

T1145

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

RAPD MARKERLERİNİ KULLANARAK TÜRK SUSAM (*Sesamum indicum* L.)
POPULASYONLARINDA GENETİK UZAKLIKLARIN ANALİZİ

A. GÜLHAN ERCAN ŞENÇİÇEK

T1145/1-1

DOKTORA TEZİ
TARLA BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

ANTALYA

2000

**RAPD MARKERLERİNİ KULLANARAK TÜRK SUSAM (*Sesamum indicum* L.)
POPULASYONLARINDA GENETİK UZAKLIKLARIN ANALİZİ**

A.GÜLHAN ERCAN ŞENÇİÇEK

**DOKTORA TEZİ
TARLA BİTKİLERİ ANABİLİM DALI**

ANTALYA

2000

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

RAPD MARKERLERİNİ KULLANARAK TÜRK SUSAM
POPULASYONLARINDA GENETİK UZAKLIKLARIN ANALİZİ

A.GÜLHAN ERCAN ŞENÇİÇEK

DOKTORA TEZİ

TARLA BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

Bu tez 29.06.2000 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından (100) not takdir edilerek
oybirliği/oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Yrd. Doç. Dr. Mehmet BİLGİN
(Danışman)

Prof. Dr. M. İlhan ÇAĞIRGAN

Doç. Dr. Kenan TURGUT

Doç. Dr. Sebahattin ÖZCAN

Yrd. Doç. Dr. Naci ONUS

ÖZET

RAPD MARKERLERİNİ KULLANARAK TÜRK SUSAM POPULASYONLARINDA GENETİK UZAKLIKLARIN ANALİZİ

A. GÜLHAN ERCAN ŞENÇİÇEK

Doktora Tezi, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman: Yard. Doç. Dr. MEHMET BİLGİN

Haziran 2000, 102 Sayfa

Germplasm koleksiyonlarındaki genetik farklılığın bilinmesi hem bitki ıslahçıları hem de taksonomistler için önemlidir. Bu çalışmada, Türkiye'de kültürü yapılan 52 yerel susam çeşidi arasındaki genetik uzaklık, morfolojik ve moleküler marker sistemleri ile değerlendirilmiştir.

Populasyonlar arasındaki genetik farklılığı belirlemek için onüç morfolojik özellik kullanılmıştır. Morfolojik özellikler arasındaki ilişkiler, korelasyon analizi ile belirlenmiş ve temel bileşenler analizi ile desteklenmiştir. Populasyonlar, hiyerarşik kümeleme analizinde öklit uzaklığına dayanarak gruplandırılmıştır. Farklı gruplarda yer alan populasyonlar, coğrafik orijinlerine göre dağılım göstermemiştir. PCR kökenli RAPD marker analizi için her grup içindeki en az genetik uzaklık mesafesi olan populasyonlar eleştirilmiştir. PCR aracılığı ile DNA çoğaltılmasında oniki primer kullanılmıştır.

Kalan 38 populasyon arasındaki genetik farklılık, polimorfik RAPD bantlarının varlığı veya yokluğuna göre tahmin edilmiştir. Amplifikasyon ürünleri UPGMA ile analiz edilmiş ve sonra populasyonlar iki farklı gruba kümelendirilmiştir.

Bu sonuçlar RAPD tekniğinin susam sistematigi için kullanışlı olduğunu, gen bankalarının devamlılığında ve ıslah programlarında etkili ebeveyn seçimi için yararlı

olduğunu göstermektedir. Çalışma susam populasyonlarında, gelecekteki moleküler temelli çalışmalar için referans kaynağı olacaktır.

ANAHTAR KELİMELER: Susam, *Sesamum indicum* L., genetik uzaklık, RAPD, morfolojik marker, kümeleme analizi

JÜRİ: Yrd. Doç. Dr. Mehmet BİLGİN (Danışman)

Prof. Dr. M. İlhan ÇAĞIRGAN

Doç. Dr. Kenan TURGUT

Doç. Dr. Sebahattin ÖZCAN

Yrd. Doç. Dr. Naci ONUS

ABSTRACT

ANALYSIS OF GENETIC DISTANCE IN TURKISH SESAME POPULATIONS USING RAPD MARKERS

A. GÜLHAN ERCAN ŞENÇİÇEK

Ph.D. Thesis in Department of Field Crops

Adviser: Asst. Prof. Dr. MEHMET BILGEN

June 2000, 102 pages

Knowledge of genetic diversity in germplasm collections is important for both plant breeders and taxonomists. In this study, morphological and molecular marker systems were used to determine genetic distance among 52 landraces of cultivated sesame (*Sesamum indicum* L.) from Turkey.

13 morphological traits were used to determine genetic distance among sesame populations. Intercorrelation among morphological traits was established by correlation analysis and supported by PC analysis. In hierarchical cluster analysis, the populations were grouped based on Euclidean distance. The resulting distribution of populations in clusters was *not* according to their geographical origin. For PCR-based RAPD marker analysis, the populations with the shortest genetic distances within each group were eliminated. Twelve primers were used to amplify DNA via PCR.

The genetic diversity among the remaining 38 populations was estimated based on presence or absence of polymorphic RAPD bands. The amplification products were analyzed using UPGMA, and then the populations were clustered in two different groups.

These results indicate that RAPD techniques are useful for sesame systematics, and should be valuable for the maintenance of germplasm banks and the efficient choice of

parents in breeding programs. The study can serve as a source of reference for future molecular based studies in sesame populations.

KEY WORDS; Sesame, *Sesamum indicum* L , genetic distance, RAPD, morphological marker, cluster analysis

COMMITTEE: Asst. Prof. Dr. Mehmet BİLGİN (Adviser)

Prof. Dr. M. İlhan ÇAĞIRGAN

Assoc. Prof. Dr. Kenan TURGUT

Assoc. Prof. Dr. Sebahattin ÖZCAN

Asst. Prof. Dr. Naci ONUS

ÖNSÖZ

Ülkemizde susam üreticileri, uzun yıllar doğal seleksiyon ile elde edilmiş susam populasyonlarının üretimini yapmaktadırlar. Ancak, bu populasyonların genetik yapıları hakkındaki bilgiler yeterli değildir. Oysa populasyonların genetik yapısı hakkındaki ön bilgiler, ıslahçı için yeni çeşit oluşturmada hangi ebeveyni seçmek gerektiği konusunda olduğu kadar, gen bankalarının oluşturulması ve sistematikte de büyük yararlar sağlamaktadır. Bu nedenle Türkiye'de yetiştirilen susam populasyonları arasındaki genetik farklılık morfolojik ve moleküler marker sistemleri ile belirlenmiştir. Ülkemizde ve Dünyada susam populasyonları arasındaki genetik farklılığın ilk kez moleküler olarak belirlendiği bu çalışmanın, susam ıslah çalışmaları için temel bilgi kaynağı olarak kullanılacağını umuyorum.

Bana tez konumu belirleyerek bu konuda çalışma olanağı veren, her aşamada katkılarını esirgemeyen danışmanım Sayın Hocam Doç. Dr. Kenan TURGUT'a, tez çalışmamın yürütülmesi esnasında tarla çalışmalarımın yanı sıra, jel fotoğraflarımın çekiminde yardımcı olan danışmanım Sayın Yard. Doç. Dr. Mehmet BİLGİN'e, çalışmalarımı yürütmem için uygun ortamı sağlayan Bölüm Başkanımız Sayın Prof. Dr. M. Emin TUĞAY'a, tez çalışmamın yön kazandırılmasında bilgilerinden yararlandığım Sayın Prof. Dr. İlhan ÇAĞIRGAN ve Yard. Doç. Dr. Naci ONUS ve Doç. Dr. Sebahattin ÖZCAN'a, bitkisel materyali temin etmemde yardımcı olan Sayın Yard. Doç. Dr. Hasan BAYDAR'a (S.D.Ü.Z.F.), tezimin yapılması esnasında bilgisiyle desteğini gördüğüm Sayın Doç. Dr. Hüseyin BASIM'a, İstatistiksel hesaplamaların yapılmasında yardım eden Sayın Doç. Dr. M. Ziya FIRAT ve Dr. Handan ÇAMDEVİREN'e (A.Ü.Z.F.), jel fotoğraflarımın düzenlenmesini sağlayan Necat SAĞIROĞLU'na teşekkür ederim. Laboratuvar ve tarla çalışmalarım esnasında yardımlarını gördüğüm Araş. Gör. Melih TAŞKIN, Araş. Gör. Ayşe YALÇIN ELİDEMİR'e ve tüm Araştırma Görevlisi arkadaşlarıma teşekkür ederim. Bu çalışmayı destekleyen Akdeniz Üniversitesi Araştırma Fonu'na, ve bana tezimin yazımı yanı sıra manevi olarak da destek veren eşim Mehmet ŞENÇİÇEK ve annem Güngör ERCAN'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
ÖNSÖZ	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL BİLGİLER VE KAYNAK TARAMALARI	5
2.1. Morfolojik ve Biyolojik Özelliklerin Değerlendirilmesi	5
2.2. DNA İzolasyonu ve RAPD Optimizasyonu	12
2.3. RAPD Tekniği İle İlgili Çalışmalar	20
3. MATERYAL VE METOT	39
3.1. Morfolojik Gözlem İçin Yapılan Çalışmalar	39
3.1.1. Araştırma yeri	39
3.1.1.1. Toprak özellikleri	39
3.1.1.2. İklim özellikleri	40
3.1.2. Materyal	41
3.1.2.1. Genetik bitki materyali	41
3.1.3. Metod	41
3.1.3.1. Ölçüm ve değerlendirmeler	44
3.1.3.2. Yetiştirme teknikleri	45
3.1.4. İstatistiksel değerlendirmeler	46
3.2. RAPD Markerleri ile İlgili Çalışmalar	47
3.2.1. Materyal	47
3.2.2. Metod	47
3.2.2.1. DNA ekstraksiyonunda kullanılan çözeltiler	49
3.2.2.2. RAPD (Random Amplified Polimorphic DNA) tekniğinin optimizasyonu	50
3.2.2.3. Agaroz jel elektroforesis	55
3.2.2.4. İstatistiksel değerlendirmeler	55
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	57
4.1. Morfolojik Özelliklerin Değerlendirilmesi	57

4.2. RAPD Markerleri İle Populasyonların Değerlendirilmesi	70
4.2.1. DNA izolasyonunun optimizasyonu	70
4.2.2. DNA Amplifikasyon koşullarının optimizasyonu	71
4.2.2.1. DNA konsantrasyonunun optimizasyonu	72
4.2.2.2. $MgCl_2$ konsantrasyonunun optimizasyonu	72
4.2.2.3. Primer konsantrasyonunun optimizasyonu	73
4.2.2.4. dNTP konsantrasyonunun optimizasyonu	73
4.2.2.5. Taq polimeraz konsantrasyonunun optimizasyonu	74
4.2.2.6. PCR amplifikasyonu için döngü parametrelerinin optimizasyonu	74
5. SONUÇ	90
6. KAYNAKLAR	93
ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

A	Adenin
C	Sitozin
cm	Santimorgan
dk	Dakika
g	Gram
G	Guanin
HCl	Hidrojenklorür
h	saat
K	Potasyum
KCl	Potasyum klorür
l	Litre
mM	Milimolar
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar
nm	Nanometre
ng	Nanogram
NaCl	Sodyum klorür
pmol	Pikomol
rpm	Devir/dakika
u	Unit
V	Volt
T	Timin

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. Susam Populasyonlarına Ait Tarla Denemesinden Genel Görünüş.....	39
Şekil 3.2. Bakım İşlemleri Yapılmış Susam Populasyon Ekim Alanı.....	46
Şekil 4.1. Değişkenlerin İki Boyutlu Düzlemde Gösterimi.....	60
Şekil 4.2. Susam Populasyonlarının Morfolojik Özelliklerinin Öklit Uzaklığına dayanarak Yapılan Dendogramı.....	68
Şekil 4.3. Susam Populasyonlarında K2 Primeri ile Çoğaltılan RAPD Bant Profilleri Agaroz Jelde (% 1.5 high melting + % 0.3 low melting agaroz) 70V'da 1.45 saat sürede yürütülmüştür.....	78
Şekil 4.4. Susam Populasyonlarında K4 Primeri ile Çoğaltılan RAPD Bant Profilleri Agaroz Jelde (% 1.5 high melting + % 0.3 low melting agaroz) 70V'da 1.45 saat sürede yürütülmüştür.....	79
Şekil 4.5. Susam Populasyonlarında K6 Primeri ile Çoğaltılan RAPD Bant Profilleri Agaroz Jelde (% 1.5 high melting + % 0.3 low melting agaroz) 70V'da 1.45 saat sürede yürütülmüştür.....	80
Şekil 4.6. Susam Populasyonlarında K8 Primeri ile Çoğaltılan RAPD Bant Profilleri Agaroz Jelde (% 1.5 high melting + % 0.3 low melting agaroz) 70V'da 1.45 saat sürede yürütülmüştür.....	81
Şekil 4.7. RAPD Bant Profillerinin UPGMA ile Yapılan Dendogramı.....	86

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Deneme Yapılan Toprağın Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	40
Çizelge 3.2. Deneme alanının 1997-1998 yıllarına ait ortalama iklim verileri	40
Çizelge 3.3. Susam Bitkilerinin Toplandığı Bölgeler	42
Çizelge 3.4. Populasyon Analizinde İncelenen Özellikler	43
Çizelge 3.5. DNA Ekstraksiyon Çözeltisi (100mM Tris-HCl pH 8.0, 50mM EDTA pH 8.0, 500mM NaCl, 10mM 2-mercaptoethanol) 100 ml için	48
Çizelge 3.6. RAPD Analizinde Kullanılan Primerler ve Baz Dizilişleri	52
Çizelge 4.1. Morfolojiklere Özelliğe Ait Ortalama ve Standart Sapma	58
Çizelge 4.2. Morfolojik Özelliklerden Elde Edilen Korelasyon Matrisi	61
Çizelge 4.3. 52 Susam Populasyonuna Ait Özelliklerin Temel Bileşenler Analizi	63
Çizelge 4.4. Populasyonların Kümeleme Analizi Sonucu Benzerlik ve Uzaklık Düzeyleri	64
Çizelge 4.5. Susam Populasyonlarının Gruplara Göre Kantitatif Değişkenlerinin Ortalama Değeri	69
Çizelge 4.6. PCR Optimizasyonunda Test Edilen Parametreler	76
Çizelge 4.7. Susam Populasyonları Arasındaki Polimorfizmi Belirlemek için Kullanılan Reaksiyon Parametreleri ve Miktarları	77
Çizelge 4.8. RAPD Bant Profillerinin Nei ve Li'ye göre Hesaplanan Genetik Uzaklık Matrisi	82

1. GİRİŞ

Türkiye susamın orijini olmamasına rağmen Trakya'dan Güneydoğu Anadolu Bölgesine kadar oldukça geniş bir alanda yayılış gösteren çok sayıda popülasyona sahiptir. Ülkemizde yetiştirilen bu yerel susam popülasyonları arasında genetik farklılığın bulunup bulunmadığına dair bir bilgi yoktur. Oysa, bitki germplazmasının genetik uzaklığına dair bilgiler birçok bitki ıslahçısı için spesifik bir germplazm kaynağındaki genetik ilişkinin belirlenmesi ve hatlar veya popülasyonların tanımlanması açısından önemli başvuru kaynağı olacaktır. Islah programının başlangıcında genotipler arasındaki genetik ilişkinin bilinmesi fenotipik bilgiyi tamamlayıcı olarak ıslah popülasyonlarının geliştirilmesinde kullanılabilir (Santalla vd 1998). Genotipler arasındaki genetik benzerlik, yeni genetik kombinasyonların oluşturulması için melezleme kaynağı olarak ıslahçının neyi kullanacağı konusunda karar vermesini sağlar (Hallden vd 1994).

Çeşitler geliştirilmesi için kullanılan saf hat seleksiyonu yanı sıra, verim artışında bir değişimin sağlanması için başvurulacak heterosis ıslahı kendine ve yabancı döllen bitkilerde, hibritlerin gelişimi için önemlidir. Genellikle farklı coğrafik orijinli genotiplerden oluşan hibritler benzer orijinli hibritlerden daha yüksek verimli olmaktadır. Susamın, diğer kendine döllen bitkiden daha fazla genetik çeşitliliğe sahip olduğunu (Ganesh ve Thangavelu 1995) göz önüne alırsak yapılacak hibrit ıslahında genetik olarak farklı bireyler ıslahçı için iyi birer materyal olacaktır. Nitekim Quijada ve Layrisse (1995), susamda heterosis ve kombinasyon yeteneğini araştırmak için kullandıkları 12 susam varyetesini farklı lokasyonlardan morfolojik özelliklerine ve gelişim periyotlarına göre seçmişlerdir.

Bireyler veya popülasyonlar arasındaki varyasyon morfolojik özelliklere ve biyokimyasal parametrelere (izozim analizi ve tohum depo proteinleri) dayanarak belirlenmektedir (Jain vd 1994). Bitki genetik haritalarının oluşturulmasında kullanılan marker sistemlerinden biri olan bu fenotipik markerler, yaprak veya çiçek morfolojisini etkileyen özellikler, bitki boyu ve pigment biyosentezi gibi özelliklerdir. Fenotipik

markerlere dayalı genetik haritalar "klasik haritalar" olarak isimlendirilmektedir (Koorneef 1990). Fenotipik özelliklere göre yapılan morfolojik-agronomik gruplamalar çevreden etkilenen az sayıda karaktere dayandığı için iki grup gerçekte uzak ilişkili olmasına rağmen oldukça yakın akraba olarak görülebilir. Bununla birlikte bu karakterler birbirine oldukça yakın genotipler arasında sınırlı polimorfizm gösterirler.

Biyokimyasal parametrelerden olan enzim markerleri ise pratik ve bilgi verici olmasına rağmen düşük frekans verdikleri için kullanımı sınırlıdır. Isshiki ve Umezaki (1997), kültürü yapılan 68 susam varyetesinde varyasyonu belirlemek için 7 tane enzim sistemi kullanmışlardır. Ancak, araştırmacılar sadece bir enzim sisteminin (IDH; izozimcitra dehydrogenase) varyasyonun açığa çıkarılmasında yardımcı olduğunu ve izozim markeri ile çok düşük oranda varyasyonun belirlenebildiğini açıklamışlardır. Sorgumda genetik varyasyonun belirlenmesi için izozim markerleri varyasyonu net olarak açıklayamamıştır. Bu markerler tüm genom boyunca genetik varyasyonun açığa çıkarılmasında etkili olmamıştır (Aldrich 1992). Çeşitlerin belirlenmesinde kullanılan izozim elektroforesisde, sınırlı sayıda izozimler genotipler arasındaki polimorfizmi çok az belirleyebilmektedir. Her izozim analizi için taze bitki örnekleri kullanılması gerekmekte ve ayrıca kullanılan protein RAPD için gereken DNA'dan daha az stabil olmaktadır (Golembiewski vd 1997).

Kleppe vd (1971) tarafından PCR'ın ilk teorik temelleriyle ilgili makaleleri yayınlanmıştır. Ancak, bu 1980'de Kary Mullis vd'lerinin genomik DNA'dan çok sayıda tek kopya genlerin çoğaltılması ile ilgili çalışmalarına kadar bir ses getirmemiştir. PCR'ın ilk uygulamasında kullanılan enzimin denatürasyon adımı süresince inaktif olmasından dolayı her döngü süresince *E. coli* DNA polimerazın klenow fragmentinden eklemek gerekiyordu. Daha sonra *Thermus aquaticus*'dan ısıya dayanıklı Taq DNA polimerazın eldesi ile bu problem ortadan kaldırılarak PCR'ın otomasyonu sağlanmıştır. Bu şekilde, Taq DNA polimeraz, yapışma (annealing) ve uzama (extension) için yüksek sıcaklığın kullanımına olanak tanımıştır.

PCR'ın gelişimi ile spesifik DNA fragmentlerinin çoğaltılması yolu ile DNA polimorfizmi belirlenebilmiştir. Protein veya DNA markerlerine dayanan haritalar ise "moleküler haritalar" olarak adlandırılır (Reiter vd 1993). Genetik uzaklık bir çok tarla bitkisinde çeşitli moleküler, kimyasal ve morfolojik özellikler kullanılarak belirlenmeye çalışılmıştır. Hem temel hem de uygulamalı bitki bilimcileri tarafından çalışılan organizmalar arasındaki genetik varyasyonun daha iyi anlaşılması için, bu araçlara ihtiyaç duyulmaktadır. DNA sekansındaki polimorfizmin belirlenmesi için RFLP, AFLP, SSR, CAPs ve RAPD teknikleri geliştirilmiştir. Son yıllarda rasgele primerlerin kullanılması ile elde edilen markerler, "random amplified polymorphic DNAs" (RAPDs) ve "arbitrarily primed-PCRs" (AP-PCRs) olarak isimlendirilmiştir. Bu DNA markerleri çok basittir. Çünkü, herhangi bir spesifik DNA sekans bilgisine yada spesifik primerlerin sentezine ihtiyaç yoktur. Fragmentler PCR'da primer olarak kullanılan rasgele ve çok kısa DNA sekanslarından çoğaltılırlar. Böylece farklı bir lokusu temsil eden her bir PCR ürünü ile DNA düzeyindeki farklılık tahmin edilebilir.

Ancak, yine de farklı genotiplerden gelen fragmentlerin genetik akrabalığı ve fragmentlerin genom orijini hakkında bazı şüpheler vardır. Çünkü, RAPD'ler aynı zamanda dominant genetik markerler olarak davranırlar. Bunun anlamı dominant RAPD markerleri ile bir DNA segmentinin heterozigot veya homozigot bir lokusdan mı amplifiye olduğunu ayırt etmek mümkün değildir. Ko-dominant RAPD markerleri, aynı lokusdan amplifiye olmuş farklı büyüklükte DNA segmentleri olarak nadiren belirlenmiştir. Mesela *Nicotiana crassa*'nın genetik haritasının yapılmasında 88 RAPD markerinin 84 tanesi dominant ve sadece 4 tanesi ko-dominant olmuştur (Williams 1990). Her fragment farklı segregasyon analizi ile haritalanmazsa çoğaltılan fragmentin genom lokasyonu bilinmez. RAPD markerlerinin bu karakteristikleri bazı germplasm grupları içindeki genetik akrabalığı belirlemek için etkilidir (Thormann ve Osborn 1992). Dominant markerler, kendilenmiş homozigot ebeveynlerin kullanılması durumunda genetik haritalama için uygundur. RAPD markerleri genetik haritalamada, bitki ve hayvan ıslahı uygulamalarında, populasyon genetiği çalışmalarında genetik farklılığı belirlemede, DNA parmakizi çıkarılmasında, aynı zamanda kromozom-spesifik DNA fragmentlerinin hızlı belirlenmesi ve izolasyonuna

olanak vererek polimorfizm için etkili bir yöntemdir (Newbury ve Ford-Lloyd 1993). RAPD markerleri kullanılarak genetik haritalamanın pek çok avantajı vardır; büyük varyeteli türlerde genomik analiz için universal bir primer seti kullanılır, klonlanmış DNA problemlerinin izolasyonuna, hibridizasyon için filitrenin hazırlanmasına veya nükleotid sekansı gibi ön hazırlıklara ihtiyaç yoktur (Williams 1990). RAPD, basit ve oldukça geniş türlere uygulanabilmesi nedeni ile yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Örneğin, moleküler marker kullanımının sınırlı olduğu bazı konifer türlerinde RAPD markerleri bu yükü azaltmıştır (Hallden vd 1994) *Brassica oleracea*, *Sorghum bicolor*, *Beta*, *Allium*, *Lotus*, *Avena sterilis* ve *coffea* bunlardan bazılarıdır. *Hevea* klonları arasında morfolojik varyasyonlar çok farklı olmadığı için morfolojik özelliklere dayalı fenotip belirlenmesindeki zorluk, RAPD markerleri ile giderilmiştir.

Susamda yapılan bu çalışmada populasyonların sınıflandırılması, germplasmin değerlendirilmesi ve genetik kaynakların planlanması için gereklidir. Populasyonlar hakkında bugüne kadar moleküler düzeyde bir yaklaşım olmamıştır. Bu nedenle tarla denemeleri sonucu elde edilen agronomik özellikler değerlendirilerek fenotipik özelliklere dayalı bir seleksiyondan sonra fenotipik olarak farklı olan 38 populasyon arasındaki genetik farklılık, RAPD markerleri kullanılarak belirlenmiştir. Yapılan bu çalışma susam ıslahı ile uğraşan ıslahçılar için yeni genetik kaynakların oluşturulmasında bilgi kaynağı olacaktır. Bunun yanı sıra moleküler düzeyde tanımlanmasının yapıldığı ülkemiz susam populasyonlarının gen bankalarının oluşturulması için faydalı olacağına inanılmaktadır.

2. KURAMSAL BİLGİLER VE KAYNAK TARAMALARI

2.1. Morfolojik ve Biyolojik Özelliklerin Değerlendirilmesi

Jeffers vd (1967), yaptıkları çalışmada ışıık tuzağı ile yakalanan kanatlı afidlerde 19 değişken ölçmüşlerdir. Araştırmacılar temel bileşenler analizi yapmadan önce değişkenlerin bir uzunluk ve sayı karışımı oluşturduklarını göz önüne almışlar ve ön işlem olarak korelasyon matrisi yapmışlardır (Digby ve Kempton 1987).

Hu (1985), 45 susam varyetesi ile yaptığı çalışmada, kapsülde karpel sayısı ve boğumda kapsül sayısına dayanarak varyeteleri BAN (iki karpelli veya 4 lokus, tek kapsüllü), 3BA (iki karpelli veya 4 lokus, 3 kapsüllü), QAN (dört karpelli veya 8 lokus, tek kapsüllü), 3QA (4 karpelli veya 8 lokus, 3 kapsüllü) olmak üzere 4 tipte sınıflandırmıştır. Her bir karakterin kültürü yapılan tiplerinin arasındaki farklılıklar yanında kültürü yapılan her tipin ıslah karakteristikleri de temel bileşenler analizi ile tartışılmıştır. QAN ve 3QA tipinin kapsül başına tohum sayısının BAN ve 3BA tipine göre daha yüksek olduğu ancak BAN ve 3BA tipinde kısa internod ve çok sayıda kapsül olduğunu tespit etmiştir. 3BA tipi diğer tiplere göre daha erken olgunlaşan, daha az dallı ve az kapsüllü fakat boğum sayısı, bitki uzunluğu ve 1000 tane ağırlığı bakımından daha düşüktür. Temel bileşenler analizi, verimin, kapsül başına tohum sayısı, boğum arası uzunluğu ve boğum sayısı ile aralarında korelasyon olduğunu göstermiştir.

Digby ve Kempton (1987), birçok çoklu değişken analizi uygulamalarında, her birey üzerinde çok sayıda değişken ölçümü yapıldığını fakat, araştırmacının bu değişkenlerin hepsini kullanıp kullanmayacağını belirlemek zorunda olduğunu bildirmişlerdir. Çünkü araştırmacının eldeki çalışma için hangi bulguların önemli olduğundan emin olmaması veya düzenleyeceği anketin pahalı ve zor olmasından dolayı bu gibi durumlarda bütün veri setinin analizi ile ilgili üç ana sorun olduğunu belirtmişlerdir;

1. Bazı değişkenler çalışmanın amacı ile tamamen ilgisiz olabilir ve diğer verilerin gerçek etkilerini maskeleyebilir.

2. Çok değişken olunca güvenilir parametre tahminleri elde etmek için gerekli örnek büyüklüğü gerçekçi büyüklükten yüksek olabilir.
3. Çok değişken problemde çok sayıda parametreye yol açar. Bu da örnekleme değişkenliğinden dolayı daha çok karmaşıklığa neden olur.

Bu yüzden çoğu problemlerde, analizde kullanılacak en iyi değişkenlerin önceden seçilmesinin gerektiğini ve böyle bir seçimin çoklu değişken analizi problemlerini azalttığını açıklamışlardır. Aynı şekilde düzenlenmemiş veri setinin ana özelliklerini göstermek için ölçülmüş "p" değişkeninden en iyi "m" tanesini seçerek iki popülasyonu ayırt etmek için veya iki değişken grubu arasında tatmin edici bir ilişkiyi sağlamak için yapıldığını belirtmişlerdir.

Araştırmacılar, hiyerarşik kümeleme yöntemlerinin standart gösteriminin dendogram olduğunu, dendogramda sağdan sola gittikçe kümelerin daha küçük kümelere bölündüğünü ve yatay eksenin kümelerin birleştii benzerliği gösterdiğini bildirmişlerdir.

Krzanowski (1988), dendogramın, kümeleme katsayısının ekstrem değerler arasında sistematik olarak değiştirilmesi ile var olan gruplar arasından ortaya çıkan birleşme ve bölünme sırasını gösterdiğini bildirmiştir. Dendogramın alt kısmında bütün birimlerin ayrı gruplar oluşturduğunu ancak dendogramın tepesinde bütün birimlerin tek gruba girdiğini böylece bölücü bir yöntemin dendogramın tepesinden başlayarak aşığı doğru ilerlediğini açıklamıştır. Toplayıcı yöntemin ise dendogramın en altından başlayıp yukarı doğru çıktığını belirtmiştir.

Perry ve McIntosh (1991), germplasm koleksiyonunun artışı ve devamlılığının oldukça önemli olduğunu bildirmişlerdir. 78 ülkeden *Hordeum vulgare*, *Triticum turgidum*, *Carthamus tinctorius*, *Oryza sativa*'nın 2250 bireyinde yapılan çalışmada fenotipik farklılık tanımlanmıştır. 17 morfolojik özellik kullanılarak ırklar içinde ve arasında varyasyon belirlenmiştir. Gruplar arasındaki farklılıkların belirlenmesinde kanonikal diskriminant analizi kullanılarak azaltılmış boyut modeli geliştirilmiştir. Daha sonra hiyerarşik kümeleme analizi ile 4 gruba ayrılmıştır.

Singh vd (1991), 306 tane yerel *Phaseolus vulgaris* arasındaki genetik farklılığı morfolojik ve agronomik karakterleri kullanarak belirlemişlerdir. Bu değişkenler çoklu değişken analizi kullanarak analiz edilmiştir. Araştırmacılar, öncelikle normalite analizi yapmışlardır. Yaptıkları

analiz sonucu tüm değişkenler yaklaşık bir normalite vermiştir. Ancak hipokotil ve çiçek rengi, büyüme şekli, tohum parlaklığı, ilk çiçeğe kadar olan boğum sayısı, mozaik virüsüne, yaprak biti, bakteriyel hastalık, anthraknoza ve köşeli yaprak beneklerine reaksiyon gibi kesikli değişkenler normaliteden ayrı tutulmuşlardır. Analiz, normalite yapılan değişkenlerle yapılmıştır. Ancak numara verilerek değerlendirmesi yapılan kalitatif değişkenler ve kantitatif değişkenlerin birlikte kullanılarak yapılan kümeleme analizinde de herhangi bir farklılık bulunmamıştır.

Souza ve Sorrells (1991), yulafta yaptıkları çalışmada 13 kantitatif özellik kullanmışlardır. Yapılan kümeleme analizi sonucu orijinleri bakımından 4 büyük gruba ayrılmışlardır. Araştırmacılar, korelasyon matrisinin özvektörü üzerinden standardize edilmiş orijinal değerlerin tahmin edilmesi, değişken bağımsızlığını ve özelliklerin dengeli ağırlıklandırılmasını sağladığını ve temel bileşenler analizi kullanılarak her çeşit için ortogonal, bağımlılık olmayan karakterlerin elde edilip bu bağımsız karakterleri kullanarak gruplar arası ilişki belirlendiğini belirtmişlerdir.

Brown (1991), çeşit performansının coğrafik dağılımını vermek için agronomik özellik verilerini temel bileşen ve kümeleme analizleri ile değerlendirmişlerdir. Agronomik performansa ve lif kalitesi ölçümlerine dayanarak pamuk çeşitleri arasındaki ilişki saptanmıştır. Analiz sonucu USA pamuk çeşitleri arasındaki genetik varyabilite hakkında bilgi verilmiştir. Her bir pamuk varyetesi özelliklerinin başlangıçta standardize edilmiş verileri kullanılmıştır. Daha sonra korelasyon matrisi üzerinden temel bileşenler analizi yapılmıştır.

Patil ve Sheriff (1994), 100 farklı susam genotipinde genetik farklılığın belirlenmesi için yaptıkları çalışmada çiçeklenmenin % 50' sinin tamamlandığı gün sayısı, bitki uzunluğu, dal sayısı, ilk dalın uzunluğu, kapsül sayısı, ilk kapsülün uzunluğu, verim, olgunlaşma zamanı, kapsül uzunluğu, kapsül başına tohum sayısı, 1000 dane ağırlığı, bitki başına tohum verimi, hasat indeksi, yağ içeriği, bitki başına yağ verimi ve kapsül çevresi olmak üzere 16 özelliği incelemişlerdir. Çalışılan tüm özellikler için varyeteler arasında varyans analizi önemli farklılıklar açığa çıkarmıştır. Genetik uzaklığına göre varyeteler 14 kümede gruplanmıştır.

Araştırmacılar, farklı kümeler içindeki varyetelerin dağılışının coğrafik orijinlerine göre olmadığını bildirmişlerdir.

Türker ve Türker (1994), değişkenler arasındaki bağımlılığın olmadığı veya değişkenler arasındaki ilişkilerin yapısı hakkında ön bilgi bulunmadığı durumlarda çok değişkenli istatistik yöntemlere ihtiyaç olduğunu ve bu amaçla faktör analizi, ana bileşenler analizi, sınıflandırma analizi ve diskriminant analizinin yaygın olarak kullanıldığını ve bunlarda değişkenler arasındaki ilişkilerin incelenmesinde en etkili istatistiksel yöntemin ana bileşenler analizi olduğunu bildirmişlerdir.

Araştırmacılar, 50X10 boyutlu veri matrisine ana bileşenler analizi uygulayarak elde ettikleri korelasyon matrisinin 10 değişkenin bir sistem içerisinde birbiriyle olan pozitif ve negatif yöndeki korelasyonunu açıkladığını ve korelasyon matrisinde değişkenler arasında görülen bazı özelliklerin daha net bir şekilde açıklığa kavuştuğunu belirtmişlerdir.

Şentürk (1995), küme sayısına karar vermede kullanılan ölçülerden birinin 1971 yılında Marriot tarafından geliştirildiğini ve W , grup içi kareler toplam matrisi olmak üzere $|W|$ ölçütünü küme sayısı ile inceleyerek küme sayısını bulmayı amaçladığını bildirmiştir. Yöntem $M=k^2|W|$ ilişkisine dayanmakta olup en küçük M değerini veren k değeri gerçek küme sayısı olarak ele alınmıştır. Marriot tarafından yapılan çeşitli araştırmalarda küme sayısı ile ilgili kesin bir uygunluk testinin bulunmadığı ve mode analizinin uygulamada en tutarlı sonucu verdiği vurgulanmıştır. Küme sayısının belirlenmesinde diğer bir yaklaşım ise $k \approx (n/2)^{1/2}$ ölçütü olmuştur. Burada k küme sayısını, n ise gözlem sayısını göstermektedir.

Ganesh ve Thangavelu (1995), 50 farklı susam genotipinde genetik uzaklığı araştırmışlardır. Araştırmada her genotipin rastgele örneklenen 5 bitkisinde bitki uzunluğu, bitki başına dal sayısı, ana gövdedeki kapsül sayısı, dallardaki kapsül sayısı, bitki başına toplam kapsül sayısı, kapsül uzunluğu, kapsül başına tohum sayısı ve bitki başına tohum verimi gibi özellikleri incelemişlerdir. Verilerin orijinal ortalama değerleri normallik analizi için transforme edilmiştir. Mümkün olan tüm D^2 değerleri hesaplanmıştır. Analiz sonunda 50 genotip 4 farklı gruba ayrılmıştır. Coğrafik orijini farklı olan susam genotiplerinin aynı grupta yer alabildiğini

göstermişlerdir. Bir coğrafik bölgeden alınan tip, farklı bir kümede yayılış göstermiştir. Buna heterojenlik, popülasyonların genetik farklılığı, önceki seleksiyon çalışmaları ve genel kombinasyon yeteneğinin derecesi gibi bir çok faktör neden olmuştur. Araştırmacılar, coğrafik farklılığın genetik farklılıkla bir ilişkisinin olmadığını bildirmişlerdir.

Royo vd (1995), 18 ülkeden elde ettikleri 299 tane buğday çeşidinde çalışmışlardır. Araştırmada 23 farklı gözlem alınarak çeşitlere ait veriler temel bileşenler analizi ve kümeleme analizi ile değerlendirilmiştir. Veriler önce standardize edilmiş ve daha sonra temel bileşenler analizi uygulanacak veriler arasındaki varyabilite tayin edilmiştir. Daha sonra UPGMC (Unweighted pair-group method of centroid) kullanılarak kümeleme analizi yapılmıştır. Hem kümeleme hem de temel bileşenler analizi gruplar arasındaki farklılığı belirlemede etkili olmuştur.

Tatlıdil (1996), gözlem veya ölçüm yoluyla elde edilen özelliklerin analizinin klasik istatistik teknikleri ile yapılamadığını, değişken adı verilen bu özelliklerin analizinde multivaryete analizi (çok değişkenli analiz) tekniklerinin geliştiğini belirtmiştir. Çok değişkenli analiz adı verilen bu tekniklerin amacının, bilimsel çalışmaların sayı ile ifade edilen sonuçlarının özetlenmesi, yorumlanması ve karar verilirken kullanılmasının sağlanması olduğunu, araştırmacının geçerli ve güvenilir sonuçlar elde etmek için ele aldığı konuyu tüm yönleri ile değerlendirmek zorunda olması nedeni ile çok değişkenli veri ve bunların analizinin gerektiğini açıklamıştır.

Tatlıdil, değişken sayısının çok olması nedeni ile gösterim kolaylığı sağlamak için çoklu değişken analizlerinde vektör ve matrislerden yararlanıldığını belirtmiştir. Standartlaştırılmış veri matrisinin kullanılması durumunda korelasyon matrisinden, aynı şekilde verilerin ölçü birimleri ve varyansları birbirlerine yakınsa kovaryans matrisinden, değilse korelasyon matrisinden yararlanılması gerektiğini tavsiye etmiştir. Genellikle değişkenlerin ölçü birimleri birbirine yakın olmadığı için pratikte standartlaştırılmış değerlerinden oluşan Z_{pxn} standart matrisi kullanıldığını açıklamıştır. Kümeleme analizinin amacının, elde edilen verilere dayanarak birbirine benzer olanları gruplamak olduğunu, bunun için pek çok yöntem

kullanıldığını ancak bunlardan en çok bilinenlerin hiyerarşik (hierarchical) ve hiyerarşik olmayan (non-hierarchical) yöntemler olduğunu belirtmiştir.

Harch vd (1997), farklı ülkelerden toplanan yerfistığını morfolojik özellikleri açısından değerlendirmişlerdir. Araştırmacılar verilerin ortalama ve varyans analizlerinden sonra 9 kantitatif değişkenin normallik testlerini yapmışlardır. Kantitatif verilerin ortalamaları 0 ve varyansları 1 olarak standardize edilmiştir. Standardizasyonun özellikle kantitatif verilere dayanan çok değişkenli analizlerde oldukça önemli olduğunu belirtmişlerdir. Daha sonra temel bileşenler analizi ve kümeleme için Ward metodunu (Hiyerarşik kümeleme) kullanmışlardır.

Beuningen vd (1997), veri özetlemek için veri indirgeme aracı olarak kullandıkları temel bileşenler analizi ile 56 değişken özdeğerleri 0.88'e yakın veya daha yüksek olan 16 bağımsız değişkene indirgemişlerdir. Özellikler arasındaki 56x56 matrisi temel bileşenler analizi için girdi olarak kullanılmıştır. Çalışma sonunda pek çok özellik olgunlaşma süresi ve bitki yüksekliği ile yüksek oranda ilişkili çıkmıştır. Veri setini temel bileşenler skorlarına dönüştürmek dolaylı ekstra ağırlığı gidermiştir. Kümeleme analizi için Temel bileşenler skorları öklit uzaklığı ile değerlendirilmiştir. Araştırmacılar, tüm değişkenlerin kullanıldığı analizde Ward'ın metodunun (Hiyerarşik Kümeleme) küme içi varyansı minimize ettiğini ve çoğu çeşitler için en tatmin edici kümeleme sonucunu verdiğini belirtmişlerdir. Ortaya çıkan dendogram, en farklı grupların tek başlarına kümelenmelerine olanak veren ama pedigree yönünden yüksek derecede ilişkili çeşitleri mümkün olduğunca bir tek grup içinde tutan bir kümeleme analizi olduğu gösterilmiştir. Araştırmacılar, değişkenleri kümeleme analizinde girdi olarak kullanmadan önce bağımsız doğrusal değişken oluşturmak için değişken transformasyonu yapmışlardır.

Jolliffe (1986) eğer matris korelasyon tipinde ise özdeğerlerinin 0.75'e kadar olduğu temel bileşenlerin tutulmasının da önerilebileceğini ifade etmiştir. Araştırmacılar yaptıkları çalışmada yaklaşık kümülatif varyans 0.8 olduğu zaman bu değere denk gelen temel bileşende kesmişlerdir.

Loi vd (1997), İtalya, İspanya, Fransa, Fas ve Yunanistan'dan toplanan 29 *Biserrula pelecinus* L. popülasyonunu 15 morfolojik özelliği ile değerlendirmişlerdir. Kantitatif karakterler temel bileşenler analizi ve k-ortalama kümeleme kullanılarak analiz edilmiştir. Çalışma sonunda multivaryete analizlerinin germplasmin değerlendirilmesinde faydalı olduğu ve *biserrula*'nın değerlendirilmesinde de coğrafik orijini aynı olan popülasyonlar benzer gruplarda yer almıştır.

Escribano vd (1998), 66 tane Amerikan orijinli yerel fasulye çeşitlerinde 14 kantitatif ve 5 kalitatif değişken kullanarak kümeleme analizi ile 11 gruba ayırmışlardır. Bu sonuçlara göre Meso ve Andean Amerikan gruplarından, Andean Amerikan çeşitleri 8 gruba ve Meso Amerikan çeşitleri ise 3 gruba ayrılmıştır.

Tunalı ve Okur'un (1980) yaptıkları çalışmada hesaplanan ana bileşenlerin çok değişkenli sisteme ilişkin toplam bilgiyi açıklama payının, ilgili özdeğerlerle doğru orantılı olduğunu, en büyük özdeğerlere karşılık gelen özvektörler yardımıyla belirlenen düzlemde, noktalar arasındaki ilişkilerin aşağıdaki kural yardımı ile belirlenebildiğini açıklamışlardır;

Veri tabloları oluşturulurken değişkenler üzerinde yapılan ölçümler, değişik ölçü birimlerinde olabilir. Bu nedenle, değişkenler arasındaki uzaklıkların hesabında yanlış yorumlamayı ortadan kaldıracak basit bir dönüşümle, veriler standartlaştırılabilir (Türker ve Türker (1999)).

2.2. DNA İzolasyonu ve RAPD Optimizasyonu

PCR, seçilmiş bir DNA segmentinin çok sayıda kopyasını yapan enzimatik bir metottur. Bu çoğaltma işleminde, iki oligonükleotid, ısıya dayanıklı DNA polimeraz, 4 tane deoksiribonükleosid trifosfat, kalıp DNA ve buffer kullanılır. PCR'ın işleyişi şöyledir; Çift zincirli kalıp DNA ısıtılınca, komplementer zincirleri tutan iyonik bağlar zayıflar ve DNA tek zincirli duruma geçmeye başlar. Bu olaya "denatürasyon" denir. Genellikle 94 °C sıcaklık uygulanır. "Denatürasyon"un ardından yavaş yavaş soğutulur. Bu esnada oligonükleotidler tek zincirli DNA'daki komplementeri olan bölgeye bağlanır. DNA sentezi bu noktada başlar. Primer

yapışması "annealing" denilen bu aşamada, primer tek zincirli DNA'nın 3' ucundan bağlanır. Oligonükleotidlere primer adı verilir. Çünkü DNA sentezini hazırlar. Primerin iyonik bağlanmasında kullanılan sıcaklık değeri Tm olarak adlandırılır. Uzun primerlerde veya GC içeriği fazla olanlarda Tm yüksek olur. Tm şu şekilde hesaplanır:

$$T_m = 4x(GC) + 2x(AT) - 5$$

Bundan sonra ısı yükseltilir. Bu aşamada enzim, hedef DNA parçasının sentezini yapar. Bu safha uzama "extension" adını alır. DNA polimeraz senteze, çift zincirin 3' ucundan başlar ve yeni DNA 5'-3' yönünde sentezlenir. Taq polimeraz 72 °C sıcaklıkta iyi çalışır ve bu sıcaklık derecesi de uzama için seçilir. Isıtma ve soğutma işlemleri pek çok kez tekrarlanarak spesifik bölgenin çok sayıda kopyası elde edilir (Maniatis vd 1982).

Dellaporta vd (1985), bitki DNA izolasyonunda sorun olan protein ve polisakkaritlerin "potasium dodecyl acetat" kullanarak, 0 °C'de nükleik asitlerden uzaklaştırılabildiğini bildirmişlerdir.

Williams vd (1990), insan, *Glycine max* varyete Bonus, *Glycine soja* PI81762 ve bu iki ebeveynin 72 tane F₂ bireylerinde, *Zea mays* CM37 ve I232, *Neurospora crassa* ile bakteriyel DNA örnekleri kullanmışlardır. Amplifikasyon reaksiyon hacmi 25 µl olup 10mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, % 0.001 gelatin, 200 µM primer 25 ng genomik DNA ve 0.5 ünite Taq pol. içermektedir. Amplifikasyon, Perkin Elmer Cetus DNA Thermal Cycler ile 45 döngü olarak 1 dk 94 °C, 1 dk 36 °C, 2 dk 72 °C'de yapılmıştır. Amplifikasyon ürünleri % 1.4 agaroz jel elektroforesisde analiz edilerek ethidium bromid ile boyanmıştır. Reaksiyonda 9-10 nükleotid uzunluğunda % 50-80 G+C kompozisyonlu ve palindromik sekans içermeyen primerler kullanılmıştır. Belirlenebilir düzeyde amplifiye olmuş ürünlerin çoğaltılması için en az % 50 GC içerikli primerlere ihtiyaç olduğu bildirilmiştir. Araştırmacılar, genomik DNA'nın veya enzim konsantrasyonunun azalması halinde jel üzerinde ayrı ayrı büyüklükteki bantların üstlerinin kaplanmasına yani smeare neden olduğunu bildirmişlerdir. RAPD prosedüründe ele alınan her örnekte pek çok DNA segmenti amplifiye olmakta ve bu fragmentlerin bir çoğu alınan bir türün iki bireyinden birinde oluşurken diğerinde oluşmayabilmektedir. İnsan genomunda yapılan çalışmada bir örnekte 1.4 kb'lik DNA segmenti amplifiye olurken diğer

örnekte amplifikasyon olmamıştır. Elde edilen bantlar genomik DNA'dan amplifiye olmaktadır. Genomik DNA ilave edilmeden her primer için kontrol reaksiyonları hazırlandığı zaman hiç bir amplifikasyon ürününün oluşmaması kontrol ortamında, primerin kendinden kaynaklanan amplifikasyonun oluşmadığını kanıtlar. Bu sonuçlarla rastgele sekanslı tek primerlerin *E. coli* gibi küçük genomların amplifikasyonu dahil genomik DNA segmentlerinin oluşmasına ve farklı bireylerin amplifikasyon ürünleri arasında polimorfizmin belirlenebileceğini göstermiştir.

Palumbi vd (1991) tarafından RAPD optimizasyonunda DNA, $MgCl_2$ konsantrasyonunun önemli olduğunu, yüksek DNA ve $MgCl_2$ konsantrasyonunda PCR ürünlerinde smear oluştuğunu bildirmişlerdir.

Bell ve DeMarini (1991), yüksek moleküler ağırlıklı fragmentlerin Agaroz jelde ethidium bromid ile boyanması durumunda smear gibi görüldüğünü bildirmişlerdir. Oligonükleotid primerlerinin pek çoğu PCR ürünlerine dönüştüğü zaman bu ürünlerin 3' OH uçları genomik DNA'ya veya kendi kendilerine bağlanır. Bu moleküllerin uzama ve rastgele sonuçlanması muhtemelen smeare neden olur. Oluşan smear, primer/DNA konsantrasyonunun veya PCR döngü sayısının değiştirilmesi ile önlenabilir.

Klein-Lankhorst vd (1991), domateste polimorfik RAPD markerlerinin haritalanması ve belirlenmesi için yapılan çalışmada 11 primer kullanmışlardır. Her primer genom-spesifik amplifikasyonu idare etmektedir. Bireyler arasındaki benzerliğin primerler arasındaki sekans pozisyonuna dayandığını, örneğin iki primer arasındaki farklılığın 5' uçtaki A'nın T'e dönüşümü olması durumunda % 100 bağlanma olmadığını belirtmişlerdir. RAPD sonuçları tek primer yerine primerlerin kombinasyonlarının kullanılması durumunda değişmiştir. İki primerin kombinasyonunda her primer ayrı ayrı kullanıldığında görülmeyen yeni amplifiye olmuş DNA fragmentlerinin ortaya çıktığını bildirmişlerdir.

Devos ve Gale (1992), buğdayda genetik marker sistemi olarak RAPD markerlerinin kullanımını değerlendirmişlerdir. RAPD prosedürüne DNA, Mg^{+2} , Taq polimeraz konsantrasyonu ve "denatürasyon" sıcaklığının etkili olduğunu bildirmişlerdir. RAPD

ünlerinin dominant davranışının buğdayda linkage haritalarının oluşturulması için genetik marker olarak kullanımını sınırladığını, bununla birlikte genotiplerin analizinde tekrarlanılabileceğini açıklamışlardır. DNA konsantrasyonunu belirlemek için reaksiyon karışımında 0.1-100 ng arasında DNA miktarları denenmiştir. Tüm reaksiyonların 4 kez tekrarlandığı denemede sadece 10-20 ng DNA, 200 nM primer konsantrasyonu tekrarlanabilen güvenilir bantlar vermiştir. Araştırmacılar, DNA miktarının düşük olması durumunda farklı ürünlerde bantlar oluştuğunu, konsantrasyonun artması durumunda ise spesifik olmayan amplifikasyonlarla sonuçlandığını bildirmişlerdir. Mg^{+2} konsantrasyonunun optimizasyonu için Mg^{+2} , reaksiyon tamponuna 1.5 mM, 2 mM, 2.5 mM, 3 mM konsantrasyonlarında ilave edilmiştir. Spesifik ve tekrarlanan sonuçlar sadece 1.5 mM Mg^{+2} konsantrasyonunda elde edilmiştir. Bununla birlikte DNA miktarının reaksiyon karışımında 10 ng 'dan 5 ng'a düşürülmesi ve Mg^{+2} konsantrasyonundaki artışın yeni ve/veya kaybolan bantlara neden olduğu belirlenmiştir. Taq DNA Polimeraz konsantrasyonu optimizasyonunda, konsantrasyonun artışı bant sayısının artışına neden olmuştur. Araştırmacılar 0.8 U/50 µl enzimin reaksiyon ortamında en spesifik ve güvenilir bantlar oluşturduğunu, enzim konsantrasyonunun artışında ise küçük bantların kaybolduğunu belirtmişlerdir. "Annealing" ve "denatürasyon" sıcaklığının belirlenmesinde, "annealing" için 36 °C uygun olmasına rağmen, araştırmacılar minimum 40 °C'ye kadar düşürmüştür. 42 °C'ye kadar bağlanma reaksiyonlarının korunduğu belirlenmiştir. PCR makinelerinde bloklar arasındaki 2 °C'lik olan sıcaklık farklılıklarının RAPD prosedürü üzerine etkisi önemsiz olmuştur. "denatürasyon" sıcaklığında, 94 °C olan sıcaklığın 90 °C'ye düşürülmesi halinde büyük bantlar kaybolmuş ve küçük bantlar oluşmuştur. Primer konsantrasyonu optimizasyonunda, 50 ng DNA konsantrasyonunda kullanılan bir primer ile hem spesifik hem de spesifik olmayan amplifikasyon ürünlerinin oluştuğu, başka bir primerle yapılan PCR sonucu ise yüksek molekül ağırlıklı smear oluştuğu bildirilmiştir. Bu çalışmada 100 nM/10-20 ng primer/DNA oranı kullanılmıştır. Tüm primerler tam olarak iyi sonuç vermemiştir. Tahminen uygun primer bölgelerinin azlığı, buğdayda zayıf amplifikasyona neden olmuştur.

Skroch vd (1992), iki genotipin RAPD markerleri ile karşılaştırmanın, her genotip için RAPD markerlerinin var olduğu (1) veya olmadığına (0) göre yapıldığını ve marker

amplifikasyonlarının varlığı veya yokluğu için genotip karşılaştırması yapılırken sonuçların karşılaştırma türüne göre değişebildiğini bildirmişlerdir. Her iki genotipte de RAPD markerinin varlığı bu lokusta yüksek düzeyde sekans homolojisinin olduğuna işaret eder. Bir genotipte var olup da diğerinde olmaması durumunda, sekans farkı olduğu kesindir. Üçüncü bir farklılık her iki genotipte de amplifikasyon olmamasıdır. Bu sonuç, sekans homolojisi hakkında hiçbir şey söylemez. Amplifikasyon yokluğu gösteren genotip için rastgele lokuslarda yüksek düzeyde sekans bilgisi vardır. Böylece amplifikasyon yokluğu (0,0) karşılaştırmaları homoloji tablosudur ve (1,1) karşılaştırmalarına neredeyse eşdeğer bilgi sağlar. Bütün karşılaştırmaların geçerli olması, bütün olasılık tablo sınıflarını kullanan basit bir eşleme katsayısının, genetik uzaklık (GD) için uygun bir tahminleyici olduğuna işaret eder. Böylece genetik uzaklık farklarının toplam karşılaştırmaların sayısına bölünmesi ile tahmin edilebilir; $GD = (A+D) / (A+B+C+D)$. RAPD marker analizi ile bulunan genetik uzaklık her birinin 2 olası sonucu (benzerlik veya farklılık) olan bir dizi karşılaştırmaların sonucudur. GD'yi farkların toplam karşılaştırma sayısına oranı olarak tanımlanırsa her sonuç, farklılık için 1, benzerlik için 0 değeri verilerek, bu gözlemler setinin sayısal ortalamasına eşittir.

	A	B	$ A-B $	$GD(A,B) = \frac{\sum A_i - B_i }{10} = 0.50$
1	1	0	1	
2	0	1	1	
3	1	1	0	
4	0	0	0	
5	0	0	0	
6	1	0	1	
7	1	1	0	
8	1	1	0	
9	0	1	1	
10	1	0	1	

Her genotip çiftinin GD'si test edilen bütün marker lokuslarındaki benzerlik veya farklılık değerlerinin ortalaması olarak yeniden tanımlanmış olur. Herhangi bir RAPD veri seti için her genetik uzaklığın varyasyon ve standart hatası kolayca hesaplanabilir. Yukarıda tanımlanan GD'nin tahmini varyansı, örnek varyansı için kullanılan formül ile hesaplanabilir. Bu

rapıldığında n RAPD bant bazında bir genetik uzaklık (d)'nin varyans ve standart hataları şöyle formüle edilebilir:

$$\text{varyans}(d) = nd(1-d)/(n-1)$$

$$\text{tahminlenmiş standart hata} = [\text{var}(d)/n]^{1/2}$$

Araştırmacıların veriler hakkındaki en önemli kaygılarından biri sonuçların tekrarlanabilmesidir. Belli bir RAPD veri setinin germplasmin organize ediş şeklinin tekrarlanabilirliğidir. GD'ler arasındaki farklılığın test edilmesi ile ölçülebilir. Çünkü genotiplerin diğer genotiplere oranla lokasyonunu belirleyen göreceli genetik uzaklıktır

Weeden vd (1992), farklı primer konsantrasyonlarının farklı sayıda bant oluşumuna neden olduğunu bildirmişlerdir. Düşük primer konsantrasyonu büyük fragmentleri (1500-3000 bp) çoğaltma eğiliminde iken, primer konsantrasyonunun artması ile bu fragmentler kaybolmakta ve yerlerini daha küçük (200-400 bp) fragmentlere bırakmaktadır.

Pikaart ve Villeponteau (1993), genomik DNA'da bulunan RNA kontaminasyonunun PCR amplifikasyonunu önlediğini bildirmişlerdir.

Koller vd (1993), elmadan DNA'yı Dellaporta yönteminde modifikasyon yaparak izole etmişlerdir. Modifikasyon RNase uygulamasından sonra 1 hacim kloroform-isoamilalkol (24:1) eklenerek 6500 rpm'de 10 dk santrifüj yapılarak gerçekleştirilmiştir. Oluşan üstteki sıvı faz yeni bir tüpe alınmış ve 5 M NaCl ilâve edilmiştir. 2 hacim soğuk etanol eklenmiş, karıştırılmış ve 30 dk 4 °C'de bekletilmiştir. Santrifüjden sonra oluşan DNA peleti % 70'lik etanolde yıkandıktan sonra kurutulmuş ve TE içinde çözülmüştür.

Pammi vd (1994), sorgumda tekrarlanabilir RAPD markerlerinin amplifikasyonu için primer, DNA miktarı, Taq polimeraz, MgCl₂ ve "annealing" sıcaklığını test etmişlerdir. Araştırmacılar primerin artan veya azalan konsantrasyonlarının amplifiye olan ürünlerin verimini azalttığını ve optimum 3-6 µM primerin reaksiyonda yeterli olduğunu bulmuşlardır. DNA'nın ise yüksek konsantrasyonları dışında amplifiye olmuş ürünlerin profili ve veriminde

bir etkisi olmamıştır. Taq polimerazın 0.19 ve 3.04 ünite kadar olan etkisinde ise ancak 15 µl'lik reaksiyon karışımında 0.38 U enzimin iyi sonuçlar verdiği tespit edilmiştir. "Annealing" sıcaklığının 36 °C'de iken az amplifikasyon belirlenirken, 48 °C'de optimum sonuçlar alınmıştır. 48 °C'nin üstünde ise amplifikasyon ürünlerinde önemli bir azalma kaydedilmiştir. Araştırmacılar MgCl₂'ün düşük ve yüksek konsantrasyonunun amplifiye olmuş DNA oluşumunu azalttığını ve optimum 2.5 mM MgCl₂'in iyi sonuçlar verdiği bulunmuştur. En son olarak PCR döngüleri analiz edilmiştir. 25 ve 30 döngü arasında hızlı bir amplifikasyonun, 30 ve 35 döngü arasında ise daha düşük amplifikasyon olduğu bildirilmiştir.

Riede vd (1994), RAPD markerlerine dayanarak yaptıkları çalışmalarda, bazı türlerde primerlerin spesifik olmayan bağlanmalar yaptığını ve bunun jelde DNA'nın smearli görülmesine neden olduğunu bildirmişlerdir. Yapılan bu çalışmada spesifik olmayan bağlanmalar, kalıp DNA'nın, restriksiyon endonükleaz ile kesilmesiyle engellenmiştir.

Pancholi (1995), RAPD'in en büyük avantajının hedef DNA dizilerinin önceden bilinmesine ihtiyaç olmadığını fakat kalıp DNA'nın konsantrasyonunun başarısı için çok kritik bir faktör olduğunu belirtmiştir. Kalıp DNA'nın kalitesi amplifiye olmuş ürünlerin çoğaltılması ve güvenilirliğinde etkilidir. Güvenilir bir DNA replikasyonu için Taq polimerazın önemli olduğunu ve magnezyuma bir divalent katyon kaynağı olarak ihtiyaç duyduğunu bildirmiştir. Optimal Mg⁺² konsantrasyonunun her PCR tekniği için yapılması gerektiğini, çok az Mg⁺² konsantrasyonunda amplifikasyon verimi azalırken çok yüksek miktarda ise spesifik olmayan bağlanmalara neden olduğunu göstermiştir.

Strand vd (1996), amplifiye olmuş DNA fragmentlerinin sayısının genomik DNA ile primere dayandığını bildirmişlerdir. RAPD reaksiyonunda kullanılacak olan primerlerin kalıp DNA ile etkili olarak hibridize olması gerektiğini belirtmişlerdir.

Parani vd (1997), susamda uyguladıkları RAPD, 25 µl'lik reaksiyon tüplerinde yapmışlardır. PCR reaksiyon karışımında 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, % 0.001 gelatin, 100 µM dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 15 ng primer, 30-40 ng genomik DNA ve 0.5 µl

Taq DNA polimeraz yer almıştır. Amplifikasyon koşulları 94 °C'de 3 dk 1 döngü ardından 94 °C'de 1 dk. "denatürasyon", 40 °C'de 1 dk yapışma "annealing", 72 °C'de 2 dk uzama "extension" olmak üzere 45 döngüde gerçekleşmiştir. Reaksiyon karışımı 72 °C'de 10 dk bekletildikten sonra 4 °C'de saklanmıştır. Amplifikasyon ürünleri % 1.3'lük agaroz jelde yürütülmüştür.

Pessino vd (1997), mısırdaki DNA izolasyonu için Dellaporta vd yöntemini modifiye ederek kullanmışlardır. Araştırmacılar, 6 gr bitki yaprağını sıvı nitrojende dondurduktan sonra un haline getirmişlerdir. Daha sonra 15 ml ekstraksiyon buffer (100 mM Tris-HCl, pH 7.5, 50 mM EDTA, pH 8.0, 500 mM NaCl, % 2 SDS, % 1 polyvinyl-pyrrolidone) ekledikleri karışımı 68 °C'de 20 dk inkübe etmişlerdir. İnkübasyon sonrası 5 M 4 ml potasyum asetat eklenen örnekler 1-2 saat buzda bekletilmiştir. Buzdan alınan örnekler 20 dk 11 000 rpm'de 4 °C'de santrifüj yapılmıştır. Süpernatant alınmış ve soğuk isopropanol (25 ml) eklenerek 1 gece -20 °C'de inkübe edilmiştir. Oluşan pelet TE içinde süspanse edilmiş ve 50 µg/ml RNAz ilave edilerek oda sıcaklığında bekletilmiştir. Örnekler etanol presipitasyonu yapıldıktan sonra 15000 rpm'de 15 dk santrifüj yapılmış, oluşan peletler % 70'lik etanolde yıkandıktan sonra kurutulmuş ve TE içinde çözölmüştür.

Lange vd (1998), marker destekli ıslahat, PCR amplifikasyonu için bitki DNA izolasyonunun çok önemli olduğunu, bir çok DNA izolasyon yönteminin çok zaman alıcı veya pek çok örneğin birlikte yapılmasının zorluğundan dolayı Dellaporta vd 'lerinin kullandıkları DNA izolasyon yönteminin kullanılabilirliğini araştırmışlardır. Araştırmacılar yaptıkları çalışmada, tek kişinin bir günde 96 soya bireyinden izolasyon yapabildiğini ve bu DNA örneklerinin PCR'a dayanan RAPD, SSR, AFLP analizlerine uygun olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmada kullanılan bitkiler serada yetiştirilmiş ve çok genç yapraklar izolasyon için kullanılmıştır.

Boiteux vd (1999), bitki dokularından yüksek moleküler ağırlıklı DNA'nın eldesinin moleküler genetik ve uygulamalı bitki ıslahında kullanılan birçok prosedür için gerekli olduğunu ve DNA veriminin, parmak izi ve linkage haritalaması çalışmalarında önemli bir

aktör olduğunu açıklamışlardır. Bitki dokularından temiz genomik DNA'nın ekstraksiyonu kompleks karbonhidrat kompozisyonlu sert hücre duvarlarından dolayı oldukça zordur. Bitki DNA eldesinde polisakkarit kompozisyonu en büyük problemdir. Polisakkaritlerin bazı sınıfları polimeraz, ligaz ve restriksiyon endonükleaz aktivitesini azaltır. Bu nedenle negatif polimorfik bantlar belirlenmiştir. PCR'a dayanan parmak izi çıkarılmasında polisakkarit veya diğer DNA'ya bağlı maddelerden dolayı bireyler arasındaki genetik farklılığın hatalı yorumlanmasına neden olmuştur. Araştırmacılar, DNA'nın eldesinde fenolik moleküllerin varlığının birçok enzimatik sistem üzerinde inhibitör etkisinin bulunduğu ifade edilmiştir. Araştırmacılar 7 farklı DNA ekstraksiyon yöntemi kullanmışlardır. Bu yöntemlerden biride Dellaporta metodu olup bu yöntemle elde edilen DNA'lar diğer ekstraksiyon yöntemlerinden daha uzun sürede (3-3.5 saat) elde edilebilmesine karşın tohum, kök gibi problemli dokulardaki DNA izolasyonunda oldukça etkili olmuştur.

Steen (1999), primer optimizasyonunda uygun primerin belirgin ve oldukça parlak bant verdiğini ancak primer optimizasyonunda önce kalıp DNA miktarının optimize edilmesi gerektiğini bildirmiştir.

Li ve Midmore (1999), polisakkaritlerin enzimi inhibe ederek DNA amplifikasyonunda engellemeye neden olabileceğini ve bu nedenle izole ettikleri DNA örneklerini 1M NaCl ile resipite ederek RAPD reaksiyonunda da BSA kullanılmasının bu engellemeyi ortadan kaldırabileceğini bildirmişlerdir.

2.3. RAPD Tekniği İle İlgili Çalışmalar

Demeke vd (1992), *Brassica*, *Sinapis* ve *Raphanus* taxalarının taksonomik gruplandırılmaları için RAPD markerlerinin kullanımını araştırmışlardır. Diploid ve amfidiploid *Brassica* taksaları arasındaki ilişki 284 RAPD bantının değeriendirilmesi ile açığa çıkarılmıştır. *Raphanus sativus* ve *Sinapis alba*, *Brassica* taxalarından farklı olmuştur. Bu sonuç, genetik ilişkinin yeterli olarak tanımlanabilmesi için en az 10 primerden elde edilecek olan 100 banta ihtiyaç olduğunu göstermiştir. Yapılan bu çalışma sonunda popülasyonlardan türlere kadar taksonomik çalışmalarda RAPD'in faydalı bir araç olduğu bildirilmiştir.

Thormann ve Osborn (1992), RAPD ve RFLP markerlerini, *Brassica* türleri arasındaki genetik ilişkinin karşılaştırılmasında kullanmalarına rağmen, türler içinde hiçbir farklılığın ortaya çıkmadığını belirlemişlerdir.

Heun ve Helentjaris (1993), RAPD markerlerini, 16 F1 mısır hibrit ve 5 kendilenmiş ebeveyni içeren materyalin analizinde kullanmışlardır. 21 primer kullanılarak 141 farklı fragment hesaplanmıştır. 21 genotipin hepsi alındığında, bu fragmentlerin % 20.7'si polimorfik olmayan, % 37.1'i belirgin polimorfik ve % 42.1'i kantitatif olarak polimorfik bulunmuştur. Belirgin polimorfizm kendilenmiş genotiplerde bulunan spesifik fragmentlerin varlığı veya yokluğu ile ayırt edilirken, kantitatif polimorfizm bir fragmentin yoğunluğundaki varyasyon ile belirlenmiştir. F1 döllerinde belirgin polimorfizm durumunda % 95.2'si ebeveynsel fragmentin varlığından dolayı tam dominansi olduğu varsayılarak genetik olarak yorumlandığını ve F1 döllerinin % 3.2'sinin ise iki ebeveyn arasında bir fragment yoğunluğu gösterdiğini (kısmi dominans) bildirmişlerdir. Sayısal polimorfizmlerde tam dominans için % 88.1 ve kısmi dominans için % 5 değeri elde edilmiştir. Araştırmacılar, bu sonuçlarla RAPD analizinin bazı uygulamalar için daha ihtiyatlı kullanılabileceğini işaret etmişlerdir.

Cantrell ve Davis (1993), uygun genetik popülasyonların yokluğunun pamukta ekonomik öneme sahip kantitatif özelliklerin genetik haritalanmasını engellendiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar bu nedenle 10 farklı *Gossypium barbadense* x *G. hirsutum* popülasyonlarından 25

homozigot bireyde RAPD markerleri ile filogenetik ilişkiyi belirlemek için analiz yapmışlardır. 100 tane primer ıslah hatları arasındaki genetik ilişkiyi belirlemede değerlendirilmiştir.

Tao vd (1993), RAPD ve RFLP markerlerini *Sorghum bicolor*'un DNA polimorfizm frekansının belirlenmesinde kullanmışlardır. 36 bireyde, 29 primer RAPD markerlerinin çoğaltılmasında kullanılarak oluşan toplam 262 DNA fragmentinin 145 tanesi polimorfik olmuştur. RFLP için toplam 27 genotipte mısır, arpa ve buğdaydan orijin alan 11 tane problema polimorfizm taranmıştır. Bu DNA problemlerinin hepsi tek veya az sayıda bant oluşturmuştur. Çalışma sonunda, RAPD ve RFLP markerleri tarafından belirlenen DNA polimorfizm frekansı benzer olarak bulunmuştur.

Kazan vd (1993), *Stylosanthes* cinsine ait agronomik önemi olan dört tür ve 20 çeşidi RAPD markerleri ile değerlendirilmiştir. Yaklaşık 200 fragment 22 primerden elde edilmiştir. Her tür içinde düşük düzeyde (% 16) polimorfizm bulunurken türler arasında polimorfizm daha yüksek (% 46) bulunmuştur. Benzer çeşitlerin bireyleri arasında ise çok az (% 2) polimorfizm belirlenmiştir. Araştırmacılar, amplifikasyon parametreleri arasında Mg^{+2} iyon konsantrasyonunun çok önemli olduğunu, düşük Mg^{+2} iyon konsantrasyonlarında (2 mM) fragment sayısının azaldığını veya hiç fragment oluşmadığını bildirmişlerdir. Bununla birlikte yüksek Mg^{+2} konsantrasyonunda (4 mM) ise bant sayısında artış görülmüştür.

Joshi ve Nguyen (1993), buğday varyeteleri arasındaki genetik farklılığın RAPD markerleri ile belirlenmesini araştırmışlardır. Kullanılan 40 tane primerin % 80'i iyi sonuç vermiştir. 109 amplifiye olmuş fragmentin 71 tanesi polimorfiktir. Bu sonuçlar bir dendogramda incelenerek, akrabalık ve kışlık buğdayların pek çoğu kendi gruplarında değerlendirilmiştir.

Koller vd (1993), 11 elma çeşidinde genetik farklılığı RAPD kullanarak tespit etmişlerdir. 10 primer kullanarak yeterli genetik varyasyon belirlenmiştir. Bununla birlikte elmada dar bir genetik havuzun bulunması ve birçok çeşit arasında çok yakın ilişkinin bulunması tam farklılık karakterizasyonun sağlanması için daha çok sayıda çoğaltılmış ek markerlere ihtiyaç olduğunu açıklamışlardır.

Çobanoğlu (1994), *Hordeum vulgare*, *H. murinum*, *H. bulbosum* ve *H. vulgare spontaneum* türlerine ait 23 yabancı arpa hattı arasındaki genetik farklılığı RAPD markerlerini kullanarak belirlemiştir. Yapılan değerlendirme sonucu yabancı arpa hatları arasındaki polimorfizm oranı %1-58 arasında bulunmuştur. En yüksek polimorfizm değeri 48883 nolu arpa hattı olan *H. murinum* ile 50327 nolu arpa hattı olan *H. bulbosum* arasında % 58 olarak tespit edilmiştir.

Vierling vd (1994), seçilmiş *Sorghum* hatlarında RFLP ve RAPD markerlerinin genetik farklılığı belirlemedeki rollerini araştırmışlardır. Polimorfizm, RFLP probunun % 61 ile ve RAPD primerlerinde % 77'si ile belirlenmiştir. RFLP profilinde 574 toplam bantın 290 tanesi (% 51) polimorftir. RAPD prosedüründe ise kullanılan 73 primerin amplifikasyona neden olan 70 tanesi içinden ancak 5 tanesi polimorfik ürün oluşturmuştur. 194 amplifikasyon ürününün 177'si (% 91) polimorftir. Sadece bir primer polimorfik tek bant profili diğer 55 primer çoklu bant profili oluşturmuştur. RAPD bant sayısı 2-10 arasında değişmiştir ve ortalama 3.5 olmuştur.

Rowland ve Levi (1994), Yaban mersininde yaptıkları çalışmada, kış dormansisi ve soğuğa dayanıklılığı kontrol eden genlerin bağlı bulunduğu RAPD markerlerini belirlemişlerdir. Böylece moleküler markerlere dayalı haritaların eldesinin meyve kalitesi, meyve büyüklüğü, bitki hastalığına dayanıklılık, çeşitli çevre şartlarına tolerans gibi özellikleri kontrol eden genlerin yerini belirlemeyi kolaylaştıracağı bildirilmiştir.

Jain vd (1994), rastgele seçilen 6 primer ve bunların kombinasyonlarını kullanarak 12 Hindistan ve 11 ekzotik *Brassica juncea* genotipleri arasındaki genetik ilişkiyi araştırmışlardır. Tüm genotipte 595 amplifikasyon ürününden 500 tanesi polimorfik olarak belirlenmiştir. Hindistan genotipleri arasında düşük düzeyde genetik varyabilite belirlenirken ekzotik olanlar arasında oldukça fazla polimorfizm bulunmuştur. Amplifikasyon ürünlerinin ikili karşılaştırmasına dayanan genetik benzerlik UPGMA kullanılarak hesaplanmıştır. Araştırmacılar RAPD markerleri aracılığı ile 24 tane *B. juncea* genotipi ve bu genotiplerin ilişkisini belirlemişler ve bunlar arasında melezleme ile oluşturulan hibritlerin performansının değerlendirilebileceğini bildirmişlerdir.

Dunemann vd (1994), 27 elma çeşidinde ve bunların 18 yabani türünde taksonomik çalışmalar için RAPD markerlerinin kullanımını araştırmışlardır. 29 tane decamer primer kullanılmıştır. Fragmentlerin polimorfik amplifikasyonun ve genetik benzerliğin tahmini yaklaşık 50 polimorfik RAPD bantına dayanarak hesaplanmıştır. UPGMA ile kümeleme analizi yapılmıştır. Bu çalışma sonunda yabani türlerle yapılan melezlemeden elde edilen elma türlerinde RAPD markerleri ile genom haritalamasının yapılabileceği gösterilmiştir.

Halldén vd (1994), üç tane *Brassica napus* ıslah hattında RFLP ve RAPD markerlerinin genetik ilişkiyi belirlemedeki yetenekleri değerlendirilmiştir. 50 RFLP ve 92 RAPD markerleri kullanılarak hatlar arasındaki ilişki belirlenmiştir. Toplam RFLP'de 500'den fazla ve RAPD'de 100'den fazla bant ortaya çıkmıştır. RFLP ve RAPD markerleri üç hat arasında aynı benzer ilişkiyi göstermiştir. Bootstrap analizi kullanılarak yaklaşık 30 prob veya primerin genetik ilişkiyi belirlemede yeterli olduğu gösterilmiştir. *Brassica napus* genotiplerinde, RAPD markerlerinin RFLP markerleri kadar güçlü etkiye sahip olduğu bildirilmiştir. Araştırmacılar, RAPD markerlerinin kullanımının kolay ve hızlı olmasının, hatlar arasındaki ilişkinin belirlenmesinde tercih edilebilecek bir uygulama olduğunu belirtmişlerdir.

Yu ve Nguyen (1994), 9 upland ve 4 lowland çeltik çeşitlerinin genetik varyasyonunu DNA düzeyinde RAPD kullanarak araştırmışlardır. 42 rastgele seçilmiş primer, DNA segmentlerinin amplifikasyonunda kullanılmıştır. Belirlenen 260 PCR ürününün % 80'i polimorfik olmuştur. Kullanılan 42 primer 1-4 arasında büyük bant oluşturmuştur. Sadece 2 primer polimorfizm göstermemiştir. Genelde *japonika* ve *indica* türleri arasında yüksek düzeyde polimorfizm bulunmuştur. Fakat *India* alttürü içindeki lowland ve upland çeşitleri arasında daha az polimorfizm bulunmuştur. Elde edilen RAPD sonuçları izozim analizi ile benzer sonuçları vermiştir.

Gidoni vd (1994), doğru ve hızlı olarak çeşitlerin belirlenmesinin ıslah çalışmalarında oldukça önemli olduğunu, özellikle vegetatif olarak çoğalan bitkilerde bunun ayrı bir anlam taşıdığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar, RAPD markerleri ile *Fragaria ananassa* Dutch 'da

çeşit spesifik markerlerin geliştirilmesini araştırdıkları çalışmada, 41 primer kullanılmışlar her primer 4-12 arasında amplifiye edilmiş DNA ürünleri oluşturmuştur.

Transue vd (1994), morfolojik karakterleri bakımından varyasyon gösteren 3 tane *Amaranthus* türünün genetik kaynaklarının doğru olarak sınıflandırılmasında RAPD markerlerini değerlendirmişlerdir. Araştırmacılar tür tanımlanması için, *Amaranthus* türlerinde RAPD markerleri ve bulk segregant analizinden yararlanmışlardır. Bulk segregant analizi, DNA örnekleri karıştırıldığı zaman karıştırılmış örnek içindeki bireylerde yaygın olan fakat, diğer karışmış örneklerin bireyleri arasında bulunmayan polimorfik markerlerin ortaya çıkacakları önermesi üzerine yapılmıştır. Bu metot, önceden genetik haritalama yapılmadan agronomik önemi olan allellere bağlı olarak RAPD markerlerinin tanımlanması için etkili olmuştur.

Novy vd (1994), RAPD markerlerini kullanarak yaptıkları çalışmada 22 tane *Vaccinium macrocarpon* varyetesini tanımlamışlardır. Çalışmada 22 primer kullanarak amplifiye ettikleri 162 DNA fragmentinin 66 tanesi polimorfik olmuştur. Tekrarlanabilen polimorfik RAPD bantlarının varlığı (1) veya yokluğuna (0) göre değerlendirme yapılmıştır. Elde edilen spesifik RAPD markerlerinin coğrafik orijinine göre farklılıkları belirlediği bildirilmiştir.

Liu vd (1995), *Paspalum vaginatum*'un 46 ekotipi arasındaki polimorfizmi belirlemek amacıyla SSR analizini kullanmışlardır. Araştırmacılar 1994 yılında *Paspalum vaginatum*'un 46 ekotipindeki genetik varyasyonu RAPD kullanarak da araştırmışlardır. Ekotipler arasındaki genetik ilişkinin belirlenmesinde SSR analizi ile elde edilen sonuçlar RAPD analizi ile elde edilen sonuçlarla benzer olmuştur. Araştırmacılar RAPD analizinin fazla masraflı olmadığını, sekans bilgisine gereksinim olmadığı için daha kısa sürede yapıldığını ve RAPD fragmentlerinin agaros jelde kolaylıkla ayrılabilmesini buna karşılık SSR analizinde sekans bilgisine ihtiyaç olduğu, agaros jelde ayrılmalarının güç olduğunu bildirmişlerdir.

Mouzeyar vd (1995), RFLP ve RAPD moleküler markerleri kullanarak ayçiçeğinde mildiyö hastalığına dayanıklılığı temsil eden P/1 lokusuna bağlı markerleri bulk segregant analizi ile belirlemişlerdir. Downy mildew'e dayanıklı ve hassas hatlar arasında yapılan melezlemeden elde

Elde edilen F₂ döllerinden 135 bitkide 2 RFLP ve 1 RAPD markerinin P/1 lokusu ile bağlı olduğunu bildirmişlerdir.

Sharma vd (1995), kültürü yapılan 6 farklı *Lens* taxası ve bunların yabani formları arasındaki benzerliği RAPD markerleri kullanılarak belirlemişlerdir. Rastgele seçilen 10 bazlık 4 primer kolaylıkla ve oldukça parlak amplifikasyon ürünlerinin ortaya çıkmasına neden olmuştur. *Lens* taxaları arasında ve içindeki varyasyonu 54 bireyde toplam 88 polimorfik bant belirlemiştir. Elde edilen veriler kültürü yapılan mercimek ile spp.*orientalis*'in oldukça benzer olduğunu göstermiştir. *L. ervoides* kendini takip eden yabani form *L. nigricans* ile farklı bulunmuş, diğer var. *macrosperma* ve var. *microsperma* spp benzerliği *orientalis* ve kültürü yapılan mercimek ile aynı önemde olduğu belirlenmiştir. Bu çalışma, RAPD kullanılarak yabani ve kültürü yapılan mercimekler arasındaki genetik uzaklığın analiz edilebileceğini göstermiştir.

Gözükırmızı vd (1995), *Hordeum vulgare* cv. Zafer 160 bitkisi *in vitro* rejenerasyonu sonucu oluşan sürgünlerde kromozom varyasyonları incelenmiş ve gen mutasyonlarının RAPD yöntemi ile araştırılabileceği gösterilmiştir. Çalışmada RAPD markerleri kullanılarak arpa melezlerinin tanısı da yapılmıştır. Yabani hat ile *Hordeum vulgare*'nin Kaya, Tokak, Yerçil ve Cumhuriyet varyetelerinin melezlenmesinden elde edilen F₁'ler RAPD ile incelenerek melezler belirlenmiştir.

Yamagishi (1995), RAPD markerlerinden *lilium* türlerinin ve hibritlerinin belirlenmesinde yararlanmıştır. Optimum "annealing" sıcaklığı *lilium* için 54 °C olmuştur. Kullanılan 74 primerin 18 tanesi (% 24) polimorfik DNA fragmentlerini oluşturmuştur. Araştırmacı, RAPD markerlerinin *lilium* türlerinin ve hibritlerinin genetik ilişkisinin belirlenmesinde oldukça etkili bir metod olduğunu bildirmiştir.

Hu vd (1995), Almanya'da yetişen Duplo ve düşük linolenik asit içerikli 3637-1 kolza çeşitleri melezlenerek düşük LA içeren Mutant Oro ve IXLIN hatlarını elde etmişlerdir. Elde edilen F₁, F₂, F₃ ve ebeveynlerinde RAPD kullanılarak polimorfizm taranması yapılmıştır.

Çalışma sonunda *B. napus*'da RAPD markerleri kullanılarak F2 populasyonunda linolenik asit konsantrasyonunu belirleyen bir genin başarıyla haritalanabileceği bildirilmiştir.

Tanhuanpää vd (1995), Jo4002 ve Sv3402 yazlık şalgam melezinden elde ettikleri 105 tane F2 bitkisinde OPB-11a RAPD markerinin palmitik asit içeriği ile arasında bir linkage olduğu bildirilmiştir. Çalışmada test edilen 220 RAPD primerinin % 75'i ebeveyn ve melezler arasında polimorfizmi belirlemiştir. Araştırmacılar, çalışma sonunda marker destekli seleksiyonun ıslahı hızlandıracağını, çünkü RAPD markerlerinin kolay yorumlanabildiğini bildirmişlerdir. Ayrıca palmitik asit içeriği ile çok sıkı linkage olan markerler palmitik asit konsantrasyonunda etkili genin analizi ve izolasyonuna olanak sağlamıştır.

Skroch ve Nienhuis (1995), 10 tane *Phaseolus vulgaris* genotipleri arasındaki polimorfizmi, 400 RAPD primeri ile taramışlardır. Çalışmada kullanılan 400 primerin 364 tanesi amplifikasyon ürünü oluşturmuştur. Bu amplifikasyon ürünleri 1-13 arasında değişmiş ve elde edilen toplam 1894 RAPD bantından primer başına ortalama 5.19 RAPD bantı oluşmuştur. Polimorfik bantların sayısı ise toplam 784 olup, her genotip için 0-7 arasında ve ortalama 2.15 olmuştur. Araştırmacılar her genotip için her RAPD bantını, var olan bant için (1), olmayan bant için ise (0) olarak değerlendirilmiştir. Sadece birbirine uygun ve tutarlı farklılık gösteren RAPD bantlarını değerlendirmişlerdir. Eğer RAPD bantları bir genotip için belirgin olarak değerlendirilemiyorsa genotipler için değerlendirme kayıp veri olarak yapılmıştır. Aynı şekilde bir genotip için RAPD amplifikasyonu önemli azalma gösteriyorsa tüm RAPD bantları veya tek bir bant için fragment değerleri yine kayıp veri olarak girilmiştir. Bu değerlendirme yanında RAPD bantları zayıf (3), orta (2) ve koyu (1) olarak da değerlendirilmiştir. Buna göre 333 zayıf, 281 orta ve 170 koyu bant belirlenmiştir. Genotipler arasındaki genetik ilişki UPGMA analizine dayanarak yapılan bir dendogramda değerlendirilmiştir.

Frello vd (1995), *Brassica juncea* x (*Brassica juncea* x *Brassica napus*) melezinden elde edilen geriye melezleme (BC1) generasyonunun 54 bitkisinde, transgenik, herbisite dayanıklı kölzadan 20 tane kolza-spesifik RAPD markerinin kalıtımını açıklamıştır. BC1 bitkileri kolza

APD markerlerinin 0-20'sini içermiş ve analiz edilen bitkilerin % 52'si transgenik olarak bulunmuştur.

Sugawara vd (1995), RAPD markerleri aracılığıyla *Citrus* çeşitlerinde bulunan kimerayı belirlemiştir. RAPD ile 4 *Citrus* kimerasının belirlenmesinde 124 primer kullanmışlardır.

Maughan vd (1996), moleküler markerleri kullanarak, soyada tohum ağırlığını kontrol eden kalitatif özellik lokuslarının (QTL) tanımlanması, tohum ağırlığının genetik temelini belirlemek için karakterize edilmesi ve soyanın börülce veya yeşil börülce ile tohum ağırlığını kontrol eden lokusları paylaşıp paylaşmadığı saptanmıştır. Araştırmacılar RAPD, RFLP ve SSR dahil olmak üzere 91 polimorfik genetik marker ile analiz yapmışlardır. Araştırma sonunda soya ile börülce ve yeşil börülcenin tohum ağırlığı genini paylaştığı bildirilmiştir.

Millan vd (1996), tarafından 19 gül türü, RAPD markerleri kullanılarak analiz edilmiştir. Kalitatif kalıtım analizi ile türler arasındaki genetik ilişki ve genetik uzaklık açıklanmıştır. Bu araştırma sonunda elde edilen sınıflandırmanın farklı araştırmacıların morfolojik ve karyolojik verilerine dayanan sınıflandırmaları ile yüksek düzeyde bağımlılık gösterdiği bildirilmiştir.

Tatineni vd (1996), 16 tane homozigot pamuk genotiplerinde genetik farklılığı DNA analizinde RAPD analizi ile fenotipik düzeyde de morfolojik karakterler kullanarak belirlemiştir. 80 tane primer kullanılmıştır. 27 tanesi monomorfik amplifikasyon ürünü veya bir fragment oluşturmamıştır. Kalan 53 primer toplam 135 fragment oluşturmuştur. Primer 1.7 RAPD fragmenti polimorfik olarak tespit edilmiştir. Tarla denemelerinde ise 19 morfolojik özellik değerlendirilmiştir. Morfolojik verilerden ortalama taksonomik uzaklık ve RAPD'den genetik uzaklık için dendrogram oluşturulmuştur. İki metoda göre yapılan sınıflandırmada genetik uzaklık ve taksonomik uzaklık arasında 0.63 korelasyon ile benzer sonuçlar elde edilmiştir. Araştırmacılar *G. hirsutum* ve *G. barbadense*'den genetik ve fenotipik olarak uzak bir çok genotip belirlemiştir.

Spooner vd (1996), *Solanum etuberosum* ve *S. palustre*'ye ait 15 bireyde ve *S. fernandezianum*'un 4 bireyinde genetik uzaklıkların belirlenmesi için RAPD, RFLP, kloroplast DNA'sı ve izozim analizi ile değerlendirmişlerdir. Üç taxa arasında izozim, RFLP ve RAPD sonuçları genel olarak uyumlu bulunmuştur. Kloroplast DNA'sı ise *Solanum etuberosum* ve *S. palustre*'nin *S. fernandezianum*'dan daha fazla birbirlerine benzediklerini göstermiştir. Türler arasında benzerlik ise izozimlerle daha düşük olmuş ve bunu sırasıyla RAPD ve RFLP (en yüksek) izlemiştir. Türler içinde ise RFLP en düşük ve RAPD en yüksek varyasyonu göstermiştir.

Demeke vd (1996), RAPD analizini kullanarak 28 patates genotipinin genetik farklılığını göstermişlerdir. 12 primer aracılığı ile 158 DNA fragmenti amplifiye olmuştur. Bu fragmentler 100-3200 bp büyüklüğündedir. Çalışma sonunda 158 amplifikasyon ürününden 30 tanesi polimorfik olarak bulunmuştur.

Doldi vd (1997), Orta Avrupa'da yetişen 18 soya genotipinde protein içeriği yüksek genotiplerin seçimi için genetik farklılığı, RAPD ve mikrosatellite (SSR) teknikleri kullanılarak gösterilmiştir. RAPD amplifikasyonu için 33 primerin sadece 1 tanesi amplifikasyon ürünü oluşturamamıştır. Bununla birlikte 12 tanesi polimorfizm göstermiştir. Mikrosatellite tekniğinde kullanılan 12 primerin hepsinde polimorfizmi belirlemede etkili olmuştur. RAPD verileri ile genotipler arasındaki genetik farklılık 0.3-0.5 iken SSR verileri 0.5-0.9 arasında genetik farklılık gösterilmiştir. Araştırmacılar SSR ve RAPD verilerinin birlikte değerlendirilmesi sonucu genotiplerin genetik ilişkilerinin değerlendirilmesinin oldukça güvenilir olduğunu ve kombinasyon sonucu genetik farklılığın 0.4-0.7 arasında olduğunu bildirmişlerdir.

Manninen vd (1997), arpada mildiyöye dayanıklılık için yaptıkları ıslah programında dayanıklılık genlerini RAPD ile haritalamışlardır. RAPD markerleri ve bulk segregant analizi kullanılarak m/o lokusuna bağlı olan markerler belirlenmiştir. Çalışmada m/o allelini taşıyan dayanıklı ve taşımayan dayanıksız izogenik hatlarının melezinden elde edilen 60 dabil haploid hatlar kullanılmıştır. Dayanıklılık geninden 1.6 cM uzaklıkta bağlanan 7 RAPD markeri

bulunmuştur. Dayanıklılık genine bağlı olan bu markerler ıslah programında seleksiyon için bir araç olarak kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Menkir vd (1997), kültürü yapılan 190 *Sorghum bicolor* 'da taxonomik ilişkiyi ve genetik farklılığı belirlemek için RAPD markerlerini kullanmışlardır. Kültürü yapılan genotipler arasında yüksek düzeyde varyasyon belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan 82 primerden 53 tanesi 20 RAPD bandı oluşturmuştur. Bunların % 74'ü polimorfik olmuştur.

Golembiewski vd (1997), *Agrostis stolonifera* çeşitlerinin belirlenmesinde izozim elektroforesis metodunu kullanmışlardır. İzozim elektroforesiste sınırlı sayıda izozim içermesi nedeni ile oldukça yakın genotipler arasında çok az polimorfizm belirlenmiştir. Her izozim analizi için taze bitki örnekleri kullanılmasının gerektiği ve ayrıca izozim analizi için kullanılan proteinden RAPD için gereken DNA'nın daha stabil olduğunu bildirmişlerdir.

Liu (1997), Avustralya tropikal ormanlarından toplanmış 100 *Stylosanthes scabra* türünün coğrafik dağılımının belirlenmesi için RAPD markerlerini kullanmıştır. Brezilya'dan toplanan bitkiler arasındaki farklılık (0.053), Kolombiya (0.074) ve Venezuela'dan (0.088) toplananlardan daha düşük bulunmuştur. Bu farklılık değerlerine dayanarak bitkiler 5 grupta toplanmıştır. Bitkilerin birçoğu Brezilya genotipinde yer almıştır. Araştırmacılar, RAPD ve morfolojik-agronomik özelliklere dayanarak elde edilen sonuçları karşılaştırmışlardır. DNA varyasyonuna dayanan gruplamalar morfolojik-agronomik analizine dayanan gruplamalarla tamamen aynı olmadığını bildirmişlerdir. Çalışmada kullanılan PCR parametreleri, 94 °C 1dk., 72 °C 1dk., 72 °C 2 dk. olmak üzere 40 döngüdür. Amplifikasyon ürünleri % 1.5 agaroz jelde ayrıştırılmıştır. 100 bireyin PCR amplifikasyon ürünleri bantların varlığı (1) veya yokluğuna (0) dayanarak puanlandırılmıştır.

Fofana vd (1997), Lima fasulyesinin 16 yabani formu ve 30 yöresel formu olmak üzere 46 bireyinde genetik varyabiliteyi değerlendirmek için RAPD markerleri kullanmışlardır. Çalışmada kullanılan 20 primer 172 RAPD markeri oluşturmuştur. Lima fasulyesi, Mesoamerican ve Andean grupları olmak üzere iki ana gruba ayrılmıştır. AMOVA analizi

kullanılarak iki grup arasında % 37.7 varyasyon belirlenmiş ve RAPD markerlerinin Lima fasulyesinin yabani formları ve yöreseller arasındaki genetik uzaklığın tahmininde kullanılabileceğini, bu türlerin yabani formları ve yöresel olanların kendi içlerindeki genetik akrabalığı da araştırmada kullanılabileceğini belirtmişlerdir. Araştırmada, 34 bireyde genetik uzaklık 172 RAPD bandı ile açığa çıkmıştır. Primer başına ortalama 14.3 bant elde edilmiştir. 172 bantın 163 tanesi polimorfik olarak bulunmuştur. RAPD reaksiyonları 25 µl'lik tüplerde yapılmıştır. Reaksiyon tüpünde 20 ng genomik DNA, reaksiyon buffer (10mM Tris-HCl, pH:9.0, 1.5 mM MgCl₂, 50mM KCl), 20 pmol primer, her bir dNTP'den 200 µM, 2mM MgCl₂, 1.5 U Taq DNA polimeraz yer almıştır. Reaksiyonda her birinde negatif kontrol olarak kalıp DNA içermeyen reaksiyon tüpü kullanılmıştır. Reaksiyon karışımının üzeri mineral yağ ile kaplanmıştır. Çalışmada 94 °C 5 dk 1 döngü ardından, 94 °C 1 dk "denatürasyon", 34 °C 1 dk, 72 °C 2 dk. döngü parametreleri kullanılmıştır. Amplifikasyon ürünleri % 1.8 agaroz jelde yaklaşık 3 saat 50 mA'de ayrılmıştır. Jel daha sonra polaroid film ile UV altında fotoğraflandırılmıştır. Çalışma sonunda RAPD markerlerinin, türlerin ayrıntılı gen havuzlarının oluşturulmasında Lima fasulyesindeki gen havuzunun arzu edilen morfolojik özelliklere göre tanımlanması yerine, genomik düzeyde tanımlanmasının, gelecekteki çalışmalarda birbiri ile yakın akrabalığı olan materyallerin kolaylıkla ve güvenle tespit edilebileceğini bildirilmişlerdir.

Varghese vd (1997), kültürü yapılan *Hevea brasiliensis*'de RAPD markerlerinin uygulanabilirliğini 43 decamer oligonükleotidi test ederek değerlendirmişlerdir. RAPD markerlerinin *Hevea*'da klon belirlenmesi ve klonlar arasında genetik akrabalığın analizi için etkili bir metod olduğu görülmüştür. Çalışmada primerlerin yarısından fazlası amplifikasyon ürünü vermiş ve kültürü yapılan *Hevea* ağacında genetik varyabilitenin yüksek olduğu belirlenmiştir. Güneydoğu Asya'nın farklı ülkelerinden seçilen 24 klon arasındaki genetik uzaklığın bilinmesi rekombinasyon ve çoklu melez ıslah programlarında klon seleksiyonu için önemli olduğu açıklanmıştır.

Page vd (1997), Kırmızı üçgülde gövde çürüklüğüne dayanıklılığına bağlı olan DNA markerlerinin belirlenmesinde RAPD kullanmışlardır. Bulk segregant analizi polimorfizmi

lemek için yararlı olmuştur. Her bir bulkdan (bir dayanıklı, bir hassas) ve bunlar arasında ekleme yapılarak elde edilen F2'lerden izole edilen genetik materyal kullanılmıştır. RAPD polimorfizmi kirmızı üçgül genotipleri arasında büyük bir genetik varyabilite açığa çıkarmıştır. Kullanılan 200 primerle 241 polimorfik fragment elde edilmiştir.

Rajaseger vd (1997), *Ixora*'nın 22 çeşidi içindeki bireyleri belirlemek için RAPD markerlerini kullanmışlardır. 22 çeşit, 6 primerden elde edilen veriler ile *Ixora Coccinea* ve *I. anica* olmak üzere iki çeşit grubuna ayrılmıştır. Germplasm koleksiyonunda yer alan *Ixora* türlerinin belirlenmesi için RAPD markerlerinin kullanılması gelecek ıslah programlarında RAPD analizinden faydalanılabileceğini göstermiştir.

Johns vd (1997), Şili'de genetik ilişkili iki büyük gen havuzu olan Andean ve Orta Amerikan *aseolus vulgaris* yerel çeşitlerinin fenotipik olarak gruplandırılması durumunda yeterince kesin sonuçlar elde edememişlerdir. Araştırmacılar, 69 Şili yerel çeşidi, 15 ticari ve daha önce kontrol edilen 11 atasal çeşidin genetik kompozisyonunu RAPD kullanarak tespit etmişlerdir. Morfolojik veriler uzaklık matrisinin ortaya çıkarılmasında kullanılmış ve RAPD verileri ile karşılaştırma yapılmıştır. Çalışmada morfolojik özelliklerin sınıflandırmada RAPD verilerine göre daha az etkili olduğu bildirilmiştir.

Nagaoka ve Ogihara (1997), Diploid ve tetraploid buğdayları içeren 6 buğday türü arasındaki genetik ilişkinin belirlenmesinde ISSR (Inter simple sequence repeat polymorphic marker), RAPD ve RFLP markerlerinin uygunluğunu araştırmışlardır. ISSR ile 33 primer 6 türün her birinde fark edilecek düzeyde polimorfik bant oluşturmuştur. (AC)'in tekrarlarına dayanan primerler en fazla polimorfik bant oluşturmuştur. Buğdayda RAPD analizinde 200 primer test edilmiştir. Oluşan bantlar ISSR bantlarına benzer olmasına rağmen RFLP ve ISSR bantlarından daha az polimorfik olmuştur. Çalışma sonunda ISSR ve RFLP bantlarının RAPD bantlarından daha etkili polimorfizmi belirlediği bildirilmiştir.

Ur-Rahman vd (1997), *Malus* türlerinde apomiksisi belirlemek için RAPD markerlerinden faydalanmışlardır. Renk markerlerine dayanarak yapılan seçimde apomiktik hatlarda yeşil fide

rengi olduğu belirlenmiştir. Araştırmacılar *M. turingoides* X *M. cv. Baskatung* fidelerinin melezlenmesi sonucu *in-vitro*'da 5 tane apomiktik (yeşil fideli) ve 1 tane hibrit (kırmızı fideli) elde edilmiştir. Ancak *M. hupehensis* X *M. cv. Baskatung* melezlenmesi sonucu *in-vitro*'da aynı renkte (kırmızı) fideler elde edilmiştir. RAPD markerleri kullanılarak 19 primerden 7 tanesi bir hibritte ekstra bir bant vermiştir. Böylece *in-vitro*'da hibritlerden apomiktik fidelerin seçiminde RAPD tekniğinden yararlanılabileceği bildirilmiştir.

Russel vd (1997), kültürü yapılan 18 arpa bireyinde genetik ilişkiyi belirlemek için RFLP, AFLP, RAPD ve SSR kullanılmışlardır. Dört uygulamanın da, polimorfizmi belirlemede farklı etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. AFLP ve RFLP benzer sonucu verirken SSR diğerleri ile karşılaştırıldığında düşük, RAPD ise daha düşük sonuç vermiştir.

Pessino vd (1997), *Brachiarra*'nın bulk ettikleri F1 populasyonunda RFLP ve RAPD kullanarak apomiksis ile birlikte açılım gösteren moleküler markerlerin belirlenmesi için yaptıkları çalışmada apomiksis ile birlikte açılım gösteren polimorfik bir bant bulunmuştur. 184 primer kullanarak yaptıkları RAPD analizinde OPC4 apomiksis ile ilgili önemli bir marker olmuştur.

Parani vd (1997), *S. alatum*'daki Phyllody hastalığına dayanıklılığı *S. indicum*'a aktarmak için yaptıkları melezleme sonucu elde ettikleri hibritleri test etmek amacıyla protein, izozim ve RAPD markerlerini kullanmışlardır. Araştırmacılar 20 primer kullanarak 127 DNA fragmenti elde etmişlerdir. Bunların 56 tanesinin polimorfik olduğunu bulmuşlardır. Polimorfik fragmentlerin hepside hibrit belirlenmesinde kullanılmamıştır. Çünkü bunlardan bir kısmı anneye özgüdür. Fakat babaya özgü olduğu bulunan 25 tane fragmentin hepsinin de, hibritlerde varlığı gözlenmiştir. Bu fragmentler kendilenmiş döller hibritlerden ayırmada marker olarak kullanılmıştır. Çalışma sonunda RAPD markerlerinin susamda protein ve izozim markerlerine oranla daha stabil ve güvenilir olduğu bildirilmiştir.

Cao ve Oard (1997), A.B.D' de üretimi önerilen 26 elit çeltik genotipinden elde edilen RAPD ve Pedigree verilerini karşılaştırmışlardır. RAPD analizi için 220 tane primer

değerlendirmeye alınmış ve bunlardan 69 primer, büyüklükleri 0.25-3.5 kb arasında değişen 92 polimorfik bant üretmişlerdir. G.D (Genetik uzaklık) = $1 - [2N / (N_i + N_j)]$ formülüne göre genetik uzaklık hesaplanmıştır. N, RAPD analizinde elde edilen toplam bant sayısı, N_i ve N_j çeşit i ve j nin toplam bantların sayısıdır. GD, average linkage metodu (UPGMA) kullanarak bir linkage kümeleme analiz dendogramı oluşturmak için yararlanılmıştır. RAPD ve Pedigree verileri ile uzun-orta daneli çeşitler için benzer yakınlıklar bulunmuştur. Fakat Pedigree verilerinde her iki ane tipi içinde ortalama genetik uzaklık, RAPD verilerinden önemli ölçüde farklı olmuştur. Araştırma sonunda çeltik çeşitleri arasındaki genetik ilişkinin saptanmasında RAPD'in güvenilirliği bildirilmiştir.

Ashburner vd (1997), Güney Pasifik bölgesinde önemli bir genetik potansiyele sahip olan 17 farklı popülasyona ait olan hindistan cevizi ağaçlarında genetik ilişkiyi belirlemek için, RAPD analizi ile yaptıkları çalışmada, tek bir tür olan popülasyon içinde düşük bir genetik farklılık belirlenmiştir. Belirlenen varyasyon düzeyi popülasyonlar arasında değişmiştir. Bu sonuç, popülasyonlar arasında düşük bir varyasyon olduğu fakat bu varyasyona yol açan bir gen çeşitliliğinin olduğunu göstermiştir. Çalışmada, 13 farklı RAPD markeri 14 primer kullanılarak çoğaltılmıştır. Primer başına elde edilen marker sayısı 3-15 arasında ve yine primer başına polimorfik RAPD marker sayısı 1-14 arasında değişmiştir. Monomorfik marker toplam sayısı markerlerin % 41'ini oluşturmuştur.

Aran vd (1997), 48 farklı hindistan cevizi genotipini RAPD, MS-PCR (microsatellite-trimmed PCR) ve ISTR (Inverse sequence-tagged repeat) olmak üzere üç farklı DNA marker teknolojisi kullanarak analiz etmişlerdir. RAPD tekniğinde 22 tane 10 bazlık primer kullanılarak toplam 238 farklı RAPD fragmenti oluşmuştur. Bu fragmentlerin % 14'ü polimorfik olmuştur. MS-PCR tekniğinde 5 tane microsatellite primeri ile 63 tane amplifiye olmuş bant açığa çıkmıştır. Bunların 55 tanesi polimorfik banttır. ISTR tekniğinde ise 3 tane ISTR primerleri ile büyük sayıda DNA fragmentleri (30-40 arasında) çoğaltılmıştır. Oluşan toplam 107 fragmentin 66 tanesi polimorfiktir. Araştırmacılar yaptıkları çalışmada, tüm DNA markerleri ile farklı hindistancevizi genotipleri arasında yüksek oranda polimorfizmin belirlenebildiğini bildirmişlerdir.

Papa vd (1998), İtalya'da yetişen arpa yerel populasyonlarında genetik farklılığı, morfolojik, izozim ve RAPD markerleri kullanarak belirlemişlerdir. Tüm marker tipleri ile populasyonlar arasında ve içinde farklılık oranı benzer bulunmuştur. Ancak, RAPD verileri diğer marker tipleri ile karşılaştırıldığında, RAPD'in çevresel özellikler ile düşük korelasyon gösterdiği ve populasyon içindeki farklılığı en yüksek oranda belirlediği bildirilmiştir.

Thompson vd (1998), Kuzey Amerika'da yetişen 18 soya fasulyesi atasını ve introduksiyon ile geliştirilmiş 17 çeşidin genetik farklılığını araştırmışlardır. 35 genotip arasındaki genetik ilişkinin tahmini 281 RAPD markeri aracılığı ile hesaplanmıştır. Çalışmada kullanılan 169 primerin 125 tanesi analizde sonuç vermiştir. 833 tane amplifiye edilmiş fragmentin ancak 281 tanesi polimorfik fragment oluşturmuştur.

Thompson ve Nelson (1998), soya fasulyesinde yaptıkları çalışmada çok sayıda rastgele primer kullanarak RAPD markerlerini elde etmişlerdir. Çalışmada, Kuzey Amerika soya fasulyeleri arasındaki genetik ilişkiyi az sayıda ancak yeterince tanımlayabilecek primer setinin bulunması amaçlanmıştır. 281 polimorfik bant değerlendirilmiştir. Büyük varyasyon kaynağı gösteren RAPD fragmentlerinin belirlenmesinde temel bileşenler analizine başvurulmuştur. Hiyerarşik ve hiyerarşik olmayan kümeleme analizi ile 35 genotip arasındaki genetik ilişki belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan 64 primerden 35 tanesinin en yüksek farklılığı belirlemede etkili olduğu bildirilmiştir.

Galderisi vd (1998), Kestane çeşitleri arasındaki genetik farklılığı belirlemek için yaptıkları çalışmada tüm primerler için 1-14 arasında ortalama 5 bant elde etmişlerdir. Araştırmada sadece 3 primer polimorfizmi belirlemek için yeterli olmuştur. Amplifiye olan fragmentler 150-1400 bp büyüklüğünde olmuştur.

Ko vd (1998), menekşe türleri arasındaki genetik ilişkiyi RAPD metodu ile analiz etmişlerdir. Analizde GC içeriği % 60-70 olan 40 primer kullanmışlardır. Bunların 13 tanesi genetik ilişkiyi belirlemede etkili olmuştur. Analizde menekşe türleri tek bir alt grup dışında

morfolojik karakterlere dayanan konvensiyonel taksonomi ile benzer olmuştur. Bundan dolayı RAPD analizinin menekşe türlerinde genotip ve morfolojik karakterleri belirlemek için alternatif bir sınıflandırma sistemi olabileceğini bildirmişlerdir.

Santalla vd (1998), kültürü yapılan 22 *Vigna radiata* yerel çeşidinde genetik benzerliği araştırmak için RAPD analizini kullanmışlardır. Çalışmada, 60 primerin 28 tanesi 246 bant oluşturmuştur. Bunların 229 tanesi polimorfiktir. Genetik uzaklık matrisi Nei ve Li'ye göre yapılmıştır. Genetik uzaklık $D_{ij} = 1 - S_{ij}$ formülüne göre hesaplanmıştır. Analiz sonucu 3 ana gruba ayrılan yerel çeşitlerde yüksek düzeyde moleküler polimorfizm belirlenmiştir.

Villand vd (1998), eski ve yeni dünya ülkelerinden toplanan domates türleri arasında genetik varyasyonun yapısını karşılaştırmak için 41 RAPD primeri kullanarak 98 polimorfik RAPD markeri oluşmuştur. Genetik farklılık, marker frekansı ve marker farklılığı bu bireylerin alt popülasyonlarını karşılaştırmada kullanılmıştır. RAPD marker frekansındaki farklılıklar, yeni ve eski dünya koleksiyonlarının tek tip olmadığını belirlemiştir.

Schneller vd (1998), apomiktik *Dryopteris remote* türlerinin orijinlerinin değerlendirilmesi için RAPD markerlerini kullanmışlardır. Çalışmada 19 primerin 12 tanesi yorumlanabilen ve tekrarlanabilen sonuçlar verdiği için bunlardan elde edilen veriler kullanılmıştır. 5 primer ürün oluşturmazken, 2 primerde tatmin etmeyen sonuçlar verdiği için değerlendirmeden çıkarılmıştır. Toplam 67 bant analiz edilmiş ve bunların 20 tanesi polimorfik olarak bulunmuştur. Daha önce polimorfizm ile yapılan çalışmada *D. remote* türlerinde genetik üniformite olduğu bildirilmişken RAPD markerleri ile bu türlerin güney Avrupa kesiminden toplananları arasında varyasyon ortaya çıkmıştır. Araştırmacılar *D. remote* bireyleri arasında düşük genetik farklılık belirlemişlerdir.

Schontz ve Rether (1999), *Seteria italica*'nın 37 hattında polimorfizmi belirlemek için RAPD analizini 4 tane 10 bazlık primer ile kullanmışlardır. Bu primerler birbirlerinden sadece bir veya iki dizi G-C bakımından farklıdır. Her primer spesifik RAPD ürünleri oluşturmuştur. Oluşan 25 tane polimorfik bant 33 hattın farklı genotipte olduğunu göstermiştir. Çalışmada

ortaya çıkarılan genetik gruplar coğrafik orijinleri ile bağlantılı olmuştur. Araştırmacılar elde ettikleri sonuçların RFLP analizi sonuçları ile benzer olduğunu bildirmişlerdir.

Wang ve Goldman (1999), *Beta vulgaris*'in 37 alttüründe RAPD kullanarak genetik farklılığı tahmin etmişlerdir. Çalışmada dünyada yayılış gösteren yeşil aksamı kullanılan pancar genotipleri ve şeker pancarı ıslah populasyonları arasındaki genetik uzaklıkların belirlenmesinde RAPD markerlerinden yararlanılabileceği ortaya konmuştur.

Boehm vd (1999), *Panax quinquefolium* L. 'un 8 yabani tip ve 7 kültürü yapılan populasyonu ile *Panax ginseng*'in kültürü yapılan 4 populasyonu arasında genetik farklılıklar RAPD markerleri kullanılarak tahmin etmişlerdir. Germplasmin değerlendirilmesi 10 primer ile yapılmıştır. 100 polimorfik bant elde edilmiştir. Populasyonlar arasındaki genetik uzaklık farklı bantların toplam bantlara oranı olarak hesaplanmıştır. Kültürü yapılan *P. ginseng* ve *P. quinquefolium*'un yabani tipleri arasında yüksek genetik uzaklık (GD) değerinin türler, ekotipler ve bölgesel populasyonlar arasındaki genetik farklılığı belirlediğini bildirilmişlerdir.

Dhillon ve Ishiki (1999), yabani varyetenin de bulunduğu farklı coğrafik lokasyonlardan toplanmış 29 tatlıpatates bitkisinde genetik ilişkiyi RAPD markerleri kullanarak belirlemişlerdir. Primerler 46 polimorfik bant oluşturmuştur. Tatlıpatateste polimorfizmin derecesine dayanarak yüksek genetik varyabilitenin varlığı önerilmiştir. Yabani türler *Ipomoea gracilis* ve *Ipomoea* *acea* kültürü yapılan tatlı patateslerden farklı bir grup oluşturmuştur. Her primerin oluşturduğu amplifikasyon ürünleri farklı sayı ve yoğunlukta olup bu fragmentler 200-1200 bp büyüklüğünde olmuştur.

Mekuria vd (1999), zeytinin 39 bireyinde genetik varyabiliteyi belirlemek için yaptıkları çalışmada RAPD analizini değerlendirmişlerdir. Araştırmada kullanılan 30 primerden 6 tanesi polimorfizmi belirlemede yeterli olmuştur. Çeşitler içinde genetik benzerlik en az % 69-98 arasında değişmiştir.

Verdison vd (1999), asmada *in-vitro*'da kallus safhası süresince ve sürgün organogenesisi unca bitki büyüme regülatörlerinin etkisiyle oluşabilen varyasyonun olduğunu ve bu varyasyonun genomda kalitatif ve kantitatif değişikliğe yol açtığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar asmada RAPD kullanılarak oluşan bu kimeranın belirlenebileceğini termişlerdir.

Lanham ve Brennan (1999), beктаşı üzümünün 20 genotipi arasındaki genetik farklılığı anlamakta RAPD, ISSR ve AFLP markerlerini kullanmışlardır. Toplam 793 bantın 184 tanesi 23) polimorfik olmuştur. AFLP, tüm primerleri ile polimorfizmin belirlenmesinde en etkili n marker sistemi olmuştur. Primer başına ortalama 19 polimorfik bant elde edilmiştir. RAPD 24 primer kullanılarak 170 bant, ISSR ile 9 primer kullanılarak 333 bant ve AFLP ile 4 mer kombinasyonu kullanılarak 290 bant elde edilmiştir. Aynı zamanda 6 RAPD primeri ve 2 SR primeri ile hiç bir polimorfizm belirlenememiştir. Araştırmacılar RAPD'in teknik olarak nit ve çok küçük miktarda DNA'ya ihtiyaç olduğunu bununla birlikte iki bireyde de benzer yükölükte bantların ölçölümüş olmasının bantların aynı sekansta olduğunu garantisini bildirmişlerdir. RAPD analizi sonucu elde ettikleri bantların varlığına (1) ve kluğuna (0) göre bir tablo oluşturmuşlardır. Bu verilere dayanarak, Nei ve Li tarafından erilen i ve j gibi iki çeşit arasındaki benzerliği ($S_{ij} = 2N_{ij}/(N_i + N_j)$) formölünden yararlanarak saplamışlardır (N_{ij} : iki çeşitte da ortak olan bant sayısı, N_i : i çeşidindeki bant sayısı, N_j : j lindeki bant sayısı). Oluşturdıkları benzerlik matrisini kullanarak UPMA ile gruplama omışlardır.

Li ve Midmore (1999), Avustralya'da kültürü yapılan 28 tane Çin su keşanesi arasındaki netik ilişkiyi RAPD kullanarak araştırmışlardır. RAPD analizinde 20 tane primer lanmışlardır. Bunlardan 14 tanesi 99 RAPD markeri çoğaltmıştır. Örnekler arasındaki klılığın % 0.78-4.4 arasında olduğunu bildirmişlerdir.

Yee vd (1999), *Vigna angularis*'de yaptıkları çalışmada iki farklı gen havuzunda bulunan eyler arasındaki genetik benzerliği açıklamak için RAPD ve AFLP marker sistemlerinden arlanmışlardır. 58 birey arasında 57 RAPD ve 214 AFLP bantları genetik farklılığı

belirlenmiştir AFLP primeri ile reaksiyon başına ortalama 11.3 polimorfik bant belirlenirken buna karşın RAPD primeri ile ortalama 3.2 polimorfik bant bulunmuştur. AFLP verileri RAPD verilerinden daha önemli kesin sonuçlar vermiştir. Bireyler arasında gruplar oluşturmada kümeleme analizinden faydalanılmıştır. Çalışma sonunda oluşan gruplar coğrafik orijinleri ile bir korelasyon göstermemiştir.

Bhat vd (1999), 36 tane Hindistan ve 22 tane Doğu Asya Ülkesinde üretimi yapılan susam çeşitlerinde RAPD markerleri kullanarak % 19-89 arasında polimorfizm belirlemişlerdir. Çalışmada kullanılan 48 primerin 24 tanesi güvenilir sonuçlar vermiştir. Doğu Asya Ülkelerinde yetiştirilen susam çeşitleri arasında Hindistan orijinli olanlara göre düşük polimorfizm bulunmuştur. Araştırmacılar bunun, bu ülkelerde üretimi yapılan çeşitlerin introduksiyon yoluyla yayılış göstermesinden kaynaklandığını belirtmişlerdir. RAPD analizi sonucu elde edilen veriler Jaccard'ın benzerlik indeksinden yararlanarak oluşturulan matris UPGMA ve Wagner'e göre dendogramları elde edilmiştir.

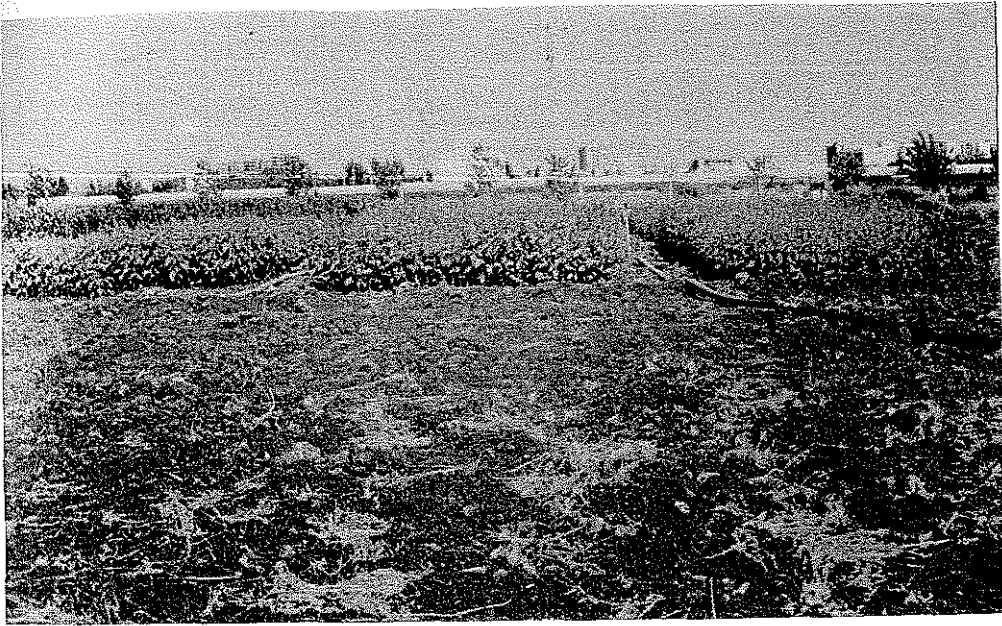
3. MATERYAL VE METOT

3.1. Morfolojik Gözlem İçin Yapılan Çalışmalar

3.1.1. Araştırma yeri

Araştırmanın tarla denemeleri Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Yem Bitkileri Grubu Deneme Tarlasında yapılmıştır. Araştırma yerinin denizden yüksekliği 51 m olup $30^{\circ} 44'$ doğu, $36^{\circ} 52'$ kuzeyde yer almaktadır.

Tarla denemeleri, 1997 yılı yaz döneminde tohum almak amacıyla ve 1998 yılı yaz döneminde ise morfolojik özelliklerin ölçülmesi amacıyla yapılmıştır (Şekil 3 1).



Şekil 3 1. Susam Populasyonlarına Ait Tarla Denemesinden Görünüş

3.1.1.1. Toprak özellikleri

Deneme alanının fiziksel ve kimyasal analizleri Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Toprak Bölümü Laboratuvarında yapılmıştır. Deneme tarlasının 0-35 cm derinliğinden alınan toprak örneklerinin analiz sonuçları Çizelge 3 1.'de verilmiştir.

Analiz sonuçlarına göre araştırma yeri alkali, kireçli, tuzsuz ve az humuslu bir toprağa sahiptir.

Susam, pek çok toprak tipine adapte olabilir Fakat drenajı iyi, nötr pH'lı, verimli toprakları tercih eder. Tuza toleransı çok az olup ıslak topraklara toleransı yoktur (Oplinger vd 1990). Susamın bu istekleri ve analiz sonuçları değerlendirilmesi durumunda araştırma yerinin susam için oldukça uygun özellikler taşıdığı söylenebilir.

Çizelge 3.1 Deneme Yapılan Toprağın Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

	Değer	Sınıf
pH	8.12	Alkali
Kireç (%)	22.00	Aşırı Kireçli
Tuz (%)	0.0199	Tuzsuz
Toplam N (%)	0.1078	Orta
Değişebilir Katyonlar (Na-K-Ca-Mg) (me/100g toprak)	1.14-1.15-28.71	
KDK (me/100g toprak)	36.27	Yüksek
Organik Madde (%)	2.40	Az Humuslu

3.1.1.2. İklim özellikleri

Susam populasyonlarının ekiminin yapıldığı deneme alanının 1997 ve 1998 yıllarına ait Haziran-Ekim dönemi aylık ortalama sıcaklık ($^{\circ}\text{C}$) ve yağış miktarı (mm) değerleri Çizelge 3.2.'de verilmiştir.

Çizelge 3.2 Deneme alanının 1997-1998 yıllarına ait ortalama iklim verileri

	<u>1997</u>					<u>1998</u>				
	<u>Haz</u>	<u>Tem</u>	<u>Ağus</u>	<u>Eylül</u>	<u>Ekim</u>	<u>Haz</u>	<u>Tem</u>	<u>Ağus</u>	<u>Eylül</u>	<u>Ekim</u>
Ortalama sıcaklık ($^{\circ}\text{C}$)	26.6	30.5	28.6	25.2	20.9	26.5	30.2	30.5	25.6	21.5
Ort. Yağış Mik. (mm)	20.2	----	28.6	62.2	189.3	27	30	----	21	120.3

Susam, 90-120 günlük bir yetiştirme süresine ihtiyaç duyar. Optimum 25-26 °C sıcaklık isteği vardır. Sıcaklığın 20 °C'ın altında olması halinde büyüme azalır ve 10 °C'de döllenme ve büyüme durur.

Susam kök sisteminden dolayı kurağa tolerans gösterir. Bununla birlikte büyümenin başlaması için yeterli neme ihtiyaç vardır. Büyüme sezonunda minimum 20-26 mm yağış uygundur. Büyüme ve çiçeklenmeden önceki nem seviyesi verim üzerine oldukça etkilidir. Çiçeklenmenin başlangıcında fotoperiyota hassastır. Tohumların yağ içeriği artan fotoperiyot ile artmaya meyillidir (Oplinger vd 1990).

Susamın iklim özellikleri göz önüne alındığında araştırma sezonu boyunca ortalama sıcaklık büyüme ve gelişme için yeterli olmuştur.

3.1.2. Materyal

3.1.2.1. Genetik bitki materyali

Bu çalışmada, Türkiye'de yerel olarak üretimi yapılan 52 farklı yetiştirme bölgesinden Tarım İl ve İlçe Müdürlüklerinin aracılığı ile elde edilen susam populasyonları kullanılmıştır. Çalışmada materyal olarak kullanılan 52 adet susam populasyonunun orijinleri Çizelge 3.3'de verilmiştir.

3.1.3. Metod

Bir yıl önce elde edilen tohumlar 26.6.1998 tarihinde Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü deneme tarlasında her bir populasyon 4 m uzunluğundaki iki sraya ekilmiştir. Ekim el ile 50 cm sıra arası mesafe verilerek yapılmıştır. Çiçeklenme başlamadan önce her populasyondan rastgele seçilen 10 bitki etiketlenmiştir.

Cizelge 3.3. Susam Bitkilerinin Toplandığı Bölgeler

Kütük No İlçe	İl	Köy (Mevkii)
TSP 9301 Uzunköprü	Edirne	Mezarlıkaltı Maksutlu Köyü
TSP 9302 Uzunköprü	Edirne	Taşlıbayii Türkobası Köyü
TSP 9303 Uzunköprü	Edirne	Ortaova Altınyazı Köyü
TSP 9304 Uzunköprü	Edirne	Balbanköyü Gönekırı Mevkii
TSP 9307 Meriç	Edirne	Kavaklıköy Yedikavaklar Mevkii
TSP 9308 Eceabat	Çanakkale	Büyükanafartalar
TSP 9309 Lapseki	Çanakkale	Çavuşköy
TSP 9310 Lapseki	Çanakkale	Alpagat Köyü
TSP 9311 Lapseki	Çanakkale	Taştepe Köyü
TSP 9312 Lapseki	Çanakkale	Dişbudak Köyü
TSP 9313 Orhangazi	Bursa	Çeltikçi Köyü
TSP 9314 Turgutlu	Manisa	Merkez
TSP 9316 Turgutlu	Manisa	Merkez
TSP 9317 Alaşehir	Manisa	Killik Köyü
TSP 9318 Alaşehir	Manisa	Hacıaliler Köyü
TSP 9319 Alaşehir	Manisa	Tepeköy
TSP 9321 Menemen	İzmir	Türkeli Köyü
TSP 9322 Menemen	İzmir	Çavuş Köyü
TSP 9323 Menemen	İzmir	Kesik Köyü
TSP 9324 İncirliova	Aydın	Gölmarmara
TSP 9325 Bozdoğan	Aydın	Kozandere
TSP 9326 Bozdoğan	Aydın	Haydere Köyü
TSP 9327 Güney	Denizli	Çorbacılar Köyü
TSP 9328 Acıpayam	Denizli	Kumavşarı Köyü
TSP 9329 Acıpayam	Denizli	Gümüşköyü (Sarı)
TSP 9330 Acıpayam	Denizli	Gümüşköyü
TSP 9332 Dalaman	Denizli	Akçataş Köyü
TSP 9333 Ortaca	Muğla	Ekşiliyurt Köyü
TSP 9334 Köyceğiz	Muğla	Kavakarası Köyü
TSP 9335 Fethiye	Muğla	Kemer-Seydiler Köyü
TSP 9336 Keçiborlu	Burdur	İlyas Köyü, Uzunalar Mevkii
TSP 9337 Bucak	Burdur	Ürkütlü Köyü
TSP 9338 Mut	İçel	Kadıköy
TSP 9339 Ceyhan	Adana	Yeşildam Köyü
TSP 9340 Ceyhan	Adana	Gündoğan Köyü
TSP 9341 Ceyhan	Adana	Dokuztekne Köyü
TSP 9342 Ceyhan	Adana	Kızıldere Köyü
TSP 9343 Kadirli	Adana	Yukarıbozkuyu Köyü
TSP 9344 Kadirli	Adana	Topraktepe Köyü
TSP 9345 Kadirli	Adana	Cıgıcık Köyü
TSP 9346 Kozan	Adana	Zerdali Köyü
TSP 9347 Kozan	Adana	Poskabasakal Köyü
TSP 9348 Kozan	Adana	Akdam Köyü
TSP 9349 Kozan	Adana	Gazi Köyü
TSP 9350 Osmaniye	Adana	Selimiye
TSP 9352 Hilvan	Ş Urfa	Üçüzlen Köyü
TSP 9353 Hilvan	Ş Urfa	Faik Köyü
TSP 9354 Hilvan	Ş Urfa	Özbaş Köyü
TSP 9355 Hilvan	Ş Urfa	Hilvan Merkez-Konçik Mezra
TSP 9356 Hilvan	Ş Urfa	Merkez İlçe
TSP 9359 Cizre	Şırnak	Dirsekli Köyü (koyu renkli)
TSP 9360 Cizre	Şırnak	Dirsekli Köyü (açık renkli)

Olgunlaşma ile birlikte her populasyondan örneklenen 10 bitki toplu olarak sökülüp çuval içinde tarlada kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan tohumlar çuvala çırpılmıştır. Populasyonları temsil eden bu bitkiler populasyon analizinde kullanılmak üzere morfolojik ve tarımsal özellikleri bakımından değerlendirilmiştir. Populasyon analizlerinde Çizelge 3.4.'de verilen morfolojik ve tarımsal özellikler kullanılmıştır (Baydar 1997).

Çizelge 3.4. Populasyon Analizinde İncelenen Özellikler

Morfolojik Özellikler		Numaralandırma
Çiçeklenme Zamanı		
Erkenci	(30-40 gün arasında çiçeklenme)	0
Orta erkenci	(40-50 gün arasında çiçeklenme)	1
Orta geççi	(50 gün sonunda çiçeklenme)	2
Dallanma durumu		
Az dallı	(dal sayısı 3'den az)	0
Çok dallı	(dal sayısı 3'den fazla)	1
Yaprak koltuğunda kapsül sayısı		
Monocapsulle	(tek kapsüllülük)	1
Tricapsulle	(üç kapsüllülük)	2
Kapsülde karpel sayısı		
Bicarpellatum	(iki karpelli= 4 lokuslu)	2
Quadricarpellatum	(dört karpelli= 8 lokuslu)	3
Tohum kabuğu rengi		
Koyusarı	0	
Beyaz -açıksarı	1	Beyaz- koyu sarı 2
Koyusarı-açikkahverengi	3	Puslu açıksarı- açikkahverengi 4
Parlak koyusarı-koyukahverengi	5	Beyaz 6
Açıksarı- koyukahverengi	7	Açıksarı-koyukahverengi-Siyah 8
Kapsül dizilişi		Kapsül Tüylülüğü
seyrek düzenli	0	tüysüz 0
sık-seyrek düzenli	1	kısa-seyrek 1
sık-düzenli	2	kısa-sık 2
seyrek-sık düzenli	3	uzun-seyrek 3
seyrek düzensiz	4	uzun-sık 4
sık düzensiz	5	
Tarımsal Özellikler		
Bitki Boyu (cm)		
İlk kapsül yüksekliği (cm)		
Ana sapta kapsül sayısı (adet/ana sap)		
Bitkide kapsül sayısı (adet/bitki)		
Kapsülde tohum sayısı (adet/kapsül)		
1000 tane ağırlığı (g)		

3.1.3.1. Ölçüm ve değerlendirmeler

Her populasyondan 10 bitki örneklenerek yapılan çalışmada;

İlk Kapsül Yüksekliği ve Bitki Boyu: Bitkilerin toprak yüzeyinden itibaren ilk kapsülün çıktığı boğuma kadar olan uzunluğu ölçülerek ilk kapsül yüksekliği (cm) ve toprak yüzeyinden en üstteki kapsülün ucuna kadar olan uzaklık ölçülerek bitki boyu bulunmuştur (cm).

Bitkide ve Ana Sapta Kapsül Sayısı: Ana sapta bulunan gelişmiş kapsüller sayılarak ana sapta kapsül sayısı ve tüm bitki üzerindeki toplam kapsül sayısı ile bitkide kapsül sayısı (adet/bitki) belirlenmiştir.

Yaprak Koltuğunda Kapsül Sayısı: Önemli bir genetik özellik olan yaprak koltuğunda kapsül sayısı (Baydar 1997), populasyonların ayırımında kullanılan önemli değişkenlerdendir (Hiltebrandt 1932). Boğumda oluşan kapsül sayısına göre tek ve üç kapsüllü olmak üzere nümerik olarak değerlendirilmiştir.

Kapsülde Tohum Sayısı: Örneklenen her 10 bitkiden rastgele alınan üçer kapsülün tohumları sayılıp ortalamaları alınarak kapsülde tohum sayısı (adet/kapsül) bulunmuştur.

1000 Tohum Ağırlığı: Her populasyondan örneklenen 10 bitkiye ait 100'er adet susam tohumu tartılarak bulunmuştur (g)

Kapsülde Karpel Sayısı: Populasyonlar kapsülde karpel sayısına göre iki karpelli "*ssp. bicarpellatum* Hilt." ve dört karpelli "*ssp. quadricarpellatum* Hilt." olmak üzere (Hitebrandt 1932) gruplandırılıp nümerik olarak değerlendirilmiştir.

Kapsül Tüylülüğü: Her populasyona ait örneklenen 10 bitkide susam kapsüllerinin tüylülüğü tüysüz, kısa-seyrek, kısa-sık, uzun-seyrek, uzun-sık olmak üzere beş özellik (Demir 1962) nümerik olarak değerlendirilmiştir.

Dallanma Durumu: Çalışmada her popülasyonda 3'den az yan dala sahip olanlar az dallanan ve 3'den çok yan dala sahip popülasyonlar ise çok dallanan olarak sınıflandırılmıştır (Hiltebrandt 1932).

Çiçeklenme Zamanı: Susamların ilk çiçeklenme zamanına göre erkenci, orta erkenci ve geç (Baydar 1997) olarak çiçeklenme zamanı tespit edilmiştir.

Tohum Kabuğu Rengi: Susam popülasyonlarına ait tohumlar birbiri ile karşılaştırılarak beyazdan siyaha kadar değişen farklı renkler belirlenmiştir. Renkler nümerik olarak değerlendirilmiştir.

Kapsül Dizilişi: 10 bitkide gövde üzerinde sıralanan kapsüller, seyrek-düzenli, sık düzenli, sık-seyrek düzenli (sık kapsüllü bitki sayısı daha fazla ise), seyrek-sık düzenli (seyrek kapsüllü bitki sayısı daha fazla ise), seyrek düzensiz ve sık düzensiz olmak üzere her birine bir numara vermek sureti ile gruplandırma yapılmıştır.

1.1.2.2.2. Yetiştirme teknikleri

Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Deneme Tarlasında yapılan susam tarımında sırasıyla uygulanan tarla hazırlığı ve bakım işlemleri şöyledir:

Deneme alanı önce, sürüm işlerinde problem olacak iri taşlardan temizlenmiştir.

Toprak tavlı olduğu dönemde 10-15 cm derinliğinde soklu pulluk ile sürülüp arkasından disk-harrow çekilmiştir.

Saf madde üzerinden dekara 5 kg N, 5 kg P_2O_5 ve 5 kg K_2O olacak şekilde gübre atılmıştır.

Tapan geçirilerek toprak ekime hazır hale getirilmiştir.

Markör yardımı ile 50 cm sıra arası belirlenerek ekim yapılmıştır.

Fide çıkışından bir hafta sonra sıra üzeri 10 cm olacak şekilde el ile seyreltme yapılmıştır.

Gelişmeyi takiben yabancı ot kontrolünün yanı sıra boğaz doldurmak içinde el çapası ile bakım işleri yapılmıştır. Sulama, yağmurlama sulama olarak yapılmıştır (Şekil 3.2). Alttaki kapsülleri sararan susam bitkileri elle sökölüp teliz torbalara yerleştirilerek gölgede kurumaya bırakılmıştır. Daha sonra torbanın içine bitkiler çırpılarak tohumlar elde edilmiştir.



Şekil 3.2. Bakım İşlemleri Yapılmış Susam Populasyon Ekim Alanı

3.1.4. İstatistiksel değerlendirmeler

Çalışmada kullanılan 52 populasyonda 13 farklı özellik (Bitki boyu=Bit.boy, Kapsül yüksekliği=kap yuk, Bin tane ağırlığı=1000TA, Yaprak koltuğundaki kapsül sayısı=YKKS, Kapsüldeki karpel sayısı=KKS, Kapsül Tüylülüğü=Kap.Tüy, Dallanma, Çiçeklenme zamanı=Çi.zam., Tohum rengi=Toh.ren, Kapsüldeki tohum sayısı=KTS, Ana saptaki kapsül sayısı=ASKS, Tüm bitkideki kapsül sayısı=TBKS) incelenmiştir. Değişkenlerin istatistiksel analizde kullanılması amacıyla transformasyonunun yapılması gerektiği için adet olarak tespit edilen kapsüldeki tohum sayısı (KTS), ana saptaki kapsül sayısı (ASKS) ve tüm bitkideki kapsül sayısı (TBKS) değişkenlerinin karekökleri alınmıştır. Bu değişkenlerin karekökleri alındığı zaman normal dağılım göstermiştir.

İncelenen değişkenlerin ortalama ve standart sapma gibi temel istatistikleri hesaplanarak özellikler arasındaki ilişki korelasyon analizi ile belirlenmiştir. 13 değişken arasındaki bu

temel bileşenler analizi ile desteklenmiştir. Korelasyon analizi SAS (SAS, Institute) paket programı, temel bileşenler analizi ise MINITAB paket programı kullanılarak yapılmıştır.

Korelasyon ve temel bileşenler analizlerinden elde edilen sonuçlardan yararlanarak verilerde bağımlılığın düşük olduğu tespit edilen değişkenler kullanılarak populasyonları alt gruplara kümelemek için kümeleme analizinden faydalanılmıştır. x_i ve x_j gözlem birimleri arasındaki $d(x_i, x_j) = d_{ij}$ uzaklık değerini belirlemek amacıyla öklit uzaklığından yararlanılmıştır (Tatlidil, 1996). Kümeleme analizi hiyerarşik kümeleme analizinde tek bağlantı tekniği ile yapılmıştır. Teknikte önce iki yakın birim birleştirilir sonra çok yakın sonuçlardan oluşan birimleri içeren grupla bağlanır (Digby vd.1987). Kümeleme analizi MINITAB paket programı kullanılarak yapılmıştır. Bunun dışında SPSS 8.0 paket programı ile de kümeleme analizi yapılmıştır. Elde edilen benzerlik oranları ve dendogram MINITAB ile yapılan analizden elde edilen sonuçlarla aynı olmuştur.

2. RAPD Markerleri ile İlgili Çalışmalar

2.1. Materyal

DNA izolasyonu için bitki materyali, Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Üretim Bölümü iklim odalarında 26 °C sıcaklıkta 16 h aydınlık 8 h karanlık koşullarında saksılarda yetiştirilmiştir. Bitki genomik DNA'sı, ortalama 10-12 gün sonunda köklerin kotiledon yapraklarından sonra çıkan ilk gerçek yapraklarından elde edilmiştir.

2.2. Metod

Çalışmada Dellaporta vd. (1985) tarafından geliştirilen DNA ekstraksiyonu yöntemi modifiye edilerek aşağıdaki işlem sırasıyla yapılmıştır.

0.075 g 10-12 günlük genç yapraklar sıvı nitrojen yardımı ile dondurularak havanda toz haline gelinceye kadar ezilmiştir.

- b. Pudra halindeki yapraklar üzerine 400 µl DNA ekstraksiyon çözeltisi (Çizelge 3.5) eklenerek homojen bir karışım oluncaya kadar havanda karıştırılmıştır. Daha sonra eppendorf tüplere alınarak % 10'luk 50 µl SDS ilave edilmiştir. Eppendorf tüplere hafifçe vurularak karıştırılmıştır.
- c. Tüpler daha sonra 65 °C'de 12 dk. su banyosunda tutulmuştur. İnkübasyon süresince eppendorf tüpler ara sıra dikkatle ters yüz edilerek karıştırılmıştır.

Çizelge 3.5 DNA Ekstraksiyon Çözeltisi (100mM Tris-HCl pH 8.0, 50mM EDTA pH 8.0, 500mM NaCl, 10mM 2-mercaptoethanol). 100 ml için:

2.0 M Tris-HCL pH 8.0	5 0 ml
0.5 M EDTA pH 8 0	10.0 ml
5.0 M NaCl	10.0 ml
2-mercaptoethanol	70.0 µl

- d. Sıcak su banyosundan çıkartılan tüplere 5M 125 µl potasyum asetat ilave edilerek yine parmakla hafif fiskeler vurularak karıştırılmıştır. Bundan sonra 5 dk. buzda bekletmeye alınmıştır.
- e. Bu işlemten sonra 200 µl kloroform:octanol çözeltisi (24:1) ilave edilerek 4 °C'de 10000 rpm'de 45 dk santrüfj yapılmıştır. Santrüfukasyon sonrası SDS/protein peletinin üstünde oluşan süpernatant temiz bir tüpe alınarak -20 °C'den çıkarılan 375 µl soğuk isopropanol ilave edilmiştir. Tüp dikkatle ileri geri hareket ettirilerek karıştırılmış ve ardından -20 °C'de 30 dk inkübe edilmiştir.
- f. İnkübasyondan sonra 10 000 rpm'de 20 dk 4 °C'de santrüfj yapılmıştır ve tüpün tabanında oluşan peletin üstündeki sıvı atılmıştır. Pelet % 80'lik etil alkolle üç kez yıkandıktan sonra 50µl TE içinde çözülmüştür.
- g. Ortamdaki RNA'yı uzaklaştırmak için 2.5 µl RNaz enzimi eklenerek su banyosunda 37°C'de 30 dk bekletilmiştir. Daha sonra RNaz uygulanmamış bir DNA örneği kontrol olmak şartı ile RNaz ilave edilmiş DNA örnekler % 0.4'lük agaroz jelde yürütülerek karşılaştırılmıştır. Uygulama sonucu RNaz ilave edilen örneklerde RNA bantları kaybolmuştur.
- h. DNA miktarının belirlenmesi ve polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılması için sulandırma oranlarının hesaplanmasında spektrofotometrik ölçümler yapılmıştır. Destile su ile yapılan 1/200'lük sulandırmalar ile UV- spektrofotometresinde (Shimadzu UV-

160) 260 nm (A_{260}) ve 280 nm (A_{280}) dalga boyundaki absorpsiyon değerlerine bakılarak DNA molekülünün konsantrasyonu hesaplanmıştır

İzole edilen DNA'nın protein ve diğer fenolik bileşiklerle bulaşık olup olmadığını belirlemek için (A_{260}) dalga boyunda okunan absorbans değeri (A_{280}) dalga boyundaki absorbans değerine oranlanmıştır (A_{260}/A_{280}). Çıkan değer 1.8'in altında olması halinde o popülasyonlara ait DNA ekstraksiyonu tekrarlanmıştır. Çünkü değerin 1.8'den düşük olması DNA'da protein ve fenol kontaminasyonunun olduğunu göstermektedir (Maniatis *et al.*, 1982)

2.2.1 DNA ekstraksiyonunda kullanılan çözeltiler

0 M 100 ml Tris-HCl (pH 8.0): 24.22 g trisma base 80 ml destile su içinde çözüldükten sonra son hacmi 100 ml olacak şekilde HCl ile pH 8'e ayarlanmıştır Tris-HCl otoklavlanarak sterilize edilmiştir.

0.05 M 100 ml EDTA: 18.71 g 80 ml destile su içinde çözülmüş ve yaklaşık 2 g NaOH eklenmesi ile pH 8 olacak şekilde son hacim 100 ml'ye tamamlanmış ve daha sonra otoklav edilmiştir.

0 M 100 ml NaCl: 29.22 g NaCl 90 ml su içinde çözüldükten sonra son hacim destile su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır. Otoklavla sterilizasyonu yapılmıştır.

1% 10 SDS: 10 gr SDS 70 ml ddH₂O içinde ısıtılarak çözülmüş ve daha sonra oda sıcaklığında soğutularak toplam hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır. SDS filitre kullanılarak sterilize edilmiştir.

0.1 M 100 ml Potasyum asetat: 49.1 g potasyum asetat ddH₂O içinde çözüldükten sonra toplam hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır.

Tris/EDTA (TE) Tamponu: 100 ml için 2 M Tris HCl'den (pH 8.0) 2.5 ml ve 0.5 M EDTA'dan (pH 8.0) 2 ml alınarak son hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır.

10X TAE Tamponu (1 L): 242 g tris base, 57.1 ml glacial acetic acid ve 100 ml 0.5 M EDTA içinde çözüldükten sonra toplam hacim 1L'ye tamamlanmıştır. TAE tamponu oda sıcaklığında saklanmıştır.

1X TAE Tamponu (1 L): 50X TAE tamponundan 20 ml alınıp çözeltinin hacmi 1 L'ye tamamlanmıştır.

RNase: Sigma'dan temin edilen Ribonuclease A (RNase), önerilen şekilde 10 mM Tris-HCl pH 7.5 ve 15 mM NaCl içinde konsantrasyon 10 mg/ml olacak şekilde çözülmüştür. Elde edilen RNase stokundan 50 µl'lik DNA'lara her örnek için 50 µg/ml olacak şekilde eklenmiştir.

16X Loading Buffer (10 ml): 4 g sucrose, 25 mg Bromophenol Blue Dye, 2.4 ml 0.5 M EDTA steril ddH₂O ile son hacim 10 ml'ye tamamlanmıştır.

Ethidium Bromid: 0.1 mg ethidium bromid 10 ml ddH₂O içinde karıştırılarak çözülür. Karanlıkta +4 °C'de saklanır. Hazırlanan ana stok 10 mg/ml Ethidium bromid içermektedir. Gel boyaması yapılacağı zaman 200 µl bu ana stoktan alınarak 1 L suya ilave edilmiş ve koyu renkli şişede kullanıma hazırlanmıştır. Ethidium bromid oldukça kanserojen bir madde olup çalışırken mutlaka eldiven giyilmeli ve etrafa bulaştırılmamaya özen gösterilmelidir.

3.2.2.2. RAPD "Random Amplified Polymorphic DNA" tekniğinin optimizasyonu

RAPD yöntemi (Williams vd. 1990) ile 38 farklı susam populasyonundan elde edilen genomik DNA'lar kullanılarak, genetik akrabalıkları saptanmıştır.

DNA konsantrasyonunun optimizasyonu

Kalıp DNA konsantrasyonu amplifikasyonun başarısı için çok önemli bir faktördür. Tekrarlanabilen RAPD profillerinin elde edilmesi için reaksiyon karışımında bulunması gereken DNA miktarı UV-spektrofotometresinde 260 nm dalga boyundaki absorpsiyon değerinden faydalanılarak hesaplanmıştır (Maniatis ve ark., 1982).

DNA miktarı ($\mu\text{g/ml}$) = Absorbans değeri (OD_{260}) X 50 X Seyreltme Katsayısı

Yukarıdaki formüle göre tüm populasyonlara ait DNA miktarı 1760 ng/ μl -1820 ng/ μl arasında değişmiştir. Konsantrasyonu belli olan bu DNA'lar ikiye bölünüp -20°C 'de muhafaza edilmiştir. Reaksiyon için kullanılan DNA'lar buradan alınmıştır. Her bir DNA örneği 87.5 ng/ μl olacak şekilde TE buffer ile seyreltilmiştir. Kalıp DNA konsantrasyonu diğer bitkiler için ortalama 3 ve 30 ng arasında optimum amplifikasyon vermektedir. Bu sınırın dışında amplifikasyon olmamaktadır. Çalışmada test edilen DNA miktarı 2 ng, 3.5 ng, 7 ng ve 14 ng olmuştur. Uygun DNA miktarı 7 ng olarak tespit edilmiştir.

MgCl₂ Konsantrasyonunun Optimizasyonu

Magnezyum konsantrasyonu primer yapışmasına "annealing", enzim aktivitesine, ürünün belirginliğine ve primer-dimer artifaktlarının oluşumuna etki etmektedir (Pancholi 1995, Devos ve Gale 1992). Düşük konsantrasyonlu MgCl₂ kullanıldığı zaman genellikle düşük verimli ürün veya hiç ürün oluşmazken yüksek konsantrasyonlu Mg iyonu ise istenmeyen ürünlerin oluşmasına neden olmaktadır. Çalışmada 0.5 mM, 1.5 mM, 2 mM, 2.5 mM, 3 mM ve 5.5 mM Mg konsantrasyonu denenmiştir. Elde edilen PCR ürünlerinde 3 mM Mg konsantrasyonu çok sayıda ve parlak bantlar vermiştir. MgCl₂'de Taq Pol enzimi ile birlikte 25 mM olarak (Promega) temin edilmiştir.

Primer konsantrasyonunun optimizasyonu

Primer konsantrasyonu yüksek olduğu durumlarda kalıp DNA'dan bağımsız primer-dimerlerinin ve spesifik olmayan ürünlerin oluşmasına neden olmaktadır (Pancholi 1995, Weeden vd.1992). Çalışmada 10 nükleotidlik 12 farklı primer kullanılmıştır. Bu primerlerin baz dizilişi Çizelge 3.6'da verilmiştir.

Çizelge 3.6 RAPD Analizinde Kullanılan Primerler ve Baz Dizilişleri

İsim	Dizi (5'.....3')
K1	TTGGCGGCCT
K2	ACCTCGCCAC
K3	GGCTGGTTC
K4	TGCTGGTTC
K5	ACGGGCCAGT
K6	CTGCGCIGGA
K7	ACCTGGGGAG
K8	GAGGTCCACA
K9	GTCAGTGC GG
K10	ACAGCCCCCA
K11	AGACCCAGAG
K12	CTATGCCGAC

Kullanılan primerlerin nükleotid dizileri rastgele seçilmiş olup Guanin/Sitozin oranı en az % 60'dır. Susam için kullanılan primer konsantrasyonu 5 pmol, 10 pmol, 12.5 pmol, 25 pmol ve 50 pmol olmak üzere test edilmiştir. Yapılan optimizasyon sonucu her bir primerden 25 pmol kullanılması uygun bulunmuştur.

dNTP konsantrasyonunun optimizasyonu

Deoxynucleotide triphosphate (dNTP) konsantrasyonunun düşük miktarda kullanımı PCR'ın güvenilirliğini arttırmaktadır. Düşük dNTP konsantrasyonu nükleotidlerin yanlış bağlanma olasılığını azaltır (Pancholi 1995, Göçmen 1994). Çalışmamızda yanlış bağlanma hatasını azaltmak için 0.02 mM, 0.04 mM, 0.08 mM, 0.1 mM ve 0.2 mM olmak üzere 5 farklı dNTP konsantrasyonu denenmiştir. Deneme sonunda en iyi sonuç veren dNTP konsantrasyonu 0.2 mM olarak belirlenmiştir. Çalışmada dATP, dGTP, dCTP, dTTP'den

kadar soğutulduktan sonra tarak yerleştirilmiş jel tepsisine hava kabarcığı olmayacak şekilde dökülmüştür. Katılaştıran agaroz jel daha sonra 1XTAE buffer içeren tanka yerleştirilmiştir. PCR ürünlerini jelde yürütmek için 20 µl örnek alınarak 3 µl loading buffer ilave edilmiş ve yükleme yapılmıştır.

Sonuçta "low melting" ve "high melting" agaroz karıştırılarak hazırlanan jelde PCR ürünleri 75 V'ta 250 amper akım uygulanarak 1.45 saat yürütülmüştür.

Yürütme tamamlandıktan sonra DNA bantları ethidium bromid ile 45 dk boyanarak UV transiliminatörü altında gözlenmiştir. RAPD profillerinin fotoğraf çekimleri için video kamera kullanılmıştır. Video kameradan alınan görüntüler fotoğraf filmine aktararak oldukça olumlu sonuçlar alınmıştır.

3.2.2.4. İstatistiksel değerlendirmeler

Genetik ilişkinin belirlenmesi için kümeleme analizinde "unweighted pair group method of arithmetic analysis" (UPGMA) kullanılmıştır. Kullanılan 12 primere ait RAPD bantlarının varlığı (1) veya yokluğuna (0) göre oluşturulan veriler, her populasyonların kendi aralarında paylaştıkları amplifikasyon ürünlerinin sayısına dayanarak benzerlik tahmin edilmiştir (Nei ve Li 1979). İstatistiksel değerlendirme için uygulanan adımlar aşağıda verilmiştir.

▪ Amplifikasyon profili, bantların varlığı (1) veya yokluğuna (0) göre değerlendirilmiştir.

▪ Nei ve Li'nin (1979) katsayı analizi yapılmıştır;

a. $S_{ij} = 2N_{ij} / (N_i + N_j)$ veya

$$\frac{2 \times i \text{ ve } j \text{ arasındaki ortak bant sayısı}}{i \text{ ve } j \text{ arasında toplam bant sayısı}}$$

b. Ortalama Primerin $\sum N_{ij}$ veya

i ve j'nin toplam benzerlik indeksi

toplam primer sayısı

Benzerlik Matrisinin oluşturulması ve benzerlik matrisine dayanarak $1-S_{ij}$ =genetik uzaklık formülü ile genetik uzaklık matrisinin oluşturulması

Benzerlik matrisini kullanarak, populasyonları kümelemek için UPGMA ile dendogram oluşturulmuştur.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Morfolojik Özelliklerin Değerlendirilmesi

Farklı bölgelerden toplanan susam populasyonları, çiçeklenme zamanı, dallanma durumu, yaprak koltuğunda kapsül sayısı, kapsülde karpel sayısı, tohum kabuğu rengi, kapsül tüylülüğü, kapsül dizilişi, bitki boyu, ilk kapsül yüksekliği, ana saptaki kapsül sayısı, tüm bitkide kapsül sayısı, kapsülde tohum sayısı, 1000 tane ağırlığı olmak üzere 13 farklı özellik bakımından değerlendirmeye alınmıştır. Bu özellikler, Demir (1962) tarafından bildirilen kapsül sıklığı, dallanma, kapsülde karpel sayısı, yaprak koltuğunda gelişen çiçek sayısı, kapsül bağlama yüksekliği, bitki boyu ve kapsülde yan zarların gelişimi gibi değişkenlerin yanı sıra, Baydar'ın (1997) değerlendirmeye aldığı, ana saptaki kapsül sayısı, tüm bitkide kapsül sayısı, kapsülde tohum sayısı, 1000 tane ağırlığı ve çiçeklenme zamanı gibi değişkenlere göre seçilmiştir. Patil ve Sheriff (1994), susamda incelediğimiz 13 değişkenden farklı olarak kapsül uzunluğu, ilk kapsülün uzunluğu, ilk dalın uzunluğu, verim, hasat indeksi, bitki başına tohum verimi, bitki başına yağ verimi ve kapsül çevresi gibi özellikleri de incelemişlerdir.

Araştırmada kullanılan 13 değişkenden elde edilen veri tabloları oluşturulurken değişkenler üzerinde yapılan ölçümler farklı ölçü birimlerinde olduğu için veriler, özellikler arasındaki korelasyon ve kümeleme analizi için girdi olarak kullanılmadan önce bağımsız doğrusal değişkenleri oluşturmak (Beuningen vd 1997) ve değişkenler arasındaki uzaklıkların hesabında hatalı yorumlamayı ortadan kaldırmak için basit bir dönüşümle standartlaştırılmıştır (Türker ve Türker 1994, Singh 1991). Belt ve Brown (1991), pamuk varyetelerinin analizinde standardize edilmiş verileri kullanarak kümeleme analizi yapmışlardır. Ölçüm yaptığımız kapsüldeki tohum sayısı, tüm bitkideki kapsül sayısı ve ana saptaki kapsül sayısına ait veriler adet olarak alındığı için özelliklerin karekökleri alınarak normal dağılım göstermesi sağlanmıştır.

Değişkenlere ait ortalama ve standart sapmadan oluşan temel istatistik sonuçları Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Morfolojik Özelliklere Ait Ortalama ve Standart Sapma

Değişkenler	Ortalama	Standart Sapma
Bitki boyu	137.72	21.75
Kapsül yüksekliği	44.033	20.859
1000TA	3.3908	0.3157
YKKS	0.01923	0.13747
TKS	0.00962	0.09768
Kapsül Tüylülüğü	0.3923	0.9556
Dallanma	0.2058	0.4047
Çiçeklenme zamanı	0.5385	0.5710
Tohum rengi	2.712	2.309
KTS	8.5152	0.4625
ASKS	5.5161	0.6752
TBKS	6.8773	1.3858
Kapsül dizilişi	0.9769	1.1776

Çalışmada kullanılan 13 özellik (p) ve 52 populasyonun her birinden onar bitkinin (52x10) değerlendirilmesi sonucu elde edilen veriler arasındaki ilişkilerin incelenmesinde korelasyon analizi kullanılmıştır. Jeffers vd (1967), temel bileşenler analizini yapmadan önce ön işlem olarak uzunluk ve sayı karışımından olan değişkenlerin korelasyon matrisini bulmuşlardır. 13 değişkenin birbiri ile ilişkisinin incelendiği korelasyon matrisi Çizelge 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.2'nin incelenmesi sonucu, bitki boyu ve kapsül yüksekliği arasında ($r=0.549$) ve çiçeklenme zamanı ile bitki boyu arasında ($r=0.580$) pozitif ve önemli ($p<0.01$) bir korelasyon olduğu görülmüştür. Aynı şekilde ASKS ve TBKS ($r=0.593$), YKKS ve KKS arasında ($r=0.417$), çiçeklenme zamanı ile kapsül yüksekliği arasında ($r=0.458$), kapsül dizilişi ile tohum rengi arasında ($r=0.484$), 1000 TA ve çiçeklenme zamanı arasında ($r=0.189$) pozitif ve önemli ($p<0.01$) korelasyon bulunmuştur. Bununla birlikte kapsül tüylülüğü ile dallanma ($r=-0.194$), KTS ile bitki boyu ($r=-0.131$), çiçeklenme zamanı ve tohum rengi arasında ($r=-0.162$) ve çiçeklenme zamanı ile KTS arasında ($r=-0.202$),

ASKS ile çiçeklenme zamanı arasında ($r = -0.173$) negatif ve önemli ($p < 0.01$) bir korelasyon tespit edilmiştir.

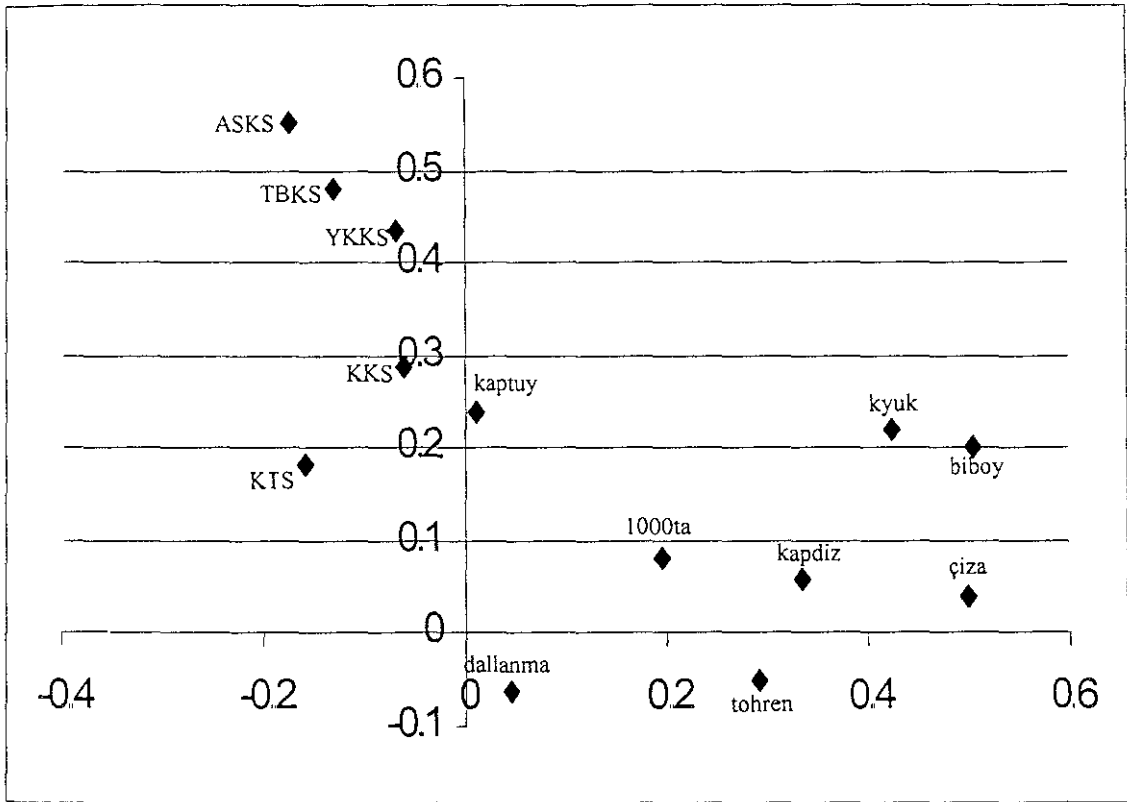
Ancak değişkenler arasındaki bağımlılığın yüksek olmadığı durumda veya değişkenler arası ilişkilerin yapısı hakkında önbilginin desteklenmesi açısından temel bileşenler analizinden yararlanılmaktadır (Türker ve Türker 1994). Buğdayda yapılan bir çalışmada, çeşitlerine ait bilgileri değerlendirmek için standardize edilen verilere temel bileşenler analizi yapılmış ve veriler arasındaki bağımlılık belirlenmiştir (Royo vd 1995). Beuningen vd (1997) ise korelasyon matrisindeki verileri girdi olarak kullanarak temel bileşenler analizi ile özellikler arasındaki ilişkiyi belirlemişlerdir. Hu (1985) ise kültürü yapılan susam tipleri arasında farklılıkları ve karakteristikleri temel bileşenler analizi ile belirlemiştir. Bu bilgiden yola çıkarak, incelediğimiz özellikler, çok değişkenli istatistik yöntemleri içinde değişkenler arasındaki ilişkilerin incelenmesinde en etkili yöntem olan temel bileşenler analizi (Türker ve Türker 1993, Souza vd 1991) ile de değerlendirilmiştir. Elde edilen veriler Çizelge 4.3'de verilmiştir.

Çizelge 4.3'deki özdeğerler incelendiği zaman ilk temel bileşen eksen (PC1) toplam varyasyonun % 19.1'ini, ikinci temel bileşen eksen (PC2) % 12.8'ini ve üçüncü temel bileşen (PC3) eksen ise % 11.6'sını olmak üzere üç eksen toplam % 53.9'unu açıklamıştır. PC4, PC5 ve PC6 eksenleri ile birlikte varyasyonun toplam % 70.6'sı açıklanmıştır.

Çizelge 4.3'de değişkenlere ait ana bileşenler katsayıları incelendiğinde PC1'de bitki boyu (0.504) en yüksek etkiye sahipken bunu olgunlaşma zamanı (0.424) ve kapsül yüksekliği (0.499) izlemiştir. PC2'de ise ASKS (0.552) ve TBKS (0.478) en yüksek değere sahiptir. PC3'de YKKS (-0.434) ve KKS (-0.487) en yüksek etkiye sahip olmuştur. İlk 10 PC eksen genotipler arasındaki varyasyonun % 91.2'sini belirlediği için populasyonlar için değişkenler arasındaki korelasyonun derecesi düşük olmuştur. Bu durum korelasyon matrisinden elde edilen sonuçları daha net olarak açıklığa kavuşturmuştur. Çizelge 4.3'teki değişkenlere ait 1. ve 2. eksen de yer alan değerlerin iki boyutlu düzlemdeki durumları Şekil 4.1'de gösterilmiştir. Şekildeki, birinci ana eksenin pozitif tarafında yer alan bitki boyu,

kapsül yüksekliği, çiçeklenme zamanı, tohum rengi ve 1000 TA değişkenleri korelasyon matrisi incelendiği zaman, söz konusu değişkenler arasında pozitif korelasyonun olduğu görülmektedir. Diğer yandan ikinci eksende kümelenen YKKS, ASKS ve TBKS'nın diğer değişkenlerle arasında zayıf bir korelasyonun olduğu saptanmıştır. Birinci ana eksenin negatif tarafında yer alan dallanma özelliği ise diğer özelliklerle zayıf bir korelasyon göstermesi yanında kapsül tüylülüğü ile arasında da negatif bir korelasyon vardır.

Şekil 4.1. Değişkenlerin İki Boyutlu Düzlemde Gösterilmesi



kapyuk	0.549**												
1000ta	0.226**	0.184**											
YKKS	0.015	0.012	0.041										
KKS	0.001	-0.004	0.049	0.417**									
Kaptuy	0.009	0.072	-0.060	0.177**	-0.040								
dallan	0.060	-0.035	0.048	-0.071	-0.050	-0.194**							
erken	0.580**	0.458**	0.189**	-0.059	-0.024	0.004	-0.030						
kap.diz	0.303**	0.138	-0.052	0.038	-0.032	0.017	0.103	0.276					
toh.ren.	0.186**	0.106	0.045	-0.098	-0.116	0.106	0.086	0.162**	0.484**				
KTS	-0.131**	-0.068	0.006	0.167**	0.072	0.042	-0.024	-0.202**	-0.004	-0.015			
ASKS	-0.042	-0.015	-0.056	0.105	0.052	0.082	-0.024	-0.173**	-0.022	-0.060	0.142		
TBKS	0.013	-0.007	-0.041	0.043	-0.062	0.040	0.120	-0.110	-0.057	-0.084	-0.028	0.593**	

**p≤0.01 düzeyinde önemli

Kümeleme analizinin en farklı grupları tek başına kümelenmesiyle fakat pedigre yönünden yüksek derecede ilişkili olan populasyonları ise mümkün olduğunca tek bir grup içinde toplaması özelliğinden yararlanarak analiz yapılmıştır (Beuningen vd 1997). Çalışmada bu özelliği veren hiyerarşik sınıflandırma yöntemi kullanılmıştır. Çünkü birimlerin geniş kategorilere sınıflandırılması belli çiftlerin arasındaki ilişkiyi vermekten daha uygun olmaktadır (Tatlídil 1996).

Ölçülen özelliklerden birimi cm, gr ve adet olan 6 özellik kantitatif, ordinal (sıralı; nesne veya bireyler bir sıra düzenine sokulur) ve nominal (nesnelerin özelliklerine göre belli adlar altında sınıflar) ölçekten (Çakır, 1994) oluşan diğer 7 özellik ise kalitatif niteliktedir. Verilen ölçü birimlerindeki farklılıktan dolayı başka bir ifadeyle sürekli ve kesikli değişkenlerin birlikte bulunmasından dolayı kümeleme analizinde kantitatif değişkenler alınmıştır. Genetik uzaklığın belirlenmesinde öklit uzaklığı (Tatlídil, 1996) kullanılmıştır. Patil ve Sheriff (1994), Ganesh ve Thangavelu (1995) ise susamda genetik farklılığı belirlemek için Mahalanobis uzaklığına dayanarak kümeleme analizi yapmışlardır.

Yaptığımız çalışmada kantitatif değişkenlerle birlikte kalitatif değişkenlerinde kullanılması durumunda aynı dendogram elde edilmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlar Singh vd (1991) tarafından da desteklenmektedir. Araştırmacılar fasulyede kalitatif değişkenlere normallik analizi yaparak bunları kümeleme analizinde kullanmışlardır. Kalitatif değişkenleri de hesaplamaaya dahil ettikleri zaman, aynı sonuçları elde etmişlerdir. Aynı şekilde Loi vd (1997) sadece kantitatif karakterleri kullanarak kümeleme analizi yapmışlardır. Escribano vd (1998) ise fasulyede hem kantitatif hem de kalitatif değişkenleri birlikte kullanarak kümeleme analizine gitmişlerdir.

	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7	PC8	PC9	PC10	PC11	PC12	PC13
Özdeğer	2.4890	1.668	1.5138	1.3417	1.1999	0.9711	0.8364	0.7666	0.5677	0.5017	0.4187	0.3739	0.3515
Kısmi Varyasyon	0.191	0.128	0.116	0.103	0.092	0.075	0.064	0.059	0.044	0.039	0.032	0.029	0.027
Toplam Var.	0.191	0.320	0.436	0.539	0.632	0.706	0.771	0.830	0.873	0.912	0.944	0.973	1.000
Değişkenler	Özdeğer Vektörü												
Bit.Boy.	0.504	0.202	0.005	0.152	0.017	0.020	-0.123	-0.118	0.071	-0.075	-0.042	-0.789	-0.133
Kap.yük	0.424	0.219	-0.060	0.210	-0.150	-0.101	-0.217	-0.242	-0.412	0.510	0.207	0.314	0.122
1000TA	0.196	0.080	-0.162	0.308	0.212	-0.575	0.510	0.375	0.121	-0.025	0.193	0.053	0.049
YKKS	-0.068	0.433	-0.434	-0.183	0.163	0.160	0.173	-0.155	0.450	0.433	-0.254	0.070	-0.142
KKS	-0.061	0.289	-0.487	-0.019	0.336	0.337	-0.001	0.190	-0.514	-0.336	0.076	-0.032	0.174
Kap.Tüy	0.011	0.237	-0.083	-0.320	-0.565	-0.094	0.479	-0.379	-0.113	-0.303	0.166	-0.024	0.040
Dallanma	0.045	-0.064	0.303	0.050	0.624	0.022	0.285	-0.611	-0.111	-0.110	0.031	0.106	-0.138
Çi.Zam	0.499	0.040	-0.065	0.151	-0.091	0.106	-0.126	-0.007	0.238	-0.495	-0.383	0.482	-0.079
Kap.Diz	0.333	0.059	0.162	-0.516	0.199	0.159	-0.120	0.162	0.322	-0.038	0.579	0.102	0.191
Toh.Ren	0.290	-0.050	0.218	-0.538	0.085	-0.105	0.216	0.292	-0.372	0.191	-0.497	-0.023	-0.059
KTS	-0.160	0.181	-0.137	-0.288	0.170	-0.673	-0.490	-0.208	0.012	-0.197	-0.125	-0.014	0.139
ASKS	-0.175	0.552	0.353	0.040	-0.030	-0.033	-0.115	0.231	-0.103	-0.089	0.154	0.121	-0.642
TBKS	-0.131	0.478	0.475	0.188	0.001	0.090	0.078	0.053	0.098	-0.008	-0.225	-0.028	0.645

Çizelge 4 4'deki 6 kantitatif değişken kullanılarak yapılan kümeleme analizi sonuçlarına göre susam populasyonları arasındaki genetik benzerlik 98.91 ile 76.00, genetik uzaklık ise 1.09-24 arasında değişmiştir.

Çizelge 4.4 Populasyonların Kümeleme Analizi Sonucu Benzerlik ve Uzaklık Düzeyleri

Benzerlik Düzeyi	Uzaklık Düzeyi	Kümeler	Benzerlik Düzeyi	Uzaklık Düzeyi	Kümeler
98.91	1.186	37-50	96.31	4.008	28-40
98.76	1.343	8-47	96.23	4.088	1-12
98.47	1.665	14-29	96.06	4.271	3-4
98.46	1.675	35-37	95.83	4.526	8-36
98.22	1.935	48-52	95.63	4.740	28-43
98.19	1.962	44-54	95.63	4.744	11-42
98.19	1.964	40-48	95.57	4.803	11-44
98.09	2.071	24-38	95.57	4.806	11-16
97.95	2.223	22-23	95.53	4.845	8-28
97.81	2.381	40-46	95.50	4.879	8-53
97.77	2.417	40-49	95.12	5.299	1-3
97.72	2.473	3-17	95.01	5.415	8-11
97.59	2.609	14-18	94.68	5.768	25-34
97.53	2.683	2-13	94.64	5.814	1-2
97.51	2.699	41-45	93.13	7.451	21-22
97.51	2.703	28-56	93.03	7.564	30-33
97.45	2.762	9-10	92.17	8.496	26-30
97.28	2.950	11-24	90.19	10.645	1-7
97.22	3.013	35-55	89.70	11.177	1-8
97.20	3.038	3-9	89.63	11.249	1-19
96.98	3.275	40-41	88.55	12.419	25-32
96.85	3.420	28-39	88.71	13.017	1-32
96.74	3.539	59-60	87.79	13.347	25-26
96.67	3.613	8-14	81.71	19.841	1-25
96.55	3.738	26-59	76.00	26.039	1-16

Aynı bölgeden toplanan populasyonlar arasında yüksek düzeyde benzerlik bulunmasına rağmen, bu tüm populasyonlar için geçerli bir özellik değildir. Çanakkale-Büyükanaftalar'dan (8) ve Adana-Poskabasakal köyünden (47) toplanan populasyonlar arasında yüksek düzeyde (% 98.70) benzerlik tespit edilmiştir. Yine Burdur-İlyas köyü (36) ile Çanakkale-Büyükanaftalar (8) arasında (% 95.83), Manisa-Killik köyü (17) ile Edirne-

Altınyazı (3) köyleri arasında (% 97.72), Manisa-Merkez (14) ve Denizli-Acıpayam (29) arasında (%98.47), yüksek düzeyde benzerlik bulunmuştur. En düşük genetik benzerlik Edirne-Maksutlu köyü (4) ile Manisa Turgutlu (18) (% 76.00) ve Edirne-Maksutlu köyü (4) ile Aydın-Kozandere'den (25) köylerinden (% 81.71) toplanan populasyonlarda tespit edilmiştir. Patil ve Sheriff (1994), 100 susam genotipinde yaptıkları çalışmada ayırdıkları varyetelerin dağılışının coğrafik orijinlerine göre olmadığını belirtmişlerdir. Yine Ganesh ve Thangavelu (1995) 50 susam varyetesinde yaptıkları kümeleme analizinde coğrafik farklılığın genetik farklılıkla bir ilişkisinin olmadığı sonucu ile bizim sonuçlarımızı desteklemektedir. Dendogramın incelenmesi ile (Şekil 4.2) aynı bölgeden toplanan populasyonların farklı ve hatta birbirine uzak bölgelerden toplanan populasyonlar ile aynı gruplarda yer alabildiği görülmektedir.

Populasyonların benzerlik düzeylerine göre yapılan dendogramdan (Şekil 4.2) yararlanarak tüm populasyonlar 7 gruba ayrılmıştır;

I.Grup: Şırnak-Cizre Dirsekli (59-60) köylerinden toplanan iki populasyon arasındaki genetik farklılık düşük olup (% 3.539), Aydın-Bozdoğan Haydere (26) populasyonu ile birleşmektedirler. Bunlar arasındaki genetik farklılık % 3.378 olarak bulunmuştur. Bu grupta aynı zamanda Denizli-Acıpayam Gümüş (30), Muğla -Ortaca Ekşiliyurt (33), Muğla-Dalaman (32), Muğla-Köyceğiz (34) ve Aydın-Bozdoğan Kazandere (25) populasyonları da yer almaktadır. Ege Bölgesinden toplanan populasyonların çoğunlukta olduğu bu grupta, Güneydoğu Anadolu Bölgesinden de iki populasyon (Şırnak-Cizre Dirsekli (59-60)) yer almıştır. Her iki populasyonda, Ege bölgesinden toplanan diğer populasyonlarla bitki boyu bakımından, TBKS ve ASKS bakımından oldukça benzer bulunmuşlardır.

II. Grup: Bu grubu Urfa-Hilvan Merkez (56), Konçik (55), Faik (53) ve Uçüzlen (52) köyleri, Adana-Osmaniye (50), Adana-Kozan Gazi (49), Akdam (48), Zerdali köyleri (46), Adana-Kadirli Çıglık (45), Y. Bozkuyu köyleri (43), Adana-

Ceyhan Dokuztekne (41), Gündoğan (40), Yeşildam köyleri (39), Burdur-Bucak (37), Muğla Fethiye (35), Denizli-Acıpayam Kumavşarı (28) köylerinden toplanan populasyonlar oluşturmaktadır Adana-Ceyhan Gündoğan (40), Adana-Kozan (48-49) ve Urfa-Hilvan Üçüzlen (52) köyleri arasındaki benzerlik oldukça yüksektir (% 98.22). Adana-Ceyhan Dokuztekne (41) ve Kadirli-Çıglık (45) köyleri arasındaki benzerlik ise % 97.95 olarak bulunmuştur.

Çoğunluğunu Güneydoğu Anadolu ve Güney Bölgelerinden toplanan populasyonların oluşturduğu bu gruba, aralarındaki genetik farklılık % 1.343 ile % 4.526 arasında değişen Manisa-Turgutlu Merkez (14), Manisa-Alaşehir Hacıaliler köyü (18), Denizli-Acıpayam Kumavşarı (28) ve Gümüş köyleri (29), Burdur-Keçiborlu (36), Çanakkale-Eceabat (8) ve Adana-Kozan Poskabasakal (47) populasyonlarından oluşan grup bağlanmıştır. Bu şekilde II. grup oluşmuştur.

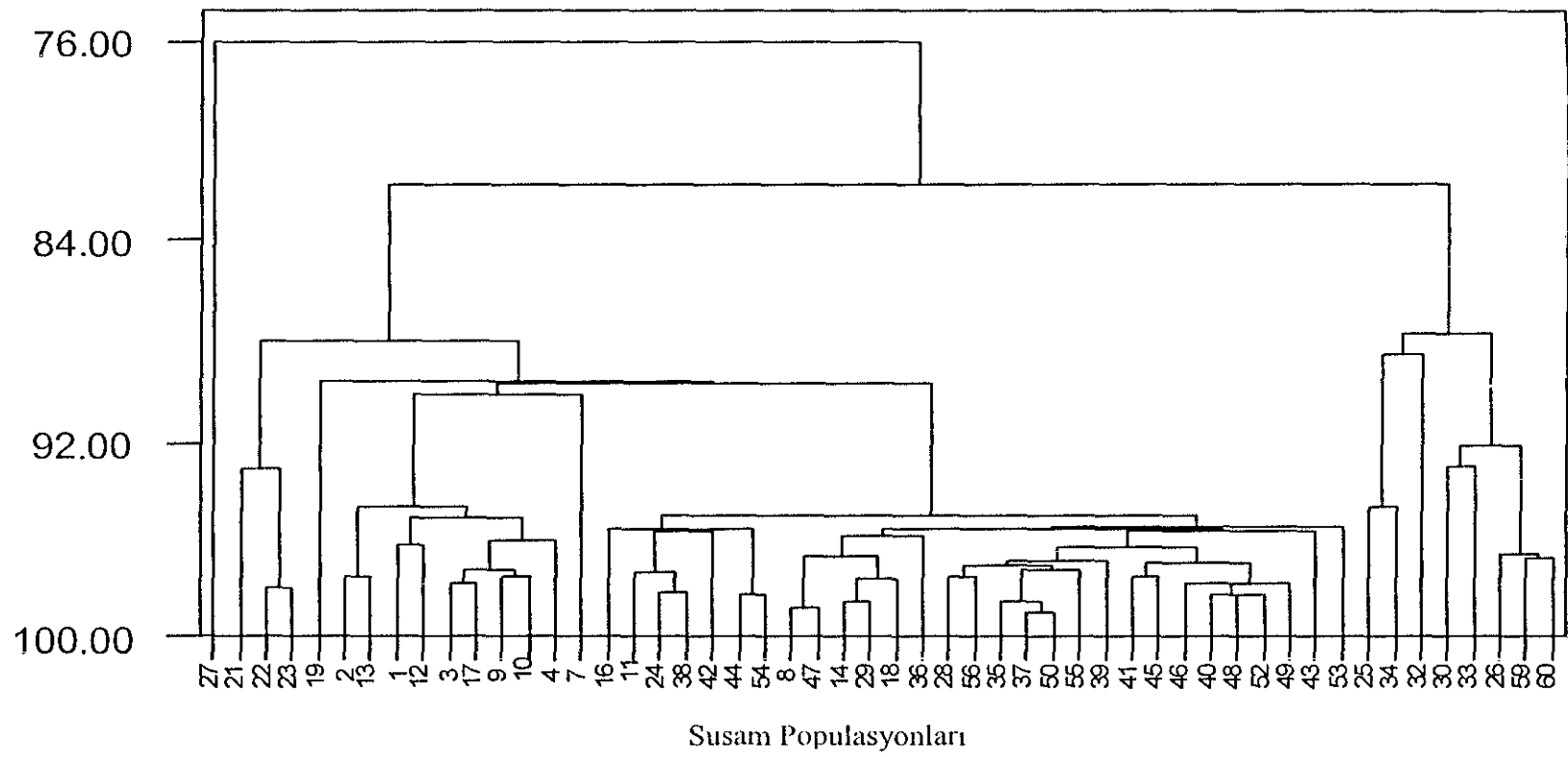
Grup: Adana-Kadirli Topraktepe (44), Urfa-Hilvan Özbaş (54), Adana-Ceyhan Kızıldere (42), İçel-Mut (38), Aydın-İncirliova (24), Manisa-Turgutlu Merkez (16), Çanakkale-Lapseki Taştepe (11) populasyonlarının oluşturduğu III. grupta % 1.962-4.806 arasında genetik farklılık bulunmaktadır.

Grup: Edirne-Uzunköprü Maksutlu (1), Altinyazı (3), Balaban köyleri (4), Edirne-Meriç Kavaklı (7), Çanakkale-Lapseki Çavuşköy (9), Alpagat (10), Dışbudak (12), Manisa-Alaşehir Killik (17), Tepeköy (19) populasyonlarından oluşan bu grup görüldüğü üzere Trakya ve Ege bölgesi populasyonlarından oluşmuştur.

Grup: Bu grupta Manisa-Alaşehir Tepeköy (19)'den toplanan populasyonlar yer almaktadır. Kendine en yakın grup olan IV grup içindeki Edirne-Maksutlu (1) köyünden toplanan populasyon ile aralarında % 11.25 polimorfizm vardır.

Grup: Bu grubu İzmir'den toplanan üç populasyon (21-22-23) oluşturmaktadır. İzmir-Menemen Çavuşköy (22) ve İzmir-Menemen Türkeliköyü (21) populasyonları arasında % 7.451'lik bir polimorfizm belirlenmiştir. İzmir-Menemen Çavuşköy (22) ve İzmir-Menemen Kesikköyü (23) arasında ise % 2.223 polimorfizm bulunmuştur. Nitekim İzmir-Menemen Çavuşköy ve Kesikköylerinden toplanan populasyonların tohum renkleri beyaz ve açık sarıdan oluşmaktadır. İzmir-Menemen Türkeliköyü populasyonları tohum renkleri ise tamamen beyazdır.

Grup: Denizli-Güney Çorbacılar'dan (27) toplanan populasyon tek başına bir grup oluşturmuştur.



Şekil 4.2. Susam Populasyonlarının Morfolojik Özelliklerinin Öklit Uzaklığına dayanarak Yapılan Dendogramı (Numaralara ait bilgiler Çizelge 3.3'de verilmiştir).

Çizelge 4.5. Susam Populasyonlarının Gruplara Göre Kantitatif Değişkenlerinin Ortalama Değeri

Kenler	Gruplar						
	I. Grup	II. Grup	III. Grup	IV. Grup	V. Grup	VI. Grup	VII. Grup
Boyu	169.72	140.62	143.54	113.89	130.50	117.00	174.10
p. Yük.	74.30	43.70	36.34	24.67	59.80	46.90	88.80
s	29.82	30.75	31.41	30.65	30.10	33.80	31.80
s	55.37	50.22	54.42	55.49	43.30	60.80	49.50
	68.55	73.25	74.65	71.45	73.40	77.30	75.90
TA	3.57	3.33	3.46	2.90	3.18	3.48	3.49

Çizelge 4.5. incelendiği zaman VII. Grup ve I. Grupta en yüksek bitki boyu (174.1-72) ve ilk kapsül yüksekliğine (88.80-74.30) sahip populasyonları bulunmaktadır. Bu populasyonlarla birlikte VI. grupta, kapsülde tohum sayısı (77.30), tüm bitkideki kapsül sayısı (80) ve ana saptaki kapsül sayısı (33.80) fazla olan populasyonlar yer almaktadır. Bin gram başına ağırlığı yüksek olan populasyonlar ise I. Grup (3.57), VII. Grup (3.49), VI. (3.48) ve III. (3.46) gruplarda toplanmışlardır. IV. Grupta, kısa boylu (113.89), ilk kapsül yüksekliği (24.67) daha az olan populasyonlar bulunmaktadır. Kapsüldeki tohum sayısı bakımından II. Grupta bulunan populasyonlardan birbirine yakın değerler elde edilmiştir.

Morfolojik özelliklere göre yapılan grupta, susam populasyonlarından her grupta en yüksek oranın yüksek olanları alınmıştır. Bu alınan 38 populasyon moleküler analiz için kullanılmış ve populasyonlar arasındaki genetik farklılık RAPD tekniği ile analiz edilmiştir.

RAPD Markerleri İle Populasyonların Değerlendirilmesi

DNA izolasyonunun optimizasyonu

Susam bitkisinde yapılan DNA izolasyonu optimizasyonu çalışmalarında, yaprakların zamanının büyük önem taşıdığı açığa çıkmıştır. 15-20 günlük bir bitkinin üstteki genç yapraklarının alınması durumunda polisakkaritlerden dolayı temiz bir DNA izolasyonu yapılamamıştır. Bu DNA'larla yapılan RAPD analizi sonucu populasyonların büyük bir kısmında amplifikasyon gerçekleşmemiştir. Nitekim Li ve Midmore (1999), polisakkaritlerin enzimi inhibe ederek DNA amplifikasyonunu engellediğini bildirmişlerdir. Çözümlenirler, DNA ekstraksiyonundaki kirliliğin primerin bağlanmasına olumsuz yönde etki ederek, kontrol edilemeyen amplifikasyon ürünlerinin oluşmasına neden olduğunu bildirmişlerdir. Aynı zamanda Boiteux vd (1999) polisakkaritlerin polimeraz, ligaz ve restriksiyon endonükleaz aktivitesini azalttığını ve kirli DNA'lar ile yapılan PCR sonuçlarının genetik farklılığın hatalı yorumlanmasına neden olduğunu bildirmişlerdir. Bu nedenle susamda problem olan polisakkaritlerin uzaklaştırılması için bitki materyalinin toplanma zamanına dikkat edilmiştir. Saksılara ektiğimiz tohumlardan kotiledon yapraklardan toplanan ve sonra çıkan ilk genç yapraklar DNA izolasyonu için kullanılmıştır. Bunun yanı sıra, ekstraksiyonda 1M'dan daha yüksek konsantrasyonlu potasyum asetatın SDS ile birlikte kullanılması protein ve polisakkaritlerin uzaklaştırılmasında etkili olmuştur (Draper vd 1988). Bu şekilde elde ettiğimiz materyal kullanılarak Dellaporta'nın DNA izolasyon yöntemi (Dellaporta vd 1985) proteinleri denatüre etmek için (Draper vd 1988) 2-merkapto-etanol ilavesi yapılarak ve santrüfuj süreleri artırılıp temiz ve kaliteli DNA izolasyonu yapılmıştır. Parani vd (1997) ise susam yapraklarındaki mukilajı Kuske ve Patrick tarafından geliştirilen izolasyon metodu ile uzaklaştırmışlardır.

Susamda DNA izolasyonunda, yaprakların dondurulup ezilmesi için sıvı nitrojen ve kuru buz ile denemeler yapılmıştır. Bu denemeler sonunda, kuru buz kullanıldığı zaman yaprakların iyi ezilemediği için DNA izolasyonunda başarı sağlanamamıştır. Sıvı nitrojen

anılması halinde ise, yapraklar kolaylıkla toz haline getirilinceye kadar ezilmiş ve raksiyonda başarı sağlanmıştır

Boiteux vd (1999), Dellaporta'nın metodunu diğer metotlarla karşılaştırdıklarında temin uzun zaman almasına rağmen tohum, kök gibi problemli dokularda DNA asyonunun oldukça başarılı olduğunu bulmuşlardır. Bununla birlikte Lange vd (1998), laporta yöntemini tek kişinin bir günde, 96 soya bitkisinden izolasyon yapabilecek ilde modifiye etmeyi başarmışlardır. Bizim çalışmamızda ise, bir günde 24 örnekten A izolasyonu yapılabilir. Pessino vd (1997), mısırdaki DNA izolasyonu için landıkları Dellaporta yöntemini ekstraksiyon çözeltisine PVP ekleyip buzda daha uzun e örnekleri bekletmek sureti ile modifiye etmişlerdir. Koller vd (1993), elma DNA'sının lasyonunda kullandıkları Dellaporta yöntemini, kloroform ve isoamilalkol ekleyerek difiye etmişlerdir. RNA'ların PCR amplifikasyonunu engelleyeceği düşünülerek (Pikaart Villeponteau 1993), izole edilen DNA'da bulunan RNA'lar 50 µg/ml RNaz ilavesi ile aklaştırılmıştır.

2. DNA amplifikasyon koşullarının optimizasyonu

2.1. DNA konsantrasyonunun optimizasyonu

Susam'da DNA amplifikasyon koşullarının optimizasyonunda DNA miktarının değiştirilmesi amplifikasyonda oluşan bant sayısını değiştirmiştir Strand vd (1996), PCR inlerinin sayısının genomik DNA ile primere dayandığını ve RAPD prosedüründe llanılacak olan kalıp DNA ve primerin etkili hibridizasyonunun önemli olduğunu dirmişlerdir. Yaptığımız çalışmada 25 µl'lik reaksiyon tüplerinde 2 ve 3.5 ng DNA 'da e bant oluşmadığı, 7 ng kalıp DNA'nın ise en iyi amplifikasyonu oluşturduğu otanmıştır. Williams vd (1990), DNA konsantrasyonunun azalmasının, Palumbi vd, 991) ise yüksek DNA konsantrasyonunun "smeare" neden olduğunu bildirmişlerdir. ptığımız çalışmada da DNA konsantrasyonu 14 ng'a çıkarılması durumunda belirgin mayan "smearli" bantlar oluşmuştur (Çizelge 4.6). Aynı şekilde Devos ve Gale (1992),

İktarının düşük olmasının farklı görünüşte bantlar oluşturduğunu, miktarın artması da ise spesifik olmayan amplifikasyonun olduğunu bulmuşlardır. Bununla birlikte vd (1997), susamda hibritlerin belirlenmesi için yaptıkları çalışmada RAPD de 30-40 ng genomik DNA kullanmışlardır. Bu miktarla bizim kullandığımız arasındaki farklılığın DNA miktarının ölçülmesinde ve DNA'nın izolasyonunda an yöntemlerin farklılıklarından kaynaklanabileceği düşünülebilir (Pancholi 1995). : vd (1992), RAPD analizinde *Brassica*'da 3 ng genomik DNA'nın, Pammi vd se sorgumda 9 6 ng genomik DNA'nın yeterli olduğunu bulmuşlardır

MgCl₂ konsantrasyonunun optimizasyonu

MgCl₂ konsantrasyonu amplifikasyon ürünlerinin sayısını ve parlaklığını etkilemiştir. vonda kullanılan 0.5 mM MgCl₂ konsantrasyonunda amplifikasyon ürünü oluşmamış santrasyonun 1.5 mM MgCl₂'a çıkarılması durumunda ise tek bant oluşmuştur. 2 ve M MgCl₂ konsantrasyonunda ise bant sayısının artmasına rağmen en iyi kasyon 3 mM konsantrasyonda elde edilmiştir. Parani vd (1997), PCR onunda susamda 2 mM MgCl₂'ün kullanıldığını bildirmişlerdir.

timizasyonda, konsantrasyonun 4 ve 5.5 mM'a yükseltilmesi durumunda "smearli" oluşmuş ve bu bantların belirginliğini azaltmıştır (Çizelge 4.6). Palumbi vd (1991), MgCl₂ konsantrasyonunda PCR ürünlerinin "smearli" olduğunu bildirmişlerdir. vd (1993) ise *Stylosanthes*'de 2 mM'dan düşük Mg konsantrasyonunda fragment n azaldığını veya hiç fragment oluşmadığını fakat bundan yüksek trasyonlarda ise bant sayısında artış olduğunu bildirmişlerdir. Pancholi (1995) ise, konsantrasyonunun az olması durumunda amplifikasyon veriminin azaldığını, konsantrasyonunun artması durumunda ise spesifik olmayan bağlanmaların unu bildirmeleri bizim sonuçlarımızı desteklemiştir.

4.2.3. Primer konsantrasyonunun optimizasyonu

Primer konsantrasyonunun belirlenmesi için yapılan denemede 5 pmol primerde hiç bir amplifikasyon görülmezken 10 ve 12.5 pmol primer konsantrasyonunda silik bantlar oluşur. 25 pmol primer konsantrasyonunda oldukça iyi amplifikasyon ürünleri oluşur. Konsantrasyonun 50 pmol'e yükseltilmesinde oluşan bantlarda "smear" oluşmuştur (Çizelge 4.6). Parani vd (1997), 15 ng primer kullandıkları reaksiyonlarında 3-7 arasında bant oluşumunu sağlamışlardır. Bell ve DeMarini (1991) bunun için rDNA konsantrasyonunun veya PCR döngü sayısının değiştirilmesi ile mümkün olduğunu belirtmişlerdir. Primerlerin pek çoğunun PCR ürünlerine dönüşmesi için 3'OH uçlarının kendi kendilerine bağlanabildiklerini ve bu moleküllerin uzama reaksiyonuna uğramasının "smear" neden olduğunu bildirmişlerdir. Yine Weeden vd (1992), primer konsantrasyonundaki değişikliğin farklı sayıda bant oluşumuna neden olduğunu bulmuşlardır. Bu çalışmada, 25 pmol primer ile çok sayıda ve belirgin bant oluşumu gerçekleştiği dikkate alınırsa optimizasyonun oldukça başarılı olduğu söylenebilir. Galderisi vd (1998) kestane, Fofana vd (1997) fasulyede 20 pmol primer kullanmış ve bu çalışmada bulunan konsantrasyonla uyumlu olduğu görülmektedir.

Yaptığımız çalışmada her primer aynı sayıda bant oluşturmamıştır. Örneğin K1 primeri 9-16 arasında PCR ürünü oluştururken aynı koşullarda K2 primeri 9-16 arasında bant oluşturmuştur. İki primer arasındaki sekans farklılığının örneğin 5' uçtaki A'nın T'ye dönüşümü olmasında % 100 bağlanmanın olmadığını bildiren Lankhorst vd (1999), elde edilen bu farklı sonuçlara açıklık getirmektedirler. Nitekim aynı araştırmacılar primerlerin konsantrasyonlarının kullanılması durumunda daha önce görülmeyen amplifikasyon ürünlerinin oluşmasına yol açtığını bulmuşlardır.

4.2.2.4. dNTP konsantrasyonunun optimizasyonu

dNTP miktarı test edilen amplifikasyon ürünlerinde en iyi bant 200 µM dNTP konsantrasyonundan sağlanırken bu miktarın altındaki konsantrasyonlarda (0.02 mM, 0.04

1 ve 0.08 mM) hiç bir bant oluşumu gerçekleşmemiştir. 0.1 mM konsantrasyonda ise k bantlar oluşmuştur (Çizelge 4.6). Parani vd (1997) ise, susamda 0.1 mM dNTP konsantrasyonunda iyi sonuçlar aldıklarını bildirmektedirler. Papa vd (1998), arpada yaptıkları RAPD reaksiyonunda, 0.1 mM dNTP'nin uygun olduğunu bulmuşlardır. Bununla birlikte Göçmen (1994) *Taxus brevifolia*'da, dNTP konsantrasyonunun 100-200 µM'ında uygun olduğunu en iyi sonucun ise 200 µM dNTP konsantrasyonunda alındığını bildirmiştir. Konsantrasyonun 100 µM'dan düşük veya 200 µM'dan yüksek olması durumunda ya çok silik bant oluştuğu ya da hiç bir bant oluşumu gerçekleşmediği sonuçları çalışmayı desteklemektedir. Yine Yamagishi vd (1995) *lilyum*'da, Demeke vd (1992) *assica*'da, Rowland ve Levi (1994) yabamersininde, Tatineni vd (1996) pamukta yaptıkları çalışmada 0.2 mM dNTP konsantrasyonunun uygun olduğunu bulmuşlardır.

4.2.2.5. Taq DNA polimeraz konsantrasyonunun optimizasyonu

Taq DNA polimeraz konsantrasyonunun artması bant sayısını da arttırmıştır. Ancak daha yüksek konsantrasyonlarda küçük bantlar kaybolmaktadır (Devos ve Gale 1992). Optimizasyon parametrelerinden biri olan Taq polimeraz DNA replikasyonu için çok önemlidir (Pancholi 1995). Bu çalışmada 1.0 ünite enzim kullanılması durumunda oluşan bantlar, enzim miktarının 1.3 üniteye çıkarılması durumunda daha fazla sayıda ve belirgin olarak ortaya çıkmasına neden olmuştur (Çizelge 4.6). Parani vd 1997), ise susamda 0.5 ünite enzim kullanmaları durumunda başarı sağladıklarını belirtmişlerdir. Fofana vd (1997) asulyede RAPD tekniğinde 1.5 ünite, Varghese vd (1997) *Hevea brasiliensis*'de 1.4 ünite enzim kullanarak sonuç almışlardır.

4.2.2.6. PCR amplifikasyonu için döngü parametrelerinin optimizasyonu

Çalışmada optimize edilen reaksiyon karışımı ile en iyi sonucu 1 döngü 95 °C'de 5 dk ve ardından 35 döngü 94 °C'de 1 dk denatürasyon, 36 °C'de 1.30 dk'da primer yapışması (annealing) ve 72 °C'de primer uzaması (extension) iyi sonuç vermiştir. Tüm döngüler tamamlandıktan sonra 10 dk 72 °C'de uzamaya (extension) devam edilmiştir (Çizelge 4.6.)

, jelde yürütölünceye kadar +4⁰C'de saklanmıştır. Devos ve Gale (1992), denatürasyon nı 94 ⁰C'den 90 ⁰C'ye düşürmeleri durumunda büyük bantların kaybolup küçük . ortaya çıktığını açıklamışlardır. Yamagishi (1995), *lilyum*'da annealing sıcaklığını rak kullandıkları zaman "smear" oluştuğunu, sıcaklığın 54 ⁰C'ye çıkarılması durumunda arın belirginleştiğini bildirmiştir.

şmada 35 kez tekrarlanan reaksiyon döngü sayısının 45'e yükseltilmesi durumunda bant le bir değişiklik olmamıştır. Bununla birlikte Parani vd (1997) ise susamda, 45 döngüde nu tamamlamışlardır. Pammi vd (1994) tarafından 25 ve 30 döngü arasında hızlı bir asyonun, 30 ve 35 döngü arasında ise daha düşük amplifikasyon olduğu bildirilmiştir. vd (1994), ananasta yaptığı çalışmada 35 döngünün başarılı bir amplifikasyonu nı bildirmişlerdir.

Şekil 4.6. PCR Optimizasyonunda Test Edilen Parametreler

İçin Reaksiyon Şerh	Test Edilen Reaksiyon Komponenti	Komponent Konsantrasyonu	Sonuçlar
DNA (2.5, 3, 4 mM), Primer (25, 50 pmol), Taq pol. (0.1, 0.2 mM), Taq pol. 1.0 U, 2.5 µl 10X buffer	DNA	2 ng/25µl 3.5 ng/25µl 7 ng/25µl 14 ng/25µl	Amplifikasyon yok Amplifikasyon yok Amplifikasyon çok iyi Belirgin olmayan bant
DNA, Primer (25, pmol), dNTP (0.1, mM), Taq pol. 1.0 U, 2.5 µl 10X buffer	MgCl ₂	0.5 mM 1.5 mM 2 mM 2.5 mM 3 mM 4 mM 5.5 mM	Amplifikasyon yok Tek bant oluştu Bant sayısı az Bant sayısı az Çok sayıda belirgin bant "Smearli" bant oluşumu "Smearli" bant oluşumu
DNA, 3 mM MgCl ₂ dNTP (0.1, 0.2 mM), Taq pol. 1.0 U, 2.5 µl 10X buffer	Primer	5 pmol 10 pmol 12.5 pmol 25 pmol 50 pmol	Amplifikasyon yok Belirgin olmayan bant Belirgin olmayan bant Amplifikasyon çok iyi Amplifikasyon var
DNA, 3mM MgCl ₂ 25pmol primer, Taq pol. 1.0 U, 2.5 µl 10X buffer	dNTPs	0.02 mM 0.04 mM 0.08 mM 0.1 mM 0.2 mM	Amplifikasyon yok Amplifikasyon yok Amplifikasyon yok Çok silik bantlar Amplifikasyon çok iyi
DNA, 3mM MgCl ₂ 25pmol primer, 2.5 µl 10X buffer, 0.1 mM dNTP	Taq polimeraz	1 ünite 1.3 ünite	Amplifikasyon iyi Bant sayısı fazla ve bantlar daha net

Yapılan optimizasyon sonunda susam bitkisinde RAPD tekniğinin kullanılması için en uygun optimizasyon koşulları Çizelge 4.7'de verilmiştir.

4.7. Susam Populasyonları Arasındaki Polimorfizmi Belirlemek için Kullanılan Reaksiyon Parametreleri ve Miktarları

Reaksiyon Parametreleri	Reaksiyon Ortamındaki Miktar (25 µl)	Döngü Parametreleri
Genetik DNA	7 ng	95 °C 5 dk ilk "denatürasyon"
Buffer	2.5 µl	94 °C 1 dk "denatürasyon"
	3 mM	36 °C 1.30 dk "annealing"
	0.2 mM	72 °C 1.30 dk "extension"
	25 pmol	72 °C 10 dk "extension"
Polimeraz	1.3 Ünite	35 döngü

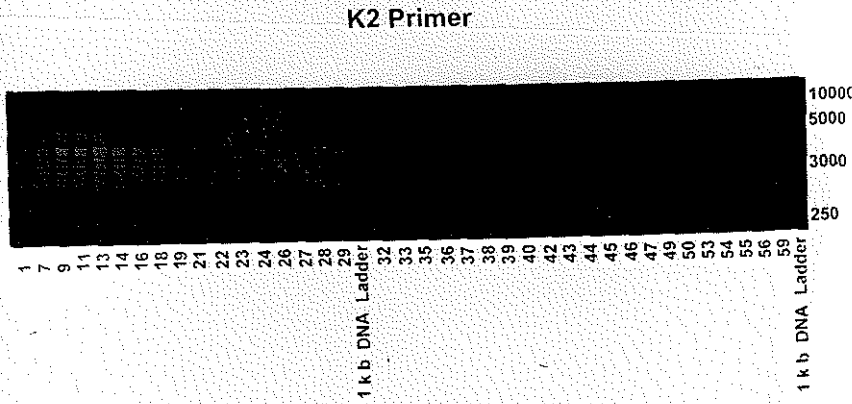
Reaksiyon koşullarının optimizasyonundan sonra, morfolojik özelliklerine göre elde edilen birbirinden farklı 38 populasyon, rasgele seçilen 12 primer ile polimorfizmi analiz edilmiştir. Kullanılan 12 primerden 3 tanesi monomorfik bant oluşumunu verirken 9 tanesi polimorfik bant oluşturmuştur. Susamda yapılan bu çalışmada primerler rasgele seçilmiştir. Buna rağmen daha önce hiçbir ön seleksiyonun yapılmadığı primerin polimorfizmi belirlemede etkili olması oldukça başarılı bir sonuç olarak değerlendirilir. Nitekim Menkir vd (1997) sorgumda 82 primerden 53 tanesinin, Kazan vd (1993) mısırda 22 tanesinin, Rajaseger vd (1997) ise *Ixora*'da 20 primerin 6 tanesinin ve Cao ve al (1997) çeltikte 220 primerden 69 tanesinin polimorfik fragment oluşturduğunu bildirmektedir. Diğer yandan Vierling vd (1994) sorgumda 73 primerden 70 tanesinin, Li ve al (1998) soya da 169 primerin 125 tanesinin polimorfik bant verebildiğini bildirmektedir. Bu sonuçlarımızı desteklemektedirler. Polimorfik bant oluşumunu sağlayan primerlerin 0.3 kb'den 10 kb'ye ve hatta 10 kb'den daha büyük fragmentler elde edilmiştir.

Bu çalışmada kullanılan 12 primerden 9 tanesinin polimorfizmi belirlemede yeterli olduğu grafiklerden anlaşılmaktadır. Zira çok sayıda primer kullanılması genetik haritalamanın etkinliğini artırır. Li ve Midmore (1999), eğer çeşitleri arasındaki varyasyon, yüksek ise az sayıda primerin kullanımının yeterli olduğunu açıklamışlardır. Nitekim Millan vd (1997) mısırda 10 primerin, Demeke vd (1997) soya fasulyesinde 12 primerin, Rajaseger vd

Ixora çeşitlerinde 6 primerin, Schontz ve Rether (1999), İtalyan çiminde 4 tane primerin orfizmi belirlemek için yeterli olacağını bildirmektedirler. Bu bilgiler ışığında seçilen rlerin sayısının polimorfizmi belirlemek için uygun olduğu söylenebilir. Çalışmada ılan primerler:

1 primeri: TGGCGGCCT dizisine sahip olan K1 primeri ile polimorfik bant elde iştir. Bantların büyüklüğü 400 bp-1000 bp arasında değişmiştir. K1 primeri, genom da 3 farklı profil oluşmasına neden olmuştur.

2 Primeri: ACCTCGCCAC dizisinden oluşan K2 primeri ile 9-16 arasında bant oluşumu enmiştir. K2 primeri polimorfik bant oluşumuna neden olmuştur. Bu primerle genom da, 14 farklı profil oluşmuştur. En büyük bant 10.000 bp ve en küçük bant ise 1500 bp'in da bulunmuştur (Şekil 4.3)



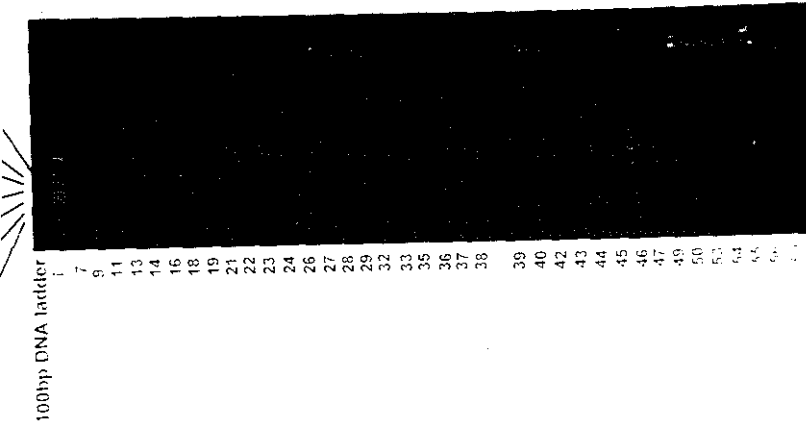
Şekil 4.3. Susam Populasyonlarında K2 Primeri ile Elde edilen RAPD Bant Profilleri

Agaroz Jelde (% 1.5 "high melting" + % 0.3 "low melting" agaroz) 70V'da 1.45 saat sürede yürütülmüştür.

imeri: GGCTGGTICC dizisinden oluşan primer ile yapılan RAPD analizi sonucu 3 bantlar elde edilmiştir. Ortalama 3-4 fragment oluşmuştur. Bantlar 400 bp-1000 bp arasında değişmektedir. Genom bazında, 5 farklı profil meydana gelmiştir.

imeri: TGCTGGTICC dizisinden oluşan K4 primeri ile 1000 bp'den büyük ve 200 bp'den küçük olan 6-10 tane bant oluşumu gerçekleşmiştir. Oluşan bantlar polimorfik olup, 5 bant profili tespit edilmiştir. (Şekil 4.4).

K4 Primer

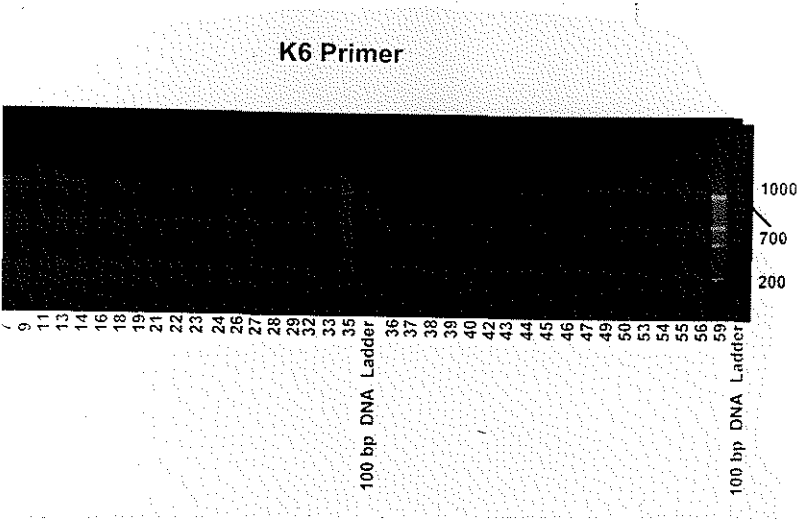


4.4 Susam Populasyonlarında K4 Primeri ile Çoğaltılan RAPD Bant Profilleri.

Agaroz Jelde (% 1.5 "high melting" + % 0.3 "low melting" agaroz) 70V'da 1.45 saat sürede yürütülmüştür.

Primeri: ACGGGCCAGT dizisinden oluşan K5 primeri 6-7 adet bant oluşturmuştur. 6 bant oluşumu gerçekleşmiştir ve genom bazında 2 bant profili meydana gelmiştir.

Primeri: CTGCGCTGGA dizisinden oluşan K6 primeri ile yapılan RAPD analizinde 7-10 bant oluşumu gerçekleşmiştir ve 200 bp-1000 bp büyüklüğüne sahip bantlar elde edilmiştir. Bu primerle oluşan bantlar polimorfiktir. Genom bazında 4 farklı bant profili bulunmuştur (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Susam Populasyonlarında K6 Primeri ile Çoğaltılan RAPD Bant Profilleri.

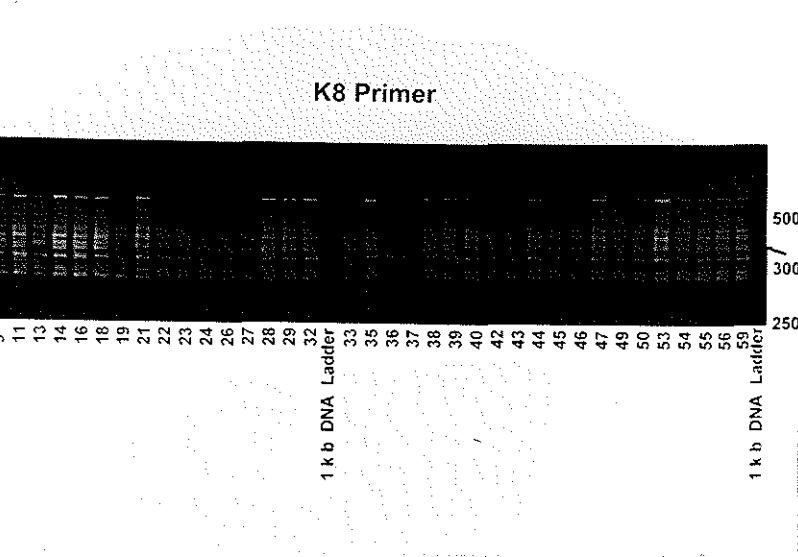
Agaroz Jelde (% 1.5 "high melting" + % 0.3 "low melting" agaroz) 70V'da 1.45 saat sürede yürütülmüştür.

Primeri: ACCTGGGGAG dizisinden oluşan K7 primeri monomorfik bant oluşturmuştur. Bantlar her populasyon için 5 tanedir.

Primeri: GAGGICCACA dizisinden oluşan K8 primeri 9-14 arasında polimorfik bant oluşturmuştur. Bant büyüklüğü 3000 bp ile 10000 bp arasında değişmiştir (Şekil 4.6.). K8 primeri ile 6 farklı bant profili belirlenmiştir.

Primeri: GTCAGTGCGG dizisinden oluşan K9 primeri ile 5-9 arasında bant oluşumu gözlemlenmiştir. Bantlar polimorfik olup 2 farklı bant profili oluşmuştur.

K10 Primeri: ACAGCCCCCA dizisinden oluşan K10 primeri ile yapılan reaksiyonda her populasyonda 4'er tane monomorfik bant oluşumu gerçekleşmiştir. Bant büyüklüğü 4000 bp-10000 bp arasında değişmiştir.



1.4.6 Susam Populasyonlarında K8 Primeri ile Çoğaltılan RAPD Bant Profilleri.

Agaroz Jelde (% 1.5 "high melting" + % 0.3 "low melting" agaroz) 70V'da 1.45 saat sürede yürütülmüştür

Primeri: AGACCCAGAG dizisinden oluşan K11 primeri 1-8 arasında bant oluştu. En üstteki bant 1000 bp'den büyük ve diğerleri ise bununla 300 bp arasında yer K11 primeri ile genom bazında 6 farklı bant profili tespit edilmiştir.

Primeri: CTATGCCGAC dizisinden oluşan K12 primeri monomorfik yapıda 4'er tane oluşturmuştur Bant büyüklüğü 3000 bp-10000 bp arasında değişmiştir.

çalışmada kullanılan primerler göre elde edilen bant sayısı 1 ile 16 arasında saptanırken, göre her primerin oluşturduğu profil sayısı da 2 ile 14 arasında değişmiştir. çalışmada kullanılan primerlerden polimorfizmi en başarılı olarak tespit eden primerlerin K2, K8, K9 ve K4 primerleri olduğunu bant sayıları ve genom bazında oluşturdukları profillerine dayanarak söyleyebiliriz. Gidoni vd (1994), ananasta 4-12, Ko vd (1998) ise 2-7 arasında bant elde etmişlerdir

82

ulusyonda, her primerden oluşan DNA fragmentlerinin varlığı (1) veya yokluğuna (0) seti oluşturulmuştur. Populasyonlar arasındaki benzerlik, Nei ve Lei'nin (1979) indeksinden yararlanarak bulunmuştur. Daha sonra benzerlik indeksi kullanılarak (1-indeksi=Genetik uzaklık) genetik uzaklık hesaplanmıştır. Kümeleme analizi için elde edilen genetik benzerlik matrisi, NTSYS paket programı kullanılarak UPGMA ile dendrogram oluşturulmuştur.

Şekil 4.8 incelendiğinde polimorfik bant oluşturan primerler ile tüm populasyonlar arasında % 0.0-% 21 arasında polimorfizm bulunmuştur.

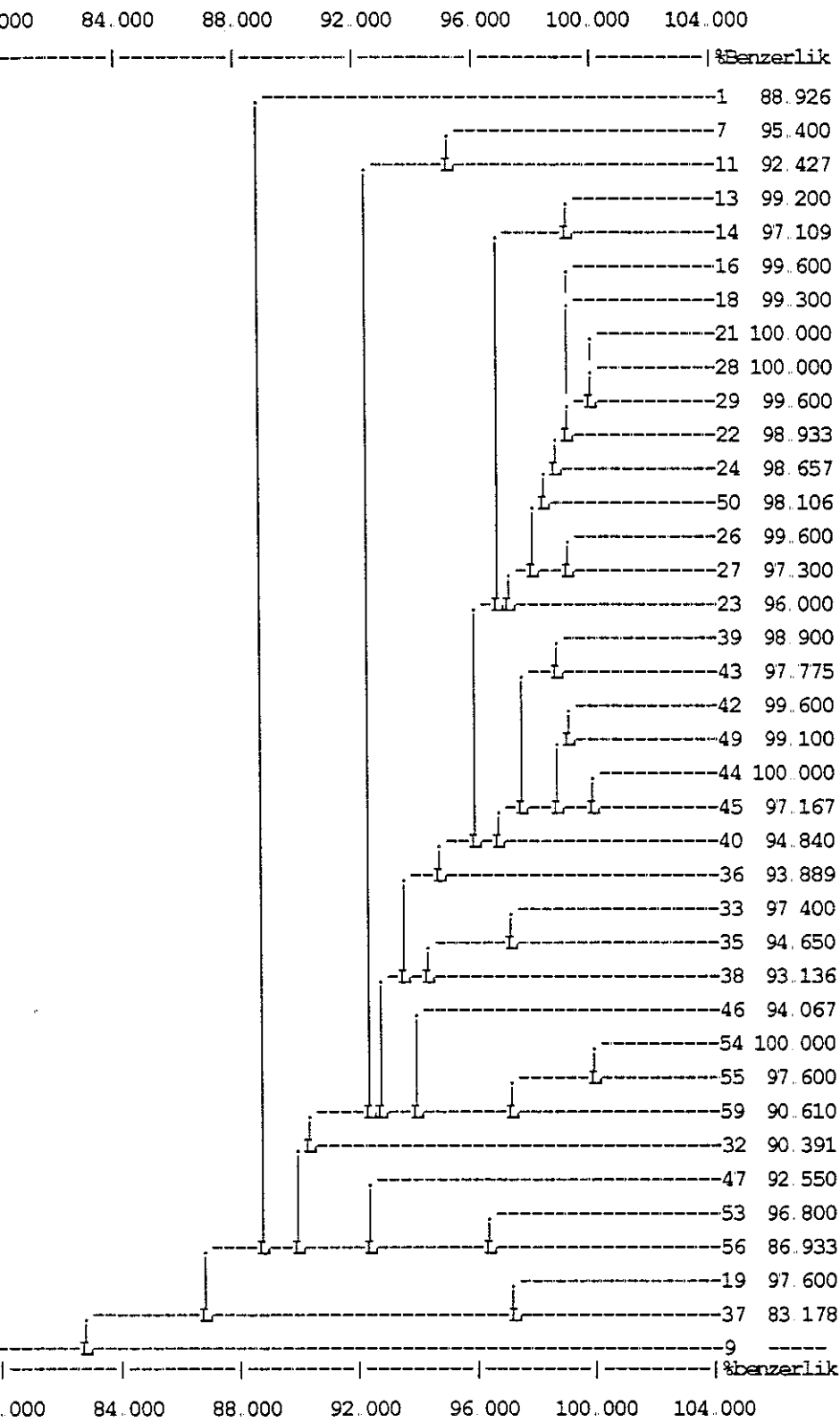
Kazan vd (1993), sorgumda genotipler arasındaki polimorfizmin % 3.9-21.2 arasında olduğunu ve bu sonuçlara göre, *Sorghum bicolor*'ın farklı coğrafik bölgelerden toplanan genotipler arasında yüksek polimorfizm gösterdiğini bildirmişlerdir. Diğer yandan Menkir vd (1997), kültürü yapılan sorgum varyeteleri arasındaki genetik farklılığı açıklamak için RAPD çalışmada, oldukça yüksek (% 77) polimorfizm bulmuşlardır. Liu (1997), *Sorghum scabra* türüne ait Brezilya, Kolombiya ve Venezuela'dan toplanan genotipler arasında ortalama % 5.9 polimorfizm bulmuştur. Kazan vd (1993) aynı bitkide yaptıkları çalışmada, türler içinde farklılığın oldukça düşük olduğunu ve bunu da izozim markerleri ile belirlediklerini belirtmişlerdir. Li ve Midmore (1999) ise, farklı ülkelerden topladıkları Çin süs bitkisi örnekleri arasında % 0.78-4.4 polimorfizm bulmuşlardır.

Bu sonuçlara dayanarak, bu çalışmada elde edilen polimorfizm oranının ülkemizde yetişen azı susam populasyonları arasında oldukça yüksek olduğu saptanmıştır. Diğer yandan RAPD polimorfizm oranını belirlemek için kullandığımız primer sayısı da yeterli olmuştur.

Şekil 4.8'deki genetik uzaklık ve Şekil 4.7'de gruplamanın yapıldığı dendrogram verilerine dayanarak tüm populasyonları, RAPD markerlerine dayanarak iki ana grup altında incelenmiştir. Bu gruplardan bazıları coğrafik orijinlerine göre bazıları da farklı coğrafik orijinden toplanan genotiplerle birlikte kümelenmişlerdir. John vd (1997), 68 yerel fasulye çeşidinde yaptıkları çalışmada, 47 yerel çeşidi Andean grubu, 18 yerel çeşidi, Mezoamerikan grubu, ve 3

ırlamayan yerel çeşit olmak üzere gruplara ayırmışlardır. Araştırmada Andean ve erikan grupları coğrafik orijinlerine göre dağılım göstermiştir. Fofana vd (1997) ise, 30 16 yabani lima fasulyesi çeşitlerini RAPD markerlerine göre Mezoamerikan ve Andean a ayırmışlardır. Mezoamerikan ve Andean grupları arasında, hem yerel hem de yabani bakımından yüksek polimorfizm belirlenirken, mezoamerikan grubunun içindeki yerel arasında düşük polimorfizm bulunmuştur. Görüldüğü üzere türler arasında bulunan polimorfizm, türler içinde daha düşük olmaktadır. Nitekim, Thormann ve Osborn *Brassica* türleri arasındaki genetik ilişkinin karşılaştırılmasında RAPD ve RFLP erini kullanmaları sonucu türler içinde hiçbir farklılığın ortaya çıkmadığını ıışlardır. Kazan vd (1993), *Stylosanthes* cinsine ait agronomik önemi olan 4 türü ve 20 APD markerleri ile değerlendirmişlerdir. Polimorfizm, her tür içinde düşük düzeyde (0- ulunurken türler arasında ise daha yüksek (% 46) bulunmuştur.

burner vd (1997), Güney Pasifik bölgesinde yetişen hindistan cevizinin 17 farklı yonunu RAPD analizi ile değerlendirmişlerdir. Çalışmada, çok az RAPD markerleri nalarına rağmen tek bir tür olan populasyon içinde genetik farklılığın düşük olduğunu ıışlardır. Belirlenen varyasyon düzeyi populasyonlar arasında değişmiştir. Bu sonuç, yonlar arasında bulunan düşük varyasyona yol açan bir gen göçünün olduğunu ııştır. Tüm bu bilgiler ışığında çalışmamızda elde ettiğimiz polimorfizm oranı oldukça olarak değerlendirilebilir. Çünkü *Sesamum indicum* türüne ait populasyonların analizi ıştır. Diğer araştırmacıların çalışmalarında, türler içindeki varyasyonun düşük olduğunu eleri bizim sonuçlarımızı desteklemektedir.



Şekil 4.7 RAPD Bant Profillerinin UPGMA ile Yapılan Dendrogramı

mamızda genetik benzerlik matrisine dayanarak elde ettiğimiz dendogramda, onlar iki farklı ana grup altında toplanmıştır. I. Ana grupta tek başına Edirne-Üzümlü Maksudlu köyü (1) ve II. Ana Grupta ise kalan 37 populasyon yer almaktadır.

A Grup: Bu grupta Edirne-Üzümlü Maksudlu köyünden (1) toplanan populasyon yer almaktadır. Bu populasyonun en fazla genetik benzerliğe sahip olduğu Manisa-Turgutlu Merkez (16) populasyonları ile bile arasında % 7.7 gibi yüksek bir polimorfizm vardır. Diğer yandan, Çanakkale-Lapseki Çavuşköy (9)'den toplanan populasyonlarla coğrafik olarak yakın olmalarına rağmen aralarında çok yüksek bir polimorfizm (% 23.7) bulunmuştur. Yine Edirne-Meriç Kavaklı köyünden (7) toplanan populasyonlar ile arasında % 12.3 polimorfizm bulunmuştur. Edirne-Üzümlü Maksudlu populasyonu fenotipik olarak kısa boylu ve erkenci özellik taşıması yanında, Meriç İlçesinden toplanan populusyona göre daha koyu tohum kabuğu rengine sahiptir.

Ana Grup: Bu ana grupta 8 tane alt grup vardır;

Alt Grup: Edirne Meriç (7) ve Çanakkale-Lapseki Taştepe (11) Köylerinden toplanan populasyonlar bu grubu oluşturmuşlardır. İki populasyon arasında % 4.6 polimorfizm bulunmuştur.

Alt Grup: Bursa-Orhangazi (13), Manisa-Turgutlu (14-16), Manisa-Alaşehir Hacıhaliler köyü (18), İzmir-Menemen'den toplanan üç populasyon (21-22-23), Aydın-İncirliova'dan (24), Aydın-Bozdoğan Haydere (26), Denizli-Güney (27), Denizli-Acıpayam Gümüş (29) ve Kumavşarı köyleri (28) ve Adana-Osmaniye (50)'den toplanan populasyonlar bu grupta yer almaktadırlar. II. alt grupta genel olarak Ege bölgesinden toplanan populasyonlar yer almakta ise de coğrafik orijini bakımından farklılık gösteren Osmaniye populasyonunda bu gruba dahil olmuştur. Osmaniye populasyonunun gruptaki diğer populasyonlarla arasında % 1-2.4 genetik farklılık tespit edilmiştir. Bu alt grup içinde % 0-9.4

polimorfizm bulunmuştur. Grup içinde yer alan İzmir-Menemen (21), Denizli-Acıpayam Gümüş (29) ve Kumavşarı köylerinden (28) toplanan populasyonlar arasında % 100 benzerlik vardır.

Alt Grup: Adana-Ceyhan Yeşildam (39), Gündoğan (40), Kadirli-Kızıldere (42), Kadirli-Bozkuyu (43), Topraktepe (44), Çıgıcık (45) köylerinden toplanan populasyonları bu grup içinde yer almaktadırlar. Bu grup içindeki varyasyon, % 0.7-7.1 arasında belirlenmiştir. Topraktepe (44) ve Çıgıcık (45) köylerinden toplanan populasyonlar % 100 benzer olarak bulunmuşlardır. III. alt grupta, Adana'dan toplanan populasyonların yer alması, populasyonların, coğrafik orijinlerine göre gruplandığını göstermektedir.

Alt Grup: Muğla-Ortaca (33) ve Fethiye (35), İçel (38) ve Burdur-Keçiborlu'dan (36) toplanan populasyonların oluşturduğu bu gruptaki polimorfizm % 2.6-17 arasında belirlenmiştir. Grup içindeki % 17 olan yüksek farklılık, İçel (38) ve Burdur-Keçiborlu (36) populasyonları arasındaki farklılıktan ileri gelmektedir.

Alt Grup: Adana-Kozan (46), Ş. Urfa-Hilvan Özbaş (54) ve Konçik köyleri (55), Şırnak-Cizre (59) populasyonları aynı grupta yer almaktadırlar. Şanlıurfa'dan toplanan Özbaş ve Konçik köylerine ait populasyonlar birbirinin aynıdır (% 100). V. alt gruptaki populasyonlar arasında % 2.4-11.4 genetik farklılık belirlenmiştir.

Alt Grup: Muğla-Dalaman Akçataş'tan (32), Adana-Kozan Poskabasakal (47), Urfa-Hilvan Merkez (56) ve Faik (53) köylerinden toplanan populasyonların oluşturduğu bu grupta, Muğla-Dalaman populasyonu Urfa merkezden (56) % 15 farklı, Adana-Kozan (47) ve Urfa-Hilvan (56)' dan toplanan populasyonlardan ise % 12-12.7 farklılık göstermiştir.

Alt Grup: Manisa-Alaşehir Tepeköy (19) ve Burdur Ürkütlü'den (37) toplanan Populasyonların oluşturduğu bu grupta populasyonlar arasında % 2.4 genetik

farklılık bulunmuştur. Burdur'dan toplanan IV. alt grupta yer alan populasyon (36) ile bu grupta yer alan populasyonlar arasında morfolojik olarak da farklılık vardır. IV. alt gruptaki Burdur populasyonu morfolojik olarak sık ve uzun kapsül tüylülüğüne sahiptir.

Alt Grup: Son olarak Çanakkale-Lapseki'den (9) toplanan populasyonlar bir grup oluşturmuştur. Bu grup ile kendine en fazla genetik benzerliğe sahip VII. alt grup ile arasında % 13.4-15.8 polimorfizm vardır. Bu popülasyondaki farklılığın fenotipinin incelenmesinde çok belirgin olarak bir farklılığın ortaya çıkmamasından dolayı genotipik farklılıktan bahsedilebilir.

Yapılan bu grulamada, genel olarak populasyonlar toplandıkları bölgelere göre birleşik göstermektedirler. Ancak II. ve VI. alt grupta yer alan Osmaniye ve Muğla'dan toplanan populasyonları kendi coğrafik orijinlerinden oldukça farklı bir grup içinde yer alanlardır. Susam, % 0.0-5.10 arasında yabancı döllenenmektedir. Özellikle böceklerin ve diğer hayvanların aktif oldukları sabah saatlerinde yabancı dölllenme oldukça yüksek bulunmuştur (Kocak, 1994). Osmaniye ve Muğla'dan toplanan iki popülasyonun coğrafik orijinlerinden farklı bir grupta yer alması, tarla denemeleri sırasında, bulundukları grup içindeki popülasyonlardan toz almış olabilecekleri ihtimalini kuvvetlendirmektedir. Kocak ve Ashburner vd (1997), Hindistan cevizi ağaçlarında da tozlanmadan dolayı bir genetik benzerliğin olduğunu, Hawaii, Marquesas ve Rennell adalarının diğer adalardan izole olarak tozlanmasından dolayı, buralarda yetişen popülasyonların da diğer popülasyonlardan oldukça farklılık gösterdiğini belirtmişlerdir.

Çalışmada morfolojik olarak değerlendirilen popülasyonlara ait dendogram ile RAPD markerlerine göre elde edilen dendogram karşılaştırıldığı zaman morfolojik olarak popülasyonlar birbirine oldukça yakın genetik benzerlik göstermesine rağmen RAPD markerleri ile daha az benzer bulunmuştur. Örneğin morfolojik ve RAPD markerlerine göre değerlendirilen Muğla-Fethiye (35) ve Burdur-Bucak (37) popülasyonları arasındaki genetik benzerlik sırasıyla % 95.83 ve % 84.9, Edirne-Uzunköprü (1) ve Edirne-Meriç (7)

populasyonları arasında ise % 90.19, % 87.7 olarak bulunmuştur. Morfolojik markerlerin çevresel şartlardan etkilendikleri göz önüne alınırsa bu sonuçlar RAPD markerlerinin daha güvenilir olduğunu göstermektedir.

Türkiye'de geniş bir yayılış alanı gösteren susamda, tohum verimi, yağ kalitesi yüksek olan, kapalı kapsüllü, hastalıklara dayanıklı susam çeşitlerinin geliştirilmesi bitki üreticisi ve üretici açısından büyük önem taşımaktadır. Ancak ülkemizde üretimi yapılan susam populasyonlarının genetik özellikleri ile ilgili başvuru kaynağının olmaması ıslahçı için zaman ve para kaybıdır. Her geçen gün genetik kaynağın daralması ıslahçıyı yeni genetik kaynakların oluşturulması arayışı içine itmektedir. Oysa ülkemiz farklı susam populasyonları bakımından oldukça zengindir. Genetik olarak farklı ebeveynlerin melezlemede kullanılması gerektiği düşünülürse, bugüne kadar ıslahçının genetik farklılığa sahip ebeveynleri tespit edebileceği bilgiler yoktu. Yaptığımız bu çalışma ile ülkemizde yetişen susam populasyonlarının genetik farklılığı RAPD markerleri ile tespit edilmiştir. Karşılaştırmada, çevresel şartlardan etkilenmeden kısa sürede populasyonlar arasındaki genetik farklılık belirlenmiştir. Yapılan literatür taramasında, Türkiye susam populasyonlarının genetik farklılığının belirlenmesi yönünde bir çalışmaya rastlanmamakla birlikte, Parani vd (1997), susamda melezleme sonucu elde ettikleri hibritlerin tanımlanmasında izozim markerlerini kullanmışlardır. Yazarlar bu analizin, örnek toplanmasından jelin boyanmasına kadar çok dikkat gerektirdiğini, çünkü hem berraklığı hem de tekrarlanabilirliği olumsuz etkileyen enzim degradasyonunun olabildiğini bildirmiş, bunun sonucu olarak RAPD markerlerini de kullanmışlardır. RAPD markerleri ile izozim analizinde görülen olumsuzlukların giderildiği, kontrollü ve deneysel şartlar altında oldukça stabil ve tekrarlanabilirliğinin olduğu bulunmuştur.

Morfolojik markerler aracılığı ile önce fenotipik olarak tamamen aynı olan populasyonlar tespit edilmiş, daha sonra kalan populasyonlar arasındaki genetik farklılık RAPD markerleri aracılığı ile belirlenmiştir. RAPD markerlerinin susam genetik farklılığını belirlemede etkili olduğu ve bu çalışmanın susam ile ilgili ıslah çalışmalarında bilgi kaynağı olarak yararlı olabileceği düşünülmektedir.

SONUÇ

Batı Trakya'dan Güneydoğu Anadolu Bölgesinde, Ege, İç Ege ve Akdeniz bölgelerinde yer alan yerleşim alanlarından toplanan 52 yerel susam populasyonlarının genetik farklılığını belirlemek amacıyla yapılan bu çalışmada morfolojik ve moleküler yöntemler kullanılmıştır.

Araştırma sonunda, aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir;

52 susam populasyonundan örneklenen onar bitkiden morfolojik gözlemler alınmıştır. Morfolojik gözlemler kantitatif ve kalitatif olmak üzere toplam on üç tanedir. İncelenen kalitatif özellikler; çiçeklenme zamanı, dallanma durumu, yaprak koltuğunda kapsül sayısı, kapsülde karpel sayısı, tohum kabuğu rengi, kapsül tüylülüğü ve kapsül dizilişi, kantitatif özellikler ise bitki boyu, ilk kapsül yüksekliği, ana sapta kapsül sayısı, tüm bitkide kapsül sayısı, kapsülde tohum sayısı, 1000 tane ağırlığı olarak alınmıştır.

Elde edilen veriler, değişkenler üzerinde yapılan ölçümlerin değişik ölçü biriminde bulunmalarından dolayı, değişkenler aralarındaki korelasyon ve kümeleme analizleri için girdi olarak kullanılmadan önce standartlaştırılmıştır. İncelediğimiz ana sapta kapsül sayısı, tüm bitkide kapsül sayısı, kapsülde tohum sayısına ait veriler adet olarak değerlendirildiği için özelliklerin karekökleri alınarak normal dağılım göstermesi sağlanmıştır.

Gözlem aldığımız 13 değişkenin birbiri ile ilişkisinin incelendiği korelasyon matrisinde, bitki boyu ile kapsül yüksekliğinin arasında, çiçeklenme zamanı ve bitki boyu arasında pozitif ve önemli ($p < 0.01$) bir korelasyon bulunmuştur. Değişkenler arasındaki ilişkinin desteklenmesi açısından temel bileşenler analizi de kullanılmıştır. Temel bileşenler analizinde de bitki boyu en yüksek etkiye sahipken bunu çiçeklenme zamanı ve ilk kapsül yüksekliği izlemiştir.

İncelenen kantitatif değişkenlere dayanarak kümeleme analizi yapılmıştır. Kümeleme analizinde kantitatif değişkenlerle birlikte kalitatif değişkenlerinde birlikte kullanılması durumunda aynı kümeleme sonuçları ortaya çıkmıştır. Populasyonların genetik uzaklığının belirlenmesinde öklit uzaklığı kullanılmıştır. Yapılan analiz sonunda populasyonlar arasındaki genetik uzaklık, % 1.09-24 arasında değişmiştir. Bu uzaklığa dayanarak populasyonlar 7 farklı grup içinde toplanmıştır.

Populasyonlardan genetik farklılığı yüksek olanlar alınarak RAPD analizi için kullanılmıştır. Morfolojik özelliklere göre yapılan kümeleme analizinde populasyonlar gruplarına göre bir farklılık göstermemişlerdir. Aynı grupta farklı bölgelerden toplanan populasyonlar da yer almıştır.

Seçilen 38 populasyonun genetik farklılığı moleküler marker sisteminden faydalanarak tespit edilmiştir. Moleküler analiz için önce uygun DNA izolasyon metodunun belirlenmesi için çalışmalar yapılmıştır. Bitki yapraklarındaki musilajdan dolayı geç alınan yapraklarda kaliteli ve saf DNA izolasyonu gerçekleştirilememiştir. Bu nedenle 10-12 günlük fidelerden alınan yapraklar izolasyonda kullanılmıştır. DNA izolasyonu için Dellaporta vd 'nin (1985) geliştirdiği metot modifiye edilerek kullanılmıştır. Susamda, DNA izolasyonunun Dellaporta yöntemine kloroform-oktanol eklenip santrüfuj sürelerini uzatmak suretiyle gerçekleştirilmiştir. DNA izolasyonunun başarı ile tamamlanmasından sonra RAPD parametrelerinin optimizasyonu yapılmıştır. Optimizasyon sonunda 25 µl'lik reaksiyon karışımında, 7 ng genomik DNA, 3 mM MgCl₂, 25 pmol primer, 2.5 µl 10X buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 100mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, % 50 glycerol ve % 1 TritonX-100), 0.2 mM dNTP, 1.3 unit Taq polimeraz ve steril su bulunmaktadır. Optimize edilen reaksiyon karışımı ile 95 °C'de 5 dk 1 döngü ilk "denatürasyon" bunu takiben 35 döngü 94 °C'de 1 dk "denatürasyon", 36 °C'de 1.30 dk primer yapışması "annealing", 72 °C'de 2 dk primer uzaması "extension" olmak üzere PCR yapılmıştır. 35 döngünün ardından 72 °C'de 10 dk primer uzaması "extension" yapılmış ve amplifikasyon ürünleri % 1 high melting agaroz ve % 0.3 low melting agaroz içeren jelde 70 V, 250 amperde 1.45 saat yürütülmüştür. Ethidium bromid ile boyanan DNA fragmentleri translüminatörde UV

nda incelenip video kamera ile görüntüsü alınmıştır. Görüntü daha sonra fotoğraf aktarılıp fotoğraf kartlarına basılmıştır. Çalışmada 10 bazlık 12 primer kullanılmıştır. 12 primerden 9 tanesi polimorfik bant oluşumuna neden olmuştur.

populasyon arasındaki genetik uzaklığın belirlenmesi için bantların varlığı (1) veya yokluğu (0) göre bir veri seti oluşturulmuştur. Uzaklık matrisi Nei ve Li (1979) tarafından önerilen benzerlik indeksine dayanarak hesaplanmıştır. İki populasyon arasındaki genetik uzaklık 1-benzerlik indeksi ile bulunmuştur ve 0-1 arasında değişmiştir. Benzerlik matrisi veri olarak kullanılarak UPGMA analizi ile dendrogram oluşturulmuştur.

RAPD markerlerine göre susam populasyonları arasında % 0.0-21 polimorfizm bulunmuştur. Elde edilen polimorfizme dayanarak, populasyonlar iki ana grup altında toplanmışlardır. I. ana grupta, tek başına Edirne-Uzunköprü Maksutlu köyü (1) ve II. Ana grupta ise kalan 37 populasyon yer almıştır. Populasyonların oluşturduğu gruplar, coğrafik kökenleri coğrafik orijinlerine göre olmasına rağmen, Osmaniye (50) ve Muğla (32) populasyonları farklı bölgelerden toplanan populasyonların yer aldığı gruplara ayrılmışlardır.

Türkiye'de yetişen Susam populasyonlarının genetik uzaklığının moleküler düzeyde belirlenmesi için yapılan bu çalışmada, RAPD markerlerinin genetik olarak farklı populasyonların tespit edilmesinde güvenle kullanılabileceği bulunmuştur.

KAYNAKLAR

- DRICH, P.R., Doebley, J., Schertz, K.F. and Stec, A. 1992. Patterns of Allozyme Variation in Cultivated and Wild *Sorghum bicolor* *Theor. Appl. Genet.*, 85, 451-460.
- SHBURNER, G.R., Thompson, W.K. and Halloran G.M. 1997. RAPD Analysis of South Pacific Coconut Palm Populations. *Crop Science*, 37, 992-997.
- AYDAR, H. 1997. Türkiye Susam Populasyonlarında Bazı Özelliklerin Varyasyonu ve Verim İle Kalite Tipi Hat Geliştirme Olanakları. Doktora Tezi, Akd. Üniv. Fen Bilimleri Enst., Antalya.
- ELL, A. and DeMarini, D.M. 1991. Excessive Cycling Converts PCR Products to Random-Length Higher Molecular Weight Fragments. *Nucleic Acids Res.* 19, 5079.
- BEUNINGEN van, L.T. and Busch, R.H. 1997. Genetic Diversity Among North American Spring Wheat Cultivars: III. Cluster Analysis Based on Quantitative Morphological Traits. *Crop Science*, 37: 981-988.
- BHAT, K.V., Babrekar, P.P. and Lakhanpaul, S. 1999. Study of genetic diversity in Indian and exotics sesame (*Sesamum indicum* L.) germplasm using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Euphytica*, 110, 21-33.
- BOEHM, C.L., Harrison H.C., Jung, G. and Nienhuis, J. 1999. Organization of American and Asian Ginseng Germplasm Using Randomly Amplified Polymorphic DNA. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 124 (3), 252-256.
- BOITEUX, L.S., Fonseca, M.E.N., Simon, P.W. 1999. Effects of Plant Tissue and DNA Purification Method on Randomly Amplified Polymorphic DNA-based Genetic Fingerprinting Analysis in Carrot. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 124 (1), 32-38.
- BROWN, J.S. 1991. Principal Component and Cluster Analyses of Cotton Cultivar Variability across the U.S. Cotton Belt. *Crop science*, 31: 915-922.
- CANTRELL, R.G. and Davis, D.D. 1993. Characterization of *hirsutum* x *barbadense* Breeding Lines Using Molecular Markers. Beltwide Cotton Conferences, pp. 1551-1553.
- CAO, D. and Oard, J.H. 1997. Pedigree and RAPD-Based DNA Analysis of Commercial U.S. Rice Cultivars. *Crop Science*, 37, 1630-1635.
- ÇAKIR, F. 1994. Karşılıklı Bağımlılığın Ölçülmesinde Kümeleme Analizi ve Bir Uygulama Marmara Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü Ekonometri Anabilim Dalı İstatistik Bilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul.

- BANOĞLU, G. 1994. Arpa Genomunun Moleküler Analizi. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniv. Fen Bilimleri Enst., İstanbul.
- LLAPORTA, S L., Wood, J. and Hicks, J.B. 1985. Maize DNA Miniprep In: Molecular Biology of Plants: A Laboratory Course Manual, pp. 36-37 I Cold Spring Harbor Press, New York
- MEKE, T., Adams, R.P. and Chibbar, R. 1992. Potential Taxonomic Use of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD): A Case Study in *Brassica Theor. Appl. Genet.*, 84, 990-994.
- MEKE, T., Lynch, D.R., Kawchut, L.M., Kozub, G.C. and Armstrong, J.D. 1996. Genetic Diversity of Potato Determined by Random Amplified Polymorphic DNA Analysis. *Plant Cell Reports*, 15 (9), 662-667
- EMİR, İ., 1962. Türkiye'de yetiştirilen Önemli Susam Çeşitlerinin Başlıca Morfolojik Biyolojik ve Sitolojik Vasıfları Üzerinde Araştırmalar. E.Ü.Z.F. Yayınları: 53, İzmir.
- EVOS, K.M., and Gale, M.D. 1992. The Use of Random Amplified Polymorphic DNA Markers in Wheat. *Theor. Appl. Genet.*, 84, 567-572.
- HILLON, N.P.S., Ishiki, K. 1999. Genomic Variation and Genetic Relationships in *Ipomoea* spp. *Plant breeding*, 118, 161-165.
- IGBY, P.G.N. and Kempton, R.A. 1987. Multivariate Analysis of Ecological Communities. Population and Community Biology, New York
- OLDI, M.L., Volmann, J. and Lelley, T. 1997. Genetic Diversity in Soybean as Determined by RAPD and Microsatellite Analysis. *Plant Breeding*, 116, 331-335
- RAPER, J., Scott, R., Armitage, P. and Walden R. 1988. Plant Genetic Transformation and Gene Expression A Laboratory Manual, Great Britain.
- UNEMANN, F., Kahnau, R. and Schmidt, H. 1994. Genetic Relationships in *Malus* Evaluated by RAPD "Fingerprinting" of Cultivars and Wild Species *Plant Breeding*, 113, 150-159
- URAN, Y., Rohde, W., Kullaya, A., Goikoetxea and Ritter, E. 1997. Molecular Analysis of East African Tall Coconut Genotypes by DNA Marker Technology. *J. Genet. and Breed.*, 51, 279-288.
- SCRIBANO, M.R., Santalla, M., Casquero, P.A. and DeRon, A.M. 1998. Patterns of Genetic Diversity in Landraces of Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) from Galicia. *Plant breeding*, 117, 49-56.

- OFANA, B., Vekemans, X., du Jardin, P. and Baudoin, J.P. 1997. Genetic Diversity in Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) As Revealed by RAPD Markers, *Euphytica*, 95, 157-165.
- RELLO, S., Hansen, K.R., Jensen, J. and Jørgensen, R.B. 1995. Inheritance of Rapeseed (*Brassica napus*)-specific RAPD Markers and a Transgene in the Cross *Brassica juncea* x (*Brassica juncea* x *Brassica napus*). *Theor Appl. Genet.*, 91, 236-241.
- ANESH, S.K. and Thangavelu, S. 1995. Genetic Divergence in Sesame (*Sesamum indicum* L.). *Madras Agric. J.*, 82(4), 263-265.
- ALDERISI, U., Cipollaro, M., Di Bernardo, G.D., De Masi, L., Galano, G. and Cascino, A. 1998. Molecular Typing of Italian Sweet Chestnut Cultivars by Randomly Amplified Polymorphic DNA Analysis. *Journal of Hort. Science and Biotechnology*, 73 (2), 259-263.
- VIDONI, D., Rom, M., Kunik, I., Zur, M., Izsak, E. and Firon, N. 1994. Strawberry-Cultivar Identification Using Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers. *Plant Breeding*, 113, 339-342.
- GOLEMBIEWSKI, R. C., Danneberger, I. K. and Sweeney, P.M. 1997. Potential of RAPD Markers for Use in the Identification of Creeping Bentgrass Cultivars. *Crop Sci.* 37, 212-214.
- GÖÇMEN, B. 1994. Single Tree Genetic Linkage Mapping of *Taxus brevifolia* Nutt. Based on Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers Using DNA from Haploid Megagametophytes. Master Thesis, The Graduate School of Natural and Applied Sciences of Middle East Technical University, Ankara.
- GÖZÜKIRMIZI, N., Arı, Ş., Gürel, F., Çobanoğlu, G., Rüstemova, P., Bilgen, G., Can, Ö. ve Ekiz, H. 1995. *Hordeum* (Arpa)'da Genetik Stabilite, Germplasm Örneklerinde Polimorfizm ve Genetik Haritalama için RAPD Yöntemi ile Parmak İzi Çalışmaları ve Arpa Islahına Etkileri. Biyoteknoloji ve Bitki Islahı, Workshop, 17-19 Nisan, Gebze/Kocaeli.
- HALLDÉN, C., Nilsson, N.O., Rading, I.M. and Säll, T. 1994. Evaluation of RFLP and RAPD Markers in a Comparison of *Brassica napus* Breeding Lines. *Theor. Appl. Genet.*, 88, 123-128.
- HARCH, B.D., Basford, K.E., DeLacy, L.H. and Lawrence, P.K. 1997. The Analysis of Large Scale Data Taken From The World Groundnut (*Arachis hypogaea* L.) Germplasm Collection I. Two-way Quantitative Data. *Euphytica*, 95, 27-38.
- HEUN, M. and Helentjaris, T. 1993. Inheritance of RAPDs in F₁ Hybrids of Corn. *Theor Appl. Genet.*, 85, 961-968.

TEBRANDT, V.M. 1932. *Sesamum indicum* L. Bull. Appl. Bot. Gen. and Plant Breeding Series IX, No:2, 3-107.

RMANN, C.E. and Osborn, I.C. 1992. Use of RAPD and RFLP Markers for Germplasm Evaluation. In:Proc. Conf. Appl. RAPD Tech. *Plant Breeding*, Minneapolis, pp.9-11.

, J., Quiros, C., Arus, P., Struss, D. and Robbelen, G. 1995. Mapping of Gene Determining Linolenic Acid Concentration in Rapeseed with DNA-based Markers. *Theor. Appl. Genet.*, 90, 258-262.

, T.K. 1985. Studies on Inheritance and Breeding in Sesame I. The application of Different Cultivated, Types in the Improvement of Yield. *Journal of the Agric. Assoc. of China*, 130, 44-51.

HIKI, S. and Umezaki, T. 1997. Genetic Variations of Isozyme in Cultivated Sesame (*Sesamum indicum* L.). *Euphytica*, 93, 375-377.

N, A., Bhatia, S., Banga, S.S., Prakash, S. and Lakshmikumaran, M. 1994. Potential Use of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Technique to Study the Diversity in Indian mustard (*Brassica juncea*) and Its Relationship to Heterosis. *Theor. Appl. Genet.*, 88:116-122.

HNS, M.A., Skroch, P.W., Nienhuis, J., Hinrichsen, P., Bascur, G. and Muñoz-Schick, C. 1997. Gene Pool Classification of Common Bean Landraces from Chile Based on RAPD and Morphological Data. *Crop Science*, 37, 605-613.

LLIFFE, I.T. 1986. Principle component analysis. Springer Verlag, New York.

SHI, C.P. and Nguyen, H.T. 1993. RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) Analysis Based Intervarietal Genetic Relationships Among Hexaploid Wheats. *Plant Science-Limerick*, 93, 1-2, 95-103.

ZAN, K., Manners, J.M. and Cameron, D. F. 1993. Genetic Variation in Agronomically Important Species of *Stylosanthes* Determined Using Random Amplified Polymorphic DNA Markers. *Theor. Appl. Genet.*, 85, 882-888.

FEIN-LANKHORST, R.M., Vermunt, A., Weide, R., Liharska I. and Zabel, P. 1991. Isolation of Molecular Markers for Tomato (*L. esculentum*) Using Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD). *Theor. Appl. Genet.*, 83, 108-114.

OLLER, B., Lehmann, A., McDermott, J.M. and Gessler, C. 1993. Identification of Apple Cultivars Using RAPD Markers. *Theor. Appl. Genet.*, 85, 901-904.

- M.K., Yang, J., Jin, Y.H., Lee, C.H. and Oh, B.J. 1998. Genetic Relationships of *Viola* Species Evaluated by Random Amplified Polymorphic DNA Analysis. *Journal of Hort. Science and Biotechnology*, 74 (5), 601-605.
- ORNNEEF, M. 1990. In O'Brien, S.J. Genetic Maps. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, pp. 694-697, New York.
- ZANOWSKI, W.J. 1988. Principles of Multivariate Analysis, A user's Perspective, Oxford Publications
- NHAM, P.G. and Brennan, R.M. 1999. Genetic Characterization of Gooseberry (*Ribes grossularia* subgenus *Grossularia*) Germplasm Using RAPD, ISSR and AFLP Markers. *Journal of Hort. Science and Biotechnology*, 74 (3), 361-366.
- NGE, D.A., Peñuela, S., Denny, R.L., Mudge, J., Concibido, V.C., Orf, J.H. and Young, N.D. 1998. A Plant DNA Isolation Protocol Suitable for Polymerase Chain Reaction Based Marker-Assisted Breeding. *Crop Science*, 38, 217-220.
- M. and Midmore, D.J. 1999. Estimating The Genetic Relationships of Chinese Water Chestnut (*Eleocharis dulcis* (Burm. f.) Hensch) Cultivated in Australia, Using Random Amplified Polymorphic DNAs (RAPDs). *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 74(2), 224-231.
- J, C.J. 1997. Geographical Distribution of Genetic Variation in *Stylosanthes scabra* revealed by RAPD analysis, *Euphytica*. 98, 21-27.
- J, Z.W., Jarret, R.L., Kresovich, S. and Duncan, R.R. 1995. Characterization and Analysis of Simple Sequence Repeat (SSR) Loci in Seashore Paspalum (*Paspalum vaginatum* Swartz). *Theor. Appl. Genet.*, 91, 47-52.
- I, A., Cocks, P.S., Howieson, J.G. and Carr, J. 1997. Morphological Characterization of Mediterranean Populations of *Biserrula pelecinus* L. *Plant Breeding*, 116, 171-176.
- UGHAN, P.J., Maroof, M.A.S. and Buss, G.R. 1996. Molecular-marker Analysis of Seed-Weight: Genomic Locations, Gene Action, and Evidence for Orthologous Evolution Among Three Legume Species. *Theor. Appl. Genet.*, 93, 574-579.
- NNINEN, O.M., Turpeinen, T. and Nissilä, E. 1997. Identification of RAPD Markers Closely Linked to The *mlo*-locus in Barley. *Plant Breeding*, 116, 461-464.
- NIATIS, T., Fritsch, E. and Sambrook, J. 1982. Molecular Cloning: A Laboratory Manual: Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York

- MEKURIA, G I., COLLINS, G.G. and Sedgley, M. 1999. Genetic Variability Between Different Accession of Some Common Commercial Olive Cultivars. *Journal of Hort Science and Biotechnology*, 74 (3), 309-314.
- MENKIR, A., Goldsbrough, P. and Ejeta, G. 1997. RAPD Based Assessment of Genetic Diversity in Cultivated Races of *Sorghum*. *Crop Sci.* 37, 564-569.
- MILLAN, T., Osuna, F., Cobos, S., Torres, A.M. and Cubero, A.M. 1996. Using RAPDs to Study Phylogenetic Relationships in Rosa. *Theor. Appl. Genet.*, 92, 273-277.
- MOUZEYAR, S., Roeckel-Drevet, P., Gentzbittel, L., Philippon, J., Tourvieille De Labrouhe, D., Vear, F. and Nicolas, P. 1995. RFLP and RAPD Mapping of The Sunflower P11 Locus for Resistance to *Plasmopara halstedii* race 1. *Theor. Appl. Genet.*, 91, 733-737.
- NAGAOKA, T., Ogihara, Y. 1997. Applicability of Inter-Simple Sequence Repeat Polymorphism in Wheat for Use as DNA Markers in Comparison to RFLP and RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.*, 94, 597-602.
- NEI, N. and Li, W. 1979. Mathematical Model for Studying Genetic Variation in Terms of Restriction Endonucleases. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 76, 5269-5273.
- NEWBURY, H.J and Ford-Lloyd, B.V. 1993. The Use of RAPD for Assessing Variation in Plants. *Plant Growth Regulation*, 12, 43-51.
- NOVY, R.G., Kobak, C., Goffreda, J. and Vorsa, N. 1994. RAPDs Identify Varietal Misclassification and Regional Divergence in Cranberry (*Vaccinium macrocarpon* (Ait.) Pursh). *Theor. Appl. Genet.*, 88, 1004-1010.
- PAGE, D., Delclos, B., Aubert, G., Bonavent, J.F. and Mousset-Declas, C. 1997. Sclerotinia rot resistance in red clover: Identification of RAPD Markers Using Bulk Segregant Analysis. *Plant Breeding*, 116, 73-78.
- PALUMBI, S., Martin, A., Romana, S., McMillan, W.D., Stice, L. and Grabowski, G. 1991. The Simple Fool's Guide to PCR. University of Hawaii, sf.12.
- PAMMI, Schertz, K., Xu, G., Hart and G., Mullet, J.E. 1994. Random Amplified Polymorphic DNA markers in *Sorghum*. *Theor. Appl. Genet.*, 89, 80-88.
- PANCHOLI, N. 1995. Aspect of Tissue Culture in Relation to Banana Improvement and Germplasm conservation. The University of Reading, Department of Agricultural Botany, School of Plant Sciences, 301pp.
- PAPA, R., Attene, G., Barcaccia, G., Ohgata, A. and Konishi, T. 1998. Genetic Diversity in Landrace Populations of *Hordeum vulgare* L. from Sardinia, Italy, as revealed by RAPDs, Isozyme and Morphophenological Traits. *Plant breeding*, 117, 523-530.

- ARANI, M., Singh, K.N., Rangasamy, S and Ramalingam, R.S 1997 Identification of *Sesamum alatum* x *Sesamum indicum* Hybrid Using Protein, Isozyme and RAPD Markers. *Indian J Genet.*, 57(4), 381-388.
- ATIL, R.R. and Sheriff, R.A. 1994. Genetic Divergence in Sesame (*Sesamum indicum* L.). *Mysore J Agric Sci*, 28, 106-110.
- ERRY, M.C. and McIntosh, M.S. 1991. Geographical Patterns of Variation in the USDA Soybean Germplasm Collection: I. Morphological Traits. *Crop science*, 31: 1350-1355.
- ESSINO, S C., Ortiz, J.P.A., Leblanc, O., do Valle, C.B., Evans, C. and Hayward, M.D. 1997. Identification of a Maize Linkage Group Related to Apomixis in *Brachiaria*. *Theor. Appl. Genet.*, 94, 439-444.
- UIJADA, P. and Layrisse, A. 1995. Heterosis and Combining Ability in Hybrids Among 12 Commercial Varieties of Sesame (*Sesamum indicum* L.). *Plant Breeding*, 114, 239-242.
- KAART, M.J. and Villeponteau, B. 1993. Suppression of PCR Amplification by High Levels of RNA. *Biotechniques*, 14, 24-25.
- AJASEGER, G., Tan, H I.W., Turner, I.M., and Kumar, P.P. 1997. Analysis of Genetic Diversity Among *Ixora* Cultivars (*Rubiaceae*) Using Random Amplified Polymorphic DNA. *Annals of Botany*, 80: 355-361.
- ETER, S.R., Young, M. and Scolnik, P.A. 1993. Genetic Linkage of The Arabidopsis Genome: Methods for Mapping with Recombinant Inbreds and Random Amplified Polymorphic DNAs (RAPDs) Methods in Arabidopsis Research, World Scientific Publishing, Singapore.
- IEDE, C.R., Fairbanks, D.J., Andersen, W.R., Kehrer, R.L. and Robinson, L.R. 1994. Enhancement of RAPD Analysis by Restriction-Endonuclease Digestion of Template DNA in Wheat. *Plant Breeding*, 113, 254-257.
- OLF, F.J. 1993. NTSYS-PC Numerical Taxonomy and Multivariate Sysetem Version 1.80. Applied Biostatistics Inc., New York.
- OWLAND, L.J. and Levi, A. 1994. RAPD-Based Genetic Linkage Map of Blueberry Derived from a Cross Between Diploid Species (*Vaccinium darrowi* and *V. elliottii*), *Theor Appl. Genet.*, 87, 863-868.
- ROYO, C., Soler, C. and Romagosa, I. 1995. Agronomical and Morphological Among Winter and Spring *Triticale*s. *Plant Breeding*, 114, 413-416.

- USSEL, J.R., Fuller, J.D., Macaulary, M., Hatz, B.G., Jahoor, A., Powell, and Waugh, R. 1997. Direct Comparison of Levels of Genetic Variation Among Barley Accessions Detected by RFLPs, AFLPs, SSRs and RAPDs. *Theor. Appl. Genet.*, 95, 714-722.
- ANTALLA, M., Power, J.B. and Davey, M.R. 1998. Genetic Diversity in Mung Bean Germplasm Revealed by RAPD Markers. *Plant Breeding*, 117, 473-478.
- SAS, Sas Institute 1987. SAS User's Guide Release 6.03 Edition. Cary, North Carolina, SAS Institute Inc.
- CHNELLER, J., Holderegger, R., Gugerli, F., Eichenberger, K. and Lutz, E. 1998. Patterns of Genetic Variation Detected by RAPDs Suggest a Single Origin With Subsequent Mutations and Long-Distance Dispersal in the Apomictic Fern *Dryopteris remota* (*Dryopteridaceae*). *American Journal of Botany*, 85 (7), 1038-1042.
- CHONTZ, D. and REITHER, B. 1999. Genetic Variability in Foxtail Millet, *Setaria italica* (L.) P. Beauv.: Identification and Classification of Lines with RAPD Markers. *Plant Breeding*, 118, 190-192.
- HARMA, S.K., Dawson, I.K. and Waugh, R. 1995. Relationships Among Cultivated and Lentils Revealed by RAPD Analysis. *Theor. Appl. Genet.*, 91: 647-654.
- INGH, S.P., Gutiérrez, J.A., Molina, A., Urrea, C., and P. Gepts. 1991. Genetic Diversity in Cultivated Common Bean: II. Marker-Based Analysis of Morphological and Agronomic Traits. *Crop science*, 31: 23-29.
- KROCH, P.W. and Nienhuis, J. 1995. Qualitative and Quantitative Characterization of RAPD Variation Among Snap Bean (*Phaseolus vulgaris*) Genotypes. *Theor. Appl. Genet.*, 91, 1078-1085.
- KROCH, P.W., Tivang, J. and Nienhuis, J. 1992. Analysis of Genetic Relationships Using RAPD Marker Data. Applications of RAPD Technology to Plant Breeding Joint Plant Breeding Symposia Series, Minneapolis, Minnesota.
- OUZA E., and Sorrells, M.E. 1991. Relationships Among 70 North American Oat Germplasm: I. Cluster Analysis Using Quantitative Characters. *Crop science*, 31:599-605.
- POONER, D.M., Tivang, J., Nienhuis, J., Miller, J.T., Douches D.S. and Contreras-M, A. 1996. Comparison of Four Molecular Markers in Measuring Relationships Among The Wild Potato Relatives *Solanum* Section *Etuberosum* (subgenus potatoe), *Theor. Appl. Genet.*, 92, 532-540.
- STEEN, S.W. 1999. Handbook for DNA Isolation, RAPD-PCR and PCR-RFLP. Botanical Garden and Museum, Univ. of Oslo.

- RAND, A.E., Leebens-Mack, J. and Milligan, B. 1996. Nuclear DNA-Based Markers to Plant Evolutionary Biology. *Molecular Ecology*, 6, 113-118.
- UGAWARA, K., Oowada, A., Moriguchi, T. and Omura, M. 1995. Identification of *Citrus* Chimeras by RAPD Markers. *Hort. Science*, 30(6), 1276-1278.
- ENTÜRK, A. 1995. Kümeleme Analizi ve Bir Uygulama. Yüksek Lisans Tezi. Uludağ Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü Ekonometri Anabilim Dalı İstatistik Bilim Dalı, Bursa.
- ANHUANPÄÄ, P.K., Vilkki, J.P. and Vilkki, H.J. 1995. Identification of a RAPD Marker for Palmitic-acid Concentration in The Seed Oil of Spring Turnip Rape (*Brassica rapa ssp. oleifera*). *Theor Appl Genet.*, 91, 477-480.
- AO, Y., Manners, J.M., Ludlow, M.M. and Henzell, R.G. 1993. DNA Polymorphism in Grain *Sorghum* (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). *Theor Appl Genet*, 86, 679-688.
- ATINENI, V., Cantrell, R.G. and Davis, D.D. 1996. Genetic Diversity in Elite Cotton Germplasm Determined by Morphological Characteristics and RAPDs. *Crop Science*, 36, 186-192.
- ATLIDİL H. 1996. Uygulamalı Çok Değişkenli İstatistiksel Analiz. Ankara
- HOMPSON, J.A., Nelson, R.L. and Vodkin, L.O. 1998. Identification of Diverse Soybean Germplasm Using RAPD Markers. *Crop Science*, 38, 1348-1355
- HOMPSON, J.A. and Nelson, R.L. 1998. Core Set of Primers to Evaluate Genetic Diversity in Soybean, *Crop Science*, 38, 1356-1362.
- HORMANN, C.E. and Osborn, T.C. 1992. Use of RAPD and RFLP Markers for Germplasm Evaluation. Applications of RAPD Technology to Plant Breeding. Joint Plant Breeding Symposia Series, Minneapolis, Minnesota.
- RANSUE, D.K., Fairbanks, D.J., Robinson, L.R. and Andersen, W.R. 1994. Species Identification by RAPD Analysis of Grain Amaranth Genetic Resources. *Crop Science*, 34, 1385-1389
- TÜRKER, M.F. ve Türker, E.S. 1994. Ana Bileşenler Analizi Yardımıyla Yakacak Odun Tüketiminin Sosyo- Ekonomik Analizi. *Tr. J. of Agriculture and Forestry*, 18, 155- 159.
- TÜRKER, M.F. ve Türker, E.S. 1999. Çok Değişkenli İstatistik Analiz Yardımı ile Orman İşletmelerinin Ekonomik Analizi (Doğu Karadeniz Bölgesi 25 Devlet Orman İşletmesi Örneği). *Tr. J. of Agriculture and Forestry*, 23 (1), 169-177

- RAHMAN, H., James D.J., Hadonou, A.M. and Caligari, P.D.S. 1997. The Use of RAPD for Verifying The Apomictic Status of Seedlings of *Malus* Species. *Theor Appl. Genet*, 95, 1080-1083.
- RGHESE, Y.A., Knaak, C., Sthuraj, M.R., and Ecke, W. 1997. Evaluation of RAPD Markers in *Hevea brasiliensis*, *Plant Breeding*, 116, 47-52.
- RDISSON, S., Baillieul, F. and Audran, J.C. 1999. Use of Markers to Detect Chimerism in Synthetic Grape Chimeras (*Vitis vinifera* L.). *Vitis*, 38, 3, 93-95.
- ERLING, R.A., Xiang, Z., Joshi, C.P., Gilbert, M.L. and Nguyen, H.T. 1994. Genetic Diversity Among Elite *Sorghum* Lines Revealed by Restriction Fragment Length Polymorphisms and Random Amplified Polymorphic DNAs. *Theor Appl. Genet*, 87, 816-820.
- LAND, J., Skroch, P.W., Lai, T., Hanson, P., Kuo, C.G. and Nienhuis, J. 1998. Genetic Variation Among Tomato Accession from Primary and Secondary Centers of Diversity. *Crop Science*, 38, 1339-1347.
- ANG, M. and Goldman, I.L. 1999. Genetic Distance and Diversity in Table Beet and Sugar Beet Accessions Measured by Randomly Amplified Polymorphic DNA. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 124 (6), 630-635.
- EDEN, N.F., Timmerman, G.M., Hemmat, M., Kneen, B.E. and Lodhi, M.A. 1992. Inheritance and Reliability of RAPD Markers, Applications of RAPD Technology to Plant Breeding, Joint Plant Breeding Symposia Series, Minneapolis, Minnesota.
- LLIAMS, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V. 1990. DNA Polymorphisms Amplified by Arbitrary Primers are Useful as Genetic Markers. *Nucleic Acids Research*, 18 (22), 6531-6535.
- MAGISHI, M. 1995. Detection of Section-specific Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers in *Lilium*. *Theor Appl. Genet*, 91, 830-815.
- E, E., Kidwell, K.K., Sills, G.R. and Lumpkin, T.A. 1999. Diversity Among Selected *Vigna angularis* (Azuki) Accessions on The Basis of RAPD and AFLP Markers. *Crop Science*, 39: 268-275.
- , L.X. and Nguyen, H.T. 1994. Genetic Variation Detected with RAPD Markers Among Upland and Lowland Rice Cultivars (*Oryza sativa*, L.). *Theor Appl. Genet*, 87, 6, 668-672.

ış

1 yılında Konya'da doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Konya'da
m. 1989 yılında Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümüne
rdım ve 1993 yılında lisansımı tamamladım. Aynı yıl Akdeniz Üniversitesi
ültesi Tarla Bitkileri Bölümünde Yüksek Lisans yapmaya başladım. 1996
sek lisansımı tamamlayarak aynı bölümde doktora çalışmaya başladım. Halen
niversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümünde Araştırma görevlisi
çalışmalarımı sürdürmekteyim.

AKDENİZ
ÜNİVERSİTESİ
ZİRAAT FAKÜLTESİ
TARLA BİTKİLERİ BÖLÜMÜ