

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Burcu ÖZCAN

**KENDİLENMİŞ MONOİK ATLANTİK SAKIZI POPULASYONUNDA
GENETİK HARİTALAMA İÇİN POLİMORFİK YÖNTEM VE
PRİMERLERİN BELİRLENMESİ**

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

ADANA, 2008

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**KENDİLENMİŞ MONOİK ATLANTİK SAKIZI POPULASYONUNDA
GENETİK HARİTALAMA İÇİN POLİMORFİK YÖNTEM VE
PRİMERLERİN BELİRLENMESİ**

Burcu ÖZCAN

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI**

Danışman: Prof.Dr. Salih KAFKAS

Yıl: 2008, syf: 68

Jüri: Prof. Dr. Salih KAFKAS

Prof. Dr. Bekir Erol AK

Doç. Dr. Hakan ÖZKAN

Bu çalışmada, AFLP yöntemi ve AFLP'den türemiş yöntemler olan SAMPL ve TE-AFLP yöntemleri ile kodominant markör yöntemi olan SSR yöntemi kullanılmış, kendilenmiş monoik atlantik sakızı populasyonunda genetik haritalama için polimorfik yöntem ve primerlerin belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmada ebeveyn olarak monoik *P. atlantica* ve bu monoik bitkinin kendilenmesiyle elde edilmiş 10 adet yavru birey kullanılmıştır. AFLP yönteminde 96 adet *EcoRI-MseI* primer kombinasyonu, 603'ü polimorfik olan toplam 8177 bant, SAMPL yönteminde 96 adet SAMPL-*MseI* primer kombinasyonu 358'i polimorfik olan toplam 5952 bant, TE-AFLP yönteminde 8 adet *Xba-BamHI* primer kombinasyonu 36'sı polimorfik olan toplam 302 bant ve SSR yönteminde 33 primer çifti kullanılmış, 18'i polimorfik olan toplam 50 bant elde edilmiştir. Çalışma sonucunda, en fazla polimorfik bant veren yöntemin AFLP yöntemi olduğu ve genetik haritalama çalışması için AFLP yönteminin en uygun yöntem olduğu, AFLP yöntemiyle birlikte kodominant markör yöntemi olan SSR yönteminin kullanılmasının avantaj sağlayabileceği görülmüştür.

Anahtar kelimeler: Antepfıstığı, AFLP, TE-AFLP, SAMPL, SSR.

ABSTRACT

MSc THESIS

<p style="text-align: center;">DETERMINATION OF MOLECULAR MARKER SYSTEMS AND POLYMORPHIC PRIMER PAIRS IN SELF POLLINATED <i>P. atlantica</i> POPULATION FOR GENETIC MAPPING</p>
--

Burcu ÖZCAN

**DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY
INSTITUTE OF BASIC AND APPLIED SCIENCES
UNIVERSITY OF CUKUROVA**

Supervisor: Prof. Dr. Salih KAFKAS

Year: 2008, Page: 68

Jury: Prof. Dr. Salih KAFKAS

Prof. Dr. Bekir Erol AK

Assoc. Prof. Dr. Hakan ÖZKAN

In the present study, dominant AFLP method and its derivatives such as SAMPL and TE-AFLP techniques with a codominant SSR method were used to determine the most polymorphic primer combinations and the most polymorphic marker system in self-pollinated monoecious *P. atlantica* population to use for genetic-mapping studies. One monoecious *P. atlantica* and its ten progenies were used. In AFLP method, 96 *EcoRI-MseI* primer combinations generated a total of 8177 fragments that 603 were polymorphic. Total of 358 polymorphic SAMPL markers were produced by 96 SAMPL/*MseI* primer combinations. In TE-AFLP method, 8 *XbaI/BamHI* primer combinations produced 302 fragments which 36 were polymorphic and in SSRs, 33 primer combinations generated 50 SSR alleles that 18 were polymorphic. The results of this study showed that the most polymorphic marker system is AFLP and AFLP method can be used with codominant SSR method together for genetic-mapping studies.

Key words: Pistachio, AFLP, TE-AFLP, SAMPL, SSR.

TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesi ve yürütülmesinde ilgi, bilgi ve yardımlarını esirgemeyen yüksek lisans tez danışmanım, Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Salih KAFKAS'a yürekten teşekkürü bir borç bilirim.

Laboratuvar çalışmalarım sırasında ilgi ve yardımlarını esirgemeyen Ziraat Yüksek Mühendisi Yıldız DOĞAN'a ve manevi yönden her zaman destek olan arkadaşlarım Serap GÜNAYDIN ve Aysun TURHAN'a ve bugüne kadar her zaman yanımda olan, desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen aileme (Ali Rıza ÖZCAN, Perihan ÖZCAN, Burçak ÖZCAN, Özgün ÖZCAN, Mesadet ÖZGÜL ve Selahattin ÖZGÜL'e) sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER	SAYFA
ÖZ	I
ABSTRACT	II
TEŞEKKÜR	III
İÇİNDEKİLER	IV
ÇİZELGELER DİZİNİ	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ	VIII
SİMGELER ve KISALTMALAR	X
1.GİRİŞ	1
2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	7
2.1. Antepfıstığında Moleküler Düzeyde Yapılmış Çalışmalar.....	7
2.2. AFLP, AFLP Türevleri ve SSR Yöntemleriyle Yapılmış Çalışmalar.....	10
3. MATERYAL ve METOD	22
3.1. Materyal.....	22
3.2. Metod.....	22
3.2.1. Yaprak Örneklerinin Toplanması.....	22
3.2.2. DNA İzolasyonu.....	22
3.2.3. DNA Miktarının Belirlenmesi ve DNA Konsantrasyonun PCR Reaksiyonları için Ayarlanması.....	23
3.2.4. AFLP Analizleri.....	25
3.2.5. SAMPL Analizleri.....	28
3.2.6. TE-AFLP Analizleri.....	28
3.2.7. AFLP ve AFLP Benzeri Markör Analizlerinde Kapiller Elektroforez Koşulları ve Kullanılan Primerler.....	29
3.2.8. SSR Analizleri.....	32
3.2.8.1. SSR Analizlerinde Kapiller Elektroforez Koşulları...	33
3.2.9. Primerlerin Polimorfizm Oranlarının ve Bilgi İçeriklerinin Belirlenmesi.....	34
3.2.10. Primerlerin Ayırma Güçlerinin Belirlenmesi.....	34

4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	35
4.1. Kendilenmiş Monoik Atlantik Sakızı Populasyonunda AFLP Yöntemiyle Polimorfizmin Belirlenmesi.....	35
4.2. Kendilenmiş Monoik Atlantik Sakızı Populasyonunda TE- AFLP Yöntemiyle Polimorfizmin Belirlenmesi.....	42
4.3. Kendilenmiş Monoik Atlantik Sakızı Populasyonunda SAMPL Yöntemiyle Polimorfizmin Belirlenmesi.....	44
4.4. Kendilenmiş Monoik Atlantik Sakızı Populasyonunda SSR Yöntemiyle Polimorfizmin Belirlenmesi.....	50
4.5. AFLP, TE-AFLP, SAMPL ve SSR Yöntemlerinin Karşılaştırılması.....	53
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	57
KAYNAKLAR.....	61
ÖZGEÇMİŞ.....	68

ÇİZELGELER DİZİNİ	SAYFA
Çizelge 1.1 100 g antepfıstığı, ceviz, fındık ve sığır etinde bulunan değerler.....	2
Çizelge 3.1 <i>EcoRI</i> ve <i>MseI</i> kesim enzimlerinin tanıma bölgeleri ve kesim özellikleri.....	26
Çizelge 3.2 <i>XbaI</i> , <i>BamHI</i> , <i>RsaI</i> kesim enzimlerinin tanıma bölgeleri ve özellikleri	29
Çizelge 3.3 AFLP yöntemi ve AFLP'den türemiş yöntemlerde kullanılan primer kombinasyonları.....	30
Çizelge 3.4 AFLP yöntemi ve AFLP'den türemiş yöntemlerde kullanılan adaptör, önselektif ve selektif primerleri.....	30
Çizelge 3.5 SSR analizlerinde kullanılan sıcaklık ve döngü koşulları .	33
Çizelge 4.1 Monoik atlantik sakızı ve monoik atlantik sakızının kendilenmesiyle elde edilmiş 10 yavru bireyde AFLP primerleri kullanılarak yapılan ön selektif PCR ve selektif PCR aşamalarından sonra elde edilen toplam bant sayıları (TBS), polimorfik bant sayısı (PBS), polimorfizm oranı (PO), polimorfizm bilgi içeriği (PBI) ve ayırma gücü (AG) değerleri.....	36
Çizelge 4.2 Monoik atlantik sakızı ve monoik atlantik sakızının kendilenmesiyle elde edilmiş 10 yavru bireyde TE-AFLP primerleri kullanılarak yapılan selektif PCR aşamasından sonra elde edilen toplam bant sayıları (TBS), polimorfik bant sayısı (PBS), polimorfizm oranı (PO), polimorfizm bilgi içeriği (PBI) ve ayırma gücü (AG) değerleri.....	44

Çizelge 4.3	Monoik atlantik sakızı ve monoik atlantik sakızının kendilenmesiyle elde edilmiş 10 yavru bireyde SAMPL primerleri kullanılarak yapılan selektif PCR aşamasından sonra elde edilen toplam bant sayıları (TBS), polimorfik bant sayıları (PBS), polimorfizm oranı (PO), polimorfizm bilgi içeriği (PBİ) ve ayırma gücü (AG) değerleri.....	46
Çizelge 4.4	Monoik atlantik sakızı ve monoik atlantik sakızının kendilenmesiyle elde edilmiş 10 yavru bireyde SSR primerleri kullanılarak yapılan PCR aşamasından sonra elde edilen toplam bant sayıları (TBS), polimorfik bant sayıları (PBS), polimorfizm oranı (PO), polimorfizm bilgi içeriği (PBİ) ve ayırma gücü (AG) değerleri.....	51
Çizelge 4.5	Monoik atlantik sakızı ve monoik atlantik sakızının kendilenmesiyle elde edilmiş 10 yavru bireyde yapılan AFLP, TE-AFLP, SAMPL ve SSR analizleri sonrası elde edilen toplam bant sayıları (TBS), primer başına düşen toplam bant sayıları (PBDTBS), polimorfik bant sayıları (PBS), primer başına düşen polimorfik bant sayıları (PBDPBS), polimorfizm oranları (PO%), polimorfizm bilgi içerikleri (PBİ) ve ayırma güçleri (AG).....	54

ŞEKİLLER DİZİNİ	SAYFA
Şekil 3.1 Kendilenmiş monoik atlantik sakızı ve 10 yavru bireyden izole edilen DNA'nın miktarına ait jel görüntüsü	24
Şekil 3.2 Kendilenmiş monoik atlantik sakızı ve 10 yavru bireyden izole edilen DNA'nın miktarına göre yapılan 50 ng konsantrasyonda DNA'nın jel görüntüsü.....	24
Şekil 3.3 Kendilenmiş monoik atlantik sakızı ve 10 yavru bireyden izole edilen DNA'nın miktarına göre yapılan 5 ng konsantrasyonda DNA'nın jel görüntüsü.....	25
Şekil 3.4 AFLP yönteminde kesim ve bağlanma reaksiyonunun gerçekleşip gerçekleşmediğini kontrol etmek amacıyla alınan jel görüntüsü.....	26
Şekil 3.5 E01/M01 primer kombinasyonu ile yapılan ön selektif PCR reaksiyonu sonrası elde edilen jel görüntüsü	27
Şekil 4.1 E33-M52 primer kombinasyonu ile yapılmış selektif PCR reaksiyonu ardından ABI 3130xl cihazına yüklenen PCR ürünlerinin kapiller elektroforez sonrası kendilenmiş monoik yavru bireylerde polimorfik bantları içeren elektroferogramı.....	35
Şekil 4.2 TE-AFLP yönteminde <i>Xba</i> +CA- <i>Bam</i> HI+A primer kombinasyonu kullanılarak yapılmış selektif PCR reaksiyonu ardından ABI 3130xl cihazına yüklenen PCR ürünlerinin kapiller elektroforez sonrası kendilenmiş monoik yavru bireylerde polimorfik bantları içeren elektroferogramı.....	43
Şekil 4.3 SAMPL yönteminde SAMPL7-M31 primer kombinasyonu kullanılarak yapılmış selektif PCR reaksiyonu ardından ABI 3130xl cihazına yüklenen PCR ürünlerinin kapiller elektroforez sonrası kendilenmiş monoik yavru bireylerde polimorfik bantları içeren elektroferogramı.....	45

Şekil 4.4 PET flourosan boyasıyla boyanmış CUPVB009 SSR primeri için kapiller elektroforez sonrası kendilenmiş monoik yavru bireylerde polimorfik allelleri içeren elektroferogram	50
---	----

SİMGELER ve KISALTMALAR

AFLP	: Amplified Fragment Length Polymorphism
AG	: Ayrma 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
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	: Polimorfik Bilgi İçeriği
PBS	: Polimorfik Bant Sayısı
PBDTBS	: Primer Başına Düşen Toplam Bant Sayısı
PBDPBS	: Primer Başına Düşen Polimorfik Bant Sayısı
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
pH	: Hidrojen iyonlarının (-) logaritması
PO	: Polimorfizm Oranı
PVP	: Polivinilpirolidon
RNase A	: Ribonuclease A

rpm	: Revolutions per minute
SAMPL	: Selective Amplification of Microsatellite Polymorphic Loci
SSR	: Simple Sequence Repeats
Taq	: <i>Thermus Aquaticus</i>
TBE	: Tris/ Borik asit/ EDTA Tampon Çözeltilisi
TBS	: Toplam Bant Sayısı
TE-AFLP	: Three endonuclease Amplified Fragment Length Polymorphism
Tris	: Tris (Hidroksil Metil) Aminometan
Tris HCl	: Tris Hidroklorür
UPGMA	: Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean
UV	: Ultraviolet
μM	: Mikromolar
μl	: Mikrolitre
λDNA	: Lambda Deoksiribonükleik Asit

1.GİRİŞ

Antepfıstığı, Anacardiaceae familyası içerisinde yer alan, ticari değere sahip meyvesi yenilebilen dioik bir bitkidir (Zohary, 1952). Ancak dioik olmayan örnekleri de vardır (Özbek ve Ayfer, 1958; Crane, 1974; Kafkas ve ark., 2000). On üç ve üzerinde türü kapsar (*P. khinjuk*, *P. vera*, *P. eurycarpa*, *P. atlantica* [var. *mutica* ve var. *cabulica*], *P. terebinthus*, *P. integerrima*, *P. chinensis*, *P. falcata*, *P. aethiopica*, *P. saportae*, *P. leutiscus*, *P. weinmannifolia*, *P. mexica*, *P. texana*) (Kafkas, 2006a). *P. vera*'nın, cins içerisindeki diğer türlerin atası olduğu bildirilmiştir (Zohary, 1952; Parfitt ve Badenes, 1997; Kafkas ve Perl-Treves, 2001).

Antepfıstığı içeriğinde önemli miktarda sabit yağ, E vitamini, B ve C vitaminleri ve protein bulunmaktadır. Protein ihtiyacının son yıllarda ve özellikle gelişmiş ülkelerde bitkisel üretimle karşılanma eğilimi olduğu bilinmektedir. Antepfıstığı, fındık, badem, yerfıstığı gibi diğer yağlı meyvelere göre, protein ve karbonhidrat değeri açısından birinci, yağ oranı açısından ise fındık ve cevizden sonra üçüncü sırada yer alır. Potasyum, fosfor, demir, vitamin A ve B1 vitamini yönünden fındık, ceviz ve sığır etinden daha üstün durumdadır. Çerez olarak tüketildiği gibi, şeker ve şekerli ürünler sanayinde (dondurma, baklava, cezerye vs. yapımında) hammadde olarak kullanılır. Antepfıstığının kandaki kolesterol düzeyini düşürdüğü ve ince bağırsakta glikoz emilimini azaltarak kan şekerini düşürdüğü, kronik kalp hastalığı riskini de azalttığı bilinmektedir (Tunahoğlu, 2003). Antepfıstığının 100 gramının bileşimi ile, fındık, ceviz ve sığır eti içeriği karşılaştırıldığında elde edilen değerler Çizelge 1.1'de verilmiştir (DİE, 1997).

Antepfıstığı dünyada birçok ülkede ekonomik olarak üretildiği gibi, yaklaşık 15 ülkede de tarımı yapılmaktadır. 2003 yılında, dünyada 542.072 ton olan antepfıstığı üretimi, 2007 yılında 501.451 ton olmuştur.

2007 yılında İran, antepfıstığı üretiminde %45.8'lik üretim payıyla dünyada birinci sırada yer alırken, Türkiye %15.6'lık üretimle, İran ve ABD'den sonra dünyada üçüncü sırada yer almaktadır (Faostat, 2007).

Çizelge 1.1. 100 gr antepfıstığı, ceviz, fındık ve sığır etinde bulunan değerler.

100 gr	Antepfıstığı	Fındık	Ceviz	Sığır eti
Protein (%)	19.3	12.6	14.8	13.6
Yağ (%)	53.7	62.4	64.0	41.0
Karbonhidrat (%)	19.0	16.7	15.8	-
Ca (mg)	131.0	209.0	99.0	8.0
P (mg)	500.0	337.0	380.0	124.0
Fe (mg)	7.30	3.4	3.1	2.0
K (mg)	972.0	704.0	450.0	355.0
Vitamin A (iu)	230.0	-	30.0	80.0
Vitamin B1 (mg)	0.67	0.46	0.23	0.06
Vitamin B6 (mg)	1.40	0.90	0.90	3.30
Kalori	597.0	634.0	651.0	428.0

Antepfıstığının, Anadolu, Kafkasya, İran ve Türkmenistan'ın yüksek kısımlarını içine alan Yakın Doğu gen merkezi ve Kuzey Afrika'yı, Ortadoğu'yu ve Akdeniz'e kıyısı olan Avrupa ülkelerini içine alan Orta Asya gen merkezi olmak üzere iki gen merkezi vardır. Türkiye Yakın Doğu gen merkezi içerisinde (Maggs, 1973; Hormaza ve ark. 1994; 1998).

Antepfıstığı, dünyada kuzey ve güney yarım kürenin 30–45⁰ enlemleri arasında, uygun mikroklimalarda yetişmektedir. Türkiye'de 56 ilimizde antepfıstığı yetiştiriciliği yapılmaktadır. Gaziantep, Şanlıurfa, Adıyaman, Siirt, Kahramanmaraş, Mardin ve Diyarbakır illerinde ekonomik olarak yetiştirilmektedir. Üretimimizin %94 ünü Güneydoğu Anadolu bölgesi karşılamaktadır (Tunahoğlu, 2003).

Türkiye'de yaklaşık 66 milyon yabancı *Pistacia* ağacı bulunmaktadır (Kuru ve Özsabuncuoğlu, 1990). *P. eurycarpa*, *P. terebinthus*, *P. atlantica*, *P. palaestina*, *P. vera* yaygın olarak bulunan türlerdir. Fenotipik özellikler bakımından birbirlerinden oldukça farklıdır. Türkiye'de 45 milyon kültüre alınmış *P. vera* ağacı bulunmaktadır (Emeksiz ve Şengül, 2001).

Toprak ve iklim isteği yönünden diğer meyvelere göre antepfıstığı fazla seçici değildir. Bu meyve ağacının köklerinin çok derinlere gitmesi kuraklığa dayanımını artırmaktadır (Kaşka ve ark., 2004). Yaz aylarında meyvenin gelişmesi ve

olgunlaşması için uzun süre yüksek sıcaklık, kış aylarında ise belli bir süre düşük sıcaklığa ihtiyaç duyar (Özbek, 1978). Bu özelliklerinden dolayı antepfıstığı, Türkiye’de genellikle diğer kültür bitkilerinin üretimi için uygun olmayan kıraç, taşlık, eğimli ve susuz arazilerde yetiştirilmektedir. Başka kültür bitkilerinin yetişme olanağı bulamadığı bu alanlarda, antepfıstığının yetiştirilebilir olması, bu bölgelerde yaşayan insanlar için gelir kaynağı olduğu gibi mevcut yabani ağaçların aşılmasıyla başka hiçbir şekilde değerlendirilemeyen bu kayalık arazilerin değer kazandığı ve ülkeye döviz girdisi sağladığı bilinmektedir. Son yıllarda GAP projesiyle sulu koşullarda da antepfıstığı üretimi yapılmaya başlanmıştır (Tunahöglü, 2003).

Antepfıstığının dioik bir meyve olması (erkek ve dişi çiçeklerin ayrı ağaçlar üzerinde bulunması) tozlanma ve dölleme bazı problemlere neden olabilmektedir. Diğer sert kabuklu meyvelerde olduğu gibi meyvenin yenilen kısmı tohumu olduğundan, meyve eldesi için tozlanma ve dölleme zorunludur. Tozlanma erkek ağaçtaki çiçek tozlarının dişi ağaçlardaki çiçeklerin tepesine taşınmasıyla olur. Dolayısıyla döllemenin gerçekleşebilmesi için erkek ve dişi ağaçların çiçek açması gereklidir. Bu çiçeklenme zamanlarının aynı dönemlerde olması ve hakim rüzgar yönünün bilinmesi tozlanma için oldukça büyük öneme sahiptir.

İyi bir tozlanma ve tohumlu meyve oluşumu için kurulacak olan bir antepfıstığı bahçesinde belirli oranda erkek ağaç bulundurulması, erkek ağaç sayısının 8–11 dişiye bir erkek ağaç düşecek şekilde ayarlanması gerekmektedir (Maranto and Crane, 1982). Bu olay bahçede %10 alan kaybına neden olmaktadır.

P. atlantica diğer *Pistacia* türleri içinde çiçeklenme zamanı bakımından en erken çiçeklenen türdür, bu durum tozlanmayı olumsuz olarak etkilemektedir. Bunun yanında, Kafkas ve ark. (2000) tarafından Manisa-Koruköy’de bulunan monoik *P. atlantica* kullanılarak (Kafkas ve ark., 2002) monoik antepfıstığı çeşidi geliştirmek amaçlanmaktadır. Erkek ve dişi çiçeklerin aynı ağaç üzerinde olması, oluşturulacak bir bahçede yerden kazanç sağlanmasına ve bu sayede verimin en az %10 artmasına sebep olacağı için monoik antepfıstığı çeşidi ıslahı oldukça büyük öneme sahiptir.

Bununla beraber, orman ağaçlarının büyük ölçüde kesilmesi *Pistacia* cinsini de tehdit altında bırakmaktadır ve *Pistacia* türlerinde biyoçeşitliliğinin koruma altına

alınabilmesi için acil önlemlere ihtiyaç vardır. Çok yıllık bir bitki olan antepfıstığının tohumdan meyveye yatma süresinin çok uzun zaman alması (10–15 yıl), daha kısa sürede sonuç alınabilmesini sağlayan moleküler temelli ıslah programlarının önemini daha da artırmıştır (**Kafkas, 2006a**). Buna bağlı olarak, Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Moleküler Genetik Laboratuvarında antepfıstığında ilk genetik haritanın oluşturulması ile ilgili çalışma devam etmektedir (**Türkeli ve ark., 2008**).

Antepfıstığı ve antepfıstığı gibi ekonomik ve ekolojik önemi olan bitkilerin genetik yönden düzenlenmesi, var olan genetik varyasyondan faydalanarak istenilen amaca uygun bitkilerin geliştirilmesine bitki ıslahı denmektedir. Bitki ıslahında temel prensip ekonomik öneme sahip olan genotipi tespit edebilmektir. Bitki ıslahında kullanılan, bilinen ilk ve en eski yöntem seleksiyondur. Bitkilerde eşey durumunun fark edilmesi ve Mendel genetiğiyle beraber melezleme de bitki ıslahında kullanılmaya başlanmıştır. İlerleyen zamanlardaysa bitkilerin tanımlanmasında sırasıyla morfolojik, sitolojik, biyokimyasal ve günümüzde özellikle moleküler birçok yöntem kullanılır durumdadır (**Scarano ve ark., 2002**).

Moleküler markörlerinin genel olarak ıslahta kullanım alanları; genetik kaynakların karakterizasyonu, çeşitler arasındaki benzerlik ve farklılıkların belirlenmesi, ıslah programlarında kullanılacak ebeveynlerin belirlenmesi, yeni geliştirilen çeşitlerin koruma altına alınması, bilinmeyen çeşit ve genotiplerin tanımlanması, evrimsel gelişmeler ve kromozomlarda oluşan yapısal değişmelerin belirlenmesi ve kalitatif ve kantitatif lokusların belirlenmesidir.

Moleküler markörlerin kaynağı üretildikleri bitkilerin DNA'larıdır. Bundan dolayı bitki populasyonundaki çeşitlilik veya o populasyon içindeki bitki genotipleri arasındaki ilişkilerin tespitinde %100'e yakın güvenilirlikle sonuç verirler (**Gülşen ve Mutlu, 2005**). Dolayısıyla bitki ıslahında moleküler düzeyde çalışmak zaman ve güvenilirlik bakımından önemlidir.

Moleküler markörler ıslah programlarının daha iyi planlanmasını ve daha az maliyetle yapılmasını, geliştirilen markör meyve ve çiçek özellikleriyle ilgiliyse ve özellikle çok yıllık bitkilerde bitki meyve verinceye kadar, 2–10 yıl beklemeden erken seleksiyonu sağlar. Analizi uzun ve pahalı olan karakterler için zaman ve

ekonomik kazanç sağlar. Erken seleksiyon sonucu deneme alanından ve işgücünden kazanç, daha fazla bitkiyle çalışabilme olanağı ve daha kısa sürede ana hedefe ulaşma imkanı sağlar (**Gülşen ve Mutlu, 2005**).

Moleküler markörler PCR temelli ve hibridizasyon temelli olmak üzere ikiye ayrılırlar. Hibridizasyon temelli moleküler markörlerin masraflı ve yavaş olması PCR'a dayalı markörlerin geliştirilmesine neden olmuştur. AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) ve SSR (Simple Sequence Repeats) teknikleri PCR temelli olup son yıllarda yaygın olarak tercih edilen güvenilir ve yüksek polimorfizm gösteren moleküler markör teknikleridir.

AFLP, toplam DNA'nın kesildikten sonra PCR reaksiyonuyla çoğaltılması esasına dayanan güçlü bir tekniktir. En büyük avantajı tek bir reaksiyonla çok sayıda bant (60-500 bp) vermesidir ve çalışma için çok az miktarda DNA'ya ihtiyaç vardır (**Vos ve ark., 1995**). Bitkilerde hızlı bir şekilde genetik harita oluşturabilmek için kullanışlıdır. Kompleks organizmalarda uygulanabilen, genetik çeşitlilik çalışmalarında yaygın olarak kullanılan, parmak izi analizi çalışmaları için de uygun bir tekniktir. Ancak patentli bir tekniktir, dolayısıyla maliyeti yüksektir. Ayrıca uygulama esnasında radyoaktif madde veya flourosan boyaların kullanılması bu yöntemden faydalanılmasını sınırlamaktadır. Dominant markör sistemi olması ise diğer bir dezavantajdır (**Vuylsteke ve ark., 2007**).

Günümüzde AFLP'den türemiş farklı moleküler markör teknikleri de geliştirilmiştir. Bunlar, **MITE-AFLP** (Miniature Inverted Transpozon Elements Amplified Fragment Length Polymorphism; **Casa ve ark., 2000**), **cDNA-AFLP** (Complementary DNA Amplified Fragment Length Polymorphism; **Cui ve ark., 2006**), **TE-AFLP** (Three Endonuclease Amplified Fragment Length Polymorphism; **Van der Wurff ve ark., 2000**), **MSAP** (Methylation Sensitive Amplified Polymorphism; **Portis ve ark., 2003**), **SAMPL** (Selective Amplification of Microsatellite Polymorphic Loci; **Gupta ve ark., 2005**), **SSAP** (Sequence Specific Amplified Polymorphism; **Tam ve ark., 2005**), **MEGA AFLP** (Multiplex-Endonuclease Genotyping Approach; **Agbo ve ark., 2003**), **SE-AFLP** (Single Endonuclease Amplified Fragment Length Polymorphism; **Giammanco ve ark.,**

2006) ve **C-AFLP** (Cleaved Amplified Fragment Length Polymorphism; **Zhang ve ark., 2005**) olarak adlandırılan yöntemlerdir.

Mikrosatellitler ökaryotik genomlarda 1–6 bp arasında değişen sayıda tekrarlardır, tüm genoma dağılmış halde bulunurlar. Kodominant bir markör sistemidir. Polimorfizm seviyesi düşük olan türlerde çeşit tayininde ve genetik haritaların oluşturulmasında kullanılmaktadır (**Staub ve ark., 1996**). Ancak primerlerin belirlenmesi için ön çalışma gerektirdiğinden dolayı maliyetli bir yöntemdir (**Goulao ve ark., 2001**).

Bu çalışmanın amacı;

Kendilenmiş monoik *P. atlantica* populasyonunda AFLP ve AFLP'den türetilmiş yöntemler ile SSR yöntemini kullanarak ileride yapılacak olan genetik haritalama çalışması için polimorfik yöntem ve primer kombinasyonlarını belirlemek ve yöntemleri karşılaştırmaktır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR**2.1. Antepfıstığında Moleküler Düzeyde Yapılmış Çalışmalar**

Parfitt ve Badenes (1997), RFLP tekniğini kullanarak ve kloroplasttan izole ettikleri DNA ile, 10 *Pistacia* türü arasında filogenetik sınıflandırma yapmışlardır. Çalışma sonunda elde ettikleri verilere göre, *P. vera* ile *P. khinjuk* ve *P. mexicana* ile *P. texana* türleri arasında farklılık bulunmadığını, bunların aynı tür olabileceğini bildirmişlerdir.

Kafkas ve Perl-Treves (2001), *P. eurycarpa*, *P. vera*, *P. atlantica* ve *P. terebinthus* türlerini morfolojik ve moleküler seviyede tanımlamışlardır. Morfolojik çalışma sonucunda oluşturulan soyağacında *P. khinjuk* olarak toplanan örneklerin *P. vera*'ya, *P. atlantica* türünden daha yakın olduğunu görmüşlerdir. Moleküler çalışmada ise RAPD tekniğini kullanarak, 40 yabancı *Pistacia* genotipi ve iki *P. vera* çeşidi üzerinde analiz yapmışlar, analizde, 10 polimorfik RAPD primeri ile türler arasında ve türler içinde 128'i polimorfik olan toplam 138 skorlanabilir bant elde etmişlerdir. Primer başına düşen toplam bant sayısını 13.8 ve primer başına düşen polimorfik bant sayısını 12.8 olarak bulmuşlardır. Çalışma sonucuna göre 4 *Pistacia* türünü birbirinden kesin olarak ayırmışlardır. Ayrıca moleküler veriler ışığında oluşturdukları soyağacının, morfolojik düzeyde oluşturdukları soyağacından farklı sonuçlar verdiğini bildirmişlerdir. *P. khinjuk* olarak toplanan örneklerin *P. atlantica* türüne, *P. vera*'dan daha yakın olduğunu görmüşlerdir. Araştırmacılar incelenen 4 türe özgü RAPD markörleri bulmuşlardır.

Kafkas ve Perl-Treves (2002), 9 *Pistacia* türünde RAPD tekniğini kullanarak türler arası akrabalıkları incelemişlerdir. Analizde 20 RAPD primeriyle 228'i türler arası seviyede polimorfik olan toplam 242 fragment elde etmişlerdir. Primer başına düşen toplam bant sayısını 12.1 ve primer başına düşen polimorfik bant sayısını 11.4 olarak bulmuşlardır. Değerlendirme sonucunda *Pistacia* cinsini çalı formunda (*P. terebinthus*, *P. palaestina*, *P. mexicana* ve *P. lentiscus*) ve büyük ağaç formundaki türler (*P. vera*, *P. khinjuk*, *P. eurycarpa*, *P. atlantica*) olmak üzere iki gruba ayırmışlardır. *P. terebinthus* ile *P. palaestina* türlerinin ise birbirlerine çok

yakın akraba olduklarını bildirmişler ve *P. integerrima*'yı her iki grubun da dışında tutmuşlardır. Anacardiaceae üzerinde daha önce yapılan sınıflandırmalar morfolojik düzeyde olmuştur.

Ahmad ve ark. (2003), antepfıstığına SSR primeri geliştirmek için Kerman çeşidinin DNA'sını kullanarak genomik kütüphane oluşturmuşlardır. Araştırmacılar CA, CT ve CTT tekrarlarını kullanarak sekanslamaya hazır klonlar elde etmişlerdir. Bu kütüphanelerden faydalanarak dizayn edilen primer çiftlerinden 25 tanesinin sentezinin yapıldığı ve primerlerin değişik orijinli antepfıstığı çeşitlerinde Li-Cor sekanslama ünitesi kullanılarak test edildiğini bildirmişlerdir. Bu 25 primer çiftinden 14 tanesinin (%56) PCR sonucunda değerlendirilebilir bant ürettiğini, 14 primer çiftinin ise toplam 46 allel ürettiğini ve primer başına düşen allel sayısının 2–5 arasında değiştiğini, primer başına düşen ortalama allel sayısının 3.3 olduğunu, bant büyüklüklerinin ise 120–342 bp arasında değiştiğini bildirmişlerdir.

Ahmad ve ark. (2005), SSR ve SRAP yöntemlerini kullanarak *P. atlantica*, *P. integerrima* ve iki türler arası melez PioneerGold II ve UCB–1 bitkilerinde çalışmışlardır. SSR yönteminde 12 primer çifti kullanmışlar, 35 skorlanabilir allel elde etmişlerdir. Primer başına düşen allel sayısının 2–5 arasında değiştiğini ve primer başına düşen ortalama allel sayısının 2.9 olduğunu tespit etmişlerdir. SRAP yönteminde ise 8 primer kombinasyonu kullanmışlar, 104'ü (%51) polimorfik olan 202 allel elde etmişlerdir. Primer başına düşen bant sayısının 11–38 arasında değiştiğini, primer başına düşen ortalama bant sayısının 25.2 olduğunu bildirmişlerdir. Her iki yöntemin de antepfıstığına DNA parmak izi analizleri için başarıyla kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Kafkas ve ark. (2006a), RAPD, ISSR ve AFLP yöntemlerini kullanarak Türkiye'de bulunan 69 antepfıstığı çeşidini tanımlamışlar ve bunlar arasındaki genetik ilişkileri belirlemişlerdir. Çalışmada toplam 572 markör elde etmişlerdir. Bunlardan 307 (%53.6) tanesinin polimorfizm gösterdiğini bildirmişlerdir. AFLP yönteminden her primer çifti için ortalama 27.5 polimorfik AFLP bandı elde etmişlerdir. Çalışma sonucuna göre, ülkemizde yetiştirilen Halebî çeşidinin Yunanistan, Tunus, İtalya ve Kıbrıs'ta yetiştirilen çeşitlerle aynı grupta olduğunu, Siirt çeşidinin ise İran grubu ile Akdeniz orijinli çeşitler arasında yer aldığını

bildirmişlerdir. Ayrıca üç moleküler markör sisteminde polimorfizmi karşılaştırmışlar ve sonuçta en iyi yöntemin AFLP olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar RAPD ile ISSR arasında polimorfizm ve bant sayısı yönünden farklılık olmamasına rağmen tekrarlanabilirlik açısından ISSR yönteminin daha üstün olduğunu tespit etmişlerdir.

Kafkas ve ark. (2006b), AFLP tekniğini kullanarak Afganistan'ın Kunduz ve Takhar bölgelerinden alınan 17 yabani antepfıstığı (*P. vera*) ve 3 kültür çeşidinin moleküler karakterizasyonunu yapmışlardır. 8 AFLP primer kombinasyonu kullanılarak 136'sı polimorfik olan toplam 288 AFLP fragmenti elde etmişlerdir. Primer kombinasyonlarının 18–48 arasında değişen sayıda polimorfik bant ürettiğini ve primer başına düşen polimorfik bant sayısının ortalama 17 olduğunu bildirmişlerdir. En yüksek polimorfizmi E_{ACC}/M_{GAG} primer kombinasyonunun verdiği, en düşük polimorfizmi ise E_{AAG}/M_{CTA} primer kombinasyonun verdiği bildirmişlerdir. Polimorfizm oranını %46.7 olarak hesaplamışlardır. Elde edilen sonuçlara göre 17 yabani Afgan antepfıstığı çeşidini bölgelerine göre gruplandırmışlar ve 3 kültür formundan ayırmışlardır. AFLP tekniğinin yabani *P. vera*'da karakterizasyon için uygun bir teknik olduğunu bildirmişlerdir.

Kafkas (2006b), 10 *Pistacia* türüne ait 31 yabani ve 4 kültür çeşidi olmak üzere toplam 35 genotip üzerinde AFLP tekniğini kullanarak filogenetik analiz yapmıştır. 6 AFLP primer kombinasyonu ile 254'ü polimorfik olan (%92.4) toplam 275 fragment elde etmiş, primer başına düşen toplam bant sayısını 45.8 ve primer başına düşen polimorfik bant sayısını 41.5 olarak bulmuştur. Polimorfizm oranını (%PO) 90.5 olarak hesaplamıştır. Ayırma gücü değerlerinin 30.7 (E_{AGG}/M_{ATC}) ile 54.0 (E_{AGC}/M_{ATC}) aralığında değiştiğini tespit etmiş, ortalama ayırma gücünü 40.43 ve toplam ayırma gücünü (AG) 242.6 olarak hesaplamıştır. Polimorfizm bilgi içeriği (PBİ) ortalamasının 0.668 olduğunu bildirmiştir. Ortalama farklılık karakteri kullanarak ve Jaccard katsayısı kullanarak UPGMA analizleri yapmış, PCo analizleri ve dendrogram sonuçlarına göre *P. terebinthus*'un ayrı bir grup olarak sınıflandırılmasını önermiştir.

Basha ve ark (2007), Suriye'de bulunan 37 bahçeden topladıkları 114 antepfıstığında morfolojik ve moleküler düzeyde analiz yapmışlardır. Moleküler

analiz için 7 primer kombinasyonu kullanarak AFLP yöntemini uygulamışlardır. Primer başına düşen ortalama polimorfik bant sayısının 24 olduğunu bildirmişlerdir. Çalışma sonucunda, 25 dişi antepfıstığı çeşidi tespit etmişler ve bunlardan bazılarının ilk kez tespit edilen çeşitler olduğunu bildirmişlerdir. AFLP yönteminin genetik çeşitliliği belirlemede başarılı bir yöntem olduğunu ve morfolojik karakterlerle moleküler analiz sonuçlarının tutarlı olduğunu bildirmişlerdir.

2.2. AFLP, AFLP Türevleri ve SSR Yöntemleriyle Yapılmış Çalışmalar

Paglia ve ark. (1998), Avrupa ladininde (*Picea abies* K.) AFLP ve SAMPL yöntemlerini kullanarak parmak izi analizi çalışması yapmışlardır. Çalışmada haploid megagametofit kullanmışlardır. Bu tür ağaçların oldukça büyük genoma sahip olmaları ($1.5-2.5 \times 10^{10}$) ve bu ağaçlarda tandem şeklinde organize olmuş ya da genom içerisinde dağılmış halde, farklı bölgelerde, geniş, tekrarlayan dizilerin bulunmasının multipleks parmak izi analizlerinin yapılmasını olumsuz etkilediğini bildirmişlerdir. Bundan dolayı da standart AFLP yöntemindeki *EcoRI* kesim enzimi yerine metilasyona duyarlı kesim enzimi olan *PstI*'i kullanmışlardır. AFLP yönteminde 39 *PstI/MseI* primer kombinasyonu kullanmışlar, 29 primer kombinasyonu için tek bir ana ağaçtan gelmiş 72 megagametofitte skorlama yapmışlar ve 366 polimorfik bant elde etmişlerdir. Her bir primer çifti için ortalama 12.6 polimorfik bant elde etmişlerdir. Bu bantları diğer araştırmacılar tarafından geliştirilen 81 markörle birlikte haritalama için kullanmışlardır. Bunların içinden 52 bandın (%14) dominant, 26 bandın kodominant olduğunu ve 2 kodominant allelin ise eksilme (deletion) mutasyonu sonucunda jelde görünmediğini bildirmişlerdir. SAMPL yönteminde ise araştırmacılar 19-20 baz dinükleotid mikrosatellit içeren SAMPL-1 ve SAMPL-7 primerleri ile *MseI* primer kombinasyonunu kullanmışlar ve 20 polimorfik bant elde etmişlerdir. Primer başına düşen polimorfik bant sayısını 10 olarak bulmuşlardır. Kesim enzimlerinde yapılan değişikliklerle çalışmanın genetik haritalama için daha etkili olduğunu bildirmişlerdir. *EcoRI* kesim enzimiyle kesim yapıldığında çok sayıda bant ancak daha düşük polimorfizm, *PstI* kesim enzimiyle

kesim yapıldığında ise az sayıda temiz bant ancak daha yüksek polimorfizm elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Marques ve ark (1998), Okalüptüs bitkisinde AFLP markörleriyle genetik harita oluşturmuşlardır. *E. tereticornis* x *E. globulus* çaprazına ait 91 F1 bitkisi kullanmışlardır. *E. tereticornis* haritasının 268 markörle oluşturulduğunu ve 14 bağlantı grubu içerdiğini (919 cM), *E. globulus* haritasının 200 markörle oluşturulduğunu ve 16 bağlantı grubu içerdiğini (967 cM) bildirmişlerdir. Haritanın okalüptüs genomunun %90'ını temsil ettiğini ve markörler arası mesafenin ortalama 3.9 cM olduğunu görmüşlerdir. AFLP yönteminde 24 primer kombinasyonu ile 487'si 1:1 açılımında olan toplam 606 polimorfik bant elde etmişler ve primer başına düşen polimorfik bant sayısını 25.25 olarak bulmuşlardır.

Van der Wurff ve ark. (2000), çalışmalarında TE-AFLP ve standart AFLP yöntemini karşılaştırmışlardır. Çalışma öncesi 10 farklı adaptör, primer ve endonükleaz kombinasyonunu test etmişler ve fazla bant veren 5 kombinasyon seçmişlerdir. TE-AFLP yönteminin ilk aşaması olan kesim ve adaptör bağlanması aşamasında standart AFLP yönteminden farklı olarak bir tane fazladan kesim enziminin kullanılmasının, seçiciliğin artmasına dolayısıyla elde edilen fragment sayısının azalmasına ve polimorfizm yakalama olasılığının artmasına neden olduğunu bildirmişlerdir. AFLP yönteminin, TE-AFLP yönteminin 20 katı kadar fazla fragment verdiğini görmüşlerdir. TE-AFLP yönteminin karmaşık organizmalar için de rahatlıkla kullanılabilir, yüksek ayırma gücüne sahip, parmak izi analizleri için uygun, yeni bir teknik olduğunu bildirmişlerdir.

Hurtado ve ark. (2002), Kayısıda, Goldrich x Valenciano çaprazına ait 81 F1 bitkisinde, AFLP, RAPD, RFLP ve SSR markörleriyle genetik haritalama çalışması yapmışlardır. Tarama yaptıkları 160 RAPD primeri içinden seçtikleri 44 tanesiyle, 30'u Goldrich'te (1:1 açılımına sahip), 19'u Valenciano'da (1:1 açılımına sahip) ve 12 tanesi her iki ebeveynde de heterozigot olan (3:1 açılımına sahip) toplam 61 skorlanabilir bant elde etmişlerdir. Bu RAPD markörlerinden 33'ünü Goldrich haritasında, 19'unu Valenciano haritasında kullanmışlardır. AFLP yönteminde 14 primer kombinasyonu kullanmışlar ve hepsinde polimorfizm yakalamışlardır. Her primer kombinasyonunda ortalama 10 markör elde etmişler ve

toplam 140 markörden 95 tanesinin 1:1 açılımına sahip olduğunu, bunlardan 62 tanesinin Goldrich'te, 33 tanesinin Valenciano'da heterozigot olduğunu bildirmişlerdir. 45 tanesinin ise her iki ebeveynde de var olduğunu ve 3:1 açılımına sahip olduğunu bildirmişlerdir. Toplam 82 AFLP markörünü Goldrich'te, 48 AFLP markörünü Valenciano'nun haritasında kullanmışlardır. Aynı populasyonda 20 RFLP probunu taramışlar, 1 lokusun Valenciano'da heterozigot, 4 lokusun ise her iki ebeveynde de heterozigot (1:2:1) olduğunu ve taradıkları 45 SSR primerinin 17 tanesinin haritalama popülasyonunda açılım gösterdiğini bildirmişlerdir.

Roy ve ark. (2002), 29 farklı ülke orijinli 55 buğday genotipinde SAMPL ve BSA (Bulked Segregant Analysis) analizleri yapmışlardır. Genetik çeşitlilik analizi için buğdayda SAMPL ilk kez bu çalışmada uygulanmıştır. SAMPL analizleri için iki SAMPL primeri içeren (SAMPL-6 ve SAMPL-7) AFLP kiti kullanmışlardır. 2 SAMPL primeri ve üç seçici nükleotid içeren *MseI* primerleriyle 10 primer kombinasyonu oluşturmuşlardır. 43'ü polimorfik olan 87 bant elde etmişlerdir. SAMPL-6'nın, 22 si polimorfik olan 42 bant ve SAMPL-7'nin, 21'i polimorfik olan toplam 45 bant verdiğini bildirmişlerdir. Primer başına düşen toplam bant sayısını 8.7 ve primer başına düşen plimorfik bant sayısını 4.3 olarak bulmuşlardır. SAMPL primerlerinin polimorfizm bilgi içeriği ortalamasını (PBİ) 0.221 olarak bulmuşlardır. SAMPL markörlerinin markör indeksini (MI) 9.61 olarak hesaplamışlardır. 55 genotipten 54'ünü SAMPL analizi sonucunda elde edilen bant görüntüsüne göre ayırmışlardır. QTL analizleri için toplam 1185 SAMPL bandının polimorfik olan 568'inden faydalanmışlardır. Ayrıca BSA analizinde ebeveynlerde (özellik bakımından farklı, üç çift ebeveyn) polimorfizmi belirlemek için 1 SAMPL primeri ve 5 *MseI* primerle oluşturdukları 5 primer kombinasyonunu kullanmışlardır. 3 farklı özellik için de bant elde etmişlerdir. SAMPL yönteminin genetik çeşitlilik, etiketleme ve BSA analizleri için uygulanabilir bir yöntem olduğunu bildirmişlerdir.

Carlier ve ark. (2004), RAPD, AFLP ve ISSR markörleriyle ananas bitkisinde ($2n=50$), *Ananas comosus* x *Ananas bracteatus* çaprazına ait 46 F1 bitkisi kullanarak, ilk genetik haritayı yapmışlardır. *Ananas bracteatus*'a ait harita 60 RAPD, 264 AFLP ve 11 ISSR olmak üzere 335 markörle oluşturulmuş, 50 bağlantı grubu elde edilmiştir. 26 bağlantı grubunun en az 4 markör içerdiğini bildirmişlerdir.

Ananas comosus'a ait harita 33 RAPD, 115 AFLP, 8 ISSR ve çekirdek özelliğine ait bir lokus olmak üzere 157 markörden oluşturulmuş, 30 bağlantı grubu elde edilmiştir. Elde edilen bağlantı gruplarından 18 tanesinin en az 4 markör içerdiğini bildirmişlerdir. *A. bracteatus*'un genom büyüklüğünün 3693 cM olduğunu ve oluşturulan haritanın, *A. bracteatus* genomunun %57'sini kapsadığını, *A. comosus*'un genom büyüklüğünün ise 4146 cM olduğunu ve elde edilen haritanın genomun %31.6'sını kapsadığını bildirmişlerdir. *A. bracteatus* ve *A. comosus*'a ait fiziksel ve genetik uzaklık arasındaki ilişkiyi sırasıyla, ortalama 120 ve 127 kbp/cM olarak tahmin etmişlerdir. Çalışmada, test ettikleri 300 RAPD primeri içerisinde seçtikleri 70 primerin 83'ü *A. bracteatus*'ta ve 51'i *A. comosus*'ta heterozigot olan 134 polimorfik bant verdiğini, 48 AFLP primer kombinasyonunun 338'i *A. bracteatus*'ta ve 153'ü *A. comosus*'ta heterozigot olan toplam 491 polimorfik AFLP bandı verdiğini, 9 ISSR primerinin ise 26'sı *A. bracteatus*'ta ve 23'ü *A. comosus*'ta heterozigot olmak üzere toplam 49 polimorfik markör verdiğini bildirmişlerdir. AFLP yönteminde primer başına düşen polimorfik bant sayısını 10.2 olarak bulmuşlardır.

Beedanagari ve ark. (2005), pıkan cevizi (*Carya illinoensis*) çeşitlerinde RAPD ve AFLP markörlerini kullanarak ilk genetik haritayı yapmışlardır. Haritalama popülasyonu için Pawnee x Eliot çaprazına ait 120 F1 bitkisini (full-sibling) seçmişler ve double-pseudo-testcross haritalama stratejisini kullanmışlardır. Haritada 217 RAPD, 258 AFLP ve 2 morfolojik markör olmak üzere toplam 477 markör kullanmışlardır. Pawnee haritasının 218 markör içerdiğini, 176'sının kontrol çaprazına ait olduğu ve 16 büyük grup oluşturduğunu, 42'sinin kendileme çaprazına ait olduğu ve 13 küçük grup oluşturduğunu harita büyüklüğünün 2.227 cM'yi kapsadığını bildirmişlerdir. Elliot'a ait haritanın ise 150'si kontrol çaprazına ait 17 büyük grup ve 22'si kendileme çaprazına ait 9 küçük gruptan oluşan toplam 174 markör içerdiğini, harita büyüklüğünün 1.698 cM olduğunu bildirmişlerdir. RAPD analizlerinde 600 RAPD primerini taramışlar, güçlü ve polimorfik bant veren 90 tanesini (%15) 120 F1 bitkisi için kullanmışlar ve 217 RAPD markörü elde etmişlerdir. Bu markörlerden 174 (%80.2) kontrol çaprazından, 43 tanesinin (%19.8) kendileme çaprazından geldiğini bildirmişlerdir. 82 RAPD markörünün (%47.1)

Pawnee’de heterozigot, 92 RAPD markörünün (%52.9) Elliot’ta heterozigot olduğunu tespit etmişlerdir. Primerlerin ürettiği polimorfik markör sayısının her primer için 1–6 arasında değiştiğini ve primer başına düşen polimorfik markör sayısının 2.4 olduğunu hesaplamışlardır. AFLP yöntemi için ise 64 primer kombinasyonu kullanmışlar ve yüksek polimorfizm gösteren 20 primer kombinasyonunu haritalama için seçmişlerdir. 20 primer kombinasyonunun 258 markör ürettiğini, bunlardan 212’sinin (%82.2) kontrol çaprazına ait olduğunu, 46’sının (%17.8) kendileme çaprazına ait olduğunu, 212 kontrol çaprazı AFLP markörünün 116’sının (%54.7) Pawnee’de heterozigot ve 96’sının (%45.3) Elliot’ta heterozigot olduğunu bildirmişlerdir. Polimorfik markör sayısının 2–24 arasında değiştiğini ve primer başına düşen polimorfik bant sayısının 12.9 olduğunu hesaplamışlardır. Kendilemede daha az polimorfik markör elde edildiğini saptamışlardır. Bu haritanın ticari açıdan önemli olan özellikleri hangi genlerin kontrol ettiğini anlamak bakımından önemli olduğunu bildirmişlerdir.

Bolibok ve ark. (2005), SSR, ISSR ve SAMPL yöntemlerini kullanmışlardır. Bu üç markör sisteminin polimorfizm bulmadaki etki derecesini, 30 IL çavdar populasyonunda yapılan çalışmalarla kıyaslamışlar, bu markör sistemlerinden elde edilen verileri farklı istatistiksel metotlar ve katsayılar kullanarak karşılaştırmışlardır. ISSR analizi için 55 ISSR primerini test etmişler, temiz ve polimorfik bant veren 14 primeri genetik çeşitlilik çalışmaları için kullanmışlardır. Toplam 65 allel elde etmişlerdir. SSR analizi için, 19’u genomik kütüphanelerden, 19’u EST’den olmak üzere 38 primer kullanmışlardır. 55’i EST’den, 46’sı genomik SSR’dan olmak üzere toplam 101 allel elde etmişlerdir. SAMPL analizi için ise 37 SAMPL primeri (5’ ve 3’ ucunda mikrosatellit bölge içeren) ve 6 *MseI*+3 primeriyle oluşturdukları 222 kombinasyonunu taramışlar ve içerisinden seçtikleri 16 primer kombinasyonunu genetik çeşitlilik çalışması için kullanmışlardır. Toplam 319 SAMPL bandı elde etmişlerdir. ISSR, EST SSR, genomik SSR, SSR ve SAMPL için primer başına düşen allel sayılarını sırasıyla, 4.64, 2.89, 2.42, 2.66 ve 19.94 bulmuşlardır. ISSR yönteminde genetik benzerlik ortalamasını 0.28 ve SAMPL yönteminde 0.53 olarak bulmuşlardır. SSR yönteminde ise genomik kütüphanelerden faydalanarak oluşturulmuş primer kombinasyonlarıyla yapılmış çalışmada genetik benzerlik

ortalamasını 0.32 ve EST den faydalanarak oluşturulmuş primer kombinasyonlarıyla yapılan çalışmada bulunan genetik benzerlik ortalamasını 0.38 olarak bulmuşlardır. SSR yönteminde elde edilen bu her iki verinin ortalamasını 0.35 olarak hesaplamışlardır. Aynı özellik için çalışmada kullanılan bütün markör sistemlerinden elde edilen verilerin ortalamasını ise 0.49 olarak hesaplamışlardır. Polimorfizm bilgi içeriği değerlerini ISSR yöntemi için 0.88, SAMPL yöntemi için 0.40, SSR (EST) için 0.41, SSR (genomik) için 0.35 ve tüm SSR için 0.38 olarak bulmuşlardır. SAMPL yönteminin genetik çeşitlilik çalışması için en uygun yöntem olduğunu bildirmişlerdir.

Duval ve ark. (2005), farklı bölgelerden topladıkları 307 mango genotipi ile yaptıkları çalışmada, genom kütüphanesinden faydalanarak $(GA)_n$ ve $(GT)_n$ tekrarlarını içeren SSR primeri geliştirmişlerdir. 99 mikrosatellit primerle yaptıkları analizde 121'i polimorfik olan toplam 140 allel elde etmişlerdir. Primer başına düşen allel sayısını 1.41 ve primer başına düşen polimorfik allel sayısını 1.2 olarak bulmuşlardır. Her lokusta 4–11 arasında değişen sayıda allel olduğunu lokus başına ortalama allel sayısının 7.3 olduğunu bildirmişlerdir. Allellerin heterozigotluk seviyesinin 0.059–0.857 arasında değişim gösterdiğini saptamışlardır.

Gupta ve ark. (2005), Kanada için ekonomik önemi olan *Picea* cinsinde SAMPL yöntemi kullanarak genetik karakterizasyon çalışması yapmışlardır. 10 yeni SAMPL primerini 16 *MseI* kombinasyonu ile birlikte kullanmışlardır. SAMPL primerlerini *Picea abies* ve *Picea glauca* da bulunan yaygın mikrostallit bölgelere göre dizayn etmişlerdir. 160 SAMPL-*MseI* primer kombinasyonundan 6313 polimorfik SAMPL markörü elde etmişlerdir. Primer başına düşen polimorfik bant sayısını 39.5 olarak hesaplamışlardır. SAMPL yönteminin ıslah programları ve genetik çalışmalar için yüksek derecede bilgi veren bir markör sistemi olduğunu bildirmişlerdir.

Kafkas ve ark. (2005), AFLP ve SAMPL yöntemlerini kullanarak 21 ceviz genotipinde karakterizasyon ve genetik akrabalığı belirleme çalışması yapmışlardır. AFLP yönteminde 6 primer kombinasyonu kullanmışlar ve 89'u polimorfik olan toplam 179 AFLP bandı elde etmişlerdir. Primer başına düşen bant sayısını 29.8 ve primer başına düşen polimorfik bant sayısını 14.8 olarak bulmuşlardır. AFLP

yönteminde polimorfizm oranını %49.9 ve toplam ayırma gücünü 97.1 olarak hesaplamışlardır. Ayırma gücü değerlerinin 10.3 ile 18.9 aralığında değiştiğini ve ortalama ayırma gücünün 16.1 olduğunu bildirmişlerdir. SAMPL yönteminde 2 SAMPL primeri kullanmışlar ve %26'sı polimorfik olan toplam 51 bant elde etmişlerdir. Primer başına düşen polimorfik bant sayısını 13 ve primer başına düşen bant sayısını 25.5 olarak hesaplamışlardır. SAMPL yönteminde polimorfizm oranını %50.9 ve toplam ayırma gücünü 29.8 olarak hesaplamışlardır. Ayırma gücü değerlerini 13.7 ve 16.1 olarak hesaplamışlar, ortalama ayırma gücünü ise 14.9 olarak bulmuşlardır. SAMPL yönteminin toplam bant sayısı ve polimorfik bant sayısı bakımından AFLP yönteminden daha düşük değerler verdiği ancak polimorfizm oranı bakımından daha yüksek değer verdiğini ve SAMPL yönteminin yakın genotipleri birbirinden ayırmada daha etkili bir yöntem olduğunu bildirmişlerdir.

Tam ve ark. (2005), yaygın olarak yetişen ve ticari önemi olan domates ve biberdeki genetik akrabalığı belirlemek için SSAP, AFLP ve SSR yöntemlerini kullanmışlar, SSAP yöntemiyle elde ettikleri sonuçları dominant markör sistemi olan AFLP ve kodominat markör sistemi olan SSR yönteminden elde ettikleri sonuçlarla karşılaştırmışlardır. Çalışmada domates için 34 homozigot hat ve biber için 35 homozigot hat kullanmışlardır. SSAP yönteminde domates için bilinen bir retrotranspozon bölge içeren 3 primer seti, biber için de yine bilinen bir retrotranspozon bölge içeren 3 primer seti kullanmışlardır. Sonuçta, biberde 92'si (%76.03) polimorfik olan 121 bant elde etmişlerdir. Domateste ise 79'u (%57.3) polimorfik olan 138 bant skorlamışlardır. Primer başına düşen toplam bant sayısını domates için 46 ve biber için 40.33, primer başına düşen polimorfik bant sayısını yine sırasıyla 26.33 ve 30.67 olarak bulmuşlardır. AFLP yönteminde 9 primer seti kullanmışlar, domateste 123'ü (%14.56) polimorfik olan toplam 845 ve biberde 115'i (%8.031) polimorfik olan toplam 1432 bant skorlamışlardır. Domateste primer başına düşen toplam bant sayısını 93.89 ve primer başına düşen polimorfik bant sayısını 13.67 olarak tespit etmişlerdir. Yine AFLP yönteminde, biberde primer başına düşen toplam bant sayısını 159.11 ve primer başına düşen polimorfik bant sayısını 12.78 olarak hesaplamışlardır. SSR yönteminde ise domates için 16, biber için 13 primer seti kullanmışlardır. Domates için 39 farklı allel, biber için 31 farklı

allel skorlamışlardır. Domateste primer başına düşen toplam allel sayısını 2.44 ve polimorfik allel sayısını yine 2.44 (%100) olarak bulmuşlardır. Biberde ise SSR yöntemiyle primer başına düşen allel sayısı 2.385 ve polimorfik allel sayısı yine 2.385 (%100) olmuştur. SSAP, AFLP ve SSR yöntemlerinden elde edilen polimorfizm bilgi içeriği değerlerini ise sırasıyla domateste, 0.175, 0.046, 0.393 ve biberde yine sırasıyla, 0.229, 0.026 ve 0.354 olarak bulmuşlardır. SSAP yönteminin üç markör sistemi arasında, domates ve biber için, en çok bilgi veren markör sistemi olduğunu bildirmişlerdir. En yüksek markör indeksini (MI) SSAP yönteminde hesaplamışlardır. Domates için SSAP yönteminin genetik varyasyon ve akrabalığın belirlenmesinde uygun bir yöntem olduğunu, SSR yönteminin ise spesifik özellikleri ortaya koyan bir yöntem olduğunu bildirmişlerdir. Biber için, üç markör sisteminin de genel olarak benzer sonuçlar verdiğini ve bir türden izole edilen retrotranspozon sekansın genel olarak familya içerisindeki (Solanacea) diğer türler için de kullanılabilir olduğunu bildirmişlerdir.

Mnejja ve ark. (2005), Texas badem çeşidine ait genom kütüphanesinden 47 yeni SSR primeri geliştirmişlerdir. Bu primerlerden 42'sinin bademde polimorfik olduğunu ve yine bu 42 primerden 31'nin ise tek lokuslu olduğunu bildirmişlerdir. Lokus başına düşen ortalama allelin 6.6 olduğunu ve 31 SSR için %76'lık heterozigotluk ile gözlenen değerlerin %65 olduğunu belirlemişlerdir. SSR'ların diğer *Prunus* türlerine aktarılabilirliğinin yüksek (%83-%100) olduğunu saptamışlardır.

Saha ve ark. (2005), AFLP ve SSR markörleriyle çimende (*Festuca arundinacea*) ilk genetik haritayı oluşturmuşlardır. 91 F1 bitkisinde çalışmışlardır. İki ebeveyne ait haritayı double-pseudo-testcross haritalama stratejisi kullanılarak oluşturmuşlardır. Anneye (HD28–56) ait haritanın 558 markör içerdiğini ve 22 bağlantı grubundan oluştuğunu, haritanın genomun 2.013 cM'ini kapsadığını bildirmişlerdir. Babaya (R43–64) ait haritanın ise 579 markör içerdiğini, 22 bağlantı grubundan oluştuğunu, harita büyüklüğünün 1.722 cM olduğunu bildirmişlerdir. Markörler arası mesafenin anne haritasında ortalama 3.61 cM ve baba haritasında ortalama 2.97 cM olduğunu bulmuşlardır. AFLP yönteminde 55 AFLP primeri kullanmışlar bunlardan 22 tanesinin (%39) skorlanabilir bant ürettiğini, 136'sı *EcoRI-MseI* primer kombinasyonundan, 637'si *PstI-MseI* primer kombinasyonundan

olmak üzere toplam 773 markör elde ettiklerini bildirmişlerdir. Primer kombinasyonlarının 24–53 arasında polimorfik bant ürettiğini, primer başına düşen polimorfik bant sayısının 35 olduğunu belirlemişlerdir. HD28–56 haritasında 430 AFLP markörü, R43–64 haritasında 494 AFLP markörü kullanmışlardır. SSR yönteminde toplam 134 primer kombinasyonu kullanmışlar ve 343 polimorfik allel tespit etmişlerdir. Primer başına düşen allel sayısını 2.6 olarak bulmuşlardır. 131 tanesinin R43-64'te polimorfik, 161 tanesinin HD28-56'da polimorfik ve 51 tanesinin her iki ebeveynde de polimorfik olduğunu bildirmişlerdir.

Tosti ve ark. (2005), İtalya'nın merkezinde bulunan Trasimeno gölü'nün etrafında birbirine komşu olan üç araziden toplanmış 3 RL popülasyonuna ait bürülcede SAMPL ve AFLP yöntemlerini kullanarak hangi yöntemin genetik çeşitliliği belirlemede daha üstün olduğunu kıyaslamışlardır. AFLP yönteminde 5 primer kombinasyonu kullanmışlar ve 14'ü polimorfik (%7.11) olan toplam 197 bant, SAMPL yönteminde ise yine 5 primer kombinasyonu ile 34'ü polimorfik (%17.71) olan toplam 192 bant elde etmişlerdir. Primer başına düşen polimorfik bant sayılarını AFLP yönteminde 2.8 ve SAMPL yönteminde 6.8 olarak bulmuşlardır. Primer başına düşen toplam bant sayısını AFLP yönteminde 39.4 ve SAMPL yönteminde 38.4 olarak bulmuşlardır. Polimorfizm bakımından, her üç RL popülasyonu için de SAMPL yöntemiyle elde edilen polimorfizmin AFLP yöntemine göre daha fazla olduğunu bildirmişlerdir. SAMPL yöntemiyle daha düşük genetik benzerlik yakalamışlardır.

Zhang ve ark. (2005), pamukta C-AFLP ve AFLP yöntemleriyle çalışmışlardır. C-AFLP yönteminde, AFLP fragmentlerini sıklıkla kesen çeşitli kesim enzimleriyle kesmişlerdir. İki farklı genotipe ait toplam 7 örnek üzerinde yaptıkları çalışmada 64 primer çifti kullanmışlar, 211'i polimorfik olan 4679 fragment elde etmişlerdir. *TaqI* kesim enzimi kullanıldığında AFLP fragmentlerinin %30'unun kesildiğini, 100–300 bp arasında değişen uzunluklarda fragmentlerin elde edildiğini bildirmişlerdir. C-AFLP'nin, AFLP yönteminden, her iki genotip için de %67-%132 oranında daha fazla polimorfizm gösterdiğini, her AFLP primer kombinasyonu için 15.5–25.5 polimorfik C-AFLP markörü elde edilirken, AFLP yönteminde 9.1–11.0 polimorfik markör elde edildiği tespit etmişlerdir. C-AFLP

yönteminin genotipler arasındaki akrabalıkları belirlemede daha uygun olduğunu, yüksek ayrılma gücüne sahip bir markör sistemi olduğunu bildirmişlerdir. Tek bir örnek için aynı primer kombinasyonlarını kullanarak AFLP ve C-AFLP yöntemleriyle çoğaltılmış fragmentlerle, AFLP yönteminde ilk PCR öncesi kullanılan çeşitli kesim enzimi kombinasyonları ve C-AFLP yönteminde ikinci PCR sonrası kullanılan çeşitli kesim enzimi kombinasyonlarıyla genetik haritalama ve parmak izi analizi çalışmaları için sınırsız sayıda polimorfik markör elde edilebileceğini bildirmişlerdir.

Cavalcanti ve ark. (2007), kaju fıstığında (*Anacardium occidentale*) CP1001 (cüce klon) x CP96 (dev klon) çaprazına ait 85 F1 bitkisinde AFLP ve SSR markörlerini kullanarak genetik harita oluşturmuşlardır. Haritayı, 194 AFLP ve 11 SSR markörü olmak üzere toplam 205 markörden oluşturmuşlardır. CP1001'e ait haritanın 122 markör içerdiğini ve 19 bağlantı grubu oluşturduğunu, CP96'ya ait haritanın 120 markör içerdiğini ve 23 bağlantı grubu oluşturduğunu bildirmişlerdir. CP1001 harita büyüklüğünün 1050.7 cM olduğunu ve genomun %68'ini temsil ettiğini, CP96'ya ait harita büyüklüğünün ise 944.7 cM olduğunu ve genomun %64'ünü temsil ettiğini bildirmişlerdir. Markörler arası mesafeyi CP1001 haritasında 8.6 cM, CP96 haritasında 7.9 cM olarak hesaplamışlardır. AFLP yönteminde 50 primer kombinasyonu kullanmışlar, 140'ı 1:1 açılımında, 84'ü 3:1 açılımında olmak üzere toplam 224 polimorfik markör elde etmişlerdir. Primer başına düşen polimorfik bant sayısını 4.5 olarak bulmuşlardır. SSR yönteminde 20 SSR primeriyle 3 tanesi CP1001'de, 8 tanesi CP96'da ve 1 tanesi her iki ebeveynde de heterozigot olan toplam 12 markör elde etmişlerdir. CP1001 ve CP96 için toplam 27 allel elde etmişlerdir. Primer başına düşen polimorfik allel sayısını 2.25 olarak bulmuşlardır.

Boersma ve ark. (2007), SAMPL yöntemini kullanarak azot fiksasyonu yapan bir bitki olan *Lupinus angustifolius*'a ait RIL (Recombinant Inbred Lines) F8 haritalama popülasyonunda genetik haritalama çalışması yapmışlar ve ıslah edilecek genle bağlantılı markör bulmaya çalışmışlardır. Çalışmada kullanılan popülasyonu yabani ve ıslah edilmiş iki türün çaprazlanmasıyla elde etmişlerdir. Ebeveynlerle birlikte 89 bireyden oluşan bir popülasyonda çalışmışlardır. 160 adet SAMPL primer kombinasyonu kullanmışlardır. Toplam 153 primer kombinasyonunun polimorfik

olduğunu bildirmişler ve 1083 polimorfik markör skorlamışlardır. Her primer kombinasyonu için ortalama 6.7 markör polimorfizm göstermiştir. Haritayı %21'i kodominant, %79 dominant olan 522 markörle oluşturmuşlardır. İslah edilmiş türlere ait 7 fenotipik özellik ile ilgili markör bulmuşlardır. 7 markörden 3'ünün ilgili olduğu genle mesafesini 5 cM olarak bulmuşlardır. Haritanın toplam uzunluğunu 1543 cM ve markörler arası ortalama mesafeyi 3.4 cM olarak hesaplamışlardır.

Altıntaş ve ark. (2008), 22 ekmeklik buğday ile 12 esmer buğday olmak üzere toplam 34 buğday çeşidinde SAMPL ve AFLP yöntemleriyle genetik varyasyonu ve türe özgü bantları tespit etmeyi amaçlamışlardır. 5 AFLP ve 3 SAMPL primer kombinasyonu kullanmışlar ve 5 AFLP primer kombinasyonundan 251 polimorfik bant, 3 SAMPL primer kombinasyonundan 93 bant olmak üzere toplam 214'ü (%62) polimorfik olan 344 bant skorlamışlardır. AFLP yönteminde üç buğday çeşidi için primer başına düşen toplam polimorfik bant sayısının 75.8 ve SAMPL yönteminde üç buğday çeşidi için primer başına düşen toplam polimorfik bant sayısının 45.7 olduğunu bildirmişlerdir. E_{ACG}/ M_{AGG} kombinasyonunun en polimorfik olduğunu, en düşük polimorfizmi, SAMPL6/M_{AGA} kombinasyonunun verdiğini bildirmişlerdir. AFLP yönteminden elde ettikleri polimorfizm oranlarını beyaz buğday, esmer buğday ve ekmeklik buğday için sırasıyla %64, %40 ve %48 olarak bulmuşlar, SAMPL yönteminden elde ettikleri polimorfizm oranlarını ise yine aynı sırayla, %62, %39 ve %47 olarak tespit etmişlerdir. AFLP yöntemiyle primer kombinasyonlarından elde ortalama ayırma gücünü beyaz buğdayda 39.96, esmer buğdayda 19.42 ve ekmeklik buğdayda 31.22 olarak bulmuşlardır. SAMPL yönteminde ise ayırma gücü ortalamalarını beyaz buğday için 25.5, esmer buğday için 15.9 ve ekmeklik buğday için 20.4 olarak hesaplamışlardır. Çalışma sonucunda beyaz buğday çeşidi için 7, esmer buğday çeşidi için 6 adet türe özgü markör bulmuşlardır.

Li ve ark. (2008), şeftalide (*Prunus persica* L.) SSR yöntemiyle çalışmışlar ve 51 çeşit şeftalide filogenetik ilişkiyi ve evrimsel gelişimi incelemişlerdir. 22 SSR primeri ile 111 allel tespit etmişlerdir. Lokus başına 2–11 arasında değişen sayıda allel elde etmişler ve lokus başına ortalama 5 allel düştüğünü belirlemişlerdir. Geleneksel olarak yapılan sınıflandırmada, çalışmada kullanılan bu 51 çeşit şeftalinin

6 farklı gruba ait olduğunun bilindiği, SSR analizleri sonucunda da şekerli, yassı, tüysüz, bal, sarı ve sulu şeftali olarak adlandırılabilen 6 grubun ortaya çıktığı, Çin'deki genetik çeşitliliğin bu belirtilenlerden de fazla olduğunu bildirmişlerdir. UPGMA ile yapılan küme analizleri sonucunda ise 5 grup elde etmişlerdir. Bu 5 grubun kapsadığı bireylerin geleneksel sınıflandırma ve SSR verileri sonucunda yapılan sınıflandırmayla paralellik göstermediğini bildirmişlerdir. Sonuçta, SSR yönteminin zengin genetik çeşitliliği açığa çıkarttığını bildirmişlerdir.

Kafkas ve ark. (2008), Türkiye'nin 4 farklı bölgesinden (Karadeniz, Akdeniz, İç Anadolu ve Doğu Anadolu) topladıkları 43 dut genotipinde (33 adet karadut, *M. nigra*, 5 adet kırmızı dut, *M. rubra*, 5 adet beyaz ve mor dut, *M. alba*) AFLP yöntemiyle karakterizasyon çalışması yapmışlardır. 8 primer kombinasyonu (E_{AAG}/M_{CAC} , E_{AAG}/M_{CCA} , E_{AAG}/M_{CCG} , E_{AAC}/M_{CAC} , E_{ACC}/M_{CCT} , E_{AAC}/M_{CGA} , E_{AGC}/M_{CCC} , E_{AGG}/M_{CCC}) kullanmışlar ve 337'si polimorfik olan toplam 416 bant elde etmişlerdir. Primer başına düşen toplam bant sayısını 52 ve primer başına düşen polimorfik bant sayısını 42.1 olarak bulmuşlardır. Polimorfizm oranını %80.5 olarak hesaplamışlar, ayırma gücü değerlerinin 0.410 (E_{AAG}/M_{CCG}) ile 0.942 (E_{ACC}/M_{CCT}) arasında değiştiğini tespit etmişler, toplam ayırma gücünün 5.015 olduğunu bildirmişlerdir. Ayırma gücü ortalamasını 0.62 olarak hesaplamışlardır. Polimorfizm bilgi içeriğinin 0.662 ile 0.898 arasında değiştiğini ve ortalama polimorfizm bilgi içeriğinin 0.812 olduğunu bulmuşlardır. UPGMA analizleri sonucunda, *M. nigra*, *M. rubra* ve *M. alba*'yı temsil eden üç farklı küme oluştuğunu, *M. alba*'nın meyve rengine göre beyaz ve mor dut olarak iki alt grup oluşturduğunu bildirmişlerdir. Sonuçta, *M. nigra* ve *M. rubra*'nın moleküler olarak *M. alba*'dan uzak olduğunu ve *M. nigra*'nın morfolojik çeşitliliğinin düşük olduğunu, moleküler olarak da kendi içinde benzer ve genetik çeşitliliğinin az olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar, AFLP yönteminin genotipleri ayırmada başarılı bir yöntem olduğunu ve dut populasyonları için kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

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

Bu çalışmada materyal olarak, daha önce Manisa-Koruköy'de (**Kafkas ve ark. (2000)**) tarafından bulunan monoik atlantik sakızı genotipinin kendilenmesiyle oluşturulan ve Gaziantep Antepfıstığı Araştırma Enstitüsü Araştırma ve Uygulama Bahçesinde bulunan (**Kafkas ve ark., 2003**) 10 adet kendilenmiş monoik atlantik sakızı yavru bitkisi ve 1 ana bitki olmak üzere toplam 11 bitkiden alınan yaprak örnekleri kullanılmıştır.

3.2. Metod**3.2.1. Yaprak Örneklerinin Toplanması**

Kendilenmiş monoik atlantik sakızı popülasyonuna ait 10 adet yavru bitki ve ebeveyne ait ağaçlardan genç yaprak örnekleri 2007 ilkbahar döneminde toplanmış ve yapraklar ayrı ayrı alüminyum folyoya sarılarak buz kutusu içerisinde Çukurova Üniversitesi'ne getirilmiştir. DNA izolasyonuna kadar -80°C 'de saklanmıştır.

3.2.2. DNA İzolasyonu

Yaprak örneklerinden DNA izolasyonu **Doyle ve Doyle (1987)**'nin geliştirdiği ve **Kafkas ve ark. (2006a)** tarafından modifiye edilen CTAB yöntemine göre yapılmıştır.

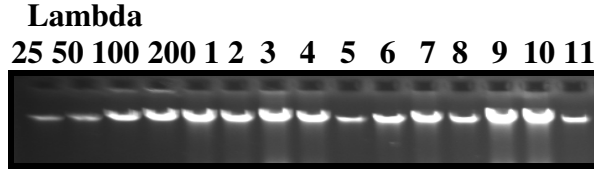
Bu yöntemeye göre; her bir antepfıstığı örneği için 1 g genç yaprak örneği, içerisinde sıvı azot bulunan havanda iyice ezildikten sonra 15 ml'lik tüplere alınmış ve tüpler içerisine 6 ml CTAB tampon çözeltisi (100 mM Tris-HCl, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, %2 CTAB, %2 PVP, %0.1 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) eklenmiş ardından sıcaklığı 65°C 'de olan su banyosuna koyulmuştur. İçerisinde ezilmiş yaprak örnekleri bulunan tüpler her 5–10 dk'da bir karıştırılarak 60 dk 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 dk'da bir karıştırılarak oda koşullarında 15 dk tutulmuştur. Daha sonra 5500 rpm'de 15 dk süre ile santrifüj edilmiştir. Üstteki faz yeni bir tüpe aktarılmış ve içerisine eşit oranda soğuk (-20⁰C'de bekletilmiş) isopropanol ilave edilmiştir ve tüp yavaşça çevrilerek DNA'nın çökmesi sağlanmıştır. Daha iyi bir çökme sağlamak için örnekler 2 saat -70⁰C'de veya 1 gece -20⁰C'de bekletilmiştir. Daha sonra tüpler 2.000 rpm'de 2 dk süre ile santrifüj edilerek tüp içerisindeki isopropanol boşaltılmıştır. Tüpün içerisine, içeriğinde 10 mM amonyum asetat bulunan, 3 ml %76'lık etanol yani yıkama tampon çözeltisi ilave edilmiş ve 1–2 saat çalkalanmıştır. Yıkanan DNA kurutulmuş ve saf suda çözündürülmüş ve DNA izolasyonu işlemi bu şekilde tamamlanmıştır.

3.2.3. DNA Miktarının Belirlenmesi ve DNA Konsantrasyonun PCR Reaksiyonları için Ayarlanması

İzole edilen DNA'nın miktarı, konsantrasyonu belli lambda DNA ve jel-elektroforez yöntemiyle UV ışık altında karşılaştırma yapılarak belirlenmiştir. Bu aşamada %0.8'lik agaroz jel kullanılmıştır.

İzole edilmiş ve saf suda çözündürülmüş olan her bir kendilenmiş monoik atlantik sakızı genotipine ait DNA'lardan, ebeveyn DNA'sından ve konsantrasyonu bilinen λ DNA'lardan (25, 50, 100 ve 200 ng) 2 μ l alınarak, 14 μ l saf su ve 4 μ l yükleme boyası ile 20 μ l'lik bir karışım hazırlanmış ve bu karışımın 10 μ l'si %0.8'lik konsantrasyonda hazırlanmış olan agaroz jelin kuyucuklarına yüklenmiştir. Jel, elektroforez tankına yerleştirilmiş ve 45 dk süresince 90 voltta elektroforez işlemi yapılmıştır. Elektroforez sonrasında jelin UV ışık altında görüntüsü alınmıştır (**Şekil 3.1**).

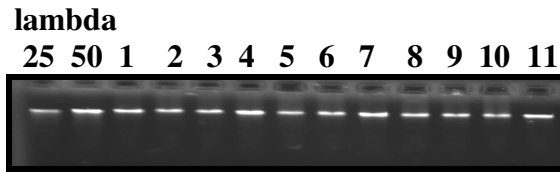


Şekil 3.1. Kendilenmiş monoik atlantik sakızı ve 10 adet yavru bireyden izole edilen DNA'nın miktarına ait jel görüntüsü. Kullanılan λ DNA'lar sırasıyla 25 ve 50 ng **1**. Monoik ana atlantik sakızı ve diğerleri sırasıyla: **2.** 46, **3.** 50, **4.** 51, **5.** 53, **6.** 54, **7.** 55, **8.** 10, **9.** 18, **10.** 20, **11.** 26 no'lu yavru bireyler.

Görünen λ DNA konsantrasyonlarıyla, genotiplere ait DNA konsantrasyonları arasında bir karşılaştırma yapılarak, stok DNA'ların konsantrasyonu tahmin edilmiştir. Daha sonra RNA kirliliğini ortadan kaldırmak amacıyla her örnek için stok DNA'ya 1 μ l RNase A (Ribonuclease A, Fermentas) eklenmiş ve 37⁰C'de 15–20 dk bekletilmiştir.

PCR reaksiyonlarında standardı sağlamak amacıyla stok DNA'lardan AFLP analizlerinde kullanmak üzere 50 ng/ μ l, SSR analizlerinde kullanmak üzere 5 ng/ μ l, konsantrasyonlarda hazırlanmıştır.

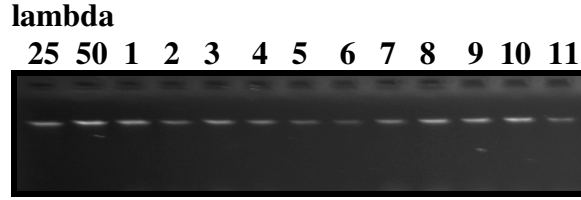
DNA'nın 50 ng ayarlamasının gerçekleşip gerçekleşmediğini jelde kontrol edebilmek için 50 ng olarak hazırlanan DNA'dan 2 μ l alınarak, 14 μ l saf su ve 4 μ l yükleme boyası ile 20 μ l'lik bir karışım hazırlanmış ve bu karışımın 10 μ l'si %0.8'lik konsantrasyonda hazırlanmış olan agaroz jelin kuyucuklarına yüklenmiştir (**Şekil 3.2**).



Şekil 3.2. Kendilenmiş monoik atlantik sakızı ve 10 adet yavru bireyden izole edilen DNA'nın miktarına göre yapılan 50 ng konsantrasyonda DNA'nın jel görüntüsü. Kullanılan λ DNA'lar sırasıyla 25 ve 50 ng **1**. Monoik ana atlantik sakızı ve diğerleri sırasıyla: **2.** 46, **3.** 50, **4.** 51, **5.** 53, **6.** 54, **7.** 55, **8.** 10, **9.** 18, **10.** 20, **11.** 26 no'lu yavru bireyler.

DNA'nın 5 ng ayarlamasının gerçekleşip gerçekleşmediğini jelde kontrol edebilmek için ise, 5 ng olarak hazırlanan DNA'dan 10 μ l alınarak, 4 μ l yükleme boyası ve 10 μ l saf su ile yine 20 μ l'lik bir karışım hazırlanmış ve bu karışımın 10

μ l'si %0.8'lik konsantrasyonda hazırlanmış olan agaroz jelin kuyucuklarına yüklenmiştir (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Kendilenmiş monoik atlantik sakızı ve 10 adet yavru bireyden izole edilen DNA'nın miktarına göre yapılan 5 ng konsantrasyonda DNA'nın jel görüntüsü. Kullanılan λ DNA'lar sırasıyla 25 ve 50 ng **1.** Monoik ana atlantik sakızı ve diğerleri sırasıyla: **2.** 46, **3.** 50, **4.** 51, **5.** 53, **6.** 54, **7.** 55, **8.** 10, **9.** 18, **10.** 20, **11.** 26 no'lu yavru bireyler.

Konsantrasyonu bilinen λ DNA'lar (25 ve 50 ng) kullanılarak ve jel-elektroforez yöntemiyle UV ışık altında karşılaştırma yapılarak, hazırlanan DNA'ların 50 ng konsantrasyonda ve 5 ng konsantrasyonda olup olmadığının testi yapılmıştır. Tahmini olarak istenen miktardan az olan DNA konsantrasyonları için DNA eklenmiş, fazla olanlar için ise saf su eklenmiştir ve istenen ayarlamının gerçekleşip gerçekleşmediği aynı şekilde jel görüntüsü alınarak kontrol edilmiştir.

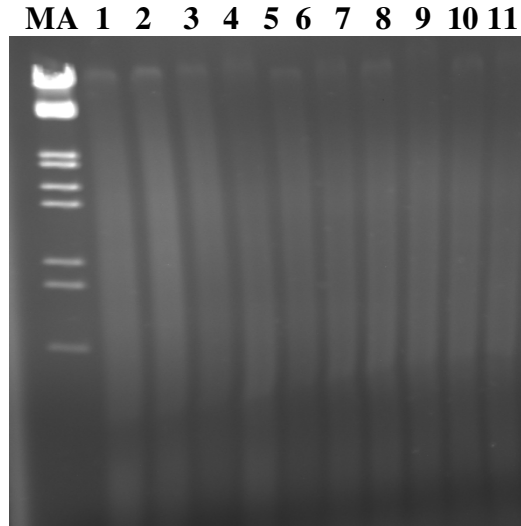
3.2.4. AFLP Analizleri

AFLP-PCR analizleri Vos ve ark.'nın (1995) geliştirdiği yöntemle yapılmıştır.

AFLP analizlerinde restriksiyon (DNA'nın kesilmesi) ve ligasyon (adaptör bağlanması) işlemleri birlikte ve 11 μ l hacimde yapılmıştır. Reaksiyon, 250–300 ng DNA, 5 ünite *Eco*RI kesim enzimi, 1 ünite *Mse*I kesim enzimi, 0.5 μ M *Eco*RI adaptör, 5 μ M *Mse*I adaptör, 10 x T₄ DNA ligaz tampon çözeltisi (40 mM Tris HCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 0.5 mM ATP, pH:7.8, 25⁰C), 50 mM NaCl, 0.05 mg/ μ l BSA ve 1 ünite T₄ DNA ligaz içerecek şekilde hazırlanmıştır. Hazırlanan reaksiyon karışımı 37⁰C'de 8 saat inkübe edilmiştir.

İnkübasyon süresinin bitiminde kesim ve bağlanma reaksiyonunun gerçekleşip gerçekleşmediğini kontrol etmek amacıyla ürünün yarısı %1.5'lük agaroz

jelde, 130 voltta ve 1.5 saatte koşulmuş ve UV ışığı altında jel görüntüsü alınmıştır. DNA bantlarının uzunluğunu görmek için λ DNA'nın *EcoRI* ve *HindIII* kesim enzimleriyle hazırlanmış ve ticari olarak satılan DNA'sı kullanılmıştır. Bant büyüklükleri sırasıyla, 564, 831, 947, 1375, 1584, 1904, 2027, 3520 bp şeklindedir. **Şekil 3.4**'te kesim ve bağlanma reaksiyonunun gerçekleşip gerçekleşmediğini kontrol etmek amacıyla alınan jel görüntüsü verilmiştir. *EcoRI* ve *MseI* kesim enzimleriyle iyi şekilde kesilmiş DNA'nın 100–1500 bp'de net olarak bant vermesi beklenmektedir. **Çizelge 3.1**'de *EcoRI* ve *MseI* kesim enzimlerinin tanıma bölgeleri ve kesim özellikleri verilmiştir.



Şekil 3.4. AFLP yönteminde kesim ve bağlanma reaksiyonunun gerçekleşip gerçekleşmediğini kontrol etmek amacıyla alınan jel görüntüsü. **MA:** Moleküler ağırlık, **1.** Monoik ana atlantik sakızı, **2.** 46, **3.** 50, **4.** 51, **5.** 53, **6.** 54, **7.** 55, **8.** 10, **9.** 18, **10.** 20, **11.** 26 no'lu yavru bireyler.

Çizelge 3.1. *EcoRI* ve *MseI* kesim enzimlerinin tanıma bölgeleri ve kesim özellikleri.

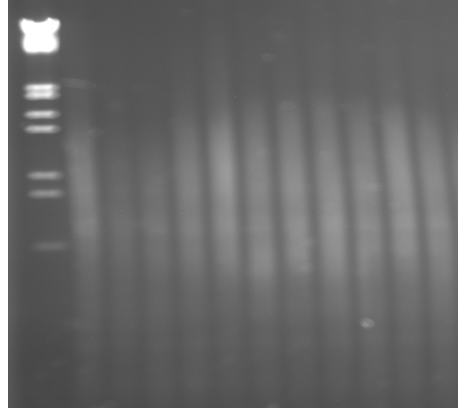
Kesim Enzimi	Tanıma Bölgesi	Kesim Özelliği
<i>EcoRI</i>	5'-G ^A A T T C-3' 3'-C T T A A ^G -5'	Nadir kesen enzim
<i>MseI</i>	5'-T ^A T A A-3' 3'-A A T ^A -5'	Sıklıkla kesen enzim

Kesim ve bağlanma reaksiyonunun gerçekleştiği görüldüğünde ise elde edilen ürünün diğer yarısı TE tampon çözeltisiyle (pH=8, 120 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA) 20 kat seyreltilmiş ve 4 μ l'si ön selektif PCR reaksiyonu için kullanılmıştır.

Ön selektif PCR reaksiyonu 20 µl hacminde yapılmış ve reaksiyon 1 x PCR tampon çözeltisi (10 mM Tris-HCl, pH: 8.8, 50 mM KCl, %0.08 Nonident P40), 2 mM MgCl₂, 200 µM dNTP, 0.25'er µM 1 seçici nükleotid içeren *EcoRI* primer ve *MseI* primerler ve 1 ünite Taq DNA polymeraz içerecek şekilde hazırlanmıştır. PCR döngü koşulları; 94⁰C'de 1 dk ilk denatürasyon, daha sonraki 30 döngü, 94⁰C'de 30 sn denatürasyon, 52⁰C'de 30 sn primerlerin bağlanması (annealing), 72⁰C'de 30 sn uzama (extension) ve son uzama aşaması 72⁰C'de 5 dk şeklinde olmuştur.

Ön PCR sonucunda elde edilen ürünün yarısıyla ön selektif amplifikasyonunun gerçekleşip gerçekleşmediği kontrol edilmiştir. Ön PCR ürününün yarısı %1.5'lük agaroz jelde 130 voltta ve 1.5 saat koşulmuş ve UV ışığı altında jel görüntüsü alınmıştır (**Şekil 3.5**). DNA bantlarının uzunluğunu belirlemek için λ DNA'nın *EcoRI* ve *HindIII* kesim enzimleriyle hazırlanmış ve ticari olarak satılan DNA'sı kullanılmıştır. Bant büyüklükleri sırasıyla, 564, 831, 947, 1375, 1584, 1904, 2027, 3520 bp şeklindedir.

MA 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11



Şekil 3.5. E01/M01 primer kombinasyonları kullanılarak yapılan ön selektif PCR reaksiyonu sonrası elde edilen jel görüntüsü. **MA:** Moleküler ağırlık, **1.** Monoik ana atlantik sakızı, **2.** 46, **3.** 50, **4.** 51, **5.** 53, **6.** 54, **7.** 55, **8.** 10, **9.** 18, **10.** 20, **11.** 26 no'lu yavru bireyler.

Amplifikasyonun gerçekleştiği görüldüğünde ise ürünün diğer yarısı TE tampon çözeltisi ile (pH=8, 120 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA) 20 kat seyreltilmiş ve bunun 4 µl'si selektif PCR amplifikasyonu için kullanılmıştır. Selektif PCR reaksiyonu 20 µl hacimde gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon 1 x PCR tampon çözeltisi

(10 mM Tris-HCl, pH: 8.8, 50 mM KCl, %0.08 Nonident P40), 2 mM MgCl₂, 200 µM dNTP, 0.25'er µM *EcoRI* ve *MseI* primerler ve 1 ünite Taq DNA polymeraz içermiştir. Seçici PCR döngü koşulları, 94⁰C'de 2 dk ilk döngü, sonraki 10 döngü, 94⁰C'de 45 sn denatürasyon, 66⁰C'de 45 sn bağlanma (her döngüde sıcaklık 1⁰C azalmıştır), 72⁰C'de 2 dk uzama aşaması şeklinde olmuştur. Daha sonra 20 döngü boyunca 94⁰C'de 45 sn denatürasyon, 56⁰C'de 45 sn bağlanma, 72⁰C'de 2 dk uzama aşaması ve son uzama aşaması 60⁰C'de 30 sn olacak şekilde hazırlanmıştır.

AFLP reaksiyonlarında ön PCR aşamasında 1 seçici nükleotid içeren *EcoRI* primer, *EcoRI*+A ve *MseI* primerler *MseI*+A, *MseI*+C ve *MseI*+G kullanılmıştır. Seçici PCR aşamasında 6-FAM ve VIC flourosan boya ile etiketli, 3 seçici nükleotid içeren 2 adet *EcoRI* primer, 3 seçici nükleotid içeren, 48 adet etiketsiz *MseI* primerlerle 96 primer kombinasyonu yapılarak kullanılmıştır.

AFLP analizlerinde PET ve NED ile etiketli primerlerin iyi sonuç vermemesi nedeniyle 6-FAM ve VIC flourosan boya ile etiketli primerler kullanılmıştır.

3.2.5. SAMPL Analizleri

Standart AFLP den farklı olarak ikinci PCR aşamasında her biri 0.25 mM olan ve 3 seçici nükleotid içeren 48 adet işaretli *MseI* primerlerinin, 0.25 mM 6-FAM ve VIC flourosan boya ile işaretli SAMPL-6 ve SAMPL-7 primerler ile kombinasyonu kullanılmıştır. Standart AFLP yönteminde olduğu gibi toplam 96 primer kombinasyonu denenmiştir.

3.2.6. TE-AFLP Analizleri

TE-AFLP analizlerinde 50 ng DNA kullanılmıştır. Kesim ve bağlanma reaksiyonu için, DNA ligaz tampon çözeltisi (40 mM Tris HCl, pH: 7.8, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 0.5 mM ATP), 0.1 µM *XbaI* adaptör, 0.1 µM *BamHI* adaptör, 0.5 ünite T₄ DNA ligaz, 6 ünite *XbaI*, 1.25 ünite *BamHI* 1 ünite *RsaI* enzimleri ile son hacim 20 µl olacak şekilde reaksiyon hazırlanmış ve 1.5 saat 30⁰C'de inkübasyona bırakılmıştır.

Çalışma öncesinde *Xba* adaptör I ve *Xba* adaptör II ile *Bam*HI adaptör I ve *Bam*HI adaptör II, 95⁰C sıcaklıkta 3 dk bekletildikten sonra birleştirilmiş ve *Xba* adaptör ile *Bam*HI adaptör elde edilmiştir. **Çizelge 3.2**'de *Xba*I, *Bam*HI, *Rsa*I kesim enzimlerinin tanıma bölgeleri ve özellikleri verilmiştir.

Çizelge 3.2. *Xba*I, *Bam*HI, *Rsa*I kesim enzimlerinin tanıma bölgeleri ve özellikleri.

Kesim Enzimi	Tanıma Bölgesi	Kesim Özelliği
<i>Xba</i> I	5'-T [^] C T A G A-3' 3'-A G A T C [^] T-5'	Nadir kesen enzim
<i>Bam</i> HI	5'-G [^] G A T C C-3' 3'-C C T A G [^] G-5'	Nadir kesen enzim
<i>Rsa</i> I	5'-G T [^] A C-3' 3'-C A [^] T G-5'	Sıklıkla kesen enzim

İnkübasyon sonrasında elde edilen ürünün 0.5 µl'si direk seçici PCR için kullanılmıştır. Seçici PCR da 0.2 µM FAM veya VIC flourosan boyayla işaretli *Xba* adaptör primer, *Xba*+CC ve *Xba*+CA ile 0.2 µM pmol, işaretsiz *Bam*HI adaptör primerler, *Bam*HI+A, *Bam*HI+C, *Bam*HI+G, *Bam*HI+T kullanılarak toplam 8 primer kombinasyonu yapılmıştır. Reaksiyon 25 µl hacimde yapılmış, 1 x PCR tampon çözeltisi (10 mM Tris HCl, pH: 8.8, 50 mM KCl, %0.08 Nonident P40), 120 µM dNTP, 1.8 mM MgCl₂ ve 1.25 ünite Taq DNA polymeraz içerecek şekilde hazırlanmıştır. PCR döngü koşulları; ilk döngü 2.5 dk 95⁰C'de denatürasyon, daha sonra 95⁰C'de 30 sn denatürasyon, 70⁰C'de 30 sn bağlanma, 72⁰C'de 60 sn uzama aşaması 10 döngü boyunca devam etmiş, sonra 95⁰C'de 30 sn denatürasyon, 60⁰C'de 30 sn bağlanma ve 72⁰C'de 60 sn uzama aşaması 40 döngü boyunca devam etmiş, son uzama aşaması 72⁰C'de 20 dk olacak şekilde ayarlanmıştır.

3.2.7. AFLP ve AFLP Benzeri Markör Analizlerinde Kapiller Elektroferez Koşulları ve Kullanılan Primerler

Kapiller elektroferez işlemi ABI 3130xl [Applied Biosystems Inc., Foster City, Calif, (ABI)] genetik analizör cihazı kullanılarak yapılmıştır. PCR işlemi

sonrası, her bir örnek için 1 µl PCR ürünü alınmış, 9.8 µl Hi-Di Formamid ve 0.2 µl LIZ-500 size standart ile birlikte bir kuyucuğa yüklenmiştir. Daha sonra 95⁰C’ de 5 dk bekletilerek denatüre olması sağlanmış ve denatürasyon sonrası 5 dk buzda bekletilerek DNA’nın tek iplikçik halinde ABI 3130xl cihazına yüklenmesi sağlanmıştır.

Araştırmada kullanılan AFLP, SAMPL ve TE-AFLP yöntemlerinde kullanılan primer kombinasyonları ve sayıları **Çizelge 3.3**’de verilmiştir. AFLP ve AFLP benzeri yöntemler için kullanılan adaptör ve primer isimleri ve baz dizilimleri ise **Çizelge 3.4**’de verilmiştir.

Çizelge 3.3. AFLP ve AFLP’den türemiş yöntemlerde kullanılan primer kombinasyonları.

Yöntemler	İleri Primerler	Geri Primerler	Toplam Primer Kombinasyonu
AFLP	2 adet <i>EcoRI</i> primer	48 adet <i>MseI</i> primer	96 adet <i>EcoRI/MseI</i> primer kombinasyonu
SAMPL	2 adet SAMPL primer	48 adet <i>MseI</i> primer	96 adet SAMPL/ <i>MseI</i> primer kombinasyonu
TE-AFLP	2 adet <i>Xba</i> primer	4 adet <i>BamHI</i> primer	8 adet <i>Xba/BamHI</i> primer kombinasyonu
TOPLAM			200 primer kombinasyonu

Çizelge 3.4. AFLP ve AFLP’den türemiş yöntemlerde kullanılan adaptör, önselektif ve selektif primerleri.

	Primer/ Adaptör Adı	Kısaltma	Baz Dizilimi (5’-3’)
Adaptörler	<i>EcoRI</i> adaptör-1		CTCGTAGACTGCGTACC
	<i>EcoRI</i> adaptör-1		AATTGGTACGCAGTCTAC
	<i>MseI</i> adaptör-1		GACGATGAGTCCTGAG
	<i>MseI</i> adaptör-1		TACTCAGGAACTCAT
	<i>BamHI</i> adaptör-1		ACGAAGTCCC GCGCCAGCAA
	<i>BamHI</i> adaptör-2		GATCTTGCTGGCGCGGG
	<i>Xba</i> adaptör-1		ACGTTGTGGCGGCGTTCGAGA
	<i>Xba</i> adaptör-2		CTAGTCTCGACGCCGCC

Çizelge 3.4'ün devamı.

	Primer/ Adaptör Adı	Kısaltma	Baz Dizilimi (5'-3')
Önselektif primerleri	<i>EcoRI</i> +A	E01	GACTGCGTACCAATTCA
	<i>Msel</i> +A	M01	GATGAGTCCTGAGTAAA
	<i>Msel</i> +C	M02	GATGAGTCCTGAGTAAC
	<i>Msel</i> +G	M03	GATGAGTCCTGAGTAAG
Selektif primerleri	<i>EcoRI</i> +AAG	E33(FAM)	GACTGCGTACCAATTCAAG
	<i>EcoRI</i> +AGG	E42(VIC)	GACTGCGTACCAATTCAGG
	<i>Msel</i> +AAA	M31	GATGAGTCCTGAGTAAA
	<i>Msel</i> +AAC	M32	GATGAGTCCTGAGTAAC
	<i>Msel</i> +AAG	M33	GATGAGTCCTGAGTAAG
	<i>Msel</i> +AAT	M34	GATGAGTCCTGAGTAAT
	<i>Msel</i> +ACA	M35	GATGAGTCCTGAGTACA
	<i>Msel</i> +ACC	M36	GATGAGTCCTGAGTACC
	<i>Msel</i> +ACG	M37	GATGAGTCCTGAGTACG
	<i>Msel</i> +ACT	M38	GATGAGTCCTGAGTACT
	<i>Msel</i> +AGA	M39	GATGAGTCCTGAGTAGA
	<i>Msel</i> +AGC	M40	GATGAGTCCTGAGTAGC
	<i>Msel</i> +AGG	M41	GATGAGTCCTGAGTAGG
	<i>Msel</i> +AGT	M42	GATGAGTCCTGAGTAGT
	<i>Msel</i> +ATA	M43	GATGAGTCCTGAGTATA
	<i>Msel</i> +ATC	M44	GATGAGTCCTGAGTATC
	<i>Msel</i> +ATG	M45	GATGAGTCCTGAGTATG
	<i>Msel</i> +ATT	M46	GATGAGTCCTGAGTATT
	<i>Msel</i> +CAA	M47	GATGAGTCCTGAGTCAA
	<i>Msel</i> +CAC	M48	GATGAGTCCTGAGTCAC
	<i>Msel</i> +CAG	M49	GATGAGTCCTGAGTCAG
	<i>Msel</i> +CAT	M50	GATGAGTCCTGAGTCAT
	<i>Msel</i> +CCA	M51	GATGAGTCCTGAGTCCA
	<i>Msel</i> +CCC	M52	GATGAGTCCTGAGTCCC
	<i>Msel</i> +CCG	M53	GATGAGTCCTGAGTCCG
	<i>Msel</i> +CCT	M54	GATGAGTCCTGAGTCCT
	<i>Msel</i> +CGA	M55	GATGAGTCCTGAGTCGA
	<i>Msel</i> +CGC	M56	GATGAGTCCTGAGTCGC
<i>Msel</i> +CGG	M57	GATGAGTCCTGAGTCGG	
<i>Msel</i> +CGT	M58	GATGAGTCCTGAGTCGT	

Çizelge 3.4'ün devamı.

	Primer/ Adaptör Adı	Kısaltma	Baz Dizilimi (5'-3')
Selektif primerleri	<i>Msel</i> +CTA	M59	GATGAGTCCTGAGTCTA
	<i>Msel</i> +CTC	M60	GATGAGTCCTGAGTCTC
	<i>Msel</i> +CTG	M61	GATGAGTCCTGAGTCTG
	<i>Msel</i> +CTT	M62	GATGAGTCCTGAGTCTT
	<i>Msel</i> +GAA	M63	GATGAGTCCTGAGTGAA
	<i>Msel</i> +GAC	M64	GATGAGTCCTGAGTGAC
	<i>Msel</i> +GAG	M65	GATGAGTCCTGAGTGAG
	<i>Msel</i> +GAT	M66	GATGAGTCCTGAGTGAT
	<i>Msel</i> +GCA	M67	GATGAGTCCTGAGTGCA
	<i>Msel</i> +GCC	M68	GATGAGTCCTGAGTGCC
	<i>Msel</i> +GCG	M69	GATGAGTCCTGAGTGCG
	<i>Msel</i> +GCT	M70	GATGAGTCCTGAGTGCT
	<i>Msel</i> +GGA	M71	GATGAGTCCTGAGTGGA
	<i>Msel</i> +GGC	M72	GATGAGTCCTGAGTGGC
	<i>Msel</i> +GGG	M73	GATGAGTCCTGAGTGGG
	<i>Msel</i> +GGT	M74	GATGAGTCCTGAGTGGT
	<i>Msel</i> +GTA	M75	GATGAGTCCTGAGTGTA
	<i>Msel</i> +GTC	M76	GATGAGTCCTGAGTGTC
	<i>Msel</i> +GTG	M77	GATGAGTCCTGAGTGTG
	<i>Msel</i> +GTT	M78	GATGAGTCCTGAGTGTT
	SAMPL-6		6-FAMACACACACACACACATATAA
	SAMPL-7		7-VIC-TGTGTGTGTGTGTATAT
	<i>Xba</i> +CC		6-FAM-GGCGTCGAGACTAGACC
	<i>Xba</i> +CA		VIC-GGCGTCGAGACTAGACA
	<i>Bam</i> HI+A		GTTTCGCGCCAGCAAGATCCA
	<i>Bam</i> HI+C		GTTTCGCGCCAGCAAGATCCC
	<i>Bam</i> HI+G		GTTTCGCGCCAGCAAGATCCG
	<i>Bam</i> HI+T		GTTTCGCGCCAGCAAGATCCT

3.2.8. SSR Analizleri

SSR-PCR reaksiyonu 12 µl hacimde hazırlanmıştır. Reaksiyon, 75 mM Tris-HCl, pH: 8.8, 20 mM (NH₄)₂ SO₄, 2.0 mM MgCl₂, %0.01 Tween 20, 200 µM dNTP, 50 nM 5' ucunda M13 üniversal primeri eklenmiş ileri primer (5'-TGTAACG

ACGGCCAGT-3'+ ileri primer), 200 nM geri primer, 200 nM 5' ucu 6-FAM, VIC, NED ve PET ile işaretlenmiş M13 üniversal primer (5'-TGTAACAACG ACGGCCAGT-3'), 0.6 ünite Taq DNA polymeraz ve 10 ng DNA ile hazırlanmıştır. Çalışmada, **Zaloğlu (2008)** tarafından Yüksek Lisans tezi kapsamında Çukurova Üniveristesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Moleküler Genetik Laboratuvarında geliştirilen ve monoik *P. atlantica* ana bitkisinde bant verdiği belirlenen 28 primer çifti ile **Ahmad ve ark. (2003)** tarafından geliştirilen 5 SSR primer çifti kullanılmıştır.

PCR reaksiyonu için sıcaklık ve döngü koşulları **Schuelke (2000)**'e göre bazı değişiklikler ile uygulanmıştır (**Çizelge 3.5**).

Çizelge 3.5. SSR analizlerinde kullanılan sıcaklık ve döngü koşulları.

Program No	İşlem	Sıcaklık (°C)	Süre (sn)	Döngü sayısı
1.	İlk denatürasyon	94	300	1
2.1	Denatürasyon	94	45	28
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

3.2.8.1. SSR Analizlerinde Kapiller Elektroferez Koşulları

Kapiller elektroferez işlemi ABI 3130xl [Applied Biosystems Inc., Foster City, Calif, (ABI)] genetik analizör cihazı kullanılarak yapılmıştır. Kapiller elektroferez için FAM, VIC, NED, PET flourosan boya ile etiketli primerle yapılmış PCR reaksiyonlarından, her bir örnek için 0.5 µl PCR ürünü alınmış, 9.8 µl

Hi-Di Formamid ve 0.2 µl LIZ-500 size standart ile birlikte bir kuyucuğa yüklenmiştir. Daha sonra 95⁰C’de 5 dk bekletilerek denatüre olması sağlanmış ve denatürasyon sonrası 5 dk da buzda bekletilerek DNA’nın tek iplikçik halinde ABI 3130xl cihazına yüklenmesi sağlanmıştır.

3.2.9. Primerlerin Polimorfizm Oranlarının ve Bilgi İçeriklerinin Belirlenmesi

Çalışmada kullanılan primerlerin polimorfizm oranları (PO), primelerden elde edilen polimorfik bant sayılarının, toplam bant sayısına bölünüp 100 ile çarpılmasıyla elde edilmiştir.

Polimorfizm bilgi içeriklerinin belirlenmesinde polimorfik ve monomorfik bantların frekansları ayrı ayrı ve **Smith ve ark.’a (1997)** göre hesaplanmıştır. Formülde yer alan Pi, i bandının frekansını temsil etmektedir.

$$PBI: 1-\sum Pi^2$$

3.2.10. Primerlerin Ayırma Güçlerinin Belirlenmesi

Çalışmada kullanılan primerlerin ayırma güçleri **Prevost ve Wilkinson (1999)** tarafından geliştirilen yöntemle göre aşağıdaki formül esas alınarak hesaplanmıştır. Formülde bulunan “p”, “I” bandının toplam genotipteki oranını temsil etmektedir.

$$\text{Ayırma gücü: } \sum Ib$$

$$Ib=1-(2 \times |0.5-p|)$$

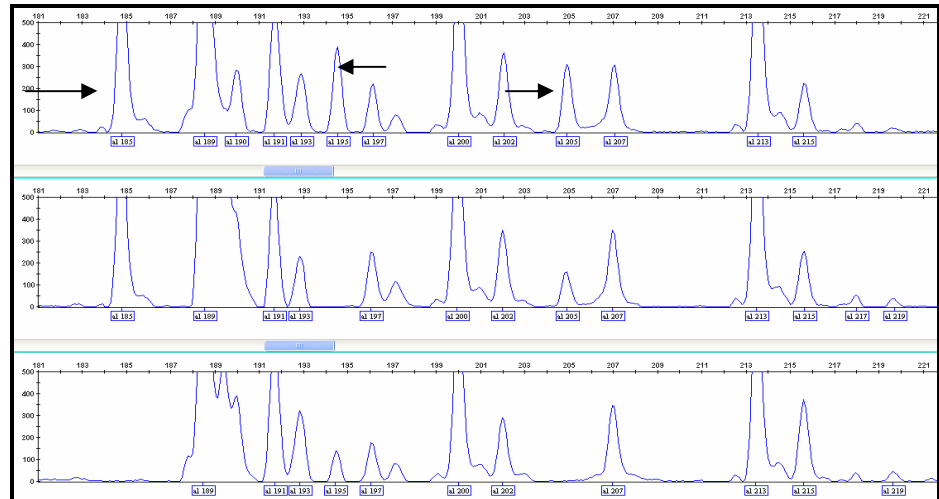
4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. Kendilenmiş Monoik Atlantik Sakızı Populasyonunda AFLP Yöntemiyle Polimorfizmin Belirlenmesi

AFLP analizlerinde, ön PCR aşamasında 1 seçici nükleotid içeren *EcoRI* primer *EcoRI*+A ve *MseI* primerler *MseI*+A, *MseI*+C ve *MseI*+G kombinasyonları ile seçici PCR aşamasında FAM ve VIC flourosan boyalarla etiketli, 3 seçici nükleotid içeren 2 adet *EcoRI* primer ve 3 seçici nükleotid içeren, 48 adet etiketsiz *MseI* primer kombinasyonları olmak üzere toplam 96 adet primer kombinasyonu kullanılmıştır.

Elektroforez işlemi, kapiller elektroforez yöntemi ile, ABI 3130xl otomatik genetik analizör cihazı kullanılarak yapılmış, amplifikasyon ürünleri var (1) ya da yok (0) şeklinde GeneMapper 4.0 bilgisayar paket programında skorlanmıştır. Skorumlama esnasında değerlendirmesi kolay ve net olan bantlar seçilmiştir.

Şekil 4.1'de standart AFLP yönteminde E33-M52 primer kombinasyonu kullanılarak yapılmış selektif PCR reaksiyonu ardından ABI 3130xl cihazına yüklenen PCR ürünlerinin kapiller elektroforez sonrası kendilenmiş monoik yavru bireylerde polimorfik bantları içeren elektroferogramı verilmiştir.



Şekil 4.1. E33-M52 primer kombinasyonu ile yapılmış selektif PCR reaksiyonu ardından ABI 3130xl cihazına yüklenen PCR ürünlerinin kapiller elektroforez sonrası kendilenmiş monoik yavru bireylerde polimorfik bantları içeren elektroferogramı.

AFLP analizlerinde kullanılan primer kombinasyonlarının isimleri ve elde edilen toplam bant sayıları (TBS), polimorfik bant sayıları (PBS), primerlere ait polimorfizm oranları (PO), polimorfizm bilgi içerikleri (PBI) ve ayırma güçleri (AG) Çizelge 4.1’de verilmiştir.

96 adet primer kombinasyonundan 2 tanesi hiç bant üretmemiştir. Kalan 94 primer kombinasyonu 603’ü (%7.3) polimorfik olan toplam 8177 bant üretmiştir. Monomorfik bant sayısı 7574 olarak bulunmuştur. Primer başına düşen toplam bant sayısı (PBDTBS) 85.17 ve primer başına düşen polimorfik bant sayısı (PBDPBS) 6.28 olarak belirlenmiştir. En fazla polimorfik bant veren primer çifti (18 adet) E33-M52 olarak bulunurken, en az polimorfik bant veren (1) primer çiftleri E42-M56, E33-M46 ve E33-M38 olarak bulunmuştur. En yüksek polimorfizm oranını (%23.4) E42-M37 primer kombinasyonu verirken, en düşük polimorfizm oranını (%1.1) E42-M56 primer kombinasyonu vermiştir. Polimorfik bant büyüklüklerinin 51–496 bp arasında değiştiği belirlenmiştir.

Çizelge 4.1. Monoik atlantik sakızı ve monoik atlantik sakızının kendilenmesiyle elde edilmiş 10 yavru bireyde AFLP primerleri kullanılarak yapılan ön selektif PCR ve selektif PCR aşamalarından sonra elde edilen toplam bant sayıları (TBS), polimorfik bant sayıları (PBS), polimorfizm oranı (PO), polimorfizm bilgi içeriği (PBI) ve ayırma gücü (AG) değerleri.

No	Primer Kombinasyonu	TBS	PBS	PO	AG	PBI
1	E33-M31	0	0	0	0	0
2	E42-M31	0	0	0	0	0
3	E33-M32	79	0	0	0	0
4	E42-M32	100	0	0	0	0
5	E33-M33	108	8	7.4	1.62	0.33
6	E42-M33	131	14	10.6	1.44	0.45
7	E33-M34	113	6	5.3	1.58	0.36
8	E42-M34	128	9	7	1.44	0.46
9	E33-M35	99	7	7	1.31	0.56
10	E42-M35	150	3	2	1.2	0.63
11	E33-M36	92	8	8.6	1.15	0.66
12	E42-M36	100	9	9	1.24	0.59
13	E33-M37	64	14	21.8	1.38	0.50
14	E42-M37	64	15	23.4	1.38	0.50
15	E33-M38	74	1	1.3	1.6	0.36
16	E42-M38	119	9	7.5	1.46	0.44
17	E33-M39	140	7	5	1.51	0.42
18	E42-M39	110	10	9	1.44	0.47
19	E33-M40	89	6	6.7	1.23	0.61
20	E42-M40	81	4	4.9	1.6	0.36

Çizelge 4.1'in devamı.

No	Primer Kombinasyonu	TBS	PBS	PO	AG	PBI
21	E33-M41	102	2	1.9	1.2	0.63
22	E42-M41	81	9	11.1	1.15	0.65
23	E33-M42	93	6	6.4	1.36	0.52
24	E42-M42	110	7	6.3	1.17	0.65
25	E33-M43	108	2	1.8	1.5	0.43
26	E42-M43	123	0	0	0	0
27	E33-M44	117	7	5.9	1.57	0.38
28	E42-M44	110	9	8.1	1.26	0.58
29	E33-M45	120	4	3.3	1.3	0.55
30	E42-M45	118	8	6.7	1.3	0.56
31	E33-M46	70	1	1.4	1.6	0.36
32	E42-M46	137	2	1.4	1.5	0.43
33	E33-M47	93	2	2.1	1.2	0.64
34	E42-M47	153	12	7.8	1.23	0.61
35	E33-M48	91	7	7.6	1.45	0.46
36	E42-M48	96	14	14.5	1.31	0.55
37	E33-M49	101	8	7.9	1.4	0.50
38	E42-M49	90	11	12.2	1.45	0.46
39	E33-M50	70	3	4.2	1.2	0.59
40	E42-M50	101	7	6.9	1.22	0.61
41	E33-M51	45	4	8.8	1.45	0.46
42	E42-M51	86	6	6.9	1.4	0.50
43	E33-M52	94	18	19.1	1.32	0.55
44	E42-M52	64	10	15.6	1.28	0.58
45	E33-M53	73	13	17.8	1.33	0.53
46	E42-M53	77	11	14.2	1.25	0.59
47	E33-M54	84	6	7.1	1.23	0.59
48	E42-M54	77	7	9	1.37	0.51
49	E33-M55	63	11	17.4	1.18	0.62
50	E42-M55	74	8	10.8	1.3	0.56
51	E33-M56	48	10	20.8	1.32	0.54
52	E42-M56	86	1	1.1	1.4	0.51
53	E33-M57	43	7	16.2	1.25	0.60
54	E42-M57	63	10	15.8	1.22	0.62
55	E33-M58	68	6	8.8	1.23	0.59
56	E42-M58	92	6	6.5	1.4	0.5
57	E33-M59	112	2	1.7	1.6	0.36
58	E42-M59	100	9	9	1.37	0.51
59	E33-M60	93	5	5.3	1.4	0.50
60	E42-M60	110	6	5.4	1.2	0.63
61	E33-M61	61	0	0	0	0
62	E42-M61	77	0	0	0	0
63	E33-M62	95	4	4.2	0.95	0.77
64	E42-M62	123	4	3.2	1.3	0.57
65	E33-M63	66	1	1.5	1.4	0.51
66	E42-M63	110	10	9	1.36	0.52
67	E33-M64	80	11	13.7	1.32	0.55
68	E42-M64	66	12	18.1	1.28	0.57

Çizelge 4.1'in devamı.

No	Primer Kombinasyonu	TBS	PBS	PO	AG	PBI
69	E33-M65	87	7	8	1.31	0.56
70	E42-M65	88	5	5.6	1.36	0.52
71	E33-M66	75	3	4	1.2	0.63
72	E42-M66	80	0	0	0	0
73	E33-M67	92	6	6.5	1.26	0.59
74	E42-M67	96	8	8.3	1.35	0.53
75	E33-M68	59	9	15.2	1.26	0.58
76	E42-M68	62	8	12.9	1.42	0.48
77	E33-M69	63	3	4.7	1.4	0.49
78	E42-M69	65	2	3	1.4	0.51
79	E33-M70	58	1	1.7	1.4	0.51
80	E42-M70	71	8	11.2	1.22	0.61
81	E33-M71	60	5	8.3	1.32	0.55
82	E42-M71	94	7	7.4	1.25	0.59
83	E33-M72	26	1	3.8	1.6	0.36
84	E42-M72	101	15	14.8	1.25	0.59
85	E33-M73	76	9	11.8	1.4	0.49
86	E42-M73	85	8	9.4	1.22	0.61
87	E33-M74	15	0	0	0	0
88	E42-M74	57	3	5.2	1.53	0.41
89	E33-M75	60	2	3.3	1.3	0.57
90	E42-M75	100	4	4	1.4	0.50
91	E33-M76	65	7	10.7	1.25	0.60
92	E42-M76	62	2	3.2	1.3	0.57
93	E33-M77	66	6	9	1.4	0.5
94	E42-M77	72	8	11.1	1.45	0.46
95	E33-M78	77	5	6.4	1.4	0.5
96	E42-M78	110	12	10.9	1.28	0.56
	TOPLAM	8177	603	-	117.2	-
	ORTALAMA	85.17	6.28	8	1.22	0.53

F1 bitkilerinde yapılmış çalışmalarda, **Marques ve ark. (1998)** okalüptüs bitkisinde yaptıkları haritalama çalışmasında primer başına düşen polimorfik bant sayısını 25.25 olarak bulmuşlardır. **Hurtado ve ark. (2002)** kayısı bitkisinde F1 bireylerinde yaptıkları haritalama çalışmasında, AFLP yöntemiyle primer başına düşen polimorfik bant sayısını 10 olarak hesaplamışlardır. **Carlier ve ark. (2004)** ananas bitkisinde F1 bireylerinde yaptıkları haritalama çalışmasında AFLP yönteminde primer başına düşen polimorfik bant sayısını 10.2 olarak bulmuşlardır. **Beedanagari ve ark. (2005)** pikan cevizi (*Carya illinoensis*) F1 bitkileriyle yapmış oldukları çalışmada AFLP yöntemiyle, başına düşen polimorfik bant sayısını 12.9 olarak tespit etmişlerdir. Kendileme çaprazından daha az sayıda polimorfik markör

elde ettiklerini bildirmişlerdir. **Saha ve ark. (2005)** çimende (*Festuca arundinacea*) yine F1 bitkileriyle ve AFLP yöntemiyle yaptıkları çalışmada, primer başına düşen polimorfik bant sayısının 35 olduğunu bildirmişlerdir.

Antepfıstığında genetik kaynakların karakterizasyonu ile ilgili yapılmış çalışmalarda, **Kafkas ve Perl-Treves (2001)** 4 *Pistacia* türünde RAPD yöntemiyle yaptıkları çalışmada, primer başına düşen toplam bant sayısını 13.8 ve primer başına düşen polimorfik bant sayısını 12.8 olarak bulmuşlardır. **Kafkas ve Perl-Treves (2002)** 9 *Pistacia* türünde yine RAPD yöntemiyle yaptıkları çalışmada, primer başına düşen toplam bant sayısını 12.1 ve primer başına düşen polimorfik bant sayısını 11.4 olarak bulmuşlardır. Bu çalışmada AFLP yöntemi, RAPD yönteminin yaklaşık 6–7 katı kadar fazla bant vermiştir ancak polimorfik bant sayısı bakımından AFLP yöntemi, RAPD yönteminin yarısı kadar bant vermiştir. RAPD yönteminde polimorfizm kaynağı, primerlerin genom üzerinde rastgele bölgelere bağlanması ve bu rastgele bölgelerin çoğaltılmasıdır. İyi derecede polimorfizm gösteren bir tekniktir ancak RAPD yönteminin tekrarlanabilirliği zayıftır. Ayrıca çalışmada kullanılan materyalin antepfıstığının farklı türlerine ait olması da daha fazla oranda polimorfik bant elde edilmesine sebep olmuştur. AFLP yöntemi kesim bölgelerindeki değişime göre polimorfizmi saptayan ve kesilen fragmetlerin çoğaltılmasını sağlayan, bu şekilde çok fazla sayıda bant elde edilmesine sebep olan bir tekniktir. **Kafkas ve ark. (2006a)** 69 antepfıstığı çeşidini kullanarak yaptıkları çalışmada her primer çifti için ortalama 27.5 polimorfik AFLP bandı elde etmişlerdir. **Kafkas ve ark. (2006b)** antepfıstığına ait yabancı ve kültür çeşitleriyle yaptıkları çalışmada, primer başına düşen polimorfik bant sayısının ortalama 17 olduğunu bildirmişlerdir. **Kafkas (2006b)** 10 *Pistacia* türünde yaptığı AFLP çalışmasında, primer başına düşen toplam bant sayısını 45.8 ve primer başına düşen polimorfik bant sayısını 41.5 olarak bulmuştur. **Basha ve ark. (2007)** Suriye antepfıstıklarında primer başına düşen polimorfik bant sayısının ortalama 24 olduğunu bildirmişlerdir.

Antepfıstığı dışında, başka bitkilerde yapılmış genetik kaynakların karakterizasyonu ile ilgili çalışmalarda, **Paglia ve ark. (1998)** Avrupa ladininde (*Picea abies* K), *PstI/MseI* primer kombinasyonlarıyla, her bir primer çifti için ortalama 12.6 polimorfik bant elde etmişlerdir. **Kafkas ve ark. (2005)** ceviz

bitkisinde yaptıkları çalışmada AFLP yönteminde primer başına düşen polimorfik bant sayısını 29.8 olarak bulmuşlardır. **Tam ve ark. (2005)** AFLP yöntemi ile domateste primer başına düşen toplam bant sayısını 93.89 ve primer başına düşen polimorfik bant sayısını 13.67 ve biberde primer başına düşen toplam bant sayısını 159.11 ve primer başına düşen polimorfik bant sayısını 12.78 olarak hesaplamışlardır. **Zhang ve ark. (2005)** AFLP yönteminde primer başına 9.1–11.0 polimorfik markör elde ettiklerini bildirmişlerdir. **Altıntaş ve ark. (2008)** buğdayda yapmış oldukları çalışmada AFLP yönteminde, primer başına düşen polimorfik bant sayısının 75.8 olarak bulmuşlardır. **Kafkas ve ark. (2008)** dutta AFLP ile yaptıkları çalışmada primer başına düşen toplam bant sayısının 52 ve primer başına düşen polimorfik bant sayısının 42.1 olduğunu bildirmişlerdir.

Bu çalışmada primer başına düşen polimorfik bant sayıları bahsedilen çalışmalarda elde edilen değerlerden oldukça düşüktür. Bunun nedeni bu çalışmada kendilenmiş bitkilerin kullanılmasıdır.

Tosti ve ark. (2005) börülcede, AFLP yöntemi ile, primer başına düşen polimorfik bant sayısının 2.8 ve primer başına düşen toplam bant sayısının 39.4 olduğunu, **Cavalcanti ve ark. (2007)** kaju fıstığında (*Anacardium occidentale*) AFLP yöntemi ile primer başına düşen polimorfik bant sayısının 4.5 olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada elde edilen toplam bant ve polimorfik bant sayıları bahsedilen çalışmalara göre daha yüksektir. Bunun nedeninin kullanılan populasyonlar olduğu düşünülmektedir. **Tosti ve ark.’ın (2005)** kullandığı populasyonun, İtalya’nın merkezinde bulunan Trasimeno gölü’nün etrafında, birbirine komşu olan üç araziden ve yalıtılmış bir bölgeden toplanmış olması ve **Cavalcanti ve ark.’ın (2007)** kullandığı populasyonun F1 bireylerine ait olmasının polimorfizmi düşürdüğü tahmin edilmektedir. Çaprazlamada aynı özellik bakımından zıt ve homozigot iki birey kullanılmıştır.

Çalışma sonucunda, tüm primer çiftlerinden elde edilen ortalama polimorfizm oranı %8 olarak bulunmuştur. Antepfıstığıyla yapılmış çalışmalarda, **Kafkas (2006b)** 10 *Pistacia* türünde AFLP yöntemiyle polimorfizm oranını (%PO) 90.5 olarak bulmuştur. **Kafkas ve ark. (2006b)** yabancı antepfıstığı (*P. vera*) ve 3 kültür çeşidi ile yaptıkları çalışmada polimorfizm oranını % 46.7 olarak hesaplamışlardır.

Antepfıstığı dışında başka bitkilerde yapılmış çalışmalara bakıldığında, **Kafkas ve ark. (2005)** cevizde AFLP yöntemiyle yaptıkları çalışmada, polimorfizm oranının %49.9 olduğunu bildirmişlerdir. **Altıntaş ve ark.'ın (2008)** AFLP yönteminden elde ettikleri polimorfizm oranları beyaz buğday, esmer buğday ve ekmeklik buğday için sırasıyla %64, %40 ve %48 şeklindedir. **Kafkas ve ark. (2008)** dut bitkisinde AFLP yöntemiyle yapmış oldukları çalışmada polimorfizm oranını %80.5 olarak bulmuşlardır. Bu çalışmada elde edilen polimorfizm oranı değeri bahsedilen çalışmalara göre oldukça düşüktür. Bu durum kullanılan popülasyondan kaynaklanmaktadır.

Antepfıstığının farklı tür ve çeşitleri kullanılarak ya da farklı bir bitki için yapılan karakterizasyon çalışmalarında polimorfizm yakalama olasılığı, bireyin kendilenmesiyle elde edilmiş yavru bireyler arasında polimorfizm yakalama olasılığından daha yüksektir. Bu çalışmada kendilenmiş popülasyon kullanılması polimorfizmi düşüren bir durum olmuştur.

Polimorfizm bilgi içeriğinin 0.33 ile 0.77 arasında değiştiği ve polimorfizm bilgi içeriği ortalamasının 0.53 olduğu belirlenmiştir. En düşük polimorfizm bilgi içeriği değerininin (0.33) E33-M33 primer kombinasyonundan ve en yüksek polimorfizm bilgi içeriği değerinin (0.77) E33-M62 primer kombinasyonundan elde edildiği görülmüştür. **Kafkas (2006b)** 10 *Pistacia* türünde AFLP yöntemiyle yaptığı çalışmada polimorfizm bilgi içeriği (PBİ) ortalamasını 0.668 olarak elde etmiştir. Antepfıstığı dışında başka bitkilerde yapılmış çalışmalara bakıldığında, **Kafkas ve ark. (2008)** dut bitkisinde AFLP ile yaptıkları çalışmada polimorfizm bilgi içeriğini 0.812 olarak bulmuşlardır. Bu çalışmada elde edilen polimorfizm bilgi içeriği daha düşüktür. Bunun nedeni kullanılan primer kombinasyonlarının ve kullanılan bitkisel materyalin farklı olmasından kaynaklanmaktadır.

Tam ve ark. (2005) polimorfizm bilgi içeriği değerlerini AFLP yöntemiyle, domateste 0.046 ve biberde, 0.026 olarak bulmuşlardır. Bu çalışmada elde edilen polimorfizm bilgi içeriği değeri **Tam ve ark.'a (2005)** göre ise daha yüksektir. Bunun nedeninin kullanılan bitkisel materyalden kaynaklandığı düşünülmektedir. **Tam ve ark.'ın (2005)** homozigot hat domates ve biber kullanmasının buna neden olduğu tahmin edilmektedir. Bu durum, AFLP yönteminin homozigot hatlarda

bağlantı analizlerinde kullanılabilir polimorfik markör verme eğiliminin düşük olduğunu göstermektedir.

Primerlerin ayırma güçleri incelendiğinde, ayırma gücünün 0.95 ile 1.62 arasında değiştiği ve toplam ayırma gücünün 117.2 olduğu görülmüştür. En yüksek ayırma gücü değeri (1.62) E33-M33 primer kombinasyonundan elde edilirken en düşük ayırma gücü değeri (0.95) E33-M62 primer kombinasyonundan elde edilmiştir. Ortalama ayırma gücü değeri 1.22 olarak hesaplanmıştır. **Kafkas (2006b)** 10 *Pistacia* türünde AFLP yöntemiyle yapmış olduğu çalışmada ortalama ayırma gücünü 40.43 olarak hesaplamıştır.

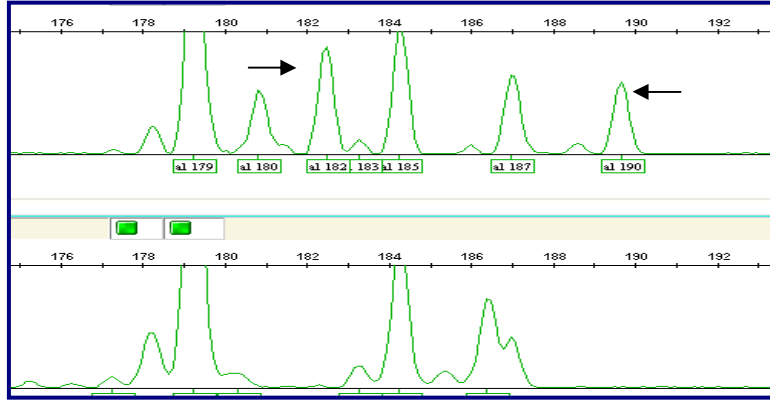
Antepfıstığı dışında başka türlerde yapılan çalışmalara bakıldığında, **Kafkas ve ark. (2005)** ceviz bitkisinde AFLP ile yapmış oldukları çalışmada ortalama ayırma gücünün 16.1 olduğunu bildirmişlerdir. **Altıntaş ve ark. (2008)** buğdayda, AFLP yöntemiyle yaptıkları çalışmada ortalama ayırma güçlerini beyaz buğdayda 39.96, esmer buğdayda 19.42 ve ekmeçlik buğdayda 31.22 olarak bulmuşlardır. Bu çalışmada elde edilen ayırma gücü ortalaması daha düşüktür. Bu durum kullanılan materyalde varyasyonun az olmasından kaynaklanmaktadır.

Kafkas ve ark. (2008) dut bitkisinde AFLP yöntemiyle yaptıkları çalışmada ayırma gücü ortalamasını 0.62 olarak hesaplamışlardır. Bu çalışmada, **Kafkas ve ark.'a (2008)** göre ortalama ayırma gücü değeri daha yüksek bulunmuştur. Bu durum dut genetik kaynaklarındaki varyasyonun antepfıstığından daha düşük olduğunu göstermektedir.

4.2. Kendilenmiş Monoik Atlantik Sakızı Populasyonunda TE-AFLP Yöntemiyle Polimorfizmin Belirlenmesi

TE-AFLP yönteminde toplam 8 primer kombinasyonu test edilmiştir. Standart AFLP yönteminde olduğu gibi elektroforez işlemi, kapiller elektroforez yöntemi ile, ABI 3130xl otomatik genetik analizör cihazı kullanılarak yapılmış, amplifikasyon ürünleri var (1) ya da yok (0) şeklinde GeneMapper 4.0 bilgisayar paket programında skorlanmıştır. Skorlama esnasında net olan bantlar seçilmiştir.

Şekil 4.2'de TE-AFLP yönteminde *Xba*+*CA-Bam*HI+A primer kombinasyonu kullanılarak yapılmış selektif PCR reaksiyonu ardından ABI 3130xl cihazına yüklenen PCR ürünlerinin kapiller elektroforez sonrası polimorfik bantları içeren elektroferogramı verilmiştir.



Şekil 4.2. TE-AFLP yönteminde *Xba*+*CA-Bam*HI+A primer kombinasyonu kullanılarak yapılmış selektif PCR reaksiyonu ardından ABI 3130xl cihazına yüklenen PCR ürünlerinin kapiller elektroforez sonrası kendilenmiş monoik yavru bireylerde polimorfik bantları içeren elektroferogramı.

TE-AFLP analizlerinde kullanılan primer kombinasyonlarının isimleri ve elde edilen toplam bant sayıları (TBS), polimorfik bant sayıları (PBS), primerlere ait polimorfizm oranları (PO), polimorfizm bilgi içerikleri (PBI) ve ayırma güçleri (AG) **Çizelge 4.2'**de verilmiştir.

Xba+*CA-Bam*HI+G ve *Xba*+*CC-Bam*HI+C primer kombinasyonları hiç bant üretmemiştir. Kalan 6 primer kombinasyonu, 36'sı (%11.9) polimorfik olan toplam 302 bant üretmiştir. Monomorfik bant sayısı 266 olarak bulunmuştur. Primer başına düşen toplam bant sayısı 37.75 ve primer başına düşen polimorfik bant sayısı 4.50 olarak hesaplanmıştır.

En fazla polimorfik bandı (13) *Xba*+*CC-Bam*HI+A primer kombinasyonu vermiş olup, en az polimorfik bandı (1) *Xba*+*CC-Bam*HI+T primer kombinasyonu vermiştir. Polimorfik bant büyüklüklerinin 59–492 bp arasında değiştiği belirlenmiştir.

Çalışma sonucunda tüm primer çiftlerinden elde edilen ortalama polimorfizm oranı %14 olarak bulunurken, en düşük polimorfizm oranını (%8) *Xba*+*CA*-*Bam*HI+C primer kombinasyonu ve en yüksek polimorfizm oranını (%48) *Xba*+*CC*-*Bam*HI+G primer kombinasyonu vermiştir.

Polimorfizm bilgi içeriği ortalaması 0.59 olarak bulunmuş, en yüksek polimorfizm bilgi içeriğine (0.75) sahip primer kombinasyonu *Xba*+*CC*-*Bam*HI+T ve en düşük polimorfizm bilgi içeriğine sahip (0.51) primer kombinasyonu *Xba*+*CC*-*Bam*HI+A olarak bulunmuştur.

Toplam ayırma gücünün 7.49 olduğu ve *Xba*+*CA*-*Bam*HI+A primer kombinasyonunun en yüksek ayırma gücü değerine (1.37) sahip olduğu, *Xba*+*CC*-*Bam*HI+T primer kombinasyonunun en düşük (1.00) ayırma gücü değerine sahip olduğu belirlenmiştir. Ortalama ayırma gücü 0.07 olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 4.2. Monoik atlantik sakızı ve monoik atlantik sakızının kendilenmesiyle elde edilmiş 10 yavru bireyde TE-AFLP primerleri kullanılarak yapılan selektif PCR aşamasından sonra elde edilen toplam bant sayıları (TBS), polimorfik bant sayısı (PBS), polimorfizm oranı (PO), polimorfizm bilgi içeriği (PBI) ve ayırma gücü (AG) değerleri.

No	Primer Kombinasyonu	TBS	PBS	PO	AG	PBI
1	<i>Xba</i> + <i>CC</i> - <i>Bam</i> HI+A	56	13	23	1.36	0.51
2	<i>Xba</i> + <i>CA</i> - <i>Bam</i> HI+A	77	7	9	1.37	0.52
3	<i>Xba</i> + <i>CC</i> - <i>Bam</i> HI+C	21	0	0	0	0
4	<i>Xba</i> + <i>CA</i> - <i>Bam</i> HI+C	39	3	8	1.13	0.67
5	<i>Xba</i> + <i>CC</i> - <i>Bam</i> HI+G	21	10	48	1.32	0.54
6	<i>Xba</i> + <i>CA</i> - <i>Bam</i> HI+G	59	0	0	0	0
7	<i>Xba</i> + <i>CC</i> - <i>Bam</i> HI+T	6	1	17	1.00	0.75
8	<i>Xba</i> + <i>CA</i> - <i>Bam</i> HI+T	23	2	9	1.30	0.57
	TOPLAM	302	36	-	7.49	-
	ORTALAMA	37.75	4.50	14	0.07	0.59

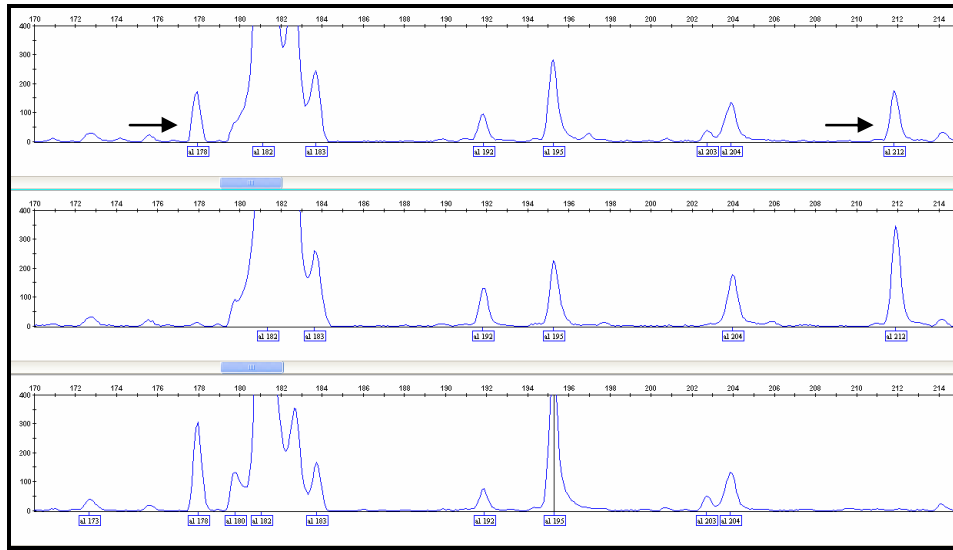
4.3. Kendilenmiş Monoik Atlantik Sakızı Populasyonunda SAMPL Yöntemiyle Polimorfizmin Belirlenmesi

SAMPL yönteminde standart AFLP yönteminden farklı olarak ikinci PCR aşamasında her biri 3 seçici nükleotid içeren 48 adet işaretli *Mse*I primerlerinin, FAM ve VIC florasan boyalarla işaretli SAMPL-6 ve SAMPL-7 primerler ile

kombinasyonu kullanılmış olup standart AFLP yönteminde olduğu gibi toplam 96 adet primer kombinasyonu denenmiştir.

Standart AFLP ve TE-AFLP yönteminde olduğu gibi elektroforez işlemi, kapiller elektroforez yöntemi ile ABI 3130xl otomatik genetik analizör cihazı kullanılarak yapılmış, amplifikasyon ürünleri var (1) ya da yok (0) şeklinde GeneMapper 4.0 bilgisayar paket programında skorlanmıştır. Skorlama esnasında değerlendirmesi kolay ve net olan bantlar alınmıştır.

Şekil 4.3’de SAMPL yönteminde SAMPL7-M31 primer kombinasyonu kullanılarak yapılmış selektif PCR reaksiyonu ardından ABI 3130xl cihazına yüklenen PCR ürünlerinin kapiller elektroforez sonrası kendilenmiş monoik yavru bireylerde polimorfik bantları içeren elektroferogramı verilmiştir.



Şekil 4.3. SAMPL yönteminde SAMPL7-M31 primer kombinasyonu kullanılarak yapılmış selektif PCR reaksiyonu ardından ABI 3130xl cihazına yüklenen PCR ürünlerinin kapiller elektroforez sonrası kendilenmiş monoik yavru bireylerde polimorfik bantları içeren elektroferogramı.

SAMPL analizlerinde kullanılan primer kombinasyonlarının isimleri ve elde edilen toplam bant sayıları (TBS), polimorfik bant sayıları (PBS), primerlere ait polimorfizm oranları (PO), polimorfizm bilgi içerikleri (PBİ) ve ayırma güçleri (AG) Çizelge 4.3’te verilmiştir.

Primer çiftlerinden 3 tanesi hiç bant üretmemiştir. Kalan 93 primer kombinasyonu 358'i (%6.01) polimorfik olan toplam 5952 bant vermiştir. Primer başına düşen toplam bant sayısı 62 ve primer başına düşen polimorfik bant sayısı 3.72 olarak tespit edilmiştir. En fazla polimorfik bandı (27) SAMPL7-M31 primer kombinasyonu vermiş olup, en az polimorfik bandı (1) SAMPL7M46, SAMPL7-M47, SAMPL6-M48, SAMPL6-M49, SAMPL6-M53, SAMPL6-M54, SAMPL6-M55, SAMPL6-M57, SAMPL7-M57, SAMPL7-M58, SAMPL7-M60, SAMPL6-M61, SAMPL7-M61, SAMPL7-M62, SAMPL7-M65, SAMPL7-M69, SAMPL6-M70, SAMPL6-M72, SAMPL7-M74, SAMPL6-M77, SAMPL7-M78 primer kombinasyonları vermiştir. Monomorfik bant sayısı 5594 olarak elde edilmiştir. Polimorfik bant büyüklüklerinin 53–488 bp arasında değiştiği gözlenmiştir.

Çizelge 4.3. Monoik atlantik sakızı ve monoik atlantik sakızının kendilenmesiyle elde edilmiş 10 yavru bireyde SAMPL primerleri kullanılarak yapılan selektif PCR aşamasından sonra elde edilen toplam bant sayıları (TBS), polimorfik bant sayıları (PBS), polimorfizm oranı (PO), polimorfizm bilgi içeriği (PBI) ve ayırma gücü (AG) değerleri.

No	Primer Kombinasyonu	TBS	PBS	PO	AG	PBI
1	SAMPL6-M31	50	6	12	1.06	0.70
2	SAMPL7-M31	139	27	19.4	1.36	0.52
3	SAMPL6-M32	51	13	25.4	1.4	0.50
4	SAMPL7-M32	124	24	19.3	1.38	0.51
5	SAMPL6-M33	55	10	18.1	1.12	0.67
6	SAMPL7-M33	140	19	13.5	1.42	0.48
7	SAMPL6-M34	60	3	5	1	0.75
8	SAMPL7-M34	102	16	15.6	1.41	0.49
9	SAMPL6-M35	62	8	12.9	1.3	0.56
10	SAMPL7-M35	102	12	11.7	1.31	0.55
11	SAMPL6-M36	69	14	20.2	1.41	0.49
12	SAMPL7-M36	112	10	8.9	1.46	0.45
13	SAMPL6-M37	50	9	18	1.28	0.58
14	SAMPL7-M37	130	0	0	0	0
15	SAMPL6-M38	60	6	10	1.33	0.52
16	SAMPL7-M38	98	15	15.3	1.42	0.47
17	SAMPL6-M39	64	3	4.6	1.26	0.59
18	SAMPL7-M39	140	2	1.4	1.5	0.43
19	SAMPL6-M40	60	6	10	1.4	0.49
20	SAMPL7-M40	145	11	7.5	1.34	0.53
21	SAMPL6-M41	108	0	0	0	0
22	SAMPL7-M41	120	19	15.8	1.35	0.52
23	SAMPL6-M42	52	4	7.6	1.15	0.65
24	SAMPL7-M42	110	9	8.1	1.33	0.54
25	SAMPL6-M43	57	7	12.2	1.25	0.42
26	SAMPL7-M43	108	0	0	0	0

Çizelge 4.3'ün devamı.

No	Primer Kombinasyonu	TBS	PBS	PO	AG	PBI
27	SAMPL6-M44	40	3	7.5	1.6	0.36
28	SAMPL7-M44	120	2	1.6	1.2	0.64
29	SAMPL6-M45	64	9	14	1.4	0.50
30	SAMPL7-M45	58	3	5.1	1.4	0.51
31	SAMPL6-M46	0	0	0	0	0
32	SAMPL7-M46	130	1	0.7	1.6	0.36
33	SAMPL6-M47	40	0	0	0	0
34	SAMPL7-M47	50	1	2	1.4	0.51
35	SAMPL6-M48	32	1	3.1	1	0.75
36	SAMPL7-M48	36	0	0	0	0
37	SAMPL6-M49	31	1	3.2	1	0.75
38	SAMPL7-M49	60	0	0	0	0
39	SAMPL6-M50	26	0	0	0	0
40	SAMPL7-M50	56	0	0	0	0
41	SAMPL6-M51	32	0	0	0	0
42	SAMPL7-M51	43	0	0	0	0
43	SAMPL6-M52	37	0	0	0	0
44	SAMPL7-M52	40	0	0	0	0
45	SAMPL6-M53	30	1	3.3	1.4	0.51
46	SAMPL7-M53	64	2	3.1	1.5	0.43
47	SAMPL6-M54	17	1	5.8	1	0.75
48	SAMPL7-M54	25	0	0	0	0
49	SAMPL6-M55	21	1	4.7	1.4	0.51
50	SAMPL7-M55	42	0	0	0	0
51	SAMPL6-M56	15	3	20	1.26	0.58
52	SAMPL7-M56	29	1	3.4	1.2	0.64
53	SAMPL6-M57	14	4	28.5	1.45	0.46
54	SAMPL7-M57	33	1	3	1.6	0.36
55	SAMPL6-M58	19	4	21	1.45	0.46
56	SAMPL7-M58	27	1	3.7	1	0.75
57	SAMPL6-M59	24	3	12.5	1.13	0.67
58	SAMPL7-M59	43	3	6.9	1.46	0.45
59	SAMPL6-M60	20	0	0	0	0
60	SAMPL7-M60	58	1	1.7	1.6	0.36
61	SAMPL6-M61	27	1	3.7	1.4	0.51
62	SAMPL7-M61	41	1	2.4	1.4	0.51
63	SAMPL6-M62	19	0	0	0	0
64	SAMPL7-M62	50	1	2	1.6	0.36
65	SAMPL6-M63	20	3	15	1.13	0.67
66	SAMPL7-M63	135	2	1.4	1.2	0.6
67	SAMPL6-M64	37	0	0	0	0
68	SAMPL7-M64	100	6	6	1.36	0.51
69	SAMPL6-M65	41	0	0	0	0
70	SAMPL7-M65	116	1	0.8	1.4	0.51
71	SAMPL6-M66	30	0	0	0	0
71	SAMPL7-M66	75	2	2.6	1.3	0.57
73	SAMPL6-M67	19	0	0	0	0
74	SAMPL7-M67	110	3	2.7	1.4	0.49
75	SAMPL6-M68	45	0	0	0	0
76	SAMPL7-M68	69	2	2.8	1.3	0.57
77	SAMPL6-M69	30	3	10	1.4	0.51

Çizelge 4.3'ün devamı.

No	Primer Kombinasyonu	TBS	PBS	PO	AG	PBI
78	SAMPL7-M69	81	1	1.2	1.2	0.64
79	SAMPL6-M70	28	1	3.5	1.2	0.64
80	SAMPL7-M70	100	2	2	1.5	0.43
81	SAMPL6-M71	50	0	0	0	0
82	SAMPL7-M71	130	3	2.3	1.26	0.59
83	SAMPL6-M72	30	1	3.3	1.6	0.36
84	SAMPL7-M72	80	5	6.2	1.28	0.57
85	SAMPL6-M73	0	0	0	0	0
86	SAMPL7-M73	126	3	2.3	1.33	0.55
87	SAMPL6-M74	25	0	0	0	0
88	SAMPL7-M74	91	1	1	1.6	0.36
89	SAMPL6-M75	42	6	14.2	1.33	0.54
90	SAMPL7-M75	100	0	0	0	0
91	SAMPL6-M76	33	4	12.1	1.35	0.54
92	SAMPL7-M76	110	2	1.8	0.6	0.9
93	SAMPL6-M77	26	1	3.8	1.2	0.64
94	SAMPL7-M77	102	2	1.9	1.3	0.57
95	SAMPL6-M78	30	0	0	0	0
96	SAMPL7-M78	60	1	1.6	1	0.75
	TOPLAM	5952	358	-	91.03	-
	ORTALAMA	62	3.72	6	0.94	0.54

SAMPL yöntemiyle yapılan çalışmalarda, **Paglia ve ark. (1998)** Avrupa ladininde (*Picea abies* K.) primer başına düşen polimorfik bant sayısını 10 olarak bulmuşlardır. **Roy ve ark. (2002)** buğdayda yaptıkları çalışmada primer başına düşen toplam bant sayısını 8.7 ve primer başına düşen polimorfik bant sayısını 4.3 olarak tespit etmişlerdir. **Bolibok ve ark. (2005)** çavdarda SAMPL yöntemiyle yaptıkları çalışmada primer başına düşen bant sayısının 19.94 olduğunu bildirmişlerdir. **Gupta ve ark. (2005)** çam bitkisinde yaptıkları çalışmada primer başına düşen polimorfik bant sayısını 39.5 olarak hesaplamışlardır. **Kafkas ve ark. (2005)** cevizde yaptıkları çalışmada SAMPL yöntemiyle primer başına düşen polimorfik bant sayısını 13 ve primer başına düşen toplam bant sayısını 25.5 olarak hesaplamışlardır. **Tosti ve ark. (2005)** börülcede, SAMPL yönteminde, primer başına düşen bant sayısını 38.4 ve primer başına düşen polimorfik bant sayısını 6.8 olarak bulmuşlardır. **Boersma ve ark. (2007)** SAMPL yöntemini kullanarak azot fiksasyonu yapan bir bitki olan *Lupinus angustifolius*'ta yaptıkları çalışmada, her primer kombinasyonu için ortalama 6.7 markör polimorfizm göstermiştir. **Altıntaş ve ark. (2008)** SAMPL yöntemiyle yaptıkları çalışmada, üç buğday çeşidi için primer başına düşen

polimorfik bant sayısının 45.7 olduğunu görmüşlerdir. Bu çalışmada primer başına düşen polimorfik bant sayısı diğer çalışmalarda elde edilen değerlere göre oldukça düşüktür. Bu durum, bu çalışmada kullanılan popülasyonun kendilenmiş popülasyon olmasından kaynaklanmaktadır.

Çalışma sonucunda, tüm primer çiftlerinden elde edilen ortalama polimorfizm oranı değeri %6 olarak bulunmuştur. En yüksek polimorfizm oranını (%29) SAMPL6-M57 primer kombinasyonunun verdiği, en düşük polimorfizm oranını ise (0.7) SAMPL7-M46 primer kombinasyonunun verdiği görülmüştür. **Kafkas ve ark. (2005)** cevizde yaptıkları çalışmada SAMPL yönteminde, polimorfizm oranını %50.9 olarak bulmuşlardır. **Altıntaş ve ark. (2008)** SAMPL yöntemiyle yaptıkları çalışmada, beyaz, esmer ve ekmeçlik buğdayda polimorfizm oranlarını sırasıyla %62, %39 ve %47 olarak tespit etmişlerdir. Bu çalışmada elde edilen polimorfizm oranı değeri diğer çalışmalarda elde edilen polimorfizm oranlarına göre oldukça düşüktür. Bu durum, bu çalışmada kullanılan popülasyondan kaynaklanmaktadır.

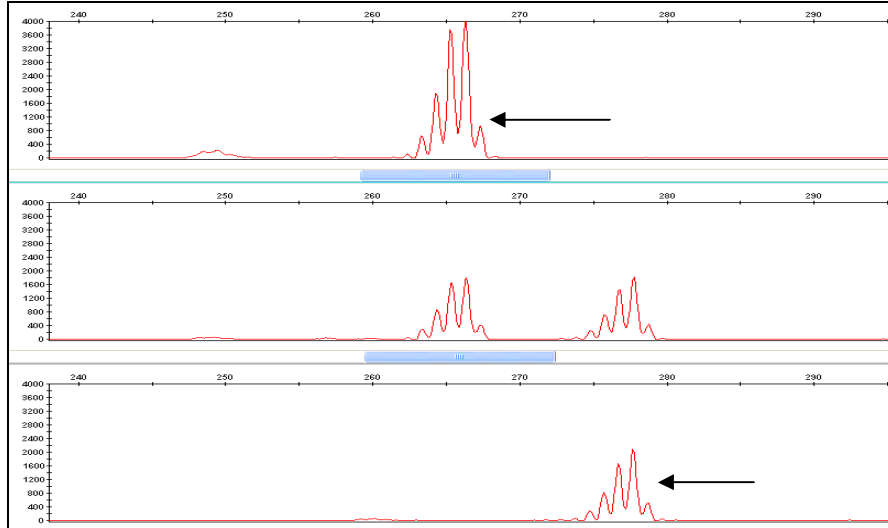
Ortalama polimorfizm bilgi içeriği 0.54 olarak bulunmuş, en düşük polimorfizm bilgi içeriği değerine (0.36) sahip primer kombinasyonlarının SAMPL6-M44, SAMPL7-M46, SAMPL7-M57, SAMPL7-M60, SAMPL7-M62, SAMPL6-M72 ve SAMPL7-M74 olduğu, en yüksek polimorfizm bilgi içeriği değerine sahip (0.75) primer kombinasyonlarının SAMPL6-M34, SAMPL6-M48, SAMPL6-M49, SAMPL6-M54, SAMPL7-M58 ve SAMPL7-M78 olduğu görülmüştür. **Roy ve ark. (2002)** buğdayda SAMPL yöntemiyle yaptıkları çalışmada SAMPL primerlerinin polimorfizm bilgi içeriği ortalamasını 0.221 olarak bulmuşlardır. **Bolibok ve ark. (2005)** çavdarda yaptıkları çalışmada SAMPL yöntemi ile, polimorfizm bilgi içeriği değerini 0.40 olarak elde etmişlerdir. Bu çalışmada elde edilen polimorfizm bilgi içeriği değeri daha yüksektir. Bu durum, kullanılan materyal ve primerlerden kaynaklanmaktadır ve SAMPL yönteminin, kendilenmiş monoik *P. atlantica* popülasyonunda bağlantı analizlerinde kullanılabilen polimorfik markör verme eğiliminin daha yüksek olduğunu göstermektedir.

Primerlerin ayırma gücüne bakıldığında ise toplam ayırma gücünün 91.03 olduğu, en yüksek ayırma gücü değerine (1.60) sahip primer kombinasyonlarının SAMPL6-M44, SAMPL7-M46, SAMPL7-M57, SAMPL7-M60, SAMPL7-M62,

SAMPL6-M72 ve SAMPL7-M74 olduğu, en düşük ayırma gücü (0.60) değerine sahip primer kombinasyonunun SAMPL7-M76 olduğu belirlenmiştir. Ortalama ayırma gücü 0.94 olarak hesaplanmıştır. **Kafkas ve ark. (2005)** cevizde SAMPL yöntemini kullanarak yaptıkları çalışmada ortalama ayırma gücünü 14.9 olarak bulmuşlardır. Bu çalışmada elde edilen ayırma gücü değeri daha düşüktür. Bu durum çalışmada kullanılan populasyonda varyasyonun az olmasından kaynaklanmaktadır.

4.4. Kendilenmiş Monoik Atlantik Sakızı Populasyonunda SSR Yöntemiyle Polimorfizmin Belirlenmesi

SSR-PCR analizlerinde toplam 33 adet primer kombinasyonu kullanılmıştır. Diğer yöntemlerde olduğu gibi elektroforez işlemi, kapiller elektroforez yöntemi ile, ABI 3130xl otomatik genetik analizör cihazı kullanılarak yapılmış, amplifikasyon ürünleri var (1) ya da yok (0) şeklinde GeneMapper 4.0 bilgisayar paket programında skorlanmıştır. **Şekil 4.4**'te PET flourosan boyasıyla boyanmış CUPVB009 SSR primeri için kapiller elektroforez sonrası kendilenmiş monoik yavru bireylerde polimorfik allelleri içeren elektroferogram verilmiştir.



Şekil 4.4. PET flourosan boyasıyla boyanmış CUPVB009 SSR primeri için kapiller elektroforez sonrası kendilenmiş monoik yavru bireylerde polimorfik allelleri içeren elektroferogram.

SSR analizlerinde kullanılan primer kombinasyonlarının isimleri ve elde edilen toplam bant sayıları (TBS), polimorfik bant sayıları (PBS), primerlere ait polimorfizm oranları (PO), polimorfizm bilgi içerikleri (Pİ) ve ayırma güçleri (AG) Çizelge 4.4'te verilmiştir.

Çizelge 4.4. Monoik atlantik sakızı ve monoik atlantik sakızının kendilenmesiyle elde edilmiş 10 yavru bireyde SSR primerleri kullanılarak yapılan PCR aşamasından sonra elde edilen toplam bant sayıları (TBS), polimorfik bant sayıları (PBS), polimorfizm oranı (PO), polimorfizm bilgi içeriği (Pİ) ve ayırma gücü (AG) değerleri.

No	SSR PRİMERLERİ	TBS	PBS	PO	AG	Pİ
1	CUPVA006	1	0	0	0	0
2	CUPVA102	2	0	0	0	0
3	CUPVA105	1	0	0	0	0
4	CUPVA114	1	0	0	0	0
5	CUPVA213	1	1	100	1	0.75
6	CUPVA220	1	0	0	0	0
7	CUPVA313	2	2	100	1.2	0.63
8	CUPVB009	2	2	100	1.6	0.36
9	CUPVB010	2	2	100	1.5	0.43
10	CUPVB101	2	2	100	0.86	0.37
11	CUPVB106	2	2	100	1.4	0.5
12	CUPVB208	2	2	100	1.6	0.36
13	CUPVB217	1	0	0	0	0
14	CUPVB219	2	2	100	1.5	0.43
15	CUPVC007	1	0	0	0	0
16	CUPVC116	1	0	0	0	0
17	CUPVC204	2	0	0	0	0
18	CUPVC313	1	0	0	0	0
19	CUPVC317	1	0	0	0	0
20	CUPVD004	2	0	0	0	0
21	CUPVD011	1	0	0	0	0
22	CUPVD103	2	0	0	0	0
23	CUPVD120	2	2	100	1.4	0.51
24	CUPVD201	1	0	0	0	0
25	CUPVD207	1	0	0	0	0
26	CUPVD214	1	0	0	0	0
27	CUPVD220	1	0	0	0	0
28	CUPVD310	2	1	50	1	0.75
29	PVSSR31	1	0	0	0	0
30	PVSSR33	2	0	0	0	0
31	PVSSR42	2	0	0	0	0
32	PVSSR45	2	0	0	0	0
33	PVSSR7	2	0	0	0	0
	TOPLAM	50	18	-	13.06	-
	ORTALAMA	1.51	0.54	28.7	0.39	0.15

SSR analizlerinde, 33 primer kombinasyonundan, 18'i (%36) polimorfik olan toplam 50 allel elde edilmiştir. Monomorfik allel sayısının 32 olduğu tespit edilmiştir. Primer başına düşen toplam allel sayısı 1.51 ve primer başına düşen polimorfik allel sayısı 0.54 olarak bulunmuştur. Polimorfik allel büyüklüklerinin 102–311 bp arasında değiştiği görülmüştür.

F1 bitkilerinde yapılmış çalışmalara bakıldığında, **Saha ve ark. (2005)** çimende (*Festuca arundinacea*) F1 bitkilerinde primer başına düşen allel sayısını 2.6 olarak bulmuşlardır. **Cavalcanti ve ark. (2007)** Amerikan elması (*Anacardium occidentale*) F1 bitkilerinde, SSR yöntemini kullanarak yaptıkları çalışmada, primer başına düşen polimorfik allel sayısını 2.25 olarak bulmuşlardır.

Antepfıstığına SSR yöntemiyle yapılmış çalışmalarda, **Ahmad ve ark. (2003)** Kerman çeşidinin DNA'sını kullanarak yaptıkları çalışmada primer başına düşen allel sayısının 2–5 arasında değiştiğini, primer başına düşen ortalama allel sayısının 3.3 olduğunu, bant büyüklüklerinin ise 120–342 bp arasında değiştiğini belirlemiştir. **Ahmad ve ark. (2005)** *Pistacia* türlerinde (*P. atlantica*, *P. integerrima* ve iki türler arası melez PioneerGold II ve UCB-1 bitkilerinde) SSR yöntemiyle yaptıkları çalışmada primer başına düşen allel sayısının 2-5 arasında değiştiğini ve primer başına düşen ortalama allel sayısının 2.9 olduğunu bildirmişlerdir.

Antepfıstığı dışında, başka bitkilerde yapılmış çalışmalarda, **Bolibok ve ark. (2005)** çavdarda SSR yöntemi ile, EST SSR, genomik SSR ve SSR'da primer başına düşen allel sayılarını sırasıyla 2.89, 2.42, 2.66 olarak bulmuşlardır. **Duval ve ark. (2005)** mangoda yaptıkları SSR çalışmasında primer başına düşen allel sayısını 1.41 ve primer başına düşen polimorfik allel sayısını 1.2 olarak bulmuşlardır. Her lokusta 4–11 arasında değişen sayıda allel olduğunu, lokus başına ortalama allel sayısının 7.3 olduğunu bildirmişlerdir. **Tam ve ark. (2005)** SSR yöntemiyle domates için, primer başına düşen toplam allel sayısını 2.44 ve polimorfik allel sayısını yine 2.44 (%100), biberde ise primer başına düşen allel sayısı 2.385 ve polimorfik allel sayısı yine 2.385 (%100) olarak bulmuşlardır. **Mnejja ve ark. (2005)** Texas badem çeşidinde SSR yöntemiyle yaptıkları çalışmada lokus başına düşen allelin ortalama 6.6 olduğunu bildirmişlerdir. **Li ve ark. (2008)** Şeftalide (*Prunus persica* L.) SSR

yöntemiyle lokus başına 2–11 arasında değişen sayıda allel elde etmişler ve lokus başına ortalama 5 allel düştüğünü görmüşlerdir. Bu çalışmada primer başına düşen polimorfik allel sayısı diğer çalışmalarda elde edilen değerlere göre oldukça düşük bulunmuştur. Bunun nedeni kullanılan popülasyondan kaynaklanmaktadır.

Çalışma sonucunda polimorfizm oranlarının % 50–100 arasında değiştiği, tüm primerlerden elde edilen ortalama polimorfizm oranının %28.7 olduğu tespit edilmiştir.

En yüksek polimorfizm bilgi içeriği değerinin (0.75) CUPVA213 ve CUPVD310 primerlerine ait olduğu, en düşük polimorfizm bilgi içeriği değerine (0.36) sahip primerlerin CUPVB009 ve CUPVB208 olduğu görülmüştür. Polimorfizm bilgi içeriği ortalaması 0.15 olarak bulunmuştur. **Bolibok ve ark. (2005)** çavdarda yapmış oldukları çalışmada polimorfizm bilgi içeriği değerlerini SSR (EST) için 0.41, SSR (genomik) için 0.35, toplam SSR için 0.38 olarak bulmuşlardır. **Tam ve ark. (2005)** SSR yönteminden elde ettikleri polimorfizm bilgi içeriği değerini domateste, 0.393 ve biberde 0.354 olarak bulmuşlardır. Bu çalışmada elde edilen polimorfizm bilgi içeriği ortalaması diğer çalışmalarda elde edilen polimorfizm bilgi içeriği ortalamalarına yakın ancak daha düşüktür. Bu durum kullanılan materyal ve primerlerden kaynaklanmaktadır ve SSR yönteminin kendilenmiş monoik *P. atlantica* popülasyonunda, bağlantı analizlerinde kullanılabilir polimorfik markör verme eğiliminin daha düşük olduğunu göstermektedir.

Primerlerin ayırma güçlerine bakıldığında toplam ayırma gücünün 13.06 olduğu, en yüksek ayırma gücü değerinin (1.60) CUPVB009 ve CUPVB208 primerlerine ait olduğu, en düşük ayırma gücü değerinin (0.86), CUPVB101 primerine ait olduğu görülmüştür. Ortalama ayırma gücü değeri 0.39 olarak hesaplanmıştır.

4.5. AFLP, TE-AFLP, SAMPL ve SSR Yöntemlerinin Karşılaştırılması

AFLP, TE-AFLP, SAMPL ve SSR analizleri sonrası elde edilen toplam bant sayıları (TBS), primer başına düşen toplam bant sayıları (PBDTBS), polimorfik bant sayıları (PBS), primer başına düşen polimorfik bant sayıları (PBDPBS), polimorfizm

oranları (PO%), polimorfizm bilgi içerikleri (PBİ) ve ayırma güçleri (AG), **Çizelge 4.5'**te verilmiştir.

Çizelge 4.5. Monoik atlantik sakızı ve monoik atlantik sakızının kendilenmesiyle elde edilmiş 10 yavru bireyde yapılan AFLP. TE AFLP. SAMPL ve SSR analizleri sonrası elde edilen toplam bant sayıları (TBS), primer başına düşen toplam bant sayıları (PBDTBS), polimorfik bant sayıları (PBS), primer başına düşen polimorfik bant sayıları (PBDPBS), polimorfizm oranları (PO%), polimorfik bilgi içerikleri (PBİ) ve ayırma gücü ortalamaları (OAG).

Yöntemler	TBS	PBDTBS	PBS	PBDPBS	PO	PBİ	OAG
AFLP	8177	85.17	603	6.28	8	0.53	1.22
TE-AFLP	302	37.75	36	4.50	14	0.59	0.07
SAMPL	5952	62.00	358	3.72	6	0.54	0.94
SSR	50	1.51	18	0.54	28.7	0.15	0.39

Analizler sonucunda, AFLP yönteminden 8177, SAMPL yönteminden 5952, TE-AFLP yönteminden 302 ve SSR yönteminden 50 bant elde edilmiştir. Toplam bant sayısı bakımından en yüksek değeri AFLP yönteminin verdiği, en düşük değeri SSR yönteminin verdiği görülmüştür. **Van der Wurff ve ark. (2000)** TE-AFLP ve AFLP yöntemini karşılaştırarak yaptıkları çalışmada AFLP yönteminin, TE-AFLP yönteminden 20 kat daha fazla fragment verdiğini görmüşlerdir. Bu çalışmada AFLP yöntemi, TE-AFLP yönteminin 27 katı kadar fazla fragment vermiştir. Bu bakımdan benzer sonuç elde edilmiştir. TE-AFLP yönteminde fazladan 1 kesim enzimi kullanılmasının seçiciliği artırdığı ve çoğalabilecek potansiyel fragment sayısını azalttığı bilinmektedir.

Primer başına düşen toplam bant sayılarına bakıldığında, AFLP yönteminin 85.17, SAMPL yönteminin 62.0, TE-AFLP yönteminin 37.75 ve SSR yönteminin 1.51 bant verdiği görülmüştür. Primer başına düşen toplam bant sayısı bakımından en yüksek değeri AFLP yöntemi, en düşük değeri SSR yöntemi vermiştir.

Analizler sonucunda, AFLP yönteminden 603, SAMPL yönteminden 358, TE-AFLP yönteminden 36 ve SSR yönteminden 18 polimorfik bant elde edilmiştir. Polimorfik bant sayısı bakımından en yüksek değeri AFLP yönteminin verdiği, en düşük değeri SSR yönteminin verdiği görülmüştür.

Primer başına düşen polimorfik bant sayılarına bakıldığında, AFLP yönteminin 6.28, SAMPL yönteminin 3.72, TE-AFLP yönteminin 4.50 ve SSR yönteminin 0.54 bant verdiği belirlenmiştir. Primer başına düşen polimorfik bant sayısı bakımından en yüksek değeri AFLP yöntemi, en düşük değeri SSR yöntemi vermiştir.

Polimorfizm oranlarına (PO%) bakıldığında, AFLP yönteminin %8, SAMPL yönteminin %6, TE-AFLP yönteminin %14 ve SSR yönteminin %28.7 polimorfizm oranına sahip olduğu görülmüştür.

AFLP ve AFLP türevi yöntemler içerisinde polimorfizm oranı bakımından en yüksek değeri (%14) TE-AFLP yöntemi vermiştir. **Van der Wurff ve ark. (2000)** TE-AFLP yönteminde fazladan bir kesim enzimi kullanılmasının (1 adet sıklıkla kesen enzim, *RsaI* ve 2 adet nadir kesen enzim, *XbaI* ve *BamHI*), DNA'nın kesilmesi aşamasında, DNA'nın SAMPL ve AFLP yöntemlerinde olduğundan daha kısa fragmentlere kesilmesine neden olduğunu ve ligasyon aşamasında seçiciliğe, bunun ise PCR aşamasında çoğalabilecek potansiyel fragment sayısının azalmasına sebep olduğunu ancak polimorfizm oranını arttırdığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar yaptıkları çalışmada, TE-AFLP yönteminin polimorfizm oranı bakımından daha üstün olduğunu bildirmişlerdir. **Van der Wurff ve ark. (2000)** ile benzer sonuç elde edilmiştir. TE-AFLP yöntemi standart AFLP yöntemine göre laboratuvarında kısmen daha az iş gücü gerektirmesi bakımından avantajlıdır.

Kafkas ve ark. (2005) AFLP yönteminde polimorfizm oranının %49.9, SAMPL yönteminde polimorfizm oranının %50.9 olduğunu, **Tosti ve ark. (2005)** SAMPL yöntemiyle elde edilen polimorfizmin AFLP yöntemine göre daha fazla olduğunu bildirmişlerdir. **Altıntaş ve ark. (2008)** AFLP yönteminden elde ettikleri polimorfizm oranlarını beyaz buğday, esmer buğday ve ekmeklik buğday için sırasıyla %64, %40 ve %48 olarak bulmuşlar, SAMPL yönteminden elde ettikleri polimorfizm oranlarını ise yine aynı sırayla, %62, %39 ve %47 olarak tespit etmişlerdir. Bu çalışmada SAMPL yöntemi polimorfizm oranı bakımından AFLP yönteminden daha düşük ancak diğer çalışmalarda olduğu gibi AFLP yöntemine yakın bir değer vermiştir. SAMPL primerlerinin mikrosatellit bölgeler içermesi ve genom içerisinde bulunan çok sayıda tekrarlı bölgeyi çoğaltmaya imkan vermesi

bakımından polimorfizm yakalama olasılığının AFLP yönteminden daha yüksek olması beklenmektedir. Bu çalışmada daha düşük bulunmasının sebebi kullanılan primerlerden ve kullanılan bitki materyalinden kaynaklanmaktadır.

Polimorfizm bilgi içeriği değerleri AFLP ve türevi yöntemlerde birbirine yakın olarak bulunmuş, hesaplamalar sonucunda AFLP yönteminin 0.53, SAMPL yönteminin 0.54, TE-AFLP yönteminin 0.59 ve SSR yönteminin 0.15 değerlerini verdiği belirlenmiştir. Bu durum TE-AFLP markörlerinin bağlantı analizleri için kullanılabilceğini göstermektedir.

Ayırma gücü ortalamalarına bakıldığında en yüksek değeri (1.22) AFLP yönteminin verdiği, en düşük değeri (0.07) TE-AFLP yönteminin verdiği görülmüştür. Bu durum AFLP yönteminin yakın bireyleri ayırmada daha başarılı olduğunu göstermektedir.

Toplam ayırma güçlerine bakıldığında, AFLP yönteminin 117.2, SAMPL yönteminin 91.03, TE-AFLP yönteminin 7.49 ve SSR yönteminin 13.06 toplam ayırma gücü değerlerini verdiği, en yüksek ayırma gücü toplamını AFLP yönteminin verdiği, en düşük ayırma gücü toplamını ise TE-AFLP yönteminin verdiği görülmüştür. AFLP ve SAMPL yöntemlerinde ayırma gücü toplamının fazla olması kullanılan primer sayısının fazla olmasından kaynaklanmaktadır.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada AFLP, TE-AFLP, SAMPL ve SSR yöntemleri karşılaştırılmış ve primer kombinasyonlarından elde edilen toplam bant sayıları, polimorfik bant sayıları, monomorfik bant sayıları, polimorfizm bilgi içerikleri ve ayırma güçleri hesaplanmıştır.

Elde edilen sonuçlar aşağıda kısaca özetlenmiştir.

1. AFLP analizleri sonucunda elde edilen verilere göre 96 primer kombinasyonu 603'ü polimorfik olan toplam 8177 bant üretmiştir. Monomorfik bant sayısı 7574 olarak bulunmuştur. En fazla polimorfik bant veren primer çifti (18 adet) E33-M52 olarak bulunurken, en az polimorfik bant veren (1) primer çiftleri E42-M56, E33-M46 ve E33-M38 olarak bulunmuştur.

Tüm primer çiftlerinden elde edilen ortalama polimorfizm oranı %8 olarak belirlenmiştir. En yüksek polimorfizm oranını E42-M37 primer kombinasyonu verirken (%23.4), en düşük polimorfizm oranını E42-M56 primer kombinasyonu vermiştir (%1.1).

En yüksek polimorfizm bilgi içeriği değerinin E33-M62 primer kombinasyonundan (0.77) ve en düşük polimorfizm bilgi içeriği değerinin E33-M33 primer kombinasyonundan (0.33) elde edildiği görülmüştür. Polimorfizm bilgi içeriği ortalamasının 0.53 olduğu belirlenmiştir.

Primerlerin ayırma güçleri incelendiğinde, toplam ayırma gücünün 117.20 olduğu görülmüştür. En yüksek ayırma gücü değeri (1.62) E33-M33 primer kombinasyonundan elde edilirken en düşük ayırma gücü değeri (0.95) E33-M62 primer kombinasyonundan elde edilmiştir. Ortalama ayırma gücü değeri 1.22 olarak hesaplanmıştır.

2. TE-AFLP analizleri sonucunda elde edilen verilere göre; 8 primer kombinasyonu, 36'sı polimorfik olan toplam 302 bant üretmiştir. Monomorfik bant sayısı 266 olarak bulunmuştur. En fazla polimorfik bandı (13) *Xba*+CC-*Bam*HI+A primer kombinasyonu vermiş olup, en az polimorfik bandı (1) *Xba*+CC-*Bam*HI+T primer kombinasyonu vermiştir.

Tüm primer çiftlerinden elde edilen ortalama polimorfizm oranı %14 olarak bulunurken en düşük polimorfizm oranını %8 ile *Xba*+CA-*Bam*HI+C primer kombinasyonu ve en yüksek polimorfizm oranını (%48) *Xba*+CC-*Bam*HI+G primer kombinasyonu vermiştir.

Polimorfizm bilgi içeriği ortalaması 0.59 olarak bulunmuş, en yüksek polimorfizm bilgi içeriğine (0.75) sahip primer kombinasyonu *Xba*+CC-*Bam*HI+T ve en düşük polimorfik bilgi içeriğine sahip primer kombinasyonu (0.51) *Xba*+CC-*Bam*HI+A ve olarak bulunmuştur.

Toplam ayırma gücünün 7.49 olduğu ve *Xba*+CA-*Bam*HI+A primer kombinasyonunun en yüksek ayırma gücü değerine (1.37) sahip olduğu, *Xba*+CC-*Bam*HI+T primer kombinasyonunun en düşük (1.00) ayırma gücü değerine sahip olduğu belirlenmiştir. Ortalama ayırma gücü değeri 0.07 olarak bulunmuştur.

3. SAMPL analizleri sonucunda elde edilen verilere göre; 96 primer kombinasyonun 358'i polimorfik olan toplam 5952 bant verdiği belirlenmiştir. En fazla polimorfik bandı (27) SAMPL7-M31 primer kombinasyonu vermiş, en az polimorfik bandı (1) ise SAMPL7M46, SAMPL7-M47, SAMPL6-M48, SAMPL6-M49, SAMPL6-M53, SAMPL6-M54, SAMPL6-M55, SAMPL6-M57, SAMPL7-M57, SAMPL7-M58, SAMPL7-M60, SAMPL6-M61, SAMPL7-M61, SAMPL7-M62, SAMPL7-M65, SAMPL7-M69, SAMPL6-M70, SAMPL6-M72, SAMPL7-M74, SAMPL6-M77, SAMPL7-M78 primer kombinasyonları vermiştir. Monomorfik bant sayısı 5594 olarak hesaplanmıştır.

Tüm primer çiftlerinden elde edilen ortalama polimorfizm oranı değeri %6 olarak bulunmuştur. En yüksek polimorfizm oranını % 29 ile SAMPL6-M57 primer kombinasyonunun verdiği, en düşük polimorfizm oranını ise (0.76) SAMPL7-M46 primer kombinasyonunun verdiği belirlenmiştir.

Ortalama polimorfizm bilgi içeriği değeri 0.54 olarak bulunmuş, en düşük polimorfizm bilgi içeriği değerine (0.36) sahip primer kombinasyonlarının SAMPL6-M44, SAMPL7-M46, SAMPL7-M57, SAMPL7-M60, SAMPL7-M62, SAMPL6-M72 ve SAMPL7-M74 olduğu, en yüksek polimorfizm bilgi içeriği değerine sahip (0.75) primer kombinasyonlarının SAMPL6-M34, SAMPL6-M48, SAMPL6-M49, SAMPL6-M54, SAMPL7-M58 ve SAMPL7-M78 olduğu saptanmıştır.

Primerlerin ayırma gücü incelendiğinde ise toplam ayırma gücünün 91.03 olduğu, en yüksek ayırma gücü değerine (1.6) sahip primer kombinasyonlarının SAMPL6-M44, SAMPL7-M46, SAMPL7-M57, SAMPL7-M60, SAMPL7-M62, SAMPL6-M72 ve SAMPL7M-74 olduğu, en düşük ayırma gücü (0.6) değerine sahip primer kombinasyonunun SAMPL7-M76 olduğu görülmüştür. Ortalama ayırma gücü 0.94 olarak hesaplanmıştır.

4. SSR analizleri sonucunda elde edilen verilere göre; 33 primer kombinasyonunu 50 allel vermiştir. Bunların 18'inin polimorfik olduğu belirlenmiştir. Primer başına düşen allel sayısının 1.51 ve primer başına düşen polimorfik allel sayısının 0.54 olduğu bulunmuştur. Polimorfizm oranlarının %50–100 arasında değiştiği, tüm primerlerden elde edilen toplam polimorfizm oranının %28.7 olduğu tespit edilmiştir.

En yüksek polimorfizm bilgi içeriği değerinin (0.75) CUPVA213 ve CUPVD310 primerlerine ait olduğu, en düşük polimorfizm bilgi içeriği değerine (0.36) sahip primerlerin CUPVB009 ve CUPVB208 olduğu görülmüştür. Polimorfizm bilgi içeriği ortalaması 0.15 olarak bulunmuştur.

Primerlerin ayırma güçlerine bakıldığında toplam ayırma gücünün 13.06 olduğu, en yüksek ayırma gücü değerinin (1.60) CUPVB009 ve CUPVB208 primerlerine ait olduğu, en düşük ayırma gücü değerinin (0.86), CUPVB101 primerine ait olduğu görülmüştür. Ortalama ayırma gücü değeri 0.39 olarak hesaplanmıştır.

5. Moleküler markör yöntemleri elde edilen toplam bant sayıları (TBS), polimorfik bant sayıları (PBS), polimorfizm oranları (PO%), polimorfizm bilgi içerikleri ve ayırma gücü ortalamaları bakımından karşılaştırıldığında;

a. En fazla bandı (8177 adet) AFLP yöntemi, en az bandı (50 adet) SSR yöntemi vermiştir.

b. En fazla polimorfik bandı (603 adet) AFLP yöntemi, en az polimorfik bandı (18 adet) SSR yöntemi vermiştir.

c. Primer başına düşen toplam bant sayısı bakımından en yüksek değeri (85.17) AFLP yöntemi vermiştir. En düşük değeri (1.51) SSR yöntemi vermiştir.

d. Primer başına düşen polimorfik bant sayısı bakımından en yüksek değeri (6.28) AFLP yöntemi vermiştir. En düşük değeri (0.54) SSR yöntemi vermiştir

e. Polimorfizm oranı bakımından (%PO) en yüksek değeri (%28.7) SSR yöntemi vermiştir. En düşük değeri (%6) SAMPL yöntemi vermiştir.

f. Polimorfizm bilgi içerikleri (PBI) karşılaştırıldığında değerlerin birbirine yakın olduğu ancak en yüksek değeri (0.59) TE-AFLP yönteminin verdiği görülmüştür. En düşük polimorfizm bilgi içeriği değerini (0.15) SSR yöntemi vermiştir.

g. Ayırma gücü ortalamaları karşılaştırıldığında ise; AFLP yönteminin en yüksek ayırma gücü ortalamasına sahip olduğu (1.22), TE-AFLP yönteminin en düşük ayırma gücü ortalamasına (0.07) sahip olduğu belirlenmiştir.

Kendilenmiş monoik atlantik sakızında olduğu gibi polimorfizm yakalama olasılığının düşük olduğu populasyonlarda primer başına düşen polimorfik bant sayısı bakımından ve ayırma gücü ortalaması bakımından en yüksek değeri veren AFLP yöntemi kullanılabilir.

Oluşturulacak olan bir genetik haritada, AFLP yöntemi ile kodominant markör sistemi olan SSR yöntemi birlikte kullanılmalıdır. AFLP markörlerinin kromozomun sentromer bölgelerinde yoğunluk kazanmasıyla oluşan dezavantaj, AFLP markörleri yanında, tüm genoma dağılmış SSR markörlerinin kullanılmasıyla giderilebilir. SSR yöntemi genom içerisinde gelişigüzel dağılmış halde ve oldukça fazla sayıdaki tekrarlanan bölgeleri çoğaltan bir yöntemdir (**Tautz, 1989**).

Bundan sonra yapılacak olan çalışmalarda AFLP yönteminde farklı kesim enzimleri kullanılarak (*PstI* gibi) polimorfizm yakalama şansı artırılabilir.

Bu çalışmada belirlenen polimorfik primer ve yöntemler ileride yapılacak olan genetik haritalama çalışması için kullanılabilir, oluşturulacak olan genetik harita ile monoik *P. atlantica*'nın genetik yapısı çözülebilecek ve ticari değeri olan özellikler için moleküler markör geliştirilebilecektir.

KAYNAKLAR

- AGBO, C.E., DUIM, B., MAJIVA, A.O.P., BUSHCER, P., CALAASSEN, E., and PAS, M.F.W., 2003. Multiplex-endonuclease genotyping approach (MEGA): a tool for the fine-scale detection of unlinked polymorphic DNA markers. *Chromosoma*, 111: 518-524.
- 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. *J. Hort. Sci & Biotech.*, 80 (3): 382–386.
- ALTINTAŞ, S., TOKLU, F., KAFKAS, S., KILIAN, B., BRANDOLINI, A. and ÖZKAN, H., 2008. Estimating genetic diversity in durum and bread wheat cultivars from Turkey using AFLP and SAMPL markers. *Plant Breeding*, 127: 9-14.
- BASHA, I.A., PADULOSI, S., CHABANE, K., HADJ-HASSAN, A., DULLOO, E., PATNOTTA, M.A. and PORCEDDU, E., 2007. Genetic diversity of Syrian Pistachio (*Pistacia vera* L.) varieties evaluated by AFLP markers. *Genet Resour Crop Evol.*, 54:1807-1816.
- BEEDANAGARI, S.R., DOVE, S.K., WOOD, W.B. and CONNER, J.P., 2005. A first linkage map of pecan cultivars based on RAPD and AFLP markers. *Theor Appl Genet*, 110: 1127–1137.
- BOERSMA, J.G., PALLOTTA, M., LI, C., BUIRCHELL, J.B., SIVASITHAMPARAM, K. and YANG, H., 2007. Construction of a genetic linkage map using M-AFLP and identification of molecular markers linked to Domestication genes in narrow-leaved Lupin (*Lupinus angustifolius* L.). *Cellular and Molecular Biology Letters*, 10: 331- 344.
- BOLIBOK, H., RAKOCZY-TROJANOWSKA M., HROMADA A. and PIETRZYKOWSKI R., 2005. Efficiency of different PCR based marker

- systems in assessing genetic diversity among Winter rye (*Secale cereale* L.) inbred lines. *Euphytica*, 146:109-116.
- CARLIER, J. D., REIS, A., DUVAL, M. F., COPPENS D'EECKENBRUGGE, G. and LEITA, J. M., 2004. Genetic maps of RAPD, AFLP and ISSR markers in *Ananas bracteatus* and *A. comosus* using the pseudo-testcross strategy. *Plant Breeding*, 123:186–192.
- CASA, M.A., BROUWER, C., NAGEL, A., WANG, L., ZHANG, Q., KRESOVICH, S. and WESSLER, R.S., 2000. The MITE family Heartbreaker (Hbr): Molecular markers in Maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol.97, 18: 10083-10089.
- CAVALCANTI, J.V.J. and WILKINSIN, J.M., 2007. The First genetic maps of Cashew (*Anacardium occidentale* L.). *Euphytica*, 157:131-143.
- CRANE, J.C., 1974. Hermaphroditism in *Pistacia*. *Calif Agr.*, 28: 3- 4.
- CUI, Z.J., SHEN, Y.X., GONG, L.Q., YANG, P.G. and GU, Q.Q., 2006. Identification of sex markers by cDNA-AFLP in *Takifugu rubripes*. *Division of Life Science and Technology*, 257: 30–36.
- DEVLET İSTASTİSTİK ENSTİTÜSÜ, 1997. Tarımsal yapı TC Başbakanlık.
- DOYLE, J.J. and DOYLE, J.L., 1987. A rapid isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19: 11–15.
- DUVAL, M. F., BUNEL, J., SITBON, C. and RISTERUCCI, M. A., 2005. Development of microsatellite markers for Mango (*Mangifera indica* L.). *Molekular Ecology Notes*, 5: 824-826.
- EMEKSİZ, F. ve SENGÜL, S., 2001. Determining production and export potencial of Pistachio in Turkey. *Proceedings of XI. GREMPA Meeting on Pistachios and Almonds, Şanlıurfa- Turkey. Cahiers OPTİONS mediterraneennes*. 56: 201- 8.
- FAOSTAT, 2006. Fao web page (<http://www.fao.org>).
- GIAMMANCO, G.M., MAMMINA, C., ROMANI, C., LUZZI, I., DIONISI, M.A. and NASTASI, A., 2006. Evaluation of a modified single-enzyme amplified fragment length polymorphism (SE-AFLP) technique for subtyping

- Salmonella enterica serotype Enteritidis. Research in microbiology, Vol.158, 1:10-17.
- GOULAO, L., and OLIVEIRA, C.M., 2001. Molecular characterization of cultivars of apple (*Malus x domestica* Borkh.) using microsatellite (SSR and ISSR) markers. Euphytica, 122: 81–89.
- GUPTA, A.K., KANG B.Y., ROY J.K. and RAJORA O.P., 2005. Large scale development of selectively amplified microsatellite polymorphic loci (SAMPL) markers in *Spruce(Picea)*. Molecular Ecology Notes, 5: 481- 483.
- GÜLŞEN, O. ve MUTLU, N., 2005. Bitki Biliminde Kullanılan Genetik Markırlar ve Kullanım Alanları. Alatarım 4 (2): 27–37.
- HORMAZA, J.L., DOLLO, L. and POLITO, V.S., 1994. Determination of relatedness and geographic movements of *Pistacia vera* germplasm by RAPD analysis. Economic Botany, 48: 349- 58.
- HORMAZA, J.L., PINNEYK. and POLITOV. S., 1998. Genetic diversity of Pistachio (*Pistacia vera*, Anacardiaceae) germplasm based on randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. Economic Botany, 52:78-87
- HURTADO, M.A., ROMERO, C., VILANOVA, S., ABBOTT, A.G., LLACER, G. and BADENES, M.L., 2002. Genetic linkage maps of two apricot cultivars (*Prunus armenica* L.) and mapping of PPV (sharka) resistance. Theor Appl Genet. 105:182-191.
- KAFKAS, S., PERL-TRAVES R. and KASKA, N., 2000. Unusual *Pistacia atlantica* Desf. (Anacardiaceae) monoecious Sex type in the Yunt Mountains of the Manisa Province of Turkey. Israil J. Plant Sci., 48: 277- 280.
- KAFKAS, S. and PERL-TREVES, R., 2001. Morphological and molecular phylogeny of *Pistacia* species in Turkey. Theor Appl Genet, 102: 908–915.
- KAFKAS, S. and PERL-TRAVES, R., 2002. Interspecific relationships in *Pistacia* based on RAPD fingerprinting. Hortscience, 37(1): 168–171.
- KAFKAS, S., ACAR I. ve GOZEL H., 2003. A project on developing monoecious pistachio (*Pistacia vera* L.) populations and determination of sex mechanism in Pistachia. XIII GIEMPA Meeting on Almonds and Pistachios. Options Mediterraneennes, 63:57–60.

- KAFKAS, S., OZKAN, H. ve SUTYEMEZ, M., 2005. DNA polymorphism and assessment of genetic relationships in walnut genotypes based on AFLP and SAMPL markers. *J. Amer. Hort. Sci.* 130 (4) 585- 590.
- 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 Systems and Evolution*, Vol. 262:1–2, 113–124.
- KAFKAS, S., KASKA, N., WASSIMI, A.N. and PADULOSI, S., 2006b. Molecular characterisation of Afghan pistachio accessions by amplified fragment length polymorphisms (AFLPs). *J. Hort. Sci & Biotech.* 81: 864–868(5).
- KAFKAS, S., OZKAN, H., AK, B. E., ACAR, 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*. Vol. 131, no:4, pp. 522–529.
- KAFKAS, S., OZGEN, M., ERCİŞLİ, S., SERCE, S., DOGAN, Y. and OZCAN, B., 2008 Molecular characterization of mulberry accessions in Turkey by AFLP markers. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 133(4):593–597.
- KAŞKA, N., GÜLERYÜZ, M., KAPLANKIRAN, M., KAFKAS, S., ERCİŞLİ, S., EŞİTKEN, A., ASLANTAŞ, R. ve AKÇAY, E., 2004. Türkiye meyveciliğinde üretim hedefleri. *Türkiye Ziraat Mühendisliği VI. Teknik Kongresi*.6 (1): 519–549.
- KURU, C. ve ÖZSABUNCUOĞLU I.H., 1990. Yabani *Pistacia* türlerinin aşılmasında sorunlar ve çözüm yolları. *Türkiye 1*. In: Kuru C, Can A, Öcal M, Yalcin M, Basut M (eds) *Antepfıstığı Sempozyumu*. Pistachio Research Institute, Gaziantep, Turkey, pp 51- 57.
- LI, H.T., LI, Y.X., LI, Z.C., ZHANG, H.L., QI, Y.W. and WANG, T., 2008. Simple sequence repeat analysis of genetic diversity in primary core collection of Peach (*Prunus persica*). *Journal of Integrative Plant Biology*, 50(1): 102–110.

- MAGGS, D.H., 1973. Genetic resources in Pistachio. *Plant Gen Res News*. 29: 7–15.
- MARANTO, J. and CRANE, J.C., 1982. Pistachio production division of agricultural sciences. Univ of California, Leaflet 2279.
- MARQUES, C.M., ARAUJO, J.A., FERREIRA, J.G., WHETTEN, R., O'MALLEY, D.M., LIU, B-H. and SEDEROFF, R., 1998. AFLP genetic maps of *Eucalyptus globulus* and *E.tereticornis*. *Theor APPL Genet*. 96:727–737.
- 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.
- ÖZBEK, S. ve AYFER, M., 1958. A hermaphrodite *Pistacia* found in the vicinity of Gaziantep, Turkey. *Proc Amer Soc Hort Sci* 72: 240- 241.
- ÖZBEK, S., 1978. Özel Meyvecilik. ÇÜ Zir. Fak. Yayınları, No:128, A.Ü.Basımevi, Ankara 488s.
- PAGLIA, G. and MORGANTE M., 1998. PCR based multiplex DNA fingerprinting techniques for the analysis of Conifer genes. *Mol Breeding* 4: 173- 177.
- PARFITT, D. E. and 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.
- PORTIS, E., ACQUADRO, A., COMINO, C. and LANTERI, S., 2003. Analysis of DNA methylation during germination of pepper (*Capsicum annum* L.) seeds using methylation- sensitive amplification polymorphism (MSAP). 166: 169- 178.
- PREVOST, A. and WILKINSON, M. J., 1999. A new system of comprasing PCR Primers applied to ISSR fingerprinting of potato accessions. *Theoretical and Applied Genetics*, 98: 107–112.
- ROY, J.K., BALYAN H.S., PARASAD M. and GUPTA P.K., 2002. Use of SAMPL for a study of DNA polymorphizm genetic diversity and possible gene tagging in bread wheat. *Theor Apple Genet* 465- 472.
- SAHA, M.C., MIAN, R., ZWONITZER, J.C., CHEKHOVSKIY, K. and HOPKINS, A.A., 2005. An SSR- and AFLP based genetic linkage map of tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.). *Theor Apple Genet*. 110: 323-336.

- 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. *Nat Biotech*. 18: 233–234.
- SMITH, J.S.C., CHIN, E.C.L., SHU, H., SMITH, O.S., WALL, S.J., SENIOR, M.L., MITCHEL, S.E., KRESORICH, S. and TIEGLE, J., 1997. An evaluation of the utility of SSR loci as molecular marker in Maize (*Zea mays*): comparisons with data from RFLP and pedigree. *Theor Apple Genet*, 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.
- TAM, S.M., MHIRI C., VOGELAAR A., KERKVELD M., PEARCE S.R., GRANDBASTIEN M. and GRANDBASTIEN A., 2005. Comparative analyses of genetic diversities within Tomato and Pepper collections detected by retrotransposon based SSAP, AFLP and SSR. *Theor Apple Genet*, 110: 819–831.
- TAUTZ, D., 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research*, Vol. 17, No. 16 6463-6471.
- TOSTI, N. and NEGRI V., 2005. On going On farm micro evolutionary processes in neighbouring cowpea landraces revealed by molecular markers. *Theor Apple Genet*, 110: 1275- 1283.
- TUNALIOĞLU, R. ve TAŞKAYA, B., 2003. Antepfıstığı Tarımsal Ekonomi Araştırma Enstitüsü T.E.A.E – Bakış, 5(2):1–4.
- TÜRKELİ, Y., DOĞAN, Y. ve KAFKAS, S., 2008. Antepfıstığında ilk genetik haritanın oluşturulması. Doktora tezi. (Yayımlanmamış).
- VAN DER WURRF, A.W.G., CHAN, Y.L., STRAALLEN, N.M. and VAN, SCHOUTEN J., 2000. TE-AFLP: Combining rapidity and robustness in a fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 28: 24/105.

- VOS, P., HOGERS, R., BLEEKER, M., REIJANS, M., VAN de LEE, T., HORNES, M., FRIJTERS, A., POT, J., PELEMAN, J., KUIPER, M. and ZABEAU, M., 1995. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23. 4407–4414.
- VUYLSTEKE, M., PELEMAN, J.D and JT van EIJK, M., 2007. AFLP technology for DNA fingerprinting. *Nature Protocols*, Vol. 2, No. 6 1387.
- ZALOĞLU, S., DOĞAN, Y. ve KAFKAS, S., 2008. Antepfıstığında mikrosatellit primerlerin geliştirilmesi ve diğer *Pistacia* türlerinde kullanılma durumlarının belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Yayımlanmamış.
- ZHANG, J., LU, Y. and YU, S., 2005. Cleaved AFLP (C-AFLP), a modified amplified fragment length polymorphism analysis for cotton. *Theor Appl Genet*, 111:1385–1395.
- ZOHARY, M., 1952. A monographical study of the genus *Pistacia*. *Palest J Bot Jerusalem Ser.*, 5:187-228.

ÖZGEÇMİŞ

1979 yılında Mersin’de doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Mersin’de tamamladım. 2004 yılında İnönü Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’nden, 2006 yılında Selçuk Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü Ortaöğretim Alan Öğretmenliği Biyoloji Bölümü Tezsiz Yüksek Lisans Programı’ndan mezun oldum. 2006 yılı Eylül döneminde Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı’nda Tezli Yüksek Lisans eğitimime başladım.