

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Yıldız DOĞAN**

**BAZI CEVİZ (*Juglans regia* L.) ÇEŞİT VE GENOTİPLERİNİN  
MOLEKÜLER MARKÖR TEKNİKLERİ İLE KARAKTERİZASYONU**

**BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI**

**ADANA, 2006**

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BAZI CEVİZ (*Juglans regia* L.) ÇEŞİT VE GENOTİPLERİNİN  
MOLEKÜLER MARKÖR TEKNİKLERİ İLE KARAKTERİZASYONU**

**Yıldız DOĞAN**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI**

**Bu tez ..../..../ 2006 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oybirliği İle  
Kabul Edilmiştir.**

İmza..... İmza..... İmza.....  
Doç. Dr. Salih KAFKAS Prof. Dr. Nurgül TÜREMİŞ Doç. Dr. Hakan ÖZKAN  
DANIŞMAN ÜYE ÜYE

Bu Tez Enstitümüz Bahçe Bitkileri Anabilim Dalında Hazırlanmıştır.

Kod No:

Prof. Dr. Aziz ERTUNÇ  
Enstitü Müdürü

Bu Çalışma Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Tarafından  
Desteklenmiştir.

**Proje No:ZF2005YL42**

**NOT:** Bu tezde kullanılan özgün ver başka kaynaktan yapılan bildirimlerin, şekil ve fotoğrafların  
kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere  
tabidir.

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**BAZI CEVİZ (*Juglans regia* L.) ÇEŞİT VE GENOTİPLERİNİN  
MOLEKÜLER MARKÖR TEKNİKLERİ İLE KARAKTERİZASYONU**

Yıldız DOĞAN

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI**

**Danışman: Doç. Dr. Salih KAFKAS  
Yıl: 2006, Sayfa: 69**

**Jüri: Doç. Dr. Salih KAFKAS  
Prof. Dr. Nurgül TÜREMİŞ  
Doç. Dr. Hakan ÖZKAN**

Bu çalışma Türk ve yabancı orijinli 62 ceviz çeşit ve genotipleri arasındaki genetik benzerliği ortaya çıkarmak amacı ile ISSR ve RAPD DNA moleküler markör teknikleri kullanılarak yapılmıştır. Ceviz genotiplerinde DNA seviyesinde genetik çeşitliliği saptamak için 108 adet ISSR primeri ve 200 adet RAPD primeri öncelikle tarama amaçlı 7 adet ceviz genotipinde polimorfizm bakımından test edilmiştir. Taramalar sonucunda ISSR ve RAPD primerleri içerisinde polimorfizm oranına göre seçilen 25'şer adet primer tüm ceviz genotiplerine uygulanmıştır. Uygulanan 25 adet ISSR primeri toplam 181 adet bant üretmiş olup bunun 129 adedinin polimorfik olduğu belirlenmiştir. RAPD analizlerinde 25 adet primer 211 adet bant vermiş olup, bunların 144 adedinin polimorfik olduğu belirlenmiştir. ISSR tekniğinde genetik benzerlik katsayısı 0.62–0.94 arasında değişmiştir. Şen–1 ile KR–2 genetik olarak birbirlerine en yakın, KR–2 ile Sunland genetik olarak birbirine en uzak genotipler olduğu tespit edilmiştir. RAPD tekniğinde elde edilen sonuçlara göre, genetik benzerlik katsayısı 0.63–0.95 arasında değişmiştir. Akça–2 ile Karabodur birbirine en yakın, Yalova–1 ile KR–2 ise en uzak genotipler olmuştur. RAPD ve ISSR tekniklerinin kombinasyonu ile yapılan analizlerde ise, genetik benzerlik katsayısı 0.65–0.93 arasında değişim göstermiştir. Akça–2 ile Karabodur en yakın, Sunland ile KR–1 ise en uzak genotipler olmuştur. ISSR tekniği ile RAPD tekniği arasındaki korelasyon orta seviyede, 0.46 olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada ceviz genotipleri arasında genetik çeşitliliği saptamada kullanılan ISSR ve RAPD moleküler markör tekniklerinin polimorfizm ve genotipler arasında benzerliği belirlemede birbirine benzer teknikler olduğu, ancak ISSR tekniğinin RAPD tekniğine göre tekrarlanabilirlik bakımından daha üstün olduğu sonucuna varılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Ceviz, RAPD, ISSR, Genetik çeşitlilik, *Juglans regia*.

## ABSTRACT

### MSc THESIS

# CHARACTERIZATION OF SOME WALNUT CULTIVARS AND GENOTYPES (*Juglans regia* L.) VIA MOLECULAR MARKER TECHNIQUES

Yıldız DOĞAN

DEPARTMENT OF HORTICULTURE  
INSTITUTE OF BASIC AND APPLIED SCIENCES  
UNIVERSITY OF CUKUROVA

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Salih KAFKAS

Year: 2006, Page: 69

Jury : Assoc. Prof. Dr. Salih KAFKAS  
: Prof. Dr. Nurgül TÜREMİŞ  
: Assoc. Prof. Dr. Hakan ÖZKAN

This study was performed to evaluate genetic relatedness between 62 walnut cultivars originated from Turkey and other countries via ISSR and RAPD DNA molecular marker techniques. In order to determine genetic diversity among walnut genotypes, 108 ISSR primers and 200 RAPD primers were screened primarily on seven selective walnut cultivars to obtain the most polymorphic primers. Considering the screening results, 25 polymorphic primers for each marker system were selected to evaluate whole walnut cultivars. 25 ISSR primers generated 181 total bands in which 129 were polymorphic. As for 25 RAPD primers, 144 primers were polymorphic in total 211. Similarity index for ISSR technique ranged between 0.62-0.94. KR-2 and Sunland genotypes were found the closest genotypes, while KR-2 with Sunland were the most distant. According to RAPD results, genetic similarity index were changed between 0.63-0.95. Akça-2 and Karabodur genotypes were the closest cultivars, while Yalova-1 with KR-2 were the most distant. According to the combination of RAPD and ISSR data, genetic similarity index values were between 0.65-0.93. Akça-2 and Karabodur were the closest genotypes, while Sunland with KR-1 were the most distant genotypes. Correlation between RAPD and ISSR genetic similarity matrix was found to be intermediate (0.46). In this study, ISSR and RAPD techniques were found to be similar methods in determination of genetic diversity and discrimination of walnut cultivars, while ISSR was better in reproducibility.

**Key Words:** Walnut, RAPD, ISSR, Genetic diversity, *Juglans. regia*.

## TEŞEKKÜR

Öncelikle bana bu konuyu veren, araştırmaya yönlendiren ve bugüne kadar yapmış olduğumuz çalışmalarda yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen, Yüksek Lisans'a başladığım günden itibaren çalışmalarına önder olan çok değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Salih KAFKAS'a yürekten teşekkürü borç bilirim.

Tezimde kullanmış olduğum bitki materyallerini elde etmeme yardımcı olan başta bölümümüzün öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Nurgül TÜREMİŞ hocama, Gaziosmanpaşa Üniversitesi öğretim üyesi Prof. Dr. Yaşar AKÇA'ya, Kahramanmaraş Sütçüimam Üniversitesi öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Mehmet SÜTYEMEZ'e teşekkür ederim.

Tezin yürütülmesi aşamasında bilgisini ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen Çukurova Üniversitesi Tarla Bitkileri Bölümü öğretim üyesi değerli hocam Doç. Dr. Hakan ÖZKAN'a çok teşekkür ederim.

Tezimin laboratuvar çalışmalarının yürütülmesinde maddi destek sağlayan TÜBİTAK-TOVAG grubuna ve Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine teşekkürü bir borç bilirim.

Bütün tez çalışmalarım boyunca burs almamı sağlayan TÜBİTAK-TOVAG grubuna en içten teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmaları sırasında desteğini esirgemeyen değerli arkadaşım Arş. Gör. Sevda ALTINTAŞ'a, tezimin yürütülmesi sırasında değerli bilgilerini benimle paylaşan ve desteklerini esirgemeyen değerli arkadaşlarım Arş. Gör. Ali SABİR ve Arş. Gör. Ferhan SABİR'a ve laboratuvar çalışmalarımın yürütülmesi sırasında geç saatlere kadar beni yalnız bırakmadan yanımda olan ve tezimin yazımı süresince beni destekleyen değerli arkadaşım Zir. Müh. Derya İĞDIRLI'ya çok teşekkür ederim.

Bugüne kadar her zaman yanımda olan ve çalışmalarım sırasında maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen çok değerli aileme (İdris DOĞAN, Hediye DOĞAN, Mehmet Uğur ve Ülkü DOĞAN) yürekten sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

| <b>İÇİNDEKİLER</b>  | <b>SAYFA</b> |
|---|--------------|
| <b>ÖZ</b>   | <b>I</b>     |
| <b>ABSTRACT</b>   | <b>II</b>    |
| <b>TEŞEKKÜR</b>   | <b>III</b>   |
| <b>İÇİNDEKİLER</b>  | <b>IV</b>    |
| <b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b>  | <b>VI</b>    |
| <b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b>  | <b>VIII</b>  |
| <b>SİMGELER ve KISALTMALAR</b>  | <b>X</b>     |
| 1. GİRİŞ.....   | 1            |
| 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....   | 5            |
| 2.1.Genetik Markörler İle İlgili Genel Literatür Özeti.....                       | 5            |
| 2.2. Ceviz ( <i>Juglans</i> ) Türünde İzoenzim Yöntemi İle İlgili Çalışmalar..... | 6            |
| 2.3. Ceviz ( <i>Juglans</i> ) Türünde RFLP Yöntemi İle İlgili Çalışmalar.....     | 8            |
| 2.4. Ceviz ( <i>Juglans</i> ) Türünde RAPD Yöntemi İle İlgili Çalışmalar.....     | 9            |
| 2.5. Ceviz ( <i>Juglans</i> ) Türünde ISSR Yöntemi İle İlgili Çalışmalar.....     | 10           |
| 2.6. Ceviz ( <i>Juglans</i> ) Türünde SSR Yöntemi İle İlgili Çalışmalar.....      | 10           |
| 2.7. Ceviz ( <i>Juglans</i> ) Türünde AFLP Yöntemi İle İlgili Çalışmalar.....     | 11           |
| 3. MATERYAL VE METOD.....   | 12           |
| 3.1. Materyal.....  | 12           |
| 3.1.1. Denemede Kullanılan Çeşit ve Genotipler.....                               | 12           |
| 3.2. Metod.....   | 14           |
| 3.2.1. Yaprak Örneklerinin Toplanması.....  | 14           |
| 3.2.2. DNA İzolasyonu.....  | 14           |
| 3.2.3. DNA Konsantrasyonun Belirlenmesi.....                                      | 20           |
| 3.2.4. ISSR Analizleri.....   | 22           |
| 3.2.5. RAPD Analizleri.....   | 26           |
| 3.2.6. Primerlerin Polimorfizm Oranının Belirlenmesi.....                         | 33           |
| 3.2.7. Primerlerin Polimorfizm Bilgi İçeriklerinin (PBI) Belirlenmesi.            | 34           |
| 3.2.8. Primerlerin Ayırma Güçlerinin Belirlenmesi.....                            | 34           |
| 3.2.9. Soyağacı Analizleri.....   | 34           |

|   |    |
|---|----|
| 4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....  | 35 |
| 4.1. ISSR Analizleri.....   | 35 |
| 4.1.1.Ceviz Genotiplerinin ISSR Tekniği İle Karakterizasyonunda Polimorfizm ve Ayırma Gücü.....                                     | 36 |
| 4.1.2.Ceviz Çeşitlerinin ISSR Yöntemi ile Aralarındaki Genetik İlişkilerinin Belirlenmesi.....                                      | 40 |
| 4.2. RAPD Analizleri.....   | 43 |
| 4.2.1.Ceviz Genotiplerinin RAPD Tekniği İle Karakterizasyonunda Polimorfizm ve Ayırma Gücü.....                                     | 44 |
| 4.2.2.Ceviz Genotiplerinin RAPD Yöntemi ile Aralarındaki Genetik İlişkilerinin Belirlenmesi.....                                    | 47 |
| 4.2.3.RAPD ve ISSR Verilerinin Birlikte Değerlendirilmesi ve Karşılaştırılması.....   | 52 |
| 4.2.3.1. RAPD ve ISSR Tekniklerinin Polimorfizm ve Ayırma Gücü Bakımından Karşılaştırılması.....                                    | 51 |
| 4.2.3.2. Ceviz Genotipleri Arasındaki Genetik İlişkilerin RAPD ve ISSR Verilerinin Birlikte Değerlendirilmesi ile Belirlenmesi..... | 52 |
| 4.2.3.3. RAPD ve ISSR Yöntemlerinden Elde Edilen Benzerlik İndeksleri Arasındaki Korelasyon.....                                    | 55 |
| 4.2.3.4. Elde Edilen Soyağaçları ile Genetik Benzerlik İndeksleri Arasındaki Korelasyon.....  | 56 |
| 5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....   | 58 |
| KAYNAKLAR.....  | 61 |
| ÖZGEÇMİŞ.....   | 69 |
| EKLER   |    |

| <b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b>   | <b>SAYFA</b> |
|--|--------------|
| Çizelge 1.1 Dünyada önemli ceviz üreticisi ülkelerin üretim değerleri.....   | 1            |
| Çizelge 3.1 Denemede kullanılan ceviz çeşit ve genotipleri ile alındıkları genetik kaynaklar.....  | 12           |
| Çizelge 3.2 ISSR–PCR reaksiyonunda kullanılan kimyasallar ve konsantrasyonları.....  | 22           |
| Çizelge 3.3 Cevizde ISSR tekniğinin uygulanmasında PCR sıcaklık ve döngü koşulları.....  | 22           |
| Çizelge 3.4 Çalışmada kullanılan ISSR primerlerinin baz dizilimleri, baz sayıları ve Ceviz DNA’sına PCR’da yapışma sıcaklıkları.....   | 23           |
| Çizelge 3.5 RAPD–PCR reaksiyonunda kullanılan kimyasallar ve konsantrasyonları.....  | 27           |
| Çizelge 3.6 Cevizde RAPD tekniğinin uygulanmasında PCR sıcaklık ve döngü koşulları.....  | 27           |
| Çizelge 3.7 Çalışmada kullanılan RAPD primerleri ve baz dizilimleri.....   | 28           |
| Çizelge 4.1 ISSR primerlerinin amplifikasyonu sonucu elde edilen toplam bant sayıları (TBS), polimorfik bant sayıları (PBS), polimorfizm oranı (PO), polimorfizm bilgi içeriği (PBİ) ve primerin ayırma gücü (AG) değerleri.....   | 37           |
| Çizelge 4.2 RAPD primerlerinin amplifikasyonu sonucu elde edilen toplam bant sayıları (TBS), polimorfik bant sayıları (PBS), polimorfizm oranı (PO), polimorfizm bilgi içeriği (PBİ) ve primerin ayırma gücü (AG) değerleri.....   | 45           |
| Çizelge 4.3 RAPD ve ISSR primerlerinin amplifikasyonu sonucu elde edilen toplam bant sayıları (TBS), primer başına düşen toplam bant sayısı (PBDTBS), polimorfik bant sayıları (PBS), primer başına düşen polimorfik bant sayısı (PBDPBS), polimorfizm oranı (PO), polimorfizm bilgi içeriği (PBİ) ve primerin ayırma gücü (AG) değerleri..... | 51           |
| Çizelge 4.4 ISSR, RAPD ve ISSR+RAPD verilerinden elde edilen genetik benzerlik indeksleri arasındaki korelasyonlar.....  | 55           |

|             |  |    |
|-------------|--|----|
| Çizelge 4.5 | RAPD, ISSR ve RAPD + ISSR verilerinin analizi sonucunda elde edilen soyağaçları ile benzerlik indeksleri arasındaki korelasyonlar..... | 56 |
|-------------|--|----|

## ŞEKİLLER DİZİNİ

## SAYFA

|            |   |    |
|------------|---|----|
| Şekil 3.1  | Cevizde DNA izolasyonunda yaprak örneğinin sıvı azotta ezilme aşamasından bir görünüm.....                                      | 14 |
| Şekil 3.2  | Ceviz DNA izolasyonunda CTAB solüsyonu eklenme aşamasından bir görünüm.....   | 15 |
| Şekil 3.3  | Ceviz DNA izolasyonunda su banyosunda bekletme aşamasından bir görünüm .....  | 15 |
| Şekil 3.4  | Cevizde DNA izolasyonunda kloroform:isoamil alkol solüsyonunun eklenme aşamasından bir görünüm .....                            | 16 |
| Şekil 3.5  | Cevizde DNA izolasyonunda çalkalama aşamasından bir görünüm.....  | 16 |
| Şekil 3.6  | DNA izolasyonunda santrifüj aşamasından bir görünüm.....  | 17 |
| Şekil 3.7  | DNA izolasyonunda üst fazın yeni bir tüpe aktarılması aşamasından bir görünüm .....   | 17 |
| Şekil 3.8  | Cevizde DNA izolasyonunda DNA'yı çöktürmek için soğuk isopropanal ekleme aşamasından bir görünüm .....                          | 18 |
| Şekil 3.9  | DNA izolasyonunda DNA çökmesinin sağlanması için -70 <sup>0</sup> C'de bekletme aşamasından bir görünüm .....                   | 18 |
| Şekil 3.10 | DNA izolasyonunda isopropanol'ün boşaltılması aşamasından bir görünüm .....   | 19 |
| Şekil 3.11 | Cevizde DNA izolasyonunda yıkama solüsyonunun eklenmesi aşamasından bir görünüm.....  | 19 |
| Şekil 3.12 | Cevizde DNA izolasyonunda çalkalama aşamasından bir görünüm.....  | 20 |
| Şekil 3.13 | DNA izolasyonunda yıkanan DNA'nın saf suda çözündürülme aşamasından bir görünüm .....   | 20 |
| Şekil 3.14 | DNA konsantrasyonu belirlemede A. jel yükleme aşaması, B. UV transilluminatör ile jel görüntüleme aşamasından bir görünüm ..... | 21 |
| Şekil 3.15 | UBC853, UBC855 ve UBC856 nolu ISSR primerinin   | 26 |

|            |  |    |
|------------|--|----|
|            | taramada kullanılan 7 ceviz genotipindeki amplifikasyonu..   |    |
| Şekil 3.16 | OPG04, OPG05 ve OPG06 nolu RAPD primerlerinin taramada kullanılan 7 ceviz genotipindeki amplifikasyonu.. | 33 |
| Şekil 4.1  | 30 Ceviz genotipinin ISSR28 ve UBC855 nolu ISSR primerlerinin amplifikasyon ürünleri.....                | 35 |
| Şekil 4.2  | 62 Ceviz genotipine ISSR tekniğinin uygulanması sonucu elde edilen soyağacı.....                         | 42 |
| Şekil 4.3  | 30 ceviz genotipinin OPB18 ve OPH12 nolu RAPD primerlerinin amplifikasyon ürünleri.....                  | 43 |
| Şekil 4.4  | 62 Ceviz genotipine RAPD tekniğinin uygulanması sonucu elde edilen soyağacı.....                         | 48 |
| Şekil 4.5  | 62 Ceviz genotipine RAPD ve ISSR tekniğinin uygulanması sonucu elde edilen soyağacı.....                 | 53 |

## SİMGELER ve KISALTMALAR

|   |   |  |
|---|---|--|
| AFLP  | : | Amplified Fragment Length Polymorphism     |
| AG  | : | Ayrırma Gücü                               |
| bç  | : | Baz çifti                                  |
| CTAB  | : | Setil Trimetil amonyum bromit              |
| dk  | : | Dakika                                     |
| dATP  | : | deoksi adenzin trifosfat                   |
| dCTP  | : | deoksi sitidin trifosfat                   |
| dGTP  | : | deoksi guanozin trifosfat                  |
| dTTP  | : | deoksi timidin trifosfat                   |
| DNA:  | : | Deoksiribonükleik asit                     |
| EDTA  | : | Etilendiamin tetraasetikasit               |
| EST   | : | Esteraz                                    |
| HCl   | : | Hidroklorik asit                           |
| ISSR  | : | Inter Simple Sequence Repeat               |
| M   | : | Molar                                      |
| MA  | : | Moleküler ağırlık                          |
| MDH   | : | Malat dehidrogenaz                         |
| MgCl <sub>2</sub>                             | : | Magnezyum klorür                           |
| ml  | : | Mililitre                                  |
| mM  | : | Milimolar                                  |
| NaCl  | : | Sodyum klorür                              |
| Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>5</sub> | : | Sodyum metabisülfid                        |
| ng  | : | Nanogram                                   |
| PBİ   | : | Polimorfizm Bilgi İçeriği                  |
| PBS   | : | Polimorfik bant sayısı                     |
| PBDTBS  | : | Primer başına düşen toplam bant sayısı     |
| PBDPBS  | : | Primer başına düşen polimorfik bant sayısı |
| PCR   | : | Polimeraz Zincir Reaksiyonu                |
| PGM   | : | Fosfoglukomutaz                            |

|               |   |  |
|---------------|---|--|
| PO            | : | Polimorfizm oranı  |
| PRO           | : | Peroksidaz   |
| PVP           | : | Polivinilpirolidon   |
| QTL           | : | Kantitatif özellik lokusu                                  |
| RAPD          | : | Randomly Amplified Polymorphic DNA                         |
| RFLP          | : | Restriction Fragment Length Polymorphism                   |
| rpm           | : | Revolutions per minute                                     |
| SAMPL         | : | Selective amplification of microsatellite polymorphic loci |
| SSR           | : | Simple Sequence Repeat                                     |
| Taq           | : | <i>Thermus aquaticus</i>                                   |
| TBE           | : | Tris/borat/EDTA (tampon çözeltisi)                         |
| TBS           | : | Toplam bant sayısı   |
| Tris          | : | Tris (hidroksil metil) aminometan                          |
| Tris-HCl      | : | Tris hidroklorür   |
| UPGMA         | : | Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average       |
| UBC           | : | University of British Columbia                             |
| UV            | : | Ultraviolet  |
| $\mu\text{M}$ | : | Mikromolar   |
| $\mu\text{l}$ | : | Mikrolitre   |
| $\lambda$ DNA | : | Lamda deoksiribonükleik asit                               |

## 1. GİRİŞ

Ceviz; sınıfı Dicotyledoneae, takımı Juglandales, familyası Juglandaceae, cinsi *Juglans* olan sert kabuklu bir meyve türüdür (Şen, 1986). *Juglans* cinsi içerisinde 20 kadar tür bulunmasına karşın, çoğunlukla *Juglans regia*'nin kültürü ve ticareti yapılmaktadır (Manning, 1978). *Juglans regia*, Karpat dağlarından güneyden itibaren Doğu Avrupa ve Türkiye, Irak, İran'ın doğusundan Himalaya dağlarının ötesinde kalan ülkeleri içeren geniş bir alanın doğal bitkisidir (Şen, 1986). *J. regia*'nin anavatanlarından biri olan Türkiye; sahip olduğu potansiyel ile dünya ceviz üretiminde Çin, ABD ve İran'dan sonra 4. sırada yer almaktadır (Çizelge 1.1). Türkiye sahip olduğu 133.000 ton üretim değeri ile dünya ceviz üretiminde %8.9'luk paya sahiptir (Faostat, 2005).

**Çizelge 1.1** Dünya'da önemli ceviz üreticisi ülkelerin üretim değerleri (Faostat, 2005)

| Sıra | Ülkeler       | Üretim (ton)     | %            |
|------|---------------|------------------|--------------|
| 1    | Çin           | 420.000          | 28.2         |
| 2    | ABD           | 308.000          | 20.7         |
| 3    | İran          | 150.000          | 10.1         |
| 4    | Türkiye       | 133.000          | 8.9          |
| 5    | Ukrayna       | 70.000           | 4.7          |
| 6    | Hindistan     | 31.500           | 2.1          |
|      | Diğer         | 379.067          | 25.3         |
|      | <b>Toplam</b> | <b>1.491.567</b> | <b>100.0</b> |

Ceviz monoik yani erkek ve dişi çiçek salkımları aynı ağaç üzerinde ancak farklı yerlerde bulunan çiçek yapısına sahiptir. Erkek çiçek içeren püsküller (kedicikler), bir önceki gelişme döneminin sürgünleri üzerinde bulunan yan tomurcukların gelişmesiyle oluşurken, dişi çiçekler o yılın gelişme dönemine ait ilkbahar sürgünlerinin ucunda meydana gelir. Cevizlerin tozlanması rüzgârla gerçekleşir (Şen, 1986).

Türkiye'nin ceviz ağacı sayısı 4 milyon dolayında olup bunların büyük bir kısmı tohumdan çıkmıştır. Bu nedenle, genetik açımdan dolayı her bir ceviz ağacı bir çeşit yada genotip durumundadır. Bu durum ıslah açısından çok önemli olmasına

karşın, dışsatımda bir örneklilik sağlama bakımından dezavantajdır ve bu şekilde ülkemizin dış pazarda rekabet şansı bulunmamaktadır (Akça, 2003).

Tüm dünyada yetiştiriciliği yapılan ceviz çeşitleri şans çöğürlerinden veya ıslah programlarından meydana gelmiştir. Bu çeşitlerin karakterize edilmesi ıslahçılar için oldukça önemlidir. Ayrıca çeşitlerin ismine doğru olarak kısa bir süre içerisinde tanımlanması meyvecilikte çok önemlidir. Ancak genetik çeşitliliği karakterize etmek için kullanılan morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal yöntemler oldukça zaman almakta ve çevresel faktörlerden etkilenmektedir. DNA markör teknikleri ile farklı ekolojideki genetik materyallerin karakterize edilmesi sağlanmaktadır.

Bugüne kadar ceviz çeşitlerinin tanımlanması çoğunlukla biyokimyasal (Arulsekar ve ark, 1985; 1986; Aleta ve ark., 1990; 1993; Germain ve ark. 1993; Malvolti ve ark., 1993; Solar ve ark., 1994; Fornari ve ark., 2001; Vyas ve ark., 2003) yöntemlerle yapılmış ve son yıllarda da DNA markörleri kullanılmaya başlanmıştır.

Bitkilerde genetik ilişkileri ortaya çıkarmak için kullanılan ilk DNA markörü RFLP(Restriction Fragment Length Polymorphisms) olmuştur. Fakat bu yöntemin maliyetinin çok yüksek ve yavaş olması PCR'a (Polymerase Chain Reaction) dayalı moleküler markörlerin gelişmesine neden olmuştur. Bu markörlerin bazıları RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphisms) ve mikrosatellitlerdir.

Çeşitler arasındaki genetik varyasyonu ortaya çıkarmak ve en uygun moleküler markör tekniğini belirlemek amacıyla birçok bitki türünde bu yöntemler karşılaştırılmışlardır. Yapılan araştırmalar sonucunda; polimorfizm bakımından SSR (Simple Sequence Repeat) ve AFLP markörleri, maliyet bakımından RAPD ve ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) teknikleri, tekrarlanabilirlik bakımından RFLP, SSR, ISSR ve AFLP markörlerinin avantajlı oldukları belirlenmiştir. Bunların yanı sıra çalışılacak laboratuvar olanakları göz önünde bulundurulduğunda, RAPD ve ISSR yöntemlerinin radyoaktif madde kullanımının olmadığı ve koşulların sınırlı olduğu laboratuvarlarda rahatlıkla kullanılacak yöntemler olduğu bildirilmiştir (Powell ve ark., 1996; Lin ve ark., 1996; Nagaoka ve Ogihara, 1997; Jones ve ark., 1997;

Milbourne ve ark., 1997; Russell ve ark., 1997; Pejic ve ark., 1998; Crouch ve ark., 1999; Arcade ve ark., 2000; Patzak, 2001; Goulao ve ark., 2001; Palombi ve Damiano, 2002; Belaj ve ark., 2003; Mignouna ve ark., 2003; Rana ve Bhat, 2004; Kwon ve ark., 2004). Ayrıca yüksek çözünürlükte agaroz kullanarak veya akrilamit jeli gümüş nitratla boyayarak SSR ve AFLP analizleri de radyoaktif madde kullanmadan uygulanabilmektedir (Hormaza, 2002; Martinez-Gomez ve ark., 2003).

Cevizlerde moleküler markör tekniklerinden ilk olarak RFLP yöntemi kullanılmıştır. RFLP tekniği ceviz türlerinin sınıflandırılmasında (Fjellstrom ve Parfitt, 1994a; 1995), ceviz çeşitlerinin karakterizasyonunda (Fjellstrom ve ark., 1994) ve genetik haritalama çalışmalarında (Fjellstrom ve Parfitt, 1994b), RAPD yöntemi de melez bitkilerin belirlenmesinde (Malvolti ve ark., 1997) ve genetik haritaların oluşturulmasında (Woeste ve ark., 1996; Malvolti ve ark., 2001) kullanılmıştır. Bunların yanında *Juglans nigra*'nın genomik kütüphanesinden mikrosatellit (SSR) primerler de geliştirilmiş (Woeste ve ark., 2002) ve *J. regia*'da polimorfizm bakımından test edilmişlerdir (Dangl ve ark., 2005; Foroni ve ark., 2005).

Yukarıda belirtilen RFLP, RAPD ISSR ve SSR yöntemleri kullanılarak ceviz çeşitlerinin karakterizasyonu ile ilgili çalışmalar aynı gen kaynakları (Kaliforniya) kullanılarak yapılmış olup böylece bu gen kaynaklarında bulunan tüm ceviz çeşitleri genetik olarak tanımlanmıştır. Ceviz yetiştiriciliği yapan ve gen kaynağına sahip olan her ülkenin yapması gerektiği gibi ülkemizin de kendi ceviz gen kaynaklarını DNA düzeyinde tanımlaması gerekmektedir. Bu amaçla ülkemizde ceviz genotiplerinin moleküler karakterizasyonu ile ilgili ilk çalışma Kafkas ve ark. (2005) tarafından AFLP ve SAMPL teknikleri kullanılarak yapılmıştır. Bu çalışmada Kahramanmaraş Sütçü İmam üniversitesi, Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri bölümü genetik kaynaklarında bulunan 21 ceviz genotipi kullanılmıştır. Ancak, böyle bir çalışmanın ülkemiz genetik kaynaklarında bulunan önemli tüm ceviz genotiplerini içine alması gerekir. Bu durum ülkemizdeki ceviz yetiştiriciliği ve ıslahı için oldukça önemlidir. Bu açıdan bu tezin amaçları şu şekilde sıralanabilir:

1.Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü, Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü ve Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü'nde bulunan toplam 62 adet ceviz çeşit ve genotipinin RAPD ve ISSR moleküler markör teknikleri kullanarak DNA parmak izlerini çıkarmak,

2. Ceviz çeşitlerinin RAPD ve ISSR teknikleri ile tanımlanmalarında kullanılacak en uygun (polimorfik) primerleri belirlemek,

3. Çalışmada analiz edilecek ceviz çeşit ve genotipleri arasındaki genetik ilişkileri ortaya çıkarmak,

4. Her iki yöntemde elde edilecek verileri ayrı ayrı değerlendirerek yöntemleri karşılaştırmaktır.

Böylece ülkemiz gen kaynaklarında bulunan ceviz çeşit ve genotiplerinin DNA parmak izlerinin çıkartılmasıyla ülkemizde büyük sorun haline gelen ismine doğru ceviz fidanı üretimi ve dağıtımını kontrol edilebilir hale gelebilecek ve ileride yapılacak ıslah çalışmalarına da genetik bilgi sağlanmış olacaktır.

**2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR****2.1. Genetik Markörler ile İlgili Genel Literatür Özeti**

Günümüzde bitkilerde genetik ilişkileri ortaya çıkarmak için değişik markör teknikleri kullanılmaktadır. Polimorfizmin ve izoenzim sisteminin yetersiz olması izoenzim yönteminin kullanımını sınırlayan en önemli faktörler olmuş (**Tanksley, 1983**) ve daha sonra bulunan DNA markörleri bu olumsuz özellikleri ortadan kaldırmıştır. İlk olarak RFLP tekniği geliştirilerek (**Tanksley ve ark., 1989**) çeşitlerin tanımlanmasında ve genetik haritaların çıkartılmasında kullanılmıştır. RFLP kodominant moleküler markör tekniği olmasına karşın, tekniğin uygulanması pahalı, uzun ve çok işçilik istemesinin yanında radyoaktif madde kullanımını da gerektirmektedir. Bu teknikten sonra PCR (Polymerase Chain Reaction) esaslı teknikler geliştirilmiş olup bunların başında RAPD moleküler markör tekniği gelmektedir. Bu teknik çok az miktarda DNA gerektirir ve 10'luk oligonükleik asitlerin primer olarak kullanılması ile amplifikasyon gerçekleşir. Bu yöntem radyoaktif madde kullanımını gerektirmez ve polimorfizm oranı oldukça fazladır. RAPD dominant markör tekniği olup PCR örnekleri agaroz jelde elektroforez edilir ve ethidium bromit ile boyanan jelden elde edilen amplifike olmuş bantlar var veya yok olarak değerlendirilir (**Williams ve ark., 1990; 1993**).

Bu olumlu özellikleri yanında RAPD tekniği bazı olumsuz özelliklere de sahiptir ve bu özellikler analizlere başlamadan önce mutlaka bilinmelidir. Bunların başında PCR öncesi örneklerde meydana gelebilecek bulaşıklar, dominant özellik ve farklı laboratuvarlarda sonuçların tekrarlanmasında karşılaşılan sorunlardır (**Newbury ve Ford-Lloyd, 1993; Bachmann, 1994**).

Son zamanlarda kullanılmaya başlanan AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) ve SSR (Simple Sequence Repeats) teknikleri en fazla gündemde olan moleküler markör teknikleridir. AFLP tekniği PCR esaslı olup bu teknikte polimorfizm oranı oldukça yüksektir. Yüksek orandaki tekrarlanabilir özelliği ve polimorfik bant sayısı AFLP tekniğini ön plana çıkarmasına karşın, bu tekniğin uygulanmasının pahalı olması ve amplifike olmuş bantların ortaya çıkarılmasında

radioaktif madde veya florasan boyama istemesi bu yöntemin uygulanmasını sınırlamaktadır (Vos ve ark., 1995).

SSR mikrosatellit tekniği olup bu teknikte polimorfizm oranı oldukça yüksektir. Ancak çalışılan genomdaki tekrarlanan nükleik asit dizilimlerinin belirlenmesi ve bunların primer olarak kullanılması gibi ön bir çalışmayı gerektirmektedir. Bunun ötesinde bu teknik radioaktif madde kullanımını da gerektirir. Bu yönlerden SSR tekniği kullanımda sınırlayıcı özelliklere sahiptir (Powell ve ark., 1996).

Bunların ötesinde Zietkiewicz ve ark. (1994) tarafından geliştirilen inter-SSR tekniğinde hazır üretilmiş olan 2'li, 3'lü, 4'lü ve 5'li tekrarlanan primerler kullanılmakta ve elde edilen PCR ürünü agaroz jelde koşularak ethidium bromit ile boyanmasından sonra belirlenebilmektedir. Bu yöntemde herbir primer için annealing sıcaklığının ayarlanması gerekmektedir.

## **2.2. Ceviz (*Juglans*) Türünde İzoenzim Yöntemi ile İlgili Çalışmalar**

Arulsekar ve ark. (1985), 42 *J. regia* ve 68 *J. hindsii* genotipi ile bu iki türün melezlerini GPI ve AAT enzim sistemlerini kullanılarak nişasta gel elektroforezinde tanımlamışlardır. Yapılan analizlerde bir GPI ve iki AAT lokusunun kalıtsal olduğu belirlenmiştir. Aynı araştırmacı grubunun yaptığı diğer bir araştırmada, *J. regia* çeşitlerinde fosfoglukomutaz (PGM) ve esteraz (EST) izozimlerinin kalıtımı araştırılmış ve PGM için iki, EST için bir lokus tanımlanmıştır (Arulsekar ve ark., 1986).

Mas Bove'de (İspanya) ceviz genetik kaynaklarında bulunan değişik orijinli 29 çeşit 8 farklı izoenzim ile karakterize edilmişlerdir. PGM, SDH, MDH ve 6PGD enzim sistemleri polimorfizm göstermiş ve 29 çeşitten 23 tanesi birbirinden ayırt edilebilmiştir. Lara, Pedro, Vina gibi Fransız çeşitleri ile Hartley, Mayette, Parisienne gibi Kaliforniya orijinli çeşitler birbirinden ayırt edilememiştir (Aleta ve ark., 1990).

Aleta ve ark. (1993), 8 yavru ceviz (*J. regia*) bitkisini dört farklı izoenzim sistemi kullanarak tanımlamışlardır. Dört adet polimorfizm gösteren lokus

tanımlanmıştır. Dört lokustan iki lokusun üç allele, öteki iki lokusun ise iki allele sahip olduğu belirlenmiştir.

Sekiz *Juglans* türünün ve altı türlerarası melezin tanımlanması izoenzim analizleri ile **Germain ve ark. (1993)** tarafından yapılmıştır. Araştırmada sekiz türe ait toplam 28 genotip ve altı türlerarası meleze ait toplam 16 genotip kullanılmıştır. Test edilen 20 farklı izoenzim sisteminden dokuz tanesi iyi sonuç vermiş ve bunlar toplam 44 genotipin tanımlanmasında kullanılmıştır. Türler birbirinden kolaylıkla ayırt edilirken, tür içinde polimorfizm oldukça düşük bulunmuştur.

İzoenzim tekniği kullanılarak 11 farklı İtalyan ceviz popülasyonunun genetik analizi yapılmıştır. Bu popülasyonlar birbirine uzak iki bölgeden seçilmiştir. Araştırmada 10 farklı izoenzim sistemi kullanılmış ve üretilen 16 lokustan 5 tanesi polimorfizm göstermiştir. Birbirine uzak iki bölgeden seçilen popülasyonlar arasında genetik varyasyon oldukça düşük bulunmuştur (**Malvolti ve ark., 1993**).

**Solar ve ark. (1994)**, Slovenya’da ceviz genetik kaynaklarında bulunan 15 çeşidi üç farklı enzim sistemi ile analiz etmişlerdir. Kullanılan enzim sistemleri 4 lokusta polimorfizm göstermiş ve bu da araştırmacılar göre yeterli bulunmamıştır.

Avrupa ve Asya kökenli *J. regia* popülasyonlarının **Fornari ve ark. (2001)** tarafından karşılaştırıldığı bir çalışmada, 986 ceviz genotipi izoenzim yöntemi ve organel DNA’lar kullanılarak PCR-RFLP yöntemiyle analiz edilmiştir. Genotipler arasında kloroplast ve mitokondriyel DNA bakımından polimorfizm görülmemiştir. İzoenzim analizleri sonucunda, Avrupa popülasyonları arasındaki genetik farklılaşma Asya kökenli popülasyonlar arasındaki genetik farklılaşma ile benzer bulunmuştur. Popülasyon içi farklılaşma ise Avrupa grubunda Asya grubu popülasyonlarına göre daha düşük bulunmuştur.

*J. nigra* ile sekiz *J. regia* çeşidi beş farklı izoenzim sistemi ile **Vyas ve ark. (2003)** tarafından karakterize edilmiştir. Peroxidase (PRO) enzim sistemi kullanılarak iki ceviz türü birbirinden ayırt edilebilmiştir. Esterase (EST) ve malate dehydrogenase (MDH) ise *J. regia* çeşitlerinin tanımlanmasında en iyi enzimler olarak bulunmuşlardır. Toplam 13 lokus ve 24 allel gözlenmiş ve 13 lokusun 8 tanesi polimorfizm göstermiştir. *J. nigra*’nın *J. regia*’dan daha heterozigot yapıya sahip

olduğu belirlenmiştir. Araştırmada Tuttle ve Blackmore çeşitleri birbirine en uzak, Blackmore ve Payne çeşitleri ise birbirine en yakın akraba çeşitler olmuşlardır.

### **2.3. Ceviz( *Juglans*) Türünde RFLP Yöntemi ile İlgili Çalışmalar**

*Juglans* cinsine giren türler arasındaki filogenetik ilişkiler çekirdek DNA kullanılarak RFLP yöntemi ile **Fjellstrom ve Parfitt (1994a; 1995)** tarafından belirlenmiştir. Çalışmada 13 *Juglans* türüne ait toplam 41 populasyon ile kültüre alınan ve klonal olarak çoğaltılan *J. cinerea* ve *J. nigra* türlerine ait 16 adet çeşit kullanılmıştır. Daha önceki bir çalışmada belirlenen 19 RFLP probunun kullanıldığı bu araştırmada toplam 117 allel, lokus başına ise ortalama 6.16 allel belirlenmiştir. 19 lokustan ikisinin monomorfik olduğu belirlenmiş ve lokus başına en fazla allel sayısı 15 olarak bulunmuştur. Türler lokus başına 1.11 ile 2.11 arasında değişen ve ortalama 1.45 allele sahip olmuşlardır.

Cevizlerde genetik haritalama çalışmasında kullanılmak üzere **Fjellstrom ve Parfitt (1994b)** tarafından *PstI* restriksiyon enzimi ile oluşturulmuş genomik kütüphanesi kullanılarak 48 lokusa sahip 32 RFLP probu geliştirilmiştir. Bu problemler 63 adet (*J. hindsii* x *J. regia*)x *J. regia* melez bitkileri ve ebeveynleri kullanılarak kalıtıma bakılmıştır. Çalışmada 42 lokus ile 12 bağlantı grubu belirlenmiştir. Ayrıca problemlerin dörtte biri 1:1 Mendel açılımı göstermiştir.

**Fjellstrom ve ark. (1994)**, Kaliforniya'da Wolfskill araştırma bahçesinde yer alan 48 ceviz (*J. regia*) genotipi arasındaki genetik ilişkileri RFLP tekniğini kullanarak belirlemişlerdir. Kullanılan 21 RFLP probundan 16 tanesi polimorfik bant vermiştir. Yapılan analizler sonucunda iki farklı grup oluşmuştur. Ashley ile Payne çeşitleri birbirinden ayırt edilememiştir. Kaliforniya ceviz genetik kaynağının Fransa, İç Avrupa ve İran genetik kaynakları ile daha yakın ilişkili olduğu bulunurken, Nepal, Çin, Kore ve Japon ceviz genetik kaynakları ise daha az benzerlik gösterdiği belirlenmiştir.

**2.4. Ceviz (*Juglans*) Türünde RAPD Yöntemi ile İlgili Çalışmalar**

**Malvolti ve ark. (1997)** tarafından yapılan bir çalışmada, RAPD moleküler markör tekniği değişik ceviz melezlerinin ayırt edilmesinde kullanılmıştır. Araştırmada iki farklı *J. nigra*. x *J. regia* F1 melezleri ile (*J. nigra* x *J. regia*) x *J.nigra* ve (*J. nigra* x *J. regia*) x *J.regia* geri melez bitkileri kullanılmıştır. 80 adet primer polimorfizm bakımından önce taranmış ve bunların arasından 25 adet polimorfizm gösteren primer RAPD analizlerinde kullanılmak üzere seçilmiştir. Yapılan RAPD analizleri sonucunda toplam 91 bant üretilmiştir. Sonuç olarak araştırmacılar RAPD tekniğinin cevizlerde F1 melez bitkilerin ayırt edilmesinde ve ebeveynlerin belirlenmesinde kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

**Nicese ve ark. (1998)** tarafından yapılan bir araştırmada, Kaliforniya Üniversitesi'nde yapılan ıslah çalışmalarında ortaya çıkan yeni çeşitlerin ve ebeveyn olarak kullanılan 19 ceviz (*J. regia*) çeşit ve genotipinin RAPD tekniği ile karakterizasyonu ve genotipler arası genetik ilişkileri belirlenmiştir. Çalışmada 72 primer kullanılmış ve tüm primerler bant vermiştir. Polimorfizm bakımından ancak 18 primer bir ile iki arasında polimorfik bant vermiş olup toplam 23 polimorfik bant elde edilmiştir. Bantların büyüklüğü 250 bç ile 1700 bç arasında değişmiştir. Tüm genotipler arasında polimorfizm görülmüş ve soyağacı elde edilmiştir. Islah programında kullanılan ebeveynler ile bunlardan elde edilen yeni çeşitler arasında ortak bantlar olduğu gibi sadece yavru bitkilerde amplifike olan bantlara da rastlanmıştır. Araştırmacılar, RAPD teknolojisinin ceviz ıslahı programlarında, yeni çeşitlerin tanımlanmasında, genotipler arasındaki genetik benzerliğin ortaya çıkarılmasında, ebeveyn seçiminde kullanışlı olabileceğini bildirmişlerdir.

**Woeste ve ark. (1996)** tarafından RAPD tekniği ile (*J. hindsii* x *J. regia*) x *J. regia* melez bitkileri kullanılarak genetik haritalama çalışması yapılmıştır. 25 primer kullanılarak 66 markör belirlenmiştir. Bunların içerisinde yedi tanesi 1:1 Mendel açılımı göstermiş ve genetik haritalama için kullanılmıştır.

Bir diğer çalışmada Lara 480 ve Chandler 1036 çeşitleri arasında yapılan tür içi melezleme çalışmasından 82 bitki elde edilmiş ve bu bitkiler genetik haritalama

çalışması için kullanılmıştır. Çalışmada izoenzim ve RAPD teknikleri kullanılmıştır. RAPD analizlerinde 400 primer taranmış ve 100 tanesi tekrarlanabilir ve güçlü bantlar vermiştir. 100 primerden 1:1 Mendel açılımı gösteren toplam 193 bant elde edilmiştir. İzoenzim analizlerinde 12 enzim sistemi kullanılmış ve bunlardan sadece 4 adet açılım gösteren markör elde edilmiştir. 193 RAPD ve 4 izoenzim markörü genetik haritanın oluşturulmasında birlikte kullanılmıştır (Malvolti ve ark., 2001).

### **2.5. Ceviz (*Juglans*) Türünde ISSR Yöntemi ile İlgili Çalışmalar**

Potter ve ark. (2002) ISSR moleküler markör tekniğini kullanarak Kaliforniya'da Wolfskill araştırma bahçesinde yer alan 48 ceviz (*J. regia*) çeşidi arasındaki genetik ilişkileri belirlemişlerdir. Çalışmada kullanılan 8 adet polimorfik ISSR primeri, 47 primerin dört çeşitte taranmasından sonra seçilmiştir. Sekiz primerin 48 ceviz çeşidinde amplifikasyonu sonucu 54 bant elde edilmiş ve bunun 31 tanesi (%57) polimorfizm göstermiştir. Primer başına düşen bant sayısı 5 ile 9 arasında değişirken, polimorfik bant sayısı ise 1 ile 7 arasında değişim göstermiştir. Araştırmacılar, ISSR tekniğinin ceviz çeşit ve genotiplerinin tanımlanmasında ve aralarındaki genetik ilişkilerin belirlenmesinde kullanılabileceğini ve RAPD ile benzer maliyete ancak daha fazla polimorfizme sahip olduğunu bildirmişlerdir.

### **2.6. Ceviz (*Juglans*) Türünde SSR Yöntemi ile İlgili Çalışmalar**

Woeste ve ark. (2002), *J. nigra* türünde yaptıkları bir çalışmada, 30 adet (GA/CT)<sub>n</sub> tekrarlanan baz dizilerini içeren SSR primerlerini geliştirmişlerdir. Bu primerlerin *J. nigra*'da popülasyon çalışmalarında, genetik haritalama çalışmalarında, çeşitlerin karakterizasyonunda kullanılabileceğini bildirmişlerdir. Ancak, araştırmacılar bu primerlerin *J. regia*'da çalışıp çalışmadığını test etmemişlerdir.

Dirlewanger ve ark. (2002), şeftali için 41 adet SSR primeri geliştirdikleri bir çalışmada, bu primerlerin cevizde kullanılabilirliğini test etmişlerdir. Sonuç olarak 41 adet SSR primerden 9 tanesinin ceviz için uygun olduğunu bildirmişlerdir.

**Dangl ve ark. (2005)**, *J. nigra* L. ve *J. regia* ceviz türlerinde geliştirilen 147 SSR (mikrosatellit) primerinin polimorfizm seviyelerini saptamışlardır. Çalışmada 47 *J. regia* çeşidi ile *J. hindsii* x *J. regia* hibrit (Paradox) bitkisinde en uygun 14 primeri tespit etmişlerdir. Araştırmacılar, çalışmada kullanılan markörlerin yakın akraba ceviz çeşitlerinin karakterizasyonunda ve gen havuzunda bulunan genotiplerin ayrılmasında etkili olduğunu bildirmişlerdir. Gelecekte cevizde yönetilecek ıslah çalışmalarında da bu markörlerin önemli bilgi kaynağı olabileceğini vurgulamışlardır.

**Foroni ve ark. (2005)**, İtalya’da yaptıkları bu çalışmada **Woeste ve ark.’nın (2002)** geliştirmiş oldukları 23 adet SSR primerini *J. regia* türüne giren Sorrento çeşidinin 6 aşılı bitkisinde, 10 adet çöğüründe ve 6 farklı *J. regia* çeşidinde denemişlerdir. Test edilen 23 primerden 6 tanesinin polimorfik olduğunu ve *J. regia*’da kullanılabileceğini belirlemişlerdir.

### **2.7. Ceviz (Juglans) Türünde AFLP Yöntemi ile İlgili Çalışmalar**

**Kafkas ve ark. (2005)**, SAMPL ve AFLP tekniklerini 21 ceviz genotipinin moleküler karakterizasyonunda kullanmışlardır. Araştırmada 6 AFLP ve 2 SAMPL olmak üzere toplam 8 primer kombinasyonu kullanılmıştır. Bu primer kombinasyonları ile %50,4’ü polimorfik olmak üzere toplam 230 bant elde edilmiştir. Sonuç olarak, cevizde yakın akraba genotiplerin ayırımında SAMPL tekniğinin AFLP tekniğine göre daha etkili olduğu bildirilmiştir. Ayrıca, Maraş-18 ile Maraş-46; KSÜ-5 ile Sütyemez-1; Maraş-12 ile Sütyemez-2; Kaman-3 ile Kaman-4 ve KSÜ-11 ile Maraş-10 genotiplerinin yakın akraba oldukları belirlenmiştir.

**3. MATERYAL ve METOD****3.1. Materyal****3.1.1. Denemede Kullanılan Çeşit ve Genotipler**

Bu araştırmada toplam 62 adet ceviz çeşit ve genotipi materyal olarak kullanılmıştır. Bitkisel materyaller Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Gaziosmanpaşa Üniversitesi ve Çukurova Üniversitesi genetik kaynaklarından sağlanmıştır. Denemede kullanılan ceviz çeşit ve genotiplerinin isimleri ile alındıkları genetik kaynaklar **Çizelge 3.1**'de verilmiştir.

**Çizelge 3.1.** Denemede kullanılan ceviz çeşit ve genotipleri ile alındıkları genetik kaynaklar

| <b>No</b> | <b>Çeşit ve Genotip İsmi</b> | <b>Genetik Kaynak</b>                 |
|-----------|------------------------------|---------------------------------------|
| 1         | 77-H -1                      | Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi |
| 2         | Ashley                       | “                                     |
| 3         | Back                         | “                                     |
| 4         | Bilecik                      | “                                     |
| 5         | Bursa 95                     | “                                     |
| 6         | Chandler                     | “                                     |
| 7         | Fernet                       | “                                     |
| 8         | Kaplan 86                    | “                                     |
| 9         | KR -1                        | “                                     |
| 10        | KR -2                        | “                                     |
| 11        | KSÜ -5                       | “                                     |
| 12        | KSÜ -11                      | “                                     |
| 13        | Maraş -10                    | “                                     |
| 14        | Maraş- 12                    | “                                     |
| 15        | Maraş -14                    | “                                     |
| 16        | Maraş- 18                    | “                                     |
| 17        | Maraş- 19                    | “                                     |
| 18        | Maraş 46                     | “                                     |
| 19        | Midland                      | “                                     |
| 20        | Payne                        | “                                     |
| 21        | Pedro                        | “                                     |
| 22        | Ronde de Montignac           | “                                     |
| 23        | Serr                         | “                                     |
| 24        | Sunland                      | “                                     |

Çizelge 3.1' in devamı

| No | Çeşit ve Genotip İsmi | Genetik Kaynak                         |
|----|-----------------------|--|
| 25 | Sütyemez- 1           | Sütçü İmam Üniversitesi, Kahramanmaraş |
| 26 | Sütyemez- 2           | “                                      |
| 27 | Şebin                 | “                                      |
| 28 | Şen- 1                | “                                      |
| 29 | Şen- 2                | “                                      |
| 30 | Tokat- 1              | “                                      |
| 31 | Ürgüp                 | “                                      |
| 32 | Van - 4               | “                                      |
| 33 | Van - 6               | “                                      |
| 34 | Yalova 1              | “                                      |
| 35 | Yalova 3              | “                                      |
| 36 | Yalova 4              | “                                      |
| 37 | Amigo                 | Çukurova Üniversitesi, Adana           |
| 38 | Erzin - 1             | “                                      |
| 39 | Franquette            | “                                      |
| 40 | Hartley               | “                                      |
| 41 | Kuyuluk               | “                                      |
| 42 | Vina                  | “                                      |
| 43 | Akça-1                | Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Tokat      |
| 44 | Akça-2                | “                                      |
| 45 | Akça-3                | “                                      |
| 46 | Karabodur             | “                                      |
| 47 | İskilip 1             | “                                      |
| 48 | İskilip 2             | “                                      |
| 49 | İskilip 3             | “                                      |
| 50 | İskilip 4             | “                                      |
| 51 | Anıt ceviz            | Kaman, Kırşehir                        |
| 52 | Göçmen                | “                                      |
| 53 | Hirfanlı              | “                                      |
| 54 | İlyas köylü           | “                                      |
| 55 | Kaman-1               | “                                      |
| 56 | Kaman-2               | “                                      |
| 57 | Kaman-3               | “                                      |
| 58 | Kaman-4               | “                                      |
| 59 | Kaman-5               | “                                      |
| 60 | Kaman 5 Ana           | “                                      |
| 61 | Ülkü                  | “                                      |
| 62 | Yayla 1               | “                                      |

**3. 2. Metod****3.2.1. Yaprak Örneklerinin Toplanması**

Kahramanmaraş Sütçü İmam ve Gaziosmanpaşa Üniversitelerinin Araştırma ve Uygulama Bahçelerinde bulunan toplam 56 ceviz çeşit ve genotipine ait yaprak örnekleri 2005 yılının erken ilkbahar döneminde toplanmıştır. Toplanan genç yapraklar ayrı ayrı kese kâğıtlarına konduktan sonra buz kutusu içerisinde Adana'da Çukurova Üniversitesi'ne ulaştırılmıştır. Aynı işlem Çukurova Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Bahçesinden alınan 6 adet örnek için de uygulanmıştır. Yaprak örnekleri laboratuvarında önce çeşme suyu ile ve sonra %50'lik alkolle yıkandıktan sonra kurutulmuş ve sıvı azot ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) ile muamele edildikten sonra DNA izolasyonuna kadar  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edilmiştir.

**3.2.2. DNA İzolasyonu**

DNA ekstraksiyonu **Doyle ve Doyle 'nin (1987)** geliştirdiği ve **Kafkas ve ark. 'nın (2005)** modifiye ettiği CTAB yöntemine göre yapılmıştır.

Bu yöntemde; herbir ceviz çeşidi için 1 g genç yaprak örneği, içerisinde sıvı azot bulunan havanda iyice ezildikten (**Şekil 3.1**) sonra 15 mililitrelik tüplere konmuş ve tüpler içerisinde 6 ml CTAB tampon çözeltisi (100 mM Tris-HCl, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, %2 CTAB, %2 PVP,  $\beta$ -merkaptotanol, %0.1  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ) ilave edilerek, (**Şekil 3.2**) sıcaklığı  $65^{\circ}\text{C}$ 'de olan su banyosuna konmuştur (**Şekil 3.3**).



**Şekil 3.1.** Cevizde DNA izolasyonunda yaprak örneğinin sıvı azotta ezilme aşamasından bir görünüm



**Şekil 3.2.** Cevizde DNA izolasyonunda CTAB solüsyonu eklenme aşamasından bir görünüm



**Şekil 3.3.** Cevizde DNA izolasyonunda su banyosunda bekletme aşamasından bir görünüm

İçerisinde ezilmiş yaprak örnekleri bulunan tüpler her 5–10 dakikada bir karıştırılmak suretiyle 60 dakika boyunca su banyosunda tutulmuştur. Su banyosundan çıkarılan örnekler oda sıcaklığında 5–10 dk bekletilmiştir.

Daha sonra tüpler içerisine, ekstraksiyon tampon çözeltisi ile eşit oranda, 6 ml kloroform: isoamil alkol (24: 1) ilave edilmiştir (**Şekil 3.4**).



**Şekil 3.4.** Cevizde DNA izolasyonunda kloroform: isoamil alkol solüsyonun eklenme aşamasından bir görünüm

Tüpler her 3 dakikada bir karıştırılarak oda koşullarında 15 dk tutulmuştur (Şekil 3.5).



**Şekil 3.5.** Cevizde DNA izolasyonunda çalkalama aşamasından bir görünüm

İçerisinde kloroform: isoamil alkol bulunan tüpler 5000 rpm'de 15 dk süre ile santrifüj edilmiştir (Şekil 3.6).



**Şekil 3.6.** DNA izolasyonunda santrifüj aşamasından bir görünüm.

Santrifüj işleminden sonra tüp içerisinde oluşan üst faz yeni bir 15 ml'lik tüpe aktarılmıştır (**Şekil 3.7**).



**Şekil 3.7** DNA izolasyonunda üst fazın yeni bir tüpe aktarılması aşamasından bir görünüm

Temiz tüp içerisine alınan üst fazın üstüne 2/3 veya eşit oranda soğuk (-20<sup>0</sup>C'de bekletilmiş) isopropanol ilave edilmiş ve yavaşça tüp çevrilerek DNA'nın çökmesi sağlanmıştır (**Şekil 3.8**).



**Şekil 3.8.** Cevizde DNA izolasyonunda DNA'yı çöktürmek için soğuk isopropanol ekleme aşamasından bir görünüm

Daha iyi bir çökelme sağlamak için örnekler 1 saat  $-70^{\circ}\text{C}$ 'de veya 1 gece  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de bekletilmiştir (**Şekil 3.9**).



**Şekil 3.9.** DNA izolasyonunda DNA çökmesinin sağlanması için  $-70^{\circ}\text{C}$ 'de bekletilme aşamasından bir görünüm

Daha sonra tüpler  $1500\text{ rpm}$ 'de 2 dk süre ile santrifüj edilerek DNA tüpün dibine çöktürülmüş ve sonra tüp içerisindeki isopropanol boşaltılmıştır (**Şekil 3.10**).

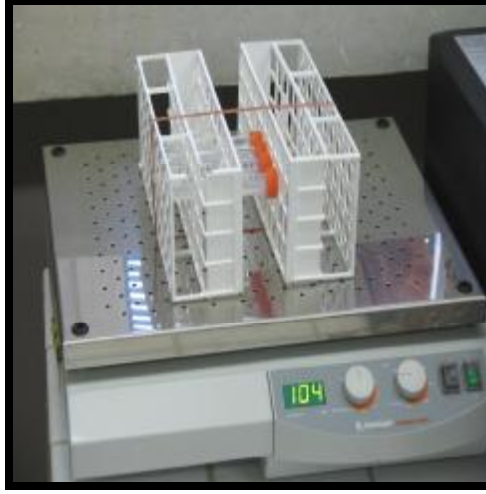


**Şekil 3.10.** DNA izolasyonunda isopropanol'ün boşaltılması aşamasından bir görünüm

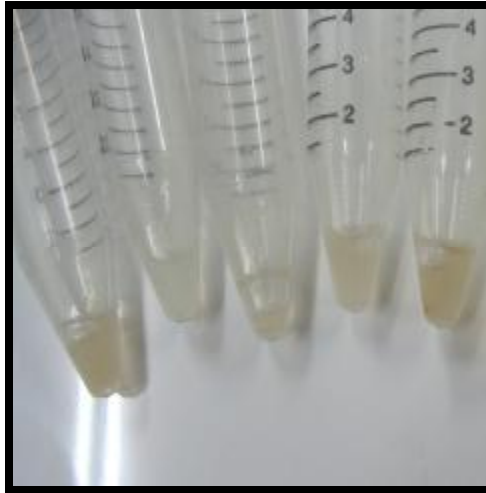
Daha sonra, DNA'ların üzerine, içerisinde 10 mM amonyum asetat bulunan, 3 ml %76'lık etanol yani yıkama tampon çözeltisi ilave edilmiş ve 1–2 saat çalkalanmıştır (Şekil 3.11 ve Şekil 3.12). Son olarak ise yıkanan DNA kurutularak saf suda çözdürülmüştür (Şekil 3.13).



**Şekil 3.11.** Cevizde DNA izolasyonunda yıkama solüsyonunun eklenmesi aşamasından bir görünüm.



**Şekil 3.12.**Cevizde DNA izolasyonunda çalkalama aşamasından bir görünüm.



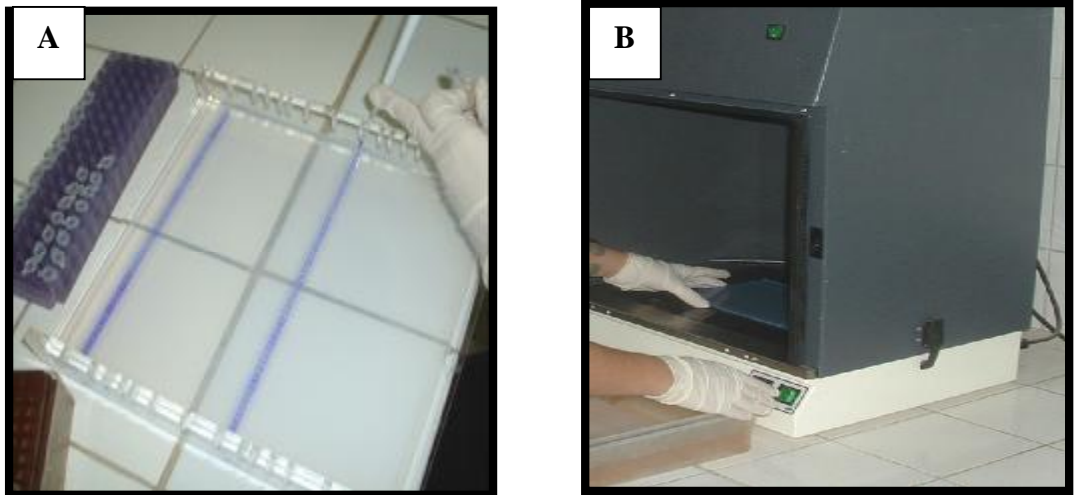
**Şekil 3.13.** DNA izolasyonunda yıkanan DNA'nın saf suda çözündürülme aşamasından bir görünüm.

### **3.2.3. DNA Konsantrasyonunun Belirlenmesi**

PCR esaslı DNA moleküler markör teknikleri ile çalışırken kullanılan DNA konsantrasyonları oldukça önemlidir. Bu nedenle her bir genotipin PCR reaksiyonunda kullanılacak DNA miktarının çok iyi ayarlanması gerekir. Bu araştırmada ceviz genotiplerinin DNA konsantrasyonu, %0.8'lik agaroz jelde konsantrasyonu belli  $\lambda$  DNA ile karşılaştırılarak tahmini olarak belirlenmiştir.

DNA konsantrasyonunun belirlenmesi için her bir örnek için toplam hacmi 20  $\mu$ l olacak şekilde 2  $\mu$ l stok DNA, 4  $\mu$ l jel yükleme boyası ve 14  $\mu$ l saf su konularak örnekler hazırlanmıştır. Hazırlanan örneklerden 10  $\mu$ l'si, %0.8 konsantrasyondaki agaroz jel üzerinde hazırlanmış yuvalara yerleştirilmiş (**Şekil 3.14A**) ve elektroforezde 90 voltta 45 dakika koşturma işlemi yapılmıştır. UV transilluminatör (**Şekil 3.14B**) yardımıyla elde edilen DNA yoğunlukları konsantrasyonu belli  $\lambda$  DNA'lar (25ng-50ng-100ng-200ng) ile karşılaştırılarak belirlenmiştir. Böylece her bir genotipten elde edilen stok DNA miktarı tahmin edilmiştir.

Stok DNA konsantrasyonları esas alınarak, PCR analizleri için her bir DNA örneğinin konsantrasyonu 5ng /  $\mu$ l olacak şekilde ayarlanmıştır. Bu işlem de yine %0.8'lik agaroz jelde yapılmıştır. Bunun için toplam hacmi 20  $\mu$ l olacak şekilde 10  $\mu$ l seyreltik DNA, 4  $\mu$ l jel yükleme boyası ve 6  $\mu$ l saf su konularak örnekler hazırlanmıştır. Daha sonra bu hazırlanan örneklerden 10  $\mu$ l'si agaroz jeldeki yuvalara yerleştirilmiş (**Şekil 3.14A**) ve 90 voltta 45 dakika süre ile elektroforez işlemi yapılmıştır. Böylece her bir örneğin 5 ng /  $\mu$ l olup olmadığı kontrol edilmiştir. 5 ng /  $\mu$ l'den fazla olan örneklere saf su, az olan örneklere ise orantılı olarak DNA eklenerek tüm örneklerin konsantrasyonunun 5 ng /  $\mu$ l olması sağlanmıştır. Böylece tüm DNA örnekleri PCR'a hazır hale getirilmiştir.



**Şekil 3.14.** DNA konsantrasyonu belirlemede **A.** jel yükleme aşaması, **B.** UV transilluminatör ile jel görüntüleme aşamasından bir görünüm.

## 3.2.4. ISSR Analizleri

ISSR analizleri Zietkiewicz ve ark.'nın (1994) geliştirdiği ve Kafkas ve ark.'nın (2006) modifiye ettiği yönteme göre yapılmıştır. Bu yönteme göre kullanılan ISSR reaksiyonunda kullanılan kimyasallar ve konsantrasyonları Çizelge 3.2'de verilmiştir. PCR reaksiyonları 25 µl hacimde yapılmıştır. ISSR analizlerinde kullanılan PCR döngü koşulları ise Çizelge 3.3'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. ISSR-PCR reaksiyonunda kullanılan kimyasallar ve konsantrasyonları

| PCR bileşenleri                                 | Konsantrasyon |
|---|---------------|
| Tris-HCl pH=8.8                                 | 75 mM         |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 20 mM         |
| Tween 20  | 0.1%          |
| MgCl <sub>2</sub>                               | 2 mM          |
| dATP  | 100 µM        |
| dCTP  | 100 µM        |
| dGTP  | 100 µM        |
| dTTP  | 100 µM        |
| ISSR Primer                                     | 0.2 µM        |
| Taq DNA Polimeraz                               | 1.0 unite     |
| DNA   | 10 ng         |

Çizelge 3.3. Cevizde ISSR tekniğinin uygulanmasında PCR sıcaklık ve döngü koşulları

| Program No | İşlem                           | Sıcaklık (°C)                      | Süre (dk) | Döngü sayısı |
|------------|---------------------------------|------------------------------------|-----------|--------------|
| 1.         | Ön denatürasyon                 | 94                                 | 2         | 1            |
| 2.1        | Denatürasyon                    | 94                                 | 1         | 40           |
| 2.2        | Primerin DNA'ya yapışma safhası | 40-60<br>(primere göre değişmekte) | 1         |              |
| 2.3        | Uzama safhası                   | 72                                 | 2         |              |
| 3.         | Son uzama safhası               | 72                                 | 7         | 1            |

Ceviz çeşitlerinin karakterizasyonunda kullanılmak üzere amacını ile ISSR primeri olarak University of British Columbia tarafından üretilen ISSR primerleri (set #9) kullanılmıştır (**Çizelge 3.4**). Bu primerlerin baz dizimleri farklı olduğu için kalıp DNA'ya yapışma sıcaklıkları da (annealing) farklıdır. Bu sıcaklıklar **Kafkas ve ark. (2006)** tarafından yapılan bir çalışmada belirlenmiştir. Bu çalışma göz önünde bulundurularak **Çizelge 3.2** ve **Çizelge 3.3**'de verilen koşullara göre 62 adet ceviz genotipinde en polimorfik ISSR primerlerini belirlemek için 100 adet primer taranmıştır. Ayrıca primer olarak araştırmada 'Genosys Biotechnologies' tarafından üretilen ve **Potter ve ark. (2002)** tarafından polimorfik olduğu belirlenen 8 adet primer de (**Çizelge 3.4**) kullanılmıştır. Böylece toplam 108 ISSR primerinin taraması yapılmıştır. Tüm ön tarama reaksiyonları 7 ceviz genotipi (Maraş-18, Şebın, Sütyemez-2, Kaman-1, Tokat-1, Van-4 ve Yalova-1) kullanılarak yapılmıştır. **Şekil 3.6**'da polimorfik ISSR primeri taranması aşamasındaki bir jelin görüntüsü verilmiştir. Tarama işlemi sonucunda 25 adet polimorfik ISSR primeri, 62 ceviz genotipinin moleküler karakterizasyonunda kullanılmak üzere seçilmiştir.

**Çizelge 3.4.** Çalışmada kullanılan ISSR primerlerinin baz dizimleri, baz sayıları ve ceviz DNA'sına PCR'da yapışma sıcaklıkları

| Sıra No | Kod     | Baz dizilimi (5' – 3') | Baz sayısı | DNA'ya yapışma sıcaklıkları(°C) |
|---------|---------|------------------------|------------|---------------------------------|
| 1       | UBC 801 | ATA TAT ATA TAT ATA TT | 17         | -                               |
| 2       | UBC 802 | ATA TAT ATA TAT ATA TG | 17         | -                               |
| 3       | UBC 803 | ATA TAT ATA TAT ATA TC | 17         | -                               |
| 4       | UBC 804 | TAT ATA TAT ATA TAT AA | 17         | -                               |
| 5       | UBC 805 | TAT ATA TAT ATA TAT AC | 17         | -                               |
| 6       | UBC 806 | TAT ATA TAT ATA TAT AG | 17         | -                               |
| 7       | UBC 807 | AGA GAG AGA GAG AGA GT | 17         | 50                              |
| 8       | UBC 808 | AGA GAG AGA GAG AGA GC | 17         | 52                              |
| 9       | UBC 809 | AGA GAG AGA GAG AGA GG | 17         | 52                              |
| 10      | UBC 810 | GAG AGA GAG AGA GAG AT | 17         | 50                              |
| 11      | UBC 811 | GAG AGA GAG AGA GAG AC | 17         | 52                              |
| 12      | UBC 812 | GAG AGA GAG AGA GAG AC | 17         | 50                              |
| 13      | UBC 813 | CTC TCT CTC TCT CTC TT | 17         | 50                              |
| 14      | UBC 814 | CTC TCT CTC TCT CTC TA | 17         | 50                              |
| 15      | UBC 815 | CTC TCT CTC TCT CTC TG | 17         | 52                              |
| 16      | UBC 816 | CAC ACA CAC ACA CAC AT | 17         | 50                              |
| 17      | UBC 817 | CAC ACA CAC ACA CAC AA | 17         | 50                              |
| 18      | UBC 818 | CAC ACA CAC ACA CAC AG | 17         | 52                              |
| 19      | UBC 819 | GTG TGT GTG TGT GTG TA | 17         | 50                              |

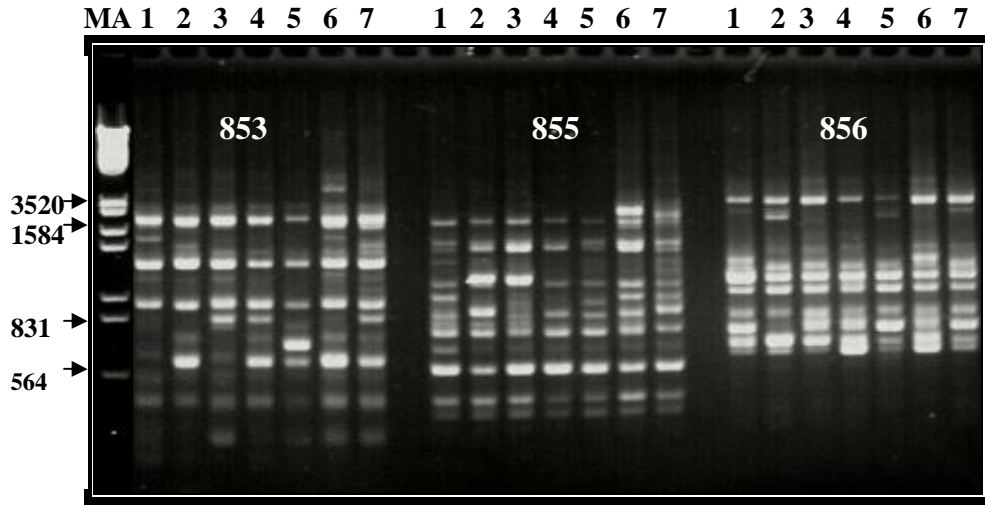
Çizelge 3.4'ün devamı

| Sıra No | Kod     | Baz dizilimi (5' – 3')  | Baz sayısı | DNA'ya yapışma sıcaklıkları(°C) |
|---------|---------|-------------------------|------------|---------------------------------|
| 20      | UBC 820 | GTG TGT GTG TGT GTG TC  | 17         | 52                              |
| 21      | UBC 821 | GTG TGT GTG TGT GTG TT  | 17         | 50                              |
| 22      | UBC 822 | TCT CTC TCT CTC TCT CA  | 17         | 50                              |
| 23      | UBC 823 | TCT CTC TCT CTC TCT CC  | 17         | 52                              |
| 24      | UBC 824 | TCT CTC TCT CTC TCT CG  | 17         | 52                              |
| 25      | UBC 825 | ACA CAC ACA CAC ACA CT  | 17         | 50                              |
| 26      | UBC 826 | ACA CAC ACA CAC ACA CC  | 17         | 52                              |
| 27      | UBC 827 | ACA CAC ACA CAC ACA CG  | 17         | 52                              |
| 28      | UBC 828 | TGT GTG TGT GTG TGT GA  | 17         | 50                              |
| 29      | UBC 829 | TGT GTG TGT GTG TGT GC  | 17         | 52                              |
| 30      | UBC 830 | TGT GTG TGT GTG TGT GG  | 17         | 52                              |
| 31      | UBC 831 | ATA TAT ATA TAT ATA TYA | 18         | -                               |
| 32      | UBC 832 | ATA TAT ATA TAT ATA TYC | 18         | -                               |
| 33      | UBC 833 | ATA TAT ATA TAT ATA TYG | 18         | -                               |
| 34      | UBC 834 | AGA GAG AGA GAG AGA GYT | 18         | 52                              |
| 35      | UBC 835 | AGA GAG AGA GAG AGA GYC | 18         | 54                              |
| 36      | UBC 836 | AGA GAG AGA GAG AGA GYA | 18         | 52                              |
| 37      | UBC 837 | TAT ATA TAT ATA TAT ART | 18         | -                               |
| 38      | UBC 838 | TAT ATA TAT ATA TAT ARC | 18         | -                               |
| 39      | UBC 839 | TAT ATA TAT ATA TAT ARG | 18         | -                               |
| 40      | UBC 840 | GAG AGA GAG AGA GAG AYT | 18         | 52                              |
| 41      | UBC 841 | GAG AGA GAG AGA GAG AYC | 18         | 54                              |
| 42      | UBC 842 | GAG AGA GAG AGA GAG AT  | 17         | 54                              |
| 43      | UBC 843 | CTC TCT CTC TCT CTC TRA | 18         | 52                              |
| 44      | UBC 844 | CTC TCT CTC TCT CTC TRC | 18         | 54                              |
| 45      | UBC 845 | CTC TCT CTC TCT CTC TRG | 18         | 54                              |
| 46      | UBC 846 | CAC ACA CAC ACA CAC ART | 18         | 54                              |
| 47      | UBC 847 | CAC ACA CAC ACA CAC ARC | 18         | 52                              |
| 48      | UBC 848 | CAC ACA CAC ACA CAC ARG | 18         | 54                              |
| 49      | UBC 849 | GTG TGT GTG TGT GTG TYA | 18         | 52                              |
| 50      | UBC 850 | GTG TGT GTG TGT GTG TYC | 18         | 52                              |
| 51      | UBC 851 | GTG TGT GTG TGT GTG TYG | 18         | 54                              |
| 52      | UBC 852 | TCT CTC TCT CTC TCT CRA | 18         | 52                              |
| 53      | UBC 853 | TCT CTC TCT CTC TCT CRT | 18         | 52                              |
| 54      | UBC 854 | TCT CTC TCT CTC TCT CRG | 18         | 54                              |
| 55      | UBC 855 | ACA CAC ACA CAC ACA CYT | 18         | 52                              |
| 56      | UBC 856 | ACA CAC ACA CAC ACA CYA | 18         | 52                              |
| 57      | UBC 857 | ACA CAC ACA CAC ACA CYG | 18         | 54                              |
| 58      | UBC 858 | TGT GTG TGT GTG TGT GRT | 18         | 52                              |
| 59      | UBC 859 | TGT GTG TGT GTG TGT GRC | 18         | 54                              |
| 60      | UBC 860 | TGT GTG TGT GTG TGT GRA | 18         | 52                              |
| 61      | UBC 861 | ACC ACC ACC ACC ACC ACC | 18         | 54                              |
| 62      | UBC 862 | AGC AGC AGC AGC AGC AGC | 18         | 56                              |
| 63      | UBC 863 | AGT AGT AGT AGT AGT AGT | 18         | -                               |

Çizelge 3.4'ün devamı

| Sıra No | Kod     | Baz dizilimi (5' – 3')     | Baz sayısı | DNA'ya yapışma sıcaklıkları(°C) |
|---------|---------|----------------------------|------------|---------------------------------|
| 64      | UBC 864 | ATG ATG ATG ATG ATG ATG    | 18         | 44                              |
| 65      | UBC 865 | CCG CCG CCG CCG CCG CCG    | 18         | 54                              |
| 66      | UBC 866 | CTC CTC CTC CTC CTC CTC    | 18         | 56                              |
| 67      | UBC 867 | GGC GGC GGC GGC GGC GGC    | 18         | 52                              |
| 68      | UBC 868 | GAA GAA GAA GAA GAA GAA    | 18         | 48                              |
| 69      | UBC 869 | GTT GTT GTT GTT GTT GTT    | 18         | 48                              |
| 70      | UBC 870 | TGC TGC TGC TGC TGC TGC    | 18         | -                               |
| 71      | UBC 871 | TAT TAT TAT TAT TAT TAT    | 18         | -                               |
| 72      | UBC 872 | GAT AGA TAG ATA GAT A      | 16         | 40                              |
| 73      | UBC 873 | GAC AGA CAG ACA GAC A      | 16         | 48                              |
| 74      | UBC 874 | CCC TCC CTC CCT CCC T      | 16         | 51                              |
| 75      | UBC 875 | CTA GCT AGC TAG CTA G      | 16         | 48                              |
| 76      | UBC 876 | GAT AGA TAG ACA GAC A      | 16         | 48                              |
| 77      | UBC 877 | TGC ATG CAT GCA TGC A      | 16         | 48                              |
| 78      | UBC 878 | GGA TGG ATG GAT GGA T      | 16         | 48                              |
| 79      | UBC 879 | CTT CAC TTC ACT TCA        | 15         | 48                              |
| 80      | UBC 880 | GGA GAG GAG AGG AGA        | 15         | 48                              |
| 81      | UBC 881 | GGG TGG GGT GGG GTG        | 18         | 60                              |
| 82      | UBC 882 | VBV ATA TAT ATA TAT AT     | 17         | -                               |
| 83      | UBC 883 | BVB TAT ATA TAT ATA TA     | 17         | -                               |
| 84      | UBC 884 | HBH AGA GAG AGA GAG AG     | 17         | 51                              |
| 85      | UBC 885 | BHB GAG AGA GAG AGA GA     | 17         | 51                              |
| 86      | UBC 886 | VDV CTC TCT CTC TCT CT     | 17         | 51                              |
| 87      | UBC 887 | DVD TCT CTC TCT CTC TC     | 17         | 51                              |
| 88      | UBC 888 | BDB CAC ACA CAC ACA CA     | 17         | 51                              |
| 89      | UBC 889 | DBD ACA CAC ACA CAC AC     | 17         | 51                              |
| 90      | UBC 890 | VHV GTG TGT GTG TGT GT     | 17         | 51                              |
| 91      | UBC 891 | HVH TGT GTG TGT GTG TG     | 17         | 51                              |
| 92      | UBC 892 | TAG ATC TGA TAT CTG AAT    | 18         | 40                              |
| 93      | UBC 893 | NNN NNN NNN NNN NNN        | 15         | -                               |
| 94      | UBC 894 | TGG TAG CTC TTG ATC ANN    | 18         | -                               |
| 95      | UBC 895 | AGA GTT GGT AGC TCT TGA    | 18         | -                               |
| 96      | UBC 896 | AGG TCG CGG CCG CNN NNN    | 18         | -                               |
| 97      | UBC 897 | CCG ACT CGA GNN NNN NAT    | 18         | 50                              |
| 98      | UBC 898 | GAT CAA GCT TNN NNN NAT    | 18         | -                               |
| 99      | UBC 899 | CAT GGT GTT GGT CAT TGT    | 18         | -                               |
| 100     | UBC 900 | ACT TCC CCA CAG GTT AAC    | 18         | -                               |
| 101     | ISSR 7  | AGA GAG AGA GAG AGA GYC    | 18         | 50                              |
| 102     | ISSR 9  | CTC TCT CTC TCT CTC TCT RC | 20         | 50                              |
| 103     | ISSR 16 | TCC TCC TCC TCC TCC RY     | 17         | 50                              |
| 104     | ISSR 21 | AGA GAG AGA GAG AGA GYT    | 18         | 50                              |
| 105     | ISSR 22 | HVH CAC ACA CAC ACA CAT    | 18         | 50                              |
| 106     | ISSR 28 | AGA AAG AAA GAA AGA AAG    | 18         | 50                              |
| 107     | ISSR 43 | GTG TGT GTG TGT GTG TYA    | 18         | 50                              |
| 108     | ISSR 47 | AGA GAG AGA GAG AGA GY     | 17         | 50                              |

Hem tarama hem de 62 genotipin karakterizasyonu aşamalarında elde edilen PCR ürünleri 1 x TBE tampon çözeltisinde (89 mM Tris-Cl, 89 mM borik asit, 20 mM EDTA) %1.8'lik agaroz jelde elektroforez edilerek etidyum bromit ile boyanmış ve UV altında fotoğrafları çekilmiştir. DNA bantlarının büyüklüğünü belirlenmesinde  $\lambda$  DNA'nın *EcoRI* ve *HindIII* kesim enzimleri ile hazırlanmış olan ve ticari olarak satılan DNA'sı kullanılmıştır DNA'nın bant büyüklükleri sırası ile 564, 831, 947, 1375, 1584, 1904, 2027, 3520 bp şeklindedir (Şekil 3.15).



Şekil 3.15. UBC 853, UBC855, UBC856 nolu ISSR primerlerinin taramada kullanılan 7 ceviz genotipindeki amplifikasyonu (1. Maraş-18, 2. Şebın, 3.Sütyemez-2, 4. Kaman-1, 5. Tokat-1, 6. Van-4, 7. Yalova-1). MA: moleküler ağırlık.

### 3.2.5. RAPD Analizleri

RAPD analizleri Williams ve ark.'nın (1990) geliştirdiği ve Kafkas ve ark.'nın (2006) modifiye ettiği yöntemle yapılmıştır. RAPD reaksiyonunda kullanılan kimyasallar ve konsantrasyonları Çizelge 3.5'de verilmiştir. PCR reaksiyonları 25  $\mu$ l hacimde hazırlanmıştır.

**Çizelge 3.5.** RAPD–PCR reaksiyonunda kullanılan kimyasallar ve konsantrasyonları

| PCR bileşenleri                                 | Konsantrasyon |
|---|---------------|
| Tris-HCl pH=8.8                                 | 75 mM         |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 20 mM         |
| Tween 20  | 0.1%          |
| MgCl <sub>2</sub>                               | 2 mM          |
| dATP  | 100 µM        |
| dCTP  | 100 µM        |
| dGTP  | 100 µM        |
| dTTP  | 100 µM        |
| RAPD Primer (10 baz)                            | 0.2 µM        |
| Taq DNA Polymeraz                               | 1.0 unite     |
| DNA   | 10 ng         |

RAPD tekniğinde PCR sıcaklık ve döngü koşulları ise **Çizelge 3.6'**da verilmiştir.

**Çizelge 3.6.** Cevizde RAPD tekniğinin uygulanmasında PCR sıcaklık ve döngü koşulları

| Program No | İşlem                           | Sıcaklık (°C) | Süre (sn) | Döngü sayısı |
|------------|---------------------------------|---------------|-----------|--------------|
| 1.         | Ön denatürasyon                 | 94            | 120       | 1            |
|            | Denatürasyon                    | 94            | 45        |              |
| 2.1<br>2.2 | Primerin DNA'ya yapışma safhası | 36            | 60        | 35           |
| 2.3        | Uzama safhası                   | 72            | 120       |              |
| 3.         | Son uzama safhası               | 72            | 300       | 1            |

RAPD primeri olarak ‘Operon Technologies’ (Alameda, Kaliforniya) firmasından satın alınan primerler kullanılmıştır. Ceviz çeşitlerinin karakterizasyonunda kullanılacak polimorfik RAPD primerlerini belirlemek için öncelikle 7 ceviz genotipi (Maraş-18, Şebın, Sütyemez-2, Kaman-1, Tokat-1, Van-4, Yalova-1) kullanılarak 100 RAPD primerin (OPA, OPB, OPC, OPD ve OPE setleri) taranması yapılmıştır. Yeterli sayıda polimorfik primer elde edilememesi nedeniyle 100 primer (OPF, OPG, OPH, OPI, OPJ setleri) daha test edilerek toplam 200 adet primer polimorfizm bakımından taranmıştır (**Çizelge 3.7**). Bu işlemde sonra 25 adet polimorfik RAPD primeri seçilmiş ve bu primerler 62 ceviz genotipinin RAPD yöntemi ile moleküler karakterizasyonunda kullanılmıştır.

**Çizelge 3.7.** Çalışmada kullanılan RAPD primerleri ve baz dizilimleri

| Sıra No | Kod    | Baz Dizilimi (5' – 3') |
|---------|--------|------------------------|
| 1       | OPA-01 | CAGGCCCTTC             |
| 2       | OPA-02 | TGCCGAGCTG             |
| 3       | OPA-03 | AGTCAGCCAC             |
| 4       | OPA-04 | AATCGGGCTG             |
| 5       | OPA-05 | AGGGGTCTTG             |
| 6       | OPA-06 | GGTCCCTGAC             |
| 7       | OPA-07 | GAAACGGGTG             |
| 8       | OPA-08 | GTGACGTAGG             |
| 9       | OPA-09 | GGGTAACGCC             |
| 10      | OPA-10 | GTGATCGCAG             |
| 11      | OPA-11 | CAATCGCCGT             |
| 12      | OPA-12 | TCGGCGATAG             |
| 13      | OPA-13 | CAGCACCCAC             |
| 14      | OPA-14 | TCTGTGCTGG             |
| 15      | OPA-15 | TTCCGAACCC             |
| 16      | OPA-16 | AGCCAGCGAA             |
| 17      | OPA-17 | GACCGCTTGT             |
| 18      | OPA-18 | AGGTGACCGT             |
| 19      | OPA-19 | CAAACGTTCG             |
| 20      | OPA-20 | GTTGCGATCC             |
| 21      | OPB-01 | GTTTCGCTCC             |
| 22      | OPB-02 | TGATCCCTGG             |
| 23      | OPB-03 | CATCCCCCTG             |
| 24      | OPB-04 | GGACTGGAGT             |
| 25      | OPB-05 | TGCGCCCTTC             |
| 26      | OPB-06 | TGCTCTGCCC             |
| 27      | OPB-07 | GGTGACGCAG             |
| 28      | OPB-08 | GTCCACACGG             |
| 29      | OPB-09 | TGGGGGACTC             |

Çizelge 3.7'in devamı

| Sıra No | Primer No | Baz Dizilimi (5' – 3') |
|---------|-----------|------------------------|
| 30      | OPB-10    | CTGCTGGGAC             |
| 31      | OPB-11    | GTAGACCCGT             |
| 32      | OPB-12    | CCTTGACGCA             |
| 33      | OPB-13    | TTCCCCCGCT             |
| 34      | OPB-14    | TCCGCTCTGG             |
| 35      | OPB-15    | GGAGGGTGTT             |
| 36      | OPB-16    | TTTGCCCGGA             |
| 37      | OPB-17    | AGGGAACGAG             |
| 38      | OPB-18    | CCACAGCAGT             |
| 39      | OPB-19    | ACCCCCGAAG             |
| 40      | OPB-20    | GGACCCTTAC             |
| 41      | OPC-01    | TTCGAGCCAG             |
| 42      | OPC-02    | GTGAGGCGTC             |
| 43      | OPC-03    | GGGGGTCTTT             |
| 44      | OPC-04    | CCGCATCTAC             |
| 45      | OPC-05    | GATGACCGCC             |
| 46      | OPC-06    | GAACGGACTC             |
| 47      | OPC-07    | GTCCCGACGA             |
| 48      | OPC-08    | TGGACCGGTG             |
| 49      | OPC-09    | CTCACCGTCC             |
| 50      | OPC-10    | TGTCTGGGTG             |
| 51      | OPC-11    | AAAGCTGCGG             |
| 52      | OPC-12    | TGTCATCCCC             |
| 53      | OPC-13    | AAGCCTCGTC             |
| 54      | OPC-14    | TGCGTGCTTG             |
| 55      | OPC-15    | GACGGATCAG             |
| 56      | OPC-16    | CACACTCCAG             |
| 57      | OPC-17    | TTCCCCCAG              |
| 58      | OPC-18    | TGAGTGGGTG             |
| 59      | OPC-19    | GTTGCCAGCC             |
| 60      | OPC-20    | ACTTCGCCAC             |
| 61      | OPD-01    | ACCGCGAAGG             |
| 62      | OPD-02    | GGACCCAACC             |
| 63      | OPD-03    | GTCGCCGTCA             |
| 64      | OPD-04    | TCTGGTGAGG             |
| 65      | OPD-05    | TGAGCGGACA             |
| 66      | OPD-06    | ACCTGAACGG             |
| 67      | OPD-07    | TTGGCACGGG             |
| 68      | OPD-08    | GTGTGCCCCA             |
| 69      | OPD-09    | CTCTGGAGAC             |
| 70      | OPD-10    | GGTCTACACC             |
| 71      | OPD-11    | AGCGCCATTG             |
| 72      | OPD-12    | CACCGTATCC             |
| 73      | OPD-13    | GGGGTGACGA             |

Çizelge 3.7'in devamı

| Sıra No | Primer No | Baz Dizilimi (5' – 3') |
|---------|-----------|------------------------|
| 74      | OPD-14    | CTTCCCCAAG             |
| 75      | OPD-15    | CATCCGTGCT             |
| 76      | OPD-16    | AGGGCGTAAG             |
| 77      | OPD-17    | TTTCCCACGG             |
| 78      | OPD-18    | GAGAGCCAAC             |
| 79      | OPD-19    | CTGGGGACTT             |
| 80      | OPD-20    | ACCCGGTCAC             |
| 81      | OPE-01    | CCCAAGGTCC             |
| 82      | OPE-02    | GGTGCGGGAA             |
| 83      | OPE-03    | CCAGATGCAC             |
| 84      | OPE-04    | GTGACATGCC             |
| 85      | OPE-05    | TCAGGGAGGT             |
| 86      | OPE-06    | AAGACCCCTC             |
| 87      | OPE-07    | AGATGCAGCC             |
| 88      | OPE-08    | TCACCACGGT             |
| 89      | OPE-09    | CTTCACCCGA             |
| 90      | OPE-10    | CACCAGGTGA             |
| 91      | OPE-11    | GAGTCTCAGG             |
| 92      | OPE-12    | TTATCGCCCC             |
| 93      | OPE-13    | CCCGATTCCG             |
| 94      | OPE-14    | TGCGGCTGAG             |
| 95      | OPE-15    | ACGCACAACC             |
| 96      | OPE-16    | GGTGACTGTG             |
| 97      | OPE-17    | CTACTGCCGT             |
| 98      | OPE-18    | GGACTGCAGA             |
| 99      | OPE-19    | ACGGCGTATG             |
| 100     | OPE-20    | AACGGTGACC             |
| 101     | OPF-01    | ACGGATCCTG             |
| 102     | OPF-02    | GAGGATCCCT             |
| 103     | OPF-03    | CCTGATCACC             |
| 104     | OPF-04    | GGTGATCAGG             |
| 105     | OPF-05    | CCGAATTCCC             |
| 106     | OPF-06    | GGGAATTCGG             |
| 107     | OPF-07    | CCGATATCCC             |
| 108     | OPF-08    | GGGATATCGG             |
| 109     | OPF-09    | CCAAGCTTCC             |
| 110     | OPF-10    | GGAAGCTTGG             |
| 111     | OPF-11    | TTGGTACCCC             |
| 112     | OPF-12    | ACGGTACCAG             |
| 113     | OPF-13    | GGCTGCAGAA             |
| 114     | OPF-14    | TGCTGCAGGT             |
| 115     | OPF-15    | CCAGTACTCC             |
| 116     | OPF-16    | GGAGTACTGG             |
| 117     | OPF-17    | AACCCGGGAA             |

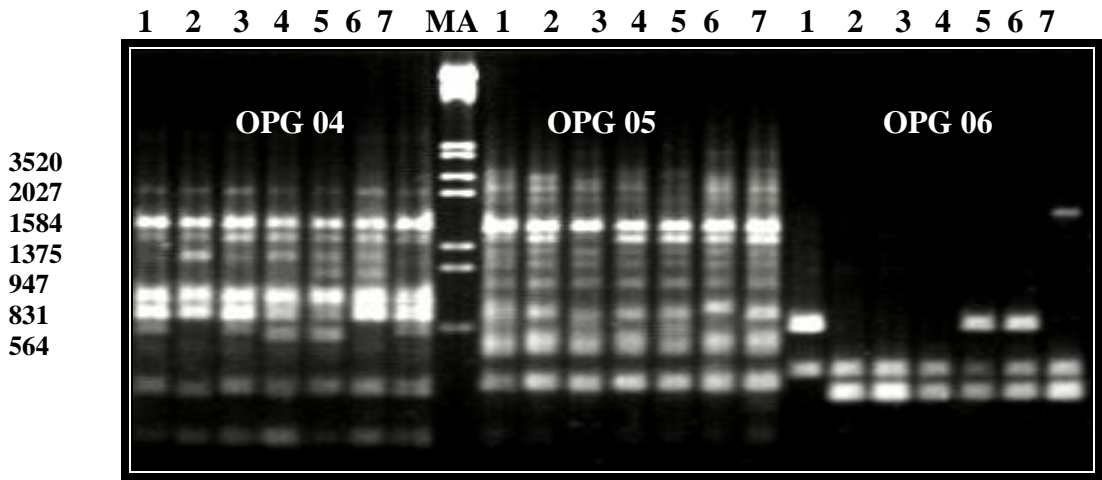
Çizelge 3.7'in devamı

| Sıra No | Primer No | Baz Dizilimi (5' – 3') |
|---------|-----------|------------------------|
| 118     | OPF-18    | TTCCCGGGTT             |
| 119     | OPF-19    | CCTCTAGACC             |
| 120     | OPF-20    | GGTCTAGAGG             |
| 121     | OPG-01    | CTACGGAGGA             |
| 122     | OPG-02    | GGCACTGAGG             |
| 123     | OPG-03    | GAGCCCTCCA             |
| 124     | OPG-04    | AGCGTGTCTG             |
| 125     | OPG-05    | CTGAGACGGA             |
| 126     | OPG-06    | GTGCCTAACC             |
| 127     | OPG-07    | GAACCTGCGG             |
| 128     | OPG-08    | TCACGTCCAC             |
| 129     | OPG-09    | CTGACGTCAC             |
| 130     | OPG-10    | AGGGCCGTCT             |
| 131     | OPG-11    | TGCCCGTCGT             |
| 132     | OPG-12    | CAGCTCACGA             |
| 133     | OPG-13    | CTCTCCGCCA             |
| 134     | OPG-14    | GGATGAGACC             |
| 135     | OPG-15    | ACTGGGACTC             |
| 136     | OPG-16    | AGCGTCCTCC             |
| 137     | OPG-17    | ACGACCGACA             |
| 138     | OPG-18    | GGCTCATGTG             |
| 139     | OPG-19    | GTCAGGGCAA             |
| 140     | OPG-20    | TCTCCCTCAG             |
| 141     | OPH-01    | GGTCGGAGAA             |
| 142     | OPH-02    | TCGGACGTGA             |
| 143     | OPH-03    | AGACGTCCAC             |
| 144     | OPH-04    | GGAAGTCGCC             |
| 145     | OPH-05    | AGTCGTCCCC             |
| 146     | OPH-06    | ACGCATCGCA             |
| 147     | OPH-07    | CTGCATCGTG             |
| 148     | OPH-08    | GAAACACCCC             |
| 149     | OPH-09    | TGTAGCTGGG             |
| 150     | OPH-10    | CCTACGTCAG             |
| 151     | OPH-11    | CTTCCGCAGT             |
| 152     | OPH-12    | ACGCGCATGT             |
| 153     | OPH-13    | GACGCCACAC             |
| 154     | OPH-14    | ACCAGGTTGG             |
| 155     | OPH-15    | AATGGCGCAG             |
| 156     | OPH-16    | TCTCAGCTGG             |
| 157     | OPH-17    | CACTCTCCTC             |
| 158     | OPH-18    | GAATCGGCCA             |
| 159     | OPH-19    | CTGACCAGCC             |
| 160     | OPH-20    | GGGAGACATC             |

Çizelge 3.7'in devamı

| Sıra No | Primer No | Baz Dizilimi (5' – 3') |
|---------|-----------|------------------------|
| 161     | OPI-01    | ACCTGGACAC             |
| 162     | OPI-02    | GGAGGAGAGG             |
| 163     | OPI-03    | CAGAAGCCCA             |
| 164     | OPI-04    | CCGCCTAGTC             |
| 165     | OPI-05    | TGTTCCACGG             |
| 166     | OPI-06    | AAGGCGGCAG             |
| 167     | OPI-07    | CAGCGACAAG             |
| 168     | OPI-08    | TTTGCCCGGT             |
| 169     | OPI-09    | TGGAGAGCAG             |
| 170     | OPI-10    | ACAACGCGAG             |
| 171     | OPI-11    | ACATGCCGTG             |
| 172     | OPI-12    | AGAGGGCACA             |
| 173     | OPI-13    | CTGGGGCTGA             |
| 174     | OPI-14    | TGACGGCGGT             |
| 175     | OPI-15    | TCATCCGAGG             |
| 176     | OPI-16    | TCTCCGCCCT             |
| 177     | OPI-17    | GGTGGTGATG             |
| 178     | OPI-18    | TGCCCAGCCT             |
| 179     | OPI-19    | AATGCGGGAG             |
| 180     | OPI-20    | AAAGTGCGGG             |
| 181     | OPJ-01    | CCCGGCATAA             |
| 182     | OPJ-02    | CCCGTTGGGA             |
| 183     | OPJ-03    | TCTCCGCTTG             |
| 184     | OPJ-04    | CCGAACACGG             |
| 185     | OPJ-05    | CTCCATGGGG             |
| 186     | OPJ-06    | TCGTTCCGCA             |
| 187     | OPJ-07    | CCTCTCGACA             |
| 188     | OPJ-08    | CATACCGTGG             |
| 189     | OPJ-09    | TGAGCCTCAC             |
| 190     | OPJ-10    | AAGCCCGAGG             |
| 191     | OPJ-11    | ACTCCTGCGA             |
| 192     | OPJ-12    | GTCCCGTGGT             |
| 193     | OPJ-13    | CCACACTACC             |
| 194     | OPJ-14    | CACCCGGATG             |
| 195     | OPJ-15    | TGTAGCAGGG             |
| 196     | OPJ-16    | CTGCTTAGGG             |
| 197     | OPJ-17    | ACGCCAGTTC             |
| 198     | OPJ-18    | TGGTCGCAGA             |
| 199     | OPJ-19    | GGACACCACT             |
| 200     | OPJ-20    | AAGCGGCCTC             |

Hem tarama hem de 62 genotipin karakterizasyonu aşamalarında elde edilen PCR ürünleri 1 x TBE tampon çözeltisinde (89 mM Tris-Cl, 89 mM borik asit, 20 mM EDTA) %1.5 'luk agaroz jelde elektroforez edilerek etidyum bromit ile boyanmış ve UV altında fotoğrafları çekilmiştir. DNA bantlarının büyüklüğünü belirlenmesinde  $\lambda$  DNA'nın *EcoRI* ve *HindIII* kesim enzimleri ile hazırlanmış olan ve ticari olarak satılan DNA'sı kullanılmıştır DNA'nın bant büyüklükleri sırası ile 564, 831, 947, 1375, 1584, 1904, 2027, 3520 bç şeklindedir (Şekil 3.16).



Şekil 3.16.OPG04, OPG05 ve OPG06 nolu RAPD primerlerinin taramada kullanılan 7 ceviz genotipindeki amplifikasyonu (1. Maraş-18, 2.Şebın, 3. Sütyemez-2, 4. Kaman-1, 5. Tokat-1, 6. Van-4, 7.Yalova-1). MA: moleküler ağırlık.

### 3.2.6. Primerlerin Polimorfizm Oranlarının Belirlenmesi

Çalışmada kullanılan ISSR ve RAPD primerlerinin polimorfizm oranları, primerlerden elde edilen polimorfik bant sayılarının, toplam bant sayısına bölünüp 100 ile çarpılması ile bulunmuştur.

$$\text{Polimorfizm Oranı (\%)} = \frac{\text{Polimorfik Bant Sayısı}}{\text{Toplam Bant Sayısı}} \times 100$$

**3.2.7. Primerlerin Polimorfizm Bilgi İçeriğinin (PBİ) Belirlenmesi**

Çalışmada kullanılan primerlerin polimorfizm bilgi içerikleri (PBİ) **Smith ve ark.'na (1997)** göre aşağıdaki formül yardımıyla belirlenmiştir. Buna göre, öncelikle polimorfik bantlarda toplam var (1) ve yok (0) olan bantların sayıları belirlenmiştir. Daha sonra bu bantların ayrı ayrı frekansları hesaplanmıştır. Formüle göre  $P_i$ ,  $i$  bandının frekansıdır.

$$PBİ = 1 - \sum P_i^2$$

**3.2.8 Primerlerin Ayırma Güçlerinin Belirlenmesi**

Çalışmada primerlerin ayırma güçleri **Prevost ve Wilkinson (1999)** tarafından geliştirilen aşağıdaki formül yardımıyla hesaplanmıştır. Formüldeki  $p$ ,  $I$  bandının 62 genotipteki oranıdır.

$$\begin{aligned} \text{Ayırma gücü} &= \sum I_b & \text{burada} \\ I_b &= 1 - (2 \times |0.5 - p|) \end{aligned}$$

**3.2.9. Soyağacı Analizleri**

RAPD ve ISSR amplifikasyon ürünleri var (1) ya da yok (0) şeklinde değerlendirilmiş ve elde edilen veriler NTSYSpc 2.1 (**Rohlf, 2004**) adlı bilgisayar paket programında analiz edilmiştir. Her bir markör tekniğinden elde edilen veriler ayrı ayrı değerlendirildiği gibi birlikte de değerlendirilmiştir. Genetik benzerlik indeksi Jaccard'a göre hesaplanmıştır. Soyağacının elde edilmesinde UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average) yöntemi kullanılmıştır.

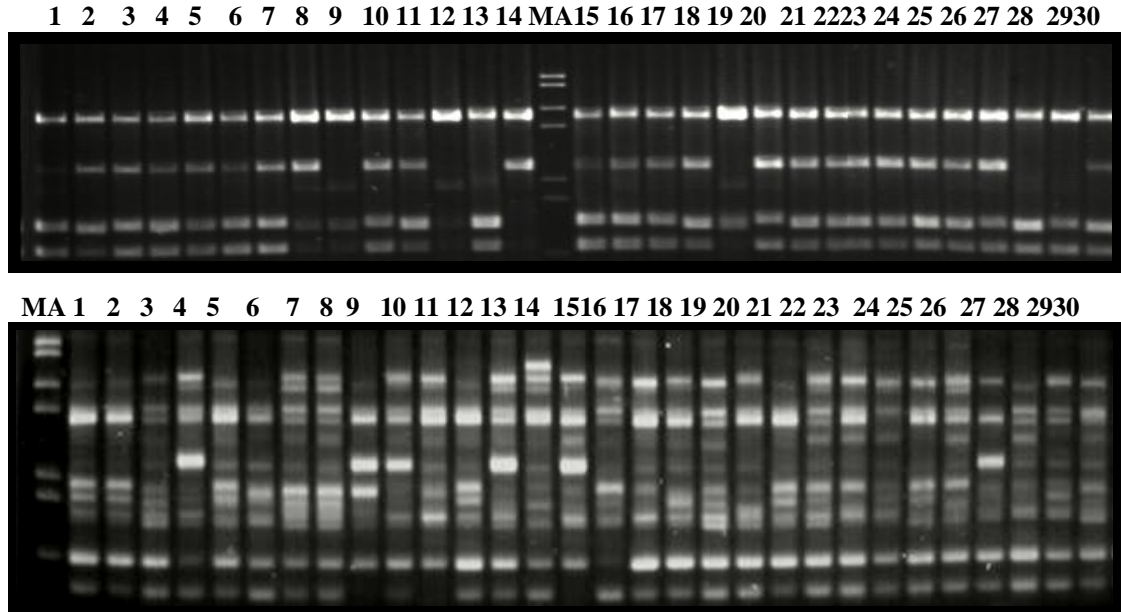
Her iki yöntemden elde edilen benzerlik indeksleri arasındaki korelasyon Mantel kofenetik korelasyon testi (**Mantel, 1967**) yapılarak hesaplanmıştır. Ayrıca elde edilen soyağaçların, benzerlik indekslerini temsil etme oranları da yine aynı paket programı kullanılarak hesaplanmıştır.

## 4. BULGULAR ve TARTIŞMA

## 4.1. ISSR Analizleri

ISSR tekniği, farklı 62 ceviz genotipini karakterize etme ve aralarındaki genetik ilişkiyi tanımlama amacı ile kullanılmış bir tekniktir. Bu teknikte ilk olarak ceviz genotiplerinde en polimorfik ISSR primerlerini saptamak amacıyla, 7 ceviz genotipinde 108 ISSR primeri denenmiş olup, bu primerlerden 69 adedinin bant verdiği ve bunlardan ise 61 adedinin polimorfik bant verdiği, 8 adedinin ise polimorfik bant üretmediği tespit edilmiştir. Tarama işleminden elde edilen bulgulara göre, 69 adet ISSR primeri toplam 503 bant vermiş olup, bu bantların 205 adedinin polimorfik olduğu saptanmıştır.

Tarama işleminden sonra, en polimorfik olarak belirlenmiş olan 25 adet ISSR primeri 62 adet ceviz genotipinde test edilmiştir. ISSR 28 ve UBC 855 nolu primerlerinin denemede bazı ceviz çeşit ve genotiplerindeki jel görüntüleri Şekil 4.1'de verilmiştir.



**Şekil 4.1.** 30 ceviz genotipinde ISSR 28 ve UBC 855 nolu ISSR primerlerinin amplifikasyon ürünleri. Sırası ile çeşit ve genotiplerin isim listesi, **1.** Yalova-1, **2.** Yalova-2, **3.** Yalova-4, **4.** Şebin, **5.** Bilecik, **6.** KR-1, **7.** KR-2, **8.** Şen-1, **9.** Şen-2, **10.** Van-4, **11.** Van-6, **12.** Bursa-95, **13.** Ürgüp, **14.** Kaplan-86, **15.** 77-H-1, **16.** KSÜ-5, **17.** Maraş-10, **18.** KSÜ-11, **19.** Maraş-14, **20.** Maraş-18, **21.** Maraş -19, **22.** Sütyemez-1, **23.** Sütyemez-2, **24.** Erzin-1, **25.** Kuyuluk, **26.** Tokat-1, **27.** Akça-1, **28.** Akça-2, **29.** Akça-3, **30.** Karabodur. **MA:** moleküler ağırlık

**Şekil 4.1**'de görüldüğü gibi, ISSR 28 nolu primerin 62 ceviz genotipi ile yapılan PCR amplifikasyonu sonucu oluşan ürünlerin 30 ceviz genotipini temsil eden jel resminde toplam 5 adet bandın 4'ünün polimorfik olduğu tespit edilmiştir. Polimorfik bantların büyüklükleri ise 570–1080 bç arasında değişim göstermiştir.

UBC 855 nolu ISSR primerinin 62 ceviz genotipi ile yapılan PCR amplifikasyonu sonucu oluşan ürünlerin 30 ceviz genotipini temsil eden jel resminde (**Şekil 4.1**), elde edilen toplam 12 adet banttın 10'unun polimorfik olduğu belirlenmiş olup, bu primere ait polimorfik bantların büyüklüklerinin ise 564–1850 bç arasında değişim gösterdiği belirlenmiştir.

#### **4.1.1 Ceviz Genotiplerinin ISSR Tekniği ile Karakterizasyonunda Polimorfizm ve Ayırma Gücü**

ISSR analizinde tarama işlemi sonucu elde edilen değerlere göre belirlenen 25 adet en polimorfik primer 62 genotipe uygulanmıştır. Elde edilen amplifikasyon ürünlerinden çok güçlü ve belirgin olanlar dikkate alınarak bantlar var (1) ve yok (0) şeklinde değerlendirilmiştir. Bu değerlendirme sonucu elde edilen toplam bant sayıları (TBS), polimorfik bant sayıları (PBS), polimorfizm oranı (PO), bu primerlerin polimorfizm bilgi içerikleri (PBI) ve ayırma gücü (AG) değerleri **Çizelge 4.1**'de verilmiştir.

Çalışmada kullanılan 25 ISSR primeri değerlendirildiğinde; toplam 181 adet bant elde edilmiş, bunların 129 adedi polimorfik bulunmuştur. Primer başına düşen toplam bant sayısı 4–12 (ortalama 7.24) arasında değişmiş, primer başına düşen polimorfik bant sayısı ise 2–10 (ortalama 5.16) arasında değişim göstermiştir. Toplam bant sayısı açısından UBC 807 ve ISSR 43 nolu primerler en düşük (4 adet) bant sayısını üretmiş olup, UBC 814 ve UBC 855 nolu primerler ise en fazla (12 adet) bant vermiştir. Polimorfik bant sayısı bakımından ise, UBC 823 nolu primer en düşük sayıda (2 adet) bant üretirken, UBC 855 nolu ISSR primerinden ise en yüksek sayıda (10 adet) bant elde edilmiştir.

Primerlerin polimorfizm oranı %71.08 olarak bulunmuştur. UBC 823 nolu primerden en düşük (%28.57) polimorfizm oranı elde edilirken, UBC 846 nolu ISSR primerinden ise en yüksek (%100) polimorfizm oranı elde edilmiştir.

**Çizelge 4.1.** ISSR primerlerinin amplifikasyonu sonucu elde edilen toplam bant sayıları (TBS), polimorfik bant sayıları (PBS), polimorfizm oranı (PO), polimorfizm bilgi içeriği (PBİ) ve primerin ayırma gücü (AG) değerleri

| No              | Primer  | TBS         | PBS         | PO           | PBİ          | AG           |
|-----------------|---------|-------------|-------------|--------------|--------------|--------------|
| 1               | UBC 807 | 4           | 3           | 75.00        | 0.555        | 1.140        |
| 2               | UBC 811 | 5           | 3           | 60.00        | 0.759        | 0.828        |
| 3               | UBC 813 | 7           | 6           | 85.70        | 0.786        | 0.849        |
| 4               | UBC 814 | 12          | 9           | 75.00        | 0.481        | 1.323        |
| 5               | UBC 815 | 10          | 8           | 80.00        | 0.605        | 1.065        |
| 6               | UBC 817 | 10          | 4           | 40.00        | 0.452        | 1.403        |
| 7               | UBC 819 | 5           | 4           | 80.00        | 0.572        | 1.250        |
| 8               | UBC 823 | 7           | 2           | 28.57        | 0.708        | 1.032        |
| 9               | UBC 826 | 6           | 4           | 66.70        | 0.862        | 0.734        |
| 10              | UBC 829 | 7           | 4           | 57.10        | 0.778        | 0.871        |
| 11              | UBC 834 | 10          | 8           | 80.00        | 0.560        | 1.185        |
| 12              | UBC 836 | 6           | 5           | 83.33        | 0.434        | 1.406        |
| 13              | UBC 840 | 8           | 7           | 87.50        | 0.299        | 1.645        |
| 14              | UBC 844 | 6           | 5           | 83.33        | 0.657        | 1.006        |
| 15              | UBC 846 | 7           | 7           | 100.00       | 0.645        | 1.023        |
| 16              | UBC 851 | 8           | 6           | 75.00        | 0.602        | 1.129        |
| 17              | UBC 853 | 8           | 4           | 50.00        | 0.846        | 0.685        |
| 18              | UBC 854 | 5           | 3           | 60.00        | 0.399        | 0.887        |
| 19              | UBC 855 | 12          | 10          | 83.33        | 0.584        | 1.152        |
| 20              | UBC 856 | 8           | 6           | 75.00        | 0.554        | 1.129        |
| 21              | UBC 858 | 6           | 3           | 50.00        | 0.360        | 1.505        |
| 22              | UBC 860 | 8           | 6           | 75.00        | 0.722        | 0.946        |
| 23              | UBC868  | 7           | 5           | 71.40        | 0.544        | 1.277        |
| 24              | ISSR 28 | 5           | 4           | 80.00        | 0.593        | 1.121        |
| 25              | ISSR 43 | 4           | 3           | 75.00        | 0.623        | 1.097        |
| <b>Toplam</b>   |         | <b>181</b>  | <b>129</b>  | <b>-</b>     | <b>-</b>     | <b>27.69</b> |
| <b>Ortalama</b> |         | <b>7.24</b> | <b>5.16</b> | <b>71.08</b> | <b>0.599</b> | <b>-</b>     |

Potter ve ark.'nın (2002) yaptıkları bir çalışmada, 48 ceviz çeşidine ISSR tekniğini uygulamışlar ve araştırmacılar kullandıkları 8 primerden 54 bant elde ettiklerini, bunların 31 tanesinin polimorfik olduğunu, polimorfizm oranının %57

olduğunu, primer başına düşen toplam bant sayısının 5–9 arasında değiştiğini, polimorfik bant sayısının ise 1–7 arasında değişim gösterdiğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar **Potter ve ark.’nın (2002)** sonuçlarından daha yüksek değerlere sahiptir. Bu durum büyük bir olasılıkla kullanılan gen kaynağının ve primerlerin farklı olmasından kaynaklanmaktadır.

**Patzak’ın (2001)** şerbetçiotu (*Humulus lupulus* L.) bitkisinde yapmış olduğu çalışmasında 10 şerbetçiotu bitkisinde RAPD ve ISSR tekniklerini uygulamışlardır. Araştırmacılar kullandıkları 14 ISSR primerinden toplam 93 bant elde ettiklerini, bu bantlardan 66’sının polimorfik olduğunu belirtmişlerdir. Primerlerin polimorfizm oranının %32.6 olduğunu bildirmişlerdir.

**Goulão ve ark. (2001)** 6 kestane çeşidinde yaptıkları çalışmada ise, 7 ISSR primeri kullanmışlar, bu primerlerden toplam 291 bant elde ettiklerini bunlardan 153 adedinin polimorfik, polimorfizm oranın ise %54 olduğunu bildirmişlerdir.

Bu çalışmada elde edilen bulgular **Patzak’ın (2001)** ve **Goulão ve ark.’nın (2001)** sonuçlarından daha yüksek değerlere sahiptir. Bu durum kullanılan bitki türünden kaynaklanmaktadır.

ISSR primerlerinin polimorfizm bilgi içeriği (PBİ) ve ayırma güçleri de bu çalışmada değerlendirilmiştir. Ortalama polimorfizm bilgi içeriği değeri 0.599 olarak bulunmuştur. En düşük (0.299) polimorfizm bilgi içeriği değeri UBC 840 nolu primerden, en yüksek (0.862) polimorfizm bilgi içeriği değeri ise UBC 826 nolu primerden elde edilmiştir.

Primerlerin ayırma gücü (AG) değerleri incelendiğinde ise; toplam ayırma gücü değeri 27.69 olarak belirlenmiş olup; en düşük (0.685) ayırma gücü değeri UBC 853 nolu primerden elde edilirken, en yüksek (1.505) ayırma gücü değeri ise UBC 858 nolu primerden elde edilmiştir.

**Kafkas ve ark. (2006)** antepfıstığı gen kaynağının değişik DNA markör teknikleri kullanılarak DNA polimorfizminin ve genetik uzaklığının belirlenmesi çalışmalarında kullandıkları 20 ISSR primerindeki ayırma gücü değerini 53.62 olarak bulmuşlardır. Bu çalışmada elde edilen değer, **Kafkas ve ark.’nın (2006)** antepfıstığından elde ettikleri değerden, yaklaşık 2.5 kat daha düşük bulunmuştur. Bu

durum da ceviz genetik kaynaklarındaki varyasyonun antepfıstığına göre daha düşük olduğunu göstermektedir.

ISSR tekniği; birbirine ters yönlü ve yakın olan mikrosatellit bölgelerin (100–3000 bp) amplifikasyonu esasına dayanan bir tekniktir. Mikrosatellitler genomda bol miktarda ve orantılı olarak dağılmış olarak bulunurlar. Bu şekilde primerler ile elde edilen PCR ürünleri SSR lokuslarıdır. Bu tekniğin en önemli avantajı ön bilgi gerektirmemesidir. ISSR tekniğinde kullanılan primerler 5' veya 3' ucunda rastgele genellikle 1–4 bazdan oluşan seçici baz dizilimlerine sahiptirler. Ancak seçici baz içermeyen primerlerde kullanılabilir. Bu teknikte basit tekrar dizileri içeren (15–24 bp) primerler SSR'lar arasında kalan bölgeleri amplifikasyona ederler (**Kafkas, 2006**). Dolayısıyla ile bu özellikler ISSR tekniğine bazı olumlu yönler kazandırmaktadır. Bunlardan en önemlisi az miktarda DNA ile bu tekniğin yapılabilmesidir. Kullanılacak primerler için ön dizilim bilgisine gerek yoktur (**Kafkas, 2006**). Tekniğin uygulanmasının çok kolay olduğu ve kuruluş maliyetinin çok düşük olduğu bildirilmiştir (**Kafkas, 2006**). ISSR tekniğinde, bir reaksiyonda çoklu bantlar elde edilebileceği gibi, otomasyona uygun olduğu ve tekniğin sonuçlarını görüntülemek için radyoaktif madde kullanımına gereksinim olmadığı bildirilmektedir (**Kafkas, 2006**).

Bu teknikte olumlu yönleri dışında olumsuz yönlere de sahip olduğu bilinmektedir. Bunlar; dominant bir markör tekniği olması ve bu teknikte kullanılacak primerlerin ayrı ayrı yapışma sıcaklıklarının belirlenmesi gerekmesi gibi olumsuzluklardır.

Bu olumlu ve olumsuz özelliklerle dikkate alındığında; ISSR tekniği filogenetik çalışmalar, genetik kaynakların karakterizasyonu, genetik varyasyonun belirlenmesi, genotipler arasında genetik ilişkilerin saptanması ve çeşit tanımlanmaları gibi alanlarda kullanılabilir (**Kafkas, 2006**).

**4.1.2. Ceviz Genotiplerinin ISSR Yöntemi ile Aralarındaki Genetik İlişkilerinin Belirlenmesi**

İstatistiksel analiz sonuçlarına göre, ceviz genotipleri arasındaki genetik benzerlik indeksinin 0.62–0.94 arasında değişim gösterdiği belirlenmiştir. Araştırmada yer alan tüm ceviz genotipleri arasındaki Jaccard genetik benzerlik katsayıları **Ek 1**'de verilmiştir.

62 adet ceviz genotipi genetik benzerlik açısından incelendiğinde, birbirine en yakın genotipler sırasıyla; KR–2 ile Şen–1 (0.94), Ronde de Montignac ile Pedro (0.93), Yalova–1 ile Yalova–3 (0.92), Maraş–10 ile Yalova–3 (0.91), Akça–2 ile Karabodur (0.90), KSÜ–5 ile Sütyemez–1 (0.90), Maraş–12 ile Sütyemez–2 (0.90), KSÜ–5 ile Maraş–12 (0.89), Maraş–18 ile Maraş–46 (0.89), Ronde de Montignac ile Chandler (0.88) olmuştur. Genetik olarak en uzak genotipler ise sırasıyla; KR–2 ile Sunland (0.62), Erzin–1 ile Franquette (0.63), Şen–1 ile Serr (0.64) ve Şen–1 ile Sunland (0.64), 77–H–1 ile Göçmen (0.65), Van–4 ile Hirfanlı (0.66), Erzin–1 ile Akça–3 (0.66), Erzin–1 ile İskilip–3 (0.68), Erzin–1 ile Hirfanlı (0.71), Erzin–1 ile Pedro (0.72), Akça–1 ile İskilip–2 (0.77) olduğu saptanmıştır.

ISSR analizleri sonucunda 62 ceviz genotipinin tamamı birbirinden ayrılmıştır. Analiz sonucunda elde edilen soyağacında 2 ana grup oluşmuştur. **Şekil 4.2**'de ilk grubu Türk orijinli ceviz genotiplerinin oluşturduğu belirlenmiştir. Diğer grupta ise, yabancı çeşitler bir arada yer almıştır Türk orijinli genotipler ile oluşan ana grup içerisinde KR–2 ile Şen–1'in en yakın (0.94) genotip olduğu, Yalova–1 ile Yalova–3 (0.92), Akça–2 ile Karabodur (0.90), KSÜ–5 ile Sütyemez–1 (0.90), Maraş–12 ile Sütyemez–2 (0.90) genotiplerinin çok yakın ilişkili genotipler olduğu saptanmıştır.

Soyağacına göre, Adana ilinden alınan Kuyuluk çeşidinin K.Maraş orijinli genotiplerin arasında yer aldığı görülmüştür. Diğer taraftan K.Maraş'taki genetik kaynaktan alınan Ürgüp çeşidinin ise Kırşehir ve Tokat ilinden alınan genotipler grubuna dahil olduğu saptanmıştır.

Yabancı çeşitlerin oluşturduğu grup içerisinde ise, Ronde de Montignac ile Pedro (0.93) çeşitlerinin diğer yabancı orijinli çeşitlere göre en yakın çeşit olduğu belirlenmiştir. Amigo ile Sunland (0.86) ve Fernet ile Franquette (0.85) çeşitlerinin

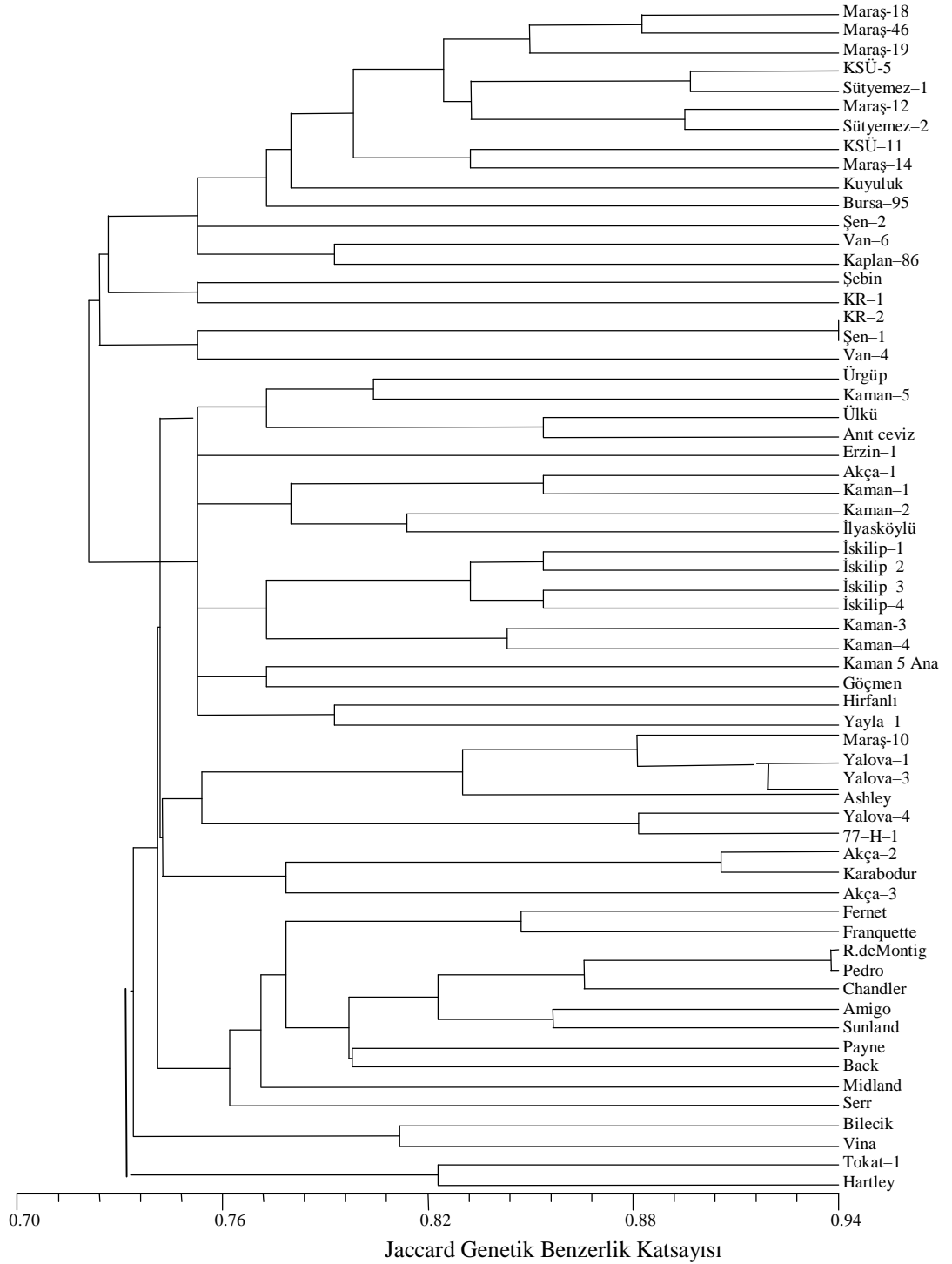
de birbirlerine yakın akraba oldukları saptanmıştır. Payne ile Back (0.77) çeşitlerinin diğerlerine göre daha uzak çeşitler olduğu saptanmıştır.

Soyağacına göre, Ashley çeşidi Tokat ve K.Maraş ilinden alınan Türk çeşitlerinin oluşturduğu grup içerisinde yer almıştır. Bu çeşidin dahil olduğu grup içerisinde yer alan diğer genotipler ile benzerlik durumu incelendiğinde, Maraş-10 ile Ashley arasında 0.83'lük, Yalova-1 ile Ashley arasında 0.81'lik, Yalova-3 ile Ashley arasında 0.83'lük bir benzerlik indeksinin olduğu tespit edilmiştir.

Vina, Hartley, Bilecik ve Tokat-1 genotipleri ise Türk orijinli ve yabancı orijinli genotiplerin oluşturduğu grupların dışında yer almıştır. Bu genotiplerin kendi aralarında oluşturduğu benzerlik durumu incelendiğinde, Tokat-1 ile Hartley 0.82'lik, Bilecik ile Vina 0.80'lik bir benzerliğe sahip olduğu saptanmıştır (**Şekil 4.2**)

**Kafkas ve ark.'nın (2005)** ceviz genotiplerinde AFLP ve SAMPL tekniğini kullanarak 21 ceviz genotipi arasındaki genetik ilişkiyi ve polimorfizmi belirlemek amacı ile yaptıkları çalışmada elde ettikleri bulgularda, Maraş-18 ile Maraş-46, KSÜ-5 ile Sütyemez-1, Maraş-12 ile Sütyemez-2, Kaman-3 ile Kaman-4, ve KSÜ-11 ile Maraş-10 genotiplerini yakın ilişkili bulduklarını bildirmişlerdir. Bu çalışmada ise ISSR verileri kullanılarak elde edilen soyağacı ve benzerlik indeksine göre; Maraş-18 ile Maraş-46, KSÜ-5 ile Sütyemez-1, Maraş-12 ile Sütyemez-2, Kaman-3 ile Kaman-4'ün yakın ilişkili oldukları belirlenmiştir. Sonuç olarak **Kafkas ve ark.'nın (2005)** sonuçları ile benzer sonuçlar elde edilmiştir.

**Potter ve ark.'nın (2002)** ceviz çeşitleri arasında ISSR tekniğini kullanarak çeşitler arasındaki genetik ilişkiyi belirleme ve çeşitlerin parmak izlerini çıkarmak amaçlı yaptıkları çalışmada, Howard ve Chandler çeşitleri ve Serr ile Sunland çeşitlerinin yakın ilişkili çeşitler olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada ise, kullanılan yabancı orijinli çeşitler içinden Ronde de Montignac ile Pedro çeşitlerinin en yakın çeşitler olduğu, Serr ile Sunland çeşitlerinin ise en uzak akraba çeşitler olduğu saptanmıştır. Bu sonuca göre, **Potter ve ark.'nın (2002)** elde ettikleri bulgudan farklı bir bulgu elde edilmiştir. Bu durumun kullanılan primer sayısının farklı ve çeşitlerin gen kaynağının farklı olmasından kaynaklanmış olabilir.

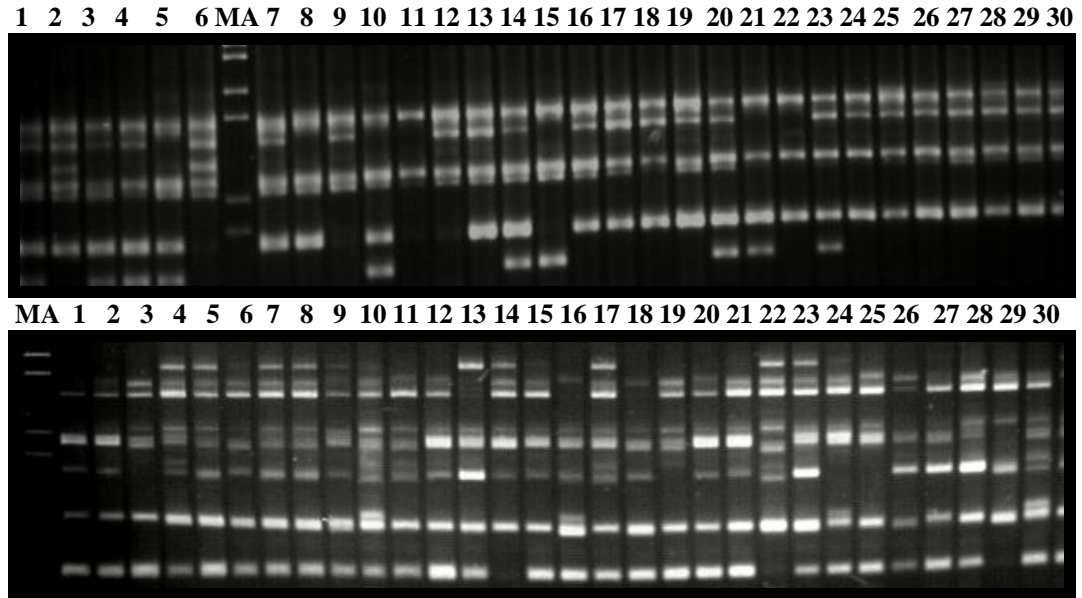


Şekil 4.2. 62 ceviz genotipine ISSR tekniğinin uygulanması sonucu elde edilen soyağacı

#### 4.2 RAPD Analizleri

RAPD tekniği 62 ceviz genotipini karakterize etme ve aralarındaki genetik ilişkiyi ortaya çıkarma amacı ile kullanılmıştır. Bu teknikte ceviz genotipleri için en polimorfik RAPD primerini saptamak amacıyla ilk olarak; 7 ceviz genotipinde 200 adet RAPD primeri test edilmiş, bu primerlerden 141 adedinin polimorfik bant ürettiği, 38 adedinin polimorfik bant üretmediği ve 21 adet primerin de hiç bant üretmediği tespit edilmiştir. Tarama işleminden elde edilen bulgulara göre 163 adet RAPD primeri toplam 950 bant vermiş olup, bu bantların 314 'ünün polimorfik olduğu saptanmıştır.

Tarama işleminden sonra en polimorfik olarak saptanan 25 adet RAPD primeri 62 adet ceviz çeşit ve genotipinde test edilmiştir. OPB 18 ve OPH 12 primerlerinin denemedeki bazı ceviz genotiplerindeki amplifikasyonu sonucu elde edilen ürünlerin gösterildiği jel görüntüleri **Şekil 4.3**'de verilmiştir.



**Şekil 4.3.** 30 ceviz genotipinde OPB 18 ve OPH 12 nolu RAPD primerlerinin amplifikasyon ürünleri. Sırası ile çeşit ve genotiplerin isim listesi, **1.** Yalova-1, **2.** Yalova-2, **3.** Yalova-4, **4.** Şebin, **5.** Bilecik, **6.** KR-1, **7.** KR-2, **8.** Şen-1, **9.** Şen-2, **10.** Van-4, **11.** Van-6, **12.** Bursa-95, **13.** Ürgüp, **14.** Kaplan-86, **15.** 77-H-1, **16.** KSÜ-5, **17.** Maraş-10, **18.** KSÜ-11, **19.** Maraş-14, **20.** Maraş-18, **21.** Maraş-19, **22.** Sütyemez-1, **23.** Sütyemez-2, **24.** Erzin-1, **25.** Kuyuluk, **26.** Tokat-1, **27.** Akça-1, **28.** Akça-2, **29.** Akça-3, **30.** Karabodur. **MA:** moleküler ağırlık

**Şekil 4.3'**de görüldüğü gibi, OPB 18 RAPD primerinin 62 ceviz genotipi ile yapılan PCR amplifikasyonu sonucu oluşan ürünlerin 30 ceviz genotipini temsil eden jel resminde; 6 bandın 4'ünün polimorfik olduğu tespit edilmiştir. Polimorfik bantların büyüklükleri ise 750–1350 bp arasında değişim göstermiştir.

OPH 12 RAPD primeri ile 62 ceviz genotipinde yapılan PCR amplifikasyonu sonucu oluşan ürünlerin 30 çeşit ve genotipi temsil eden jel resminde; 10 banttan 9'unun polimorfik olduğu belirlenmiş olup, polimorfik bantların büyüklüklerinin ise 300–2000 bp arasında değişmiş olduğu belirlenmiştir

#### **4.2.1.Ceviz Genotiplerinin RAPD Tekniği ile Karakterizasyonunda Polimorfizm ve Ayırma Gücü**

RAPD analizinde tarama işlemi sonucu elde edilen değerlere göre belirlenen 25 adet en polimorfik primer 62 genotipe uygulanmıştır. Elde edilen amplifikasyon ürünlerinden çok güçlü ve belirgin olanlar dikkate alınarak bantlarda var (1) ve yok (0) değerlendirmesi yapılmıştır. Bu değerlendirme sonucu elde edilen toplam bant sayıları (TBS), polimorfik bant sayıları (PBS), polimorfizm oranı (PO) ve bu primerlerin polimorfizm bilgi içerikleri (PBI) ve ayırma gücü (AG) değerleri aşağıdaki **Çizelge 4.2'**de verilmiştir.

Çalışmada kullanılan 25 RAPD primeri değerlendirildiğinde; toplam 211 adet bant elde edilmiş ve bunların 144 adedi polimorfik bulunmuştur. Primer başına düşen toplam bant sayısı 3–15 (ortalama 8.44) arasında değişim göstermiştir. Primer başına düşen polimorfik bant sayısı ise, 1–11 (ortalama 5.76) arasında değişim göstermiştir. Toplam bant sayısı açısından primerler değerlendirildiğinde, OPH 06 nolu primer en düşük (3 adet) bant sayısını üretmiş olup, OPG 10 ve OPG 18 nolu primerler ise en fazla (15 adet) bantı vermiştir. Polimorfik bant sayısı bakımından ise OPH 08 nolu primerden en düşük (1 adet) bant sayısı elde edilir iken, OPG 10 nolu RAPD primerinden en yüksek (11 adet) bant sayısı elde edilmiştir.

Primerlerin polimorfizm oranı % 69,05 bulunmuştur. OPH 08 nolu primerden en düşük (%20.00), OPH 06 nolu RAPD primerinden en yüksek (%100) polimorfizm oranı elde edilmiştir.

**Çizelge 4.2.** RAPD primerlerinin amplifikasyonu sonucu elde edilen toplam bant sayıları(TBS), polimorfik bant sayıları(PBS), polimorfizm oranı (PO), polimorfizm bilgi içeriği (PBİ) ve primerin ayırma gücü (AG) değerleri

| No              | Primer | TBS         | PBS         | PO           | PBİ          | AG            |
|-----------------|--------|-------------|-------------|--------------|--------------|---------------|
| 1               | OPA 02 | 5           | 3           | 60.00        | 0.822        | 0.763         |
| 2               | OPA 09 | 7           | 5           | 71.43        | 0.785        | 0.690         |
| 3               | OPB 08 | 9           | 7           | 77.78        | 0.505        | 1.318         |
| 4               | OPB 10 | 9           | 6           | 66.67        | 0.532        | 1.274         |
| 5               | OPB 18 | 6           | 4           | 66.67        | 0.651        | 1.048         |
| 6               | OPC 01 | 6           | 4           | 66.67        | 0.518        | 1.250         |
| 7               | OPC 04 | 7           | 4           | 57.14        | 0.352        | 1.508         |
| 8               | OPC 07 | 12          | 10          | 83.33        | 0.685        | 1.000         |
| 9               | OPC 11 | 9           | 8           | 88.89        | 0.652        | 1.077         |
| 10              | OPD 15 | 11          | 10          | 90.91        | 0.553        | 1.255         |
| 11              | OPF 10 | 11          | 6           | 54.55        | 0.457        | 1.317         |
| 12              | OPG 04 | 7           | 4           | 57.14        | 0.624        | 1.121         |
| 13              | OPG 06 | 13          | 7           | 53.85        | 0.599        | 1.092         |
| 14              | OPG 10 | 15          | 11          | 73.33        | 0.671        | 0.915         |
| 15              | OPG 11 | 9           | 7           | 77.78        | 0.724        | 0.945         |
| 16              | OPG 18 | 15          | 6           | 40.00        | 0.807        | 0.774         |
| 17              | OPG 19 | 10          | 9           | 90.00        | 0.558        | 1.179         |
| 18              | OPH 06 | 3           | 3           | 100.00       | 0.350        | 1.516         |
| 19              | OPH 08 | 5           | 1           | 20.00        | 0.584        | 1.290         |
| 20              | OPH 12 | 10          | 9           | 90.00        | 0.558        | 1.179         |
| 21              | OPI 05 | 5           | 4           | 80.00        | 0.673        | 1.000         |
| 22              | OPI 13 | 10          | 3           | 30.00        | 0.384        | 1.505         |
| 23              | OPI 14 | 6           | 5           | 83.33        | 0.576        | 1.194         |
| 24              | OPI 19 | 6           | 4           | 66.67        | 0.552        | 1.290         |
| 25              | OPJ 13 | 5           | 4           | 80.00        | 0.479        | 1.395         |
| <b>TOPLAM</b>   |        | <b>211</b>  | <b>144</b>  | <b>-</b>     | <b>-</b>     | <b>28.897</b> |
| <b>ORTALAMA</b> |        | <b>8.44</b> | <b>5.76</b> | <b>69.05</b> | <b>0.586</b> | <b>-</b>      |

Nicese ve ark.'nın (1998) yaptıkları çalışmada ise, 19 ceviz genotipinde uyguladıkları RAPD tekniğinde, 72 primerin hepsinin bant vermiş olduğunu, bu primerlerden 23 adedinin polimorfik olduğunu, bantların büyüklüğü ise 250–1700 bp arasında değişim gösterdiğini araştırmacılar bildirmişlerdir. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar Nicese ve ark.'nın (1998) yaptıkları çalışmadaki bulgular ile yakın benzerlikler göstermektedir.

Goulão ve ark.'nın (2001) 6 kestane genotipinde yaptıkları çalışmada 28 RAPD primeri kullanmışlardır. Bu primerlerden toplam 224 bant elde ettiklerini

bunlardan 125 adedinin polimorfik olduğunu, primer başına düşen polimorfik bant sayısının 7–12 arasında değişim gösterdiğini, polimorfizm oranının ise %54 olduğunu bildirmişlerdir.

**Awasthi ve ark.’nın (2004)** dut bitkisinde genetik farklılık ve birbirleri ile ilişkilerini tespit etme amacı ile yaptıkları çalışmada, 19 RAPD primeri kullanarak toplam 119 polimorfik bant elde etmişlerdir. Elde ettikleri bantların büyüklüklerinin 500–3000 bp arasında değişim gösterdiğini, primer başına düşen polimorfik bant sayısının 3–9 arasında değiştiğini, polimorfizm oranının %92 olduğunu bildirmişlerdir.

Bu çalışmada elde edilen bulgular **Goulão ve ark.’nın (2001)** ve **Awasthi ve ark.’nın (2004)** sonuçlarından kullanılan primer adedi ve elde edilen bant sayıları bakımından daha yüksek değerlere sahiptir. Polimorfizm oranı açısından ise, **Awasthi ve ark.’nın (2004)** çalışmasından elde ettiği bulgudan daha düşük, **Goulão ve ark.’nın (2001)** elde ettikleri bulgudan yüksek bir orana sahiptir. Bu durum büyük bir olasılıkla kullanılan bitki türünün ve primerlerin farklı olmasından kaynaklanmaktadır.

Primerlerin polimorfizm bilgi içeriği (PBI) ve ayırma güçleri de çalışmada değerlendirilmiştir. Ortalama polimorfizm bilgi içeriği değeri 0.586 olarak bulunmuştur. OPH 06 nolu primerden en düşük (0.350) polimorfizm bilgi içeriği, OPA 02 nolu primerden en yüksek (0.822) polimorfizm bilgi içeriği değeri elde edilmiştir. Primerlerin ayırma gücü (AG) değerleri incelendiğinde, toplam ayırma gücü değeri 28.897 olarak belirlenmiş olup; OPA 09 nolu primerden en düşük (0.690) ayırma gücü, OPH 06 nolu primerden ise, en yüksek (1.516) ayırma gücü değeri elde edilmiştir (**Çizelge 4.2**).

**Prevost ve Wilkinson (1999)** genellikle farklı araştırmalarda kullanılan primer sonuçlarını birbirleri ile karşılaştırma yapmanın zor olduğunu, ayırma gücü değerinin kullanımının bu güçlüğün aşılmasında etkili olabileceğini, ayrıca primer gruplarının da performans tahminlerinde kullanışlı olabileceğini çalışma bulgularında bildirmişlerdir.

Bu çalışmada primerlerin ayırma gücü (AG) değerleri incelendiğinde; toplam ayırma gücü değeri 28.90 olarak bulunmuştur. **Kafkas ve ark.’nın (2006)** antepfıstığı gen kaynağının değişik markör teknikleri kullanılarak DNA

polimorfizminin ve genetik uzaklığının belirlenmesi çalışmasından elde ettikleri ayırma gücü değeri ise 49.51'dir. Bu çalışmada elde ettiğimiz sonuçlar; **Kafkas ve ark.'nın (2006)** elde ettikleri sonuçlardan daha düşük bulunmuştur. Bu durum da ceviz genetik kaynaklarındaki farklılığın antepfistiğine göre daha düşük olduğunu göstermektedir.

#### **4.2.2.Ceviz Genotiplerinin RAPD Yöntemi ile Aralarındaki Genetik İlişkilerinin Belirlenmesi**

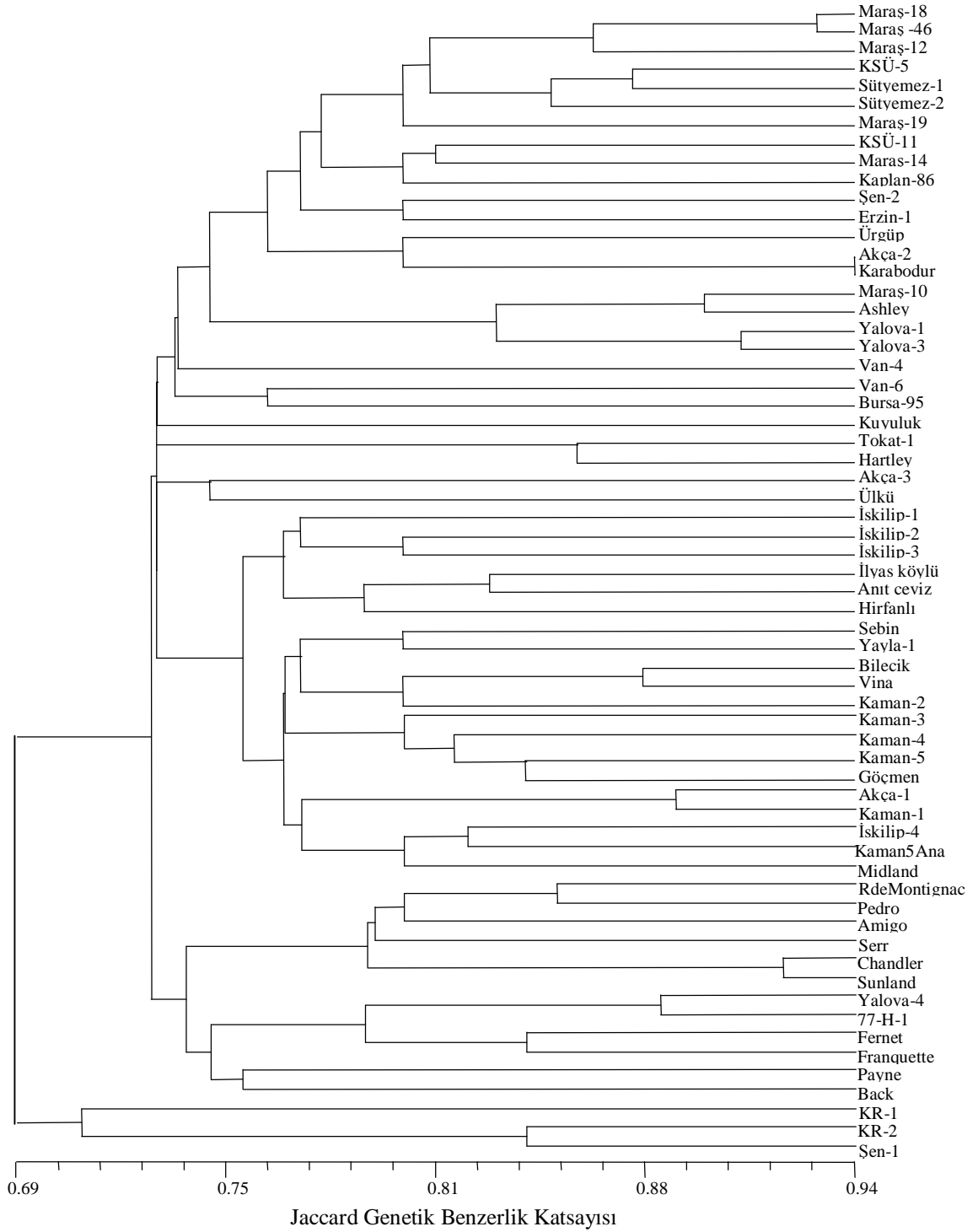
Ceviz genotipleri arasındaki benzerlik indeksini belirlemek amaçlı RAPD verileri kullanılarak yapılan istatistiksel analizlere göre elde edilen indeks 0.63–0.95 arasında değişim göstermiştir. Tüm ceviz çeşit ve genotipleri arasındaki genetik benzerlik indeksleri **Ek 2'**de verilmiştir.

Genel olarak 62 ceviz genotipinden elde edilen değerlere göre, sırasıyla genetik olarak en yakın genotiplerin başında: Akça–2 ile Karabodur (0.95), Chandler ile Sunland (0.92), Yalova–1 ile Yalova–3 (0.91), Maraş–46 ile Maraş–12 (0.90), Maraş–10 ile Ashley (0.90), Akça – 1 ile Kaman–1 (0.89), Yalova – 4 ile 77–H–1 (0.88), Bilecik ile Vina (0.88), KSÜ–5 ile Sütyemez–1 (0.87), Sütyemez–1 ile Sütyemez–2 (0.88) gelmektedir.

En uzak olan genotipler ise sırasıyla Yalova–1 ile KR–2 (0.63), KR–1 ile Serr (0.64), KR–2 ile Van–6 (0.64), Şen–1 ile Akça–3 ve Kaman–2 (0.64) ve Van–6 (0.65), Akça–3 ve Payne (0.65), Akça–3 ile İskilip–1 (0.70) ve Akça–3 ile İskilip–2 (0.75)'dir.

Elde edilen soyağacına göre, 62 ceviz genotipi kolay bir şekilde ayırt edilmiştir. **Şekil 4.4'**de ki soyağacında iki ana grup oluşmuştur: birinci grubu Türk orijinli genotipler ve ikinci grubu da yabancı orijinli genotipler oluşturmuştur.

Elde edilen soyağacına göre, Türk orijinli genotiplerin oluşturduğu ilk grupta Akça–2 ile Karabodur'un en yakın (0.95) genotipler olduğu belirlenmiştir. Sırası ile diğer yakın ilişkili genotipler ise; Maraş –18 ile Maraş– 46 (0.93), Yalova –1 ile Yalova –3 (0.91), Maraş– 46 ile Maraş –12 (0.90), Maraş –10 ile Ashley (0.90), Akça –1 ile Kaman –1 (0.89), Bilecik ile Vina (0.88), KSÜ–5 ile Sütyemez–1 (0.87),



Şekil 4.4. 62 ceviz genotipine RAPD tekniğinin uygulanması sonucu elde edilen soyağacı

Sütyemez-1 ile Sütyemez-2 (0.88) olarak belirlenmiştir. Diğer taraftan K.Maraş ilinden alınan Yalova-4 ve 77-H-1 genotiplerinin yabancı çeşitler arasında yer aldığı saptanmıştır.

Türk genotiplerinden oluşan ilk grup içerisinde yer alan Ashley, Hartley, Vina ve Midland çeşitleri ise farklılık göstererek K.Maraş, Tokat ve Kırşehir illerinden alınan genotiplerin arasında yer almışlardır. Bu genotipler dahil oldukları grup içerisinde ilişkili olduğu genotipler ile benzerlikleri incelendiğinde, Maraş-10 ile Ashley genotipleri arasında 0.90'lık, Tokat-1 ile Hartley genotipleri arasında 0.87'lik, Bilecik ile Vina arasında 0.88'lik bir benzerlik olduğu belirlenmiştir.

Yabancı genotiplerin oluşturduğu grup içerisinde Chandler ile Sunland genotipleri en yakın (0.92), daha sonra bunu Fernet ile Franquette (0.85) izlemiştir. Payne ve Back'in diğerlerine göre daha az (0.75) ilişkili genotipler olduğu saptanmıştır. Yabancı orijinli olup, diğer Türk orijinli genotipleri içerisinde yer alan Vina, Hartley ve Ashley genotiplerinin diğer yabancı çeşitler ile aralarındaki genetik benzerlik incelendiğinde; Ashley ve Back (0.71), Vina ile Back (0.69), Hartley ile Payne (0.67) çeşitlerinin birbirlerine uzak akraba oldukları saptanmıştır.

KR-1, KR-2 ve Şen-1 genotipleri ise yukarıdaki iki ana grubun dışında yer almışlardır. Bu grup içerisinde KR-2 ile Şen-1 genotipleri yakın (0.84) ilişkili, KR-1 ile KR-2 genotipleri ise uzak (0.67) ilişkili bulunmuşlardır (**Şekil 4.4**).

**Kafkas ve ark'nın (2005)** ceviz genotiplerinde AFLP ve SAMPL tekniğini kullanarak 21 Türk orijinli ceviz genotipinde polimorfizm belirleme ve genetik benzerliklerini tespit etme amaçlı yaptıkları çalışmada elde ettikleri bulgularda, Maraş-18 ile Maraş-46, KSÜ-5 ile Sütyemez-1, Maraş-12 ile Sütyemez-2, Kaman-3 ile Kaman-4 ve KSÜ-11 ile Maraş-10 genotiplerini yakın ilişkili bulduklarını bildirmişlerdir. Bu çalışmada ise RAPD verileri kullanılarak elde edilen bulgulara göre; Maraş-18 ile Maraş-46, KSÜ-5 ile Sütyemez-1 yakın ilişkili, Maraş-12 ile Maraş-18 ve Maraş-46, Kaman-3'ün Kaman-4, Kaman-5 ve Göçmen ile yakın ilişkili oldukları belirlenmiştir. Buradan kullanılan genotip sayısı farkı ve kullanılan tekniğin farklı olmasından dolayı farklı bir sonuç elde edilmiştir.

**Nicese ve ark.'nın (1997)** ceviz çeşitlerinde RAPD tekniğini kullanarak karakterizasyon amaçlı yaptıkları çalışmada elde ettikleri soyağacına göre, Sunland

ve Cisco çeşitlerinin Payne çeşidine genetik olarak uzak ilişkili olan 2 çeşit olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada ise elde edilen soyağacına göre, Chandler ile Sunland çeşitlerinin genetik olarak en yakın, Payne ve Back çeşitlerinin ise çalışmada kullanılan diğer yabancı orijinli çeşitlere göre genetik olarak daha uzak ilişkili çeşitler olduğu saptanmıştır. Diğer bir sonuç olarak Sunland ile Payne çeşitleri bu çalışmada da genetik olarak uzak akraba oldukları belirlenmiştir. Sonuç olarak çalışmada elde edilen bulgular ile **Nicese ve ark.'nın (1997)** çalışmalarında elde ettikleri bulgular ile benzer bulunmuştur.

RAPD tekniği; nükleotid dizilimi rastgele seçilmiş primerler kullanılarak yapılan polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) olup, nükleotid bilgisine sahip olmaksızın polimorfizmin belirlenmesini sağlar. Polimorfizmin belirlenmesi genetik işaretlerin (markör) elde edilmesinde ve genetik harita yapımında kullanılabilir. RAPD'in temeli yaklaşık 10 nükleotidlik ve nükleotid dizilimi rastgele seçilmiş tek çeşit primerlerin kullanımına dayanır. Bu primerler tasarlanır iken primerlerin GC/AT oranlarının %50 ya da daha fazla olmasına dikkat edilir. Bu primerlerin çoğaltılacak DNA'da kendine uygun bölgelere bağlanabilmelerini kolaylaştırmak için primer bağlanma sıcaklığının düşürülmesi de önemlidir (**Temizkan ve Arda, 2004**)

Ayrıca RAPD analizinde PCR sonunda elde edilen polimorfik DNA dizileri genetik markör olarak kullanılmaktadır (**Altinkunt, 2001**)

RAPD tekniğinde az miktarda DNA ile çalışılması, primer sentezi için özel nükleotid dizi bilgisine gerek duyulmaması ve radyoaktif madde kullanılmadan görüntüleme işleminin yapılabilmesi, kolay, çabuk ve diğer markör yöntemlerine göre daha ucuz bir yöntem olması bu tekniğin çok tercih edilmesine neden olmuştur. Ancak RAPD'e dayalı PCR reaksiyonlarının tekrar edildiğinde aynı reaksiyon ürünlerini her zaman vermeyişi ve RAPD markörlerinin dominant olması nedeni ile heterozigot bireyleri saptayamaması bu yöntemi kısıtlayan en önemli etkenlerdir (**Altinkunt, 2001**).

RAPD tekniği, genetik markörleri tanımlamada (**Devos ve Gale, 1992; Klein-Lankhorst ve ark., 1991**), gen kaynaklarının tanımlanmasında ve sınıflandırılmasında (**Yang ve Quiros, 1993; Yu ve Pauls, 1993**), genetik uzaklığı

belirlemede (Williams ve St. Clair, 1993) ve genetik haritalama için (Kazan ve ark., 1993) kullanılabilirliğini araştırmacılar bildirmişlerdir.

#### **4.2.3. RAPD ve ISSR Verilerinin Birlikte Değerlendirilmesi ve Karşılaştırılması**

##### **4.2.3.1. RAPD ve ISSR Tekniklerinin Polimorfizm ve Ayırma Gücü Bakımından Karşılaştırılması**

RAPD ve ISSR tekniklerinin polimorfizm ve ayırma gücü bakımından karşılaştırması **Çizelge 4.3'**de verilmiştir.

**Çizelge 4.3.** RAPD ve ISSR primerlerinin amplifikasyonu sonucu elde edilen toplam bant sayıları (TBS), primer başına düşen toplam bant sayısı (PBDTBS), polimorfik bant sayıları (PBS), primer başına düşen polimorfik bant sayısı (PBDPBS), polimorfizm oranı (PO), polimorfizm bilgi içeriği (PBİ) ve primerin ayırma gücü (AG) değerleri

|             | <b>TBS</b> | <b>PBDTBS</b> | <b>PBS</b> | <b>PBDPBS</b> | <b>PO</b> | <b>PBİ</b> | <b>AG</b> |
|-------------|------------|---------------|------------|---------------|-----------|------------|-----------|
| <b>ISSR</b> | 181        | 7.24          | 129        | 5.16          | 71.08     | 0.599      | 27.690    |
| <b>RAPD</b> | 211        | 8.44          | 144        | 5.76          | 69.05     | 0.586      | 28.897    |

RAPD ve ISSR teknikleri polimorfizm ve ayırma gücü bakımından karşılaştırıldığında, ISSR tekniğinden toplam 181 bant elde edilmiş, bunlardan ise 129 adedi polimorfik olarak tespit edilmiştir. RAPD tekniğinde ise toplam 211 adet bant elde edilmiş, bunlardan ise 144 adedi polimorfik bant olarak saptanmıştır. Dolayısı ile elde edilen bulgulara göre RAPD tekniği toplam ve polimorfik bant sayısı bakımından ISSR tekniğine göre daha iyi sonuç vermiştir.

Polimorfizm oranı açısından ISSR tekniğinin %71.08'lik, RAPD tekniğinin ise %69.05'lik bir orana sahip olduğu belirlenmiştir. Polimorfizm bilgi içeriği bakımından ISSR tekniğinden 0.599'luk, RAPD tekniğinden ise 0.586'lik bir değer elde edilmiştir. İncelenen bu özellikler bakımından ISSR tekniğinin RAPD tekniğine göre biraz daha polimorfik bir teknik olduğu ortaya çıkmıştır.

Primerlerin ayırma gücü bakımından teknikler karşılaştırıldığında ise, ISSR tekniğinin 27.690, RAPD tekniğinin ise 28.897 ayırma gücüne sahip olduğu saptanmıştır. Elde edilen bu sonuca göre, RAPD tekniğinde kullanılan primerler, ISSR tekniğinde kullanılan primerler ile benzer ayırma gücüne sahip olmuştur.

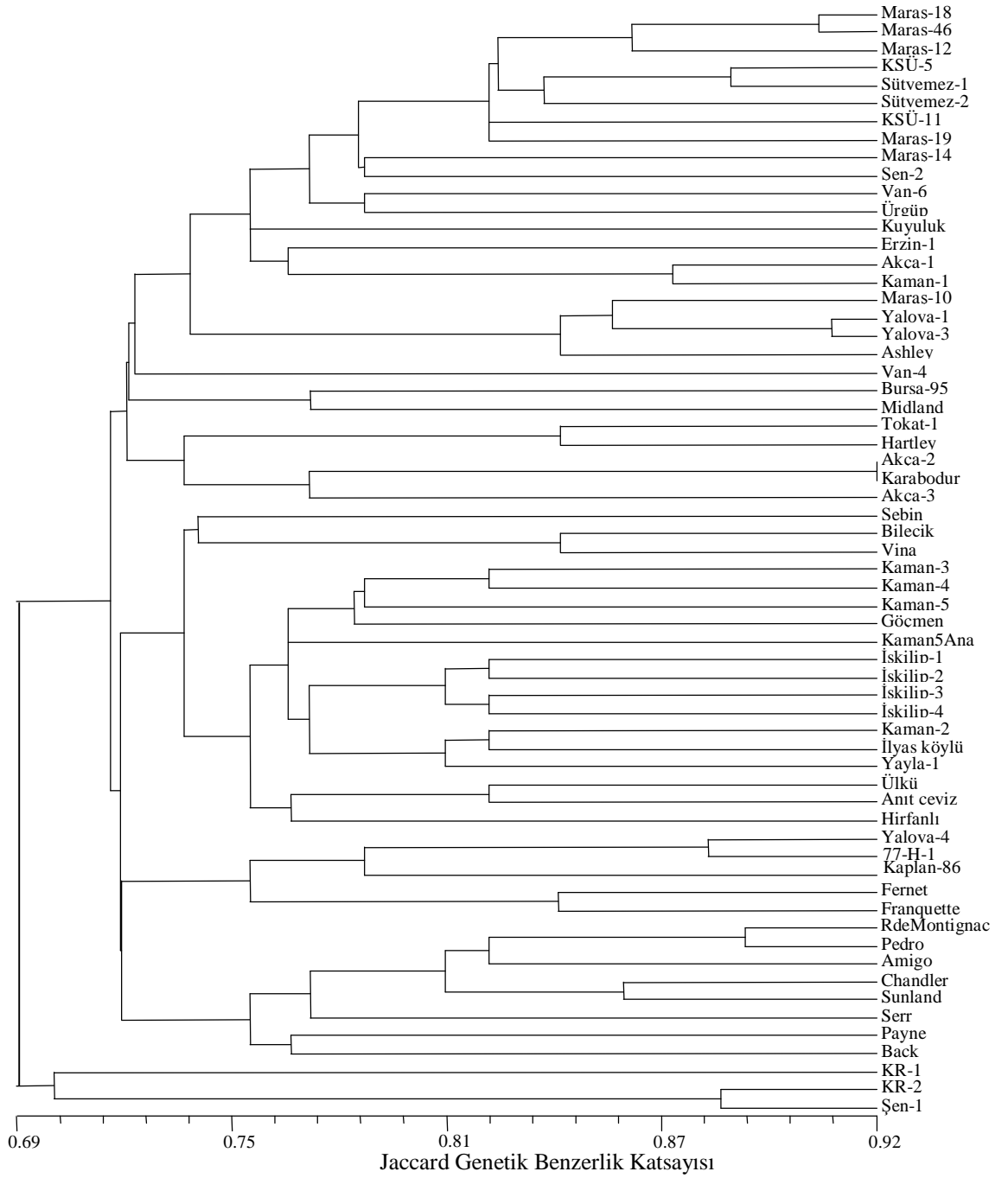
**Kafkas ve ark.'nın (2006)** antepfıstığında yaptıkları çalışmada, toplam bant, polimorfik bant, polimorfizm oranı, ayırma gücü, polimorfizm bilgi içeriği gibi özellikler bakımından RAPD ve ISSR teknikleri karşılaştırılmışlardır ve elde edilen bulgularda, incelenen özellikler bakımından bu tekniklerin birbirlerine benzer oldukları bulunmuştur. Bu çalışmada da benzer bir sonuç elde edilmiştir.

#### **4.2.3.2. Ceviz Genotipleri Arasındaki Genetik İlişkilerin RAPD ve ISSR Verilerinin Birlikte Değerlendirilmesi ile Belirlenmesi**

RAPD ve ISSR verilerinin birlikte istatistiksel olarak değerlendirilmesi sonucu elde edilen genetik benzerlik indeksi 0,65–0,93 arasında değişim göstermiştir. Tüm ceviz genotipleri arasındaki genetik benzerlik katsayıları **Ek 3'**de verilmiştir.

Genel olarak 62 genotip içerisinde en yakın bulunan genotipler; Akça–2 ile Karabodur (0.93), daha sonra sırası ile Yalova–1 ile Yalova–3 (0.92), Maraş–18 ile Maraş–46 (0.91), Ronde de Montignac ile Pedro (0.89), KSÜ–5 ile Sütyemez–1 (0.89), KR–2 ile Şen–1 (0.88), Akça–1 ile Kaman–1 (0.87), Maraş–10 ile Yalova–3 (0.87), Yalova–4 ile 77–H–1 (0.88), Maraş–10 ile Ashley (0.87), Maraş–12 ile Sütyemez–2 (0.86) gelmişlerdir.

En uzak genotipler ise sırasıyla, KR–1 ile Sunland (0.65), Yalova–1 ile KR–2 (0.66), Yalova–4 ile Akça–3 (0.66), Şen–1 ile Van–6 (0.67), Şen–1 ile Akça–3, Şen–1 ile Kaman–3 (0.68), Van–4 ile Akça–3 (0.68), Van–4 ile İskilip–3 (0.70), Van–4 ile Akça–2 (0.71), Van–6 ile Bursa–95 (0.76), Ürgüp ile Kuyuluk (0.77), Akça–1 ile İskilip–2 (0.79) oldukları saptanmıştır.



**Şekil 4.5.** 62 ceviz genotipine RAPD ve ISSR tekniklerinin bir arada uygulanması sonucu elde edilen soyağacı

RAPD ve ISSR verilerinin birlikte değerlendirilmesi sonucu elde edilen soyağacına (**Şekil 4.5**) göre RAPD ve ISSR sonuçlarının ayrı ayrı değerlendirildiğindeki gibi, yine iki ana grup oluşmuştur: Birinci grubu Türk orijinli genotipler oluştururken, ikinci grubu ise yabancı orijinli çeşitler oluşturmuştur.

Türk orijinli genotiplerin oluşturduğu ana grup içerisinde alt gruplar oluşmuştur. Akça-2 ile Karabodur en yakın (0.93) genotipler olmuştur. Sırası ile yakın ilişki diğer genotipler, Yalova-1 ile Yalova-3 (0.92), Maraş-18 ile Maraş-46 (0.91), KSÜ-5 ile Sütyemez-1 (0.89), Maraş-46 ile Maraş-12 (0.89), Akça-1 ile Kaman-1 (0.87), Maraş-10 ile Yalova-3 (0.87), Yalova-4 ile 77-H-1 (0.88)'dir. Yabancı genotiplerden oluşan grupta ise, Ronde de Montignac ile Pedro (0.89) ve Chandler ile Sunland (0.86) yakın ilişkili genotipler olarak bulunmuştur.

Türk orijinli grupta Adana ilinden alınan Kuyuluk, Erzin-1 genotipleri ile Tokat ve Kırşehir ilinden alınan Akça-1 ve Kaman-1 genotipleri K. Maraş orijinli genotipler içerisinde yer almıştır. Akça-1 ve Kaman-1 genotipleri arasında 0.87 lik benzerlik bulunduğu saptanmıştır.

Yabancı orijinli çeşitlerden Ashley, Midland, Hartley, Vina çeşitleri ise Türk orijinli genotiplerin içerisinde yer almıştır. Ashley ile Maraş-10 (0.87), Tokat-1 ile Hartley (0.85), Bilecik ile Vina (0.84) yakın ilişkili bulunmuştur. Yalova-4, 77-H-1 ve Kaplan-86 ceviz genotiplerinin yabancı çeşitler içerisinde yer aldığı belirlenmiştir.

KR-1, KR-2 ve Şen-1 genotiplerinin ise Türk orijinli ve yabancı orijinli genotiplerin oluşturduğu gruplar dışında yer aldıkları saptanmıştır. Bunlar arasından KR-2 ile Şen-1 genotiplerinin yakın (0.88) ilişkili olduğu belirlenmiştir (**Şekil 4.5**).

**Kafkas ve ark.'nın (2005)** ceviz genotiplerinde AFLP ve SAMPL tekniğini kullanarak yaptıkları bir çalışmada elde ettikleri bulgularda, Maraş-18 ile Maraş-46, KSÜ-5 ile Sütyemez-1, Maraş-12 ile Sütyemez-2 ve Kaman-3 ile Kaman-4 genotiplerini yakın ilişkili bulduklarını bildirmişlerdir. Bu çalışmada ISSR ve RAPD verilerinin birlikte değerlendirilmesi sonucu elde edilen veriler de bu genotipler arasındaki ilişkilerin benzer olduğunu göstermiştir.

#### 4.2.3.3. RAPD ve ISSR Yöntemlerinden Elde Edilen Benzerlik İndeksleri Arasındaki Korelasyon

ISSR, RAPD ve RAPD+ISSR yöntemleri sonucu elde edilen benzerlik indekslerinin arasındaki korelasyonların belirlenmesinde Mantel kofenetik korelasyon testi (Mantel, 1967) kullanılmıştır. Her iki yönteme göre korelasyon katsayıları hesaplanmıştır (Çizelge 4.4).

**Çizelge 4.4.** ISSR, RAPD ve ISSR+RAPD verilerinden elde edilen genetik benzerlik indeksleri arasındaki korelasyonlar

|           | ISSR | RAPD | RAPD+ISSR |
|-----------|------|------|-----------|
| ISSR      | -    | 0.46 | 0.84      |
| RAPD      |      | -    | 0.87      |
| RAPD+ISSR |      |      | -         |

Elde edilen sonuçlara göre, korelasyon katsayıları RAPD ile ISSR tekniği arasında 0.46, RAPD+ISSR teknikleri arasında 0.87 ve RAPD+ISSR ile ISSR arasında ise 0.84 olarak hesaplanmıştır. Böylece RAPD ve ISSR arasında orta seviyede bir korelasyon olduğu belirlenmiştir.

**Patzak (2001)** *Humulus lupulus* bitkisinde yapmış olduğu çalışmada RAPD ile ISSR arasında yüksek korelasyon katsayısı (0.96) elde ettiğini bildirmiştir. **Lanham ve ark. (2000)** *Ribes nigrum* L.'da yaptıkları çalışmada RAPD ve ISSR teknikleri arasındaki korelasyonun çok düşük (0.43) olduğunu bildirmişlerdir. **Virk ve ark. (2000)** ise pirinç (*Oryza sativa*) bitkisinde yaptıkları çalışmalarında RAPD ve ISSR arasında düşük korelasyon (0.22) elde etmişlerdir

**Kafkas ve ark. (2006)** ise antepfıstığına yaptıkları çalışmada RAPD ve ISSR teknikleri arasındaki korelasyon katsayısının 0.73 olarak saptadıklarını bildirmişlerdir. Bu çalışmada saptanan korelasyon katsayıları yukarıda değişik türlerde belirlenen korelasyon katsayıları ile karşılaştırıldığında orta bir değere sahip olduğu sonucuna varılmıştır.

Genomda SSR lokusları arasındaki bölgelerin PCR amplifikasyonunu içeren bir teknik olan ISSR tekniğinin, RAPD yönteminden daha yüksek tekrarlanabilirliğe sahip olduğu araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Moreno ve ark., 1998; Goulao ve ark., 2001; Mattioni ve ark., 2002; Kafkas, 2006). Bu çalışmada da ISSR tekniğinin tekrarlanabilirliğini test amacı ile ISSR primer reaksiyonları 2 defa yinelenmiştir ve araştırma sonuçlarına göre sonuçların aynı olduğu belirlenmiştir.

ISSR tekniğinin RAPD'den daha yüksek polimorfizm sağladığı ve bu özelliği sayesinde benzer moleküler özelliklere sahip genotiplerin karşılaştırılması için daha uygun bir teknik olduğu çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilmektedir (Moreno ve ark., 1998; Nagaoka ve Ogihara 1997). Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar ile polimorfizm bakımından bu tekniklerin benzer olduğu ancak tekrarlanabilirlik bakımından ISSR tekniğinin daha üstün olduğu belirlenmiştir.

#### 4.2.3.4. Elde Edilen Soyağaçları ile Genetik Benzerlik İndeksleri Arasındaki Korelasyon

RAPD, ISSR ve bu iki tekniğin kombinasyonu sonucu elde edilen soyağaçları ile benzerlik indeksleri arasındaki korelasyon Mantel kofenetik korelasyon testi (Mantel, 1967) yapılarak hesaplanmıştır. Elde edilen korelasyon katsayıları Çizelge 4.5'de verilmiştir.

**Çizelge 4.5.** RAPD, ISSR ve RAPD+ISSR verilerinin analizi sonucunda elde edilen soyağaçları ile benzerlik indeksleri arasındaki korelasyonlar

| Benzerlik İndeksi | Soyağacı |      |      |           |
|-------------------|----------|------|------|-----------|
|                   |          | ISSR | RAPD | RAPD+ISSR |
| ISSR              |          | 0.72 |      |           |
| RAPD              |          |      | 0.75 |           |
| RAPD+ISSR         |          |      |      | 0.81      |

Çizelge 4.5'e göre, RAPD'e ait soyağacı ile genetik benzerlik indeksi arasında %75'lik bir korelasyon, ISSR tekniğinden elde edilen soyağacı ile genetik benzerlik indeksi arasında %72'lik bir korelasyon, RAPD ve ISSR tekniklerinin birlikte

değerlendirilmesi sonucu elde edilen soyağacı ile genetik benzerlik indeksi arasında % 81'lik bir korelasyon olduğu belirlenmiştir.

Bu sonuçlara göre, her iki teknikten elde edilen verilerin birleştirilmesi sonucu ortaya çıkan soyağacı, bu tekniklerin ayrı ayrı değerlendirilmesi sonucu elde edilen soyağaçlarına göre 62 ceviz genotipi arasındaki ilişkiyi daha iyi göstermektedir.

**5 SONUÇ ve ÖNERİLER**

Bu araştırmada RAPD ve ISSR moleküler markör teknikleri kullanılarak 62 adet ceviz genotipinin DNA parmak izleri çıkarılmıştır. Ceviz genotipleri RAPD ve ISSR teknikleri ile tanımlanmalarında kullanılacak en uygun (polimorfik) primerler belirlenmiştir. Ayrıca çalışmada analiz edilen ceviz genotipleri arasındaki genetik ilişkiler ortaya çıkarılmıştır. Her iki yöntemden elde edilen veriler ayrı ayrı değerlendirilerek yöntemler karşılaştırılmıştır.

Elde edilen sonuçlar kısaca aşağıda özetlenmiştir:

1. ISSR analizleri sonucunda elde edilen verilere göre; UBC 855 nolu primerin toplam ve polimorfik bant açısından en fazla bantı sağlayan primer olduğu saptanmıştır. UBC 823 nolu primerinin ise en az polimorfik bant üreten ve en düşük polimorfizm oranına sahip primer olduğu belirlenmiştir. UBC 814 nolu primer en fazla toplam bant verirken, UBC 807 ve ISSR 43 nolu primerler en düşük toplam bant üreten primerler olmuştur. UBC 846 nolu primer ise en yüksek polimorfizm oranına sahip primer olarak bulunmuştur. UBC 840 nolu primer en düşük polimorfizm bilgi içeriğine sahip primer iken, UBC 826 nolu primer en yüksek polimorfizm bilgi içeriğine sahip primer olarak belirlenmiştir. UBC 853 nolu primer en düşük ayırma gücüne sahip iken, UBC 858 nolu primer en yüksek ayırma gücüne sahip primer olarak saptanmıştır.
2. ISSR verileri kullanılarak elde edilen soyağacı ve benzerlik indeksi matriksine göre; Türk orijinli genotipler içerisinde şen-1 ile KR-2'nin, yabancı orijinliler içerisinde ise Ronde de Montignac ile Pedro eşitlerinin genetik olarak en yakın akraba oldukları belirlenmiştir. Genel olarak 62 ceviz genotipi değerlendirildiğinde, KR-2 ile Sunland'in, yabancı genotipler grubu içerisinde ise Serr ile Midland genotiplerinin genetik açıdan birbirlerine en uzak genotipler olduğu belirlenmiştir.

3. RAPD analizleri sonucunda primerler değerlendirildiğinde, OPH 06 nolu primer toplam bant bakımından en az bantı üretmiş ve polimorfizm bilgi içeriği açısından ise en az bilgi içeren primer olmuştur. Diğer taraftan bu primerin en yüksek polimorfizm oranına ve ayırma gücüne sahip primer olduğu belirlenmiştir. OPG 10 nolu RAPD primeri ise, toplam bant ve polimorfik bant bakımından en yüksek bant üreten primer olarak saptanmıştır. OPG 18 nolu primer en fazla bant üreten bir diğer primer olarak belirlenmiştir. OPA 02 nolu primer ise en yüksek ayırma gücüne sahip primer olarak bulunmuştur. OPH 08 nolu primer ise, en az polimorfik bant üreten ve en düşük polimorfizm oranına sahip primer olarak saptanmıştır.
4. RAPD analizleri sonucu elde edilen soyağacına ve genetik benzerlik indeksine göre; Akça-2 ile Karabodur genotiplerinin genetik olarak en yakın, Yalova-1 ile KR-2 genotiplerinin ise en uzak genotipler oldukları bulunmuştur. Yabancı orijinli genotipler içerisinde Serr ile Sunland'in genetik olarak en yakın, Hartley ile Amigo'nun en uzak genotipler olduğu belirlenmiştir.
5. Çalışmada kullanılan teknikler karşılaştırıldığında, incelenen özellikler bakımından RAPD tekniğinin ISSR tekniği ile benzer olduğu bulunmuştur. Ancak tekrarlanabilirlik bakımından ISSR tekniğinin daha üstün olduğu belirlenmiştir.

Tüm dünyada yetiştiriciliği yapılan ceviz çeşitleri şans çöğürlerinden veya ıslah programlarından meydana gelmiştir. Bu çeşitlerin karakterize edilmesi ıslahçılar için oldukça önemlidir. Ayrıca çeşitlerin ismine doğru olarak kısa bir süre içerisinde tanımlanması meyvecilikte çok önemlidir. Ancak genetik çeşitliliği karakterize etmek için kullanılan morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal yöntemler oldukça zaman almakta ve çevresel faktörlerden etkilenmektedir. DNA markör teknikleri ile farklı ekolojilerdeki genetik materyallerin karakterize edilmesi sağlanmaktadır.

Dolayısı ile ceviz gen kaynağının içerisinde yer alan genotipler arasında genetik ilişkiyi ve genetik varyasyonu belirleme gen kaynaklarının verimli bir şekilde kullanımını etkileyecek önemli bir konudur. Bu bakımdan ceviz gen kaynağının içerisinde yer alan genotipler arasında genetik ilişkiyi ve genetik varyasyonun belirlenmesi amacı ile yapılan çalışmadan elde edilen sonuçlara göre, ISSR ve RAPD teknikleri ile yakın akraba ceviz genotiplerinin ayırımı yapılabilmektedir. Ancak bundan sonraki çalışmalarda öteki DNA markör tekniklerinin de (SSR ve SRAP vb) cevizde uygulanmasına ve uygulanmasına devam edilmelidir.

Ceviz genotiplerinin yayılım alanlarının belirlenmesinde, gen kaynaklarının karşılaştırılmasında, ceviz genotiplerinin karakterizasyonunda ve ceviz ıslah programlarında en iyi ebeveynlerin seçilmelerine yardımcı olmak amacı ile bu çalışmadan çıkan sonuçlar kullanılmalıdır.

Ülkemizde ceviz yetiştiriciliğinin en önemli sorunu ismine doğru aşılı ceviz fidanları ile kapama bahçelerinin kurulamamasıdır. Bu nedenle, bu çalışma sonucunda elde edilen ceviz genotiplerine özgü DNA parmak izleri ceviz fidanlarının ismine doğru olup olmadığının belirlenmesinde kullanılabilir.

Bunların ötesinde, cevizde gençlik kısırlığı dönemi uzun olduğu için cevizde moleküler ıslaha geçişin bir an önce sağlanması gerekir. Bu da bundan sonra cevizde ekonomik öneme sahip bazı bitki özellikleri ile ilişkili DNA markörlerinin geliştirilmesine bağlıdır. Bu nedenle, bundan sonra yapılacak ilk çalışmalardan birisi genetik haritalama ve QTL (quantitative trait loci) analizleri olmalıdır.

## KAYNAKLAR

- AKÇA, Y., 2003. Türkiye Ceviz Yetiştiriciliğine Genel Bakış. [http://www.ceviz.gen.tr/yazi 1. htm](http://www.ceviz.gen.tr/yazi1.htm).
- ALETA, N., OLARTE, C., TRUCO, M.J. and ARUS, P., 1990. Identification of Walnut Cultivars by Isozyme Analysis. *Acta Horticulturae*, 284: 91–96.
- ALETA, N., ROVIRA, M, NINOT, A. and ARUS, P., 1993. Inheritance of Four Isozymes in Walnut. *Acta Horticulturae*, 311: 62–67.
- ALTINKUNT, A., 2001. Bitki Biyogüvenlik Araştırmaları Eğitim Programı. TÜBİTAK, Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü, Kurs Notları (Yayınlanmamış).
- ARCADE, A., ANSELIN, F., FAIVRE RAMPANT, P., LESAGE, M.C., PAQUES, L.E. and PRAT, D., 2000. Application of AFLP, RAPD ve ISSR Markers to Genetic Mapping of European and Japanese Larch. *Theoretical and Applied Genetics*, 100: 299–307.
- ARULSEKAR, S., PARFITT, D.E. and MCGRANAHAN, G.H., 1985. Isozyme Gene Markers in *Juglans* Species Inheritance of GPI and AAT in *J. regia* and *J.hindsii*. *The Journal of Heredity*, 76: 103–106.
- ARUSELKAR, S., McGRANAHAN, G.H. and PARFITT, D.E., 1986. Inheritance of Phosphoglucomutase and Esterase Isozymes in Persian Walnut. *The Journal of Heredity*, 77: 220–221.
- AWASTHI, A. K., NAGARAJA G.M., NAIK, G. V., KANGINAKUDRU, S., THANGAVELU, K. and NAGARAJU, J. 2004. Genetic Diversity and Relationships in Mulberry (genus *Morus*) as Revealed by RAPD and ISSR Marker Assays. *BMC Genetics*, 5: 1–9.
- BACHMANN, K., 1994. Molecular Markers in Plant Ecology. *The New Phytologist*, 126: 403–418.
- BELAJ A., SATOVIC Z., CIPRIANI G., BALDONI L., TESTOLIN R., RALLO L. and TRUJILLO I., 2003. Comparative Study of The Discriming Capacity of RAPD, AFLP and SSR Markers and of Their Effectiveness in Establishing Genetic Relationships in Olive. *Theoretical and Applied Genetics*, 107(4): 736–744.

- CROUCH, J. H., CROUCH, H. K., CONSTANDH, H., VAN GYSEL, A., BREYNE, P., VAN MONTAGU, M., JARRET, R. L. and ORTIZ, R., 1999. Comparison of PCR-Based Molecular Marker Analyses of *Musa* Breeding Populations. *Molecular Breeding*, 5: 233–44.
- DANGL, S. G., WOESTE, K., ARADHYA, K. M., KOCHMSTEDT, A., SIMON, C., POTTER, D., LESLIE, A. C. and McGRANAHAN, G., 2005. Characterization of 14 Microsatellite Markers for Genetic Analysis and Cultivar Identification of Walnut. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 130(3): 348–354.
- DEVOS, K.M. and GALE, M.D., 1992. The Use of Random Amplified Polymorphic DNA Markers in Wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 83: 567–572.
- DIRLEWANGER, E., COSSON, P., TAVAUD, M., ARANZANA, M.J., POIZAT, C., ZANETTO, A., ARUS, P. and LAIGRET, F., 2002. Development of Microsatellite Markers in Peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] and Their Use in Genetic Diversity Analysis in Peach and Sweet Cherry (*Prunus avium* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 105(1): 127–138.
- DOYLE, J.J. and DOYLE, J.L., 1987. A Rapid Isolation Procedure for Small Quantities of Fresh Leaf Tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19: 11–15.
- FAOSTAT, 2005. FAO web page. (<http://www.fao.org>).
- FJELLSTROM, R.G. and PARFITT, D.E., 1994a. Walnut (*Juglans* spp.) Genetic Diversity Determined by Restriction Fragment Length Polymorphisms. *Genome*, 37: 690-700.
- FJELLSTROM, R.G. and PARFITT, D.E., 1994b. RFLP Inheritance and Linkage in Walnut. *Theoretical and Applied Genetics*, 89: 665–670.
- FJELLSTROM, R.G., PARFITT, D.E. and McGRANAHAN, G.H., 1994. Genetic Relationships and Characterization of Persian Walnut (*J. regia* L.) Cultivars Using Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLPs). *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 119(4): 833–839.
- FJELLSTROM, R.G. and PARFITT, D.E., 1995. Phylogenetic Analysis and Evolution of Genus *Juglans* (Juglandaceae) as Determined from Nuclear Genome RFLPs. *Plant Systematics and Evolution*, 197: 19–32.

- FORNARI, B., MALVOLTI, M.E., TAURCHINI, D. and FINESCHI, S., 2001. Isozyme and Organellar DNA Analysis of Genetic Diversity in Natural/Naturalised European and Asiatic Walnut (*Juglans regia* L.) Populations. *Acta Horticulturae*, 544: 167–178.
- FORONI, I., RAO, R., WOESTE, K. and GALLITELLI, M., 2005. Characterisation of *Juglans regia* L. with SSR Markers and Evaluation of Genetic Relationships Among Cultivars and The ‘Sorrento’ Landrace. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 80(1): 49–53.
- GERMAIN, E., HANGUIER, I. and MONET, R., 1993. Identification of Eight *Juglans* spp. and Their Interspecific Hybrids by Isoenzymatic Electrophoresis. *Acta Horticulturae*, 311: 73–85.
- GOULÃO L., CABRITA L., OLIVERIA C.M. and LEITAO J.M., 2001. Comparing RAPD and AFLP (™) Analysis in Discrimination and Estimation of Genetic Similarities among Apple (*Malus domestica* Borkh.) Cultivars–RAPD and AFLP Analysis of Apples. *Euphytica*, 119(3), 259–270.
- GOULAO, L., VALDIVIESSO, T., SANTANA C. AND OLIVEIRA, C.M., 2001. Comparison Between Phenetic Characterisation Using RAPD and ISSR Markers And Phenotypic Data Of Cultivated Chestnut (*Castanea Sativa* Mill.). *Genetic Resources and Crop Evolution*, 48: 329–338.
- HORMAZA , J. I., 2002. Molecular Characterization and Similarity Relationships among Apricot (*Prunus armeniaca* L.) Genotypes Using Simple Sequence Repeats. *Theoretical and Applied Genetics*, 104: 321–328.
- JONES, C. J., EDWARDS, K. J., CASTAGLIONE, S., WINFIELD, M. O., SALA, F., VAN DE WIEL, C., BREDEMEIJER, G., VOSMAN, B., MATTHES, M., DALY, A., BRETTSCHNEIDER, R., BETTINI, P., BUIATTI, M., MAESTRI, E., MALCEVSCHI, A., MARMIROLI, N., AERT, R., VOLCKAERT, G., RUEDA, J., LINACERO, R., VAZQUEZ, A. and KARP, A., 1997. Reproducibility Testing of RAPD, AFLP and SSR Markers in Plants by a Network of European Laboratories. *Molecular Breeding*, 3: 381–90.
- KAFKAS, S., ÖZKAN, H., SÜTYEMEZ, M., 2005. DNA Polymorphism and Assessment of Genetic Relationships in Walnut Genotypes Based on AFLP and

- SAMPL Markers. Journal of the American Society for Horticultural Science, 130(4): 585–590.
- KAFKAS, S., ÖZKAN, H., AK, B.E. AÇAR, İ., ATLI, H. S. and KOYUNCU, S., 2006. Detecting DNA Polymorfism and Genetic Diversity in A Wide Pistachio Germplasm: Comparison of AFLP, ISSR and RAPD Markers. Journal of the American Society for Horticultural Science, 131(4): 522–529.
- KAFKAS, S., 2006. DNA Markörleri ve Bitki Islahında Kullanımı Kursu, 19-20 Ocak 2006. Kurs notu (Yayınlanmamış).
- KAZAN, K., MANNERS, J.M. and CAMERON, D.F., 1993. Inheritance of Random Amplified Polymorphic DNA Markers in An Intrespecific Cross in The Genus *Stylosanthes*. Genome, 36: 506–509.
- KLEIN–LANKHORST, R.M., VERMUNT A., WEIDE, R., LIHARSKA, T. And ZABEL, P., 1991. Isolation of Molecular Markers for Tomato (*L. esculentum*) Using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD). Theoretical and Applied Genetics, 83: 108–114.
- KWON, Y.S., RYU, T.H., KIM C.H., SONG, I.H. and KIM, K.M., 2004. A Comparative Study of The RAPD and SSR Markers in Establishing a Genetic Relationship of The Various Types of *Cucurbita*. Korean Journal of Genetics, 26 (2): 115–122.
- LANHAM, P.G., KORYCINSKA, A. and BRENNAN, R.M., 2000. Genetic Diversity within a Secondary Gene Pool for *Ribes nigrum* L. Revealed by RAPD and ISSR Markers. Journal of Horticultural Science & Biotechnology, 75: 371–375.
- LIN, J.J., KUO, J., MA, J., SAUNDERS, J.A., BEARD, H.S., MACDONALD, M.H., KENWORTHY, W., LDE, G.N. and MATHEWS, B.L., 1996. Identification of Molecular Markers in Soybean: Comparing RFLP, RAPD and AFLP DNA Mapping Techniques. Plant Mol. Biol. Rep., 14: 156-169.
- MALVOLTI, M.E., PACIUCCI, M., CANNATA, F. and FINESCHI, S., 1993. Genetic Variation in Italian Populations of *Juglans regia* L. Acta Horticulturae, 311: 86-94.

- MALVOLTI, M.E., SPADA, M., BERITOGNOLO, I. and CANNATA F., 1997. Differentiation of Walnut Hybrids (*Juglans nigra* L. x *Juglans regia* L.) through RAPD Markers. *Acta Horticulturae*, 462: 43–52
- MALVOLTI, M.E., FORNARI, B., MACCAGLIA E. and CANNATA, F., 2001. Genetic Linkage Mapping in An Intraspecific Cross of Walnut (*Juglans regia* L.) Using Molecular Markers. *Acta Horticulturae*, 544: 179–185.
- MANNING , W. E., 1978. The Classification within The Juglandaceae. *Ann. Mo. Bot. Gard.*, 65: 1058–1087.
- MANTEL, N., 1967. The Detection of Disease Clustering and Generalized Regression Approach. *Cancer Res.*, 27: 209–220.
- MARTINEZ–GOMEZ, P, ARULSEKAR S, POTTER D and GRADZIEL TM., 2003. An Extended Interspecific Gene Pool Available to Peach and Almond Breeding As Characterized Using Simple Sequence Repeat (SSR) Markers. *Euphytica*, 131(3): 313–322.
- MATTIONI, C., CASASOLI, M., GONZALEZ, M., IPINZA, R. and VILLANI, F. 2002. Comparison of ISSR and RAPD Markers to Characterize Three Chilean *Nohofagus* species. *Theoretical and Applied Genetics*, 104: 1064–1070.
- MIGNOUNA HD., ABANG MM. and FAGBEMI SA., 2003. A Comparative Assays (AFLP, RAPD and SSR) for White Yam (*Dioscorea rotundata*) Germplasm Characterisation. *Annals of Applied Biology*, 142(3): 269–276.
- MILBOURNE, D., MEYER, R., BRADSHAW, J. E., BAIRD, E., BONAR, N., PROVAN, J., POWELL, W and WAUGH, R., 1997. Comparison of PCR-Based Marker Systems for The Analysis of Genetic Relationships in Cultivated Potato. *Molecular Breeding*, 3: 127–36.
- MORENO, S., MARTIN, J.P. and ORTIZ, J.M., 1998. Inter-Simple Sequence Repeats PCR for Characterization of Closely Related Grapvine Germplasm. *Euphytica*, 101:117–125.
- NAGAOKA T. and OGIHARA, Y., 1997. Applicability of Inter-Simple Sequence Repeat Polymorphism in Wheat for Use As DNA Markers in Comparison to RFLP and RAPD Markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 94: 597–602.
- NEWBURY, H.J. and FORD-LLOYD, B.V., 1993. The Use of RAPD for Assessing Variation in Plants. *Plant Growth Regulation*, 12: 43–51.

- NICESE, F. P., HORMAZA , J.I. and MCGRANAHAN, G.H., 1997. Characterization of Walnut (*Juglans regia* L.) Cultivars Using RAPD. III. Int. Walnut Congress. Acta Horticulturae, 442. ISHS 1997, 51–63.
- NICESE, F. P., HORMAZA , J.I. and MCGRANAHAN, G.H., 1998. Molecular Characterization and Genetic Relatedness among Walnut (*Juglans regia* L.) Genotypes Based on RAPD Markers. Euphytica, 101: 199–206
- PALOMBI, M.A. and DAMIANO, C., 2002. Comparison between RAPD and SSR Molecular Markers in Detecting Genetic Variation in Kiwifruit (*Actinidia deliciosa* A. Chev) . Plant Cell Reports, 20(11): 1061–1066.
- PATZAK, J., 2001. Comparison of RAPD, STS, ISSR and AFLP Molecular Methods Used for Assessment of Genetic Diversity in Hop (*Humulus lupulus* L.). Euphytica, 121(1): 9-18.
- PEJIC, I., AJMONE-MARSAN, P., MORGANTE, M., KOZUMPLICK, V., CASTIGLIONI, P., TARMINO, G. and MOTTO, M., 1998. Comparative Analysis of Genetic Similarity among Maize Inbred Lines Detected by RFLPs, RAPDs, SSRs, and AFLPs. Theoretical and Applied Genetics, 97:1248–55.
- POTTER, D., GAO, F., AIELLO, G., LESLIE, C. and McGRANAHAN, G., 2002. Intersimple Sequence Repeat Markers for Fingerprinting and Determining Genetic Relationships of Walnut (*Juglans regia*) Cultivars. Journal of the American Society for Horticultural Science, 127(1):75–81.
- POWELL, W., MORGANTE, M., ANDRE, C., HANAFEY, M., VOGEL, J., TINGEY, S. and RAFALSKI, A., 1996. The Comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) Markers for Germplasm Analysis. Molecular Breeding, 2: 225–38.
- PREVOST, A. and WILKINSON, M. J., 1999. A New System of Comprising PCR Primers Applied to ISSR Fingerprinting of Potato Accessions. Theoretical and Applied Genetics, 98: 107–112.
- RANA, M.K. and BHAT K.V., 2004. A Comparison of AFLP and RAPD Markers for Genetic Diversity and Cultivar Identification in Cotton. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology, 13 (1): 19–24.

- ROHLF, J. F., 2004. NTSYS-pc:2. 11 Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Exeter Software, N. Y.
- RUSSELL, J. R., FULLER, J. D., MACAULAY, M., HATZ, B. G., JAHOOR, A., POWELL, W. and WAUGH, R., 1997. Direct Comparison of Levels of Genetic Variation among Barley Accessions Detected by RFLPs, AFLPs, SSRs and RAPDs. *Theoretical and Applied Genetics*, 95: 714–22.
- SMITH, J.S.C., CHIN, E.C.L., SHU, H., SMITH, O.S., WALL, S.J., SENIOR, M.L., MITCHEL, S.E., KRESORICH, S. and TIEGLE, J., 1997. An Evaluation of The Utility of SSR Loci as Molecular Marker in Maize (*Zea mays*): Comparisons with Data from RFLP and Pedigree. *Theoretical and Applied Genetics*, 95: 163–173.
- SOLAR, A., SMOLE, J. and STAMPAR, F., 1994. Identification of Walnut Cultivars by Polen Isozymes. *Acta Horticulturae*, 311: 95–100.
- ŞEN, S.M., 1986. Ceviz Yetiştiriciliği. Eser Matbaası. Samsun, 229 s.
- TANKSLEY, S.D., 1983. Molecular Markers in Plant Breeding. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 1: 3–8
- TANKSLEY, S.D., YOUNG, N.D., PATERSON, A.H. and BONIERBALE, M.W., 1989. RFLP Mapping in Plant Breeding, New Tools for an Old Science. *Biotechnology*, 7: 257–264.
- TEMİZKAN, G. ve ARDA, N., 2004. Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. Nobel Matbaacılık, İstanbul 345s.
- VIRK, P.S., ZHU, J., NEWBURY, H.J., BRYAN, G.J., JACKSON M.T. and FORD-LLOYD, B.V., 2000. Effectiveness of different classes of molecular marker for classifying and revealing variation in rice (*Oryza sativa*) germplasm. *Euphytica*, 112: 275–284.
- VOS, P., HOGERS, L., BLEEKER, M., VAN DE LEE, T., HORNES, M., FRIJTERS, A., POT, J., PELEMAN, J., KUIPER, M. and ZABEAU, M., 1995. AFLP: A New Technique for DNA Fingerprinting. *Nucleic Acids Res.*, 23: 4407–4414.
- VYAS, D., SHARMA, S.K. and SHARMA, D.R., 2003. Genetic Structure of Walnut Genotype Using Leaf Isozymes as Variability Measure. *Scientia Horticulturae*, 97: 141–152.

- WILLIAMS, J.G.K., KUBELIK, A.R., LIVAK, K.J., RAFALSKI, J.A. and TINGEY, S.V., 1990. DNA Polymorphism Amplified by Arbitrary Primers are Useful as Genetic Markers. *Nucleic Acids Res.*, 18(22): 6531-6535.
- WILLIAMS, J.G.K., HANAFEY, M.K., RAFALSKI, J.A. and TINGEY, S.V., 1993. Genetic Analysis Using Random Amplified Polymorphic DNA Markers. *Methods in Enzymology*, 218: 704–740.
- WILLIAMS, C.E. and St CLAIR, D.A., 1993. Phenetic relationships and levels of variability detected by restriction fragment length polymorphism and random amplified polymorphic DNA analysis of cultivated and wild accessions of *Lycopersicon esculentum*. *Genome*, 36: 619–630.
- WOESTE, K., MCGRANAHAN, G.H. and BERNATZKY, R., 1996. Randomly Amplified Polymorphic DNA Loci from A Walnut Backcross [ (*Juglans hindsii* x *Juglans regia*) x *Juglans regia* ] . *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 121(3): 358- 361.
- WOESTE, K., BURNS, R., RHODES, O. and MICHLER, C., 2002. Thirty Polymorphic Nuclear Microsatellite Loci from Black Walnut. *The Journal of Heredity*, 93(1): 58–60.
- YANG, X. and QURIOS, C. 1993. Identification and Classification of Celery Cultivars with RAPD Markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 86: 205–212.
- YU, K. and PAULS, K.P., 1993. Rapid Estimation Of Genetic Relatedness Among Heterogeneous Populations of Alfaalfa by Random Amplification of Bulked Genomic DNA Samples. *Theoretical and Applied Genetics*, 86: 778–794.
- ZIETKIEWICZ, EWA, RAFALSKI ANTONI and DAMIAN LABUDA, 1994. Genome Fingerprinting by Simple Sequence Repeat (SSR)- Anchored Polymerase Chain Reaction Amplification . *Genomics*, 20(2): 176–183.

## **ÖZGEÇMİŞ**

1980 yılında Adana'da doğdum. İlk ve orta öğrenimimi Adana'da tamamladım. Lise eğitimimi 1994–1997 yılları arasında Tarsus'ta tamamladım. 1998 yılında Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü'nde lisansımı yapmaya hak kazandım. 2002 yılında Ziraat Mühendisi olarak aynı bölümden mezun oldum. Aynı yıl Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Ana Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitimime başladım ve halen devam etmekteyim.





