

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TÜRKİYE’NİN AKDENİZ SAHİLİNDEN
ÖRNEKLENEN ÇEŞİTLİ PLOİDİ DÜZEYLERİNE SAHİP
BERMUDA ÇİMİ (*CYNODON SPP.*) TÜRLERİNDE
KLOROPLAST DNA POLİMORFİZMİNİN
BELİRLENMESİ**

**Tezi Hazırlayan
Ahmet CEYLAN**

**Tezi Yöneten
Yrd. Doç. Dr. Mikail AKBULUT
Doç. Dr. Osman GÜLŞEN**

**Biyoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

**Temmuz 2010
KAYSERİ**

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TÜRKİYE’NİN AKDENİZ SAHİLİNDEN
ÖRNEKLENEN ÇEŞİTLİ PLOİDİ DÜZEYLERİNE SAHİP
BERMUDA ÇİMİ (*CYNODON SPP.*) TÜRLERİNDE
KLOROPLAST DNA POLİMORFİZMİNİN
BELİRLENMESİ**

**Tezi Hazırlayan
Ahmet CEYLAN**

**Tezi Yöneten
Yrd. Doç. Dr. Mikail AKBULUT
Doç. Dr. Osman GÜLŞEN**

**Biyoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

**Bu çalışma, Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
FBY-09-1117 kodlu proje ile desteklenmiştir.**

**Temmuz 2010
KAYSERİ**

Yrd. Doç. Dr. Mikail AKBULUT ve Doç. Dr. Osman GÜLŞEN danışmanlığında **Ahmet CEYLAN** tarafından hazırlanan “**Türkiye’nin Akdeniz Sahilinden Örneklenen Çeşitli Ploidi Düzeylerine Sahip Bermuda Çimi (*Cynodon spp.*) Türlerinde Kloroplast DNA Polimorfizminin Belirlenmesi**” adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında **Yüksek Lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

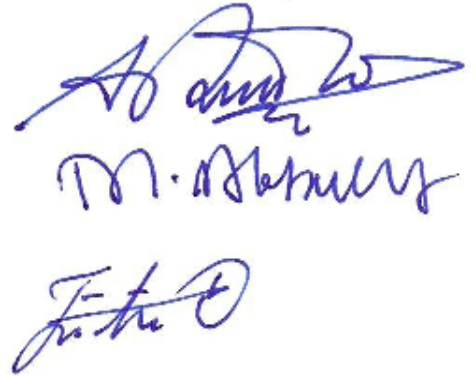
26/07/2010

JÜRİ:

Başkan :Doç.Dr. Abdurrahman AYVAZ

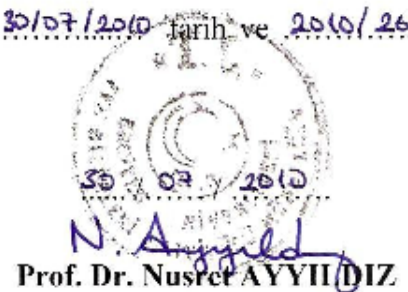
Üye :Yrd.Doç.Dr. Mikail AKBULUT

Üye : Yrd.Doç.Dr. Fatma ÖZTÜRK



ONAY :

Bu tezin kabulü, Enstitü Yönetim Kurulunun 30/07/2010 tarih ve 2010/26-08 sayılı kararı ile onaylanmıştır.



Prof. Dr. Nusret AYYILDIZ

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın her aşamasında bilgi ve deneyimleri ile bana rehberlik eden ve yardımlarını esirgemeyen danışman hocalarım Yrd. Doç. Dr. Mikail AKBULUT ve Doç. Dr. Osman GÜLŞEN' e teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarımda yardım ve desteklerini esirgemeyen, her zaman yanımda olan arkadaşlarım Arş. Gör. Hamit CEYLAN, Arş. Gör. Fuat BOZOK ve Arş. Gör. Musa KAR'a, teşekkür ederim.

Hayatımın her aşamasında olduğu gibi yüksek lisans dönemimde de maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen sevgili aileme sonsuz teşekkür ederim.

Bu çalışmayı FBY-09-1117 kodlu proje ile destekleyen Erciyes Üniversitesi'ne teşekkür ederim.

**TÜRKİYE’NİN AKDENİZ SAHİLİNDEN ÖRNEKLENEN ÇEŞİTLİ PLOİDİ
DÜZEYLERİNE SAHİP BERMUDA ÇİMİ (CYNODON SPP.)TÜRLERİNDE
KLOROPLAST DNA POLİMORFİZMİNİN BELİRLENMESİ**

Ahmet CEYLAN

**Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Yüksek Lisans Tezi, Temmuz 2010
Tez Danışmanları: Yrd. Doç. Dr. Mikail AKBULUT
Doç. Dr. Osman GÜLŞEN**

ÖZET

Bu çalışmanın amacı cpDNA PZR-RFLP ve cpDNA SSR yöntemleri kullanarak Türkiye’de doğal olarak yayılış gösteren farklı bermuda çimi genotiplerinde kloroplast DNA polimorfizminin belirlenmesidir. Bermuda çimi birçok ülkede kamu parkları, evsel alanlar, golf sahaları ve spor sahalarında çim ve mera bitkisi olarak ve ayrıca toprak ıslahında kullanılmaktadır. Çeşitli ploidi seviyelerinden 47 farklı genotiple çalışılmıştır. Bu genotiplerden 40 tanesi Akdeniz bölgesinden toplanan 182 genotip arasından seçilmiş ve 7 tanesi ise Kayseri ve Nevşehir’den toplanmıştır. Farklı genotiplerin kloroplast DNA’larındaki rbcL, TrnHK, 30S, Psb-TrnS ve TrnST bölgeleri, ilgili primerler kullanılarak çoğaltıldıktan sonra EcoRI, TaqI, MseI, DraI, HinIII, BsuRI, MspI, MboI, RsaI ve EcoRV restriksiyon enzimleri ile kesilmiştir. cpDNA PCR-RFLP metodu kullanılarak elde edilen 143 bandtan 53 tanesi polimorfik bulunmuştur (%37). Bu bermuda çimi genotipleri aynı zamanda 10 ccSSR primerleri ile de analiz edilmiştir. Bütün genotipler arasındaki benzerlik cpDNA PCR-RFLP kullanıldığında ortalama 0.88 olup 0.77 ile 1 arasında değişirken, bu değer ccSSR için ortalama 0.75 olup 0.50 ile 1 arasında değişmektedir. Her iki markır sistemi birlikte kullanıldığında UPGMA tarafından üretilen dendrogram bermuda çimi genotiplerini 0.76 benzerlik değeri ile birlikte kümelemiştir. Çalışılan 47 genotip içerisinde 5. genotip hariç tüm diploid genotipler birlikte kümelenmiştir. Bu sonuçlar doğal olarak oluşan bermuda çimi popülasyonlarında kloroplast DNA polimorfizminin düşük olduğunu göstermektedir

Anahtar Kelimeler: Bermuda çimi, kloroplast DNA polimorfizmi, ccSSR

**DETECTION OF CHLOROPLAST DNA POLYMORPHISM IN
BERMUDAGRASS (CYNODON SPP.) SPECIES OF DIFFERENT PLOIDY
LEVEL COLLECTED FROM MEDITERRANEAN REGION OF TÜRKİYE**

Ahmet CEYLAN

Erciyes University, Graduate School of Natural and Applied Sciences

M.Sc.Thesis, July 2010

Thesis Supervisors: Assist. Prof. Dr. Mikail AKBULUT

Assoc. Prof. Dr. Osman GÜLŞEN

ABSTRACT

Main purpose of this study was to detect chloroplast DNA polymorphism by using cpDNA PZR-RFLP and CpDNA SSR in different bermudagrass genotypes. Bermudagrass is a perennial grass which is used for pasture, forage, turf grass, soil stabilization, and remediation. Forty seven bermudagrass genotypes from various ploidy levels were used in this study. Fourty of the genotypes were selected among the 182 genotypes collected from Mediterranean region and seven were collected from Kayseri and Nevşehir. *rbcL*, *TrnHK*, *30S*, *Psb-TrnS* ve *TrnST* regions of chloroplast DNA were amplified by polymerase chain reaction (PCR) using universal chloroplast primer pairs and *EcoRI*, *TaqI*, *MseI*, *DraI*, *Hin1II*, *BsuRI*, *MspI*, *MboI*, *RsaI* ve *EcoRV* enzymes were used for restriction analysis of amplified fragments. Of the 143 scored fragments, 53 were polymorphic (%37) when cpDNA PCR-RFLP method is used. These 47 bermudagrass genotype was also analyzed by using 10 ccSSR primers. Among the 10 primers used for PCR analysis, eight of them produce clear PCR product. Of the 16 scored SSR bands 14 of them were polymorphic (%87). Similarities among all genotypes ranged from 0.77 to 1, with a mean of 0.88 and ranged from 0.50 to 1, with a mean 0.75, when cpDNA PCR-RFLP and ccSSR analysis is used, respectively. The UPGMA analysis clustered bermudagrasses together when both markers are used with similarity value of 0.76. Excluding diploid genotype 5, diploid genotypes (%13) were clustered together in 47 genotypes studied. These results suggest that low level of chloroplast DNA polymorphism is present in naturally occurring bermudagrass populations.

Keywords: Bermuda grass, chloroplast DNA polymorphism, ccSSR

KISALTMA ve SİMGELER

AFLP	: Amplified Fragment Length Polymorphism (Çoğaltılmış Fragment Uzunluk Polimorfizmi)
APS	: Amonyum persülfat
BSA	: Bovine serum albumin
ccSSR	: consensus chloroplast simple sequence repeat (konsensus kloroplast basit dizi tekrarları)
cpDNA	: Kloroplast DNA
CTAB	: Setil 3-Metil Amonyum Bromid
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dH ₂ O	: Distile su
dNTP	: Deoksiribonükleik asit trifosfat
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
gDNA	: Genomik DNA
HCl	: Hidrojen klorür
ISSR	: Internal Simple Sequence Repeats (Basit Dizi Tekrarları Arası)
M	: Molar
MgCl ₂	: Magnezyum klorür
mM	: Milimolar

NaCl	: Sodyum klorür
PAGE	: Poli Akrilamir Jel Elektrforezi (Polyacrylamide Gel Electrophoresis)
PCA	: Temel bileşen analizi (Principal Components Analysis)
PIC	: Polimorfizm bilgi içeriği (Polymorphism information content)
PZR(PCR)	: Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
RAPD	: Random Amplified Polymorphic DNA (Rastgele Çoğaltılmış Polimorfizm DNA)
RE	: Restriksiyon endonükleaz
RFLP	: Restriction Fragment Length Polymorphism (Kesilen Parça Uzunluk Polimorfizmi)
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
TAE	: Tris asetik asit - EDTA
TE	: Tris – EDTA
Tris	: Trisodyum tuzu
T _m	: Çözülme (Melting) sıcaklığı
V	: Volt
UPGMA	: Unweighted pair group method using arithmetic averages (ağırlıksız aritmetik ortalamayı kullanan çift grup metodu)

İÇİNDEKİLER

KABUL ve ONAY	i
TEŞEKKÜR.....	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT.....	iv
KISALTMA ve SİMGELER	v
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLER LİSTESİ	xi
1. BÖLÜM	
GİRİŞ	1
2. BÖLÜM	
GENEL BİLGİLER	4
2.1. Bermuda Çimi.....	4
2.1.1.1. Hibrit Bermuda Çimleri	6
2.1.1.2. Ultra Küçük ‘Bodur’ Hibrit Bermuda çimleri	7
2.1.1.3. Genel Bermuda Çimleri	7
2.1.1.4. Bermuda Çimlerinin Çoğaltılması	8
2.1.1.4.1. Vejetatif Çoğaltılması	8
2.1.1.4.2. Tohumla Çoğaltılması.....	8
2.1.1.5. Toprak ve Çevre Gereksinimleri.....	9
2.1.1.6. Su Gereksinimleri	9
2.1.1.7. Bermuda Çimi Genetiği	9
2.1.1.8. Bermuda Çimi (<i>Cynodon spp.</i>) Taksonomisi	10
2.1.1.9. <i>Poaceae</i> Familyasının Genel Özellikleri	11

2.1.1.10.	Bermuda Çimi (<i>Cynodon spp.</i>) Genel Özellikleri	12
2.2.	Moleküler Markırlar	12
2.2.1.	Moleküler Markır Çeşitleri	12
2.2.2.	Morfolojik Markırlar.....	12
2.2.3.	Biyokimyasal Markırlar	12
2.2.3.1.	DNA Markırları	13
2.2.3.1.1.	RAPD.....	13
2.2.3.1.2.	RFLP	14
2.2.3.1.3.	AFLP.....	14
2.2.3.1.4.	Mikrosatellit DNA Markırları (Basit Dizin Tekrarları).....	15
2.2.3.1.5.	SNP	15
2.2.3.1.6.	SCAR.....	16
2.2.3.1.7.	SRAP	16
2.2.3.1.8.	ISSR.....	16
3.	BÖLÜM	
	MATERYAL VE METOD.....	18
3.1.	Materyal	18
3.1.1.	Bitki Materyali.....	18
3.1.2.	Primerler	22
3.2.	Metod	23
3.2.1.	Bitki Yetiştirilmesi.....	23
3.2.2.	Genomik DNA İzolasyonu	23
3.2.3.	DNA Miktarı ve Temizliği	24
3.2.4.	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR veya PCR)	24
3.2.5.	Restriksiyon Enzimleri	26
3.2.6.	Agaroz Jel Elektroforezi	27

3.2.7.	Poliakrilamit Jel Elektroforezi (PAGE)	27
3.2.8.	Polimorfiz Oranlarının Belirlenmesi.....	27
3.2.9.	Polimorfizmin Hesaplanması.....	28
4. BÖLÜM		
BULGULAR		29
5. BÖLÜM		
TARTIŞMA VE SONUÇ		79
KAYNAKLAR		87
EKLER		93
ÖZGEÇMİŞ		96

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 3.1: Çalışma kapsamında kullanılan çeşitlerin toplanmış olduğu alanlar ve koordinatları.....	19
Tablo 3.2. Bermuda çimi genotiplerinin ploidi seviyeleri	21
Tablo 3.3. Çalışmada kullanılan primerler ve yapışma sıcaklıkları	22
Tablo 3.4: PZR reaksiyonu için gerekli temel bileşenler	24
Tablo 3.5. PZR reaksiyon karışımı için gerekli temel bileşenler.....	25
Tablo 3.6. PZR Döngüsü cpDNA PZR-RFLP primerleri için denatürasyon, annealing ve extension aşamaları	25
Tablo 3.7. PZR Döngüsü ccSSR primerleri için denatürasyon, annealing ve extension aşamaları	26
Tablo 3.8. PZR reaksiyonu için gerekli temel bileşenler.....	26
Tablo 4.1. cpDNA PZR-RFLP analizi sonucu oluşan bant profilleri, monomorfik ve polimorfik bant sayıları ile % polimorfizm değerleri.....	30
Tablo 4.2. ccSSR analizi sonucu oluşan bant profilleri, monomorfik ve polimorfik bant sayıları ile % polimorfizm değerleri.....	32
Tablo 4.3. Restriksiyon enzimlerinin her bir primerdeki kesmiş olduğu bant sayıları	33
Tablo 4.4. cpDNA ve ccSSR primerleri PZR analizi sonucu oluşturdukları ürün boyutu.....	34
Tablo 4.5. cpDNA PZR-RFLP profilinin DICE metoduna göre yapılan benzerlik matriksi	71
Tablo 4.6. ccSSR profilinin DICE metoduna göre yapılan benzerlik matriksi .74	
Tablo 4.7. cpDNA PZR-RFLP ve ccSSR profillerinin birlikte analizi ve DICE metoduna göre yapılan benzerlik matriksi	77

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1.	Erciyes Üniversitesi Ziraat Fakültesi Araştırma Birimi arazisinde yetiştirilen bermuda çiminin genel görünüşü	4
Şekil 2.2.	Erciyes Üniversitesi Ziraat Fakültesi Araştırma Birimi arazisinde yetiştirilen bermuda çiminin genel görünüşü	5
Şekil 2.3.	Erciyes Üniversitesi Ziraat Fakültesi Araştırma Birimi arazisinde yetiştirilen bermuda çiminin genel görünüşü	5
Şekil 3.1.	Türkiye’de Akdeniz sahili boyunca uzanan Toros dağlarının güney kesimlerindeki bermuda çiminin toplandığı bölgeler	18
Şekil 4.1.	TrnHK (f-r) primeri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerinin agaroz jeldeki bant profilleri.	35
Şekil 4.2.	TrnHK (f-r) primeri PZR ürününün <i>TaqI</i> enzimi ile kesimi sonucu agaroz jeldeki bant profilleri.	35
Şekil 4.3.	TrnHK (f-r) primeri PZR ürününün <i>MseI</i> enzimi ile kesimi sonucu agaroz jeldeki bant profilleri.	36
Şekil 4.4.	TrnHK (f-r) primeri PZR ürününün <i>DraI</i> enzimi ile kesimi sonucu agaroz jeldeki bant profilleri	36
Şekil 4.5.	TrnHK (f-r) primeri PZR ürününün <i>HinIII</i> enzimi ile kesimi sonucu agaroz jeldeki bant profilleri	37
Şekil 4.6.	TrnHK (f-r) primeri PZR ürününün <i>BsuRI</i> enzimi ile kesimi sonucu agaroz jeldeki bant profilleri	37
Şekil 4.7.	TrnHK (f-r) primeri PZR ürününün <i>MspI</i> enzimi ile kesimi sonucu agaroz jeldeki bant profilleri	38
Şekil 4.8.	TrnHK (f-r) primeri PZR ürününün <i>EcoRI</i> enzimi ile kesimi sonucu agaroz jeldeki bant profilleri	38

Şekil 4.9. TrnHK (f-r) primeri PZR ürününün <i>MboI</i> enzimi ile kesimi sonucu agaroz jeldeki bant profilleri	39
Şekil 4.10. TrnHK (f-r) primeri PZR ürününün <i>EcoRV</i> enzimi ile kesimi sonucu agaroz jeldeki bant profilleri	39
Şekil 4.11. TrnHK (f-r) primeri PZR ürününün <i>RsaI</i> enzimi ile kesimi sonucu agaroz jeldeki bant profilleri	40
Şekil 4.12. rbcL (f-r) primeri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerinin agaroz jeldeki bant profilleri	40
Şekil 4.13. rbcL (f-r) primeri PZR ürününün <i>BsuRI</i> enzimi ile kesimi sonucu agaroz jeldeki bant profilleri	41
Şekil 4.14. rbcL (f-r) primeri PZR ürününün <i>EcoRI</i> enzimi ile kesimi sonucu agaroz jeldeki bant profilleri	41
Şekil 4.15. rbcL (f-r) primeri PZR ürününün <i>MseI</i> enzimi ile kesimi sonucu agaroz jeldeki bant profilleri	42
Şekil 4.16. rbcL (f-r) primeri PZR ürününün <i>TaqI</i> enzimi ile kesimi sonucu agaroz jeldeki bant profilleri	42
Şekil 4.17. rbcL (f-r) primeri PZR ürününün <i>DraI</i> enzimi ile kesimi sonucu agaroz jeldeki bant profilleri	43
Şekil 4.18. rbcL (f-r) primeri PZR ürününün <i>HinIII</i> enzimi ile kesimi sonucu agaroz jeldeki bant profilleri	43
Şekil 4.19. rbcL (f-r) primeri PZR ürününün <i>MboI</i> enzimi ile kesimi sonucu agaroz jeldeki bant profilleri	44
Şekil 4.20. rbcL (f-r) primeri PZR ürününün <i>RsaI</i> enzimi ile kesimi sonucu agaroz jeldeki bant profilleri	44
Şekil 4.21. rbcL (f-r) primeri PZR ürününün <i>MspI</i> enzimi ile kesimi sonucu agaroz jeldeki bant profilleri	45

Şekil 4.22. rbcL (f-r) primeri PZR ürününün <i>EcoRV</i> enzimi ile kesimi sonucu agaroz jeldeki bant profilleri	45
Şekil 4.23. TrnST (f-r) primeri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerinin agaroz jeldeki bant profilleri	46
Şekil 4.24. TrnST (f-r) primeri PZR ürününün <i>DraI</i> enzimi ile kesimi sonucu agaroz jeldeki bant profilleri	46
Şekil 4.25. TrnST (f-r) primeri PZR ürününün <i>MspI</i> enzimi ile kesimi sonucu agaroz jeldeki bant profilleri	47
Şekil 4.26. TrnST (f-r) primeri PZR ürününün <i>TaqI</i> enzimi ile kesimi sonucu agaroz jeldeki bant profilleri	47
Şekil 4.27. TrnST (f-r) primeri PZR ürününün <i>BsuRI</i> enzimi ile kesimi sonucu agaroz jeldeki bant profilleri	48
Şekil 4.28. TrnST (f-r) primeri PZR ürününün <i>EcoRI</i> enzimi ile kesimi sonucu agaroz jeldeki bant profilleri	48
Şekil 4.29. TrnST (f-r) primeri PZR ürününün <i>EcoRV</i> enzimi ile kesimi sonucu agaroz jeldeki bant profilleri	49
Şekil 4.30. TrnST (f-r) primeri PZR ürününün <i>HinIII</i> enzimi ile kesimi sonucu agaroz jeldeki bant profilleri	49
Şekil 4.31. TrnST (f-r) primeri PZR ürününün <i>MseI</i> enzimi ile kesimi sonucu agaroz jeldeki bant profilleri	50
Şekil 4.32. TrnST (f-r) primeri PZR ürününün <i>MboI</i> enzimi ile kesimi sonucu agaroz jeldeki bant profilleri	50
Şekil 4.33. TrnST (f-r) primeri PZR ürününün <i>RsaI</i> enzimi ile kesimi sonucu agaroz jeldeki bant profilleri	51
Şekil 4.34. Psb-TrnS (f-r) primeri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerinin agaroz jeldeki bant profilleri	51

Şekil 4.35. Psb-TrnS (f-r) primeri PZR ürününün <i>MseI</i> enzimi ile kesimi sonucu agaroz jeldeki bant profilleri	52
Şekil 4.36. Psb-TrnS (f-r) primeri PZR ürününün <i>TaqI</i> enzimi ile kesimi sonucu agaroz jeldeki bant profilleri	52
Şekil 4.37. Psb-TrnS (f-r) primeri PZR ürününün <i>MspI</i> enzimi ile kesimi sonucu agaroz jeldeki bant profilleri	53
Şekil 4.38. Psb-TrnS (f-r) primeri PZR ürününün <i>EcoRI</i> enzimi ile kesimi sonucu agaroz jeldeki bant profilleri	53
Şekil 4.39. Psb-TrnS (f-r) primeri PZR ürününün <i>HinIII</i> enzimi ile kesimi sonucu agaroz jeldeki bant profilleri	54
Şekil 4.40. Psb-TrnS (f-r) primeri PZR ürününün <i>BsuRI</i> enzimi ile kesimi sonucu agaroz jeldeki bant profilleri	54
Şekil 4.41. Psb-TrnS (f-r) primeri PZR ürününün <i>EcoRV</i> enzimi ile kesimi sonucu agaroz jeldeki bant profilleri	55
Şekil 4.42. Psb-TrnS (f-r) primeri PZR ürününün <i>MboI</i> enzimi ile kesimi sonucu agaroz jeldeki bant profilleri	55
Şekil 4.43. Psb-TrnS (f-r) primeri PZR ürününün <i>DraI</i> enzimi ile kesimi sonucu agaroz jeldeki bant profilleri	56
Şekil 4.44. Psb-TrnS (f-r) primeri PZR ürününün <i>RsaI</i> enzimi ile kesimi sonucu agaroz jeldeki bant profilleri	56
Şekil 4.45. 30S (f-r) primeri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerinin agaroz jeldeki bant profilleri	57
Şekil 4.46. Psb-TrnS (f-r) primeri PZR ürününün <i>RsaI</i> enzimi ile kesimi sonucu agaroz jeldeki bant profilleri	57
Şekil 4.47. 30S (f-r) primeri PZR ürününün <i>BsuRI</i> enzimi ile kesimi sonucu agaroz jeldeki bant profilleri	58

Şekil 4.48. 30S (f-r) primeri PZR ürününün <i>MspI</i> enzimi ile kesimi sonucu agaroz jeldeki bant profilleri	58
Şekil 4.49. 30S (f-r) primeri PZR ürününün <i>HinIII</i> enzimi ile kesimi sonucu agaroz jeldeki bant profilleri	59
Şekil 4.50. Şekil 4.50: 30S (f-r) primeri PZR ürününün <i>MseI</i> enzimi ile kesimi sonucu agaroz jeldeki bant profilleri	59
Şekil 4.51. 30S (f-r) primeri PZR ürününün <i>TaqI</i> enzimi ile kesimi sonucu agaroz jeldeki bant profilleri	60
Şekil 4.52. 30S (f-r) primeri PZR ürününün <i>MboI</i> enzimi ile kesimi sonucu agaroz jeldeki bant profilleri	60
Şekil 4.53. 30S (f-r) primeri PZR ürününün <i>EcoRV</i> enzimi ile kesimi sonucu agaroz jeldeki bant profilleri	61
Şekil 4.54. 30S (f-r) primeri PZR ürününün <i>DraI</i> enzimi ile kesimi sonucu agaroz jeldeki bant profilleri	61
Şekil 4.55. 30S (f-r) primeri PZR ürününün <i>RsaI</i> enzimi ile kesimi sonucu agaroz jeldeki bant profilleri	62
Şekil 4.56. ccSSR-5(f-r) primer çiftiyle elde edilen allel profili sonucu elde edilen bant profilleri	63
Şekil 4.57. ccSSR-5(f-r) primer çiftiyle elde edilen allel profili sonucu elde edilen bant profilleri.	63
Şekil 4.58. ccSSR-5(f-r) primer çiftiyle elde edilen allel profili sonucu elde edilen bant profilleri	64
Şekil 4.59. ccSSR-12(f-r) primer çiftiyle elde edilen allel profili sonucu elde edilen bant profilleri	64
Şekil 4.60. ccSSR-12(f-r) primer çiftiyle elde edilen allel profili sonucu elde edilen bant profilleri	65

Şekil 4.61. ccSSR-12(f-r) primer çiftiyle elde edilen allel profili sonucu elde edilen bant profilleri	65
Şekil 4.62. ccSSR-19(f-r) primer çiftiyle elde edilen allel profili sonucu elde edilen bant profilleri	66
Şekil 4.63. ccSSR-19(f-r) primer çiftiyle elde edilen allel profili sonucu elde edilen bant profilleri	66
Şekil 4.64. ccSSR-19(f-r) primer çiftiyle elde edilen allel profili sonucu elde edilen bant profilleri	67
Şekil 4.65. ccSSR-22(f-r) primer çiftiyle elde edilen allel profili sonucu elde edilen bant profilleri	67
Şekil 4.66. ccSSR-22(f-r) primer çiftiyle elde edilen allel profili sonucu elde edilen bant profilleri	68
Şekil 4.67. ccSSR-22(f-r) primer çiftiyle elde edilen allel profili sonucu elde edilen bant profilleri	68
Şekil 4.68. 47 bermuda çiminde 5 cpDNA PCR-RFLP ile elde edilen 53 polimorfik ve 90 monomorfik bandın analizine göre oluşturulan UPGMA dendogramı.....	70
Şekil 4.69. 47 bermuda çiminde 8 ccSSR primeriyle elde edilen 14 polimorfik 2 monomorfik bandın analizine göre elde edilen UPGMA dendogramı	73
Şekil 4.70. 47 bermuda çiminde cpDNA PCR-RFLP ve ccSSR yöntemi kullanılarak elde edilen bandların birlikte analizi ile oluşturulan UPGMA dendogramı.....	76
Şekil 4.71. cpDNA PZR-RFLP ve ccSSR markırlarına dayalı genetik benzerliklerin temel bileşen analiziyle farklı ploidi seviyelerinden 47 genotip arasındaki ilişkinin gösterilmesi	78

1. BÖLÜM

GİRİŞ

Bermuda çimi (*Cynodon spp.*), Dünya'nın tropikal ve subtropikal bölgelerinde doğal olarak bulunan, mera alanları, kamu parkları, toprak stabilizasyonu ve evsel alanlarda kullanılan çok yıllık bir bitkidir [1]. Bermuda çimi, *Cynodon* cinsi'nin bir çok türünü ifade etmek için kullanılan ortak bir isimdir. *Cynodonteae* takımı, *Chloridinae* alt takımı, *Graminae* (*Poaceae*) familyası ve *Chloridoideae* alt familyası üyesidir [2].

Genellikle gelişimi hızlı olan bu bitkiler, çimen formunda bulunur ve Akdeniz bölgeleri boyunca yayılış gösterirler [3, 4]. Genellikle kozmopolit bir yayılış gösteren bermuda çimi, morfolojik olarak çeşitli varyasyonlara sahiptir. Golf sahalarında kullanılması için dayanıklı türler yetiştirilmiştir. Taksonların 45°N paraleli ve 45°S paraleli arasındaki tüm kıta ve adalar boyunca ve Avrupa'da yaklaşık 53°N paralelinde bulunduğu bilinmektedir. Harlan ve ark. (1969), tarafından yapılan biyosistematik çalışmalarda elde edilen kanıtlara göre Pakistanın batısından Türkiye'ye kadar olan geniş bir coğrafik bölgenin taksonların evrimsel aktivite merkezi olduğunu göstermiştir [5].

Seçkin bermuda çimi kültürleri, parklar, atletizm sahası ve golf sahası çimi gibi bir çok amaç için kullanılır. Bermuda çimi aynı zamanda mezarlıklarda, yol kenarları gibi benzer alanlarda da kullanılır [6].

Bermuda çimi $x=9$ temel kromozom sayısına sahiptir, nükleer DNA içerikleri temel alınarak, genotipleri diploid, triploid, tetraploid, pentaploid ve hekzaploid olarak 5 farklı ploidi seviyelerinde gruplandırılır [7, 8, 9, 10]. Cinsin diploid, triploid, tetraploid, pentaploid ve hekzaploid olan ploidi serileri morfolojik benzerlikleri oluşturur [11]. *Cynodon* cinsinin genom kompozisyonu geniş çapta bilinmemektedir. Autoploid olduğu düşünülür [12]. Intra ve inter ploidi seviyeleri çaprazlanırsa, triploidlerin dışında, canlı tohumlar üretebilirler [13]. En yaygın ploidi seviyesi tetraploiddir. Türkiyede genellikle triploid, tetraploid, pentaploid ve hekzaploidlerin yanı sıra diploid genotiplerin bulunduğu da tespit edilmiştir [11, 14].

Kloroplast DNA, kalıtımla klonlanan yüksek korunumlu sitoplazmik moleküldür. Farklı poliploid taksonlar arasındaki filogenetik ilişkiyi ve polimorfizmi kanıtlamak için güçlü bir araçtır [15, 16, 17, 18]. Kloroplast DNA (cpDNA) dizileri bitkide filogenetik çalışmalar için kullanılan ana kaynaklardan biridir. İlk çalışmaların çoğu yüksek seviyedeki taksonlar arasında filogenetik ilişkiyi aydınlatmak için kodlanan gen bölgeleri üzerine odaklanmıştır [19]. Oysa muhtemelen kodlanmayan bölgeler daha az fonksiyonel sınırlara sahip olduğu için kodlanan bölgelerden daha çok varyasyon göstermektedir. [20].

Angiospermilerin kloroplast DNA'sı çoğunlukla maternal kalıtım gösterir [21]. Kloroplast genomu bitkilerdeki moleküler evrim ve sistematik çalışmalarının odak noktası olmuştur [22]. Total genomun %0.1'den az bir kısmını oluşturmaya rağmen kloroplasta odaklanmanın bir çok nedeni vardır. Bunların ilki cpDNA'sı total hücresel DNA'sının oldukça büyük miktarını oluşturur ve bu da kloroplast DNA genomunun erken moleküler karakterizasyonunu kolaylaştırmıştır. İkincisi kloroplast DNA'sının konservatif oranda nükleotit yer değişimine sahip olması ve moleküler evriminde düşük oranda olması onu aileye üstü seviyede bitki filogenetik ilişkileri çalışmasında ideal kılmıştır. Çünkü bitki ilişkileri evrimin derin seviyelerinde çok fazla çelişkili olduğundan kloroplast DNA verileri bitki filogenilerinin yeniden yapılandırılmasında önemli bir araçtır. Bu amaç kloroplast DNA'sı tarafından kodlanan genlerin bitki filogeni çalışmalarında çok fazla miktarda kullanılmalarından doğmuştur. Sonuç olarak bitki moleküler evrimindeki çalışmaların çoğu moleküler sistematikteki problemler üzerine odaklanmıştır [23].

Hem kloroplast DNA hem de mitokondrial DNA, nükleer DNA'dan daha düşük mutasyon oranına sahip olduğundan taksonomik çalışmalar için nükleer DNA'dan daha uygundur [24].

Moleküler markırlar, genetik farklılıkların analizi, germplasm organizasyonu ve genetik benzerliklerin belirlenmesinde kullanılır. Kloroplast genomundan üretilen markırlar yüksek korunumlu olmasına karşın nükleer kökenli markırlarda korunum düşüktür. Kloroplast DNA (cpDNA)'dan geliştirilen markırlar çeşitli sistematik seviyelerde taksonomik ve filogenetik ilişkilerin çalışılmasında daha uygundur [25].

Basit dizi tekrarları (SSR) DNA polimorfizmi veya mikrosatellit markırlar, ökaryotik genomlarda bulunan nükleotid tekrar dizileridir. SSR'lar ilk olarak memeli genomunda bulunmuştur [26]. SSR'ın tanımlanması, SSR tekrar ünitesine komşu olan alanları kuvvetlendiren, spesifik primerlerin kullanılarak PZR amplifikasyonu ile yapılmıştır. SSR DNA polimorfizmi farklı bireylerde tekrar birimlerinin sayısındaki değişiklikten kaynaklanır [27]. SSR markırları gen haritalama ve seleksiyon başta olmak üzere bitki genomu ile ilgili çalışmalarda kullanılır [28, 29]. SSR markır sistemindeki, multiallellik, kodominantlık ve kolay PZR uygulaması DNA temelli diğer markır sistemlerinden daha güçlüdür [30]. Bununla birlikte lokus spesifik primerler dizayn etmek için kullanılan SSR markırların izolasyonu zaman ve iş gücü gerektirir. Bir tür için uygun olan SSR markırları diğer yakın türlerdeki gen bölgeleri ve polimorfizmi tanımlamak içinde kullanılır [31].

Gen havuzları arasında Türkiye'nin de bulunduğu bermuda çiminin genetik yapısı, çeşitliliği ve türler arası ilişkileri konu edinen fazla çalışma yoktur. Gülşen ve ark. (2009) çekirdek markırları kullanarak bermuda çimi genomunun çeşitliliğini ortaya koymuş olmalarına rağmen kloroplast DNA markırlarıyla ilgili çalışma yapılmamıştır. Kloroplast DNA'nın maternal kalıtım göstermesi, nükleer DNA ya göre daha az mutasyon oranına sahip olması nedeniyle kloroplast DNA'sının bermuda çimleri arasındaki ilişkiyi açıklamak için çekirdek markırlarından elde edilen sonuçlara katkıda bulunacağı düşünüldükçe cpDNA PZR-RFLP ve ccSSR markırlarıyla kloroplast DNA polimorfizminin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. BÖLÜM

GENEL BİLGİLER

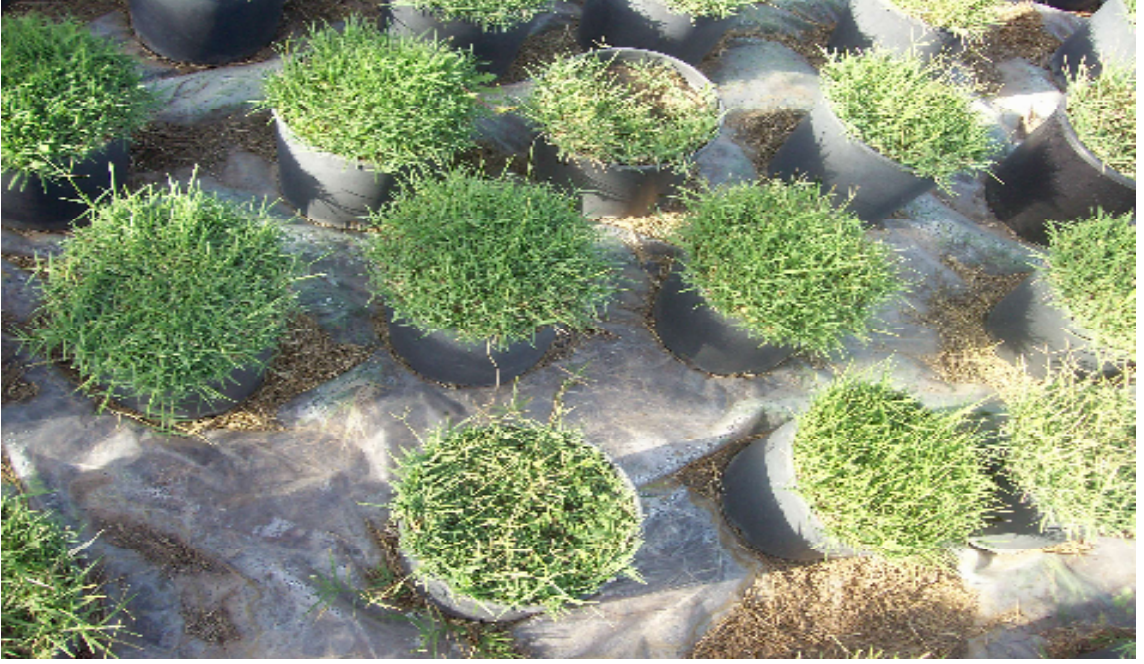
2.1. Bermuda Çimi

2.1.1 Bermuda Çimi Hakkında Genel Bilgi

Bermuda çimleri (*Cynodon* türleri) tropikal ve subtropikal bölgelerde yaygın olarak bulunan çim bitkisiidir. Bermuda çiminin ana vatanı Afrika'dır. Çok yoğun topluluklar halinde yavaş büyüyen sıcaklığa ve kuraklığa toleranslı bitkilerdir. Bermuda çimleri hem stolonlu hem de rizomlu organlarıyla yayılış gösterir ve hızlı gelişir. Gölge alanda gelişme hızı çok düşüktür, en iyi gelişimi güneşli koşullarda gösterir. Doğal olarak bulunan bermuda çimlerinin yanı sıra hibrit formları da vardır [32].



Şekil 2.1. Erciyes Üniversitesi Ziraat Fakültesi Araştırma Birimi arazisinde yetiştirilen bermuda çiminin genel görünüşü



Şekil 2.2. Erciyes Üniversitesi Ziraat Fakültesi Araştırma Birimi arazisinde yetiştirilen bermuda çiminin genel görünüşü



Şekil 2.3. Erciyes Üniversitesi Ziraat Fakültesi Araştırma Birimi arazisinde yetiştirilen bermuda çiminin genel görünüşü

2.1.1.1. Hibrit Bermuda Çimleri

Hibrit bermuda çimleri *Cynodon dactylon* ve *Cynodon transvaalensis*'in türler arası çaprazlanması ile meydana gelir. Hibrit formlar verimli tohumlar üretemez, filizlenerek, stolonlarıyla veya eşeysiz olarak çoğalır. Hibrit bermuda çimleri kalite açısından daha iyidir. Ayrıca trafik, sıcaklık ve kuraklık streslerine de dayanıklıdır. Hibrit bermuda çimleri 2.54 cm'den kısa olduğu durumda biçilmeye dayanıklıdır ve pürüzsüz tohumlar üretir. Fakat bütün bunların yanında maliyeti yüksektir ve daha yoğun bir bakım ister.

İlk hibrit bermuda çimi 1962'de Hawai'de belirlenen 'Sunturf'tur ve geniş oranda kabul görmüş ve çoğu durumlarda tercih edilen yaygın bermuda çimlerinin yerini almıştır. Daha sonra diğer yeni hibrit bermuda çimi kültürleri üretilmiş ve 'Sunturf'un yerini almıştır. Bermuda çimi hibritlerinden bazıları aşağıda verilmiştir.

Celebration, koyu yeşil renkte, ince dokulu, agresif, trafiğe ve kuraklığa karşı yüksek toleransı olan kültürlerdir. Araştırmalar Celebration çeşidinin toleransı diğer hibrit bermuda çimlerine göre gölgeye daha toleranslı olduğunu göstermiştir.

Tifway, koyu yeşil renkte, ince dokulu, trafik toleransı son derece yüksek olan kültürdür. Tohum ve polen üretmezler. Tifway en çok golf atletizm, sahalarında ve çimenlik alanlarda kullanılır. Tifgreen den daha dirençlidir ve daha hızlı yayılım gösterir. En son seleksiyonu TifwayII ,Tifway ile aynı karakteristik özelliklere sahiptir.

Tifgreen, normal yeşillikte, ince dokulu bermuda çimleridir, kök yoğunluğu çok, büyümesi ise yavaştır. Tifgreen birkaç sarımsı yeşil tohum başı üretmesine rağmen verimli tohum üretemez. Tifgreen atletizm ve golf sahalarında kullanılmasına karşın Tifway'den daha fazla bakım gerektirir ve nematodların ısırmasına karşı duyarlıdır.

Tifdwarf, koyu rengi ve yaprakları daha kısa olmasının dışında 'Tifgreen'e benzerdir. Bu kültür koyu yeşil renginde olduğundan dolayı golf sahalarını kaplamada düzenli olarak kullanılır.

Tifsport, Tifgreen ve Tifway II'ye benzer kalitededir. Tifsport sık biçilmeye karşı toleranslıdır. Diğer hibrit formları ile karşılaştırıldığında soğuga toleransı yüksektir. Son

zamanlarda bitki ıslahı çalışmalarıyla soğuğa karşı ‘Tifsport’ dan daha iyi hibrit bermuda çimi üretilmeye çalışılmaktadır [32].

2.1.1.2. Ultra Küçük ‘Bodur’ Hibrit Bermuda çimleri

Tifgreen ve Tifdwarf gibi golf sahalarında kullanılan eski hibrit bermuda çimlerinin yerini ‘bodur’ hibrit bermuda çimi kültürleri almıştır. Hibrit bermuda çiminin değiştirilmesi ile elde edilen bodur bermuda çimleri eski seleksiyonları ile karşılaştırıldığında çim kalitesi bir hayli geliştirilmiştir. bodurlar’ın internodyum uzunluğu daha küçüktür ve kök yoğunluğu fazladır. Bodur bermuda çimlerinden bazıları aşağıda verilmiştir.

FloraDwarf Tifdwarf ile benzer özellikler gösterir ancak yaprak ayası daha incedir. Kök yoğunluğu daha fazla, internod boşlukları daha kısa ve büyümesi yavaştır.

MiniVerde Tifdrawf’den türetilmiştir, yaprakları daha incedir, lateral büyüme oranı yüksek ve kökü iyi gelişmiştir.

TifEagle son derece iyi gelişmiş kök sistemine sahip, yaprak dokusu ince olan koyu renkli yaprakları vardır. TifEagle, Tifway II’nin kobalt radyasyonu ile ortaya çıkarılmış bir mutanttır. Golf sahalarını kaplama amacıyla kullanılır. Gölgeye karşı düşük toleranslıdır.

2.1.1.3. Genel Bermuda Çimleri

Genel bermuda çimleri sıklıkla ev çimenleri, atletizm sahaları, golf sahaları ve diğer kamusal alanlarda kullanılır. Tohumlar ile üreyebilir. Orta kalınlıkta yaprak dokusuna sahiptir ve 2,54 cm den daha kısa biçildiği zaman yaşayamazlar. Bitki ıslah çalışmaları yaygın bermuda çimleri kültürlerinin gelişmesine yol açmıştır. Seleksiyonlarla soğuğa karşı olan toleransı artırılmış, yeşil rengi, yaprak dokusu, kök yoğunluğu geliştirilmiştir. Çimlenmesi iklimsel koşullara bağlı olarak 5 ile 14 gün arasında gerçekleşir. Genel bermuda çimlerinden bazıları aşağıda verilmiştir.

Princess-77 koyu yeşil renkli, ince dokulu ve gölge toleransı yüksek olup tohumları yüksek kaliteye sahiptir. Princess-77, Riveria ve Tifway gibi çeşitlerden daha az trafik toleransına sahiptir.

Riveria, koyu yeşilliği orta düzeydedir, dokusu ince, Trafik toleransı yüksek olan bitkidir. Riveria, Tifway gibi trafik toleransı gösterir.

Savannah, koyu yeşilliği orta düzeydedir, dokusu ince, yavaş büyüyen ve kök yoğunluğu gelişmiş bitkilerdir.

Southern Star, koyu yeşil renkte , çim kalitesi oldukça yüksek olan bitkilerdir. Diğer bermuda çimleri ile karşılaştırıldığında gölge toleransı oldukça yüksektir.

Transcontinental, koyu yeşildir, gelişimi yavaş ve kök yoğunluğu oldukça yüksektir. Kuraklık ve sıcaklığa toleransı oldukça yüksektir.

Yukon, yüksek kök yoğunluğuna sahip olan koyu yeşil renkteki çeşitlerdir. Kuraklığa karşı yüksek toleranslıdır [32].

2.1.1.4. Bermuda Çimlerinin Çoğaltılması

2.1.1.4.1. Vejetatif Çoğaltılması

Hibrit bermuda çimleri genellikle filizlenme yoluyla ve stolonlarıyla yayılırlar. Filizleme için bitkinin vejetatif kısımları olan kökler ve gövdelerini kullanırlar. Stolon ile yayılmak için genellikle toprak üstü organlarını kullanır. Filizler ve stolonlar genellikle hasat edilir. Filizin boyu 15,2-20.3 cm uzunluğunda olmalıdır (en az iki nod bulunması gerekir). Taze hasat edilen filiz ve stolonlar uzun süre canlılığını devam ettirebilmesine karşın ideal olarak 48 saat içerisinde dikilmeleri gerekir. Bitki dikimi esnasında ısı birikimini önlemek için topraktan hafif yukarda tutulur. Bitki ekildikten sonra hemen sulanır, 6 ile 8 hafta içerisinde ekilen alanı kaplar [32].

2.1.1.4.2. Tohumla Çoğaltılması

Genel bermuda çimleri tohum yoluyla da çoğaltılabilir. Tohumla çoğalma vejetatif üremeden daha ucuz olabilmesine karşın tohumla üretilen bermuda çimleri, hibrit bermuda çimlerinin kalite seviyesine ulaşamazlar. Tohumla çoğalmada, tohumun saçılması, ışık ve toprak şartları büyük önem arzeder. Tohumun çimlenmesi 5-14 günü bulabilir. Normal şartlar altında 4 ile 6 hafta içerisinde ekilen alanın tamamını kaplar [32].

2.1.1.5. Toprak ve Çevre Gereksinimleri

Bermuda çimlerinin tamamı toprak tiplerine karşı oldukça toleranslıdır, fakat onlar en iyi pH'ı 6 ile 7 arasında olan topraklarda gelişim gösterirler. pH 7.5 tan daha üst seviyelere çıkarsa beslenmesi engellenir. Bermuda çimleri en iyi gelişim gösterebilmesi için güneşe gereksinim duyar. Günlük minimum 6 saat güneş alması gerekir. Gölge ortamlar fotosentezi sınırlayarak büyümeyi yavaşlatır. Gölgede gelişim gösteren bermuda çimlerinin gelişimi zayıflar, yaprakları solgunlaşır ve kökleri az gelişir. Bermuda çimleri'nin en iyi gelişim gösterdiği ortam sıcaklığı 30-38°C arasındır. Toprak sıcaklığı ise 24°C ile 35°C arası olması gerekir. Sıcaklık 13°C altına düştüğünde bitki dormant hale geçer [32].

2.1.1.6. Su Gereksinimleri

Bermuda çimlerinin su gereksinimleri oldukça düşük olmasına rağmen haftada bir kez sulanması gereklidir. İklim koşulları ve toprak tipide haftalık su ihtiyacını önemli ölçüde etkilemektedir. Sabahın erken saatlerinde sulanmalıdır. Sulandıktan sonra yaprakların gün boyu nemli kalması hastalıkların bulaşma olasılığını artırır [32].

2.1.1.7. Bermuda Çimi Genetiği

Bermuda çimi $x=9$ temel kromozom sayısına sahiptir, diploidten hekzaploide kadar olan ploid seviyeleri rapor edilmiştir [7, 8, 9, 10]. Cinsin temel kromozom sayısı $x=9$ olan diploid, triploid, tetraploid, pentaploid ve hekzaploid olan ploid serileri morfolojik benzerlikleri oluşturur [11]. *Cynodon* cinsinin genom kompozisyonu çok iyi bilinmemekte ve otoploid olduğu düşünülmektedir [12]. Intra ve inter ploid seviyeleri çaprazlanırsa, çoğu triploidler hariç, canlı tohumlarda üretebilir [13].

2.1.1.8. Bermuda Çimi (*Cynodon spp.*) Taksonomisi

Cynodon cinsi'nin revizyonu Taliefferro (2003) tarafından yapılmıştır ve Türkiye florasının 9. cildinde bulunmaktadır. Harlan'ın (1970) sistematik çalışması ise en fazla kullanılan sistem olup 9 tür ve 10 varyeteyi içermektedir.

Alem:.....*Plantae*↔Bitkiler

Alt Alem:..... *Tracheobionta* ↔Damarlı Bitkiler

Üst Şube:..... *Spermatophyta* ↔Tohumlu Bitkiler

Şube:..... *Magnoliophyta* ↔Çiçekli Bitkiler

Sınıf:..... *Liliopsida*↔Monokotiller

Alt Sınıf:.....*Commelinidae*

Takım:.....*Poales*

Familya:.....*Poaceae*

Cins:.....*Cynodon* L.

-*Cynodon aethiopicus* Clayton et Harlan

-*Cynodon arcuatus* J. S. Presl ex C. B. Presl

-*Cynodon barberi* Rang. et Tad

-*Cynodon dactylon* (L.) Pers.

var. *dactylon*

var. *afghanicus* Harlan et de Wet

var. *aridus* Harlan et de Wet

var. *coursii* (A. Camus) Harlan et de Wet

var. *elegans* Rendle

var. *polevansii* (Stent) Harlan et de Wet

-*Cynodon incompletus* Nees

var. *incompletus*

var. *hirsutus* (Stent) de Wet et Harlan

-*Cynodon nlemfuensis* Vanderyst

var. *nlemfuensis*

var. *robustus* Clayton et Harlan

-*Cynodon plectostachus* (K. Shum.) Pilger

-*Cynodon transvaalensis* Burt-Davya

-*Cynodon x magennisii* Hurcombe

2.1.1.9. *Poaceae* Familyasının Genel Özellikleri

Çayır ve meraların önemli bitkileri bu familyaya aittir. Kozmoploit olan bu familya 9000 kadar tür içermektedir. Genellikle tek veya çok yıllık otsular, nadiren çalılar ve ağaçlardan oluşan bir familyadır. Kök yapısı fibrilli, rizomlu veya değildir. Gövde dik, yatık, yükselici veya sürünücü tiptedir. Gövdenin içi boş olup sadece nodyumlarda doludur. Yapraklar gövde üzerinde iki sıralı, her nodyumda tek, kını gövdeyi sarıcı, ligulalı ve genellikle paralel damarlı ve çoğunlukla şeritsidir. Çiçekler erdişi, bazen tek eşeyli spikula adı verilen özel yapılarda toplanmıştır. Spikulalar spika, rasemus veya panikula durumlarındadır. Her bir spikula eksenin dibinde brakteye karşılık gelen 2 gluma mevcuttur (alt ve üst gluma). Spikula ekseninde bulunan çiçekler glumella adı verilen iki brakteolün koltuğundan çıkarlar. Stamenler genellikle 3, nadiren çok sayıdadır (1-6). Ovaryum üst durumlu, 3 karpelli, 1 ovüllüdür. Stigma 2 tanedir ve tüylüdür. Meyva nişasta bakımından zengin bir karyopsis, nadiren fındıksı ve bakka tipindedir [33].

2.1.1.10. Bermuda Çimi (*Cynodon spp.*) Genel Özellikleri

Sürünücü, stolonlu çok yıllık otsu bir bitkidir. Çiçekler gövdenin ucunda 3-5 adet, digitat olarak düzenlenmiş tek taraflı spikalarda bulunur. Spikulalar yandan basık ve bir çiçeklidir. İnfloresans terminal durumdadır. Gulumalar zarsı omurgalı ve bir damarlıdır. Ülkemizde bahçe ve tarlalarda geniş yayılış alanı vardır. Karyopsis meyve silindirik veya elipsoidtir [34]. Cinsin üyeleri çayır, yem, çimen, toprak stabilizasyonu ve zenginleştirilmesinde kullanılır [35]. Bermuda çimi ev ve kamusal alanlarda, parklarda, atletizm sahası, golf sahalarında, mezarlıklarda, yol kenarları ve benzer yerleri kaplamak için kullanılır [1].

2.2. Moleküler Markırlar

Moleküler markır ile; genomda herhangi bir gen bölgesi ya da gen bölgesi ile ilişkili DNA parçası temsil edilmektedir. Son yıllarda moleküler genetik alanındaki gelişmelere paralel olarak moleküler markır (belirteç) çeşitlerinin de artması genom analizlerinde ve bitki genetiği çalışmalarında devrim niteliğinde gelişmelere yol açmıştır. Moleküler markır yöntemleri DNA molekülündeki polimorfik bölgelerin çoğaltımındaki farklılığın saptanması amacıyla çeşitli tipteki primerlerin ve Polimer Zincir Reaksiyonu metodunun kullanımına dayanır [36].

2.2.1. Moleküler Markır Çeşitleri

2.2.2. Morfolojik Markırlar

Morfolojik özellikleri tek genle kontrol edilebilir ve genetik markır olarak kullanılabilir. Görsel olarak değerlendirilebilen kalitatif özelliklerdir. Bu markırlar bitki doğasında vardır ve mutasyon sonucu ortaya çıkmışlardır. Morfolojik markırların kullanım potansiyelleri uzun bir süredir bilinmesine rağmen sınırlı sayıda olmaları nedeniyle pratikte uygulanabilirliği kısıtlı kalmıştır [37]..

2.2.3. Biyokimyasal Markırlar

Biyokimyasal markırlar genlerin ürettikleri proteinlerdeki polimorfizmdn elde edilir. İzoenzimler farklı olarak yüklere sahip proteinlerdir. Elektroforez tekniği kullanılarak kolayca ayrılabilirler. Enzimler spesifik biyokimyasal reaksiyonları katalizlerler. Belirli enzimlerin substrat ve kofaktörleri eklenerek jel üzerinde görülmesi sağlanır ve enzimatik reaksiyonların ürünleri renkli olarak üretilir. Renkli ürünler jel üzerinde görülür bantlar

oluşturur. Bu bantlar genetik temellere sahiptir ve kodominant markır olarak genetik bilgi sağlar. Bununla birlikte morfolojik karakterlere göre çok daha yaygın kullanılmakla birlikte izoenzim lokuslarının azlığı ve bazı enzim sistemlerinin çevre koşullarından etkileniyor olması kullanımlarını sınırlar [37].

2.2.3.1. DNA Markırları

Moleküler markırlar DNA'nın aktif bölgelerinden veya herhangi bir genetik kodlama fonksiyonuna sahip olmayan DNA dizilerinden geliştirilebilirler.

Her biri ökaryotik DNA'daki özelliklere dayalı olarak tasarlanan ve kalıtsal olarak izlenebilen moleküler markırlar günümüzde bitki moleküler biyolojisi alanında yoğun bir şekilde kullanılmaktadır. Moleküler markırların bitki moleküler biyolojisinde kullanıldığı alanlara örnek olarak bitki genom haritalanması, markırlar yardımıyla ıslah, gen klonlama, tohum saflığı testleri ve saflık tayini verilebilir.

DNA markırları kullanılarak genetik çeşitlilik araştırılabilir. Örneğin birbirlerine çok yakın olan kültür çeşitleri ayrılabilir ve tanımlanabilir. Türlerin taksonomik tanımlanması yapılabilir ve filogenetik akrabalıkları bulunabilir [37].

2.2.3.1.1. RAPD

Genetik polimorfizmin taranmasında kullanılan moleküler tekniklerden bir tanesi Rasgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD) yöntemidir. PCR tekniği ilk defa DR. Alec Jefferys ve arkadaşları tarafından 1985 yılında Leicester Üniversitesi'nde insanlar üzerinde uygulanmış ve aynı yıl Nobel Ödülü'nü almıştır. Daha sonra diğer canlılarda yoğun bir şekilde uygulanmasına başlamıştır.

RAPD yöntemi ilk tanımlandığından itibaren önemli bir değişikliğe uğramamıştır. Rasgele dizilerden oluşan oligonükleotit dizileri, kalıp DNA kullanılarak PCR ile çoğaltılır. Bu teknikte 9-10 baz çifti uzunluğundaki primerler kullanılmaktadır. Reaksiyon başına tek primer ve 10-25 ng DNA gerekmektedir. Genomik DNA; primer, DNA polimeraz, dNTP, magnezyum ve uygun bir tampon çözelti varlığında PZR cihazında çoğaltılır. Uygun bağlanma ısı ve reaksiyon şartları sağlandığında primerlerin kendileri ile homolog DNA dizilerine bağlanması ve dur kodonuna kadar senztezin devam etmesini sağlar.

Polimorfizmlerin varlığı, primer bağlanma noktalarındaki mutasyon ve dizi değişikliklerinin sonucu olarak bantların varlığı ve yokluğuna dayalı olarak tespit edilir. RAPD markırları genelde dominanttır. RAPD-PCR yöntemi ile çoğaltılan ürünler; elektiriksel alanda uygun tampon bulunan ortamda, jel elektroforezinde yürütülür [38].

2.2.3.1.2. RFLP

Bu markır, çeşitli şekillerde etiketlenmiş bir DNA parçasının araştırılan bir DNA örneğindeki benzer veya aynı dizilişteki DNA'ya melezlenebilmesini baz almaktadır. Bu teknik RFLP analizi ile çok yaygın bir kullanım alanı bulmuştur.

RFLP analizi dokulardan izole edilen genomik DNA'nın nükleik asit dizilişlerini tanıyan DNA kesim enzimlerince spesifik olarak kesilmesi ve prob DNA'nın melezlendiği DNA etrafındaki farklı kesim yapılarının saptanması esasına dayanır. Genomik DNA'nın kesimi tipik olarak 4-6 nükleotid tanıyan enzimlerce yapılır. Kesim sonrasında DNA bir jel destek sistemi içinde elektroforeze tabi tutulduğunda taşıdığı negatif yüklerden dolayı pozitif yöne doğru hareket edecektir. DNA'nın bu hareketi kütlelerinin logaritması ile ters orantılıdır. Kesilen parçalar elektroforez sonucunda jel içinde büyüklüklerine göre sıralanırlar. Bu sıralama sonrası DNA jel ortamdan daha kullanışlı olan naylon filtrele tek iplik halinde southern transfer metoduyla transfer edilir [39].

2.2.3.1.3. AFLP

AFLP tekniği, toplam kesim yapılmış genomik DNA'dan elde edilen restriksiyon fragmentlerinin selektif PCR amplifikasyonu ile çoğaltılması prensibine dayanmaktadır. AFLP markır tekniğinde PZR ürünleri floresan boyalarla veya radyoaktif maddeler ile işaretlenerek tespit edilebilmektedir. Floresan boyalarla tespit radyoaktivite ile tespiti göre daha hassas olduğu için DNA'nın daha fazla seyreltilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. PZR ürünlerine denatüre poliakrilamid jelde ayrırılanırlar. AFLP yöntemi avantajlı olan bir metottur. Bu metot ile çok sayıda polimorfizm elde edilebilmektedir. AFLP metodu ile yüksek çözünürlükte haritalama kalitesi elde edilebilmektedir. AFLP tekniğinde zaman ve maliyet verimi, tekrarlanabilirlik, çözünürlük diğer markırlara göre daha iyi veya eşit seviyededir. Ancak kodominant markırlar elde edilemez, elde edilen markırlar dominanttır. Geniş uygulama alanıyla; sistematik, populasyon genetiği, DNA ve parmakizi analizi çalışmalarında yararlanılmaktadır [40].

2.2.3.1.4. Mikrosatellit DNA Markırları (Basit Dizin Tekrarları)

Mikrosatellit veya basit dizin tekrarları (Simple Sequence Repeats = SSR) nisbeten yeni tip DNA markırları olarak bilinmektedir. Mikrosatellitler, herhangi bir canlı organizma genomunda ardı ardına dizilmiş, genellikle 2 ile 5 baz çifti uzunluğunda oluşmuş DNA tekrarlarıdır. Bu tekrarlar genellikle 10 veya daha fazladır. Mikrosatellit tekrarlamaları tam tekrar, eksik tekrar veya karışık tekrarlar olarak bitki genomunda bulunmaktadır.

Mikrosatellitler, dizi tekrarlarını kapsayacak şekilde geliştirilen iki primer yardımıyla PZR ile çoğaltılabilir. Herhangi iki bitki veya birey arasındaki farklılık dizilerin tekrarlanma sayılarındaki farklılıklardan kaynaklanmaktadır. Herhangi bir mikrosatellit lokusu bir veya birden fazla allele sahip olabilir.

Mikrosatellit markırlar kodominant kalıtım göstermekte olup, farklı melezlerden oluşturulan genetik haritalar arasında kolaylıkla kullanılabilirler. Buna karşılık dominant (baskın) kalıtım gösteren RAPD gibi markır sistemlerinde her bir melez için ayrı bir genetik harita oluşturma zorunluluğu vardır. Tek lokus markırları olmaları nedeniyle skorlamaların yapılması, genetik analizleri ve gen haritalarının oluşturulması, multi lokuslu DNA markırlarına göre daha kolaydır [41].

2.2.3.1.5. SNP

DNA dizisinde, aynı pozisyonda farklı nükleotidlerin ortaya çıkarılmasında kullanılmaktadır. İnsanda her 100-300 baz çiftinde SNP'ler görülmektedir. SNP, kodlanan bölgelerdeki protein fonksiyonları ile direk ilişkilendirilebilir. Atasal kalıtımda sabit olduğundan dolayı seleksiyon için uygun işaretleyicileridir. Son yıllarda, insan genetik hastalıklarının araştırılmasında, insan evrim çalışmalarında ve çeşitli çiftlik hayvanları üzerinde yapılan araştırmalarda tercih edilmektedir. İnsan genom haritalamasında, insan evrimi ile ilgili çalışmalarda da kullanılmaktadır. Ayrıca diğer hayvanlar ile ilgili genom projelerinde geniş ölçüde kullanılmaya başlanmıştır [38].

2.2.3.1.6. SCAR

Bireysel RAPD parçalarından köken alan PCR tabanlı markırlardır ancak uzun, özel primerlerin kullanımıyla tanımlanırlar. Spesifik SCAR markırlarını elde etmek için RAPD veya ISSR parçaları jelden kesilir, klonlanır ve dizi analizi yapılır. Dizi analizinden sonra genellikle 20-25 baz uzunluğundaki parçaların terminal bölgeleri için SCAR primerleri seçilir [42].

2.2.3.1.7. SRAP

Srap; patates pirinç, kıvırcık, kereviz gibi pek çok üründe başarıyla kullanılmış yeni, basit ve güvenilir PCR-tabanlı markır sistemidir. Pek çok yayın SRAP marker sisteminin genetik çeşitlilik analizlerinde, kültürlerin tanımlanmasında ve filogenetik çalışmalarda çok etkili bir araç olduğunu göstermiştir. Ferriol ve ark. (2003) SRAP markırlar tarafından verilen bilginin morfolojik çeşitlilik ve morfortiplerin evrimsel geçmişi ile AFLP markırlarından daha uygun olduğunu bildirmiştir.

SRAP, bitkilerde genetik farklılık çalışmaları için son dönemlerde geliştirilmiş bir moleküler markır sistemidir. ISSR'dan farklı olarak SRAP tekniği primer dizilerinin kendine has dizaynını kullanarak genomdaki kodlanmış dizileri hedefler ve bir kısım ko-dominant markırların tanımlanmasında sonuçlanır. SRAP primerleri, 17 veya 18 nükleotid uzunluğundadır. 13 veya 14 bazlık bir öz dizi ve bunun içinde 5' ucunda spesifik olmayan 10 veya 11 nükleotidden oluşur, bu diziyi forward primerde CCGG ve reverse primerde AATT izler. SRAP markırları genetik farklılığı belirlemek ve aynı zamanda gen işaretleme ve genom hatıralanması için kullanışlı bir yöntem olarak tanımlanmıştır [42].

2.2.3.1.8. ISSR

Mikrosatelitler genellikle az çok tüm genoma yayılmışlardır. Bununla birlikte, bu dizileri bol miktarda içeren bölgeler bulunmuş ve 'SSR hot spots' olarak isimlendirilmiştir. Böyle bölgeler ISSR markır kaynakları olarak işlev görebilirler.

ISSR teknolojisi ters düzenlenmiş yakın aralıklı mikrosatelitlerin arasındaki bölgelerin (100-300bp) amplifikasyonuna dayanmaktadır. Bu bölgelerin amplifikasyonu için

kullanılan 16-18 bç uzunluğunda tek primerleri içeren çok sayıda basit dizi tekrarları herhangi bir SSR motifi ve 5' veya 3' ucuna bağlanmış tesadüfî seçilmiş nükleotidlere dayanabilir. Ayrıca bağlanmamış primerler de kullanılmaktadır. PZR ürünlerine belirsiz SSR bölgeleridir. ISSR'lar genellikle bir reaksiyonda 20-50 ürün çoğaltabilirler. Basmati ve non Basmati pirinç çeşitleri arasındaki genetik akrabalığı bulan Nagaraju ve ark.(2002) tarafından gösterildiği gibi oluşan bantların sayısı motifin tekrarlayan biriminin nükleotid sayısı ile ters orantılı olabilir. Bu metodun en büyük avantajı genomik kütüphanelerin yapım aşaması pahalı değildir ve çok fazla zaman gerektirmez. ISSR markırları daha çok dominant kalıtım gösterirler; eğer mikrosatelitlerde primerlerin bağlanma bölgeleri arasındaki mesafe değişmişse nadiren ko-dominant kalıtım gösterirler. ISSR markırları özellikle filogenetik çalışmalar genetik çeşitliliğinin değerlendirilmesi ve kültürlerin tanımlanması çalışmaları için uygundur. ISSR markırların kolaylığı onları gen işaretleme için de öncül kılar [42].

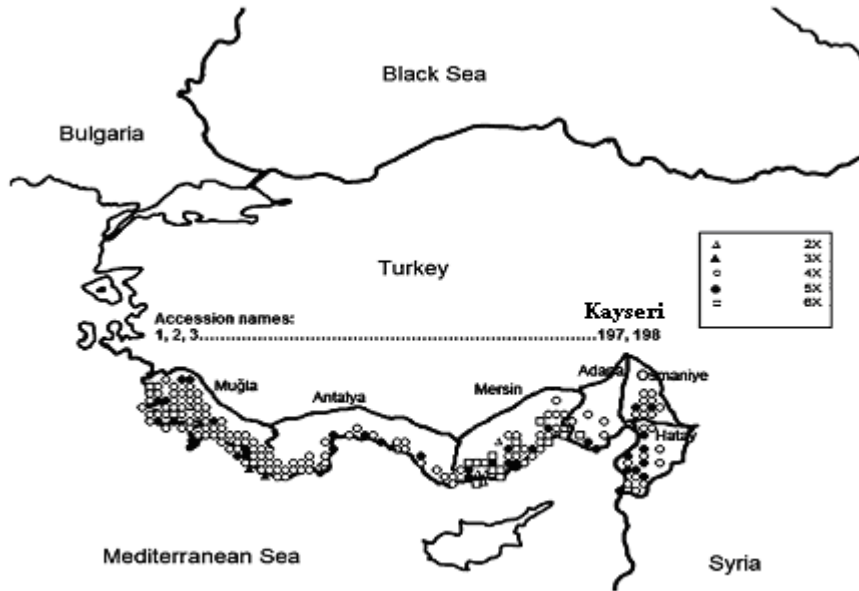
3. BÖLÜM

MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Bitki Materyali

Bu çalışmada diploid, triploid, tetraploid, pentaploid ve hekzaploid genotipe sahip olan 47 farklı bermuda çimi genotipiyle çalışılmıştır. Bu genotiplerden 40'ı Türkiye'de Akdeniz sahili boyunca uzanan Toros dağlarının güney bölgelerinden Gülşen ve ark.(2009) tarafından toplanan 182 genotip arasından seçilmiştir. Genotiplerin 7 tanesi ise Kayseri ve Nevşehir'den toplanmıştır. Bitki örnekleri hem Erciyes Üniversitesi Ziraat Fakültesi Araştırma Birimi Arazisinde hem de Mersin Erdemlide Alata Bahçe Bitkileri Araştırma Enstitüsünde korunarak yetiştirilmiştir.



Şekil 3.1. Türkiye'de Akdeniz sahili boyunca uzanan Toros dağlarının güney kesimlerindeki bermuda çiminin toplandığı bölgeler [35].

Tablo 3.1: Çalışma kapsamında kullanılan çeşitlerin toplanmış olduğu alanlar ve koordinatları

NO	UTM KORDİNATLARI	RAKIM (m)	YER ÖZELLİKLERİ	ALINAN YERİN ADI
1	35522174E 4098709N	21	YOL KENARI, GÜNEŞLİ, KUMLU, KURAK	BODRUM-KADIKALESİ
2	35528356E 4108365N	4	SAHİL KENARI, GÜNEŞLİ, TAŞLI	BODRUM-YALIKAVAK ÇIKIŞI(SAHİLE DOĞRU)
3	35565827E 4124370N	40	YOL KENARI, GÜNEŞLİ, HAFİF KUMLU,	MİLAS KÜÇÜK SANAYİ SİTESİ GİRİŞİ YOL AYRIMI
4	35580398E 4129031N	520	YOL KENARI,GÜNEŞLİ, KUMLU-TINLI,NEMLİ	MİLAS-YATAĞAN YOLU BENCİK KÖYÜ ÖNCESİ
5	35617978E 4101061N	0	SAHİL, GÜNEŞLİ, KUM TEPEŞİ, NEMLİ	GÖKOVA SAHİLİ, DENİZE 2M
6	35564594E 4068611N	2	SAHİL, GÜNEŞLİ, KUMSAL, KURAK	DATÇA-MARMARİS ARASI DEĞİRMEN SONRASI TATİL KÖYLERİ,DENİZE 25M
7	35600338E 4074081N	1	YOL KENARI,TARLA İÇİ GÜNEŞLİ, KUMLU KİLLİ, SAZLIK KENARI	DATÇA-MARMARİS ARASI BOZBURUN KAVŞAĞI DENİZE 100M
8	35604321E 4076489N	22	NEHİR YATAĞI YAMACI, TAŞLI, GRİ TOPRAK ÇAMLIK ALAN	DATÇA MARMARİS DEĞİRMENYANI KÖYÜ ÇIKIŞI
9	35626126E 4099226N	51	YOL KENARI,HAFİF KUMLU, GÜNEŞLİ, ZEYTİN- ÇAM KORUSU	GÖKOVA-KÖYCEĞİZ ARASI ÇITLIK KÖYÜ, GÖKOVA DÜZLÜK BİTİŞİ
10	35681587E 4064992N	28	YOL KENARI,AÇIK GÜNEŞLİ,ÇAMLIK YAMAÇ, KIRMIZI TOPRAK	DALAMAN-FETHİYE KATRANCI KOYU TEPEŞİ
11	35706545E 4039455N	98	YOL KENARI, TARLA KENARI, AÇIK KIRMIZI TOPRAK	FETHİYE-KALKAN PINARA KAVŞAĞI
12	35734001E 4010080N	4	YOL KEN., MAKİ,KURAK ,KAYALIK, KIRMIZI TOPRAK, YAMAÇ	KALKAN-KAŞ KAŞ GİRİŞİ DENİZE 2M
13	36248551E 4022577N	0	DENİZ KENARI KUMLU AÇIK ALAN	FİNİKE- HASYURT SAHİLKENT TOPTANCI HALİ KAVŞAĞI
14	362648117E 4017897N	0	YOL KENARI YAMAÇ ÇAMORMAN ALTI	KUMLUCA MAVİKENT KARAÖZ ARASI
15	36278238E 4042758N	6	YOL KENARI KUMLU AÇIK ALAN	TEKİROVA DERE KENARI
16	36277321E 4052456N			MYRA
17	36320116E 4088872N	8		BATEM KOCAYATAK KAMPÜSÜ
18	36337294E 4089554N	10		ASPENDOS (TİYATRONUN İÇİNDEN)
19	36483822E 3991369N	6	DERE YATAĞI	ANAMUR MERKEZ SULTANSUYU
20	36478757E 3987353N	136	KURAK, KAYALIK, GÜNEYBATI CEPHESİ	ANAMUR
21	36490840E 3992466N	10	OLDUKÇA KURAK	ANAMUR KALESİ İÇİ
22	36595733E 4025031N	0	SULAK MERA	ATAYURT YOLA ÇIKIŞ

(Tablo 3.1'in devamı)

23	36586134E 4025305N	7	MEZARLIK	MERSİN ERDEMLİ KURTULUŞ
24	36599140E 4034661N	130	BASAMAKLARIN ARASINDA	SİLİFKE CENNET MAĞARASI GİRİŞİ
25	36599140E 4034661N	130	BASAMAKLARIN ARASINDA	SİLİFKE CENNET MAĞARASI GİRİŞİ
26	36599140E 4034661N	136		ZEUS TAPINAĞI İÇİ
27	36614780E 4058484N	390	PIKNİK YERİ, TASLIK	ALATA ÜSTÜ
28	36666079E 4071831N	0	KUMSAL NEHİR KENARI	TARSUS-.....
29	36666079E 4071831N	0	KUMSAL NEHİR KENARI	TARSUS-.....
30	36658642E 4095251N	224	BAĞ İÇİ	TARSUS ULAŞÖNÜ
31	36646951E 4115029N	1162	ORMANLIK	TARSUS ULU MERASI
32	36735418E 4152828N	380	TARLA İÇİ	ADANA KOZAN FOSKABASAKAL KÖYÜ
33	36763299E 4000774N	0	SAHİL	SAMANDAĞI
34	36964173E 3999194N	0	SAHİL	SAMANDAĞI
35	37279466E 4025003N	95	DÜZ ARAZI	REYHANLI- KIRIKHAN REYHANLI ÇIKIŞI
36	37250200E 4078561N	21	DERE YATAĞI	DÖRT YOL ÖNÜ
37	37245565E 4101745N	64		ERZİN OSMANİYE YOLU
38	36755433E 4087906N	92	KAYALIK	CEYHAN YUMURTALIK YOLU
39	36709386E 4062932N	3	ÇORAK ALAN	KARATAŞ ADANA ARASI
40	E N			
41	36S 0728456 UTM:4299680		YOL KENARI	SİVAS YOLU
42	36S0706596 UTM:4252208		YOL KENARI, SULAK ALAN	DEVELİ-SOYSALLI
43	36S0717713 UTM:4256087		ERCİYES DAĞI ETEĞİ	DEVELİ-ERCİYES DAĞ YOLU
44	36S0672106 UTM:4275681		YOL KENARI	ÜRGÜP(KARACAÖREN KÖYÜ)
45	36S066916 UTM:4284215		MERA	ÜRGÜP YOLU
46	36S0737176 UTM:4309408		MERA	SARIMSAKLI
47	38 31' 207" N 35 43' 515" E		YOL KENARI	TALAS EKİNLİ KÖYÜ

Bermuda çimlerinin ploidi seviyeleri Gülşen ve ark. (2009) tarafından Toros dağlarının güney bölgelerinden toplanan genotipler üzerinde belirlenmiştir [35]. Seçilen örneklerin ploidi seviyeleri Tablo 3.2. de verilmiştir. Diploid genotipe sahip olan 7 birey, triploid genotipe sahip 3 birey, tetraploid genotipe sahip 10 birey, pentaploid genotipe sahip 10 birey ve hekzaploid genotipe sahip 10 birey seçilmiştir.

Tablo 3.2. Bermuda çimi genotiplerinin ploidi seviyeleri

Genotip Adı	Ploidi seviyesi	Genotip Adı	Ploidi seviyesi
1	Hekzaploid	21	Pentaploid
2	Tetraploid	22	Hekzaploid
3	Pentaploid	23	Pentaploid
4	Tetraploid	24	Diploid
5	Diploid	25	Diploid
6	Tetraploid	26	Diploid
7	Pentaploid	27	Hekzaploid
8	Hekzaploid	28	Hekzaploid
9	Tetraploid	29	Pentaploid
10	Tetraploid	30	Hekzaploid
11	Pentaploid	31	Tetraploid
12	Triploid	32	Pentaploid
13	Tetraploid	33	Hekzaploid
14	Triploid	34	Diploid
15	Tetraploid	35	Hekzaploid
16	Diploid	36	Tetraploid
17	Pentaploid	37	Pentaploid
18	Pentaploid	38	Hekzaploid
19	Triploid	39	Hekzaploid
20	Tetraploid	40	Diploid

3.1.2. Primerler

Bu çalışmada *rbcl*, *Psb-TrnS*, *TrnHK*, *TrnST* ve *30S* olmak üzere 5 farklı cpDNA primeri kullanılmıştır. cpDNA primerlerinin yanında ccSSR4, ccSSR5, ccSSR7, ccSSR8, ccSSR10, ccSSR12, ccSSR15, ccSSR19, ccSSR20, ccSSR22 olmak üzere 10 farklı ccSSR primeri kullanılmıştır. Bu primerlerin baz dizileri ve annealing sıcaklıkları Tablo 3.4.' de verilmiştir [43, 44].

Tablo 3.3. Çalışmada kullanılan primerler ve yapışma sıcaklıkları

Primer adı	Baz Dizisi	T _M (°C)
1. <i>rbcl</i> f	5'-TAGTTTCTGTTTGTGGTGACAT-3'	60°C
<i>rbcl</i> r	5'-AAGTAGTAGGATTGGTTCTCAT-3'	60°C
2. <i>Psb-trnS</i> f	5'-GGTCGTGACCAAGAAACCAC-3'	60°C
<i>Psb-trnS</i> r	5'-GGTTCGAATCCCTCTCTCTC-3'	60°C
3. <i>TrnHK</i> f	5'-ACGGGAATTGAACCCGCGCA-3'	60°C
<i>TrnHK</i> r	5'-CCGACTAGTTCCGGGTTCGA-3'	60°C
4. <i>TrnST</i> f	5'-CGAGGGTTCGAATCCCTCTC-3'	60°C
<i>TrnST</i> r	5'-AGAGCATCGCATTTGTAATG-3'	60°C
5. <i>30S</i> f	5'-TGCGGATCGAACATCAATTGCAAC-3'	60°C
<i>30S</i> r	5'-GTGGTAGAAAGCAACGTGCGACTT-3'	60°C
6. ccSSR12f	5'- CCAAAAACCTGGAGATCCAACACTAC-3'	54 °C
ccSSR12r	5'-TTCCATAGATTCGATCGTGGTTTA-3'	52°C
7. ccSSR20f	5'-CCG CARATATTGGA AAAACWACAA-3'	51°C
ccSSR20r	5'-GCTAARCAAATWGCTTCTGCTCC-3'	55°C
8. ccSSR4f	5'-AGGTTCAAATCCTATTGGACGCA-3'	53°C
ccSSR4r	5'-TTTGAAGAAGCTATTCARGAAC-3'	51°C
9. ccSSR5f	5'-TCTGATAAAAAACGAGCAGTTCT-3'	50°C
ccSSR5r	5'-GAGAAGGTTCATCGGAACAA-3'	52°C
10. ccSSR10f	5'-TCTAGGATTTACATATAACAT-3'	46°C
ccSSR10r	5'-CATCATTATTGTATACTCTTTCA-3'	46°C
11. ccSSR7f	5'-CGGGAAGGGCTCGKGCAG-3'	59°C
ccSSR7r	5'-GTTTGAATCCCTCTCTCTCTTTT-3'	56°C
12. ccSSR8f	5'-TTGATCTTTACGGTGCTTCTCTTA-3'	54°C
ccSSR8r	5'-TCATTACGTGCGACTATCTCC-3'	52°C
13. ccSSR15f	5'-TGCATTACAGACGTATGATCATTA-3'	59 °C
ccSSR15r	5'-TGCATTACAGACGTATGATCATTA-3'	51°C
14. ccSSR19f	5'-CTATGCAGCTCTTTATGYGGATC-3'	54°C
ccSSR19r	5'-TCCARGTAATAAATGCCCAAGTT-3'	52°C
15. ccSSR22f	5'-CCGACCTAGGATAATAAGCYCATG-3'	56°C
ccSSR22r	5'-GGAAGGTGCGGCTGGATC-3'	55°C

3.2. Metod

3.2.1. Bitki Yetiştirilmesi

Bu çalışmada kullanılan bitki örnekleri Alata Bahçe kültürleri Araştırma Enstitüsü ve Erciyes Üniversitesi Ziraat Fakültesi Araştırma Birimi arazisinde saksılarda düzenli aralıklarla bakımı yapılarak korunmaktadır.

3.2.2. Genomik DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu için CTAB DNA ekstraksiyon işlemi değiştirilerek kullanılmıştır [45]. Her bir örnek için 250-300 mg arasında taze yaprak dokusu alınmış, bu dokular sıvı azot aracılığı ile toz haline getirilmiştir. Sıvı azotla ezme işleminin ardından toz haline gelen dokunun üzerine 1 ml ekstraksiyon tamponu (%2 (W/v) CTAB, 100 mM Tris-HCl Ph 8.0, 1.4 M NaCl, 20 mM Na EDTA pH 8.0, % 0.2 β -merkaptoetanol) ilave edilerek homojenize edilmiştir. Ezme işleminden sonra bitki özütü bir ependorf tüpüne alınmıştır. Tüpler önceden ısıtılarak 62°C' ye getirilen su banyosunda 60 dk bekletilmiştir. İnkübasyon işleminden sonra 700 μ l kloroform: izoamilalkol (24:1) eklenmiş ve tüpler 100 defa yavaşça ters düz edildikten sonra 16000 g'de 7 dk santrifüj edilmiştir.

Santrifüj sonrası süpernatant temiz bir tüpe alınmış ve üzerine hacmin 2/3'ü kadar soğuk isopropanol eklenerek -20°C' de 30 dk. bekletilmiş, bunu takiben 14000 g'da, +4°C' de 5 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılmıştır. Kalan pellet üzerine 500 μ l yıkama tamponu (%76 EtOH, 10 M amonyum asetat) ilave edilerek oda sıcaklığında 10 dk. bekletilmiştir. Beklemenin ardından 14000 g'da, +4°C' de 5 dk. santrifüj edilmiş ve sıvı kısım uzaklaştırılmıştır. Kalan beyaz pellet üzerine 300 μ l TE (10 mM Tris, 0.1 mM EDTA, pH 7.4) ilave edilerek 65°C'de 60 dk. bekletilmiştir. İnkübasyondan sonra 10 μ g/ml konsantrasyonda olacak şekilde RNaz ilave edilerek 37°C' de 30 dk. bekletilmiştir. Ardından 200 μ l TE ve 15 μ l amonyum asetat (10 M, pH: 7.7) ilave edilmiş ve tüp içerisindeki toplam çözelti hacminin iki katı kadar %80'lik soğuk etanol eklenerek -20°C'de 30 dk .bekletilmiştir. Yine 14000 g'da, +4°C'de 5 dk santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonrası sulu kısım dikkatlice uzaklaştırılarak kalan pellet gece boyunca kuruması için bırakılmıştır. Kuruyan pellet uygun miktarda TE (10 mM Tris, 0.1

mM EDTA, pH 7.4) içerisinde çözülerek PZR aşamasında kullanılmak üzere -20°C’ de muhafaza edilmiştir.

3.2.3. DNA Miktarı ve Temizliği

Reaksiyonlarda kullanılacak olan DNA’nın temizliği ve miktarı reaksiyon verimliliği için önemlidir. Bu yüzden izolasyon sonrası genomik DNA % 1’ lik agaroz jel elektroforezinde 1X TAE tamponu içerisinde yürütülerek yaklaşık miktarı belirlenmiştir.

3.2.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR veya PCR)

Uygun reaksiyon koşullarını saptamak için gDNA ve MgCl₂ konsantrasyonları optimize edilmiştir. Reaksiyonlar Sensequest marka thermal cycler cihazında gerçekleştirilmiştir. PZR reaksiyonları cpDNA primerleri için her tüpte 50 µl reaksiyon hacmi olacak şekilde ccSSR primerleri içinde her tüpte 15 µl reaksiyon hacmi olacak şekilde ayarlanmıştır (Tablo 3.5 ve Tablo 3.6).

Tablo 3.4: PZR reaksiyonu için gerekli temel bileşenler (cpDNA PZR-RFLP için)

PZR Kompetanı	Kullanılan Miktar (µl)	Konsantrasyon
dH ₂ O	25.78	-
Primer R (100 nmol)	1.33	30 pmol
Primer F (100 nmol)	1.33	30 pmol
Buffer (10X)	5	1X
MgCl ₂ (25 mM)	4	2.5 - 3 mM
BSA (20 mg/ml)	4	0.016 mg
dNTP (10 mM)	1.66	0.33 mM
Taq Polimeraz (5 u/µl)	0.3	1 Ünite
gDNA	6.6	
Toplam Reaksiyon Hacmi	50	

Tablo 3.5. PZR reaksiyon karışımı için gerekli temel bileşenler (ccSSR için)

PZR Kompetanı	Kullanılan Miktar (μ l)	Konsantrasyon
dH ₂ O	6.1	-
Primer R (100 nmol)	0.5	30 pmol
Primer F (100 nmol)	0.5	30 pmol
Buffer (10X)	1.5	1X
MgCl ₂ (25 mM)	2.4	2.5 - 3 mM
BSA (20 mg/ml)	1.2	0.016 mg
dNTP (10 mM)	0.5	0.33 mM
Taq Polimeraz (5 u/ μ l)	0.3	1 Ünite
gDNA	2	
Toplam Reaksiyon Hacmi	15	

Bütün PZR reaksiyonları denatürasyon, yapışma ve uzama olmak üzere 3 aşamada gerçekleştirilmiştir. Aşamalar ve detayları Tablo 3.7. ve 3.8.' de gösterilmiştir.

Tablo 3.6. PZR Döngüsü cpDNA PZR-RFLP primerleri için denatürasyon, annealing ve extension aşamaları

Aşamalar	Sıcaklık / Süre / Döngü
Ön – Denatürasyon	94°C / 2.30 dk / 1 döngü
Denatürasyon	94°C / 1 dk / 35 döngü
Yapışma (annealing)	60°C / 1 dk / 35 döngü
Uzama (extension)	72°C / 2 dk / 35 döngü
Son uzama	72°C / 10 dk / 1 döngü
Bekleme	+4°C / -

Tablo 3.7. PZR Döngüsü ccSSR primerleri için denatürasyon, annealing ve extension aşamaları

Aşamalar	Sıcaklık / Süre / Döngü
Ön – Denatürasyon	94°C / 5 dk / 1 döngü
Denatürasyon	94°C / 1 dk / 35 döngü
Yapışma (annealing)	55-65°C / 1 dk / 35 döngü
Uzaman (extension)	72°C / 1 dk / 35 döngü
Son uzama	72°C / 6 dk / 1 döngü
Bekleme	+4°C / -

3.2.5. Restriksiyon Enzimleri

MseI, *EcoRI*, *MspI*, *HinIII*, *TaqI*, *DraI*, *BsuRI*, *MboI*, *RsaI* ve *EcoRV* olmak üzere 10 farklı kesim enzimi seçilmiştir. Uygun reaksiyon koşullarını saptamak için enzim ve PZR reaksiyon ürünleri konsantrasyonları optimize edilmiştir. Reaksiyonlar sirkülasyonlu su banyosu cihazında inkübe edilmiştir. Enzim reaksiyonları her tüpte 16 µl olacak şekilde ayarlanmıştır (Tablo 3.9).

Tablo 3.8. PZR reaksiyonu için gerekli temel bileşenler (enzimler için)

Enzim Kompetanı	Kullanılan Miktar (µl)	Konsantrasyon
dH ₂ O	9	-
Buffer	1,5	10X
RE	0,5	5 U/µl
PZR reaksiyon ürünü	5	-
Toplam	16	-

3.2.6. Agaroz Jel Elektrophorezi

cpDNA PZR-RFLP primerlerinden elde edilen PZR ürünleri ve kesim enzimleri ürünleri % 2 lik agaroz jelde 110 V / 4 saat yürütülmüştür. Bantların büyüklüğünü belirlemek için 100-3000 ve 100-10000 baz çifti aralığında DNA markırı kullanılmıştır. Jel içersine son konsantrasyonu 0.5 µg/ml olan etidyum bromür katılmıştır ve görüntüleme cihazında resimleri çekilmiştir. Kullanılan TAE tamponu içeriği ve yükleme tampoları içeriği Ek-1 ve Ek-2’de verilmiştir.

3.2.7. Poliakrilamid Jel Elektrophorezi (PAGE)

ccSSR primerlerinden elde edilen PZR ürünleri % 6’ lik poliakrilamid jel de 150 V / 5 saat yürütülmüştür. Bantların büyüklüğünü belirlemek için 100-3000 ve 100-10000 baz çifti aralığında DNA markırı kullanılmıştır. Jel konsantrasyonu 0.5 µg/ml olan etidyum bromür ile boyandıktan sonra görüntüleme cihazında jelin fotoğrafı çekilmiştir. Kullanılan tampon ve çözeltilerin hazırlanışı Ek-3, Ek-4, Ek-5, Ek-6 ve Ek-7’de verilmiştir.

3.2.8. Polimorfiz Oranlarının Belirlenmesi

Çalışmada kullanılan cpDNA PZR-RFLP primerleri PZR ürünü-enzim kombinasyonu ile ccSSR primerleri’nin polimorfizm oranlarının belirlenmesi için aşağıdaki formül kullanılmıştır.

<u>Polimorfizm oranı:</u> (Polimorfik bant sayısı/ Toplam bant sayısı) x 100
--

3.2.9. Polimorfizmin Hesaplanması

Agaroz jelde görüntülenen bantların her biri ‘1’ , ‘0’ veya ‘9’ olarak kaydedilmiş olup, 1: bandın varlığını, 0: bandın olmadığını, 9 ise: değerlendirilemeyen bantları göstermektedir. Veriler Numerical Taxonomy Multivariate Analysis System (NTSYS-pc) version 2.1 paket bilgisayar programı (Exeter Software, Setauket, New York, USA) ile değerlendirilmiştir. Dice (Dice, 1945) katsayısına göre (taksonların benzerliği için sadece birebir eşleşmeleri kabul eder) benzerlik matrisi yapılmıştır. Çalışılan genotipler arasında genetik ilişkiyi belirlemek için benzerlik matrisi UPGMA metodunu kullanarak dendrogram oluşturmak amacıyla kullanılmıştır.

PCA, bireyler arasındaki farkların kolayca görülmesini sağlar ve bir çalışmadaki optimum sayıdaki kümeleri belirler. PCA, PCA kullanılarak markırlardan hesaplanan varyans kovaryans matrisi üzerinden yapılmıştır. Benzerlik matrisi ve cluster analizi için uyumluluk testi (goodness-of-fit) yapmak için ilk olarak CPH modülü ağaç matrisini ultrametrik benzerlik matrisine dönüştürmek için kullanılmış sonrada MXCOMP modülü bu ultrametrik benzerliklerin üretilen benzerlik matrisiyle karşılaştırılması için kullanılmıştır.

4. BÖLÜM

BULGULAR

Bu çalışmada cpDNA PZR-RFLP markırları ve ccSSR markırları uygulanarak bermuda çimindeki polimorfizm belirlenmiştir. Çalışma kapsamında toplanmış olan genotiplerin 40'ı Türkiye'de Akdeniz sahili boyunca uzanan Toros dağlarının güney bölgelerinden Gülşen ve ark.(2009) tarafından, 7 bermuda örneği ise Kayseri ve Nevşehir'den farklı noktalarından toplanmış 47 genotip belirtilen markırlar tarafından taranmıştır.

PZR ürünlerinin agaroz jel elektroforezinde verdiği bantlar var (1), yok (0) veya kayıp veri (9) olarak değerlendirilmiştir. Elde edilen toplam bant sayıları, monomorfik bant sayıları, polimorfik bant sayıları ile polimorfizm oranları Tablo 4.1. ve 4.2.'de verilmiştir.

Kloroplast DNA'sının 5 farklı bölgesine özgü primerler kullanılarak elde edilen ürünler 10 farklı restriksiyon endonükleaz ile kesildiğinde 100-1900 baz çifti aralığında 143 DNA bandı elde edilmiştir. Bu bantlardan elde edilen polimorfizm oranı %37 olarak hesaplanmıştır. Enzimler içerisinde en fazla kesimi toplam 5 farklı PZR ürününde 24 bant oluşturarak *MseI* olmuştur. En az kesim ise 2 bant ile *EcoRV*'da görülmüştür. PZR ürünlerinin restriksiyon enzimleriyle kesimi sonucu en fazla bant veren 32 bant ile TrnST(r-f) bölgesi olmuştur. En az ise 20 bant ile rbcL(r-f) primeri olduğu Tablo 4.1'de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. cpDNA PZR-RFLP analizi sonucu oluşan bant profilleri, monomorfik ve polimorfik bant sayıları ile % polimorfizm değerleri

Primer Adı	TBS ^a	BÇ ^b	MBS ^c	PBS ^d	% polimorfizm
1.TrnHK-TaqI	3	1000-650	1	2	66
2.TrnHK-MseI	4	880-120	4	0	0
3.TrnHK-DraI	3	1900-400	0	3	100
4.TrnHK-HinIII	3	1000-300	3	0	0
5.TrnHK-BsuRI	3	1100-300	3	0	0
6.TrnHK-MspI	2	1900-1700	0	2	100
7.TrnHK-EcoRI	1	1900	1	0	0
8.TrnHK-MboI	6	700-130	6	0	0
9.TrnHK-EcoRV	2	1200-700	2	0	0
10.TrnHK-RsaI	5	800-300	3	2	40
11.rbcL- BsuRI	2	900-420	0	2	100
12.rbcL-EcoRI	3	600-200	1	2	66
13.rbcL-MseI	3	280-50	3	0	0
14.rbcL-TaqI	2	280-180	2	0	0
15.rbcL-DraI	1	900	1	0	0
16.rbcL-HinIII	2	300-200	2	0	0
17.rbcL- MboI	2	600-300	2	0	0
18.rbcL-RsaI	4	615-200	0	4	100
19.rbcL-MspI	2	600-250	2	0	0
20.rbcL-EcoRV	1	900	1	0	0
21.TrnST-DraI	2	900-400	2	0	0
22.TrnST-MspI	4	580-140	3	1	25
23.TrnST-TaqI	6	700-190	1	5	83
24.TrnST-BsuRI	2	700-600	2	0	0
25.TrnST-EcoRI	2	1180-120	2	0	0
26.TrnST-EcoRV	1	1300	1	0	0
27.TrnST-HinIII	3	920-180	1	2	66
28.TrnST-MseI	5	310-100	4	1	25
29.TrnST-MboI	4	800-120	2	2	50

(Tablo 4.1'in devamı)

Primer Adı	TBS ^a	BÇ ^b	MBS ^c	PBS ^d	% polimorfizm
30.TrnST-RsaI	4	570-320	2	2	50
31.Psb-trnS -MseI	7	420-100	3	4	57
32.Psb-trnS-TaqI	1	1600	1	0	0
33.Psb-trnS -MspI	2	1000-300	2	0	0
34.Psb-trnS -EcoRI	1	1600	1	0	0
35.Psb-trnS -HinIII	4	550-200	2	2	50
36.Psb-trnS -BsuRI	4	600-200	4	0	0
37.Psb-trnS -EcoRV	1	1600	1	0	0
38.Psb-trnS -MboI	3	1000-120	3	0	0
39.Psb-trnS -DraI	2	1200-400	2	0	0
40.Psb-trnS -RsaI	4	750-180	2	2	50
41.30S-RsaI	3	490-180	1	2	66
42.30S-BsuRI	2	670-230	2	0	0
43.30S-MspI	2	520-380	2	0	0
44.30S-HinIII	4	900-160	0	4	100
45.30S-MseI	5	390-180	1	4	80
46.30S-TaqI	6	270-100	1	5	83
47.30S-MboI	2	580-320	2	0	0
48.30S-EcoRV	1	900	1	0	0
49.30S-DraI	1	900	1	0	0
50.30S- RsaI	1	720	1	0	0
Toplam	143	1900-100	90	53	37

a) TBS: Toplam Bant Sayısı, b) BÇ: Baz Çifti, c) MBS: Monomorfik Bant Sayısı, d) PBS: Polimorfik Bant Sayısı.

Bermuda çiminde 10 farklı ccSSR primeri kullanılmış ve bunlardan 8 tanesi beklenen büyüklükte PZR ürünü vermiştir. ccSSR primerinin amplifikasyonu sonucu 190-410 bp aralığında toplam 16 adet bant elde edilmiştir. 190-410 bp aralığında olan bu bantların genel polimorfizm oranı %87 olarak hesaplanmıştır. En fazla bant veren primerler ccSSR-5 ve ccSSR-19 olmuştur. Bu primerlerden elde edilen bant sayısı 3'tür. ccSSR-4 ve ccSSR-15 primerleri ise tek bant vermiştir (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. ccSSR analizi sonucu oluşan bant profilleri, monomorfik ve polimorfik bant sayıları ile % polimorfizm değerleri

Primer Adı	TBS ^a	BÇ ^b	MBS ^c	PBS ^d	% Polimorfizm
1.ccSSR-4	1	210	1	0	0
2.ccSSR-5	3	310-290	0	3	100
3.ccSSR-8	2	255-250	0	2	100
4.ccSSR-12	2	220-210	0	2	100
5.ccSSR-15	1	270	1	0	0
6.ccSSR-19	3	410-390	0	3	100
7.ccSSR-20	2	410-400	0	2	100
8.ccSSR-22	2	200-190	0	2	100
Toplam	16	410-190	2	14	87

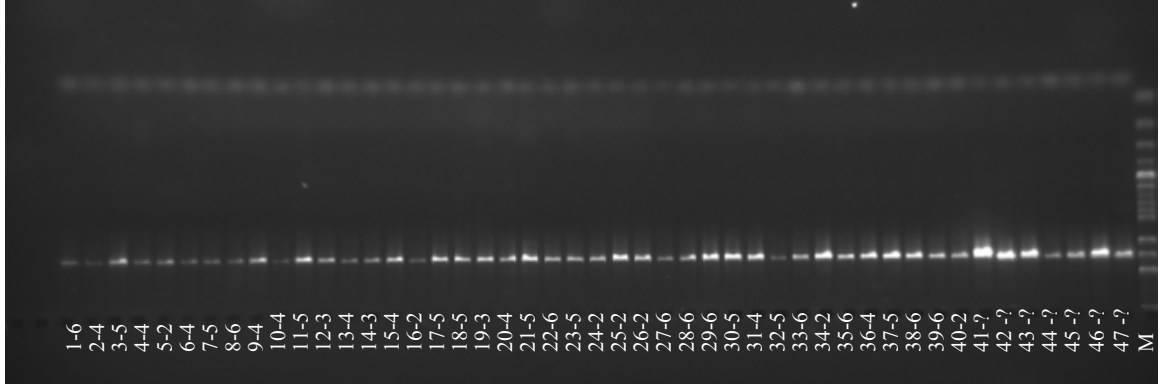
a) TBS: Toplam Bant Sayısı, b) BÇ: Baz Çifti, c) MBS: Monomorfik Bant Sayısı, d) PBS: Polimorfik Bant Sayısı.

cpDNA'sının spesifik bölgeleri amplifikasyonu sonrası agaroz jel elektroforezi yapılmış ve molekül ağırlıkları belirlenmiştir. Molekül ağırlığı en yüksek PZR ürünü *TrnHK(r-f)* primeri ile elde edilirken, en düşük olan ise *rbcL(r-f)* ve *30S(r-f)* primerleri ile elde edilmiştir. Tütün cpDNA'sının dizisine göre dizayn edilen 8 tane primer kullanılarak *Cynodon* cpDNA'sın dan SSR'lar elde edilmiştir. Elde edilen SSR bantlarının büyüklükleri tütün SSR'ları ile uyumlu büyüklükte bulunmuştur. Kullanılan SSR primerleri ve bu primerler kullanılarak elde edilen ürünlerin molekül ağırlıkları Tablo 4.4'de gösterilmiştir. Molekül ağırlığı en büyük olan ccSSR-19 ve ccSSR-20 primerleri ile elde edilen SSR'lar iken en düşük molekül ağırlığa sahip olan SSR ise ccSSR-22 ile elde edilmiştir (Tablo 4.4).

Tablo 4.4. cpDNA ve ccSSR primerleri PZR analizi sonucu oluşturdukları ürün boyutu.

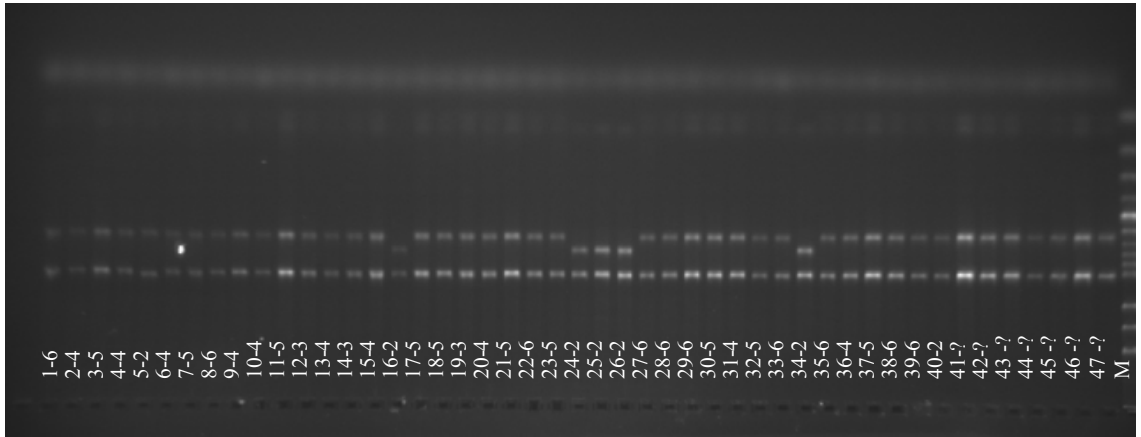
Primer çiftleri	PZR ürünü boyutu (bp)
<i>Psb-trnS (r-f)</i>	1600 bp
<i>TrnST (r-f)</i>	1600 bp
<i>rbcL (r-f)</i>	900 bp
<i>TrnHK (r-f)</i>	2000 bp
<i>30S (r-f)</i>	900 bp
<i>ccSSR-4 (r-f)</i>	210 bp
<i>ccSSR-5 (r-f)</i>	290-310 bp
<i>ccSSR-8 (r-f)</i>	250-255 bp
<i>ccSSR-12 (r-f)</i>	210-220 bp
<i>ccSSR-15 (r-f)</i>	270 bp
<i>ccSSR-19 (r-f)</i>	390-410 bp
<i>ccSSR-20 (r-f)</i>	400-410 bp
<i>ccSSR-22 (r-f)</i>	190 bp

***TrnHK (f-r)* primer çifti ile amplifikasyon sonucu elde edilen PZR ürünü:** *TrnHK* primeri kullanılarak yapılan PZR sonucunda tüm genotiplerde beklenen büyüklükte 2000 bp civarında PZR ürünü elde edilmiştir. Farklı genotiplerdeki cpDNA polimorfizmini tespit etmek için elde edilen PZR ürünlerine 10 farklı restriksiyon enzimi uygulanmıştır. Restriksiyon ürünlerinin agaroz jel elektroforezi yapılarak farklı genotiplerdeki kullanılan 10 enzim açısından kesme noktası polimorfizmi tespit edilmiştir (Şekil 4.1).



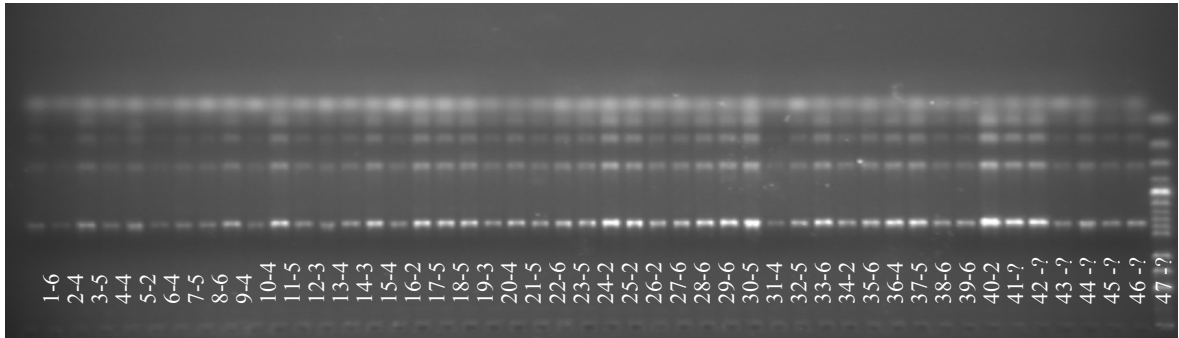
Şekil 4.1. *TrnHK (f-r)* primeri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerinin agaroz jeldeki bant profilleri. M: 100-3000 bp DNA moleküler ağırlık belirteci.

***TrnHK (f-r)* bölgesinin *TaqI* enzimi ile restriksiyon analizi:** *TrnHK* primerleri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerine *TaqI* enzimi uygulandıktan sonra agaroz jel elektroforezi yapılarak farklı genotiplerdeki bu enzim açısından kesme noktası polimorfizmi tespit edilmiştir. RE analizi sonucu 47 farklı genotipten, 1000, 750 ve 650 bp olmak üzere üç farklı büyüklükte bant gözlenmiş olup polimorfik bant sayısı 2, monomorfik bant sayısı ise 1'dir (Tablo 4.1). cpDNA PZR-RFLP analizi ile %66 oranında polimorfizm tespit edilmiştir. Polimorfizm, diploid oldukları bilinen 16, 24, 25, 26 ve 34 numaralı bireylerde gözlenmiştir (Şekil 4.2).



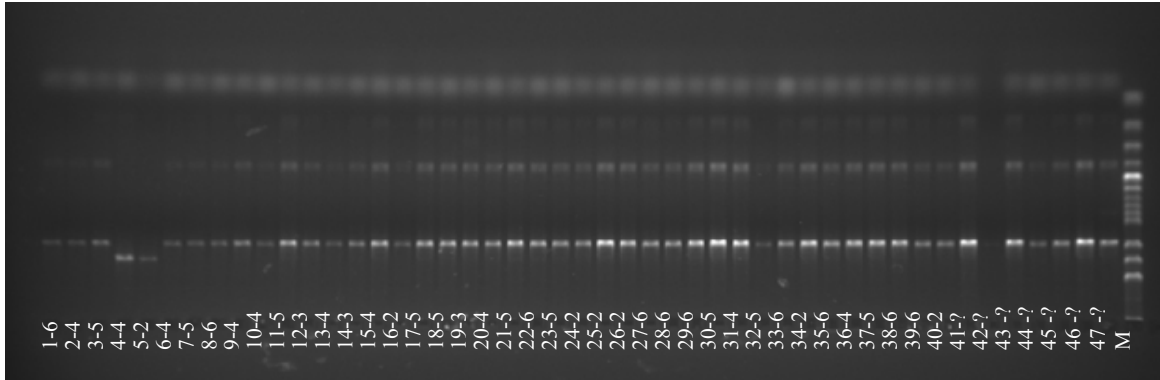
Şekil 4.2. *TrnHK (f-r)* primeri PZR ürününün *TaqI* enzimi ile kesimi sonucu agaroz jeldeki bant profilleri. M: 100-3000 bp DNA moleküler ağırlık belirteci.

***TrnHK (f-r)* bölgesinin *MseI* enzimi ile restriksiyon analizi:** *TrnHK* primerleri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerine *MseI* enzimi uygulandıktan sonra agaroz jel elektroforezi yapılarak farklı genotiplerdeki bu enzim açısından kesme noktası polimorfizmi tespit edilmiştir. RE analizi sonucu 47 farklı genotipten, 880, 300, 180 ve 120 bp olmak üzere dört farklı büyüklükte bant gözlenmiş olup polimorfik bant sayısı 0, monomorfik bant sayısı ise 4'tür (Tablo 4.1). cpDNA PZR-RFLP analizi ile polimorfizm tespit edilmemiştir(Şekil 4.3).



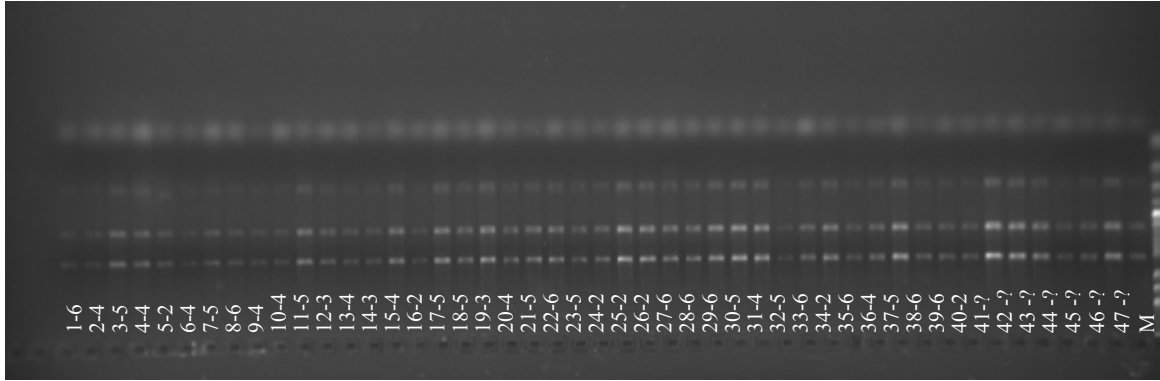
Şekil 4.3. *TrnHK (f-r)* primeri PZR ürününün *MseI* enzimi ile kesimi sonucu agaroz jeldeki bant profilleri. M: 100-3000 bp DNA moleküler ağırlık belirteci.

***TrnHK (f-r)* bölgesinin *DraI* enzimi ile restriksiyon analizi:** *TrnHK* primerleri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerine *DraI* enzimi uygulandıktan sonra agaroz jel elektroforezi yapılarak farklı genotiplerdeki bu enzim açısından kesme noktası polimorfizmi tespit edilmiştir. RE analizi sonucu 47 farklı genotipten, 1900, 1500, ve 400 bp olmak üzere üç farklı büyüklükte bant gözlenmiş olup polimorfik bant sayısı 3, monomorfik bant sayısı ise 0'dır (Tablo 4.1). cpDNA PZR-RFLP analizi ile %100 oranında polimorfizm tespit edilmiştir. Polimorfizm, 4 ve 5 numaralı bireylerde gözlenmiştir (Şekil 4.4).



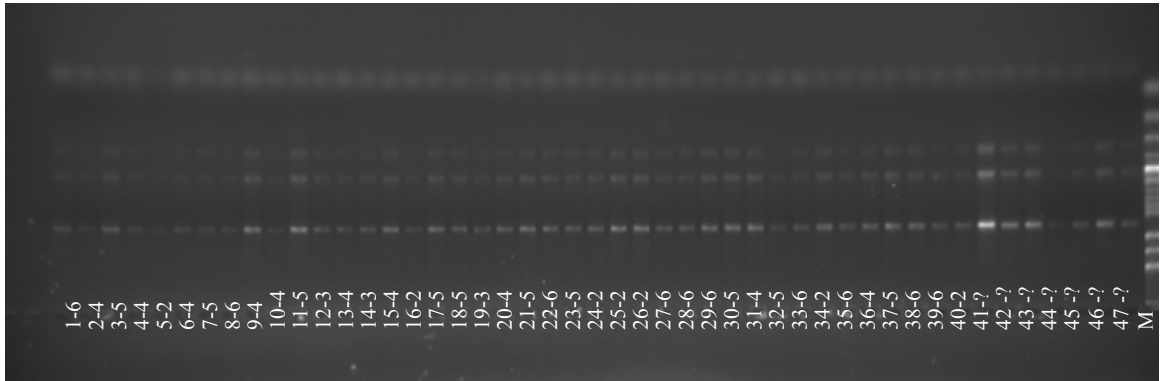
Şekil 4.4. *TrnHK (f-r)* primeri PZR ürününün *DraI* enzimi ile kesimi sonucu agaroz jeldeki bant profilleri. M: 100-3000 bp DNA moleküler ağırlık belirteci.

***TrnHK (f-r)* bölgesinin *HinIII* enzimi ile restriksiyon analizi:** *TrnHK* primerleri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerine *HinIII* enzimi uygulandıktan sonra agaroz jel elektroforezi yapılarak farklı genotiplerdeki bu enzim açısından kesme noktası polimorfizmi tespit edilmiştir. RE analizi sonucu 47 farklı genotipten, 1000, 600, ve 300 bp olmak üzere üç farklı büyüklükte bant gözlenmiş olup polimorfik bant sayısı 0, monomorfik bant sayısı ise 3'tür (Tablo 4.1). cpDNA PZR-RFLP analizi ile polimorfizm tespit edilmemiştir (Şekil 4.5).



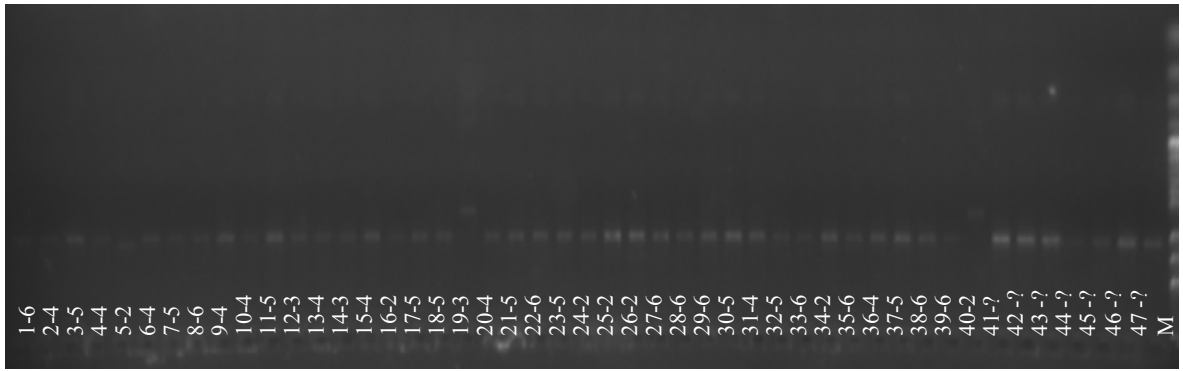
Şekil 4.5. *TrnHK (f-r)* primeri PZR ürününün *HinIII* enzimi ile kesimi sonucu agaroz jeldeki bant profilleri. M: 100-3000 bp DNA moleküler ağırlık belirteci.

***TrnHK (f-r)* bölgesinin *BsuRI* enzimi ile restriksiyon analizi:** *TrnHK* primerleri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerine *BsuRI* enzimi uygulandıktan sonra agaroz jel elektroforezi yapılarak farklı genotiplerdeki bu enzim açısından kesme noktası polimorfizmi tespit edilmiştir. RE analizi sonucu 47 farklı genotipten, 1100, 500, ve 300 bp olmak üzere üç farklı büyüklükte bant gözlenmiş olup polimorfik bant sayısı 0, monomorfik bant sayısı ise 3'tür (Tablo 4.1). cpDNA PZR-RFLP analizi ile polimorfizm tespit edilmemiştir (Şekil 4.6).



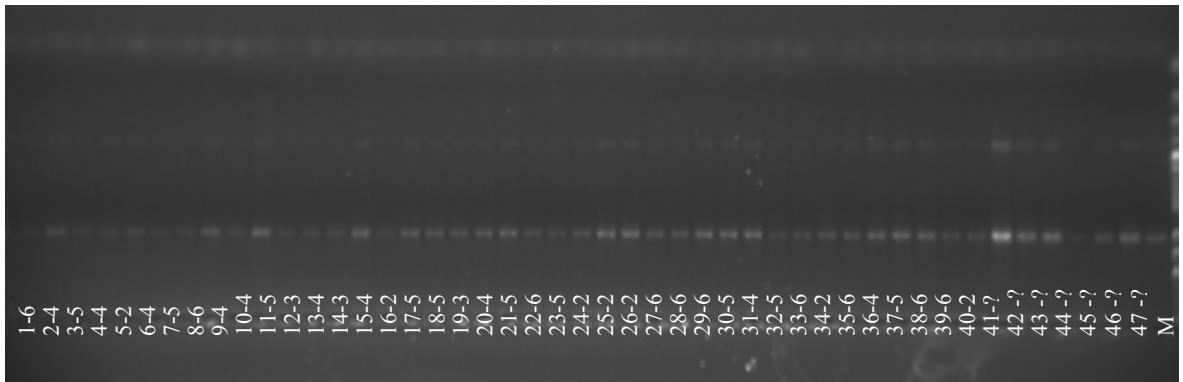
Şekil 4.6. *TrnHK (f-r)* primeri PZR ürününün *BsuRI* enzimi ile kesimi sonucu agaroz jeldeki bant profilleri. M: 100-3000 bp DNA moleküler ağırlık belirteci.

***TrnHK (f-r)* bölgesinin *MspI* enzimi ile restriksiyon analizi:** *TrnHK* primerleri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerine *MspI* enzimi uygulandıktan sonra agaroz jel elektroforezi yapılarak farklı genotiplerdeki bu enzim açısından kesme noktası polimorfizmi tespit edilmiştir. RE analizi sonucu 47 farklı genotipten, 1900 ve 1700 bp olmak üzere iki farklı büyüklükte bant gözlenmiş olup polimorfik bant sayısı 2, monomorfik bant sayısı ise 0'dır (Tablo 4.1). cpDNA PZR-RFLP analizi ile %100 oranında polimorfizm tespit edilmiştir. Polimorfizm, 5, 19 ve 40 numaralı bireylerde gözlenmiştir(Şekil 4.7).



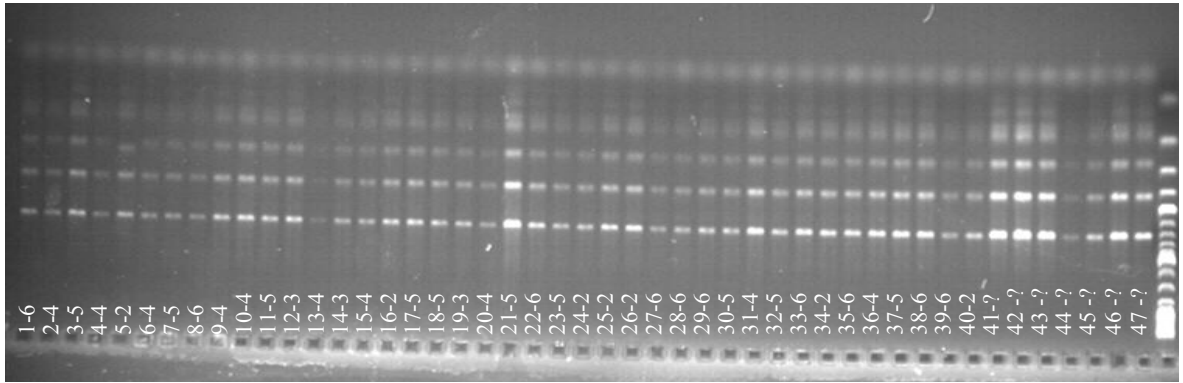
Şekil 4.7. *TrnHK (f-r)* primeri PZR ürününün *MspI* enzimi ile kesimi sonucu agaroz jeldeki bant profilleri. M: 100-3000 bp DNA moleküler ağırlık belirteci.

***TrnHK (f-r)* bölgesinin *EcoRI* enzimi ile restriksiyon analizi:** *TrnHK* primerleri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerine *EcoRI* enzimi uygulandıktan sonra agaroz jel elektroforezi yapılarak farklı genotiplerdeki bu enzim açısından kesme noktası polimorfizmi tespit edilmiştir. RE analizi sonucu 47 farklı genotipten, 1900 ve 400 bp olmak üzere 2 büyüklükte bant gözlenmiş olup polimorfik bant sayısı 0, monomorfik bant sayısı ise 2'dir (Tablo 4.1). cpDNA PZR-RFLP analizi ile polimorfizm tespit edilmemiştir (Şekil 4.8).



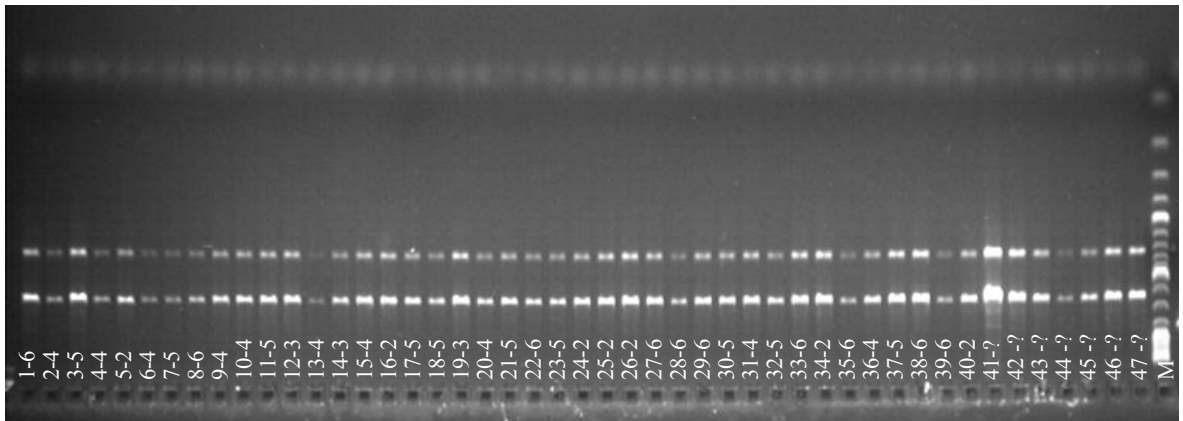
Şekil 4.8. *TrnHK (f-r)* primeri PZR ürününün *EcoRI* enzimi ile kesimi sonucu agaroz jeldeki bant profilleri. M: 100-3000 bp DNA moleküler ağırlık belirteci.

***TrnHK (f-r)* bölgesinin *MboI* enzimi ile restriksiyon analizi:** *TrnHK* primerleri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerine *MboI* enzimi uygulandıktan sonra agaroz jel elektroforezi yapılarak farklı genotiplerdeki bu enzim açısından kesme noktası polimorfizmi tespit edilmiştir. RE analizi sonucu 47 farklı genotipten, 700, 410, 290, 190, 180 ve 130 bp olmak üzere 6 büyüklükte bant gözlenmiş olup polimorfik bant sayısı 0, monomorfik bant sayısı ise 6'dır (Tablo 4.1). cpDNA PZR-RFLP analizi ile polimorfizm tespit edilmemiştir (Şekil 4.9).



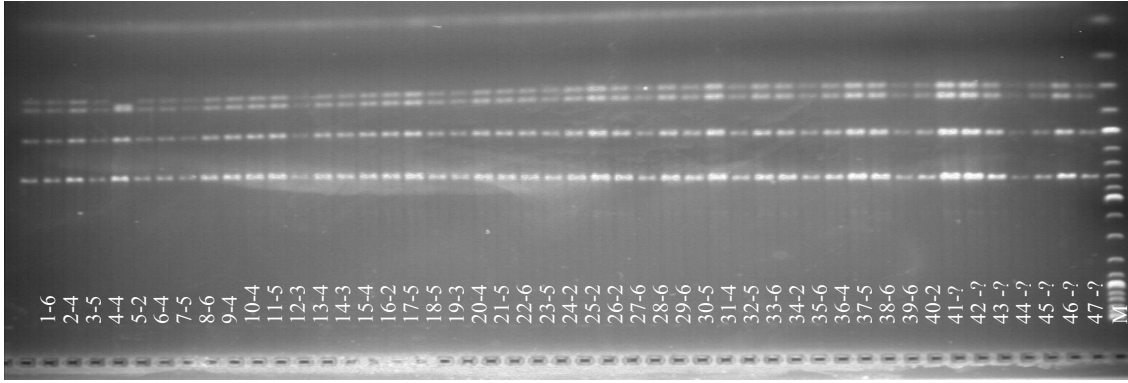
Şekil 4.9. *TrnHK (f-r)* primeri PZR ürününün *MboI* enzimi ile kesimi sonucu agaroz jeldeki bant profilleri. M: 100-10000 bp DNA moleküler ağırlık belirteci.

***TrnHK (f-r)* bölgesinin *EcoRV* enzimi ile restriksiyon analizi:** *TrnHK* primerleri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerine *EcoRV* enzimi uygulandıktan sonra agaroz jel elektroforezi yapılarak farklı genotiplerdeki bu enzim açısından kesme noktası polimorfizmi tespit edilmiştir. RE analizi sonucu 47 farklı genotipten, 1200 ve 700 bp olmak üzere 2 büyüklükte bant gözlenmiş olup polimorfik bant sayısı 0, monomorfik bant sayısı ise 2'dir (Tablo 4.1). cpDNA PZR-RFLP analizi ile polimorfizm tespit edilmemiştir (Şekil 4.10).



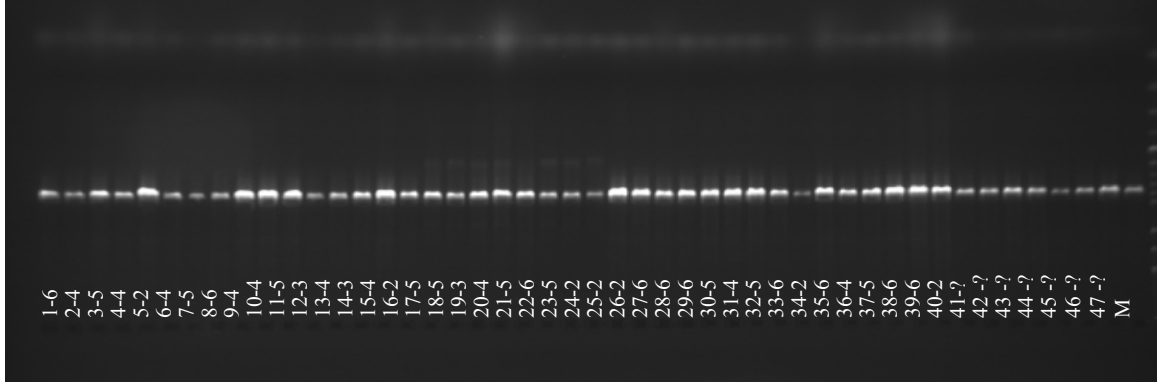
Şekil 4.10. *TrnHK (f-r)* primeri PZR ürününün *EcoRV* enzimi ile kesimi sonucu agaroz jeldeki bant profilleri. M: 100-10000 bp DNA moleküler ağırlık belirteci.

TrnHK (f-r) bölgesinin *RsaI* enzimi ile restriksiyon analizi: TrnHK primerleri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerine *RsaI* enzimi uygulandıktan sonra agaroz jel elektroforezi yapılarak farklı genotiplerdeki bu enzim açısından kesme noktası polimorfizmi tespit edilmiştir. RE analizi sonucu 47 farklı genotipten, 800, 510, 330, 315 ve 300 bp olmak üzere 5 büyüklükte bant gözlenmiş olup polimorfik bant sayısı 2, monomorfik bant sayısı ise 3'tür (Tablo 4.1). cpDNA PZR-RFLP analizi ile %40 oranında polimorfizm tespit edilmiştir. Polimorfizm, 5 numaralı bireyde gözlenmiştir (Şekil 4.11).



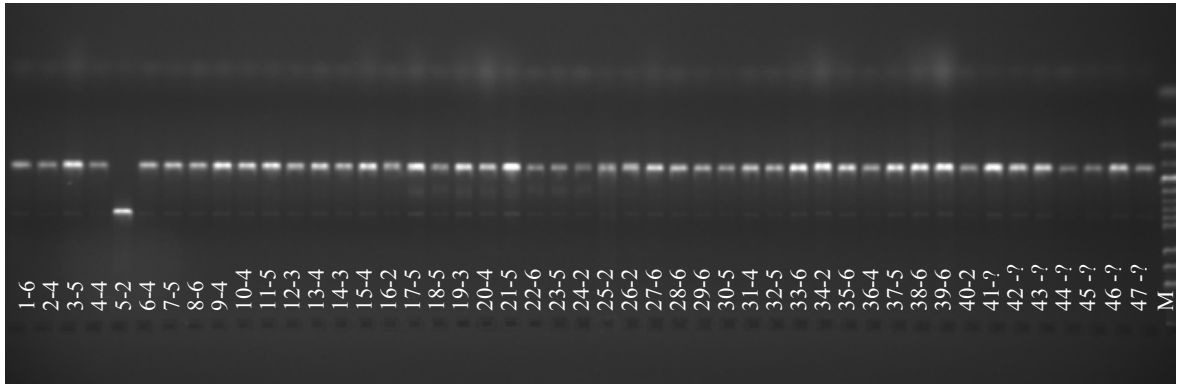
Şekil 4.11. TrnHK (f-r) primeri PZR ürününün *RsaI* enzimi ile kesimi sonucu agaroz jeldeki bant profilleri. M:100-10000 bp

***rbcL* (f-r) primeri çifti ile amplifikasyon sonucu elde edilen PZR ürünü:** *rbcL* primeri kullanılarak yapılan PZR sonucunda tüm genotiplerde beklenen büyüklükte 900 bp civarında PZR ürünü elde edilmiştir. Farklı genotiplerdiki cpDNA polimorfizmini tespit etmek için elde edilen PZR ürünlerine 10 farklı restriksiyon enzimi uygulanmıştır. Restriksiyon ürünlerinin agaroz jel elektroforezi yapılarak farklı genotiplerdeki kullanılan 10 enzim açısından kesme noktası polimorfizmi tespit edilmiştir (Şekil 4.12).



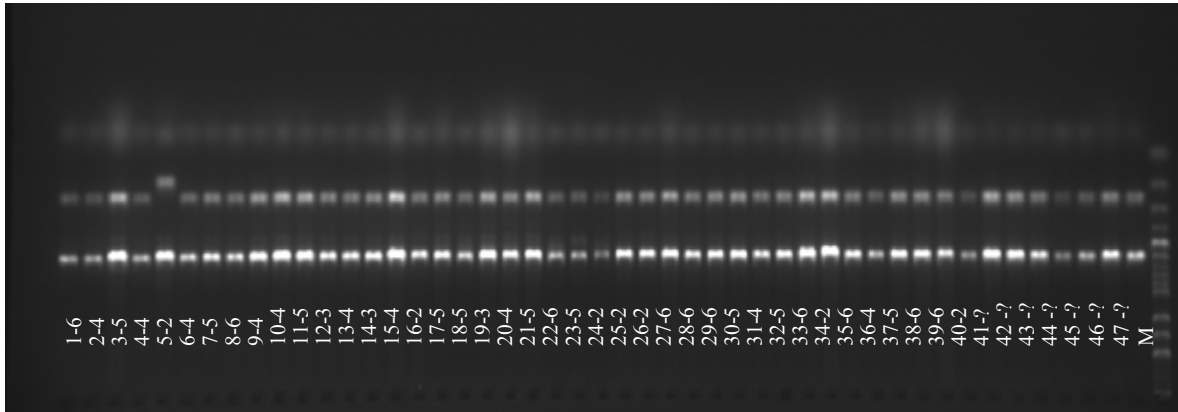
Şekil 4.12. *rbcL* (f-r) primeri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerinin agaroz jeldeki bant profilleri. M: 100-3000 bp DNA moleküler ağırlık belirteci.

***rbcL (f-r)* primeri ile *BsuRI* enzimi ile restriksiyon analizi:** *rbcL* primerleri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerine *BsuRI* enzimi uygulandıktan sonra agaroz jel elektroforezi yapılarak farklı genotiplerdeki bu enzim açısından kesme noktası polimorfizmi tespit edilmiştir. RE analizi sonucu 47 farklı genotipten, 900 ve 420 bp olmak üzere 2 bant elde edilmiştir. Polimorfik bant sayısı 2, monomorfik bant sayısı ise 0'dır (Tablo 4.1). cpDNA PZR-RFLP analizi ile %100 oranında polimorfizm tespit edilmiştir. Polimorfizm, 5 numaralı bireyde gözlenmiştir (Şekil 4.13).



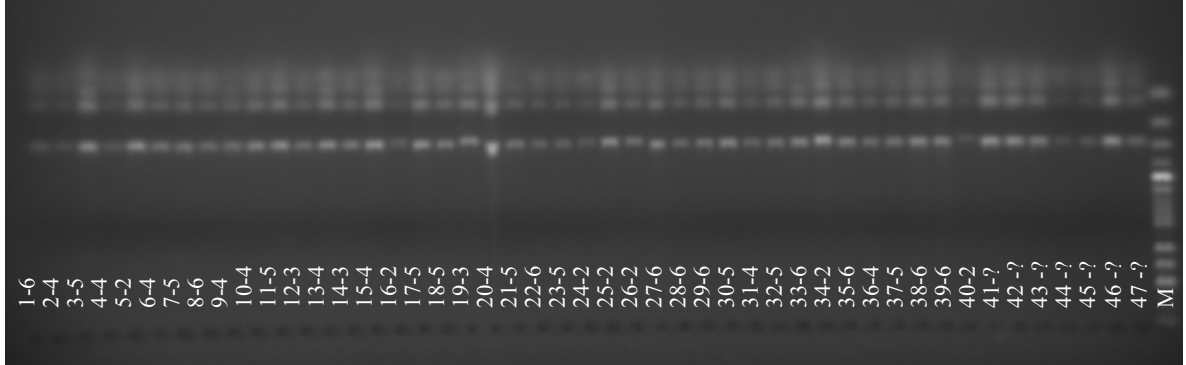
Şekil 4.13. *rbcL (f-r)* primeri PZR ürününün *BsuRI* enzimi ile kesimi sonucu agaroz jeldeki bant profilleri. M: 100-3000 bp DNA moleküler ağırlık belirteci.

***rbcL (f-r)* bölgesinin *EcoRI* enzimi ile restriksiyon analizi:** *rbcL* primerleri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerine *EcoRI* enzimi uygulandıktan sonra agaroz jel elektroforezi yapılarak farklı genotiplerdeki bu enzim açısından kesme noktası polimorfizmi tespit edilmiştir. RE analizi sonucu 47 farklı genotipten, 600, 280 ve 200 bp olmak üzere 3 büyüklükte bant gözlenmiş olup polimorfik bant sayısı 2, monomorfik bant sayısı ise 1'dir (Tablo 4.1). cpDNA PZR-RFLP analizi ile %66 oranında polimorfizm tespit edilmiştir. Polimorfizm, 5 numaralı bireyde gözlenmiştir (Şekil 4.14).



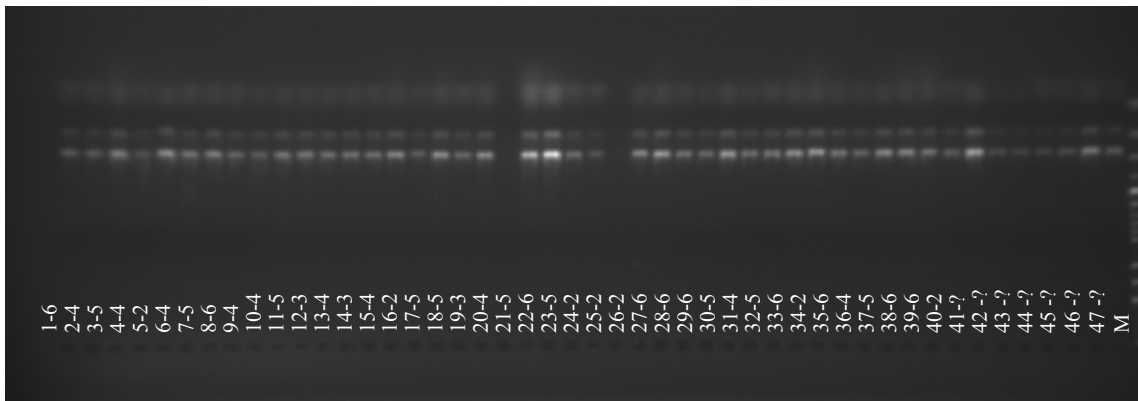
Şekil 4.14. *rbcL (f-r)* primeri PZR ürününün *EcoRI* enzimi ile kesimi sonucu agaroz jeldeki bant profilleri. M: 100-3000 bp DNA moleküler ağırlık belirteci.

***rbcl (f-r)* bölgesinin *MseI* enzimi ile restriksiyon analizi:** *rbcl* primerleri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerine *MseI* enzimi uygulandıktan sonra agaroz jel elektroforezi yapılarak farklı genotiplerdeki bu enzim açısından kesme noktası polimorfizmi tespit edilmiştir. RE analizi sonucu 47 farklı genotipten, 280, 120 ve 50 bp olmak üzere 3 büyüklükte bant gözlenmiş olup polimorfik bant sayısı 0, monomorfik bant sayısı ise 3'tür (Tablo 4.1). cpDNA PZR-RFLP analizi ile polimorfizm tespit edilmemiştir (Şekil 4.15).



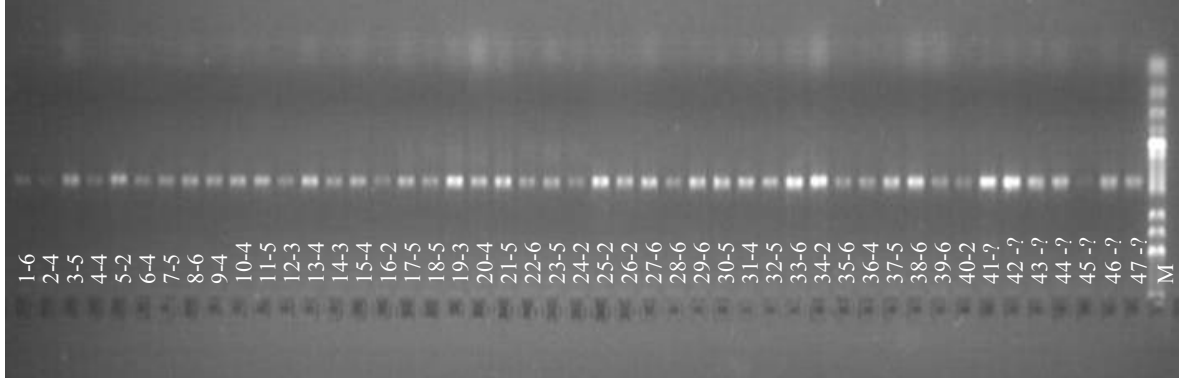
Şekil 4.15. *rbcl (f-r)* primeri PZR ürününün *MseI* enzimi ile kesimi sonucu agaroz jeldeki bant profilleri. M: 100-3000 bp DNA moleküler ağırlık belirteci.

***rbcl (f-r)* bölgesinin *TaqI* enzimi ile restriksiyon analizi:** *rbcl* primerleri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerine *TaqI* enzimi uygulandıktan sonra agaroz jel elektroforezi yapılarak farklı genotiplerdeki bu enzim açısından kesme noktası polimorfizmi tespit edilmiştir. RE analizi sonucu 47 farklı genotipten, 280 ve 180 bp olmak üzere 2 büyüklükte bant gözlenmiş olup polimorfik bant sayısı 0, monomorfik bant sayısı ise 2'dir (Tablo 4.1). cpDNA PZR-RFLP analizi ile polimorfizm tespit edilmemiştir (Şekil4.16).



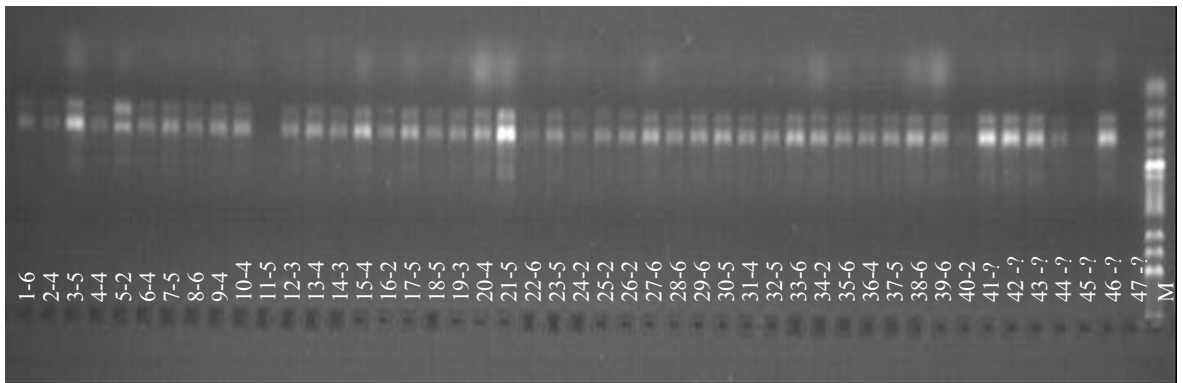
Şekil 4.16. *rbcl (f-r)* primeri PZR ürününün *TaqI* enzimi ile kesimi sonucu agaroz jeldeki bant profilleri. M: 100-3000 bp DNA moleküler ağırlık belirteci.

***rbcL* (f-r) bölgesinin *DraI* enzimi ile restriksiyon analizi:** *rbcL* primerleri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerine *DraI* enzimi uygulandıktan sonra agaroz jel elektroforezi yapılarak farklı genotiplerdeki bu enzim açısından kesme noktası polimorfizmi tespit edilmiştir. RE analizi sonucu 47 farklı genotipten, 900 bp olmak üzere 1 büyüklükte bant gözlenmiş olup polimorfik bant sayısı 0, monomorfik bant sayısı ise 1'dir (Tablo 4.1). cpDNA PZR-RFLP analizi ile polimorfizm tespit edilmemiştir (Şekil 4.17).



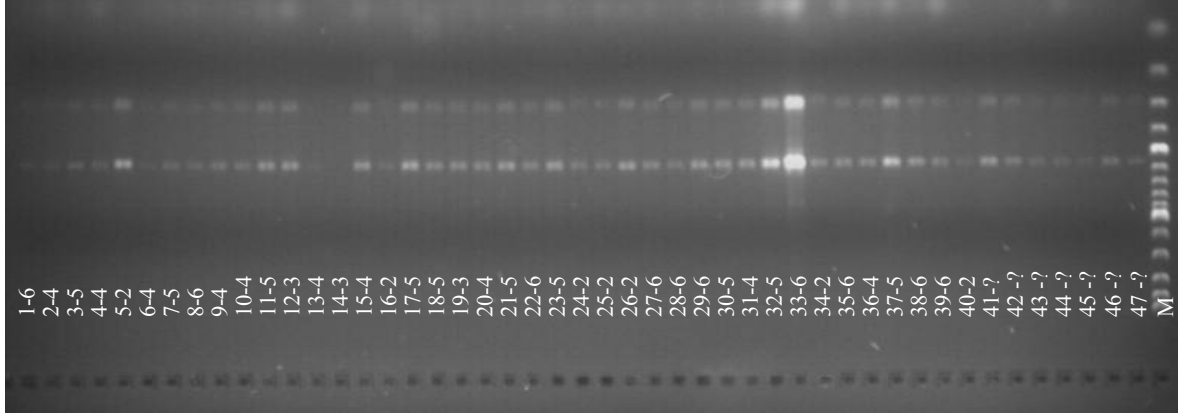
Şekil 4.17. *rbcL* (f-r) primeri PZR ürününün *DraI* enzimi ile kesimi sonucu agaroz jeldeki bant profilleri. M: 100-3000 bp DNA moleküler ağırlık belirteci.

***rbcL* (f-r) bölgesinin *HinIII* enzimi ile restriksiyon analizi:** *rbcL* primerleri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerine *HinIII* enzimi uygulandıktan sonra agaroz jel elektroforezi yapılarak farklı genotiplerdeki bu enzim açısından kesme noktası polimorfizmi tespit edilmiştir. RE analizi sonucu 47 farklı genotipten, 300 ve 200 bp olmak üzere 2 büyüklükte bant gözlenmiş olup polimorfik bant sayısı 0, monomorfik bant sayısı ise 2'dir (Tablo 4.1). cpDNA PZR-RFLP analizi ile polimorfizm tespit edilmemiştir (Şekil 4.18).



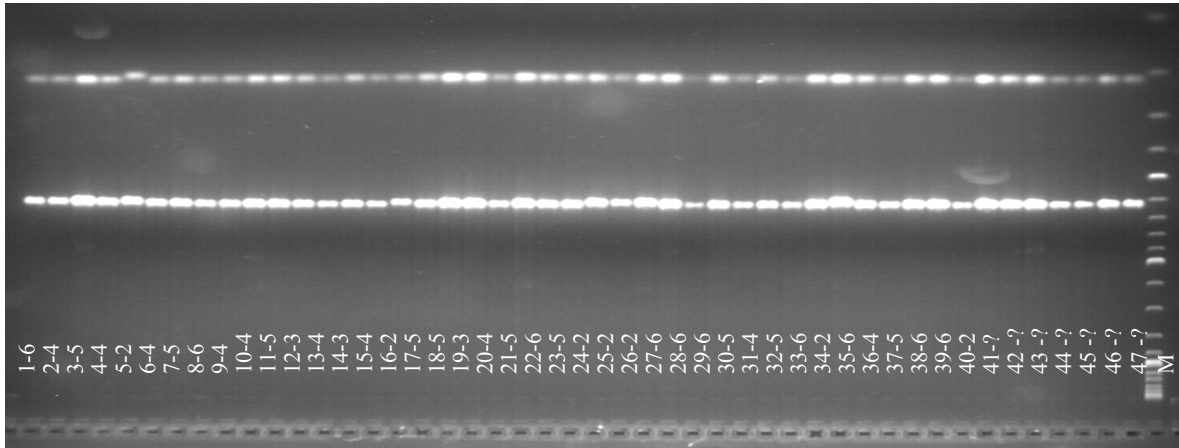
Şekil 4.18. *rbcL* (f-r) primeri PZR ürününün *HinIII* enzimi ile kesimi sonucu agaroz jeldeki bant profilleri. M: 100-3000 bp DNA moleküler ağırlık belirteci.

***rbcl (f-r)* bölgesinin *MboI* enzimi ile restriksiyon analizi:** *rbcl* primerleri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerine *MboI* enzimi uygulandıktan sonra agaroz jel elektroforezi yapılarak farklı genotiplerdeki bu enzim açısından kesme noktası polimorfizmi tespit edilmiştir. RE analizi sonucu 47 farklı genotipten, 600 ve 300 bp olmak üzere 2 büyüklükte bant gözlenmiş olup polimorfik bant sayısı 0, monomorfik bant sayısı ise 2'dir (Tablo 4.1). cpDNA PZR-RFLP analizi ile polimorfizm tespit edilmemiştir (Şekil 4.19).



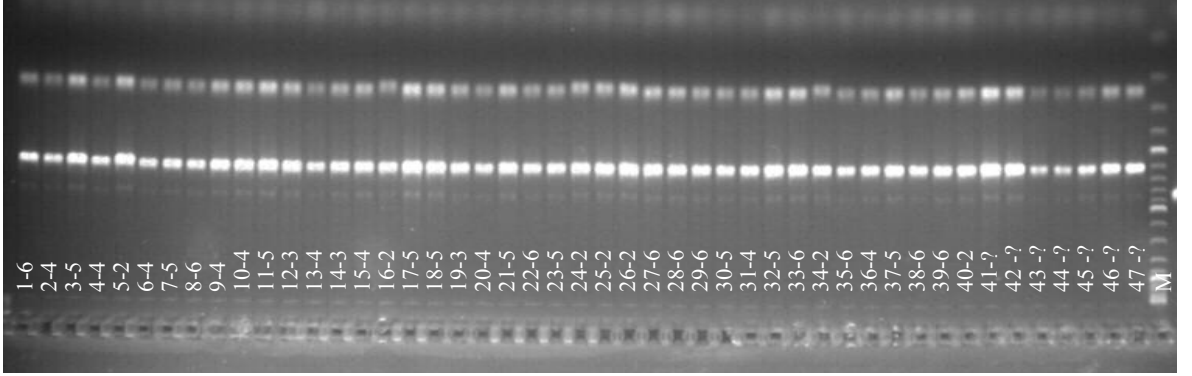
Şekil 4.19. *rbcl (f-r)* primeri PZR ürününün *MboI* enzimi ile kesimi sonucu agaroz jeldeki bant profilleri. M: 100-3000 bp DNA moleküler ağırlık belirteci.

***rbcl (f-r)* bölgesinin *RsaI* enzimi ile restriksiyon analizi:** *rbcl* primerleri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerine *RsaI* enzimi uygulandıktan sonra agaroz jel elektroforezi yapılarak farklı genotiplerdeki bu enzim açısından kesme noktası polimorfizmi tespit edilmiştir. RE analizi sonucu 47 farklı genotipten, 615, 610, 210 ve 200 bp olmak üzere 4 büyüklükte bant gözlenmiş olup polimorfik bant sayısı 4, monomorfik bant sayısı ise 0'dır (Tablo 4.1). cpDNA PZR-RFLP analizi ile %100 oranında polimorfizm tespit edilmiştir. Polimorfizm, 5 numaralı bireyde gözlenmiştir (Şekil 4.20).



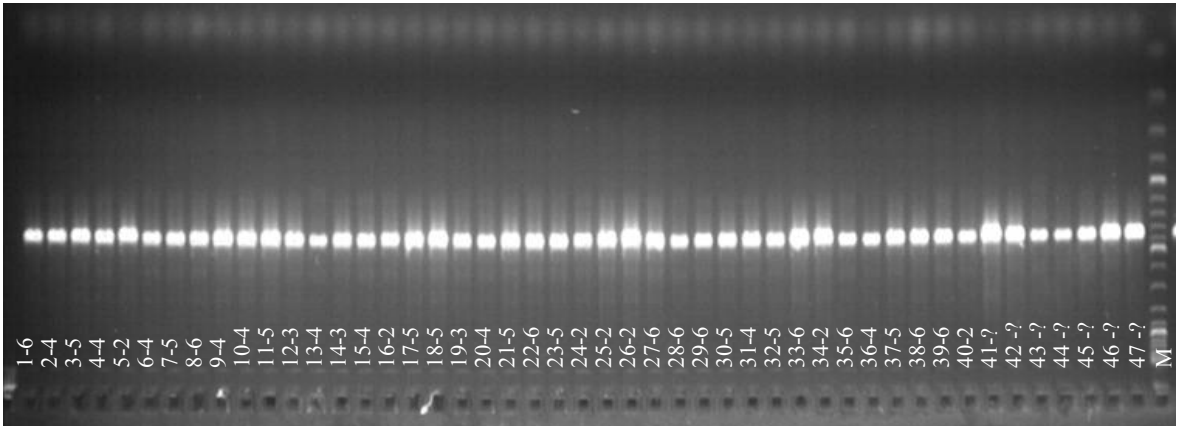
Şekil 4.20. *rbcl (f-r)* primeri PZR ürününün *RsaI* enzimi ile kesimi sonucu agaroz jeldeki bant profilleri. M:100-10000 bp DNA moleküler ağırlık belirteci.

***rbcL* (f-r) bölgesinin *MspI* enzimi ile restriksiyon analizi:** *rbcL* primerleri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerine *MspI* enzimi uygulandıktan sonra agaroz jel elektroforezi yapılarak farklı genotiplerdeki bu enzim açısından kesme noktası polimorfizmi tespit edilmiştir. RE analizi sonucu 47 farklı genotipten, 600 ve 250 bp olmak üzere 2 büyüklükte bant gözlenmiş olup polimorfik bant sayısı 0, monomorfik bant sayısı ise 2'dir (Tablo 4.1). cpDNA PZR-RFLP analizi ile polimorfizm tespit edilmemiştir (Şekil 4.21).



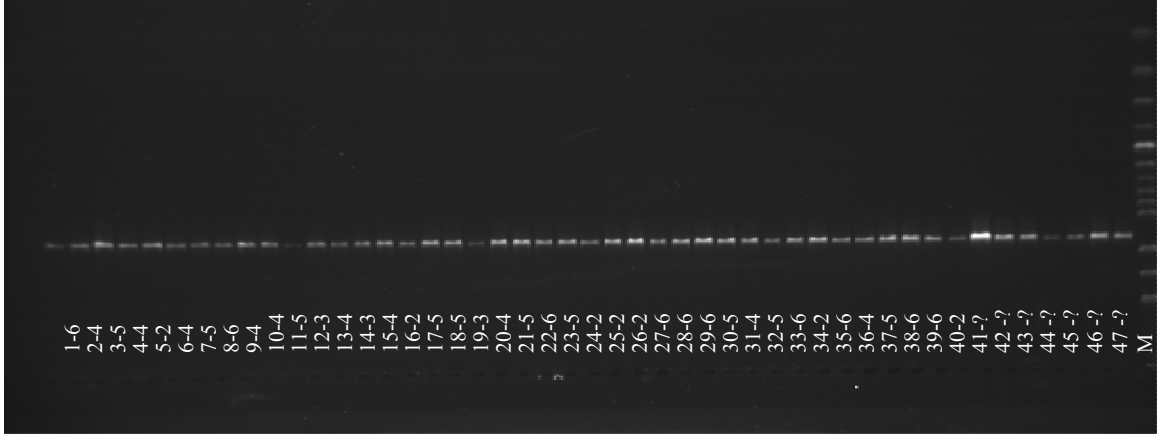
Şekil 4.21. *rbcL* (f-r) primeri PZR ürününün *MspI* enzimi ile kesimi sonucu agaroz jeldeki bant profilleri. M:100-10000 bp DNA moleküler ağırlık belirteci.

***rbcL* (f-r) bölgesinin *EcoRV* enzimi ile restriksiyon analizi:** *rbcL* primerleri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerine *EcoRV* enzimi uygulandıktan sonra agaroz jel elektroforezi yapılarak farklı genotiplerdeki bu enzim açısından kesme noktası polimorfizmi tespit edilmiştir. RE analizi sonucu 47 farklı genotipten, 900 bp olmak üzere 1 büyüklükte bant gözlenmiş olup polimorfik bant sayısı 0, monomorfik bant sayısı ise 1'dir (Tablo 4.1). cpDNA PZR-RFLP analizi ile polimorfizm tespit edilmemiştir (Şekil 4.22).



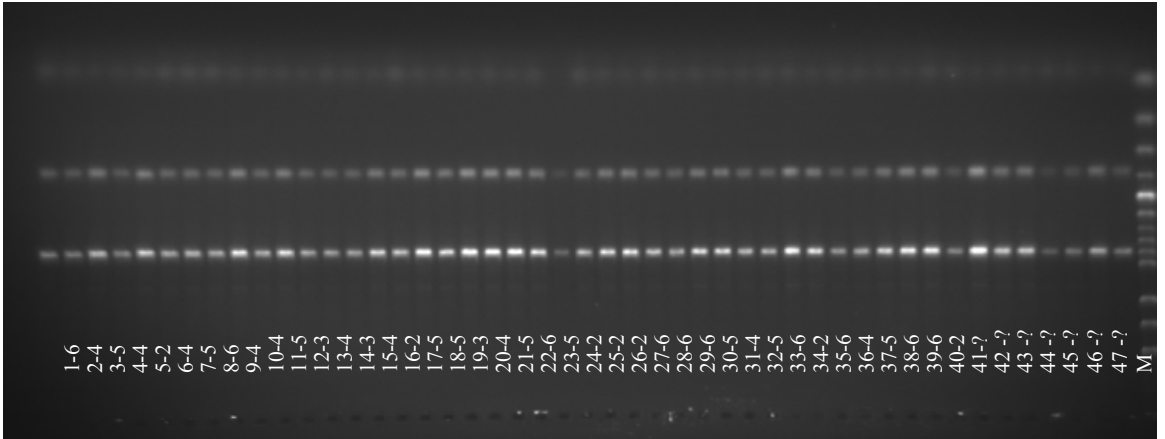
Şekil 4.22. *rbcL* (f-r) primeri PZR ürününün *EcoRV* enzimi ile kesimi sonucu agaroz jeldeki bant profilleri. M:100-10000 bp DNA moleküler ağırlık belirteci.

***TrnST* (f-r) primeri çifti ile amplifikasyon sonucu elde edilen PZR ürünü:** *TrnST* primeri kullanılarak yapılan PZR sonucunda tüm genotiplerde beklenen büyüklükte 1300 bp civarında PZR ürünü elde edilmiştir. Farklı genotiplerdeki cpDNA polimorfizmini tespit etmek için elde edilen PZR ürünlerine 10 farklı restriksiyon enzimi uygulanmıştır. Restriksiyon ürünlerinin agaroz jel elektroforezi yapılarak farklı genotiplerdeki kullanılan 10 enzim açısından kesme noktası polimorfizmi tespit edilmiştir (Şekil 4.23).



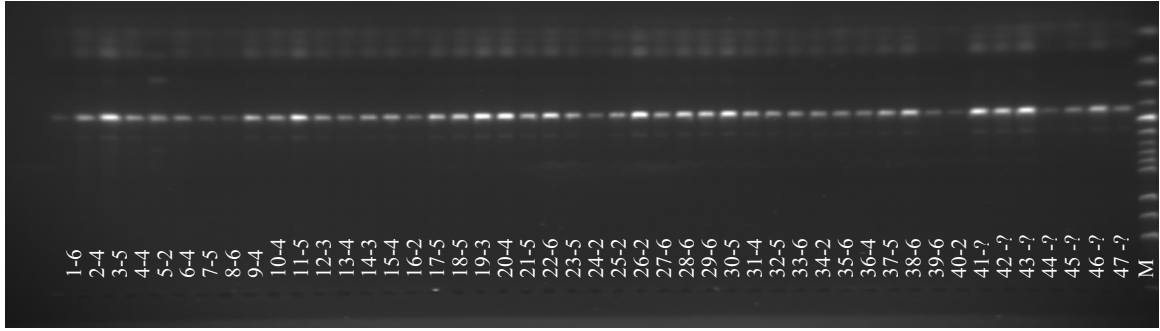
Şekil 4.23. *TrnST* (f-r) primeri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerinin agaroz jeldeki bant profilleri. M: 100-3000 bp DNA moleküler ağırlık belirteci.

***TrnST* (f-r) bölgesinin *DraI* enzimi ile restriksiyon analizi:** *TrnST* primerleri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerine *DraI* enzimi uygulandıktan sonra agaroz jel elektroforezi yapılarak farklı genotiplerdeki bu enzim açısından kesme noktası polimorfizmi tespit edilmiştir. RE analizi sonucu 47 farklı genotipten, 900 ve 400 bp olmak üzere 2 büyüklükte bant gözlenmiş olup polimorfik bant sayısı 0, monomorfik bant sayısı ise 2'dir (Tablo 4.1). cpDNA PZR-RFLP analizi ile polimorfizm tespit edilmemiştir (Şekil 4.24).



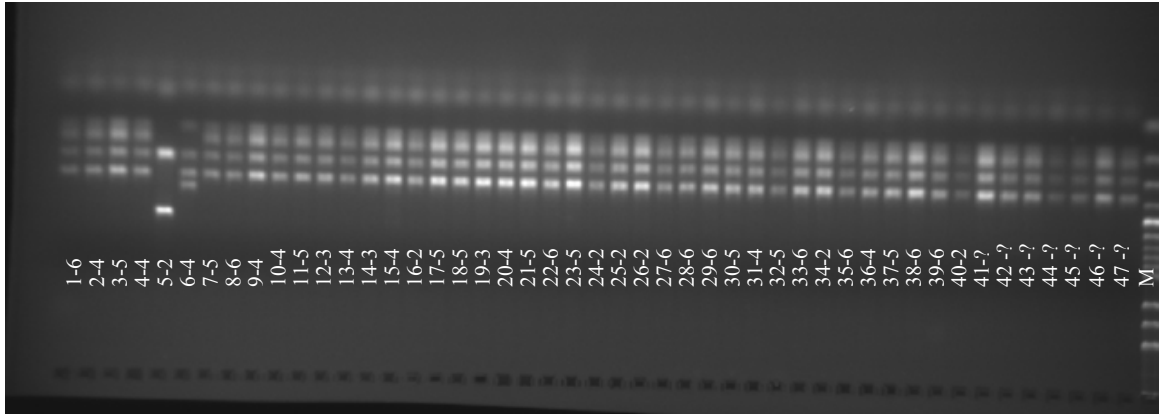
Şekil 4.24. *TrnST* (f-r) primeri PZR ürününün *DraI* enzimi ile kesimi sonucu agaroz jeldeki bant profilleri. M: 100-3000 bp DNA moleküler ağırlık belirteci.

***TrnST (f-r)* bölgesinin *MspI* enzimi ile restriksiyon analizi:** *TrnST* primerleri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerine *MspI* enzimi uygulandıktan sonra agaroz jel elektroforezi yapılarak farklı genotiplerdeki bu enzim açısından kesme noktası polimorfizmi tespit edilmiştir. RE analizi sonucu 47 farklı genotipten, 580, 420, 160 ve 140 bp olmak üzere 4 büyüklükte bant gözlenmiş olup polimorfik bant sayısı 1, monomorfik bant sayısı ise 3'tür (Tablo 4.1). cpDNA PZR-RFLP analizi ile %25 oranında polimorfizm tespit edilmiştir. Polimorfizm, 5 numaralı bireyde gözlenmiştir (Şekil 4.25).



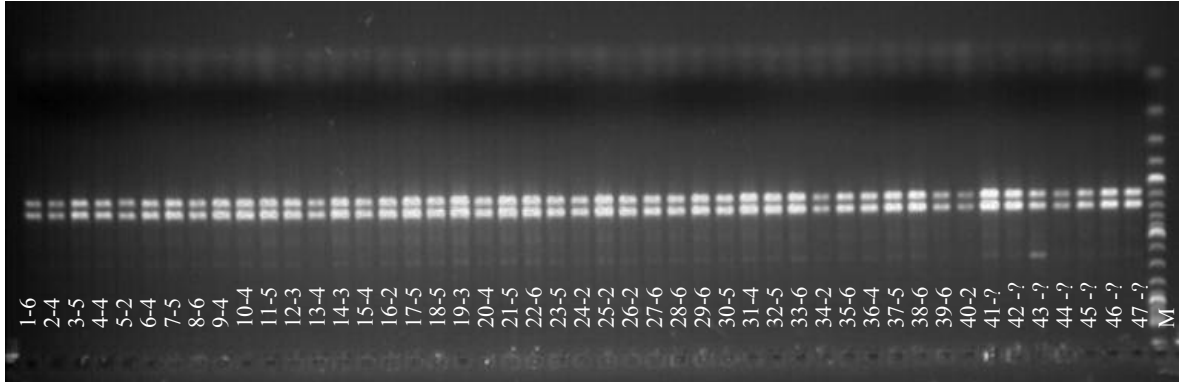
Şekil 4.25. *TrnST (f-r)* primeri PZR ürününün *MspI* enzimi ile kesimi sonucu agaroz jeldeki bant profilleri. M: 100-3000 bp DNA moleküler ağırlık belirteci.

***TrnST (f-r)* bölgesinin *TaqI* enzimi ile restriksiyon analizi:** *TrnST* primerleri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerine *TaqI* enzimi uygulandıktan sonra agaroz jel elektroforezi yapılarak farklı genotiplerdeki bu enzim açısından kesme noktası polimorfizmi tespit edilmiştir. RE analizi sonucu 47 farklı genotipten, 700, 450, 390, 290, 210 ve 190 olmak üzere 6 büyüklükte bant gözlenmiş olup polimorfik bant sayısı 5, monomorfik bant sayısı ise 1'dir (Tablo 4.1). cpDNA PZR-RFLP analizi ile %83 oranında polimorfizm tespit edilmiştir. Polimorfizm, 5 ve 6 numaralı bireylerde gözlenmiştir (Şekil 4.26).



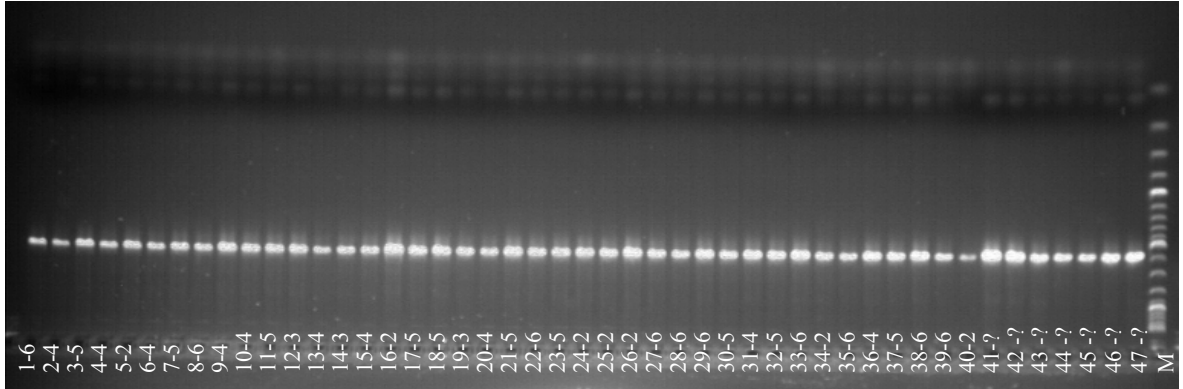
Şekil 4.26. *TrnST (f-r)* primeri PZR ürününün *TaqI* enzimi ile kesimi sonucu agaroz jeldeki bant profilleri. M: 100-3000 bp DNA moleküler ağırlık belirteci.

***TrnST (f-r)* bölgesinin *BsuRI* enzimi ile restriksiyon analizi:** *TrnST* primerleri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerine *BsuRI* enzimi uygulanarak analiz edilmiştir. Restriksiyon ürünlerinin agaroz jel elektroforezi yapılarak farklı genotiplerdeki bu enzim açısından kesme noktası polimorfizmi tespit edilmiştir. RE analizi sonucu 47 farklı genotipten, 700 ve 600 bp olmak üzere 2 büyüklükte bant gözlenmiş olup polimorfik bant sayısı 0, monomorfik bant sayısı ise 2'dir (Tablo 4.1). cpDNA PZR-RFLP analizi ile polimorfizm tespit edilmemiştir (Şekil 4.27).



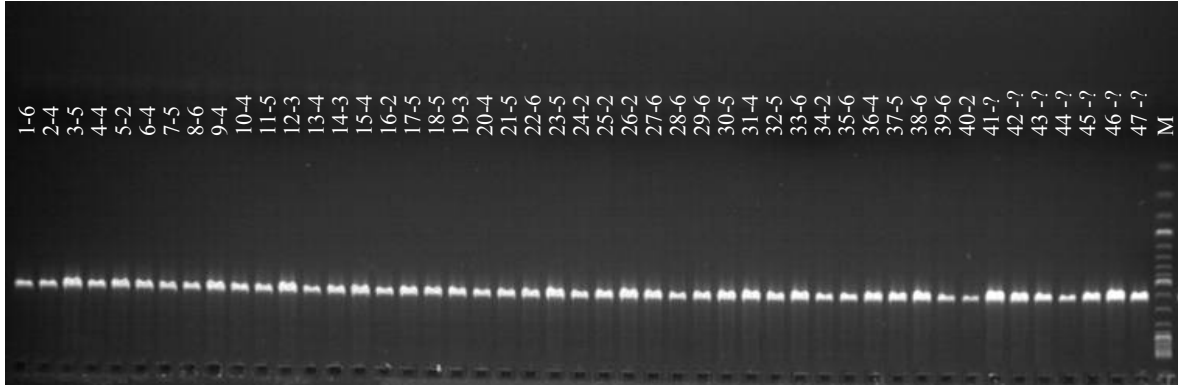
Şekil 4.27. *TrnST (f-r)* primeri PZR ürününün *BsuRI* enzimi ile kesimi sonucu agaroz jeldeki bant profilleri. M:100-10000 bp DNA moleküler ağırlık belirteci.

***TrnST (f-r)* bölgesinin *EcoRI* enzimi ile restriksiyon analizi:** *TrnST* primerleri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerine *EcoRI* enzimi uygulandıktan sonra agaroz jel elektroforezi yapılarak farklı genotiplerdeki bu enzim açısından kesme noktası polimorfizmi tespit edilmiştir. RE analizi sonucu 47 farklı genotipten, 1180 ve 120 bp olmak üzere 2 büyüklükte bant gözlenmiş olup polimorfik bant sayısı 0, monomorfik bant sayısı ise 2'dir (Tablo 4.1). cpDNA PZR-RFLP analizi ile polimorfizm tespit edilmemiştir (Şekil 4.28).



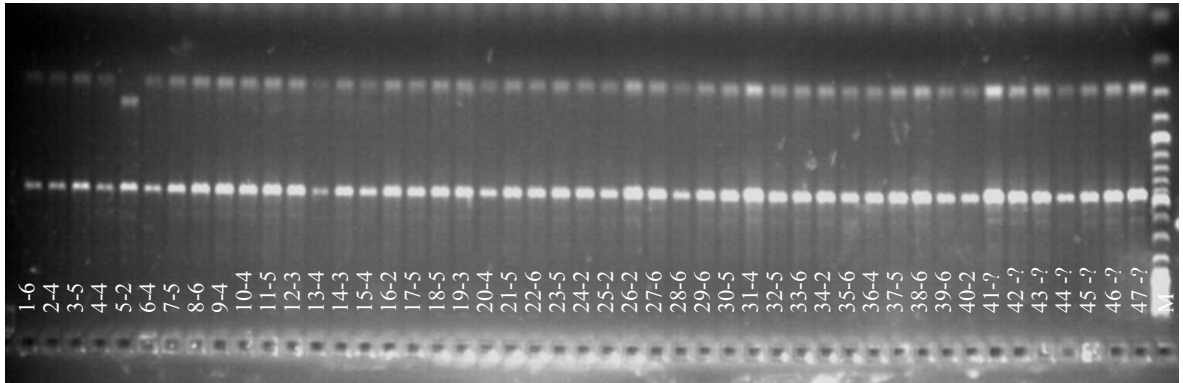
Şekil 4.28. *TrnST (f-r)* primeri PZR ürününün *EcoRI* enzimi ile kesimi sonucu agaroz jeldeki bant profilleri. M: 100-3000 bp DNA moleküler ağırlık belirteci.

***TrnST (f-r)* bölgesinin *EcoRV* enzimi ile restriksiyon analizi:** *TrnST* primerleri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerine *EcoRV* enzimi uygulandıktan sonra agaroz jel elektroforezi yapılarak farklı genotiplerdeki bu enzim açısından kesme noktası polimorfizmi tespit edilmiştir. RE analizi sonucu 47 farklı genotipten, 1300 bp olmak üzere 1 büyüklükte bant gözlenmiş olup polimorfik bant sayısı 0, monomorfik bant sayısı ise 1'dir (Tablo 4.1). cpDNA PZR-RFLP analizi ile polimorfizm tespit edilmemiştir (Şekil 4.29).



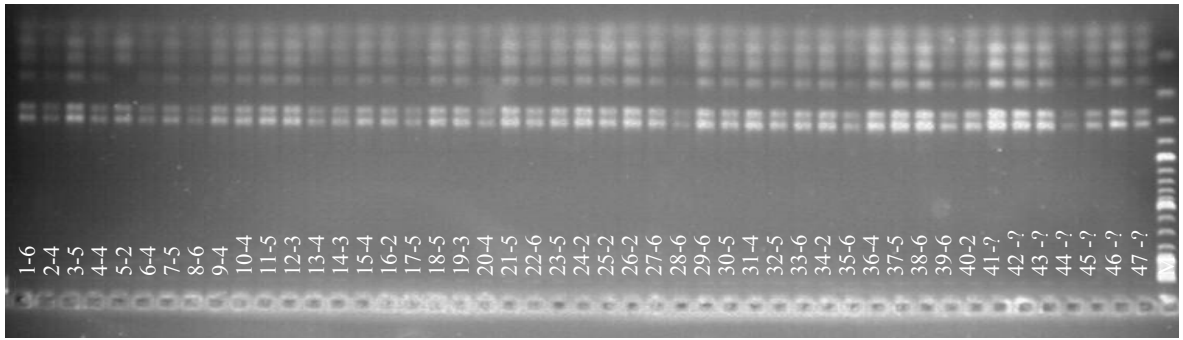
Şekil 4.29. *TrnST (f-r)* primeri PZR ürününün *EcoRV* enzimi ile kesimi sonucu agaroz jeldeki bant profilleri. M: 100-3000 bp DNA moleküler ağırlık belirteci.

***TrnST (f-r)* bölgesinin *HinIII* enzimi ile restriksiyon analizi:** *TrnST* primerleri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerine *HinIII* enzimi uygulandıktan sonra agaroz jel elektroforezi yapılarak farklı genotiplerdeki bu enzim açısından kesme noktası polimorfizmi tespit edilmiştir. RE analizi sonucu 47 farklı genotipten, 920, 280 ve 180 bp olmak üzere 3 büyüklükte bant gözlenmiş olup polimorfik bant sayısı 2, monomorfik bant sayısı ise 1'dir (Tablo 4.1). cpDNA PZR-RFLP analizi ile %66 oranında polimorfizm tespit edilmiştir. Polimorfizm, 5 numaralı bireyde gözlenmiştir (Şekil 4.30).



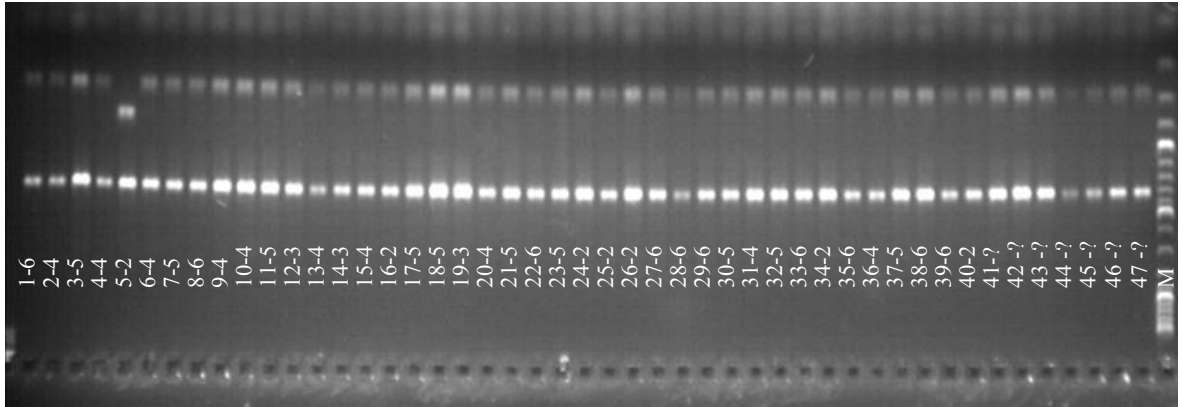
Şekil 4.30. *TrnST (f-r)* primeri PZR ürününün *HinIII* enzimi ile kesimi sonucu agaroz jeldeki bant profilleri. M: 100-10000 bp DNA moleküler ağırlık belirteci.

***TrnST (f-r)* bölgesinin *MseI* enzimi ile restriksiyon analizi:** *TrnST* primerleri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerine *MseI* enzimi uygulanarak analiz edilmiştir. Restriksiyon ürünlerinin agaroz jel elektroforezi yapılarak farklı genotiplerdeki bu enzim açısından kesme noktası polimorfizmi tespit edilmiştir. RE analizi sonucu 47 farklı genotipten, 310, 290, 180, 130 ve 50 bp olmak üzere 5 büyüklükte bant gözlenmiş olup polimorfik bant sayısı 1, monomorfik bant sayısı ise 4'tür (Tablo 4.1). cpDNA PZR-RFLP analizi ile %25 oranında polimorfizm tespit edilmiştir. Polimorfizm, 5 numaralı bireyde gözlenmiştir (Şekil 4.31).



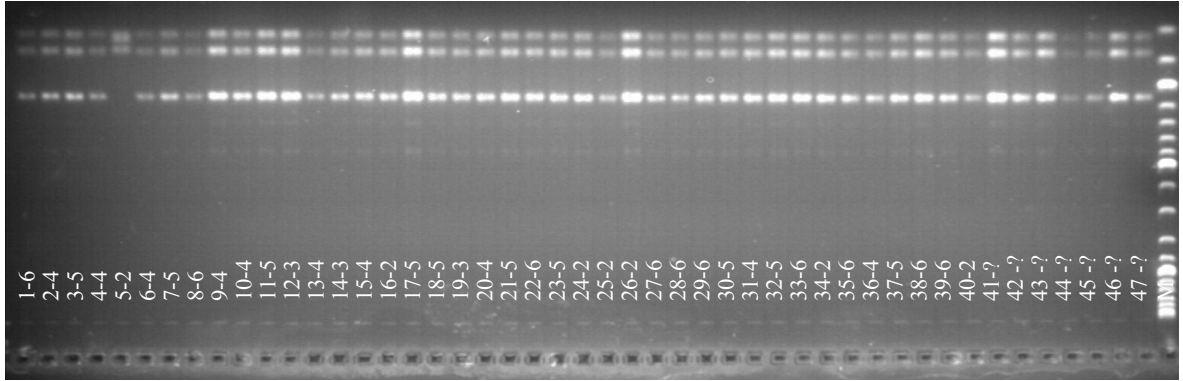
Şekil 4.31. *TrnST (f-r)* primeri PZR ürününün *MseI* enzimi ile kesimi sonucu agaroz jeldeki bant profilleri. M:100-10000 bp DNA moleküler ağırlık belirteci.

***TrnST (f-r)* bölgesinin *MboI* enzimi ile restriksiyon analizi:** *TrnST* primerleri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerine *MboI* enzimi uygulandıktan sonra agaroz jel elektroforezi yapılarak farklı genotiplerdeki bu enzim açısından kesme noktası polimorfizmi tespit edilmiştir. RE analizi sonucu 47 farklı genotipten, 800, 400 ve 280 bp olmak üzere 3 bant elde edilmiştir. Polimorfik bant sayısı 2, monomorfik bant sayısı ise 1'dir (Tablo 4.1). cpDNA PZR-RFLP analizi ile %66 oranında polimorfizm tespit edilmiştir. Polimorfizm, 5 numaralı bireyde gözlenmiştir (Şekil 4.32).



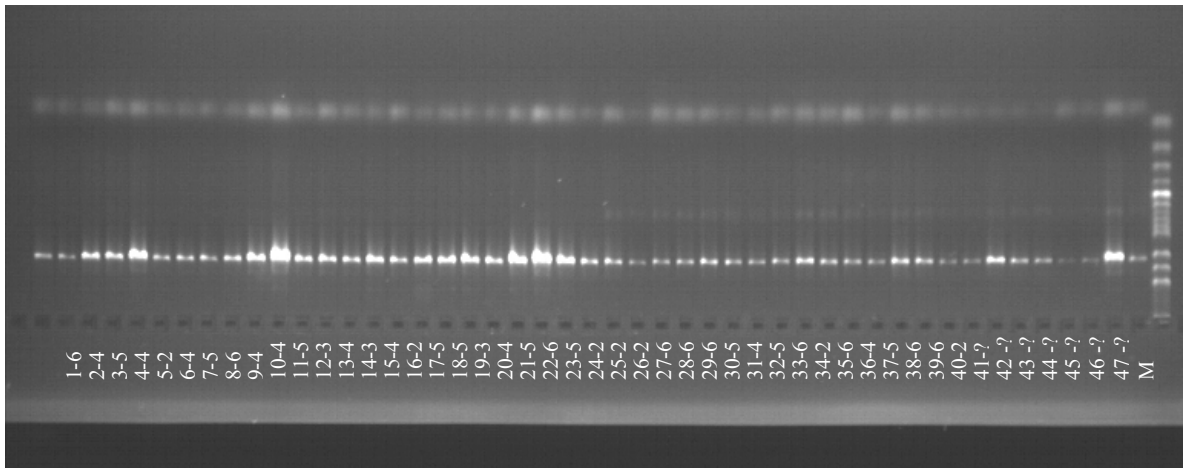
Şekil 4.32. *TrnST (f-r)* primeri PZR ürününün *MboI* enzimi ile kesimi sonucu agaroz jeldeki bant profilleri. M:100-10000 bp DNA moleküler ağırlık belirteci.

***TrnST (f-r)* bölgesinin *RsaI* enzimi ile restriksiyon analizi:** *TrnST* primerleri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerine *RsaI* enzimi uygulandıktan sonra agaroz jel elektroforezi yapılarak farklı genotiplerdeki bu enzim açısından kesme noktası polimorfizmi tespit edilmiştir. RE analizi sonucu 47 farklı genotipten, 570, 390, 340 ve 320 bp olmak üzere 4 büyüklükte bant gözlenmiş olup polimorfik bant sayısı 2, monomorfik bant sayısı ise 2'dir (Tablo 4.1). cpDNA PZR-RFLP analizi ile %50 oranında polimorfizm tespit edilmiştir. Polimorfizm, 5 numaralı bireyde gözlenmiştir (Şekil 4.33).



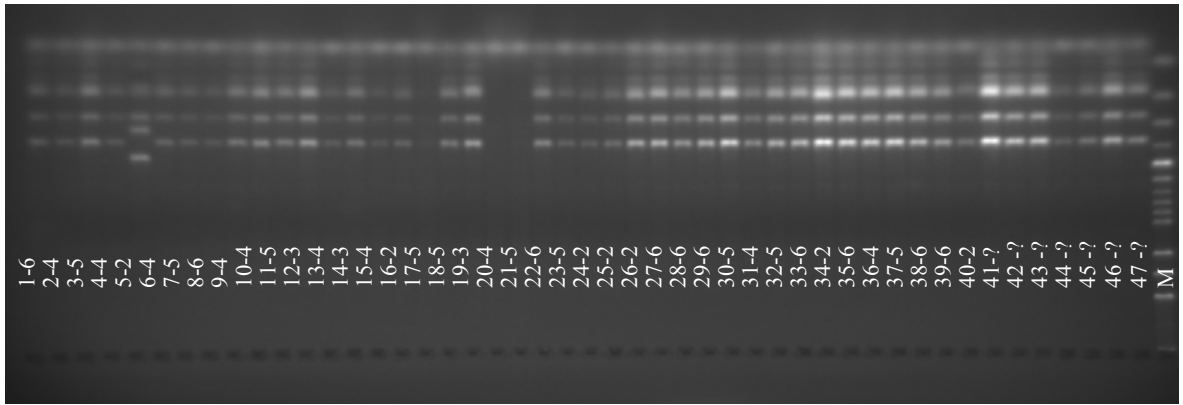
Şekil 4.33. *TrnST (f-r)* primeri PZR ürününün *RsaI* enzimi ile kesimi sonucu agaroz jeldeki bant profilleri. M:100-10000 bp DNA moleküler ağırlık belirteci.

***Psb-TrnS (f-r)* primeri çifti ile amplifikasyon sonucu elde edilen PZR ürünü:** *Psb-TrnS(f-r)* primeri kullanılarak yapılan PZR sonucunda tüm genotiplerde beklenen büyüklükte 1600 bp civarında PZR ürünü elde edilmiştir. Farklı genotiplerdeki cpDNA polimorfizmini tespit etmek için elde edilen PZR ürünlerine 10 farklı restriksiyon enzimi uygulanmıştır. Restriksiyon ürünlerinin agaroz jel elektroforezi yapılarak farklı genotiplerdeki kullanılan 10 enzim açısından kesme noktası polimorfizmi tespit edilmiştir (Şekil 4.34).



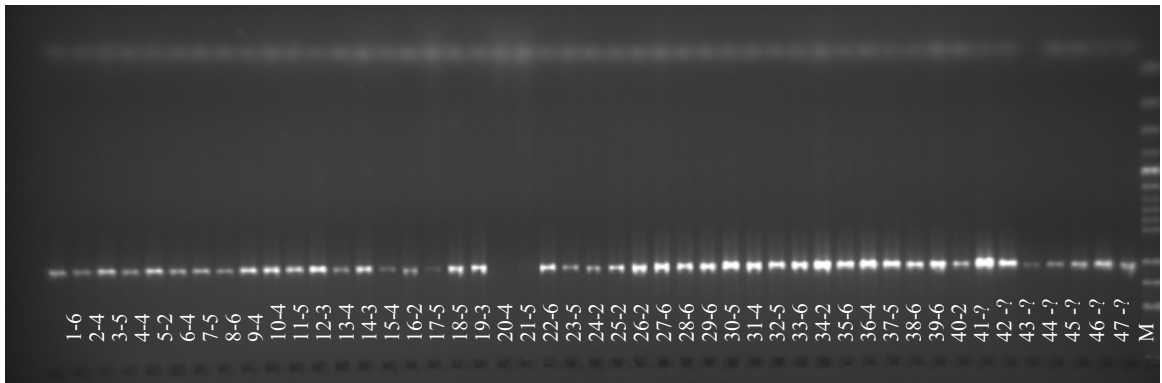
Şekil 4.34. *Psb-TrnS (f-r)* primeri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerinin agaroz jeldeki bant profilleri. M:100-3000 bp DNA moleküler ağırlık belirteci.

***Psb-TrnS (f-r)* bölgesinin *MseI* enzimi ile restriksiyon analizi:** *Psb-TrnS* primerleri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerine *MseI* enzimi uygulandıktan sonra agaroz jel elektroforezi yapılarak farklı genotiplerdeki bu enzim açısından kesme noktası polimorfizmi tespit edilmiştir. RE analizi sonucu 47 farklı genotipten, 420, 380, 320, 280, 180, 150 ve 100 bp olmak üzere 7 büyüklükte bant gözlenmiş olup polimorfik bant sayısı 4, monomorfik bant sayısı ise 3'tür (Tablo 4.1). cpDNA PZR-RFLP analizi ile %57 oranında polimorfizm tespit edilmiştir. Polimorfizm, 5 numaralı bireyde gözlenmiştir. 5 numaralı birey polimorfizm göstermiştir (Şekil 4.35).



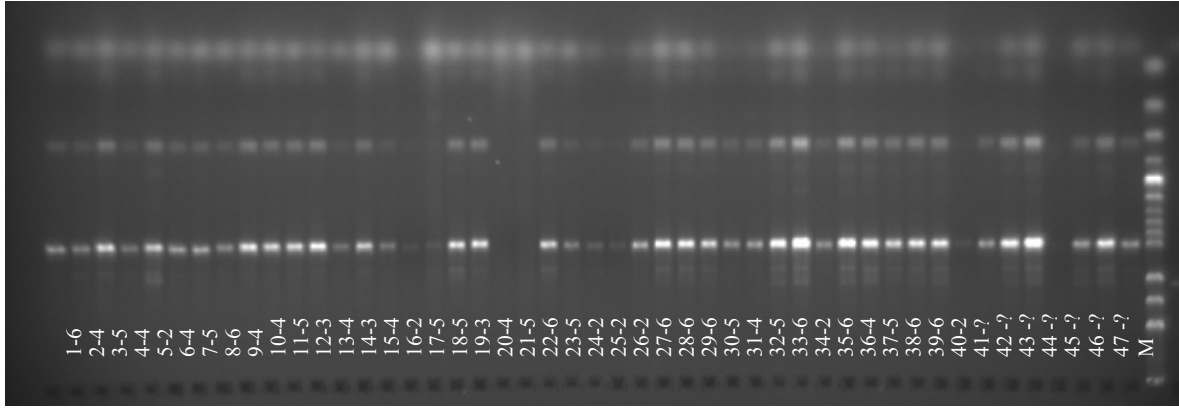
Şekil 4.35. *Psb-TrnS (f-r)* primeri PZR ürününün *MseI* enzimi ile kesimi sonucu agaroz jeldeki bant profilleri. M:100-10000bp DNA moleküler ağırlık belirteci.

***Psb-TrnS (f-r)* bölgesinin *TaqI* enzimi ile restriksiyon analizi:** *Psb-TrnS* primerleri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerine *TaqI* enzimi uygulandıktan sonra agaroz jel elektroforezi yapılarak farklı genotiplerdeki bu enzim açısından kesme noktası polimorfizmi tespit edilmiştir. RE analizi sonucu 47 farklı genotipten, 1600 bp olmak üzere 1 büyüklükte bant gözlenmiş olup polimorfik bant sayısı 0, monomorfik bant sayısı ise 1'dir (Tablo 4.1). cpDNA PZR-RFLP analizi ile polimorfizm tespit edilmemiştir (Şekil 4.36).



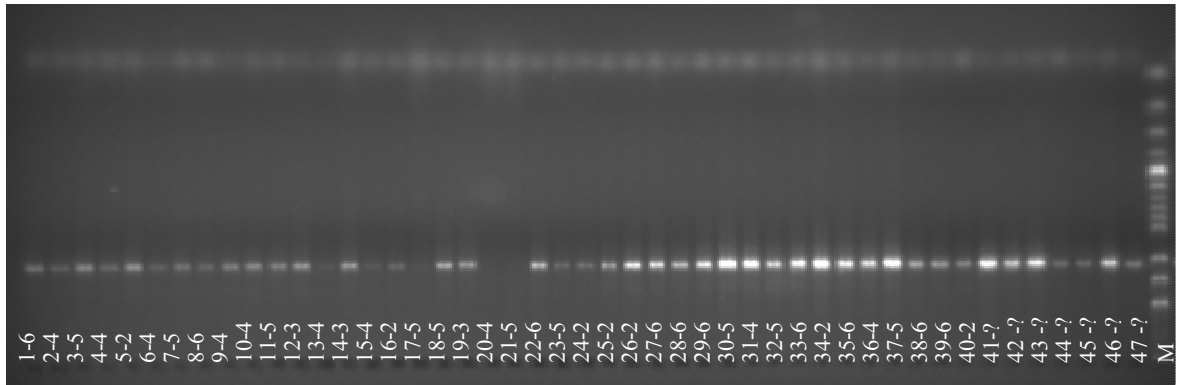
Şekil 4.36. *Psb-TrnS (f-r)* primeri PZR ürününün *TaqI* enzimi ile kesimi sonucu agaroz jeldeki bant profilleri. M:100-3000 bp DNA moleküler ağırlık belirteci.

***Psb-TrnS (f-r)* bölgesinin *MspI* enzimi ile restriksiyon analizi:** *Psb-TrnS* primerleri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerine *MspI* enzimi uygulandıktan sonra agaroz jel elektroforezi yapılarak farklı genotiplerdeki bu enzim açısından kesme noktası polimorfizmi tespit edilmiştir. RE analizi sonucu 47 farklı genotipten, 1000 ve 300 bp olmak üzere 2 büyüklükte bant gözlenmiş olup polimorfik bant sayısı 0, monomorfik bant sayısı ise 1'dir (Tablo 4.1). cpDNA PZR-RFLP analizi ile polimorfizm tespit edilmemiştir (Şekil 4.37).



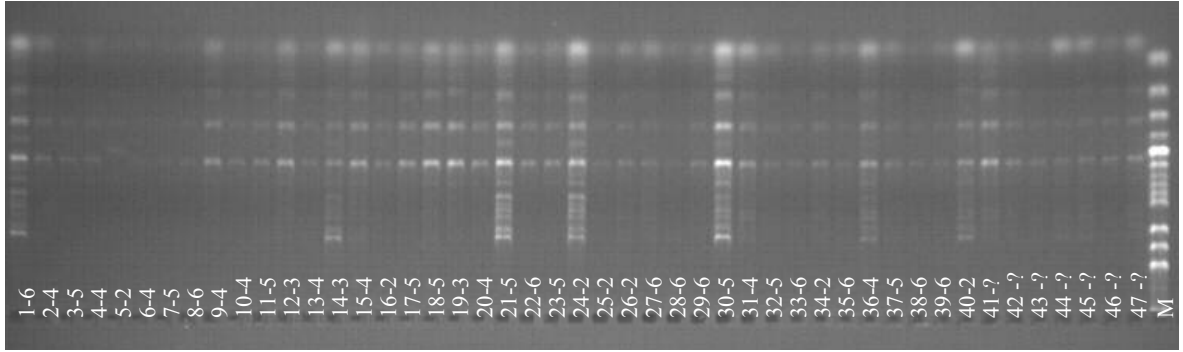
Şekil 4.37. *Psb-TrnS (f-r)* primeri PZR ürününün *MspI* enzimi ile kesimi sonucu agaroz jeldeki bant profilleri. M: 100-3000 bp DNA moleküler ağırlık belirteci.

***Psb-TrnS (f-r)* bölgesinin *EcoRI* enzimi ile restriksiyon analizi:** *Psb-TrnS* primerleri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerine *EcoRI* enzimi uygulandıktan sonra agaroz jel elektroforezi yapılarak farklı genotiplerdeki bu enzim açısından kesme noktası polimorfizmi tespit edilmiştir. RE analizi sonucu 47 farklı genotipten, 1600 bp olmak üzere 1 büyüklükte bant gözlenmiş olup polimorfik bant sayısı 0, monomorfik bant sayısı ise 1'dir (Tablo 4.1). cpDNA PZR-RFLP analizi ile polimorfizm tespit edilmemiştir (Şekil 4.38).



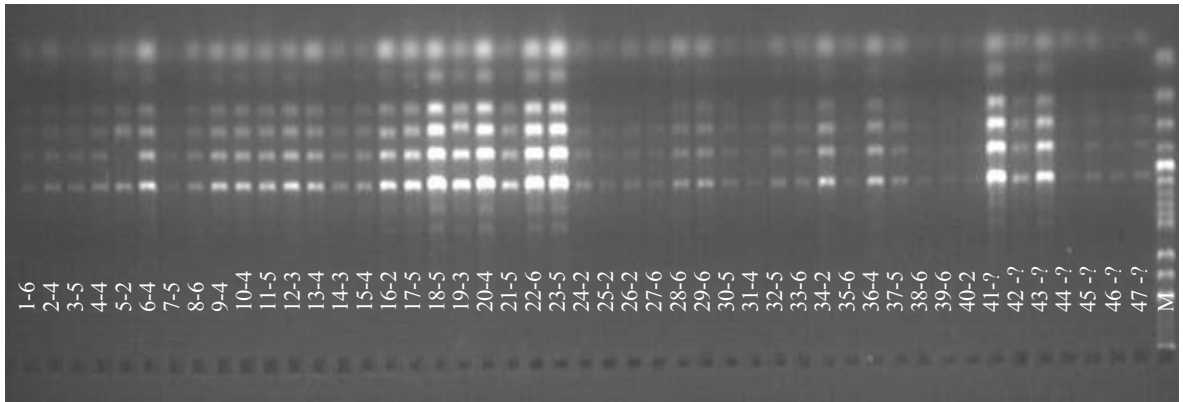
Şekil 4.38. *Psb-TrnS (f-r)* primeri PZR ürününün *EcoRI* enzimi ile kesimi sonucu agaroz jeldeki bant profilleri. M: 100-3000 bp DNA moleküler ağırlık belirteci.

***Psb-TrnS (f-r)* bölgesinin *HinIII* enzimi ile restriksiyon analizi:** *Psb-TrnS* primerleri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerine *HinIII* enzimi uygulandıktan sonra agaroz jel elektroforezi yapılarak farklı genotiplerdeki bu enzim açısından kesme noktası polimorfizmi tespit edilmiştir. RE analizi sonucu 47 farklı genotipten, 550, 500, 300 ve 200 bp olmak üzere 4 büyüklükte bant gözlenmiş olup polimorfik bant sayısı 2, monomorfik bant sayısı ise 2'dir (Tablo 4.1). cpDNA PZR-RFLP analizi ile %50 oranında polimorfizm tespit edilmiştir. Polimorfizm, 5 numaralı bireyde gözlenmiştir (Şekil 4.39).



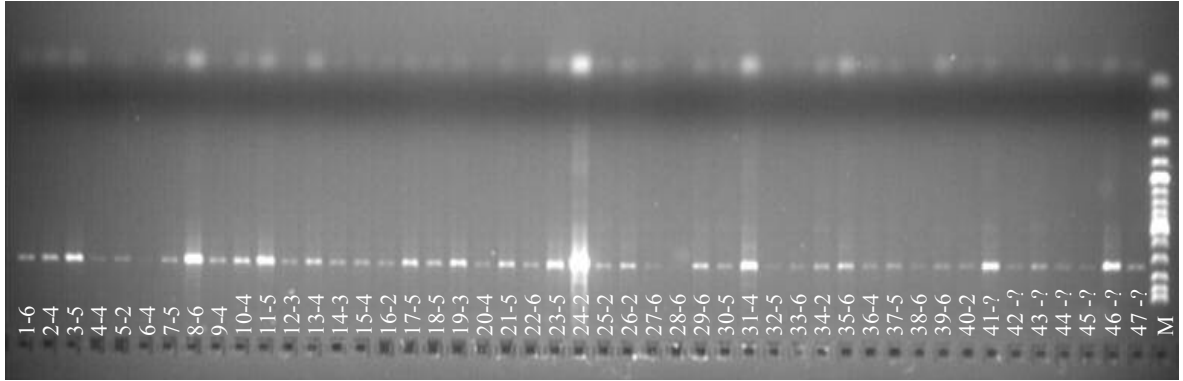
Şekil 4.39. *Psb-TrnS (f-r)* primeri PZR ürününün *HinIII* enzimi ile kesimi sonucu agaroz jeldeki bant profilleri. M: 100-3000 bp DNA moleküler ağırlık belirteci.

***Psb-TrnS (f-r)* bölgesinin *BsuRI* enzimi ile restriksiyon analizi:** *Psb-TrnS* primerleri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerine *BsuRI* enzimi uygulandıktan sonra agaroz jel elektroforezi yapılarak farklı genotiplerdeki bu enzim açısından kesme noktası polimorfizmi tespit edilmiştir. RE analizi sonucu 47 farklı genotipten, 600, 400, 300 ve 200 bp olmak üzere 4 büyüklükte bant gözlenmiş olup polimorfik bant sayısı 1, monomorfik bant sayısı ise 4'tür (Tablo 4.1). cpDNA PZR-RFLP analizi ile %20 polimorfizm tespit edilmiştir. Polimorfizm, 5 numaralı bireyde gözlenmiştir (Şekil 4.40).



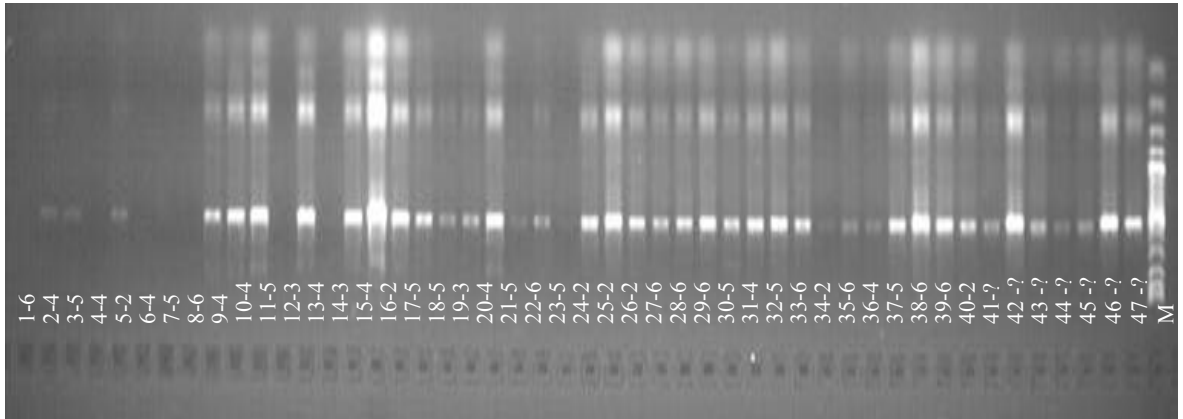
Şekil 4.40. *Psb-TrnS (f-r)* primeri PZR ürününün *BsuRI* enzimi ile kesimi sonucu agaroz jeldeki bant profilleri. M: 100-3000 bp DNA moleküler ağırlık belirteci.

***Psb-TrnS (f-r)* bölgesinin *EcoRV* enzimi ile restriksiyon analizi:** *Psb-TrnS* primerleri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerine *EcoRV* enzimi uygulandıktan sonra agaroz jel elektroforezi yapılarak farklı genotiplerdeki bu enzim açısından kesme noktası polimorfizmi tespit edilmiştir. RE analizi sonucu 47 farklı genotipten, 1600 bp olmak üzere 1 büyüklükte bant gözlenmiş olup polimorfik bant sayısı 0, monomorfik bant sayısı ise 1'dir (Tablo 4.1). cpDNA PZR-RFLP analizi ile polimorfizm tespit edilmemiştir (Şekil 4.41).



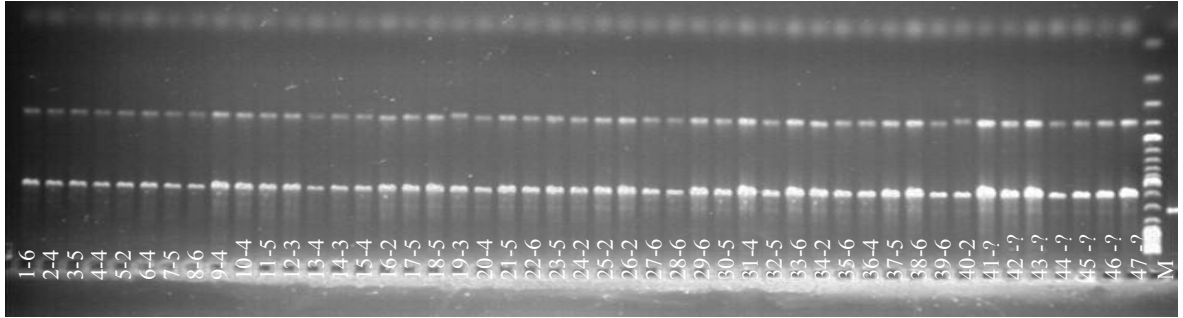
Şekil 4.41. *Psb-TrnS (f-r)* primeri PZR ürününün *EcoRV* enzimi ile kesimi sonucu agaroz jeldeki bant profilleri. M: 100-3000 bp DNA moleküler ağırlık belirteci.

***Psb-TrnS (f-r)* bölgesinin *MboI* enzimi ile restriksiyon analizi:** *Psb-TrnS* primerleri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerine *MboI* enzimi uygulandıktan sonra agaroz jel elektroforezi yapılarak farklı genotiplerdeki bu enzim açısından kesme noktası polimorfizmi tespit edilmiştir. RE analizi sonucu 47 farklı genotipten, 1000 ve 280 bp olmak üzere 2 büyüklükte bant gözlenmiş olup polimorfik bant sayısı 0, monomorfik bant sayısı ise 2'dir (Tablo 4.1). cpDNA PZR-RFLP analizi ile polimorfizm tespit edilmemiştir (Şekil 4.42).



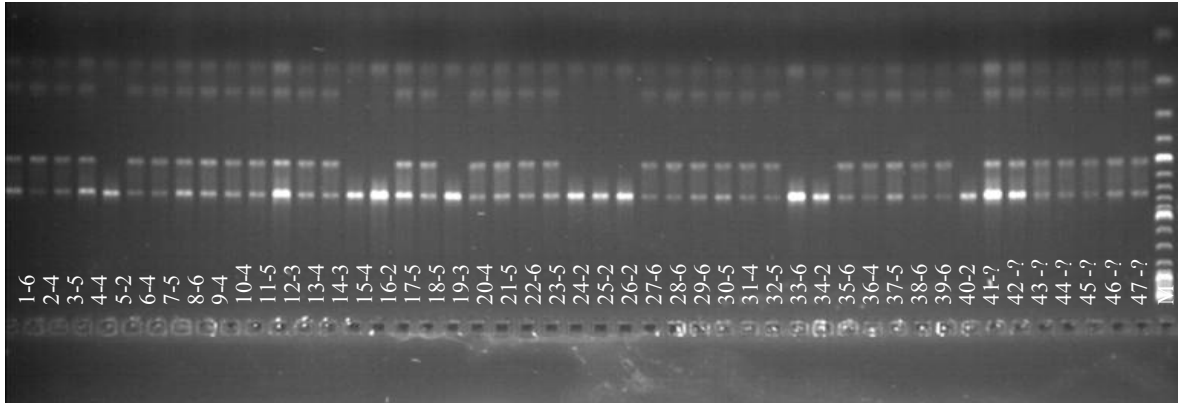
Şekil 4.42. *Psb-TrnS (f-r)* primeri PZR ürününün *MboI* enzimi ile kesimi sonucu agaroz jeldeki bant profilleri. M: 100-3000 bp DNA moleküler ağırlık belirteci.

***Psb-TrnS (f-r)* bölgesinin *DraI* enzimi ile restriksiyon analizi:** *Psb-TrnS* primerleri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerine *DraI* enzimi uygulandıktan sonra agaroz jel elektroforezi yapılarak farklı genotiplerdeki bu enzim açısından kesme noktası polimorfizmi tespit edilmiştir. RE analizi sonucu 47 farklı genotipten, 1200 , ve 400 bp olmak üzere 2 büyüklükte bant gözlenmiş olup polimorfik bant sayısı 0, monomorfik bant sayısı ise 2'dir (Tablo 4.1). cpDNA PZR-RFLP analizi ile polimorfizm tespit edilmemiştir (Şekil 4.43).



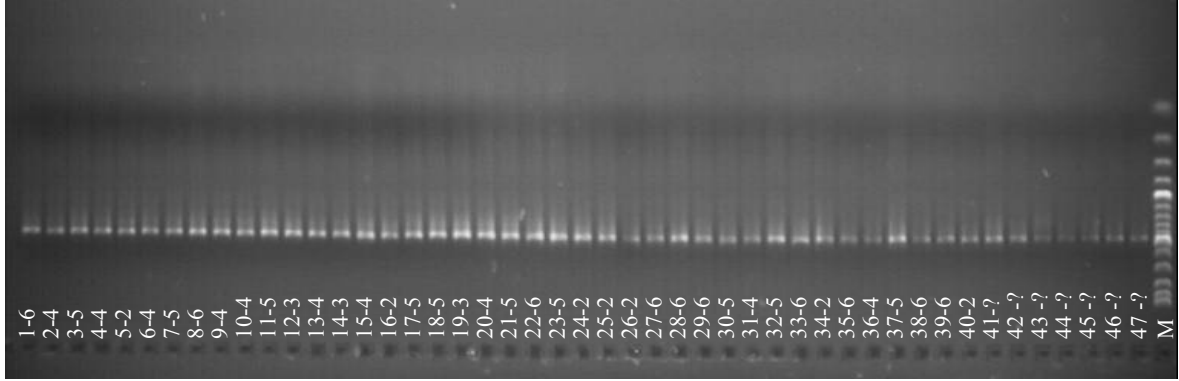
Şekil 4.43. *Psb-TrnS (f-r)* primeri PZR ürününün *DraI* enzimi ile kesimi sonucu agaroz jeldeki bant profilleri. M:100-3000 bp DNA moleküler ağırlık belirteci.

***Psb-TrnS (f-r)* bölgesinin *RsaI* enzimi ile restriksiyon analizi:** *Psb-TrnS* primerleri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerine *RsaI* enzimi uygulandıktan sonra agaroz jel elektroforezi yapılarak farklı genotiplerdeki bu enzim açısından kesme noktası polimorfizmi tespit edilmiştir. RE analizi sonucu 47 farklı genotipten, 750, 500, 210 ve 180 bp olmak üzere 4 büyüklükte bant gözlenmiş olup polimorfik bant sayısı 2, monomorfik bant sayısı ise 2'dir (Tablo 4.1). cpDNA PZR-RFLP analizi ile %50 oranında polimorfizm tespit edilmiştir. Polimorfizm, diploid oldukları bilinen 5, 15, 16, 24, 25, 26, 33, 34 ve 40 numaralı bireylerde gözlenmiştir (Şekil 4.44).



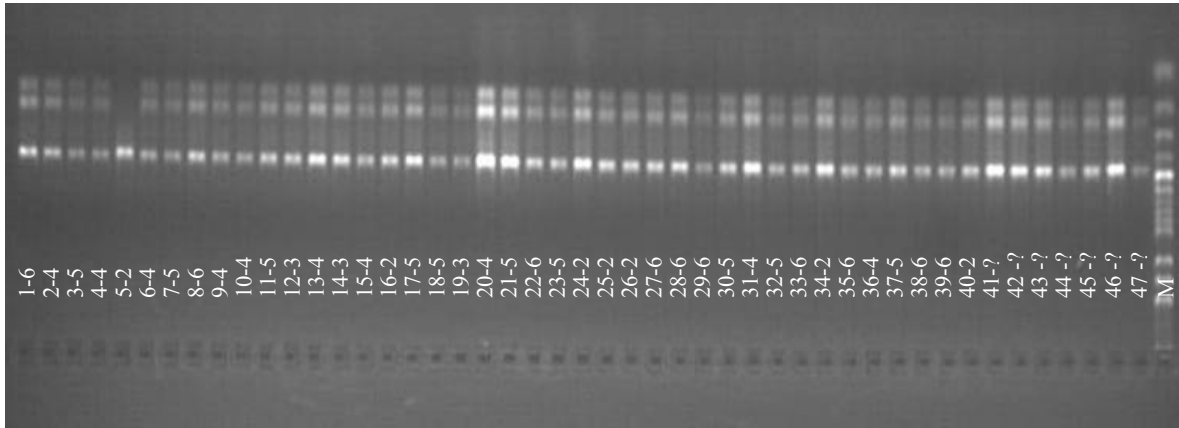
Şekil 4.44. *Psb-TrnS (f-r)* primeri PZR ürününün *RsaI* enzimi ile kesimi sonucu agaroz jeldeki bant profilleri. M: 100-3000 bp DNA moleküler ağırlık belirteci.

30S (f-r) primeri çifti ile amplifikasyon sonucu elde edilen PZR ürünü: 30S primeri kullanılarak yapılan PZR sonucunda tüm genotiplerde beklenen büyüklükte 900 bp civarında PZR ürünü elde edilmiştir. Farklı genotiplerdaki cpDNA polimorfizmini tespit etmek için elde edilen PZR ürünlerine 10 farklı restriksiyon enzimi uygulanmıştır. Restriksiyon ürünlerinin agaroz jel elektroforezi yapılarak farklı genotiplerdeki kullanılan 10 enzim açısından kesme noktası polimorfizmi tespit edilmiştir (Şekil 4.45).



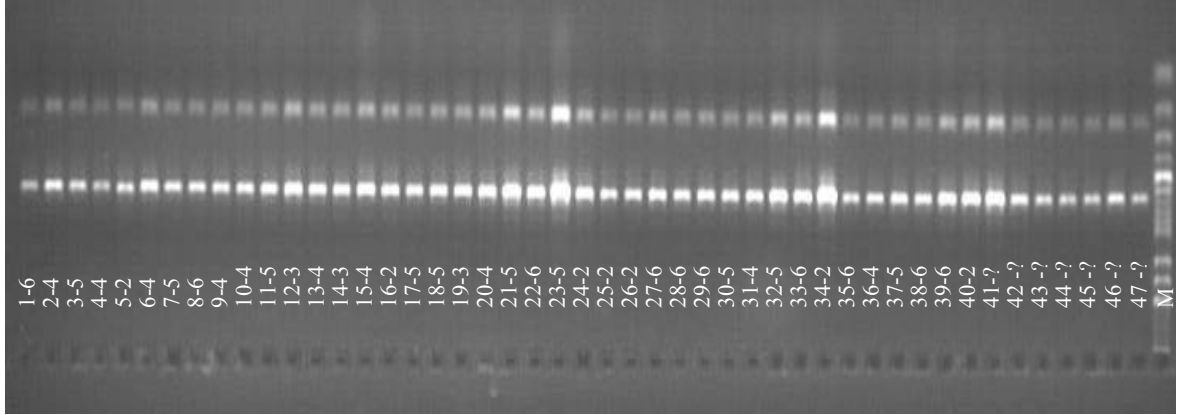
Şekil 4.45. 30S (f-r) primeri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerinin agaroz jeldeki bant profilleri. M: 100-3000 bp DNA moleküler ağırlık belirteci.

30S (f-r) bölgesinin *RsaI* enzimi ile restriksiyon analizi: 30S primerleri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerine *RsaI* enzimi uygulandıktan sonra agaroz jel elektroforezi yapılarak farklı genotiplerdeki bu enzim açısından kesme noktası polimorfizmi tespit edilmiştir. RE analizi sonucu 47 farklı genotipten, 490, 280 ve 180 bp olmak üzere 3 büyüklükte bant gözlenmiş olup polimorfik bant sayısı 2, monomorfik bant sayısı ise 1'dir (Tablo 4.1). cpDNA PZR-RFLP analizi ile %66 oranında polimorfizm tespit edilmiştir. Polimorfizm, 5 numaralı bireyde gözlenmiştir (Şekil 4.46).



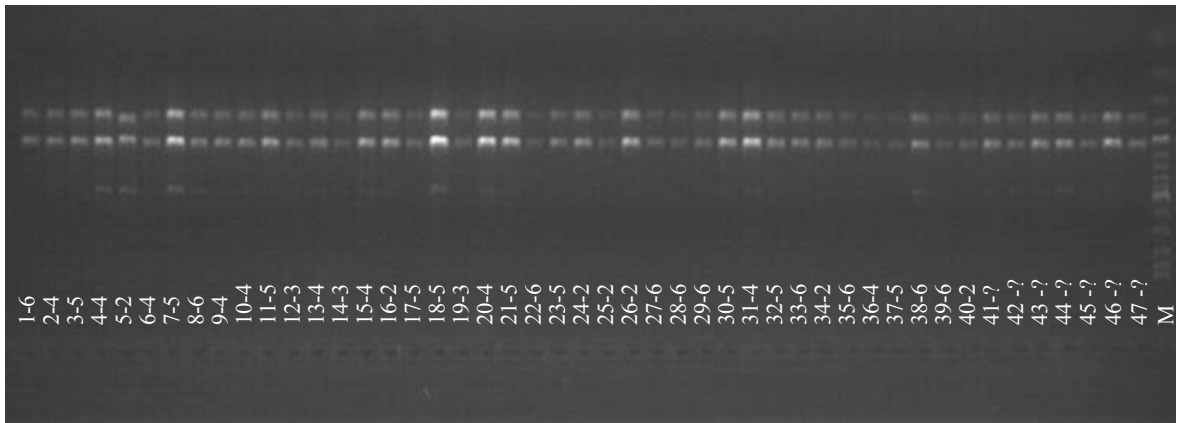
Şekil 4.46. Psb-TrnS (f-r) primeri PZR ürününün *RsaI* enzimi ile kesimi sonucu agaroz jeldeki bant profilleri. M: 100-3000 bp DNA moleküler ağırlık belirteci.

30S (f-r) bölgesinin *BsuRI* enzimi ile restriksiyon analizi: 30S primerleri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerine *BsuRI* enzimi uygulandıktan sonra agaroz jel elektroforezi yapılarak farklı genotiplerdeki bu enzim açısından kesme noktası polimorfizmi tespit edilmiştir. RE analizi sonucu 47 farklı genotipten, 670 ve 230 bp olmak üzere 2 büyüklükte bant gözlenmiş olup polimorfik bant sayısı 0, monomorfik bant sayısı ise 2'dir (Tablo 4.1). cpDNA PZR-RFLP analizi ile polimorfizm tespit edilmemiştir (Şekil 4.47).



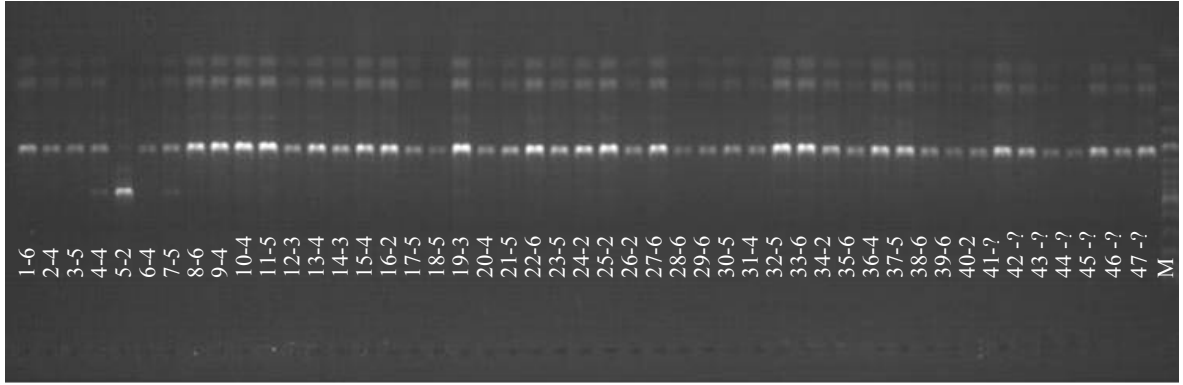
Şekil 4.47. 30S (f-r) primeri PZR ürününün *BsuRI* enzimi ile kesimi sonucu agaroz jeldeki bant profilleri. M: 100-3000 bp DNA moleküler ağırlık belirteci.

30S (f-r) bölgesinin *MspI* enzimi ile restriksiyon analizi: 30S primerleri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerine *MspI* enzimi uygulandıktan sonra agaroz jel elektroforezi yapılarak farklı genotiplerdeki bu enzim açısından kesme noktası polimorfizmi tespit edilmiştir. RE analizi sonucu 47 farklı genotipten, 520 ve 380 bp olmak üzere 2 büyüklükte bant gözlenmiş olup polimorfik bant sayısı 0, monomorfik bant sayısı ise 2'dir (Tablo 4.1). cpDNA PZR-RFLP analizi ile polimorfizm tespit edilmemiştir (Şekil 4.48).



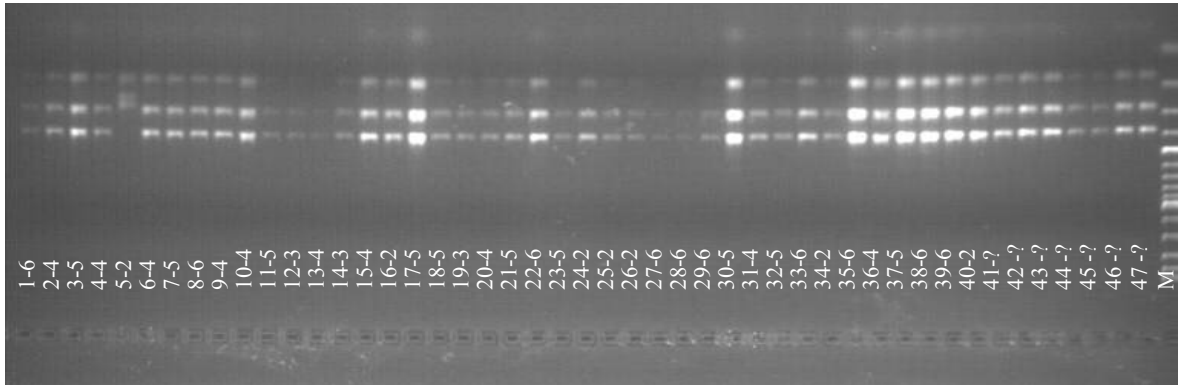
Şekil 4.48. 30S (f-r) primeri PZR ürününün *MspI* enzimi ile kesimi sonucu agaroz jeldeki bant profilleri. M: 100-3000 bp DNA moleküler ağırlık belirteci.

30S (f-r) bölgesinin *HinIII* enzimi ile restriksiyon analizi: 30S primerleri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerine *HinIII* enzimi uygulandıktan sonra agaroz jel elektroforezi yapılarak farklı genotiplerdeki bu enzim açısından kesme noktası polimorfizmi tespit edilmiştir. RE analizi sonucu 47 farklı genotipten, 900, 520, 220 ve 160 bp olmak üzere 4 büyüklükte bant gözlenmiş olup polimorfik bant sayısı 4, monomorfik bant sayısı ise 0'dır (Tablo 4.1). cpDNA PZR-RFLP analizi ile %100 oranında polimorfizm tespit edilmiştir. Polimorfizm, 5 numaralı bireyde gözlenmiştir (Şekil 4.49).



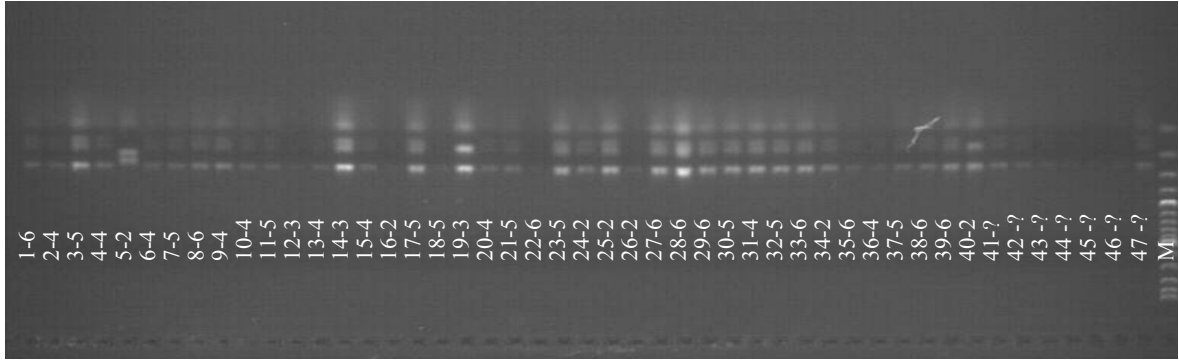
Şekil 4.49. 30S (f-r) primeri PZR ürününün *HinIII* enzimi ile kesimi sonucu agaroz jeldeki bant profilleri. M: 100-3000 bp DNA moleküler ağırlık belirteci.

30S (f-r) bölgesinin *MseI* enzimi ile restriksiyon analizi: 30S primerleri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerine *MseI* enzimi uygulanarak analiz edilmiştir. Restriksiyon ürünlerinin agaroz jel elektroforezi yapılarak farklı genotiplerdeki bu enzim açısından kesme noktası polimorfizmi tespit edilmiştir. RE analizi sonucu 47 farklı genotipten, 390, 290, 280, 250 ve 180 bp olmak üzere 5 büyüklükte bant gözlenmiş olup polimorfik bant sayısı 4, monomorfik bant sayısı ise 1'dir (Tablo 4.1). cpDNA PZR-RFLP analizi ile %80 oranında polimorfizm tespit edilmiştir. Polimorfizm, 5 numaralı bireyde gözlenmiştir (Şekil 4.50).



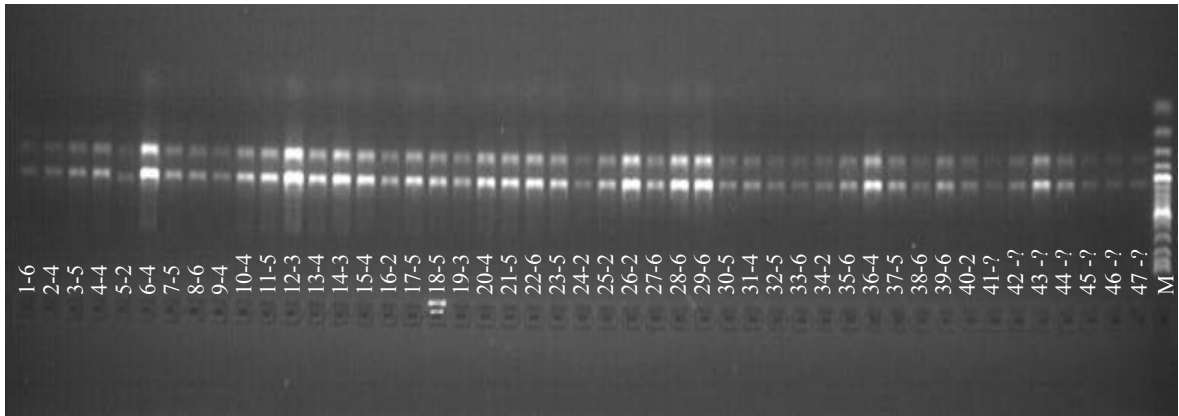
Şekil 4.50. Şekil 4.50: 30S (f-r) primeri PZR ürününün *MseI* enzimi ile kesimi sonucu agaroz jeldeki bant profilleri. M: 100-3000 bp DNA moleküler ağırlık belirteci.

30S (f-r) bölgesinin *TaqI* enzimi ile restriksiyon analizi: 30S primerleri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerine *TaqI* enzimi uygulanarak analiz edilmiştir.. Restriksiyon ürünlerinin agaroz jel elektroforezi yapılarak farklı genotiplerdeki bu enzim açısından kesme noktası polimorfizmi tespit edilmiştir. RE analizi sonucu 47 farklı genotipten, 270, 260, 220, 180, 170 ve 100 bç olmak üzere 6 büyüklükte bant gözlenmiş olup polimorfik bant sayısı 5, monomorfik bant sayısı ise 1'dir (Tablo 4.1). cpDNA PZR-RFLP analizi ile %83 oranında polimorfizm tespit edilmiştir. Polimorfizm, 5 numaralı bireyde gözlenmiştir (Şekil 4.51).



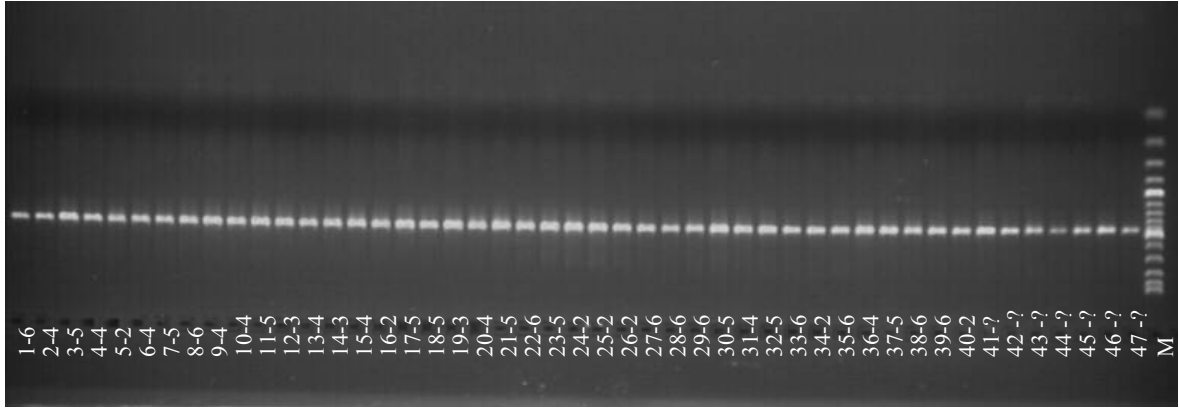
Şekil 4.51. 30S (f-r) primeri PZR ürününün *TaqI* enzimi ile kesimi sonucu agaroz jeldeki bant profilleri. M: 100-3000 bç DNA moleküler ağırlık belirteci.

30S (f-r) bölgesinin *MboI* enzimi ile restriksiyon analizi: 30S primerleri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerine *MboI* enzimi uygulanarak analiz edilmiştir.. Restriksiyon ürünlerinin agaroz jel elektroforezi yapılarak farklı genotiplerdeki bu enzim açısından kesme noktası polimorfizmi tespit edilmiştir. RE analizi sonucu 47 farklı genotipten, 580 ve 320 bç olmak üzere 2 büyüklükte bant gözlenmiş olup polimorfik bant sayısı 0, monomorfik bant sayısı ise 2'dir (Tablo 4.1). cpDNA PZR-RFLP analizi ile polimorfizm tespit edilmemiştir (Şekil 4.52).



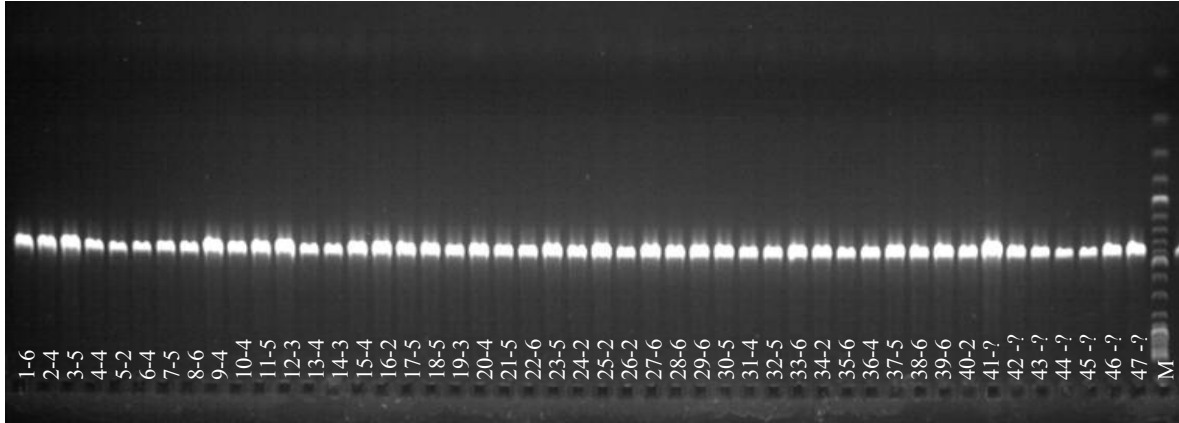
Şekil 4.52. 30S (f-r) primeri PZR ürününün *MboI* enzimi ile kesimi sonucu agaroz jeldeki bant profilleri. M: 100-3000 bç DNA moleküler ağırlık belirteci.

30S (f-r) bölgesinin *EcoRV* enzimi ile restriksiyon analizi: 30S primerleri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerine *EcoRV* enzimi uygulanarak analiz edilmiştir.. Restriksiyon ürünlerinin agaroz jel elektroforezi yapılarak farklı genotiplerdeki bu enzim açısından kesme noktası polimorfizmi tespit edilmiştir. RE analizi sonucu 47 farklı genotipten, 900 bç olmak üzere 1 bant elde edilmiştir. . Polimorfik bant sayısı 0, monomorfik bant sayısı ise 1'dir (Tablo 4.1). cpDNA PZR-RFLP analizi ile polimorfizm tespit edilmemiştir (Şekil 4.53).



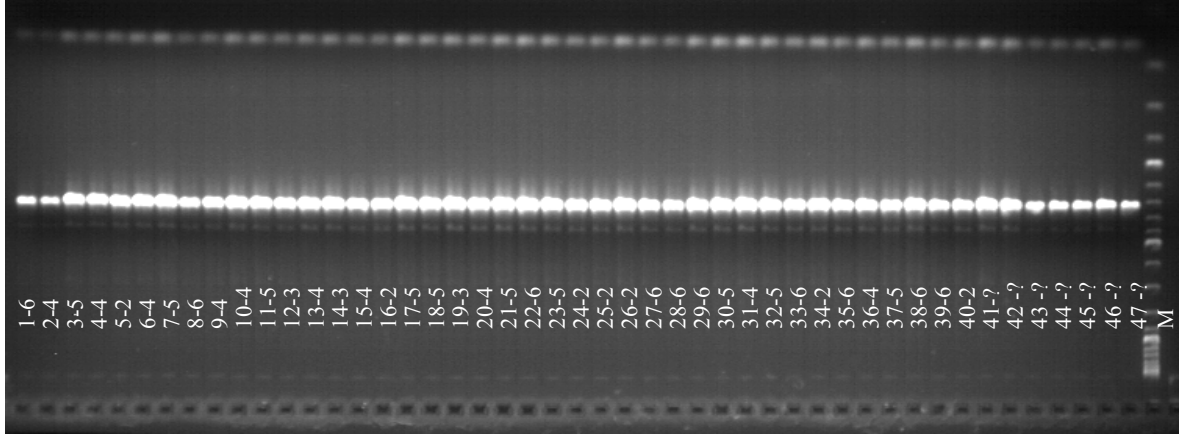
Şekil 4.53. 30S (f-r) primeri PZR ürününün *EcoRV* enzimi ile kesimi sonucu agaroz jeldeki bant profilleri. M: 100-3000 bç DNA moleküler ağırlık belirteci.

30S (f-r) bölgesinin *DraI* enzimi ile restriksiyon analizi: 30S primerleri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerine *DraI* enzimi uygulandıktan sonra agaroz jel elektroforezi yapılarak farklı genotiplerdeki bu enzim açısından kesme noktası polimorfizmi tespit edilmiştir. RE analizi sonucu 47 farklı genotipten, 900 bç olmak üzere 1 büyüklükte bant gözlenmiş olup polimorfik bant sayısı 0, monomorfik bant sayısı ise 1'dir (Tablo 4.1). cpDNA PZR-RFLP analizi ile polimorfizm tespit edilmemiştir (Şekil 4.54).



Şekil 4.54. 30S (f-r) primeri PZR ürününün *DraI* enzimi ile kesimi sonucu agaroz jeldeki bant profilleri. M: 100-3000 bç DNA moleküler ağırlık belirteci.

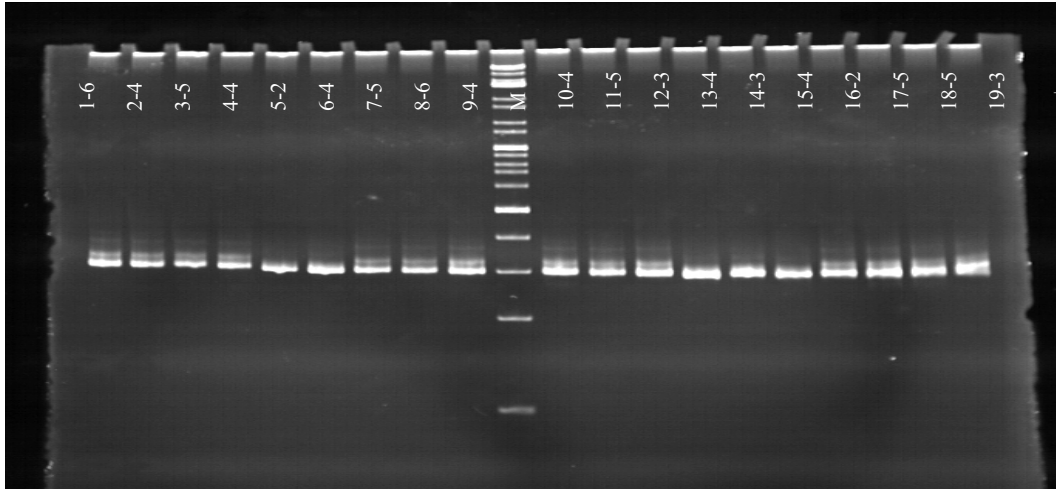
30S (f-r) bölgesinin *RsaI* enzimi ile restriksiyon analizi: 30S primerleri kullanılarak elde edilen PZR ürünlerine *RsaI* enzimi uygulandıktan sonra agaroz jel elektroforezi yapılarak farklı genotiplerdeki bu enzim açısından kesme noktası polimorfizmi tespit edilmiştir. RE analizi sonucu 47 farklı genotipten, 720 bç olmak üzere 1 büyüklükte bant gözlenmiş olup polimorfik bant sayısı 0, monomorfik bant sayısı ise 1'dir (Tablo 4.1). cpDNA PZR-RFLP analizi ile polimorfizm tespit edilmemiştir (Şekil 4.55).



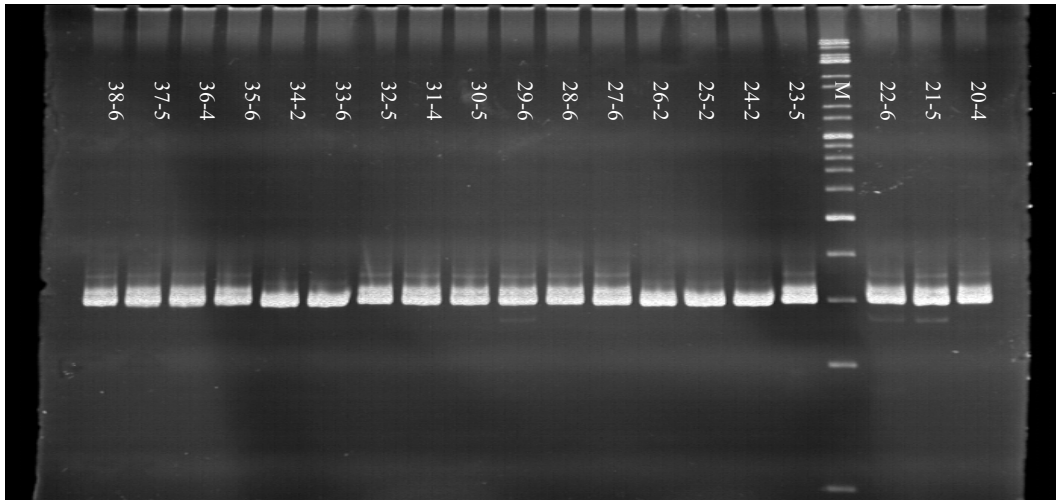
Şekil 4.55. 30S (f-r) primeri PZR ürününün *RsaI* enzimi ile kesimi sonucu agaroz jeldeki bant profilleri. M: 100-10000 bç DNA moleküler ağırlık belirteci.

ccSSR-4 primer çiftiyle elde edilen allel profili: ccSSR-4 primeri ile PZR yapıldıktan sonra ürünleri %6'lık poliakrilamid jelde yürütülmüş ve 210 bç civarında 1 bant elde edilmiştir. Polimorfik bant sayısı 0, monomorfik bant sayısı ise 1'dir (Tablo 4.2). Bu primerle SSR polimorfizmi tespit edilmemiştir.

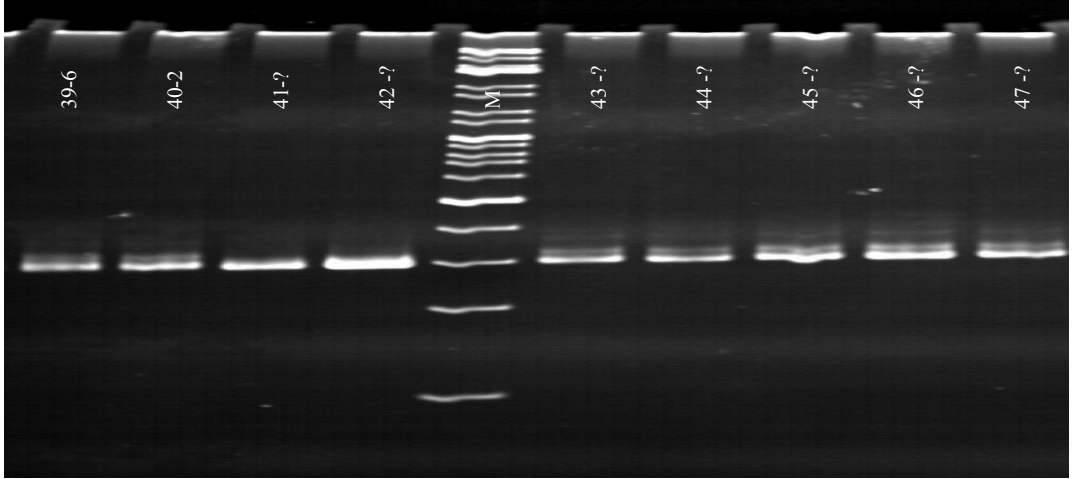
ccSSR-5 primer çiftiyle elde edilen allel profili: ccSSR-5 primeri ile PZR yapıldıktan sonra ürünleri %6'lık poliakrilamid jelde yürütülmüş ve 310-290 bç civarında 3 farklı büyüklükte bant elde edilmiştir. Polimorfik bant sayısı 3, monomorfik bant sayısı ise 0'dır (Tablo 4.2). ccSSR analizi ile %100 oranında polimorfizm tespit edilmiştir (Şekil 4.56, 4.57, 4.58).



Şekil 4.56. ccSSR-5(f-r) primer çiftiyle elde edilen allel profili sonucu elde edilen bant profilleri (47 örnekten 1 ile 19 arasındaki genotipler) M: 100-10000 bç DNA moleküler ağırlık belirteci.



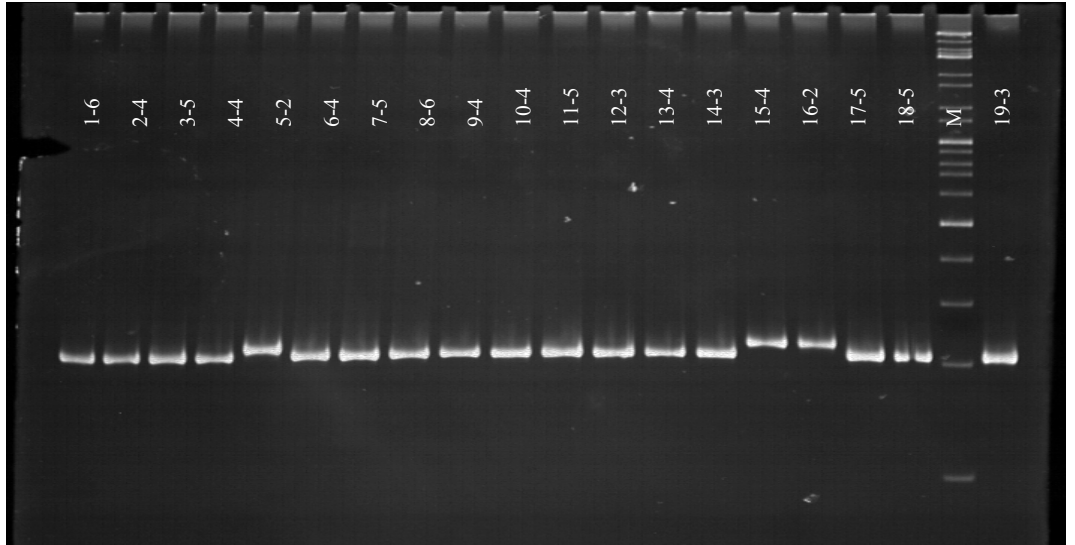
Şekil 4.57. ccSSR-5(f-r) primer çiftiyle elde edilen allel profili sonucu elde edilen bant profilleri (47 örnekten 20 ile 38 arasındaki genotipler) M: 100-10000 bç DNA moleküler ağırlık belirteci.



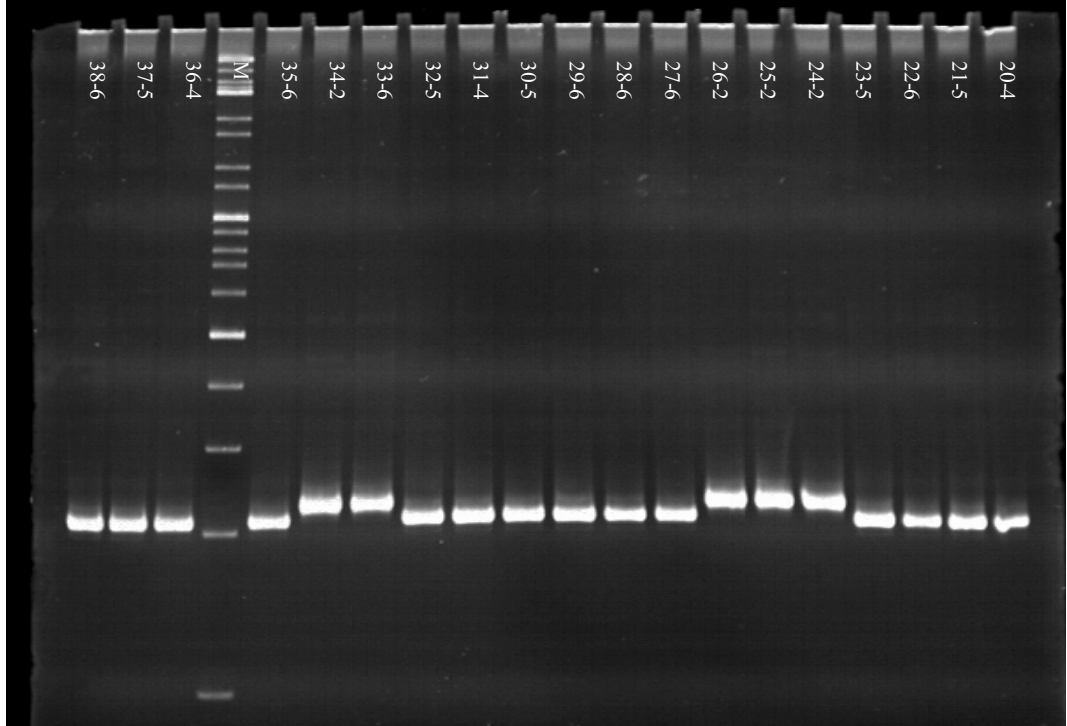
Şekil 4.58. ccSSR-5(f-r) primer çiftiyle elde edilen allel profili sonucu elde edilen bant profilleri (47 örnekten 39 ile 47 arasındaki genotipler) M: 100-10000 bç DNA moleküler ağırlık belirteci.

ccSSR-8 primer çiftiyle elde edilen allel profili: ccSSR-8 primeri ile PZR yapıldıktan sonra ürünleri %6'lık poliakrilamid jelde yürütülmüş ve 250-255 bç civarında 2 farklı büyüklükte bant elde edilmiştir. Polimorfik bant sayısı 2, monomorfik bant sayısı ise 0'dır (Tablo 4.2). ccSSR analizi ile %100 oranında polimorfizm tespit edilmiştir.

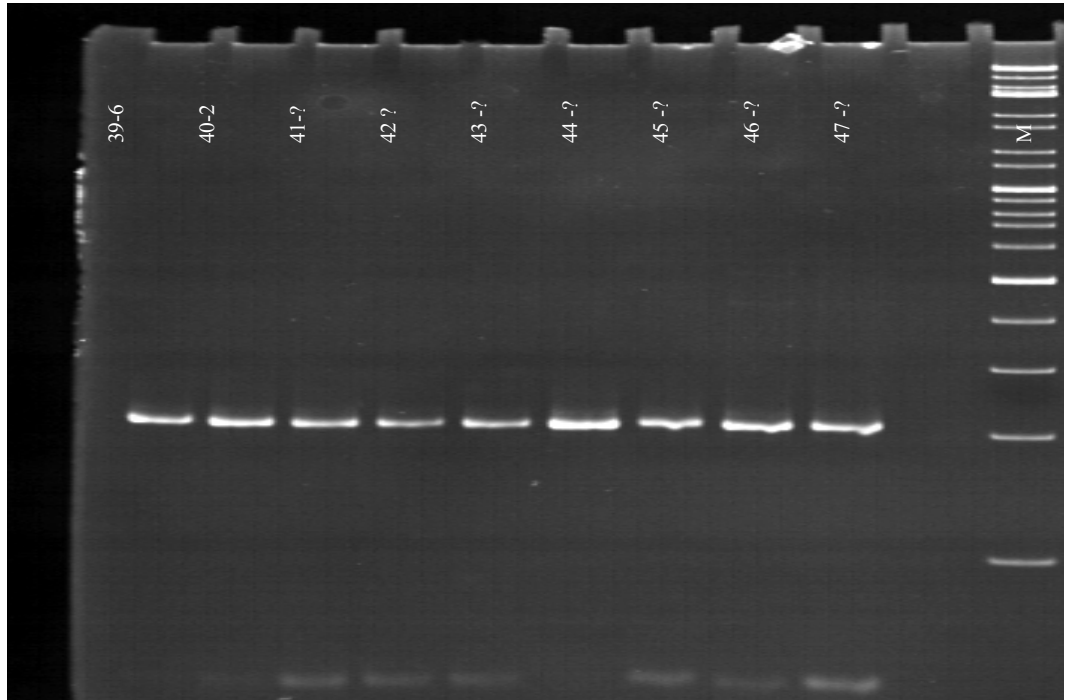
ccSSR-12 primer çiftiyle elde edilen allel profili: ccSSR-12 primeri ile PZR yapıldıktan sonra ürünleri %6'lık poliakrilamid jelde yürütülmüş ve 220-210 bç civarında 3 farklı büyüklükte bant elde edilmiştir. Polimorfik bant sayısı 2, monomorfik bant sayısı ise 0'dır (Tablo 4.2). ccSSR analizi ile %100 oranında polimorfizm tespit edilmiştir (Şekil 4.59, 4.60, 4.61).



Şekil 4.59. ccSSR-12(f-r) primer çiftiyle elde edilen allel profili sonucu elde edilen bant profilleri (47 örnekten 1 ile 19 arasındaki genotipler) M: 100-10000 bç DNA moleküler ağırlık belirteci.



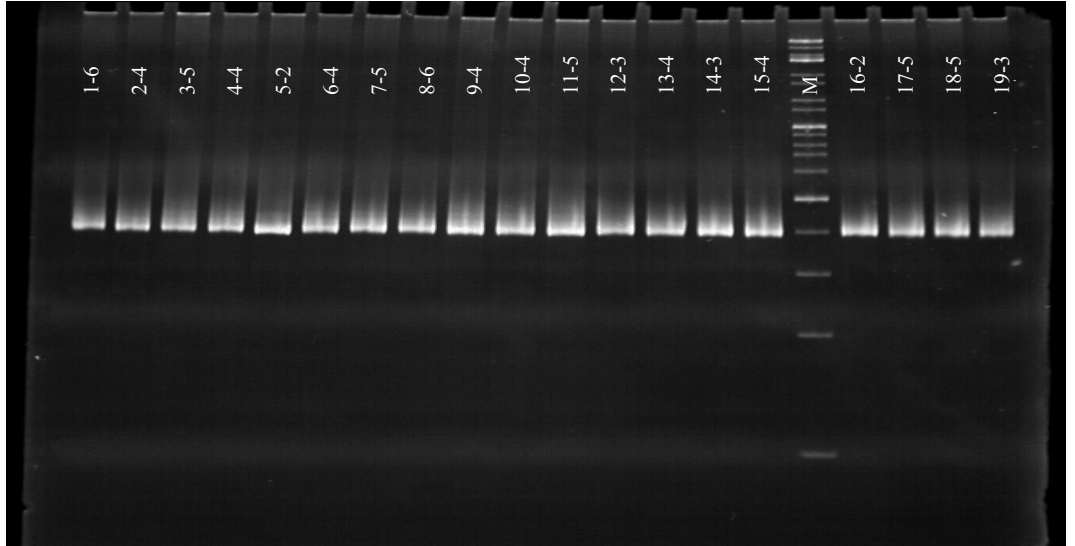
Şekil 4.60. ccSSR-12(f-r) primer çiftiyle elde edilen allel profili sonucu elde edilen bant profilleri (47 örnekten 20 ile 38 arasındaki genotipler) M: 100-10000 bp DNA moleküler ağırlık belirteci.



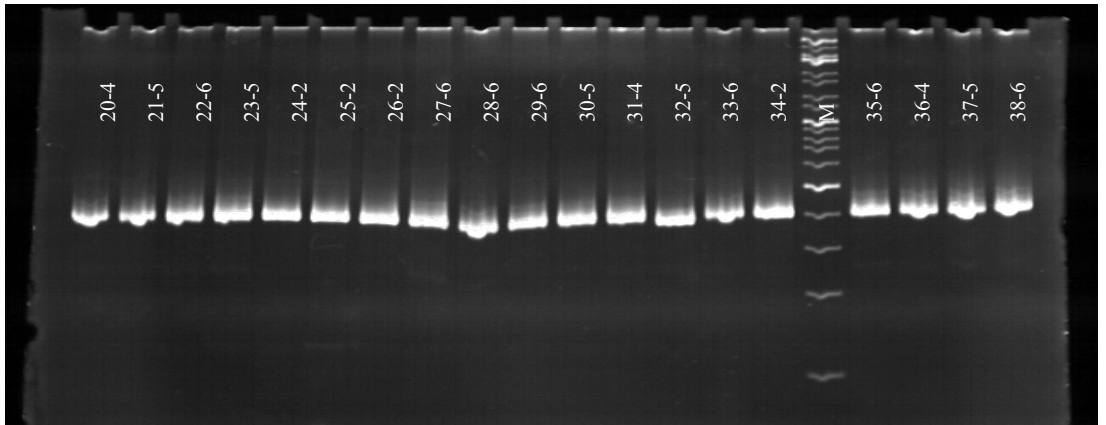
Şekil 4.61. ccSSR-12(f-r) primer çiftiyle elde edilen allel profili sonucu elde edilen bant profilleri (47 örnekten 39 ile 47 arasındaki genotipler) M: 100-10000 bp DNA moleküler ağırlık belirteci.

ccSSR-15 primer çiftiyle elde edilen allel profili: ccSSR-15 primeri ile PZR yapıldıktan sonra ürünleri %6'lık poliakrilamid jelde yürütülmüş ve 270 bp civarında 1 bant elde edilmiştir. Polimorfik bant sayısı 0, monomorfik bant sayısı ise 1'dir (Tablo 4.2). Bu primerle SSR polimorfizmi tespit edilmemiştir.

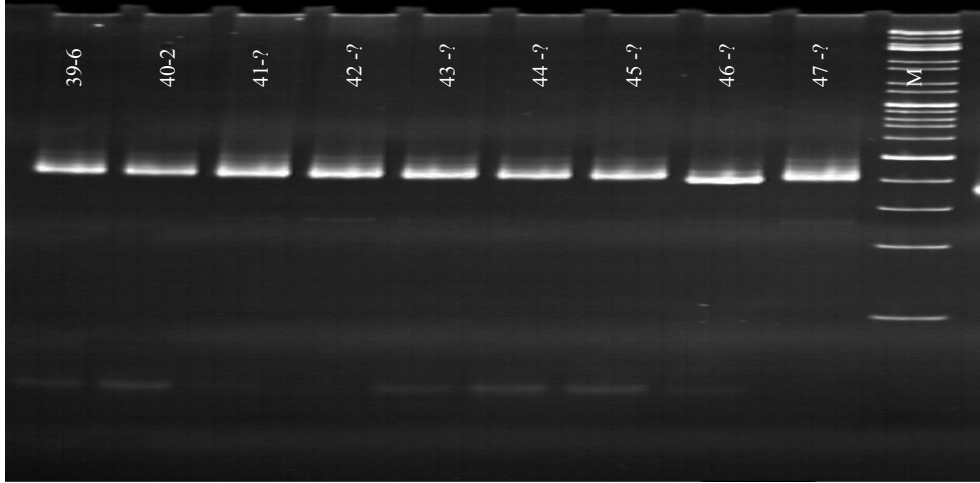
ccSSR-19 primer çiftiyle elde edilen allel profili: ccSSR-19 primeri ile PZR yapıldıktan sonra ürünleri %6'lık poliakrilamid jelde yürütülmüş ve 410-390 bp civarında 3 farklı büyüklükte bant elde edilmiştir. Polimorfik bant sayısı 3 monomorfik bant sayısı ise 0'dır (Tablo 4.2). ccSSR analizi ile %100 oranında polimorfizm tespit edilmiştir (Şekil 4.62, 4.63, 4.64).



Şekil 4.62. ccSSR-19(f-r) primer çiftiyle elde edilen allel profili sonucu elde edilen bant profilleri (47 örnekten 1 ile 19 arasındaki genotipler) M: 100-10000 bp DNA moleküler ağırlık belirteci.



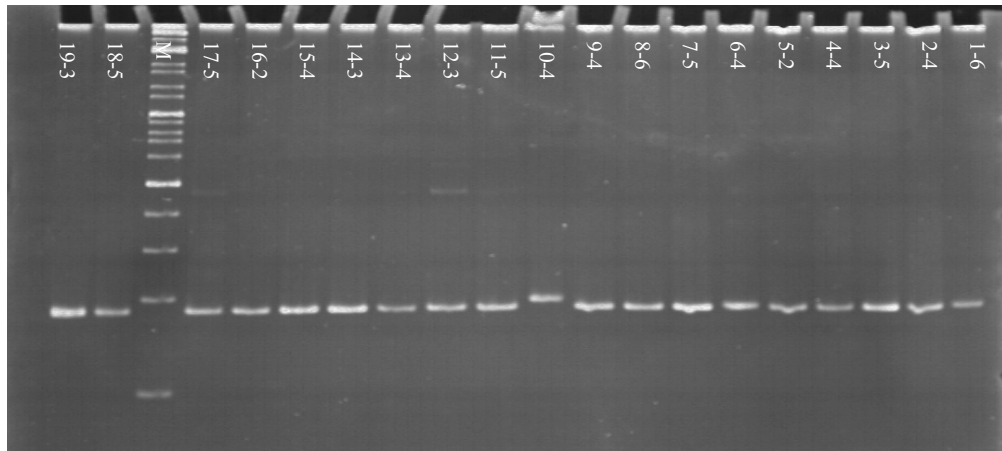
Şekil 4.63. ccSSR-19(f-r) primer çiftiyle elde edilen allel profili sonucu elde edilen bant profilleri (47 örnekten 20 ile 38 arasındaki genotipler) M:100-10000 bp DNA moleküler ağırlık belirteci.



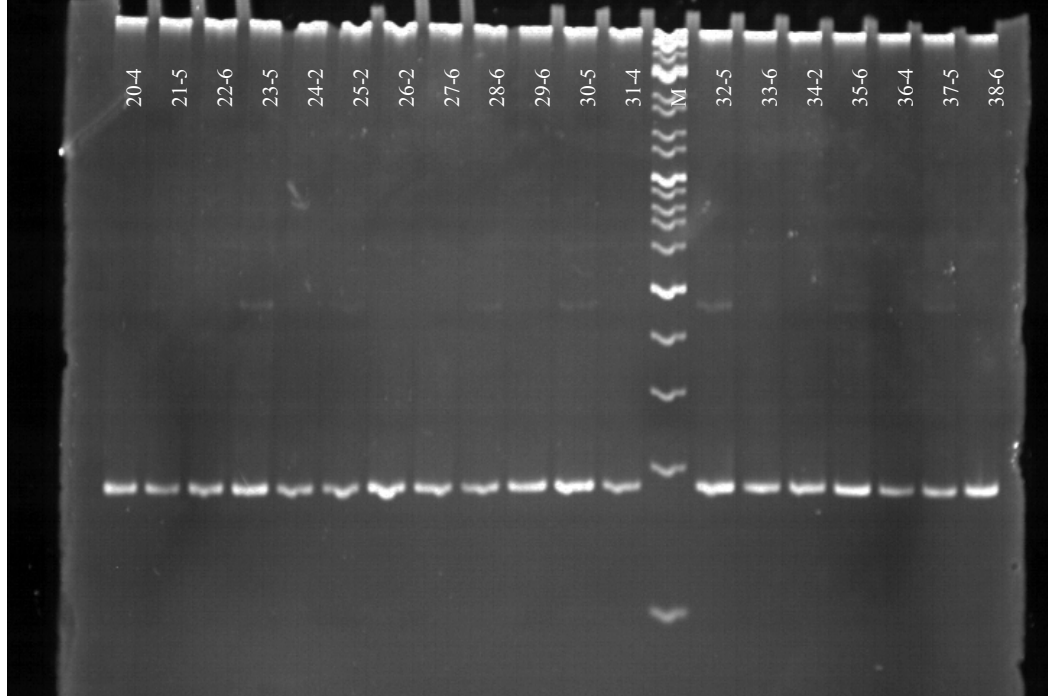
Şekil 4.64. ccSSR-19(f-r) primer çiftiyle elde edilen allel profili sonucu elde edilen bant profilleri (47 örnekten 30 ile 47 arasındaki genotipler) M: 100-10000 bç DNA moleküler ağırlık belirteci.

ccSSR-20 primer çiftiyle elde edilen allel profili: ccSSR-20 primeri ile PZR yapıldıktan sonra ürünleri %6'lık poliakrilamid jelde yürütülmüş ve 400-410 bç civarında 2 farklı büyüklükte bant elde edilmiştir. Polimorfik bant sayısı 2, monomorfik bant sayısı ise 0'dır (Tablo 4.2). ccSSR analizi ile %100 oranında polimorfizm tespit edilmiştir.

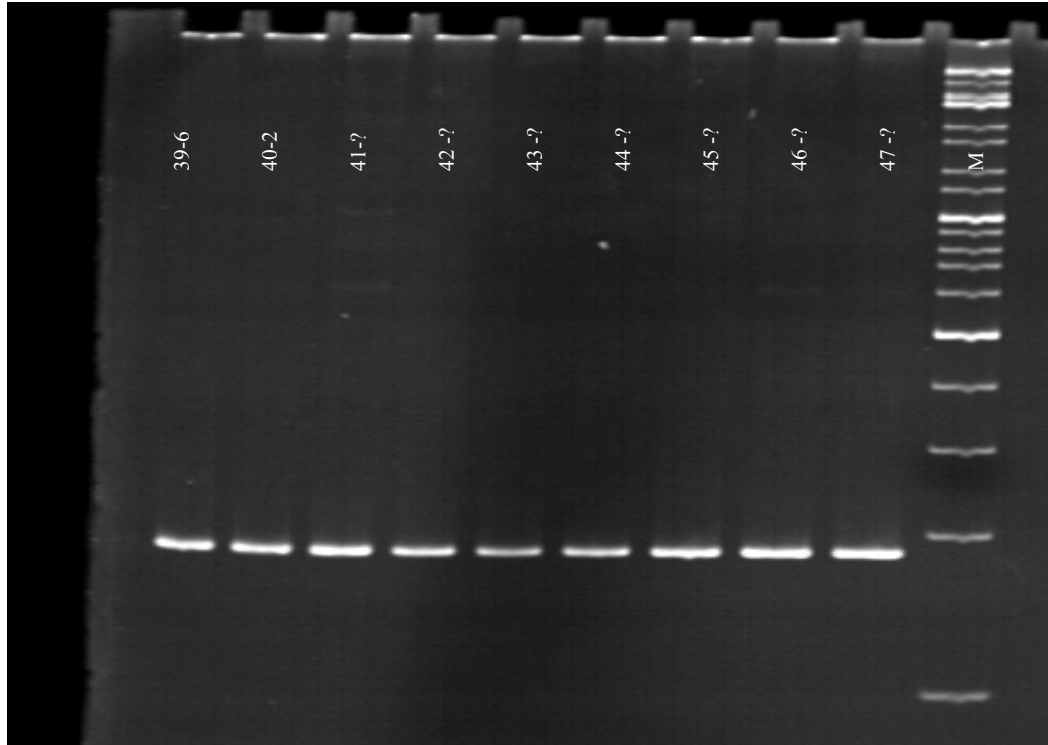
ccSSR-22 primer çiftiyle elde edilen allel profili: ccSSR-22 primeri ile PZR yapıldıktan sonra ürünleri %6'lık poliakrilamid jelde yürütülmüş ve 200-190 bç civarında 2 farklı büyüklükte bant elde edilmiştir. Polimorfik bant sayısı 2, monomorfik bant sayısı ise 0'dır (Tablo 4.2). ccSSR analizi ile %100 oranında polimorfizm tespit edilmiştir (Şekil 4.65, 4.66, 4.67).



Şekil 4.65. ccSSR-22(f-r) primer çiftiyle elde edilen allel profili sonucu elde edilen bant profilleri (47 örnekten 1 ile 19 arasındaki genotipler) M: 100-10000 bç DNA moleküler ağırlık belirteci.



Şekil 4.66. ccSSR-22(f-r) primer çiftiyle elde edilen allel profili sonucu elde edilen bant profilleri (47 örnekten 20 ile 38 arasındaki genotipler) M: 100-10000 bp DNA moleküler ağırlık belirteci.

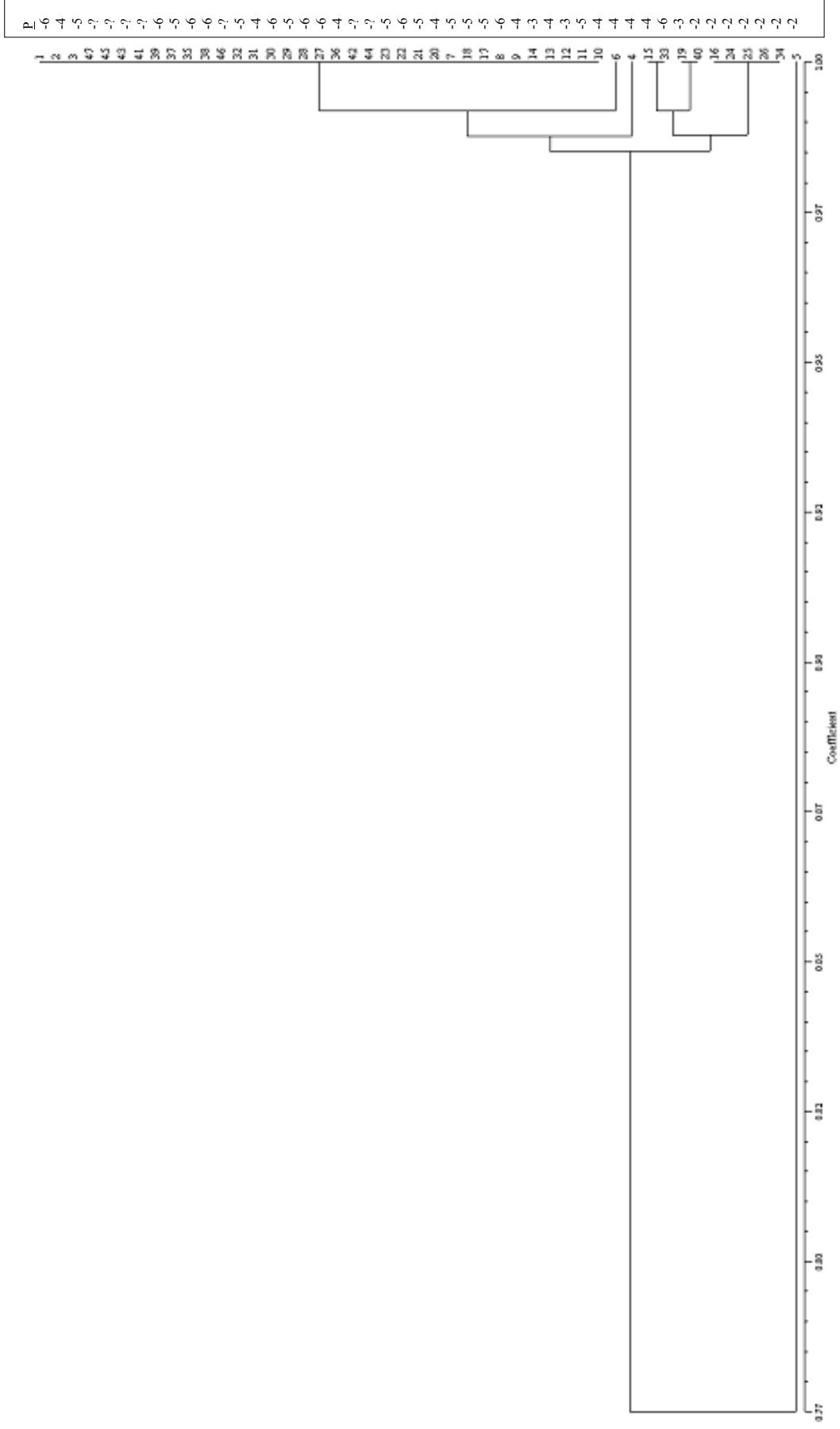


Şekil 4.67. ccSSR-22(f-r) primer çiftiyle elde edilen allel profili sonucu elde edilen bant profilleri (47 örnekten 39 ile 47 arasındaki genotipler) M: 100-10000 bp DNA moleküler ağırlık belirteci.

cpDNA PZR-RFLP ve ccSSR profilleri skorlandıktan sonra NTSYS pc 2.1 (Numerical Taxonomy Multivariate Analysis System) paket programı (Exeter Software, Setauket, New York, USA) kullanılarak analiz edilmiştir. SIMQUAL modülü kullanılarak oluşturulan genetik benzerlik (GS) matrisi Tablo 4.5., Tablo 4.6. ve Tablo 4.7.' de gösterilmiştir. Oluşturulan bu benzerlik matrisleri çalışılan genotipler arasındaki genetik akrabalığı belirlemek amacı ile unweighted pair group method arithmetic average (UPGMA) modülü kullanılarak dendogram oluşturmada kullanılmıştır. Elde edilen dendogramlar Şekil 4.68, Şekil 4.69 ve Şekil 4.70'de gösterilmiştir.

Çalışmamızda bermuda çimleine ait 47 genotip arasındaki genetik ilişki; cpDNA PCR-RFLP ile restriksiyon enzimi analizi kullanılarak yapılan skorlamalar sonucunda ortaya konmuştur. UPGMA dendogramına (Şekil 4.68) göre; 47 genotip iki ana kola ayrılmıştır. İlk ana kolda diploid genoma sahip olan 5 numaralı genotip bulunmaktadır. İkinci ana kolda ise genel olarak bakıldığı zaman temel ayrım noktasının örneklerin ploidi düzeyleri olduğu görülebilmektedir. Birinci alt grupta 1, 2, 3, 47, 45, 43, 41, 39, 37, 35, 38, 46, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 36, 42, 44, 23, 22, 21, 20, 7, 18, 17, 8, 9, 14, 13, 12, 11, 10 numaralı genotipler bulunmaktadır ve bu alt grubu içerisinde diploid genoma sahip örnek bulunmamaktadır. İkinci alt grupta ise diploid genoma sahip olan 16, 24, 25, 26, 34, 40 numaralı genotipler bulunmaktadır. Diploid genoma sahip olan 5 numaralı örnek dahil edilmediği zaman genotiplerin birbirine olan benzerliklerinin %98 oranında olduğu belirlenmiştir.

Bantların skorlanması sonucuna göre elde edilen genetik uzaklık değerlerinin cpDNA PZR-RFLP restriksiyon enzimleri analizinde 0.77 ile 1.00 arasında olduğu tesbit edilmiştir (Tablo 4.5). Genotiplerden birbirine en yakın olanlarına bakacak olursak grupta 1, 2, 3, 47, 45, 43, 41, 39, 37, 35, 38, 46, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 36, 42, 44, 23, 22, 21, 20, 7, 18, 17, 8, 9, 14, 13, 12, 11, 10 numaralı örneklerin birbirine %100 oranında benzemekte olduğu ve 16, 24, 25, 26, 34 numaralı diploid genoma sahip örneklerinde %100 oranında birbirine benzemekte olduğu belirlenmiştir. 4 numaralı örneğin diğer gruplar ile benzerliği %98 ve 6 numaralı örneğin diğer gruplar ile olan benzerliği ise %99 dur. Genotiplerden en uzak olanın ise 5 numaralı örnek olduğu ve diğer genotiplere %77 oranında bir benzerlik gösterdiği belirlenmiştir.

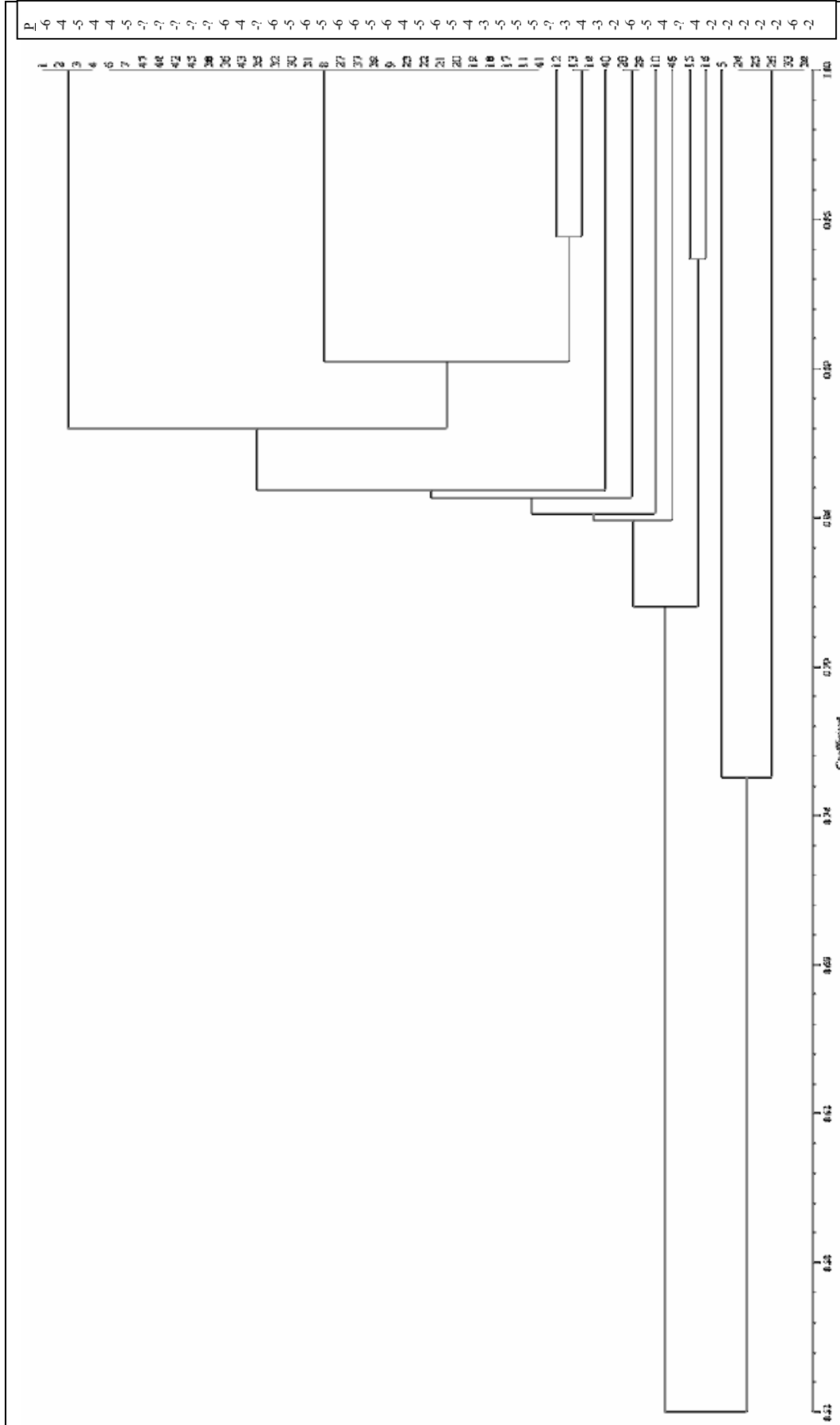


Şekil 4.68. 47 bermuda çiminde 5 cpDNA PCR-RFLP ile elde edilen 53 polimorfik ve 90 monomorfik bandın analizine göre oluşturulan UPGMA dendrogramı

Tablo 4.5. cpDNA PZR-RFLP profilinin DICE metoduna göre yapılan benzerlik matrisi

Çalışmamızda bermuda çimlerine ait 47 genotip arasındaki ilişki; ccSSR profili analizi kullanarak yapılan skorlamalar sonucunda ortaya konmuştur. UPGMA dendogramına (Şekil 4.69) göre; 47 genotip iki ana kola ayrılmıştır. İlk ana kolun birinci alt grupta diploid genoma sahip olan 5 numaralı genotip bulunmaktadır. İkinci alt grupta ise 24, 25, 26, 34 numaralı diploid genotipler bulunmaktadır. İkinci ana kolun birinci alt grubu 1, 2, 3, 4 numaralı genotipleri bulundurmaktadır. İkinci alt grup ise 6, 7, 47, 44, 42, 45, 38, 36, 43, 35, 32, 30, 31, 8, 27, 37, 39, 9, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 11, 41 numaralı genotipleri bulundurmaktadır.

Bantların skorlanması sonucuna göre elde edilen genetik uzaklık değerlerinin ccSSR analizinde 0.50 ile 1.00 arasında olduğu tesbit edilmiştir (Tablo 4.6). Genotiplerden birbirine en yakın olanlarına bakacak olursak 6, 7, 47, 44, 42, 45, 38, 36, 43, 35, 32, 30, 31, 8, 27, 37, 39, 9, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 11, 41 numaralı örneklerin birbirine %100 oranında benzemekte olduğu bulunmuştur ve 1, 2, 3, 4 numaralı örneklerinde %100 oranında birbirine benzemekte olduğu belirlenmiştir. 15 ve 16 numaralı örneklerin birbirine benzerlik oranı %94 lerde 46 numaralı örneğin en yakın benzerlik oranı %84.5, 10 numaralı örneğin %85, 28 ve 29 numaralı örneğin en yakın benzerliği %85.5, 40 numaralı örnek %86 bulunmuştur. Genotiplerden en uzak olanın ise 5 numaralı örnek olduğu ve diğer genotiplere %77 oranında bir benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Diploid genoma sahip 5 numaralı örnek ile 24, 25, 26, 33, 34 numaralı örnekler arasında %75 oranında bir benzerlik bulunmuştur. Diploid genotiplerin diğer genotiplere benzerliği ise %53 olarak tesbit edilmiştir.

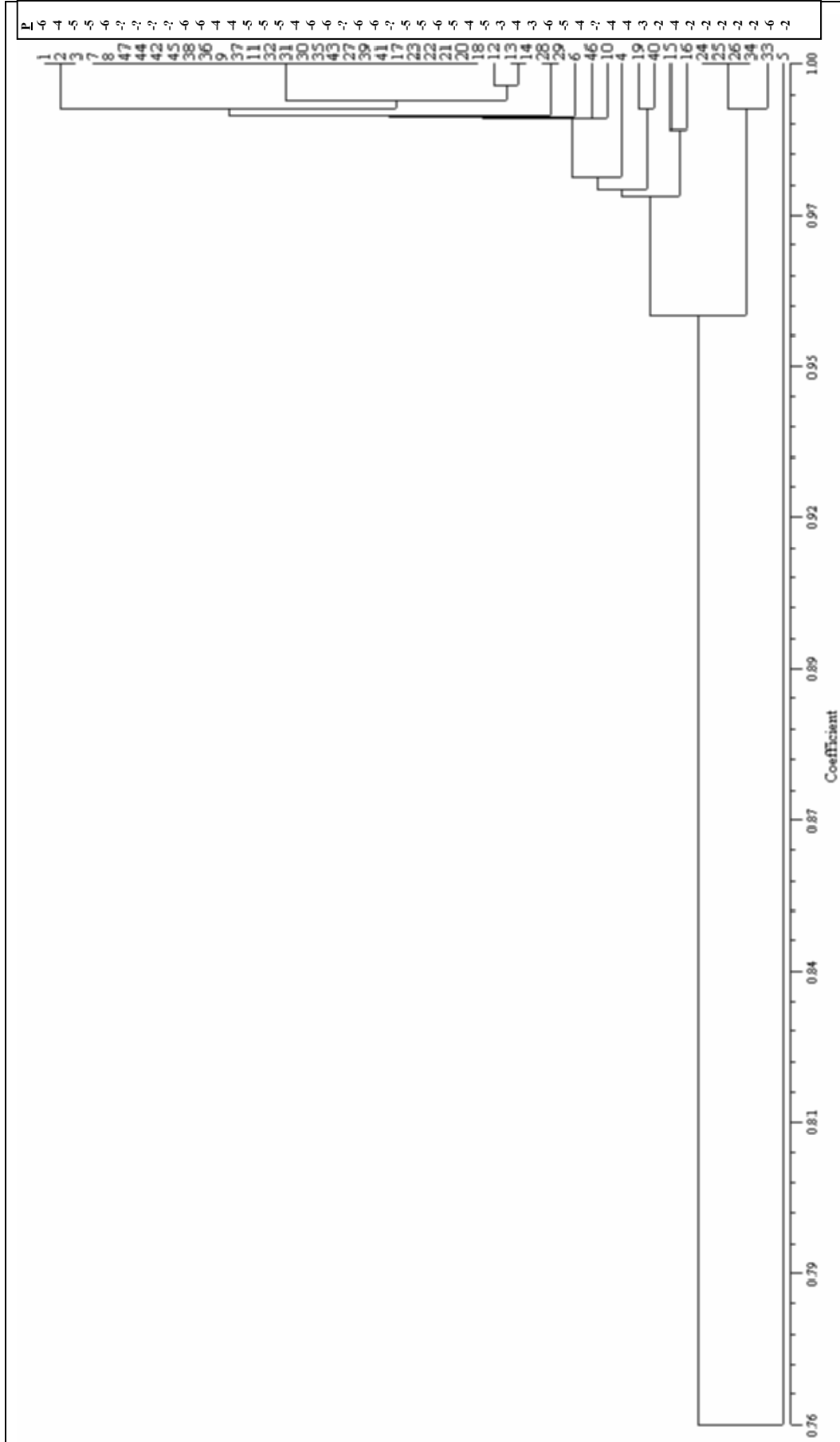


Şekil 4.69. 47 bermuda çiminde 8 ccSSR primeriyle elde edilen 14 polimorfik bandın analizine göre elde edilen UPGMA dendrogramı

Tablo 4.6. ccSSR profilinin DICE metoduna göre yapılan benzerlik matrisi

Çalışmamızda bermuda çimlerine ait 47 genotip arasındaki ilişki; cpDNA PCR-RFL ve ccSSR profil analizleri birlikte kullanılarak yapılan skorlama sonucunda ortaya konmuştur. UPGMA dendogramına (Şekil 4.70) göre; 47 genotip iki ana kola ayrılmıştır. İlk ana kolda diploid genoma sahip olan 5 numaralı genotip bulunmaktadır. İkinci ana kol 3 alt gruba ayrılır. Birinci ana grupta 1, 2, 3 numaralı genotipler bulunmaktadır. İkinci ana grupta ise 7, 8, 47, 44, 42, 45, 38, 36, 9, 37, 11, 32, 31, 30, 35, 43, 27, 39, 41, 17, 23, 22, 21, 20, 18 numaralı genotipler bulunmaktadır. Üçüncü grupta ise 24, 25, 26, 34 numaralı genotipler bulunmaktadır.

Bantların skorlanması sonucuna göre elde edilen genetik uzaklık değerlerinin cpDNA PZR-RFLP ile ccSSR'ın birlikte analizinde 0.76 ile 1.00 arasında olduğu tesbit edilmiştir (Tablo 4.7). Genotiplerden birbirine en yakın olanlarına bakacak olursak 7, 8, 47, 44, 42, 45, 38, 36, 9, 37, 11, 32, 31, 30, 35, 43, 27, 39, 41, 17, 23, 22, 21, 20, 18 numaralı örneklerin birbirine %100 oranında benzemekte olduğu bulunmuştur ve bulunduğu 24, 25, 26, 34 numaralı örneklerinde %100 oranında birbirine benzemekte olduğu belirlenmiştir. 24, 25, 26 numaralı örneklerin diğer genotiplere benzerlik oranı %95 olarak bulunmuştur. Genotiplerden en uzak olanın ise 5 numaralı örnek olduğu ve diğer genotiplere %76 oranında bir benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Diploid genoma sahip 5 numaralı örnek ile 24, 25, 26, 33, 34 numaralı diğer diploid genotiplerle arasında %96 oranında bir benzerlik bulunmuştur.

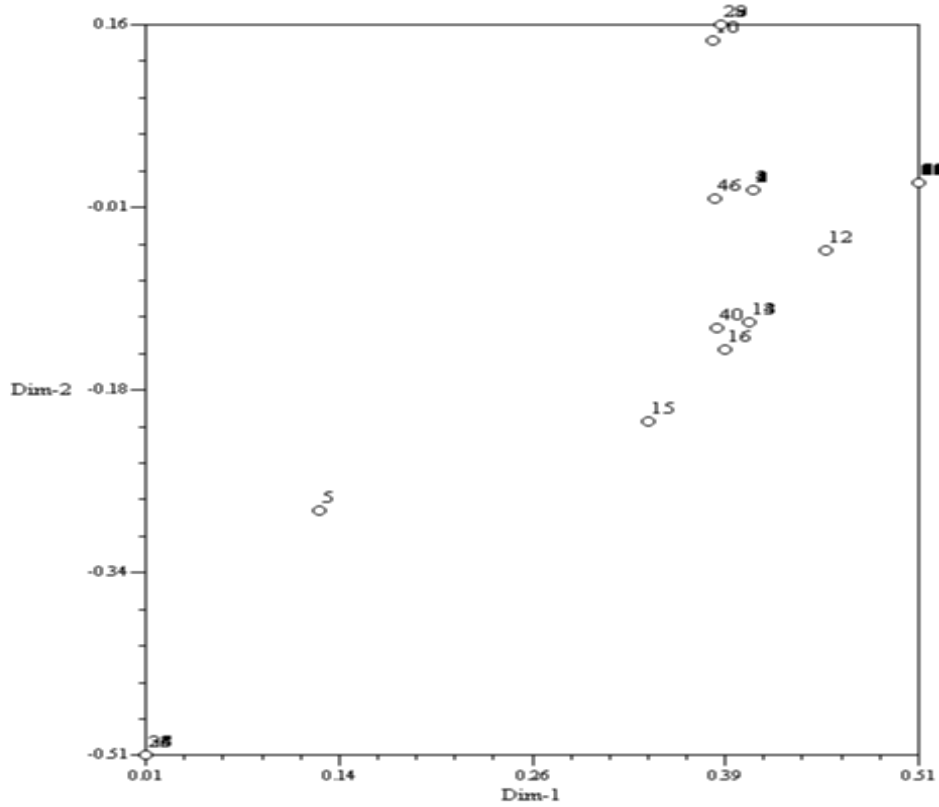


Şekil 4.70. 47 bermuda çiminde cpDNA PCR-RFLP ve ccSSR yöntemi kullanılarak elde edilen bandların birlikte analizi ile oluşturulan UPGMA dendrogramı

Tablo 4.7. cpDNA PZR-RFLP ve ccSSR profillerinin birlikte analizi ve DICE metoduna göre yapılan benzerlik matrisi

Mantel testi sonuçları göz önüne alındığında $r=0.334$ değeri matrisler arasındaki korelasyon katsayısını verir (Şekil 4.71). Matrisler arasındaki korelasyon katsayısı oldukça düşük bulunmuştur. İki farklı markır sistemi arasındaki korelasyon kat sayısının düşük çıkmasının nedeni iki sisteminde farklı sonuçlar üretmesinden kaynaklanır.

İlk üç eigen değeri toplam gözlenen varyasyonun %92'sini açıklamaktadır. Temel bileşen analizi grafiğinde sadece kloroplast DNA'larına bakılarak farklı örnek sayısı 47'den 10'a düşürülebilir (Şekil 4.71), yalnız bunun için sadece kloroplast DNA değil aynı zaman da nükleer DNA'nında değerlendirilmesi gerekir.



Şekil 4.71. cpDNA PZR-RFLP ve ccSSR markırlarına dayalı genetik benzerliklerin temel bileşen analiziyle farklı ploidi seviyelerinden 47 genotip arasındaki ilişkinin gösterilmesi

i	Eigen değeri	Yüzde	Kümülatif
1	9.37535676	74.8531	74.8531
2	1.57539892	12.5780	87.4312
3	0.58402306	4.6629	92.0940

5. BÖLÜM

TARTIŞMA VE SONUÇ

Bermuda çimlerinde polimorfizmi belirlemek için cpDNA genomunun çeşitli bölgelerini çoğaltan boyutları 20 ile 24 baz arasında değişen toplam 5 cpDNA PZR-RFLP primeri (*rbcL*, *Psb-trnS*, *TrnHK*, *TrnST* ve *30S*) kullanılarak cpDNA'nın ilgili bölgeleri çoğaltılmış ve analiz edilmiştir. cpDNA'daki çeşitliliği tespit etmek için PZR ürünlerine 10 farklı restriksiyon enzimi (*TaqI*, *RsaI*, *HinIII*, *BsuRI*, *EcoRI*, *EcoRV*, *MboI*, *MseI*, *MspI* ve *DraI*) uygulanmıştır. Agaroz jel elektroforezi yapılarak örneklerin tamamından skorlanabilen bantlar elde edilmiştir. cpDNA'sının belirli bölgelerine uygulanan restriksiyon enzimleri ile 47 bermuda çimi türünde toplam 143 bant elde edilmiş olup bunlardan, 53 bant polimorfik 90 bant ise monomorfik bulunmuştur. Molekül ağırlıkları 100 ile 1900 bp arasında değişen bandlarda polimorfizm oranı %37 olarak belirlenmiştir.

Elde edilen cpDNA PZR-RFLP primer ürünleri RE analizine tabi tutulduğunda en fazla polimorfizmi %100 ile *TrnHK-DraI*, *TrnHK-MspI*, *rbcL-BsuRI*, *rbcL-RsaI*, *30S-HinIII* kombinasyonların da olmuştur. Bireyler içerisindeki en fazla polimorfizmi ise 5 numaralı diploid birey göstermiştir. Diploid genotipe sahip olan bireyler, triploid, tetraploid, pentaploid ve hekzaploid bireylere göre daha çok polimorfizm göstermiştir.

Vekemans ve arkadaşları [46], *Phaseolus* çeşitleri arasındaki filogenetik ilişkiyi araştırmak için kloroplast DNA PCR-RFLP yöntemini kullanmıştır. Çalışma kapsamında 6 fasülye türünün 74 çeşidine 3 kloroplast DNA bölgesini kullanmışlardır. PZR neticesinde elde edilen ürünlere *Alu I*, *Ava I*, *Hae II*, *Hha I*, *Hinf I*, *Msp I*, *Nde II*, *Rsa I*, *ScrF I*, ve *Taq I* enzimleri ile kesildikten sonra elde edilen bant profillerine bakıldığında 74 çeşit arasında %80 oranında polimorfizm görülmüştür. Bu çalışmada daha düşük polimorfizm görülmesinin nedeni çoğaltılan DNA bölgeleri veya kullanılan farklı restriksiyon enzimlerinden kaynaklanabilir. Farklı bitki gruplarında cpDNA'sındaki polimorfizm oranının farklı olmasında doğaldır.

Gülşen ve arkadaşları [47], *Buchloe dactyloides* (buffalo çimi) cpDNA'sının aynı bölgelerini ve benzer enzimler kullanarak cpDNA PZR-RFLP çalışması yapmışlar ve 2 ile 14 arasında değişen sayıda DNA bandı elde etmişlerdir. Elde ettikleri 225 banddan 189 tanesi polimorfik (%84) bulunmuştur. Bizim bermuda çimi ile yaptığımız çalışmada ise bu oran %37 bulunmuştur. Sonuçlara göre bermuda çiminin bufalo çimine göre daha dar bir genetik çeşitliliğe sahip olduğu görülmektedir.

Wei ve arkadaşları [48], *Houttuynia* aksesyonlarında cpDNA ve mtDNA'nın PCR-RFLP ile analizi için 7 primer ile çoğaltılan DNA bölgelerine *HinfI*, *Hin6I*, *BsuRI* ve *RsaI* enzimlerini uygulamışlardır. Tanımladıkları 90 bant tanımlamışlar ve bunlardan 31 tanesi polimorfik olup polimorfizm oranını % 34 olarak hesaplamışlardır. Bu sonuçlar bizim çalışmamızla paralellik göstermektedir.

Filiz'in [36], yapmış olduğu çalışmada *Poaceae*(*Gramineae*) familyasından *Brachypodium distachyon* ve *Triticum aestivum* bitkilerini seçerek moleküler markır tekniklerinden cpDNA PZR-RFLP ve SSR'ı kullanmıştır. Çalışmalarında 8 primer-enzim kombinasyonu sonucu 244 bant elde etmişlerdir. Bu bantlardan 54 tanesinin polimorfik olduğunu ve polimorfizm oranının %22 olduğunu gözlemlemiştir. Bizim çalışmamıza göre bu farkın nedeni kullanılan primer enzim kombinasyonu veya bitki genotiplerinden kaynaklanabilir

Wu ve arkadaşları [49], Çin'deki *Cynodon* çeşitlerinin genetik analizinde AFLP markırlarını kullanmışlar, 13 AFLP selektif primerini 132 *Cynodon* örneğine uygulamışlardır. Bu araştırmacılar toplam bant sayısını 763 olarak bulmuşlar ve bu bantların 466 tanesinin polimorfik olduğu ve polimorfizm oranının %61 olduğunu belirtmişlerdir. AFLP diğer markır sistemleri ile karşılaştırıldığında genel olarak daha fazla polimorfizm göstermektedir. Ayrıca çekirdek genomunda organel genomuna göre daha fazla varyasyon olması doğaldır. AFLP çekirdek genomunun büyük bir kısmındaki varyasyonu yansıtır.

Wang ve arkadaşları [50], Amerika, Avusturya ve Çin de bulunan 24 *Cynodon* çeşitleri arasında moleküler varyasyon ve benzerlikleri tanımlamak için yaptıkları çalışmada SRAP primerleri uygulamışlardır. Yaptıkları çalışmada 274 bant elde edilmişlerdir. Bu bantlardan 249 tanesi (%91) polimorfizm göstermiştir. Genotipler arasındaki genetik mesafe 0.57 ile

0.87 arasında bulunmuştur. Bizim cpDNA PZR-RFLP çalışmasında bireyler arasındaki genetik mesafe 0.77 ile 1 arasında bulunmuş ve bu çalışmada polimorfizm oranının yüksek çıkmasının nedeni ise kullanılan markırların çekirdeğe özgü olmasından kaynaklanabilir. Ayrıca SRAP markırları polimorfizmi tespit etmek için diğer çekirdek markırlarına göre daha etkilidir.

Gandhi ve arkadaşları [51], SSR'ların boyutlarını değiştiren mutasyonların eşit olmayan krossingover veya replikasyon kaymasından kaynaklanmakta olduğunu ileri sürmüşlerdir. SSR bölgelerini çevreleyen kısımlardaki göreceli korunumun mikrosatellitlerin taksonlar arası lokus spesifik ve kodominant genetik markırlar olarak kullanılmasını sağladığını da düşünmektedirler. SSR lokuslarında mutasyon oranının genomun diğer genlerinden daha fazla olmasından dolayı (her jenerasyon için yaklaşık 10^{-3}), tesadüfi mutasyonlardan varyasyonlar beklenebilir [52]. cpSSR lokuslarında çekirdek SSR lokuslarına göre daha az allel rapor edilmiştir ve cpSSR lokuslarında daha az mutasyon oranında öngörülmüştür [53].

Kodlanmayan DNA içerisindeki SSR'ların başlangıçta fonksiyonu olmadığı düşünülmekteydi [54], fakat şimdi onların genom organizasyonunda, transkripsiyonun düzenlenmesinde DNA rekombinasyonu ve tamirinde rol aldıkları bilinmektedir.

Yapmış olduğumuz çalışmada bermuda çimlerinde kloroplast DNA polimorfizm belirlemek için kullanılan cpDNA PZR-RFLP yanında ccSSR polimorfizmi de kullanılmıştır. Bu amaçla boyutları 18 ile 24 baz arasında değişen 8 ccSSR primeri Akdeniz sahilinden toplanan 40 örnek, Kayseri ve Nevşehir'den toplanan 7 örneğin tamamına uygulanmıştır. Poliakrilamid jel elektroforezi yapılarak örneklerin tamamından skorlanabilen bantlar elde edilmiştir. Bant profilleri incelendiğinde toplamda 16 bant elde edilmiş ve bu bantlardan (190-410bp) 14 tanesinin polimorfik ve 2 tanesinin ise monomorfik olduğu gözlenmiştir. SSR markır ile belirlenen polimorfizm oranının % 87 olduğu ve PIC (Polymorphism information content) değerinin 0.57 olduğu bulunmuştur.

Çalışılan bermuda çimleri ccSSR profilleriine bakıldığında en fazla polimorfizmi %100 ile ccSSR-5, ccSSR-8, ccSSR-12, ccSSR-19 ve ccSSR-22 primerleri göstermiştir. ccSSR-4 ve ccSSR-15 numaralı primerler polimorfizm göstermemiştir. cpDNA PCR-RFLP’de olduğu gibi bireyler içerisindeki en fazla polimorfizmi ise 5 numaralı diploid birey göstermiştir. Diploid genotipe sahip olan bireyler, triploid, tetraploid, pentaploid ve hekzaploid bireylere göre daha fazla polimorfizm göstermiştir.

Filiz’in [36], yapmış olduğu çalışmada, *Poaceae (Gramineae)* familyasından *Brachypodium distachyon* ve *Triticum aestivum* bitkilerini seçerek moleküler markır tekniklerinden SSR’ı kullanmış ve PIC değerini 0.66 bulmuştur. PIC değeri 0.60’dan büyük olan sonuçlar genelde yüksek genetik çeşitlilik olarak kabul edilmektedir. Fu ve Somers çalışmalarında 75 farklı buğday çeşidiyle SSR markır tekniği kullanarak genetik çeşitliliğini belirlemişlerdir. 21 buğday kromozomu üzerinde 370 SSR primeri kullandı ve toplam 280 allel tespit etmişlerdir, PIC değerini ise 0.61 bulmuşlardır [55]. Bizim yaptığımız çalışmada kullandığımız 10 primerden 8 tanesinde beklenen PCR ürünü elde edilmiş olup PIC değeri 0.57 bulunmuştur. Genetik çeşitlilik oranının birbirlerine yakın olduğu tespit edilmiştir.

Wills ve arkadaşları [56], Ayçiçeği ile yaptıkları bir çalışmada polimorfizm seviyesini belirlemek için 36 cpSSR primeri kullanmışlar ve genetik çeşitliliği ortalama 0.50 olarak tahmin etmişlerdir. Genetik çeşitlilik açısından bizim çalışmamız ile karşılaştırıldığında ayçiçeğindeki PIC değerinin bermuda çimine göre düşük olduğu belirlenmiştir.

Provan ve arkadaşları [57, 58], yaptıkları çalışmalarda kullanmış oldukları SSR markırların RFLP markırlara göre kloroplast DNA’sında daha fazla varyasyon gösterdiğini kanıtlamışlardır. Bizim çalışmamızda da benzer şekilde cpDNA PZR-RFLP markırları ve ccSSR markırlarını karşılaştırdığımız zaman, ccSSR markırlarının polimorfizm oranının daha yüksek seviyede olduğunu bulunmuştur.

Li ve arkadaşları [59], Çinin kuzey batısından toplamış oldukları 7 *Psammochloa villosa* (*Poaceae*) popülasyonuna ait bireylerdeki genetik çeşitliliği araştırmak için SSR primerleri uygulamış ve araştırmacılar kullandıkları 12 primerden 173 bant elde ettiklerini, bunların 157 tanesinin polimorfik olduğunu, polimorfizm oranının ise %70 olduğunu bulmuşlardır. Bu çalışmanın sonuçları da bizim yaptığımız çalışmayla paralellik göstermektedir.

Çalışmamızda bermuda çimi genotipler arasındaki ilişki; cpDNA PCR-RFLP ve ccSSR profillerinin birlikte kullanılarak yapılan skorlamalar sonucunda ortaya konmuştur. UPGMA dendogramına göre; bermuda çimlerine ait 47 genotip iki ana dala ayrılmıştır. Birinci ana dalda diğerlerinden tamamen farklı duran diploit genomlu 5 numaralı örnek bulunmaktadır. İkinci ana dal 3 alt gruba ayrılmıştır. Birinci alt grupta 1, 2, 3 numaralı örnekler bulunmaktadır. İkinci alt grupta yalnızca tetraploid, pentaploid ve hekzaploid genoma sahip örnekler, üçüncü grupta ise yalnızca diploid genoma sahip örnekler bulunmaktadır.

Gülşen ve arkadaşları [35] çalışmamızda kullandığımız bermuda çimi genotiplerine SRAP, POGP, ISSR ve RAPD olmak üzere 4 farklı çekirdek markırlarını uygulamışlardır. Onlarda UPGMA dendogramına göre 5 numaralı diploid bireyin tamamen farklı bir grup oluşturduğu sonucunu bulmuşlardır. Bizim cpDNA markırları ile bulduğumuz sonuca uyumlu olarak 5 numaralı diploid bireyin diğer bireylerden farklı kümelendiği ve diğer bireylere genetik olarak daha uzak olduğunu göstermişlerdir.

Skorlamalarımız sonucuna göre elde edilen genetik uzaklık değerlerinin cpDNA PZR-RFLP restriksiyon enzimleri analizinde 0.77 ile 1.00 arasında olduğu tesbit edilmiştir. ccSSR profilleri için ise bu benzerlik oranı 0.53 ile 1.00 arasında bulunmaktadır. Genotiplerden aykırı olan 5 numaralı bireyi çıkardığımız zaman cpDNA PZR-RFLP restriksiyon enzimleri analizi benzerlik oranı 0.98 ile 1.00 arasındadır. cccSSR profilleri için ise bu oran değişmemektedir. cpDNA PCR-RFLP ve ccSSR profilleri birlikte analizine göre 47 genotip içerisinde birbirine en yakın genotiplerin sayısı 30'u bulunmaktadır, en uzak genotip ise 5 numaralı genotip olarak belirlenmiştir. Benzerlik oranı 0.76 ile 1.00 arasında bulunmuştur. Genotiplerden farklı bir oran veren 5 numaralı birey çıkarıldığı zamanki benzerlik oranı ise %96 olarak belirlenmiştir.

Diploid, triploid, tetraploid, pentaploid ve hekzaploid genotiplerin polimorfizmine bakacak olursak diploid bireylerin diğer ploidi düzeylerine oranla daha fazla polimorfizme sahip olduğu bulunmuştur. Diploid bireyler cpDNA PZR-RFLP restriksiyon enzimleri analizinde diğer genotiplere %98 oranında benzemekte iken, ccSSR profillerinde diploid bireylerin diğer genotiplere benzerliği %75 oranında bulunmuştur. cpDNA PZR-RFLP ve ccSSR profillerinin birlikte değerlendirilmesi ile elde edilen benzerlik oranı ise %96 bulunmuştur.

Çalışmamızda temel bileşen analizi (PCA) oldukça benzer genotipleri belirlemek ve tanımlamak için kullanılmıştır. Temel bileşen analizi UPGMA dendogramındakine benzer gruplandırma göstermiştir. Mohammadi ve Prasanna [60], genetik varyasyonun çoğunu ilk iki veya üç vektör açıklandığında temel bileşen analizinin bireyleri gruplandırmada oldukça faydalı olduğunu söylemişlerdir. Bu çalışmada ilk üç eigen değeri total gözlenen varyasyonun %92'sini oluşturmuştur.

Mantel Testi sonuçları göz önüne alındığında (Şekil 4.70.) iki farklı markır sisteminin matrisleri arasındaki korelasyon katsayısı 0.334 bulunmuştur ($r=0.334$). Korelasyonun çok düşük çıkmasının sebebi cpDNA PZR-RFLP restriksiyon enzimleri polimorfizmi ve ccSSR polimorfizmi farklı kloroplast bölgelerini güçlendirdiğini gösterir.

Gülşen ve arkadaşları [35] bizim çalışmamızda kullandığımız bermuda çimi genotiplerine SRAP, POGP, ISSR ve RAPD olmak üzere 4 farklı markır sistemini uygulamışlardır. Bu markır sistemlerine göre genetik mesafesi 0.5-0.98'e kadar değişen aralıkta olduğunu rapor etmişlerdir. Yapılan mantel testinde SRAP, POGP ve ISSR markırları yüksek korelasyon göstermişler, fakat RAPD ve diğer markırların korelasyonu düşük bulunmuştur.

Karaca ve arkadaşları [61], *Cynodon* ile yaptıkları bir çalışmada 15 AFLP, 10 cpSSRLP, 10 DAMD, 10 RAPD primerleri kullanarak 1423 DNA bandı elde etmişler ve bunlardan 472 tanesi polimorfik bulunmuştur. Bu markır sistemlerinden AFLP tekniği en fazla polimorfik band üretmiştir. DAMD ve RAPD tekniklerinin tekrarlanabilirlikleri AFLP ve cpSSRLP göre daha düşük bulunmuştur. cpSSRLP'nin tekrarlanabilirliği AFLP ye eşit bulunmuş olup *Cynodon* türlerinde maternal genomun ve filogenetik ilişkilerin analizinde kullanışlı bulunmuştur. AFLP, cpSSRLP, DAMD ve RAPD verisi için DİCE genetik benzerlik indeksi (GST) hesaplamıştır. Parsimoni kriterleri kullanıldığında GSI değerleri

göreceli olarak düşük bulunmuşken fenotipler arası ilişkiler etkilenmemiştir. Alınan sonuçlar bermuda çiminin dar bir germplasm temelli olduğunu göstermiş olup, GSI değeri AFLP’de 0,6-0,97, SSR’da 0,6-1.00, DAMD’de 0,6-1 ve RAPD 0,55-1 arasında bulunmuştur. GSI’nın markırlar arası doğrusal korelasyon katsayısı hesaplanmıştır ve AFLP, DAMD, ve RAPD arasında yüksek bulunmuştur. Fakat cpSSRLP ile diğer teknik arasında düşük bulunmuştur. Bizim çalışmamızda yaptığımız Mantel testinde, benzer şekilde cpSSR markır sistemi ile cpDNA PZR-RFLP arasındaki korelasyon düşük bulunmuştur.

Ferriol ve arkadaşları [62], yaptıkları bir çalışmada SRAP, AFLP ve SSR gibi 3 farklı markır sistemindeki polimorfizm oranındaki farklılığı şu şekilde açıklamışlardır; SRAP’ın kodlanan gen bölgelerini amplifiye ettiği, AFLP’nin hem kodlanan hem de kodlanmayan gen bölgelerini amplifiye ettiği, SSR’ın ise kodlanmayan gen bölgelerini amplifiye ettiği için polimorfizm farklılıklarının ortaya çıktığını bildirmişlerdir. Bizim bulgularımıza göre de SSR markırları ile elde edilen polimorfizm oranı RFLP ile elde edilenden daha yüksek olmuştur. Gandhi ve arkadaşları [51], *Brassicaceae* familyasının 12 türünün cpDNA’sında yaptıkları çalışmada yapısal (sekans temelli) filojeni ile SSR uzunluğuna dayalı filojeni karşılaştırmışlar ve aralarında bir korelasyon bulamamışlardır.

Hale ve arkadaşları [63], 24 brokoli örneğiyle yapmış oldukları çalışmada AFLP ve SSR markırları arasındaki ilişkiyi Mantel testi ile belirlediklerinde kofenetik ve benzerlik matrisleri arasındaki korelasyon katsayısını $r = 0.35$ olarak bulmuşlardır. Benzer şekilde bizim çalışmamızda korelasyon katsayısı düşük ($r = 0.33$) bulunmuştur.

Bu çalışmada kloroplast DNA markırları kullanılarak 47 çeşit bermuda çimi örneği arasındaki genetik ilişkinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla cpDNA PZR-RFLP ve ccsSSR markır sistemleri kullanılmış ve sırasıyla %37 ve %87 oranında polimorfizm olduğu tespit edilmiştir. Farklı bermuda çimleri genotipleri arasındaki genetik mesafeyi belirlemek için ccSSR markır sisteminin daha elverişli olacağı sonucuna varılmıştır. Bu çalışma bermuda çimi çeşitlerinin kloroplast DNA'sındaki polimorfizmi belirlemede cpDNA PZR-RFLP ve ccsSSR markırının kullanımı açısından özgünlük arz etmektedir. Farklı bermuda çimleri arasındaki genetik çeşitliliği tespit etmek için çekirdek markırlarına ek olarak cpDNA PZR-RFLP ve ccSSR'ların da etkin bir şekilde kullanılabileceği gösterilmiştir. Bu tez çalışmasından elde edilen bulgular doğrultusunda aşağıdaki önerilerde bulunulabilir.

Günümüzde DNA moleküler markırları ile yapılan detaylı çalışmalar sayesinde istenilen genlerin doğrudan takibi ve bu genlerin seçilebilmesi mümkündür. Bu gelişmeler sayesinde, polimorfizm çalışmalarında istenilen genlerin incelenebilmesi mümkün hale gelmiştir. Gelecek çalışmalar için bermuda türlerinde fonksiyonel bütün genlerin yerlerinin belirlenmesi ve ürünleri belli olmayan bir çok genin klonlanması çalışılabilir.

Moleküler biyoloji biliminin hızlı gelişimine paralel olarak bireylerin doğrudan genetik materyali hakkında bilgi sağlayan moleküler markırlar devreye girmiştir. Bu gelişmeler sayesinde genotip tanımlama çalışmaları kapsamında birbirine destek nitelikte farklı yöntemler bir araya getirilerek daha ayrıntılı bulgular elde edilebilir.

Bu çalışmada elde edilen bulgular literatür ile uyumlu bulunurken bazı farklı bulgular da elde edilmiştir. Bu problemin çözümü için bermuda çimi çeşitlerinde farklı markır sistemleri kullanılarak hem çekirdek hem de organel genomunda polimorfizm düzeyi belirlenebilir ve varyasyon durumu açıklanabilir. Bizim kullandığımız markırlar bu alanda başka markırlarla yapılacak olan çalışmalarda kıstas olarak kullanılabilir.

KAYNAKLAR

1. Beard, J.B., Turfgrass: Science and Culture. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey, USA, 1973.
2. Clayton, W.D., Renvoize, S.A., Genera *Gramineae*-grasses of world. Kew Bulletin. Additional Series XIII. Royal Botanic Gardens, Kew, UK, 1986.
3. Anonymous, Chinese floral acta.(In Chinese) Vol 10.Science Pres, Benjing, China p. 82-85, 1990.
4. Abulaiti, Shi D.S., Yang, G., Apreliminary survey of native Xinjiang bermudagrass, J. Xinj. Agric. Univ. 21,124-127, 1998.
5. Harlan, J.R., de Wet, J.M.J., Sources of variation in *Cynodon dactylon* (L.) Pers. Crop Sci, 9,774-778, 1969.
6. Watson, L., Dallwitz, M.J., The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval, 1992.
7. Malik, C.P., Tripathi, R.C., Cytological evolution within the *Cynodon dactylon* complex. Biol. Zentralbl, 87,625-627, 1968.
8. Harlan, J.r., J.M.J de Wet, Rawal, K.M., Geographic distribution of the species of *Cynodon* L.C. Rich(*Gramineae*), East Afric. Agric. Fores, J. 36,220-226, 1970b.
9. de Silva, P.H.A.U., Snaydon R.W., Chromosome number in *Cynodon dactylon* in relation to ecological conditions, Ann. Bot.(London) 76,535-537, 1995.
10. Forbes, I., Burton, G.W., Chromosome numbers and meiosis in some *Cynodon* species and hybrids, Crop Sci, 3,75-79, 1963.
11. Wu, Y.Q., Taliaferro, C.M., Martin, D.L., Anderson, C.A., Anderson, M.P., Genetic analyses of Chienese *Cynodon* accession by flow cytometry and AFLP markers, Crop Sci 46,917-926, 2006.

12. Zeven, A.C., Polyploidy and domestication: The origin and survival of polyploids in cytotype mixtures. In: Lewis WH(ed) Polyploidy, biological relevance. Plenum Pres, New York, 385-408, 1979.
13. Taliaferro, C.M., Bermudagrass (*Cynodon*(L.) Rich). In: Casler MD, Duncan RR(eds) Turfgrass biology, genetics, and breeding. John Wiley and Sons, Inc, New Jersey, pp 235-257, 2003.
14. Kang, S.Y., Lee, G.J., Lim, K.B., Lee, H.J., Park, I.S., Chung, S.J., Kim, J.B., Kim, D.S., Rhee, H.K., Genetic Diversity among Korean bermudagrass (*Cynodon spp*) ecotypes characterized by morphological, cytological and molecular approach. Mol Cells 25,163-171, 2007.
15. Erickson, L.R., Strauss, W.A., Bevensdorf, W.D., Restriction patterns reveal origins of chloroplast genomes in Brassica amphidiploids. Theor Appl Genet, 65,201-206, 1983.
16. Song, K., Osborn, T.C., Polyphyletic origins of *Brassica napus*: new evidence based on organelle and nuclear RFLP analyses. Genome, 35,992-100,1992.
17. Gauthier, P., Lumaret, R., Bedecarrats, A., Chloroplast-DNA variation in the genus *Lotus* (*Fabaceae*) and further evidence regarding the maternal parentage of *Lotus corniculatus* L. Theor Appl Genet, 95,629-636, 1997.
18. Segraves, G.H., Renno, J.F., Genotypic variation in progeny of the agamic grass complex *Pennisetum* section *Brevivalvula* in West Africa. PL Syst Evol, 215,71-83,1999.
19. Chase, M.W., et.al., Phylogenetics of seed plants: an analysisi of nucleotide sequences from the plastid gene *rbc L*. Ann. Missori Bot. Gard, 80, 528-580,1993.
20. Shaw, J., Lickey, E.B., Beck, J.T., Farmer, S.B., Liu, W., Miller, J., Siripun, K.C., Winder, C.T., Schilling, E.E., Small, R.L., The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis, Am. J. Bot.92, 142-166, 2005.

21. Birky, C.W., Uniparental inheritance of mitochondrial and chloroplast genes: mechanism and evolution, *Proc Natl Acad Sci USA* 92,11331-11338, 1995.
22. Clegg, M.T., Gaut, B.S., Learn G.H., Morton, B.R., Rates and patterns of chloroplast DNA evolution, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 91, 6795-6801, 1994.
23. Clegg, M.T., Cummings, M.P., Durbin M.L., The evolution of plant nuclear genes, *Proc. Natl. Acad. Sci, USA.*, 94, 7791-7798, 1997.
24. Wolfe, K.H., Li, W.H., Sharp, P.M., Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast, and nuclear DNAs. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA.*,84,9054-9058, 1987.
25. Staub, J.E., Serquen, F.C., Gupta, M., Genetic markers, map construction and their application in plant breeding. *HortScience* 31(5), 729-741,1996.
26. Hamada, H., Petrino, M.G., Kakunaga, T., Anovel repeated element with Z-DNA-forming potential is widely found evolutionary diverse eucaryotic genomes, *Proc Natl Acad Sci USA*, 79,6465-6469,1982.
27. Weber, J. L., May, P.E., Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction, *Am. J. Hum. Genet.*, 44,388-396, 1989.
28. Bell, C.J., Ecker, J.R., Assignment of 30 microsatellite loci to the linkage map of *Arabidopsis*, *Genomics*, 19,137-144, 1994.
29. Röder, M.S., Korzun, V., Wendehake, K., Plaschke, J., Tixier, M. H., Leroy, P., Ganal, M.W.A., microsatellite map of wheat, *Genetics*, 149,2007-2023, 1998.
30. Powell, W., Machray, G.C., Provan J., Polimorphism revealed by simple sequence repeats, *Trends Plant Sci.*, 1,215-222, 1996.
31. Devos, K.M., Millan, T., Gale, M.D., Comparative RFLP maps of the homoeologous group-2 chromosomes of wheat, rye, and barley, *Theor Appl Genet*, 85,784-792, 1993.

32. Brosnan, J.T., Deputy, J., Bermudagrass. Cooperative Extension Service Turf Management TM-5, 2008.
33. Davis, P.H., Flora of Turkey and the East Aegean Island, Edinburg at the Univercity Press, 8, 156-157, 1988.
34. Seçmen,Ö., Gemici, Y. G., ve ark., Tohumlu Bitkiler Sistematigi, E.Ü. Fen Fak. Kitaplar Serisi No. 116, 6. baskı, 2000.
35. Gulsen, O., Mutlu-Server, S., et al., Polyploidy Creates Higher Diversity Among *Cynodon* Accessions As Assessed By Molecular Markers, Theor. Appl. Genet., 118, 1309–1319, 2009.
36. Filiz, E., *Poaceae (Gramineae)* Familyasının Bazı Taksonlarından Coğrafik Dağılımın Sitoplazmik Analiz Yöntemiyle (mtDNA-cpDNA) incelenmesi, Doktora Tezi, Marmara Üniversitesi, İstanbul, 2009.
37. Ağar, A., *Aurantionideae* Alt Familyasındaki Cinslerde Yer Alan Bai Türlerin SSR Markırlarıyla Moleküler Karakterizasyonu, Çukurova Üniversitesi, Adana, 2007.
38. Budak, A., Karayaka, Sakız ve Bafra Koyun ırklarının RAPD-PCR yöntemi ile moleküler genetik analizi, Kırıkkale Üniversitesi, Kırıkkale, 2003.
39. Yıldırım, A., ve Kandemir, N., Genetik markırlar ve Analiz Metodları, Selçuk Üniv. Vakıf yayınları, 112-159, 2001.
40. Özatay, Ş., Mercimek genomunun AFLP, RAPD, ISSR ve bazı morfolojik markırlar kullanarak haritalanması, Ege Üniversitesi, İzmir, 2007.
41. Varlı, İ., Microsatellit (SSR) DNA Markırlarının Mercimek Genom Haritalamasında Kullanılması, Harran Üniversitesi, Şanlıurfa, 2009.
42. Gürkök, T., Türkiye Doğal Florasında Yetişen Papaver Cinsi Oxytona Seksiyonuna ait Gen Havuzunun ISSR Tekniği ile Genetik Karakterizasyonu, Gazi Osman Paşa Üniv., Tokat, 2009.

43. Chung, S.M., Staub, J.E., The development and evolution of consensus chloroplast primer pairs that possess highly variable sequence region in a diverse array of plant taxa, *Theor Appl Genet*, 107,757-767, 2003.
44. Doyle, J.J., Doyle, J. L., A Rapid Total DNA preparation Procedure For Fresh Plant Tissue, *focus*, 12, 13-15, 1990.
45. Temizkan, G., Arda, N., Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler. İstanbul Üniversitesi Biyoteknoloji ve Genetik Mühendisliği Uygulama Merkezi Yayın No,3.2008
46. Vekemans, X., Hardy, O., Berken, B., Fofana, B., Baudoin, J.P., Use of PCR-RFLP on Chloroplast DNA to investigate phylogenetic relationship in the genus *Phaseolus*, *Biotechnol. Argon. Soc. Environ.* 2(2), 128-134, 1998
47. Gülşen, O., Shearman, R.C., Heng-Moss, T.M., Mutlu, N., Lee, D.J., Sarath, G., Peroxidase Gene Polymorphism in Buffalograss and Other Grasses, Published in *Crop Sci* 47,767-774 (2007).
48. Wei, W., Youliang, Z., Li, C., Yuming, W., Zehong, Y., Ruiwu, Y., PCR-RFLP analysis of cpDNA and mtDNA in the genus *Houttuynia* in some areas of China, *Hereditas* 142:24, 32, 2005.
49. Wu, Y.Q., Taliaferro, C.M., Bai, G.H., Martin D.L., and Anderson, J.A. (2006). Genetic analyses of Chinese *Cynodon* accessions by flow cytometry and AFLP markers. *Crop Sci.* 46, 917-926.
50. Wang, Z., Yuan, X., Zheng, Y., Liu, J., Molecular identification and genetic analysis for 24 turf-type *Cynodon* cultivars by Sequence-Related Amplified Polymorphism markers, *Scientia Horticulturae* 122, 461-467, 2009.
51. Gandhi, S., Awasthi, P., Bedi, Y., Analysis of SSR dynamics in chloroplast genomes of Brassicaceae family, *Bioinformation* 5(1), 16-20, 2010.
52. Goldstein, D., Pollock, D., Launching microsatellites: a review of mutation processes and methods of phylogenetic interference, *Heredity* 88, 335-342, 1997.

53. Powell, W., et.al., The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis, *Molecular Breeding* 2, 225-238, 1996.
54. Li, Y.C., Korol, A.B., Fahima, T., Nevo, E., Microsatellites within genes: Structure, function, and evolution, *Society for Molecular Biology and Evolution*, 21.6,991-1007, 2004.
55. Fu, Y.B., Somers, D.J., Genome-Wide Reduction of Genetic Diversity in Wheat Breeding, *Crop Sci.* 49, 161-168, 2009.
56. Wills, M.W., Hester, M.L., Liu, A., Burke, J.M., Chloroplast SSR polymorphisms in the Compositae and the mode of organellar inheritance in *Helianthus annuus*, *Theor Appl Genet* 110, 941-947, 2005.
57. Provan, J., Corbett, G., McNicol, W., Powell, W., Chloroplast DNA variability in wild and cultivated rice (*Oryza spp.*) revealed by polymorphic chloroplast simple sequence repeats, *Genome* 40(1),104-110, 1997.
58. Provan, J., Corbett, G., Waugh, R., McNicol, W., Morgante, M., Powell, W., DNA fingerprints of rice (*Oryza sativa*) obtained from hypervariable chloroplast simple sequence repeats, *Proc Biol Sci.* 22,263(1375),1275-81, 1996.
59. Li, A., Ge, S., Genetic variation and clonal diversity of *Psammochloa villosa* (Poaceae) detected by ISSR Markers, *Annals of Botany* 87, 585-590, 2001.
60. Mohammadi, S.A., Prassanna, B.M., Analysis of genetic diversity in crop plants-salient statistical tools and considerations. *Crop Sci*, 43, 1235-1248, 2003.
61. Karaca, M., Saha, S., Zipf, A., Jenkins, J.N., Lang, D.J., Genetic diversity among forage *Bermudagrass* (*Cynodon spp.*): Evidence from chloroplast and nuclear DNA fingerprinting, *Crop Sci.* 42, 2118-2127, 2002.
62. Ferriol, M., Pico, B., Nuez, F., Morphological and molecular diversity of a collection of *Cucurbita maxima* landraces, *J Amer.Soc. Hort. Sci.*, 129,60-69, 2004.
63. Hale, A.L., Farnham, M.V., Menz, M.A., Use of PCR-based markers for differentiating elite *broccoli* anbeds, *J. Am. Soc. Hort. Sci* 131,418-423,2006.

EKLER**Ek- 1.** Tris-Asetat(TAE) tamponu içeriği ve kullanılan miktarı

Tris-Asetat (TAE) tamponu pH 8.0 (50X/litre)	Kullanılan Miktar
Trizma base	242 g
Glasiyel asetik asit	57.1 ml
0.5 M EDTA (pH 8.0)	100 ml

Ek- 2. Yükleme tamponu içeriği ve kullanılan miktarı

Yükleme Tamponu (bromophenol blue)	Kullanılan Miktar
Üre	4 M
EDTA	0.025 M
Sukroz	%60
Bromophenol blue	%0.025
Ksilen	%0.025

Ek- 3. TAE tamponu

Tris-Asetat (TAE) tamponu pH 8.0 (50X/litre) ve tank tamponu	Kullanılan Miktar
Trizma-base	242 g
Glasiyel asetik asit	57.1 ml
0.5 M EDTA (pH 8.0)	100 ml

Ek- 4. Yükleme tamponu

Yükleme Tamponu:	Kullanılan Miktar
Üre	4 M
EDTA	0.025 M
Sukroz	%60
Bromophenol blue	%0.025
Ksilen	%0.025

Ek- 5. Akrilamid çözeltisi hazırlanışı

Akrilamid/bis Çözeltisi	Kullanılan Miktar
Akrilamid	29.2
Bis	0.8 g
H ₂ O	100 ml'ye tamamlanır. Karanlıkta 4°C'de saklanır.

Ek- 6: APS çözeltisi

Amonyum persülfat	Kullanılan Miktar
Amonyum persülfat	0.5 g
H ₂ O	5 ml'ye tamamlanır.

Ek- 7. Poliakrilamid Jel içeriği

PAGE kompetanı	Kullanılan Miktar
Akrilamid çözeltisi	10 ml
H ₂ O	39 ml
50X TAE	0.5 ml
%10 APS	0.5 ml
TEMED	41.5 µl

ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı: Ahmet CEYLAN

Doğum Yeri ve Yılı: Yeşilhisar/KAYSERİ, 1986

Baba Adı: Latif

Anne Adı: Emine

1998 yılında Keykubat İlköğretim Okulu'ndan, 2001 yılında 50.yıl Dedeman İlköğretim Okulu'ndan, 2004 yılında da Aydınlık Evler Lisesi'nden mezun oldu. 2004-2005 yılında Erciyes Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'ne kayıt yaptırdı. 2008 yılında lisans eğitimini tamamladı ve aynı yıl içerisinde Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans öğrenimine başladı. 2009 yılında Erciyes Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Ana Bilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi olarak göreve başladı ve halen bu görevine devam etmektedir.

Adres : Erciyes Üniversitesi
Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü

Tel :0534 495 70 70

e-mail : aceylan@erciyes.edu.tr