA kontaminasyonu, 260/230 <1.8 ise protein kontaminasyonu olduğunu gösterir. Herhangi bir kontaminasyon birçok sorunu da beraberinde getirir. Eğer kontaminasyon varsa moleküler çalışmalarda kötü sonuçlar elde edebilir hatta örneği bile kaybetmek mümkün olmaktadır. Ayrıca bulaşıklık örneğin muhafaza süresini de etkilemektedir. Böylece elde edeceğimiz nükleik asitleri daha kısa sürede kaybedebiliriz (Yörek, 2005). Spittle ve ark. (2010) ekstraksiyonda kullanılan kimyasallar, purifikasyon metodu ile çalışılan materyal ve ortamların kontaminasyona neden olabileceğini dolayısı ile 260/230 oranının düşeceğini bildirmiştir.

Şimşek ve ark. (2008) fındık, avakado, Trabzon hurması, mandarin ve portakal türlerinden, MiniPrep DNA izolasyon yöntemi ve bu yöntemin

modifiye edilmiş versiyonlarını kullanarak DNA ekstraksiyonu yapmıştır. 1) Sadece CTAB, 2) CTAB ve PVP birlikte (CTAB+PVP), 3) CTAB ve SDS (CTAB+SDS) beraber ve 4) yalnızca SDS olacak şekilde ekstraksiyon tampon çözeltilerini denemiş ve genelde tüm yöntemlerden yüksek konsantrasyonda DNA elde edilmesi ile beraber en yüksek DNA konsantrasyonu fındık ve portakal örneklerinden elde edilmiştir. Ancak, tür X yöntem interaksyonu önemli bulunmamıştır. Burada çalışılan örnekler farklı türler olduğu için farklı sonuçlar çıktığı düşünülmektedir. Çünkü ceviz gibi ikincil bileşikler (fenolik bileşikler) oldukça yüksek türlerde ekstraksiyon çözeltilerinde kullanılan tampon çözeltilerin içeriği büyük önem arz etmektedir. Yine aynı çalışmada DNA kalite sonuçlarında, meyve türleri arasındaki farklılıklar ve interaksyon önemli bulunmamıştır. Yöntemler arasında ise farklılıklar önemli bulunmuş, genotiplerden en yüksek değerler CTAB ve CTAB + SDS yöntemlerinden elde edilmiştir. Bu çalışmada

ceviz örneklerinden farklı iki yöntemle elde edilen örnekler arasında da gerek toplam RNA miktarında gerekse 260/280 oranı ve 260/230 oranı SDS'nin kullanıldığı modifiye edilmiş Dellaporta ekstraksiyon yönteminde daha yüksek bulunmuş ve benzer sonuçlar alınmıştır.

Bozkaya (2012) PCR işlemlerinde kullanılmak üzere kandan genomik DNA izolasyonu amacıyla proteinleri ortamdan uzaklaştırmak için fenol-kloroform yöntemi yerine potasyum asetat çözeltisinin daha düşük düzeyde DNA elde edildiği ancak elde edilen DNA'nın yeterli miktar ve kalitede olmasından dolayı araştırmacıların sağlığı ve çevreye zararlı olan fenol-kloroform yerine potasyum asetatın DNA izolasyonunda kullanılabileceği kanaatine varmıştır.

Sonuç ve Öneriler

Sonuç olarak, badem örnekleri ile yapılacak moleküler çalışmalarda ilkbaharda örnek alınmasının daha uygun olacağı, ceviz izolatları ile yapılan nükleik asit ekstraksiyonunda ise modifiye edilmiş Dellaporta yönteminde, total nükleik asit konsantrasyonu ve elde edilen total RNA miktarı istatistiksel olarak daha yüksek bulunmuştur. Dolayısı ile ceviz gibi fenolik bileşikler yoğun olan örneklerle yapılan moleküler çalışmalarda modifiye edilmiş Dellaporta total nükleik asit ekstraksiyonu yönteminin Total RNA ticari ekstraksiyon kitine göre daha uygun olduğu kanaatine varılmıştır.

Teşekkür

Çalışmayı destekleyen T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü (TAGEM) ve Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (ÇÜ-BAP-ZF2012D12)'ne teşekkür ederiz.

Kaynaklar

- Aka Kaçar, Y. 2003. Bitkilerde DNA İzolasyonu. Alata Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü Dergisi 2:1-3.
- Bozkaya, F. 2012. DNA İzolasyonunda Fenol-kloroform Yerine Potasyum Asetat Kullanımının DNA Miktar ve Kalitesi Üzerine Etkisi. Harran Üniv. Vet. Fak. Dergisi, 1(2):92-96, 2012.
- Dellaporta, S.L., Wood, J., Hicks, J.B., 1983. A Plant DNA Minipreparation: Version 11. Plant Molecular Biology Reporter 1:19-21.
- Doyle, J. J. Doyle, J. L. 1991. Isolation of Plant DNA Fresh Tissue. Focus 12:13-15.
- Koç, G, 2010. Doğu Akdeniz Bölgesinde Sert Çekirdekli Meyvelerde Plum pox potyvirus (PPV, Sharka)'ünün Durumunun Belirlenmesi ve Karakterizasyonu, Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi. 227 S.

- Lefort, F., Lally, M., Thompson, D., Douglas, G. C. 1998. Morphological Traits Microsatellite Fingerprinting and Genetic relatedness of a Stand of Elite Oaks (*Q. robur* L.) at Tullnynally. *Silvae Genetica* 47:5-6.
- Lodhi, M. A., Daly, M. J., Ye, G.N., Weeden, N. F., Reisch, B. I. 1994. A simple and Efficient Method for DNA Extraction from Grapevine Cultivars and *Vitis* species. *Plant Molecular Biology Reports* 12: 6-13.
- Milne, R.G., 1993. Electron Microscopy as a Powerful Tool for Detection and Identification of Plant Viruses. XI International Symposium on Virus Diseases of Ornamental Plants. *ISHS Acta Horticulturae*, 722: 37-40.
- Presting, G.G., Smith, O.P., Brown, C.R. 1995. Resistance to potato leafroll virus in potato plants transformed with the coat protein gene or with vector control constructs. *Phytopathology* 85:436-442.
- Spittle, K., Wang, S., Baybayan, P. 2010. Sample Quality – Effects of Contaminants on SMRTbell™ Library Preparation and Sequencing, Pacific Biosciences.
- Şimşek, Ö., Karaat, F. E., Serçe, S., Kaçar, Y. 2008. Bazı Meyve Türlerinde DNA İzolasyon Yöntemlerinin Etkinliğinin Araştırılması. *Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Derim Dergisi*, 2008, 25(1):59-69.
- Thomas, M. R., Matsumoto, S., Chain, P., Scott, N.S. 1993. Repetitive DNA of Grapevine: Classes Present and Sequences Suitable for cultivar identification. *Theoretical and Applied Genetics* 86:173-180.
- Uyemoto, J.K., Scott, S.W. 1992. Important Diseases of Prunus Caused by Viruses and Other Graft-Transmissible Pathogens in California and South Carolina. *Plant Diseases*, 76: 5-11.
- Yörek, N. 2005. BİY 4008 Genetik Mühendisliğine Giriş ders notları.
- Wilfinger, W.W., Mackey, K., Chomczynski, P. 1997. Effect of pH and Ionic Strength on the Spectrophotometric Assessment of Nucleic Acid Purity: *BioTechniques*, 22:474-481 (March 1997).