

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Sıdıka Nezihe ZALOĞLU

**ANTEPFISTIĞINDA MİKROSATELLİT PRİMERLERİN
GELİŞTİRİLMESİ VE DİĞER *PISTACIA* TÜRLERİNDE KULLANILMA
DURUMLARININ BELİRLENMESİ**

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

ADANA, 2008

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ANTEPFISTIĞINDA MİKROSATELLİT PRİMERLERİN GELİŞTİRİLMESİ
VE DİĞER *PISTACIA* TÜRLERİNDE KULLANILMA DURUMLARININ
BELİRLENMESİ**

Sıdıka Nezihe ZALOĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

Bu tez/...../ 2008 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Oy Birliği/Oy Çokluğu ile Kabul Edilmiştir.

İmza.....	İmza.....	İmza.....
Prof. Dr.Salih KAFKAS	Prof. Dr. Bekir Erol AK	Doç. Dr. Hakan ÖZKAN
DANIŞMAN	ÜYE	ÜYE

Bu Tez Enstitümüz Biyoteknoloji Anabilim Dalında Hazırlanmıştır.
Kod No:

Prof. Dr. Aziz ERTUNÇ
Enstitü Müdürü
İmza ve Mühür

Bu çalışma Ç. Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Tarafından ve Devlet Planlama Teşkilatı Tarafından Desteklenmiştir

Proje No: ZF2007YL13 – DPT2006K120320-A06

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANTEPFISTIĞINDA MİKROSATELLİT PRİMERLERİN GELİŞTİRİLMESİ VE DİĞER *PISTACIA* TÜRLERİNDE KULLANILMA DURUMLARININ BELİRLENMESİ

Sıdıka Nezihe ZALOĞLU

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman: Prof. Dr. Salih KAFKAS

Yıl: 2008, Sayfa: 67

Jüri: Prof. Dr. Salih KAFKAS

Prof. Dr. Bekir Erol AK

Doç. Dr. Hakan ÖZKAN

Bu çalışmada Siirt çeşidi DNA'sı kullanılarak 'CA', 'GA', 'AAC' ve 'AAG' motifleri ile zenginleştirilmiş genomik kütüphaneler oluşturulmuştur. Her bir kütüphaneden 57 klon olmak üzere toplam 228 klonun sekansı yapılmıştır. Sekansı yapılan 228 klondan 68 adedinin duplike klonlar olduğu, geriye kalan 160 klondan da 94 adedinin tekrar dizisi içerdiği, bunlardan 5 adedinin ise 2 tekrar dizisi içerdiği saptanmıştır. Böylece 99 tekrar dizisinin bulunduğu bölgeler için primer dizaynı yapılmaya çalışılmış ve sonuçta 84 çift primer dizayn edilmiştir. Sonuç olarak sekansı yapılan 228 klonun %36.8'inin primere dönüştüğü tespit edilmiştir. Bant üretme bakımından test edilen 84 primerden de 59 adet primer çiftinin (%70.2) bant verdiği saptanmıştır. Geliştirilen 59 primer arasından 13 primer çifti 12 *Pistacia* türüne ait olan 46 genotipin karakterizasyonunda kullanılmıştır. Toplam 169 adet allel elde edilmiş ve bunların 165 adedi polimorfik bulunmuştur. Primer başına düşen toplam allel sayısı ortalaması 13.0, primer başına düşen polimorfik allel sayısı ortalaması ise 12.7 olarak bulunmuştur. 13 SSR primerinin ortalama polimorfizm bilgi içeriği (PBI) 0.905, toplam ayırma gücü (AG) ise 5.39 olarak bulunmuştur. *Pistacia* genotipleri arasındaki Jaccard indeksine göre, antepfıstığı genotipleri arasındaki genetik benzerlik indeksi 0.08–0.98 arasında değişmiştir. 46 adet genotip arasında genetik benzerlik açısından birbirine en yakın çeşitlerin Ketengömlek ile Kırmızı (0.98) ve Hacireşo ile Siirt (0.98), en uzak genotiplerin ise PM-0104 ile Uzun (0.08), PM-0104 ile Ashoury (0.08) ve PTX-0292 ile Ashoury (0.08) olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Antepfıstığı, SSR, Mikrosatellit, *Pistacia*.

ABSTRACT

MSc THESIS

DEVELOPMENT OF MICROSATELLITE MARKERS IN PISTACHIO AND THEIR TRANSFERABILITY TO OTHER *PISTACIA* SPECIES

Sıdıka Nezihe ZALOĞLU

DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY
INSTITUTE OF BASIC AND APPLIED SCIENCES
UNIVERSITY OF ÇUKUROVA

Supervisor: Prof. Dr. Salih KAFKAS

Year: 2008, Pages: 67

Jury: Prof. Dr. Salih KAFKAS

Prof. Dr. Bekir Erol AK

Assoc. Prof. Dr. Hakan ÖZKAN

In this study, genomic libraries enriched with the repeats of ‘CA’, ‘GA’, ‘AAC’ and ‘AAG’ were developed by using DNA of pistachio cultivar ‘Siirt’. Selecting 57 clones from each library, a total of 228 clones were sequenced. Sixty-eight of these were duplicates, while 94 contained repeatative sequences and five contained duplicate sequences. Thus, primer development studies were attempted for the regions containing 99 repeatative sequences. Finally, eighty-four primer combinations were successfully designed. Among the sequenced clones, 36.8% of them generated primers. Among 84 primers tested, 59 generated (70.2%) bands. Among 59 primers generated, 13 primers were used to characterize 46 *Pistacia* genotypes belong to the 12 species. A total of 169 alleles were generated of which 165 were polymorphic. Average allele number per primer was 13.0, while average polymorphic allele number per primer was 12.7. Mean polymorphism information content of 13 primers were 0.905, while total resolving power was 5.39. According to Jaccard index between 46 *Pistacia* genotypes changed from 0.08 to 0.98. The closest genotypes were ‘Ketengömlek’ – ‘Kırmızı’ (0.98), and ‘Hacıreşo’- ‘Siirt’ (0.98), while ‘PM-0104’- ‘Uzun’ (0.08), ‘PM-0104’- ‘Ashoury’ (0.08) and ‘PTX-0292’- ‘Ashoury’ (0.08) were the most distant ones.

Key Words: Pistachio, SSR, Microsatellite, *Pistacia*.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez konumun belirlenmesinde ve bu araştırmanın her aşamasında yönlendirici katkıları ve değerli yardımları için Danışman Hocam Sayın Prof. Dr. Salih KAFKAS'a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tezimde kullanmış olduğum bitki materyallerini elde etmeme yardımcı olan Dr. Mallikarjuna ARADHYA'ya, Kaliforniya Davis'de bulunan USDA genetik kaynaklarından sağladığı materyaller için ve Antepfıstığı Araştırma Enstitüsü (Gaziantep) Müdürlüğüne teşekkür ederim.

Tezimin laboratuvar çalışmalarının yürütülmesinde maddi destek sağlayan Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine ve Devlet Planlama Teşkilatına teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmamın her aşamasında yardımlarını esirgemeyen özellikle laboratuvar aşamasında öneri ve deneyimlerinden yararlandığım değerli arkadaşım Ziraat Yüksek Mühendisi Yıldız DOĞAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Öğrenimim boyunca maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen aileme (değerli annem Fazilet ZALOĞLU ve değerli kardeşim Latife ZALOĞLU'na) ve daima yanımda olan arkadaşım Biyolog Murat Talha Köse'ye teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER	SAYFA
ÖZ.....	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	IX
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	X
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	7
2.1. <i>Pistacia</i> Türlerinde Yapılan Filogenetik Araştırmalar.....	7
2.2. <i>Pistacia</i> Türlerinde Yapılan Mikrosatellit Primer Geliştirme ve Kullanma Araştırmaları.....	10
2.3.Diğer Bitki Türlerinde Yapılan Mikrosatellit Primer Geliştirme ve Kullanma Araştırmaları.....	11
3. MATERYAL VE METOD.....	14
3.1. Materyal.....	14
3.2. Metod.....	14
3.2.1. DNA İzolasyonu.....	14
3.2.2. DNA Konsantrasyonun Belirlenmesi.....	16
3.2.3. Mikrosatellit Primer Çiftlerinin Dizayn Edilmesi.....	17
3.2.4.Dizayn Edilen Primer Çiftlerinin Amplifikasyon Bakımından Taranması	18
3.2.5.Dizayn Edilen SSR Primer Çiftlerinin Polimorfizm Bakımından Taranması	19
3.2.6.Geliştirilen SSR Primer Çiftleri Kullanılarak 46 <i>Pistacia</i> Genotipinin Karakterizasyonu	22
3.2.6.1.SSR Karakterizasyon Sonuçlarının Değerlendirilmesi...	22
3.2.6.2.Karakterizasyonda Kullanılan Primer Çiftlerinin Polimorfizm Oranlarının Belirlenmesi.....	22

3.2.6.3.Karakterizasyonda Kullanılan Primer Çiftlerinin Polimorfizm Bilgi İçeriklerinin (PBI) Belirlenmesi.....	22
3.2.6.4. Karakterizasyonda Kullanılan Primer Çiftlerinin Ayırma Güçlerinin Belirlenmesi.....	23
4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	24
4.1.Dört Farklı Motif ile Zenginleştirilmiş Genomik Kütüphanelerdeki Klonlarda Tekrarlı Dizilerin Belirlenmesi ve Primer Dizaynı	24
4.2.Geliştirilen SSR Primerlerinin Amplifikasyon Bakımından Değerlendirilmesi.....	30
4.3.Geliştirilen SSR Primerlerinin <i>P. vera</i> 'da Amplifikasyonu ile Polimorfizm Durumları ve Allel Büyüklükleri.....	31
4.4.Geliştirilen SSR Primerlerinin Yabani <i>Pistacia</i> Türlerindeki Amplifikasyonu ile Polimorfizm Durumları ve Allel Büyüklükleri.....	37
4.5. Geliştirilen SSR Primerlerinin Genel Değerlendirilmesi.....	43
4.6. <i>Pistacia</i> Tür ve <i>P. vera</i> Çeşitlerinin Geliştirilen SSR Primerleri ile Karakterizasyonu.....	47
4.6.1. SSR Primer Çiftlerinin <i>P. vera</i> ve Yabani <i>Pistacia</i> Türlerinde Polimorfizm Durumu ve Ayırma Gücü.....	47
4.6.2. Antepfıstığı Genotiplerinin SSR Yöntemi ile Aralarındaki Genetik İlişkilerinin Belirlenmesi.....	51
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	57
KAYNAKLAR.....	60
ÖZGEÇMİŞ.....	66
EKLER.....	67

ÇİZELGELER DİZİNİ	SAYFA
Çizelge 3.1 Denemede kullanılan antepfıstığı çeşitleri ve <i>Pistacia</i> türleri	15
Çizelge 3.2 SSR–PCR reaksiyonunda kullanılan kimyasallar ve konsantrasyonları.....	18
Çizelge 3.3 Antepfıstığında SSR tekniğinin uygulanmasında PCR sıcaklık ve döngü koşulları	18
Çizelge 3.4 Agaroz jelde kullanılan antepfıstığı (<i>P. vera</i>) çeşitleri ve <i>P. atlantica</i> genotipi.....	19
Çizelge 3.5 ABI genetik analizör cihazında taramada kullanılan <i>Pistacia vera</i> çeşitleri.....	20
Çizelge 3.6 ABI genetik analizör cihazında taramada kullanılan yabancı <i>Pistacia</i> türleri.....	20
Çizelge 3.7 ABI 3130xl genetik analizör cihazında elektroforez edilen örneklerde SSR analizi için kullanılan PCR döngü koşulları.....	21
Çizelge 4.1 ‘CA’ tekrar dizisi ile zenginleştirilmiş kütüphanede elde edilen tekrarlar ve primer dizaynları.....	25
Çizelge 4.2 ‘GA’ tekrar dizisi ile zenginleştirilmiş kütüphanede elde edilen tekrarlar ve primer dizaynları.....	26
Çizelge 4.3 ‘AAC’ tekrar dizisi ile zenginleştirilmiş kütüphanede elde edilen tekrarlar ve primer dizaynları.....	28
Çizelge 4.4 ‘AAG’ tekrar dizisi ile zenginleştirilmiş kütüphanede elde edilen tekrarlar ve primer dizaynları.....	29
Çizelge 4.5 ‘CA’ tekrarı ile zenginleştirilmiş kütüphaneden geliştirilen 15 adet SSR primerinin <i>P. vera</i> ’da allel büyüklükleri, sayıları ve polimorfizm durumları	33
Çizelge 4.6 ‘GA’ tekrarı ile zenginleştirilmiş kütüphaneden geliştirilen 17 adet SSR primerinin <i>P. vera</i> ’da allel büyüklükleri, sayıları ve polimorfizm durumları	34

Çizelge 4.7	‘AAC’ tekrarı ile zenginleştirilmiş kütüphaneden geliştirilen 9 adet SSR primerinin <i>P. vera</i> ’da allel büyüklükleri, sayıları ve polimorfizm durumları.....	35
Çizelge 4.8	‘AAG’ tekrarları ile zenginleştirilmiş kütüphaneden geliştirilen 18 adet SSR primerinin <i>P. vera</i> ’da allel büyüklükleri, sayıları ve polimorfizm durumları.....	36
Çizelge 4.9	‘CA’ tekrarı ile zenginleştirilmiş kütüphaneden elde edilen 15 adet SSR primer çiftinin yabani <i>Pistacia</i> türlerindeki polimorfizm durumları ve allel büyüklükleri.....	38
Çizelge 4.10	‘GA’ tekrarı ile zenginleştirilmiş kütüphaneden elde edilen 17 adet SSR primer çiftinin yabani <i>Pistacia</i> türlerindeki polimorfizm durumları ve allel büyüklükleri	40
Çizelge 4.11	‘AAC’ tekrarı ile zenginleştirilmiş kütüphaneden elde edilen 9 adet SSR primer çiftinin yabani <i>Pistacia</i> türlerindeki polimorfizm durumları ve allel büyüklükleri .	41
Çizelge 4.12	‘AAG’ tekrarı ile zenginleştirilmiş kütüphaneden elde edilen 18 adet SSR primer çiftinin yabani <i>Pistacia</i> türlerindeki polimorfizm durumları ve allel büyüklükleri .	42
Çizelge 4.13	‘CA’, ‘GA’, ‘AAC’ ve ‘AAG’ tekrarları ile zenginleştirilmiş kütüphanelerden kullanılan 59 adet SSR primer çiftinin <i>Pistacia</i> türlerinden ve <i>P. vera</i> çeşitlerinden elde edilen tahmini bant büyüklükleri, allel aralığı, allel sayısı, markör tipi ve markör kalitesi.....	45
Çizelge 4.14	SSR primer çiftlerinin <i>P. vera</i> ’da, yabani <i>Pistacia</i> türlerinde ve 46 <i>Pistacia</i> genotipindeki toplam allel sayısı ve polimorfik allel sayısı.....	48

Çizelge 4.15	46 <i>Pistacia</i> genotipinin 13 SSR primer çifti ile amplifikasyonu sonucu elde edilen toplam allel sayıları (TAS), polimorfik allel sayıları (PAS), polimorfizm oranı (PO), polimorfizm bilgi içeriği (PBI) ve primerin ayırma gücü (AG) değerleri.....	50
--------------	--	----

ŞEKİLLER DİZİNİ

SAYFA

Şekil 3.1	<i>Pistacia</i> tür ve antepfıstığı çeşitlerinin DNA miktarının 5 ng'a ayarlanması ile ilgili hazırlanan jelin görüntüsü.....	17
Şekil 4.1	İki tekrar dizisi içeren CUPVA104 klonuna ait baz dizilimi.....	24
Şekil 4.2	Sekiz genotipte tarama amaçlı SSR PCR ürünlerinin %3'lük agaroz jelde yürütülmesi sonucunda elde edilen görüntü.....	30
Şekil 4.3	CUPVB009 lokusunun ABI 3130xl genetik analizör cihazında elektroforezinin yapılması sonucunda elde edilen elektroferogramdan bir görüntü.....	32
Şekil 4.4	CUPVC102 lokusunun ABI 3130xl genetik analizör cihazında elektroforezinin yapılması sonucunda elde edilen elektroferogram görüntüsü.....	37
Şekil 4.5	12 <i>Pistacia</i> türüne ait 46 çeşit ve genotipin 13 SSR primeri ile amplifikasyonu sonucu elde edilen soyağacı	53
Şekil 4.6	<i>Pistacia</i> genotipleri arasındaki genetik benzerlik ortalamalarının hesaplanması sonucu oluşturulan 12 <i>Pistacia</i> türüne ait dendrogram.....	56

SİMGELER ve KISALTMALAR

AFLP	: Amplified Fragment Length Polymorphism
AG	: Ayırma Gücü
bç	: Baz çifti
CTAB	: Setil Trimetil amonyum bromit
dk	: Dakika
dATP	: deoksi adenozin trifosfat
dCTP	: deoksi sitidin trifosfat
dGTP	: deoksi guanozin trifosfat
dTTP	: deoksi timidin trifosfat
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EDTA	: Etilendiamin tetraasetikasit
HCl	: Hidroklorik asit
ISSR	: Inter Simple Sequence Repeat
M	: Molar
MA	: Moleküler ağırlık
MgCl ₂	: Magnezyum klorür
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
NaCl	: Sodyum klorür
Na ₂ S ₂ O ₅	: Sodyum metabisülfid
ng	: Nanogram
PBI	: Polimorfizm Bilgi İçeriği
PAS	: Polimorfik Allel Sayısı
TBB	: Tahmini Bant Büyüklüğü
TAS	: Toplam Allel Sayısı
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PO	: Polimorfizm oranı
PVP	: Polivinilpirolidon
RAPD	: Randomly Amplified Polymorphic DNA

rpm	: Revolutions per minute
SSR	: Simple Sequence Repeat
Taq	: <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	: Tris/borik asit/EDTA tampon çözeltisi
Tris-HCl	: Tris hidroklorür
UPGMA	: Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average
UV	: Ultraviolet
μ M	: Mikromolar
μ l	: Mikrolitre
λ DNA	: Lamda deoksiribonükleik asit
gr	: Gram
mg	: Miligram
cDNA	: Complementary DNA
ABI	: Applied Biosystems
DİE	: Devlet İstatistik Enstitüsü
Zoh.	: Zohary
PAUP	: Phylogenetic Analysis Using Parsimony
C	: Cytosin
G	: Guanin
A	: Adenin
T	: Timin
USDA	: United States Division of Agriculture
sn	: Saniye
6-FAM	: 6-Carboxyfluorescein
LIZ	: Size standart
NTSYSpc	: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System
F	: Forward primer
R	: Revers primer
MA	: Moleküler Ağırlık
RFLP	: Restriction Fragment Length Polymorphism
SRAP	: Sequence Related Amplified Polymorphism

1. GİRİŞ

Antepfıstığının (*Pistacia vera* L.) ilk olarak Etiler döneminde Güney Anadolu'da kültüre alınıp yetiştirildiği ve Kral sofralarına girecek kadar kaliteli kültür çeşitlerinin üretildiği bilinmektedir. Antepfıstığı, Miladi I.yy'da Roma'ya oradan İspanya'ya daha sonrada Fransa'ya yayılmıştır. Antepfıstığının Amerika'ya geçişi ise, 1853–1854 yıllarına rastlamaktadır (**Anonim, 2001**).

Antepfıstığı (*Pistacia vera* L.) *Pistacia* cinsi içerisinde yer alan, ticari değere sahip olan, kuruyemiş olarak alınıp satılan ve meyveleri yenen tek türdür. Antepfıstığının iki anavatanı vardır. Birisi; Anadolu, Kafkasya, İran ve Türkmenistan'ın yüksek kısımlarını içine alan Yakın Doğu gen merkezi, diğeri ise Orta Asya gen merkezidir. Antepfıstığının kültür formlarının gen merkezinin ise Anadolu, İran, Suriye Afganistan ve Filistin olduğu bildirilmektedir. Antepfıstığı günümüzde, 30–45 güney-kuzey paralelleri arasında ve genellikle kuzey yarım kürede, iklim olarak ifade edilebilen alanlarda yetiştirilmektedir (**Tunalıoğlu, 2003**). Antepfıstığı yetiştiriciliğinin, ekonomik anlamda bu gen merkezleri içinde bulunan Türkiye, İran, Afganistan gibi ülkelerde başladığı ve Etiler döneminde meyve değeri öğrenilen bitkinin kültüre alındığı belirlenmiştir.

Türkiye'nin yaklaşık 56 ilinde antepfıstığı üreticiliği yapılmakla beraber potansiyel üretim Gaziantep, Kahramanmaraş, Adıyaman, Şanlıurfa, Mardin, Diyarbakır ve Siirt gibi illerde yoğunlaşmaktadır.

1995 yılı verilerine göre (**DiE, 1995**) Türkiye antepfıstığı ağaç sayısı 42,7 milyondur. Türkiye'de yaygın olarak yetiştirilen çeşitler Siirt, Kırmızı, Uzun, Halebi ve Ohadi çeşitleridir. Bunlardan Uzun, Kırmızı ve Halebi olarak tabir edilen çeşitleri uzun daneli, iç renginin koyu yeşil olması ve olağanüstü tat ve aromasından dolayı özellikle tatlı ve pasta yapımı ile çikolata ve şekerleme sanayisinde tercih edilmektedir. Diğer Siirt ve Ohadi çeşitlerinin ise, çıtlaklık oranları yüksek, yuvarlak daneli ve iri olması nedeniyle, özellikle çerezlik olarak tercih edilmesine neden olmaktadır (**Anonim, 2001**).

Antepfıstığı dioik bir meyve türüdür. Erkek ve dişi çiçekleri ayrı ayrı ağaçlar üzerinde bulunur ve tozlanma rüzgârla olur. Öteki sert kabuklu meyvelerde olduğu

gibi antepfıstığında da meyvenin yenilen kısmı tohumu olduğundan, meyve eldesi için tozlanma ve dölleme zorunludur. Döllemeyen çiçekler dökülür veya bunlardan içi boş (fıs) meyveler meydana gelir, dolayısıyla verim doğrudan etkilenir. Antepfıstığında çiçeklenme zamanının bilinmesi ve bu zamandaki hakim rüzgarın yönün tozlanma için çok önemlidir. Erkek ağaçların bahçeye yerleştirilmesinde hakim rüzgarların esme yönü de dikkate alınmalıdır.

Antepfıstığı periyodisite (ağacın bir yıl ürün vermesi bir yıl daha az vermesi ya da hiç vermemesi) eğilimi olan bir türdür. Antepfıstığı lezzetli ve besin elementlerince oldukça zengin bir meyvedir. 100 gram antepfıstığı 594 kalori, 20.8 g protein, 51.6 g yağ ve 16.4 g karbonhidrat ve 0 kolesterol içermektedir. Ayrıca 100 gramında, 500 mg fosfor, 1020 mg potasyum, 136 mg kalsiyum, 158 mg magnezyum, 7.3 mg demir, 5.2 mg vitamin E, 7 mg vitamin C, 0.62 mg vitamin B1, 0.20 mg B2 ve 1.45 mg nikotinamide bulunmaktadır **(Tunalıoğlu, 2003)**.

Antepfıstığı meyvesi fındık, badem ve yarfıstığı gibi yağlı meyvelerle karşılaştırıldığında protein, karbonhidrat ve kalori değeri olarak birinci, yağ oranı açısından ise fındıktan sonra ikinci sırayı almaktadır. Besleyici özelliğinin yanı sıra sadece çerez olarak değil şeker ve şekerli ürünler sanayinde de (dondurma ve baklava) hammadde olarak kullanılmaktadır. Antepfıstığının kandaki kolesterol düzeyini düşürerek, kronik kalp hastalığı riskini azaltıcı, kan şekerinin yükselmesini önleyici ve de insan vücuduna olumlu etkilerinin olduğu ifade edilmektedir **(Tunalıoğlu, 2003)**.

Pistacia cinsi 11 veya daha fazla türün dahil olduğu Anacardiaceae familyasının bir üyesidir **(Kafkas, 2006a)**. Türkiye’de yaklaşık 66 milyon yabani *Pistacia* ağacı bulunmaktadır **(Kuru ve Özabuncuoğlu, 1990)**. Türkiye’de en fazla rastlanılan başlıca yabani *Pistacia* türleri; *P. terebinthus*, *P. eurycarpa*, *P. khinjuk*, *P. palaestina*, *P. atlantica* ve *P. lentiscus*’dur **(Kafkas, 2006a)**.

Bitkiler arasındaki genetik varyasyonların belirlenmesinde ve bunların sınıflandırılmasında öncelikle morfolojik, fizyolojik ve sitolojik özellikler kullanılmış, daha sonra ise biyokimyasal markörler geliştirilmiştir. Son zamanlarda ise moleküler seviyede çalışmalar yapılmaktadır **(Scarano ve ark., 2002)**.

Genetik kaynakların karakterizasyonu morfolojik ve genetik olarak yapılabilir. Klasik çekirdek koleksiyonların oluşturulmasında coğrafi ve morfolojik karakterizasyon verilerinden yararlanılmaktadır (**Ford-Loyd, 2001**). Agronomik karakterler genellikle polimorfik yapıda olduğundan çevreden önemli ölçüde etkilenirler. Bu nedenle genetik değişiklikleri izlemenin önemi büyüktür. Genetik karakterizasyonda kullanılan moleküler tekniklerin, çevresel koşullardan etkilenmemesi, analizin bitkinin herhangi bir parçasında ya da büyüme döneminde yapılabilmesi, analiz sayısının zamanla ve materyalle sınırlı olmaması, analizin bitkinin çok küçük örneklerinde yapılabilmesi, DNA analizleri ile stabilitenin en duyarlı biçimde belirlenebilmesi ve cansız örneklerde de karakterizasyonun yapılabilmesi gibi olumlu özelliklerinin yanında; geniş bir genetik tarama için uygun olmaması, sonuçların genomun çok küçük bir bölümünü karakterize etmesi ve agronomik önemi olan genlerin analizinde istenilen düzeye gelinmemiş olunması gibi olumsuz özellikleri de vardır (**Özgen ve ark., 2000**).

Biyoteknolojik karakterizasyon çalışmaları sayesinde aynı materyalin gen bankasına girişi engellenir, genotiplerin tam olarak “parmak izi” oluşturulur, gen bankasında ya da doğal koşullarda genetik çeşitlilik belirlenir ve büyük koleksiyonlarda çeşitliliğin önemli bir kısmını en az örnekle temsil edebilen çekirdek koleksiyonlar oluşturulur (**Dodds ve Watanabe, 1990**).

Moleküler markörler, kaynağını kendilerinin üretildiği bitkilerin hücrelerinde bulunan DNA’lardan alır. Canlıların yapısını belirleyen şifrede DNA zincirlerinde olduğundan moleküler markörler, bitki popülasyonundaki çeşitlilik veya o popülasyon içindeki bitki genotipleri arasındaki ilişkilerin tespitinde %100’e yakın güvenilirlikle değerlendirilirler. Bugün moleküler markörler bitki sistematğinde, ıslahında ve gen kaynaklarının değerlendirilmesinde etkin olarak kullanılmaktadır (**Gülşen ve Mutlu, 2005**).

Tek lokus ile idare edilen morfolojik özellikler, değişik çevre koşullarında ifade edilebildiği sürece genetik markör olarak kullanılabilir. Kodominant morfolojik markörler seleksiyonla genetik tepkiyi önceden bildirirse de çevresel ve genetik (epistasis) faktörlerden etkilenirler (**Staub ve ark., 1996**).

Protein ya da DNA’da bulunan polimorfizme dayanan moleküler markörlerin geliştirilmesi; taksonomi, filojeni, ekoloji, genetik ve bitki ıslahı alanlarında yürütülen çalışmaları büyük oranda kolaylaştırmaktadır. Moleküler markörler genetik kaynaklar içerisindeki çeşitliliğin araştırılmasında, genotipler arasındaki genetik yakınlıkların ortaya çıkarılmasında, çeşitlerin tanımlanmasında, tohum saflığının belirlenmesinde, sistematik çalışmalarında ve genetik kaynak koleksiyonlarının bazı spesifik genler bakımından taranmasında etkin şekilde kullanılmakta olup böylece klasik bitki ıslahı sürecinde karşılaşılan problemlerin çözümüne olanak tanıyarak bitki ıslahçılarına yeni ufuklar açmaktadır (**Kumar, 1999; Levi ve ark., 2001**).

Zorluk, güvenilirlik, maliyet ve bilgi üretme bakımından birbirinden farklı olan PCR’a (Polymerase Chain Reaction) dayalı her bir markör sisteminin (RAPD, AFLP, SSR vs.) avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır (**Lee, 1995; Rafalski ve ark., 1996**).

Bitkilerde genetik ilişkileri ortaya çıkarmak için kullanılan ilk DNA markörü RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) olmuştur. RFLP kodominant moleküler markör tekniği olmasına karşın, bu yöntemin uzun zaman alması, hızlı olmaması ve maliyetinin çok yüksek olması PCR (Polymerase Chain Reaction)’a dayalı moleküler markörlerin gelişmesine neden olmuştur. Bu markörlerin bazıları RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) ve mikrosatellitlerdir (**Tanskley ve ark., 1989**).

Bazı araştırmacılara göre, **Williams ve ark. (1990)** tarafından geliştirilen RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) tekniği maliyeti düşük ve çabuk uygulanabilir olması nedeniyle hızlı bir şekilde yayılmıştır. Ancak markörün dominant özellikte olması, tekniğin tekrarlanabilirliğinin ve güvenilirliğinin diğer tekniklere göre daha düşük olması bu yöntemin dezavantajlarını oluşturmuştur (**Martin ve ark., 2000; Mattioni ve ark., 2002**).

Kolay uygulanabilen, güvenilir ve etkin olan SRAP (Sequence Related Amplified Polymorphism), **Li ve Quiros (2001)** tarafından geliştirilmiş PCR temelli yeni bir markör sistemidir. Genomda kodlanan sekansları hedef alan SRAP tekniği, iki primer amplifikasyonuna dayanmaktadır. Primerler 17–18 nükleotitten meydana

gelmekte ve bunlardan biri forward (ileri), diğeri ise reverse (geri) primer olarak adlandırılmaktadır (**Li ve Quiros, 2001**).

RAPD markörlerine göre daha tutarlı sonuçlar veren, AFLP markörlerine göre de daha ucuz ve az işçilik gerektiren bir markör tekniği olan SRAP; genetik haritaların oluşturulması, gen etiketlenmesi, genomik DNA ve cDNA parmak izinin çıkarılması ve haritaya dayalı klonlama gibi birçok farklı amaca hizmet edebilmektedir (**Li ve Quiros, 2001**).

Zietkiewicz ve ark. (1994) tarafından geliştirilen ISSR (inter-simple sequence repeats) tekniğinde hazır üretilmiş olan 2’li, 3’lü, 4’lü ve 5’li tekrarlanan bazlara sahip primerler kullanılmakta ve elde edilen PCR ürünü agaroz jelde koşularak etidiyum bromit ile boyandıktan sonra belirlenebilmektedir. ISSR’da eşbaskınlık görülmemesi ve her bir primerin DNA’ya yapışma sıcaklığının belirlenmesi bu yöntemin dezavantajıdır.

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 amplifiye olmuş bantların ortaya çıkarılmasında radyoaktif madde veya florasan boyama istemesi bu yöntemin uygulanmasını sınırlamaktadır (**Vos ve ark., 1995**).

Mikrosatellit DNA dizileri ökaryotik genomlar için mükemmel bir polimorfizm kaynağıdır. SSR (Simple Sequence Repeats) polimorfizm seviyesi düşük olan türlerde çeşit tayininde ve genetik haritaların oluşturulmasında son derece etkin bir şekilde kullanılmaktadır (**Staub ve ark., 1996**). SSR tekniğinde polimorfizm oranı yüksek olmasına karşın, primerlerin geliştirilmesi için ön çalışma gerektiğinden maliyetli bir yöntemdir (**Goulao ve ark., 2001**). Ancak öteki PCR’a dayalı tekniklere göre daha fazla bilgi içermesi, kodominant ve kararlı markör sistem olması, tekrarlanabilir ve otomasyona uygun olması, az DNA gerektirmesi, yüksek polimorfizm göstermesi ve bazen çoklu allel vermesinden dolayı çok kullanışlı bir yöntemdir (**Powell ve ark., 1996**). Bu teknikte ortaya çıkacak bantlar arasındaki

mesafe çok yakın olacağından analizde ya radyoaktif madde kullanmak ya da Li-Cor veya ABI gibi genetik analizör cihazlarını kullanmak gerekebilir.

Bu çalışmanın amacı,

- 1) Antepfıstığı (*P. vera*) için mikrosatellit (SSR) primerleri geliştirmek,
- 2) Geliştirilen mikrosatellit primerlerin yabani *Pistacia* türlerindeki kullanılabilirlik durumlarını ortaya koymak ve
- 3) Geliştirilen SSR primerlerini kullanarak 12 *Pistacia* türüne ait toplam 46 *Pistacia* genotipi arasındaki filogenetik ilişkileri incelemektir.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. *Pistacia* Türlerinde Yapılan Filogenetik Araştırmalar

Pistacia cinsinin sınıflandırılma çalışmaları çok az sayıdadır ve mevcut çalışmaların çoğu morfolojik verilere dayanmaktadır. *Pistacia* cinsinde morfolojik verilere dayalı olarak geniş çapta ilk sınıflandırmayı Zohary (1952) yapmıştır. Araştırmacı 11 türün bulunduğu *Pistacia* cinsini 4 temel gruba ayırmıştır:

- 1) Lenticella Zoh.= *P. mexicana*, *P. texana*
- 2) Eu-Lentiscus Zoh.= *P. lentiscus*, *P. weinmannifolia*, *P. saportae*,
- 3) Butmela Zoh.= *P. atlantica*
- 4) Eu-Terebinthus Zoh.= *P. terebinthus*, *P. palaestina*, *P. khinjuk*, *P. vera* ve *P. chinensis*

Araştırmacı ayrıca *P. atlantica*'ya ait 2 çeşit (var. *latifolia*, var. *kurdica*), *P. terbinthus*'a ait 2 çeşit (var. *macrocarpa*, var. *oxycarpa*) ve *P. khinjuk*'a ait 4 çeşit (var. *populifolia* var. *macrocarpa*, var. *glaberrima*, var. *microphylla*) tanımlamıştır.

Yaltırık (1967), Türkiye'deki *Pistacia* türlerini sınıflandırmış ve Zohary'nin *P. atlantica* var. *kurdica* olarak tanımladığı bitkileri *P. eurycarpa* adında yeni bir tür olarak tanımlamıştır. *P. eurycarpa* türünün *P. atlantica* türünden esas olarak yaprak ve meyve özellikleri bakımından farklı olduğunu açıklamıştır. Araştırmacı, *P. palaestina* ve *P. terebinthus* türlerinin morfolojik özelliklerinin çok benzer olduğunu belirtmiş ve bu nedenle bu iki türü *P. terebinthus* türü altında toplamıştır: *P. terebinthus* subsp. *terebinthus*, *P. terebinthus* subsp. *palaestina*.

Parfitt ve Badenes (1997), RFLP tekniği ile kloroplast genom analizine dayalı olarak 10 *Pistacia* tür arasındaki filogenetik sınıflandırmayı yapmışlardır. Sonuç olarak, *Pistacia* cinsini *Lentiscus* (*P. lentiscus*, *P. weinmannifolia*, *P. mexicana*, *P. texana*) ve *Terebinthus* (*P. terebinthus*, *P. palaestina*, *P. vera*, *P. chinensis*, *P. integerrima*, *P. khinjuk*, *P. atlantica*) olmak üzere iki gruba ayırmışlardır. Araştırmacılar, *P. vera* ile *P. khinjuk* ve *P. mexicana* ile *P. texana* türleri arasında farklılık bulamadıkları için aynı tür olabileceklerini hipotez etmişlerdir.

Kafkas ve Perl-Treves (2001), *P. eurycarpa*, *P. vera*, *P. atlantica* ve *P. terebinthus* türlerini morfolojik ve moleküler seviyede tanımlamışlardır. Morfolojik

çalışma sonuçlarına göre, *P. khinjuk* olarak toplanan örneklerin yapılan soyağacı analizinde *P. vera*'ya, *P. atlantica* türüne göre daha yakın olduğunu belirlemişlerdir. Ancak bazı genotiplerde yaprak sapı kanadına rastlanmıştır. Moleküler çalışmada RAPD tekniği kullanılmıştır. 40 yabancı *Pistacia* genotipi ile iki *P. vera* çeşidi bu teknikle analiz edilmiş ve 10 polimorfik RAPD primeri seçilmiştir. Ayrıca bu 10 polimorfik RAPD primeri toplam 138 skorlanabilir bant vermiştir ve 128 bant türler arasında ve türler içinde polimorfik çıkmıştır. Bu moleküler çalışma sonuçlarına göre ise, bu 4 *Pistacia* türü kesin olarak birbirinden ayrılmıştır. Ayrıca yapılan soyağacı analizleri sonucunda, *P. khinjuk* olarak toplanan örneklerin *P. atlantica* türüne, *P. vera*'ya göre daha yakın olduğunu ortaya çıkarmışlardır. Buna göre araştırmacılar morfolojik özellikleri de dikkate aldıklarında bu örneklerin **Yaltırık (1967)**'in tanımladığı gibi *P. eurycarpa* olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar incelenen 4 türe özgü RAPD moleküler markörler bulmuşlardır.

Kafkas ve ark. (2002), 4 *Pistacia* türünü (*P. vera*, *P. eurycarpa*, *P. terebinthus*, *P. atlantica*) morfolojik açıdan incelemişlerdir. Araştırmacılar, türler arası morfolojik değişimlerinin yanı sıra tür içerisindeki morfolojik karakterlerin değişimini de farklı bölgelerden topladıkları örneklerle belirlemişlerdir. Kaliforniya'da çok büyük ağaçlar yaptığı belirtilen *P. terebinthus*'un Türkiye'de çalı formunda olduğunu, ağaç, meyve ve yaprak özellikleri açısından geniş bir çeşitliliğe sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca *P. eurycarpa* türünü morfolojik açıdan ayrıntılı olarak tanımlamışlardır. *Pistacia* cinsinde yapılan morfolojik tanımlamalarda büyüme şekli, yaprak büyüklüğü, yaprak sapı kanadı, yaprakçık sayısı, yaprak sapı uzunluğu, sakız kokusu, yaprak rengi, meyve ağırlığı, meyve boyutları ve meyve şekli özelliklerinin oldukça kullanışlı olduğunu belirlemişlerdir.

Kafkas ve Perl-Treves (2002), 9 *Pistacia* türünde RAPD tekniğine dayalı olarak türler arası akrabalıkları incelemişlerdir. RAPD analizinde 20 primer kullanmışlardır. Bu primerlerden toplam 242 fragment çoğaltılmış ve bunların dışında 228 bant türler arası seviyede polimorfik çıkmıştır. PAUP programından elde edilen sonuçlara göre, araştırmacılar *Pistacia* cinsini çalı formundaki (*P. terebinthus*, *P. palaestina*, *P. mexicana* ve *P. lentiscus*) ve büyük ağaç formundaki türler (*P. vera*, *P. khinjuk*, *P. eurycarpa*, *P. atlantica* ve *P. integerrima*) olmak üzere iki temel gruba

ayırmışlardır. *P. terebinthus* ile *P. palaestina* türlerinin birbirlerine çok yakın akraba olduklarını ve bu nedenle *P. palaestina*'nın ayrı bir tür değil, **Yaltırık'ın (1967)** tanımladığı gibi *P. terebinthus*'un alt türü olması gerektiğini vurgulamışlardır.

Kafkas ve ark. (2006a), RAPD, ISSR ve AFLP yöntemlerini kullanarak Türkiye'nin gen kaynaklarında bulunan 69 antepfıstığı çeşidini tanımlamışlar ve bunlar arasındaki genetik ilişkileri belirlemişlerdir. Burada toplam 572 markör elde edilmiş ve bunların ise 307 tanesi polimorfizm göstermiştir. Antepfıstığı çeşit ve genotipleri 2 gruba ayrılmıştır. Birinci grupta İran'dan gelen çeşitler yer alırken, ikinci grupta Siirt grubu, Türk çeşitleri grubu ve Suriye orijinli çeşitler ile Kuzey Afrika ve diğer Akdeniz ülkeleri orijinli çeşitler yer almıştır. İkinci grup ise üç alt gruba ayrılmıştır: birinci alt grup Siirt ve Hacıreşo gruplarından oluşan genotipleri kapsamış (Siirt), ikinci alt grup standart Gaziantep ile Şanlıurfa yöresi çeşitlerini kapsamış, üçüncü alt grup ise Yunanistan, Tunus, İtalya ve Kıbrıs'ta yetiştirilen çeşitler yer almıştır. Ülkemizde yetiştirilen Halebi çeşidinin de bu alt grupta yer aldığı bildirilmiştir. Genetik uzaklığa bakıldığında ise Siirt çeşidinin İran grubu ile Akdeniz ülkeleri orijinli çeşitler arasında yer aldığı belirlenmiştir. Ayrıca üç moleküler markör sisteminde polimorfizm karşılaştırılmış ve sonuçta en iyi yöntemin AFLP olduğu bildirilmiştir. Araştırmacılar RAPD ile ISSR arasında polimorfizm ve bant sayısı yönünden farklılık olmamasına rağmen tekrarlanabilirlik açısından ISSR yönteminin daha üstün olduğunu bildirmişlerdir.

Kafkas ve ark. (2006b), AFLP tekniğini kullanarak 17 yabani antepfıstığı (*P. vera*) ve 3 kültür çeşidinin moleküler karakterizasyonunu yapmışlardır. Materyaller Kunduz ve Takhar bölgelerinden alınmıştır. 8 AFLP primer kombinasyonu kullanılarak toplam 288 AFLP fragmenti elde edilmiştir. Çoğalan fragmentlerin sayısı her primer kombinasyonunda 18-48 arasında çıkmış ve 136 bant ise polimorfik bulunmuştur. Her primer kombinasyonunda polimorfik bantların yüzdesi %26.2 ile %79.2 arasında değişmiştir. UPGMA programından elde edilen verilere göre 17 yabani Afghan antepfıstığı çeşidi bölgelerine göre gruplanmış ve 3 kültür formundan ayrılmıştır. AFLP tekniği yabani *P. vera* materyalinin karakterizasyonu için etkili bulunmuştur.

Kafkas (2006b), AFLP tekniğini kullanarak *Pistacia* cinsinin filogenetik analizini yapmıştır. Bu çalışmada bitki materyali olarak 10 *Pistacia* türüne ait toplam 35 genotip kullanılmıştır. 6 AFLP primer kombinasyonu kullanılarak toplam 275 fragment oluşturulmuş ve polimorfik olan 254 primer çiftinin her biri ortalama 45.8 bant vermiştir. Ortalama farklılık karakteri kullanılarak yapılan UPGMA analizlerine göre; birinci grupta *P. vera*, *P. khinjuk*, *P. eurycarpa*, *P. atlantica*, *P. mutica*, *P. integerrima* ve *P. atlantica* x *P. integerrima* hibridi; ikinci grupta ise *P. palaestina*, *P. terebinthus*, *P. mexicana* ve *P. lentiscus* yer almıştır. Ancak, Jaccard katsayısı kullanılarak yapılan UPGMA analizinde ise, *P. lentiscus* ve *P. mexicana*'dan *P. palaestina* ve *P. terebinthus* ayrılmıştır. *P. atlantica*-*P. mutica* ve *P. terebinthus*-*P. palaestina* çiftleri yakın türlerdir ve bu yüzden *P. mutica*, *P. atlantica* türü altında ve *P. palaestina* ise *P. terebinthus* türü altında sınıflandırılmışlardır. Bu çalışmada PCo analizleri ve dendogram sonuçları *P. terebinthus*'un birinci grupta yer almasından ziyade ayrı bir grup olarak sınıflandırılmasını önermiştir.

2.2. *Pistacia* Türlerinde Yapılan Mikrosatellit Primer Geliştirme ve Kullanma Araştırmaları

Ahmad ve ark. (2003), antepfıstığına SSR primer geliştirmek için Kerman çeşidinin DNA'sını kullanarak genomik kütüphane oluşturmuşlardır. Araştırmacılar CA, CT ve CTT tekrarlarını kullanarak sekanslamaya hazır klonlar elde ettiklerini bildirmişlerdir. CT tekrarları ile zenginleştirilmiş kütüphaneden 89 klonun sekansını yapmışlar ve %64'nün tekrarlanan sıralardan oluştuğunu bildirmişlerdir. CA tekrarları ile zenginleştirilmiş kütüphaneden ise 62 klonun sekansını yapmışlar ve %59'nun tekrarlanan sıra içerdiğini belirtmişlerdir. Araştırmacılar toplam 151 dinükleotit klon içerisinde %44'ünden primer dizaynı yapabilmişlerdir. CTT ile zenginleştirilmiş kütüphaneden 33 klonun sekansının yapıldığı ve %24'ünde ise primer dizaynının yapılabilindiği belirtilmiştir. Ortaya çıkan primer çiftlerinden 25 tanesinin sentezinin yaptırıldığı ve primerlerin değişik orijinli antepfıstığı çeşitlerinde Li-Cor sekanslama ünitesi kullanılarak test edildiği bildirilmiştir. Bu 25 primer çiftinden 14 tanesinin (%56) PCR sonucunda değerlendirilebilir bant ürettiği belirlenmiştir. 14 primer çiftinin ise toplam 46 allel ürettiği ve primer çifti başına

düşen allel sayısının 2 ile 5 arasında değiştiği ayrıca bant büyüklüklerinin de 120 ile 342 bp arasında gözlemlendiği araştırmacılar tarafından bildirilmiştir.

Ahmad ve ark. (2005), SSR ve SRAP tekniklerini *P. atlantica*, *P. integerrima* ve bu türlerin melezi olan farklı PGold II ve UCB1 bitkilerinde Li-Cor sistemini kullanarak uyguladıklarını bildirmiştir. SSR yönteminde 12 primer çifti kullanmışlardır. Bunlardan 10 adet primerin ise polimorfik olduğu belirtilmiştir. Toplam allel sayısının 35 ve lokus başına düşen ortalama allel sayısının ise 2.9 olduğu tespit edilmiştir. SRAP yönteminde ise primer başına düşen allel sayısının 11 ile 38 arasında değiştiği ve primer başına düşen allel ortalamasının 25.2 olduğu bildirilmiştir. Toplam 104 (%51) markörün polimorfik olduğu ve bant büyüklüklerinin ise 80–720 bp arasında olduğu gözlenmiştir.

2.3. Diğer Bitki Türlerinde Yapılan Mikrosatellit Primer Geliştirme ve Kullanma Araştırmaları

Mnejja ve ark. (2004), 35 polimorfik mikrosatelliti Japon erik çeşidi Santa Rosa'nın CT/AG kullanılarak zenginleştirilmiş genom kütüphanesinden geliştirdiklerini belirtmişlerdir. Geliştirdikleri 35 primerin 27'sinin tek lokusta ve 8 tanesinin de 2 veya daha fazla lokusta bulunduğunu saptamışlardır. Sekiz genotipte 27 tek lokuslu mikrosatellit için yüksek düzeyde çeşitlilik saptamışlardır. Her lokus allelinin ortalamasının 5.7, ortalama heterozigotluğun %73 ve ayırım gücünün %74 çıktığını saptamışlardır. Birçok SSR markörünün şeftali (%85) ve bademe (%78) aktarılabildiğini bildirmişlerdir.

Bassil ve ark. (2005), Avrupa fıındığında CA tekrarları için kütüphane A, GA tekrarları için kütüphane B, GAA tekrarları için kütüphane C olmak üzere 3 mikrosatellit kütüphanesi oluşturmuşlardır. Araştırmacılar 25 primer çiftini 7 *Corylus L.* türünde ve 20 *Corylus avellana* genotipinde analiz etmişlerdir. Primer başına düşen allel sayısı tür içerisinde 2 ile 12 (ortalama 7.16) ve türler arasında ise 5 ile 22 (ortalama 13.32) arasında değişmiştir. *Corylus avellana*'da yüksek ortalama polimorfizm bilgi içeriği ($PIC \geq 0.6$) ve heterozigotluk (H_o ve $H_e > 0.6$) belirlemişlerdir. Araştırmacılar, her bir lokustaki allellerin sayısının daha az (4.5)

polimorfizm bilgi içermesinden (PIC 0.54) ve heterozigotluğundan (H_e 0.59) dolayı 3 nükleotitli mikrosatelliti 2 nükleotitli mikrosatellitlere göre daha az bilgi verici ve daha fazla homozigot (ortalamada $H_o = 0.4$) olarak bulduklarını bildirmişlerdir.

Boccacci ve ark. (2005), Avrupa fıındığında zenginleştirilmiş 3 genomik kütüphane kullanarak 18 mikrosatellit lokusu geliştirdiklerini bildirmişlerdir. Avrupa fıındığı türlerinin 20 çeşit grubunda polimorfizm bilgi içeriğinin 0.64, ayırım gücünün 0.77, heterozigotluğun 0.67 ve allellerin sayısının 7.1 olduğunu saptamışlardır. Diğer 7 *Corylus* türü kullanılarak elde edilen mezlere bu mikrosatellitlerin aktarılabiliirliğini değerdendirdiklerini bildirmişlerdir. *Corylus californica*'da ve *Corylus ferox*'da birer primer çifti dışındaki tüm primer çiftlerinin öteki türlerde de çalıştığını saptamışlardır.

Dangl ve ark. (2005), *J. nigra* 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 olan 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.

Duval ve ark. (2005), mango için $(GA)_n$ ve $(GT)_n$ dinükleotit tekrarları ile zenginleştirilmiş genom kütüphaneleri kullanarak SSR primerler geliştirmişlerdir. 41 pozitif klondan primerler dizayn edilmiştir. Araştırmacılar *Mangifera laurina* ile *Mangifera applanata*'dan çoğaltılmış iki çeşit ve 15 mango genotipini içeren örneklerde çoğaltılmış polimorfik 28 primer çiftinin amplifikasyon verdiğini saptamışlardır. Primer çifti başına 3 ile 13 arasında değışen allellerin heterozigotluk seviyesinin 0.059'dan 0.857 'ye kadar değışim gösterdiğini saptamışlardır.

Mnejja ve ark. (2005), Texas badem çeşidinin CT/AG ile zenginleştirilmiş genom kütüphanesinden 47 yeni SSR primeri elde ettiklerini bildirmişlerdir. Bunlardan 42'sinin sekiz bademde polimorfik ve 31'nin ise tek lokuslu olduğunu belirtmişlerdir. Locus başına düşen her bir allelin ortalama değerdinin 6.6 olduğunu

bildirmişlerdir. Geliştirilen SSR primer çiftlerinin diğer *Prunus* türlerine aktarılabilirliğinin yüksek (%83 - %100) olduğunu saptamışlardır.

3. MATERYAL ve METOD**3.1. Materyal**

Siirt çeşidi DNA'sı kullanılarak 4 farklı motif (CA, GA, AAC ve AAG) ile zenginleştirilen genomik kütüphanelerden oluşan 228 klonun baz dizilimleri SSR primerleri geliştirmek için kullanılmıştır. Genomik kütüphanenin oluşturulması, dört farklı motifle zenginleştirilmesi ve ortaya çıkan klonların sekansı Kaliforniya'da (ABD) bulunan 'Genetic Identification Services' adlı firmaya yaptırılmıştır.

Geliştirilen mikrosatellit primerlerinin testinde ve *Pistacia* genotiplerinin karakterizasyonun da **Çizelge 3.1**'de verilen 46 adet *Pistacia* genotipi kullanılmıştır.

3.2. Metod**3.2.1. DNA İzolasyonu**

Çizelge 3.1'de belirtilen antepfıstığı ve *Pistacia* türlerine ait yaprak örneklerinden DNA izolasyonu **Doyle ve Doyle (1987)**'nin geliştirdiği ve **Kafkas ve ark. (2006a)** tarafından modifiye edilen CTAB yöntemine göre yapılmıştır.

Bu yöntemde; her bir antepfıstığı türü için 1 g genç yaprak örneği, içerisinde sıvı azot bulunan havanda iyice ezildikten sonra 15 mililitrelik tüplere konmuş ve tüpler içerisine 6 ml CTAB tampon çözeltisi (100 mM Tris-HCl, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, %2 CTAB, %2 PVP, %0.1 Na₂S₂O₅) ilave edilerek, sıcaklığı 65⁰C'de olan su banyosuna konmuştur. 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: isoamyl alkol (24:1) ilave edilmiştir. Tüpler her 3 dakikada bir karıştırılarak oda koşullarında 15 dk tutulmuştur. Daha sonra 5000 rpm'de 15 dk süre ile santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra tüp içerisinde oluşan üst faz yeni bir 15 ml'lik tüpe aktarılmıştır.

Temiz tüp içerisine alınan üst fazın üstüne eşit oranda soğuk (-20⁰C'de bekletilmiş) isopropanol ilave edilmiş ve yavaşça tüp çevrilerek DNA'nın çökmesi

sağlanmıştır. Daha iyi bir çökelme sağlamak için örnekler 2 saat -70°C 'de veya 1 gece -20°C 'de bekletilmiştir. Daha sonra tüpler 2.000 rpm'de 2 dk süre ile santrifüj edilerek tüp içerisindeki isopropanol boşaltılmıştır. Tüpün üzerine, içerisinde 10 mM amonyum asetat bulunan, 3 ml %76'lık etanol yani yıkama tampon çözeltisi ilave edilmiş ve 1-2 saat çalkalanmıştır. Yıkanan DNA kurutularak saf suda çözündürülmüştür.

Çizelge 3.1. Denemede kullanılan antepfıstığı çeşitleri ve *Pistacia* türleri

NO	TÜR	ÇEŞİT/GENOTİP ADI / KODU	GEN KAYNAĞI
1	<i>Pistacia vera</i>	Kaşka	Antepfıstığı Araştırma Enstitüsü, Gaziantep
2	<i>Pistacia vera</i>	Uygur	Antepfıstığı Araştırma Enstitüsü, Gaziantep
3	<i>Pistacia vera</i>	Peters	Antepfıstığı Araştırma Enstitüsü, Gaziantep
4	<i>Pistacia vera</i>	Manisa-1	Manisa
5	<i>Pistacia vera</i>	Ohadi	Antepfıstığı Araştırma Enstitüsü, Gaziantep
6	<i>Pistacia vera</i>	Kalehgouchi	Antepfıstığı Araştırma Enstitüsü, Gaziantep
7	<i>Pistacia vera</i>	Mümtaz	Antepfıstığı Araştırma Enstitüsü, Gaziantep
8	<i>Pistacia vera</i>	Vahidi	Antepfıstığı Araştırma Enstitüsü, Gaziantep
9	<i>Pistacia vera</i>	Siirt	Antepfıstığı Araştırma Enstitüsü, Gaziantep
10	<i>Pistacia vera</i>	Hacireşo	Ceylanpınar, Şanlıurfa
11	<i>Pistacia vera</i>	Uzun	Antepfıstığı Araştırma Enstitüsü, Gaziantep
12	<i>Pistacia vera</i>	Kırmızı	Antepfıstığı Araştırma Enstitüsü, Gaziantep
13	<i>Pistacia vera</i>	Ketengömlek	Antepfıstığı Araştırma Enstitüsü, Gaziantep
14	<i>Pistacia vera</i>	Sultani	Antepfıstığı Araştırma Enstitüsü, Gaziantep
15	<i>Pistacia vera</i>	Halebi	Antepfıstığı Araştırma Enstitüsü, Gaziantep
16	<i>Pistacia vera</i>	Aeginea	Antepfıstığı Araştırma Enstitüsü, Gaziantep
17	<i>Pistacia vera</i>	Sfax	Çukurova Üniversitesi, Adana
18	<i>Pistacia vera</i>	Ajamy	Çukurova Üniversitesi, Adana
19	<i>Pistacia vera</i>	Ashoury	Antepfıstığı Araştırma Enstitüsü, Gaziantep
20	<i>Pistacia vera</i>	Gialla	Çukurova Üniversitesi, Adana
21	<i>Pistacia vera</i>	Kerman	Ceylanpınar, Şanlıurfa
22	<i>Pistacia vera</i>	Sefidi	Antepfıstığı Araştırma Enstitüsü, Gaziantep
23	<i>Pistacia khinjuk</i>	PK-206.5	USDA, Davis, Kaliforniya
24	<i>Pistacia khinjuk</i>	PK-210.2	USDA, Davis, Kaliforniya
25	<i>Pistacia eurycarpa</i>	PE-10F	Çukurova Üniversitesi, Adana
26	<i>Pistacia eurycarpa</i>	PE-6M	Çukurova Üniversitesi, Adana
27	<i>Pistacia atlantica</i>	PA-2	Manisa
28	<i>Pistacia atlantica</i>	PA-18	Manisa
29	<i>Pistacia integerrima</i>	PI-M	Çukurova Üniversitesi, Adana

Çizelge 3.1'in devamı

NO	TÜR	ÇEŞİT / GENOTİP ADI / KODU	GEN KAYNAĞI
30	<i>Pistacia integerrima</i>	PI-F	Çukurova Üniversitesi, Adana
31	<i>Pistacia chinensis</i>	PC-122.10	USDA, Davis, Kaliforniya
32	<i>Pistacia chinensis</i>	PC-121.2	USDA, Davis, Kaliforniya
33	<i>Pistacia terebinthus</i>	PT-44	USDA, Davis, Kaliforniya
34	<i>Pistacia terebinthus</i>	PT-77	USDA, Davis, Kaliforniya
35	<i>Pistacia terebinthus</i>	PT-9F	Çukurova Üniversitesi, Adana
36	<i>Pistacia terebinthus</i>	PT-Tek	Şanlıurfa
37	<i>Pistacia palaestina</i>	PP-B	Afyon
38	<i>Pistacia palaestina</i>	PP-CM	İsrail
39	<i>Pistacia palaestina</i>	PP-195.6	USDA, Davis, Kaliforniya
40	<i>Pistacia mexicana</i>	PM-0104	USDA, Davis, Kaliforniya
41	<i>Pistacia mexicana</i>	PM-0027	USDA, Davis, Kaliforniya
42	<i>Pistacia texana</i>	PTX-0292	USDA, Davis, Kaliforniya
43	<i>Pistacia texana</i>	PTX-0298	USDA, Davis, Kaliforniya
44	<i>Pistacia wiemannifolia</i>	PW-29A	USDA, Davis, Kaliforniya
45	<i>Pistacia lentiscus</i>	PL-01-M	Kozan yolu üzeri, Adana
46	<i>Pistacia lentiscus</i>	PL-0190A	USDA, Davis Kaliforniya

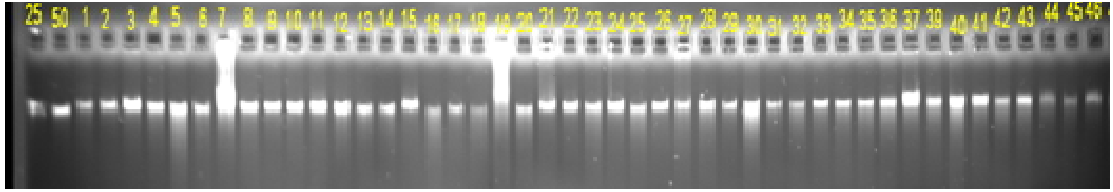
F: Dişi, M: Erkek

3.2.2. 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 gerekmektedir. Bu araştırmada antepfıstığı genotiplerinin DNA konsantrasyonu %0.8'lik agaroz jelde konsantrasyonu belli λ DNA ile karşılaştırılarak tahmini olarak belirlenmiştir.

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

Daha sonrada stok DNA konsantrasyonları esas alınarak, PCR analizleri için her bir DNA örneğinin konsantrasyonu 5 ng/μl olacak şekilde ayarlanmıştır. Bu işlem de aynı şekilde %0.8'lik agaroz jelde yapılmıştır. Bu aşamada toplam hacmi 20 μl olacak şekilde 10 μl seyreltik DNA, 4 μl jel yükleme boyası ve 6 μl saf su konularak örnekler hazırlanmıştır. Daha sonra ise bu hazırlanan örneklerden 10 μl'si agaroz jeldeki yuvalara yüklenmiş ve 90 voltta 45 dakika süre ile elektroforez işlemi gerçekleştirilmiştir. Sonuçta her bir örneğin 5 ng/μl olup olmadığı kontrol edilerek 5 ng/μl'den fazla olan örnekler saf su, az olan örnekler ise orantılı olarak DNA eklenmiş ve tüm örneklerin konsantrasyonunun 5 ng/μl olması sağlanmıştır. Bu işlemlerin sonucunda ise elimizdeki tüm DNA örnekleri PCR'a hazır hale getirilmiştir.



Şekil 3.1. *Pistacia* tür ve antepfıstığı çeşitlerinin DNA miktarının 5 ng'a ayarlanması ile ilgili hazırlanan jelin görüntüsü.(25: 25 ng lamda DNA, 50: 50 ng lamda DNA. Genotip numaralarına ait bilgiler Çizelge 3.1'de verilmiştir.)

3.2.3. Mikrosatellit Primer Çiftlerinin Dizayn Edilmesi

Siirt çeşidi DNA'sı kullanılarak oluşturulan 4 farklı motif ile zenginleştirilen genomik kütüphanelerden ortaya çıkan 228 klonun baz dizilimleri antepfıstığından SSR primerlerin geliştirilmesinde kullanılmıştır. Oluşturulan zenginleştirilmiş kütüphaneler dinükleotit tekrarları için 'CA' ve 'GA', trinükleotit tekrarları için 'AAC' ve 'AAG' dizilerinden meydana gelmiştir. Her bir kütüphaneden 57 adet klonun sekansı yapılmıştır. Sekansı yapılan klonlarda öncelikle duplike klonlar 'BioEdit' programı (Hall, 1997) kullanılarak elimine edilmiştir. Daha sonra geriye kalan klonlarda tekrarlı sıraların olup olmadığı 'Sputnik' programı kullanılarak belirlenmiş ve primer dizaynları ise 'Primer 3' programı kullanılarak yapılmıştır. Dizayn edilen primerler daha sonra 'MWG-Biotech' (Almanya) firmasına sentez ettirilmiştir.

3.2.4. Dizayn Edilen Primer Çiftlerinin Amplifikasyon Bakımından Taranması

SSR reaksiyonunda kullanılan kimyasallar ve konsantrasyonları **Çizelge 3.2**'de verilmiştir. PCR reaksiyonları ilk önce 25 µl hacimde hazırlanmıştır. SSR tekniğinde PCR sıcaklık ve döngü koşulları ise **Çizelge 3.3**'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. SSR–PCR reaksiyonunda kullanılan kimyasallar ve konsantrasyonları

PCR bileşenleri	Konsantrasyon
Tris-HCl pH=8.8	75 mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	20 mM
Tween 20	0.1%
MgCl ₂	2 mM
dATP	100 µM
dCTP	100 µM
dGTP	100 µM
dTTP	100 µM
İleri Primer	0.2 µM
Geri Primer	0.2 µM
Taq DNA Polymeraz	1.0 unite
DNA	20 ng

Çizelge 3.3. Antepfıstığında SSR tekniğinin uygulanmasında PCR sıcaklık ve döngü koşulları

Program No	İşlem	Sıcaklık (°C)	Süre (dk)	Döngü sayısı
1.	Ön denatürasyon	95	5	1
2.1	Denatürasyon	94	1	35
2.2	Primerin DNA'ya yapışma safhası	56	1	
2.3	Uzama safhası	72	2	
3.	Son uzama safhası	72	10	1

Sentez edilmiş primerler ilk önce amplifikasyon ürünü olup olmadığını belirlemek için %3'lük agaroz jel kullanılarak sekiz genotipte test edilmiştir (**Çizelge 3.4**). Tarama işlemi en az iki defa tekrar edilmiştir.

Çizelge 3.4. Agaroz jelde kullanılan antepfıstığı (*P. vera*) çeşitleri ve *P. atlantica* genotipi

NO	TÜR	ÇEŞİT veya GENOTİP
1	<i>Pistacia atlantica</i>	PA-18
2	<i>Pistacia vera</i>	Siirt
3	<i>Pistacia vera</i>	Ohadi
4	<i>Pistacia vera</i>	Uygur
5	<i>Pistacia vera</i>	Kaşka
6	<i>Pistacia vera</i>	Halebi
7	<i>Pistacia vera</i>	Kırmızı
8	<i>Pistacia vera</i>	Atlı

SSR analizlerinde 7 antepfıstığı çeşidi ve 1 adet *P. atlantica* genotipinde %3'lük agaroz jelde yapılan tarama sonucunda bant üretme bakımından değerlendirme yapılmıştır.

3.2.5. Dizayn Edilen SSR Primer Çiftlerinin Polimorfizm Bakımından Taranması

SSR analizlerinde elde edilen bantların büyüklüklerinin birbirine çok yakın olması ve bu bantları ayırmada güçlüklerin olması nedenleriyle, elektroforez işlemleri kapiler elektroforez yöntemi ile ABI 3130xl otomatik genetik analizör cihazı kullanılarak yapılmıştır.

Geliştirilen primer çiftlerinin *P. vera*'daki allel büyüklükleri ve polimorfizm durumlarını belirlemek için 6 antepfıstığı çeşidi (**Çizelge 3.5**) ve yabani *Pistacia* türlerindeki allel büyüklüklerini ve polimorfizm durumlarını belirlemek için ise 8 *Pistacia* türüne ait 9 genotip (**Çizelge 3.6**) kullanılmıştır.

Çalışmada dizayn edilen 84 primer çiftinin ileri primerleri, 5' uçlarına M13 universal (5'-TGTAACGACGGCCAGT-3') baz dizisi eklenerek (**Schuelke, 2000**) tekrar sentez ettirilmiş ve bu şekilde SSR analizlerinde kullanılmıştır. Ayrıca M13 universal primerinin 5' ucu 4 farklı (6-FAM, VIC, NED ve PET) florasan boya ile etiketlenerek ve 'Applied Biosystems' firmasına sentez ettirilerek PCR reaksiyonlarında kullanılmıştır.

Çizelge 3.5. ABI genetik analizör cihazında taramada kullanılan *Pistacia vera* çeşitleri

NO	TÜR	ÇEŞİT ADI
1	<i>Pistacia vera</i>	Siirt
2	<i>Pistacia vera</i>	Ohadi
3	<i>Pistacia vera</i>	Uygur
4	<i>Pistacia vera</i>	Kaşka
5	<i>Pistacia vera</i>	Halebi
6	<i>Pistacia vera</i>	Kırmızı

Çizelge 3.6. ABI genetik analizör cihazında taramada kullanılan yabancı *Pistacia* türleri

NO	TÜR	GENOTİP KODU
1	<i>Pistacia khinjuk</i>	PK-206.5
2	<i>Pistacia atlantica</i>	PA-18
3	<i>Pistacia atlantica</i>	PA-2
4	<i>Pistacia integerrima</i>	PI-M
5	<i>Pistacia chinensis</i>	PC-122.10
6	<i>Pistacia terebinthus</i>	PT-9F
7	<i>Pistacia mexicana</i>	PM-0104
8	<i>Pistacia wiemannifolia</i>	PW-29A
9	<i>Pistacia lentiscus</i>	PL-01-M

ABI 3130xl genetik analizör cihazında elektroforez edilen örneklerde PCR reaksiyonu 12 µl hacimde hazırlanmıştır. SSR-PCR reaksiyonu, 75 mM Tris-HCl, pH: 8.8, 20 mM (NH₄)₂SO₄, 2.0 mM MgCl₂, %0.01 Tween 20, 200 µM dNTP, 50 nM 5' ucunda M13 üniversal primer baz dizisi eklenmiş ileri primer, 200 nM geri primer, 200 nM florasan boyaların (6-FAM, VIC, NED ve PET) biriyle işaretli üniversal M13 primer, 0.6 ünite Taq DNA polimeraz ve 20 ng DNA olacak şekilde hazırlanmıştır.

ABI genetik analizörde elektroforez edilecek örneklerde PCR reaksiyonu için sıcaklık ve döngü koşulları **Schuelke (2000)**'ne göre bazı değişiklikler ile yapılmıştır (**Çizelge 3.7**).

Çizelge 3.7. ABI 3130xl genetik analizör cihazında elektroforez edilen örneklerde SSR analizi için kullanılan PCR döngü koşulları

Program No	İşlem	Sıcaklık ($^{\circ}\text{C}$)	Süre (sn)	Döngü sayısı
1.	İlk denatürasyon	94	300	1
2.1	Denatürasyon	94	45	25-30
2.2	Primerin DNA'ya bağlanması	56	60	
2.3	Uzama safhası	72	120	
3.1	Denatürasyon	94	45	8
3.2	Primerin DNA'ya bağlanması	53	60	
3.3	Uzama safhası	72	120	
4.	Son Uzama safhası	72	300	1

PCR reaksiyonundan sonra her bir örnekten 0.5 μl alınarak, 9.8 μl Hi-Di formamid ve 0.2 μl LIZ-500 size standart ile birlikte bir kuyucuğa yüklenmiştir. Daha sonra 95 $^{\circ}\text{C}$ de 5 dakika bekletilerek denatüre olması sağlanmış ve denatürasyon sonrası 5 dakika da buzda bekletilerek DNA'nın tek iplikçik haline gelmesi sağlanarak ABI cihazına elektroforez için yükleme işlemi yapılmıştır.

GeneMapper (version 4.0) paket programı kullanılarak DNA bantları pikler halinde değerlendirilmiştir. Böylece her bir primer çiftinin ürettiği alleller ve allel büyüklükleri belirlenmiştir.

GeneMapper paket programı kullanılarak pikler halinde alınan DNA bantları temiz, kirli ve ekstra bant olarak değerlendirilmiştir. Bu değerlendirmeler ise şu şekilde yapılmıştır: **Ekstra bant;** SSR alleller görülür fakat diğer PCR ürünlerine de rastlanır; bu şekilde görülen primerler ile çoklu PCR yapmak zordur. **Temiz bant;** SSR alleller kolay bir şekilde görülür, PCR ürünlerine ve ekstra bantlara rastlanmaz. **Kirli bant;** SSR allellerine benzemeyen alleller görülür, SSR allellerinin skorlanması zordur ayrıca çoklu PCR yapılması tavsiye edilmez.

3.2.6. Geliştirilen SSR Primer Çiftleri Kullanılarak 46 *Pistacia* Genotipinin Karakterizasyonu

Geliştirilen 59 adet SSR primeri arasından 14 adet SSR primeri 46 adet *Pistacia* tür ve çeşidinin karakterizasyonunda ve sınıflandırılmasında kullanılmıştır. PCR ve elektroforez koşulları bir önceki bölümde (3.2.5) verilmiştir.

3.2.6.1. SSR Karakterizasyon Sonuçlarının Değerlendirilmesi

SSR amplifikasyon ürünleri var (1) ya da yok (0) şeklinde değerlendirilmiş ve elde edilen veriler NTSYSpc 2.11V (**Rohlf, 2004**) bilgisayar paket programında analiz edilerek soyağaçları elde edilmiştir. Genotipler arasındaki genetik benzerliklerin hesaplanmasında Jaccard katsayısı kullanılmıştır. Ayrıca primerlerin allel sayısı, polimorfizm bilgi içeriği ve ayırma güçleri de hesaplanmıştır.

3.2.6.2. Karakterizasyonda Kullanılan Primer Çiftlerinin Polimorfizm Oranlarının Belirlenmesi

Çalışmamızda kullanılan SSR primerlerinin polimorfizm oranları, primerlerden elde edilen polimorfik bant sayılarının, toplam bant sayısına bölünüp 100 ile çarpılması ile bulunmuştur.

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

3.2.6.3. Karakterizasyonda Kullanılan Primer Çiftlerinin Polimorfizm Bilgi İçeriklerinin (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.

$$\text{PBİ} = 1 - \sum P_i^2$$

3.2.6.4. Karakterizasyonda Kullanılan Primer Çiftlerinin Ayırma Güçlerinin Belirlenmesi

Çalışmada primerlerin ayırma güçleri **Prevost ve Wilkinson (1999)** tarafından geliştirilen aşağıdaki formül yardımıyla hesaplanmıştır. Formüldeki p, I bandının 46 genotipteki oranıdır.

Ayırma gücü	$= \sum I_b$	burada
I_b	$= 1 - (2 \times 0.5 - p)$	

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. Dört Farklı Motif ile Zenginleştirilmiş Genomik Kütüphanelerdeki Klonlarda Tekrarlı Dizilerin Belirlenmesi ve Primer Dizaynı

Siirt çeşidi DNA'sı kullanılarak genomik kütüphane oluşturulmuş ve oluşturulan bu genomik kütüphane 4 farklı motif ile zenginleştirilmiştir. Oluşturulan genomik kütüphane 'CA' ve 'GA' dinükleotit tekrarları ile 'AAC' ve 'AAG' trinükleotit tekrarları ile zenginleştirilmiştir. Her bir kütüphaneden 57 klon olmak üzere toplam 228 klonun sekansı yaptırılmıştır. Sekanslanan 228 klondan 68 adedinin duplike klonlar olduğu belirlenmiştir.

Duplike klonların kütüphanelere dağılımı incelendiğinde ‘CA’, ‘GA’, ‘AAC’ ve ‘AAG’ tekrarları ile zenginleştirilmiş olan kütüphanelerde sırasıyla 20, 16, 22 ve 10 adet klonun aynı baz dizisine sahip oldukları belirlenmiştir. Sonuçta, duplike klonlar çıkarıldıktan sonra ‘CA’, ‘GA’, ‘AAC’ ve ‘AAG’ ile zenginleştirilmiş kütüphanelerde sırasıyla 37, 41, 35 ve 47 adet klon bundan sonraki aşamalarda değerlendirmeye alınmıştır.

Elde edilen sekanslarda tekrar dizileri paket program aracılığı ile aranmıştır. ‘CA’ ile zenginleştirilmiş kütüphanede duplike olan klonlar çıkarıldıktan sonra geriye kalan 37 adet klondan 32 (%86.5) tanesi tekrar dizisi içermiş olup bu klonlardan 4 tanesi de iki tekrar dizisi içermiştir. Böylece ‘CA’ tekrarı ile zenginleştirilmiş kütüphanede sekansı yapılan 37 klondan 36 adet tekrar dizisi elde edilmiştir. İki adet tekrar dizisi [(ATG)₁₁ ve (TG)₁₂] içeren CUPVA104 klonundan bir görünüm **Şekil 4.1**’de verilmiştir.

[illegible]

Şekil 4.1 İki tekrar dizisi içeren CUPVA104 klonuna ait baz dizilimi

Toplam 36 adet tekrar dizisinden 28 adet (%77.7) primer çifti dizayn edilmiştir. ‘CA’ ile zenginleştirilmiş kütüphaneden elde edilen tekrarlar, primer isimleri ve dizaynları **Çizelge 4.1**’de verilmiştir.

Çizelge 4.1. ‘CA’ tekrar dizisi ile zenginleştirilmiş kütüphanede elde edilen tekrarlar ve primer dizaynları

Primer Adı	Tekrar Dizisi	TBB (bç)	İleri ve Geri Primerler (5’ – 3’)
CUPVA001	(TG) ₁₃	243	F-TGA-CGG-TTA-GTG-TGG-CTG-AG R-CAC-ACA-TGA-TCG-CTC-ACT-CC
CUPVA003	(GT) ₆ GC(GT) ₁₅	201	F-CTT-CAG-ACC-CAT-CAC-AGC-AA R-TCT-CTG-TCT-CAT-TTT-TGT-TTT-CCA
CUPVA004a	(ACACA) ₆	194	F-TTC-ACG-ACG-GTC-ACA-ACT-TC R-GAA-GCA-TGC-GTG-TGA-GTG-TT
CUPVA004b	(CAA) ₆	196	F-ACA-ACA-CCA-CCA-TCA-CCA-CA R-GGT-TGT-TGG-CAG-TGT-GAA-TG
CUPVA005	(TG) ₁₀	195	F-CGT-CCT-AGC-TAA-CCG-TCA-TTG R-TTA-ACA-CGC-ACA-CAC-ACA-CG
CUPVA006	(TGG) ₅	243	F-CAA-GGC-GAC-TGA-ACA-ATG-TG R-GCG-CTT-CCA-CCT-ACA-CCT-AA
CUPVA007	(GTA) ₆ (GTT) ₇ (GGT) ₄	225	F-CAA-GGC-GAC-TGA-ACA-ATG-TG R-CAT-GTT-TGT-GCA-CGT-CTG-TG
CUPVA102	(AT) ₈	249	F-CGG-ACG-ACG-AGA-AGA-TAT-AGG R-CGT-GCC-TGC-TGT-AAG-GAA-AT
CUPVA104a	(TG) ₁₂	125	F-CGT-GTG-TTG-TAT-GCC-GAA-GT R-TTG-CAT-CGT-CAC-CAC-AAA-AT
CUPVA104b	(ATG) ₁₁	193	F-TTC-AAC-TGA-GAA-CGG-GTG-TG R-CGC-GAA-ATC-ACA-CTA-TCG-TC
CUPVA105	(TG) ₂₄ C(GT) ₅	218	F-CCG-ATC-TCA-CAA-TGG-AAT-TAT-A R-CGG-TTA-AAT-CCT-ACA-ACC-CTA-C
CUPVA106a	(TG) ₅ A(GT) ₁₀	218	F-TTC-GAC-AGT-GAC-CTG-ACG-TT R-CGC-ACA-ATA-CCT-ACC-CAA-CC
CUPVA106b	(TCAG) ₅	259	F-GTC-GAT-TTC-AGT-CGC-CAG-AT R-AAA-CCG-TCC-ATC-AAA-CAA-CC
CUPVA111	(TA) ₅ GA(TG) ₁₇	321	F-GGT-GTT-CCA-CTT-CCA-CCA-TT R-CGC-ACA-CAC-TCC-ACT-TAT-TCA
CUPVA112	(GA) ₂₀ (GT) ₂₈	241	F-AAA-GCG-ACT-CCT-ATG-TCC-AC R-AGG-GCT-CCT-CTC-TTA-TTT-ACG
CUPVA114	(AG) ₁₀ (TG) ₁₄	235	F-ATA-GTC-AGG-TCG-CAT-GTA-GC R-CCA-ATG-GGA-AGC-AAG-TTA-GG
CUPVA120	(AC) ₁₉ (AT) ₅	333	F-CAC-AAA-TAG-CTC-CCC-CAC-TT R-CAT-AGA-CCA-TCA-ATG-TGA-AAG-G
CUPVA204	(TG) ₁₉	260	F-GTC-TGC-CTC-TGT-CTC-TCT-GTA-G R-TAC-GGG-TGT-CTG-TTA-CCT-TAT-C
CUPVA210	(TG) ₁₃ TAT(TGTA) ₁₀ (TG) ₇	228	F-TGC-AAG-TAG-TAG-GTG-AGA-TCG R-GCA-ATG-TAA-TGC-TCT-CTC-TCT-C

Çizelge 4.1'in devamı

Primer Adı	Tekrar Dizisi	TBB (bç)	İleri ve Geri Primerler (5' – 3')
CUPVA213	(CA) ₁₀ TA(CA) ₅	215	F-GTT-TGG-GAC-CAT-TTT-TAC-G R-CGT-TAG-CCT-TGT-CTT-TTC-AG
CUPVA214	(TA) ₆ (TG) ₁₄	268	F-CGG-GGA-ATC-CAC-TTT-ATC R-TCG-CTT-TTT-TGC-ACA-ACT
CUPVA216	(AG) ₁₁ (GT) ₁₉	189	F-GCG-AAT-CCT-ACA-TCC-ATT-GC R-CAT-TTG-CGG-GAT-TGG-TTA-AT
CUPVA220	(GT) ₁₁	248	F-GGT-CAC-AGA-ACC-TTC-CCA-AA R-GGA-CCA-TTT-TTA-CGG-ATG-GA
CUPVA302	(AC) ₁₁	167	F-CAA-CCT-CAT-TCC-ATT-ATC-CTA-C R-ACT-GTG-AAA-CCA-CGA-GTG-TC
CUPVA310	(CA) ₁₈	161	F-CCT-TCT-AGG-TGC-CAT-CAA-ATC R-CCT-GTC-CAA-TTA-CAA-GCT-GAC-T
CUPVA313	(CT) ₁₆ ATGTA (TG) ₈ AAC(CT) ₁₄ AT(GT) ₅ (GC) ₈ (GT) ₆ TAAC (CT) ₁₈ AT(GT) ₁₄	305	F-CTT-TGT-GAC-TGT-AAC-AGG-TCT-A R-AAT-AAA-GTG-ACA-TCC-ATC-TGT-C
CUPVA315	(ACA) ₁₀	251	F-TCC-CGT-AGA-TGG-TCG-ATA-GC R-TAA-TTT-TGG-TCC-GTG-TGT-GG
CUPVA318	(AC) ₁₇ (AT) ₅	252	F-CAA-GGG-GAG-CAT-ACA-TCC R-TAA-CGG-CAC-AAA-GGT-TGA

CU: Çukurova Üniversitesi, PV: *Pistacia vera*, A: CA Kütüphanesinin Kodu, TBB: Tahmini Bant Büyüklüğü, F: İleri Primer, R: Geri Primer.

'GA' ile zenginleştirilmiş kütüphanede duplike olan klonlar çıkarıldıktan sonra geriye kalan 41 adet klondan 24 tanesi tekrar dizisi içermiş olup bu klonlardan 1 tanesi de iki tekrar dizisi içermiştir. Böylece 'GA' tekrarı ile zenginleştirilmiş kütüphanede sekansı yapılan 41 klondan 25 adet (%60.9) tekrar dizisi elde edilmiştir. Toplam 25 adet tekrar dizisinden 23 adet (%92.0) primer çifti dizayn edilmiştir. 'GA' ile zenginleştirilmiş kütüphaneden elde edilen tekrarlar, primer isimleri ve dizaynları **Çizelge 4.2'**de verilmiştir.

Çizelge 4.2. 'GA' tekrar dizisi ile zenginleştirilmiş kütüphanede elde edilen tekrarlar ve primer dizaynları

Primer Adı	Tekrar Dizisi	TBB (bç)	İleri ve Geri Primerler (5' – 3')
CUPVB005	(CT) ₁₁	322	F-GGG-GAA-TCC-GCT-CAT-TTT R-AAT-CAG-GCC-CTC-CTT-CTA-GC
CUPVB009	(CT) ₁₂ C(CT) ₅	182	F-CGA-CTC-TCC-GCC-ACA-TCA R-GAG-GAG-GAG-ATG-CCA-AGG-A

Çizelge 4.2'nin devamı

Primer Adı	Tekrar Dizisi	TBB (bç)	İleri ve Geri Primerler (5' – 3')
CUPVB010	(GA) ₉	246	F-AAC-TGC-TTG-GTA-ATT-GTT-GTG R-GTA-AGG-CTC-CTG-AAA-TGT-AAT-G
CUPVB101	(CT) ₁₅	224	F-TGG-AGC-AGT-TGA-ACA-ATA-GGA-C R-CAG-CGA-GCT-GAT-TTA-TAG-CTT-G
CUPVB103	(ATGA) ₅ (ATGG) ₆	195	F-GAT-GGT-CGG-ATG-GAT-GGA-T R-CGC-TCT-ATC-TCT-ATC-GCT-CTC-G
CUPVB106	(CT) ₁₉	175	F-TCC-CTT-GAA-CTT-CCC-CAC-TA R-ACG-AAT-CCT-ACG-TCC-ACT-GC
CUPVB108	(TC) ₂₀ (AC) ₉	311	F-TGG-AAA-GCA-AGA-GGA-TGG-TC R-TGT-CTG-TGC-CTC-TAT-GTG-AGT-G
CUPVB111a	(CAA) ₁₀	168	F-ATA-ACG-CGT-CTC-ACA-CAA-CG R-TGT-TGT-TGC-TGT-TGC-TGT-TG
CUPVB111b	(CATC) ₆	200	F-CCG-TCA-GTC-CAT-CGC-TCT-AT R-CGT-GAA-GAC-ATG-CAG-TGG-A
CUPVB112	(CT) ₁₉	150	F-GGG-AAG-AGA-GAT-CAG-ATT-GGA-G R-ATT-CCA-AGG-TCT-CCG-TTT-CC
CUPVB114	(CT) ₅	169	F-AAC-TCA-AAC-TCT-TTC-ATT-CTT-TCT-CA R-AAG-TCA-CGT-AGA-GCG-GGA-GA
CUPVB118	(TC) ₁₈	184	F-ATT-CCC-ATC-AAT-TAC-CTC-AAT-G R-GAG-GGA-TCA-GGT-CAC-AGA-CTA-G
CUPVB208	(GAGAAA) ₅	188	F-CAT-CAA-CAA-CCA-TGC-AGA-TG R-GTT-CGG-ATT-CGT-GTC-TCA-GA
CUPVB211	(AG) ₁₅	112	F-CGC-TTT-AGA-CGA-CTG-ACT-TTA R-TTC-GCA-CAT-TTT-ACT-CTT-GAC
CUPVB217	(AG) ₈	185	F-TGG-CAT-TGA-GAC-GAG-AAA-AC R-TAA-AAC-GCT-TTG-ATT-CCT-CTT-G
CUPVB219	(CT) ₁₉	102	F-TTT-TGG-GGG-ATT-AGT-CAA-TTT-C R-GAG-CTG-GGT-TAC-AAT-TTG-AGT-G
CUPVB302	(GA) ₁₂ GG (GA) ₇	171	F-CTC-CAA-AAG-ACT-AAA-ACT-TGA-G R-TTG-CTT-CTT-CTC-ACT-GTT-TC
CUPVB306	(CT) ₁₃	180	F-TCT-TTT-TCT-GCT-TTC-AGT-AAC-C R-TGG-TTC-TGA-GTG-TCA-ACA-TTA-G
CUPVB309	(CT) ₁₅	286	F-ATG-TCA-AAA-CCT-TGC-TTT-AGT-C R-AAT-CCT-ATG-TCC-ACT-GCT-ATT-G
CUPVB310	(CT) ₁₈	215	F-ACG-TGG-CTG-ATG-CAC-TTA-TC R-GGG-GGA-TTT-CTC-CAT-CTT-GT
CUPVB312	(GA) ₁₇	166	F-GCC-TCC-GGT-AAG-ATG-AGG-T R-CGG-TCG-GAA-GAT-CAC-AAA-G
CUPVB315	(GT) ₂₅ (GA) ₂₄	281	F-TGG-AGG-TCT-GAA-TGA-AAA-TG R-GCA-GCA-GGG-AGA-GAT-AGT-G
CUPVB318	(TC) ₄	234	F-GTC-TCT-CTC-GCT-CAA-CTC-TAT-C R-TAG-GCT-GTG-ACA-ACA-ATC-G

CU: Çukurova Üniversitesi, PV: *Pistacia vera*, B: GA Kütüphanesinin Kodu, TBB: Tahmini Bant Büyüklüğü, F: İleri Primer, R: Geri Primer.

‘AAC’ tekrar dizisi ile zenginleştirilmiş kütüphanede duplike olan klonlar çıkarıldıktan sonra geriye kalan 35 adet klondan 16 (%45.7) tanesi tekrar dizisi içermiştir. ‘AAC’ kütüphanesinde tekrar dizisi içeren tüm klonlarda sadece tek bir tekrar bulunmuştur. Sekansı yapılan Toplam 16 adet tekrar dizisinden 13 adet (%81.3) primer çifti dizayn edilmiştir. ‘AAC’ ile zenginleştirilmiş kütüphaneden elde edilen tekrarlar, primer isimleri ve dizaynları **Çizelge 4.3**’de verilmiştir.

Çizelge 4.3. ‘AAC’ tekrar dizisi ile zenginleştirilmiş kütüphanede elde edilen tekrarlar ve primer dizaynları

Primer Adı	Tekrar Dizisi	TBB (bp)	İleri ve Geri Primerler (5’ – 3’)
CUPVC007	(ACA) ₆	228	F-CGC-AAA-GAA-GCG-AAA-TAT-CC R-GGG-GGT-TGC-CAA-ATA-TTG-TT
CUPVC008	(GGT) ₅	175	F-TAG-ATG-GGT-GGA-ATG-GTG-GT R-CTC-GAT-TTC-GGT-CCC-ACT-AC
CUPVC102	(CAA) ₆	146	F-TGA-TTA-AGG-CAC-GAG-AGC-AG R-CGC-ATG-TCT-CTG-CAA-ATA-GGA
CUPVC105	(AC) ₁₂	134	F-TGT-CCA-GGT-TCT-AGG-CTC-GT R-CTC-CCT-CTC-TTC-CTC-AGT-CG
CUPVC108	(GTC) ₅	167	F-ACT-TTG-GTG-TGC-CTG-TCC-TT R-ATG-CTC-CGC-CTA-TCC-TTC-TT
CUPVC113	(GTT) ₆	265	F-ACA-ATC-TTG-GGA-ACA-GAA-CTG R-GAA-AAA-ACA-GCC-AAC-TTC-ATC
CUPVC116	(ACA) ₇	135	F-ACC-GTT-CTT-TCC-CTT-CCA-TC R-CTT-CAC-TTC-CTC-CTC-ACA-TGG
CUPVC119	(TG) ₁₄ AG(TG) ₁₉	186	F-TGG-AGG-ACT-GAG-AGT-GGT-TCT R-ACA-GCA-AGC-CCT-AAG-TGT-CC
CUPVC204	(CAC) ₅ (CAA) ₇	159	F-GCA-CTG-AAT-AGG-CCG-AAG-AG R-GGG-GGT-TGC-CAA-ATA-TTG-TT
CUPVC210	(TTG) ₁₀	249	F-GCG-TTT-GTT-GCC-TTT-TCT-TC R-GTG-AAC-CCC-GTC-TCA-ATG-TC
CUPVC303	(GT) ₁₄	260	F-TCT-GCA-CTG-TCC-CAT-CAA-AG R-GTG-GAC-TGT-GCC-TGG-AAA-AT
CUPVC304	(ATCT) ₁₇	339	F-CCT-CGT-GAA-GCC-AGT-CAC-TA R-GCA-TGG-ATT-TTT-CTT-TTG-ATT-GA
CUPVC313	(AAC) ₆	273	F-GTA-GGT-TGG-AGC-AGA-AGA-TGA-G R-AGC-CAG-AAA-TTA-CTG-AAA-CTG-C

CU: Çukurova Üniversitesi, PV: *Pistacia vera*, C: AAC Kütüphanesinin Kodu, TBB: Tahmini Bant Büyüklüğü, F: İleri Primer, R: Geri Primer.

‘AAG’ ile zenginleştirilmiş kütüphanede duplike olan klonlar çıkarıldıktan sonra geriye kalan 47 adet klondan 22 (%46.8) tanesi tekrar dizisi içermiştir. ‘AAG’ kütüphanesinde tekrar dizisi içeren tüm klonlarda sadece tek bir tekrar bulunmuştur. Toplam 22 adet tekrar dizisinden 20 adet (%91) primer çifti dizayn edilmiştir. ‘AAG’ ile zenginleştirilmiş kütüphaneden elde edilen tekrarlar, primer isimleri ve dizaynları **Çizelge 4.4**’de verilmiştir.

Çizelge 4.4. ‘AAG’ tekrarı ile zenginleştirilmiş kütüphanede elde edilen tekrarlar ve primer dizaynları

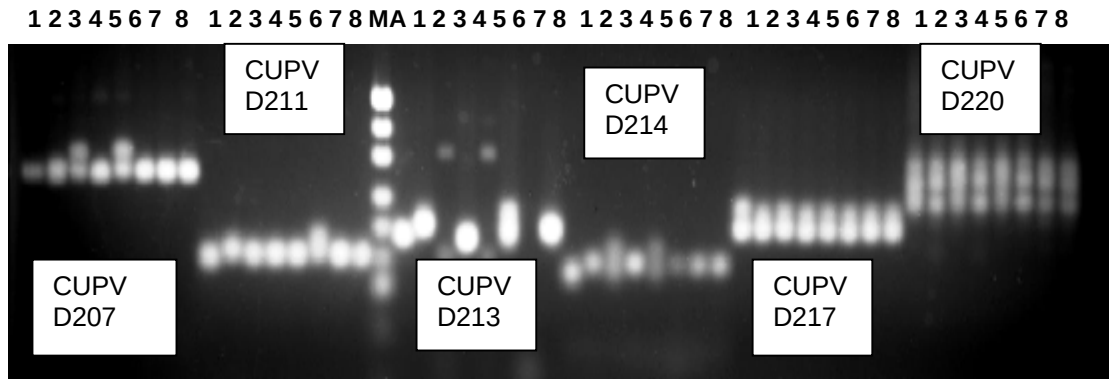
Primer Adı	Tekrar Dizisi	TBB (bç)	İleri ve Geri Primerler (5' – 3')
CUPVD002	(TTC) ₁₃	239	F-TCA-CTC-TCA-GCT-CAA-CCG-TCT R-AAG-CAC-AGC-CTT-CAC-CAT-TC
CUPVD004	(GAA) ₅	145	F-TGT-AGA-ATT-GGA-TGC-GCA-AA R-CCA-CCG-TCG-ATT-CCT-CTT-TA
CUPVD011	(GAA) ₇	254	F-GGA-GAA-ACC-AGA-CGG-TGA-AG R-TCA-ATA-TCG-GCT-TCC-CAA-AC
CUPVD102	(TTC) ₆	164	F-CGT-GGC-TGT-TAG-GGT-AAT-GG R-CCC-AAC-CTC-CAG-CAT-CTC-T
CUPVD103	(TTC) ₄	118	F-TTG-TTC-ACC-ACC-CCT-TCT-TC R-GTG-GGT-ATG-ACG-GTG-AGG-AG
CUPVD109	(GAA) ₈	176	F-GAA-GAA-CGC-GAC-ATC-CAT-TAC R-CAC-CGG-CTT-CAA-TTC-ATC-T
CUPVD117	(AGA) ₇	160	F-TGA-ATT-AGG-ACG-GGT-TTT-GG R-AAC-CAA-CTA-AAC-TGC-CTT-GCA-T
CUPVD118	(GAA) ₅	152	F-AGA-GAT-GTT-GCG-GTG-GGT-TT R-GAA-CAG-GCG-TCC-ATT-AGG-AA
CUPVD120	(AGA) ₉	247	F-ATA-GCT-CTT-CTG-GCG-CTT-CG R-GTT-CGG-TGT-CAG-CAA-CAA-TG
CUPVD201	(GAG) ₅	171	F-CAA-GCA-GAT-GAA-GAA-GAG-CAA-G R-AAT-TTG-CAT-TGT-TTG-TGA-GGA-C
CUPVD205	(TCT) ₆	171	F-GTC-CGT-CCT-TAA-CCA-AAA-TAT-G R-CAA-TGG-AGA-TCA-ATG-AGC-TAT-G
CUPVD207	(GAA) ₇	295	F-AAA-GTT-GGG-GAA-GAG-TTC-TTA-C R-GGC-TGA-GTA-AAA-AAC-AAT-GTT-C
CUPVD211	(GAA) ₁₀	153	F-AAG-GCA-ACC-ATA-CCA-CAA-AC R-CTC-CAA-GCC-GAA-TCT-CTC-TA
CUPVD213	(CTT) ₁₃	198	F-ACG-ACC-ATC-CCC-TAC-GAA-G R-ACT-GCC-ATG-ACA-GCT-CCA-C
CUPVD214	(AAG) ₇	140	F-CCA-ACC-GAA-CAC-AAA-TCA-C R-TCG-CTG-TAT-GAA-GCC-ATT-C
CUPVD220	(TTCT) ₅	284	F-GTG-AGC-ACA-AAA-CGC-TCA-GT R-CAT-GTG-CAT-TCC-ATT-CAT-GC
CUPVD307	(AGA) ₅	275	F-GCC-CAA-AAA-ATG-TTG-CTT-AAC R-GCA-CCA-CAT-ACT-GAC-ATA-CGC
CUPVD309	(AAG) ₈	218	F-TTG-AGC-ATC-AGC-GAG-TTG R-CGT-CCT-CCG-AAG-ATT-CAG
CUPVD310	(GAA) ₇	138	F-GCC-TAA-GGC-CTA-CCC-ATT-CT R-GTC-GTA-AAT-GCT-CGG-CTT-GT
CUPVD312	(TCT) ₇	120	F-CGT-TGT-CGT-CTT-TTC-CCC-TA R-ATT-GCC-ACA-TTG-CAA-GTT-CT

CU: Çukurova Üniversitesi, PV: *Pistacia vera*, D: AAG Kütüphanesinin Kodu, TBB: Tahmini Bant Büyüklüğü, F: İleri Primer, R: Geri Primer.

Sonuçta ‘CA’, ‘GA’, ‘AAC’ ve ‘AAG’ ile zenginleştirilmiş kütüphanelerden sekansı yapılan 228 klondan %30’unun (68 adet) duplike klonlar olduğu belirlenmiştir. Geriye kalan 160 klondan 94 adedi (%58.8) tekrar dizisi içermiştir. Bunlardan 5 adedinin (%5.3) 2 tekrar dizisi içerdiği belirlenmiştir. Böylece 99 tekrar dizisinin bulunduğu bölgeler için primer dizaynı yapılmış ve sonuçta 84 çift (%84.8) primer dizayn edilmiştir. Sonuç olarak, sekansı yapılan toplam 228 klonun %36.8’i primere dönüşmüştür.

4.2. Geliştirilen SSR Primerlerinin Amplifikasyon Bakımından Değerlendirilmesi

‘CA’, ‘GA’, ‘AAC’ ve ‘AAG’ tekrar dizileri ile zenginleştirilerek oluşturulan kütüphanelerden elde edilen klonlarda ortaya çıkan tekrar dizi bölgelerinden geliştirilen 84 adet mikrosatellit primer çifti bant üretme açısından değerlendirilmiştir. PCR amplifikasyonu 7 adet antepfıstığı çeşidi ile 1 adet *P. atlantica* genotipi olmak üzere 8 örnekte yapılmış ve elde edilen PCR ürünleri %3’lük agaroz jel kullanılarak 84 primer test edilmiştir. CUPVD207-CUPVD211-CUPVD213, CUPVD214, CUPVD217, CUPVD220 lokuslarının agaroz jelde yürütülmesi sonucu elde edilen görüntü **Şekil 4.2**’de verilmiştir.



Şekil 4.2 Sekiz genotipte tarama amaçlı SSR PCR ürünlerinin %3’lük agaroz jelde yürütülmesi sonucunda elde edilen görüntü (1. *P. atlantica*–18, 2. Siirt, 3. Atlı, 4. Ohadi, 5. Uygur, 6. Kaşka, 7. Halebi, 8. Kırmızı) MA (moleküler ağırlık 1000–900–800–700–600–500–400–300–250–200–150–100–50)

Tüm primer çiftlerinin PCR amplifikasyonu sonucu elde edilen agaroz jel sonuçları değerlendirildiğinde toplam 59 adet primer çiftinin bant verdiği belirlenmiştir. Böylece bant üretme bakımından test edilen 84 primerden %70.2'si bant üretmiştir.

'CA' ile zenginleştirilmiş kütüphaneden geliştirilen 28 primer çiftinden 15 tanesi (%53.6), 'GA' ile zenginleştirilmiş kütüphaneden geliştirilen 23 primer çiftinden 17 tanesi (%73.9), 'AAC' ile zenginleştirilmiş kütüphaneden geliştirilen 13 primer çiftinden 9 tanesi (%69.2) ve 'AAG' ile zenginleştirilmiş kütüphaneden geliştirilen 20 primer çiftinden 18 tanesi (%90.0) bant üretmiştir. Her bir lokustaki allel sayısı ve büyüklükleri ise bir sonraki aşamada ABI 3130xl genetik analizör cihazında belirlenmiştir.

'CA' kütüphanesinden geliştirilen CUPVA001, CUPVA003, CUPVA004a, CUPVA004b, CUPVA007, CUPVA104a, CUPVA104b, CUPVA106a, CUPVA106b, CUPVA204, CUPVA214, CUPVA302, CUPVA315 lokuslarında, 'GA' kütüphanesinden geliştirilen CUPVB103, CUPVB111a, CUPVB111b, CUPVB211, CUPVB312, CUPVB315 lokuslarında, 'AAC' kütüphanesinden geliştirilen CUPVC105, CUPVC119, CUPVC303, CUPVC304 lokuslarında ve 'AAG' kütüphanesinden geliştirilen CUPVD102, CUPVD312 lokuslarında yapılan PCR reaksiyonları sonucunda amplifikasyon olmamıştır.

4.3. Geliştirilen SSR Primerlerinin *P. vera*'da Amplifikasyonu ile Polimorfizm Durumları ve Allel Büyüklükleri

Agaroz jelde bant veren SSR primer çiftlerinin allel büyüklüklerinin, sayısının ve polimorfizm durumlarının belirlenmesi ABI 3130xl genetik analizör cihazında yapılmıştır. Genetik analizör cihazında yapılan elektroforezden elde edilen bir elektroferogramın görüntüsü **Şekil 4.3**'de verilmiştir.

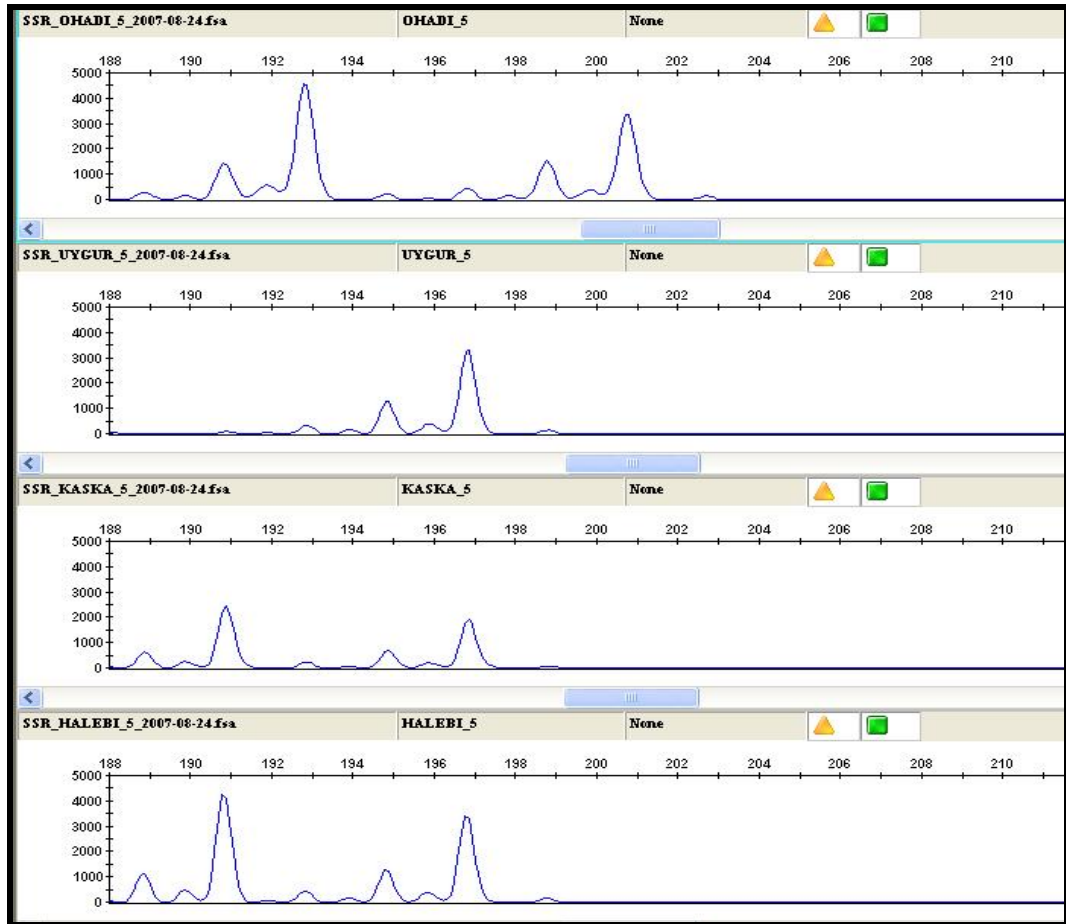
'CA' tekrarları ile zenginleştirilmiş kütüphaneden geliştirilen 15 adet SSR primerinin 6 adet *P. vera* çeşidinde taranması sonucu elde edilen alleller, büyüklükleri ve polimorfizm durumları **Çizelge 4.5**'te verilmiştir.

Geliştirilen primerler toplam allel sayısı bakımından karşılaştırıldığında, CUPVA105 ve CUPVA216 kodlu SSR primerlerinin en az (1 adet), CUPVA114

kodlu SSR primerinin ise 8 allel ile en fazla alleli vermiş ve bu primeri 5 allel ile CUPVA005, CUPVA213 ve CUPVA220 lokuslarının izlediği belirlenmiştir.

Primerler polimorfik allel sayısı bakımından incelendiğinde ise; CUPVA216 kodlu SSR primerinin *P.vera*'da polimorfizm göstermediği, CUPVA105 ve CUPVA112 lokuslarının (1 adet) en az polimorfik allele sahip olduğu, CUPVA114 lokusunun (6 adet) en fazla polimorfik allele ve CUPVA005, CUPVA213 ile CUPVA220 SSR lokuslarının ise 5 adet polimorfik allele sahip oldukları belirlenmiştir.

Sonuç olarak, 'CA' kütüphanesinden geliştirilen 15 adet SSR primer çiftinden 14 tanesi (%93.3) polimorfizm göstermiş olup, toplam 51 allel elde edilmiş ve bu allellerin 46 tanesi (%90.2) *P. vera*'da polimorfizm göstermiştir.



Şekil 4.3 CUPVB009 lokusunun ABI 3130xl genetik analizör cihazında elektroforezinin yapılması sonucunda elde edilen elektroferogramdan bir görüntü (1. Ohadi, 2. Uygur, 3. Kaşka, 4. Halebi)

Çizelge 4.5. ‘CA’ tekrarı ile zenginleştirilmiş kütüphaneden geliştirilen 15 adet SSR primerinin *P. vera*’da allel büyüklükleri, sayıları ve polimorfizm durumları

Lokus Adı	Alleller	Polimorfik Olmayan Alleller	Toplam Allel Sayısı
CUPVA005	182, 222, 225, 227, 255	-	5
CUPVA006	216, 219	-	2
CUPVA102	261, 265, 267	-	3
CUPVA105	228	-	1
CUPVA111	324, 340, 345	-	3
CUPVA112	179, 201	179	2
CUPVA114	206, 208, 211, 217, 224, 253, 259, 263	211, 224	8
CUPVA120	360, 377, 387	-	3
CUPVA210	247, 251, 258	-	3
CUPVA213	205, 216, 219, 220, 230	-	5
CUPVA216	160	160	1
CUPVA220	249, 250, 265, 266, 277	-	5
CUPVA310	176, 178, 188	-	3
CUPVA313	263, 266, 294	266	3
CUPVA318	258, 267, 269, 275	-	4

‘GA’ tekrarı ile zenginleştirilmiş kütüphaneden geliştirilen 17 adet SSR primerinin 6 adet *P. vera* çeşidinde PCR amplifikasyonu sonucu elde edilen alleller ve polimorfizm durumları **Çizelge 4.6**’da verilmiştir.

Geliştirilen primerler toplam allel sayısı bakımından karşılaştırıldığında, CUPVB112 SSR lokusunun en az (1 adet), CUPVB219 SSR lokusunun ise en fazla (9 adet) allel sayısına sahip olduğu saptanmıştır.

Primer çiftleri polimorfik allel sayısı bakımından incelendiğinde ise; CUPVB112 ve CUPVB114 SSR primerlerinin polimorfik allele sahip olmadıkları, CUPVB101, CUPVB106 ve CUPVB318 lokuslarının 2 adet polimorfik allele sahip olduğu, CUPVB219 (9 adet), CUPVB306 (7 adet), CUPVB009 (6 adet) lokuslarının ise en fazla polimorfik allele sahip oldukları belirlenmiştir.

Sonuç olarak, ‘GA’ kütüphanesinden geliştirilen 17 adet SSR lokusundan 15 tanesi (%88.2) polimorfizm göstermiş olup, toplam 67 allel elde edilmiş ve bu allellerin 64 tanesi (%95.5) *P. vera*’da polimorfizm göstermiştir.

Çizelge 4.6. ‘GA’ tekrarı ile zenginleştirilmiş kütüphaneden geliştirilen 17 adet SSR primerinin *P. vera*’da allel büyüklükleri, sayıları ve polimorfizm durumları

Lokus Adı	Alleller	Polimorfik Olmayan Alleller	Toplam Allel Sayısı
CUPVB005	336, 345, 348	-	3
CUPVB009	187, 191, 193, 197, 201, 205	-	6
CUPVB010	264, 267, 271, 274	-	4
CUPVB101	238, 240	-	2
CUPVB106	189, 194	-	2
CUPVB108	287, 295, 309, 321, 335	-	5
CUPVB112	155	155	1
CUPVB114	211, 221	211, 221	2
CUPVB118	204, 206, 210	-	3
CUPVB208	181, 192, 194, 205	-	4
CUPVB217	199, 203, 206, 210	-	4
CUPVB219	91, 94, 97, 101, 106, 110, 114, 116, 122	-	9
CUPVB302	168, 182, 188, 192, 199	-	5
CUPVB306	178, 185, 188, 190, 197, 198, 205	-	7
CUPVB309	289, 304, 306, 308, 315	-	5
CUPVB310	216, 219, 231	-	3
CUPVB318	251, 256	-	2

‘AAC’ tekrarı ile zenginleştirilmiş kütüphaneden geliştirilen 9 adet SSR primeri ile 6 adet *P. vera* çeşidinde yapılan PCR reaksiyonları sonucu elde edilen alleller, sayıları ve polimorfizm durumları **Çizelge 4.7**’de verilmiştir.

Primerler toplam allel sayısı bakımından değerlendirildiğinde CUPVC007, CUPVC102, CUPVC108, CUPVC116, CUPVC204 ve CUPVC313 lokuslarının 2 adet ile en az, CUPVC008 lokusunun ise en fazla (6 adet) allel sayısına sahip olduğu belirlenmiştir. CUPVC113 ve CUPVC210 lokuslarının ise 3 adet allele sahip olduğu saptanmıştır.

Polimorfik allel sayısı bakımından primerler incelendiğinde ise CUPVC007, CUPVC102, CUPVC108, CUPVC116 ve CUPVC204 SSR lokuslarının *P. vera*’da polimorfizm göstermedikleri, CUPVC008 (4 adet), CUPVC113 (3 adet) ve

CUPVC210 (3 adet) lokuslarının ise en fazla polimorfik allele sahip oldukları belirlenmiştir.

Sonuç olarak, ‘AAC’ kütüphanesinden geliştirilen 9 adet SSR lokusundan 4 tanesi (%44.4) polimorfizm göstermiş olup, toplam 24 allel elde edilmiş ve bu allellerin 12 tanesi (%50.0) *P. vera*’da polimorfizm göstermiştir.

Çizelge 4.7. ‘AAC’ tekrarı ile zenginleştirilmiş kütüphaneden geliştirilen 9 adet SSR primerinin *P. vera*’da allel büyüklükleri, sayıları ve polimorfizm durumları

Lokus Adı	Alleller	Polimorfik Olmayan Alleller	Toplam Allel Sayısı
CUPVC007	219, 224	219, 224	2
CUPVC008	185, 193, 196, 199, 202, 210	185, 210	6
CUPVC102	149, 161	149, 161	2
CUPVC108	175, 187	175, 187	2
CUPVC113	266, 280, 286	-	3
CUPVC116	141, 153	141, 153	2
CUPVC204	152, 158	152, 158	2
CUPVC210	253, 264, 270	-	3
CUPVC313	284, 287	-	2

‘AAG’ tekrar dizisi ile zenginleştirilmiş kütüphaneden geliştirilen 18 adet SSR primer çifti kullanılarak 6 adet *P. vera* çeşidinde bu primerlerin PCR amplifikasyonu sonucunda elde edilen alleller, büyüklükleri, sayıları ve polimorfizm durumları **Çizelge 4.8**’de verilmiştir.

Geliştirilen primerler toplam allel sayısı bakımından değerlendirildiğinde, CUPVD004 ve CUPVD307 SSR lokuslarının en az (1 adet), CUPVD205 ve CUPVD309 (7 adet), CUPVD310 (6 adet) lokuslarının ise en fazla allel sayısına sahip oldukları belirlenmiştir. CUPVD011, CUPVD214 ve CUPVD217 lokusları ise 2 allele sahip olmuşlardır.

Polimorfik allel sayısı bakımından primerler incelendiğinde ise; CUPVD004 ve CUPVD307 SSR lokuslarının *P. vera*’da polimorfizm göstermedikleri belirlenmiştir. CUPVD011 ve CUPVD214 lokusları 1 adet polimorfik allel üretirken,

CUPVD309 lokusu 7 adet ve CUPVD310 lokusu ise 6 adet polimorfik allel üretmiştir.

Sonuç olarak, ‘AAG’ kütüphanesinden geliştirilen 18 adet SSR lokusundan 16 tanesi (%88.9) polimorfizm göstermiş olup, toplam 61 allel elde edilmiş ve bu allellerin 50 tanesi (%82.0) *P. vera*’da polimorfizm göstermiştir.

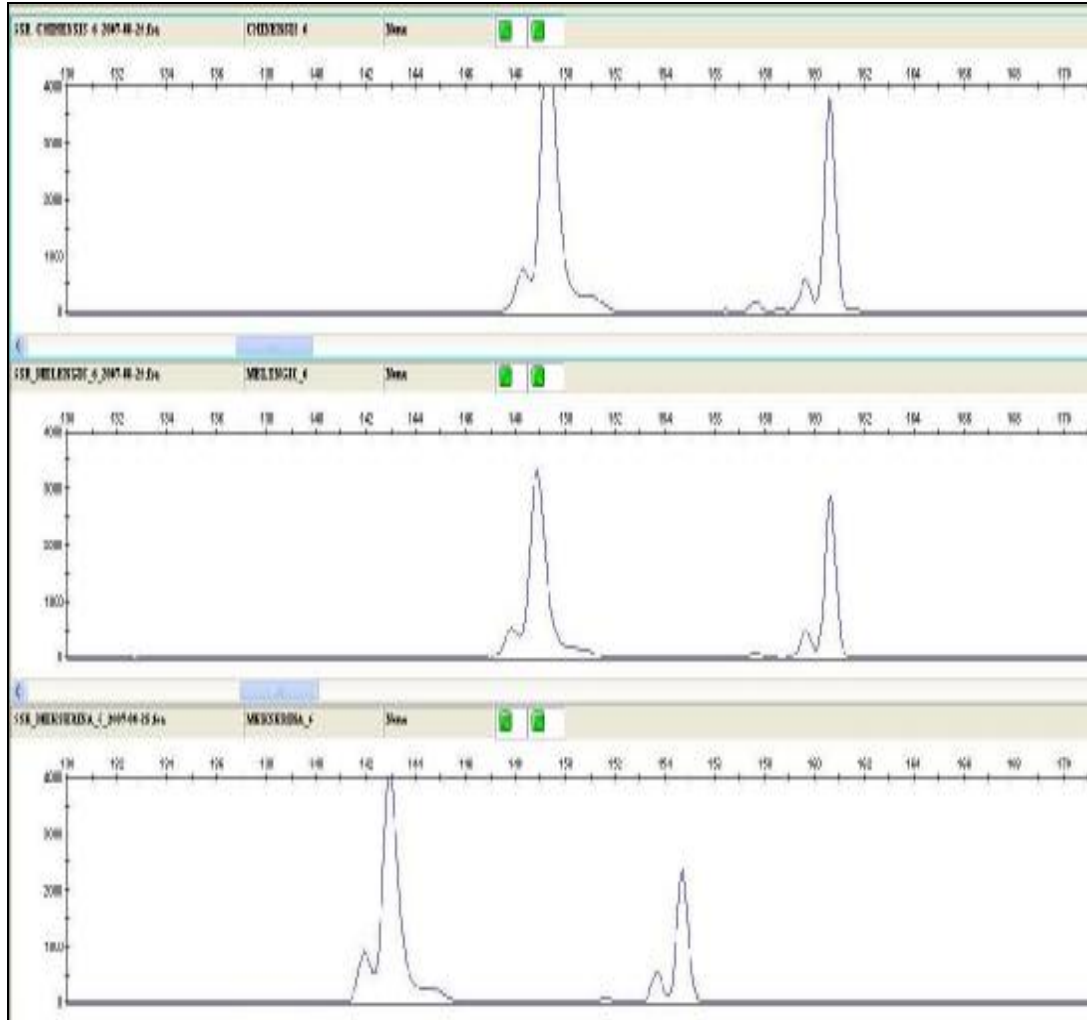
Çizelge 4.8. ‘AAG’ tekrarı ile zenginleştirilmiş kütüphaneden geliştirilen 18 adet SSR primerinin *P. vera*’da allel büyüklükleri, sayıları ve polimorfizm durumları

Lokus Adı	Alleller	Polimorfik Olmayan Alleller	Toplam Allel Sayısı
CUPVD002	244, 245, 259	-	3
CUPVD004	162	162	1
CUPVD011	262, 268	268	2
CUPVD103	110, 124, 133	-	3
CUPVD109	188, 191, 192	-	3
CUPVD117	161, 166, 172, 178	178	4
CUPVD118	188, 190, 208	-	3
CUPVD120	251, 254, 267	251	3
CUPVD201	183, 186, 189	-	3
CUPVD205	173, 188, 207, 210, 213, 219, 250	188, 219, 250	7
CUPVD207	308, 311, 316	308	3
CUPVD211	153, 158, 164, 170	-	4
CUPVD213	197, 210, 216	-	3
CUPVD214	145, 157	157	2
CUPVD220	176, 188, 202	188	3
CUPVD307	290	290	1
CUPVD309	196, 199, 200, 204, 207, 214, 219	-	7
CUPVD310	146, 149, 153, 155, 157, 164	-	6

Dört farklı kütüphaneden elde edilen alleller birlikte değerlendirildiğinde, analizi yapılan toplam 59 lokusun 48 tanesinin (%81.3) *P. vera*’da polimorfik olduğu saptanmıştır. Ayrıca toplam 59 lokustan 203 allel elde edilmiş ve bu allellerin 172 tanesi (%84.7) *P. vera*’da polimorfizm göstermiştir. Bu sonuçlara göre en düşük değerler ‘AAC’ kütüphanesinden geliştirilen primerlerden elde edilmiştir.

4.4. Geliştirilen SSR Primerlerinin Yabani *Pistacia* Türlerindeki Amplifikasyonu ile Polimorfizm Durumları ve Allel Büyüklükleri

‘CA’ tekrar dizisi ile zenginleştirilmiş kütüphaneden elde edilen ve agaroz jelde bant verdiği tespit edilen 15 adet SSR primerinin allel büyüklüklerinin, sayısının ve polimorfizm durumlarının belirlenmesi ABI 3130xl genetik analizör cihazında yapılmıştır. Geliştirilen primer çiftlerinin yabani *Pistacia* türlerinde ABI 3130xl genetik analizör cihazında yapılan elektroforezinden elde edilen elektroferograma ait bir görüntü **Şekil 4.4**’de verilmiştir.



Şekil 4.4 CUPVC102 lokusunun ABI 3130xl genetik analizör cihazında elektroforezinin yapılması sonucunda elde edilen elektroferogram görüntüsü (1. PC-122.10, 2. PT-9F, 3. PM-0104)

‘CA’ tekrar dizisi ile zenginleştirilmiş kütüphaneden elde edilen ve agaroz jelde bant verdiği tespit edilen 15 adet SSR primerinin sekiz yabancı *Pistacia* türünde ABI 3130xl genetik analizör cihazı kullanılarak test edilmesi sonucu elde edilen polimorfik ve polimorfik olmayan alleller ile toplam allel sayıları ise **Çizelge 4.9**’da verilmiştir.

Geliştirilen primerler toplam allel sayısı bakımından karşılaştırıldığında, CUPVA005, CUPVA006 ve CUPVA310 SSR lokuslarının en az (1 adet), CUPVA114 lokusunun ise 11 allel ile en fazla alleli verdiği ve bu primeri 9 adet allel ile CUPVA111, 8 adet ile CUPVA318, 6 adet allel ile CUPVA313, 5 adet allel ile CUPVA112, 4 adet allel ile CUPVA120 ve CUPVA210, 3 adet allel ile CUPVA102, CUPVA105, CUPVA213, CUPVA216 ve CUPVA220 lokuslarının izlediği belirlenmiştir.

Primerler polimorfik allel sayısı bakımından incelendiğinde ise; tüm primer çiftlerinden elde edilen alleller polimorfik olduğu için %100 polimorfizm elde edilmiştir.

Sonuç olarak, ‘CA’ kütüphanesinden geliştirilen 15 adet SSR lokusundan 15 tanesi (%100) polimorfizm göstermiş olup, toplam 65 allel elde edilmiş ve bu allellerin 65 tanesi (%100) yabancı *Pistacia* türünde polimorfizm göstermiştir.

Çizelge 4.9. ‘CA’ tekrarı ile zenginleştirilmiş kütüphaneden elde edilen 15 adet SSR primer çiftinin yabancı *Pistacia* türlerindeki polimorfizm durumları ve allel büyüklükleri

Lokus Adı	Alleller	Polimorfik Olmayan Alleller	Toplam Allel Sayısı
CUPVA005	267	-	1
CUPVA006	219	-	1
CUPVA102	261, 262, 265	-	3
CUPVA105	190, 196, 225	-	3
CUPVA111	310, 314, 320, 322, 327, 328, 336, 343, 348	-	9
CUPVA112	174, 179, 182, 188, 191	-	5
CUPVA114	202, 206, 208, 211, 217, 218, 219, 224, 229, 253, 255	-	11
CUPVA120	351, 360, 373, 382	-	4

Çizelge 4.9'un devamı

Lokus Adı	Alleller	Polimorfik Olmayan Alleller	Toplam Allel Sayısı
CUPVA210	251, 254, 258, 412	-	4
CUPVA213	225, 228, 230	-	3
CUPVA216	160, 162, 165	-	3
CUPVA220	273, 275, 277	-	3
CUPVA310	171	-	1
CUPVA313	261, 265, 268, 270, 274, 278	-	6
CUPVA318	222, 238, 244, 248, 252, 263, 272, 286	-	8

‘GA’ tekrarı ile zenginleştirilmiş kütüphaneden elde edilen ve agaroz jelde bant verdiği belirlenen 17 adet SSR primerinin 9 yabancı *Pistacia* türünde ABI 3130xl genetik analizör cihazı kullanılarak test edilmesi sonucu elde edilen polimorfik ve polimorfik olmayan alleller ile toplam allel sayıları **Çizelge 4.10**’da verilmiştir.

Geliştirilen primerler toplam allel sayısı bakımından incelendiğinde, CUPVB101 ve CUPVB118 lokuslarının yabancı *Pistacia* türlerinde allel vermediği belirlenmiştir. CUPVB112 SSR lokusunun en az (2 adet), CUPVB208 SSR lokusunun ise 11 allel ile en fazla alleli verdiği ve bu primeri 10 adet allel ile CUPVB302, 9 adet allel ile CUPVB108, 8 adet ile CUPVB217 ve CUPVB309, 7 adet allel ile CUPVB219, 6 adet allel ile CUPVB005, CUPVB009, CUPVB114 ve CUPVB310, 4 adet allel ile CUPVB306 ve 3 adet allel ile CUPVB010, CUPVB106 ile CUPVB318 lokuslarının izlediği belirlenmiştir.

Primerler polimorfik allel sayısı bakımından incelendiğinde ise aynı sayıda sonuçlar elde edilmiştir. Çünkü tüm primerler polimorfik bant üretmişlerdir.

Sonuç olarak, ‘GA’ kütüphanesinden geliştirilen 17 adet SSR lokusundan 15 tanesi (%88.2) polimorfizm göstermiş olup, toplam 92 allel elde edilmiş ve bu allellerin 92 tanesi (%100) de yabancı *Pistacia* türlerinde polimorfizm göstermiştir.

Çizelge 4.10. ‘GA’ tekrarı ile zenginleştirilmiş kütüphaneden elde edilen 17 adet SSR primer çiftinin yabancı *Pistacia* türlerindeki polimorfizm durumları ve allel büyüklükleri

Lokus Adı	Alleller	Polimorfik Olmayan Alleller	Toplam Allel Sayısı
CUPVB005	327, 328, 331, 336, 346, 348	-	6
CUPVB009	179, 183, 185, 187, 189, 191	-	6
CUPVB010	264, 275, 277	-	3
CUPVB101	-	-	-
CUPVB106	185, 197, 199	-	3
CUPVB108	283, 285, 287, 294, 297, 299, 300, 311, 328	-	9
CUPVB112	155, 157	-	2
CUPVB114	205, 208, 211, 215, 219, 227	-	6
CUPVB118	-	-	-
CUPVB208	145, 150, 157, 162, 173, 181, 184, 189, 192, 194, 196	-	11
CUPVB217	181, 190, 193, 197, 201, 203, 205, 216	-	8
CUPVB219	94, 99, 101, 104, 110, 114, 135	-	7
CUPVB302	153, 156, 160, 162, 165, 167, 173, 175, 177, 182	-	10
CUPVB306	170, 181, 188, 194	-	4
CUPVB309	209, 289, 298, 302, 304, 306, 311, 317	-	8
CUPVB310	197, 202, 203, 204, 207, 212	-	6
CUPVB318	249, 256, 262	-	3

‘AAC’ tekrarı ile zenginleştirilmiş kütüphaneden elde edilen ve agaroz jelde bant verdiği tespit edilen 9 adet SSR primerinin 9 yabancı *Pistacia* türünde ABI 3130xl genetik analizör cihazı kullanılarak test edilmesi sonucu elde edilen polimorfik ve polimorfik olmayan alleller ile toplam allel sayıları **Çizelge 4.11**’de verilmiştir.

Geliştirilen primerler toplam allel sayısı bakımından karşılaştırıldığında CUPVC113 SSR lokusunun en az (2 adet), CUPVC008 lokusunun ise 11 allel ile en fazla alleli verdiği ve bu primeri 8 adet allel ile CUPVC102, 6 adet allel ile CUPVC116 ve CUPVC210, 5 adet allel ile CUPVC007 ve CUPVC204, 4 adet allel ile CUPVC108 ve 3 adet allel ile CUPVC313 lokuslarının izlediği belirlenmiştir.

Primerler polimorfik allel sayısı bakımından incelendiğinde ise tüm lokusların yabancı *Pistacia* türlerinde polimorfik olduğu belirlenmiştir.

Sonuç olarak, ‘AAC’ kütüphanesinden geliştirilen 9 adet SSR lokusundan 9 tanesi (%100) polimorfizm göstermiş olup, toplam 50 allel elde edilmiş ve bu allellerin 50 tanesi (%100) de yabani *Pistacia* türlerinde polimorfizm göstermiştir.

Çizelge 4.11. ‘AAC’ tekrarı ile zenginleştirilmiş kütüphaneden elde edilen 9 adet SSR primer çiftinin yabani *Pistacia* türlerindeki polimorfizm durumları ve allel büyüklükleri

Lokus Adı	Alleller	Polimorfik Olmayan Alleller	Toplam Allel Sayısı
CUPVC007	210, 219, 221, 224, 227	-	5
CUPVC008	163, 179, 185, 187, 189, 193, 196, 199, 202, 208, 210	-	11
CUPVC102	143, 146, 149, 152, 155, 158, 161, 164	-	8
CUPVC108	175, 180, 187, 193	-	4
CUPVC113	276, 286	-	2
CUPVC116	136, 138, 147, 150, 157, 162	-	6
CUPVC204	141, 152, 154, 158, 160	-	5
CUPVC210	242, 246, 258, 260, 264, 268	-	6
CUPVC313	284, 287, 293	-	3

‘AAG’ tekrarı ile zenginleştirilmiş kütüphaneden elde edilen ve agaroz jelde bant verdiği tespit edilen 18 adet SSR primerinin 9 yabani *Pistacia* türünde ABI 3130xl genetik analizör cihazı kullanılarak test edilmesi sonucu elde edilen polimorfik ve polimorfik olmayan alleller ile toplam allel sayıları **Çizelge 4.12’de** verilmiştir.

Geliştirilen primerler toplam allel sayısı bakımından karşılaştırıldığında CUPVD307 lokusunun yabani *Pistacia* türlerinde allel vermediği belirlenmiştir. CUPVD213 SSR lokusunun en az (1 adet), CUPVD205 SSR lokusunun ise 15 allel ile en fazla alleli verdiği ve bu primeri 9 adet ile CUPVD211, 8 adet allel ile CUPVD002, 7 adet allel ile CUPVD117, 6 adet allel ile CUPVD120, 5 adet allel ile CUPVD201, CUPVD207 ve CUPVD310, 4 adet allel ile CUPVD011, CUPVD011, CUPVD103, CUPVD109, CUPVD220 ve CUPVD309, 3 adet allel ile CUPVD214, 2 adet allel ile CUPVD004 ve CUPVD118 lokuslarının izlediği belirlenmiştir.

Primerler polimorfik allel sayısı bakımından incelendiğinde ise aynı sayıda sonuçlar elde edilmiştir. Çünkü tüm primerler polimorfik bant üretmişlerdir.

Sonuç olarak, ‘AAG’ kütüphanesinden geliştirilen 18 adet SSR lokusundan 17 tanesi (%94.4) polimorfizm göstermiş olup, toplam 88 allel elde edilmiş ve bu allellerin 88 tanesi (%100) de yabani *Pistacia* türünde polimorfizm göstermiştir.

Çizelge 4.12. ‘AAG’ tekrarı ile zenginleştirilmiş kütüphaneden elde edilen 18 adet SSR primer çiftinin yabani *Pistacia* türlerindeki polimorfizm durumları ve allel büyüklükleri

Lokus Adı	Alleller	Polimorfik Olmayan Alleller	Toplam Allel Sayısı
CUPVD002	236, 242, 249, 251, 256, 259, 260, 262	-	8
CUPVD004	162, 164	-	2
CUPVD011	250, 253, 262, 273	-	4
CUPVD103	110, 117, 124, 133	-	4
CUPVD109	173, 179, 185, 191	-	4
CUPVD117	161, 164, 166, 172, 175, 178, 180	-	7
CUPVD118	180, 193	-	2
CUPVD120	213, 245, 251, 254, 262, 267	-	6
CUPVD201	131, 140, 186, 189, 196	-	5
CUPVD205	172, 184, 191, 201, 205, 213, 214, 217, 221, 224, 228, 230, 242, 249, 266	-	15
CUPVD207	283, 305, 308, 316, 318	-	5
CUPVD211	139, 147, 150, 153, 158, 160, 162, 170, 186	-	9
CUPVD213	210	-	1
CUPVD214	145, 148, 151	-	3
CUPVD220	174, 176, 188, 192	-	4
CUPVD307	-	-	-
CUPVD309	196, 199, 207, 214	-	4
CUPVD310	155, 157, 162, 171, 179	-	5

Dört farklı kütüphaneden elde edilen alleller birlikte değerlendirildiğinde, analizi yapılan toplam 59 lokusun 56 tanesinin (%94.9) yabani *Pistacia* türlerinde bant verdiği belirlenmiştir. Ayrıca toplam 56 lokustan 295 allel elde edilmiş ve bu allellerin hepsi (%100.0) yabani *Pistacia* türlerinde polimorfizm göstermiştir.

4.5. Geliştirilen SSR Primerlerinin Genel Değerlendirilmesi

Siirt çeşidi DNA'sı kullanılarak oluşturulan dört farklı motif ile zenginleştirilen 'CA', 'GA', 'AAC' ve 'AAG' kütüphanelerinden toplam 228 klonun sekansı yapılmıştır. Sekanslanan bu 228 klon içerisinde 68 (%30) tanesinin duplike klonlar olduğu belirlenmiştir. **Testolin ve ark. (2004)** 'AC' tekrarlarıyla bademde zenginleştirdikleri genomik kütüphanede 93 klonun sekansını yapmışlar ve sekanslanan 93 klondan %28'nin ise duplike klonlar olduğunu bildirmişlerdir. **Dirlewanger ve ark. (2002)** 'CT' tekrarlarıyla şeftalide zenginleştirdikleri kütüphanede 162 klonun sekansını yapmışlar ve sekansladıkları 162 klon içerisinde 104 adet (%64) klonun duplike olduğunu bildirmişlerdir. **Messina ve ark. (2004)** 'AG' tekrarlarıyla kayısıda zenginleştirdikleri genomik kütüphanede 127 klonun sekansını yapmışlar ve sekansladıkları bu 127 klon içerisinde ise %9'unun duplike olduğunu belirtmişlerdir. Görüldüğü gibi duplike klon sayısı literatürde %9 ile %64 arasında değişmiştir. Bu çalışmada bulunan %30 değeri ise literatürdeki sonuçlara göre orta bir değerdir.

Bu çalışmada duplike klonlar çıkarıldıktan sonra geriye kalan 160 (%70) klonda tekrar dizisi aranmış olup toplam 94 klonda (58.7) 99 adet tekrar dizisi belirlenmiştir. Bu tekrar dizilerinin bulunduğu bölgelerin 84 tanesinde primer dizaynı yapılabilmektedir. Geliştirilen primer çiftlerinin %3'lük agaroz jelde test edilmesi sonucunda 59 (%70.2) tanesinin bant verdiği belirlenmiştir.

Aranzana ve ark. (2002) (CT)/(AG) tekrarlarıyla şeftalide zenginleştirdikleri genomik kütüphanede sekanslanan 52 klon içerisinde %87'sinin tekrar dizisi içerdiğini, 45 adet klon içinden 3 tanesinin duplike olduğunu, böylece geriye kalan 42 klondan %83'ünde primer dizaynı yapıldığını bildirmişlerdir. **Testolin ve ark. (2004)** 'AC' tekrarlarıyla bademde zenginleştirdikleri genomik kütüphanede sekanslanan 93 klon içerisinde %47'sinin primere dönüştüğünü bildirmişlerdir. **Dirlewanger ve ark. (2002)** 'CT' tekrarlarıyla şeftalide zenginleştirdikleri kütüphanede duplike olanlar çıkarıldıktan sonra geriye kalan 58 adet klonun hepsinin tekrar dizisi içerdiğini ve bunlardan 42 adet klonda primer dizayn gerçekleştirildiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar başlangıçta sekanslanan 162 klondan %26'sının primere

dönüştüğünü bildirmişlerdir. **Sosinski ve ark. (2000)** ‘CT’, ‘CA’ ve ‘AGG’ tekrarlarıyla şeftalide zenginleştirdikleri genomik kütüphaneden 22 adet klonun sekansını yapmışlar ve %45’inden primer geliştirmişlerdir. **Lopes ve ark. (2002)** ‘GA’ ve ‘CA’ tekrarlarıyla kayısıda zenginleştirdikleri genomik kütüphanelerden 38 klonu sekanslamışlar ve %74’ünden primer dizaynı yapıldığını bildirmişlerdir. **Graham ve ark. (2002)** ise bir *Rubus* türünün DNA’sını kullanarak genomik kütüphane oluşturmuşlar ve bu kütüphaneyi (AC) ve (AG) tekrarlarıyla zenginleştirerek 258 klonun sekansını yaparak bunlardan %60’ının primere dönüştüğünü bildirmişlerdir. **Mnejja ve ark. (2004)** Japon erik çeşidi olan Santa Rosa’nın DNA’sını kullanarak genomik kütüphane oluşturmuşlar ve oluşturdukları bu genomik kütüphaneyi CT/AG tekrarlarıyla zenginleştirmişlerdir. Bu kütüphaneden 85 klonu sekanslamış ve %53’ünün primere (45 adet) dönüştüğünü ve 45 adet primer içerisinde ise %84’ünün amplifikasyon verdiğini saptamışlardır. **Silfverberg ve ark. (2006)** ‘AAG’, ‘AAC’, ‘ATC’, ‘GA’ ve ‘GT’ tekrarlarını kullanarak elmada zenginleştirdikleri genomik kütüphanelerden 148 klon sekanslamışlar ve %79’unun primere dönüştüğünü bildirmişlerdir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar literatürdeki sonuçlar ile karşılaştırıldığında orta değerler elde edildiği belirlenmiştir.

Agaroz jelde bant veren toplam 59 primer çifti ABI 3130xl genetik analizör cihazında *P. vera* çeşitleri ile *Pistacia* türlerinde test edilmiştir. *P. vera*’da 59 lokustan 48 tanesi (%81.3) polimorfik bulunmuş, elde edilen toplam 203 allelden 172 tanesi (%84.7) polimorfizm göstermiştir. Yabani *Pistacia* türlerinde ise toplam 59 lokustan 56 tanesinde (%94.9) amplifikasyon olmuştur. Toplam 56 primer çiftinden 295 adet allel elde edilmiş ve bunların tümü (%100) de polimorfizm göstermiştir.

ABI 3130xl genetik analizör cihazında *P. vera* ve yabani *Pistacia* türlerinde test edilen toplam 59 adet primer çiftinin genel değerlendirilmesi **Çizelge 4.13**’de verilmiştir.

Çizelge 4.13. ‘CA’, ‘GA’, ‘AAC’ ve ‘AAG’ tekrarları ile zenginleştirilmiş kütüphanelerden kullanılan 59 adet SSR primer çiftinin *Pistacia* türlerinden ve *P. vera* çeşitlerinden elde edilen tahmini bant büyüklükleri, allel aralığı, allel sayısı, markör tipi ve markör kalitesi

Lokus Adı	TBB (bç)	Allel Aralığı		Allel Sayısı		Markör Tipi	Markör * Kalitesi
		<i>Pistacia</i>	<i>P. vera</i>	<i>Pistacia</i>	<i>P. vera</i>		
CUPVA005	195	267	182-255	1	5	TL	Temiz
CUPVA006	243	219	216-219	1	2	TL	Temiz
CUPVA102	249	261-265	261-267	3	3	TL	Temiz
CUPVA105	218	190-225	228	3	1	TL	Temiz
CUPVA111	321	310-348	324-345	9	3	TL	Temiz
CUPVA112	241	174-191	179-201	5	2	TL	Kirli
CUPVA114	235	202-255	206-263	11	8	ÜL	Ekstra Bant
CUPVA120	333	351-382	360-387	4	3	TL	Ekstra Bant
CUPVA210	228	251-412	247-258	4	3	TL	Temiz
CUPVA213	215	225-230	205-230	3	5	TL	Temiz
CUPVA216	189	160-165	160	3	1	TL	Ekstra Bant
CUPVA220	248	273-277	249-277	3	5	TL	Temiz
CUPVA310	161	171	176-188	1	3	TL	Temiz
CUPVA313	305	261-278	263-294	6	3	TL	Temiz
CUPVA318	252	222-286	258-275	8	4	TL	Temiz
CUPVB005	322	327-348	336-348	6	3	TL	Ekstra Bant
CUPVB009	182	179-191	187-205	6	6	TL	Temiz
CUPVB010	246	264-277	264-274	3	4	TL	Ekstra Bant
CUPVB101	224	-	238-240	-	2	TL	Ekstra Bant
CUPVB106	175	185-199	189-194	3	2	TL	Ekstra Bant
CUPVB108	311	283-328	287-335	9	5	TL	Temiz
CUPVB112	150	155-157	155	2	1	TL	Ekstra Bant
CUPVB114	169	205-227	211-221	6	2	TL	Ekstra Bant
CUPVB118	184	-	204-210	-	3	TL	Temiz
CUPVB208	188	145-196	181-205	11	4	TL	Temiz
CUPVB217	185	181-216	199-210	8	4	TL	Temiz
CUPVB219	102	94-135	91-122	7	9	İL	Temiz
CUPVB302	171	153-182	168-199	10	5	TL	Temiz
CUPVB306	180	170-194	178-205	4	7	TL	Temiz
CUPVB309	286	209-317	289-315	8	5	TL	Ekstra Bant
CUPVB310	217	197-212	216-231	6	3	TL	Ekstra Bant
CUPVB318	234	249-262	251-256	3	2	TL	Ekstra Bant
CUPVC007	228	210-227	219-224	5	2	TL	Ekstra Bant
CUPVC008	175	163-210	185-210	11	6	İL	Ekstra Bant
CUPVC102	146	143-164	149-161	8	2	İL	Temiz
CUPVC108	167	175-193	175-187	4	2	TL	Temiz

Çizelge 4.13'ün devamı

Lokus Adı	TBB (bç)	Allel Aralığı		Allel Sayısı		Markör Tipi	Markör * Kalitesi
		<i>Pistacia</i>	<i>P. vera</i>	<i>Pistacia</i>	<i>P. vera</i>		
CUPVC113	265	276-286	266-286	2	3	TL	Temiz
CUPVC116	135	136-162	141-153	6	2	TL	Temiz
CUPVC204	159	141-160	152-158	5	2	TL	Ekstra Bant
CUPVC210	249	242-268	253-270	6	3	TL	Temiz
CUPVC313	273	284-293	284-287	3	2	TL	Temiz
CUPVD002	239	236-262	244-259	8	3	TL	Ekstra Bant
CUPVD004	145	162-164	162	2	1	TL	Ekstra Bant
CUPVD011	254	250-273	262-268	4	2	TL	Temiz
CUPVD103	118	110-133	110-133	4	3	TL	Ekstra Bant
CUPVD109	176	173-191	188-192	4	3	TL	Temiz
CUPVD117	160	161-180	161-178	7	4	TL	Ekstra Bant
CUPVD118	192	180-193	188-208	2	3	TL	Temiz
CUPVD120	247	213-267	251-267	6	3	TL	Temiz
CUPVD201	171	131-196	183-189	5	3	TL	Temiz
CUPVD205	171	172-266	173-250	15	7	ÜL	Kirli
CUPVD207	295	283-318	308-316	5	3	TL	Ekstra Bant
CUPVD211	153	139-186	153-170	9	4	TL	Ekstra Bant
CUPVD213	198	210	197-216	1	3	TL	Temiz
CUPVD214	140	145-151	145-157	3	2	TL	Temiz
CUPVD220	284	174-192	176-202	4	3	TL	Temiz
CUPVD307	275	-	290	-	1	TL	Ekstra Bant
CUPVD309	218	196-214	196-219	4	7	TL	Ekstra Bant
CUPVD310	138	155-179	146-164	5	6	TL	Temiz

CU: Çukurova Üniversitesi, PV: *Pistacia vera*, A: CA Kütüphanesinin Kodu, B: GA Kütüphanesinin Kodu, C: AAC Kütüphanesinin Kodu, D: AAG Kütüphanesinin Kodu, TBB: Tahmini Bant Büyüklüğü, TL: Tek Lokuslu, İL: İki Lokuslu, ÜL: Üç Lokuslu, * Materyal ve Metod bölümünde açıklanmıştır.

Çizelge 4.13'deki markör tipi durumu incelendiğinde CUPVB219, CUPVC008 ve CUPVC102 SSR primerleri iki lokuslu bulunurken, CUPVA114 ve CUPVD205 SSR primerleri üç lokuslu, diğer 54 adet SSR primeri ise tek lokuslu olarak belirlenmiştir.

Ayrıca Çizelge 4.13'de yer alan primerlere ait allel sayısı yabani *Pistacia* türlerinde incelendiğinde en fazla allel sayısına CUPVD205 nolu SSR primerinin (15 adet), en az allel sayısına ise CUPVA005, CUPVA006, CUPVA310 ve CUPVD213 SSR lokuslarının (1 adet) sahip olduğu belirlenmiştir. *P. vera* çeşitleri içinde ise en fazla allel sayısına CUPVB219 SSR lokusunun (9 adet), en az allel sayısına ise

CUPVA105, CUPVA216, CUPVB112, CUPVD004 ve CUPVD307 lokuslarının (1 adet) sahip olduğu bulunmuştur. Bununla birlikte, bazı lokusların ise sadece *P. vera* çeşitlerine özgü allel verdiği belirlenmiştir. Sadece *P. vera*'ya özgü allel veren lokusların CUPVB101, CUPVB118 ve CUPVD307 oldukları belirlenmiştir. Sadece yabani *Pistacia* türlerine özgü allel veren primere ya da primerlere ise rastlanılmamıştır.

Bunun yanı sıra **Çizelge 4.13**'de bulunan primerler markör kalitesi yönünden de incelendiğinde CUPVA112 ve CUPVD205 SSR lokuslarının kirli bant; CUPVA114, CUPVA120, CUPVA216, CUPVB005, CUPVB010, CUPVB101, CUPVB106, CUPVB112, CUPVB114, CUPVB309, CUPVB310, CUPVB318, CUPVC007, CUPVC008, CUPVC204, CUPVD002, CUPVD004, CUPVD103, CUPVD117, CUPVD207, CUPVD211, CUPVD307 ve CUPVD309 lokuslarının ekstra bant; geriye kalan SSR lokuslarının ise temiz bantlar verdiği belirlenmiştir.

Bassil ve ark. (2005) 'CA', 'GA' ve 'GAA' tekrarlarını kullanarak zenginleştirdikleri genomik kütüphaneden 25 klon dizayn etmişlerdir. 'CA' tekrarıyla zenginleştirilmiş kütüphanedeki primerler markör kalitesi yönünden % 35 temiz bant ve %65 ise ekstra bant vermiştir. 'GA' tekrarıyla zenginleştirilmiş kütüphanedeki primerler markör kalitesi yönünden %88 temiz bant vermiş, 'GAA' tekrarlarıyla zenginleştirilmiş kütüphanedeki primerler ise markör kalitesi yönünden %47.7 temiz bant, %38 kirli bant, %14.3 ise ekstra bant verdiğini bildirmişlerdir.

4.6. *Pistacia* Tür ve *P. vera* Çeşitlerinin Geliştirilen SSR Primerleri ile Karakterizasyonu

4.6.1. SSR Primer Çiftlerinin *P. vera* ve Yabani *Pistacia* Türlerinde Polimorfizm Durumu ve Ayırma Gücü

SSR-PCR analizlerinde 13 primer çifti 46 *Pistacia* genotipine uygulanmıştır. Elde edilen amplifikasyon ürünleri var (1) ve yok (0) şeklinde değerlendirilmiştir. Bu değerlendirme sonucu elde edilen toplam allel sayıları (TAS), polimorfik allel

sayıları (PAS) hem *P. vera*'da, hem yabani *Pistacia* türlerinde ve hem de analiz edilen tüm 46 *Pistacia* genotipi için **Çizelge 4.14'**de verilmiştir.

Çizelge 4.14. SSR primer çiftlerinin *P. vera*'da, yabani *Pistacia* türlerinde ve 46 *Pistacia* genotipindeki toplam allel sayısı ve polimorfik allel sayısı

No	Lokus Adı	Tekrar Dizisi	46 Genotip		<i>P. vera</i>		Yabani <i>Pistacia</i> Türleri	
			TAS	PAS	TAS	PAS	TAS	PAS
1	CUPVA120	(AC) ₁₉ (AT) ₅	8	8	5	5	4	4
2	CUPVB009	(CT) ₁₂ C(CT) ₅	10	10	6	6	6	6
3	CUPVB108	(TC) ₂₀ (AC) ₉	14	13	6	4	11	10
4	CUPVB114	(CT) ₅	26	26	14	2	26	26
5	CUPVB217	(AG) ₈	9	9	5	5	6	6
6	CUPVB219	(CT) ₁₉	12	12	6	6	10	10
7	CUPVB302	(GA) ₁₂ GG(GA) ₇	14	14	4	4	10	10
8	CUPVB309	(CT) ₁₅	15	15	8	8	14	14
9	CUPVB318	(TC) ₄	25	25	9	4	22	22
10	CUPVD002	(TTC) ₁₃	11	10	5	4	8	6
11	CUPVD120	(AGA) ₉	9	7	3	0	9	7
12	CUPVD207	(GAA) ₇	7	7	3	2	6	6
13	CUPVD211	(GAA) ₁₀	9	9	3	3	8	8
Toplam			169	165	77	53	140	135
Ortalama			13,0	12,7	5,9	4,1	10,8	10,4

CU: Çukurova Üniversitesi, PV: *Pistacia vera*, A: CA Kütüphanesinin Kodu, B: GA Kütüphanesinin Kodu, C: AAC Kütüphanesinin Kodu, D: AAG Kütüphanesinin Kodu, TBB: Tahmini Bant Büyüklüğü, TBS: Toplam Bant Sayısı, PBS: Polimorfik Bant Sayısı.

Çalışmada kullanılan 13 adet SSR primeri değerlendirildiğinde; 46 *Pistacia* genotipinde toplam 169 adet allel elde edilmiş, bunların 165 adedi polimorfik bulunmuştur. Primer başına düşen toplam allel sayısı 7–26 (ortalama 13.0) arasında değişmiş, primer başına düşen polimorfik allel sayısı ise 7–26 (ortalama 12.7) arasında değişim göstermiştir. Toplam allel sayısı açısından CUPVD207 lokusu en düşük (7 adet) allel sayısını üretmiş olup, CUPVB114 lokusu ise en fazla (26 adet) alleli vermiştir. Polimorfik allel sayısı bakımından ise, CUPVD120 ve CUPVD207 lokusları en düşük sayıda (7 adet) allel üretirken, CUPVB114 SSR primerinden ise en yüksek sayıda (26 adet) polimorfik allel elde edilmiştir.

Ayrıca çalışmada kullanılan 13 adet SSR primeri *P. vera* içerisinde değerlendirildiğinde; 22 çeşitte toplam 77 adet allel elde edilmiş, bunların 53 adedi

polimorfik bulunmuştur. Primer başına düşen toplam allel sayısı 3–14 (ortalama 5.9) arasında değişmiş, primer başına düşen polimorfik allel sayısı ise 0–8 (ortalama 4.1) arasında değişim göstermiştir. Toplam allel sayısı açısından CUPVD120, CUPVD207, CUPVD211 lokusları en düşük (3 adet) allel sayısını üretmiş olup, CUPVB114 lokusu ise en fazla (14 adet) alleli vermiştir. Polimorfik allel sayısı bakımından ise CUPVD120 lokusu polimorfizm göstermezken, CUPVB114 ile CUPVD207 SSR lokusları en düşük sayıda polimorfik allel ve CUPVB309 SSR lokusundan ise en yüksek sayıda (8 adet) polimorfik allel elde edilmiştir.

Çalışmada kullanılan 13 adet SSR primeri yabani *Pistacia* türlerinde değerlendirildiğinde; ise 24 genotipte toplam 140 adet allel elde edilmiş, bunların 135 adedi polimorfik bulunmuştur. Primer başına düşen toplam allel sayısı 4–26 (ortalama 10.8) arasında değişmiş, primer başına düşen polimorfik allel sayısı ise 4–26 (ortalama 10.4) arasında değişim göstermiştir. Toplam allel sayısı açısından CUPVA120 lokusu en düşük (4 adet) allel sayısını üretmiş olup, CUPVB114 lokusu ise en yüksek (26 adet) alleli vermiştir. Polimorfik allel sayısı bakımından ise CUPVA120 lokusu en düşük sayıda (4 adet) allel üretirken, CUPVB114 SSR primerinden ise en yüksek sayıda (26 adet) allel elde edilmiştir.

SSR-PCR ile 46 *Pistacia* genotipinin analizleri sonucunda elde edilen toplam allel sayıları (TAS), polimorfik allel sayıları (PAS), polimorfizm oranı (PO) ve bu primerlerin polimorfizm bilgi içerikleri (PBI) ile ayırma gücü (AG) değerleri **Çizelge 4.15**'de verilmiştir.

Çalışmada kullanılan 13 SSR primeri değerlendirildiğinde; toplam 169 adet allel elde edilmiş ve bunların 165 adedi polimorfik bulunmuştur. Tüm lokuslar %100 polimorfizm gösterirken, CUPVB108 lokusunda polimorfizm oranı %93, CUPVD002 lokusunda polimorfizm oranı %91, CUPVD120 lokusunda ise polimorfizm oranı %78 olarak bulunmuştur. Sonuçta, primerlerin ortalama polimorfizm oranı %97.1 olarak hesaplanmıştır. Primer başına düşen polimorfik allel sayısı 12.7 olarak bulunmuştur. **Ahmad ve ark.'nın (2005)** yaptıkları bir çalışmada, Kerman çeşidi DNA'sını kullanarak geliştirdikleri 12 primerin *P. atlantica*, *P. integerrima* ve melezlerine uygulanmasından toplam 35 allel elde edilmiş bunların 10 tanesinin polimorfik olduğu, primer başına düşen toplam allel sayısının 2–5

arasında değiştiğini ve toplam allel sayısının ortalamasının 2.9 olduğunu bildirmişlerdir. Görüleceği üzere bu çalışmada elde edilen primerler oldukça polimorfik bulunmuştur. Bunun en önemli nedeni bu çalışmada 11 *Pistacia* türünün kullanılmasıdır.

Çizelge 4.15. 46 *Pistacia* genotipinin 13 SSR primer çifti ile amplifikasyonu sonucu elde edilen toplam allel sayıları (TAS), polimorfik allel sayıları (PAS), polimorfizm oranı (PO), polimorfizm bilgi içeriği (PBI) ve primerin ayırma gücü (AG) değerleri

No	Lokus Adı	TAS	PAS	PO	PBI	AG
1	CUPVA120	8	8	100	0.935	0.343
2	CUPVB009	10	10	100	0.959	0.330
3	CUPVB108	14	13	93	0.837	0.312
4	CUPVB114	26	26	100	0.709	0.901
5	CUPVB217	9	9	100	0.971	0.275
6	CUPVB219	12	12	100	0.974	0.246
7	CUPVB302	14	14	100	0.984	0.188
8	CUPVB309	15	15	100	0.947	0.362
9	CUPVB318	25	25	100	0.857	0.501
10	CUPVD002	11	10	91	0.916	0.352
11	CUPVD120	9	7	78	0.742	0.667
12	CUPVD207	7	7	100	0.896	0.410
13	CUPVD211	9	9	100	0.955	0.300
Toplam		169	165	-	-	5.19
Ortalama		13.0	12.7	97.1	0.899	0.399

Primerlerin polimorfizm bilgi içeriği (PBI) ve ayırma gücü değerleri (AG) de çalışmada değerlendirilmiştir. Ortalama polimorfizm bilgi içeriği (PBI) değeri 0.899 olarak bulunmuştur. CUPVB114 lokusundan en düşük (0.709) polimorfizm bilgi içeriği, CUPVB302 lokusundan ise en yüksek (0.984) polimorfizm bilgi içeriği değeri elde edilmiştir. ,

Primerlerin ayırma gücü (AG) değerleri incelendiğinde toplam ayırma gücü değeri 5.19, ortalama AG değeri ise 0.399 olarak belirlenmiş olup; CUPVB302 lokusundan en düşük (0.188) toplam ayırma gücü değeri elde edilirken, CUPVB114 lokusundan ise, en yüksek (0.901) toplam ayırma gücü değeri elde edilmiştir (Çizelge 4.15).

Kafkas ve ark. (2006a) *Pistacia* gen kaynağının değişik DNA markör tekniklerinin kullanılmasıyla DNA polimorfizminin ve genetik uzaklığının belirlenmesi çalışmalarında kullandıkları 20 ISSR primerindeki ayırma gücü değerini 53.62 olarak bulmuşlardır. **Kafkas ve ark.’nın (2006b)** yaptıkları diğer çalışmada ise AFLP tekniğini kullanarak 20 antepfıstığı genotipinde, toplam 288 AFLP fragmenti bulduklarını bunlardan 136 tanesinin polimorfik olduğunu ve polimorfik allel ortalamasının ise %46.7 olduğunu bildirmişlerdir. **Kafkas’ın (2006b)** yaptığı çalışmada ise, 35 antepfıstığı genotipi arasındaki filogenetik ilişkiyi belirlemek amacı ile AFLP tekniğini kullanarak yaptığı çalışmada elde edilen bulgulara, toplam 275 allel bulduklarını bunlardan 249 tanesinin polimorfik olduğunu ve toplam allel sayısının ortalamasının 45.8, polimorfik allel sayısı ortalamasının ise 41.5 olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar polimorfizm yüzdesini %90.5, primerlerin ayırma gücü toplamını 242.6, primerlerin ayırma gücü ortalamasını 40.4, primerlerin polimorfizm bilgi içeriğini ise 0.668 olarak hesaplamışlardır.

Kafkas ve ark.’nın (2006a) yaptıkları çalışmadaki sonuçlara göre bizim elde ettiğimiz sonuç daha düşük (5.39) bulunmuştur. Bu durum da ISSR tekniğinin dominant SSR tekniğinin ise kodominant olmasından kaynaklanmaktadır. **Kafkas ve ark.’nın (2006b)** yaptıkları bu çalışmada ise elde edilen sonuçlar ile bu çalışmada elde edilen sonuçlar arasındaki farklılığın nedeni materyal farklılığından ve kullanılan tekniğin farklı olmasından kaynaklanmaktadır.

4.6.2. Antepfıstığı Genotiplerinin SSR Yöntemi ile Aralarındaki Genetik İlişkilerinin Belirlenmesi

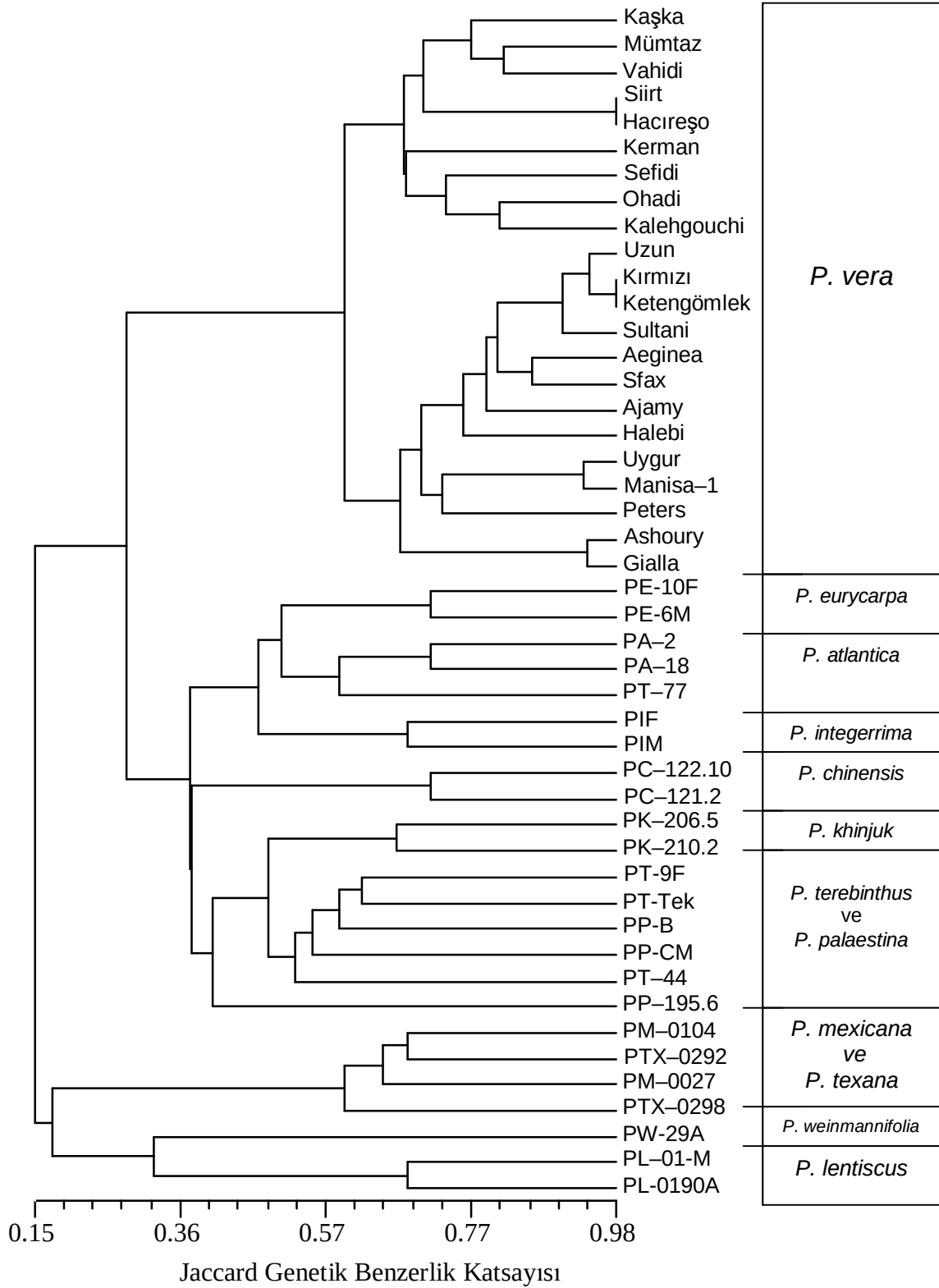
SSR analizleri sonucunda elde edilen amplifikasyon ürünlerinin istatistiksel analiz sonuçlarına göre, antepfıstığı çeşit ve *Pistacia* genotipleri arasındaki genetik benzerlik indeksinin 0.08–0.98 arasında değişim gösterdiği belirlenmiştir. Araştırmada yer alan tüm *Pistacia* türleri ve antepfıstığı çeşitleri arasındaki Jaccard genetik benzerlik katsayıları **Ek 1**’de verilmiştir.

Antepfıstığı çeşitleri genetik benzerlik açısından incelendiğinde, birbirine en yakın çeşitler sırasıyla; Ketengömlek ile Kırmızı (0.98), Hacireşo ile Siirt (0.98) bulunurken, öteki yakın çeşitler ise, Kırmızı ile Uzun (0.95), Ketengömlek ile Uzun (0.94), Manisa 1 ile Uygur (0.94), Gialla ile Ashoury (0.94) olarak saptanmıştır.

Genetik olarak en uzak *Pistacia* tür ve antepfıstığı çeşitleri ise sırasıyla; PM-0104 ile Uzun (0.08), PM-0104 ile Ashoury (0.08) ve PTX-0292 ile Ashoury (0.08) olmuştur. Sırasıyla genetik olarak en uzak diğer *Pistacia* tür ve antepfıstığı çeşitleri ise, PM-0104 ile Kaşka (0.09), PM-0104 ile Kerman (0.09), PM-0104 ile Sefidi (0.09), PM-0104 ile Mümtaz (0.09), PM-0104 ile Vahidi (0.09), PM-0104 ile Siirt (0.09), PM-0104 ile Hacireşo (0.09), PM-0104 ile Kırmızı (0.09), PM-0104 ile Ajamy (0.09), PM-0104 ile Peters (0.09), PTX-0292 ile Aeginea (0.09), PTX-0292 ile Sfax (0.09), PTX-0292 ile Gialla (0.09), PTX-0292 ile Peters (0.09), PTX-0298 ile Uzun (0.09), PTX-0298 ile Ashoury (0.09) çeşidinin olduğu belirlenmiştir.

SSR analizleri sonucunda 46 *Pistacia* tür ve çeşidinin tamamı birbirinden ayrılmıştır. Analiz sonucunda elde edilen soyağacında 2 ana grup oluşmuştur (**Şekil 4.5**). Birinci grupta *P. vera*, *P. eurycarpa*, *P. khinjuk*, *P. atlantica*, *P. integerrima*, *P. chinensis*, *P. terebinthus* ve *P. palaestina* yer almıştır. İkinci grupta ise *P. mexicana*, *P. texana*, *P. weinmannifolia* ve *P. lentiscus* yer almıştır.

Birinci ana grup iki alt gruba ayrılmıştır. Birinci alt grubu 22 adet yerli ve yabancı orijinli antepfıstığı çeşidi oluştururken ikinci alt grupta ise *P. eurycarpa*, *P. khinjuk*, *P. atlantica*, *P. integerrima*, *P. chinensis*, *P. terebinthus* ve *P. palaestina* türleri yer almıştır. Antepfıstığı çeşitleri de iki gruba ayrılmıştır. Birinci grupta İran orijinli Ohadi, Kerman, Sefidi, Kalehghochi, Kaşka, Hacireşo, Mümtaz, Vahidi çeşitleri ile Siirt çeşidi yer almıştır. İkinci grupta ise Kırmızı, Uzun, Ketengömleği, Sultani gibi Türk orijinli çeşitler ile Halebi, Ashoury, Ajamy gibi Suriye çeşitleri ve Sfax, Aeginea ve Gialla gibi Tunus, Yunanistan ve İtalya orijinli çeşitler yer almıştır.



Şekil 4.5. 12 *Pistacia* türüne ait 46 çeşit ve genotipin 13 SSR primeri ile amplifikasyonu sonucu elde edilen soyağacı

Kafkas ve ark.’nın (2006a) 69 antepfıstığı çeşidinde AFLP, ISSR ve RAPD tekniklerini kullanarak yaptıkları karakterizasyon çalışmasında İran orijinli çeşitler ile Türkiye, Suriye, Tunus, İtalya orijinli çeşitler, bu çalışmada olduğu gibi, ayrı gruplarda yer alırken Siirt ve Hacireşo çeşitler bu iki grup arasında yer almıştır. Yine bu çalışmada ikinci grupta yer alan antepfıstığı çeşitleri orijinlerine göre tam olarak ayrılmamış olup, **Kafkas ve ark. (2006a)** yaptıkları çalışmada ise ayrılmıştır. İki çalışma arasında bu farklılığın çıkmasının ana nedeni kullanılan markör tipi ve sayısıdır. Nitekim, **Kafkas ve ark. (2006a)** yaptıkları çalışmada 562 markör kullanmışlardır.

Çalışmada Ketengömlek ile Kırmızı ve Hacireşo ile Siirt’in en yakın çeşitler olduğu belirlenmiş olup bunu Kırmızı ile Uzun, Ketengömlek ile Uzun, Gialla ile Ashoury, Manisa-1 ile Uygur çeşitleri izlemiştir. Birbirine en uzak çeşitler ise sırasıyla Ashoury ile Kerman, Kırmızı ile Mümtaz, Gialla ile Kerman, Halebi ile Mümtaz, Ketengömlek ile Mümtaz, Sfax ile Mümtaz, Kırmızı ile Kaşka, Ketengömlek ile Kaşka, Ketengömlek ile Ohadi, Uzun ile Mümtaz, Ajamy ile Mümtaz olmuştur.

Birinci ana grubun ikinci alt grubu da iki gruba ayrılmıştır. Birinci grupta *P. eurycarpa*, *P. atlantica* ve *P. integerrima* türleri yer alırken, ikinci grupta ise *P. khinjuk*, *P. terebinthus* ve *P. palaestina* türleri yer almıştır. *P. chinensis* türünün ise bu iki grup arasında yer aldığı belirlenmiştir.

Birinci ana grubun ikinci alt grubunda birbirine en yakın genotipler PC-122.10 ile PC-121.2, PA-2 ile PA-18, PE-10F ile PE-6M, PIF ile PIM, PK-210.2 ile PK-206.5 ve PT-9F ile PT-Tek olurken, birbirine en uzak genotipler ise PP-195.6 ile PE-10F, PA-18 ile PP-195.6, PP-195.6 ile PE-6M, PP-195.6 ile PC-121.2 ve PT-77 ile PP-195.6 olmuştur.

Bu grupta en çarpıcı sonuç Kaliforniya’da USDA genetik kaynaklarında *P. terebinthus* olarak tanımlanmış olan PT-77 genotipinin *P. atlantica* grubunda yer almasıdır. Böylece bu genotipin *P. atlantica* olduğu belirlenmiştir. Bu sonuç da moleküler çalışmaların genetik kaynakların tanımlanmasında ne kadar önemli olduğunu ortaya koymuştur.

Yine bu alt grubun ikinci grubunda *P. terebinthus* ve *P. palaestina* türlerine ait genotipler bir arada yer alırken, *P. khinjuk* bunlardan ayrılmıştır. Kaliforniya’da bulunan USDA genetik kaynaklarından alınan *P. palaestina* türüne ait PP-195.6 genotipi bu grupta bulunan diğer genotiplerden ayrılmıştır. Bu genotipin *Pistacia* türleri arasında melez olabileceği tahmin edilmektedir.

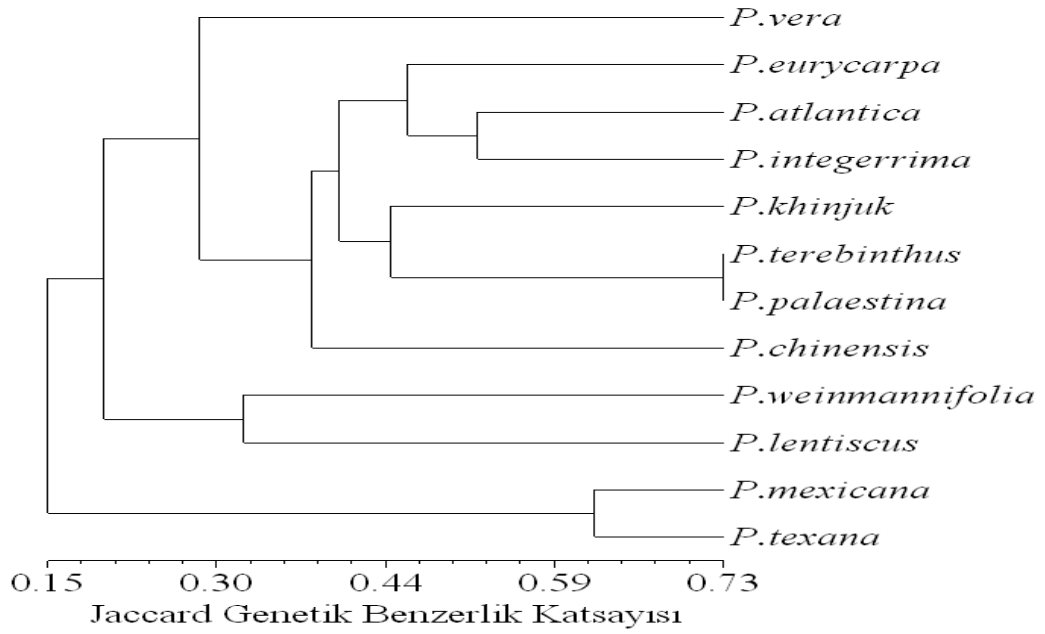
Birinci ana grubun ikinci alt grubundan çıkarılacak sonuçlardan bir tanesi de *P. vera*’ya en yakın türlerin *P. eurycarpa* ile *P. khinjuk* olduğu ancak bu iki türün birbirinden genetik olarak uzak türler olduğudur. Bunun yanında *P. terebinthus* ve *P. palaestina* türlerine ait genotipler birbirine çok yakın bulunmuş ve **Kafkas ve ark.’nın (2002)** daha önce belirttiği üzere aynı tür olabilecekleri bu çalışmada da ortaya çıkmıştır.

İkinci ana grupta da iki alt grup oluşmuştur. Birinci alt grupta *P. mexicana* ile *P. texana* yer alırken, ikinci grupta ise *P. lentiscus* ile *P. weinmannifolia* yer almıştır.

Bu grupta birbirine en yakın genotipler PTX-0292 ile PM-0104, PTX- 0292 ile PM-0027, PL-0190A ile PL-01-M ve PTX-0292 ile PTX-0298 olurken en uzak genotipler ise PL-0190A ile PTX-0298, PL-01-M ile PTX-0298, PL-0190A ile PM-0104 ve PL-01-M ile PM-0104 olmuştur.

İkinci ana grubun birinci alt grubunda yer alan *P. mexicana* ve *P. texana* genotipleri birbirlerine genetik olarak yakın akraba oldukları belirlenmiştir. **Parfitt ve Badenes (1997)** *Pistacia* türlerinin filogenetiği üzerine kloroplast genomu kullanarak yaptıkları çalışmada *P. texana* ile *P. mexicana* türlerini ayırt edememişler ve aynı tür olabileceklerini hipotez etmişlerdir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar da bu hipotezi doğrulamaktadır.

Çalışmada yer alan 12 *Pistacia* türü arasındaki genetik ilişkileri daya iyi ortaya koymak için *Pistacia* türlerine ait genetik benzerlik katsayılarının ortalamaları alınarak ve elde edilen veriler aynı paket programda analiz edilerek 12 *Pistacia* türüne ait yeni bir dendrogram oluşturulmuştur (**Şekil 4.6**). Sonuç olarak, elde edilen soyağacı 46 *Pistacia* genotipi için elde edilen dendrogram ile yüksek oranda benzerlik göstermiştir.



Şekil 4.6. *Pistacia* genotipleri arasındaki genetik benzerlik ortalamalarının hesaplanması sonucu oluşturulan 12 *Pistacia* türüne ait dendrogram

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu araştırmada Siirt çeşidi DNA'sı kullanılarak 4 farklı motif ile zenginleştirilmiş genomik kütüphane oluşturulmuş ve elde edilen bu kütüphanedeki klonlardan primer dizaynı yapılmıştır. Ayrıca çalışmada analiz edilen antepfıstığı genotipleri arasındaki genetik ilişkiler ortaya çıkarılmıştır.

Elde edilen sonuçlar aşağıda kısaca özetlenmiştir:

1. Siirt çeşidi DNA'sı kullanılarak oluşturulan genomik kütüphane 'CA' ve 'GA' dinükleotit tekrarları ile 'AAC' ve 'AAG' trinükleotit tekrarları kullanılarak zenginleştirilmiştir. Her bir kütüphaneden 57 klon olmak üzere toplam 228 klonun sekansı yaptırılmıştır.
2. Zenginleştirilmiş kütüphanelerden sekansı yapılan 228 klondan 68 adedinin duplike klonlar olduğu, geriye kalan 160 klondan da 94 adedinin tekrar dizisi içerdiği, bunlardan 5 adedinin ise 2 tekrar dizisi bulundurduğu saptanmıştır. Böylece 99 tekrar dizisinin bulunduğu bölgeler için primer dizaynı yapılmaya çalışılmış ve sonuçta 99 tekrar dizisinin bulunduğu klonlardan 84 çift primer dizayn edilmiştir. Sonuç olarak sekansı yapılan 228 klonun %36.8'inin primere dönüştüğü tespit edilmiştir.
3. Dizaynı yapılan 84 çift primer ise amplifikasyon ürünü verip vermediğini araştırmak açısından %3'lük agaroz jelde 7 adet antepfıstığı çeşidi ile 1 adet *P. atlantica* genotipi olmak üzere toplam 8 örnekte test edilmiştir. Sonuç olarak ise, agaroz jel sonuçları incelendiğinde toplam 59 adet primer çiftinin bant verdiği belirlenmiştir. Böylece bant üretme bakımından test edilen 84 primerden %70.2'sinin bant ürettiği tespit edilmiştir.
4. Dört kütüphaneden elde edilen alleller birlikte değerlendirildiğinde analizi yapılan toplam 59 lokusun 48 tanesinin *P. vera*'da, 56 tanesinin ise yabani *Pistacia* türlerinde polimorfik olduğu saptanmıştır. Ayrıca toplam 59 lokustan 203 allel elde edilmiş ve bu allellerin 172 tanesi (%84.7) *P. vera*'da polimorfizm göstermiş, yabani *Pistacia* türlerinde ise 59 lokustan 295 allel elde edilmiş ve bu allellerin hepsi (%100) yabani *Pistacia* türlerinde polimorfizm göstermiştir.

5. %3'lük agaroz jelde polimorfik olarak gözlemlenen 59 (% 70.2) adet primer ile ABI 3130xl genetik analizör cihazında 6 adet *P. vera* çeşidinde ve 8 adet *Pistacia* türünde çalışılmıştır. Bu primerlerin markör tipi durumu incelendiğinde CUPVB219, CUPVC008 ve CUPVC102 SSR primerleri iki lokuslu bulunurken, CUPVA114 ve CUPVD205 SSR primerleri üç lokuslu, diğer 54 adet SSR primeri ise tek lokuslu olarak bulunmuştur. Bununla birlikte, bazı primerlerin ise sadece *P. vera* çeşitlerine özgü allel verdiği bulgusuna varılmıştır. Sadece *P. vera*'ya özgü allel veren primerler olarak CUPVB101, CUPVB118 ve CUPVD307 lokusları belirlenmiştir. Sadece yabani *Pistacia* türlerine özgü allel veren primere ya da primerlere ise rastlanılmamıştır. Ayrıca primerler markör kalitesi yönünden de incelendiğinde CUPVA112 ve CUPVD205 SSR lokuslarının kirli bant, CUPVA114, CUPVA120, CUPVA216, CUPVB005, CUPVB010, CUPVB101, CUPVB106, CUPVB112, CUPVB114, CUPVB309, CUPVB310, CUPVB318, CUPVC007, CUPVC008, CUPVC204, CUPVD002, CUPVD004, CUPVD103, CUPVD117, CUPVD207, CUPVD211, CUPVD307 ve CUPVD309 lokuslarının ekstra bant; geriye kalan SSR lokuslarının ise temiz bant verdiği saptanmıştır.
6. SSR analizinde tarama işlemi sonucu elde edilen değerlere göre belirlenen 59 adet primer içerisinde en polimorfik 13 primer 46 *Pistacia* genotipine uygulanmıştır. 13 adet SSR primeri değerlendirildiğinde; 46 genotip antepfıstığında toplam 169 adet allel elde edilmiş, bunların 165 adedi polimorfik bulunmuştur. Primer başına düşen toplam allel sayısı 7–26 (ortalama 13.0) arasında değişmiş, primer başına düşen polimorfik allel sayısı ise 7–26 (ortalama 12.7) arasında değişim göstermiştir. Toplam allel sayısı açısından CUPVD207 lokusunda en düşük (7 adet) allel sayısı belirlenirken, CUPVB114 lokusundan ise en fazla (26 adet) allel elde edilmiştir. Polimorfik allel sayısı bakımından ise CUPVD120 ve CUPVD207 lokuslar en düşük sayıda (7 adet) allel üretirken, CUPVB114 lokusundan ise en yüksek sayıda (26 adet) allel elde edilmiştir.

7. 46 *Pistacia* genotipinin karakterizasyonunda kullanılan 13 SSR primerinin ortalama polimorfizm bilgi içeriği (PBI) değeri 0.899 olarak bulunmuştur. CUPVB114 lokusundan en düşük (0.709) polimorfizm bilgi içeriği, CUPVB302 lokusundan en yüksek (0.984) polimorfizm bilgi içeriği değeri elde edilmiştir. Primerlerin ayırma gücü (AG) değerleri incelendiğinde, toplam ayırma gücü değeri 5.19, ortalama ayırma gücü değeri ise 0.399 olarak belirlenmiş olup; CUPVB302 lokusundan en düşük (0.188) toplam ayırma gücü, CUPVB114 lokusundan ise, en yüksek (0.901) toplam ayırma gücü değeri elde edilmiştir.
8. Jaccard genetik benzerlik katsayısına göre, antepfıstığı genotipleri arasındaki genetik benzerlik indeksinin 0.08–0.98 arasında değişim gösterdiği belirlenmiştir. SSR analizleri sonucunda 46 *Pistacia* tür ve çeşidinin tamamı birbirinden ayrılmıştır. Analiz sonucunda elde edilen soyağacında 2 ana grup oluşmuştur. Birinci grupta *P. vera*, *P. eurycarpa*, *P. khinjuk*, *P. atlantica*, *P. integerrima*, *P. chinensis*, *P. terebinthus* ve *P. palaestina* yer almıştır. İkinci grupta ise *P. mexicana*, *P. texana*, *P. weinmannifolia* ve *P. lentiscus* yer almıştır.
9. Kaliforniya’da USDA genetik kaynaklarında *P. terebinthus* olarak tanımlanmış olan PT-77 genotipinin *P. atlantica* grubunda yer aldığı yani *P. atlantica* türüne ait bir genotip olduğu belirlenmiştir. Bu sonuç da moleküler çalışmaların genetik kaynakların tanımlanmasında ne kadar önemli olduğunu ortaya koymuştur.

Bu çalışmanın devamında daha fazla klonun sekansı yapılmalı ve daha fazla primer geliştirilmelidir. Bunun yanında bundan sonra *Pistacia* cinsinde yapılacak filogenetik araştırmalarda daha fazla genotipin kullanılması ve özellikle İran orijinli genotiplerin eklenmesi yararlı olacaktır.

Bu çalışma sonucunda ortaya çıkan SSR primerleri ıslah programlarında, ebeveyn testlerinde ve genetik haritalama çalışmalarında kullanılabilecektir.

KAYNAKLAR

- AHMAD, R., FERGUSON, L., and SOUTHWICK, S.M., 2003. Identification of Pistachio (*Pistacia vera* L.) Nuts with Microsatellite Markers. J.Amer. Soc. Hort. Sci. 128 (6): 898-903.
- AHMAD, R., FERGUSON, L., and SOUTHWICK, S.M., 2005. Molecular Marker Analyses of Pistachio Rootstocks by Simple Sequence Repeats and Sequence-Related Amplified Polymorphisms. Journal of Horticultural Science and Biotechnology 80 (3): 382-386.
- ANONİM, 2001. Antepfıstığı Yetiştiriciliği. Antepfıstığı Araştırma Enstitüsü Yayınları,13:1-132. Gaziantep.
- ARANZANA, M.J., GARCIA-MAS, J., CARBO, J. and ARUS, P., 2002. Development and Variability Analysis of Microsatellite Markers in Peach. Plant Breeding, 121: 87-92.
- BASSIL, V. N., BOTTA, R. and MEHLENBACHER S. A., 2005. Microsatellite Markers in Hazelnut: Isolation, Characterization, and Cross-species Amplification. J.Amer. Soc. Hort. Sci. 130 (4): 543-549.
- BOCCACCI, P., AKKAK, A., BASSIL, V. N., MEHLENBACHER S. A. and BOTTA, R., 2005. Characterization and Evaluation of Microsatellite Loci in European Hazelnut (*Corylus avellana* L.) and Their Transferability to Other *Corylus* Species. Molecular Ecology Notes 5: 934-937.
- 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.
- 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.

- DİE, 1995. Devlet İstatistik Enstitüsü
- DOYLE, J.J. and DOYLE, J.L., 1987. A Rapid Isolation Procedure for Small Quantities of Fresh Leaf Tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19: 11-15.
- DODDS, J. H., and WATANABE, K., 1990. Biotechnological Tools for Plant Genetic Resources Management. *Diversity* 6:317-28.
- DUVAL., M. F., BUNEL, J., SITBON, C. and RISTERUCCI, M. A., 2005. Development of Microsatellite Markers for Mango (*Mangifera indica* L.). *Molecular Ecology Notes* 5: 824-826.
- FORD-LOYD, B. V., 2001. Genotyping in plant genetic resources. In: *Plant Genotyping: The DNA Fingerprinting of Plants* (ed. R.J. Henry), pp.59-82. CAB International, UK.
- GOULAO, L. ve OLIVEIRA, C.M., 2001. Molecular Characterization of Cultivars of Apple (*Malus X domestica* Borkh.) Using Microsatellite (SSR and ISSR) Markers. *Euphytica*, 122: 81-89.
- GRAHAM, J., SMITH, K., WOODHEAD, M. and RUSSELL, J., 2002. Development and Use of Simple Sequence Repeat SSR Markers in *Rubus* Species. *Molecular Ecology Notes*, 2: 250-252.
- GÜLŞEN, O. ve MUTLU, N., 2005. Genetic Markers Used in Plant Sciences and Their Utilization. *Alatarım* 4 (2): 27-37.
- HALL, T., 1997. BioEdit: Biological Sequence Alignment Editor for Win95/98/NT/2K/XP. Ibis Biosciences, Carlsbad, CA 92008. www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/BioEdit.html.
- KAFKAS, S. ve PERL-TREVES, R., 2001. Morphological and Molecular Phylogeny of *Pistacia* Species in Turkey. *Theor Appl Genet*, 102:908-915.
- KAFKAS, S. ve PERL-TRAVES, R., 2002. Interspecific Relationships in *Pistacia* Based on RAPD Fingerprinting. *Hortscience*, 37(1): 168-171.
- KAFKAS, S., KAFKAS, E. ve PERL-TREVES, R., 2002. Morfological Diversity and a Germplasm Survey of Three Wild *Pistacia* Species in Turkey. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 49:261-270.
- KAFKAS, S., ÖZKAN, H., AK, B.E. AÇAR, İ., ATLI, H.S. and KOYUNCU, S., 2006a. Detecting DNA Polymorphism 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., KASKA, N., WASSIMI, A.N. and PADULOSI, S., 2006b. Molecular characterisation of Afghan pistachio accessions by amplified fragment length polymorphisms (AFLPs). Journal of Horticultural Science and Biotechnology 81 (3): 864-868.
- KAFKAS, S., 2006a. Phylogeny evolution and biodiversity in the genus *Pistacia* (Anacardiaceae) In: Sharma, A. K., Sharma, A. eds. , Plant genome: Biodiversity and Evolution. Vol. 1C: Phanerogams (Angiosperm–Dicotyledons), Science Publishers Inc Eufield N.H., U.S.
- KAFKAS, S., 2006b. Phylogenetic Analysis of the Genus *Pistacia* by AFLP Markers. Plant Systematics and Evolution, Vol. 262:1-2, 113-124.
- KUMAR, L.S., 1999. DNA markers in plant improvement: An overview. Biotechnology Advances 17:143-182.
- KURU, C. ve ÖZSABUNCUOĞLU I.H., 1990. Yabani *Pistacia* türlerinin aşılmasında sorunlar ve çözüm yolları. Türkiye 1. In: Kuru C, Can A, Ocal M, Yalcin M, Basut M (eds) Antepfıstığı Sempozyumu. Pistachio Research Institute, Gaziantep, Turkey, pp 51-57.
- LEE, M., 1995. DNA markers and plant breeding programs. Adv Agron 55:265–344.
- LEVI, A., THOMAS, C. E., KEINATH, A. P., and WEHNER, T. C., 2001. Genetic diversity among watermelon (*Citrullus lanatus* and *Citrullus colocynthis*) accessions. Genet. Resources Crop Evol. 48:559–566.
- LI, G., and QUIROS, C.F., 2001. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: Its application to mapping and gene tagging in *Brassica*. Theor Appl Genet. 103:455–461.
- LOPES, M.S., SEFC, K.M., LAIMER, M. and DA CAMARA MACHADO, A., 2002. Identification of Microsatellite Loci in Apricot. Molecular Ecology Notes, 2: 24-26.

- MARTIN, J.P. ve SANCHEZ-YELAMO, M.D., 2000. Genetic relationships among species of the genus *Diplotaxis* (*Brassicaceae*) using inter-simple sequence repeat markers. *Theor Appl Genet*, 101:1234-1241.
- 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.
- MESSINA, R., LAIN, O., MARRAZZO, M.T., CIPRIANI, G. and TESTOLIN, R., 2004. New Set of Microsatellite Loci Isolated in Apricot. *Molecular Ecology Notes*, 4: 432-434.
- MNEJJA, M., GARCIA-MAS, J., HOWAD, W., BADENEST, L. M. and ARUS, P., 2004. Simple Sequence Repeat (SSR) Markers of Japanese Plum (*Prunus salicina* Lindl.) are Highly Polymorphic and Transferable to Peach and Almond. *Molecular Ecology Notes* 4: 163-166.
- MNEJJA, M., GARCIA-MAS, J., HOWAD, W. and ARUS, P., 2005. Development and Transportability Across *Prunus* Species of 42 Polymorphic Almond Microsatellites. *Molecular Ecology Notes* 5: 531-535.
- ÖZGEN, M., ADAK, M. S., SÖYLEMEZOĞLU, G., ve ULUKAN, H., 2000. Bitkisel Gen Kaynaklarının Korunma ve Kullanımında Yeni Yaklaşımlar. V. Türkiye Ziraat Mühendisliği Teknik Kongresi, 17-20 Ocak 2000, Ankara.
- PARFITT, D. E. ve BADENES, M. L., 1997. Phylogeny of The Genus *Pistacia* as Determined from Analysis of The Chloroplast Genome . *proc Natl Acad Sci USA*, 94:7987-7992.
- POWELL, W., MACHRAY, G.C. and PROVAN, J., 1996. Polymorphism Revealed by Simple Sequence Repeats. *Trends in Plant Science*, 1(7):215-221
- PREVOST, A. and WILKINSON, M. J., 1999. A New System of Comparing PCR Primers Applied to ISSR Fingerprinting of Potato Accessions. *Theoretical and Applied Genetics*, 98: 107–112.
- RAFALSKI, J. A., VOGEL, J. M., MORGANTE, M., POWELL, W., ANDRE, C., and TINGEY, S., 1996. In: Birren B, Lai E (eds) *Non-mammalian genome analysis: a practical guide*. Academic Press, New York, pp 75–134.

- ROHLF, F.J., 2004. NTSYSpc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Version 2.1, Exeter Software, Setauket, New York.
- SCARANO, M. T., ABBATE, L., FERRANTE, S., LUCRETTI, S. and TUSA, N., 2002. ISSR-PCR Technique: a Useful Method for Characterizing New Allotetraploid Somatic Hybrids of Mandarin. *Plant Cell Rep*, 20: 1162-1166.
- SCHUELKE, M., 2000. An Economic Method for the Fluorescent Labeling of PCR Fragments. *Nature Biotechnology*, 18: 233-234.
- SILFVERBERG-DILWORTH, E., MATASCI, C.L., VAN DE WEG, W.E., VAN KAAUWEN, M.P.W., WALSER, M., KODDE, L.P., SOGLIO, V., GIANFRANCESCHI, L., DUREL, C.E., COSTA, F., YAMAMOTO, T., KOLLER, B., GESSLER, C. and PATOCCHI, A., 2006. Microsatellite markers spanning the apple (*Malus x domestica* Borkh.) genome *Tree Genetics & Genomes*, 2: 202–224.
- 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 Evaloution 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.
- STAUB, J.E., SERQUEN, F.C., and GUPTA, M., 1996. Genetic Markers, Map Construction, and Their Application in Plant Breeding. *HortScience*, 31: 729–741.
- SOSINSKI, B., GANNAVARAPU, M., HAGER, L.D., BECK, L.E., KING, G.J., RYDER, C.D., RAJAPAKSE, S., BAIRD, W.V., BALLARD, R.E. and ABBOTT, A.G., 2000. Characterization of Mikrosatellite Markers in Peach (*Prunus Persica* L. Batsch). *Theor Appl Genet*, 101: 421–428.
- 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.
- TESTOLIN, R., MESSINA, R., LAIN, O., MARRAZZO, M.T., HUANG, W.G. and CIPRIANI, G., 2004. Microsatellites Isolated in Almond from an AC-Repeat Enriched Library. *Molecular Ecology Notes*, 4: 459–461.

- TUNALIOĞLU, R., TAŞKAYA, B., 2003. Antepfıstığı. Tarımsal Ekonomi Araştırma Enstitüsü T.E.A.E – Bakış. 5(2): 1-4.
- VOS, P., HOGERS, R., BLEEKER, M., REIJANS, M., VAN de LEE, T., HORNES, M., FRİJTERS, A., POT, J., PELEMAN, J., KUIPER, M., and ZABEAU, M., 1995. AFLP: A New Technique for DNA Fingerprinting. Nucleic Acids Res 23:4407–4414.
- 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. Nucl. Acids Res., 18(22): 6531-6535.
- YALTIRIK, F., 1967 *Anacardiaceae*. In: Davis PH (ed) Flora of Turkey, vol 2. Edinburgh Universty Press, pp 544–548.
- ZIETKIEWICZ, E., RAFALSKI, A. ve LABUDA, D., 1994. Genome Fingerprinting by Simple Sequence Repeat (SSR)-Anchored Polymerase Chain Reaction Amplification. Genomics, 20: 176-183.
- ZOHARY, M., 1952. A Monographical Study of The Genus *Pistacia*. Palest J Bot Jerusalem Ser, 5: 187–228.

ÖZGEÇMİŞ

1983 yılında Adana’da doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Adana’da tamamladım. 2001-2005 yılları arasında Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’nde lisansımı yapmaya hak kazandım. 2005 yılında Biyolog olarak bölümümden mezun oldum. Aynı yıl Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı’nda Yüksek Lisans eğitimime başladım ve halen devam etmekteyim.

