



**TÜRKİYE’DE TİCARİ DEĞERİ OLAN
Papaver somniferum L. ÇEŞİTLERİNİN MOLEKÜLER
KARAKTERİZASYONU**

**Gülşen BOZTEPE
Yüksek Lisans Tezi**

**Biyoloji Anabilim Dalı
Yrd. Doç. Dr. İskender PARMAKSIZ
2010**

Her hakkı saklıdır

**T.C.
GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**TÜRKİYE’DE TİCARİ DEĞERİ OLAN *Papaver somniferum* L. ÇEŞİTLERİNİN
MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU**

Gülşen BOZTEPE

**TOKAT
2010**

Her hakkı saklıdır

Yrd. Doç. Dr. İskender PARMAKSIZ danışmanlığında, Gülşen BOZTEPE tarafından hazırlanan bu çalışma 20.08.2010 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

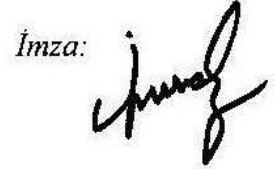
Başkan: Doç. Dr. Şaban TEKİN

İmza: 

Üye: Yrd. Doç. Dr. Bilge Hilal ÇADIRCI

İmza: 

Üye: Yrd. Doç. Dr. İskender PARMAKSIZ

İmza: 

Yukarıdaki Sonucu Onaylarım



Prof. Dr. Metin YILDIRIM

Enstitü Müdürü

12/11/2010

TEZ BEYANI

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

Gülşen BOZTEPE

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

**TÜRKİYE’DE TİCARİ DEĞERİ OLAN
Papaver somniferum L. ÇEŞİTLERİNİN MOLEKÜLER
KARAKTERİZASYONU**

Gülşen BOZTEPE

**Gaziosmanpaşa Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı**

Danışman: Yrd. Doç. Dr. İskender Parmaksız

Haşhaş (*Papaver somniferum* L.) farmosötik öneme sahip, analjezik morfin ve kodein, antimikrobiyal aktiviteye sahip sanguinarin gibi çeşitli benzilizokinolin alkaloitleri üreten ticari öneme sahip tıbbi bir bitkidir. Bu çalışmada morfin oranı yüksek haşhaş bitkilerinin ıslah çalışmalarına yardımcı olabilmek için SSR ve ISSR moleküler markörlerinden yararlanılması amaçlanmıştır. Tescillenmiş 17 haşhaş bitkisinin moleküler karakterizasyonunu belirlemek için 15 ISSR ve 5 SSR primeri kullanılmıştır. ISSR çalışması sonucunda oluşan 55 banttı 44 tanesi polimorfik ve polimorfizm oranı %80 dir. En az bant veren AT3 primeri tek bant, en çok bant veren AT19, AT 8 ve AT 15 primerleri 6’şar bant vermiştir. Ortalama genetik mesafe 0,27, Shannon indeksi 0,38 dir. SSR çalışması sonucunda 39 polimorfik bant elde edilmiştir. Ortalama genetik uzaklık 0,47, Shannon indeksi 0,46 dir.

2010, 42 sayfa

Anahtar Sözcükler: *Papaver*, *Papaver somniferum* L, ISSR, SSR, genotiplendirme

ABSTRACT

Ms Thesis

Molecular Characterization of Commercial Cultivar of *Papaver somniferum* in Turkey

Gülşen BOZTEPE

Gaziosmanpaşa University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Asst. Prof. Dr. İskender Parmaksız

Economically important plant opium poppy (*Papaver somniferum* L.) is a medicinal plant producing benzyisoquinoline alkaloids such as analgesic morphine and codein, antimicrobial agent sanguinarine. In this study, it was aimed to utilize SSR and ISSR markers to help breeding of poppies which contain high level of morphine. 15 ISSR and 5 SSR primers were studied on registered 17 populations . In ISSR, total 55 bands were obtained, of which 44 were polymorphic. Average genetic distance was found to be 0,27, and Shannon index was 0,38. The least number of bands belonging to primer AT3 was 1 and the highest was 6 belonging to primers AT19, AT8 and AT15. In SSR study, 5 SSR primers were studied and 39 polymorphic bands were obtained. Avarage genetic distance was found to be 0.47, and Shannon index was 0,46.

2010, 42 pages

Key words: *Papaver*, *Papaver somniferum* L, ISSR, SSR, genotyping

TEŞEKKÜR

Altı yıldır hem lisans hem yüksek lisans yaptığım dönem içerisinde gerek eğitmenliği gerek öğreticiliği ile bilime ve hayata hazırlanmam için her türlü desteği ve imkânı sağlayan danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. İskender PARMAKSIZ'a, değerli bölüm başkanımız Sayın Prof. Dr. Zekeriya ALTUNER'e, manevi desteğini esirgemeyen Sayın Yrd. Doç. Dr. İbrahim TÜRKEKUL'a, bitki tohumlarını temin etmemde yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Sayın Prof. Dr. Neşet Arslan'a ve TMO yetkililerine, laboratuarda yaptığım çalışmalarda ve tezimin hazırlanmasında maddi ve manevi desteğini her zaman hissettiğim değerli arkadaşım, ablam Tuğba GÜRKÖK'e, başım her sıkıştığında yanımda olan kıymetli arkadaşım, ustam İsmail BENLİ'ye, dönem boyunca her türlü zorluğu birlikte aştığımız değerli arkadaşlarım Eda DAŞTAN'a ve Elif KAYMAK'a ve son olarak, bana güvenip inanan, her zaman yanımda olduklarını bildiğim ve beni hiçbir zaman yalnız bırakmayacağına emin olduğum kıymetli aileme sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Gülşen BOZTEPE

Ağustos 2010

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
ÖNSÖZ	iii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	iv
SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	3
2.1. <i>Papaveraceae</i> Familyasının Genel Özellikleri	3
2.1.1. <i>Papaver somniferum</i> L. Bitkisinin Genel Özellikleri	3
2.1.2. Türkiye’de Tescil Edilen Bazı Haşhaş Çeşitleri	3
2.2. Bitki Genetik Kaynaklarının Karakterizasyonu	7
2.3. Moleküler Markörler	7
2.4. DNA Markörleri İle İlgili Teknikler	8
2.4.1. Hibridizasyon Temeline Bağlı Teknikler (RFLP)	8
2.4.2. PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>) Temeline Bağlı Teknikler	9
2.4.2.a RAPD (Rastgele Artırılmış Polimorfik DNA)	9
2.4.2.b AFLP (Çoğaltılmış Parça Uzunluğu Polimorfizmi)	10
2.4.2.c SRAP (Sekans İlişkili Çoğaltılan Polimorfizm)	10
2.4.2.d CAPS (Kesilip Çoğaltılmış Polimorfik Diziler	11
	11

2.4.2.e Mikrosatellitler	
2.4.2.f SSR (Basit Dizi Tekrarları)	12
2.4.2.g ISSR (Basit İç Dizi Tekrarları)	15
2.5. SSR ve ISSR Arasındaki Avantaj ve Dezavantajlar	17
3. MATERYAL VE YÖNTEM	20
3.1. Materyal	20
3.1.1 Kullanılan SSR ve ISSR Primerleri	21
3.2. Yöntem	22
3.2.1. Bitki Örneklerinin Laboratuvar Çalışmaları İçin Hazırlanması	22
3.2.2. DNA İzolasyonu	22
3.2.3. PCR Uygulaması	23
3.2.4. Elektroforez İşlemi	25
3.2.5. DNA Bantlarının Görüntülenmesi	25
3.2.6. DNA Bantlarının Değerlendirilmesi	25
4. BULGULAR	26
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	35
KAYNAKLAR	38
ÖZGEÇMİŞ	42

SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

Açıklama

bp	Base pair (baz çifti =bç)
kb	kilo base
mM	milimolar
ng	nanogram
rpm	Revolutions per minute (dakikadaki devir)
µg	mikrogram
µl	mikrolitre
µM	mikromolar
UV	Ultraviole

Kısaltmalar

Açıklama

AFLP	Çoğaltılmış Parça Uzunluğu Polimorfizmi
BBE	Berberin bridge enzimi
cDNA	Komplementer deoksiribonukleik asid
CAPS	Kesilip Çoğaltılmış Polimorfik Diziler
COR	Kodeinon redüktaz
CYP80B1	N-metilkoklaurin 3' hidroksilaz
dNTP	deoksinükleotidtrifosfat
DNA	deoksiribonükleik asid
EDTA	Ethilendiamintetraasetik asid
ISSR	Basit İç Dizi Tekrarları
ITS	internal transcribed spacer
MEGA	Molecular Evolutionary Genetics Analysis (Moleküler Evrim Genetik Analizi)
NCS	Norkoklaurin sentaz
PCR	Polymerase Chain Reaction (polimeraz zincir reaksiyonu)
PAGE	Polyacrilamide Gel Electrophoresis (poliakrilamid jel elektroforezi)
POPGENE	Population Genetic Analysis (Populasyon Genetik Analizi)
RAPD	Randomly Amplified Polymorphic DNA (rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA)

RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism (kesilmiş parçaların uzunluk polimorfizmi)
RNA	Ribonukleik Asid
SSR	Simple Sequence Repeat (basit dizi tekrarı)
SAT	Salutaridinol-7-O asetiltransferaz
STS	Sequence target site (dizisi etiketlenmiş bölge)
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris/borat/EDTA (Buffer)
TE	Tris/EDTA (Buffer)
Tris	Tris(hidroksimetil) aminometan
TYDC	Tirozin dekarboksilaz

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
Şekil.3.1. Bitki büyütme kabininde yetiştirilen <i>P.somniferum</i> L. Bitkileri	20
Şekil 4.1. ISSR AT11 primerinin %1 agaroz jel görüntüsü	26
Şekil 4.2. ISSR AT8 primerinin %1 agaroz jel görüntüsü	26
Şekil 4.3. ISSR primerlerinin oluşturduğu, bitkiler arasında filogenetik ilişkiyi gösteren dendogram	27
Şekil 4.4. SSR VRZAG15 primerinin %8 poliakrilamid jel görüntüsü	29
Şekil 4.5. SSR primerlerinin oluşturduğu, bitkiler arasında filogenetik ilişkiyi gösteren dendogram	30
Şekil 4.6. SSR+ISSR primerlerinin oluşturduğu, bitkiler arasında filogenetik ilişkiyi gösteren dendogram	32

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge		Sayfa
Çizelge 2.1.	Bazı Tescilli Bitkilerin Morfolojik Özellikleri	6
Çizelge 2.2.	RFLP ve RAPD markör teknikleri arasındaki avantaj ve dezavantajlar	9
Çizelge 2.3.	SSR ile ISSR arasındaki farklar	18
Çizelge 3.1.	Çalışmada Kullanılan Haşhaş Çeşitlerinin İsimleri	20
Çizelge 3.2.	Çalışılan SSR primerleri ve T _m değerleri	21
Çizelge 3.3.	Kullanılan ISSR primerlerinin isimleri ve baz dizileri	21
Çizelge 3.4.	ISSR PCR miks protokolü	24
Çizelge 3.5.	SSR PCR miks protokolü	24

1.GİRİŞ

Bitkiler yaşam için önemli enerji kaynakları olup, yaşamın devamı için vazgeçilmez öğelerdir. İklim şartlarının değişimi göz önüne alındığında bitki ve hayvan nesillerinin risk altında olduğu gözlenmektedir. Bitki populasyonlarındaki riskler tüm ekosistemleri etkileyeceğinden bitki gen kaynakları daha da önemli hale gelmektedir.

Yüksek bitkilerin genomları, büyük ve kompleks bir organizasyona sahiptir. DNA analizlerinde moleküler metodların kullanımı bu karmaşık genomların incelenmesinde ki yaklaşımlardan biridir. Moleküler markörlerin biyoloji çalışmalarına girmesi genetik çeşitliliğin çalışılması ve türler arasındaki akrabalığın belirlenmesi için yeni fırsatlar sağlar. Moleküler DNA markörlerinin kullanımı, detaylı kromozom haritalanması, genlerin tanımlanması ve klonlanması, yeni bitki kültürlerinin oluşturulmasında oldukça ümit vaat etmektedir.

Son yıllarda bitki genom çalışmaları bu alanda devrim niteliğindedir. Bitki genom analizlerinde kullanılan moleküler markörler bu devrimde önemli birer araç haline gelmişlerdir. Taksonomi, filogeni, ekoloji, genetik mühendisliği ve ıslah çalışmalarında rutin olarak uygulanmaktadır.

DNA markör terimi bireyler arasındaki genetik çeşitliliğe ait bir terimdir. DNA markör testleriyle elde edilen basit özelliklere ait genotip bilgisinin kullanımı oldukça kolaydır. Bu gibi özellikler sıklıkla bu özelliğin fenotipini tamamen gösterebilen bir gen tarafından kontrol edilmektedirler.

Ülkemiz coğrafik konumu nedeniyle canlı çeşitliliği bakımından oldukça zengindir. Sebebi ise iklim farklılıkları, topografik çeşitlilikler, jeolojik çeşitlilikler, deniz, göl, akarsu gibi değişik su ortamı çeşitlilikleri, yükseklik farklılıkları ve ekolojik farklılıklardır (Atalay 1994; Çelik 2003). Dünyada *Papaver* cinsine ait yaklaşık 110

türün (Kapoor, 1997) 50 taksonunun ülkemizde bulunduğu bildirilmiştir (Güner ve ark., 2000).

Bu tez çalışmasının amacı ülkemizin değişik bölgedindeki doğal florada bulunan ve ekonomik öneme sahip *Papaver somniferum* L. türüne ait tescilli 17 tek bitki üzerinde ISSR ve SSR yöntemiyle genetik karakterizasyon araştırması yapmaktır. Çalışmamız sonucunda elde edilen veriler ile *Papaver somniferum* L. ile ilgili yapılacak olan daha kapsamlı moleküler çalışmalara ve daha fazla ekonomik öneme sahip türlerin belirlenmesiyle ülke ekonomisine katkı sağlayacaktır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. *Papaveraceae* Familyasının Genel Özellikleri

Papaveraceae familyasına ait türler genellikle Kuzey Yarımkürenin ılıman ve subtropik bölgelerinde yayılış göstermektedir. Bu familyada 28 cins ve yaklaşık 250 tür vardır. Ülkemizde bu familyaya ait 5 cins bulunmaktadır (Seçmen ve ark., 1995, Parmaksız ve ark., 2009).

2.1.1 *Papaver somniferum* L. Bitkisinin Genel Özellikleri

Haşhaş bitkisi, narkotik ve analjezik morfin ve kodein gibi benzilizokinolin alkaloidlerinin büyük bir kısmını üreten, tohum ve yağından yararlanılan ve aynı zamanda tıbbi amaçla veya süs bitkisi olarak da kullanılan çok yönlü bir bitkidir (Gümüştü, 1998, Facchini ve ark., 2007). Ticari öneminden dolayı Türkiye’de üretimi kontrol altında olup, belirli bölgelerde yetiştirilmesine izin verilmiştir.

2.1.2. Türkiye’de Tescil Edilen Bazı Haşhaş Çeşitleri

Türkiye’de ilk defa, 1984 yılında Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesinde Prof. Dr. Şükrü Emiroğlu tarafından **Emiral-84** çeşidi haşhaş tescil ettirilmiştir. Bu çeşit gri-nefti tohum renkli ve kırmızı çiçeklidir. Tohumluk üretimi yoktur.

Toprak Mahsulleri Ofisince geliştirilen bazı haşhaş çeşitleri ;

Ofis-95, Afyon-95, Ofis-96 çeşitleri çiftçi popülasyonundan seleksiyonla elde edilmişlerdir. Sarı tohumludurlar. Çeşitli bölgelere adaptasyon kabiliyetleri yüksektir. Morfin oranları %0,55-0,75 arasındadır.

Ayrıca Danimarka kökenli, mutlak yazlık, küçük kapsüllü **Bolvadin-95** çeşidi tescil ettirilmiş olup ıslahta melezleme materyali olarak kullanılmaktadır. Morfin oranı çok yüksektir.

Eskişehir-Anadolu Tarımsal Araştırma Enstitüsünde ıslah edilen çeşitler ;

Anayurt-95 ve Kemer kaya-95 çeşitleri sarı tohumludur. Çiftçi popülasyonundan seleksiyonla elde edilmişlerdir. Adaptasyon kabiliyetleri iyidir. Morfin oranları %0,40-0,60 arasındadır.

Ankara-Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsünde Islah Edilen Çeşitler;

Beyaz Tohumlu Çeşitlerden **Ankara-94** seleksiyonla ıslah edilmiştir. Tohum verimi yüksek, erkenci ve geniş adaptasyon kabiliyetine sahiptir. Kışlık ve yazlık olarak ekilebilir. Morfin oranı %0,40-0,60 arasındadır.

Kocatepe-96 ise melezlemeyle ıslah edilmiştir, morfin oranı yüksek bir çeşittir (%0,60-0,85). Kışlık ve yazlık ekilebilir. Yazlık ekimlerin sulanabilir yerlerde yapılması gereklidir.

Beyaz haşhaş tohumları iç tüketimde bôrek, çörek ve tatlı imalinde ve pastacılıkta tercih edilir. Ayrıca ihracata uygundur.

Sarı Tohumlu Çeşitler **Afyon Kalesi-95** ve **Karahisar-96'dır**. Bunlardan **Afyon Kalesi-95** melezleme ile ıslah edilmiştir. Kapsül, tohum ve morfin verimi üstün bir çeşittir (Morfin oranı %0,55-0,85). Geniş adaptasyon kabiliyeti gösterir. Kışlık ve yazlık ekilebilir. Yazlık ekimlerin sulanabilir alanlarda yapılması uygundur. **Karahisar-96** ise; Melezleme ile elde edilmiştir. Adaptasyon kabiliyeti yüksek ve verimli bir çeşittir. Morfin oranı %0,55-0,80'dir.

Sarı tohumlu çeşitler i tkretimde börek-çörek yapılmasında ve yağ elde edilmesinde tercih edilir.

Mavi Tohumlu **Şuhut-94**, seleksiyonla elde edilmiştir. Morfin oranı yüksektir (%0,50-0,90). Kışlık ve yazlık ekilebilir. Kışlık ekimlerin taban tarlalarda yapılması, yazlık ekimlerin ise sulanabilir őartlarda yapılması uygundur. **Camcı-95** ise, melezleme ile elde edilmiştir. Morfin oranı yüksektir (%0,58-0,85). Morfin verimi, tohum ve kapsül verimleri iyi durumda olan bir çeşittir. Kışlık ve yazlık ekilebilir. Yazlık ekimlerin sulanabilen yerlerde olması tavsiye edilir. Adaptasyon kabiliyeti iyidir. Mavi haşhaş tohumları ihracata uygundur (TMO, 2010).

Çizelge 3.2. Bazı Tescilli *Papaver somniferum* L. Bitkilerinin Morfolojik Özellikleri (TMO,2010)

Özellikler	OFİS 8	OFİS 4	OFİS 3	AFYON 95	OFİS 95	OFİS 96	TMO 1	TMO 2	TMO 3	TMO 4
Rozet Çapı (Büyüklüğü)	Orta	Orta	Orta	Orta	Orta	Orta	Orta	Orta	Orta	Orta
Rozet Yaprığı(Tüylülük	Var	Var	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok
Sürgünlerin Dallanması	İkincil	Birincil	İkincil	Birincil	Birincil	Birincil	Birincil	Birincil	Birincil	Birincil
Sap Uzunluk	Orta	Orta	Orta	Uzun	Uzun	Uzun	Orta	Orta	Orta	Orta
Antosiyanin Renklenmesi	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok
Sap Tüylülük	Orta	Yok Veya Çok Hafif	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok Veya Çok Hafif	Yok Veya Çok Hafif	Yok Veya Çok Hafif
Sap Yaprığı Mumsuluk	Orta	Orta	Orta	Var	Var	Var	Var	Var	Var	Var
Sap Yaprığı: Kenarda Yarılma Tipi	İki Testere Dişli	İki Testere Dişli	Testere Dişli	Testere Dişli	Testere Dişli	Testere Dişli	Testere Dişli	Testere Dişli	Testere Dişli	Testere Dişli
Taç Yaprak	Beyaz	Beyaz	Viyole	Beyaz	Beyaz	Beyaz	Beyaz	Viyole	Viyole	Beyaz
Taç Yaprak Renk Yoğ.	Koyu	Koyu	Açık	Koyu	Koyu	Koyu	Koyu	Koyu	Orta	Koyu
Taç Yaprak (Benek)	Yok	Yok	Var	Var	Var	Var	Var	Var	Var	Var
Taç Yaprak Yarılma	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok
Boyuna Kesit	Yuvarlak	Armut Şekilli	Dikdörtg enimsi	Dikdörtg enimsi	Yumurta şekilli	Dikdörtg enimsi	Armut Şekilli	Dikdörtgenim si	Yuvarlak	Armut Şekilli
Kapsül Açılabilirlik	Açılır	Açılmaz	Açılır	Açılmaz	Açılmaz	Açılmaz	Açılmaz	Açılmaz	Açılmaz	Açılmaz
Tohum Renk	Beyaz	Sarı	Gri	Sarı	Sarı	Sarı	Sarı	Gri	Pembe	Beyaz
Çiçeklenme Zamanı	Çok Geç	Erken	Çok Erken	Geç	Orta	Orta	Orta	Orta	Orta	Orta
Kapsül Morfin Oranı	Yüksek	Yüksek	Yüksek	Orta	Orta	Orta	Yüksek	Yüksek	Yüksek	Yüksek

2.2. Bitki Genetik Kaynaklarının Karakterizasyonu

Bitki genetik kaynaklarının karakterizasyonu, temel olarak tohum örnekleri ya da populasyonlar arasındaki genetik farklılıkların, bu örnek ve populasyonlardaki genetik varyasyonun miktarı ve dağılımının ortaya konması amacıyla yapılır. Bu doğrultuda kullanılan genetik markörler yardımıyla; gen bankalarında duplike olarak muhafaza edilen örneklerden hangilerinin muhafaza açısından öncelik taşıdığı, muhafaza edilecek tohum örnekleri ya da populasyonlara ait optimum büyüklüklerin belirlenmesi, çekirdek koleksiyonların oluşturulması, gen akışlarını ortaya koymaya yönelik çalışmaların yapılması mümkündür.

Moleküler markör teknikleri, bitkiden alınacak çok az miktarda dokudan elde edilen DNA ile bütün bir genomun analizini mümkün kılması, genellikle yetiştirme koşullarının markörün ifadesini etkilememesi gibi birçok üstünlükleriyle, son yıllarda germplasm karakterizasyonunda yoğun olarak kullanılmaktadır. Böylece bitki genetik kaynakları daha doğru ve kesin bir şekilde karakterize edilmeye başlanmıştır. Ancak bu markör sistemlerinin morfolojik markörlere alternatif değil, onların tamamlayıcısı olarak ele alınması daha bütünsel bir yaklaşım olacaktır (Taşkın ve ark., 2010).

2.3. Moleküler Markörler

Moleküler markörler, genomda bir gen ya da gen bölgesine ilişkin DNA parçası veya biyokimyasal madde olarak tanımlanmaktadır. Bu tekniklerde başlangıçta enzim alt birimleri kullanılmakla birlikte daha sonra genomik DNA, organel DNA'sı ya da satelit bölgeler gibi kısımların esas alındığı DNA markörleri uygulama alanı bulmuştur (Ağaoğlu ve Ergül, 1999).

Moleküler markörlerin varoluşuyla, son 20 yılda biyolojik bilimlerin tüm planlarında devrim yapan yeni nesil belirteçler ortaya çıkmıştır. DNA tabanlı moleküler markörler taksonomi, fizyoloji, embriyoloji ve genetik mühendisliği gibi birçok alanın çalışma prensibini etkilemiştir. Kısa zaman önce basit DNA parmak izi markörleri yalnızca kayda değer adli olaylarda kullanılırdı. Ancak son gelişmeler, DNA'nın tümüyle

modifiye edilerek çoğaltılmasının ve genom analizlerinin işlevlerinin otomasyonunun faydasını ortaya çıkarmıştır (Gupta, M., 1994).

Moleküler markör teknolojisi son yıllarda hızla gelişerek, çeşitlerin birbirleri arasındaki genetik farklılığın belirlenmesi, kromozom haritalamaları, gen kaynaklarının karakterize edilmesi, evrimsel gelişim analizi ve transformasyonda başarı düzeyinin belirlenmesinde yeni yöntemler ortaya koymuştur. Bu yöntemler klasik yöntemlere göre büyük avantajlar sağlamaktadır. Moleküler teknikler, diğer tekniklere göre daha fazla avantajlara sahip olup, çevre faktörlerinden etkilenmezler ve polimorfizm oranları yüksektir. Aynı zamanda pleotropik (bir genin birden fazla fenotipik karakter üzerindeki etkisi) ve epistatik (bir karakterin ortaya çıkmasından sorumlu olan farklı genler arasında baskılayıcı etkilerin olması durumu) etki göstermeyip son derece stabildirler (Beckmann ve Soller, 1983; Tanksley, 1983; Bretting ve Widrlechner, 1995).

2.4. DNA Markörleri İle İlgili Teknikler

DNA markörleri temelde iki ana grupta incelenir:

2.4.1. Hibridizasyon Temeline Bağlı Teknikler (RFLP)

RFLP (Enzimlerle Kesilen DNA Parçacıklarının Uzunluk Polimorfizmi) tekniği, DNA'nın belirli nükleotid dizilerinden enzimlerle kesilerek çeşitli büyüklüklerde DNA parçaları elde edilmesi prensibine dayanmaktadır. Güvenilirliği ve tekrarlanabilirliği yüksektir. Ancak, çok miktarda temiz DNA gerekliliği ve maliyetinin yüksek olması tekniğin kullanımını sınırlandıran başlıca faktörlerdir. (Melez bireylerde 17 RFLP probu kullanarak segregasyon analizi yapan Mauro ve ark. (1992), *Vitis* türlerinde bu tekniğin etkili sonuçlar ortaya koyabileceğini belirtmişlerdir). Restriksiyon enzimleri (RE), çok özgül olarak DNA'yı belirli bölgelerden keserek genellikle 1000-20.000 baz çiftlik parçalar oluşturan enzimlerdir. DNA'nın RE'ler ile kesime uğratılmasının ardından, agaroz jel elektroforezine tabi tutulması ve sonra etidyum bromür ile boyanan jelde oluşan DNA bantlarının yeri ve sayısı kıyaslanarak elde edilen çeşitlilik RFLP olarak tanımlanmaktadır (Büyükalaca ve ark., 2008).

2.4.2. PCR (*Polymerase Chain Reaction*) Temeline Bağlı Teknikler

2.4.2.a RAPD (Rastgele Artırılmış Polimorfik DNA)

Williams ve ark. (1990) tarafından geliştirilen ve genellikle 10 bazlık rastgele seçilmiş primerlerin kullanıldığı RAPD, çeşit ve tip tanımlanma çalışmalarında sıkça tercih edilmektedir. Bu teknikte genellikle 10 nükleotid uzunluğundaki primer tek sarmallı DNA'lar kullanılarak genom üzerinde rastgele bölgelerin DNA amplifikasyonu gerçekleştirilir. Reaksiyon şartlarının spesifik olmaması rastgele çoğaltıma izin verir. Ayrıca polimorfizm oranı çok yüksektir. Uygulamasının kolay ve maliyetinin düşük olması fazlaca tercih edilmesinin nedenlerindendir. Ancak güvenilirliğinin sınırlı olması dezavantaj oluşturmaktadır (bkz. Çizelge 2.2.).

Çizelge 2.2. RFLP ve RAPD markör teknikleri arasındaki avantaj ve dezavantajlar

	RFLP	RAPD
<i>Kalıtım</i>	Basit, Mendel, Kalıcı, Kodominant	Basit, Mendel, Dominant
<i>Polimorfizm Derecesi</i>	Yüksek	Yüksek
<i>Allelik Varyant Tespiti</i>	Evet	Hayır
<i>Saptanan Lokus Sayısı</i>	1-3	1-10
<i>Teknik Zorluk</i>	Orta	Yüksek
<i>Güvenirlik</i>	Yüksek	Orta/yüksek
<i>Gereken DNA Miktarı</i>	2-10 µg.	10-50 µg.
<i>Gereken Sonda Tipi</i>	Türe Özgü Kopya Genomik DNA Veya cDNA Klonları	Rastgele Oligonükleotid Primerleri

2.4.2.b AFLP (Çoğaltılmış Parça Uzunluğu Polimorfizmi)

Vos ve ark. (1995)'nın geliştirdiği AFLP tekniği, DNA'nın enzimlerle kesilerek kesim uçlarına adaptör eklenmesi, kesilen parçaların çoğaltılması ve bu parçaların elektroforezle görüntülenmesi aşamalarından oluşmaktadır. Çoğaltılan parça uzunluğu farklılığı veya polimorfizmi anlamına gelen AFLP tekniği RAPD tekniği ile RFLP tekniğinin dezavantajlarını gidermek üzere geliştirilmiştir. Bu teknikte önce birisi altı, diğeri dört bazı tanıyan iki restriksiyon enzimi tarafından kesilir. Kesilen parçaların uçlarına nükleotid dizilişi sentetik olan DNA'lar eklenir. Eklenen sentetik DNA'nın yani adaptörün nükleotid dizisini de taşıyan başlatıcı DNA'lar yani primerlerin kullanımıyla nispeten spesifik DNA çoğaltımı yapılır.

2.4.2.c SRAP (Sekans İlişkili Çoğaltılan Polimorfizm)

17 ile 20 nükleotid arasında kullanılan özel primerlerle genomda kodlama yapan DNA parçalarını çoğaltmaya dayalı bir metottur. Ko-dominantlık ve tekrarlanabilme özeliği, morfolojik karakterlerle ilişkilerinin fazlalığı avantajları arasında yer alırken özel primer isteği ise bir dezavantajdır. SRAP iki özel primer kullanır (bir primer çifti) bu primerlerin 13 ile 15 nt uzunluğundaki sol tarafı (5'-) değişik bazlardan oluşur ve CCGG bazlarıyla uzatılır. Diğer primer ise yine benzer şekilde olup 3'- ucu AATT bazlarıyla bitirilir.

SRAP, bitkilerde genetik farklılık çalışmaları için son dönemlerde geliştirilmiş bir moleküler markör sistemidir (Li ve Quiros, 2003). ISSR'dan farklı olarak SRAP tekniği primer dizilerinin kendine has dizaynını kullanarak genomdaki kodlanmış dizileri hedefler ve bir kısım ko-dominant markörlerin 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 (Li ve Quiros, 2001). SRAP markörleri genetik farklılığı belirlemek (Ferriol ve ark., 2003) ve aynı zamanda gen işaretleme ve genom haritalanması (Li ve Quiros, 2003) için kullanışlı bir yöntem olarak tanımlanmıştır.

2.4.2.d CAPS (Kesilip oğaltılmış Polimorfik Diziler)

Kesilmiş oğaltılmış polimorfik markörler DNA parçalarını çoğaltmak için primerler olarak kullanılırlar. Bu parçalar daha sonra RFLP'yi ortaya koymak için restriksiyon endonükleaz enzimleriyle kesilmektedir. CAPS metodunda genellikle bilinen DNA dizilerinden çoğalması söz konusudur ve uygun kesim enzimleri ile belirlenir. Bu yöntemde polimorfizm oranının yüksek olması için uygun CAPS primerleri ve uygun enzim kombinasyonuna ihtiyaç vardır (Kunihisa ve ark., 2005).

2.4.2.e Mikrosatellitler

Mikrosatellitler 1-6 nükleotitten oluşan basit dizi tekrarlarıdır. Mikrosatellitlerin frekansı türler arasında, değişiklik göstermesine rağmen yüksek yapılı organizmaların hepsinde bulunmaktadır. Bunlar, genomda bol ve yaygın olarak bulunurlar ve diğer genetik markörlere göre daha yüksek seviyede polimorfizm gösterirler ve kolay tanımlanabilir olmaları sayesinde bu markörler oldukça kullanışlıdır. Diğer moleküler markör tipleri ile karşılaştırıldığında ko-dominant kalıtım göstermeleri ve otomasyon potansiyeli açısından pek çok avantaja da sahiptir (Holton, 2001).

Metzgar ve ark. (2000) de yaptığı çalışmada 7 ökaryotik hatlar için 3 ve 6 nükleotid tekrarların hem kodlanan hem de kodlanmayan bölgelerde olduğunu, ancak diğer tekrarlı dizilerin frekansı kodlanan bölgelerde kodlanmayan bölgelere göre daha düşük bulmuştur. Bu bulgular, kodlanan ve kodlanmayan mikrosatelit frekanslarından, kodlanan bölgelerdeki çerçeve kayması mutasyonlarına karşı spesifik seleksiyondan doğan farklılıkları ortaya koymaktadır ve nontriplet tekrarlarındaki uzunluk değişimlerinden kaynaklanmaktadır.

Mikrosatellitler çok basit bir şekilde dizilebilirler, örneğin 2 veya daha fazla tekrarlı dizileri içerir $-(N_1N_2.....N_x)-$ veya daha karmaşık bir yapıya, $(CA)_n(GT)_n$ veya $(dC-dA)_n(dG-dT)_n$, sahip olabilirler. Kusurlu veya bileşik olarak isimlendirilen mikrosatellitler pek çok kez tekrar eden dizilerin arasında boşluklara sahiptir, örneğin

(GA)_n(N)_n(CT)_n. Bitkilerdeki en sık mikrosatelitler dinükleotid motiflerden oluşmuştur, genellikle (AT)_n ve (GT)_n, hayvanlarda ise (AC)_n tekrarları yaygındır (Morgante ve ark., 2002, Panaud ve ark., 1995). Trinükleotidler de ise, TAT tekrarları yaygındır. Mikrosatelitlerin bazı çeşitleri belli bitki gruplarına spesifiktir ve daha çok bulunur, örneğin CCG/CGG tekrarları diğer tahıl veya dikotiledon bitkilere göre pirinçte daha bol bulunur (Morgante ve Olivieri, 1993).

2.4.2.f SSR (Basit Dizi Tekrarları)

1-10 (genellikler 3-6) baz çifti arasında, kısa diziler halinde genomda rastgele dağılmış tekrar dizileridir. SSR, son yıllarda oldukça fazla tercih edilen mikrosatellit markörlerinden biridir. Genomda bol olması, yüksek polimorfizm göstermesi, Mendel kalıtımına uygunluğu, kodominantlık ve farklı laboratuvarlarda tekrar üretilebilir olması gibi özellikleri sayesinde bu markör teknikleri çalışmalarda daha çok tercih edilmektedir (Martin ve ark., 2006).

Basit tekrarlı DNA dizileri genelde 1 ile 6 nükleotid uzunluğunda bazların ardışık olarak bulunması olayıdır. Örneğin ikili tekrar ATATATATATATATATATATAT şeklindedir. Burada ardışık olarak tekrar eden bazlar AT'dir ve bu örnekte AT 10 kez tekrarlanmaktadır ve AT₍₁₀₎ şeklinde ifade edilir. Herhangi bir DNA'nın basit tekrarlı olarak isimlendirilebilmesi için önce belirli bir motifin (yukarıdaki örnekte motif AT'dir) ve bu motifin belirli bir sayıda bulunması gerekir. Genelde ikili bir motifte motif sayısının en az 8 olması bu sekansa basit tekrarlı sekans olarak adlandırılmasını sağlar.

SSR markörlerinin doğal olarak bilgilendirici yapısı *Brassica rapa* da gösterilmiştir. 19 adet *B.rapa* kültüründe 38 primer çiftinin 35'inde (%92 si) 232 allel tespit edilmiştir.

Suwabe ve ark. (2002), Saal ve ark. (2001) *B.napus* genomunu *B. oleracea*'da 120 primer çifti kullanarak değerlendirilmiş ve 63 tanesinin Polimorfik bant oluşturduğu belirlenmiştir. *B. napus*'ta 61 çift primerde 198 polimorfik bant gözlenmiştir. Bu bulgular, bir *Brassica* türünde değerlendirilen primer çiftlerinin diğer *Brassica* türlerinde de kullanılabileceğini öne sürmektedir.

Dahası, SSR allelleri genom boyunca rastgele dağılmış olabilir, bu, az sayıda PCR primer setlerinin potansiyel olarak geniş bir dizilimine sahip olabileceğini işaret eder. Bazı araştırmacılar SSR markörlerinin floresans tabanlı otomatik teknolojiyle birleştirildiğinde varyetal ayırma etkili bir teknik olduğunu göstermişlerdir (Saal ve ark., 2001).

SSR küçük miktarda DNA gereksinimi, yüksek polimorfizm ve otomasyon özelliğinden dolayı kullanım için RFLP'den daha kolaydır. SSR markörleri kolayca araştırmacılar arasında değiş tokuş edilebilir. Çünkü her lokus primer dizileri tarafından tanımlanmıştır. SSR, RAPD den daha sağlam bir analiz metodudur ve AFLP den daha çok transfer edilebilirdir. SSR tahıl bitkilerinin genetik haritalanmasında RFLP'nin yerini almaktadır. SSR'ların AFLP ile beraber kombinasyonu detaylı genetik haritalar oluşturmak için kullanılır. Aynı zamanda ko-dominant yapısı genetik haritalamada SSR'ların bir avantajıdır (Holton, 2001).

Zhang ve ark. (2005), 31 Acala pamuk çeşidini 63 SSR primeri ile analiz etmişler ve Acala-1517 çeşitleri arasındaki genetik mesafe 0,06-0,38 olarak belirlenmiştir. Acala-1517 çeşitleri arasında önemli bir genetik varyasyonun tespit edildiği de bildirilmiştir.

Carolan ve ark. (2006), yapmış oldukları çalışmada ITS ribozomal DNA ile *Papaver* cinsi ve cinse ait seksiyonların tek atadan geliştiklerini ifade etmişlerdir. Buna göre; morfolojik karakterlerin yeterli ayıraç olamayacağı vurgulanmıştır. Morfolojik olarak heterojen olan *Meconidium*, *Oxytona* ve *Pilosa* seksiyonlarının sintiplerinin tanımlanması zordur. Çalışmanın sonunda, genomik ve floresans *in situ* hibridizasyon çalışmaları sonucu diploid *P. bracteatum*'un hexaploid *P. pseudoorientale*'nin atası olduğu ileri sürülmüştür.

Rajesh ve ark. (2008), Hindistan'da yaptıkları çalışmada 3 hindistan cevizi yetiştirme komünitesinden alınan, yetiştiği bölgeden alınarak başka bölgeye adapte olarak yetiştirilen bitkileri temsil eden 102 bitkinin genetik çeşitliliği araştırılmıştır. 14 SSR markörü kullanılarak toplamda 90 band oluştuğu tespit edilmiştir ve lokus başına

ortalama 6,42 band belirlenmiş olup ortalama polimorfizm bilgi içeriği 0,61 dir. Lokal alanlara adapte olmuş, Hindistan cevizi bitkisinin değerli karakterlerinin genetik erozyona maruz kaldığını belirtmiş ve bu çalışma Hindistan cevizinin genetik kaynaklarının değerlendirilmesi ve korunmasında zirai alanda pratik uygulamalara sahip olduğunu belirtmişlerdir.

Oliveira ve ark. (2010), yapmış oldukları çalışmada Papaya Germplazm Bank tan alınan 30 germplazm aksesyonu kullanılarak polimorfizm için Genbanktan test edilerek alınan sekans bilgilerinin verileri ile *Carica papaya* L. bitkisine ait 81 adet yeni mikrosatellit markörler tanımlanmıştır. Bu veriler genotipler arasında ikili genetik karşılaştırmaları tahmin etmede kullanılmıştır. Sonuç olarak mikrosatellitlerin çoğu polimorfik olarak tespit edilmiştir (%73). Bu markörler soyların incelenmesinde, melezleme ve papaya populasyon yapısının incelenmesinde oldukça fayda sağlayacaktır.

Bourguiba ve ark. (2010) yaptıkları çalışmada Tunus kayısı aksesyonundaki genetik çeşitliliğin çalışıldığı mikrosatellitlerin haritalama etkisini belirlemişlerdir. *Prunus* türlerinde bu markörlerin yüksek polimorfizmi heterozigotluğu gerektiren bir sonuç ortaya koymuştur. Jeolojik merkezlerine göre bu grubun genetik farklılıkları daha yavaş iken, gen kaçıışı buna bağlı olarak gerçekleşmektedir. Sonuç olarak genetik değişikliğin ölçümü için haritalanan markörlerin etkisi, sıradan bir başkası ile karşılaştırılmış ancak, çalışılan aksesyonlarda genetik ilişkilendirmenin göz önüne alınmasının avantajının olmadığı ileri sürülmüştür.

Parmar ve ark. (2010), domateste yaptıkları çalışmada 25 adet tanımlanmış ve tanımlanamamış domates çeşidinde, 23 adet SSR primeri kullanarak, aralarındaki akrabalık ilişkileri, tanımlanmaları ve genetik çeşitlilikleri hakkında net bulgular elde etmişlerdir. Yaklaşık 150 ile 1000 bp lik aralığındaki büyüklüklerde 40 allel tespit edilmiştir. Bu sayede Amerika'ya ait 25 lokaliteden alınan domates çeşitleri, UPGMA metodu ile 5 gruba ayrılmıştır.

2.4.2.g ISSR (Basit İç Dizi Tekrarları)

RAPD tekniğine benzemekle birlikte ISSR tekniği, kullanılan primerlerin mikrosatellit bölgelerinden çoğaltılmış olmaları ve primer bağlanma sıcaklıklarının yüksek olması ile RAPD tekniğinden ayrılır. ISSR tekniği ile ilgili çalışmalar 1994 yılında başlamıştır (Zietkiewicz ve ark., 1994; Gupta ve ark., 1994) ve sonraki çalışmalarda bu tekniğin varyasyonu belirlemede yüksek etkiye sahip olduğu saptanmıştır. ISSR tekniği ile 2 farklı elektroforez ve boyama tekniğini deneyen Moreno ve ark. (1998), çeşitler arasında polimorfizm sağlandığını, en net ve parlak bantların poliakrilamit jel elektroforez tekniği ve gümüş nitratla boyamadan elde edildiğini belirtmişlerdir.

ISSR teknolojisi ters düzenlenmiş yakın aralıklı mikrosatellitlerin arasındaki bölgelerin (100–300 bp) amplifikasyonuna dayanmaktadır (Zietkiewicz ve ark., 1994). Bu bölgelerin amplifikasyonu için kullanılan 16-18 bp uzunluğunda tek primerleri içeren çok sayıda basit dizi tekrarları herhangi bir SSR motifi ve 5' veya 3' ucuna bağlanmış tesadüfi seçilmiş nükleotidlere dayanabilir. Ayrıca bağlanmamış primerler de kullanılmaktadır (Bornet ve ark., 2002). PCR ürünleri belirsiz SSR bölgeleridir. ISSR lar genellikle bir reaksiyonda 25–50 ürün çoğaltabilirler.

ISSR parmak izi analizi dizi bilgisi gerektirmez. (CA)_n gibi tekrar dizilerine bağlı olan primerler (CA)₈ RG veya (AGC)₆ TY gibi dejenere 3'ucundan yapılabilir. İki SSR markörü arasında çoğaltılmış PCR ürünleri parmak izi ve çeşitlilik analizleri, genom haritalaması için kullanışlı multilokus markör sistemidir (Zietkiewicz ve ark.,1994).

Lüdtke ve ark. (2010), *Polygala* L. türünün karakterizasyonu üzerine yaptığı çalışmada 6 ISSR markörü ile 9 türde %100 polimorfik olan 75 band belirlenmiştir. Güney Afrika' da Polygalaceae familyasına ait bitkiler benzer morfolojik özelliklere sahip olduğundan sınıflandırılması oldukça güçtür. Bu bağlamda, ISSR markörü genetik karakterizasyon ve *Polygala* nın türler arası akrabalık ilişkilerinin belirlenmesinde kullanılmıştır. Türler arasındaki farklı grupların belirlenmesinde oldukça başarılı olunan ISSR sonuçları ile Güney Brezilya'da morfolojik olarak yeni teşhis edilen bir *Polygala* türü de netleştirilmiştir.

Acharya ve Sharma (2009) ticari haşhaş germplazmları ile yaptıkları moleküler karakterizasyon çalışmalarında 12 RAPD ve 9 ISSR primeri kullanmışlardır. 24 germplazm arasında yapılan çalışmada RAPD marköründe 32 polimorfik bant (% 69.52), ISSR marköründe 27 değerlendirilebilir polimorfik bant gözlemişlerdir. RAPD dendogramında bir büyük grup A,küçük grup B oluşurken 2 germplazmın 2 kümesi ayrı kalmıştır. ISSR dendogramında bir büyük grup A, bir küçük grup B oluşurken UOP-60 germplazm kümesi ayrı kalmıştır. RAPD ISSR birleştirilmiş analizlerinde ise bir büyük grup A ve küçük grup B,C,D oluşurken UOP-60 genotipi ayrı kalmıştır. Bu sonuçlara göre kültüre alınmış germplazmların büyük bir kısmının aynı kümeye düştüğünü ve genetik çeşitliliğin düşük olduğunu belirtmişlerdir.

Christopoulos ve ark. (2010) Yunanistan'da doğal olarak yetişen ve kültüre alınmış 56 ceviz (*Juglans regia* L.) aksesyonu ile yaptıkları çalışmada 7 ISSR primeri kullanmışlar ve benzerlik katsayı değerini ortalama 0,48 olarak bulmuşlardır. Doğal Yunan populasyonlarının genotipleri uluslararası kültürlere göre daha fazla çeşitlilik gösterdiğini belirlemişlerdir. Yunan germplasmlarında, görülen değerlendirilebilir morfolojik özellikleri ile yüksek çeşitliliğin kombinasyonu, kültüre alınmış cevizdeki genetik çeşitliliğin en yüksek seviyeye çıkarılmasında, ceviz üretim programlarında ve germplazm yönetim aktivitelerinde yararlı olabileceğini göstermişlerdir.

2.5 SSR ve ISSR Arasındaki Avantaj ve Dezavantajlar

Genetik markörler ile yapılan birçok çalışmada SSR ve ISSR tekniğinin oldukça iyi sonuçlar verdiği görülmektedir. ISSR, sıralanmaları yanlardan (sağ ve sol) yüksek derecede korunmuş olan ve tek parça gen içinde dağılmış olan kimi nükleotidlerin ikili dizi tekrarlarına dayalıdır (Chambers ve MacAvay, 2002). Mikrosatellitlerin bazı tiplerinde spesifik veya daha çok belirli bir bitki grubu için uygun olduğu görülmüştür (Morgente ve Vogel, 1994). Bu markör sisteminin avantajları; genetik değişkenliklerin incelenmesi için diğer bir çok moleküler markör sisteminden teknik olarak daha basit ve ayrıca *in vitro* kültürün ön aşamalarında bile bol polimorfizm doğuran, çoğaltılabilir sonuçlar sağlamasıdır (Tsumura ve ark., 1996). Ayrıca, varyete tanımlaması ve genetik farklılığın değerlendirilmesinde filogenetik araştırmalar içinde uygun olduğu görülmüştür (Raina ve ark., 2001) (bkz. Çizelge 2.3.).

Gomes ve ark. (2009) SSR ve ISSR markörlerini kullanarak *Olea europaea* L. nin genetik çeşitliliğini araştırmıştır. 41 çeşidinin DNA sı 11 ISSR primeri ile çalışılmış ve 108'i polimorfik olan 135 tekrarlanabilir band tespit edilmiştir. ISSR da % 79 oranında polimorfizm görülmüştür. 6 SSR primerinde ortalama her primerde 11 allel olan toplamda 67 allel tespit edilmiştir. Bu çalışma 41 çeşit zeytin arasında ki farklılıkları ve onları tescillemeyi büyük oranda garantileyen bir sonuç ortaya çıkarmaktadır.

Çizelge 2.3. SSR ile ISSR arasındaki farklar

ÖZELLİK	SSR	ISSR
Polimorfizm Seviyesi	Yüksek/ Çok Yüksek	Yüksek/ Orta
Bulunma Miktarı	Yüksek	Yüksek
Polimorfizm Yapısı	Tekrarların Uzunluğundaki Değişmeler/ Motif Sayısı	Baz Değişiklikleri (İnseriyonlar, Delesyonlar) SSR Tekrarlarının Uzunluğu Ve Motif Sayısı
Kalıtım Şekli	Ko-Dominant	Dominant/Ko-Dominant
Lokus Özgüllüğü	Evet	Hayır
Üretkenlik	Yüksek	Yüksek/Orta
İşçilik	Yüksek (Kütüphane Yapımında Ve Ayıklanmasında İş Gücü Kaybı)	Düşük
Zaman	Genellikle Zaman Alan Kütüphane İnşa Aşaması Ve Ayıklama Gerekir	Düşük
Temel Uygulamalar	Bağlantı Haritaları, Genetik Çeşitlilik Çalışmaları, Gen İşaretleme	İdentification Of Cultivars, Filogenetik Çalışmalar
Temel Avantajlar	Yüksek Polimorfizm Seviyesi (26 Allel'e Kadar), Ko-Dominant Kalıtım Modu, Çok Yüksek Üretkenlik	Multilokus Ve Reaksiyon Başına Yüksek Polimorfik Patern Üretimi, Teknik Kolaylığı, Düşük Ücret
Teknik Gereksinim	Orta/Düşük (Kütüphane Yapımı ve Ayıklanması Hariç)	Düşük/Orta
Dizi Bilgisi Gereksinimi	Evet	Hayır
Tutar	Orta	Düşük

Papaver somniferum L. gibi yasa dışı bitkilerin tanımlanmasının önemli olduğunu belirten Lee ve ark. (2010) bu bitkinin tanımlanmasında tüm bitkiler için evrensel ve sadece haşhaşa spesifik toplam 10 markör test etmişlerdir. Papaveraceae ve Fumariaceae familyalarında yer alan 14 türün ITS (Nuclear Internal Transcribed Spacer), 18S rRNA plastid *rbcL* ve *trnL-trnF* IGS (intergenik spacer) gibi evrensel markörlerinin genetik uzaklığını dizi karşılaştırmaları ile elde ettiklerini belirtmişlerdir. Hem ITS bölgelerinin hem de *trnL-trnF* IGS bölgelerinin yüksek derecede ayrışım

gösterdiğini bildirmişlerdir. Morfin biyosentezinde yer alan 6 adet kodlama bölgesi geliştirmişlerdir. Sadece ticari haşhaşa morfin biyosentezinde yer alan TYDC, NCS, ve BBE amplikonlarının varlığı veya yokluğuna göre 3 markör ve genus spesifik CYP80B1, SAT ve COR gen bölgelerine ait 3 markör geliştirmişlerdir. Geliştirilen bu markörlerin ticari haşhaş bitkisinin kriminal DNA analizlerinde kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Tantasawat ve ark. (2010) *Vigna unguiculata* spp. *Sesquipedalis* (Yardlong fasulyesi) bitkisini SSR ve ISSR markörleri ile teşhis etmiş, yanı sıra morfolojik açıdan da değerlendirmişlerdir. 23 adet akrabalık ilişkisi bulunmayan *Vigna unguiculata* spp. *Sesquipedalis* aksesyonu ve 7 börülce ve Yardlong fasulyesi hibritinin aksesyonu SSR ve ISSR ile aralarında ki genetik çeşitlilik araştırılmıştır. Bu 30 adet aksesyon UPGMA analizi ile 2 büyük gruba ayrılmıştır. Her lokusta yaklaşık 4,91 allel olup toplamda 54 allel tespit edilen 16 SSR primerinin 11'inin % 90,91'i polimorfik bulunmuştur. Bu polimorfik SSR markörü 28 Yardlong ve bodur fasulye aksesyonunu başarıyla ayırtmıştır. 16 ISSR primeri kullanılarak toplamda 312 ISSR fragmenti gözlenmiş ve polimorfizm % 90,03 olarak bulunmuştur. Bu oran SSR 'dan 0,137-0,276 daha düşük bulunurken multilokus markör indeksi oranları 3,495 olarak kayda geçmiştir. Bu da SSR 'dan 0,669 oranında daha yüksek olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlar yardlong fasulyesi ile bodur fasulyenin akrabalık ilişkisinde ISSR ın genetik çeşitliliği tahmin etme seviyesi bakımından daha yüksek etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

Genetik bağlantı haritaları moleküler ıslah programların temelidir. Chen ve ark (2010) yaptığı çalışmada 94 bireyin F1 dölü kullanılarak *Pinus koraiensis* ' in genetik bağlantı haritasını ilk kez ortaya çıkarmışlardır. 122 moleküler markör 11 bağlantı grubunu haritalamıştır. Bu markörlerden 96 'sı SRAP, 25'i SSR ve 1'i ISSR markörüdür. Hazırlanan harita ile *Pinus koraiensis*'in gelecekteki genomik çalışmaları için kritik bilgiler elde edilmiştir. Yayınlanan makalede Kore Çamı'nın (*Pinus koraiensis*) genetik haritasının SSR, SRAP ve ISSR markörleri ile genom kapsamında daha iyi hazırlanmasını eş zamanlı olarak sağladığı dile getirilmiştir.

3.MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Materyal olarak kullanılan bitkiler Türkiye’de ticari öneme sahip olan ve ıslah çalışmaları yapılan 17 çeşit *Papaver somniferum* türü bitkilerdir. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümünden temin edilen tohumlar GOP Üniversitesi Bitki Biyoteknolojisi ve Moleküler Genetik laboratuvarında bulunan bitki büyütme dolabında yetiştirilmiştir. Bitkilerden DNA izolasyonu için genç yapraklar alınmıştır (bkz. Şekil 3.1.).



Şekil 3.1. Bitki büyütme kabininde yetiştirilen *P.somniferum* L. bitkileri

Tez’de Kullanılan Haşhaş Çeşitleri

Çizelge 3.1. Çalışmada Kullanılan Haşhaş Çeşitlerinin İsimleri

ÖRNEK ADI	ÖRNEK ADI	ÖRNEK ADI
KOCATEPE-96	OFİS-8	TMO-2
ANKARA-94	CAMCI-95	AFYON-95
OFİS-4	OFİS-95	OFİS-3
ŞUHUT-94	KEMERKAYA-95	TMO-3
ANAYURT-95	OFİS-96	AFYON KALESİ
TMO-1	KARAHİSAR-96	

3.1.1 Kullanılan SSR ve ISSR Primerleri

Çalışmada baz dizileri aşağıda belirtilen 5 adet SSR ve 15 adet ISSR primeri kullanılmıştır (bkz. Çizelge 3.2. ve 3.3.).

Çizelge 3.2. Çalışılan SSR primerleri ve Tm değerleri

Primer	Primerlere ait baz dizileri (5'-3')	Erime Sıcaklığı (°C)
VRZAG15F	GGATTTTGGCTGTAGTTTGTGAAG	54,9
VRZAG15R	ATCTCAAGCTGGGCTGTATTACAAT	56,3
VRZAG21F	TCATTCACTCACTGCATTCATCGGC	59,5
VRZAG21R	GGGGCTACTCCAAAGTCAGTTCTTG	59,3
VRZAG25F	CTCCACTTCACATCACATGGCATGC	60,4
VRZAG25R	CGGCCAACATTTACTCATCTCTCCC	59,4
VRZAG29F	ATAACCAGGACAAGTTATTCAAGCC	55,2
VRZAG29R	ACCCAATTGACCATCTTTTATGCTG	55,9
VRZAG64F	TATGAAAGAAACCCAACGCGGCACG	61,9
VRZAG64R	TGCAATGTGGTCAGCCTTTGATGGG	61,9

Çizelge 3.3. Kullanılan ISSR primerlerinin isimleri ve baz dizileri

Primer	TM	Primerlere ait baz dizileri (5'-3')
AT1	49,90	GAGAGAGAGAGAGAGACC
AT2	48,56	AGAGAGAGAGAGAGAGTC
AT3	48,48	TCTCTCTCTCTCTCTCG
AT4	45,66	CTCTCTCTCTCTCTCTT
AT5	46,79	GAGAGAGAGAGAGAGAC
AT6	48,15	AGAGAGAGAGAGAGAGG
AT8	51,53	AGAGTTGGTACGTCTTGATC
AT10	42,51	GTGTGTGTGTGTAC
AT11	50,91	CTCCTCCTCCTCGC
AT12	60,60	ACCACCACCACCACCACC
AT14	47,36	GACAGACAGACAGACA
AT15	47,37	ACTGACTGACTGACTG
AT16	47,03	AGTCAGTCAGTCAGTC
AT17	58,08	GTCGTCGTCGTCGTCGTC
AT19	49,90	CTCTCTCTCTCTCTCTCTG

3.2. Yöntem

Bu çalışmada DNA izolasyonu yapılarak SSR ve ISSR olmak üzere iki farklı markör tekniği kullanılmıştır. SSR’da; klasik PCR, Poliakrilamid Jel Elektroforezi sistemleri kullanılırken, ISSR’da yine klasik PCR ve Agaroze jel Elektroforezi sistemleri kullanılmıştır.

3.2.1. Bitki Örneklerinin Laboratuvar Çalışmaları İçin Hazırlanması

Laboratuvar şartlarında oda sıcaklığında gün ışığını yeterli miktarda alarak yetişen bitkilerin genç yaprakları alınarak sıvı azotla parçalanıp -80°C ’de muhafaza edilmiştir.

3.2.2. DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu için Fermentas marka Genomik DNA izolasyon kiti kullanılmıştır. DNA izolasyon işlemi şu basamaklardan oluşmaktadır.

- 50–100 mg öğütölmüş bitki örneği endrofor tüplerine alınmış, üzerine 100 µl TE Buffer eklenerek fiksasyonu sağlanmıştır.
- 400 µl lizis (parçalayıcı) solüsyonu eklenmiştir.
- 5 dakika 65°C de inkübe edilmiştir.
- Üzerine 600 µl kloroform eklenmiş ve hafifçe 3-5 kez alt üst edilmiştir.
- 2 dakika 10000 rpm de santrifüj edilmiştir.
- Üst tarafta kalan kısım yeni bir tüpe alınmıştır.
- 800 µl seyreltilmiş yoğunlaştırıcı solüsyonu (precipitation solution) eklenmiştir.

- 1–2 dakika alt üst edilmiştir.
- 2 dakika 10000 rpm de santrifüj edilmiştir.
- Üst tarafta kalan kısım atılmıştır.
- Tüpün dibinde kalan DNA pelleti 100 µl NaCl solüsyonu ile çözülmüştür.
- Aynı zamanda her tüpe 0,7 µl RNAaz eklenmiştir ve 10 dk inkübasyon edilmiştir.
- 300 µl soğuk etanol eklenmiştir.
- 10 dakika -20 °C de inkübe edilmiştir.
- 4 dakika santrifüj edilmiş ve üstte kalan kısım atılmıştır.

% 70'lik soğuk etanol ile DNA peleti yıkanmıştır. DNA peleti 100 µl TE (Tris –EDTA Buffer) içinde çözdürülmüştür (bkz. Çizelge 3.1.).

3.2.3. PCR Uygulaması

PCR işlemi için Apollo Instrumentation ATC401 cihazı kullanılmıştır. PCR mix içerisine aşağıda belirtilen hacimlerde ve konsantrasyonlarda PCR bileşenleri katılmıştır (bkz. Çizelge 3.4. ve 3.5.).

Çizelge 3.4. ISSR PCR miks protokolü

PCR öğeleri	Final Konsantrasyon	Kullanılan Miktar (µl)
dH ₂ O		13,75
10x Buffer Mg free (BIOBASIC)	1X	2,5
20 mM MgSO ₄ (BIOBASIC)	2,8 mM	3,75
10 mM dNTP (Vivantis)	0,3 mM	1
primer	0,4µM	0,8
Taq DNA polimeraz (BIOBASIC)	0,2U	0,2
DNA	20 ng	3
Toplam		25

Çizelge 3.5. SSR PCR miks protokolü

PCR öğeleri	Final Konsantrasyon	Kullanılan Miktar (µl)
Su		13,95
10x Buffer Mg free (BIOBASIC)	1X	2,5
20 mM MgSO ₄ (BIOBASIC)	2,8 mM	3,5
10 mM dNTP (Vivantis)	0,3 mM	0,75
Forward primer	0,4µM	0,4
Reverse primer	0,4 µM	0,4
Taq DNA polimeraz (BIOBASIC)	0,1U	0,5
DNA	30 ng	3
Toplam		25

Uygulanan PCR Protokolü

ISSR için;

1 döngü olarak 94°C de 5dk ön denatürasyon, 40 döngü olarak; her döngüde 94°C de 30 sn denatürasyon, 42-63 °C arası 60 sn bağlanma, 72°C de 75 sn uzatma, 1 döngü olarak 72°C de 10 dk son uzatma gerçekleştirilerek PCR sonlanmaktadır.

SSR için;

1 döngü olarak 95°C de 5dk ön denatürasyon, 30 döngü olarak; her döngüde 95°C de 30 sn denatürasyon, 55-65°C arası 30 sn bağlanma, 72°C de 30sn uzatma, 1 döngü olarak 72°C de 5 dk son uzatma gerçekleştirilerek PCR sonlanmaktadır.

3.2.4. Elektroforez İşlemi

PCR ürünlerini elektroforez etmek için ISSR tekniğinde % 1'lik agaroz jel, SSR tekniğinde ise %8 lik poliakrilamid jel hazırlanmıştır. DNA'nın boyanması için etidium bromür kullanılmıştır. 25µl PCR ürünü üzerine 3µl yükleme boyası eklenerek, ISSR'da yatay elektroforez tankına yerleştirilen jel üzerine 15µl hacimlerde yüklenmiş ve 90 voltta ortalama 2 saat yürütülmüştür. SSR'da Dikey elektroforez tankına yerleştirilerek yine 15 µl hacimlerde yüklenmiş ve 300 voltta ortalama 3-4 saat yürütülmüştür.

3.2.5. DNA Bantlarının Görüntülenmesi

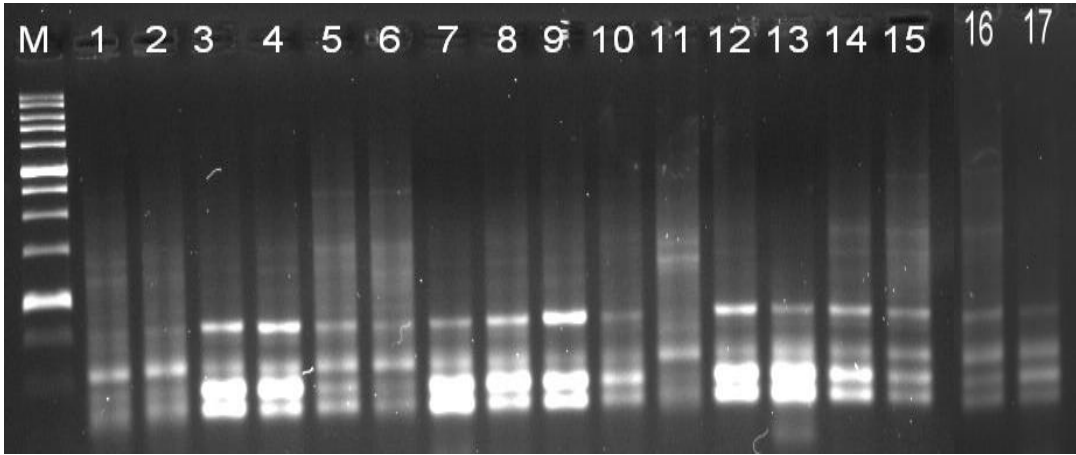
Elektroforez uygulaması bittikten sonra KODAK Gel Logic 200 jel görüntüleme cihazı kullanılarak UV ışık altında resimler alınarak değerlendirilme yapılmıştır.

3.2.6. DNA Bantlarının Değerlendirilmesi

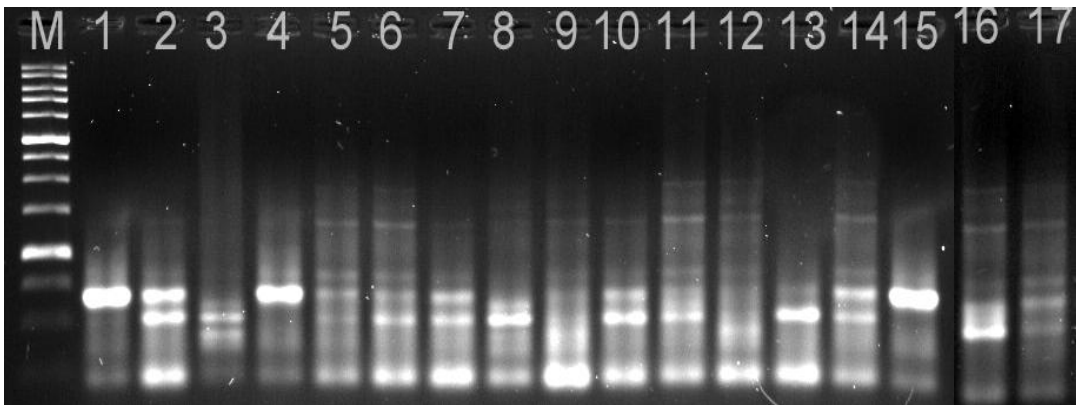
ISSR ve SSR bantları 1 ve 0 olarak kayıt edilmiş olup, '1' bandın varlığını '0' ise bandın yokluğunu göstermektedir. Materyaller arasındaki genetik mesafe POPGENE32 versiyon 1.32 (Population Genetic Analysis) ve MEGA 4.1 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) programları ile analiz edilmiştir.

4. BULGULAR

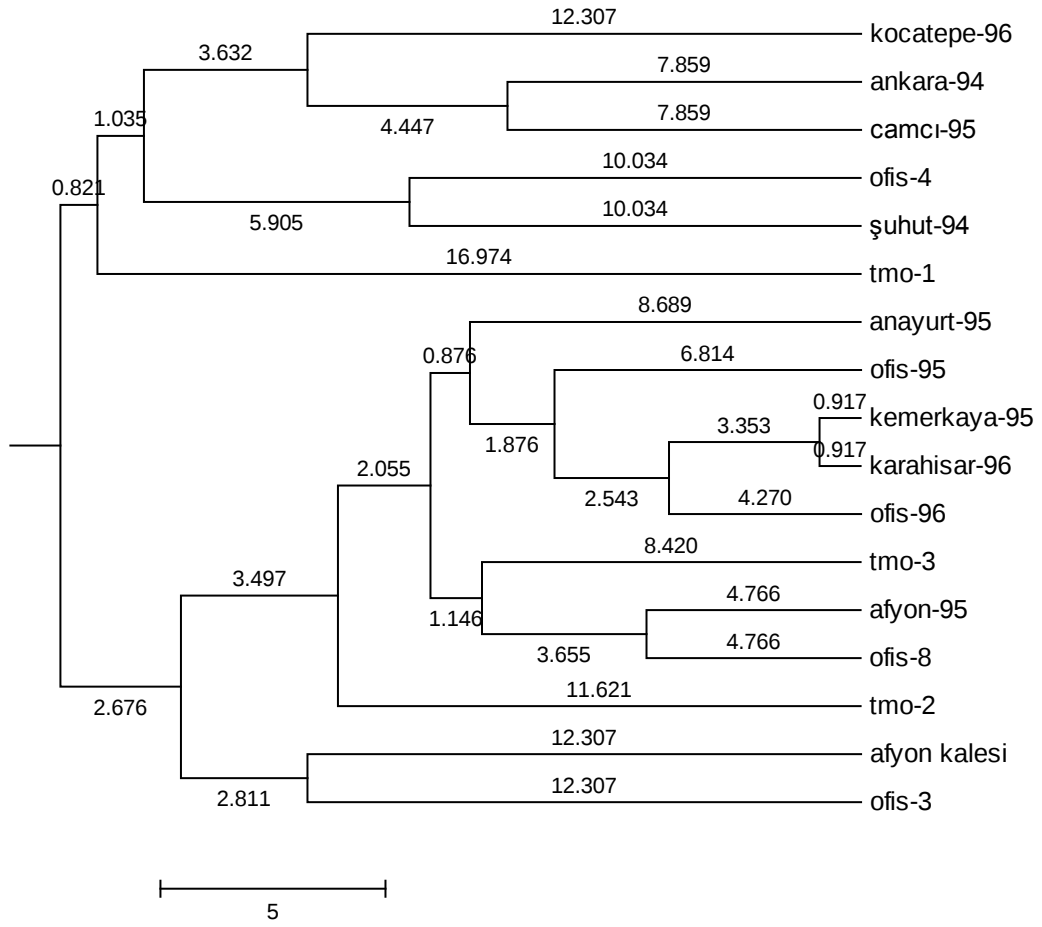
ISSR çalışmasında *Papaver somniferum* L. çeşitlerinde 15 primer çalışılmıştır (bkz Şekil 4.1. ve Şekil 4.2.). Çalışılan primerlerin tamamı polimorfiktir. 15 ISSR primeri toplam 55 bant oluşturmuş olup 44 tanesi polimorfiktir. En az bant veren AT3 primeri tek bant, en çok bant veren AT19, AT8 ve AT 15 primeri 6 bant vermiştir. Verilere göre en yakın genetik mesafe 0,08 en uzak 0,64 tür. Genetik mesafesi 0,08 olan 1 çift bitki bulunurken 1 çift bitki arasında ise genetik mesafe en uzaktır (bkz Şekil 4.2. ve Şekil 4.1.). Ortalama genetik mesafe 0,27, Shannon indeksi 0,38 dir. Polimorfizm oranı ise % 80,00 dir.



Şekil 4.1. ISSR AT11 primerinin %1 agaroz jel görüntüsü



Şekil 4.2. ISSR AT8 primerinin %1 agaroz jel görüntüsü



Şekil 4.3. ISSR primerlerinin oluşturduğu, bitkiler arasında filogenetik ilişkiyi gösteren dendrogram

Oluşturulan dendogram sonucunda bitkiler A ve B olmak üzere iki büyük gruba ayrılmışlardır.

A1 grubu;

Bu grupta Kocatepe-96, Ankara -94 ve Camcı-95 bitkileri yer almaktadır.

A2 grubu;

şuhut-94 ve Ofis-94 bu grupta yer almaktadır.

A3 grubu;

Diğer grupların aksine bu grupta tek bir bitki olarak TMO-1 bulunmaktadır.

B1 grubu;

Anayurt-95, Ofis-95, Kemerkaya-95, Karahisar-96 ve Ofis-96 çeşitleri bu grupta bulunurken Kemerkaya-95 ve Karahisar-96 diğerlerine göre daha çok benzerlik göstermektedirler.

B2 grubu;

TMO-3, Ofis-8,ve Afyon-95 çeşitleri bu grupta bulunmaktadır.

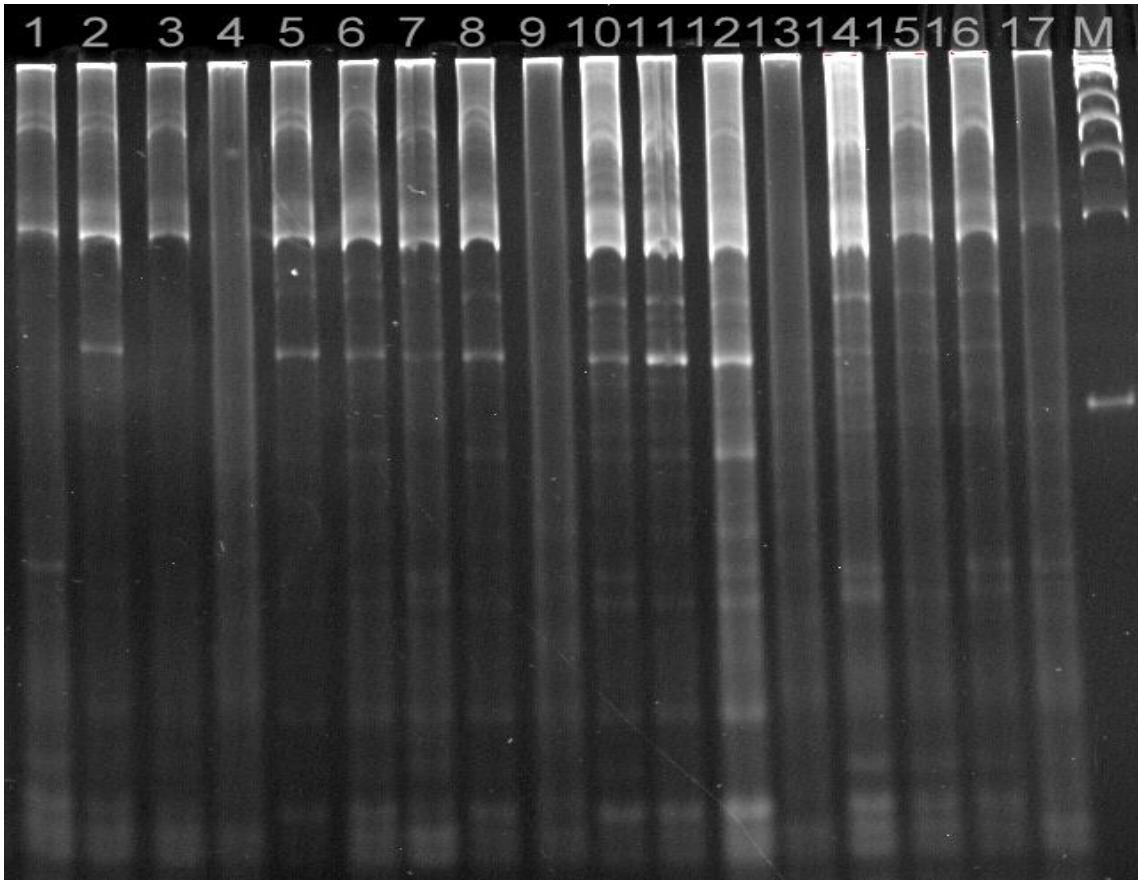
B3 grubu;

Bu grupta sadece TMO-2 yer almaktadır. A grubunda en fazla ayrışım gösteren çeşit TMO-1 olduğu gibi, B grubunda en fazla ayrışım gösteren çeşitte morfolojik açıdan birbiriyle oldukça benzer yapıya sahip TMO-2 dir.

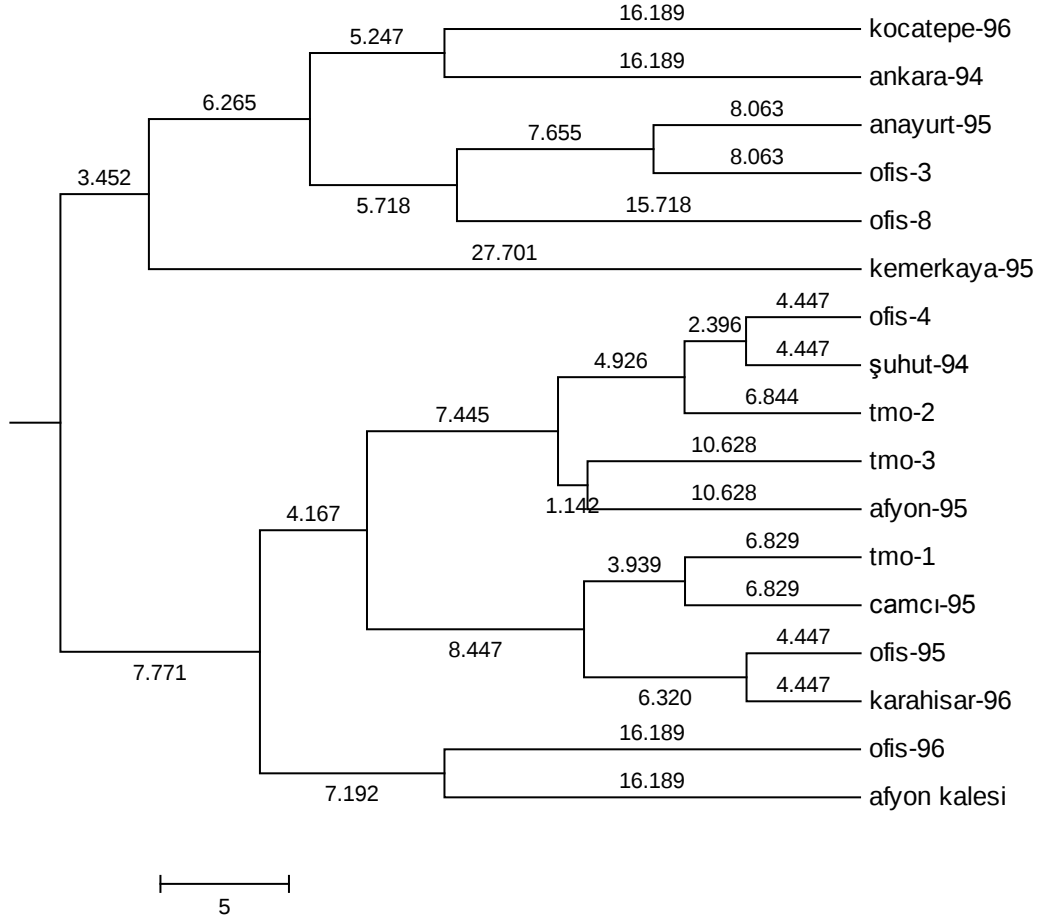
B4 grubu;

Afyon Kalesi ve Ofis-3 çeşitleri bu grupta yer alır.

SSR markörü kullanılarak çalışılan 5 primerden elde edilen veriler doğrultusunda ise; toplamda 47 banttan 39'u polimorfik olarak tespit edilmiş, polimorfizm oranı %82,98, Shannon indeksi 0,46, Nei indeksi 0,31 bulunmuştur (bkz. Şekil 4.4.). Verilere göre en yakın genetik mesafe 0,089 en uzak 0,95 'dir. Genetik mesafesi 0,089 olan 1 çift bitki bulunurken, 2 çift bitki arasında ise genetik mesafe en uzaktır (bkz. Şekil 4.5.). Ortalama değer ise 0,47 olarak bulunmuştur. Bu ortalama değer çeşitlerin birbirlerine akrabalık derecesini göstermektedir.



Şekil 4.4. SSR VRZAG15 primerinin %8 poliakrilamid jel görüntüsü



Şekil 4.5. SSR primerlerinin oluşturduğu, bitkiler arasında filogenetik ilişkiyi gösteren dendrogram

Oluşturulan dendograma göre bitkiler A ve B olmak üzere iki büyük gruba ayrılmıştır.

A1 grubu;

Kocatepe-96 ve Ankara -94 bu grupta yer almaktadır.

A2 grubu;

Bu grupta Anayurt-95, Ofis-3 ve Ofis-8 bitkileri bulunmaktadır.

A3 grubu;

Kemerkaya-95 bu grupta bulunan tek bitkidir.

B1 grubu;

Ofis-4, şuhut-94 ve TMO-2 bitkileri bu grupta bulunurken, Ofis-4 ve şuhut-94 birbirlerine daha çok benzerlik göstermektedirler.

B2 grubu;

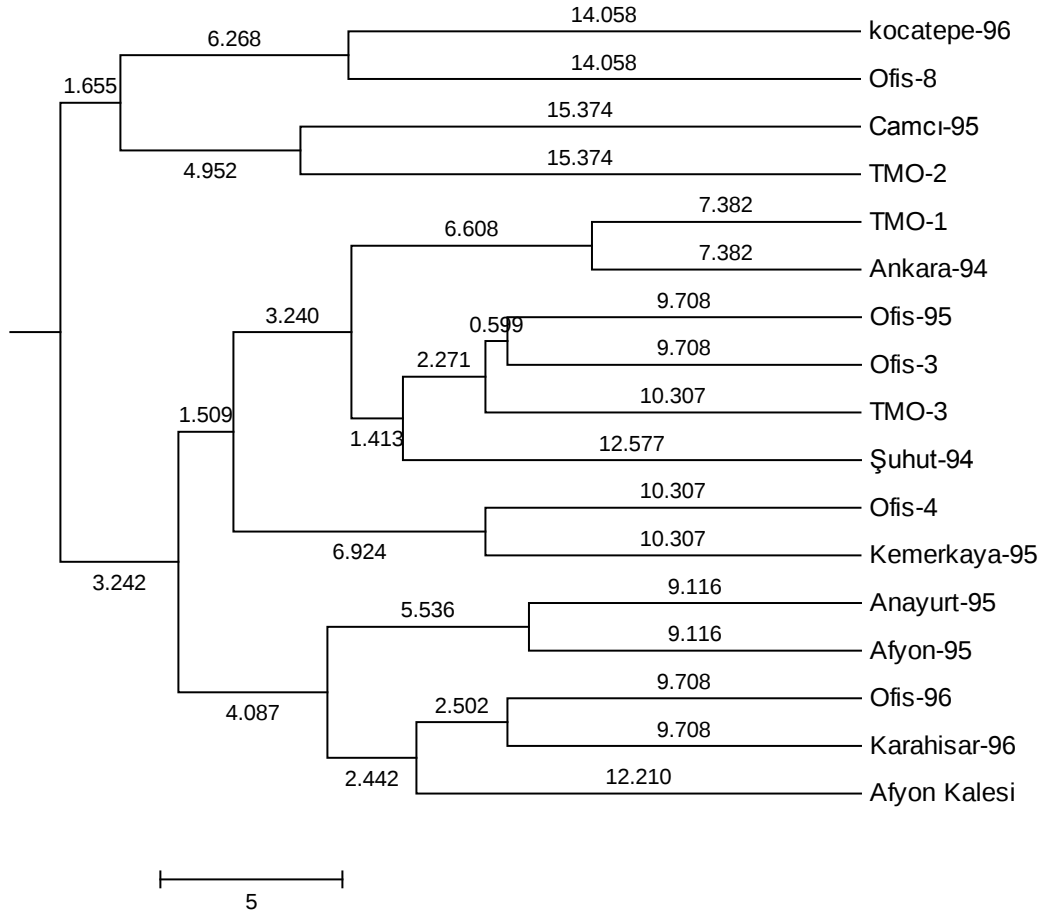
Bu grupta TMO-3 ve Afyon-95 bitkileri bulunmaktadır.

B3 grubu;

TMO-1, Camcı-95, Ofis-95 ve Karahisar-96 dan oluşan bu grupta TMO-1 ile Camcı -95; Ofis-95 ile Karahisar-96 kendi aralarında küçük gruplara ayrılmıştır.

B4 grubu;

Afyon Kalesi ve Ofis-96 bitkileri bu grupta yer almaktadırlar.



Şekil 4.6. SSR+ISSR primerlerinin oluşturduğu, bitkiler arasında filogenetik ilişkiyi gösteren dendrogram

POPGENE32 versiyon 1.32 (Population Genetic Analysis) ve MEGA 4.1 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) programlarında SSR ve ISSR bantlarının okuma değerlerinin birlikte girilmesi sonucu oluşturulan tek dendograma göre bitkiler A ve B olmak üzere iki büyük gruba ayrılmıştır.

A1 grubu;

Kocatepe-96 ve Ofis-8 çeşitleri yer almaktadır.

A2 grubu;

Camcı-95 ve TMO-2 bu grupta yer almaktadır.

B1 grubu;

TMO-1 ve Ankara-94'ün yer aldığı gruptur.

B2 grubu;

Ofis-95, Ofis-3, TMO-3 ve Şuhut-94 bitkileri bu grupta yer alırken, Ofis-95 ve Ofis-3 bitkileri kendi aralarında daha fazla benzerlik gösterir. TMO-3 ve Şuhut-94 ise diğerlerine göre daha az benzerlik gösterirler.

B3 grubu;

Ofis-4 ve Kemer kaya-95 çeşitleri bu grupta bulunmaktadır.

B4 grubu;

Anayurt-95 ve Afyon-95 bu grupta yer almaktadır.

B5 grubu;

Ofis-96, Karahisar-96 ve Afyon Kalesi bu grupta bulunmaktadır ve Ofis-96 ile Karahisar-96 birbirleri ile daha fazla benzerlik gösterir.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

ISSR ve SSR markör teknikleri genetik çeşitliliğin ortaya konulması açısından iyi sonuç alınan tekniklerdendir.

Çalışmada 15 ISSR primeri kullanılarak 17 farklı çeşitte toplam 55 bant tespit edilmiş olup bunlardan 44'ü polimorfiktir. Polimorfizm oranı % 80,00 iken, en yakın genetik mesafe 0,08 en uzak mesafe ise 0,64 olarak tespit edilmiştir. Ortalama genetik mesafe ise 0.27'dir. 5 SSR primeri kullanılarak toplamda 47 banttan 39'u polimorfik olarak belirlenmiştir. Polimorfizm oranı ise %82,98'dir. Ortalama genetik mesafe 0.47'dir. Christopoulos ve ark. (2010) ise 56 ceviz (*Juglans regia* L.) aksesyonu ile yaptıkları çalışmada 7 ISSR primeri kullanmışlar ve benzerlik katsayı değerini ortalama 0,48 olarak bulmuştur. Bu iki farklı markör tekniğinden elde edilen bu sonuçlar birbiri ile uyumludur.

SSR markörünün hem tekniği açısından hem de kodominant olmasının getirdiği sonuç ile ISSR tekniğine göre daha iyi ayrışım gösterdiği görülmektedir. Daha önce *Oxytona* seksiyonundaki *Papaver* türlerinde yapılan çalışmada elde edilen veriler doğrultusunda SSR tekniğinde %100 (Benli, 2009), RAPD tekniğinde %92,55 (Parmaksız, 2009) ve ISSR tekniğinde %96,97 (Gürkök, 2009) polimorfizm oranı tespit edilmiştir. Diğer yandan; Acharya ve Sharma (2009) Hindistan'da kültüre alınmış ve doğal yetişen 24 *P. somniferum* L. bitkisinde RAPD çalışmalarında polimorfizm oranı %69.52 olarak bulunmuştur. ISSR çalışmalarında polimorfizm oranı ise % 100 olarak bulunmuştur. Lüdtke ve ark. (2010) nın *Polygala* L. türünde yapmış olduğu çalışmada polimorfizm oranı %100 olarak belirlenmiştir. Tantasawat ve ark. (2010) SSR çalışması sonucu polimorfizm oranı %90,91, ISSR çalışma sonucu ise polimorfizm oranı % 90,03'tür. Gomes ve ark. (2009) SSR ve ISSR markörlerini kullanarak *Olea europaea* L. da yapmış oldukları araştırmada ISSR primerinde % 79 oranında polimorfizm görülmüştür.

Bu bizim yaptığımız çalışmada SSR ile ISSR primerlerinin aralarında ki polimorfizm oranının farklılığını desteklemektedir.

Yapmış olduğumuz çalışmada 5 SSR primerinde ortalama her primerde 10 allel olan 47 allel bulunurken, 15 ISSR primerinde ise ortalama her primerde 7 allel olan 102 allel tespit edilmiştir. Gomes ve ark. (2009) ise 41 çeşit *Olea europaea* L. nin aynı markör sistemlerini kullanarak yaptığı çalışmada 11 ISSR primerinde 108'i polimorfik olan 135 tekrarlanabilir band tespit edilmiştir. 6 SSR primerinde ise ortalama her primerde 11 allel olan toplamda 67 allel tespit edilmiştir. Her iki çalışma birbirlerini destekler niteliktedir.

Çalışmamızda; ISSR analizleri sonucunda elde edilen dendograma göre A ve B olmak üzere iki büyük grup oluşmuştur. Kocatepe-96, Ankara -94, Camcı-95, Şuhut-94, Ofis-94 ve TMO-1 A grubunda kümelenirken, Anayurt-95, Ofis-95, Kemer kaya-95, Karahisar-96, Ofis-96, TMO-3, Ofis-8, Afyon-95, TMO-2, Afyon Kalesi ve Ofis-3 ise B grubunda kümelenmiştir. Bu gruplar içinde birbirine en yakın genotipler 0,0183 genetik mesafeye sahip olan TMO-2 ve Ofis-3 iken, 0,6400 genetik mesafeyle birbirine en uzak genotipler Ankara-94 ve Afyon Kalesi'dir.

SSR analizleri sonucunda elde edilen dendograma göre A ve B olmak üzere yine iki büyük grup oluşmuştur. A grubunda Kocatepe-96, Ankara -94, Anayurt-95, Ofis-3, Ofis-8 ve Kemer kaya-95 çeşitleri bulunurken, B grubunda Ofis-4, Şuhut-94, TMO-2, TMO-3, Afyon-95, Afyon Kalesi, Ofis-96, TMO-1, Camcı-95, Ofis-95 ve Karahisar-96 çeşitleri yer almaktadır. Bu gruplar içerisinde birbirine en yakın genotipler 0,0889 genetik mesafe ile Ofis-4 ile Şuhut-94 iken en uzak genetik mesafe 1.00 ile Anayurt-95 ile Karahisar-96 olarak tespit edilmiştir.

SSR ve ISSR verilerinin birlikte analizlerinin değerlendirildiği dendogramda yine A ve B olmak üzere iki büyük grup elde edilmiştir. Kocatepe-96, Ofis-8, Camcı-95 ve TMO-2 A grubunda bulunurken, B grubunda TMO-1 ve Ankara-94, Ofis-95, Ofis-3, TMO-3, Şuhut-94, Ofis-4, Kemer kaya-95, Anayurt-95, Afyon-95, Ofis-96, Karahisar-96 ve Afyon Kalesi bulunmaktadır. En uzak genetik mesafe 0,6360 ile Kocatepe-96 ve TMO-3, TMO-1 ve Afyon Kalesi arasında iken, en yakın genetik mesafe 0,1476 ile Ofis-4 ve Şuhut-94 arasındadır.

Bu sonuçlar değerlendirildiğinde SSR analizleri ile SSR+ISSR birlikte analizlerinin ISSR'a göre birbirleri ile daha fazla uyum gösterdiği görülmektedir (bkz. Şekil 4.3., 4.5. ve 4.6.). Acharya ve Sharma (2009) nın yaptığı çalışmada dendogramlara baktığımızda RAPD, ISSR ve RAPD+ISSR dendogramların bizim çalışmamızdaki gibi birbiri ile çok uyum göstermediği görülmüştür.

Morfolojik ve anatomik açıdan incelendiğinde elimizde bulunan veriler sonucunda bazı çeşitler oldukça farklı özellikler gösterirken yaptığımız çalışma sonucunda elde edilen dendogramda birbiri ile daha yakın akrabalık derecesinin olduğu görülmektedir. Örneğin; Afyon-95 ve TMO-3 çeşitlerinde taç yaprak rengi farklılığı görülmektedir. Afyon-95'te koyu beyaz olan taç yapraklar, TMO-3 çeşidinde orta viyole olarak tespit edilmiştir. Ayrıca Afyon-95'in tohum rengi sarı iken, TMO-3 pembe olarak kayıtlara geçmiştir. Yine genetik mesafesi çok yakın olan TMO-2 ve Ofis-3 ün taç yaprakları incelendiğinde TMO-2 nin Ofis-3 e göre daha koyu renkli olduğu görülmüştür. Aynı zamanda kapsüllerin açılabilirliğine bakıldığında TMO-2 nin açılmaz kapsüllü Ofis-3 ün açılabilir kapsüllü olduğu tespit edilmiştir. Çiçeklenme zamanları arasında da bu iki bitki arasında farklılık görülmektedir (bkz. Çizelge 3.2.). Lüdtker ve ark. (2010) *Polygala* L. türünde yapmış olduğu çalışmada da *Polygalaceae* familyasının tür bazında sınıflandırılmasında morfolojik özellikler yeterli olmadığından ISSR verileri ile türler arasındaki farklı gruplar belirlenebilmiştir.

Sonuç olarak, elde edilen veriler, tescil edilmiş 17 çeşit *Papaver somniferum* L. bitkisinin genetik çeşitliliğini ortaya koymuştur. Daha önce bu çeşitlerle ilgili genetik açıdan yapılmış başka bir çalışma olmaması yönünden ayrıca önem taşımaktadır.

KAYNAKÇA

- Anonim,2010.Toprak Mahsülleri Ofisi(TMO),Ankara
- Acharya, S., Sharma, V. 2009. Molecular Characterization of Opium Poppy (*Papaver somniferum*) Germplasm .American Journal of Infectious Diseases. 5 (2): 148-153.
- Ağaoğlu, S., Ergül A.1999. “ Amasya Üzüm Çeşidi Ekotiplerinin RAPD Markörleri ile Genetik Tanımlanmaları”.Türkiye III. Ulusal Bahçe Bitk. Kong., Cilt: II, 369-372.
- Atalay, İ., 1994. Türkiye Vejetasyon Coğrafyası. Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir
- Beckmann, J., S. and M. Soller.1983. Restriction fragment length polymorphisms in genetic improvement: methodologies, mapping and costs. Theor. Appl. Genet. 67: 35-43.
- Benli, İ., 2009. Türkiye Doğal Florasında Yetişen *Papaver* Cinsi *Oxytona* Seksiyonuna Ait Gen Havuzunun SSR Tekniği İle Genetik Karakterizasyonu. (Yüksek Lisans Tezi), Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Tokat.
- Bretting, K, Widrlechner M. 1995.Genetic markers and plant genetic resource management. P.11- 86 in Planr Breeding Reviews, Volume 13, Edited by J Janick. John Wiley & Son Inc. Canada.
- Bornet B., Muller C., Paulus F., Branchard M.2002. “Highly informative nature of inter simple sequence repeat (ISSR) sequences amplified using triand tetra-nucleotide primers from DNA of cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis* L.)”. Genome, 45 890–896.
- Bourguiba H., Krichen L., Audergon J.M., Khadari B.,Farah N.T. 2010. “Impact of Mapped SSR Markers on the Genetic Diversity of Apricot (*Prunus armeniaca* L.)” in Tunisia Plant Mol Biol Rep. 28:578–587.
- Büyükalaca, S.,Sabır, A., Tangolar S.,2008. Moleküler Markör Tekniklerinin Bağcılıkta Kullanımı.Alatarım.7(2): 26-33
- Carolan J.C., Hook I.L.I.,Chase M.W.,Kaderet J.W., Hodkinson T.R.2006. “Phylogenetics of Papaver and Related Genera Based on DNA Sequences from ITS Nuclear Ribosomal DNA and Plastid trnL Intron and trnL–F Intergenic Spacers”. Annals of Botany 98: 141–155.
- Chambers, G.K. and MacAvoy, E.S., 2000. Microsatellites: consensus and controversy. Comp. Biochem. Physiol., 126 455-476.
- Chen, M., Feng, F., Sui, X., Li, M., Zhao, D.,Han, S.,2010.Constructionof a framework map for *Pinus koraiensis* Sieb. Et Zucc. Using SRAP, SSR,and ISSR .Trees.
- Christopoulos, M.,Rouskas, D., Tsantili, E., Bebeli, P.,2010.Germplasm diversity and genetic relationships among walnut (*Juglans regia* L.) cultivars and Greek local selections revealed by Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) markers. Scientia Horticulturae.(125) 584-594
- Çelik, S., 2003. Centaurea L. Cinsi psephelloidea (Boiss) sosn. Seksiyonuna ait türlerin ekolojik özellikleri. Doktora tezi. Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Eskişehir.

- Ergül, 2000. Asmalarda (*Vitis vinifera* L. cvs) Genomik DNA parmak izi analizi ile moleküler karakterizasyon. A.Ü. Fen Bilimleri Enst. Doktora Tezi ss. 86. Ankara
- Facchini P. J., Hagel M., Liscombe K., Loukanina N., MacLeod P., Samanani N., Zulak K. G.2007. "Opium poppy: blueprint for an alkaloid factory".*Phytochem Rev.*6:97–124.
- Ferriol, M., Pico, B., Nuez, F., 2003. Genetic diversity of a germplasm collection of cucurbita pepo using SRAP and AFLP markers. *Theor. Appl. Genet.*, 107, 271–282.
- Gomes, S., Martins-Lopes, P., Lopes, J., Guedes-Pinto, H., 2009. "Assessing Genetic Diversity in *Olea europaea* L. Using ISSR and SSR Markers." *Plant Mol Biol Rep.* 27:365–373
- Gupta, M., Chyi, Y.S., Romero-Severson, J., Owen, J.L., 1994. Amplification of DNA Markers from Evolutionarily Diverse Genomes Using Single Primers of Simple-Sequence Repeats. *Theor. Appl. Genet.*, 89: 998-1006.
- Gümüüşçü, A. ve Arslan, N., Facchini P. J. 1999. "Seçilmiş Bazı Haşhaş (*Papaver somniferum* L.) Hatlarının Verim ve Verim Öğelerinin Karşılaştırılması." *Tr. J. of Agriculture and Forestry* 23 Ek sayı 4, 991–997.
- Güner, A., Özhatay, N., Ekim, T. and Baser, K. H. C., 2000. *Flora of Turkey and East Aegean Islands (Suplement 2). Vol. 11.* Edinburg Univ. Pres. Edinburg.
- Gürkök, T., 2009. Türkiye Doğal Florasında Yetişen *Papaver* Cinsi *Oxytona* Seksiyonuna Ait Gen Havuzunun ISSR Tekniği İle Genetik Karakterizasyonu. (Yüksek Lisans Tezi), Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Tokat.
- Holton, T.A., 2001. "Plant Genotyping by Analysis of Microsatellites. Southern Cross University". 15-27, Lismore,Australia.
- <http://www.etae.gov.tr/bolumler.php?op=yayin&t=teknik>
- Kapoor, L. D., 1997. *Opium Poppy: Botany, Chemistry and Pharmacology.* Food Products Press, p.19, New York.
- Kunihisa, M., Fukino, N., Matsumoto, S.2005.CAPS markers improved by cluster-specific amplification for identification octoploid strawberry cultivars, and their disomic inheritance.theoretical and applied genetics.110 :1410-1418.
- Lee, E.J., Hwang, I.K., Kim, N.Y., Lee, K.L., Han, M.S., Lee, Y.H., Kim, M.Y., Yang, M.S., 2010. An Assessment of the Utility of Universal and Specific Genetic Markers for Opium Poppy Identification. *Journal of Forensic Sciences.*
- Li, G., Quiros, C.F., 2001. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in Brassica. *Theor. Appl. Genet.*, 107 (1), 168–180.
- Lüdtke R., Agostini, G., Miotto, S.T.S., Souza-Chies T. T. 2010. "Characterizing *Polygala* L.(Polygalaceae) species in Southern Brazil using ISSR *Plant mol biol rep.* 28:317-323
- Martin, J.P., Santiago, J.L., Pinto-Carnide, O., Leal, F., Martinez, M.C., Ortiz, J.M., 2006. Determination of Relationship among Autochthonous Grapevine Varieties (*Vitis vinifera* L.) in the Northwest of the Iberian Peninsula by Using Microsatellite Markers.*Gen. Res. and Crop Evo.*, 53: 1255-1261.
- Mauro, M.C., Strefeler, M., Weeden, N.F., Reisch, B.I., 1992. Genetic Analysis of Restriction Fragment Length Polymorphisms in *Vitis*, *J. Heredity*, 83 (1): 18-21.

- Metzgar, D., Bytof, J. and Wills, C., 2000. Selection against frameshift mutations limits microsatellite expansion in coding DNA. *Genome Res.*, 10 72- 80.
- Moreno, S., Martin, J.P., Ortiz, J.M., 1998. Inter-Simple Sequence Repeats PCR for Characterization of Closely Related Grapevine Germplasm. *Euphytica*, 101: 117-125.
- Morgante, M. and Olivieri, A.M., 1993. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics., *Plant J.*, 3 175-182.
- Morgante, M. and Vogel, J., 1994. Compound microsatellite primers for the detection of genetic polymorphism. U.S. Patent Appl., 08/326456
- Morgante, M., Hanafer, M. and Powell, W., 2002. Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. *Nat. Genet.*, 30 194–2000.
- Oliveira, E. J., Batista, V., Amorim O., Matos, E. L. S., Costa, J. L., Castellen, M. S. Pádua, J. G. & Dantas, J. L. L., 2010. Polymorphism of Microsatellite Markers in Papaya (*Carica papaya* L.) *Plant Mol Biol Rep* 28:519–530.
- Panaud, O., Chen, X. and McCouch, S.R. 1995. Frequency of microsatellite sequences in rice (*Oryza sativa* L.). *Genome*, 38 1170-1176.
- Parmar, P., Oza, V. P., Vaishnavi, C., Patel, A.D., Kathiria, K.B., Subramanian, R.B., 2010. Genetic Diversity and DNA Fingerprint Study of Tomato Discerned by SSR Markers. *International Journal of Biotechnology and Biochemistry*. Volume 6 Number 5 657–666.
- Parmaksız, İ., Önen, H., Yıldırım, A., Gümüşcü, A., İpek, A., Arslan, N., 2009. Türkiye Doğal Florasında Yetişen *Papaver* Cinsi *Oxytona* Seksiyonuna Ait Gen Havuzunun RAPD ve SSR Teknikleriyle Genetik Karakterizasyonu, Morfolojik ve Alkaloid Kompozisyonlarının Kromozom Sayılarıyla İlişkilendirilmesi. Ankara.TÜBİTAK 105 O 501 nolu proje sonuç raporu
- Raina, S.N., Rani, V., Kojima, T., Ogihara, Y., Singh, K.P. and Devarumath, R.M., 2001. RAPD and ISSR fingerprints as useful genetic markers for analysis of genetic diversity, varietal identification, and phylogenetic relationships in peanut (*Arachis hypogaea*) cultivars and wild species. *Genome*, 44 763–772.
- Rajesh, M.K., Arunachalam, V., Nagarajan, P., Lebrun, P., Samsudeen, K., Thamban, C., 2008. Genetic survey of 10 Indian coconut landraces by simple sequence repeats (SSRs) *Scientia Horticulturae* 118 282–287.
- Seçmen, Ö., Gemici, Y., Görk, G., Bekat, L.ve Leblebici, E., 1995. Tohumlu Bitkiler Sistematigi (Ders Kitabı). 4. baskı . Ege Üniv. Fen Fak. Ders Kitapları Serisi No: 116. Swati P. J., Prabhakar, K., Ranjekar and Vidya S. Gupta Plant Molecular Biology Group, Division of Biochemical Sciences, National Chemical Laboratory, Pune 411 008, India.
- Sabır, A., Tangolar, S., Büyükalaca, S., 2008. Moleküler Markör Tekniklerinin Bağcılıkta Kullanımı Alatarım. 7 (2): 26-33.
- Saal, B., Plieske, J., Hu, J., Quiros, C.F., Struss, D., 2001. Microsatellite markers for genome analysis in *Brassica* . II. Assignment of rapeseed microsatellites to the A and C genomes and genetic mapping in *Brassica oleracea* L. *Theor Appl Genet* 102:695–699.
- Seçmen, Ö., Gemici, Y., Görk, G., Bekat, L.ve Leblebici, E., 1995. Tohumlu Bitkiler Sistematigi (Ders Kitabı). 4. baskı . Ege Üniv. Fen Fak. Ders Kitapları Serisi No: 116. İzmir.

- Suwabe, K., Iketani, H., Nunome, T., Kage, T., Hirai, M. 2002. Isolation and characterization of microsatellites in *Brassica rapa* L. Theoretical and Applied Genetics, 104 : 1092-1098
- Tan, A., İnal, A., Taşkın, T., 2010. Bitki Genetik Kaynakları Ve Biyoteknoloji. Teknik Broşür. No:6
- Tanksley, D. 1983. Gene mapping. pp. 109-138. In: Isozymes in Plant Genetics and Breeding, Part A, Edited by S. Tanksley and T. Orton. Elsevier, Amsterdam.
- Tantasawat, P., Trongchuen, J., Prajongjai, T., Seehalak, W., Jittayasothorn Y., 2010. Variety identification and comparative analysis of genetic diversity in yardlong bean (*Vigna unguiculata* spp. *sesquipedalis*) using morphological characters, SSR and ISSR analysis. Scientia Horticulturae. 204-216
- Thomas, J., Vijayan, D., Joshi, S., Lopez, S., Kumar, R., 2002. Genetic integrity of somaclonal variants in tea (*Camellia sinensis* (L.) O Kuntze) as revealed by inter simple sequence repeats." Plant Physiology and Biotechnology, UPASI Tea Research Institute, Nirar Dam BPO, Valparai, Coimbatore District, Tamil Nadu 642 127, India.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Lee, T., Hornes, M., Frifiters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., Xabeau, M., 1995. AFLP: A New Technique for DNA Fingerprinting. Nuc. Acids Res., 23: 4407-4414.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V., 1990. DNA Polymorphisms Amplified by Arbitrary Primers are Useful as Genetic Markers. Nuc. Acids Res., 18: 6531-6535.
- Wu, Z.L., Fang, L.Y., Wang, J., Shen, Y.J., 2006. Analysis Genetic Diversity of *Vitis* by Using ISSR Markers. J. Fruit Sci., 23 (4): 605-608.
- Zhang, J.F., Lu, Y., Adragna, H., Hughs, E., 2005a. Genetic Improvement of New Mexico Acala Cotton Gerplasm and Their Genetic Diversity. Crop Sci., 45:2363- 2373.
- Zietkiewicz, E., Rafalski, A., Labuda, D., 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)- anchored polymerase chain reaction amplification. Genomics, 20:176–183.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Gülşen BOZTEPE
Doğum tarihi ve Yer : 1985 / Sivas
Medeni Hali : Bekar
Yabancı Dili : İngilizce
Telefon : 05449619767
e-mail : gulsen_boztepe@hotmail.com

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü	2010
Lisans	Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü	2008
Lise	Sivas Cumhuriyet Anadolu Lisesi	2003

Bilimsel Faaliyetler

1. Lisans Öğrencilerine Yönelik Proje Tabanlı Biyoloji Eğitimi Çalıştayı.16-22 Haziran 2008. AMASYA (*Katılımcı*)
2. Fen Bilimleri ve Matematik Öğretmenlerini Bilim Danışmanlığı ve Eğitimi Yönünden Destekleme Çalıştayı 08-14 Kasım 2008 TOKAT (*Yardımcı eleman*)
3. Gürkök, T.,**Boztepe, G.**, Kaymak, E., Parmaksız, İ. 2009. Türkiye Doğal Florasında yetişen *Papaver* cinsi *Oxytona* seksiyonuna ait den havuzunun ISSR tekniği ile genetik karakterizasyonu. XVI Ulusal Biyoteknoloji Kongresi 13-16 Aralık 2009, Antalya.
4. Parmaksız I., Benli I., **Boztepe G.**, Kaymak E., Gurkok T., Onen H., Arslan N. “Molecular Characterization Of *Papaver* Genus *Oxytona* Section Grown In Wild Flora Of Turkey By RAPD And SSR Techniques”, International Symposium Presentation.2009,Vienna,Austria.
5. Parmaksız I., Unver T., Kaymak E., **Boztepe G.**, Benli I., Gurkok T.,Arslan N.,Özcan S., “ Yeni Mikro-RNAların Haşhaş (*Papaver somniferum* L.) Bitkisinde Tanımlanması ve Karakterizasyonu” 20. Ulusal Biyoloji Kongresi. 21-25 Haziran 2010, Denizli.