



## RAPD (RASTGELE ARTTIRILMIŞ POLİMOFİK DNA) BELİRLEYİCİLERİ VE BİTKİ SİSTEMATIĞI

S. ÖZ AYDIN

### ÖZET

RAPD (Rastgele Arttırılmış Polimorfik DNA) genetik polimorfizmi belirleyen PCR temelli bir tekniktir. Tekniğin en büyük avantajları genom dizisi hakkında ön bilgiye, yüksek saflıktaki DNA'dan çok miktarlara, Southern blot veya radyoaktif kimyasallara ihtiyaç duymamasıdır. Ayrıca hızlı ve düşük maliyetlidir. RAPD tekniği pek çok alanda olduğu gibi değişik bitki türlerinin genetik değişkenliğinin belirlenmesinde yaygın bir şekilde başarıyla uygulanmaktadır.

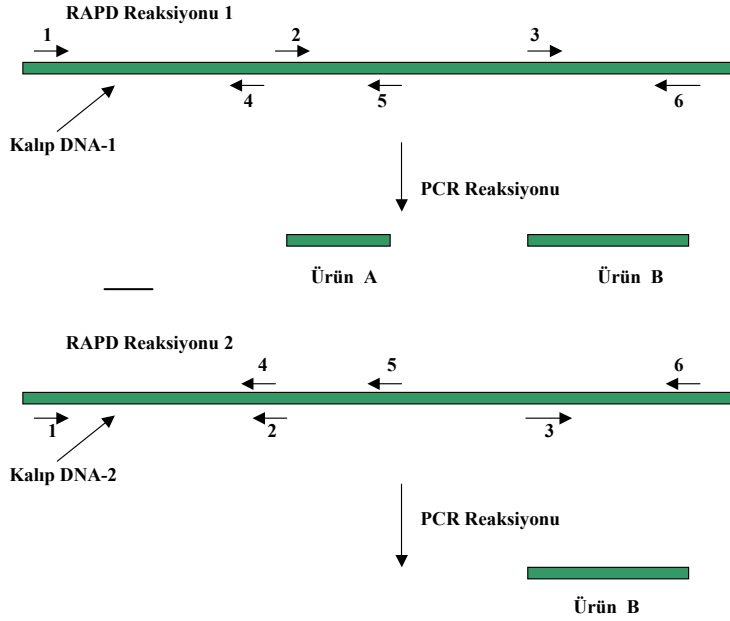
### Giriş

M.Ö.3. yüzyılda Aristo ile başlayan sistematik temel olarak büyük ölçüde morfolojik karakter temeline dayanmaktadır. Bu geleneksel yaklaşımlar bazı değişimlerle günümüzde de halen kullanılmaktadır. Ancak tür sınırlarının tanımlanmasında sadece morfolojik verilerin yeterli olmadığı değişik durumlar mevcuttur [1,2]. Bu durumdaki sorunları ve sistematik problemleri çözmek amacıyla çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. Bu çalışmalar sitogenetik çalışmalar, kimyasal içerik çalışmaları ve farklı biyokimyasal belirteçlerin kullanıldığı izozim çalışmalarıdır [1,3-7]. Sistematik problemlerin çözümündeki en son gelişmeler ise farklı DNA temelli belirteç sistemleriyle genotipin doğrudan yada dolaylı olarak belirlenmesi üzerinde olmuştur. Bu DNA temelli farklı analizler, pek çok sorunun çözümünde umut verici görülmektedir [8,9]. PZR(Polimeraz Zincir Reaksiyonu, PCR: Polymerase Chain Reaction) bu analizlerin temelini oluşturmaktadır [10]. RAPD (Rastgele Arttırılmış Polimorfik DNA, Randomly Amplified Polimorphic DNA) tekniği de PCR temelli bir DNA tekniğidir [10-12]. Dünyada son yıllarda RAPD tekniği pek çok bitki türünün sistematik probleminin çözümünde başarıyla kullanılmaktadır [1,4,8].

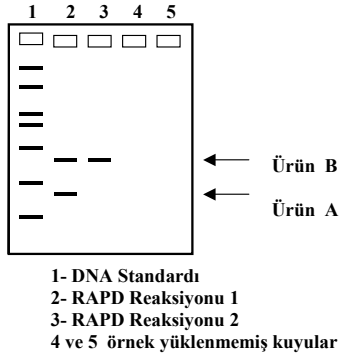
### RAPD-PCR Tekniğinin Prensipleri

RAPD (Rastgele Arttırılmış Polimorfik DNA, Randomly Amplified Polimorphic DNAs) ilk defa 1990' da rastgele seçilmiş primerlerin kullanıldığı ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu' nu (PCR) temel alan bir teknik olarak ortaya çıkmıştır [11]. Aynı yıllarda diğer bir çalışma grubu tarafından uygulanmış ve AP-PCR (Arbitrarily

Primed PCR ) olarak isimlendirmiştir [12]. 1991 tarihinde ise bu metodla aynı temele dayanan fakat farklı olarak 10 nükleotitten daha kısa primerlerle daha kompleks DNA parmakizi profili elde edilen DAF (DNA Amplification Fingerprinting) olarak isimlendirilen diğer benzer bir metod yayınlanmıştır [13].



RAPD Reaksiyonu 1 ve RAPD Reaksiyonu 2'nin agaroz jel görüntüsü



Şekil 1. RAPD Reaksiyonunun şematik gösterimi [14]

(RAPD-1, RAPD-2 Reaksiyoları bir tane primer ve iki tane farklı kalıp DNA kullanılmıştır.  
a) Oklar reaksiyona katılmış olan aynı diziyeye sahip primerin kopyalarıdır  
b) Okların yönü DNA sentez yönünü belirlemektedir

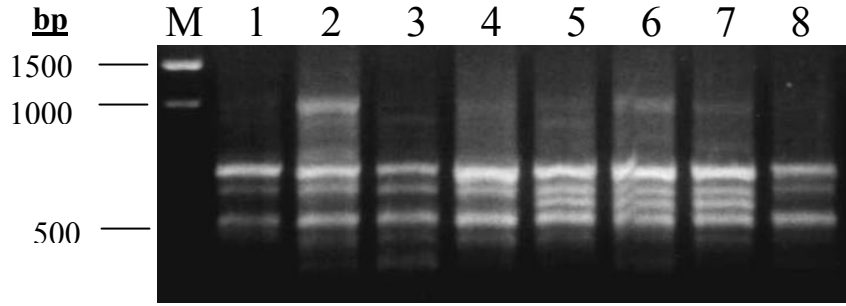
c) Sayılar kalıp DNA'da primerlerin bağlanma bölgelerini göstermektedir

1.RAPD reaksiyonunda 2 ve 5 pozisyonlarına bağlanan primerler arasındaki DNA dizisinin çoğaltılmasıyla ürün A, 3 ve 6 pozisyonlarına bağlanan primerler arasındaki DNA dizisinin çoğaltılmasıyla ürün B oluşmaktadır.

2.RAPD reaksiyonunda sadece 3 ve 6 pozisyonları arasındaki bölgedeki DNA dizisinin çoğaltılmasıyla ürün B oluşmaktadır.

Reaksiyon 1 ve reaksiyon 2' ye eklenen primerlerin tümünden PCR sonucu bant elde edilemez. Elde edilebilen bantlar agaroz jelde görüntülenmektedir .)

RAPD yönteminin temel prensibi ilgili olan türe ait genomik DNA üzerinde rastgele seçilmiş, tek bir 9-10 bp oligonükleotidin, düşük bağlanma sıcaklığında tesadüfi olarak bağlanarak PCR ile çoğaltma yapmasıdır. Tekniğin devamında elde edilen çoğaltma ürünü radyoaktif olmayan standart jel elektroforezinde yürütülür ve çoğaltma ürünleri bantlar halinde gözlemlenerek incelenir. Bantların varlığı veya yokluğuyla sonuçlar değerlendirilmektedir [11,12]. Şekil 1'de şematik olarak bu teknik gösterilmiştir. Şekil-2' de RAPD bant profillerini gösteren örnek bir agaroz jel fotoğrafı verilmiştir.



Şekil-2:Farklı *Satureja* türlerine ait UBC-208 Primerinin RAPD-PZR jel fotoğrafı M:DNA Standardı [15].

### RAPD Tekniğinin Değişkenleri

RAPD metodunun güvenilirliğini ve tekrarlanabilirliğini etkileyen pek çok farklı çoğaltma değişkeni vardır [11,12,16-20]. En önemli değişkenlerden birisi hedef DNA'dır [21-27]. MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonu [24,28], *Taq* DNA polimeraz konsantrasyonu [16,18,24], primer konsantrasyonu [16,18,24], dNTP konsantrasyonu [24], primer bağlanması [22], başlangıç denaturasyon [25], primer karışımları [29,30] RAPD tekniğini etkileyen diğer temel değişkenlerdir. Ayrıca PCR' da oluşan çelişkili sonuçlardan, yabancı DNA tarafından oluşturulan kontaminasyona ek olarak DNA izolasyon tekniğindeki varyasyonlar, kullanılan doku kaynağı, PCR koşulları ve PCR cihazının tipi sorumlu olabilmektedir [31-33]. RAPD çalışmalarında her farklı tür için reaksiyon koşullarının optimizasyonu

şarttır. Bunun amacı özgünlüğü ve tekrarlanabilirliği kontrol etmektir. Bu parametrelerin çoğu birbirine bağlı olduğundan bir RAPD tekniğini optimize etmek oldukça zor olabilmektedir [21].

Moleküler sistematik çalışmalarında organizmalardan öncelikle DNA'nın izolasyonu gereklidir. Bitkilerde DNA'nın izolasyonunun başarıyla uygulanmasını sağlayan değişik yöntemler vardır [34-40]. Ancak her yöntem her bitki için saf DNA eldesi açısından uygun olmamaktadır [41]. RAPD reaksiyonlarında, DNA'nın kalitesi çok önemli olduğundan bu yöntemlere ek olarak farklı yoğun kimyasal içeriğe sahip bitkiler için yeni yöntemler geliştirilmiştir [15,41-44]. Bu metotta kullanılan primerler 9-10 bp uzunluğundadır. Kullanılan primerlerin, PCR'da kullanılan diğer primerlerde olduğu gibi herhangi bir palindromik dizi içermemesi, %50-80 oranında G+C oranına sahip olması gerekir [11,12]. RAPD tekniğinde çoğaltma, kullanılan primerin uzunluğuna, primerin GC içeriğine ve primer dizisindeki tek bir nükleotidin yerine duyarlıdır [45]. Bu teknikte MgCl<sub>2</sub>, dNTP ve *Taq* DNA polimeraz konsantrasyonlarının çalışılan bitkilere özgü optimum koşullarının belirlenmesi reaksiyonun tekrarlanabilirliği açısından gereklidir [11,12,16,18,24,28].

#### **RAPD Yönteminin Avantaj ve Sınırlılıkları**

Moleküler sistematikte kullanılan DNA temeline dayalı diğer bazı temel teknikler; Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) [46], Çoğaltılmış Parça Polimorfizm (AFLP) [47-48], Basit Dizi Tekrarı, Mikrosatellit (SSR) [49] Basit Dizi Tekrarları Arası (ISSR) [50], Tek Zincir Konformasyonel Polimorfizm (SSCP) [51], Denatüre Gradient Jel Elektroforezi (DGGE)[52], Kesilmiş Amplifiye Polimorfik Dizi (CAPs) ve Amplifiye Edilmiş Karakterize Dizi Bölgesi (SCARs)'dir [53-54].

Genel olarak bu tekniklerle karşılaştırıldığında RAPD tekniğinin en büyük avantajı ilgilenilen taksonun genleriyle ilgili herhangi bir ön bilgi gerektirmemesidir [11,12,14]. Çoğaltmada tüm organizmalar için aynı oligonükleotid primer seti kullanılabilir ve bu oligonükleotid özgün bölgelere rastgele bağlanarak çoğaltma yapmaktadır [1,11,12,17]. Bir primerle, farklı bitkilerin genomik DNA'ları farklı olacağından oluşacak RAPD belirteçler farklı olacaktır [55]. Bu farklılık organizmaların karşılaştırılmasını sağlamaktadır. Ayrıca radyoaktiviteye, Southern transferlere veya DNA hibridizasyonuna gerek duyulmamaktadır. RAPD karakterlerinin sayısı ihtimal olarak sınırsızdır. Kullanılan primer sayısı arttırıldıkça elde edilen bant sayısı da artacaktır. Bu açıdan yakın türleri ayırmada izozimden daha duyarlıdır [18]. Farklı araştırmacılar tarafından kodominant veriler gerektirmeyen sistematik problemlerin çözümünde RAPD belirteçlerin kullanımı güçlü bir şekilde savunulmaktadır [16,19].

Bununla beraber metodun sınırlılıkları da vardır. RAPD kullanım açısından kolay olmasına karşılık, belirteçleri dominanttır ve heterozigotları teşhis etmek zordur [18]. Çalışmalar sonucunda elde edilen verilerin tekrarlanabilirliği, reaksiyona giren tüm değişkenlere bağlı olduğundan düşük olabilmektedir. Bunun için diğer karşılaştırmalı analizlere girmeden evvel yöntemin optimize edilmesi oldukça önemlidir [20,21].

### RAPD Tekniğinin Uygulama Alanları

RAPD belirteç sistemi avantajları nedeniyle prokaryotik ve ökaryotik türler gibi pek çok farklı yapının genotipinin belirlenmesi, genom yapısının araştırılması, çeşitli taksonomik çalışmalar, evrimsel sorunlar, populasyon biyolojisi, bireysel, kültür ve ırk belirlenmesinde, ebeveyn belirleme, genetik varyasyonun belirlenmesi, bağlantı haritalarının oluşturulması, özgün bir gen lokusunun belirlenmesi adli tıp, klinik teşhis, prenatal tanı, salgınlar ve ekoloji alanlarında yoğun bir şekilde kullanılmaktadır. Bu teknikle yapılan çalışmaların çokluğu nedeniyle burada sadece farklı türlerdeki bitkilere ait sistematik açıdan önemi olan çalışmalar üzerinde durulacaktır. Bu tür çalışmalar direk sistematik problemleri çözmeye yönelik olabileceği gibi bu sonuçlar bazen farklı alanlarda da kullanılabilir. Örneğin burada bahsedilen çalışmalar bitki türlerinin genetik akrabalıklarının belirlenmesi, sistematik tür problemlerinin çözülmesi, hibritlerin belirlenmesi, populasyonlar arası ve populasyon içi genetik çeşitliliğin belirlenmesi ve buna benzer diğer durumları kapsamaktadır.

Değişik familyalara ait ve farklı özelliklere sahip bir çok bitki türünün genetik akrabalığının ve türlerinin belirlenmesi amacıyla yapılan bir çok başarılı RAPD çalışması vardır. Örneğin *Labiatae* familyasına ait farklı *Mentha* türlerinin, türler arası farklılıklarını belirlemek için RAPD tekniğinin uygun olduğu ve türlerin bu teknikle açıkça belirlenebildiği açıklanmıştır [56]. Yine *Labiatae* familyasına ait tıbbi *Scutellaria* bitkilerinin 3 türünü ayırmak oldukça zordur. *Scutellaria* bitkisinin üç türünün üyelerinin hızlı bir şekilde belirlenebilmesi için RAPD belirteçlerin kullanılabilmesi belirtilmiştir [57,58]. Doğal bir populasyon olan *Ilex paraguariensis* A.St.-Hill türünün 4 farklı populasyonunun genetik çeşitliliği, RAPD tekniği kullanılarak karakterize edilmiştir [59]. Doğal populasyonlara sahip *Flax* genotiplerinin ve *Eucalyptus argutifolia*'nın polimorfizminin belirlenmesinde de RAPD tekniği kullanılmıştır [60,61]. Skepner ve arkadaşları tarafından *Acer nigrum* ve *A. saccharum* gibi iki farklı türün genetik benzerliğini RAPD belirteçler ile ortaya çıkarılmıştır [62]. Nadir görülen klonal bir bitki olan *Ranunculus reptans*'ın (*Ranunculaceae*) geniş ve dar populasyonlarının içinde ve bu populasyonlar arasındaki varyasyon, genetik uzaklık ve coğrafik uzaklığın bağıntısı belirlenmiştir RAPD belirteçler sayesinde belirlenmiştir [63]. *Pinus halepensis* ve *P. brutia* Akdeniz bölgesinin önemli çam türlerinden iki tanesidir. Bu türlerden oluşan bir doğal hibrit populasyonu RAPD belirteçler kullanılarak analiz edilmiştir [64]. Türkiye için önemli kültür bitkilerinden olan *Vitis vinifera* genomları da

RAPD tekniğiyle başarıyla belirlenmiştir [65]. *Labiatae* familyasına ait ve İspanya'nın endemik türlerinden olan *Rosmarinus tomentosus* Huber-Morath and Maire insan etkisiyle yaşam alanları zarar görmüştür. Bu nedenle tür tehdit altında bulunmaktadır. Bu bitkide zonlar arası, popülasyonlar arası ve bireyler arası genetik varyasyonun ilk değerlendirilmesi RAPD belirteçler kullanılarak yapılmıştır. Bu çalışma ile tehlike altındaki türün korunması için yapılması gerekenleri belirlemede RAPD analizi sonuçları temel alınmıştır [66]. RAPD belirteç sistemi, özellikle bitki moleküler biyolojisinde BSA (Bulked Segregant Analysis) gibi uygulamalarda da geniş kullanım alanı bulmuştur [45]. Harfouche ve ark. *Cupressus sempervirens* türünde RAPD belirteçleri teşhis etmek için BSA (Bulked Segregant Analysis) kullanılmıştır. Analiz sonucunda formlar ve onların atası olan bireyler için farklılık belirlenmiştir ve gen ile ilgili bilgilere ulaşılmıştır. Bunların yanı sıra bu tekniğin ormancılık açısından fidanlıktaki formların erken belirlenmesine izin vermesi nedeniyle büyük önemi vardır [67].

Son yıllarda yapılan çalışmalarda türlerin genetik akrabalığını belirlemek ve bağlantı haritalarını oluşturmak için RAPD belirleyicileri ile RFLP belirleyicileri birlikte kullanılmıştır [19,30,68]. Diğer bazı çalışmalarda da RAPD, Mikrosatellit, CAPS, SCAR ve AFLP teknikleri birlikte kullanılarak amaçlar doğrultusunda daha kesin sonuçlara ulaşılmaya çalışılmıştır [69-71]. Bazı çalışmalarda RAPD ve diğer PCR temelli çalışmalar ile morfolojik ve kimyasal karakterlerin analizleri değişik amaçlar için birlikte değerlendirilmektedir. Persson ve arkadaşları *Vaccinium vitis-idaea* L. türünde yaptıkları çalışmada RAPD ve yaprak şekil analizleriyle türün genetik çeşitliliği ve klonun büyüklüğü ortaya çıkarılmıştır [72]. Siyah Meksika tatlı mısır popülasyonunda kromozom çalışmalarıyla gösterilen B kromozomları, RAPD tekniği ile elde edilen polimorfik bantlar sayesinde de belirlenmiştir [73]. Bir diğer çalışmada *Atractylodes* bitkilerinin RAPD analizleri ile uçucu yağlarının değişkenlikleri karşılaştırılmıştır. RAPD analizi ile bitki türlerinin genetik farklılıkları belirlenmiştir. Bu sonuçlarla bir türe ait olduğu düşünülen iki farklı soydan bir tanesinin aslında farklı bir tür olduğuna karar verilmiştir [74]. *Allium cepa* bitkisinde seksüel ve aseksüel formlar arasındaki genetik ilişkinin belirlenmesinde RAPD belirteçler ve morfolojik özellikler yine birlikte kullanılmıştır [75]. Diğer bir çalışmada RAPD belirteçler kullanılarak *Dendroseris* (Asteraceae) türleri arasında divergens ve bunlar arasındaki çeşitlilik belirlenmiştir. RAPD sonuçları allozim, kloroplast DNA, morfoloji ve nüklear ribozomal DNA (ITS) sonuçlarıyla karşılaştırılarak sonuçların geçerliliği daha arttırılmıştır [76]. Türkiye *Satureja* cinsine (*Labiatae*) ait bazı türleri sistematik problemler içermektedir. Bu sistematik problemlerin çözümünde RAPD tekniği kullanılmıştır. Bu tekniğin sonuçları, sitogenetik, polen analizi ve morfolojik analizlerin sonuçlarıyla desteklenmiştir [15].

Adli tıpta PZR temelli teknikler giderek artan bir şekilde kullanılmaktadır. Bir suç vakasında DNA parmakizinin kullanıldığı en ilginç durumlardan biri, Palo verde vakasının RAPD tekniğiyle çözümlenmiş olmasıdır. Cinayeti araştıranlar şüphelinin kamyonunda ve cesedin bırakıldığı yerde bulunan Polo verde

(*Cercidium floridum*) bitkisinin tohumlarını bulmuşlardır. Ancak bu tohumların cesedin bulunduğu yerin yakınlarındaki Polo verde ağacına ait olup olmadığı bilinmiyordu. Yapılan RAPD çalışması sonunda Phoenix civarından gelişigüzel toplanmış 18 ayrı ağacın arasında DNA profilleri açısından belirgin bir fark bulunmuştur. Ağaçlar arasında böyle bir farkın bulunması büyük bir şanstır. Bu durumla tohumların hangi ağaca ait olduğu tesbit edilebilmiştir. Bu bilgi mahkemeye önemli bir kanıt olarak sunulmuştur. Dava bu kanıt doğrultusunda sonuca ulaşmıştır [77].

## SONUÇ

Gelişen moleküler teknikler sayesinde kalıtımın temeli olan DNA ve DNA ürünü olan proteinlerin analizleri mümkün olmuştur. Taksonomide kullanılan karakterlerin tutarlı, güvenilir, her koşula göre değişmeyen özellikte olması istenir [2-4,78,79]. Bu nedenle bir çok durumda kullanılması en uygun karakter kalıtım materyalinin kendisi olan DNA molekülüdür. Bitki sistematiğinde kullanılan değişik DNA tabanlı analiz metodları bulunmaktadır [1,3,4,8]. RAPD-PZR tekniği de moleküler sistematik tekniklerin DNA temelli tekniklerinden biridir. Bitki sistematiği amaçlı yapılan çalışmalarda elde edilen verilerin filogenetik analizi farklı metodların kullanıldığı, değişik bilgisayar programlarıyla değerlendirilmektedir. Örneğin, bu çalışmalarda sıklıkla kullanılan PAUP (Phylogenetic Analysis Using Parsimony) 4.0d65(25) Macintosh Power PC 7600 programı ile Parsimoni [80], UPGMA (Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Means) [81-83], ve NJ (Neighbor-Joining) [84-85], analizleri kullanılarak filogenetik analizler yapılabilmektedir.

Bu derlemede bazı bitkilerdeki sistematik uygulamalarına örnekler verilen RAPD-PZR tekniği çalışılan genom hakkında ön bilgi gerektirmemesi, hızlı, ucuz, daha az laboratuvar aletleri ile gerçekleştirilebilmesi, etkili bir teknik olması ve verilerinin sistematikte kullanılabilirliği sayesinde birçok alanda olduğu gibi bitki sistematiği alanında geniş kullanım alanı bulmuştur. Bu teknik uygulanırken öncelikle her bitki taksonu için optimizasyonunun yapılması şarttır. Son yıllardaki çalışmalarda olduğu gibi, sistematik veya farklı amaçlarla yapılan çalışmalarda birden fazla moleküler teknik kullanılması, bitkinin tüm dizi analizinin mümkün olmadığı durumlarda daha anlamlıdır. Ayrıca çalışma, türlerin belirlenmesi amaçlı olduğunda bu karakterlerle morfolojik karakterlerin karşılaştırmalı analizlerine gidilmesi daha değerli sonuçlar vermektedir.

### KAYNAKÇA

- [1] Hillis, D. M., Moritz, C., Molecular Systematics, Sinauer Associates, Inc. Publishers, USA (1990)
- [2] Işık K., Karakter Kavramı ve Karakterlerin Genetik Temeli, Taksonomi Yaz Okulu Ders Notları, Ed. Dr. Çıplak B., Antalya, 7-13 Eylül, 74 (1997).
- [3] Quicke, D., L.J., Principles and Techniques of Contemporary Taxonomy, Blackie Academic & Professional, Glasgow, (1993).
- [4] Başbüyük, H. H., Bardakçı, F., Belshaw, R., Quicke, D. L. J., Phylogenetic Systematics, Önder Matbaa, Sivas, (2000).
- [5] Gottlieb, O.,R., Micromolecular Evolution, Systematics and Ecology, Springer-Verlag, Berlin, NewYork (1982).
- [6] Crawford D.J., Plant Molecular Systematics, John , Willey&Sons, New York, (1990).
- [7] Buth, D. G., "The Application of Electrophoretic Data In Systematic Studies", *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 15, 501-22 (1984).
- [8] Crawford, D. J., "Plant Macromolecular Systematics In The Past 50 Years: One View", *Taxon*, 49, 81-103 (2000).
- [9] Doyle, J.J. and Doyle J.L., DNA And higher plant systematics: Principles And Results: Molecular technics in taxonomy, ed.Hewitt et all., Springer-Verlag Berlin Heidelberg (1991).
- [10] Mullis, K., Faloona F., Scharf, S., Saiki R., Horn, G. and Erlich H., Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro: The Polymerase Chain Reaction., Cold Spring Harbour Symp Quant Biol 51: 263-273 (1986).



- [11] Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V., "DNA Polimorphism Amplified By Arbitrary Primers Are Useful As Genetic Markers", *Nucleic Acids Research*, Vol 18, 6531-6535 (1990).
- [12] Welsh, J., McClelland, M., "Fingerprinting Genomes Using PCR With Arbitrary Primers", *Nucleic Acids Research*, Vol 18, 7213-7218 (1990).
- [13] Caetano-Anolles, G., Bassam, B.J., Gresshoff, P.M., "High Resolution DNA Amplification Fingerprinting Using Very Short Arbitrary Oligonucleotide Primers", *Biotechnology* 9: 553-557 (1991).
- [14] <http://avery.nutgers.edu.WSSP> Students seniors project arenaves onions napa.html
- [15] Öz Aydın S. Bazı *Satureja* Türlerinin Morfolojik, Moleküler ve Sistemik Yönden Değerlendirilmesi, Doktora Tezi, Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Eğitimi Anabilim Dalı, Balıkesir, (2004).
- [16] Rafalski, A., Tingey, S.V., Williams, J.G.K., " (RAPD) markers", *Plant Molecular Biology Manual*, 114, (1994) 1-8.
- [17] Welsh, J., Petersen, C. And "Polimorphisms Generated By Arbitrarily Primed PCR In The Mouse: Application To Strain Identification And Genetic Mapping", *Nucleic Acids Research*, Vol 19, 303-306 (1991).
- [18] Mathieu-Daudé, F., Ralph D. and McClelland M., "Arbitrarily Primed PCR Fingerprints: Laboratory Methods for the Detection of Mutations and Polymorphisms in DNA", ed. Taylor, G. R., CRS Press, Boca Raton, (1997).

- [19] Halldén, C., Nilsson, N-O, Rading, IM and Sall T, "Evaluation of RFLP and RAPD Markers In A Comparison Of Brassica Napus Breeding Lines", *Theor Appl Genet* 88: 123-128 (1994).
- [20] Tingey, S.V., Del Tufa, J.P., "Genetic Analysis With Random Amplified Polimorphic DNA Markers", *Plant Physiol.* 101, 349-352 (1993).
- [21] Halldén, C., Characterization and Use of a Multiplex PCR-based System: Random Amplified Polymorphic DNA, Ph.D. Thesis, Department of Genetics Lund University, Lund, (1998).
- [22] Atienzar, F., Evenden, A., Jha, A., Savva, D. and Depledge M., "Optimized RAPD Analysis Generates High-Quality Genomic DNA Profiles at High Annealing Temperature" *BioTechniques* 28:52-54 (2000).
- [23] Demeke, T. and Adams R.P., "The Effects of Plant Polysaccharides and Buffer Additives on PCR" *BioFeedback* Vol. 12, No.3 (1992).
- [24] Khandka, D.K., Tuna, M., Tal, M., Nejidat, A., Goldhirsh, A.G., "Variability In The Pattern Of Random Amplified Polymorphic DNA", *Electrophoresis*, 18, 2852-2856 (1997).
- [25] Doulis, A.G., Harfouche, A.L., Aravanopoulos, F.A., "Rapid, High Quality DNA Isolation from Cypress (*Cupressus sempervirens* L.) Needles and Optimization of the RAPD Marker Technique " *Plant Molecular Biology Reporter* 17, 1-14 (2000).
- [26] Boiteux, L.S., Fonseca, M.E.N., Simon, " Effects of Plant Tissue and P.W., DNA Purification Method on Randomly Amplified Polymorphic DNA-Based Genetic Fingerprinting Analysis in Carrot", *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 124:1, 32-38 (1999).

- [27] Aljanabi, S.M., Forget, L., Dookun, A., "An Improved and Rapid Protocol for the Isolation of Polysaccharide and Polyphenol-Free Sugarcane ", *Plant Molecular Biology Reporter*, 17, 1-8 (1999).
- [28] Kohel, R.,J.; Park, Y., "Effect Of Concentration Of MgCl<sub>2</sub> On Random Amplified DNA" *BioTechniques*, 16:652-656
- [29] Halldén, C. And Sall, T., "Primer mixtures in RAPD analysis". Submitted to Genomics (In Press).
- [30] Halldén, C., Hansen, M., Nilsson, N-O, Hjerdin, A. and Sall T., "Competition as a of Errors in RAPD analysis", *Theor Appl Genet* 92: 1185-1192 (1996).
- [31] Weeden N.F., Timmerman G.M., Hermmat M., Hneen B.E. and Lodhi M.A., Inheritance and Reliability of RAPD markers, Proceedings of the symposium: Applications of RAPD Techology to Plant Breeding, pp:12-17, Minneapolis (1992).
- [32] Gallego, F. J. and Martínez, I., "Method to Improve Reliability of Random-Amplified Polymorphic DNA Markers", *BioTechniques*, 23:663-664 (1997).
- [33] Hansen, M., Halldén, C., Sall T., "Error rates and Polymorphism Frequencies For Three RAPD Protocols", *Plant Molecular Biology Reporter* 16: 139-146 (1998).
- [34] Doyle J.J. and Doyle J.L. "A Rapid DNA Isolation Procedure From Small Quantities Of Fresh Leaf Tissue" *Phytochem Bull* 19:11-15(1987).
- [35] Dellaporta, S. L., Wood, J., Hicks, J.B., "A Plant DNA Mini Preparation Version II", *Plant Molecular Biology Reporter*, Voll 1, pp:19 (1983).

- [36] Saghai-Marooif, M.,A., Soliman, K.,M., Jorgensen, R.,A., And Allard, R., W., "Ribosomal DNA Spacer-Length Polymorphisms In Barley: Mendelian Inheritance, Chromosomal Location and Population Dynamics", *Population Biology*, 81, 8014-8018 (1984).
- [37] Krishna, T.G.and Jawali, N., "DNA Isolation from Single or Half Seeds Suitable for Random Amplified Polymorphic DNA", *Analyses Analytical Biochemistry*, 250, 125-127 (1997).
- [38] Stewart C.N., Via I.e., " A rapid CTAB DNA Isolation Technique Useful For RAPD Fingerprinting And Other PCR Applications", *BioTechniques* 14:4, 748-749 (1993).
- [39] Pich, U. And Schubert, I., Minipep Method For Isolation Of DNA From Plants With A High Contentof Polyfenols ",*Nüc. Acid. Res.*,21, 3328 (1993).
- [40] Khanuja, S.P.S.,Shasany, A.K., Darokar, M.P., Kumar, S., "Rapid Isolation of DNA from Dry and Fresh Samples of plants Producing Large Amount of Secondary Metabolites and Essantial oils", *Plant Molecular biology Reporter, Protocols*-17 (1999).
- [41] Do N. and Adams R.P. "A Simple Technique For Removing Plant Polysaccharide Contaminants From DNA" *BioTechniques* 10: 163–166(1991).
- [42] Weishing,K., Nybom H.,Wolff ,K. and Meyer ,W., "DNA Isolation And Purification. In: DNA Fingerprinting In Plants And Fungi", pp 44-59. CRC Press, Boca Raton, Florida (1995).
- [43] Loomis MD, "Overcoming Problems Of Fhenolics And Quinones In Isolation Of Plant Enzymes And Organelles", *Methods Enzymol* 31: 528-544 (1974).

- [44] Porebski S., Bailey L.G. and Baum B.R., "Modification of a CTAB DNA Extraction Protokol For Plants Containing High Polysaccharide And Polyphenol Components", *Plant Mol. Biol. Repr.* 15:8-15(1997).
- [45] Williams, J.G.K., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V., "Genetic Analysis Using RAPD Markers", *Methods Enzymol*, 218:704-740(1993).
- [46] Southern, E.M., "Detection Of Specific Sequences Among DNA Fragments Separated By Gej Electrophoresis", *J.Mol.Biol.*98:503-517(1975)
- [47] Zabeau M. And Vos, P., Selective Restriction Fragment Amplification: A General Method For DNA Fingerprinting European Patent Application EP 534858A1 (1993).
- [48] Vos, P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., Van De Lee T., Homes M.,Frijeters A., Pot J., Kulper M., Zabeau M., "AFLP: A new technique for DNA fingerprinting", *Nucl. Acids Res.*23: 4407-4414(1995).
- [49] Payne S.J., *Microsatellite Analysis: Laboratory Methods for the Detection of Mutations and Polymorphisms in DNA*, ed. Taylor, G. R., CRS Press, Boca Raton, (1997).
- [50] Zietkiewicz E, Rafalski A and Labuda D., "Genome Fingerprinting By Simple Sequence Repeat (SSR)-Anchored Polymerase Chain Reaction Amplification" *Genomics* 20,176-183 (1994).
- [51] Orita, M., Ivahana, H., Kazanawa,H., Hayashi, K. And Sekiya, T., *Proc.Natl.Acad.Sci., USA* 86, 2766-2770 (1989).
- [52] Myers, R.M., Sheffied, V.C., Cox, D.R., "Mutation Detection By PCR, GC-Clamps and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, in *PCR Tecnology Prenciples And*

- Applications for DNA Amplification", Academic Press Inc., USA(1987).
- [53] Konieczyn A., Ausubel F.A., "A Procedure For Mapping Arabidopsis Mutation Using Co-Dominant Acotype-Specific PCR-based markers", *Plant J.*, 4:403-410 (1993).
- [54] Paran, I., Michelmore, R.W., "Development of Reliable PCR-Based Markers Linked To Downy Mildew Resistance Genes In Lettuce", *Theor Appl Genet* 85: 985-993 (1993).
- [55] Glick B.R., Pasternak J.J., *Molecular Biotechnology (Principles and Applications of Recombinant DNA)*, ASM Press., Washington, D.C., (1998).
- [56] Khanuja, S.P.S., Shasany, A.K., Srivastava, A., Kumar, S., "Assessment of Genetic Relationships In Mentha Species" *Euphytica*, 111, 121,125 (2000).
- [57] Hosokawa, K., Minami, Kawahara, K., Nakamura, I., Shibata, T., "Discrimination Among Three Species of Medicinal Scutellaria Plants Using RAPD Markers", *Planta Medica*, 66, 270-272 (2000).
- [58] M, Sun, "Cleistogamy in Scutellaria indica (Labiatae): Effective Mating System and Population Genetic Structure", *Molecular Ecology*, 8(8), 1285-95 (1999).
- [59] Gauer, L., Cavalli-Molina, S., "Genetic Variation In Natural Populations Of Mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil., Aquifoliaceae) Using RAPD Marker", *Heredity*, 84, 647-656 (2000).
- [60] Cullis, C. A., Swami, S., and Song, Y., "RAPD Polymorphisms Detected Among The Flax Genotrophs", *Plant Molecular Biology*, 41, 795-800 (1999).

- [61] Kennington, W. J., Waycott, M., and James, S. H., "DNA Fingerprinting Supports Notions Of Clonality İn A Rare Mallee, *Eucalyptus argutifolia*", *Molecular Ecology*, 5, (1996) 693-696.
- [62] Skepner, Adam, P., K., Krane, Dan.E., "RAPD Reveals Genetic Similarity Of *Acer saccharum* and *Acer nigrum*", *Heredity*, 80(4), 422-428 (1998).
- [63] Fischer, M., Husı, R., Prati, D., Peintinger, M., Kleunen, M. and Schmid, B., "RAPD Variation Among And Within Small And Large Populations Of The Rare Clonal Plant *Ranunculus reptans* (Ranunculaceae) ", *American Journal of Botany* 87(8), 1128-1137 (2000).
- [64] Drouzas, A.D., Aravanopoulos, F.A., Panetsos, K.P., " RAPD Variation Of A Natural Hibrid Population Among *Pinus brutia* Ten. And *P.halepensis* Mill." *Mytilene Pine and Cedars*, 77 (2000).
- [65] Ağaoğlu, Y.S., Ergül, A., "Identification of some Turkish Table Grape Cultivars (*Vitis vinifera* L.)by Random Amplified Polimorphic DNA (RAPD) ", *Plants of the Balkan Peninsula: into the next Millennium*, Volume-II, 147-154 (2001).
- [66] Martin, J., P., Bermejo, H., Esteban, J., "Genetic Variation İn The Endemic and Endangered *Rosmarinus tomentosus* Huber-Morath & Maire (Labiatae) Using RAPD Markers", *Heredity*, 85(5), 434-443 (2000).
- [67] Harfouche, A.L., Aravanopoulos, F.A, Doulis, A.G., Xenopoulos, S., " Identification of RAPD Markers Associated With Crown Form İn *Cupressus sempervirens* By Bulk Segregant Analysis ", *Forest Genetics* 7(3), 171-178 (2000).

- [68] Nocelli, E., Giovannini, T., Bioni, M., and Alicchio, R., "RFLP- and RAPD- Based Genetic Relationships Of Seven Diploid Species Of Avena With The A Genome", *Genome* 42, 950-959 (1999).
- [69] Saliba-Colombani, V., Causse, M., Gervais, L., and Philouze, J., "Efficiency of RFLP, RAPD, and AFLP Markers For The Construction Of An Intraspecific Map Of The Tomato Genome", *Genome* 43, 29-40 (2000).
- [70] Dalbo, M. A., Ye, G. N., Weeden, N. F., Steinkellner, H., Sefc, K. M., and Reisch, B. I., "A Gene Controlling Sex In Grapevines Placed On A Molecular Marker-Based Genetic Map", *Genome* 43, 333-340 (2000).
- [71] Laroche, A., Demeke, T., Gaudet, D. A., Puchalski, B., Frick, M., and McKenzie, R., "Development of a PCR Marker For Rapid Identification Of The Bt-10 Gene For Common Bunt Resistance In Wheat", *Genome* 43, 217-223 (2000).
- [72] Persson, H.A., Gustavsson, B.A., "The Extent Of Clonality And Genetic Diversity In Lingonberry (*Vaccinium vitis-ideae* L.) Revealed By RAPDs And Leaf-Shape Analysis " *Molecular Ecology* 10,1385-1397 (2001).
- [73] Gourmet, C., Rayburn, A.Lane, "Identification of RAPD Markers Associated With The Presence Of B Chromosomes In Maize", *Heredity*, 77(3), 240-244 (1996).
- [74] Kohjyouma, M., Nakajima, S., Namer, A., Shimizu, R., Mizukami, H. And Kohda, H., "Random Amplified Polymorphic DNA Analysis and Variation of Essential Oil Components of *Atractylodes* Plant", *Biol. Pharm. Bull.* 20(5), 502-506 (1997).
- [75] D'Ennequin, M.L.T., Panaud, O., Robert, T., Ricroch, A., "Assesment of genetic relationships among sexual and



- asexual forms of *Allium cepa* using morphological traits and RAPD markers", *Heredity*, 78(4), 403-409 (1997).
- [76] Esselman, E., J., Crawford, D., J., Brauner, S., Stuessy, T., F., Anderson, G., J., and O., M., S., "RAPD Marker Diversity Within And Divergence Among Species Of *Dendroseris* (Asteraceae: Lactuceae) ", *Botanical Society of America*, 87, 591-596 (2000).
- [77] Klug, W. S., Cummings, M. R., Çev. Öner, C., Genetik, Palme Yayıncılık, Ankara (2002).
- [78] Mayr, E. And Ashlock, P.D. Principles of Systematic Zoology. McGraw-Hill, Inc., New York, London, 475, (1991).
- [79] Özkan, M. Taksonominin Prensipleri, Atatürk Üniv. Fen-Ed. Fak. Yayın no:45, Erzurum 137 (1988).
- [80] Swofford, D.L., Phylogenetic Analysis Using Parsimony (PAUP), Version 3.0. Illinois Natural History Survey, Urbana, 178 (1990).
- [81] Sokal, R.R., Michener, "A Statistical Method For Evaluating Systematic Relationships" *University of Kansas Science Bulletin*, 38:1409-1438(1958).
- [82] Panchen A L, Classification Evolution and the Nature of Biology ,Cambridge University Press, USA(1992).
- [83] Wen-Hsiung Li, Molecular Evolution, Sinauer Associates, Inc, Canada (1997).
- [84] Saitou, N. and M. Nei, "The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees", *Mol. Biol. Evol.* 4:406-425 (1987).

- [85] Hartl D.L. and Clark A.G., Principles of Population Genetics, Sinauer Associates, Inc., Canada (1997).

## **RAPD (RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA) MARKERS AND PLANT SYSTEMATICS**

**S. ÖZ AYDIN**

*Abstract.* RAPD (Randomly Amplified Polimorphic DNA) is a PCR based method to detect genetic polymorphism. The major advantages of RAPD include: no need for prior knowledge of genom sequence in polymorphism studies, large amount of DNA of high purity, Southern blot or radioactive chemicals. Furthermore, the technique is speed and low cost. RAPD technique is being succesfully used widely for the estimation of genetic variability in various plant species.

**Keywords:** RAPD-PCR, Plant Systematics

Balıkesir Üniversitesi Necatibey Eğitim Fakültesi, Fen Bilgisi Öğrt.  
ABD Balıkesir, Türkiye  
soz@balikesir.edu.tr