T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

UYUŞTURUCU TİPİ KENEVİR GENOTİPLERİNİN RAPD-PCR METODU İLE KARAKTERİZASYONU VE KULLANILAN İSTATİSTİKİ YÖNTEMLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Emine PINARKARA

YÜKSEK LİSANS TEZİ
ZOOTEKNİ ANA BİLİM DALI

KONYA, 2007

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

UYUŞTURUCU TİPİ KENEVİR GENOTİPLERİNİN RAPD-PCR METODU İLE KARAKTERİZASYONU VE KULLANILAN İSTATİSTİKİ YÖNTEMLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Emine PINARKARA

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Zootekni Ana Bilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Seyit Ali KAYIŞ

2007**, Sayfa:** 103

Jüri: Yrd. Doç. Dr. Seyit Ali KAYIŞ

Prof. Dr. Saim BOZTEPE

Yrd. Doç. Dr. Erdoğan Eşref HAKKI

Bu çalışmada, Türkiye'nin farklı coğrafik bölgelerinden kaçak ekimler sonucu ele geçirilerek, İstanbul Adli Tıp Kurumu tarafından fakültemize teslim edilen kenevir tohumları arasında akrabalık bulunup bulunmadığı RAPD dominant markörleri kullanılarak araştırılmıştır. Dominant markörlerin istatistiki analizlerinde kullanılan temel koordinatlar analizi, kümeleme analizi, kümelerin güven sınırları, Mantel testi ve Nei ve Li genetik mesafesi tanıtılmış ve elde edilen veriler üzerinde bu metotlar uygulanmıştır.

Bu çalışmada 29 kenevir aksesyonu sera saksı ortamında DNA izolasyonu için yaprak örnekleri alınıncaya kadar yetiştirilmiştir. Moleküler genetik çalışmalarda tek birey DNA (SET1) ve bulk DNA (SET2) setleri kullanılmıştır. PCR amplifikasyonları sonucunda SET1'de 264, SET2'de 241 DNA bantı skorlanmıştır. Elde edilen verilerin istatistiki analizleri sonucunda SET1'de kullanılan aksesyonlar arasında belirgin bir gruplaşma gözlenmemiştir. SET2'de ise ülkemizin batısındaki illerden elde edilen kenevir aksesyonları ile, doğusundaki illerden elde edilen kenevir aksesyonlarının iki farklı grup oluşturduğu gözlenmiştir.

ANAHTAR KELİMELER: Kenevir, RAPD-PCR, Temel Koordinatlar Analizi, Kümeleme Analizi, Mantel test, Nei ve Li Genetik Mesafesi

ABSTRACT

Masters Thesis

CHARACTERIZATION OF DRUG-TYPE CANNABIS GENOTYPES VIA RAPD-PCR AND EVALUATION OF STATISTICAL METHODS IN USE

Emine PINARKARA

Selcuk University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Animal Science

Supervisor: Asist. Prof. Dr. Seyit Ali KAYIŞ

2007**, Pages:** 103

Jury: Asist. Prof. Dr. Seyit Ali KAYIŞ

Prof. Dr. Saim BOZTEPE

Asist. Prof. Dr. Erdoğan Eşref HAKKI

In this study, *Cannabis Sativa* L. accessions which were seized from different parts of Turkey were used. The Istanbul forensic institute provided the *Cannabis* accessions, which used in this study. Aim of the study was to determine genetic relatedness between the accessions. For this purpose dominant markers (RAPD) were employed. In addition, statistical methods (such as principal coordinate analysis, cluster analysis, bootstraps Mantel test, and Nei and Li genetic distance), which are used in the analysis of dominant markers, were evaluated and employed in the analysis of *Cannabis* data.

In this study 29 *Cannabis* accessions were grown in the green house conditions untill DNA extraction material obtained. In the molecular study, single *Cannabis* accession (SET1) and bulk of accessions of the same genotype (SET2) were used. PCR amplifications produced 264 markers in SET1 and 241 markers in SET2. Analysis of SET1 data did not show a separation between the accessions. On the other hand, when the SET2 data were analysed, *Cannabis* accessions were clearly separated into two main groups, one of which made up of *Cannabis* accessions which were seized from eastern part of Turkey while the other group was made up of *Cannabis* accessions which were seized from western part of Turkey.

KEY WORDS: *Cannabis Sativa* L., RAPD-PCR, Principal Coordinate Analysis, Cluster Analysis, Mantel test, Nei and Li Genetic Distance

ÖNSÖZ

Moleküler markör teknikleri genetik potansiyelin belirlenmesinde, canlıların genetik yapılarının araştırılmasında son yıllarda dünyada yaygın olarak kullanılmasına karşın, ülkemizde bu tür teknikler yeni yeni kullanılmaya başlanmıştır. Dolayısıyla markör teknikleri kullanılarak yapılan çalışmalarda elde edilen verilerin istatistiki analizlerinde hangi yöntemlerin kullanılması gerektiğiyle ilgili sorunlar da gündeme gelmeye başlamıştır.

Bu çalışmada RAPD moleküler markör tekniğinden yararlanılmış, elde edilen verilerin analizlerinde kullanılan bazı istatistiki analiz yöntemleri tanıtılmış ve değerlendirilmiştir.

Bana bu konuda çalışma imkanı sunan, tez çalışmam sırasında bilgi ve deneyimleri ile bana öncülük eden, çalışmalarımı büyük bir titizlikle yürüten tez danışmanım Sayın Yrd. Doç. Dr. Seyit Ali KAYIŞ'a (Selçuk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Zootekni Bölümü), bu araştırmanın planlanıp yürütülmesinde ve moleküler genetik çalışmalarda desteğini, bilgisini ve imkanlarını esirgemeyen Sayın Yrd. Doç. Dr. Erdoğan Eşref HAKKI'ya (Selçuk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü), çalışma materyalinin temin edilmesinde yardımcı olan Sayın Ayla SAĞ'a (İstanbul Üniversitesi, Adli Tıp Enstitüsü), laboratuar çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen Zeynep ÖZBEK (Biyoloji Öğretmeni), Deniz SARAÇOĞLU (Biyoloji Öğretmeni), Nuri KESEN (Biyoloji Öğretmeni), Arş. Gör. Emine ATALAY (Selçuk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü) ve laboratuarda çalışan diğer arkadaşlarıma ve özellikle sabır ve özveriyle daima yanımda olan aileme teşekkürlerimi sunarım.

Bu araştırmayı bir proje ile destekleyen Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne (S. Ü. BAP) çok teşekkür ederim.

KONYA, 2007 **Emine PINARKARA**

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖZET i
ABSTRACT ii
ÖNSÖZ iii
İÇİNDEKİLER iv
ŞEKİL LİSTESİ viii
ÇİZELGE LİSTESİ x
SİMGELER VE KISALTMALAR xi
1. GİRİŞ 1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI 4
2.1. Kenevir Bitkisi Hakkında Bilgi 4
2.2. Kenevir Ve Esrar 5
2.3. Kriminal Olayları Aydınlatma Metotları 7
2.4. Genetik Markör 8
2.4.1. Genetik markör çeşitleri 9
2.4.1.1. Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) 10
3. MATERYAL VE METOD 13
3.1. Materyal 13
3.2. Metot 14
3.2.1. Sera çalışmaları 14
3.2.1.1. Tohumların çimlendirilmesi ve DNA örneklerinin alınması 16
3.2.2. Moleküler genetik çalışmalar 16
3.2.2.1. Sterilizasyon 16
3.2.2.2. DNA izolasyonu 17
3.2.2.3. DNA konsantrasyonu ve saflıklarının belirlenmesi 20
3.2.2.4. Primer seçimi ve konsantrasyonu 21
3.2.2.5. Magnezyum (Mg^{+2}) konsantrasyonu 22
3.2.2.6. Deoksiribonükleozid tri fosfatlar (dNTP) konsantrasyonu 23

3.2.2.7. *Taq* DNA polimeraz konsantrasyonu 23
3.2.2.8. 10X *Taq* DNA polimeraz tamponu 24
3.2.2.9. PCR Uygulamaları 24
3.2.2.9.1. RAPD PCR koşullarının optimizasyonu 29
3.2.2.10. Elektroforez uygulamaları 30
3.2.2.10.1. Tris-borik asit-EDTA (TBE) elektrolit çözeltisi 30
3.2.2.10.2. % 2'lik agaroz jelin hazırlanması ve jel tepsisine dökülmesi 31
3.2.2.10.3. PCR ürünlerinin agaroz jele yüklenmesi 32
3.2.2.10.4. PCR ürünlerinin agaroz jelde yürütülmesi 33
3.2.2.10.5. Agaroz jelin görüntülenmesi ve RAPD bantlarının elde edilmesi 34
3.2.2.10.6. İstatistiki analizlerde kullanılacak verilerin elde edilmesi 34
3.2.3. İstatistiki analiz metotları 35
3.2.3.1. Temel koordinatlar analizi (Principal Coordinate Analysis) 35
3.2.3.2. Kümeleme analizi (Cluster Analysis-UPGMA) 37
3.2.3.3. Kümelerin güven sınırları (Bootstrap) 38
3.2.3.4. Benzerlik/farklılık matrislerinin karşılaştırılmasında Mantel Z test 39
3.2.3.5. Nei ve Li genetik benzerlik, genetik mesafesi 40
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA 41
4.1. Moleküler Genetik Çalışmalara Ait Sonuçlar 41
4.1.1. DNA izolasyonu sonuçları 41
4.1.2. RAPD amplifikasyon sonuçları 42
4.1.3. İstatistiki analiz sonuçları 47
4.1.3.1. Temel koordinatlar analizi sonuçları 47
4.1.3.2. Kümeleme analizi sonuçları 52
4.1.3.3. Kümelerin güven sınırları sonuçları 57
4.1.3.4. Benzerlik/farklılık matrislerinin karşılaştırılmasında Mantel Z testi sonuçları 60
4.1.3.5. Nei ve Li genetik benzerlik, genetik mesafe sonuçları 62
5. SONUÇ VE ÖNERİLER 67
6.KAYNAKLAR 70

EKLER 74
EK-A Kenevir bitkisinin morfolojisi ve çalışma materyalinin yetiştirilmesi 74
EK-A.1 Kenevir tohumları 74
EK-A.2 Çalışma materyalinin yetiştirildiği sera 74
EK-A.3 Çimlenmiş bir kenevir bitkisi ve çalışmada kullanılan materyale ait örnekler 75
EK-A.4 Erkek ve dişi kenevir bitkileri 76
EK-A.5 Kenevir bitkisinde erkek, dişi çiçek ve erkek, dişi organ 76
EK-B 2X CTAB metodu ile yapılan DNA izolasyonu aşamaları 77
EK-C Elektroforez uygulamaları 79
EK-C.1 Agaroz jel dökmek için hazırlanmış jel tepsisi 79
EK-C.2 PCR ürünlerinin agaroz jeldeki yuvalara yüklenmesi 79
EK-C.3 Xylene cyanol FF, bromofenol blue ve agaroz jelde takibi 79
EK-D Çalışmada kullanılan cihazlar 80
EK-D.1 Spektrofotometre ve PCR cihazı 80
EK-D.2 Elektroforez cihazı ve güç kaynağı 80
EK-D.3 Jel görüntüleme sistemi 80
EK-E DNA konsantrasyonu spektrofotometre okuma sonuçları 81
EK-F Çalışmada elde edilen bazı RAPD-PCR jel görüntüleri 91
EK-F.1 RAPD L2 primerinin kenevir aksesyonlarında oluşturduğu DNA bantları .. 91
EK-F.2 RAPD L3 primerinin kenevir aksesyonlarında oluşturduğu DNA bantları .. 92
EK-F.3 RAPD L6 primerinin kenevir aksesyonlarında oluşturduğu DNA bantları .. 93
EK-F.4 RAPD B1 primerinin kenevir aksesyonlarında oluşturduğu DNA bantları .. 94
EK-F.5 RAPD B2 primerinin kenevir aksesyonlarında oluşturduğu DNA bantları .. 95
EK-F.6 RAPD B3 primerinin kenevir aksesyonlarında oluşturduğu DNA bantları .. 96
EK-F.7 RAPD B4 primerinin kenevir aksesyonlarında oluşturduğu DNA bantları .. 97
EK-F.8 RAPD B5 primerinin kenevir aksesyonlarında oluşturduğu DNA bantları .. 98
EK-F.9 RAPD B6 primerinin kenevir aksesyonlarında oluşturduğu DNA bantları .. 99
EK-F.10 RAPD B8 primerinin kenevir aksesyonlarında oluşturduğu DNA bantları 100

EK-G Çalışmada kullanılan kenevir tohumlarının ele geçirildiği illerin Türkiye Haritası üzerinde gösterilmesi 101
ÖZGEÇMİŞ 102

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1 Genetik markör çeşitleri 9

Şekil 3.1 PCR çalışmasının aşamaları 25

Şekil 3.2 PCR çalışmasında DNA amplifikasyonu 27

Şekil 3.3 *EcoR*I ve *Hind*III restriksiyon enzimleriyle kesilmiş λ DNA, molekül ağırlığı ve yüzdesi 33

Şekil 4.1 Çalışmada kullanılan örneklerin DNA jel görüntüleri 42

Şekil 4.2 RAPD L4 primerinin kenevir aksesyonlarında oluşturduğu DNA bantları 46

Şekil 4.3 SET2'deki 29 kenevir aksesyonunun SM katsayısı kullanılarak elde edilmiş 1. ve 2. temel koordinat eksenleri üzerinde dağılımı 48

Şekil 4.4 SET2'deki 29 kenevir aksesyonunun J katsayısı kullanılarak elde edilmiş 1.ve 2. temel koordinat eksenleri üzerinde dağılımı 49

Şekil 4.5 SET1'deki 29 kenevir aksesyonunun SM katsayısı kullanılarak elde edilmiş 1. ve 2. temel koordinat eksenleri üzerinde dağılımı 50

Şekil 4.6 SET1'deki 29 kenevir aksesyonunun J katsayısı kullanılarak elde edilmiş 1. ve 2. temel koordinat eksenleri üzerinde dağılımı 51

Şekil 4.7 SET2'deki 29 kenevir aksesyonunun SM katsayısı kullanılarak elde edilmiş UPGMA dendogram 53

Şekil 4.8 SET2'deki 29 kenevir aksesyonunun J katsayısı kullanılarak elde edilmiş UPGMA dendogram 54

Şekil 4.9 SET1'deki 29 kenevir aksesyonunun SM katsayısı kullanılarak elde edilmiş UPGMA dendogram 55

Şekil 4.10 SET1'deki 29 kenevir aksesyonunun J katsayısı kullanılarak elde edilmiş UPGMA dendogram 56

Şekil 4.11 SM katsayısı kullanılarak elde edilen SET2'ye ait güven sınırları sonuçları 58

Şekil 4.12 J katsayısı kullanılarak elde edilen SET2'ye ait güven sınırları

sonuçları 59
Şekil 4.13 SM katsayısı kullanılarak elde edilen SET1 ve SET2'ye ait Mantel testi grafiği 61
Şekil 4.14 J katsayısı kullanılarak elde edilen SET1 ve SET2'ye ait Mantel testi grafiği 61
Şekil 4.15 SM ve J katsayıları kullanılarak elde edilen SET2'ye ait Mantel testi grafiği 62

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa No

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan kenevir tohumlarına ait bilgiler 14
Çizelge 3.2 Çalışmada kullanılan toprak örneğinin bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri 15
Çizelge 3.3 2X CTAB (125 ml) stok çözeltisinin hazırlanmasında kullanılan kimyasal maddeler ve miktarları 17
Çizelge 3.4 Çalışmada kullanılan primerler, primer sekansları, G+C (%) oranları ile T_m ve yapışma sıcaklıkları (melting ve annealing temperature, °C)..... 22
Çizelge 3.5 PCR çalışmasında kullanılan kimyasallar ve miktarları 27
Çizelge 3.6 10X TBE (1litre) stok çözeltisinin hazırlanmasında kullanılan kimyasal maddeler ve miktarları 31
Çizelge 3.7 6X yükleme boyası hazırlamada kullanılan kimyasallar ve oranları 32
Çizelge 3.8 Veri matrisi 35
Çizelge 4.1 Çalışmada kullanılan aksesyonlara ait DNA izolasyon sayıları 41
Çizelge 4.2 Moleküler genetik çalışmalarda kullanılan primerlere ve RAPD-PCR amplifikasyonlarına ait bilgiler 45
Çizelge 4.3 SET1'e ait 29 kenevir aksesyonun oluşturduğu genetik mesafe matrisi ... 64
Çizelge 4.4 SET2'ye ait 29 kenevir aksesyonun oluşturduğu genetik mesafe matrisi . 65

SİMGELER VE KISALTMALAR

Δ^9 THC	Delta-9-tetrahydrocannabinol
µl	Mikrolitre
a	Vektör
A	Adenin
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism-Çoğaltılmış Parça Uzunluğu Farklılığı
AMOVA	Moleküler Varyans Analizi
bp	Base pair-Baz çifti
C	Sitozin
CBD	Cannabidiol
CBN	Cannabinol
CBNS	Cannabinol asidi
cm	Santimetre
CTAB	Cetil Three Metil Amonyum Bromid
ddH_2O	Distile-Deiyonize Su
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleikasit
dNTP	Deoksiribonükleotidtrifosfat
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
g	Gram
G	Guanin
ISSR	Inter Simple Sequence Repeat-İç Basit Dizi Tekrarları
J	Jaccard
M	Molar
m	Metre
$MgCl_2$	Magnezyum klorür
ml	Mililitre
mM	Milimolar

MXCOMP	Matrix Comparison Plot
ng	Nanogram
nm	Nanometre
NTSYS	Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System-Sayısal Taksonomi ve Çok Değişkenli Analiz Sistemi
^{o}C	Santigrat derece
OD	Optic Density-Optik Yoğunluk
PCR	Polymerase Chain Reaction-Polimeraz Zincir Reaksiyonu
pmol	Pikomol
r	Skalar
RAPD	Randomly Amplified Polymorphic DNA-Rasgele Çoğaltılmış DNA Farklılığı
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism-Kısıtlanmış Parça Uzunluğu Farklılığı
rpm	Rotation Per Minute-Dakikadaki Devir Sayısı
SM	Simple Matching
SSR	Simple Sequence Repeat-Basit Dizi Tekrarları
STR	Short Tandem Repeat
T	Timin
Taq	*Thermus aquaticus*
TBE	Tris-Borik asit-EDTA
THCS	Tetrahiydrocannabinol asidi
TKo	Temel Koordinatlar
TKoA	Temel Koordinatlar Analizi
T_m	Melting Temperature-Erime Sıcaklığı
U	unit-ünite
UPGMA	Unweighted Pair-Groups Method Using Arithmetic Averages
$\mathbf{X}_{n\times m}$	n satırlı m sütunlu matris
µg	Mikrogram

1. GİRİŞ

Kenevir bitkisinin (*Cannabis sativa* L.) bugün dünyanın hemen her tarafında yüzlerce çeşidi bulunmakla beraber ilk çıkış noktasının 10.000 yıl kadar önce Orta Asya olduğu tahmin edilmektedir (Shirota ve ark., 1998; Jagadish ve ark., 1996).

Kenevir, günümüzde çoğunlukla sıcak iklim bölgelerinde yetiştirilmekle birlikte, tropikal bölgelerde de geniş alanlarda ekimi yapılan bir bitkidir. Asya ve Avrupa'da gerek lifleri ve tohum yağları, gerekse ilaç ve keyif verici madde olarak antik çağlardan beri yetiştirilmektedir. Afrika'da da yaygınlaşmıştır (Faeti ve ark., 1996). Saplarından lif, tohumlarından yağ elde edilmekle birlikte, endüstride, ilaç, sabun ve kozmetik sanayisinde kenevir hammadde olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte ağır metal bakımından kirli alanların temizlenmesinde (fitoremediasyon) kullanılıp kullanılmayacağı ile ilgili çalışmalar yapılmış olup (Linger ve ark. 2002), bitkinin yaprak, tohum gibi kısımlarında Ni, Pb, Cd, Cu, Zn gibi çeşitli ağır metalleri biriktirme özelliğinin de olduğu tespit edilmiştir.

Yukarıda sayılan ekonomik özelliklerin yanında, dişi kenevir bitkilerinde çiçeklenme sırasında çiçek ön yapraklarında esrar teşekkül etmekte ve bu esrar maddeleri uyuşturucu ve keyif verici olarak kullanılmaktadır. İlave olarak, yapraklarından ve çiçekli kısımlarının kurutulmuş ve ufalanmış karışımından elde edilen marihuana (marijuana) da uyuşturucu ve keyif verici olarak kullanılmaktadır. Yapılan araştırmalar esrarın psikoaktif maddesinin Delta-9-tetrahydrocannabinol (Δ^9 THC) olduğunu göstermiştir. Esrardan izole edilen maddeler ayrı ayrı kontrol edilmiş, yalnız tetrahydrocannabinol (THC) fraksiyonunun kişilerde esrar ve marihuana gibi etki yaptığı anlaşılmıştır (Ekiz ve ark. 1989).

Endüstriyel özelliklere sahip olan kenevir bitkisi yüzyıllarca lif kaynağı olarak kullanılmış olmasına rağmen, uyuşturucu üretme potansiyelinden dolayı Kuzey Amerika ülkeleri ile beraber Türkiye'de de ekimi yasaklanmış, bazı Avrupa ülkelerinde ise sınırlandırılmıştır. Türkiye'de kenevire bağlı olarak uyuşturucu

madde üretiminin önlenmesi amacıyla kenevir ekimi yapılacak bölgelerin tespiti, ekimlerin izine bağlanması, gerekli kontrollerin yapılması ve izinsiz ekimlere yapılacak olan işlemlere ait usul ve esasları belirlemek amacıyla Tarım ve Köyişleri Bakanlığı tarafından 21.10.1990 tarih ve 20672 sayılı yönetmelik Resmi Gazete'de yayımlanarak yürürlüğe girmiştir (Anonim, 2007).

Türkiye'de kenevir ekimi yasak (ya da sınırlandırılmış) olmasına rağmen, keyif verici özelliğinden dolayı oldukça geniş alanlarda yasal olmayan yollardan bitkinin üretimi gerçekleştirilmektedir. Dolayısıyla güvenlik birimleri bu kişi ya da kuruluşlarla mücadele etmekte, adli birimler de yasal olmayan yollardan üretim yapan bu kişilerle ilgili kanuni yaptırımları uygulamaya çalışmaktadır. Adli tıp kurumlarının, bu yasal olmayan yollardan üretim yapan kişilerin birbirleri ile ilişkilerini, yakalanan kenevir bitkileri arasındaki genetik ilişkiye bağlı olarak tespit etme olanakları mevcuttur. Bu amaçla da günümüz teknolojilerinden faydalanma yolları aranmaktadır. İstanbul Adli Tıp Kurumu bu çerçevede Türkiye'nin farklı coğrafik bölgelerinden kaçak ekimler sonucu ele geçirilen kenevir tohumlarını Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi'ne teslim etmiş ve kenevir tohumları arasında akrabalık bulunup bulunmadığının moleküler teknolojiler kullanılarak tespit edilmesi için bu proje hayata geçirilmiştir.

Moleküler teknolojilerdeki gelişmeler, canlıların yapılarındaki ilişkileri (benzerlikleri) ve farklılıkları DNA düzeyinde tespit etme imkanı sunmaktadır. Son yıllarda bu ve buna benzer çalışmalarda türlerin ve varyetelerin genetik akrabalıklarının değerlendirilmesinde moleküler teknolojilerden yararlanma yoluna gidilmiş, bu amaçla DNA sekanslarında yer alan polimorfizmin belirlenmesi için Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP-Kısıtlanmış Parça Uzunluğu Farklılığı), Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD-Rasgele Çoğaltılmış DNA Farklılığı), Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP-Çoğaltılmış Parça Uzunluğu Farklılığı), Simple Sequence Repeat (SSR-Basit Dizi Tekrarları) ve Inter Simple Sequence Repeat (ISSR-İç Basit Dizi Tekrarları) gibi çeşitli DNA markör teknikleri kullanılmaya başlanmıştır.

Bu çalışmada Türkiye'nin farklı coğrafik bölgelerinden kaçak ekimler sonucu ele geçirilerek, İstanbul Adli Tıp Kurumu tarafından Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi'ne teslim edilen kenevir tohumları arasında akrabalık bulunup bulunmadığının RAPD markörleri kullanılarak tespit edilebilirliğinin belirlenmesi ve akrabalıkların belirlenmesinde kullanılan istatistiki metotların ve paket programların değerlendirilmesi ve tanıtılması amaçlanmıştır. Ele geçirilen kaçak ekim numunelerinin birbiri ile bağlantılarının bulunup bulunmadığının (uyuşturucu trafiğinin takip edilmesi kapsamında adli kriminolojiye yardımcı bilgi sağlaması amacıyla) belirlenmesi adli botaniğe ve dolayısıyla suç unsuru taşıyan eylemlerin aydınlatılmasında kullanılmak üzere güvenlik güçlerine önemli ipuçları sağlayacağı düşünülmektedir. Farklı yerlerde, farklı kişilerde ele geçirilen kenevir ya da esrarın aynı kaynağa mı ait olduğunun cevabı bulunmaya çalışılmaktadır. Ayrıca Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi'nde daha sonra yürütülecek olan kenevirle ilgili moleküler biyolojik ve genetik çalışmalara ön bilgi sağlamaktadır.

Bu tez beş bölümden oluşmaktadır. Bu bölümde çalışmanın konusu ve amacı hakkında bilgi, ikinci bölümde kenevir bitkisi ve moleküler tekniklerin adli tıp konusunda kullanımı ile ilgili kaynak araştırması verilmiştir. Üçüncü bölümde, bu tezde kullanılan bitki materyali, moleküler markör teknikleri ve istatistiki yöntemler hakkında bilgiler sunulmaktadır. Dördüncü bölümde, 2. bölümde anlatılan metotların örneklere uygulanması ile elde edilen sonuçlar ve bu sonuçların tartışılması, beşinci bölümde ise, çalışma ile ilgili sonuç ve öneriler yer almaktadır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Kenevir Bitkisi Hakkında Bilgi

Kenevir tohumunun şekli yuvarlak, kabuğu sert ve rengi açık griden koyu griye kadar değişmektedir (EK-A.1). Tohumun bileşiminde % 30-32 yağ, % 23 protein ve % 21 karbonhidrat bulunmaktadır. Bitki kazık köklüdür, sapı sert ve otsu bir yapıya sahiptir. Boyu 50 cm ile 6 m arasında değişmekte, sapın üzerinde parçalı yapraklar bulunmaktadır. Bir yaprak 3-11 adet yaprakçıktan oluşmaktadır. Ortadaki yaprakçık diğerlerinden uzundur. Çiçek durumu karışık salkım şeklindedir. Çiçekler yaprak koltuklarında kümeler halinde bulunmaktadır. (Ekiz ve ark. 1989) .

Kenevir çift evcikli (dioik) bir bitkidir. Dişi çiçekler dişi bitkilerde, erkek çiçekler erkek bitkilerde bulunmaktadır (EK-A.4). Tek evcikli (monoik) çiçekli kenevirler de vardır. Kültürü yapılan kenevir *Cannabis sativa* var. vulgaris türünün kromozom sayısı 2n=20' dir (Ekiz ve ark. 1989). Cinsiyet kromozomları X ve Y dir ve bitkilerin cinsiyetleri genetik olarak belirlenebilmektedir. Kenevir iki heteromorfik cinsiyet kromozomuna sahiptir. Dişi bitkilerde iki X kromozomu, erkek bitkilerde bir X kromozomu ve bir Y kromozomu vardır. Y kromozomu; X kromozomu ve otozomlardan daha büyüktür. Kenevirin X ve Y kromozomları dişi ve erkek belirleyici genler taşırken, otozomlar cinsiyet tespitiyle ilgili değildir (Sakamoto ve ark. 1995).

Erkek çiçeklerde 5 perigon yaprak (çanak ve taç yaprak birleşik), 5 erkek organ bulunmaktadır. Dişi kenevir çiçeklerinde yumurtalığı saran yeşil bir perigon yaprağı vardır. Yumurtalık stigmalıdır (EK-A.5). Yumurtalık erkek çiçeklerden 2-3 gün sonra olgunlaşmaktadır. Yabancı döllenmekte ve tozlaşma rüzgarla olmaktadır. Her çiçekten bir tohum meydana gelmektedir. Çiçeklenme yaklaşık bir hafta sürmekte, tohumlar döllenmeden 3-6 hafta sonra olgunlaşmaktadır (Ekiz ve ark. 1989) .

2.2. Kenevir Ve Esrar

Esrar maddesi, dişi kenevirlerin uç yapraklarında, çiçeğin çevresindeki yaprakçıklarda, perigon yaprağında küçük gümüşi renkte bulunur. Yaprakta reçinemsi yapışkan bir durum oluşturur. Kendine has bir kokusu vardır. Esrar, kenevirin bütün varyetelerinde (var. vulgaris, var. sativa, var. sinensis, var. indica vb.) bulunur. Hint kenevirlerinde (var. indica) daha fazladır. Varyetelerin hepsinden lif, tohum ve esrar elde edilir. Sıcak bölgelerde, iyi güneş gören yerlerde yetiştirilen kenevirlerde esrar maddesi fazladır. Erkek kenevirlerde de çok az miktarlarda esrar bulunur (Ekiz ve ark. 1989) .

Esrar elde etmek için kenevir bitkisinin dişi çiçekleri tamamen açıldıktan sonra, bitkiler dip kısımlarından kesilerek yan yana bir araya yığılır ve birkaç gün bu şekilde bırakılarak kurutulur. Kurutma işlemi çiçeklerin el ile kolayca ufalanabilir hale gelmesine kadar devam eder. Bitkiler yeterince kuruduktan sonra el veya süpürge ile ufalanır ve ince gözenekli bir elekten geçirilir. Elde edilen ince toz toplanır, sıcak bir yerde yumuşayıp hamurumsu bir kitle meydana getirilinceye kadar yoğrulur, sonra ince plaka veya çubuk haline getirilir (Sağ, 2002).

Bitki başına esrar verimi, yetişme koşullarına, toprağa ve suya bağlı olarak değişmekle birlikte bir kök kenevir bitkisinden, en az 3.5 g iyi kaliteli esrar elde edilmektedir (Sağ, 2002).

Esrarın kullanımı insanlık tarihi kadar eskidir. Yenilerek, içilerek ve dumanı veya buharı içe çekilerek tüketilir. Zehirli bir maddedir. İnsanlar tarafından kullanıldığı zaman baş ağrısı, uyuşukluk, vücutta sararma ve zehirlenme belirtileri gösterir. Keyif verici etkisi nedeniyle kullanımı çok yaygındır.

Esrarın etken maddesi, taşıdığı reçine içinde bulunmaktadır. Reçine ve etken madde miktarı, esrarın elde edildiği bitkinin ırkına, yetiştiği bölgeye, iklim şartlarına, bitkinin koparılma zamanına ve elde edilme şekline göre büyük değişiklik göstermektedir (Shirato ve ark. 1998). Kenevir bitkisinin psikoaktif temel maddesi

olan THC bitkinin her tarafına eşit olarak dağılmamıştır. Reçinesinde, yapraklarında ve çiçeklerinde konsantrasyonu değişmektedir. Yapraklarından ve çiçekli kısımlarının kurutulmuş ve ufalanmış karışımından elde edilen ve % 1-15 oranında THC içerenler Batı Avrupa ve Amerika Birleşik Devletleri'nde marihuana ismi ile anılmaktadır. Bitkinin çiçekli tomurcuklu kısımlarından elde edilen reçinesi ise, % 5-15 THC içermekte ve haşhiş olarak isimlendirilmektedir. Bu karışımın distile edilmesi ile elde edilen katranımsı sıvıya haşhiş yağı denilmektedir (Shirato ve ark. 1998). Terminolojide haşhiş ile haşhaş terimleri karıştırılmaktadır. Haşhaş kendisinden afyon elde edilen bitkinin adı, haşhiş ise hint kenevirinden elde edilen, yüksek oranda THC içeren bitkinin reçinesine verilen isimdir (Sağ, 2002).

Esrar ve marihuanadan şimdiye kadar başta steroidler, terpenler, cannabinoidler olmak üzere 420'den fazla kimyasal madde izole edilmiştir. Ancak esrar içindeki maddelerden sadece fenolojik bileşikler (cannabinoidler) önemli olduğundan, esrarın kimyası ile ilgili araştırmalar hemen hemen sadece bunlar üzerine yapılmaktadır. Diğerlerinin pratik bir önemi yoktur. Cannabinoidler 21 karbonlu fenolitik karaktere sahip bileşikler olup, çok defa terpenlerin izomerizasyonu ile meydana gelmektedirler. Cannabinoidlerin pek çoğu stabil bir yapıya sahip değildir ve zaman içerisinde benzer izomerlerine dönüşmektedirler. Cannabidiol (CBD), cannabinol (CBN), cannabidiolasidi (CBDS), cannabinolasidi (CBNS), cannabigerol, cannabigerol asidi, cannabicromen (THC II), cannabicyclol (cannabiginol), cannabitriol, tetrahydrocannabinol (THC), tetrahydrocannabinolasidi (THCS) şimdiye kadar izole edilen bileşiklerden bazılarıdır (Ekiz ve ark. 1989).

THC, delta-8 (Δ^8) ve delta-9 (Δ^9) izomerleri en yüksek toksik aktiviteye sahiptir. CBD ise antibiyotik özellikler ihtiva etmektedir. Diğer cannabinoidlerin herhangi bir narkotik etkisi bulunamamıştır (Sytnik ve Stelmakh 1997). Δ^8 THC ve Δ^9 THC nin (-) trans izomerleri, farmakolojik aktivitenin çoğuna sahip bulunmaktadır (Steven ve Christopher 1998). Δ^9 THC'nin *in vivo* olarak Δ^8 THC'den daha fazla psikoaktif etkiye sahip olduğu belirlendiğinden psikoaktif etki, genellikle Δ^9 THC'ye mal edilmektedir (Pertwee 1988).

Kenevir bitkisinin yapısındaki cannabinoid içeren reçinenin, biyolojik fonksiyonu hakkında bazı teoriler ileri sürülmektedir. Antibiyotik aktivitesi ile kuraklık ve ısı toleransı arasında bir ilişki olduğu (De Meijer ve ark. 1992), bir başka çalışmada ise aynı değişkenlerle kara ikliminde yetişmiş olan kenevir bitkilerinin yapısında cannabinoidlerin, deniz kenarında yetişmiş olanlara göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir (Murari ve ark. 1983). Orijini bilinen tohumların İngiltere'de yetiştirilerek yapılan diğer bir çalışmada, cannabinoidlerin oranlarında çevreden gelen etkilerin çok fazla olduğu görülmüştür (Pitts ve ark. 1992).

Psikoaktif bileşenlerinin olmasından dolayı kenevir yetiştiriciliği 20. yy'ın sonlarına doğru azalmıştır (Dempsey 1975). Kanunları gereği kenevir yetiştirmek çoğu memlekette yasaklanmış, Fransa, Doğu Avrupa, Rusya, Kanada ve Çin gibi bazı ülkelerde ise devam etmektedir. Rusya'da yetişen kenevirlerin cannabinoidleri düşük oranda psikoaktif bileşene sahip olduklarından bu bitkiler kenevir ıslah çalışmalarında kullanılmaktadır (De Meijer ve ark. 1992). Kenevir bitkisinin ıslahında en önemli problem, narkotik aktiviteye sahip olmayan varyetelerin geliştirilmesidir.

2.3. Kriminal Olayları Aydınlatma Metotları

Kriminal olayların aydınlatılmasında bilimsel metotlardan yararlanma 1930'lu yıllara kadar geri gitmektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde 1932 yılında 2. kattan bir çocuğun kaçırılması ve öldürülmesi ile ilgili bir olayda, 2. kata ulaşmak için kullanılan merdivenin basamaklarının yapıldığı ağaçtan ve merdiven yapımında kullanılan aletlerden yola çıkılarak suçu işleyenin tespit edilmesi, modern çağda bilimsel yolların kullanılarak aydınlatıldığı ilk adli vakadır (Coyle ve ark. 2001a).

Bilimsel metotlarla aydınlatılan başka bir adli vaka ise, 1994 yılında Almanya'nın Magdeburg kentinde bir çukurda bulunan 32 kişiden arta kalan kemiklerin incelenmesi ile ilgilidir. Bu kişilerin kimlikleri ve failleri bilinmemektedir. Bu kişilerle ilgili iki hipotez öne sürülmüştür. Hipotezler: 1) Bu

kişilerin II. Dünya Savaşı sonunda 1945 yılı baharında Gestapo tarafından öldürülmüş olabilmeleri ya da 2) 1953 Haziran'ında Doğu Almanya'daki ayaklanmanın ardından gizli polis tarafından öldürülmüş Rus askerleri olabilmeleridir. Burada olayların ilkbahar ya da yaz aylarında yapılmış olması olayı aydınlatacak en önemli ipucu olarak belirlenmiştir. İskeletlerin burun boşluklarından polenler elde edilebilmiştir. Bunların bir çeşit muz, ıhlamur ağacı ve çavdar polenleri olduğu tespit edilmiş, dolayısıyla da iskeletlerin Rus akerlerinden kalan parçalar olduğu anlaşılmıştır (Szibor ve ark.1998).

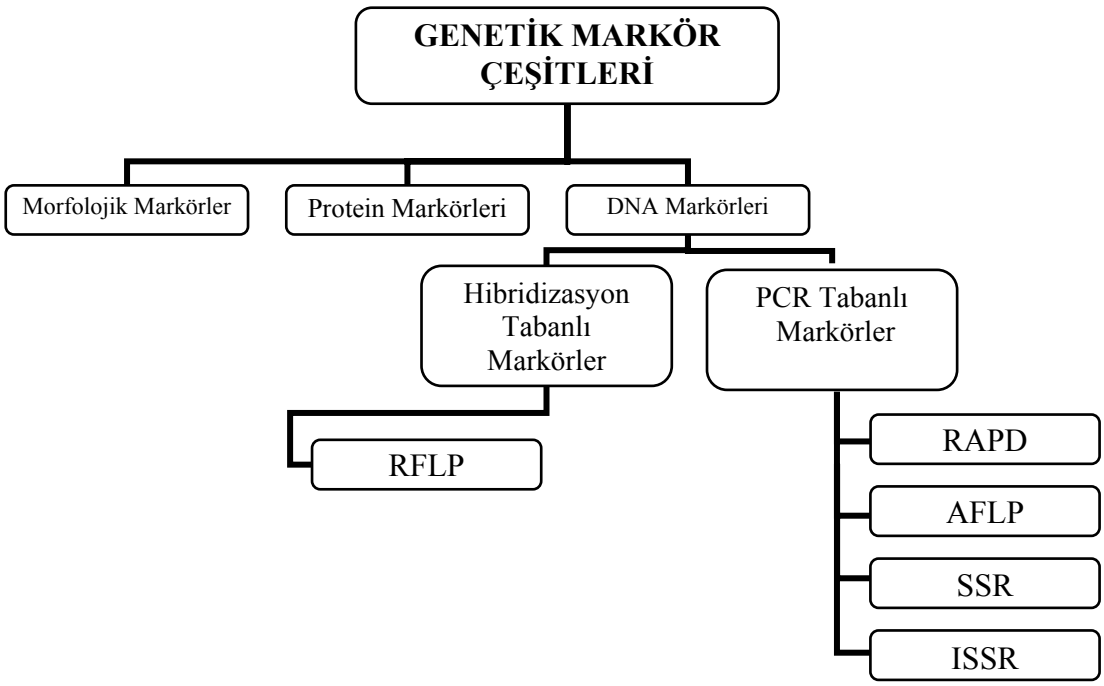
Kriminal olayların önemli bir kısmını da uyuşturucu madde kaçakçılığı, dağıtımı ve kullanımı oluşturmaktadır. Şüpheli bir maddenin içinde uyuşturucu madde ihtiva edip etmediğini tespit edebilmek amacıyla değişik metotlar geliştirilmiştir. Örneğin yakalanan bir maddede marihuana olup olmadığı klasik botanik metotlarla, kimyasal testlerle ya da gaz kromatografisi yoluyla tespit edilmeğe çalışılmakta, ancak bu metotlar yeterli olmamaktadır. Dolayısıyla günümüzde bu amaçla moleküler tekniklere başvurularak, genetik markörler kullanılmaya başlanmıştır (Coyle ve ark. 2001a).

2.4. Genetik Markör

Genetik markör, bir kromozom ya da kromozom bölgesinin ebeveynlerden bir sonraki generasyona geçerken takip edilebilen kısmı anlamına gelmektedir (Bovenhuis ve Meuwissen 1996). Kromozom üzerinde yer gösteren küçük bir DNA parçası, gen veya genin bir parçası ya da genler arasındaki bir DNA dizilimi ve bir tür içerisindeki bireyler arasındaki farklılığı gösteren bir işaret gibi farklı tanımlar yapmakta mümkündür.

2.4.1. Genetik markör çeşitleri

Genetik markörler morfolojik markörler, protein markörleri ve DNA markörleri olmak üzere üç ana başlık altında toplanabilir. Genetik markörler ve alt grupları Şekil 2.1'de gösterilmiştir.



Şekil 2.1 Genetik markör çeşitleri

DNA markörleri farklı genotiplere ait DNA nükleik asit diziliş farklılığını çeşitli şekillerde ortaya koyan markörlerdir. Bunlar:

a) Hibridizasyon tabanlı markörler (DNA melezleme markörleri)
b) Polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction-PCR) kullanımına dayalı DNA çoğaltım markörleri (PCR tabanlı markörler)

olmak üzere iki grup altında incelenirler.

RAPD, AFLP, SSR, ISSR markörleri dışında PCR tabanlı başka markörler de bulunmaktadır. Bu çalışmada kullanılan PCR tabanlı RAPD markörü ile ilgili detaylı bilgiler aşağıda verilmiştir.

2.4.1.1. Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) olarak adlandırılan bu teknikte 6-25 nükleotid uzunluğundaki başlatıcı DNA'lar kullanılarak genom üzerinde rasgele bölgelerin DNA amplifikasyonu gerçekleştirilir. Reaksiyonda kullanılan oligonükleotidlerin spesifik olmaması rasgele çoğaltıma izin verir. Yaygın olarak diğer PCR uygulamalarının aksine iki değil bir başlatıcı (primer) kullanılır. Dolayısıyla kullanılan başlatıcının DNA üzerinde birbirine yakın iki bölgeye yapışabildiği genom bölgelerinin amplifikasyonu yapılır. Üretimi yapılan DNA parçalarının bazı genotiplerde üretilip bazılarında üretilmediği gözlenir. Bu işlem açılma gösteren bir populasyonda yapıldığında ebeveynlere ait üretim motiflerine bakılarak döllerin analizi gerçekleştirilir (Welsh ve McClelland 1990).

RAPD tekniğinin avantajları arasında çabuk sonuç vermesi, ucuz olması, az işgücü gerektirmesi, az miktarda ve düşük kalitede DNA'ya ihtiyaç duyması gelmektedir. Ayrıca polimorfizm oranı yüksektir. Bu özellikleri itibariyle otomasyona uygundur. Ancak tekniğin bazı dezavantajları vardır. Bunlardan en önemlisi güvenilirliğinin sınırlı olmasıdır. Farklı laboratuarlarda, farklı araştırıcıların elinde ve hatta bir termocycler cihazından diğerine farklı sonuçlar elde edilebilmektedir. Bu dezavantajların bertaraf edilebilmesi için çalışmaların standart koşullarda yapılmasına özen gösterilmesi gerekmektedir. Tekniğin diğer dezavantajları arasında dominant özellikte markör vermesi ve bu yolla elde edilen markörlerin diğer haritalara transfer edilememesi gelmektedir (Walton 1993).

Gillan ve ark. (1995) *Cannabis sativa* L. örneklerinin HPLC ile tespit edilemediği bir durumda RAPD markörleri kullanılarak ayırt edilebildiğini bildirmişlerdir.

Jagadish ve ark. (1996) tarafından 43 adet Avustralya ve 8 adet Papua Yeni Gine orijinli toplam 51 kenevir bitkisi üzerinde RAPD markörleri ile yapılan bir çalışmada, bitkileri orijinlerine göre ayırmak mümkün olmuştur. Bu çalışmada DNA bantlarının analizinde kümeleme analizi ile elde edilmiş dendogram ve çok boyutlu ölçeklendirme istatistiki metotları kullanılmıştır.

Faeti ve ark. (1996) tarafından 13 adet kenevir aksesyonu üzerinde RAPD markörleri ile yapılan bir çalışmada, kenevir aksesyonlarını orijinlerine göre ayırmak mümkün olmuştur. Bu çalışmada 10 RAPD primeri ile 200 DNA bantı elde edilmiş, DNA bantlarının istatistiki analizinde Dice katsayısı ile hesaplanan benzerlik/farklılık matrisleri kullanılarak Temel Koordinatlar Analizi (TKoA) ve kümeleme analizi yapılmıştır.

RAPD ve RFLP markörleri beraber kullanılarak yapılan bir çalışmada uyuşturucu tipi, lif tipi ve ikisi arasında kalan kenevir bitkileri birbirlerinden ayırt edilebilmiştir (Shirota ve ark. 1998).

Kojoma ve ark. (2002) üç değişik kaynaktan elde edilen kenevir bitkilerinin ISSR markörleriyle ayrıştırıldıklarını bildirmişlerdir.

Gilmore ve ark. (2003) 93 adet lif tipi ve uyuşturucu tipi keneviri ayırt etmek için Short tandem repeat (STR) markörleri kullanmışlardır. Bitkiler arasındaki varyasyonu tespit edebilmek amacıyla moleküler varyans analizi (AMOVA) gerçekleştirilmiş ve ortalama olarak bitkiler arasında % 25'lik bir farklılık tespit edilmiştir. Bu çalışmada TKoA de kullanılmıştır.

Datwyler ve Weiblen (2006), uyuşturucu tipi kenevirlerle lif tipi kenevirleri birbirlerinden AFLP markörleri kullanarak ayırt etmişler ve buna ilave olarak, üç değişik kaynaktan elde edilmiş olan lif tipi kenevirleri de geldikleri populasyonlara göre TKoA metoduyla ayrıştırmışlardır.

Hakki ve ark. (2007), Türkiye'nin farklı coğrafik bölgelerinden kaçak ekimler sonucu ele geçirilen 23 adet uyuşturucu tipi kenevirle, 10 adet lif tipi kenevir üzerinde yaptıkları bir çalışmada, uyuşturucu tipi kenevirlerle lif tipi kenevirleri birbirlerinden ISSR markörleri kullanarak ayırt etmişlerdir. Elde edilen DNA bantlarının istatistiki analizinde TKoA ve kümeleme analizi metotları kullanılmış, Nei ve Li (1979)'a göre genetik benzerlik matrisleri hesaplanmıştır.

Connecticut Adli Tıp Laboratuvarı, marihuana örnekleri için moleküler bir strateji geliştirmeye çalışmaktadır. Bu proje çerçevesinde marihuana örneklerinin AFLP markörleri ile elde edilmiş bantlarından bir veri tabanı kurulması ve ele geçirilen kenevir bitkilerinin bu veri tabanı ile karşılaştırılıp orijinlerinin saptanması hedeflenmektedir (Coyle ve ark. 2001b).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Bu çalışmada materyal olarak, Adli Tıp Kurumları'ndan (İstanbul, İzmir, Adana, Trabzon ve Malatya) temin edilen ve farklı lokasyonlarda ele geçirilen uyuşturucu tipi kenevir (*Cannabis sativa* L.) örneklerinden tohumlar kullanılmıştır. Kullanılan uyuşturucu tipi kenevir materyalinin tamamı İstanbul Adli Tıp Kurumu tarafından tutanak karşılığı teslim alınmıştır. Kullanılan tohumlara ait bilgiler Çizelge 3.1'de verilmiştir. Kenevir tohumlarının ele geçirildiği illerin Türkiye Haritası üzerindeki dağılımı EK-G'de sunulmuştur.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan kenevir tohumlarına ait bilgiler

Çeşit No	Kod	Tutanak Kodu	Tutanaktaki Yer	Elde Edilen İl	Tohumun Temin Edildiği Kurum
1	C1	3102	Tekirdağ	Tekirdağ	İstanbul Adli Tıp Kurumu
2	C2	492784175	Geyve	Sakarya	İstanbul Adli Tıp Kurumu
3	C3	04-62927/5432ND	Tekirdağ	Tekirdağ	İstanbul Adli Tıp Kurumu
4	C4	05/002598/315	Edirne	Edirne	İstanbul Adli Tıp Kurumu
5	C5	04/409/5782	Suşehri Li	Sivas	İstanbul Adli Tıp Kurumu
6	C6	058576/5057	Tekirdağ	Tekirdağ	İstanbul Adli Tıp Kurumu
7	C7	056012/4833	Kocaeli	Kocaeli	İstanbul Adli Tıp Kurumu
8	C8	065364/5645	Li İst Cs/Gölcük	İstanbul	İstanbul Adli Tıp Kurumu
9	C9	4243-2	Ferizli	Sakarya	İstanbul Adli Tıp Kurumu
10	C10	4243	Ferizli	Sakarya	İstanbul Adli Tıp Kurumu
11	C11	2075/1	Salihli	Manisa	İzmir Adli Tıp Kurumu
12	C12	758/9	İzmir Dgm	İzmir	İzmir Adli Tıp Kurumu
13	C13	847/1-C-1	Denizli	Denizli	İzmir Adli Tıp Kurumu
14	C14	677/2	Didim	Aydın	İzmir Adli Tıp Kurumu
15	C15	315/2	Aydın	Aydın	İzmir Adli Tıp Kurumu
16	C16	676/2 A	Didim	Aydın	İzmir Adli Tıp Kurumu
17	C17	04 4047	Osmaniye	Osmaniye	Adana Adli Tıp Kurumu
18	C18	AT 05/1458	Kadirli	Osmaniye	Adana Adli Tıp Kurumu
19	C19	AT 05/678	Gaziantep	Gaziantep	Adana Adli Tıp Kurumu
20	C20	AT 04/4114	Hatay Dörtyol	Hatay	Adana Adli Tıp Kurumu
21	C21	AT 04/3933	Gaziantep	Gaziantep	Adana Adli Tıp Kurumu
22	C22		Bingöl	Bingöl	Malatya Adli Tıp Kurumu
23	C23		Elazığ	Elazığ	Malatya Adli Tıp Kurumu
24	C24		Malatya	Malatya	Malatya Adli Tıp Kurumu
25	C25		Rize Cbs 2	Rize	Trabzon Adli Tıp Kurumu
26	C26		Ardeşen Cbs 5	Rize	Trabzon Adli Tıp Kurumu
27	C27		Savcılık Akçaabat	Trabzon	Trabzon Adli Tıp Kurumu
28	C28		Savcılık Trabzon8	Trabzon	Trabzon Adli Tıp Kurumu
29	C29		Arsın Cbs 4	Trabzon	Trabzon Adli Tıp Kurumu

3.2. Metot

3.2.1. Sera çalışmaları

Bu çalışmada kullanılan bitki örnekleri Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Toprak Bölümü Otomatik Kontrollü Araştırma Serası'nda yetiştirilmiştir (EK-A.2).

Çalışmada kullanılan toprağın özellikleri, element analizleri yapılarak önceden tespit edilmiştir (Çizelge 3.2). Her saksıya 2.5 kg toprak konularak bitkiler saksı içerisinde yetiştirilmiştir.

Çizelge 3.2 Çalışmada kullanılan toprak örneğinin bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri

Toprak Özellikleri	
pH (1:2.5 Toprak-su)	8.10
E.C., (1:5 Toprak-su) µS cm^{-1}	125.20
%	
$CaCO_3$	31.30
Organik madde	4.90
Kil	18.36
Silt	14.28
Kum	67.36
1 N NH_4AOC ekstrakte edilebilir, me 100 g^{-1}	
Ca	5.42
Mg	0.35
K	0.21
Na	0.08
mg kg^{-1}	
0.5N $NaHCO_3$ ile ekstrakte edilen P	17.70
DTPA ile ekstrakte edilen Fe	0.90
DTPA ile ekstrakte edilen Zn	0.01
DTPA ile ekstrakte edilen Mn	2.40
DTPA ile ekstrakte edilen Cu	0.20
$CaCl_2$+mannitol ile eks. edilen B	0.20

Mikro besin elementleri bakımından yetersiz olan toprağa bitkinin ihtiyacı doğrultusunda hesaplanan miktarlarda (her bir saksıya) 120 mg kg^{-1} N (NH_4NO_3 ve KNO_3 formlarında), 50 mg kg^{-1} P (TSP formunda), 120 mg kg^{-1} K (KNO_3 formunda), 130 mg kg^{-1} Mg ($MgSO_4.H_2O$ formunda), 10 mg kg^{-1} Fe (Sequestrene formunda), 15 mg kg^{-1} Mn ($MnSO_4.H_2O$ formunda), 5 mg kg^{-1} Zn ($ZnSO_4.7H_2O$ formunda) ve 2 mg kg^{-1} Cu ($CuSO_4.5H_2O$ formunda) gübre karışımları ilave edilerek toprak bitkinin yetiştirilebilmesi için uygun hale getirilmiştir. Saksılara gübreler çözelti şeklinde karıştırılmıştır. Bu işlemlerden sonra her bir aksesyon için 15 adet olmak üzere her saksıya 5'er tohum ekilmiştir. Çalışma süresince toprağın su kapsamı damla sulama sistemi ile tarla kapasitesinin % 50-75 arasında tutulmaya

çalışılmıştır. Sera çalışmasında amaç DNA örneklerinin elde edilmesi olduğu için, DNA izolasyonları tamamlanıncaya kadar çalışma devam ettirilmiştir.

3.2.1.1. Tohumların çimlendirilmesi ve DNA örneklerinin alınması

Ekiminden 3-4 gün sonra bitkiler çimlenmeye başlamıştır (EK-A.3). Çimlenen bitkiler belirli büyüklüğe geldikten (~30-40 gün) sonra, steril bistüri yardımıyla bitkinin sağlıklı, genç yapraklarından (~90-100 mg) DNA izolasyonu için örnekler alınmıştır. Tek birey (SET1, her aksesyondan bir bitkiye ait DNA) ve bulk DNA (SET2, aynı aksesyonun farklı bireylerine ait DNA karışımı) ile çalışma yapılacağı için, her bir aksesyona ait dokuz farklı bitkiden ayrı ayrı DNA örnekleri alınmıştır. Bazı aksesyonlarda dokuzdan daha az sayıda tohum çimlendiği için bu sayıya ulaşılamamıştır. Bitkilerden alınan DNA örnekleri sıvı azotta ani şoklama ile dondurularak -86 ^{o}C derin dondurucuda DNA izolasyonu yapılıncaya kadar muhafaza edilmiştir.

3.2.2. Moleküler genetik çalışmalar

Moleküler genetik çalışmalar Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Bitki Biyoteknolojisi Laboratuarı'nda gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalarla ilgili detaylı bilgiler aşağıda verilmiştir.

3.2.2.1. Sterilizasyon

DNA izolasyonu sırasında kullanılan porselen havanlar, topuzları ve metal kaşıklar herhangi bir bulaşmayı önlemek amacıyla önce % 96'lık etil alkol ile temizlenmiştir. Temizlenen havanlar, topuzları ve metal kaşıklar alüminyum folyo ile

açık yer kalmayacak şekilde sarıldıktan sonra 170 ^{o}C'de 4-5 saat sıcak hava fırınında (etüv) bekletilmiştir.

3.2.2.2. DNA izolasyonu

Çalışmada RAPD gibi hassas bir yöntem kullanılacağı için DNA izolasyonunda mümkün olduğu ölçüde az komponentli ve örnekler arasında farklı sonuçlar vermeyecek bir yöntem izleyebilmek için, ön denemelerde birçok bitki için olumlu sonuç veren 2X CTAB (cetil three metil amonyum bromid) DNA izolasyon metodu kullanılmıştır.

2X CTAB ile DNA izolasyonunda kullanılan stok çözeltisinin hazırlanmasında kullanılan kimyasal maddeler ve miktarları Çizelge 3.3'de verilmiştir.

Çizelge 3.3 2X CTAB (125 ml) stok çözeltisinin hazırlanmasında kullanılan kimyasal maddeler ve miktarları

Kullanılan Kimyasal Madde	**Miktarı**
NaCl (Sodyum Klorür)	10.23 g
Tris (1M, pH 8.0)	12.5 g
CTAB (Cetil Three Metil Amonyum Bromid)	2.5 g
EDTA (Etilen Daimin Tetra Asetik Asit 0.5M, pH 8.0)	5.0 ml
$Na_2O_5S_2$ (Sodyum Bisülfit)	0.63 g

Yukarıda belirtilen miktarlarda hazırlanan çözeltinin son hacmi ddH_2O (distile-deiyonize su) ile 125 ml'ye tamamlanmıştır.

2X CTAB metodu ile DNA izolasyonu prosedürüne göre her örnek için ~1050 µl CTAB çözeltisi kullanılmaktadır. Bu nedenle izole edilecek örnek sayısına göre kullanılacak çözelti miktarı hesaplanmış, steril bir pipet yardımıyla steril falkon vb. bir kaba boşaltılmıştır. Stok çözeltiden bölünen 2X CTAB çözeltinin içerisine % 1 oranında β-mercaptoethanol ilave edilip karıştırılmıştır. Daha sonra 2X CTAB ile DNA izolasyonu prosedürüne devam edilerek izolasyona başlanmıştır (EK-B).

2X CTAB ile DNA izolasyon aşamaları aşağıda verilmiştir:

- İzolasyona kadar DNA içeriğinin zarar görmemesi için -86 ^{o}C'de muhafaza edilen yaprak örnekleri derin dondurucudan çıkarılarak erimemeleri için sıvı azot içerisine alınmıştır.
- Steril havanın içine bir miktar sıvı azot dökülerek soğuması için çok az bekletilmiştir (EK-B.1).
- Havandaki sıvı azotun içine bitkiden alınan yaprak örnekleri (~90-100 mg) ilave edilmiş, kırılgan hale gelen bitki örnekleri steril topuz yardımıyla iyice ezilerek toz haline getirilmiştir (EK-B.2-3).
- Toz haline getirilen bitki örnekleri zaman geçirmeden (örnekler erimeden) 2 ml'lik eppendorf santrifüj tüplerine en fazla miktarda alınmaya çalışılmıştır (EK-B.4).
- Tüplerin içerisine 750 µl CTAB- β-mercaptoethanol çözeltisi ve 15 µl *RNase A* ilave edilmiştir. Tüpler 3-5 saniye vortekslenerek bitki ile çözeltilerin karışması sağlanmıştır (EK-B.5-6).
- Tüplerin ağızları parafilmle sarılarak 65 ^{o}C'de çalışan blok ısıtıcıda 30 dk süreyle bekletilmiştir (tüpler zaman zaman karıştırılmıştır) (EK-B.7).
- Isıtıcıdan çıkarılan örneklerin parafilmleri çıkarılarak üzerine 750 µl kloroform:izoamilalkol (24:1) ilave edilmiş, tüpler hafifçe çalkalanmıştır (EK-B.8).
- Tüpler santrifüj cihazına alınarak 25 ^{o}C'de, 7000 rpm'de 5 dk süreyle santrifüje tabii tutulmuştur (EK-B.9).
- Santrifüj edilen tüplerin üzerinde oluşan şeffaf sıvı fazdan otomatik pipetman yardımıyla dikkatlice (alt ve orta fazlardaki örneklerle karıştırmadan) 400-

600 µl alınarak steril 2 ml' lik eppendorf santrifüj tüplerine aktarılmıştır (EK-B.10-11-12).

- İlk tüplerin üzerine 300 µl CTAB- β-mercaptoethanol çözeltisi ilave edilerek tekrar 25 ^{o}C'de, 15000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir.
- Santrifüjden çıkarılan örneklerde tekrar oluşan şeffaf sıvı fazdan otomatik pipetman yardımı ile 200-400 µl alınarak daha önce alınan üst fazın üzerine ilave edilmiş ve ilk tüpler atılmıştır.
- Yeni santrifüj tüplerindeki örneklerin (şeffaf sıvı faz) üzerlerine alınan üst fazın yaklaşık 3/5'i katı kadar izopropil alkol (oda sıcaklığında bekletilmiş) ilave edilmiştir (Genellikle 600 µl şeffaf faz için 360 µl izopropil alkol ilave edilir).
- Yeni santrifüj tüpleri hafifçe çalkalanmış (DNA zincirlerinin kırılmaması için), pellet oluşumu gözlenmiştir (EK-B.13).
- Hafifçe karıştırılan tüpler 25 ^{o}C'de, 15000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir (EK-B.14).
- Santrifüj edilen örneklerde DNA pelleti oluşumu gözlenerek tüplerdeki pellet düşürülmeden tüpteki izopropil alkol dökülmüştür.
- DNA pelletleri bulunan tüplere 1 ml % 70'lik etil alkol ilave edilmiştir (EK-B.15).
- Etil alkol ilave edilen örnekler 5 dk süreyle 15000 rpm'de santrifüj edilmiştir.
- Santrifüjün ardından etil alkol ile yıkanmış pelletlerin düşmemesine dikkat edilerek tüp içindeki etil alkol tamamen dökülmüştür.
- Kurumaya bırakılan pelletlerin üzerine daha sonra 200 µl ddH_2O ilave edilmiş ve DNA'nın çözünmesi sağlanmıştır.
- DNA örnekleri çalışma yapılıncaya kadar -20 ^{o}C derin dondurucuya kaldırılmıştır.

Bu çalışmada tek birey DNA ve bulk DNA örnekleri kullanılmış olup, DNA izolasyonları 9 set halinde yapılmış ve toplam 172 bitkiden DNA izole edilmiştir. İzole edilen DNA'lar 200 µl ddH_2O içerisinde çözülerek, % 1'lik agaroz jelinde yürütülmüş ve görüntüleme cihazında DNA'nın varlığı tespit edilmiştir.

3.2.2.3. DNA konsantrasyonu ve saflıklarının belirlenmesi

Polimeraz zincir reaksiyonunda (PCR, Polymerase Chain Reaction) kullanılacak DNA miktarının bilinmesi PCR çalışmasının sağlıklı yapılabilmesi ve doğru sonuçların alınabilmesi için önemlidir. Bu nedenle DNA izolasyonu yapılan tüm örneklerin DNA konsantrasyonlarını belirlemek amacıyla spektrofotometre (Eppendorf Biophotometer) cihazında (EK-D.1) çeşitli dalga boylarında okuma yapılmıştır. Okuma sırasında 1:50 (1µl DNA ve 49 µl saf su) dilüsyon oranı kullanılmıştır. Ölçümde 260 nm dalga boyunda (A_{260}) nükleik asitler, 280 nm'de (A_{280}) protein, 320 nm'de (A_{320}) ise içeriğe karışan yabancı maddelerin miktarları belirlenir. 260 nm ve 280 nm dalga boyunda elde edilen değerlerin oranı (OD_{260}/OD_{280}) ise DNA'nın saflığının ölçüsünü vermektedir. Çift zincirli DNA molekülleri için, 1 OD (Optik densite) 50 µg/ml'ye karşılık gelmektedir (Temizkan ve Arda 2004).

Nükleik asitlerle yapılan çalışmalarda, DNA örneklerinin bulunduğu sıvının OD_{260}/OD_{280} oranının 1.8 ve 2.0 olması istenir. Nükleik asit süspansiyonunda protein artıklarının bulunması durumunda bu oran önemli ölçüde azalmakta ve nükleik asit miktarının kesin olarak hesaplanması güçleşmektedir (Güneren 1999).

DNA izolasyonu yapılan tüm bireylerin (172 bitki) okunan değerlere göre DNA konsantrasyonları 25 ng/µl olacak şekilde dilüsyon hesaplamaları yapılmıştır. Tüm örnekler için hesaplanan DNA miktarları yeni tüplere (1.5 ml lik eppendorf tüp) aktarılmış, hacim steril saf su ile 200 µl'ye tamamlanarak PCR çalışmasında kullanılacak DNA konsantrasyonları eşitlenmiş, dilüsyon tüpleri hazırlanmıştır. DNA konsantrasyonları eşitlenen örneklerden eşit miktarlarda alınarak (5 µl DNA+1 µl yükleme boyası) % 1'lik agaroz jelinde (1X TBE çözeltisinde) yürütülerek konsantrasyonlarının eşitliği gözlenmiştir. Jeldeki bantların parlaklıklarına göre aynı aksesyonun farklı bireylerine ait DNA örnekleri belirli oranlarda alınarak bulk DNA tüpleri hazırlanmıştır.

3.2.2.4. Primer seçimi ve konsantrasyonu

Sentetik olarak hazırlanabilen tek iplikçikli spesifik DNA segmentleri olan primerler, kullanılma amaçlarına göre, 6-25 oligonükleotidden oluşmaktadır. Bunlar hedef DNA üzerinde kendine komplementer olan baz sıralarını bularak onlara bağlanır ve buradan DNA sentezinin ilerlemesine basamak teşkil ederler. Primerlerin yapısında % 50-60 kadar G+C (Guanin+Sitozin) bazlarının bulunması, hedef DNA ile daha kuvvetli bağların kurulmasına yardımcı olur. Ayrıca, böyle birleşmeler, yüksek ısıda oluşturulan amplifikasyonda nonspesifik bağlanmaları da azaltır.

Bu çalışmada genomda yerleri bilinmeyen ve Adenin (A), Timin (T), Guanin (G), Sitozin (C) nükleotidlerinin rastgele dizilmesiyle oluşmuş RAPD primerleri kullanılarak PCR amplifikasyonları gerçekleştirilmiştir. Toplam 25 adet 10 mer'lik (10 bazlık) primer denenmiş ancak bunlardan olumlu sonuç veren 22 adet RAPD primeri kullanılmıştır (Çizelge 3.4). Bu primerlerden her bir reaksiyonda toplam 50 pmol/µl kullanılmıştır.

Primerlerin yapışma sıcaklıklarının optimizasyonu ve tüm PCR işlemleri Techne marka (TC-512) PCR cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir (EK-D.1).

Çizelge 3.4 Çalışmada kullanılan primerler, primer sekansları, G+C (%) oranları ile T_m ve yapışma sıcaklıkları (melting ve annealing temperature, °C)

Primerler	Primer sekansları	G+C (%)	T_m (°C)	Yapışma sıcaklıkları (^oC)
RAPD L2	5'- GTT TCG CTC C -3'	60	32	34
RAPD L3	5'- GTA GAC CCG T -3'	60	32	33
RAPD L4	5'- AAG AGC CCG T -3'	60	32	33
RAPD L5	5'- AAC GCG CCG T -3'	60	32	34
RAPD L6	5'- CCC GTC AGC A -3'	70	34	34
RAPD B1	5'- CCC GCC GTT G -3'	80	36	35
RAPD B2	5'- TGC GCC CTT C -3'	70	34	33
RAPD B3	5'- GAT GAC CGC C -3'	70	34	34
RAPD B4	5'- CTC ACC GTC C -3'	70	34	33
RAPD B5	5'- GAC GGA TCA G -3'	60	32	31
RAPD B6	5'- CCG ATA TCC C -3'	60	32	31
RAPD B7	5'- TTG GTA CCC C -3'	60	32	31
RAPD B8	5'- ACG GTA CCA G -3'	60	32	31
RAPD B9	5'- CCA GCG TAT T -3'	50	30	29
RAPD B10	5'- CTA CTG CGC T -3'	60	32	31
RAPD B11	5'- CCT CTG ACT G -3'	60	32	31
RAPD B12.2	5'- TCC GAT GCT G -3'	60	32	31
RAPD B13	5'- TTC AGG GTG G -3'	60	32	31
RAPD B14	5'- TCC TGG TCC C -3'	70	34	33
RAPD B16	5'- AGT CGG GTG G -3'	70	34	33
RAPD B17	5'- GTC GTT CCT G -3'	60	32	31
RAPD B18	5'- GAG TCA GCA G -3'	60	32	31

3.2.2.5. Magnezyum (Mg^{+2}) konsantrasyonu

Magnezyum konsantrasyonu, primerlerin birleşmesinde hem PCR ürününün hem de kalıp DNA'nın ipliklerinin ayrılma sıcaklığında, primer-dimer oluşumunda,

enzim aktivitesinde ve doğruluğunda çok önemlidir. PCR'da Mg^{+2} miktarı 0.5-2.5 mM arasında olmalıdır (Innis ve Gelfand 1990).

Bu çalışmada ticari olarak satılan, hazır halde gelen ve içerisinde 25 mM $MgCl_2$ (Bioron) bulunan stok çözeltiden reaksiyon başına 2.5 µl $MgCl_2$ kullanılmıştır.

3.2.2.6. Deoksiribonükleozid tri fosfatlar (dNTP) konsantrasyonu

Deoksiribonükleozid tri fosfatlar (dATP, dGTP, dTTP, dCTP) yüksek saflıkta ya tek tek yada dörtlü karışım halinde ticari olarak sağlanabilir. dNTP karışımı yanlış birleşme hatalarının en aza indirgenmesi bakımından eşit konsantrasyonlarda kullanılmalıdır. PCR'ın spesifikliği ve doğruluğu her biri 1.5 mM dNTP konsantrasyonu kullanmakla yükselir. Düşük dNTP konsantrasyonu hedef olmayan yerlerde yanlış primer birleşme şansını en düşüğe indirir. Hedef dizinin uzunluğu ve kompozisyonu için uygun olan en düşük dNTP konsantrasyonu seçilmelidir (Innis ve Gelfand 1990).

Yapılan optimizasyon çalışmaları sonucunda bu çalışmada pH 7.0 olan 100 mM' lık her bir nükleotidden (dATP, dGTP, dTTP, dCTP) eşit miktarlarda bir karışım hazırlanarak reaksiyon başına 0.4 µl dNTP (Larova) kullanılmıştır.

3.2.2.7. *Taq* DNA polimeraz konsantrasyonu

Bir PCR'ı optimize etmek için, 0.5-5 U (ünite) arasındaki enzim konsantrasyonları denenerek, sonuçlar jel elektroforezde tayin edilmelidir. Eğer enzim konsantrasyonu çok yüksek ise spesifik olmayan geri plan ürünleri oluşabilir ve eğer çok düşükse istenilen üründen yetersiz oluşabilir. Bunun yanında değişik kaynaklardan temin edilen *Taq* DNA polimeraz, değişik formülasyon ve deney

koşullarından dolayı değişik sonuçlar alınabilir (Innis ve Gelfand 1990). PCR çalışmalarında yaygın olarak DNA polimerazın ısıya dayanıklı bir şekli olan sıcak su kaynaklarında yaşayan bir bakteriden *(Thermus aquaticus)* elde edilen enzim olan *Taq* DNA polimeraz kullanılır.

Bu çalışmada *Taq* DNA polimeraz (Bioron 5u/µl)'dan reaksiyon başına 0.3 µl enzim kullanılmıştır.

3.2.2.8. 10X *Taq* DNA polimeraz tamponu

PCR çalışmalarında kullanılan tamponlar arasında en çok kullanılanı *Taq*/Ampli*taq* enzimlerine özgü olan tampondur. Tampon çözelti içeriği 160mM $(NH_4)_2SO_4$, 670 mM TrisHCl pH 8.8, 0.1 % Tween-20 şeklindedir.

Bu çalışmada kullanılan 10X reaksiyon tamponu (Bioron), $MgCl_2$ ve *Taq* DNA polimeraz enzimi ile birlikte gelmiş olup, reaksiyon başına 2.5 µl kullanılmıştır.

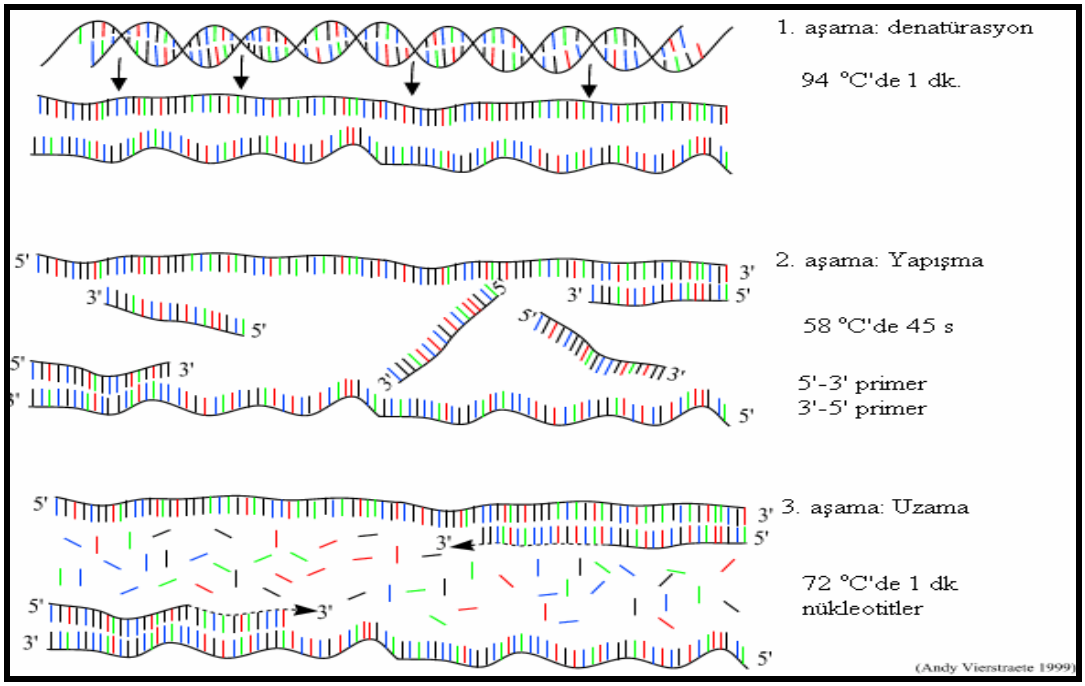
3.2.2.9. PCR Uygulamaları

Polimeraz zincir reaksiyonu, DNA polimeraz enziminin kullanılmasıyla suni şartlarda DNA üretilmesini ifade etmektedir. Bu üretim için 6-25 nükleotid uzunluğunda başlatıcı DNA'lar (primerler) gerekir. Reaksiyon ortamında ayrıca pH'yı ve tuz konsantrasyonunu optimum hale getiren tampon çözelti, polimeraz enziminin ihtiyaç duyduğu $MgCl_2$ ve DNA üretiminde kullanılacak A, T, G, C nükleotidlerinden her biri bulunur. Polimeraz enzimi, bu başlatıcı DNA'nın bir kalıp DNA üzerine bağlanmasından sonra, onu bir uçtan uzatmaya başlar ve kalıp DNA'nın aynısını üretir. DNA üretim işlemi birbirini izleyen bir seri çok spesifik sıcaklık devrelerinde yapılır (Özcan ve ark. 2001). PCR çalışmasının aşamaları şu şekildedir (Şekil 3.1).

1. ***DNA ipliklerinin birbirinden ayrılması (Denatürasyon):*** Çift zincirli DNA tek zincirli hale getirilene kadar ısıtılır (90-95 ^{o}C'de yaklaşık 3-5 dk). Normal hücre koşullarında zincirlerin ayrılması enzimatik yolla olur. PCR'da ise ekonomik ve pratik olması dolayısıyla ısı uygulanarak zincirler ayrıştırılır.

2. ***Primerlerin bağlanması (Annealing):*** Sıcaklık 40-70 ^{o}C arasında bir değere düşürülür ve önceden tasarlanmış ve sentezlenmiş primerlerin tek zincirli hale getirilmiş DNA'ya bağlanması sağlanır. Bu primerler çoğaltılacak DNA kısmının uçlarındaki tamamlayıcı dizilere karşılıklı olarak birbirlerine bakacak şekilde özgül olarak bağlanırlar.

3. ***Primerlerin uzaması (Extention):*** DNA sentezi optimum olarak 70-75 ^{o}C'de gerçekleşir (genellikle 72 ^{o}C'de). Polimeraz enzimi nükleotidleri daima 5' ucundan 3' ucuna doğru ekleyerek primerlerin uzamasını sağlar ve hedef DNA'nın iki zincirli kopyasını oluşturur.



Şekil 3.1 PCR çalışmasının aşamaları (Anonymous, 2007a)

PCR reaksiyonu ile hangi diziliş üzerinde DNA üretimi yapılacağını belirleyen iki faktör vardır. Bunlardan en önemlisi başlatıcı DNA'nın kendi dizilişidir. Yeterli uzunlukta spesifik dizilişler kullanılması durumunda genomun çok spesifik bir bölgesine ait DNA üretilir. Kısa ve rasgele dizilişte başlatıcılar kullanılma durumunda ise rasgele bölgelere ait DNA üretilir. DNA üretiminin yapılacağı yeri belirleyen ikinci faktör başlatıcı DNA'nın yapışmasının gerçekleştirildiği sıcaklık derecesidir. 30-40 ^{o}C gibi düşük sıcaklıklara inildiğinde başlatıcı DNA pek çok yere kolayca yapışacağı için pek çok yere ait spesifik olmayan DNA üretimi yapılır. Yapışma sıcaklığının yüksek tutulmasıyla (55-60 ^{o}C) ise başlatıcı DNA sadece spesifik bölgelere yapışır ve buradan üretim yapar (Özcan ve ark. 2001).

Ardı ardına tekrarlanan denatürasyon, primerlerin bağlanması ve primerlerin uzaması evreleriyle DNA parçaları üssel olarak artar (Şekil 3.2). Bu üssel artışın nedeni, bir döngü sonucu sentezlenen ürünün, ardışık döngüde diğer primerler için kalıp görevi yapmasıdır. Böylece her PCR döngüsü DNA molekülü üzerinden istenilen bölgenin iki katına çıkması ile sonuçlanır. PCR boyunca biriken ürünlerin boyu primerlerin boyu ve hedef DNA bölgeleri arasındaki mesafelerin toplamı kadardır (Temizkan ve Arda 2004).

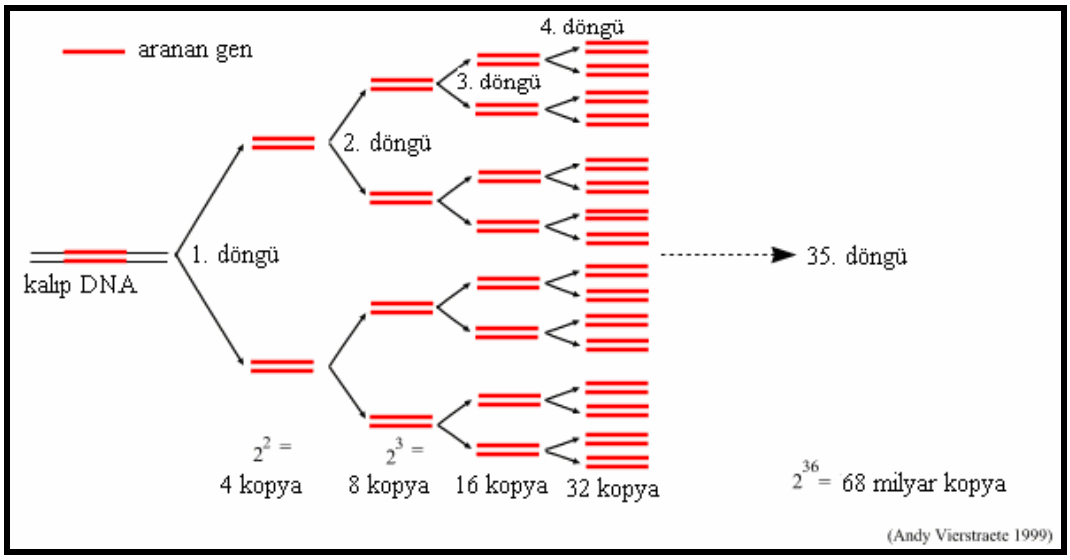
Matematiksel olarak amplifikasyon $\left(2^{n}-2n\right)\mathrm{X}$ formülü ile ifade edilir (Temizkan ve Arda 2004).

$n=$ Döngü sayısı

$2n=$ Birinci ve ikinci döngü sonucunda oluşan boyları bilinmeyen ürünler

$\mathrm{X}=$ Orijinal kalıbın kopya sayısı

Potansiyel olarak her döngünün %100 verimle gerçekleştiği varsayılırsa, örneğin 20 döngü sonucu 2^{20} kat ürün meydana gelir.



Şekil 3.2 PCR çalışmasında DNA amplifikasyonu (Anonymous, 2007a)

PCR'da kullanılan kimyasalların optimizasyonu tamamlandıktan sonra PCR çalışmalarına başlanmıştır. Reaksiyonlar steril, ince çeperli, düz kapaklı, *RNase* ve *DNase-free* 0.2 ml'lik PCR tüplerinde ve 4 µl DNA+21 µl karışım (*reaction mix*) olacak şekilde 25 µl hacimde gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kullanılan kimyasallar ve miktarları (bir örnek için) Çizelge 3.5'de verilmiştir.

Çizelge 3.5 PCR çalışmasında kullanılan kimyasallar ve miktarları

Reaksiyon karışımı	**1 örnek (tüp) için kullanılan miktar**
DNA miktarı (25 ng/µl)	4 µl
10X *Taq* tampon çözeltisi (Bioron)	2.5 µl
25 mM $MgCl_2$ (Bioron)	2.5 µl
25 mM dNTP (A, T, G, C) (Larova)	0.4 µl
Primer (50 pmol/µl)	0.5 µl
5 u/µl *Taq* DNA polimeraz (Bioron)	0.3 µl
ddH_2O (PCR hassasiyetinde)	14.8 µl

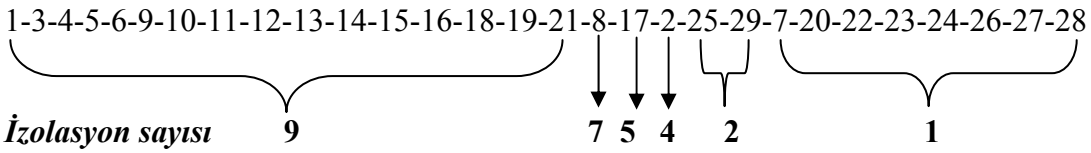
Çalışmada kullanılan DNA ve kimyasallar yüksek sıcaklıkta bozulabildikleri için -20 ^{o}C'de derin dondurucularda muhafaza edilmiş ve PCR çalışmaları buz üzerinde gerçekleştirilmiştir. Herhangi bir bulaşma (kontaminasyon) oluşmasını önlemek amacıyla çalışmanın yapılacağı tezgah ve kullanılacak otomatik pipetmanlar alkolle temizlenmiştir. Örnek sayısına göre 0.2 ml'lik PCR tüpleri hazırlanmış ve -20 ^{o}C'de muhafaza edilen DNA tüpleri çıkarılmış ve oda sıcaklığında çözünmesi sağlanmıştır. Her bir PCR tüpüne 100'er ng DNA ilave edilmiştir (alınan DNA konsantrasyonlarının homojen olması için önce parmakla vurularak tüpler karıştırılmıştır). Reaksiyonda kullanılacak kimyasallar hesaplanan miktarlarda steril, *RNase* ve *DNase-free* 1.5-2 ml'lik eppendorf tüplerine konulmuştur (en son *Taq* DNA polimeraz enzimi ilave edilmiştir). Hazırlanan reaksiyon karışımı homojen bir şekilde karıştırılmıştır. Daha sonra PCR tüplerine 21'er µl olmak üzere karışım paylaştırılmıştır. Böylece tüplerdeki toplam hacim 25 µl (4 µl DNA+21 µl reaksiyon karışımı) olmuştur.

Hazırlanan PCR tüpleri uygun program ayarlanarak PCR cihazına yerleştirilmiştir. PCR sırasında reaksiyon karışımının tüplerden buharlaşmasını engellemek amacıyla cihazın kapak sıcaklığı 105 ^{o}C ve blok sıcaklığı 94 ^{o}C olacak şekilde ayarlanmıştır.

PCR çalışmaları tek birey ve bulk DNA olmak üzere 29'ar aksesyondan oluşan iki set ile yapılmıştır. Her iki setin çalışması birlikte ve aynı koşullarda gerçekleştirilmiştir. RAPD tekniğinin hassas bir yöntem olması, çalışmada kullanılan DNA ve kimyasal madde içeriklerinden (enzim, primer, dNTP vs) etkilenen bir markör olması dolayısıyla tüm PCR uygulamaları aynı kimyasalların eşit oranlarda kullanılması ile gerçekleştirilmiştir. Uygulamalarda her zaman aynı PCR cihazı kullanılmıştır. Sadece amplifikasyon sıcaklık ve süreleri kullanılan primerlerin T_m sıcaklıklarına bağlı olarak her PCR için ayrı ayrı optimize edilmiştir (Çizelge 3.4).

PCR ürünleri %2' lik agaroz jele yüklenerek, 3-4 saat elektrik akımına tabi tutulmuştur. Jelde iki tarak kullanılmış olup, üstteki yuvalara tek bireylere ait, alttaki yuvalara bulklara ait PCR ürünleri yüklenmiştir. Tüm aksesyonlarda DNA izolasyon

sayıları eşit olmadığı için her iki sette de 9 izolasyona sahip bireylerden başlanarak sona tek izolasyona sahip bireyler, birinci ve sonuncu yuvalara da markör (*DNA ladder*) yüklenmiştir. Jele yükleme sırası aşağıdaki gibidir.



3.2.2.9.1. RAPD PCR koşullarının optimizasyonu

RAPD metodunun güvenilirliğini ve tekrarlanabilirliğini etkileyen pek çok faktör bulunmaktadır. $MgCl_2$ konsantrasyonu, *Taq* DNA polimeraz konsantrasyonu, primer konsantrasyonu, dNTP konsantrasyonu, primer bağlanması, başlangıç denatürasyonu, primer karışımları RAPD tekniğini etkileyen temel değişkenlerdir. Ayrıca PCR'da oluşan çelişkili sonuçlar için yabancı DNA tarafından oluşturulan kontaminasyona ek olarak DNA izolasyon tekniğindeki farklılıklar, kullanılan doku kaynağı, PCR koşulları ve PCR cihazının tipi sorumlu olabilmektedir (Şahin 2005). RAPD çalışmalarında her farklı tür için reaksiyon koşullarının optimizasyonu şarttır. Bunun amacı özgünlüğü ve tekrarlanabilirliği kontrol etmektir. Bu nedenle sağlıklı DNA amplifikasyonları için bu parametreler RAPD PCR çalışması için optimize edilmiştir. Aşağıdaki döngü değerleri farklı primerlere göre değiştirilerek optimum koşullarda PCR çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

- 94 ^{o}C'de → 5 dk
- 94 ^{o}C'de → 1 dk ←
- 31 ^{o}C'de → 1 dk | x 45 döngü
- 72 ^{o}C'de → 2 dk ←
- 72 ^{o}C'de → 10 dk

↓

- + 4 ^{o}C bekleme sıcaklığı

PCR programında, 94 ^{o}C'de → 1 dk ile ayrılma (denatürasyon: DNA iplikçiklerinin ayrılması), 31 ^{o}C'de → 1 dk ile yapışma (annealing: primerlerin DNA zincirindeki komplementer olan bölgelere yapışması) gerçekleşir. Çalışmada genellikle 31 ^{o}C kullanılmasına rağmen primerlerin Tm değerlerine göre bu sıcaklık değişmiştir, buna ait bilgiler daha önce Çizelge 3.4'de gösterilmiştir. Son olarak 72 ^{o}C'de → 2 dk uzama veya sentez (extention: DNA'ya yapışmış olan primer ile *Taq* DNA polimeraz yardımıyla DNA zincirinin sentezlenmesi) aşamaları gerçekleştirilmiştir. Toplam 45 döngü sonunda 72 ^{o}C'de → 10 dk bekletilerek sentezi tamamlanamayan amplifikasyon ürünlerinin sentezini tamamlaması amaçlanmıştır. Cihazdaki işlemin bitiminden sonra bekleme sıcaklığı olarak 4 ^{o}C kullanılmıştır. Denenen bu parametreler sonucunda uygun amplifikasyon ürünleri elde edilmiş olup, tüm PCR çalışmalarında bu koşullar kullanılmıştır. Çalışmanın güvenilirliği açısından tüm PCR çalışmalarının tekrarı yapılmıştır.

3.2.2.10. Elektroforez uygulamaları

PCR sonucu oluşan amplifikasyon ürünlerine ait DNA bant görüntülerinin elde edilebilmesinde takip edilen aşamalar aşağıda detaylı bir şekilde verilmiştir.

3.2.2.10.1. Tris-borik asit-EDTA (TBE) elektrolit çözeltisi

Bu çalışmada tampon çözelti olarak Tris-Borik asit-EDTA (TBE) çözeltisi kullanılmıştır. Çözeltide kullanılan EDTA (Etilen Diamin Tetra Asetik Asit) 0,5 Molar (M) ve pH 8.0 olacak şekilde hazırlanmıştır. Daha sonra 10X yoğunlukta çözelti hazırlanmaya başlanmıştır. Borik asit geç çözünen bir maddedir, bu nedenle manyetik karıştırıcı cihazı yardımıyla önce bir miktar saf suda borik asit çözünmüş, ardından Tris, son olarak ise EDTA ilave edilmiştir. Böylece tortu oluşması engellenmiştir. Kimyasallar tamamen çözündükten sonra çözeltinin son hacmi 1

litreye tamamlanmıştır. Bu stok çözeltiden 100 ml alınıp üzeri saf su ile 1 litreye tamamlanarak 1X yoğunlukta TBE elde edilmiştir. Bu çözelti hem elektroforez tankına konulmuş hem de agarozu eritmek için jel hazırlamada kullanılmıştır. Çizelge 3.6'da bu çözeltinin hazırlanmasında kullanılan kimyasallar ve miktarları verilmiştir.

Çizelge 3.6 10X TBE (1litre) stok çözeltisinin hazırlanmasında kullanılan kimyasal maddeler ve miktarları

10X stok TBE tampon çözeltisi (1litre)	**Miktar**
Tris	108 g
Borik asit	55 g
EDTA (0.5 M, pH8.0)	40 ml

3.2.2.10.2. % 2'lik agaroz jelin hazırlanması ve jel tepsisine dökülmesi

PCR'da elde edilen DNA parçalarını elektroforezde birbirinden ayırmak için agaroz jel kullanılmıştır. Jel hazırlarken, 1X yoğunluktaki TBE tampon çözeltiden 200 ml ölçülerek bir erlenmayere boşaltılmış ve üzerine 4 g agaroz (Serva Inc.) ilave edilmiştir. Bu karışım daha sonra yüksek sıcaklıkta (350–500 ^{o}C) çalışan bir mikrodalga fırın içinde 3-5 dk kaynatılarak eritilmiştir. Kaynama esnasında homojen bir karışım olması amacıyla zaman zaman erlenmayer hafifçe sallamak suretiyle karıştırılmıştır. Şeffaf bir görünüm kazanan jel mikrodalga fırından çıkarılarak soğumaya bırakılmıştır.

Jel soğurken jelin döküleceği tepsinin kenarlarına jelin dışarı taşmasını önleyen lastikler takılmış, DNA örneklerinin yükleneceği yuvaların oluşması için çok dişli (40 dişli) iki tarak yerleştirilmiştir (EK-C.1). Daha sonra soğumakta olan jelin içine PCR sonucu oluşan bantların görüntüleme cihazında ultra viyole (UV) ışığında görüntülenebilmeleri için 3.5 µl etidyum bromür (DNA'nın parlak, flüoresan bir

görünüm kazanmasını sağlar) ilave edilmiştir. Sürekli sallamak suretiyle soğutulan jel, jel kalıbında ve tarakların bulunduğu bölgelerde hava kabarcığı oluşmamasına dikkat edilerek tepsiye dökülmüş ve katılaşıncaya kadar soğumaya bırakılmıştır. Jel donduktan sonra taraklar ve lastikler jele zarar vermeden dikkatli bir şekilde çıkarılmış ve jel, jel tepsisi ile birlikte elektroforez tankının içine yerleştirilmiştir. Daha sonra hazırlanan 1X TBE elektrolit çözeltisinden jelin üst kısmını kapatacak kadar elektroforez tankına dökülmüştür.

3.2.2.10.3. PCR ürünlerinin agaroz jele yüklenmesi

PCR'da çoğaltılan DNA parçalarının elektroforez içindeki 1X TBE çözeltisine karışmasını önlemek ve yürütülmesi esnasında kolay takibi amacıyla yoğunluğu yüksek 6X yükleme boyası (loading dye) adı verilen bir çözelti hazırlanmıştır (EK-C.3). Yükleme boyası hazırlamada kullanılan kimyasallar ve oranları Çizelge 3.7'de verilmiştir.

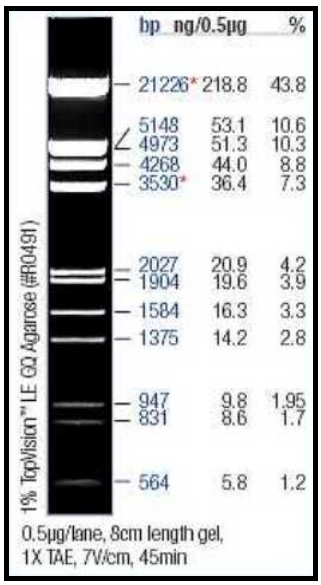
Çizelge 3.7 6X yükleme boyası hazırlamada kullanılan kimyasallar ve oranları

6X Yükleme Boyası (loading dye) Çözeltisi
10 mM Tris-HCl (pH 7.6)
% 0.03 bromophenolblue
% 0.03 xylene cyanol FF
%60 gliserol
60 mM EDTA

Agaroz jele yüklenecek 25 µl hacmindeki her bir PCR tüpüne hazırlanan yükleme boyası çözeltisinden 4 µl ilave edilmiş ve homojen bir şekilde karıştırılmıştır. Daha sonra, otomatik pipetman yardımıyla her tüpten 16 µl karışım

alınarak jelde hazır bulunan yuvalara sırayla yüklenmiştir (EK-C.2). Yükleme yaparken PCR ürünlerinin birbirine karışmamasına ve dağılmamalarına dikkat edilmiştir.

Çoğaltılan DNA parçalarının boyunu tespit etmek amacıyla örneklerin başındaki ve sonundaki yuvalara uzunluk markörü olarak *EcoR*I ve *Hind*III restriksiyon enzimleriyle kesilmiş, Lambda (λ) DNA'dan (Fermentas) 0.5 µg yüklenmiştir (Şekil 3.3).



Şekil 3.3 *EcoR*I ve *Hind*III restriksiyon enzimleriyle kesilmiş λ DNA, molekül ağırlığı ve yüzdesi (Anonymous, 2007b)

3.2.2.10.4. PCR ürünlerinin agaroz jelde yürütülmesi

Bir tarafına negatif (-), diğer tarafına pozitif (+) yük verilen elektroforez tankının (-) yüklü tarafına yüklenen DNA örnekleri, aynı yüklerin birbirini itmesi ve zıt yüklerin birbirini çekmesi prensibine göre, agaroz jelin konsantrasyonuna bağlı olarak oluşan porlardan zıt yüklü tarafa doğru DNA parçasının uzunluğu ile orantılı

bir şekilde hareket eder (küçük DNA parçaları, daha küçük por çapına sahip olan matriks şeklindeki jelde daha hızlı hareket ettikleri için büyük parçalardan daha çabuk yol alırlar). Parçaların boyları, örneklerle birlikte yürütülen uzunluğu belli standard markörler sayesinde net bir şekilde belirlenebilir (Özbek 2006).

Bu çalışmada agaroz jele yüklenen PCR ürünlerine yatay elektroforez cihazına (Thermo) bağlı güç kaynağı (Thermo EC250-90) ile 60 voltta 3-4 saat elektrik akımı verilmiştir (EK-D.2). Belirli aralıklarla (20-30 dk) görüntüleme cihazında UV ışığı altında jelden görüntü alınmış ve elektronik ortamda saklanmıştır.

3.2.2.10.5. Agaroz jelin görüntülenmesi ve RAPD bantlarının elde edilmesi

Elektroforetik olarak boylarına göre (boyları ile ters orantılı olarak) ayrıştırılan PCR ürünlerinin bulunduğu jel çözelti içerisinden alınarak görüntüleme cihazına (Vilber Lourmat) yerleştirilmiştir (EK-D.3). RAPD bantları UV ışığı altında görüntülenmiş, görüntüler jel dokümantasyon sistemindeki özel bir program içinde TIFF dosyası olarak saklanmıştır.

3.2.2.10.6. İstatistiki analizlerde kullanılacak verilerin elde edilmesi

İstatistiki analizlerde kullanılacak veriler RAPD bantlarının değerlendirilmesi ile elde edilmiştir. Bu teknik kullanılarak yaptığımız tekrarlı uygulamalarda elde edilen PCR ürünleri görüntüleme cihazında görüntülendiğinde, jelde parlak görünümlü bantların olduğu görülmüştür. Üzerinde çalışılan her bireyde benzerlik ya da farklılıkları belirlemek amacıyla, aynı satırdaki bu bantlara bakılarak elde edilen sonuçlar var (1) ya da yok (0) şeklinde skorlanarak kaydedilmiştir. Kaydedilen bu rakamlar sonucu elimizde Çizelge 3.8' deki gibi bir veri (**X**) matrisi oluşturulmuştur.

X matrisinde, "Ç" üzerinde araştırma yaptığımız bireyleri (Ç=1,...,m), "M" ise elde ettiğimiz markörleri (bantları) (M=1,...,n) ifade etmektedir.

Çizelge 3.8 Veri matrisi

	$Ç_1$	$Ç_2$	$Ç_3$	Ç...	$Ç_m$
M_1	1	0	0	...	1
M_2	1	1	0	...	1
M_3	0	0	1	...	0
M...	...	...	...	...	...
M_n	0	1	0	...	1

3.2.3. İstatistiki analiz metotları

3.2.3.1. Temel koordinatlar analizi (Principal Coordinate Analysis)

Temel Koordinatlar Analizi (TKoA), bireylerin benzerlik ya da farklılıklarının tespit edilmesinde kullanılan çok değişkenli bir istatistiki analiz yöntemidir. Benzerlik yada farklılık matrisleri kullanılarak analiz gerçekleştirilir.

TKoA'nin aşamaları aşağıda verilmiştir.

1. n özellik bakımından değerlendirilen m bireyden elde edilen veriler var (1) ya da yok (0) şeklinde kaydedilerek $n \times m$ boyutlu veri matrisi, $\mathbf{X}_{n \times m}$, elde edilir.
2. Veri matrisinden $n \times n$ boyutlu benzerlik/farklılık matrisi, $\mathbf{R}_{n \times n}$, elde edilir. Burada *i.* ve *j.* bireylerin benzerliklerinin (r_{ij}) hesaplanmasında değişik

katsayı formülleri kullanılmaktadır. Bitkilerle yapılan çalışmalarda, Chatfield ve Collins (1980) eşitlik 1 de verilen Jaccard tarafından geliştirilen katsayının (J) kullanılmasını tavsiye etmişlerdir. Ancak, eşitlik 2'de verilen simple matching (SM) ve eşitlik 3'te verilen Dice (D) benzerlik katsayıları da yaygın olarak kullanılmaktadır.

$$r_{ij} = a/(a+b+c) \quad (1)$$

$$r_{ij} = (a+d)/(a+b+c+d) \quad (2)$$

$$r_{ij} = 2a/(2a+b+c) \quad (3)$$

Burada r_{ij} = benzerlik katsayısı, *a*= *i.* ve *j.* bireylerin her ikisinde de olan özelliklerin toplamı, *b*=*i*. bireyde olup *j*. bireyde olmayan özelliklerin toplamı, *c*= *i.* bireyde olmayan *j.* bireyde olan özelliklerin toplamı, *d*=*i.* ve *j.* bireyde olmayan özelliklerin toplamıdır.

3. Benzerlik farklılık matrisi çifte merkezleme (double centering) yöntemiyle transformasyona tabi tutularak (her bir köşegen dışı elemandan satır ortalaması ve sütun ortalaması çıkartılır sonra genel ortalama ilave edilir) $\mathbf{S}_{n\times n}$ matrisi elde edilir.
4. **S** matrisi üzerinde Öz değer Öz vektör analizi yapılır. Elde edilen Öz vektörler ($\boldsymbol{a_j}$) temel koordinatlar matrisini, $\mathbf{A}_{n\times n}$, oluşturur (burada $a_{1j}^2 + a_{2j}^2 + a_{3j}^2 + ... + a_{mj}^2 = 1$ şeklinde bir kısıtlama uygulanır).

Elde edilen TKo' lar sırayla azalan bir öneme sahiptirler ve TKo' lar arasında ilişki yoktur (ortogonal). TKo' lar grafik yöntemiyle açıklamada sık sık kullanılır. Örneğin, her bir deney ünitesinin, ilk iki TKo kullanılarak oluşturulan koordinat sistemindeki yerlerinin belirlenmesiyle oluşturulan grafik, deney ünitelerinin kümelenmelerini tespit etmede etkili bir yöntemdir. Bu teknik moleküler markörlerden yararlanılarak deney ünitelerindeki kümelenmeleri açığa çıkarmak amacıyla da yaygın olarak kullanılmaktadır.

Bireyler arasındaki benzerlik/farklılık matrislerinin oluşturulmasında ve TKoA'de Rohlf (2002) tarafından geliştirilen NTSYS-pc ver. 2.10d (*Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System* - Sayısal Taksonomi ve Çok Değişkenli Analiz Sistemi) paket programı kullanılmıştır. Genetik markörlerde kayıp veriler olması durumunda bu paket program ile kayıp veriler dikkate alınarak analiz gerçekleştirilebilmektedir.

3.2.3.2. Kümeleme analizi (Cluster Analysis-UPGMA)

Kümeleme Analizi, dendogram olarak adlandırılan ve genellikle ağaca benzer diyagram şeklinde gösterilen, benzer bireyleri grup veya küme içinde birleştirmek yoluyla oluşturulan bir metottur. Yaygın olarak biyologlar tarafından kullanılmaktadır.

Dendogram oluşturulması bir birey ile başlar, diğer bireyleri bu bireye ilave ederek bütün bireyler bitene kadar devam eder. Dendogramın oluşturulmasına benzerlik yada farklılık matrisi ile başlanır ve aşağıdaki aşamalar gerçekleştirilir.

1. Çiftler halinde, bütün bireyler arasındaki benzerlik/farklılıktan oluşan (r_{ij}) **R** benzerlik/farklılık matrisi hesaplanır.
2. Birbirine en çok benzeyen iki birey arasında ilk küme oluşturulur.
3. Bu küme ve arta kalan bireyler arasındaki benzerlik/farklılık tekrar hesaplanır.
4. Birbirine en çok benzeyen iki birey (yada birey-küme, küme-küme) arasında ikinci küme oluşturulur.
5. Bu işleme bütün bireyler dendograma dahil oluncaya kadar devam edilir.

Kümeleme işleminde birkaç metot vardır. Bunlar arasındaki fark, oluşan küme ile diğer bireyler arasındaki benzerlik/farklılığın nasıl hesaplandığından kaynaklanır. Bu metotlar: en yakın komşu (nearest neighbour), en uzak komşu (furthest

neighbour) ve gurup ortalaması (group average) metotlarıdır. Bunlardan group average dominant markörlerin analizlerinde yaygın olarak kullanılır ve unweighted pair-groups method using arithmetic averages (UPGMA) olarak bilinir. Bu metotta iki küme arasındaki benzerlik/farklılık iki kümenin bütün bireylerinin ortalaması alınarak hesaplanır (Quinn ve Keough 2002).

3.2.3.3. Kümelerin güven sınırları (Bootstrap)

Kümeleme analizi ile oluşturulan dendogramda, kümelerin benzerlik/farklılık katsayıları da verilir. Ancak, burada iki bireyin oluşturduğu kümenin bir tür oluş ihtimali olarak düşünebileceğimiz, güven sınırlarına da ihtiyaç vardır. Bu amaçla Felsenstein (1985), parametrik olmayan değerlerin, güven sınırlarını elde etme yolu olarak, geriye iadeli tekrar örnekleme (bootstrapping) kullanmayı önermiştir. Bu işlem de elimizdeki veri matrisinden geriye iadeli olarak tekrar örnekleme (bootstrap) metoduna dayanır. Her bir örnekleme sonucu tekrar dendogram oluşturulur (bu işlem çok sayıda gerçekleştirilir 1000 ya da 2000 defa gibi). Sonuçta orijinal veri setimizde elde edilen iki birey arasındaki bir kümenin, geriye iadeli tekrar örnekleme sonucu kaç defa elde ettiğimizin frekansı bulunur. Bu değer bize o iki birey arasında oluşan kümenin güven sınırlarını verir. Bu işlem orijinal veri setindeki bütün kümeler için yapılır ve güven sınırları bu metotla tespit edilir (Immanuel ve Nelson 1996).

Bu çalışmada geriye iadeli tekrar örnekleme analizleri Immanuel ve Nelson (1996) tarafından geliştirilen WINBOOT paket programıyla yapılmıştır. Program kayıp veri olduğunda değerlendirme yapamadığından geriye iadeli tekrar örnekleme analizleri esnasında kayıp veri olan aksesyonlar çıkarılmıştır.

3.2.3.4. Benzerlik/farklılık matrislerinin karşılaştırılmasında Mantel Z test

Mantel testi (Mantel 1967) genelleştirilmiş regresyon tekniğine dayanır. İki özellik bakımından bireyler arasındaki benzerlik yada farklılık matrislerinin birlikteliklerinin istatistiki olarak test edilmesinde kullanılır. Herhangi bir dağılım gerektirmediğinden dolayı, parametrik olmayan bir testtir. Genel olarak benzerlik/farklılık matrislerinin aralarında fark olup olmadığını test etmek amacıyla kullanılır. Matrislerin $n_{\times}n$ boyutlu kare matrisleri olması gerekir. Matrisler simetrik olabileceği gibi, simetrik olmayan matrisler üzerinde de Mantel test uygulanabilir. Test iki matris arasında birliktelik bakımından fark olmadığı hipotezini (H_o) test eder. Testin uygulaması ile ilgili bir örnek, Schnell ve ark. (1985) tarafından verilmiştir. Mantel test ile beraber, iki matris elemanları arasındaki ilişkinin bir ölçüsü olarak (pearson) korelasyon katsayısı hesaplanır. Ancak buradaki korelasyon aşağıdaki gibi yorumlanır.

$r \geq 0.9$ kuvvetli uyum
$0.9 > r \geq 0.8$ iyi uyum
$0.8 > r \geq 0.7$ zayıf uyum
$r < 0.7$ çok zayıf uyum

Bu çalışmada SET1 ve SET2 verilerinin TKoA esnasında elde edilen benzerlik/farklılık matrisleri ve SET2 verilerinden SM ve J benzerlik katsayıları ile elde edilen matrislerin karşılaştırılmalarında NTSYS-pc paket programının MXCOMP (Matrix comparison plot) komutuyla Mantel testleri gerçekleştirilmiştir.

Mantel test parametrik bir test olmadığından, elde edilen Z değerinin oluş ihtimalini tahmin etmek için orijinal verilerden geriye iadesiz tekrar örnekleme (permütasyon) yapılarak test yapılır. MXCOMP komutu permütasyon testini de içerir. Bu çalışmada elde edilen Z değerinin oluş ihtimali permütasyon testiyle amprik olarak elde edilmiştir.

3.2.3.5. Nei ve Li genetik benzerlik, genetik mesafesi

Nei ve Li'ye (1979) göre genetik benzerlik aşağıdaki formüle göre hesaplanmaktadır.

$$\hat{F} = 2n_{xy} / (n_x + n_y)$$

$\hat{F}$ = Bireyler arasındaki akrabalık oranını

n_{xy} = Her iki bireyde bulunan (ortak) DNA bantlarının sayısı

n_x = X bireyinde skorlanan DNA bantları sayısı

n_y = Y bireyinde skorlanan DNA bantları sayısını ifade etmektedir.

$1 - \hat{F}$ de genetik mesafeyi vermektedir.

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

Türkiye'nin farklı coğrafik bölgelerinden kaçak ekimler sonucu ele geçirilerek, İstanbul Adli Tıp Kurumu tarafından Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi'ne teslim edilen kenevir tohumları arasında akrabalık bulunup bulunmadığının belirlenmesi ve akrabalıkların belirlenmesinde kullanılan istatistiki metotların değerlendirilmesi amacıyla hazırlanan bu çalışmada elde edilen sonuçlar aşağıda sunulmuştur.

4.1. Moleküler Genetik Çalışmalara Ait Sonuçlar

4.1.1. DNA izolasyonu sonuçları

Çalışmada kullanılan aksesyonlara ait DNA izolasyon sayıları Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1 Çalışmada kullanılan aksesyonlara ait DNA izolasyon sayıları

Çeşit no	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**	**13**	**14**	**15**
İzolasyon sayısı	9	4	9	9	9	9	1	7	9	9	9	9	9	9	9
Çeşit no	**16**	**17**	**18**	**19**	**20**	**21**	**22**	**23**	**24**	**25**	**26**	**27**	**28**	**29**	
İzolasyon sayısı	9	5	9	9	1	9	1	1	1	2	1	1	1	2	

Toplam 29 aksesyona ait 172 bireyden DNA izolasyonu yapılmış ve elde edilen DNA'lar %1'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülerek DNA'nın RAPD-PCR

çalışmasının yapılması için uygun olduğu gözlenmiştir. Şekil 4.1'de bu çalışmada kullanılan DNA izolasyon setlerinden bir tanesine ait örnek bir DNA jel görüntüsü verilmiştir.



Şekil 4.1 Çalışmada kullanılan örneklerin DNA jel görüntüleri

Elde edilen A_{230}, A_{260}, A_{280}, A_{320}, A_{260}/A_{280}, A_{260}/A_{320} ve DNA konsantrasyon değerleri EK-E'de verilmiştir.

Bazı aksesyonlarda yeterli sayıda tohum çimlenmediği için (Çizelge 4.1) çimlenen bitki sayısı kadar DNA örneği ile SET2 tüpleri hazırlanmıştır. Tek bitkinin çimlendiği aksesyonlarda (7, 20, 22, 23, 24, 26, 27, 28) ise bu bireyler hem SET1 hem de SET2 olarak kullanılmıştır. Bu bireylerden C20 (Hatay/Dörtyol) aksesyonuna ait DNA örneği hem iki sette de kullanılması, hem de DNA konsantrasyonunun düşük olması nedeniyle, çalışmanın yapıldığı 22 primerin ancak 11 tanesine yeterli olmuştur.

4.1.2. RAPD amplifikasyon sonuçları

Çalışmada toplam 25 adet RAPD primeri denenmiştir. Bu primerlerden 22 tanesi, çalıştığımız bireylerde skorlanabilir DNA bantları çoğaltmıştır. Çalışmada kullanılan 22 RAPD primeri ile 29 kenevir aksesyonunda SET1'de 264, SET2'de ise

241 DNA bantı elde edilmiştir. Üretilen bantların polimorfizm oranları yüksek olup, SET1'de % 93, SET2'de % 92'dir. SET1'de toplam 16, SET2'de ise toplam 18 bant monomorfiktir. RAPD B1 primeri SET1'de ve SET2'de 32 bantla en fazla bant üreten primer olmuştur. SET1'de RAPD L3, RAPD B11 ve RAPD B13 primerleri 6 bantla, SET2'de ise RAPD B12.2 primeri 4 bantla en az bant üreten primerler olmuşlardır. Bu çalışmada kullanılan her bir RAPD-PCR amplifikasyonlarına ait primer sekansları, T_m sıcaklıkları, bp değerleri, G+C oranları, yapışma sıcaklıkları, SET1 ve SET2'ye ait skorlanan bant sayıları, polimorfik bant sayıları ve yüzde polimorfik bant oranları Çizelge 4.2' de verilmiştir.

Jagadish ve ark. (1996), 4 RAPD primeri kullanarak elde ettikleri 102 DNA bantıyla, Avustralya ve Papua Yeni Gine orijinli 51 tane kenevir örneğini orijinlerine göre ayırmayı başarmışlardır. Bunun neticesinde araştırıcılar, çok sayıda örnek kullanılarak tanımlanamayan aksesyonların bu teknikle ayrılmasının mümkün olabileceğini bildirmişlerdir.

Faeti ve ark. (1996), Avrupa Kıtası'ndan İtalya ve Macaristan'dan ve Avrupa Kıtası dışından elde ettikleri 13 adet kenevir aksesyonu üzerinde yaptıkları bir çalışmada, 10 RAPD primeri kullanarak 200 DNA bantı elde etmişlerdir. Yaptıkları analizler sonucunda, üç gen havuzu tespit ederek kenevir aksesyonlarını orijinlerine göre ayırmayı başarmışlardır. Bu çalışma ile araştırıcılar, çeşitli coğrafik bölgelerden elde edilen kenevir örneklerinin RAPD-PCR tekniği kullanılarak birbirinden ayrılabileceğini bildirmişlerdir.

Yapılan bir diğer çalışmada Shirota ve ark. (1998) RAPD ve RFLP tekniklerini kullanarak Meksika kökenli bazı kenevir türlerinin genetik akrabalıklarını tespit etmeye çalışmışlardır. RAPD tekniğinin Tochigirisho ve Nara hatlarının birbirinden ayrılmasında oldukça başarılı bir teknik olduğunu belirtmişlerdir.

Yukarıdaki çalışmalara benzer şekilde bu çalışmada da Türkiye'nin farklı coğrafik bölgelerinden kaçak ekimler sonucu ele geçirilen 29 kenevir aksesyonu arasındaki genetik akrabalığın belirlenmesinde RAPD tekniği kullanılarak başarılı

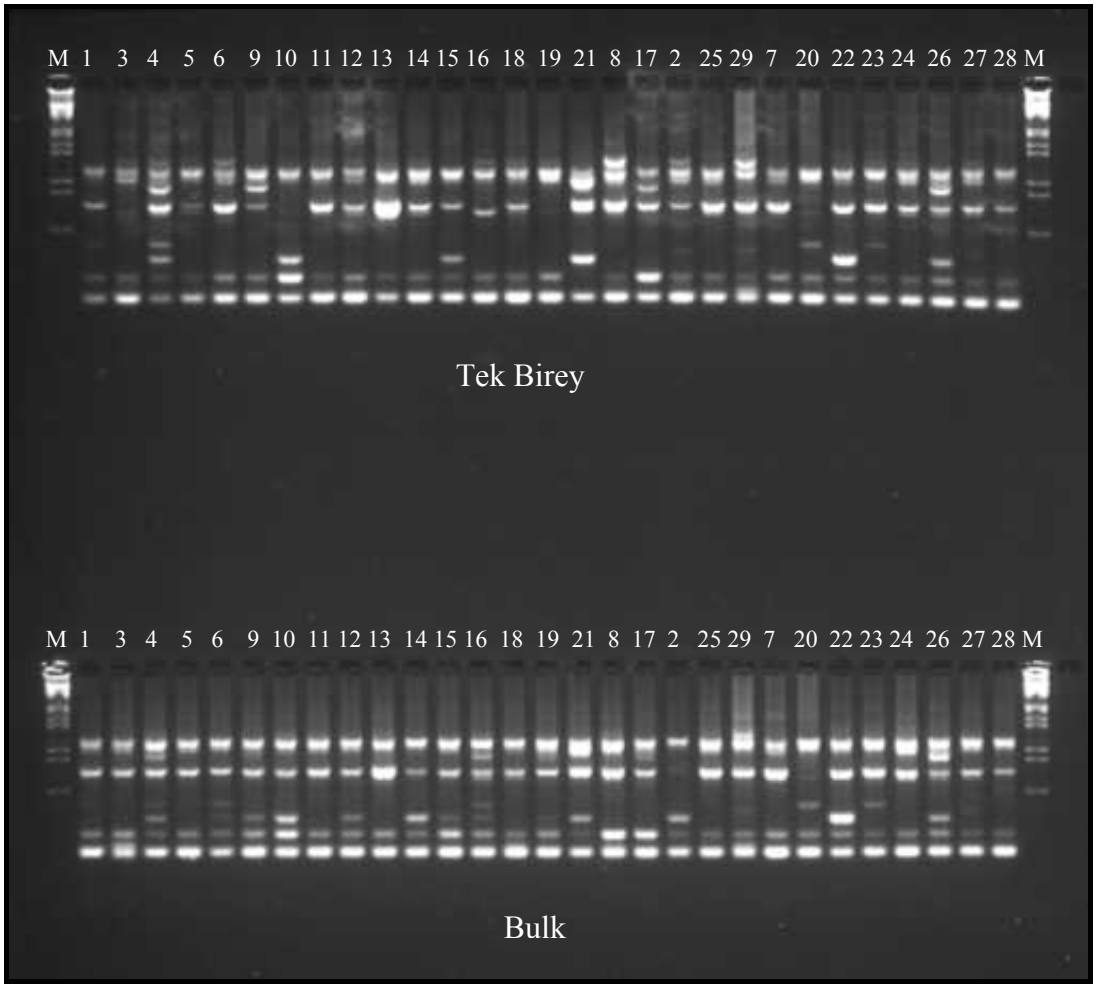
sonuçlar elde edilmiştir. Çalışmada kullanılan tohumlar saf hatlar olmadığı için SET1 sonuçlarında aksesyonlar arasında belirgin bir gruplaşma gözlenmezken, populasyonu temsil ettiği düşünülen SET2'ye ait sonuçlarda Türkiye'nin doğusundaki illerden elde edilen kenevir aksesyonları ile Türkiye'nin batısındaki illerden elde edilen kenevir aksesyonlarının iki farklı grup oluşturduğu gözlenmiştir.

Numune yetersizliği nedeniyle SET2'de eksik olan bulk bireylerinin, tüm aksesyonlarda dokuz olması durumunda elde edilen bu sonuçtan çok daha hassas ve güvenilir sonuçların elde edilebileceği düşünülmektedir.

Çizelge 4.2 Moleküler genetik çalışmalarda kullanılan primerlere ve RAPD-PCR amplifikasyonlarına ait bilgiler

Primer	Primer sekansı	T_m (°C)	bp değeri	GC (%)	Yapışma sıcaklığı (°C)	Tek birey analizi			Bulk analizi		
						Skorlanan bant sayısı	Polimorfik bant sayısı	Polimorfik bant oranı (%)	Skorlanan bant sayısı	Polimorfik bant sayısı	Polimorfik bant oranı (%)
RAPD L2	5'- GTT TCG CTC C -3'	32	10	60	34	19	18	94.7	13	12	92.3
RAPD L3	5'- GTA GAC CCG T -3'	32	10	60	33	6	4	66.6	8	6	75.0
RAPD L4	5'- AAG AGC CCG T -3'	32	10	60	33	14	12	85.7	11	8	72.2
RAPD L5	5'- AAC GCG CCG T -3'	32	10	60	34	13	9	69.2	15	12	80.0
RAPD L6	5'- CCC GTC AGC A -3'	34	10	70	34	10	9	90.0	8	6	75.0
RAPD B1	5'- CCC GCC GTT G -3'	36	10	80	35	32	32	100	32	32	100
RAPD B2	5'- TGC GCC CTT C -3'	34	10	70	33	14	14	100	8	8	100
RAPD B3	5'- GAT GAC CGC C -3'	34	10	70	34	10	9	90	8	8	100
RAPD B4	5'- CTC ACC GTC C -3'	34	10	70	33	11	11	100	13	13	100
RAPD B5	5'- GAC GGA TCA G -3'	32	10	60	31	20	20	100	18	17	94.4
RAPD B6	5'- CCG ATA TCC C -3'	32	10	60	31	10	8	80.0	10	7	70.0
RAPD B7	5'- TTG GTA CCC C -3'	32	10	60	31	10	9	90.0	7	6	85.7
RAPD B8	5'- ACG GTA CCA G -3'	32	10	60	31	9	9	100	9	9	100
RAPD B9	5'- CCA GCG TAT T -3'	30	10	50	29	8	8	100	11	11	100
RAPD B10	5'- CTA CTG CGC T -3'	32	10	60	31	10	10	100	10	10	100
RAPD B11	5'- CCT CTG ACT G -3'	32	10	60	31	6	6	100	7	7	100
RAPD B12.2	5'- TCC GAT GCT G -3'	32	10	60	31	7	7	100	4	4	100
RAPD B13	5'- TTC AGG GTG G -3'	32	10	60	31	6	6	100	8	8	100
RAPD B14	5'- TCC TGG TCC C -3'	34	10	70	33	12	12	100	8	8	100
RAPD B16	5'- AGT CGG GTG G -3'	34	10	70	33	11	9	81.8	11	9	81.8
RAPD B17	5'- GTC GTT CCT G -3'	32	10	60	31	17	17	100	13	13	100
RAPD B18	5'- GAG TCA GCA G -3'	32	10	60	31	9	9	100	9	9	100
Sonuçlardan elde edilen toplam ve ortalama değerler						**264**	**248**	**% 93**	**241**	**223**	**% 92**

Çalışmada kullanılan 22 adet primerden elde edilen sonuçlar ve RAPD-PCR çalışmalarına ait örnek bir jel görüntüsü aşağıda verilmiştir. Bu çalışmaya ait diğer bazı jel görüntüleri EK-F'de sunulmuştur.



Şekil 4.2 RAPD L4 primerinin kenevir aksesyonlarında oluşturduğu DNA bantları

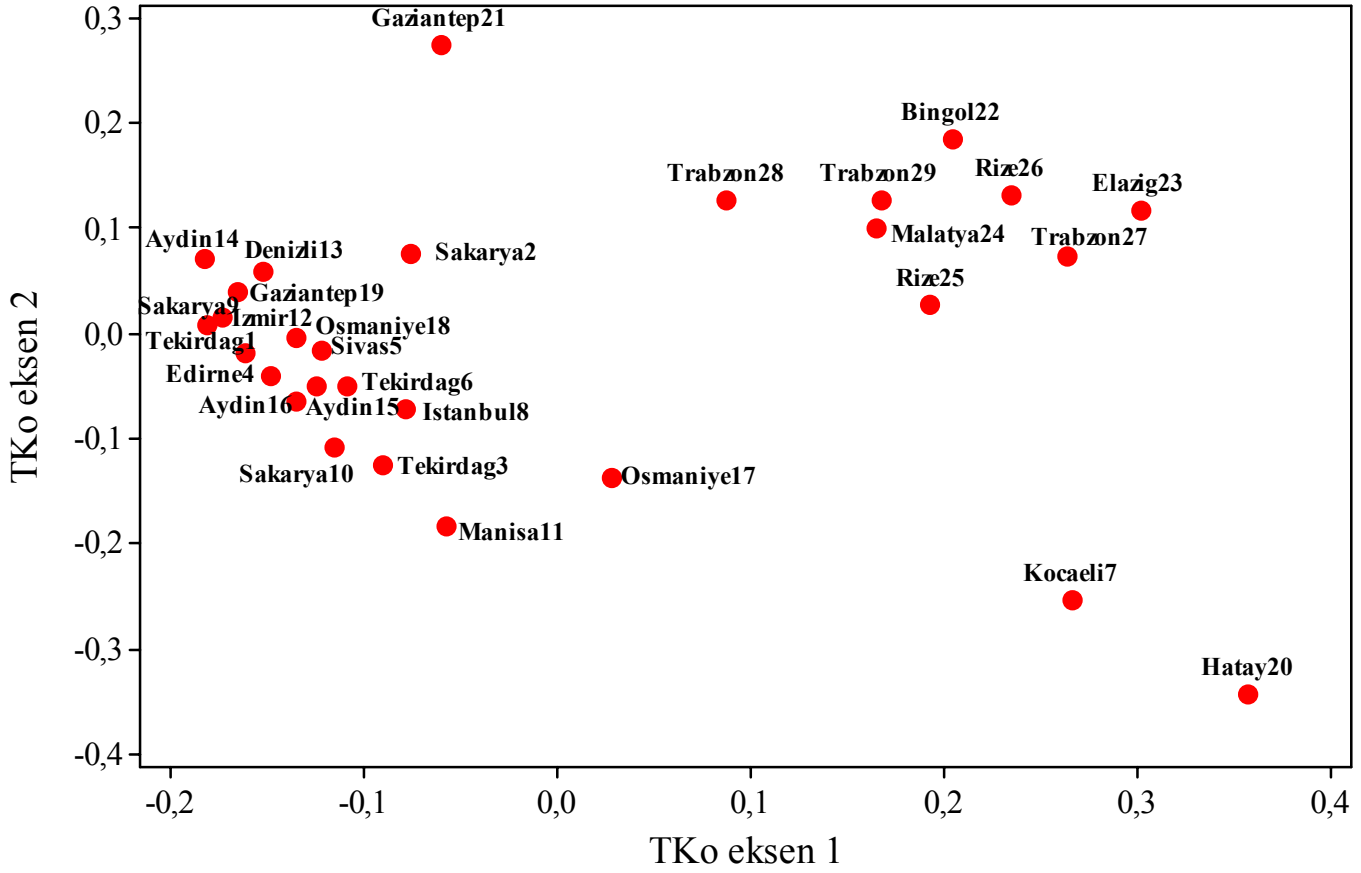
4.1.3. İstatistiki analiz sonuçları

4.1.3.1. Temel koordinatlar analizi (TKoA) sonuçları

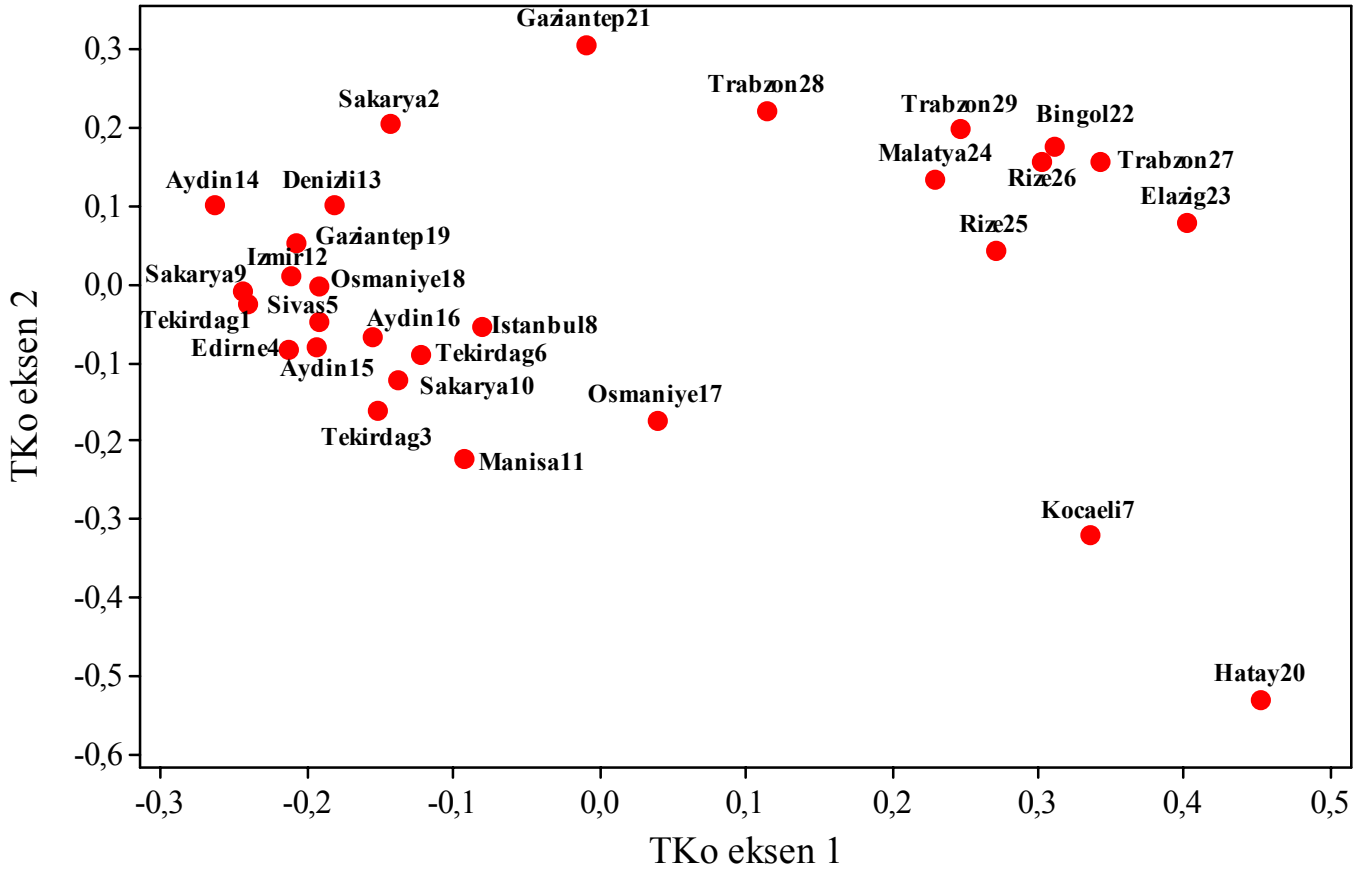
SET2'ye ait rakamların SM benzerlik katsayısı kullanılarak TKoA sonucu elde edilen 1. ve 2. koordinat eksenleri üzerine, kenevir bitkilerinin orijinlerine göre yerleştirilerek elde edilen grafik Şekil 4.3'de verilmiştir. Grafikte de görüldüğü gibi 1. eksenin, elde edilen kenevir bitkilerini temelde iki gruba ayırdığı görülmektedir. Türkiye'nin batı illerinden elde edilen kenevir bitkileri kendi aralarında gruplaşırken (grup 1), Türkiye'nin doğu illerinden elde edilen kenevir bitkileri de başka bir grup (grup 2) oluşturmuşlardır. C21 (Gaziantep), C7 (Kocaeli) ve C20 (Hatay) aksesyonları iki grubun alt ve üst köşegenlerinde fakat iki gruba da yaklaşık olarak aynı mesafede yer almışlardır. Bu da, batı illerindeki illegal kenevir üreticileri arasında bir ilişki olduğuna, benzer şekilde doğu illerindeki illegal kenevir üreticilerinin de kendi aralarında ilişkili olduğu sonucuna götürebilir. Buradaki ilişki kenevir materyali alışverişi niteliğindedir.

SET2'ye ait rakamların J benzerlik katsayısı kullanılarak TKoA sonucu elde edilen iki boyutlu grafik Şekil 4.4'de verilmiştir. SET2'ye ait verilerin J katsayısı kullanılarak elde edilen sonuçlar SM katsayısı kullanılarak elde edilen sonuçlara çok benzemektedir.

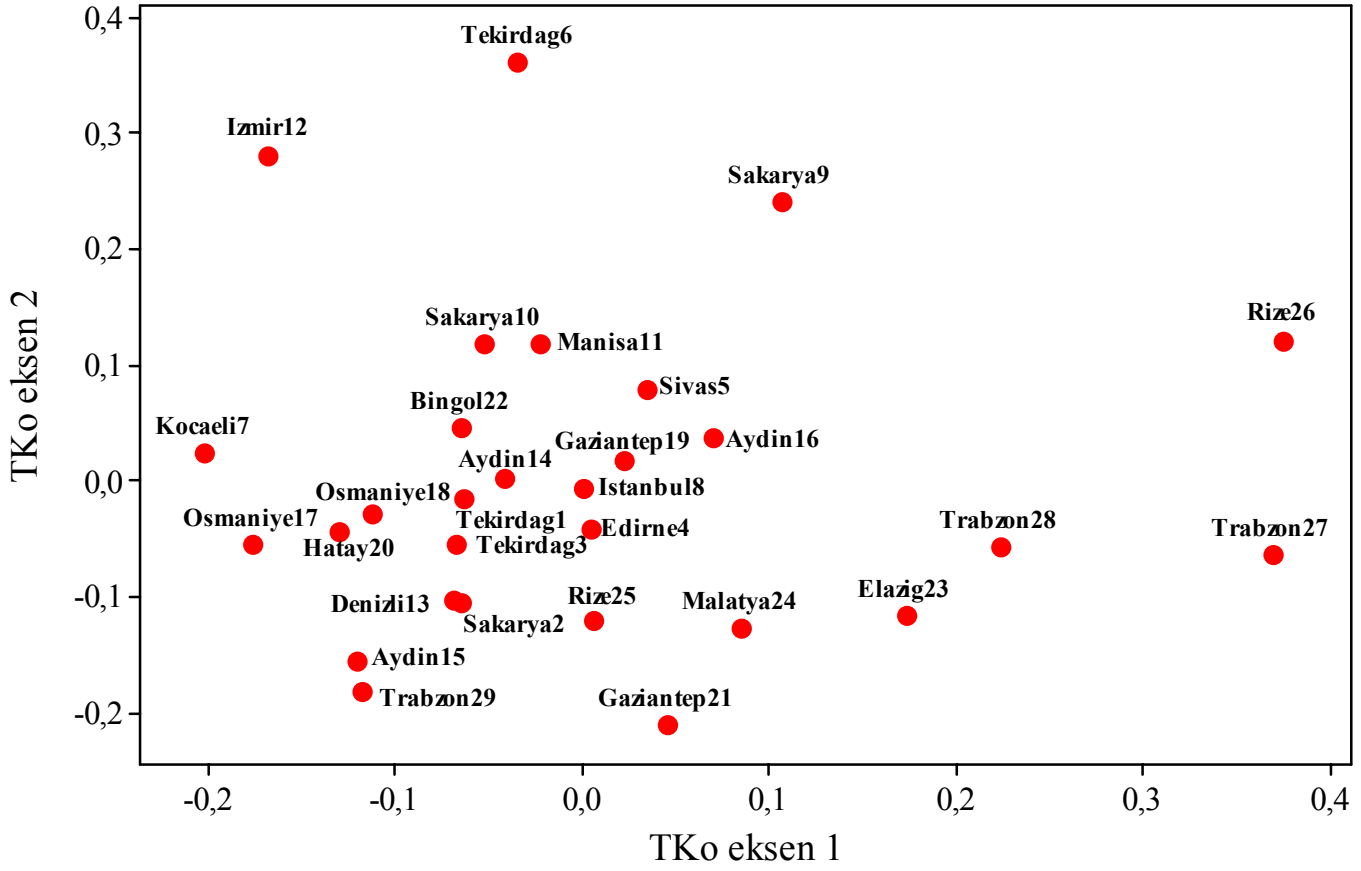
SET1'e ait rakamların SM ve J benzerlik katsayıları kullanılarak TKoA sonucu elde edilen 1. ve 2. koordinat eksenleri üzerine, kenevir bitkilerinin orijinlerine göre yerleştirilerek elde edilen grafikler Şekil 4.5 ve 4.6'da verilmiştir. SET2'den farklı olarak, SET1'deki verilerin TKoA sonucu kenevir bitkilerinin elde edildikleri orijinlere göre gruplaşma görülmemiştir.



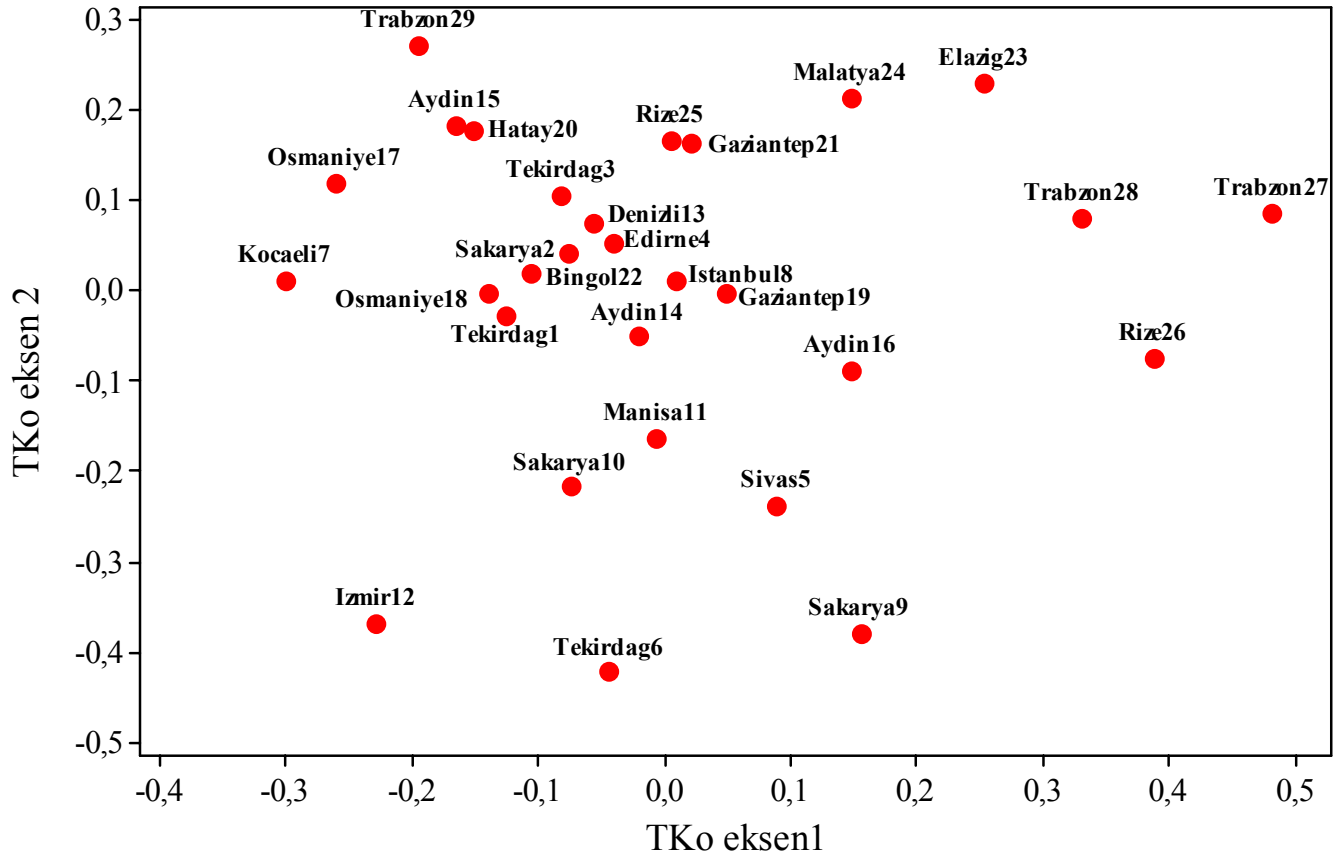
Şekil 4.3 SET2'deki 29 kenevir aksesyonunun SM katsayısı kullanılarak elde edilmiş 1. ve 2. temel koordinat eksenleri üzerinde dağılımı



Şekil 4.4 SET2'deki 29 kenevir aksesyonunun J katsayısı kullanılarak elde edilmiş 1. ve 2. temel koordinat eksenleri üzerinde dağılımı



Şekil 4.5 SET1'deki 29 kenevir aksesyonunun SM katsayısı kullanılarak elde edilmiş 1. ve 2. temel koordinat eksenleri üzerinde dağılımı

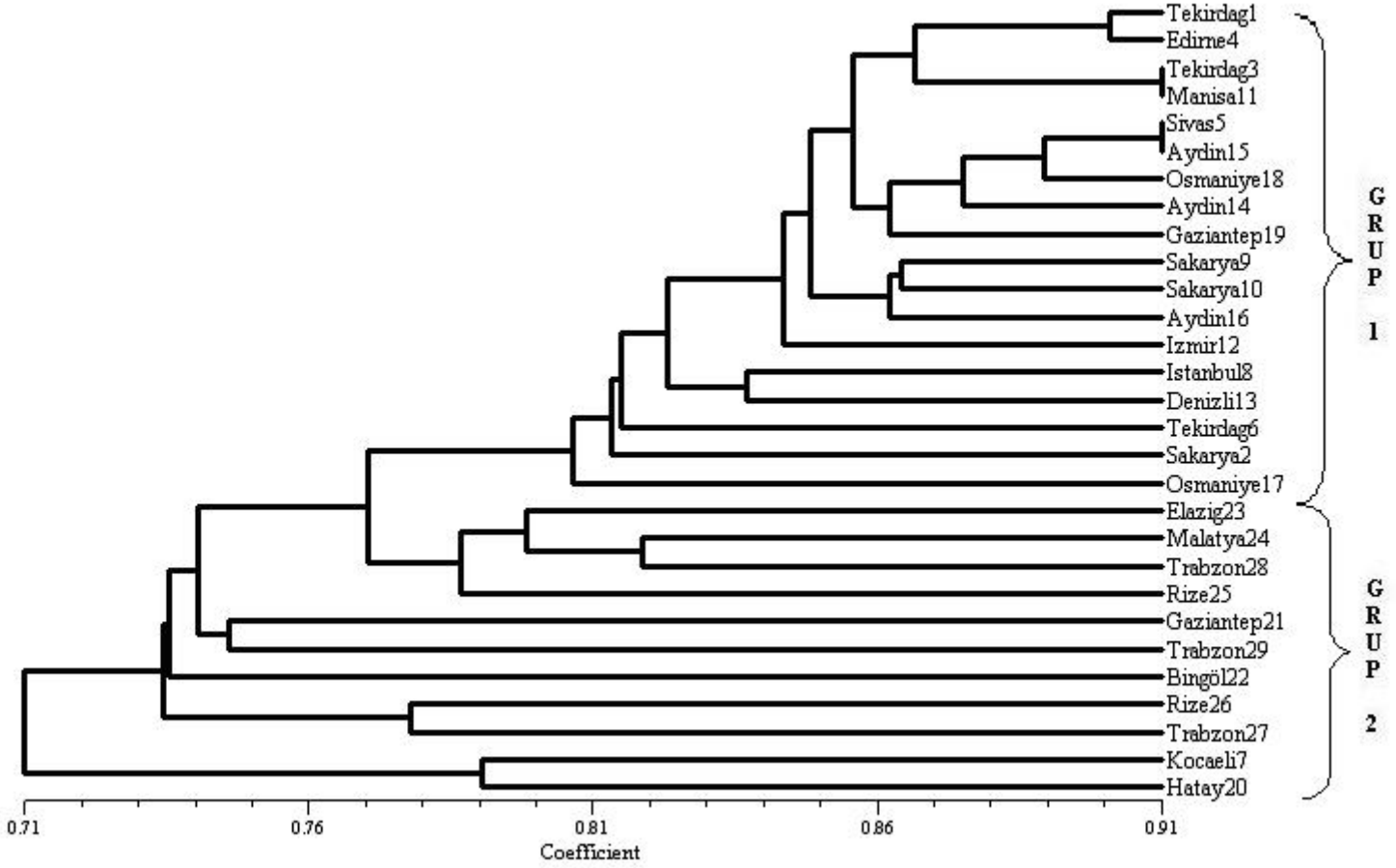


Şekil 4.6 SET1'deki 29 kenevir aksesyonunun J katsayısı kullanılarak elde edilmiş 1. ve 2. temel koordinat eksenleri üzerinde dağılımı

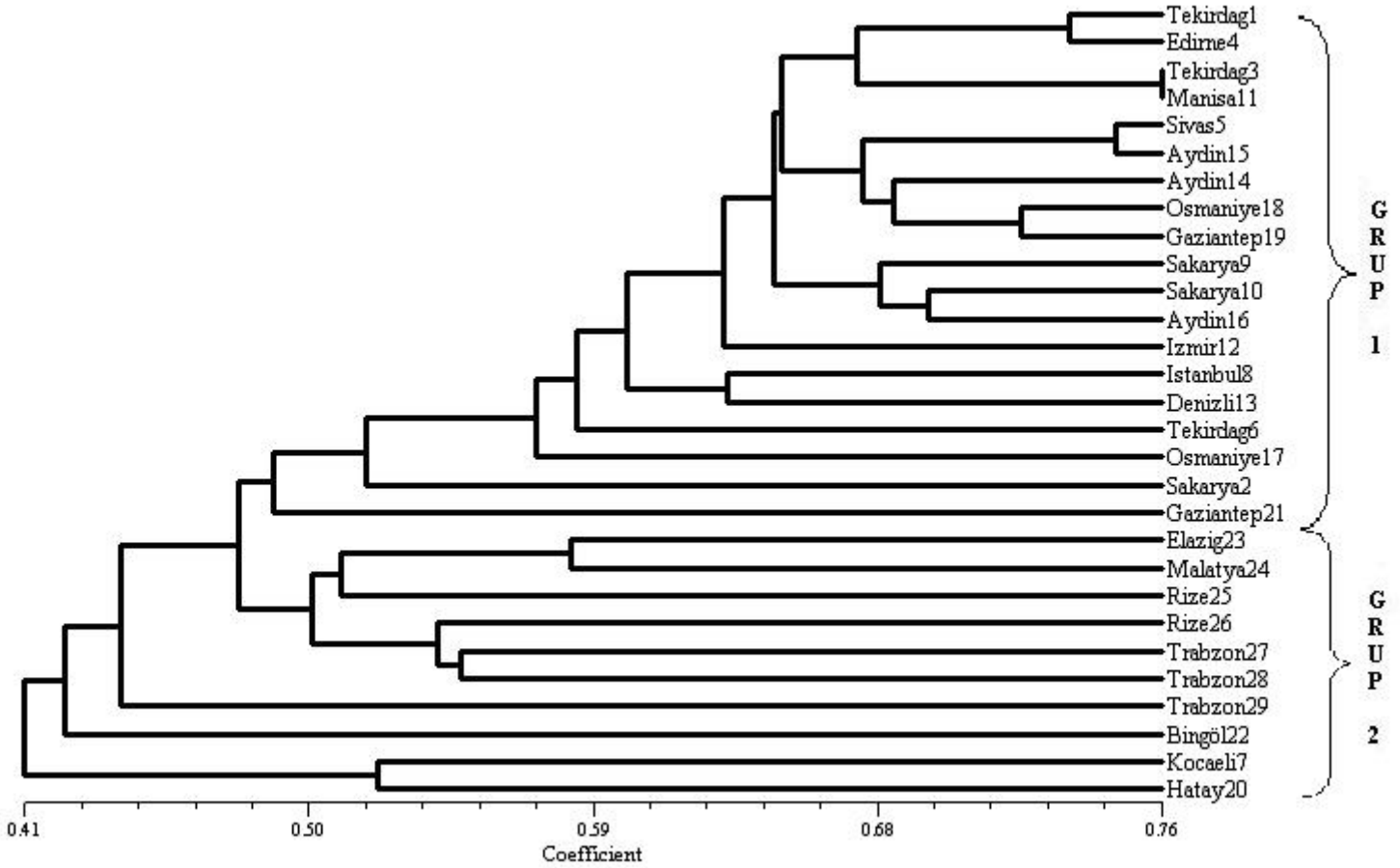
4.1.3.2. Kümeleme analizi sonuçları

SET2'den SM ve J katsayıları ile hesaplanan benzerlik/farklılık matrisleri üzerinde yapılan kümeleme analizi sonucu elde edilen dendogramlar Şekil 4.7 ve Şekil 4.8'de verilmiştir. Bu sonuçlar aynı veri setinin TKoA sonuçlarıyla örtüşmektedir. TKoA'nde 1. grubu oluşturan kenevir bitkileri, kümeleme analizinde de benzer bir şekilde bir ana dal oluşturmuşlardır. Bu grubun benzerlik oranı SM benzerlik indeksine göre % 81, J benzerlik indeksine göre % 58 olmuştur. İkinci gruptaki kenevir bitkileri de bu ana dalla birleşmişlerdir. Genel benzerlik oranı SM benzerlik indeksine göre %71, J benzerlik indeksine göre % 41 olmuştur. Her iki analiz sonucunda da C3-C11 (Tekirdağ-Manisa) aksesyonları bir dal oluşturmakta, SM benzerlik indeksinde bu değer % 91 olarak bulunurken, J benzerlik indeksinde % 76 olmuştur. Benzer bir ilişki C5-C15 (Sivas-Aydın) aksesyonlarında da görülmekte olup, SM benzerlik indeksinde bu değer % 91 olarak bulunurken, J benzerlik indeksinde % 75 olmuştur.

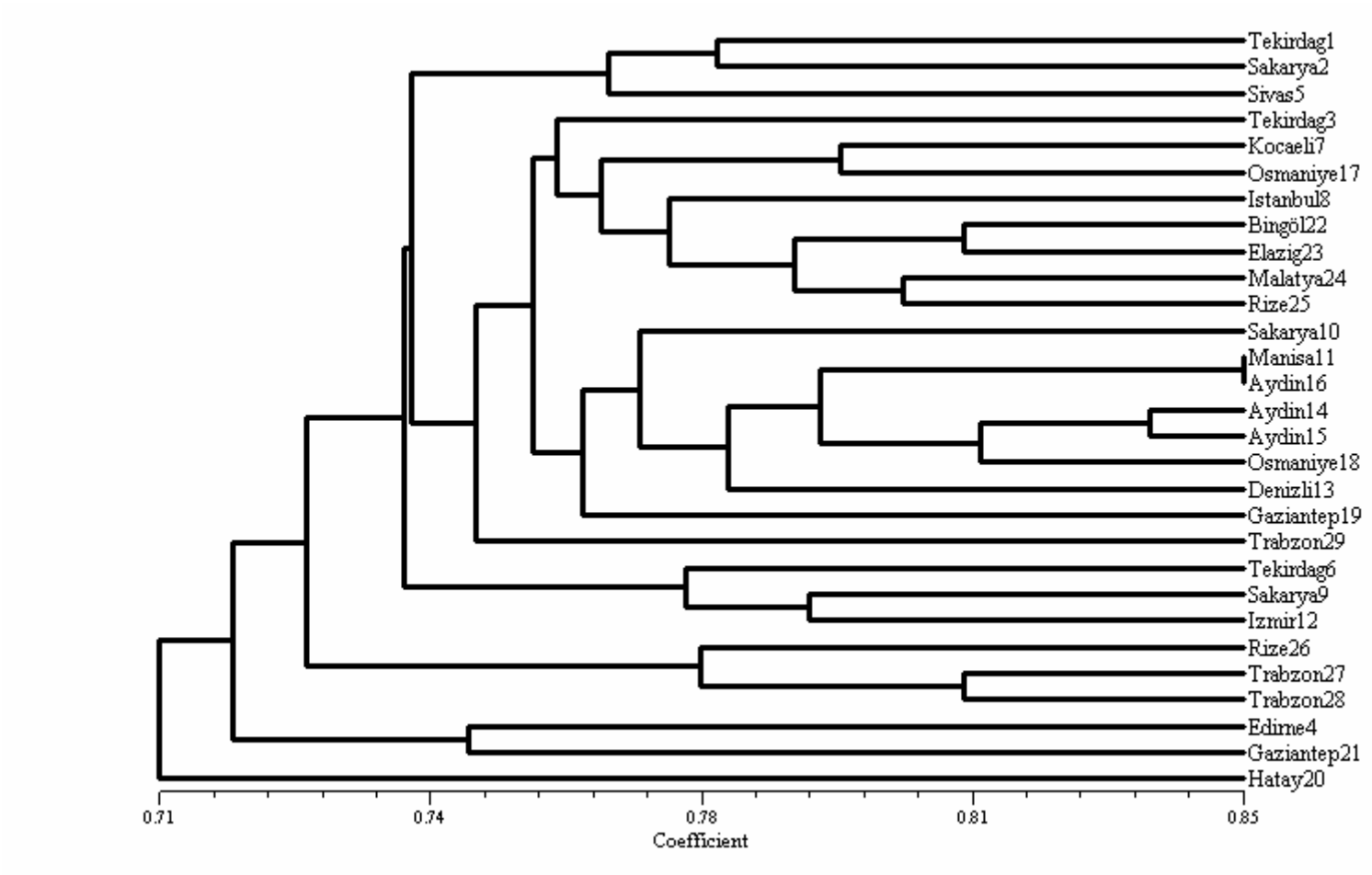
SET1'in her iki katsayı ile hesaplanan benzerlik/farklılık matrisleri üzerinde yapılan kümeleme analizi sonuçları Şekil 4.9 ve Şekil 4.10'da verilmiştir. Bu sonuçlar, SET2'de olduğu gibi, TKoA sonuçlarıyla örtüşmektedir. SET2'den farklı olarak, SET1'deki verilerin kümeleme analizi metoduyla analizi sonucu kenevir bitkilerinin elde edildikleri coğrafik orijinlere göre guruplaşma görülmemiştir. Genel benzerlik oranı SM benzerlik indeksine göre %71, J benzerlik indeksine göre % 35 olmuştur. SET1'de her iki katsayı ile yapılan analizlerde C11-C16 (Manisa-Aydın) aksesyonları bir dal oluşturmakta, SM benzerlik indeksine göre bu değer % 85 olarak bulunurken, J benzerlik indeksinde % 62 olmuştur.



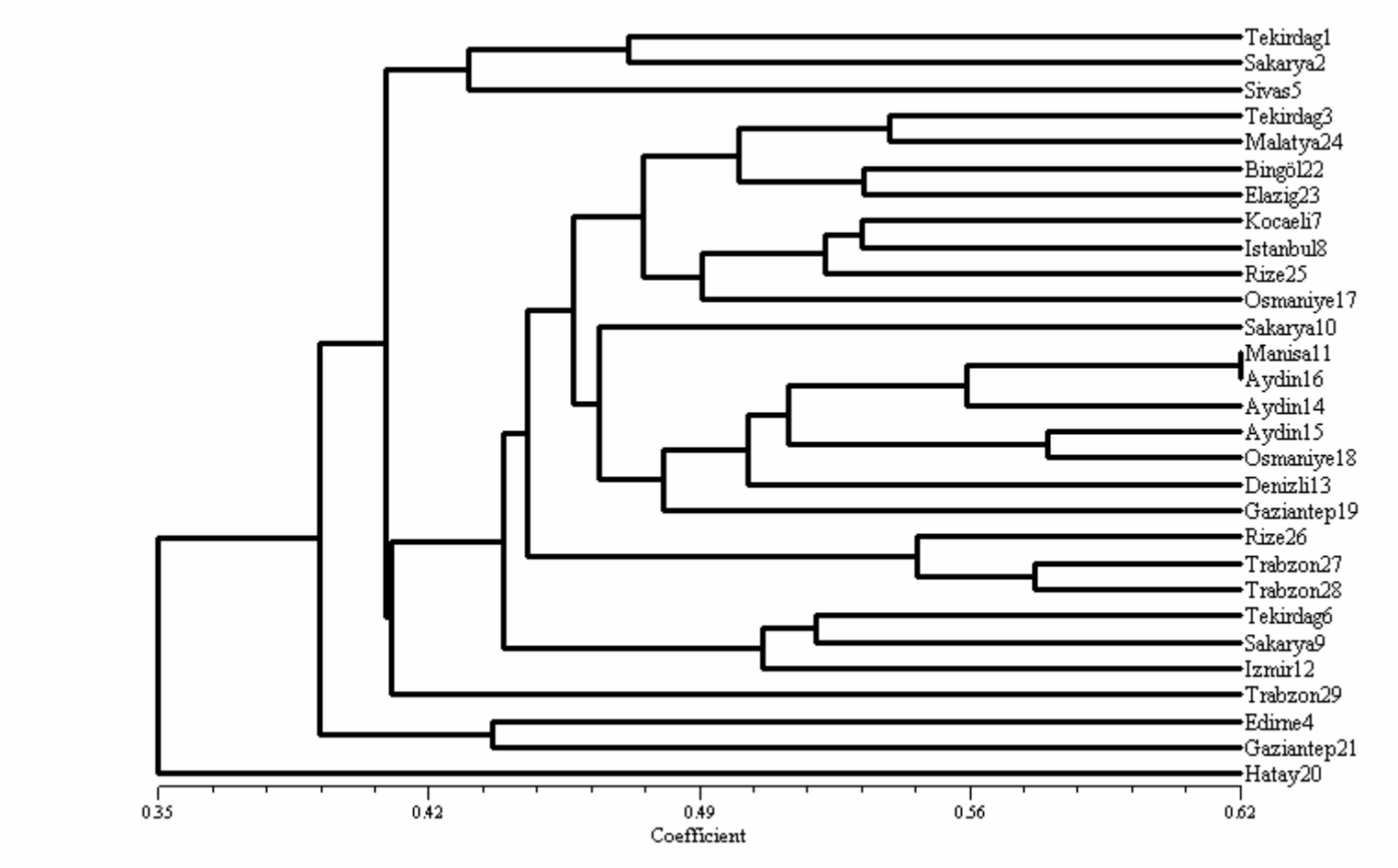
Şekil 4.7 SET2'deki 29 kenevir aksesyonunun SM katsayısı kullanılarak elde edilmiş UPGMA dendogram



Şekil 4.8 SET2'deki 29 kenevir aksesyonunun J katsayısı kullanılarak elde edilmiş UPGMA dendogram



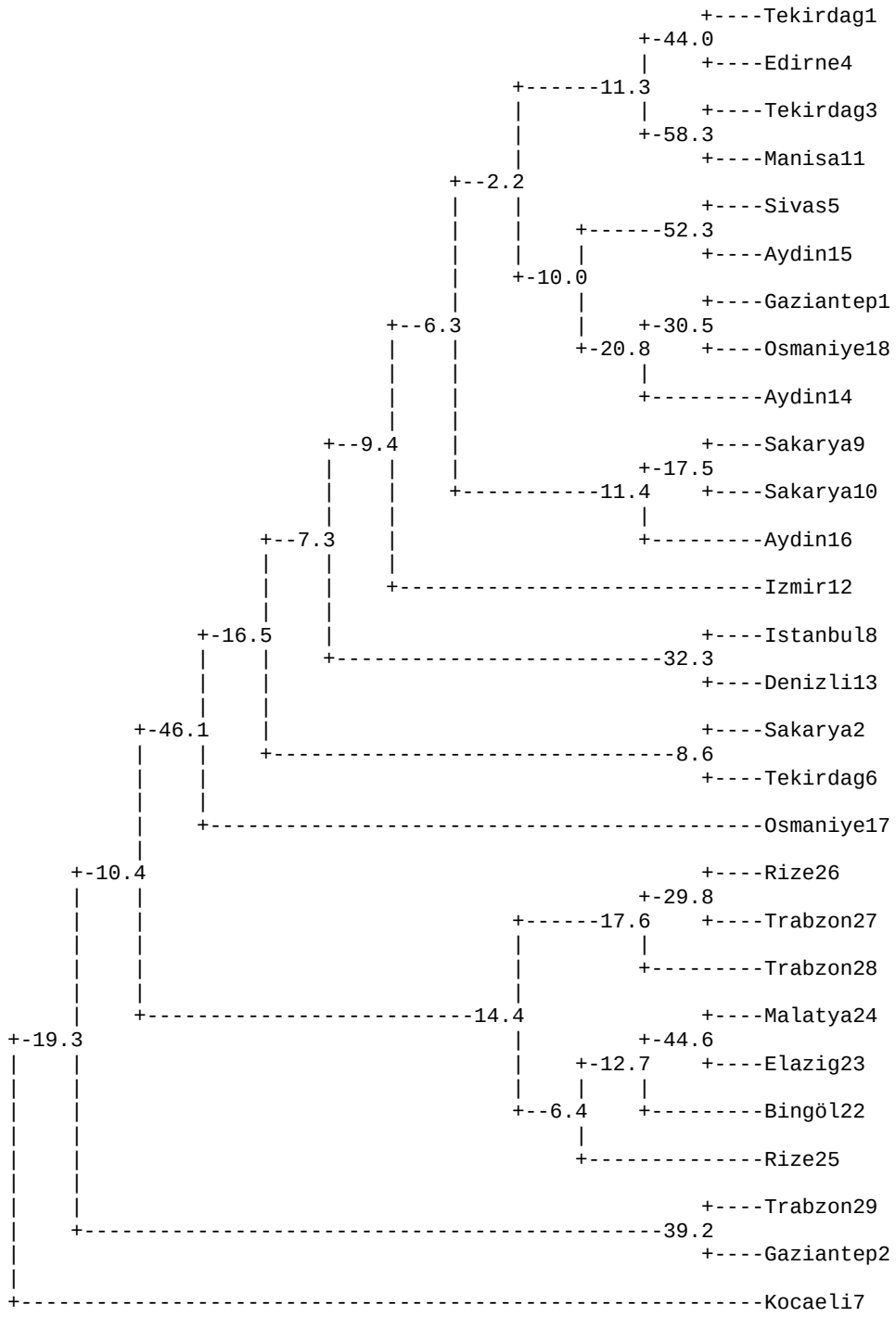
Şekil 4.9 SET1'deki 29 kenevir aksesyonunun SM katsayısı kullanılarak elde edilmiş UPGMA dendogram



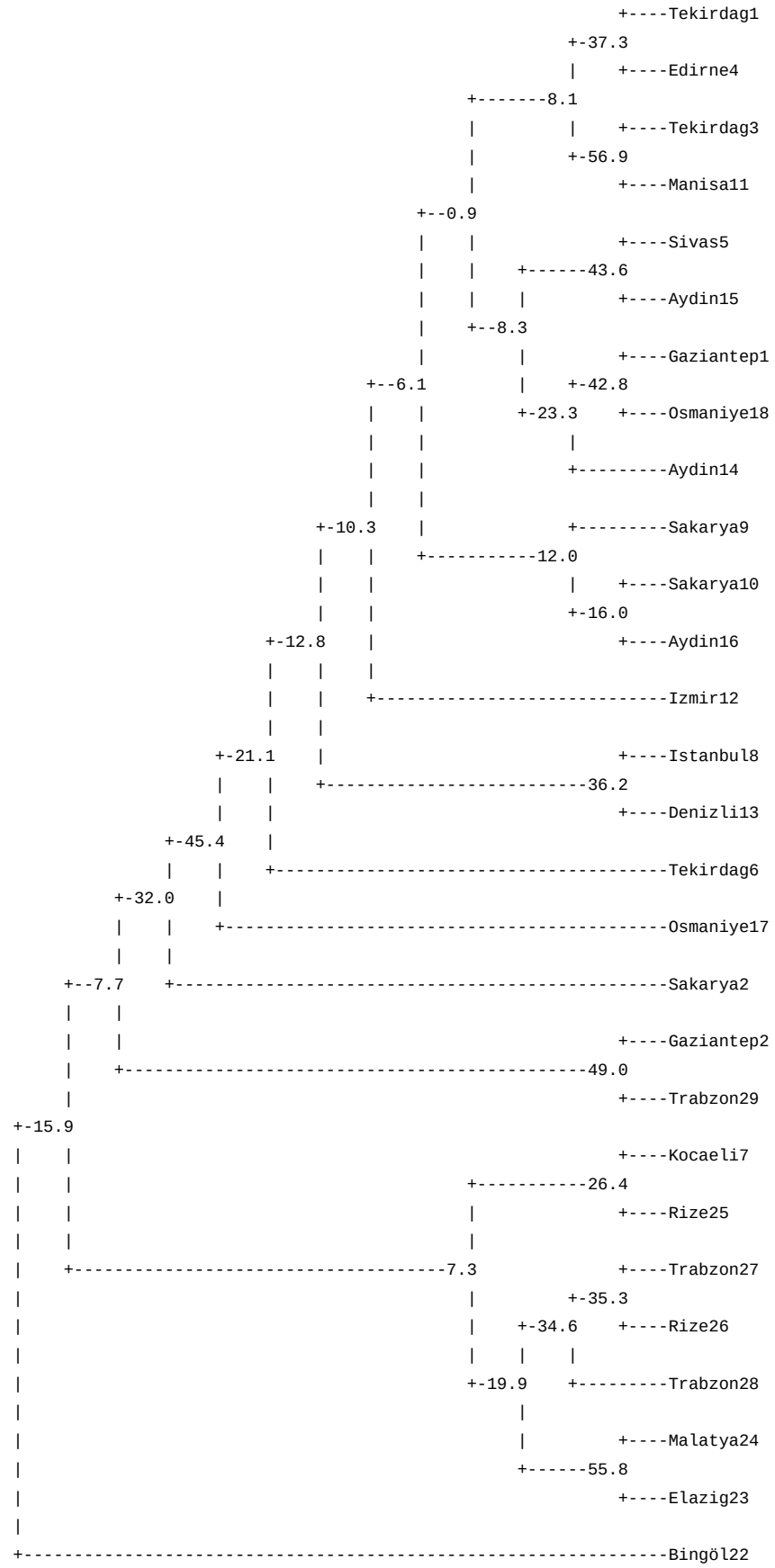
Şekil 4.10 SET1'deki 29 kenevir aksesyonunun J katsayısı kullanılarak elde edilmiş UPGMA dendogram

4.1.3.3. Kümelerin güven sınırları sonuçları

SET2'deki verilerden SM ve J katsayıları kullanılarak elde edilen dendogramlardaki kümelerin güven sınırlarını tespit etmek amacıyla yapılan bootstrap analizi sonuçları, sırasıyla Şekil 4.11 ve Şekil 4.12'de verilmiştir. Şekillerde de görüldüğü gibi, SM benzerlik katsayısına göre, aralarında 0.91 oranında genetik ilişki bulunan C3 ve C11 (Tekirdağ ve Manisa) aksesyonlarının güven sınırı % 58.3 iken C5 ve C15 (Sivas ve Aydın) aksesyonlarının güven sınırı % 52.3 olarak bulunmuştur. Bunu C3 ve C11 aksesyonları arasında % 58.3 ihtimalle SM benzerlik katsayısına göre 0.91 oranında benzerlik vardır şeklinde de ifade edebiliriz. J benzerlik katsayısına göre aralarında 0.76 oranında genetik ilişki bulunan C3 ve C11 (Tekirdağ ve Manisa) aksesyonlarının güven sınırı % 56.9 ve aralarında 0.75 oranında genetik ilişki bulunan C5 ve C15 (Sivas ve Aydın) aksesyonlarının güven sınırı % 43.6 bulunmuştur.



Şekil 4.11 SM katsayısı kullanılarak elde edilen SET2'ye ait güven sınırları sonuçları



Şekil 4.12 J katsayısı kullanılarak elde edilen SET2'ye ait güven sınırları sonuçları

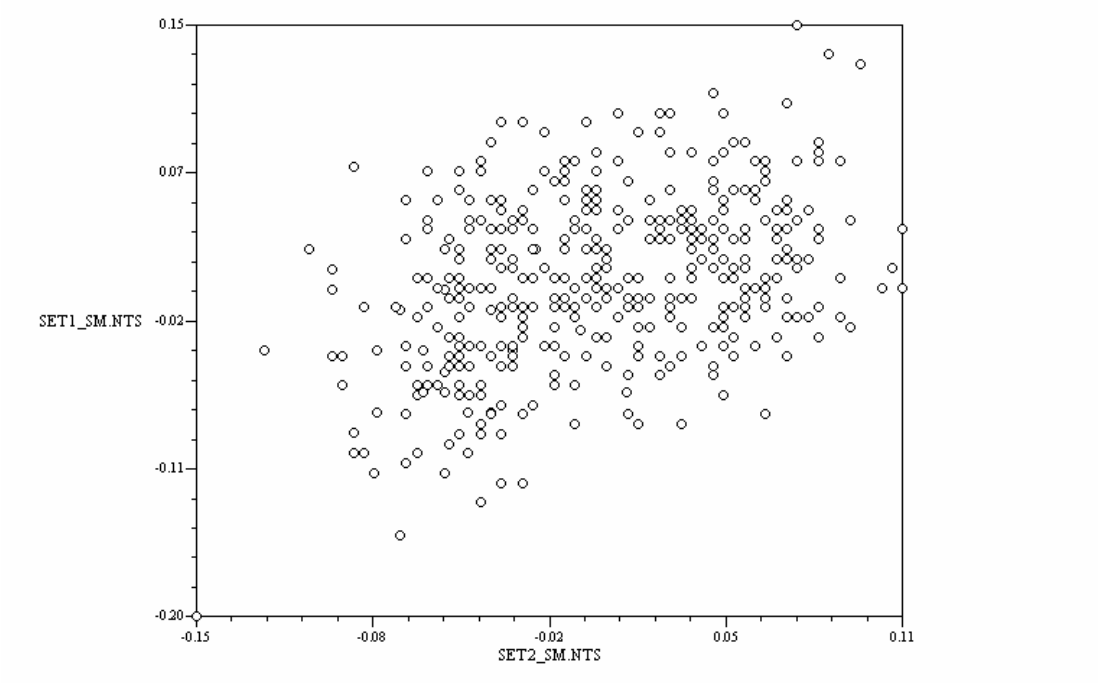
4.1.3.4. Benzerlik/farklılık matrislerinin karşılaştırılmasında Mantel Z testi sonuçları

SET1 ve SET2 verilerinden SM katsayısı ile elde edilen benzerlik/farklılık matrislerinin birlikteliklerinin Mantel testi ile test edilmesi sonucu elde edilen grafik Şekil 4.13'de verilmiştir. İki benzerlik matrisi arasında istatistiki olarak önemli ($P<0.0012$) bir birliktelik tespit edilmiş ve iki matris arasındaki korelasyon ise 0.40 olarak bulunmuştur.

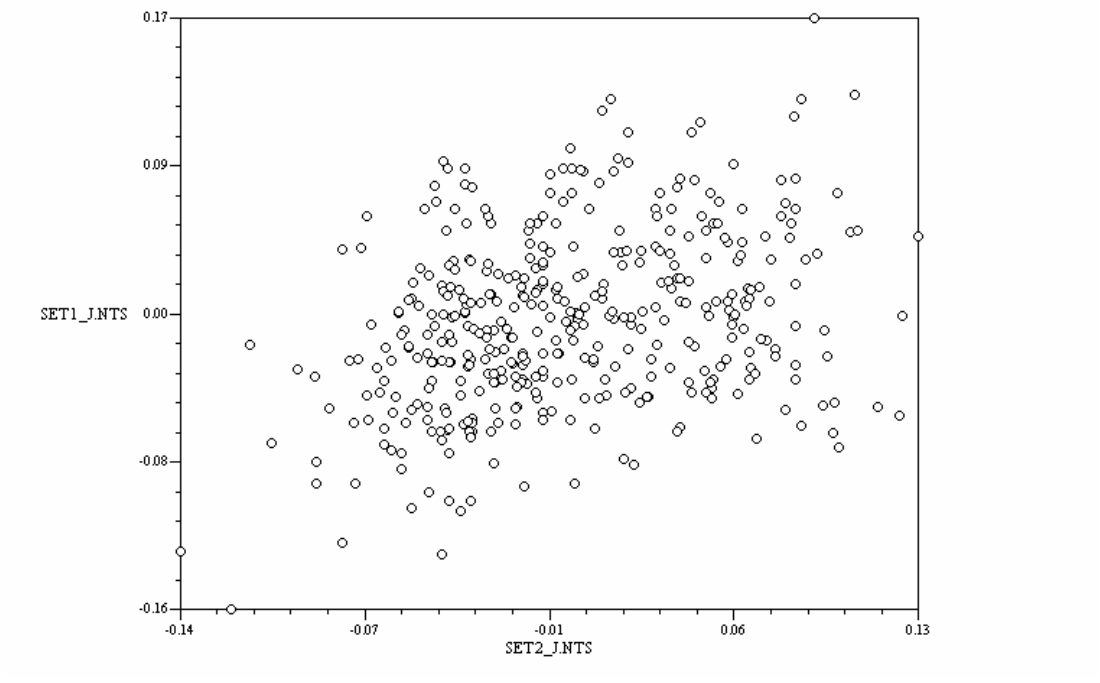
SET1 ve SET2 verilerinden J katsayısı ile elde edilen benzerlik/farklılık matrislerinin birlikteliklerinin Mantel testi ile test edilmesi sonucu elde edilen grafik Şekil 4.14'de verilmiştir. Burada SM katsayısı ile elde edilen sonuçlara benzer sonuçlar elde edilmiştir. İki benzerlik matrisi arasında istatistiki olarak önemli ($P<0.0022$) bir birliktelik tespit edildiği halde, iki matris arasındaki korelasyon ise 0.33 olarak bulunmuştur.

Her iki katsayı ile SET1 ve SET2 verilerinden elde edilen matrisler arasında birliktelik olduğu halde, bu matrislerin TKoA ve kümeleme analizleri sonucu benzer sonuçlar vermemesi çelişki olarak düşünülebilir. Her ne kadar bu benzerlik/farklılık matrisleri arasında birliktelik tespit edilmişse de, matrisler arasındaki korelasyon çok zayıf bulunmuştur (SM=0.40, J=0.33). Dolayısıyla SET1 ve SET2 verilerinin TKoA ve kümeleme analizi sonuçları benzerlik göstermemektedir. Mantel testi yoluyla matris birliktelikleri üzerine benzer sonuçlar Schnell ve ark. 1985 tarafından da bildirilmiştir.

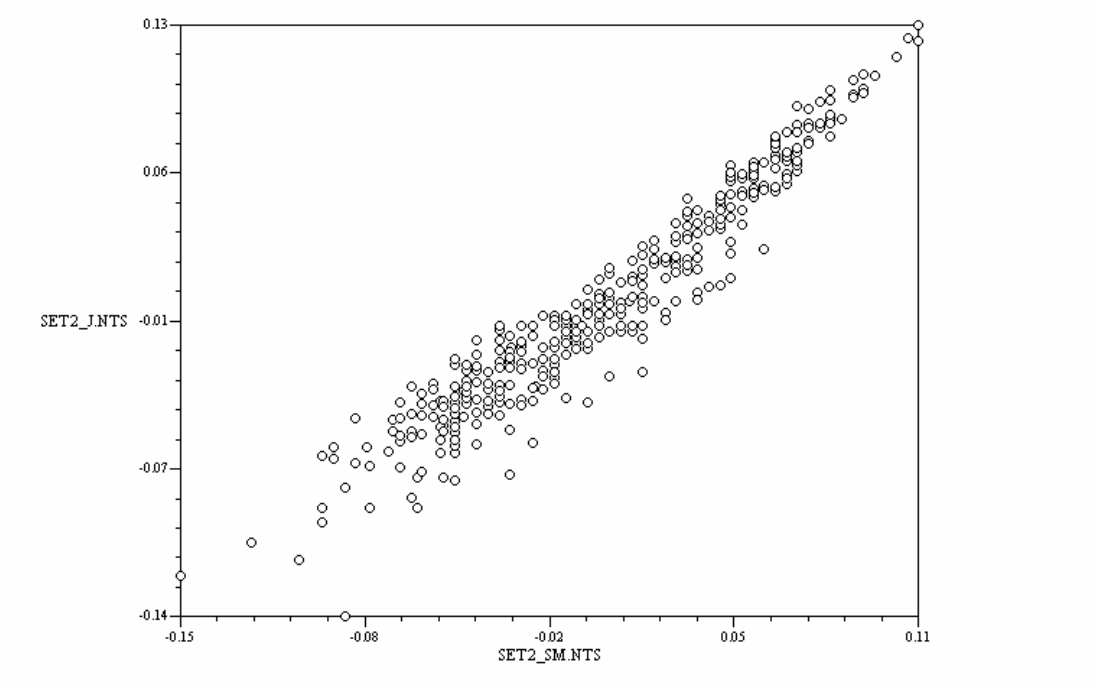
SET2 verilerinden SM ve J katsayıları ile elde edilen benzerlik/farklılık matrisleri arasındaki birlikteliği test etmek amacıyla yapılan Mantel testi sonucu elde edilen grafik Şekil 4.15'de verilmiştir. İki matris arasında istatistiki olarak önemli bir birliktelik tespit edilmiş ve iki matris arasında kuvvetli bir korelasyon ($r = 0.96$) bulunmuştur. Bu sonuç, SET2 verilerinin SM yada J katsayısı kullanılarak elde edilen benzerlik/farklılık matrislerinin TKoA ve kümeleme analizi sonuçlarında benzer sonuçlar vermesini kuvvetli bir şekilde desteklemektedir.



Şekil 4.13 SM katsayısı kullanılarak elde edilen SET1 ve SET2'ye ait Mantel testi grafiği



Şekil 4.14 J katsayısı kullanılarak elde edilen SET1 ve SET2'ye ait Mantel testi grafiği



Şekil 4.15 SM ve J katsayıları kullanılarak elde edilen SET2'ye ait Mantel testi grafiği

4.1.3.5. Nei ve Li genetik benzerlik, genetik mesafe sonuçları

SET1 ve SET2 verilerinden Nei ve Li (1979)'a göre hesaplanmış genetik benzerlik matrisleri sırasıyla Çizelge 4.3 ve Çizelge 4.4'de verilmiştir. SET2'deki bireyler arasında Nei ve Li'ye (1979) göre, genetik benzerlik 0.05 ile 0.32 arasında değişmektedir. Burada 0.05 seviyesinde benzerlik C2 ile C20 aksesyonları arasında bulunmuştur. Burada C20 aksesyonu çok sayıda markör için kayıp veri olan aksesyondur. Dolayısıyla bu aksesyon ile diğer aksesyonlar arasındaki Nei ve Li benzerliği 0.05 ile 0.11 arasında değişmiştir. Çok sayıdaki kayıp veri nedeni ile C20 aksesyonunun diğer aksesyonlarla genetik benzerliği düşük bulunmuştur. C20 aksesyonu veri setinden çıkarılıp, aksesyonlar arasındaki genetik benzerlik tekrar değerlendirildiğinde, en düşük genetik benzerliğin 0.15, en yüksek genetik benzerliğin 0.32 ve ortalamanın ise 0.24 olduğu görülmüştür. Burada en düşük benzerlik C2 - C22 aksesyonları arasında en yüksek benzerlik ise C10 - C16

aksesyonları arasında bulunmuştur. Bu en az genetik ilişkinin C2 ve C22 aksesyonları arasında olduğu, C10 ve C16 aksesyonları arasında diğer aksesyonlarla karşılaştırıldığında daha fazla genetik ilişki olduğu anlamına gelir.

SET1'deki bireyler arasında Nei ve Li'ye (1979) göre, genetik benzerlik 0.06 ile 0.28 arasında değişmektedir. Burada 0.06 seviyesindeki benzerlik C20 ile C2, C5, C9 ve C21 aksesyonları arasında bulunmuştur. Burada C20 aksesyonu çok sayıda markör için kayıp veri içerdiğinden SET2'de olduğu gibi diğer aksesyonlarla genetik benzerliği düşük bulunmuştur. C20 aksesyonu veri setinden çıkarılıp, aksesyonlar arasındaki genetik benzerlik değerlendirildiğinde, en düşük genetik benzerliğin 0.15, en yüksek genetik benzerliğin 0.28 ve ortalamanın ise 0.20 olduğu görülmüştür. Burada en düşük benzerlik C4 - C5 ve C5 - C7 aksesyonları arasında en yüksek benzerlik ise, 0.28 ile C26 - C27 aksesyonları arasında bulunmuştur. Bu en az genetik ilişkinin C4 - C5 ve C5 - C7 aksesyonları arasında olduğu, C26 - C27 aksesyonları arasında diğer aksesyonlarla karşılaştırıldığında daha fazla genetik ilişki olduğu anlamına gelir.

Çizelge 4.3 SET1'e ait 29 kenevir aksesyonun oluşturduğu genetik mesafe matrisi

	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12	C13	C14	C15	C16	C17	C18	C19	C20	C21	C22	C23	C24	C25	C26	C27	C28	C29
C1	1.00																												
C2	0.20	1.00																											
C3	0.19	0.20	1.00																										
C4	0.16	0.16	0.20	1.00																									
C5	0.17	0.19	0.18	0.15	1.00																								
C6	0.19	0.21	0.20	0.18	0.21	1.00																							
C7	0.19	0.19	0.22	0.17	0.15	0.22	1.00																						
C8	0.21	0.23	0.24	0.19	0.21	0.24	0.25	1.00																					
C9	0.17	0.17	0.19	0.17	0.19	0.23	0.19	0.24	1.00																				
C10	0.18	0.19	0.20	0.17	0.18	0.21	0.20	0.22	0.20	1.00																			
C11	0.18	0.20	0.23	0.18	0.19	0.24	0.22	0.25	0.20	0.22	1.00																		
C12	0.19	0.18	0.23	0.18	0.18	0.23	0.23	0.22	0.22	0.20	0.23	1.00																	
C13	0.19	0.21	0.22	0.18	0.19	0.20	0.21	0.24	0.20	0.19	0.21	0.21	1.00																
C14	0.17	0.20	0.22	0.18	0.20	0.21	0.20	0.24	0.21	0.21	0.23	0.21	0.23	1.00															
C15	0.17	0.19	0.19	0.16	0.16	0.19	0.19	0.21	0.18	0.18	0.19	0.18	0.21	0.22	1.00														
C16	0.18	0.20	0.23	0.18	0.19	0.21	0.19	0.24	0.21	0.21	0.25	0.21	0.23	0.23	0.20	1.00													
C17	0.17	0.19	0.22	0.17	0.16	0.20	0.23	0.23	0.19	0.19	0.21	0.21	0.19	0.20	0.20	0.20	1.00												
C18	0.18	0.19	0.23	0.19	0.17	0.21	0.23	0.24	0.20	0.21	0.22	0.21	0.22	0.23	0.23	0.24	0.21	1.00											
C19	0.17	0.19	0.22	0.18	0.18	0.23	0.20	0.23	0.19	0.20	0.23	0.20	0.22	0.21	0.19	0.23	0.21	0.23	1.00										
C20	0.07	0.06	0.09	0.07	0.06	0.08	0.07	0.09	0.06	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.07	0.08	0.07	0.08	0.08	1.00									
C21	0.17	0.19	0.19	0.20	0.18	0.19	0.20	0.22	0.19	0.19	0.20	0.17	0.21	0.20	0.19	0.19	0.19	0.21	0.20	0.06	1.00								
C22	0.17	0.19	0.22	0.19	0.19	0.23	0.22	0.23	0.19	0.19	0.22	0.22	0.21	0.21	0.18	0.20	0.22	0.19	0.21	0.09	0.19	1.00							
C23	0.16	0.17	0.21	0.17	0.17	0.19	0.19	0.23	0.18	0.18	0.21	0.17	0.20	0.20	0.19	0.20	0.17	0.18	0.20	0.08	0.19	0.21	1.00						
C24	0.17	0.20	0.24	0.18	0.18	0.21	0.21	0.25	0.19	0.19	0.21	0.19	0.21	0.21	0.19	0.23	0.22	0.21	0.22	0.07	0.19	0.22	0.22	1.00					
C25	0.19	0.20	0.20	0.17	0.17	0.20	0.22	0.24	0.19	0.17	0.23	0.19	0.21	0.19	0.19	0.21	0.20	0.20	0.19	0.07	0.20	0.19	0.21	0.22	1.00				
C26	0.21	0.20	0.23	0.21	0.19	0.24	0.22	0.25	0.24	0.21	0.23	0.21	0.21	0.21	0.19	0.23	0.21	0.21	0.23	0.08	0.21	0.23	0.23	0.23	0.21	1.00			
C27	0.18	0.20	0.22	0.18	0.20	0.20	0.19	0.24	0.21	0.20	0.22	0.19	0.21	0.22	0.19	0.23	0.19	0.21	0.23	0.08	0.21	0.20	0.23	0.23	0.20	0.28	1.00		
C28	0.18	0.19	0.21	0.18	0.17	0.20	0.20	0.23	0.21	0.19	0.22	0.20	0.21	0.22	0.20	0.23	0.21	0.22	0.21	0.07	0.20	0.20	0.21	0.23	0.21	0.25	0.25	1.00	
C29	0.16	0.19	0.20	0.17	0.16	0.19	0.19	0.20	0.16	0.18	0.20	0.17	0.18	0.19	0.19	0.17	0.19	0.19	0.19	0.07	0.19	0.20	0.19	0.19	0.19	0.19	0.19	0.17	1.00

Çizelge 4.4 SET2'ye ait 29 kenevir aksesyonun oluşturduğu genetik mesafe matrisi

	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12	C13	C14	C15	C16	C17	C18	C19	C20	C21	C22	C23	C24	C25	C26	C27	C28	C29
C1	1.00																												
C2	0.21	1.00																											
C3	0.26	0.21	1.00																										
C4	0.29	0.22	0.30	1.00																									
C5	0.25	0.20	0.26	0.28	1.00																								
C6	0.25	0.21	0.25	0.28	0.27	1.00																							
C7	0.20	0.16	0.24	0.23	0.22	0.22	1.00																						
C8	0.24	0.21	0.28	0.28	0.25	0.25	0.23	1.00																					
C9	0.25	0.20	0.26	0.28	0.25	0.26	0.20	0.24	1.00																				
C10	0.27	0.22	0.29	0.31	0.28	0.27	0.25	0.30	0.29	1.00																			
C11	0.26	0.21	0.30	0.29	0.27	0.26	0.24	0.30	0.26	0.31	1.00																		
C12	0.24	0.20	0.28	0.28	0.26	0.26	0.22	0.26	0.26	0.29	0.27	1.00																	
C13	0.23	0.21	0.26	0.27	0.25	0.25	0.20	0.28	0.25	0.28	0.26	0.26	1.00																
C14	0.25	0.20	0.26	0.27	0.26	0.25	0.21	0.26	0.25	0.26	0.26	0.25	0.25	1.00															
C15	0.26	0.20	0.27	0.29	0.28	0.26	0.24	0.28	0.26	0.30	0.28	0.28	0.26	0.27	1.00														
C16	0.25	0.22	0.29	0.30	0.27	0.28	0.24	0.30	0.29	0.32	0.31	0.30	0.29	0.27	0.30	1.00													
C17	0.22	0.18	0.26	0.26	0.24	0.25	0.25	0.28	0.24	0.27	0.28	0.26	0.23	0.25	0.27	0.28	1.00												
C18	0.25	0.20	0.27	0.27	0.28	0.26	0.23	0.29	0.27	0.29	0.29	0.26	0.26	0.27	0.29	0.30	0.25	1.00											
C19	0.26	0.21	0.28	0.29	0.26	0.27	0.23	0.29	0.27	0.30	0.28	0.28	0.26	0.28	0.28	0.30	0.26	0.30	1.00										
C20	0.08	0.05	0.09	0.10	0.09	0.10	0.11	0.09	0.09	0.10	0.11	0.08	0.08	0.07	0.09	0.10	0.09	0.09	0.08	1.00									
C21	0.22	0.18	0.24	0.26	0.25	0.24	0.22	0.25	0.23	0.26	0.24	0.24	0.25	0.25	0.25	0.25	0.22	0.26	0.27	0.07	1.00								
C22	0.18	0.15	0.20	0.20	0.19	0.18	0.20	0.21	0.19	0.20	0.20	0.20	0.19	0.20	0.20	0.22	0.20	0.21	0.21	0.09	0.20	1.00							
C23	0.21	0.17	0.22	0.24	0.22	0.22	0.22	0.24	0.21	0.24	0.23	0.21	0.22	0.22	0.22	0.23	0.23	0.22	0.23	0.11	0.21	0.23	1.00						
C24	0.20	0.17	0.24	0.25	0.23	0.22	0.22	0.24	0.21	0.25	0.25	0.22	0.22	0.22	0.23	0.25	0.23	0.23	0.23	0.09	0.22	0.19	0.26	1.00					
C25	0.21	0.18	0.23	0.24	0.22	0.21	0.24	0.24	0.22	0.26	0.25	0.22	0.23	0.20	0.23	0.25	0.23	0.22	0.23	0.09	0.22	0.21	0.23	0.23	1.00				
C26	0.22	0.19	0.23	0.26	0.22	0.23	0.23	0.24	0.23	0.26	0.25	0.24	0.22	0.22	0.25	0.26	0.25	0.24	0.25	0.10	0.23	0.21	0.26	0.25	0.24	1.00			
C27	0.18	0.16	0.22	0.22	0.21	0.21	0.22	0.24	0.20	0.24	0.25	0.21	0.21	0.21	0.23	0.26	0.22	0.24	0.22	0.09	0.21	0.19	0.22	0.22	0.23	0.26	1.00		
C28	0.21	0.17	0.23	0.24	0.23	0.22	0.20	0.22	0.22	0.26	0.24	0.22	0.22	0.21	0.24	0.25	0.22	0.23	0.22	0.07	0.22	0.18	0.22	0.22	0.22	0.25	0.23	1.00	
C29	0.18	0.17	0.22	0.22	0.20	0.22	0.20	0.22	0.19	0.23	0.22	0.21	0.20	0.19	0.21	0.22	0.21	0.21	0.23	0.08	0.23	0.17	0.20	0.21	0.22	0.21	0.22	0.20	1.00

Bu çalışmada yapılan tüm istatistiki analiz sonuçları değerlendirildiğinde, SET1'e ait verilerin hem SM hem de J katsayılarına göre hesaplanan TKoA ve kümeleme analizi sonuçlarında kenevir aksesyonları arasında belirgin bir gruplaşma olmadığı gözlenmiştir. Her iki katsayı ile hesaplanan kümeleme analizi sonuçlarında C11-C16 (Manisa-Aydın) aksesyonları bir dal oluşturmakta, SM benzerlik indeksinde bu değer % 85 olarak bulunurken, J benzerlik indeksinde % 62 olmuştur.

SET1'e ait genetik benzerlik sonuçlarının 0.06 ile 0.28 arasında değiştiği gözlenmiştir.

SET2'ye ait verilerin hem SM hem de J katsayılarına göre hesaplanan TKoA ve kümeleme analizi sonuçları değerlendiğinde Türkiye'nin batısındaki illerden elde edilen kenevir aksesyonları ile Türkiye'nin doğusundaki illerden elde edilen kenevir aksesyonlarının iki ayrı grup oluşturduğu gözlenirken, C21 (Gaziantep), C7 (Kocaeli) ve C20 (Hatay) aksesyonları iki grubun alt ve üst köşegenlerinde fakat iki gruba da yaklaşık olarak aynı mesafede yer almışlardır. Her iki katsayıya ait kümeleme analizi sonucunda da C3 - C11 (Tekirdağ-Manisa) aksesyonları bir dal oluşturmakta, SM benzerlik indeksinde bu değer % 91 olarak bulunurken, J benzerlik indeksinde % 76 olmuştur.

SET2'ye ait genetik benzerlik sonuçlarının 0.05 ile 0.32 arasında değiştiği gözlenmiştir.

Çalışmada kullanılan tohumlar saf hat olmadığından tek bireyden alınan DNA örneklerinin oluşturduğu SET1'de belirgin bir gruplaşma gözlenmezken, aynı aksesyonun farklı bireylerinden alınarak populasyonu temsil eden bulk DNA örneklerinin oluşturduğu SET2'de bölgelere göre iki ayrı grup oluşturmuştur. Bu durum saf olmayan bireylerde bulk DNA örnekleri ile yapılan çalışmaların güvenilirliğinin bir göstergesidir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Türkiye'nin farklı coğrafik bölgelerinden kaçak ekimler sonucu ele geçirilen 29 kenevir aksesyonunun kullanıldığı bu çalışmada aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir.

Kullanılan kenevir tohumları saf hatlar olmadığı için çalışmanın daha sağlıklı sonuçlar vermesi amacıyla RAPD-PCR yöntemi tercih edilmiş, yapılan moleküler genetik çalışmalarda tek birey (SET1) ve populasyonu temsil ettiği kabul edilen bulk (SET2) DNA örnekleri kullanılmıştır. İstatistiki analizlerde kullanılacak benzerlik/farklılık matrislerinin oluşturulmasında SM ve J benzerlik katsayıları kullanılmıştır. Verilerden elde edilen benzerlik/farklılık matrisleri TKoA ve kümeleme analizi yöntemleriyle analiz edilmiştir. Kümeleme analizi sonucu elde edilen dendogramların güven sınırlarının belirlenmesinde parametrik olmayan bootstrap metodu kullanılmıştır. Benzerlik/farklılık matrisleri Mantel Z testi yöntemiyle karşılaştırılmıştır.

SET1 ve SET2'ye ait verilerin TKoA ve kümeleme analizi metotlarıyla analiz sonuçları karşılaştırıldığında, her iki metotla da analiz edilmesi durumunda SET1 ve SET2'ye ait sonuçların birbirlerine benzemedikleri tespit edilmiştir. Saf olmayan hatlarla yapılan çalışmalarda bulk DNA örneklerinin daha güvenilir ve sağlıklı sonuçlar verdiği görülmektedir.

Ancak, SET1 ve SET2' ye ait verilerin kendi içlerinde farklı benzerlik/farklılık katsayıları kullanılarak yapılan analizlerin her iki metotla da benzer sonuçlar verdiği görülmüştür. Farklı benzerlik/farklılık katsayılar kullanılarak değişik metotlarla yapılan istatistiki analizler benzer sonuçlar vermektedir.

Yapılan TKoA sonucunda SET1'de aksesyonlar arasında belirgin bir gruplaşma gözlenmezken, SET2'de Türkiye'nin doğusundaki illerden elde edilen kenevir aksesyonları ile Türkiye'nin batısındaki illerden elde edilen kenevir

aksesyonları arasında bir gruplaşmanın olduğu gözlenmiştir. Bu da bizi Türkiye'nin batı illerinde illegal yoldan kenevir yetiştirenlerin irtibatlı olabilecekleri, benzer şekilde doğu illerimizde illegal yollardan kenevir yetiştirenlerin de yine kendi içlerinde irtibatlı olabilecekleri sonucuna götürmektedir.

Kümeleme analizi sonucu elde edilen dendogramlar da TKoA sonuçlarını desteklemektedir. SET1'de aksesyonlar arasında görülen dallanmada belirgin bir guruplaşma gözlenmezken, SET2'de Türkiye'nin doğusundaki illerden elde edilen kenevir aksesyonları ile Türkiye'nin batısındaki illerden elde edilen kenevir aksesyonları iki ayrı anadal oluşturarak birleşmişlerdir.

SET1 ve SET2'ye ait verilerden elde edilen benzerlik/farklılık matrislerinin Mantel testi ile karşılaştırılması sonucu iki set arasında bir birliktelik bulunmuş fakat her iki set arasındaki korelasyon düşük olduğundan aralarında çok zayıf bir uyum söz konusu olmuştur. Dolayısıyla da SET1 ve SET2 verilerine ait sonuçlar birbirlerine benzememektedirler.

SET2'ye ait verilerden SM ve J katsayılarıyla hesaplanan benzerlik/farklılık matrislerinin Mantel testi ile karşılaştırılması sonucu birliktelik tespit edilmiş ve iki benzerlik/farklılık matrisi arasındaki korelasyon yüksek bulunmuştur. Dolayısıyla SET2 verilerinin SM ve J katsayılarıyla hesaplanan benzerlik/farklılık matrislerinin TKoA ve kümeleme analizi sonuçları benzer bulunmuştur.

Her iki sete ait verilerden elde edilen bireyler arasındaki genetik mesafe üzerine kayıp verilerin etkisi büyük olmuştur. Kayıp veri olduğu durumda aksesyonlar arasındaki genetik benzerlik oranının düştüğü gözlenmiştir.

RAPD gibi dominant markörler kullanılarak yapılan moleküler genetik çalışmaların istatistiki analizlerinde TKoA ve kümeleme analizlerinin etkin bir şekilde kullanılabileceği, bununla beraber kümelerin güven sınırları, Mantel testi ve genetik mesafe bilgilerinin de elde edilebileceği gözlenmiştir.

Türkiye'de yasal olmayan yollardan kenevir yetiştiriciliği, buna bağlı olarak ta uyuşturucu madde tüketimi gün geçtikçe artmaktadır. Elde edilen bireyler arasındaki genetik benzerlik ya da farklılıkların, yasal olmayan yollardan kenevir yetiştiriciliği yapan kişilerin bağlantıları hakkında önemli ipuçları sağlayacağı düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

Anonim, 2007. http://www.tarim.gov.tr/mevzuat/yonetmelik_son/kenevirekimi_ve_kontroluhakkinda_yonetmelik.doc

Anonymous, 2007a. http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html

Anonymous, 2007b. http://www.fermentas.com/catalog/electrophoresis/convlambdamarkers.htm#3

Anonymous, 2007c. http://www.weedfarmer.com

Bovenhuis, H., ve Meuwissen, T. 1996. Detection and Mapping of Quantitative Trait Loci. Animal Genetics and Breeding Unit, University of New England Armidale.

Chatfield, C. ve Collins, A. J. 1980. Introduction to Multivariate Analysis. Chapman and Hall. London.

Coyle, H. M., Divakaran, K., Jachimowicz, E., Ladd, C. ve Lee, H. C. 2001b. Individualization of marijuana (*Cannabis sativa*) samples for forensics applications and narcotics enforcement. Proceedings of the American Academy of Forensic Sciences 53rd Annual Meeting 19-24; Seattle, Washington, USA. p. 30-1.)

Coyle, H. M., Ladd, C., Palmbach, T. ve Lee, H. C. 2001a. The Green Revolution: Botanical Contributions to Forensics and Drug Enforcement. Forensic Sciences, Croatian Medical Journal. 42 (3): 340-345.

Datwyler, S. L. ve Weiblen, G. D. 2006. Genetic variation in hemp and marijuana (*Cannabis sativa* L.) according to amplified fragment length polymorphisms. Journal Of Forensic Sciences. 51 (2): 371-375.

De Meijer, E. P. M., Van Der Kamp, H. J. ve Van Eeuwijk, F. A. 1992. Characterisation of *Cannabis* accessions with regard to cannabinoid content in relation to other plant characters. Euphytica 62: 187-200.

Dempsey, J. M. 1975. Fiber crops. University of Florida Pres 46-89. Gainesville. F. L., U. S. A.

Ekiz, E., Er, C., Arslan, N., Kolsarıcı, Ö., Bayraktar, N. ve Sümer, H. 1989. Kenevir Tarımı ve Mevzuatı. Tarım Orman ve Köyişleri Bakanlığı. Ankara.

Faeti, V., Mandolino, G. ve Ranalli, P. 1996. Genetic diversity of Cannabis sativa germplasm based on RAPD markers. Plant Breeding 115: 367-370.

Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution 39: 783-791.

Gillan, R, Cole, M. D., Linacre, A, Thorne, J. W. ve Watson, N. D. 1995. Comparison of Cannabis sativa by random amplification of polymorphic DNA (RAPD) and HPLC of cannabinoids: a preliminary study. Sci. Justice. 35: 169-177.

Gilmore, S., Peakall, R. ve Robertson, J. 2003. Short tandem repeat (STR) DNA markers are hypervariable and informative in Cannabis sativa: implications for forensic investigations. Forensic Science International. 131 (1): 65-74.

Güneren, G. 1999. Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Rasgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA Parmakizi Yönteminin (RAPD-PCR) Türkiye Yerli Sığır Irklarında Uygulanma Olanakları. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Zootekni Anabilim Dalı, Ankara.

Hakki, E. E., Kayis, S. A., Pinarkara, E., ve Sag, A. 2007. Inter Simple Sequence Repeats Separate Efficiently Hemp from Marijuana (*Cannabis sativa* L.). (Electronic Journal of Biotechnology October 15, 2007 Vol. 10, no.4 sayısında yayınlanmak üzere kabul edildi).

Immanuel, V. Y. ve Nelson, R. J. 1996. WINBOOT: A Program for Performing Bootstrap Analysis of Binary Data to Determine the Confidence Limits of UPGMA-Based Dendrograms. Manila, Philippines : International Rice Research Institute.

Innis, M. A. ve Gelfand, D. H. 1990. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press. 3-11.

Jagadish, V., Robertson, J. ve Gibbs, A. 1996. RAPD analysis distinguishes *Cannabis sativa* samples from different sources. Forensic Science International 79 (2) : 113-12.

Kojoma, M., Iida, O., Makino, Y., Sekita, S. ve Satake, M. 2002. DNA fingerprinting of Cannabis sativa using Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) Amplification. Planta Med. 68: 60-63.

Linger, P., Müssig, L., Fischer, H. ve Kobert, J. 2002. Industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) growing on heavy metal contaminated soil: fibre quality and phytoremediation potential . Industrial Crops and Products 16 (1): 33-42.

Mantel, N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. Cancer Res. 27: 209-220.

Murari, G., Lombardi, S., Puccini, A. M. ve De Sanctis, R. 1983. Influence of environmental conditions on tetrahidrocannabinol (delta 9-THC) in different cultivars of *Cannabis sativa* L. Fitoterapia 54: 195-202.

Nei, M. ve Li, W. H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proc. Natl. Acad. Sct 76 (10): 5269-5273.

Özbek, Z. 2006. Makarnalık Buğday Çeşitlerinde Bor Uygulamasına Tepkilerin RT-PCR İle İzlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, Konya.

Özcan, S. Gürel, E. ve Babaoğlu, M. 2001. Bitki Biyoteknolojisi II. Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları. (ed.). Selçuk Üniv. Vakıf Yayınları, Sayfa 334-363. ISBN 975-6652-05-5. Konya.

Pertwee, R. G. 1988. The central pharmacology of psychotropic cannabinoids. Pharmacol. Therapeut. 36: 189-261.

Pitts, J. E., Neal, J. D. ve Gough, T. A. 1992. Some features of cannabis plants grown in the United Kingdom from seeds of known origin. J. Pharm. Pharmacol 44: 947-951.

Quinn, G. P. ve Keough, M. J. 2002. Experimental Design and Data Analysis for Biologists. Cambridge University Press, 488-491.

Rohlf, F. J. 2002. NTSYSpc: Numerical Taxonomy System, ver. 2.1. Exeter Publishing, Ltd.: Setauket, NY.

Sağ, A. 2002. *Cannabis sativa* L.'de Menşei Tayini Amacı İle DNA İzolasyonu. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, Adli Tıp Enstitüsü, Fen Bilimleri Anabilim Dalı, İstanbul.

Sakamoto, K., Shimomura, K., Komeda, Y., Kamada, H. ve Satoh, S. 1995. A Male-Associated DNA Sequence in a Dicoecious Plant, *Cannabis sativa* L. Plant Cell Physiol 36(8): 1549-1554.

Schnell, G. D., Watt, D. J. ve Douglas, M. E. 1985. Statistical comparison of proximity matrices: aplications in animal behaviour. Anim. Behav. 33: 239-253.

Shirota, O., Watanabe, A., Yamazaki, M., Saito, K., Shibano, K., Sekita, S. ve Satake, M. 1998. Random Amplified Polymorphic DNA and Restriction Fragment Length Polymorphism analyses of *Cannabis sativa.* Naturel Medicines 52 (2): 160-166.

Steven, R. C. ve Christopher, S. B. 1998. Cannabis and endegenous cannabinoid systems. Drog and Alcohol Dependence 51: 173-187.

Sytnik, V. P. ve Stelmakh, A. F. 1997. Genetic analysis of differences in the content of cannabinoid componenets in hemp *Cannabis sativa* L. Cytology and Genetics 31: 44-49.

Szibor, R., Schubert, C., Schoning, R., Krause, D. ve Wendt, U. 1998. Pollen analysis reveals murder season Nature 395: 449-50.

Şahin, E. 2005. Antalya Yöresi Kıl Keçilerinde Genetik Polimorfizmin RAPD-PCR Yöntemiyle Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Akdeniz Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Zootekni Anabilim Dalı, Antalya.

Temizkan, G. ve Arda, N., 2004. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. (ed.), (2): 101-120. İstanbul Üniv. Biyoteknoloji ve Genetik Mühendisliği Araştırma ve Uygulama Merkezi (BİYOGEM). Nobel Tıp Kitabevleri.

Walton, M. 1993. Molecular markers: which ones to use? Seed World. 23-29.

Welsh, J. ve McClelland, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Res. 18: 7213-7218.

EKLER

EK-A Kenevir bitkisinin morfolojisi ve çalışma materyalinin yetiştirilmesi



EK-A.1 Kenevir tohumları



EK-A.2 Çalışma materyalinin yetiştirildiği sera



EK-A.3 Çimlenmiş bir kenevir bitkisi ve çalışmada kullanılan materyale ait örnekler



EK-A.4 Erkek (sağdaki) ve dişi (soldaki) kenevir bitkileri



a **b**



c **d**

EK-A.5 Kenevir bitkisinde erkek (a), dişi (c) çiçek ve erkek (b)[c], dişi (c) organ (d)[c] (Anonymous, 2007c)

EK-B 2X CTAB metodu ile yapılan DNA izolasyonu aşamaları (1: Steril havanın sıvı azot dökülerek soğutulması, 2: Yaprak örneklerinin sıvı azot içerisine alınması, 3: Örneklerin steril topuzla ezilmesi, 4: Toz haline gelen bitki örneklerinin eppendorf santrifüj tüplerine aktarılması, 5: CTAB-β-mercaptoethanol çözeltisi ve *RNase A* ilave edilmesi, 6: Vortex cihazında tüplerdeki bitki ve çözeltilerin karıştırılması, 7: Tüplerin blok ısıtıcıda bekletilmeleri, 8: Tüplere kloroform:izoamiloalkol ilave edilmesi ve karıştırılması, 9: Tüplerin santrifüj edilmeleri, 10: Tüpte oluşan faz ayrımları, 11: Tüpte oluşan şeffaf fazın alınması, 12: Alınan şeffaf fazın yeni santrifüj tüpüne aktarılması, 13: İzopropil alkol ilave edilen santrifüj tüplerinin hafifçe çalkalanması, pellet oluşumunun gözlenmesi, 14: Hafifçe karıştırılan tüplerin santrifüj edilmesi, 15: Etil alkol ilave edilen tüpte DNA izolasyonu sonucu oluşan DNA pelleti)



1



2



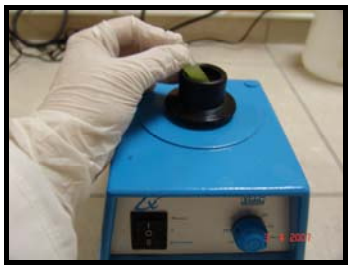
3



4



5



6



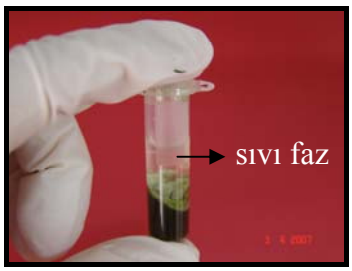
7



8



9



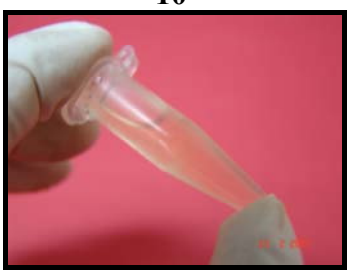
10



11



12



13

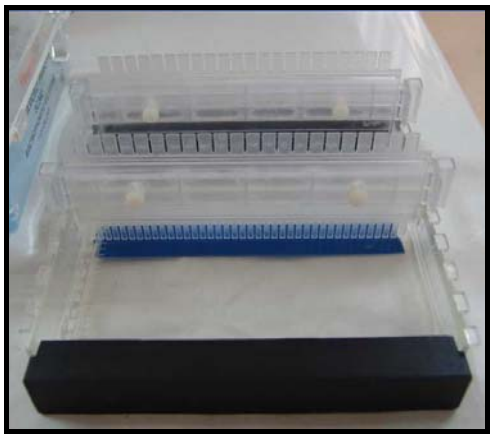


14

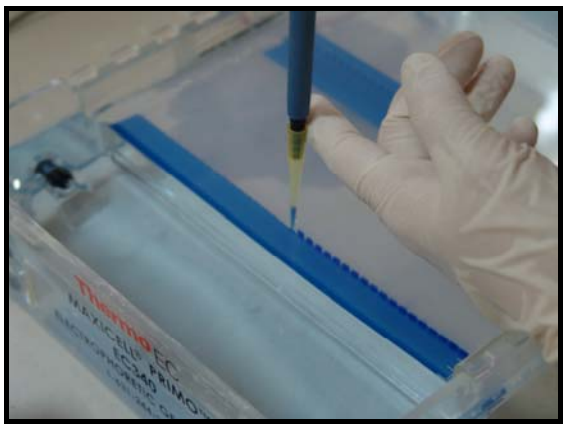


15

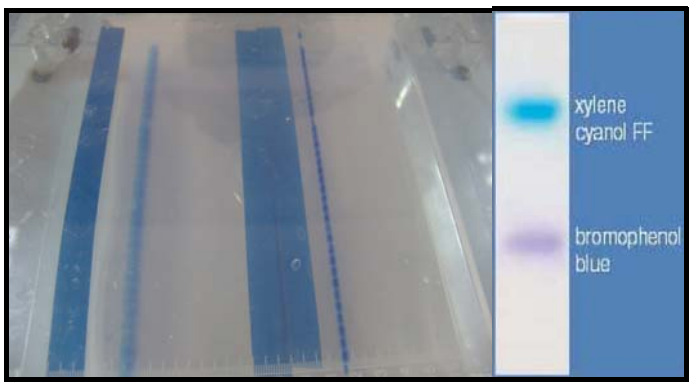
EK-C Elektroforez uygulamaları



EK-C.1 Agaroz jel dökmek için hazırlanmış jel tepsisi



EK-C.2 PCR ürünlerinin agaroz jeldeki yuvalara yüklenmesi



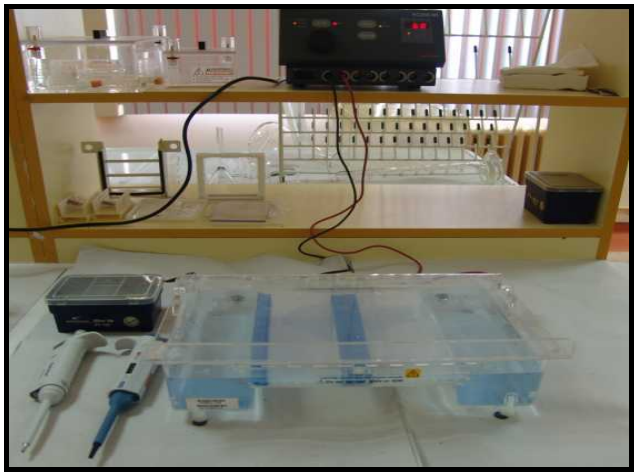
EK-C.3 Xylene cyanol FF, bromofenol blue ve agaroz jelde takibi

EK-D Çalışmada kullanılan cihazlar

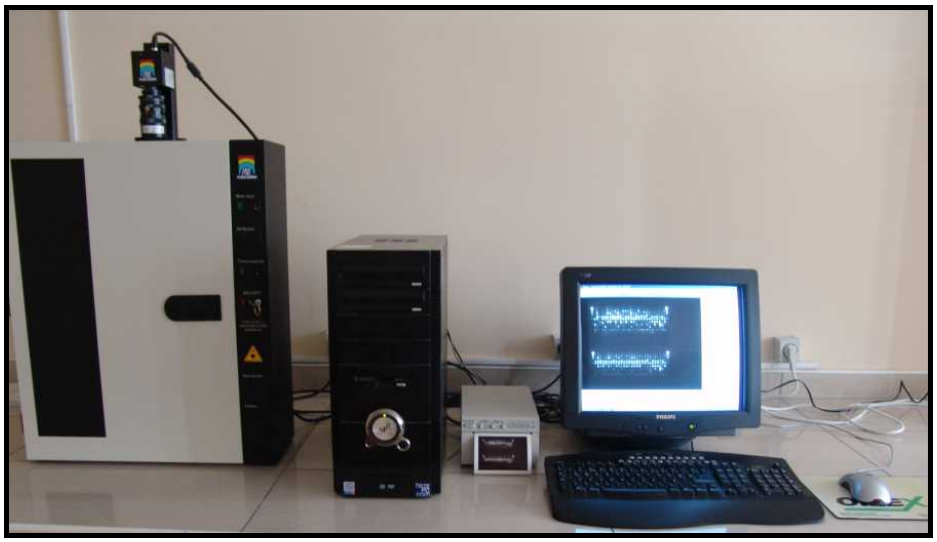




EK-D.1 Spektrofotometre ve PCR cihazı



EK-D.2 Elektroforez cihazı ve güç kaynağı



EK-D.3 Jel görüntüleme sistemi

EK-E DNA konsantrasyonu spektrofotometre okuma sonuçları

DNA KONSANTRASYONU SPEKTROFOTOMETRE OKUMA SONUÇLARI – SET 1

Çeşit No	İzolasyon Metodu	A_{230}	A_{260}	A_{280}	A_{320}	$A_{260/280}$	$A_{260/320}$	DNA Konsantrasyonu
1	CTAB	0.152	0.178	0.139	0.098	1.28	1.17	891.4
1	CTAB	0.155	0.175	0.135	0.097	1.30	1.13	873.9
2	CTAB	0.071	0.117	0.060	0.003	1.96	1.65	586.3
2	CTAB	0.073	0.121	0.063	0.002	1.93	1.66	603.9
3	CTAB	0.057	0.070	0.044	0.015	1.60	1.23	351.4
3	CTAB	0.072	0.071	0.047	0.018	1.52	0.98	354.6
4	CTAB	0.040	0.053	0.037	0.014	1.44	1.32	265.4
4	CTAB	0.046	0.054	0.038	0.016	1.43	1.17	269.4
5	CTAB	0.072	0.061	0.037	0.010	1.66	0.85	305.3
5	CTAB	0.068	0.063	0.040	0.013	1.56	0.93	313.7
6	CTAB	0.026	0.024	0.015	0.000	1.60	0.92	118.0
6	CTAB	0.017	0.024	0.014	0.000	1.73	1.39	118.7
7	CTAB	0.032	0.052	0.028	0.002	1.83	1.62	257.9
7	CTAB	0.036	0.054	0.029	0.000	1.87	1.52	272.2
8	CTAB	0.044	0.057	0.036	0.006	1.59	1.30	286.2
8	CTAB	0.044	0.054	0.035	0.013	1.52	1.23	269.5
9	CTAB	0.061	0.089	0.053	0.009	1.68	1.46	447.1
9	CTAB	0.059	0.089	0.052	0.012	1.71	1.50	443.5
10	CTAB	0.040	0.058	0.033	0.004	1.78	1.45	290.3
10	CTAB	0.041	0.058	0.031	0.003	1.87	1.39	287.6
11	CTAB	0.029	0.038	0.023	0.005	1.62	1.28	187.6
11	CTAB	0.030	0.037	0.023	0.004	1.59	1.21	184.4
12	CTAB	0.060	0.058	0.034	0.004	1.71	0.97	288.6
12	CTAB	0.055	0.057	0.034	0.006	1.70	1.04	284.2
13	CTAB	0.086	0.071	0.049	0.019	1.46	0.84	357.2
13	CTAB	0.110	0.075	0.050	0.019	1.50	0.68	372.9
14	CTAB	0.054	0.061	0.033	0.000	1.84	1.12	303.2
14	CTAB	0.041	0.061	0.034	0.002	1.80	1.50	305.9
15	CTAB	0.042	0.038	0.023	0.003	1.67	0.90	189.0
15	CTAB	0.037	0.041	0.023	0.001	1.76	1.10	205.0
16	CTAB	0.062	0.107	0.054	0.000	1.96	1.72	533.1
16	CTAB	0.053	0.109	0.055	0.001	1.98	2.05	544.2
17	CTAB	0.033	0.032	0.019	0.001	1.69	0.98	159.3
17	CTAB	0.020	0.030	0.016	0.000	1.89	1.48	150.1
18	CTAB	0.016	0.022	0.013	0.006	1.68	1.37	110.7
18	CTAB	0.019	0.020	0.013	0.001	1.61	1.04	101.0
19	CTAB	0.101	0.119	0.066	0.008	1.81	1.18	594.7
19	CTAB	0.108	0.116	0.071	0.018	1.65	1.08	582.0
20	CTAB	0.011	0.015	0.008	0.001	1.81	1.35	73.3

20	CTAB	0.012	0.014	0.009	0.000	1.56	1.15	70.7
21	CTAB	0.016	0.022	0.012	0.000	1.81	1.36	108.8
21	CTAB	0.013	0.022	0.012	0.000	1.87	1.68	110.8
22	CTAB	0.223	0.400	0.229	0.042	1.75	1.79	1001.0
22	CTAB	0.223	0.406	0.232	0.036	1.75	1.82	1014.7
23	CTAB	0.097	0.180	0.101	0.019	1.78	1.85	450.3
23	CTAB	0.093	0.174	0.102	0.021	1.71	1.87	434.2
24	CTAB	0.051	0.085	0.051	0.016	1.68	1.66	212.8
24	CTAB	0.051	0.084	0.050	0.015	1.67	1.64	210.2
25	CTAB	0.066	0.116	0.067	0.017	1.74	1.77	290.0
25	CTAB	0.071	0.114	0.068	0.021	1.67	1.61	285.6
26	CTAB	0.060	0.110	0.064	0.013	1.72	1.83	274.1
26	CTAB	0.059	0.107	0.063	0.013	1.70	1.80	266.9
27	CTAB	0.109	0.193	0.114	0.023	1.69	1.77	481.8
27	CTAB	0.112	0.193	0.116	0.027	1.67	1.72	482.2
28	CTAB	0.200	0.366	0.213	0.040	1.72	1.83	916.0
28	CTAB	0.240	0.368	0.249	0.124	1.48	1.53	921.1
29	CTAB	0.152	0.213	0.131	0.045	1.62	1.40	531.9
29	CTAB	0.120	0.212	0.125	0.024	1.69	1.77	530.4

DNA KONSANTRASYONU SPEKTROFOTOMETRE OKUMA SONUÇLARI – SET 2

Çeşit No	İzolasyon Metodu	A_{230}	A_{260}	A_{280}	A_{320}	$A_{260/280}$	$A_{260/320}$	DNA Konsantrasyonu
1	CTAB	0.125	0.099	0.061	0.017	1.62	0.79	495.8
1	CTAB	0.143	0.096	0.058	0.009	1.66	0.68	481.5
2	CTAB	0.151	0.241	0.118	0.003	2.05	1.60	1203.8
2	CTAB	0.115	0.241	0.118	0.000	2.04	2.09	1205.3
3	CTAB	0.041	0.072	0.036	0.000	2.00	1.78	361.5
3	CTAB	0.042	0.071	0.036	0.000	1.96	1.68	353.8
4	CTAB	0.162	0.336	0.165	0.006	2.03	2.07	1678.8
4	CTAB	0.162	0.340	0.167	0.007	2.03	2.10	1699.1
5	CTAB	0.119	0.121	0.063	0.003	1.93	1.01	602.8
5	CTAB	0.112	0.129	0.066	0.000	1.96	1.06	644.7
6	CTAB	0.096	0.153	0.078	0.004	1.97	1.59	765.3
6	CTAB	0.094	0.152	0.078	0.006	1.94	1.61	758.5
8	CTAB	0.073	0.145	0.074	0.001	1.95	1.99	723.1
8	CTAB	0.077	0.151	0.075	0.000	2.01	1.97	755.7
9	CTAB	0.050	0.086	0.042	0.000	2.06	1.73	429.7
9	CTAB	0.053	0.083	0.045	0.001	1.87	1.56	416.3
10	CTAB	0.087	0.148	0.072	0.000	2.06	1.70	741.1
10	CTAB	0.077	0.151	0.079	0.005	1.90	1.96	755.5
11	CTAB	0.094	0.114	0.071	0.018	1.60	1.21	568.4
11	CTAB	0.104	0.120	0.075	0.019	1.60	1.15	598.4
12	CTAB	0.141	0.238	0.124	0.012	1.92	1.68	1188.4
12	CTAB	0.130	0.231	0.132	0.036	1.74	1.78	1154.6
13	CTAB	0.045	0.088	0.046	0.002	1.89	1.94	438.1
13	CTAB	0.054	0.089	0.050	0.006	1.78	1.66	444.4
14	CTAB	0.076	0.113	0.062	0.009	1.83	1.49	566.0
14	CTAB	0.072	0.110	0.061	0.008	1.81	1.52	548.8
15	CTAB	0.099	0.109	0.060	0.005	1.81	1.10	544.1
15	CTAB	0.093	0.103	0.060	0.008	1.71	1.11	516.1
16	CTAB	0.125	0.254	0.132	0.005	1.93	2.04	1272.1
16	CTAB	0.113	0.249	0.125	0.005	1.99	2.19	1243.0
17	CTAB	0.179	0.400	0.206	0.008	1.95	2.23	1999.7
17	CTAB	0.185	0.414	0.209	0.004	1.98	2.24	2069.7
18	CTAB	0.130	0.253	0.138	0.017	1.83	1.95	1265.2
18	CTAB	0.119	0.249	0.131	0.006	1.91	2.09	1243.3
19	CTAB	0.120	0.263	0.133	0.003	1.97	2.18	1316.3
19	CTAB	0.112	0.243	0.123	0.003	1.97	2.17	1215.7
21	CTAB	0.153	0.321	0.160	0.002	2.00	2.10	1603.0
21	CTAB	0.157	0.313	0.156	0.001	2.00	1.99	1562.7
25	CTAB	0.061	0.085	0.058	0.020	1.46	1.39	211.8
25	CTAB	0.068	0.098	0.066	0.020	1.48	1.44	245.9
29	CTAB	0.175	0.307	0.180	0.035	1.70	1.76	768.0
29	CTAB	0.164	0.289	0.171	0.034	1.69	1.76	722.7

NOT: 2. set DNA izolasyonunda 7, 20, 22, 23, 24, 26, 27 ve 28. aksesyonlara ait bitki olmadığı için DNA izolasyonları yapılamadı.

DNA KONSANTRASYONU SPEKTROFOTOMETRE OKUMA SONUÇLARI – SET 3

Çeşit No	İzolasyon Metodu	A_{230}	A_{260}	A_{280}	A_{320}	$A_{260/280}$	$A_{260/320}$	DNA Konsantrasyonu
1	CTAB	0.059	0.113	0.062	0.005	1.82	1.90	565.6
1	CTAB	0.070	0.119	0.066	0.003	1.82	1.69	596.6
2	CTAB	0.286	0.208	0.139	0.022	1.50	0.73	1041.7
2	CTAB	0.330	0.220	0.149	0.021	1.47	0.67	1100.4
3	CTAB	0.101	0.099	0.064	0.023	1.55	0.98	496.2
3	CTAB	0.101	0.097	0.058	0.014	1.66	0.96	485.4
4	CTAB	0.084	0.152	0.081	0.011	1.87	1.81	761.8
4	CTAB	0.091	0.170	0.087	0.001	1.96	1.87	848.0
5	CTAB	0.070	0.057	0.031	0.001	1.84	0.81	285.4
5	CTAB	0.067	0.059	0.034	0.003	1.72	0.88	294.0
6	CTAB	0.101	0.079	0.053	0.012	1.49	0.78	394.2
6	CTAB	0.112	0.084	0.056	0.017	1.50	0.75	419.2
8	CTAB	0.023	0.031	0.017	0.000	1.80	1.32	155.0
8	CTAB	0.023	0.034	0.019	0.003	1.73	1.46	168.3
9	CTAB	0.086	0.148	0.082	0.010	1.81	1.72	740.2
9	CTAB	0.074	0.141	0.079	0.011	1.79	1.91	706.6
10	CTAB	0.092	0.187	0.100	0.006	1.88	2.05	935.7
10	CTAB	0.097	0.197	0.105	0.008	1.88	2.02	986.0
11	CTAB	0.104	0.134	0.075	0.011	1.79	1.29	672.2
11	CTAB	0.087	0.133	0.074	0.010	1.80	1.53	663.1
12	CTAB	0.032	0.039	0.025	0.006	1.58	1.21	195.5
12	CTAB	0.028	0.039	0.023	0.002	1.72	1.37	193.7
13	CTAB	0.036	0.070	0.038	0.007	1.82	1.94	349.2
13	CTAB	0.044	0.074	0.045	0.012	1.63	1.67	370.2
14	CTAB	0.065	0.140	0.071	0.000	1.97	2.14	699.6
14	CTAB	0.068	0.136	0.071	0.003	1.90	2.00	680.6
15	CTAB	0.386	0.322	0.259	0.060	1.24	0.83	1609.4
15	CTAB	0.477	0.326	0.251	0.048	1.30	0.68	1630.4
16	CTAB	0.112	0.182	0.101	0.016	1.80	1.62	908.0
16	CTAB	0.130	0.203	0.112	0.016	1.81	1.56	1015.1
17	CTAB	0.136	0.250	0.138	0.023	1.81	1.85	1251.7
17	CTAB	0.106	0.229	0.119	0.006	1.92	2.16	1147.0
18	CTAB	0.065	0.137	0.069	0.000	1.98	2.11	687.2
18	CTAB	0.059	0.123	0.061	0.000	2.02	2.07	613.3
19	CTAB	0.063	0.130	0.068	0.002	1.92	2.05	652.0
19	CTAB	0.062	0.130	0.068	0.003	1.91	2.11	651.9
21	CTAB	0.068	0.132	0.070	0.002	1.90	1.94	659.9
21	CTAB	0.065	0.130	0.069	0.002	1.88	1.99	649.4

NOT: 3. set DNA izolasyonunda 7, 20, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 ve 29. aksesyonlara ait bitki olmadığı için DNA izolasyonları yapılamadı.

DNA KONSANTRASYONU SPEKTROFOTOMETRE OKUMA SONUÇLARI – SET 4

Çeşit No	İzolasyon Metodu	A_{230}	A_{260}	A_{280}	A_{320}	$A_{260/280}$	$A_{260/320}$	DNA Konsantrasyonu
1	CTAB	0.070	0.048	0.032	0.003	1.51	0.70	242.2
1	CTAB	0.065	0.047	0.032	0.008	1.48	0.72	235.7
2	CTAB	0.053	0.105	0.055	0.001	1.89	1.97	522.8
2	CTAB	0.057	0.106	0.057	0.004	1.87	1.84	529.4
3	CTAB	0.044	0.083	0.050	0.004	1.68	1.88	417.5
3	CTAB	0.043	0.078	0.046	0.009	1.70	1.81	388.6
4	CTAB	0.017	0.028	0.020	0.002	1.42	1.65	140.6
4	CTAB	0.026	0.030	0.015	0.000	2.00	1.14	149.9
5	CTAB	0.104	0.071	0.053	0.013	1.35	0.68	354.0
5	CTAB	0.106	0.067	0.048	0.009	1.39	0.63	335.7
6	CTAB	0.031	0.051	0.031	0.001	1.67	1.66	256.2
6	CTAB	0.035	0.049	0.034	0.015	1.46	1.38	243.9
8	CTAB	0.025	0.041	0.025	0.002	1.67	1.62	204.5
8	CTAB	0.033	0.044	0.025	0.003	1.73	1.34	218.7
9	CTAB	0.026	0.047	0.027	0.001	1.73	1.81	233.8
9	CTAB	0.030	0.045	0.026	0.002	1.71	1.50	223.0
10	CTAB	0.034	0.062	0.035	0.001	1.78	1.83	310.9
10	CTAB	0.036	0.059	0.034	0.002	1.73	1.65	296.6
11	CTAB	0.016	0.023	0.015	0.000	1.61	1.43	117.5
11	CTAB	0.016	0.023	0.014	0.000	1.64	1.47	116.2
12	CTAB	0.033	0.054	0.030	0.000	1.78	1.61	270.2
12	CTAB	0.033	0.054	0.031	0.004	1.75	1.66	272.2
13	CTAB	0.028	0.048	0.028	0.001	1.68	1.68	238.5
13	CTAB	0.027	0.047	0.026	0.000	1.80	1.78	236.4
14	CTAB	0.038	0.068	0.037	0.000	1.81	1.79	337.7
14	CTAB	0.036	0.063	0.035	0.000	1.82	1.77	314.8
15	CTAB	0.024	0.022	0.016	0.000	1.40	0.91	110.7
15	CTAB	0.024	0.024	0.016	0.000	1.46	1.01	119.0
16	CTAB	0.028	0.050	0.027	0.001	1.83	1.78	248.5
16	CTAB	0.028	0.051	0.027	0.000	1.91	1.79	254.4
17	CTAB	0.056	0.115	0.059	0.000	1.96	2.07	576.3
17	CTAB	0.057	0.113	0.058	0.001	1.94	1.97	563.3
18	CTAB	0.022	0.031	0.020	0.001	1.57	1.36	153.2
18	CTAB	0.024	0.029	0.020	0.007	1.43	1.20	144.6
18	CTAB	0.024	0.036	0.023	0.004	1.57	1.49	182.5
18	CTAB	0.025	0.036	0.022	0.002	1.65	1.45	178.8
19	CTAB	0.035	0.057	0.033	0.002	1.71	1.63	286.2
19	CTAB	0.033	0.056	0.033	0.002	1.73	1.69	282.1

NOT: 4. set DNA izolasyonunda 7, 20, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 ve 29. aksesyonlara ait bitki olmadığı için DNA izolasyonları yapılamadı.

DNA KONSANTRASYONU SPEKTROFOTOMETRE OKUMA SONUÇLARI – SET 5

Çeşit No	İzolasyon Metodu	A_{230}	A_{260}	A_{280}	A_{320}	$A_{260/280}$	$A_{260/320}$	DNA Konsantrasyonu
1	CTAB	0.090	0.107	0.068	0.014	1.59	1.19	537.4
1	CTAB	0.090	0.107	0.067	0.015	1.59	1.19	534.4
3	CTAB	0.015	0.027	0.016	0.000	1.71	1.79	133.0
3	CTAB	0.017	0.029	0.017	0.000	1.73	1.71	144.0
4	CTAB	0.015	0.019	0.014	0.005	1.41	1.26	95.9
4	CTAB	0.013	0.019	0.013	0.000	1.48	1.48	93.1
5	CTAB	0.016	0.021	0.014	0.002	1.53	1.30	106.3
5	CTAB	0.020	0.022	0.015	0.006	1.44	1.12	110.3
6	CTAB	0.020	0.034	0.018	0.000	1.84	1.73	169.5
6	CTAB	0.023	0.038	0.020	0.000	1.90	1.71	192.2
8	CTAB	0.018	0.017	0.012	0.005	1.38	0.93	84.5
8	CTAB	0.017	0.017	0.012	0.002	1.45	1.01	85.3
9	CTAB	0.009	0.011	0.006	0.000	1.88	1.27	57.2
9	CTAB	0.010	0.013	0.007	0.000	1.81	1.22	64.1
10	CTAB	0.010	0.013	0.007	0.000	1.79	1.22	63.2
10	CTAB	0.012	0.014	0.008	0.000	1.75	1.21	70.7
11	CTAB	0.017	0.016	0.012	0.001	1.39	0.94	81.4
11	CTAB	0.012	0.017	0.011	0.000	1.62	1.45	86.0
12	CTAB	0.050	0.081	0.046	0.003	1.75	1.60	402.5
12	CTAB	0.067	0.085	0.049	0.002	1.75	1.27	424.9
13	CTAB	0.082	0.139	0.080	0.015	1.73	1.69	694.9
13	CTAB	0.089	0.141	0.081	0.014	1.74	1.58	705.8
14	CTAB	0.093	0.176	0.095	0.009	1.85	1.88	878.9
14	CTAB	0.088	0.164	0.087	0.019	1.89	1.86	818.7
15	CTAB	0.082	0.131	0.078	0.018	1.68	1.59	652.8
15	CTAB	0.082	0.135	0.078	0.016	1.74	1.65	673.8
16	CTAB	0.041	0.063	0.035	0.003	1.83	1.57	317.3
16	CTAB	0.040	0.062	0.035	0.002	1.76	1.55	311.6
17	CTAB	0.038	0.051	0.034	0.003	1.51	1.33	256.2
17	CTAB	0.041	0.050	0.033	0.004	1.51	1.21	250.0
18	CTAB	0.037	0.047	0.033	0.012	1.44	1.27	237.4
18	CTAB	0.041	0.048	0.032	0.011	1.49	1.17	239.8
20	CTAB	0.048	0.067	0.043	0.011	1.57	1.40	333.7
20	CTAB	0.045	0.066	0.040	0.004	1.67	1.47	329.7
21	CTAB	0.013	0.022	0.014	0.001	1.56	1.66	108.6
21	CTAB	0.013	0.024	0.015	0.001	1.56	1.75	118.0

NOT: 5. set DNA izolasyonunda 2, 7, 20, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 ve 29. aksesyonlara ait bitki olmadığı için DNA izolasyonları yapılamadı.

DNA KONSANTRASYONU SPEKTROFOTOMETRE OKUMA SONUÇLARI - SET 6

Çeşit No	İzolasyon Metodu	A_{230}	A_{260}	A_{280}	A_{320}	$A_{260/280}$	$A_{260/320}$	DNA Konsantrasyonu
1	CTAB	0.015	0.027	0.018	0.004	1.51	1.74	133.9
1	CTAB	0.014	0.026	0.017	0.000	1.54	1.91	131.0
3	CTAB	0.036	0.083	0.041	0.000	2.00	2.32	412.7
3	CTAB	0.038	0.084	0.043	0.000	1.93	2.22	419.2
4	CTAB	0.004	0.011	0.007	0.000	1.58	2.79	55.8
4	CTAB	0.015	0.019	0.011	0.001	1.71	1.31	97.3
5	CTAB	0.013	0.023	0.016	0.001	1.44	1.82	115.7
5	CTAB	0.012	0.023	0.015	0.004	1.48	1.98	114.8
6	CTAB	0.050	0.056	0.035	0.004	1.60	1.13	279.8
6	CTAB	0.050	0.057	0.034	0.001	1.69	1.13	284.4
8	CTAB	0.048	0.109	0.057	0.001	1.91	2.26	545.1
8	CTAB	0.049	0.109	0.055	0.000	1.99	2.23	546.9
9	CTAB	0.057	0.125	0.064	0.002	1.92	2.18	624.8
9	CTAB	0.058	0.130	0.065	0.001	2.00	2.24	650.6
10	CTAB	0.030	0.070	0.035	0.000	1.99	2.35	348.9
10	CTAB	0.033	0.073	0.037	0.000	1.97	2.22	363.2
11	CTAB	0.067	0.147	0.073	0.001	2.00	2.20	734.2
11	CTAB	0.064	0.144	0.071	0.000	2.02	2.25	720.7
12	CTAB	0.066	0.148	0.075	0.000	1.97	2.25	739.3
12	CTAB	0.063	0.142	0.074	0.000	1.92	2.24	709.8
13	CTAB	0.052	0.111	0.059	0.002	1.87	2.11	552.7
13	CTAB	0.050	0.110	0.056	0.000	1.97	2.20	552.4
14	CTAB	0.030	0.047	0.030	0.009	1.57	1.56	235.2
14	CTAB	0.035	0.046	0.027	0.001	1.70	1.82	231.4
15	CTAB	0.068	0.128	0.072	0.013	1.77	1.87	637.8
15	CTAB	0.066	0.123	0.072	0.014	1.71	1.87	615.7
16	CTAB	0.077	0.172	0.087	0.000	1.97	2.23	860.7
16	CTAB	0.080	0.176	0.090	0.002	1.95	2.20	881.2
18	CTAB	0.017	0.031	0.020	0.004	1.55	1.79	155.4
18	CTAB	0.016	0.027	0.017	0.002	1.58	1.73	134.8
19	CTAB	0.153	0.326	0.169	0.014	1.93	2.13	1627.5
19	CTAB	0.147	0.322	0.168	0.011	1.92	2.19	1609.2
21	CTAB	0.085	0.147	0.080	0.015	1.85	1.74	736.5
21	CTAB	0.084	0.144	0.080	0.018	1.80	1.72	722.2

NOT: 6. set DNA izolasyonunda 2, 7, 17, 20, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 ve 29. aksesyonlara ait bitki olmadığı için DNA izolasyonları yapılamadı.

DNA KONSANTRASYONU SPEKTROFOTOMETRE OKUMA SONUÇLARI – SET 7

Çeşit No	İzolasyon Metodu	A_{230}	A_{260}	A_{280}	A_{320}	$A_{260/280}$	$A_{260/320}$	DNA Konsantrasyonu
1	CTAB	0.012	0.036	0.023	0.000	1.59	3.09	182.0
1	CTAB	0.012	0.036	0.022	0.000	1.60	2.90	178.0
3	CTAB	0.035	0.062	0.035	0.002	1.79	1.79	310.6
3	CTAB	0.033	0.061	0.035	0.002	1.72	1.83	303.9
4	CTAB	0.039	0.087	0.049	0.002	1.79	2.24	434.2
4	CTAB	0.040	0.089	0.046	0.000	1.95	2.20	443.8
5	CTAB	0.018	0.026	0.015	0.002	1.74	1.45	131.4
5	CTAB	0.017	0.026	0.013	0.000	2.01	1.54	129.6
6	CTAB	0.051	0.118	0.058	0.000	2.02	2.32	589.8
6	CTAB	0.056	0.115	0.057	0.001	2.01	2.04	574.2
8	CTAB	0.034	0.075	0.038	0.002	1.95	2.18	372.6
8	CTAB	0.036	0.074	0.035	0.000	2.12	2.07	371.4
9	CTAB	0.027	0.053	0.027	0.000	1.98	2.01	266.4
9	CTAB	0.027	0.058	0.030	0.001	1.95	2.15	288.7
10	CTAB	0.026	0.058	0.032	0.000	1.78	2.26	289.1
10	CTAB	0.032	0.067	0.035	0.000	1.89	2.09	334.3
11	CTAB	0.050	0.101	0.045	0.000	2.24	2.00	504.1
11	CTAB	0.051	0.102	0.053	0.002	1.91	1.98	507.6
12	CTAB	0.044	0.078	0.036	0.000	2.19	1.77	392.5
12	CTAB	0.040	0.081	0.044	0.002	1.85	2.03	407.1
13	CTAB	0.023	0.038	0.017	0.000	2.23	1.62	188.0
13	CTAB	0.015	0.035	0.018	0.000	1.99	2.34	175.0
14	CTAB	0.065	0.114	0.062	0.002	1.83	1.77	569.8
14	CTAB	0.068	0.107	0.061	0.017	1.74	1.57	533.2
15	CTAB	0.033	0.052	0.026	0.001	1.98	1.57	260.3
15	CTAB	0.032	0.055	0.032	0.002	1.69	1.69	272.6
16	CTAB	0.020	0.044	0.024	0.000	1.80	2.20	220.6
16	CTAB	0.018	0.042	0.024	0.000	1.73	2.34	208.0
18	CTAB	0.064	0.037	0.035	0.011	1.07	0.58	186.2
18	CTAB	0.074	0.037	0.030	0.007	1.21	0.49	183.9
19	CTAB	0.021	0.052	0.031	0.000	1.69	2.46	262.5
19	CTAB	0.025	0.051	0.030	0.001	1.73	2.04	256.8
21	CTAB	0.026	0.050	0.022	0.000	2.26	1.93	248.3
21	CTAB	0.022	0.049	0.023	0.000	2.11	2.20	247.3

NOT: 7. set DNA izolasyonunda 2, 7, 17, 20, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 ve 29. aksesyonlara ait bitki olmadığı için DNA izolasyonları yapılamadı.

DNA KONSANTRASYONU SPEKTROFOTOMETRE OKUMA SONUÇLARI – SET 8

Çeşit No	İzolasyon Metodu	A_{230}	A_{260}	A_{280}	A_{320}	$A_{260/280}$	$A_{260/320}$	DNA Konsantrasyonu
1	CTAB	0.107	0.085	0.059	0.009	1.43	0.79	423.3
1	CTAB	0.125	0.097	0.059	0.008	1.64	0.77	483.9
3	CTAB	0.105	0.111	0.060	0.013	1.87	1.06	555.5
3	CTAB	0.095	0.107	0.061	0.011	1.74	1.12	533.3
4	CTAB	0.021	0.031	0.015	0.001	2.11	1.50	156.5
4	CTAB	0.018	0.030	0.014	0.000	2.19	1.67	150.9
5	CTAB	0.125	0.112	0.072	0.009	1.55	0.89	559.5
5	CTAB	0.121	0.106	0.070	0.004	1.51	0.88	530.5
6	CTAB	0.134	0.108	0.078	0.009	1.39	0.81	541.5
6	CTAB	0.150	0.110	0.078	0.007	1.42	0.73	551.9
9	CTAB	0.061	0.130	0.064	0.000	2.04	2.11	648.0
9	CTAB	0.060	0.125	0.065	0.001	1.92	2.10	626.3
10	CTAB	0.034	0.074	0.040	0.000	1.85	2.16	370.6
10	CTAB	0.038	0.077	0.037	0.000	2.10	2.04	386.2
11	CTAB	0.030	0.061	0.028	0.000	2.19	2.00	303.0
11	CTAB	0.027	0.061	0.028	0.000	1.97	2.24	303.5
12	CTAB	0.035	0.036	0.021	0.000	1.70	1.03	181.1
12	CTAB	0.036	0.035	0.021	0.000	1.65	0.98	174.7
13	CTAB	0.057	0.102	0.052	0.003	1.97	1.80	510.9
13	CTAB	0.051	0.097	0.050	0.003	1.94	1.88	484.1
14	CTAB	0.156	0.158	0.105	0.022	1.51	1.02	792.3
14	CTAB	0.154	0.156	0.097	0.016	1.61	1.01	780.5
15	CTAB	0.069	0.097	0.057	0.010	1.70	1.39	483.8
15	CTAB	0.066	0.094	0.055	0.009	1.71	1.42	469.7
16	CTAB	0.034	0.048	0.024	0.000	1.95	1.42	238.7
16	CTAB	0.036	0.051	0.026	0.000	1.94	1.41	253.1
18	CTAB	0.102	0.107	0.059	0.003	1.81	1.04	533.8
18	CTAB	0.102	0.108	0.062	0.008	1.74	1.06	541.1
19	CTAB	0.028	0.055	0.031	0.001	1.78	1.97	277.3
19	CTAB	0.027	0.055	0.029	0.000	1.89	2.02	275.4
21	CTAB	0.044	0.096	0.050	0.001	1.90	2.20	478.9
21	CTAB	0.043	0.095	0.048	0.000	1.98	2.23	475.3

NOT: 8. set DNA izolasyonunda 2, 7, 8, 17, 20, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 ve 29. aksesyonlara ait bitki olmadığı için DNA izolasyonları yapılamadı.

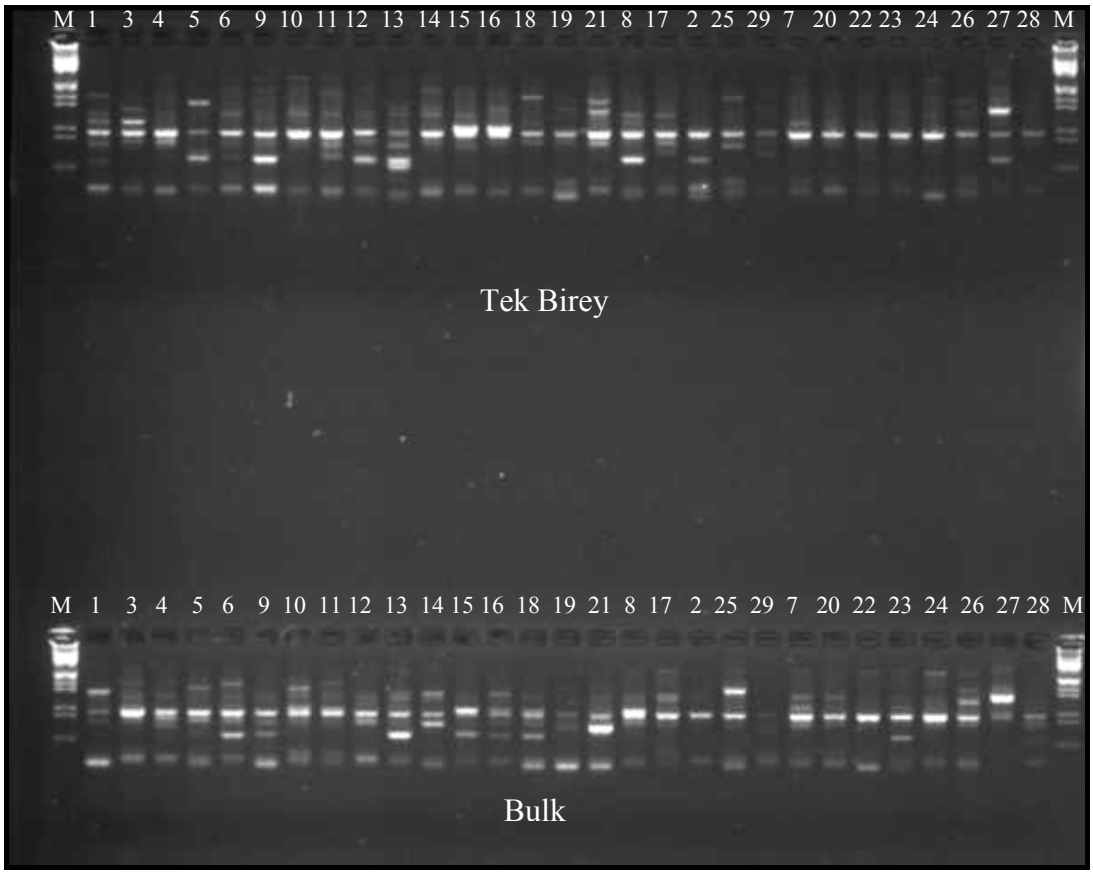
DNA KONSANTRASYONU SPEKTROFOTOMETRE OKUMA SONUÇLARI – SET 9

Çeşit No	İzolasyon Metodu	A_{230}	A_{260}	A_{280}	A_{320}	$A_{260/280}$	$A_{260/320}$	DNA Konsantrasyonu
1	CTAB	0.102	0.137	0.087	0.008	1.57	1.34	685.7
1	CTAB	0.111	0.140	0.088	0.006	1.59	1.26	699.4
3	CTAB	0.098	0.145	0.082	0.004	1.76	1.48	724.1
3	CTAB	0.100	0.144	0.084	0.007	1.71	1.44	721.8
4	CTAB	0.241	0.293	0.177	0.021	1.66	1.22	1466.5
4	CTAB	0.236	0.296	0.174	0.012	1.70	1.25	1478.3
5	CTAB	0.099	0.108	0.080	0.009	1.36	1.09	542.0
5	CTAB	0.088	0.101	0.075	0.008	1.36	1.15	506.9
6	CTAB	0.079	0.099	0.058	0.002	1.70	1.25	494.6
6	CTAB	0.075	0.085	0.054	0.007	1.56	1.14	424.0
9	CTAB	0.012	0.013	0.006	0.000	2.18	1.14	66.4
9	CTAB	0.014	0.013	0.006	0.000	2.16	0.96	65.6
10	CTAB	0.030	0.060	0.033	0.000	1.81	1.99	300.8
10	CTAB	0.035	0.062	0.035	0.003	1.75	1.75	309.7
11	CTAB	0.111	0.108	0.082	0.011	1.31	0.98	540.8
11	CTAB	0.114	0.110	0.082	0.012	1.34	0.96	549.0
12	CTAB	0.059	0.063	0.046	0.006	1.38	1.07	316.0
12	CTAB	0.062	0.066	0.046	0.007	1.44	1.06	328.3
13	CTAB	0.070	0.071	0.051	0.006	1.38	1.02	354.8
13	CTAB	0.078	0.080	0.060	0.017	1.33	1.02	399.2
14	CTAB	0.174	0.155	0.109	0.001	1.43	0.89	777.5
14	CTAB	0.165	0.156	0.110	0.007	1.41	0.95	780.4
15	CTAB	0.036	0.062	0.037	0.009	1.66	1.71	310.8
15	CTAB	0.033	0.060	0.034	0.004	1.79	1.85	302.0
16	CTAB	0.036	0.077	0.040	0.000	1.95	2.16	386.6
16	CTAB	0.036	0.077	0.041	0.000	1.90	2.14	385.9
18	CTAB	0.033	0.052	0.028	0.002	1.85	1.57	262.5
18	CTAB	0.035	0.055	0.030	0.002	1.81	1.55	274.0
19	CTAB	0.038	0.065	0.037	0.001	1.75	1.73	326.3
19	CTAB	0.039	0.067	0.037	0.000	1.81	1.71	335.7
21	CTAB	0.027	0.060	0.029	0.000	2.09	2.27	302.4
21	CTAB	0.031	0.060	0.033	0.001	1.81	1.92	302.4

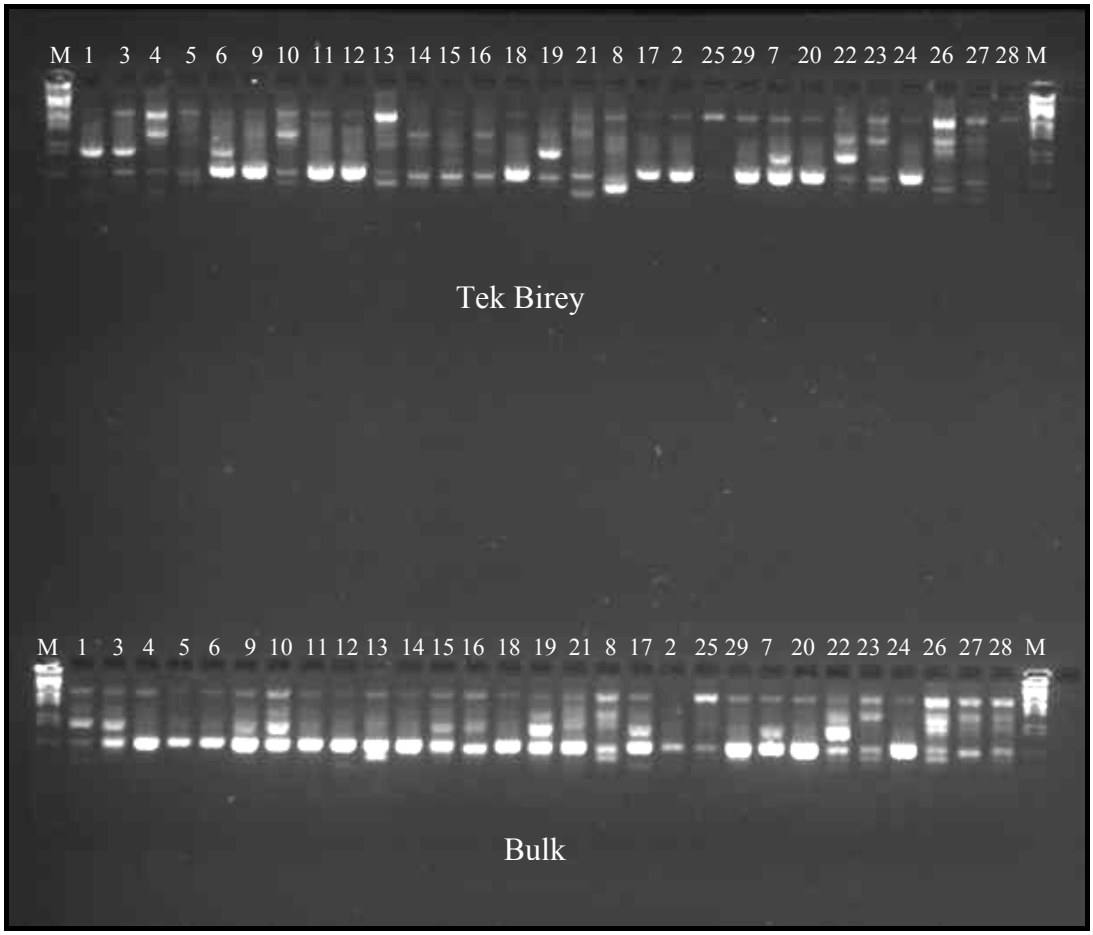
NOT: 9. set DNA izolasyonunda 2, 7, 8, 17, 20, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 ve 29. aksesyonlara ait bitki olmadığı için DNA izolasyonları yapılamadı.

EK-F Çalışmada elde edilen bazı RAPD-PCR jel görüntüleri

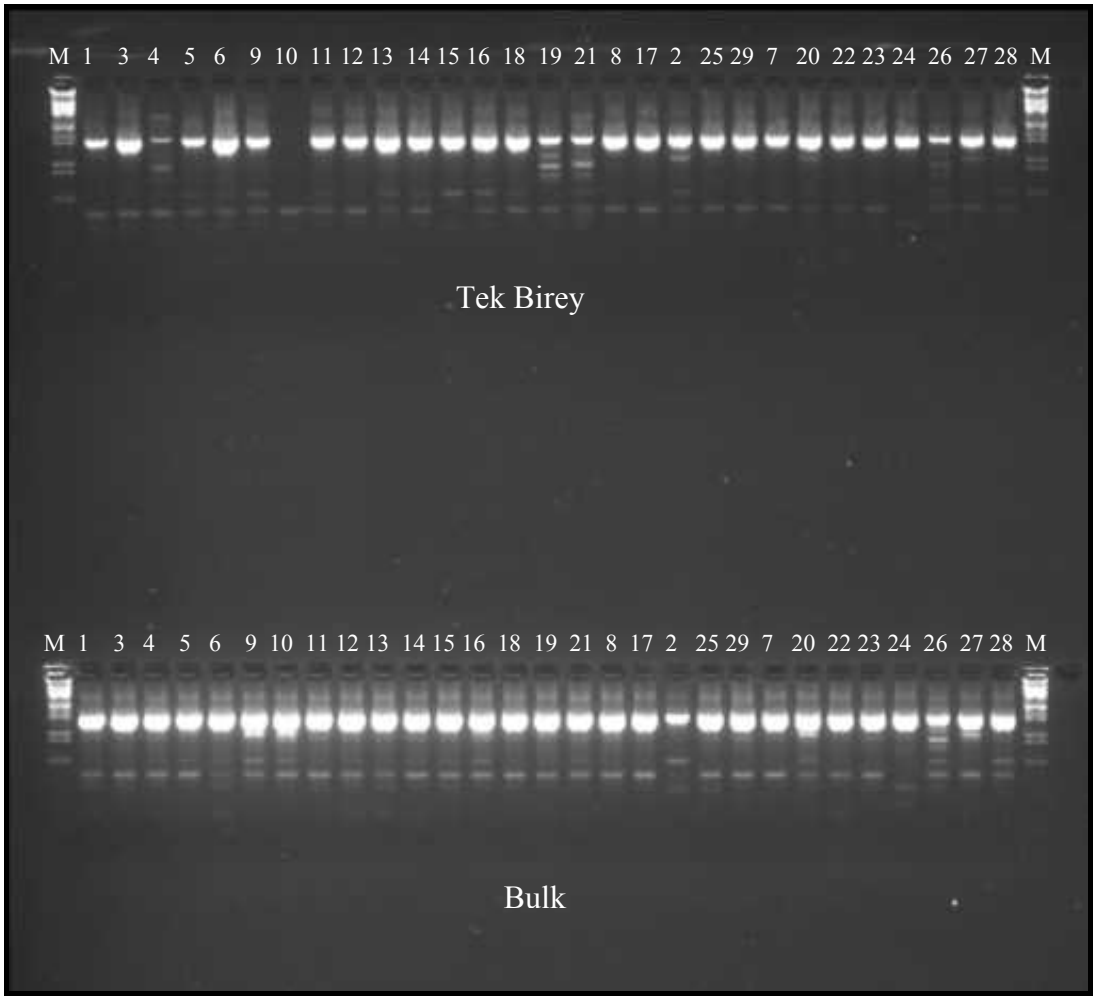
Araştırma sonuçları ve tartışma kısmında yer almayan bazı RAPD-PCR jel görüntüleri aşağıda verilmiştir. Yirminci bireye ait DNA tüm primerlerde çalışılamadığı için bazı jel görüntülerinde birey sayısı 28 veya jelde 20. bireye ait yuva boş bulunmaktadır.



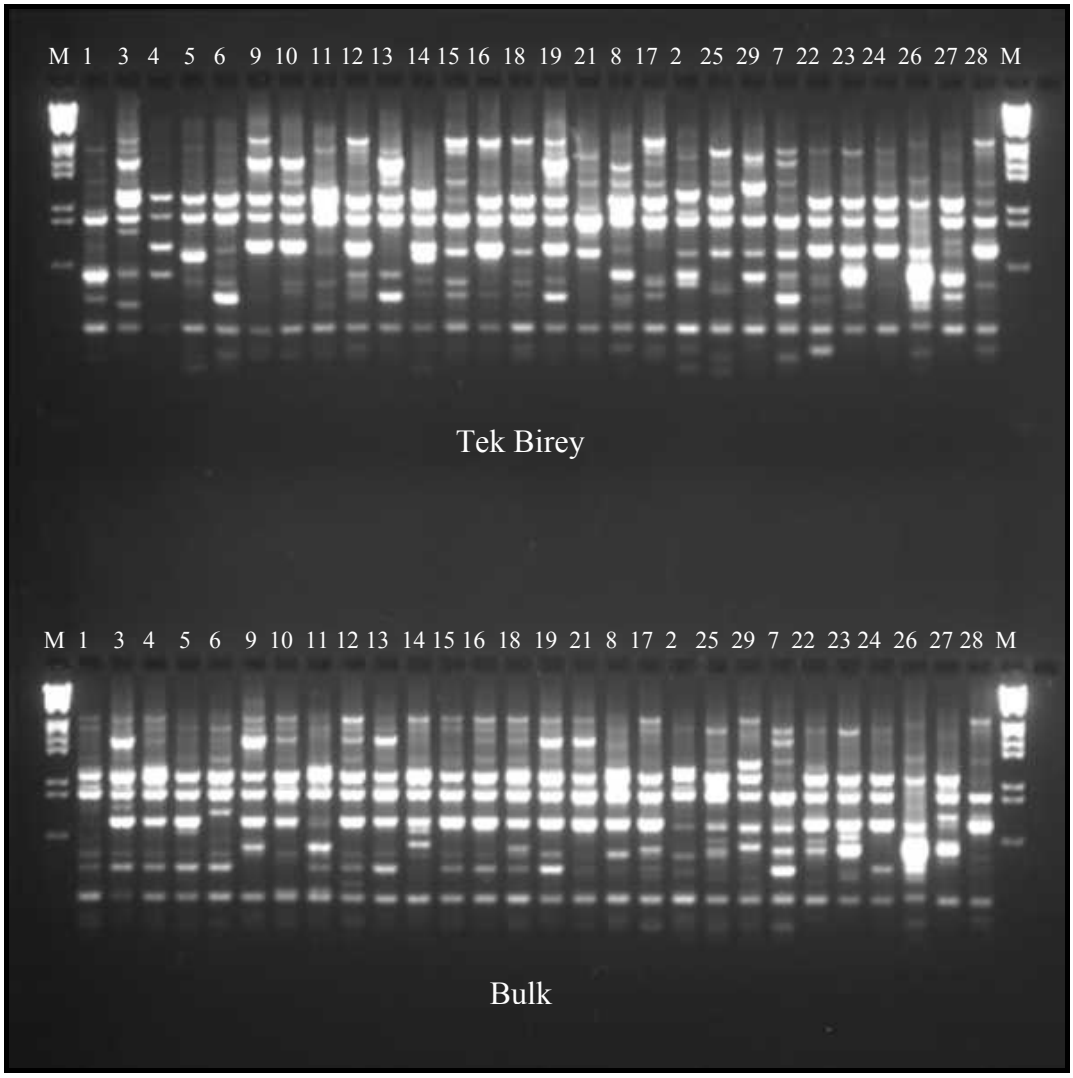
EK-F.1 RAPD L2 primerinin kenevir aksesyonlarında oluşturduğu DNA bantları



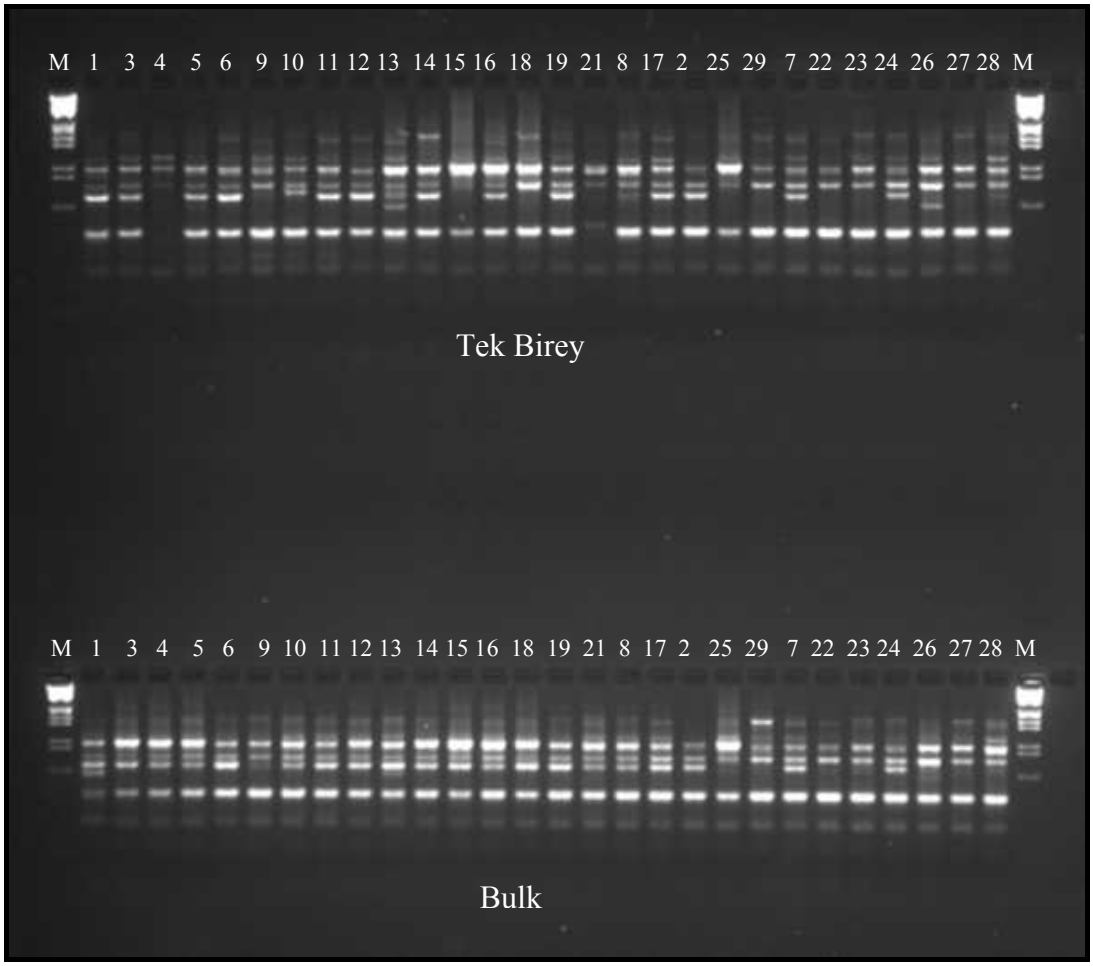
EK-F.2 RAPD L3 primerinin kenevir aksesyonlarında oluşturduğu DNA bantları



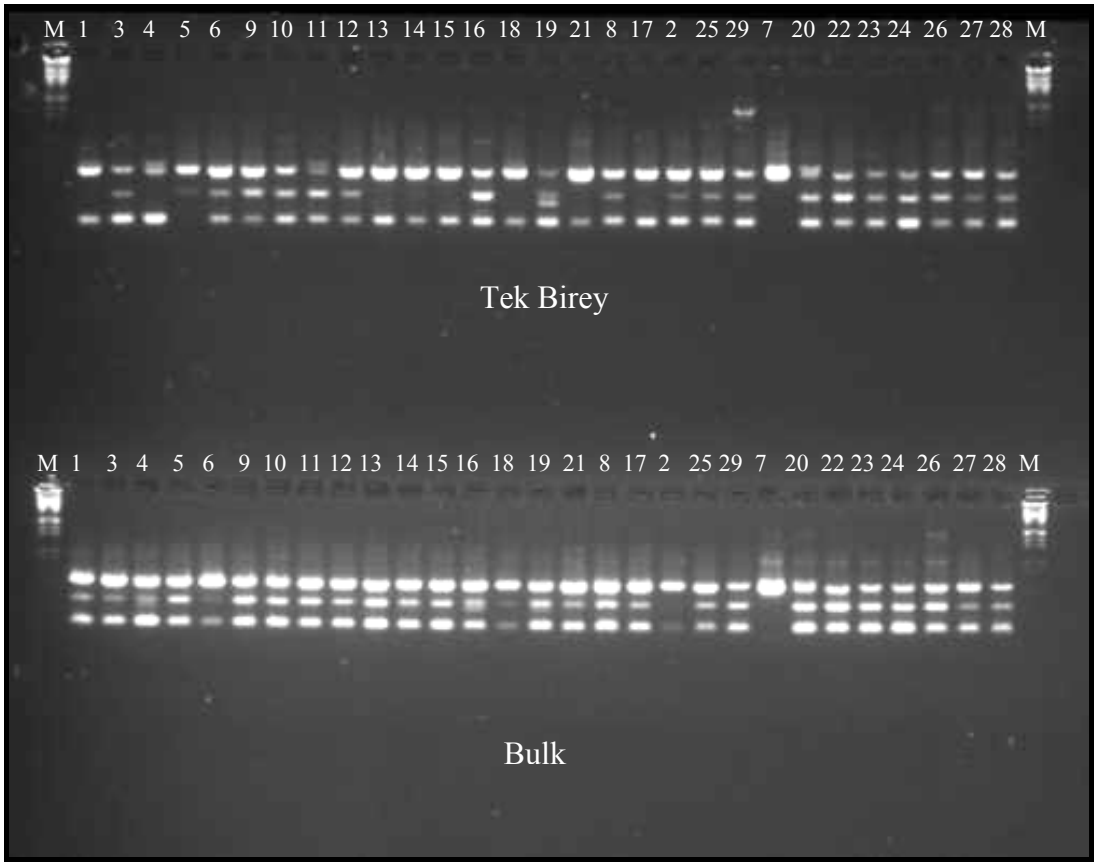
EK-F.3 RAPD L6 primerinin kenevir aksesyonlarında oluşturduğu DNA bantları



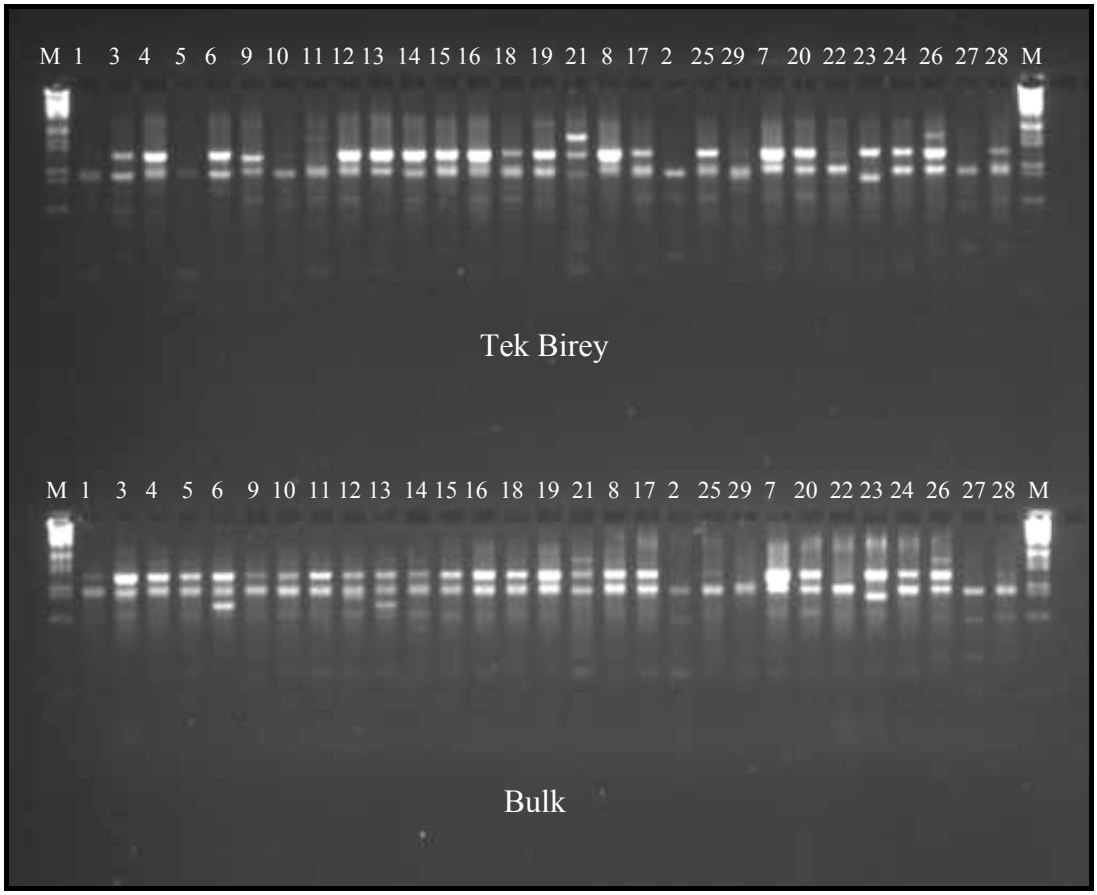
EK-F.4 RAPD B1 primerinin kenevir aksesyonlarında oluşturduğu DNA bantları



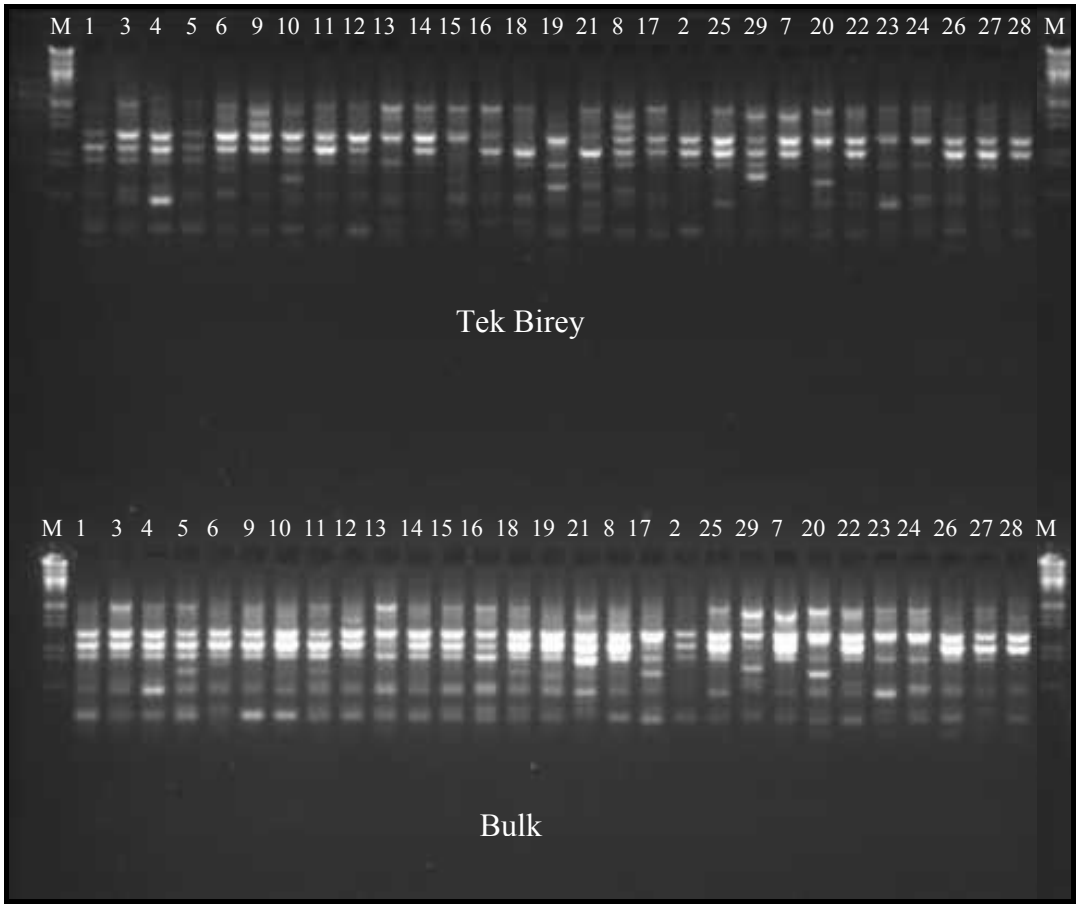
EK-F.5 RAPD B2 primerinin kenevir aksesyonlarında oluşturduğu DNA bantları



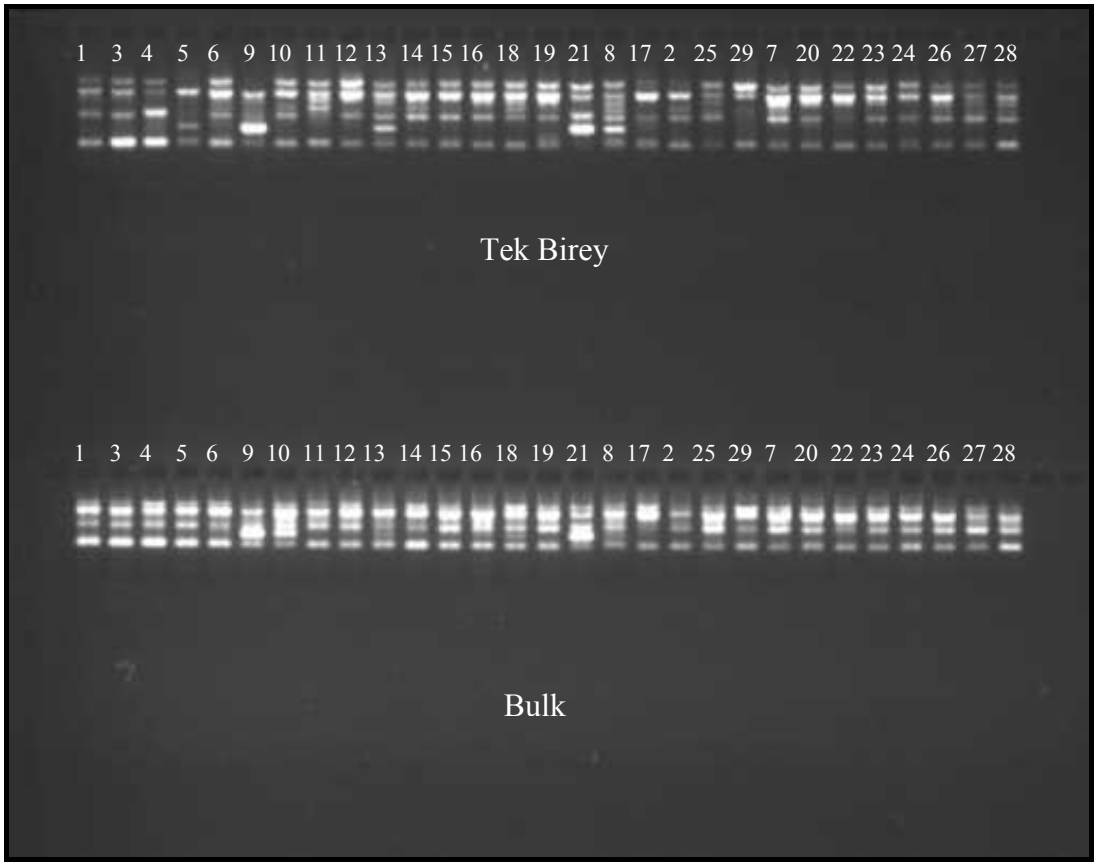
EK-F.6 RAPD B3 primerinin kenevir aksesyonlarında oluşturduğu DNA bantları



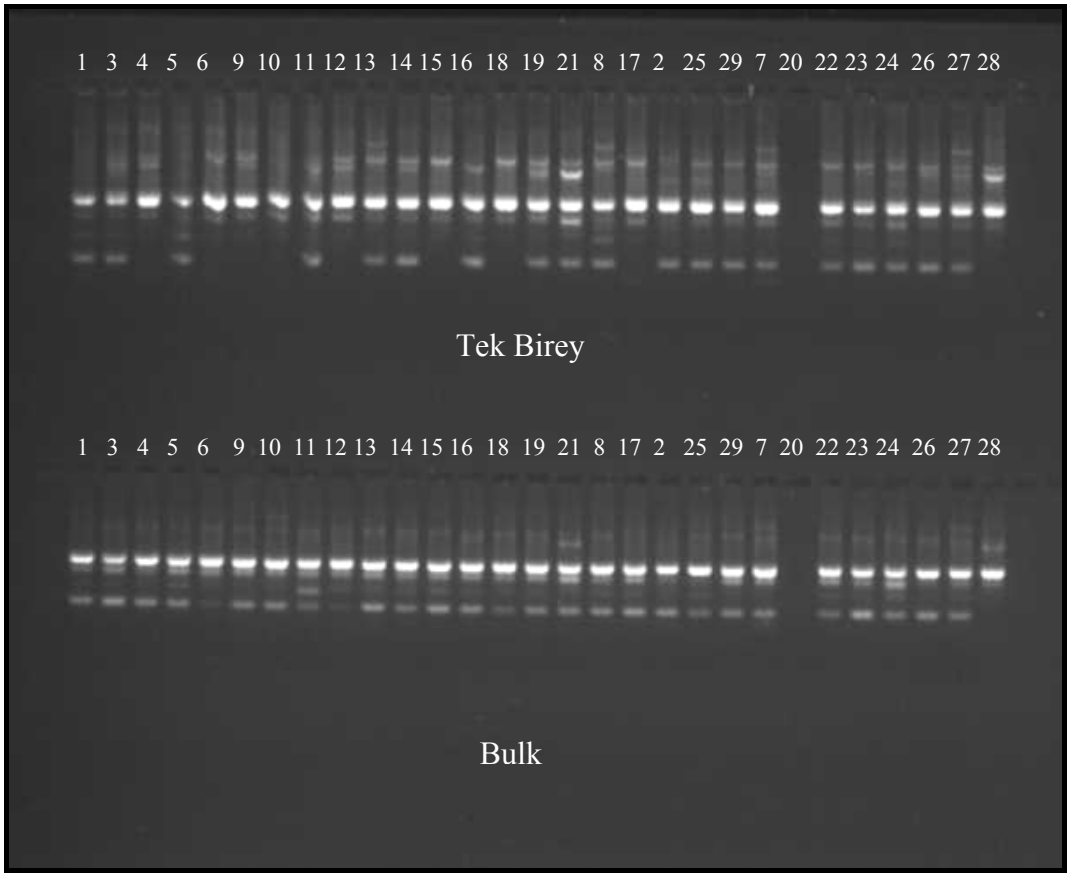
EK-F.7 RAPD B4 primerinin kenevir aksesyonlarında oluşturduğu DNA bantları



EK-F.8 RAPD B5 primerinin kenevir aksesyonlarında oluşturduğu DNA bantları

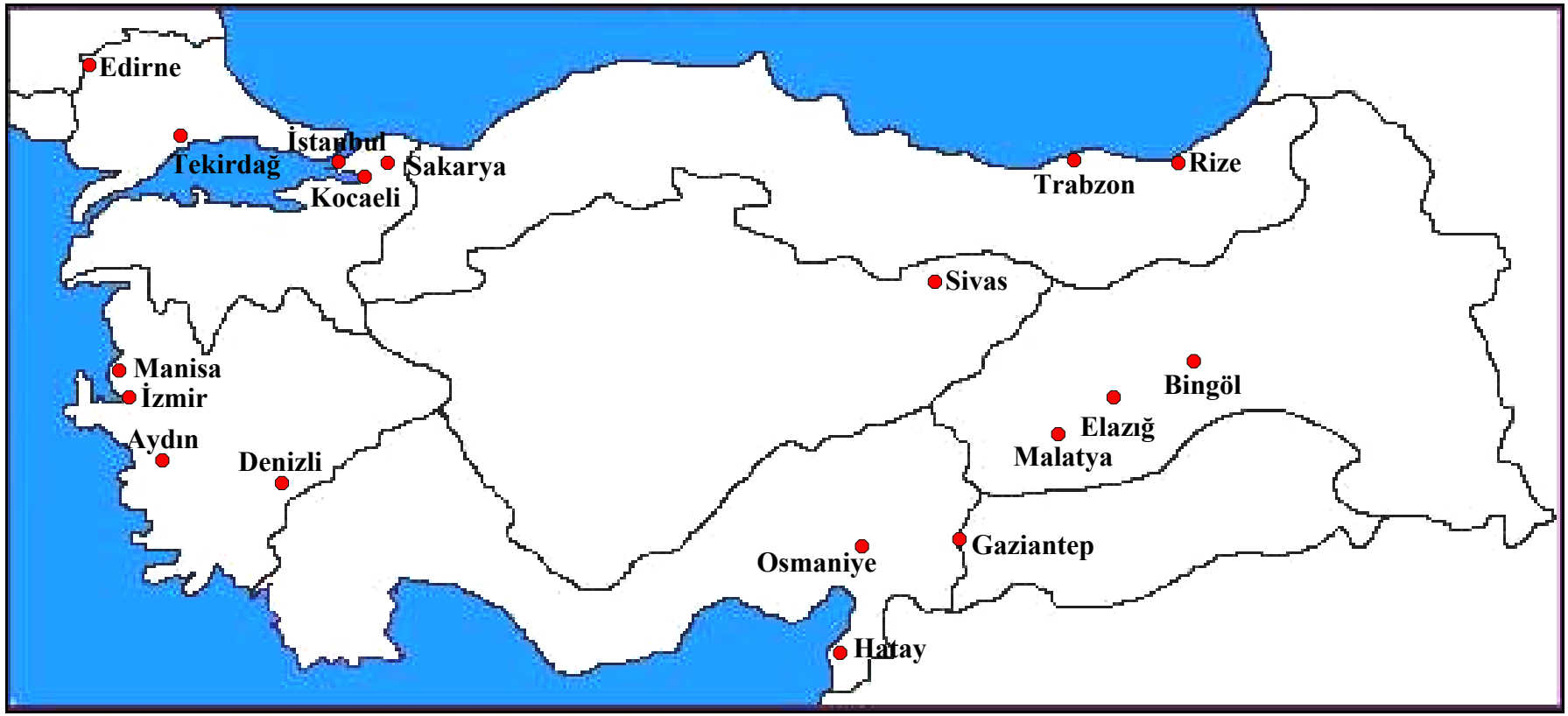


EK-F.9 RAPD B6 primerinin kenevir aksesyonlarında oluşturduğu DNA bantları



EK-F.10 RAPD B8 primerinin kenevir aksesyonlarında oluşturduğu DNA bantları

EK-G Çalışmada kullanılan kenevir tohumlarının ele geçirildiği illerin Türkiye Haritası üzerinde gösterilmesi



ÖZGEÇMİŞ

Adı soyadı:	Emine PINARKARA
Doğum yeri ve tarihi:	KONYA, 1980
Ünvan:	Ziraat Mühendisi
Yabancı dil:	İngilizce
Adres:	S.Ü. Ziraat Fak. Zootekni Bölümü, Kampüs / KONYA
E-posta:	eminepinarkara@hotmail.com
Cep Tel:	0535 983 82 37

EĞİTİM

Program	**Yıl**
Özel İdare 100. Yıl İlkolkulu	1987-1992
Mehmet Akif Ersoy Lisesi (Orta kısım)	1992-1995
Yabancı Dil Ağırlıklı Mehmet Akif Ersoy Lisesi	1995-1999
S.Ü. Ziraat Fakültesi Hayvansal Üretim Programı	2000-2004
S.Ü. FBE Zootekni ABD Yüksek Lisans Programı	2004-2007

Araştırma Konuları

Yaygın Kullanılan Dominant Genetik Markörler ve İstatistiki Analiz Yöntemleri

BURSLAR

Selçuk Üniversitesi Rektörlük Bursu 2002-2003
Selçuk Üniversitesi Rektörlük Bursu 2003-2004

YAYINLAR

1. HAKKI, E. E., **PINARKARA, E.**, KAYIS, S. A., ve SAG, A. (2006). Genetic relatedness analyses of *Cannabis sativa* L. from different geographic regions of Anatolia. The 4th European Academy of Forensic Science Conference (EAFS2006). 13-16 June 2006. Helsinki, Finland. Abstract p. 180.

2. **PINARKARA, E.**, KAYIŞ, S. A., HAMURCU, M., GEZGİN, S., SAĞ, A., ve HAKKI, E. E. (2006). Uyuşturucu Tipi Kenevir Genotiplerinin Bora Tepkileri (Response of Drug Type Cannabis Genotypes to Boron). III. Uluslararası Bor Sempozyumu. 2-4 Kasım 2006, Ankara, Türkiye, p. 139-144.

3. HAKKI, E. E., KAYIS, S. A., **PINARKARA, E.**, ve SAG, A. (2007). Inter Simple Sequence Repeats Separate Efficiently Hemp from Marijuana (*Cannabis sativa* L.). (Electronic Journal of Biotechnology October 15, 2007 Vol. 10, no.4 sayısında yayınlanmak üzere kabul edildi).

4. **PINARKARA, E.**, KAYIS, S. A., SAG, A. ve HAKKI, E. E. Individualization of Seized Marijuana (*Cannabis sativa* L.) in Turkey (Journal of Forensic Science'ta yayınlanmak üzere teslim edildi).

5. KAYIŞ, S. A., HAKKI, E. E., **PINARKARA, E.** ve SAĞ, A. Dominant Genetik Markörlerin İstatistiki Analizleri. (2007). XV. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi. 28-31 Ekim 2007, Antalya, Türkiye (yayınlanmak üzere gönderildi).