T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MİKROAŞILANAN VE MİKROÇOĞALTILAN TİCARİ ÖNEME SAHİP BADEM [*Punus dulcis* (Mill) D.A. Webb] ÇEŞİTLERİNE AİT KLONLARIN GENETİK KARARLILIKLARININ MOLEKÜLER BELİRTEÇLER İLE İNCELENMESİ

VEYSEL SÜZERER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK

ANABİLİM DALI

GEBZE

2013

T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MİKROAŞILANAN VE MİKROÇOĞALTILAN TİCARİ ÖNEME SAHİP BADEM [*Punus dulcis* (Mill) D.A. Webb] ÇEŞİTLERİNE AİT KLONLARIN GENETİK KARARLILIKLARININ MOLEKÜLER BELİRTEÇLER İLE İNCELENMESİ

VEYSEL SÜZERER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

DOÇ. DR. YELDA ÖZDEN ÇİFTÇİ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

GEBZE

2013

YÜKSEK LİSANS TEZİ JÜRİ ONAY SAYFASI

G.Y.T.E. Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun tarih ve sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 02.01.2013 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Veysel SÜZERER'in tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE
(TEZ DANIŞMANI) :Doç. Dr. Yelda ÖZDEN ÇİFTÇİ

ÜYE :Doç. Dr. Tamer ÖZCAN

ÜYE :Doç. Dr. Meltem YEŞİLÇİMEN AKBAŞ

ONAY

G.Y.T.E. Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun ……/……/20… tarih ve ……/…… sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR

ÖZET

TEZİN BAŞLIĞI: MİKROAŞILANAN VE MİKROÇOĞALTILAN TİCARİ ÖNEME SAHİP BADEM [*Prunus dulcis* (Mill) D.A. Webb] ÇEŞİTLERİNE AİT KLONLARIN GENETİK KARARLILIKLARININ MOLEKÜLER BELİRTEÇLER İLE İNCELENMESİ

YAZAR ADI: VEYSEL SÜZERER

Badem (*Prunus dulcis*) *Prunus* cinsi içerisinde ekonomik olarak en önemli yemiş ağaçlarından birisidir. Türün geleneksel olarak üretimi sırasında köklenme gibi bazı sorunlarla karşılaşılması nedeniyle ticari öneme sahip badem çeşitlerinin mikroaşılama gibi biyoteknolojik yöntemlerle çoğaltılması son zamanlarda önem kazanmıştır. Ancak, mikroaşılanan bitkiciklerin *in vitro* koşullarda altkültürlenerek mikroçoğaltımı sırasında kültürün başlatıldığı ana bitki ve klon bireyler arasında genetik varyasyon oluşma riski, çoğaltılan bireylerin tarla koşullarına aktarılmadan önce genetik kararlılıklarının belirlenmesi gerekliliğini ortaya çıkartmaktadır. Bu nedenle, tez kapsamında mikroaşılanan 'Ferrastar' ve 'Nonpareil' çeşitlerinin 3, 6 ve 9 ay; 'Teksas' çeşidinin ise 6 ve 9 ay altkültürlenmesi sonucunda oluşan bireylerin genetik kararlılıkları iki farklı (RAPD ve ISSR) moleküler belirteç kullanılarak irdelendi. 'Ferrastar' çeşidinin ana bitki ve klonları arasında RAPD belirteci ile %6.25 polimorfizm (ortalama PIC değeri 0.2585); ISSR analizi ile ise %22.38 polimorfizm (ortalama PIC değeri 0.3592) elde edildi. 'Nonpareil' çeşidine ait ana bitki ve klonlar arasında ise RAPD analizi ile %10.2 polimorfizm (ortalama PIC değeri 0.4490); ISSR primeri ile ise %37.38 polimorfizm (ortalama PIC değeri 0.3231) bulundu. 'Teksas' çeşidine ait ana bitki ve klonlarda ise RAPD ile %3.7 polimorfizm (ortalama PIC değeri 0.3733); ISSR ile ise %26.78 polimorfizm (ortalama PIC değeri 0.4160) görüldü.

İki farklı moleküler belirtecin kullanımıyla elde edilen sonuçlara göre mikroaşılama protokolünü takiben uygulanan mikroçoğaltım yönteminin klonlarda önemli bir varyasyona (PIC değeri < 0.5) neden olmadığı ve yöntemin ticari öneme sahip diğer badem çeşitlerine de uygulanabilir olduğu görülmüştür. Tez kapsamında elde edilen sonuçlar, SCI kapsamında yer alan "Biotechnology and Biotechnological Equipment" dergisinde yayınlanmıştır.

SUMMARY

TITLE OF THE THESIS: ASSESSMENT OF GENETIC STABILITY OF MICROGRAFTED AND MICROPROPAGATED CLONES OF COMMERCIALLY IMPORTANT ALMOND [*Prunus dulcis* (Mill) D.A. Webb] CULTIVARS VIA MOLECULAR MARKERS

NAME OF THE AUTHOR: VEYSEL SÜZERER

Almond is one of the most economically important nut crop tree of *Prunus* genus. Due to problems, i.e., rooting of cuttings, encountered with its traditional production, recently, propagation of commercial almond cultivars by using biotechnological techniques such as micrografting gained importance. However, the risk of occurrence of genetic variation between mother plant, from which culture is initiated, and clone individuals during the micropropagation of micrografted plantlets with subsequent sub-culture in *in vitro* conditions, reveals the necessity of assessment of genetic stability of the propagated plants prior to their transfer to field conditions. Therefore, genetic stability of micrografted individuals obtained from 3, 6 and 9 (for 'Ferrastar' and 'Nonpareil') or 6 and 9 (for 'Texas') months subculture was assessed by using two different (RAPD and ISSR) molecular markers in the frame of the thesis. 6.25% polymorphism (mean PIC value 0.2585) was detected in RAPD marker while 22.38% polymorphism (mean PIC value 0.3592) was obtained with ISSR analysis between mother plant and clones of 'Ferrastar'. In the case of 'Nonpareil', 10.2% polymorphism (mean PIC value 0.4490) was scored with RAPD whereas 37.38% polymorphism (mean PIC value 0.3231) was seen after ISSR analysis of the mother plant and clones. In 'Texas', 3.7% polymorphism (mean PIC value 0.3733) was detected with RAPD while 26.78% polymorphism (mean PIC value 0.4160) was scored between mother plant and clones.

According to results obtained from the usage of two different molecular markers, micropropagation protocol applied just after micrografting did not cause the occurrence of an important variation (PIC value < 0.5) in clones and the optimized protocol can also be applied safely to other commercially important almond cultivars. Results obtained in the frame of thesis is published in SCI indexed "Biotechnology and Biotechnological Equipment" journal.

TEŞEKKÜR

GYTE, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Bitki Biyoteknolojisi Labaratuvarı' na geldiğim günden itibaren, maddi ve manevi her türlü desteği veren, en zor zamanlarımda yanımda bulunan ve beni asla yalnız bırakmayan, akademik duruşu ile beni kendine hep hayran bırakan, hep minnettar kalacağım sevgili hocam Doç. Dr. Yelda Özden Çiftçi' ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Lisans öğrenimime başladığımdan günden itibaren akademik anlamda tüm bilgilerini paylaşan ve beni yetiştiren Prof. Dr. Ahmet Onay' a, Dicle Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoteknoloji Labaratuvarı' nda asistan öğrenci olarak çalışmaya başladığım günden itibaren akademik anlamda her zaman bilgisine başvurduğum Doç. Dr. Engin Tikat' a; Tez çalışmamın konusu oluşturan badem çeşitlerinin aşılanması ve çoğaltım aşamasını gerçekleştiren Yrd. Doç. Dr. Hakan Yıldırım'a teşekkürlerimi sunarım.

GYTE MBG Bitki Biyoteknolojisi Labaratuvarı' nı tanıdığımı günden berri bana her konuda, maddi ve manevi desteğini esirgemeyen, iş arkadaşım, dostum, ablam Dr. Hülya Akdemir' e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

GYTE MBG Bitki Biyoteknolojisi Ekibi' ne Yrd. Doç. Dr. Elif Aylin Özdoğru, Dr. Ergun Kaya, İbrahim Koç, Emrah Kırdök, Doğa Gümüşel, M. Hamit Ekinci, Ceyhun Öztürk'e teşekkür ederim.

Bölümümüze modern bir bina kazandırmasında önemli bir rolü olan GYTE MBG Bölümü Eski Başkanı Prof. Dr. Füsun Gümüşel' e teşekkür ederim.

Bölüm Başkanımız Prof. Dr. Tamer Yağcı' ya ayrıca GYTE MBG Öğretim Üyeleri, Doktora ve Yüksek Lisans Öğrencileri' ne teşekkür ederim.

Biricik Kardeşim Fatih Mehmet Kılınç'a teşekkür ederim.

Bu tezi, (Rahmetli) Babam Mehmet Süzerer, Annem Şenel Süzerer, Abim Mehmet, Ablam Oya ve yeğenlerim Vildan ve Furkan'a ithaf ediyorum.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	Sayfa
ÖZET	iv
SUMMARY	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xxiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Bademin (*Prunus dulcis*) Kökeni ve Morfolojisi	1
1.2. Yayılışı, Ekolojik İsteği ve Ekonomik Önemi	2
1.3. Bademin Sektörel Kullanım Alanları ve Kimyasal İçeriği	3
1.4. Morfolojik Olarak Bademin Sınıflandırılması	3
1.5. Dünya' da Üretimi Yapılan Bazı Kültür ve Anaç Badem Çeşitleri	4
1.6. Geleneksel Üretim ve Karşılaşılan Sorunlar	8
1.7. Biyoteknolojik Yöntemlerle Çoğaltımı	9
1.7.1. Prunus Cinsine Ait Bazı Türlerin Mikroçoğaltımı	10
1.7.2. Bademin Mikroçoğaltılması	10
1.8. Somaklonal Varyasyon	12
1.8.1. Bazı Prunus Türlerine Ait Somaklonal Varyasyon Belirleme Çalışmaları	13
1.8.2. Badem de Somaklonal Varyasyon Çalışmaları	13
1.9. Tezin Amacı	13
2. MATERYAL VE YÖNTEM	15
2.1. Materyal	15
2.1.1. Genomik DNA (gDNA) izolasyonu ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) İçin Gerekli Kimyasallar ve Cihazlar	15
2.1.2. 'Ferrastar', 'Nonpareil' ve 'Teksas' Ticari Badem Çeşitlerinin Mikroaşılanması ve Mikroçoğaltılması	18
2.2. YÖNTEM	19

Sayfa

2.2.1.‘Ferrastar’, ‘Nonpareil’ ve ‘Teksas’ Ticari Badem Çeşitleri Klonlarından gDNA’ ların İzolasyonu ve Miktar Tayini 19
2.2.2.’Ferrastar’, ‘Nonpareil’ ve ‘Teksas’ Ticari Badem Çeşitlerinin Klonlarının Genetik Analizleri 20
2.2.2.1. RAPD-PCR Analizleri 20
2.2.2.2. ISSR-PCR Analizleri 23
2.2.3. Oluşan Bantların Değerlendirilmesi, Benzerlik Oranlarının Hesaplanması ve Dendogramlarının Oluşturulması 25
3. BULGULAR 26
3.2. İzole Edilen gDNA’ ların Miktarlarının Belirlenmesi 26
3.3. RAPD-PCR Analizlerinin Değerlendirilmesi 28
3.3.3. *P. dulcis* ‘Ferrastar’ Çeşidi İçin RAPD-PCR Analizlerinin Değerlendirilmesi 28
3.3.4. *P. dulcis* ‘Nonpareil’ Çeşidi İçin RAPD-PCR Analizlerinin Değerlendirilmesi 43
3.3.5. *P. dulcis* ‘Teksas’ Çeşidi İçin RAPD-PCR Analizlerinin Değerlendirilmesi 58
3.4. ISSR-PCR Analizlerinin Değerlendirilmesi 73
3.4.3. *P. dulcis* ‘Ferrastar’ Çeşidi İçin ISSR-PCR Analizlerinin Değerlendirilmesi 73
3.4.4. *P. dulcis* ‘Nonpareil’ Çeşidi İçin ISSR-PCR Analizlerinin Değerlendirilmesi 86
3.4.5. *P. dulcis* ‘Teksas’ Çeşidi İçin ISSR-PCR Analizlerinin Değerlendirilmesi 99
4. Tartışma 112
4.1. gDNA İzolasyon Yönteminin Belirlenmesi 112
4.4.1. Klonların Genetik Kararlılıklarının İrdelenmesi İçin Yapılan RAPD-PCR ve ISSR-PCR Sonuçlarının Değerlendirilmesi 113
5. SONUÇ 117
6. KAYNAKLAR 119
ÖZGEÇMİŞ 131
EKLER 135

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

$^{\circ}C$	Santigrat Derece
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
AFLP	Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi
bç	Bazçifti
CTAB	Setiltrimetilamonyum bromid
dH_2O	Distile su
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleikasit
EtOH	Etil alkol
EDTA	Etilendiamintetraasetikasit
FaoSTAT	Gıda ve Tarım Kurumsal Teşkilatı İstatistik Veritabanı
gDNA	Genomik DNA
ISSR	Basit Tekrarlı Diziler Arası Polimorfizm
kb	Kilobaz
ml	Mililitre
mg	Miligram
MS	Murashige ve Skoog
$MgCl_2$	Magnezyum Klorür
MSAP	Metilasyona Duyarlı Çoğaltılmış Polimorfizm
NaCl	Sodyum klorür
ng	Nanogram
P.	*Prunus*
PCR (PZR)	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PIC	Polimorfik Bilgi İçeriği
PVP	Polivinilprolidon
RAPD	Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA
RFLP	Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi
rpm	Dakikada dönüş hızı
SSR	Basit Tekrarlı Diziler
TRIS-HCl	2-amino-2-hidrokismetil-1,3-propandiol-hidroklorikasit

TAE	Tris-Asetik asit-EDTA
UV	Ultraviyole
V	Volt

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil		Sayfa
1.1.	Bahar ayında çiçek açmış badem ağacı.	1
1.2.	Bademin bazı çeşitlerine ait olan tohumlar. (Soldan sağa; 'Nonpareil, 'Teksas', 'Ferrastar', 'Ferragnes', 'Ferraduel' ve 'Tuana').	5
3.1.	'Ferrastar' (F), 'Nonpareil' (N) ve 'Teksas' (T) çeşitlerine ait izole edilen gDNA' ların jel görüntüsü. B: λ DNA-Hind III DNA; A: Ana Bitki, 3-1 ve 3-2: mikroaşılamadan sonra 3. alt kültüre ait klonlar, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar.	26
3.2.	'Ferrastar' ana materyaline ait gDNA' nın seçilen RAPD primerleri ile yapılan PZR reaksiyonu ile elde edilen bant profili.	28
3.3.	'Ferrastar' çeşidine ait, K-02 primeri ile elde edilen RAPD-PZR jel görüntüsü. B: 100 bç + 1 kb Ladder DNA A: Ana bitki, 3-1 ve 3-2: mikroaşılamadan sonra 3. alt kültüre ait klonlar, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar. Şekilde gösterilen ok polimorfik olan bantı göstermektedir.	29
3.4.	'Ferrastar' çeşidine ait, K-03 primeri ile elde edilen RAPD-PZR jel görüntüsü. B: 100 bç + 1 kb Ladder DNA A: Ana bitki, 3-1 ve 3-2: mikroaşılamadan sonra 3. alt kültüre ait klonlar, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar. Şekilde gösterilen oklar polimorfik olan bantları göstermektedir.	30
3.5.	'Ferrastar' çeşidine ait, K-05 primeri ile elde edilen RAPD-PZR jel görüntüsü. B: 100 bç + 1 kb Ladder DNA A: Ana bitki, 3-1 ve 3-2: mikroaşılamadan sonra 3. alt kültüre ait klonlar, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar. Şekilde gösterilen oklar polimorfik olan bantları göstermektedir.	31

Şekil		Sayfa
3.6.	‘Ferrastar’ çeşidine ait, K-08 primeri ile elde edilen RAPD-PZR jel görüntüsü. B: 100 bç + 1 kb Ladder DNA A: Ana bitki, 3-1 ve 3-2: mikroaşılamadan sonra 3. alt kültüre ait klonlar, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar. Şekilde gösterilen ok polimorfik olan bantı göstermektedir.	32
3.7.	‘Ferrastar’ çeşidine ait, K-09 primeri ile elde edilen RAPD-PZR jel görüntüsü. B: 100 bç + 1 kb Ladder DNA A: Ana bitki, 3-1 ve 3-2: mikroaşılamadan sonra 3. alt kültüre ait klonlar, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar.	33
3.8.	‘Ferrastar’ çeşidine ait, K-11 primeri ile elde edilen RAPD-PZR jel görüntüsü. B: 100 bç + 1 kb Ladder DNA A: Ana bitki, 3-1 ve 3-2: mikroaşılamadan sonra 3. alt kültüre ait klonlar, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar.	34
3.9.	‘Ferrastar’ çeşidine ait, K-12 primeri ile elde edilen RAPD-PZR jel görüntüsü. B: 100 bç + 1 kb Ladder DNA A: Ana bitki, 3-1 ve 3-2: mikroaşılamadan sonra 3. alt kültüre ait klonlar, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar.	35
3.10.	‘Ferrastar’ çeşidine ait, K-16 primeri ile elde edilen RAPD-PZR jel görüntüsü. B: 100 bç + 1 kb Ladder DNA A: Ana bitki, 3-1 ve 3-2: mikroaşılamadan sonra 3. alt kültüre ait klonlar, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar.	36
3.11.	‘Ferrastar’ çeşidine ait, K-17 primeri ile elde edilen RAPD-PZR jel görüntüsü. B: 100 bç + 1 kb Ladder DNA A: Ana bitki, 3-1 ve 3-2: mikroaşılamadan sonra 3. alt kültüre ait klonlar, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar.	37

Şekil **Sayfa**

3.12. 'Ferrastar' çeşidine ait, K-19 primeri ile elde edilen RAPD-PZR jel görüntüsü. B: 100 bç + 1 kb Ladder DNA A: Ana bitki, 3-1 ve 3-2: mikroaşılamadan sonra 3. alt kültüre ait klonlar, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar. 38

3.13. *P. dulcis* 'Ferrastar' çeşidinin 6 klonundan, 10 RAPD primeri ile elde edilen 96 banttan UPGMA analizi ile oluşturulan dendogram. [A: Ana bitki, 3-1 ve 3-2: mikroaşılamadan sonra 3. alt kültüre ait klonlar, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar]. 42

3.14. 'Nonpareil' ana materyaline ait gDNA' nın seçilen RAPD primerleri ile yapılan PZR reaksiyonu ile elde edilen bant profili. 43

3.15. 'Nonpareil' çeşidine ait, K-01 primeri ile elde edilen RAPD-PZR jel görüntüsü. B: 100 bç + 1 kb Ladder DNA A: Ana bitki, 3-1 ve 3-2: mikroaşılamadan sonra 3. alt kültüre ait klonlar, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar. 44

3.16. 'Nonpareil' çeşidine ait, K-03 primeri ile elde edilen RAPD-PZR jel görüntüsü. B: 100 bç + 1 kb Ladder DNA A: Ana bitki, 3-1 ve 3-2: mikroaşılamadan sonra 3. alt kültüre ait klonlar, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar. Şekilde gösterilen ok polimorfik olan bantı göstermektedir. 45

3.17. 'Nonpareil' çeşidine ait, K-05 primeri ile elde edilen RAPD-PZR jel görüntüsü. B: 100 bç + 1 kb Ladder DNA A: Ana bitki, 3-1 ve 3-2: mikroaşılamadan sonra 3. alt kültüre ait klonlar, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar. Şekilde gösterilen oklar polimorfik olan bantları göstermektedir. 46

Şekil **Sayfa**

3.18. 'Nonpareil' çeşidine ait, K-08 primeri ile elde edilen RAPD-PZR jel görüntüsü. B: 100 bç + 1 kb Ladder DNA A: Ana bitki, 3-1 ve 3-2: mikroaşılamadan sonra 3. alt kültüre ait klonlar, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar. 47

3.19. 'Nonpareil' çeşidine ait, K-09 primeri ile elde edilen RAPD-PZR jel görüntüsü. B: 100 bç + 1 kb Ladder DNA A: Ana bitki, 3-1 ve 3-2: mikroaşılamadan sonra 3. alt kültüre ait klonlar, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar. Şekilde gösterilen ok polimorfik olan bantı göstermektedir. 48

3.20. 'Nonpareil' çeşidine ait, K-11 primeri ile elde edilen RAPD-PZR jel görüntüsü. B: 100 bç + 1 kb Ladder DNA A: Ana bitki, 3-1 ve 3-2: mikroaşılamadan sonra 3. alt kültüre ait klonlar, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar. Şekilde gösterilen oklar polimorfik olan bantları göstermektedir. 49

3.21. 'Nonpareil' çeşidine ait, K-14 primeri ile elde edilen RAPD-PZR jel görüntüsü. B: 100 bç + 1 kb Ladder DNA A: Ana bitki, 3-1 ve 3-2: mikroaşılamadan sonra 3. alt kültüre ait klonlar, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar. 50

3.22. 'Nonpareil' çeşidine ait, K-15 primeri ile elde edilen RAPD-PZR jel görüntüsü. B: 100 bç + 1 kb Ladder DNA A: Ana bitki, 3-1 ve 3-2: mikroaşılamadan sonra 3. alt kültüre ait klonlar, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar. 51

Şekil		Sayfa
3.23.	'Nonpareil' çeşidine ait, K-17 primeri ile elde edilen RAPD-PZR jel görüntüsü. B: 100 bç + 1 kb Ladder DNA A: Ana bitki, 3-1 ve 3-2: mikroaşılamadan sonra 3. alt kültüre ait klonlar, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar. Şekilde gösterilen oklar polimorfik olan bantları göstermektedir.	52
3.24	'Nonpareil' çeşidine ait, K-19 primeri ile elde edilen RAPD-PZR jel görüntüsü. B: 100 bç + 1 kb Ladder DNA A: Ana bitki, 3-1 ve 3-2: mikroaşılamadan sonra 3. alt kültüre ait klonlar, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar.	53
3.25.	*P. dulcis* 'Nonpareil' çeşidinin 6 klonundan, 10 RAPD primeri ile elde edilen 98 banttan UPGMA analizi ile oluşturulan dendogram. [A: Ana bitki, 3-1 ve 3-2: mikroaşılamadan sonra 3. alt kültüre ait klonlar, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar].	57
3.26.	'Teksas' ana materyaline ait gDNA' nın seçilen RAPD primerleri ile yapılan PZR reaksiyonu ile elde edilen bant profili.	58
3.27.	'Teksas' çeşidine ait, K-02 primeri ile elde edilen RAPD-PZR jel görüntüsü. B: 100 bç + 1 kb Ladder DNA A: Ana bitki, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar.	59
3.28.	'Teksas' çeşidine ait, K-03 primeri ile elde edilen RAPD-PZR jel görüntüsü. B: 100 bç + 1 kb Ladder DNA A: Ana bitki, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar.	60
3.29.	'Teksas' çeşidine ait, K-08 primeri ile elde edilen RAPD-PZR jel görüntüsü. B: 100 bç + 1 kb Ladder DNA A: Ana bitki, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar.	61

Şekil		Sayfa
3.30.	‘Teksas’ çeşidine ait, K-09 primeri ile elde edilen RAPD-PZR jel görüntüsü. B: 100 bç + 1 kb Ladder DNA A: Ana bitki, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar. Şekilde gösterilen oklar polimorfik olan bantları göstermektedir.	62
3.31.	‘Teksas’ çeşidine ait, K-11 primeri ile elde edilen RAPD-PZR jel görüntüsü. B: 100 bç + 1 kb Ladder DNA A: Ana bitki, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar.	63
3.32.	‘Teksas’ çeşidine ait, K-13 primeri ile elde edilen RAPD-PZR jel görüntüsü. B: 100 bç + 1 kb Ladder DNA A: Ana bitki, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar.	64
3.33.	‘Teksas’ çeşidine ait, K-15 primeri ile elde edilen RAPD-PZR jel görüntüsü. B: 100 bç + 1 kb Ladder DNA A: Ana bitki, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar.	65
3.34.	‘Teksas’ çeşidine ait, K-16 primeri ile elde edilen RAPD-PZR jel görüntüsü. B: 100 bç + 1 kb Ladder DNA A: Ana bitki, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar. Şekilde gösterilen ok polimorfik olan bantı göstermektedir.	66
3.35.	‘Teksas’ çeşidine ait, K-18 primeri ile elde edilen RAPD-PZR jel görüntüsü. B: 100 bç + 1 kb Ladder DNA A: Ana bitki, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar.	67
3.36.	‘Teksas’ çeşidine ait, K-20 primeri ile elde edilen RAPD-PZR jel görüntüsü. B: 100 bç + 1 kb Ladder DNA A: Ana bitki, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar.	68

Şekil		Sayfa
3.37.	*P. dulcis* 'Teksas' çeşidinin 6 klonundan, 10 RAPD primeri ile elde edilen 81 banttan UPGMA analizi ile oluşturulan dendogram. [A: Ana bitki, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar].	72
3.38.	'Ferrastar' ana materyaline ait gDNA' nın seçilen ISSR primerleri ile yapılan PZR reaksiyonu ile elde edilen bant profili.	73
3.39.	'Ferrastar' çeşidine ait, ISSR01 primeri ile elde edilen ISSR-PZR jel görüntüsü. B: 100 bç + 1 kb Ladder DNA A: Ana bitki, 3-1 ve 3-2: mikroaşılamadan sonra 3. alt kültüre ait klonlar, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar. Şekilde gösterilen ok polimorfik olan bantı göstermektedir.	74
3.40.	'Ferrastar' çeşidine ait, ISSR02 primeri ile elde edilen ISSR-PZR jel görüntüsü. B: 100 bç + 1 kb Ladder DNA A: Ana bitki, 3-1 ve 3-2: mikroaşılamadan sonra 3. alt kültüre ait klonlar, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar.	75
3.41.	'Ferrastar' çeşidine ait, ISSR10 primeri ile elde edilen ISSR-PZR jel görüntüsü. B: 100 bç + 1 kb Ladder DNA A: Ana bitki, 3-1 ve 3-2: mikroaşılamadan sonra 3. alt kültüre ait klonlar, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar.	76
3.42.	'Ferrastar' çeşidine ait, ISSR11 primeri ile elde edilen ISSR-PZR jel görüntüsü. B: 100 bç + 1 kb Ladder DNA A: Ana bitki, 3-1 ve 3-2: mikroaşılamadan sonra 3. alt kültüre ait klonlar, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar. Şekilde gösterilen oklar polimorfik olan bantları göstermektedir.	77

Şekil **Sayfa**

3.43. ‘Ferrastar’ çeşidine ait, ISSR12 primeri ile elde edilen ISSR-PZR jel görüntüsü. B: 100 bç + 1 kb Ladder DNA A: Ana bitki, 3-1 ve 3-2: mikroaşılamadan sonra 3. alt kültüre ait klonlar, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar. Şekilde gösterilen oklar polimorfik olan bantları göstermektedir. 78

3.44. ‘Ferrastar’ çeşidine ait, ISSR13 primeri ile elde edilen ISSR-PZR jel görüntüsü. B: 100 bç + 1 kb Ladder DNA A: Ana bitki, 3-1 ve 3-2: mikroaşılamadan sonra 3. alt kültüre ait klonlar, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar. 79

3.45. ‘Ferrastar’ çeşidine ait, ISSR15 primeri ile elde edilen ISSR-PZR jel görüntüsü. B: 100 bç + 1 kb Ladder DNA A: Ana bitki, 3-1 ve 3-2: mikroaşılamadan sonra 3. alt kültüre ait klonlar, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar. Şekilde gösterilen oklar polimorfik olan bantları göstermektedir. 80

3.46. ‘Ferrastar’ çeşidine ait, ISSR19 primeri ile elde edilen ISSR-PZR jel görüntüsü. B: 100 bç + 1 kb Ladder DNA A: Ana bitki, 3-1 ve 3-2: mikroaşılamadan sonra 3. alt kültüre ait klonlar, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar. Şekilde gösterilen ok polimorfik olan bantı göstermektedir. 81

3.47. *P. dulcis* ‘Ferrastar’ çeşidinin 6 klonundan, 8 ISSR primeri ile elde edilen 67 banttan UPGMA analizi ile oluşturulan dendogram. [A: Ana bitki, 3-1 ve 3-2: mikroaşılamadan sonra 3. alt kültüre ait klonlar, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar]. 85

3.48. ‘Nonpareil’ ana materyaline ait gDNA’ nın seçilen ISSR primerleri ile yapılan PZR reaksiyonu ile elde edilen bant profili. 86

Şekil **Sayfa**

3.49. 'Nonpareil' çeşidine ait, ISSR01 primeri ile elde edilen ISSR-PZR jel görüntüsü. B: 100 bç + 1 kb Ladder DNA A: Ana bitki, 3-1 ve 3-2: mikroaşılamadan sonra 3. alt kültüre ait klonlar, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar. 87

3.50. 'Nonpareil' çeşidine ait, ISSR02 primeri ile elde edilen ISSR-PZR jel görüntüsü. B: 100 bç + 1 kb Ladder DNA A: Ana bitki, 3-1 ve 3-2: mikroaşılamadan sonra 3. alt kültüre ait klonlar, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar. Şekilde gösterilen oklar polimorfik olan bantları göstermektedir. 88

3.51. 'Nonpareil' çeşidine ait, ISSR10 primeri ile elde edilen ISSR-PZR jel görüntüsü. B: 100 bç + 1 kb Ladder DNA A: Ana bitki, 3-1 ve 3-2: mikroaşılamadan sonra 3. alt kültüre ait klonlar, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar. Şekilde gösterilen oklar polimorfik olan bantları göstermektedir. 89

3.52. 'Nonpareil' çeşidine ait, ISSR11 primeri ile elde edilen ISSR-PZR jel görüntüsü. B: 100 bç + 1 kb Ladder DNA A: Ana bitki, 3-1 ve 3-2: mikroaşılamadan sonra 3. alt kültüre ait klonlar, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar. Şekilde gösterilen ok polimorfik olan bantı göstermektedir. 90

3.53. 'Nonpareil' çeşidine ait, ISSR12 primeri ile elde edilen ISSR-PZR jel görüntüsü. B: 100 bç + 1 kb Ladder DNA A: Ana bitki, 3-1 ve 3-2: mikroaşılamadan sonra 3. alt kültüre ait klonlar, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar. Şekilde gösterilen oklar polimorfik olan bantları göstermektedir. 91

Şekil		Sayfa
3.54.	'Nonpareil' çeşidine ait, ISSR13 primeri ile elde edilen ISSR-PZR jel görüntüsü. B: 100 bç + 1 kb Ladder DNA A: Ana bitki, 3-1 ve 3-2: mikroaşılamadan sonra 3. alt kültüre ait klonlar, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar. Şekilde gösterilen oklar polimorfik olan bantları göstermektedir.	92
3.55.	'Nonpareil' çeşidine ait, ISSR15 primeri ile elde edilen ISSR-PZR jel görüntüsü. B: 100 bç + 1 kb Ladder DNA A: Ana bitki, 3-1 ve 3-2: mikroaşılamadan sonra 3. alt kültüre ait klonlar, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar. Şekilde gösterilen oklar polimorfik olan bantları göstermektedir.	93
3.56.	'Nonpareil' çeşidine ait, ISSR19 primeri ile elde edilen ISSR-PZR jel görüntüsü. B: 100 bç + 1 kb Ladder DNA A: Ana bitki, 3-1 ve 3-2: mikroaşılamadan sonra 3. alt kültüre ait klonlar, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar. Şekilde gösterilen ok polimorfik olan bantı göstermektedir.	94
3.57.	*P. dulcis* 'Nonpareil' çeşidinin 6 klonundan 8 ISSR primeri ile elde edilen 69 banttan UPGMA analizi ile oluşturulan dendogram. [A: Ana bitki, 3-1 ve 3-2: mikroaşılamadan sonra 3. alt kültüre ait klonlar, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar].	98
3.58.	'Teksas' ana materyaline ait gDNA' nın seçilen ISSR primerleri ile yapılan PZR reaksiyonu ile elde edilen bant profili.	99
3.59.	'Teksas' çeşidine ait, ISSR01 primeri ile elde edilen ISSR-PZR jel görüntüsü. B: 100 bç + 1 kb Ladder DNA A: Ana bitki, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar. Şekilde gösterilen oklar polimorfik olan bantları göstermektedir.	100

Şekil		Sayfa
3.60.	‘Teksas’ çeşidine ait, ISSR02 primeri ile elde edilen ISSR-PZR jel görüntüsü. B: 100 bç + 1 kb Ladder DNA A: Ana bitki, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar. Şekilde gösterilen oklar polimorfik olan bantları göstermektedir.	101
3.61.	‘Teksas’ çeşidine ait, ISSR10 primeri ile elde edilen ISSR-PZR jel görüntüsü. B: 100 bç + 1 kb Ladder DNA A: Ana bitki, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar. Şekilde gösterilen ok polimorfik olan bantı göstermektedir.	102
3.62.	‘Teksas’ çeşidine ait, ISSR11 primeri ile elde edilen ISSR-PZR jel görüntüsü. B: 100 bç + 1 kb Ladder DNA A: Ana bitki, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar.	103
3.63.	‘Teksas’ çeşidine ait, ISSR12 primeri ile elde edilen ISSR-PZR jel görüntüsü. B: 100 bç + 1 kb Ladder DNA A: Ana bitki, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar. Şekilde gösterilen ok polimorfik olan bantı göstermektedir.	104
3.64.	‘Teksas’ çeşidine ait, ISSR13 primeri ile elde edilen ISSR-PZR jel görüntüsü. B: 100 bç + 1 kb Ladder DNA A: Ana bitki, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar. Şekilde gösterilen oklar polimorfik olan bantları göstermektedir.	105
3.65.	‘Teksas’ çeşidine ait, ISSR15 primeri ile elde edilen ISSR-PZR jel görüntüsü. B: 100 bç + 1 kb Ladder DNA A: Ana bitki, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar. Şekilde gösterilen oklar polimorfik olan bantları göstermektedir.	106

Şekil **Sayfa**

3.65. 'Teksas' çeşidine ait, ISSR19 primeri ile elde edilen ISSR-PZR jel görüntüsü. B: 100 bç + 1 kb Ladder DNA A: Ana bitki, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar. 107

3.67. *P. dulcis* 'Teksas' çeşidinin 4 klonundan, 8 ISSR primeri ile elde edilen 56 banttan UPGMA analizi ile oluşturulan dendogram. [A: Ana bitki, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar]. 111

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge		Sayfa
1.1.	Bademin Dünya Genelinde Üretimi (FaoSTAT, 2009)	2
2.1.	Ana bitki ve klonların gDNA izolasyonu için kullanılan kitte bulunan tamponlar ve saklama koşulları.	15
2.2.	Ana bitki ve klonların gDNA izolasyonu için kullanılan kimyasallar.	16
2.3.	Ana bitki ve klonların gDNA izolasyonu ve miktar tayini için kullanılan cihazlar.	17
2.4.	PZR reaksiyonu için kullanılan kimyasallar.	17
2.5.	PZR reaksiyonu için kullanılan cihazlar.	17
2.6.	Jele yüklenecek olan örneklerin hazırlanması	20
2.7.	Genetik analizlerde kullanılan RAPD-PZR primerleri.	21
2.8.	RAPD-PZR analizinde kullanılmış olan program basamakları.	22
2.9.	Genetik analizlerde kullanılan ISSR-PZR primerleri.	24
2.10.	ISSR-PZR analizinde kullanılan program basamakları.	25
3.1.	‘Ferrastar’ çeşidine ait ana bitki ve klonların gDNA miktarları.	27
3.2.	‘Nonpareil’ çeşidine ait ana bitki ve klonların gDNA miktarları.	27
3.3.	‘Teksas’ çeşidine ait ana bitki ve klonların gDNA miktarları.	27
3.4.	‘Ferrastar’ çeşidine ait, K-02 primeri ile elde edilen RAPD-PZR bant sonuçları.	29
3.5.	‘Ferrastar’ çeşidine ait, K-03 primeri ile elde edilen RAPD-PZR bant sonuçları.	30
3.6.	‘Ferrastar’ çeşidine ait, K-05 primeri ile elde edilen RAPD-PZR bant sonuçları.	31
3.7.	‘Ferrastar’ çeşidine ait, K-08 primeri ile elde edilen RAPD-PZR bant sonuçları.	32
3.8.	‘Ferrastar’ çeşidine ait, K-09 primeri ile elde edilen RAPD-PZR bant sonuçları.	33
3.9.	‘Ferrastar’ çeşidine ait, K-11 primeri ile elde edilen RAPD-PZR bant sonuçları.	34

Çizelge		Sayfa
3.10.	‘Ferrastar’ çeşidine ait, K-12 primeri ile elde edilen RAPD-PZR bant sonuçları.	35
3.11.	‘Ferrastar’ çeşidine ait, K-16 primeri ile elde edilen RAPD-PZR bant sonuçları.	36
3.12.	Ferrastar çeşidine ait, K-17 primeri ile elde edilen RAPD-PZR bant sonuçları.	37
3.13.	‘Ferrastar’ çeşidine ait, K-19 primeri ile elde edilen RAPD-PZR bant sonuçları.	38
3.14.	*P. dulcis* ‘Ferrastar’ çeşidinin ana bitki ve klonlarının genetik kararlılığının belirlenmesinde kullanılan RAPD primer dizileri ve bu primerlerden elde edilen değerlendirilmiş bant ve polimorfik bant sayısı, yüzdesi ve PIC değerleri.	40
3.15.	*P. dulcis* ‘Ferrastar’ çeşidine ait ana bitki ile klonları arasında RAPD-PZR analizi ile elde edilen benzerlik matriksi.	41
3.16.	‘Nonpareil’ çeşidine ait, K-01 primeri ile elde edilen RAPD-PZR bant sonuçları.	44
3.17.	‘Nonpareil’ çeşidine ait, K-03 primeri ile elde edilen RAPD-PZR bant sonuçları.	45
3.18.	‘Nonpareil’ çeşidine ait, K-05 primeri ile elde edilen RAPD-PZR bant sonuçları.	46
3.19.	‘Nonpareil’ çeşidine ait, K-08 primeri ile elde edilen RAPD-PZR bant sonuçları.	47
3.20.	‘Nonpareil’ çeşidine ait, K-09 primeri ile elde edilen RAPD-PZR bant sonuçları.	48
3.21.	‘Nonpareil’ çeşidine ait, K-11 primeri ile elde edilen RAPD-PZR bant sonuçları.	49
3.22.	‘Nonpareil’ çeşidine ait, K-14 primeri ile elde edilen RAPD-PZR bant sonuçları.	50
3.23.	‘Nonpareil’ çeşidine ait, K-15 primeri ile elde edilen RAPD-PZR bant sonuçları.	51
3.24.	‘Nonpareil’ çeşidine ait, K-17 primeri ile elde edilen RAPD-PZR bant sonuçları.	52

Çizelge		Sayfa
3.25.	'Nonpareil' çeşidine ait, K-19 primeri ile elde edilen RAPD-PZR bant sonuçları	53
3.26.	*P. dulcis* 'Nonpareil' çeşidinin ana bitki ve klonlarının genetik kararlılığının belirlenmesinde kullanılan RAPD primer dizileri ve bu primerlerden elde edilen değerlendirilmiş bant ve polimorfik bant sayısı, yüzdesi ve PIC değerleri.	55
3.27.	*P. dulcis* 'Nonpareil' çeşidine ait ana bitki ile klonları arasında RAPD-PZR analizi ile elde edilen benzerlik matriksi.	56
3.28.	'Teksas' çeşidine ait, K-02 primeri ile elde edilen RAPD-PZR bant sonuçları.	59
3.29.	'Teksas' çeşidine ait, K-03 primeri ile elde edilen RAPD-PZR bant sonuçları.	60
3.30.	'Teksas' çeşidine ait, K-08 primeri ile elde edilen RAPD-PZR bant sonuçları.	61
3.31.	'Teksas' çeşidine ait, K-09 primeri ile elde edilen RAPD-PZR bant sonuçları.	62
3.32.	'Teksas' çeşidine ait, K-11 primeri ile elde edilen RAPD-PZR bant sonuçları.	63
3.33.	'Teksas' çeşidine ait, K-13 primeri ile elde edilen RAPD-PZR bant sonuçları.	64
3.34.	'Teksas' çeşidine ait, K-15 primeri ile elde edilen RAPD-PZR bant sonuçları.	65
3.35.	'Teksas' çeşidine ait, K-16 primeri ile elde edilen RAPD-PZR bant sonuçları.	66
3.36.	'Teksas' çeşidine ait, K-18 primeri ile elde edilen RAPD-PZR bant sonuçları.	67
3.37.	'Teksas' çeşidine ait, K-20 primeri ile elde edilen RAPD-PZR bant sonuçları.	68
3.38.	*P. dulcis* 'Teksas' çeşidinin ana bitki ve klonlarının genetik kararlılığının belirlenmesinde kullanılan RAPD primer dizileri ve bu primerlerden elde edilen değerlendirilmiş bant ve polimorfik bant sayısı, yüzdesi ve PIC değerleri.	70

Çizelge		Sayfa
3.39.	*P. dulcis* 'Teksas' çeşidine ait ana bitki ile klonları arasında RAPD-PZR analizi ile elde edilen benzerlik matriksi.	71
3.40.	'Ferrastar' çeşidine ait, ISSR01 primeri ile elde edilen ISSR-PZR bant sonuçları.	74
3.41.	'Ferrastar' çeşidine ait, ISSR02 primeri ile elde edilen ISSR-PZR bant sonuçları.	75
3.42	'Ferrastar' çeşidine ait, ISSR10 primeri ile elde edilen ISSR-PZR bant sonuçları.	76
3.43.	'Ferrastar' çeşidine ait, ISSR11 primeri ile elde edilen ISSR-PZR bant sonuçları.	77
3.44.	'Ferrastar' çeşidine ait, ISSR12 primeri ile elde edilen ISSR-PZR bant sonuçları.	78
3.45.	'Ferrastar' çeşidine ait, ISSR13 primeri ile elde edilen ISSR-PZR bant sonuçları.	79
3.46.	'Ferrastar' çeşidine ait, ISSR15 primeri ile elde edilen ISSR-PZR bant sonuçları.	80
3.47.	'Ferrastar' çeşidine ait, ISSR19 primeri ile elde edilen ISSR-PZR bant sonuçları.	81
3.48.	*P. dulcis* 'Ferrastar' çeşidinin ana bitki ve klonlarının genetik kararlılığının belirlenmesinde kullanılan ISSR primer dizileri ve bu primerlerden elde edilen değerlendirilmiş bant ve polimorfik bant sayısı, yüzdesi ve PIC değerleri.	83
3.49.	*P. dulcis* 'Ferrastar' çeşidine ait ana bitki ile klonları arasında ISSR-PZR analizi ile elde edilen benzerlik matriksi.	84
3.50.	'Nonpareil' çeşidine ait, ISSR01 primeri ile elde edilen ISSR-PZR bant sonuçları.	86
3.51.	'Nonpareil' çeşidine ait, ISSR02 primeri ile elde edilen ISSR-PZR bant sonuçları.	87
3.52.	'Nonpareil' çeşidine ait, ISSR10 primeri ile elde edilen ISSR-PZR bant sonuçları.	88
3.53.	'Nonpareil' çeşidine ait, ISSR11 primeri ile elde edilen ISSR-PZR bant sonuçları.	89

Çizelge		Sayfa
3.54.	'Nonpareil' çeşidine ait, ISSR12 primeri ile elde edilen ISSR-PZR bant sonuçları.	90
3.55.	'Nonpareil' çeşidine ait, ISSR13 primeri ile elde edilen ISSR-PZR bant sonuçları.	91
3.56.	'Nonpareil' çeşidine ait, ISSR15 primeri ile elde edilen ISSR-PZR bant sonuçları.	92
3.57.	'Nonpareil' çeşidine ait, ISSR19 primeri ile elde edilen ISSR-PZR bant sonuçları.	93
3.58.	*P. dulcis* 'Nonpareil' çeşidinin ana bitki ve klonlarının genetik kararlılığının belirlenmesinde kullanılan ISSR primer dizileri ve bu primerlerden elde edilen değerlendirilmiş bant ve polimorfik bant sayısı, yüzdesi ve PIC değerleri.	96
3.59.	*P. dulcis* 'Nonpareil' çeşidine ait ana bitki ile klonları arasında ISSR-PZR analizi ile elde edilen benzerlik matriksi.	97
3.60.	'Teksas' çeşidine ait, ISSR01 primeri ile elde edilen ISSR-PZR bant sonuçları.	99
3.61.	'Teksas' çeşidine ait, ISSR02 primeri ile elde edilen ISSR-PZR bant sonuçları.	100
3.62.	'Teksas' çeşidine ait, ISSR10 primeri ile elde edilen ISSR-PZR bant sonuçları.	101
3.63.	'Teksas' çeşidine ait, ISSR11 primeri ile elde edilen ISSR-PZR bant sonuçları.	102
3.64.	'Teksas' çeşidine ait, ISSR12 primeri ile elde edilen ISSR-PZR bant sonuçları.	103
3.65.	'Teksas' çeşidine ait, ISSR13 primeri ile elde edilen ISSR-PZR bant sonuçları.	104
3.66.	'Teksas' çeşidine ait, ISSR15 primeri ile elde edilen ISSR-PZR bant sonuçları.	105
3.67.	'Teksas' çeşidine ait, ISSR19 primeri ile elde edilen ISSR-PZR bant sonuçları.	106

Çizelge		Sayfa
3.68	*P. dulcis* 'Teksas' çeşidinin ana bitki ve klonlarının genetik kararlılığının belirlenmesinde kullanılan ISSR primer dizileri ve bu primerlerden elde edilen değerlendirilmiş bant ve polimorfik bant sayısı, yüzdesi ve PIC değerleri.	109
3.69.	*P. dulcis* 'Teksas' çeşidine ait ana bitki ile klonları arasında ISSR-PZR analizi ile elde edilen benzerlik matriksi.	110

1.GİRİŞ

1.1. Bademin [*Prunus dulcis* (Mill) D.A. Webb] Kökeni ve Morfolojisi

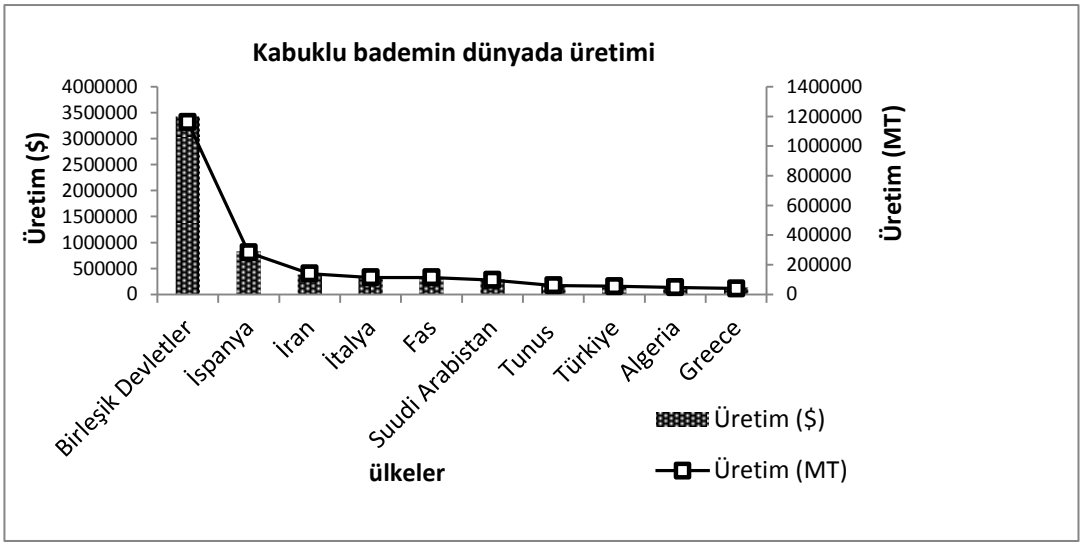
Badem [(*Prunus dulcis* (Mill) Webb)], sinonimi, *P. amygdalus* veya *Amygdalus communis*) *Rosaceae* familyasının *Prunoideae* alt familyasına ait, yılın belli döneminde yaprağını döken, kısa tipte bir yemiş ağacıdır (Kester ve ark., 1990). Kültür ve yabani tür bademlerin sahip oldukları derin kök sistemi geliştirme yeteneği, türün ağır iklim şartlarına adapte olmasını sağlamakta ve bu nedenle tür Orta Asya'dan Çin'in batısındaki Takla Makan Çöllerine ve Akdeniz' e kadar uzanmaktadır (Kester ve ark., 1990; Ladizinsky 1999). Çoğu badem çeşitleri doğal olarak kendine uyuşmaz olduğundan karşı döllenme gerektirmekte ve bu özellikte türün genetik çeşitliliğini ve farklı çevresel koşullara adaptasyonunu arttırmaktadır (Socias i Company ve ark., 2012). Ticari alanda özellikle yemiş olarak tüketilmesinin yanında, çiçeklerinin beyaz ve açık pembe olan güzel görünümüyle badem süs bitkisi olarak da kullanılmaktadır (Şekil 1.1).

Şekil 1.1. Bahar ayında çiçek açmış badem ağacı.

1.2. Yayılışı, Ekolojik İsteği ve Ekonomik Önemi

Erken çiçeklenmesi için gereksinim duyduğu düşük soğuklanma isteği, hızlı gövde büyümesi ve yaz sıcak ve kuraklarına karşı gösterdiği yüksek tolerans nedenleriyle badem aynı zamanda ılıman kış ve kurak sıcak yaz koşullarına da uyum sağlamıştır. Geç kış ve erken bahar donları badem üretiminde zararlara neden olabilir hatta üretimi engelleyebilir (Socias i Company ve ark., 2012). Badem ticari üretim açısından en önemli yemiş ağacıdır. Badem Akdeniz ikliminin hüküm sürdüğü örneğin; Akdeniz ülkeleri, Kaliforniya Vadisinin Merkezi, Ortadoğu, Orta Asya, Himalaya yamaçları ve Şili, Arjantin, Güney Afrika ve Avustralya' yı da içeren Güney Yarımküre' nin bazı uygun bölgelerinde yetişmektedir (Kester ve Asay 1975). Dünya'da badem üretimine bakıldığında Birleşik Devletler ilk sırayı alırken, bunu İspanya ve İran izlemektedir. Birleşik Devletler' de ana üretim bölgesi olan Kaliforniya Merkez Vadi' deki yüksek ölçekteki üretim, uygun toprak, iklim ve yoğun işletim sistemleriyle elde edilmiştir (Kester ve Gradziel, 1996). Ülkemiz ise badem üretiminde 8. sırada yer almaktadır (FaoSTAT, 2009, Çizelge 1.1, http://faostat.fao.org).

Çizelge 1.1. Bademin Dünya Genelinde Üretimi (FaoSTAT, 2009, http://faostat.fao.org).



Yeni-Dünya' da üretim bölgelerinin çoğunda (Arjantin, Avusturalya, Birleşik Devletler, Güney Afrika, Şili), yumuşak kabuklu ve yüksek çıtlaklık yüzdesine sahip çeşitlerin üretimi tercih edilirken, geleneksel üretim bölgelerinin birçoğunda sert kabuklu ve düşük çıtlaklık yüzdesine sahip çeşitler bulunmaktadır. Ancak çeşidin, sert kabuklu olması böcek pestisitlerine karşı dirençliliği sağlamaktadır (Socias i Company ve ark., 2012). Botanik yönden sert çekirdekli (drupa tipte) bir meyve yapısına sahip olmasına karşın, badem olgunluk döneminde mezokarbın kuruyarak deri benzeri bir hal almasıyla, sert kabuklu meyve olarak değerlendirilmektedir (Soylu, 2003).

1.3. Bademin Sektörel Kullanım Alanları ve Kimyasal İçeriği

Badem, çiğ kavrulmuş, çekirdek kabuğundan arındırılmış veya arındırılmamış bir şekilde veya diğer besin maddeleriyle karıştırılarak, tüketilmektedir. Bunun yanı sıra çekirdek parçaları (rendelenmiş veya dövülmüş olarak) yiyecek sektöründe kullanıldığı gibi (Socias i Company ve ark., 2012), çekirdeğinden elde edilen yağda ilaç, kimya, boya ve kozmetik sektöründe farklı amaçlarla kullanılmaktadır. Ayrıca bazı ülkelerde yeşil kabukları hayvan yemi olarak değerlendirilirken, sert kabuklarından da yakacak olarak yararlanılmaktadır (Özçağıran ve ark., 2005). İçerdiği makro besin ürünleri örneğin; yağlar, proteinler, fiber, mineral ve benzersiz fitobesinler örneğin; vitamin E (α-tokoferol), folat ve oleik asit nedeniyle tüketiciler tarafından giderek daha fazla tercih edilmektedir (Socias i Company ve ark., 2012).

1.4. Morfolojik Olarak Bademin Sınıflandırılması

Badem morfolojik yapısına ve tatlarına göre sınıflandırılmaktadır. Badem çeşitleri, kabuk sertliklerine göre el bademi, diş bademi, sert badem ve taş bademi olarak gruplandırılmaktadır (Anonim, 1990; 2000; 2003).

1. El Bademi: Bu gruba giren çeşitlerde kabuk, el ile kolayca kırılabilmektedir. El bademlerinde randıman oldukça yüksektir. El bademlerinin muhafazası, ince kabuklu olmalarından dolayı, uzun süreli olamamaktadır.

2. Diş Bademleri: Bu grupta yer alan bademler, diş ile kolayca kırılırken el ile zor kırılırlar. Muhafazaları, el bademlerine göre daha kolaydır. İç randımanları yüksektir.

3. Sert Bademler: Çekiçle kolay, diş ile zor kırılırlar. Randımanı yüksektir.

4.Taş Bademler: Bu gruba giren bademlerde kabuk ancak çekiçle kırılabilmektedir.

Bademler, tat durumlarına göre de tatlı ve acı badem olarak 2 gruba ayrılmaktadır (Anonim, 1990; 2000; 2003).

a. Acı Bademler; Siyanidrik asit içerdikleri için zehirlidirler ve badem yağı çıkarmak amacıyla kullanılırlar.

b. Tatlı Bademler; 28-48° güney enlemlerdeki elverişli bölgelerde yaygın olarak yetiştirilir ve bazı yörelerde şeftaliyle melezlenir. Badem, çiçeklenmeden önce kış koşullarına şeftali kadar dayanıklı olmakla birlikte, kuzey yarımkürede genellikle daha erken (ocak sonu ile nisan başı arasında) çiçeklenmektedir. Bu nedenle, çiçeklenme döneminde don olaylarına rastlanabilecek yerlerde badem yetiştirilmesi uygun değildir (Anonim, 1990; 2000; 2003).

1.5. Dünyada Üretimi Yapılan Bazı Kültür ve Anaç Badem Çeşitleri ve Özellikleri

Hem kabuklarının fiziksel yapıları hem de çekirdeklerinin değişik kimyasal (tat) içerikleri nedeniyle bademin farklı geleneksel kültür çeşitleri ve anaçları bulunmaktadır. Kültür çeşitlerinden ticari olarak en fazla kullanılan badem çeşitlerinden bazıları; ’Nonpareil’, ‘Teksas’, ‘Ferrastar’, ‘Ferragnes’, ‘Ferraduel’, ‘Tuana’ ve ‘Yaltniski’ dir (Şekil 1.2).

Şekil 1.2. Bademin bazı çeşitlerine ait olan tohumlar. (Soldan sağa; ‘Nonpareil, ‘Teksas’, ‘Ferrastar’, ‘Ferragnes’, ‘Ferraduel’ ve ‘Tuana’).

‘Ferrastar’; Avrupa’ da başarılı bir şekilde uygulanan Fransa ıslah programında keşfedilen bir çeşittir ve geç çiçeklenmesi ile bilinmektedir. Ağaçları çabuk meyveye yatan sert kabuklu bir çeşittir. İç verimliliği %20-30 civarında olup, tozlayıcısı ‘Ferragnes’ ve ‘Ferraduel’ dir (Anonim, 1990; 2000; 2003).

‘Nonpareil’; Birleşik Devletlerin Kaliforniya bölgesinde yetiştirilen en önemli kültür çeşitlerinden birisidir. Ağaçlar yayvan yüksek, verimli ve erkencidir. İnce kabuklu olup, kuş zararına sıklıkla rastlanmaktadır. ‘Nonpareil’, orta büyüklükte meyveye sahiptir. Verim ilk yıllarda düşük olup, bitki gelişimine bağlı olarak ileriki yıllarda artış görülmektedir. Tozlaştırıcısı ‘Teksas’ ve ‘Ne Plus Ultra’ dır. (Anonim, 1990; 2000; 2003).

‘**Teksas’ (Mission);** 1891 yılında Birleşik Devletlerin Teksas eyaleti civarında tespit edilen bu çeşidin en önemli özelliklerinden biri ‘Nonpareil’ e göre geç çiçeklenmesidir. Ağaçları yüksek verimlidir ve meyvelerinin ticari değeri yüksektir. Kabuğu yumuşak olup, iç badem kalitesi orta ve çift badem oranı %15-30 arasındadır. ‘Teksas’ çeşidinde ağaçların büyümesi dikine olup, ağaçlarının ömrü çok uzun değildir. *Pseudomonas amygdali’* nın meydana getirdiği dal ve gövdede oluşan kahverengi lekeler sürgünlerin ölmesine neden olan Ceratocystitin (dal kanseri) oluşmasına neden olmaktadır. Tozlaştırıcısı ‘Nonpareil’ ve ‘Ne Plus Ultra’’ dır (Anonim, 1990; 2000; 2003).

‘**Ne Plus Ultra’;** Bu çeşit, uzun süren seleksiyonlar sonucunda 1879 yılında A. T. Hatch tarafından elde edilmiştir. Özellikle meyveleri sanayiye uygun olan bir çeşittir. Olumsuz yanı, ikiz meyve oluşma oranının %20 gibi yüksek bir oranda olmasıdır. Kaliforniya grubu bademlerindendir. Önemli bir diğer özelliği de su stresine karşı çok hassas olmasıdır. Su stresinde tomurcuk ve meyve dökümlerine sıkça rastlanmaktadır. Verimli bir çeşit olan ‘N.P. Ultra’ uzun ömürlüdür ve randımanı %45-48 civarındadır. Tozlaştırıcısı ‘Nonpareil’ ve ‘Marcona’ dır (Anonim, 1990; 2000; 2003).

‘Drake’; Bu çeşit, 1880 yılında Suisun’ da bulunmuştur. Çiçeklenme, ‘Nonpareil’ den 5 gün sonra, hasadı ise eylül ayı sonunda veya daha geç yapılmaktadır. Meyveleri sert kabuklu ve orta iriliktedir. Pazar değeri yüksek olan ‘Drake’ çeşidi, pastacılık ve şekerleme sanayinde aranılan bir çeşittir. Çok fazla ikiz meyve gerçekleşmektedir. Tozlaştırıcısı ‘Nonpareil’ ve ‘Teksas’ dır (Anonim, 1990; 2000; 2003).

Geleneksel üretimde kullanılan çeşitlere ek olarak, daha derinlerdeki mineral ve sulara ulaşma başarısını gösteren doğal ve melez olarak yetişmekte olan bitkilere yani anaçlara da badem çeşitleri içerisinde çok fazla rastlanmaktadır. Anaç olarak öncelikle acı badem kullanılmış olsa da daha sonra tekdüze fidanlık bitkileri örneğin; Kaliforniya’ da ‘Teksas’, İspanya’ da ‘Desmayo Largueta’, ‘Atocha’ ve ‘Garrigues’ (Felipe, 1989) ve İsrail’ de ‘Alnem’ (daha çok nematodlara dirençli) çeşitleri kullanılmıştır (Kochba ve Spiegel-Roy, 1976). Yakın zamanda, badem çöğürlerinin sahip oldukları kazık köklerden dolayı ilk ekildiği derin su ve madenli topraklarda erişemediği derinliklere, kök sistemleri daha derine ulaşan bademXşeftali melezlerinin kullanılabilir (Kester ve Grasellely 1987; Felipe 2000). Sulu koşullar altında, hatta doymuş topraklara ekilen bademlerin kazık köklerinde, boğulma hastalığına daha fazla yatkınlık görülmektedir. Bu nedenle, badem anaçları kurak topraklarda daha çok tercih edilmektedir. Kireçli topraklara aşırı dayanıklı olmasına karşın, drenajı olmayan ağır topraklara dayanımı iyi değildir. Badem kazık kök yapma eğilimindedir ve saçak kök oluşturma eğilimi azdır. Tüplü badem fidanı üretimi ile hem sağlıklı saçak kök eldesi hem de arazide fidan kaybı azaltılabilinir. Badem tohumlarının genetik yapılarının heterozigot olmasından dolayı, elde edilen

çöğürler homojenlik göstermez. Badem anaçları genel olarak kök çürüklüğüne ve nematodlara karşı hassaslardır (Anonim, 1990; 2000; 2003).

'Nemaguard' Anacı; 'Nemaguard' anacı, *P. persica* ve *P. davidissima* melezidir. Kök nematodlarına karşı direnci iyidir. Nematod ile bulaşık yerlerde üreticiler tarafından bu anaç tercih edilmelidir. 'Nemaguard' anacının hiçbir badem çeşidiyle uyuşma problemi yoktur. Gerek ağaç ömrü (ekonomik ömür) gerekse verim istenilen düzeyde değildir. Bu nedenle, nematod ile bulaşık olmayan yerlerde anaç olarak tercih edilmemelidir. Bu badem anacı ile oluşturulan bahçelerde verim ve erken meyveye yatma oranı daha yüksektir (Anonim, 1990; 2000; 2003).

Erik Anacı; Ağır topraklarda erik anaçlarından 'Marianna-2624' anacı, bademe anaç olarak kullanılmalıdır. Kök funguslarının sıkıntı yaratabileceği bölgelerde 'Marianna-2624' anaç olarak seçilebilir ancak, bu anaç toprak kökenli birçok hastalık ve zararlılara karşı dayanıklı değildir. 'Marianna-2624' anacı üzerine aşılı bademlerde verime yatma geç olup, ağaçların verimliliği orta düzeydedir. Ağaçların gelişim düzeyi de yeterli olmamaktadır. Bunun yanı sıra, bazı badem çeşitlerinin 'Marianna-2624' ile uyuşma sorunu bulunmaktadır. 'Myrobolan P 34-16' anacı da bademe anaç olarak kısmen kullanılmaktadır. *Phytophthora, Armillaria, Agrobacterium* gibi hastalıklara karşı, badem ve şeftali anaçlarına göre daha dayanıklıdır. Erik anaçları, su tutan ve kök çürüklüğü ile bulaşık alanlarda kullanılır. Ancak erik anaçları, genellikle bademle iyi uyuşma göstermemekte ve bu nedenle düşük verimli ve meyvelerin büyük bir kısmında da dış kabuğun bademe yapışık olması yüzünden ağaçlar kısa ömürlü olmaktadır. Yapılan çalışmalarda 'Montizo-646' ve 'Monpol' isimli klonal erik anaçlarından olumlu sonuçlar alınmıştır (Anonim, 1990; 2000; 2003).

Şeftali Anacı; Özellikle Kaliforniya' da badem anacı olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Badem anaçlarına göre daha erken verime gelmeleri avantaj olarak görülmektedir. Ancak, bu anaçların ekonomik ömrünün badem çöğürü anaçlarına göre daha düşük olması ise dezavantaj oluşturmaktadır. Toprak isteği yönünden seçici olan bu anaç, bazı toprak kökenli hastalıklara karşı da hassastır. Kireç oranı ve pH derecesi yüksek olmayan topraklarda şeftali bademe anaç olarak kullanılabilir. Sulanan topraklarda şeftali üzerine aşılı ağaçlar, ilk yıllarda hızlı

gelişir ve 15-20 yıllık badem anacına göre daha çok meyve verir ve erken meyveye yatar. Ağaçların ömrü ise kısadır (Anonim, 1990; 2000; 2003).

Şeftali x Badem Melez Anaçları; Bazı ülkelerde Fransa' da üretime sokulan vejetatif çoğaltmaya uygun 'GF 577' ve 'GF 677' gibi çeşitleri anaç olarak kullanılmaktadır. Şeftali x badem melezleri, genel olarak değişik toprak koşullarına uyabilmektedir. Melezler çok kuvvetli olup, kök sistemleri iyi tutunmaktadır. Bunların olumsuz yanı ise nematodlara kısmen hassas olmalarıdır. Son yıllarda, özellikle Birleşik Devletler' de 'Hansen 2168' ve 'Hansen 536' klon hibritleri, anaç olarak kullanılmaya başlanmıştır. Yoğun yetiştiricilik yapılan ülkelerde klon anaçları gittikçe yaygınlaşmaktadır. Bu klon anaçları, odun çelikleri ve doku kültürleri ile üretilip, fidanlıklarda kullanılmaya başlanmıştır (Anonim, 1990; 2000; 2003).

1.6. Geleneksel Üretim ve Karşılaşılan Sorunlar

Çapraz tozlaşma ile çoğalan bademin tohum ile üretimi sürekli bir genetik varyasyona yol açmakta, bu durum üretim verimini engelleyen bireysel heterozigoziteye neden olmaktadır. Dolayısıyla geleneksel meyvecilikte homojenite azalmakta ve farklı ürün ve kalitede meyve elde edilmesine yol açmaktadır (Gülcan, 1976; Küden, 1998). Bu nedenle *Prunus*' türlerinde vejetatif (aşılama ve çelikle) tabanlı çoğaltım tercih edilmektedir (Cheong, 2012). Geleneksel üretimde bademin generatif yani tohum yoluyla üretiminin yanı sıra, çelikle üretimi sırasında da çeliklerin köklenmesinde karşılaşılan sorunlar nedeniyle türün vejetatif üretimi azalmaktadır. Bu durum, vejetatif üretiminde köklenme sorununun giderilmesi için aşılamanın tercih edilmesine neden olmaktadır. Aşılamada kullanılan anaç bitki sayesinde, zorlu iklim koşullarına, toprağının fiziki ve kimyasal yapısının zorluğuna ve patojen saldırılarına karşı dirençli bitki eldesi de sağlanmaktadır (Wu ve ark., 2007). Aşılamanın bu üstün özelliklerinin yanı sıra, badem ve diğer odunsu türlerin aşılanmasında karşılaşılan en önemli sorun aşı-anaç uyumsuzluğudur. Geleneksel ve ticari üreticiler bu sorunu aynı cinse ait olan anaçların (şeftali, erik vb. gibi) veya ticari olarak üretilmiş anaçların 'GF-667' kullanımıyla aşmaya çalışmışlardır. Türün generatif ve vejetatif çoğaltımında karşılaşılan zorluklar nedeniyle, son yıllarda bademde homojen bitki üretimi için bitki doku kültürü teknikleri ile klonal çoğaltım önem kazanmıştır (Henry ve ark., 1992; Gomez ve Segura, 1995).

1.7. Biyoteknolojik Yöntemlerle Çoğaltımı

1900'lü yılların başlarında Haberlant ile geliştirilmiş olan bitki doku kültürü yöntemi, aseptik şartlarda, yapay bir besi ortamında, hücre, doku veya organ gibi çeşitli bitki kısımlarından, kontrollü sıcaklık ve ışık şartlarında yeni doku, bitki veya bitkisel ürünlerin eldesini amaçlamaktadır (Thorpe, 2007). Bitki doku kültürü tekniklerine ait alternatif metotlar, 1960' lı yılların başlarında rapor edilmiştir (Martinez-Gomez ve ark., 2005). Bitki doku kültürü teknikleri, geleneksel çoğaltımda (aşılama ve çelikleme) karşılaşılan zorlukların giderilmesi için kullanılmıştır (Cheong, 2012).

Bitki hücre ve doku kültürleri, Tilkat (2006)' a göre; I. Organ Kültürleri, II. Doku Kültürleri, III. Hücre Kültürleri (Protoplast ve hücre süspansiyonları), IV. Somatik Embriyogenezis, V. Mikroaşılama şeklinde sınıflandırılmaktadır.

Bu beş doku kültürü tekniği arasından tez konusunun temelini oluşturan mikroaşılama, *in vivo* aşılamanın *in vitro* ortama uyarlanmış halidir. Mikroaşılama; aseptik koşullarda *in vitro* şartlarda yetiştirilen anaçlar üzerine mikroçeliklerin aşılanması işlemi olup, 1980'li yıllardan sonra gelişme gösteren bir mikroçoğaltım yöntemidir (Yıldırım ve ark., 2010). Ayrıca doku kültürü yoluyla üretilen bitkilerin bahçe koşullarına aktarılmasında kullanılan yardımcı bir yöntemdir (Onay ve ark., 2003).

Mikroaşılama tekniği geleneksel çoğaltımda ve diğer doku kültürü tekniklerinde ortaya çıkan bazı sorunların giderilmesinde kullanılmıştır. Örneğin, turunçta (*Citrus* spp.) sürgünlerin gençleştirilmesinde (Navarro ve ark., 1975) ve virüs ve patojenden ari bitki eldesinde (Navarro ve ark., 1975); üzümde (*Vitis* spp.) anaç ve çelik uyumsuzluğunda (Pathirana ve McKenzie, 2005); antepfıstığında köklenme sorununun giderilmesinde (Onay ve ark., 2004) kullanılmıştır. Badem ve üyesi olduğu *Prunus* cinsine ait önemli bazı türlere ait mikroçoğaltım (Socias i Company ve ark., 2012) ve mikroaşılama (Yıldırm ve ark., 2010; Işıkalan ve ark., 2011) çalışmalarına da literatürde rastlamak mümkündür.

1.7.1. *Prunus* Cinsine Ait Bazı Türlerin Mikroçoğaltımı

Bademin de dahil olduğu *Prunus* cinsine ait meyve veren veya süs bitkisi olarak kullanılan türlerde, meristem, gövde ucu ve vejetatif tomurcuk gibi organların kullanıldığı mikroçoğaltım çalışmaları bulunmaktadır; Quoirin ve Lepoivre adlı araştırıcıların 1977' de yapmış oldukları çalışmada *Prunus* türlerine ait meristem parçaları kullanılmıştır.

Prunus cinsleri içerisinde meyvesi yenen türlere ait çalışmalara baktığımızda; kayısıda (*Prunus armeniaca* var. Helena) meristemleri (Perez-Tornero ve ark., 1999) ve sürgün uçları (Kramarenko, 1999); kirazda (*Prunus avium* var. F12/1) ve yabani kirazda sürgün uçları (sırasıyla Nemeth, 1979 ve Hammat ve Grant, 1997); vişne de (*Prunus cerasus* var. Schattenmorella, Northstar, Kelleris ve Nefris), vişne anaçlarında (Theiler-Hedritch ve Feutch 1985; Borkowska 1989) ve erikte (*Prunus cerasifera* Ehrh. var. Santarosa) sürgün uçları (Rogalski ve ark., 2003); şeftalide (*Prunus persica* var. Carelli) ise yanal sürgün uçları kullanılarak (Teixeira ve ark., 2003) mikroçoğaltım çalışmaları bulunmaktadır.

Ayrıca *Prunus* cinsine ait süs bitkisi olarak kullanılan türler arasında ise *P. serotina* Ehrh. (Hammat ve Grant, 1997), *P. fruticosa* L. (Pruski ve ark., 2005), *P. tomentosa* L. (Pruski ve ark., 2005), *P. serrulata* (Hokanson ve Pooler, 2000) ve *P. mume* (Harada ve Murai, 1996) gibi onlarca türe ait mikroçoğaltım çalışmaları bulunmaktadır (Aktürk, 2009; Cheong, 2012).

Mikroaşılama çalışmaları ise; farklı *Prunus* türlerinde (Colin ve Verhoyen 1975); *Prunus armeniaca*, *Prunus persica* ve *Prunus cerasifera* (Martinez ve ark., 1979); *Prunus persica* (Mosella-Chancel ve ark., 1980); *Prunus armeniaca* (Damiano ve ark., 1988) ve *Prunus avium* (Amiri, 2006) bulunmaktadır.

1.7.2. Bademin Mikroçoğaltımı

Farklı badem çeşitleri ile gerçekleştirilen mikroçoğaltım çalışmalarında, *in vitro* kültür koşullarında üretim verimi iyileştirilmeye çalışılmıştır (Tabacknik, 1977; Rugini ve Verma, 1983; Antonelli, 1992; Caboni ve Damiano, 1994; Miguel ve ark.,

1996; Ainsley ve ark. 2000, 2001; Martins ve ark., 2004; Akbaş ve ark., 2009, Namlı ve ark., 2011). Yine bu çalışmalara ek olarak, bademde *in vitro* koşullarda altkültürleme sıklığının (Grant ve Hammat, 1999), besiyerinde farklı karbon kaynaklarının (Harada and Murai, 1996; Nowak ve ark., 2004), farklı demir kaynaklarının (Molassiotis ve ark., 2003) ve farklı bitki büyüme düzenleyicilerinin kullanımının (Pruski ve ark., 2000) etkileri araştırılmıştır. Yine bademde *Mycorrhiza* patojenlerine karşı savunma ile ilgili çalışmalar ve mikroçoğaltılmış bitkiciklerin toprağa aktarımından sonraki büyüme koşullarının belirlenmesine yönelik yapılan çalışmalar da bulunmaktadır (Hammerschlag ve Scorza, 1991; Hammat, 1999; Marin ve ark., 2003). Mikroçoğaltım çalışmalarına ek olarak, bademde çeşitlerin mikroçoğaltımı ve köklendirilmesi için mikroaşılama tekniğinin kullanıldığı çalışmalarda (Ghorbel ve ark.,1998; Channuntapitat ve ark., 2003; Yıldırım ve ark., 2010; Işıkalan ve ark., 2011) literatürde bulunmaktadır.

Mikroaşılama gibi klonal çoğaltımda kullanılan teknikler, *in vitro* çoğaltım teknikleri olarak ifade edilmektedir ve bu tekniğin uygulanmasının amacı aynı genetik yapıya sahip bitkilerin üretimidir. Ancak, bu tekniklerde gerek ortam gerekse içsel beklenmeyen ve kontrol edilemeyen varyasyonlar da ortaya çıkabilmektedir (Kaya, 2011). Bu tür varyasyonlar, doğal olarak meydana gelmektedir ve bunlar ya hücrelerdeki genetik değişimler ya da hücre ve dokulardaki geçici değişimler olarak ifade edilmektedir. *İn vitro* çoğaltım amaçlı yürütülen çalışmalarda varyasyonlar genellikle istenmemektedir. Bu nedenle *in vitro* çoğaltımda en güvenilir doku kültürü tekniklerinin kullanılması (örneğin, mikroçoğaltım ve mikroaşılama) büyük önem taşımaktadır. Yine de hangi teknik kullanılırsa kullanılsın, *in vitro* çoğaltım süresince genetik değişimin ortaya çıkma olasılığı bulunmaktadır. Bitki ıslahında doğal varyasyonun azaldığı veya varyasyon meydana getirmenin zor olduğu durumlarda avantajlı olarak değerlendirilen bu varyasyon, yeni bir kaynak olarak görülmekte ve doku kültürlerinde ortaya çıkan bu kalıtsal değişikliklerin tümü "somaklonal varyasyon" olarak tanımlanmaktadır (George, 1993).

Somaklonal varyasyon, *in vitro* koşullarda rejenere olan bitkiler arasında ortaya çıkabilen, genetik (Evans, 1988) veya epigenetik (Li ve ark., 2008) kökenli değişikliklerdir. Somaklonal varyasyon, kromozomal anomaliler, fenotipik mutasyon sıklığı, dizi değişimi, gen aktivasyon ve susturulması sonucunda görülebilmektedir

(Kaeppler ve ark., 2000). Bitkilerin küçük bir kap içerisinde, yapay bir ortamda gelişmeleri, bitkide strese neden olabilmekte ve bu stres de bitkilerin genetik bütünlüğünü etkileyebilmektedir. *İn vitro* çoğaltımda kullanılan, çoğaltım kaplarındaki bitkilerin bulunduğu ortam büyüklüğü, yine bu ortamda biriken etilen ve CO_2 gibi gazlar, besi ortamına eklenen bitki büyüme düzenleyicileri ve diğer birçok faktör, bitkilerde stres sinyallerinin oluşmasına neden olarak, bazı metabolik yolakların aktive ya da inaktive olması ya da değişmesine yol açmaktadır. Bu durum ana (verici) bitki ile klonları arasında genin dizisinde veya ifadesinde değişimine neden olabilmekte ve bu da ilgili klonlarda fenotipik, genotipik ve sitolojik değişikliklerin görülmesine yol açmaktadır (Larkins ve Scowcroft, 1981).

1.8. Somaklonal Varyasyon

Bitki doku kültürü sonucunda oluşabilecek somaklonal varyasyonların belirlenmesi amacıyla, DNA temelli birçok farklı moleküler belirteç kullanılmaktadır. Genom dizisinde oluşan değişikliklerin belirlenmesi için en çok kullanılan belirteçler; RAPD (Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA, Williams ve ark. 1990), ISSR (Basit Tekrarlı Diziler Arası Polimorfizmi, Zietkiewicz ve arkadaşları, 1994) ve AFLP (Çoğaltılmış Parçaların Uzunluk Polimorfizmi, Vos ve ark. 1995) iken, gen ifadesinde olan varyasyonların tespiti için bi-sülfit dizileme (El-Maarri, 2003) ve MSAP (Metilasyona Duyarlı Çoğaltılmış Polimorfik DNA, Reyna-Lopez ve ark., 1997) tekniklerinin kullanımı tercih edilmektedir.

Tez çalışması kapsamında ise mikroaşılanan farklı badem çeşitlerinde olası somaklonal varyasyonların belirlenmesi için RAPD ve ISSR teknikleri kullanılmıştır. Bu tekniklerden RAPD ön dizi bilgisine gerek duymaksızın rastgele seçilen kısa primerlerle genomun rastgele taranması ve olası varyasyonun belirlenmesine olanak sağlamaktadır. Tez kapsamında kullanılan ikinci teknik olan ISSR ise özellikle basit tekrar dizileri (mikrosatellit) arasında kalan dizilerin çoğaltılmasını hedefleyen ve mikrosatellit dizileri ardına 1-2 veya daha fazla baz eklenerek hazırlanmış primerler ile genomu tarayarak, varyasyonun belirlenmesini sağlamaktadır Son yıllarda bu tekniklerin tek başına kullanılmalarının somaklonal varyasyonun belirlenmesi için yetersiz olduğu ve bu nedenle genetik kararlılıklarının en az iki farklı moleküler

belirteç ile irdelenmesi gerektiği vurgulanmaktadır (Palombi ve Damiano, 2002, Martins ve ark., 2004).

1.8.1. Bazı *Prunus* Türlerine Ait Somaklonal Varyasyon Belirleme Çalışmaları

Literatürde *Prunus* türlerinde mikroçoğaltım çalışmalarını takiben klonlarda oluşacak olası somaklonal varyasyonun belirlenmesine yönelik sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Örneğin; *P. persica'* nın kallus kültürlerinde (Hashmi ve ark., 1997) ve *P. armeniaca* var. El-Hamawey çeşidinin sürgün ucu meristemleri kullanılarak çoğaltılan klonlarında (Soliman ve ark., 2012) varyasyonlar RAPD belirteçleri ile *P. avium* var. Hedelfinger yaprak eksplantlarından elde edilen klonlarda (Piagnani ve ark., 2005) ise ISSR belirteci ile somaklonal varyasyon irdelemiştir.

1.8.2. Bademde Somaklonal Varyasyon Çalışmaları

Tez konusunu oluşturan bademin özellikle bazı çeşitlerinin mikroçoğaltım çalışmaları sonrasında genetik değişimlerini araştıran çalışmalar sınırlıdır ve genellikle yapılan çalışmalar çeşitler arası genetik akrabalıkların belirlenmesine yöneliktir (Socias i Company ve ark., 2012). Martins ve arkadaşları (2004) ve Sarmento ve arkadaşları (2005)' de aksillar tomurcuklardan elde edilen klonların genetik kararlılıklarını RAPD ve ISSR belirteçleri kullanılarak, irdelemiştir. Ancak literatürde tez çalışmasının konusu olan mikroaşılama sonrasında çoğaltımı yapılan klonların, genetik kararlılığının moleküler belirteçlerle irdelenmesine yönelik bir çalışma bulunmamaktadır.

1.9. Tezin Amacı

Badem çeşitlerinin yetiştirilmesinde ve ürün alımlarında, iç randıman ve meyve dolgunluğu önemlidir. Badem geleneksel yetiştiricilikte tohumdan çoğaltılırken, köklenmesinde karşılaşılan sorunlar aşılama tekniğinin kullanılmasına neden olmuştur. Bununla birlikte aşılamada kullanılan anaç ve aşı kalemi arasında uyum

sorunları ile karşılaşılmaktadır. Bu nedenle, son zamanlarda türün çoğaltımında *in vitro* koşullarda gerçekleştirilen mikroaşılama tekniğinin uygulanması önem kazanmıştır. Ancak mikroaşılama sonrasında elde edilen bitkilerin düzenli altkültürlemeler ile çoğaltımı sırasında klonlarda oluşabilecek genetik kararlılıkların irdelendiği çalışma veya çalışmalar bulunmamaktadır. Bu nedenle, tez kapsamında mikroaşılanan 'Teksas', 'Ferrastar' ve 'Nonpareil' çeşitlerine ait bitkicikler 3, 6, ve 9 ay süre ile altkültürlenerek çoğaltılmış ve oluşan bitkiciklerden genomik DNA izolasyonu yapılarak, moleküler belirteçler (RAPD ve ISSR) yardımıyla, aşılama ve mikroçoğaltım sonrasında oluşabilecek somaklonal varyasyonlar belirlenmiştir. Dolayısıyla tezin amacı, mikroaşılama ve mikroçoğaltım sonrası elde edilen klonların genetik kararlılıklarının moleküler belirteçler ile irdelenmesidir.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. Genomik DNA (gDNA) İzolasyonu ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) İçin Gerekli Kimyasallar ve Cihazlar

Tez çalışmasının konusunu oluşturan ticari badem çeşitlerine ait ana bitki ve klonlarının gDNA izolasyonu (*i-genomic* Plant DNA extraction Mini Kit (Intron Biotechnology, Inc., Katalog Numarası; 1737,50) ve görüntülenmesi için kullanılan kimyasallar ve cihazlar, sırasıyla Çizelge 2.1., 2.2. ve 2.3.' de sunulmuştur. PZR reaksiyonları ve görüntüleme işlemleri için kullanılan kimyasallar ve cihazlar ise Çizelge 2.4 ve 2.5' de listelenmiştir.

Çizelge 2.1. Ana bitki ve klonların gDNA izolasyonu için kullanılan kitte bulunan tamponlar ve saklama koşulları.

Tamponlar	Saklama Koşulları
PG Tamponu (Liziz Tamponu)	25 ºC
PPT Tamponu (Çöktürme Tamponu)	25 °C
PB Tamponu (Bağlanma Tamponu)	25 °C
PWA Tamponu (Yıkama Tamponu A)	25 °C
PWB Tamponu (Yıkama Tamponu B)	25 °C
PE Tamponu (Elüsyon Tamponu)	25 °C
Enhancer Solüsyonu (Ayırım Artırıcı Solüsyon)	4 °C
RNase A Solüsyonu	-20 °C
Proteinaz K Solüsyonu	-20 °C

Çizelge 2.2. Ana bitki ve klonların gDNA izolasyonu için kullanılan kimyasallar.

Kimyasal	Üretici Firma	Katalog Numarası
Sıvı Azot	Messer	
Etil alkol (%96)	Pro-Lab	
Agaroz	Merck	1.16802.0250
Tris-HCl	AppliChem	A3452.0250
Asetik asit	Merck	1.00063.2511
EDTA	Calbiochem	324503
Etidyum bromür (EtBr)	Sigma	E-1510
Jel Yükleme boyası	Invitrogen	10813-015
λ DNA-Hind III	Fermentas	SM0103
Distile Su (dH_2O)		

Çizelge 2.3. Ana bitki ve klonların gDNA izolasyonu ve miktar tayini için kullanılan cihazlar.

Cihaz İsmi	Model	Firma	Ülke
Derin Dondurucu (-80 °C)	Forma 8600	Thermo	ABD
Derin Dondurucu (-20 °C)	GS51NAW30	Siemens	Türkiye
Buzdolabı (+4°C)	GSF2200	İndesit	Türkiye
Santrifüj	D-78532	Hettich	Almanya
Sıcak Su Banyosu	MP	Julaba	Almanya
Liyofilizatör	RC101-RCT90	Jouan	Almanya
Vorteks	Vortex Mixer	VWR	ABD
Mikrodalga Fırın	MW71E	Samsung	Malezya
Jel Elektroforezi ve Güç Kaynağı	MS09092879	Cleaver	İngiltere
Jel Dökümantasyon Cihazı	Chemidoc XRS^+	BioRad	ABD
Nanodrop	BioSpec-nano	Shimadzu	Japonya
Hassas Terazi	TP3030	Denver	ABD

Çizelge 2.4. PZR reaksiyonu için kullanılan kimyasallar.

Kimyasal Adı	Firma Adı	Katalog Numarası
Taq DNA polimeraz PZR kiti	Intron Biotech.	25022
dNTP	Intron Biotech.	25022
$MgCl_2$	Intron Biotech.	25022
Agaroz	Merck	1.16802.0250
Tris-HCl	AppliChem	A3452.0250
Asetik asit	Merck	1.00063.2511
EDTA	Calbiochem	324503
Etidyum bromür	Sigma	E-1510
Jel Yükleme boyası	Invitrogen	10813-015
1 kb DNA belirteç	Invitrogen	10488-072
100 bp DNA belirteç	Invitrogen	10488-058
dH_2O		

Çizelge 2.5. PZR reaksiyonu için kullanılan cihazlar.

Cihaz İsmi	Model	Firma Adı	Ülke
Termal Döngü Cihazı	PTC-200	MJ Research	Amerika
Santrifüj	D-78532	Hettich Zentrifugen	Almanya
Mikrodalga Fırın	MW71E	Samsung	Malezya
Jel Elektroforezi ve Güç Kaynağı	MS09092879	Cleaver Scientific Ltd.	İngiltere
Jel Dökümantasyon Cihazı	Chemidoc XRS^+	BioRad	ABD
Hassas Terazi	TP3030	Denver Instrument	ABD

2.1.2. ‘Ferrastar’, ‘Nonpareil’ ve ‘Teksas’ Ticari Badem Çeşitlerinin Mikroaşılanması ve Mikroçoğaltılması

Tez çalışmasının konusunu oluşturan badem çeşitlerinin mikroaşılanması Dicle Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Bitki Biyoteknolojisi Laboratuvarı’ nda Yıldırım ve arkadaşlarının (2010) geliştirdiği protokole göre yapılmıştır. Kısaca, yapılan çalışmada olgun materyalden alınan sürgün uçlarıyla başlatılan kültürlerden 8 ile 15 mm uzunluğunda alınan aşı kalemi, yabani bademlere ait tohumların *in vitro* koşullarda çimlendirilmesiyle elde edilen gövdelere dar meristemli yarma aşı yöntemi ile mikroaşılanmıştır. Aynı ekip, mikroaşılanan bitkicikleri, 4 haftada bir altkültürlemiş ve ‘Ferrastar’, ‘Nonpareil’ için 3, 6 ve 9; ‘Teksas’ için ise 6 ve 9. aylarda çoğaltılan klonlardan yaprak örneklerini almıştır. Buna ek olarak, mikroaşılama yapılmadan önce bu çeşitlere ait ana bitkiden yaprak örnekleri alınmıştır. Daha sonra hem çeşitlere ait ana bitkilerin hem de mikroaşılama ve mikroçoğaltım sonrası elde edilen klonların yaprakları (her çeşitten belirtilen altkültürler sonrasında 2 birey olacak şekilde) soğuk zincir ile Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Bitki Biyoteknolojisi Laboratuvarı’ na aktarılmış ve gDNA’ ları izole edilene kadar -80°C’ de saklanmıştır.

2.2. Yöntem

2.2.1. 'Ferrastar', 'Nonpareil' ve 'Teksas' Ticari Badem Çeşitleri Klonlarından gDNA' ların İzolasyonu ve Miktar Tayini

-80°C ultra derin dondurucuda saklanan yapraklardan *i-genomic* Plant DNA extraction Mini Kit (Intron Biotechnology, Inc.) kullanılarak, gDNA izolasyonu gerçekleştirildi. Bu protokole göre, otoklav edilerek steril edilen havanlar ezme işleminden önce örneklerin havana yapışmaması ve kolay ezilmesi için sıvı azotla soğutuldu. Daha sonra yaprak örnekleri (50 mg) sıvı azot ile ezildi ve 1.5 ml' lik ependorf tüplere dağıtıldı. İlk olarak tüplere sırasıyla, 390 µl liziz tamponu, 7 µl ayırımı daha iyi sağlamak için "enhancer" solüsyonu, 20 µl Proteinaz K ve 5 µl RNase eklendi ve tüpler birkaç defa vortekslenmeyi takiben ağzı parafin ile kapatılarak, 65°C su banyosunda 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon işlemi sırasında yaklaşık her 5-7 dakikada bir tüpler çevrildi.

Su banyosundaki inkübasyon aşamasından sonra her tüpe 100 µl çöktürme solüsyonu eklenerek, tüpler 5 dakika buz içerisinde inkübasyona bırakıldı. Buzdan alınan tüpler, 13.000 rpm de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası tüplerde oluşan fazlar karışmayacak şekilde alınarak, üst sıvı yeni tüplere alındı. Her tüp için, tüplerden alınan üst sıvıya DNA' nın bir sonraki aşamada kullanılacak olan spin kolona bağlanması için 650 µl bağlanma tamponu eklendi. Kit içerinde bulunan spin kolon içeren toplama tüpüne ters-düz edilen karışımdan 650 µl alındı ve tüpler 13000 rpm de 1 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpünde kalan sıvı atıldı. Spin kolon yeni bir toplama tüpüne alındı ve 700 µL yıkama tamponu eklendi. Tüplerin 13.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmesinin ardından toplama tüpünde biriken sıvı atıldı ve daha sonra spin kolon yeni bir toplama tüpüne aktarıldı. 700 µl yıkama tamponu (Stoğa kullanılmadan önce belirtilen miktarda %96'lık etil alkol eklendi) eklendi ve tüpler 13.000 rpm de 1 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpünde kalan sıvı atıldı ve spin kolon dikkatli bir şekilde 1.5 ml'lik yeni ependorf tüpe yerleştirildi. Son olarak spin kolondaki membran üzerine gelecek şekilde 50 µl elüsyon tamponu eklenerek,

13000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi ve tüpte biriken sıvı (gDNA) -20°C' da saklandı.

DNA izolasyonunun ardından, tüm örneklere ait genomik DNA'lar, λ-HindIII kesimi belirteç (Çizelge 2.6) ile birlikte %1'lik agaroz jele yüklenerek, 80V'da 40 dakika boyunca yürütüldü.

Çizelge 2.6. Jele yüklenen örneklerin hazırlanması

Yüklenen Kimyasal	Eklenen Miktar (µl)
gDNA	3
Yükleme boyası (1x)	1
dH_2O	8
Belirteç (λ-HindIII kesimi)	2
dH_2O	10

2.2.2. 'Ferrastar', 'Nonpareil' ve 'Texas' Ticari Badem Çeşitlerine Ait Klonların Genetik Analizleri

2.2.2.1. RAPD-PZR Analizleri

Elde edilen klonlar ile ana bitki arasındaki genetik kararlılık öncelikle RAPD analizleri kullanılarak, irdelenmiştir. Analizde 20 adet (Çizelge 2.7) RAPD primeri kullanılmıştır. gDNA' nın amplifikasyonu tüp başına, 1× PZR tampon [10 mMTris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl], 2.5 mM $MgCl_2$, 80 µM dNTP karışımı (dATP, dGTP, dCTP ve dTTP), 50 ng primer, 50 ng DNA kalıbı ve 2U Taq DNA polimeraz (Intron Biotechnology, *I*-Taq™) içerecek şekilde toplamda 25 µl reaksiyon hacminde gerçekleştirildi. Termal döngü cihazında (MJ Research INC PTC-200) gerçekleştirilen PZR reaksiyonu için optimize edilen program, ilk olarak kalıp DNA'nın 95˚C'ta 5 dk ön denaturasyonunu takiben, minimum 35 döngü olacak şekilde, 95˚C'ta 30 sn, reaksiyonda kullanılan primerlere özgü bağlanma sıcaklığı olan 35˚C'ta 1 dk, 72˚C'ta 1 dk 40 sn ve PZR reaksiyonun tamamlanması için, son

final uzama basamağı için 72˚C'ta 8 dk inkübasyonu içermektedir. Bu yönteme göre yapılan PZR programına ait tüm aşamalar Çizelge 2.8' de listelenmiştir.

Çizelge 2.7. Genetik analizlerde kullanılan RAPD-PZR primerleri.

Primer İsmi	Baz Dizisi (5´→3´)
K-01	CAT TCG AGC C
K-02	GTC TTC GCA A
K-03	CCA GCT TAG G
K-04	CCG CCC AAA C
K-05	TCT GTC GAG G
K-06	CAC CTT TCC C
K-07	AGC GAG CAA G
K-08	GAA CAC TGG G
K-09	CCC TAC CGA C
K-10	GTG CAA CGT G
K-11	ATT GCC CCA G
K-12	TGG CCC TCA C
K-13	GGT TGT ACC C
K-14	CCC GCT ACA C
K-15	CTC CTG CCA A
K-16	GAG CGT CGA A
K-17	CCC AGC TGT G
K-18	CCT AGT CGA G
K-19	CAC AGG CGG A
K-20	GTG TCG CGA G

Çizelge 2.8. RAPD-PZR analizinde kullanılmış olan program basamakları.

Döngüler	Denatürasyon 95°C	Primer Bağlanması 35°C	Primer Uzaması 72°C
Ön Denatürasyon	5 dakika	-	-
1-35 Döngü	30 saniye	1 dakika	1 dakika 40 saniye
36. Döngü	-	-	8 dakika

PZR ürünlerinin amplifiye olup olmadıklarının tespiti için; balon joje içerisinde 750 mg agaroz ve 75 ml 1× TAE (Tris-Asetik asit-EDTA) tamponu ile karıştırıldı ve mikrodalga fırında eritildi. 5-10 dakika oda sıcaklığında soğuması beklenen agaroz jele, DNA' ların UV ışığı altında görülebilmesi için EtBr eklenip, karıştırıldı. Jel daha sonra 20 kuyuluk tarak içeren jel kasting sistemine döküldü ve jelin polimerleşmesi beklendi. Polimerleşmenin ardından jel, tarak ve kasting sisteminden alınarak tray üzerinde 1X TAE yüklü elektroforez tankına konuldu.

RAPD-PZR' a özgü rastgele primerlerle çoğaltılan PZR ürünleri, toplamda 12 µl yükleme örneği olacak şekilde 11 µl RAPD-PZR ürünü ve 1 µl yükleme boyası eklenerek, agaroz jele yüklendi. Oluşan bantların büyüklüklerinin belirlenmesi için jele 100 bç (1.5 µl) ve 1 kb (1.5µl+9 µl dH_2O) DNA Ladder' da agaroz jele yüklendi. Jel, 80 V'da 90 dk yürütüldükten sonra jel dökümantasyon cihazında (Biorad Chemidoc XRS^+) UV ışık altında dijital olarak görüntülendi.

2.2.2.2. ISSR-PZR Analizleri

Tez kapsamında elde edilen klonlar ile ana bitki arasındaki genetik kararlılık ISSR-PZR belirteçleri kullanılarak da değerlendirilmiştir. Analizde toplam 16 adet (Çizelge 2.9) ISSR primeri kullanımıştır. ISSR-PZR analizlerinde tekrar bölgeleri arasını hedef alan özgün primerle gDNA' nın çoğaltımı, 1× PZR tampon [10 mMTris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl], 2.5 mM $MgCl_2$, 80 µM dNTP karışımı (dATP, dGTP, dCTP ve dTTP), 50 ng primer, 50 ng DNA kalıbı ve 2U Taq DNA polimeraz olmak üzere toplam 25 µl reaksiyonluk final hacimde gerçekleştirilmiştir. Termal döngü cihazında (MJ Research INC PTC-200) gerçekleştirilen PZR reaksiyonu için optimize edilen program, ilk olarak kalıp DNA' nın 95˚C'ta 5 dk ön denaturasyonunu takiben daha sonra minimum 35 döngü olacak şekilde, 95˚C'ta 30 sn (denaturasyon), 45-55˚C' ta 1 dk (primer bağlanması), 72˚C'ta 1 dk 40 sn (uzama) ve PZR reaksiyonun tamamlanması için, son final uzama basamağı için 72˚C'ta 8 dk inkübasyonu içermektedir. ISSR reaksiyonu için seçilen primerlere ait bağlanma sıcaklıkları kullanılan her primer için, primer dizisine bağlı olarak, değişmektedir. Tez kapsamında kullanılan ISSR primerleri için belirlenen bağlanma sıcaklıkları, ISSR-10 primeri için 50˚C; ISSR-11 primeri için 45˚C; ISSR-13 primeri için 52˚C; ISSR-14, ISSR-17, ISSR 19, ISSR 1 ve ISSR-2 primerleri için ise 55˚C' tır. ISSR-PZR reaksiyonunda kullanılan amplifikasyon programının basamakları Çizelge 2.10' da sunulmuştur.

Çizelge 2.9. Genetik analizlerde kullanılan ISSR-PZR primerleri.

Primer İsmi	Baz Dizisi (5´→3´)
ISSR-1	GAG AGA GAG AGA GAG AT
ISSR-2	GAG AGA GAG AGA GAG AC
ISSR-3	CAC ACA CAC ACA CAC AT
ISSR-4	CAC ACA CAC ACA CAC AC
ISSR-5	CTC TCT CTC TCT CTC TT
ISSR-6	CTC TCT CTC TCT CTC TC
ISSR-10	GAG AGA GAG AGC
ISSR-11	CAC ACA CAC AGT
ISSR-12	GAA GAA GAA GAA GAA GC
ISSR-13	GAA GAA GAA GAA GAA GG
ISSR-14	TAG AGA GAG AGA GA
ISSR-15	CTC TCT CTC TCT CTC TA
ISSR-16	AGA GAG AGA GAG AGA GT
ISSR-17	CTT CTT CTT CTT CTT A
ISSR-18	CTT CTT CTT CTT CTT G
ISSR-19	AAC TCT CTC TCT CTC T

Çizelge 2.10. ISSR-PZR analizinde kullanılan program basamakları.

Döngüler	Denatürasyon 95˚C	Primer Bağlanması 45˚C, 50˚C, 52˚C veya 55˚C	Primer Uzaması 72˚C
Ön Denatürasyon	5 dakika	-	-
1-35 Döngü	30 saniye	1 dakika	1 dakika 40 saniye
36. Döngü	-	-	8 dakika

PZR ürünlerinin amplifiye olup olmadıklarının tespiti için örnekler RAPD-PZR reaksiyonunda açıklandığı şekilde hazırlanmış, jele yüklenmiş ve elektroforez sonrası görüntülenmiştir.

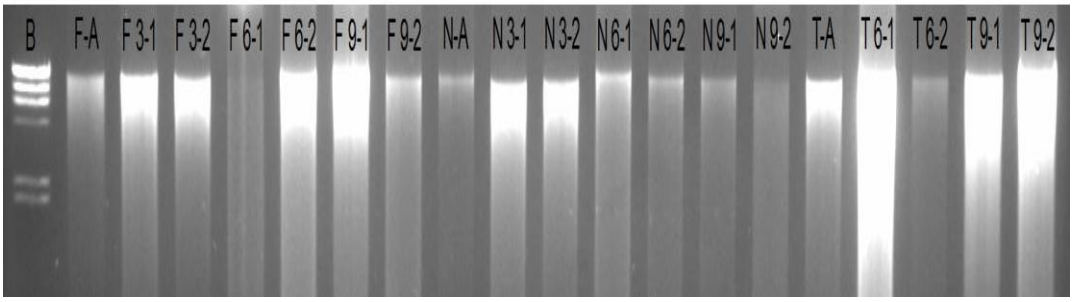
2.2.3. Oluşan Bantların Değerlendirilmesi, Benzerlik Oranlarının Hesaplanması ve Dendogramlarının Oluşturulması

'Ferrastar', 'Nonpareil' ve 'Teksas' badem çeşitlerinin mikroaşılama sonrası çoğaltılan klonlarının RAPD ve ISSR primerleri ile yapılan PZR reaksiyonları sonucu oluşan jel profillerinde her bir primer için o çeşide ait ana bitki ve klonlarda var olan bantlar için (1) olmayan bantlar için (0) değeri verilerek, veriler toplandı. Her çeşit için RAPD ve ISSR reaksiyonlarına ait veriler, MVSP 3.1 software (Kovach, 1999) kullanılarak, analiz edildi. Bu yazılım programı aynı zamanda, Jaccard (1908) benzerlik oranlarını hesaplamakta ve ana bitki ve klonlar arasında dendogram oluşturulmasında kullanılmıştır. Buna ek olarak, PIC (Polymorphism Information Content) değeri, PIC= 2Pi(1-Pi) formülü (Botstein ve ark., 1980; Bhat, 2000) ile hesaplanmıştır.

3. BULGULAR

3.1. İzole Edilen gDNA' ların Miktarlarının Belirlenmesi

'Ferrastar', 'Nonpareil' ve 'Teksas' çeşitlerine ait ana bitki ve klonlara ait yaprak örneklerinden *i-genomic* Plant DNA extraction Mini Kit ile gDNA izolasyonları yapıldı ve DNA belirteci ile birlikte jele yüklendi (Şekil 3.1) ve Nanodrop (Shimadzu bioSpec-nano) cihazı ile A260/A280 nm dalga boyunda ölçüm yapılarak, örneklere ait gDNA miktarları belirlendi (Çizelge 3.1, 3.2, 3.3).



Şekil 3.1. 'Ferrastar' (F), 'Nonpareil' (N) ve 'Teksas' (T) çeşitlerine ait izole edilen gDNA' ların jel görüntüsü. B: λ DNA-Hind III DNA; A: Ana Bitki, 3-1 ve 3-2: mikroaşılamadan sonra 3. alt kültüre ait klonlar, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar.

Çizelge 3.1. ‘Ferrastar’ çeşidine ait ana bitki ve klonların gDNA miktarları.

Örnek ismi	DNA Miktarı (ng/µl)
Ana Bitki	110.7
Klon (3-1)	69.4
Klon (3-2)	88.1
Klon (6-1)	99.4
Klon (6-2)	390.0
Klon (9-1)	99.4
Klon (9-2)	193.1

Çizelge 3.2. ‘Nonpareil’ çeşidine ait ana bitki ve klonların gDNA miktarları.

Örnek ismi	DNA Miktarı (ng/µl)
Ana Bitki	50.6
Klon (3-1)	123.8
Klon (3-2)	22.5
Klon (6-1)	324.8
Klon (6-2)	309.4
Klon (9-1)	234.4
Klon (9-2)	187.5

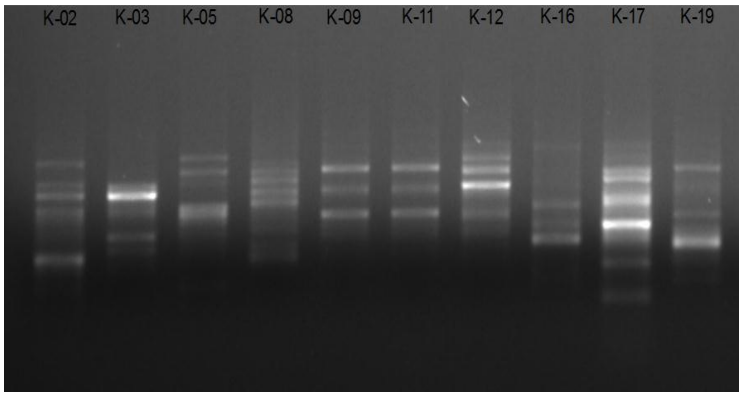
Çizelge 3.3. ‘Teksas’ çeşidine ait ana Bitki ve klonların gDNA miktarları.

Örnek ismi	DNA Miktarı (ng/µl)
Ana Bitki	50.3
Klon (6-1)	400.0
Klon (6-2)	210.6
Klon (9-1)	192.4
Klon (9-2)	375.5

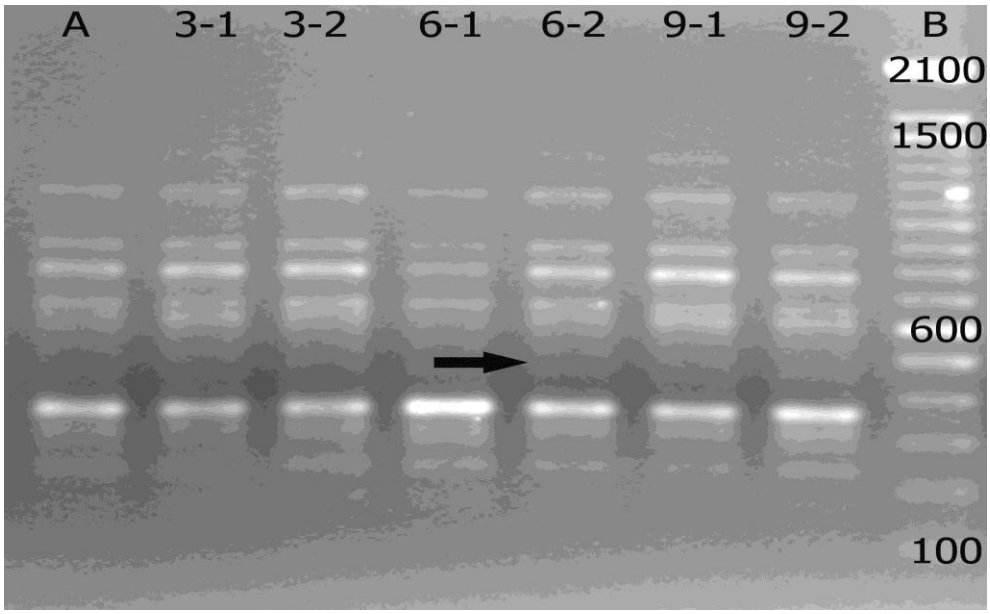
3.2. RAPD-PZR Analizlerinin Değerlendirilmesi

3.2.1. *P. dulcis* 'Ferrastar' Çeşidi İçin RAPD-PZR Analizlerinin Değerlendirilmesi

RAPD-PZR analizleri için denemeye alınmış olan 20 primer (K-01-K-20) arasından 'Ferrastar' çeşidi için K-01, K-04, K-06, K-07, K-10, K-13, K-14, K-15, K-18 ve K-20 primerleri ana bitki gDNA' sının çoğaltımı çalışmalarında bant üretkenliğinin az olması veya hiç olmaması nedenleriyle klonlar için değerlendirmeye alınmadı. K-02, K-03, K-05, K-08, K-09, K-11, K-12, K-16, K-17 ve K-19 primerleri ise ana bitkide yeterli (en az 2 bant) bant ürettiğinden (Şekil 3.2), klonlara ait gDNA' larda bu primerler ile amplifiye edilmiş, çoğaltım ürünleri ve ana bitki ile birlikte bir belirteçle jele yüklenerek, jel görüntüleri sırasıyla Şekil 3.3, Şekil 3.4, Şekil 3.5, Şekil 3.6, Şekil 3.7, Şekil 3.8, Şekil 3.9, Şekil 3.10, Şekil 3.11, Şekil 3.12' de sunulmuştur. Her RAPD primer jel görüntüsü için yapılan bant yorumları var olan bant için 1; olmayan bant için 0 verilerek değerlendirilmiş ve bu yorumlar sırasıyla Çizelge 3.4, Çizelge 3.5, Çizelge 3.6, Çizelge 3.7, Çizelge 3.8, Çizelge 3.9, Çizelge 3.10, Çizelge 3.11, Çizelge 3.12, Çizelge 3.13' da sunulmuştur. Değerlendirme sonucunda 'Ferrastar' çeşidi için ana bitki ve klonlara ait gDNA' ların çoğaltılması sonrası her RAPD primeri için oluşan bant sayısı, polimorfik bant sayısı, polimorfizm yüzdesi ve PIC değeri ise Çizelge 3.14' de verilmiştir.



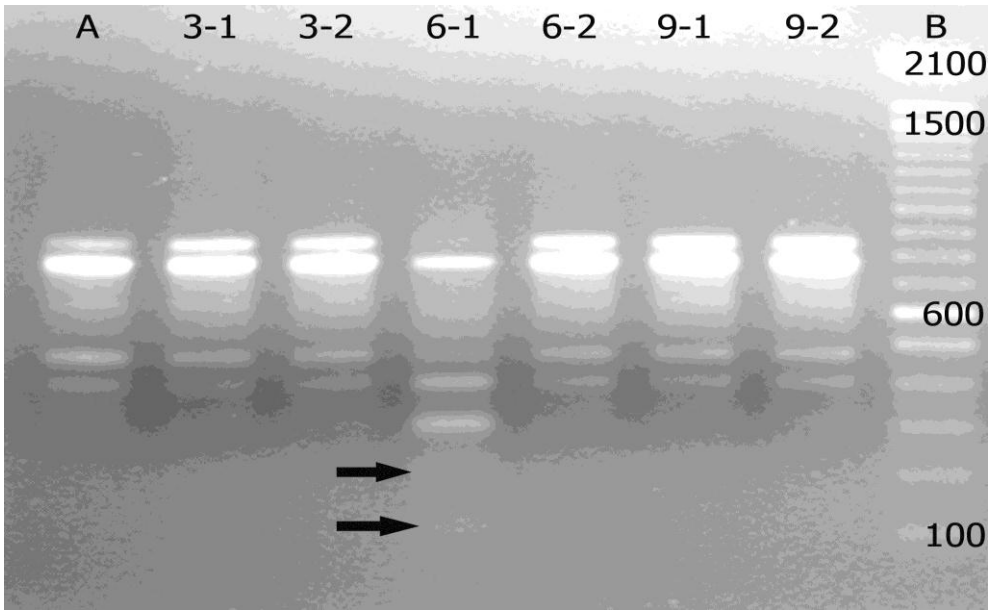
Şekil 3.2. 'Ferrastar' ana materyaline ait gDNA' nın seçilen RAPD primerleri ile yapılan PZR reaksiyonu ile elde edilen bant profili.



Şekil 3.3. 'Ferrastar' çeşidine ait, K-02 primeri ile elde edilen RAPD-PZR jel görüntüsü. B: 100 bç + 1 kb Ladder DNA A: Ana bitki, 3-1 ve 3-2: mikroaşılamadan sonra 3. alt kültüre ait klonlar, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar. Şekilde gösterilen ok polimorfik olan bantı göstermektedir.

Çizelge 3.4. 'Ferrastar' çeşidine ait, K-02 primeri ile elde edilen RAPD-PZR bant sonuçları.

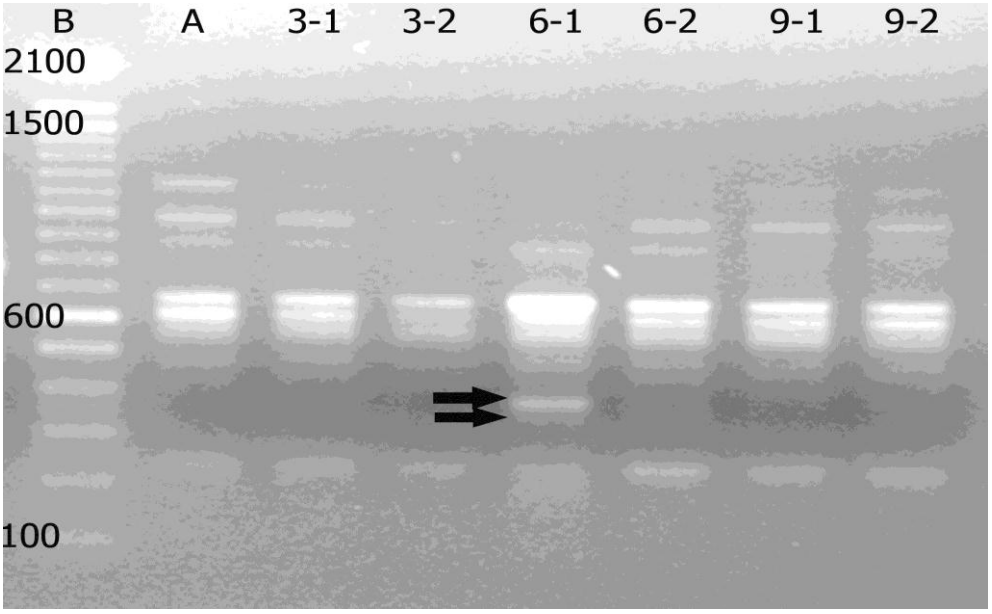
K-02 Primeri							
Bant (bç)		**Klonlar**					
	Ana	**3-1**	**3-2**	**6-1**	**6-2**	**9-1**	**9-2**
1300	1	1	1	1	1	1	1
1120	1	1	1	1	1	1	1
880	1	1	1	1	1	1	1
780	1	1	1	1	1	1	1
680	1	1	1	1	1	1	1
450	1	1	1	1	1	0	0
370	1	1	1	1	1	1	1
320	1	1	1	1	1	1	1
280	1	1	1	1	1	1	1
250	1	1	1	1	1	1	1
190	1	1	1	1	1	1	1



Şekil 3.4. 'Ferrastar' çeşidine ait, K-03 primeri ile elde edilen RAPD-PZR jel görüntüsü. B: 100 bç + 1 kb Ladder DNA A: Ana bitki, 3-1 ve 3-2: mikroaşılamadan sonra 3. alt kültüre ait klonlar, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar. Şekilde gösterilen oklar polimorfik olan bantları göstermektedir.

Çizelge 3.5. 'Ferrastar' çeşidine ait, K-03 primeri ile elde edilen RAPD-PZR bant sonuçları.

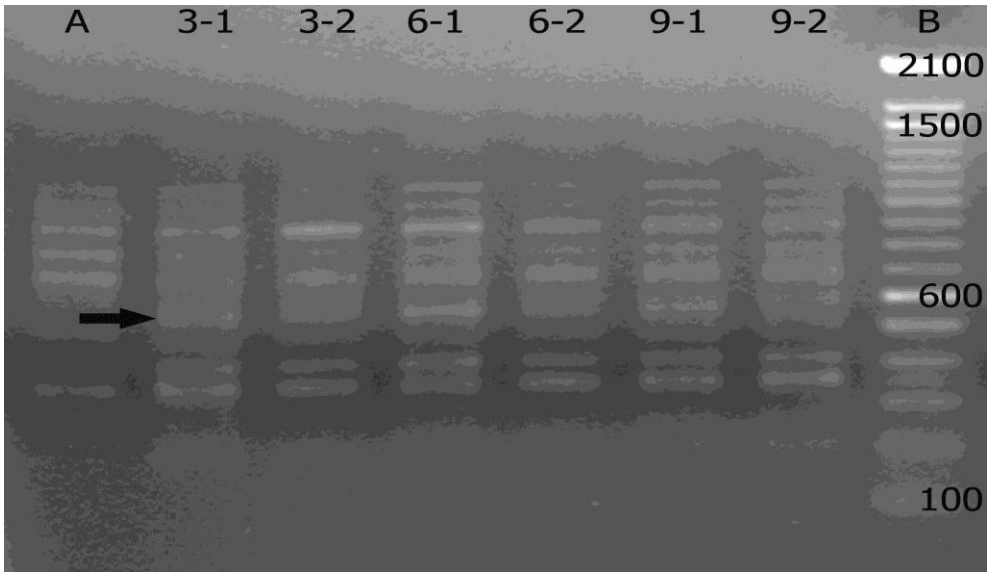
K-03 Primeri							
Bant (bç)		**Klonlar**					
	Ana	**3-1**	**3-2**	**6-1**	**6-2**	**9-1**	**9-2**
830	1	1	1	1	1	1	1
780	1	1	1	1	1	1	1
650	1	1	1	1	1	1	1
480	1	1	1	1	1	1	1
400	1	1	1	1	1	1	1
320	1	1	1	1	1	1	1
200	0	0	0	1	0	0	0
120	0	0	0	1	0	0	0



Şekil 3.5. ‘Ferrastar’ çeşidine ait, K-05 primeri ile elde edilen RAPD-PZR jel görüntüsü. B: 100 bç + 1 kb Ladder DNA A: Ana bitki, 3-1 ve 3-2: mikroaşılamadan sonra 3. alt kültüre ait klonlar, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar. Şekilde gösterilen oklar polimorfik olan bantları göstermektedir.

Çizelge 3.6. ‘Ferrastar’ çeşidine ait, K-05 primeri ile elde edilen RAPD-PZR bant sonuçları.

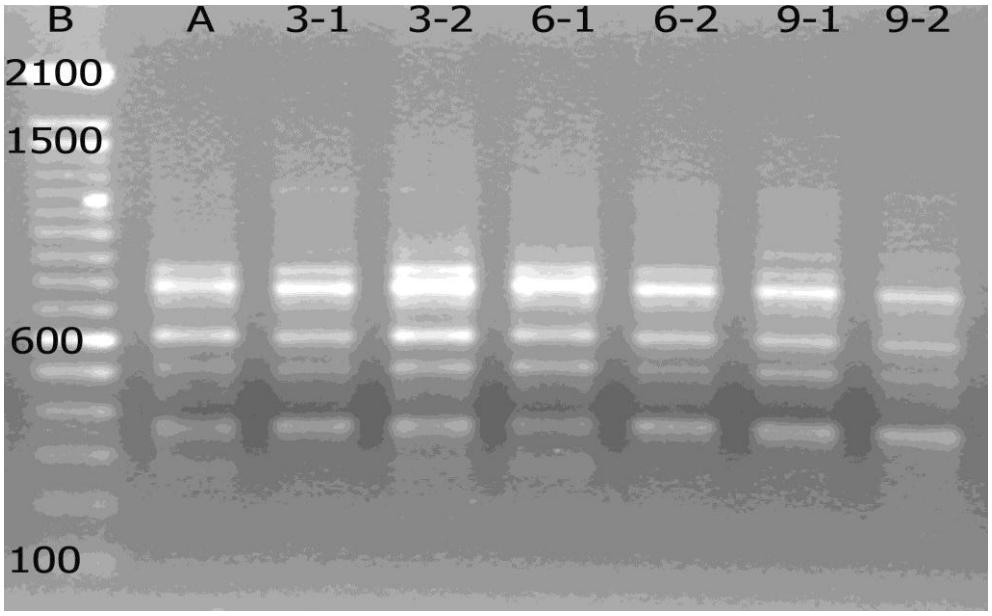
K-05 Primeri							
Bant (bç)		**Klonlar**					
	Ana	**3-1**	**3-2**	**6-1**	**6-2**	**9-1**	**9-2**
1100	1	1	1	1	1	1	1
980	1	1	1	1	1	1	1
880	1	1	1	1	1	1	1
670	1	1	1	1	1	1	1
620	1	1	1	1	1	1	1
570	1	1	1	1	1	1	1
480	1	1	1	1	1	1	1
460	1	1	1	1	1	1	1
370	0	0	0	1	0	0	0
350	0	0	0	1	1	0	0
230	1	1	1	1	1	1	1



Şekil 3.6. 'Ferrastar' çeşidine ait, K-08 primeri ile elde edilen RAPD-PZR jel görüntüsü. B: 100 bç + 1 kb Ladder DNA A: Ana bitki, 3-1 ve 3-2: mikroaşılamadan sonra 3. alt kültüre ait klonlar, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar. Şekilde gösterilen ok polimorfik olan bantı göstermektedir.

Çizelge 3.7. 'Ferrastar' çeşidine ait, K-08 primeri ile elde edilen RAPD-PZR bant sonuçları.

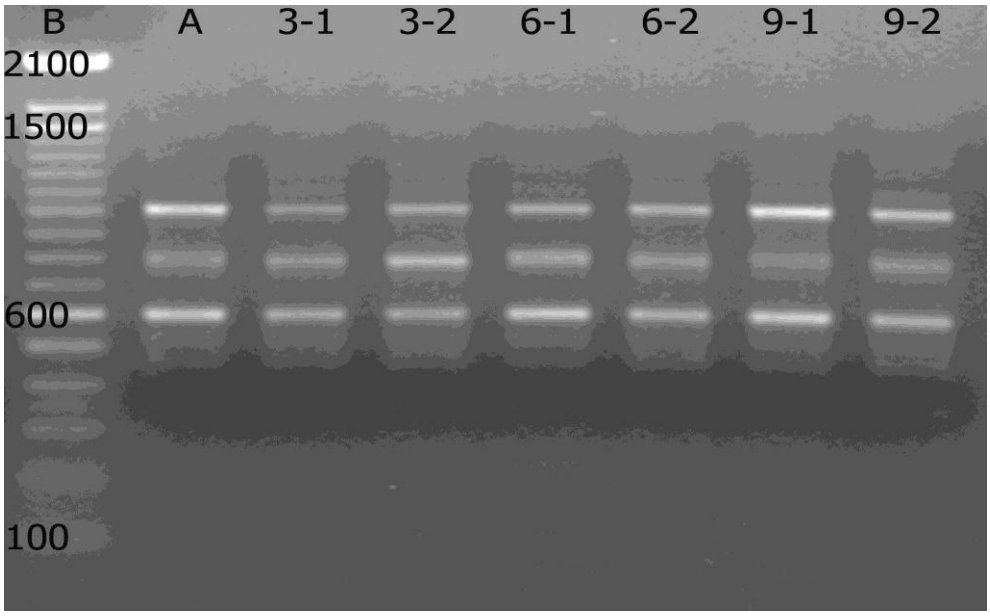
K-08 Primeri							
Bant (bç)		**Klonlar**					
	Ana	**3-1**	**3-2**	**6-1**	**6-2**	**9-1**	**9-2**
1100	1	1	1	1	1	1	1
1000	1	1	1	1	1	1	1
900	1	1	1	1	1	1	1
800	1	1	1	1	1	1	1
700	1	1	1	1	1	1	1
690	1	1	1	1	1	1	1
580	0	1	1	1	1	1	1
550	1	1	1	1	1	1	1
490	1	1	1	1	1	1	1
420	1	1	1	1	1	1	1
360	1	1	1	1	1	1	1
200	1	1	1	1	1	1	1



Şekil 3.7. 'Ferrastar' çeşidine ait, K-09 primeri ile elde edilen RAPD-PZR jel görüntüsü. B: 100 bç + 1 kb Ladder DNA A: Ana bitki, 3-1 ve 3-2: mikroaşılamadan sonra 3. alt kültüre ait klonlar, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar.

Çizelge 3.8. 'Ferrastar' çeşidine ait, K-09 primeri ile elde edilen RAPD-PZR bant sonuçları.

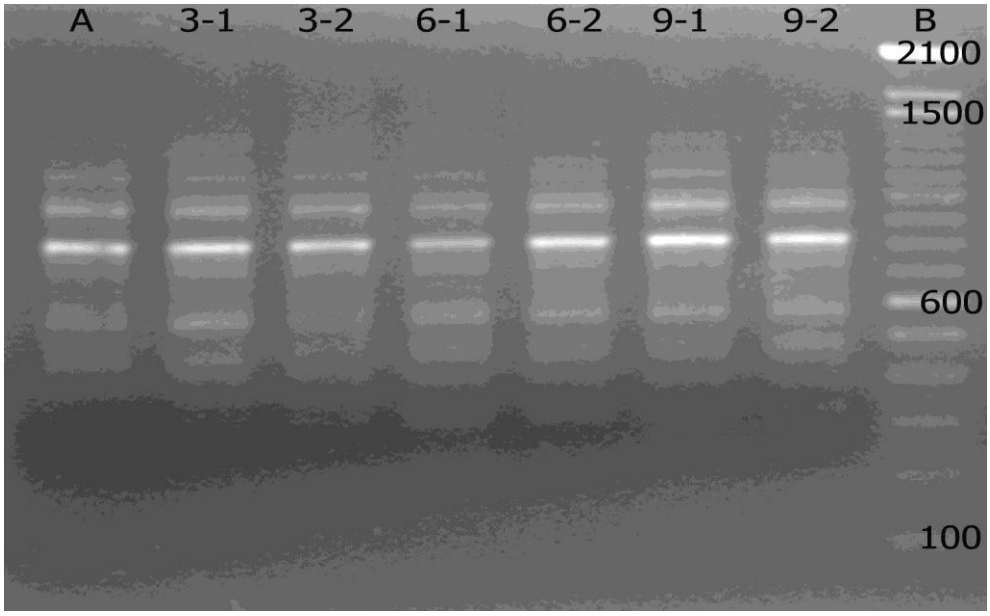
K-09 Primeri							
Bant (bç)		**Klonlar**					
	Ana	**3-1**	**3-2**	**6-1**	**6-2**	**9-1**	**9-2**
1200	1	1	1	1	1	1	1
950	1	1	1	1	1	1	1
850	1	1	1	1	1	1	1
800	1	1	1	1	1	1	1
750	1	1	1	1	1	1	1
620	1	1	1	1	1	1	1
520	1	1	1	1	1	1	1
350	1	1	1	1	1	1	1
280	1	1	1	1	1	1	1
180	1	1	1	1	1	1	1



Şekil 3.8. ‘Ferrastar’ çeşidine ait, K-11 primeri ile elde edilen RAPD-PZR jel görüntüsü. B: 100 bç + 1 kb Ladder DNA A: Ana bitki, 3-1 ve 3-2: mikroaşılamadan sonra 3. alt kültüre ait klonlar, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar.

Çizelge 3.9. ‘Ferrastar’ çeşidine ait, K-11 primeri ile elde edilen RAPD-PZR bant sonuçları.

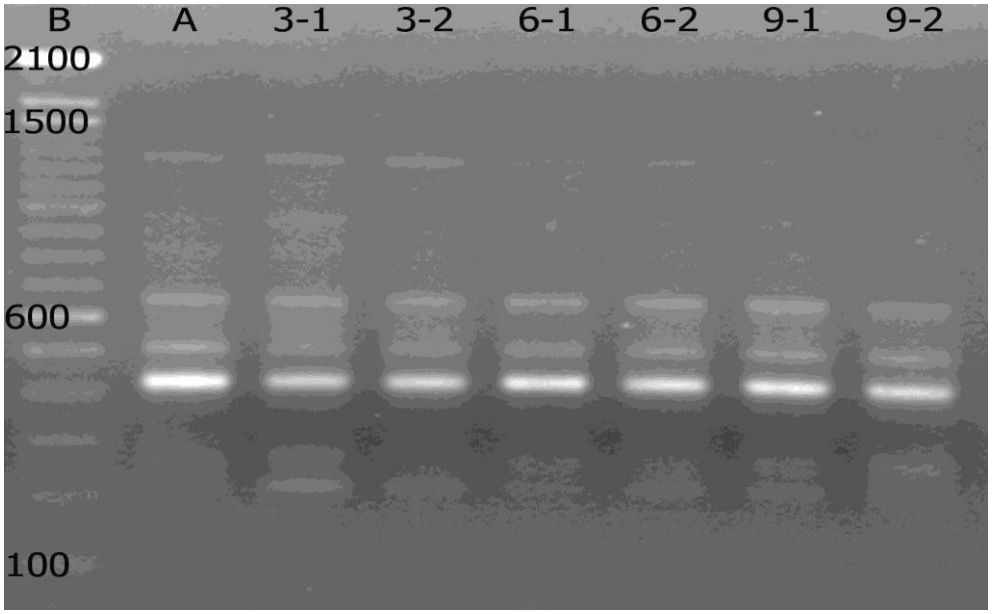
K-11 Primeri							
Bant (bç)		**Klonlar**					
	Ana	**3-1**	**3-2**	**6-1**	**6-2**	**9-1**	**9-2**
1200	1	1	1	1	1	1	1
1100	1	1	1	1	1	1	1
1000	1	1	1	1	1	1	1
800	1	1	1	1	1	1	1
600	1	1	1	1	1	1	1
520	1	1	1	1	1	1	1
480	1	1	1	1	1	1	1
350	1	1	1	1	1	1	1
200	1	1	1	1	1	1	1



Şekil 3.9. 'Ferrastar' çeşidine ait, K-12 primeri ile elde edilen RAPD-PZR jel görüntüsü. B: 100 bç + 1 kb Ladder DNA A: Ana bitki, 3-1 ve 3-2: mikroaşılamadan sonra 3. alt kültüre ait klonlar, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar.

Çizelge 3.10. 'Ferrastar' çeşidine ait, K-12 primeri ile elde edilen RAPD-PZR bant sonuçları.

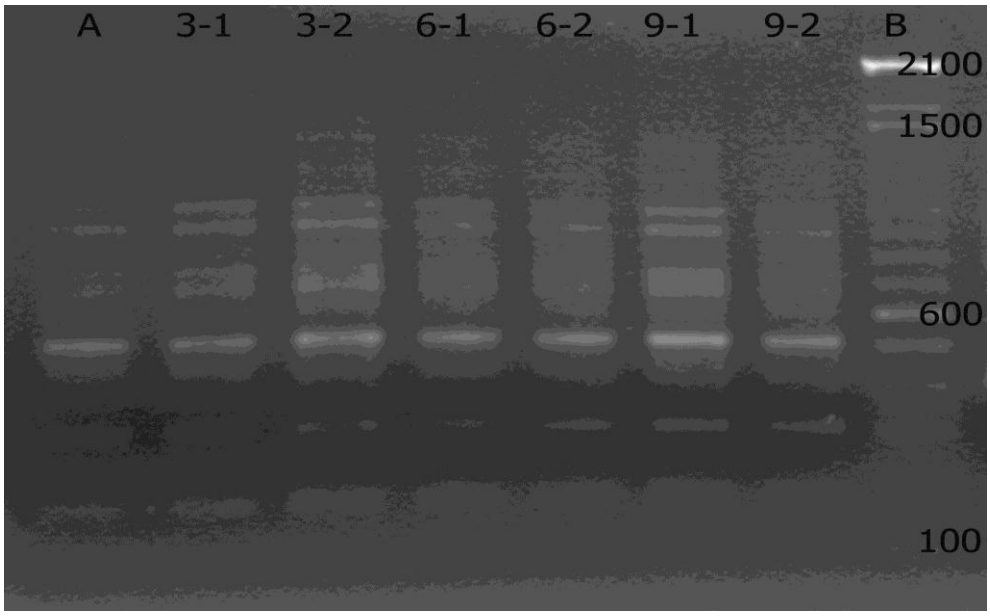
K-12 Primeri							
Bant (bç)		**Klonlar**					
	Ana	**3-1**	**3-2**	**6-1**	**6-2**	**9-1**	**9-2**
1200	1	1	1	1	1	1	1
1100	1	1	1	1	1	1	1
1000	1	1	1	1	1	1	1
980	1	1	1	1	1	1	1
820	1	1	1	1	1	1	1
750	1	1	1	1	1	1	1
720	1	1	1	1	1	1	1
600	1	1	1	1	1	1	1
580	1	1	1	1	1	1	1
480	1	1	1	1	1	1	1
320	1	1	1	1	1	1	1



Şekil 3.10. ‘Ferrastar’ çeşidine ait, K-16 primeri ile elde edilen RAPD-PZR jel görüntüsü. B: 100 bç + 1 kb Ladder DNA A: Ana bitki, 3-1 ve 3-2: mikroaşılamadan sonra 3. alt kültüre ait klonlar, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar.

Çizelge 3.11. ‘Ferrastar’ çeşidine ait, K-16 primeri ile elde edilen RAPD-PZR bant sonuçları.

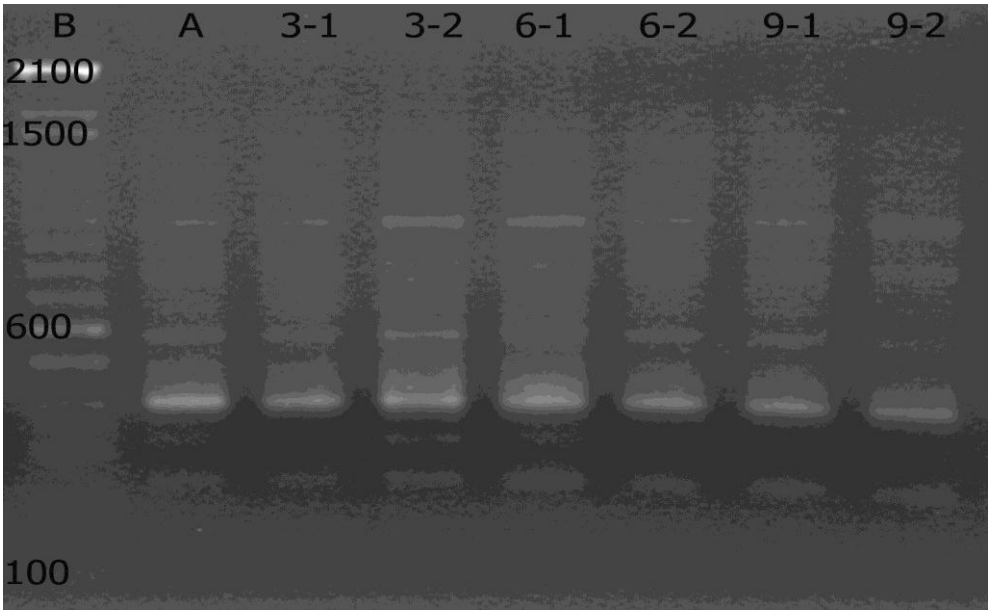
K-16 Primeri							
Bant (bç)		**Klonlar**					
	Ana	**3-1**	**3-2**	**6-1**	**6-2**	**9-1**	**9-2**
1250	1	1	1	1	1	1	1
950	1	1	1	1	1	1	1
650	1	1	1	1	1	1	1
500	1	1	1	1	1	1	1
450	1	1	1	1	1	1	1
250	1	1	1	1	1	1	1
220	1	1	1	1	1	1	1



Şekil 3.11. 'Ferrastar' çeşidine ait, K-17 primeri ile elde edilen RAPD-PZR jel görüntüsü. B: 100 bç + 1 kb Ladder DNA A: Ana bitki, 3-1 ve 3-2: mikroaşılamadan sonra 3. alt kültüre ait klonlar, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar.

Çizelge 3.12. 'Ferrastar' çeşidine ait, K-17 primeri ile elde edilen RAPD-PZR bant sonuçları.

K-17 Primeri							
Bant (bç)		**Klonlar**					
	Ana	**3-1**	**3-2**	**6-1**	**6-2**	**9-1**	**9-2**
1300	1	1	1	1	1	1	1
1100	1	1	1	1	1	1	1
990	1	1	1	1	1	1	1
900	1	1	1	1	1	1	1
800	1	1	1	1	1	1	1
710	1	1	1	1	1	1	1
650	1	1	1	1	1	1	1
600	1	1	1	1	1	1	1
450	1	1	1	1	1	1	1
310	1	1	1	1	1	1	1
190	1	1	1	1	1	1	1



Şekil 3.12. 'Ferrastar' çeşidine ait, K-19 primeri ile elde edilen RAPD-PZR jel görüntüsü. B: 100 bç + 1 kb Ladder DNA A: Ana bitki, 3-1 ve 3-2: mikroaşılamadan sonra 3. alt kültüre ait klonlar, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar.

Çizelge 3.13. 'Ferrastar' çeşidine ait, K-19 primeri ile elde edilen RAPD-PZR bant sonuçları.

K-19 Primeri							
Bant (bç)		**Klonlar**					
	Ana	**3-1**	**3-2**	**6-1**	**6-2**	**9-1**	**9-2**
1000	1	1	1	1	1	1	1
700	1	1	1	1	1	1	1
580	1	1	1	1	1	1	1
400	1	1	1	1	1	1	1
330	1	1	1	1	1	1	1
240	1	1	1	1	1	1	1

‘Ferrastar’ çeşidi için seçilen primerler ile yapılan RAPD-PZR’ lara ait jel görüntüleri değerlendirilerek oluşturulan ve oluşan bantlarla ilgili yapılan yorumlara ait değerlendirmeler Çizelge 3.14’ de verilmiştir. Çizelgeye göre değerlendirmeye alınan primerlere ait oluşan bantlar irdelendiğinde, 120 bç ile 1300 bç arasında bantların oluştuğu belirlenmiştir. Bu çeşide ait ana bitki ve klonlar da amplifikasyon sağlayan primerler arasında 12 bantla en fazla bant üreten primer K-08 primeri olup, çoğaltımda kullanılan 10 primer ile toplam da 96 bant elde edilmiştir. Çoğaltımda kullanılan primerler arasında 4 primer de (K-02, K-03, K-05 ve K-08) polimorfik bantların oluştuğu gözlenirken, bu primerler ile toplamda 6 adet polimorfik bant elde edilmiştir. Dolayısıyla, ‘Ferrastar’ çeşidine ait ana bitki ve klonlar arasında oluşan bantların % 6.25’ i polimorfik olduğu belirlenmiştir. Primerler arasında en yüksek PIC değeri K-02 primerinde 0.4082 hesaplanmıştır. Ayrıca RAPD-PZR analizlerinde kullanılan primerler arasındaki polimorfik bant üreten primerlerin ortalama PIC değeri ise 0.2585 olarak hesaplanmıştır.

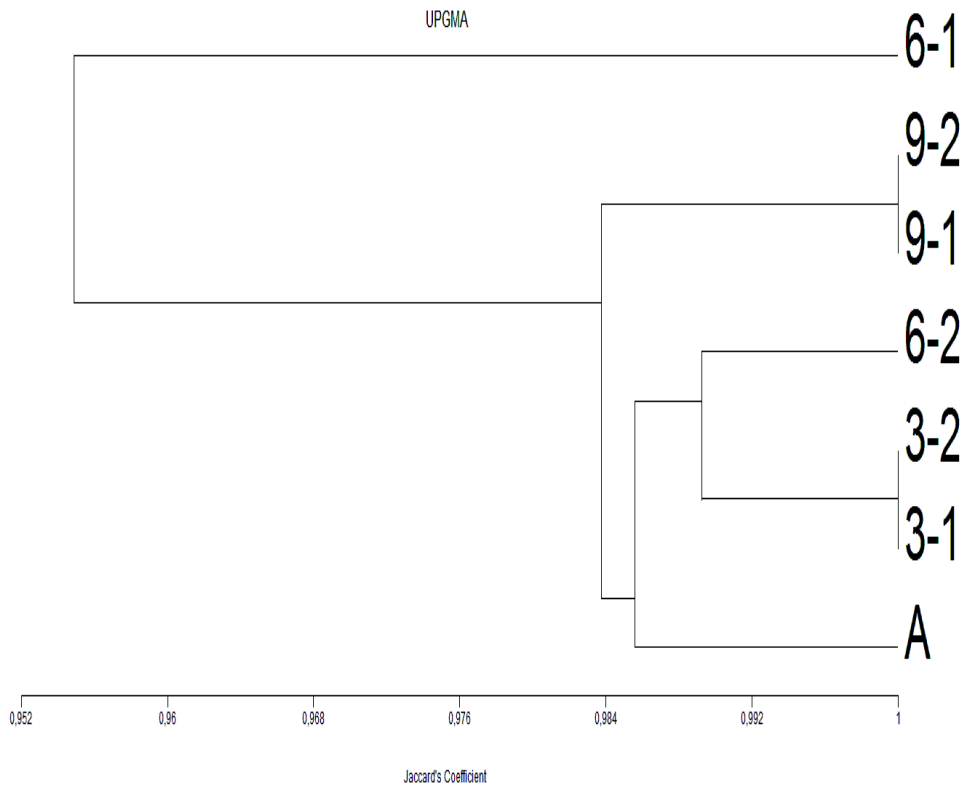
Çizelge 3.14. *P. dulcis* 'Ferrastar' çeşidinin ana bitki ve klonlarının genetik kararlılığının belirlenmesinde kullanılan RAPD primer dizileri ve bu primerlerden elde edilen değerlendirilmiş bant ve polimorfik bant sayısı, yüzdesi ve PIC değerleri.

Primer İsmi	Primer Dizisi (5´-3´)	Bant Uzunluğu (bç)	Bant Sayısı	Polimorfik Bant Sayısı	Polimorfizm Yüzdesi	PIC Değeri (Ort)
K-02	GTC TTC GCA A	190-1300	11	1	9.1	0.4082
K-03	CCA GCT TAG G	120-830	8	2	25.0	0.1224
K-05	TCT GTC GAG G	230-1100	11	2	18.1	0.3265
K-08	GAA CAC TGG G	200-1100	12	1	8.3	0.2449
K-09	CCC TAC CGA C	180-1200	10	0	0.0	-
K-11	ATT GCC CCA G	220-1200	9	0	0.0	-
K-12	TGG CCC TCA C	320-1200	11	0	0.0	-
K-16	GAG CGT CGA A	220-1250	7	0	0.0	-
K-17	CCC AGC TGT G	190-1300	11	0	0.0	-
K-19	CAC AGG CGG A	240-1000	6	0	0.0	-
	Toplam		**96**	**6**	**6.25**	**0.2585**

‘Ferrastar’ çeşidine ait jel profilleri sonucu elde edilen benzerlik matriksi (Çizelge 3.15) ve dendogram (Şekil 3.13) irdelendiğinde benzerlik matriksinde ana bitki ve klonlar arasındaki benzerliklerin 0.948 ile 1.000 arasında değiştiği görülmekte olup, benzerlik matriksi ortalaması 0.9776 olarak hesaplanmıştır. Dendogram incelendiğinde ana materyale en yakın klonun 3. alt kültüre ait klonlar 3-1 ve 3-2 olduğu, ana bitkiye en uzak olan klonun ise 6. alt kültüre ait olan klon 6-1 olduğu görülmektedir. Ayrıca ana bitki ile mikroaşılama sonrası elde edilen klonların genetik kararsızlıkları 3. alt kültürden sonra başlamış olup, klon 6-1’de görece daha fazla değişim elde edilmiştir. Ancak yine de bu klon ana bitki ile 0.948 benzerlik göstermektedir.

Çizelge 3.15. *P. dulcis* ‘Ferrastar’ çeşidine ait ana bitki ile klonları arasında RAPD-PZR analizi ile elde edilen benzerlik matriksi.

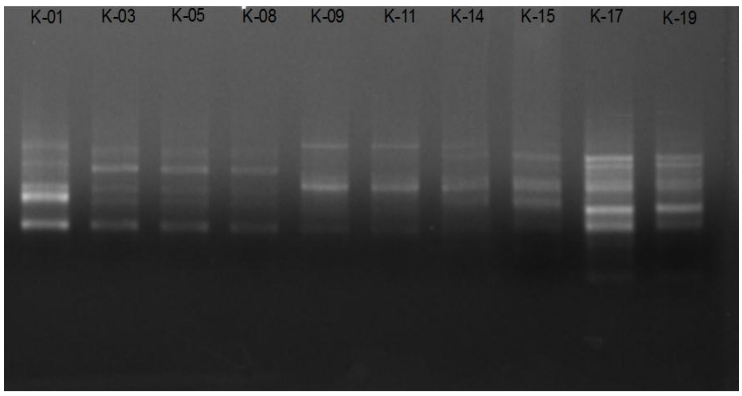
	A	**3-1**	**3-2**	**6-1**	**6-2**	**9-1**	**9-2**
A	1,000						
3-1	0,989	1,000					
3-2	0,989	1,000	1,000				
6-1	0,948	0,958	0,958	1,000			
6-2	0,978	0,989	0,989	0,969	1,000		
9-1	0,978	0,989	0,989	0,948	0,978	1,000	
9-2	0,978	0,989	0,989	0,948	0,978	1,000	1,000



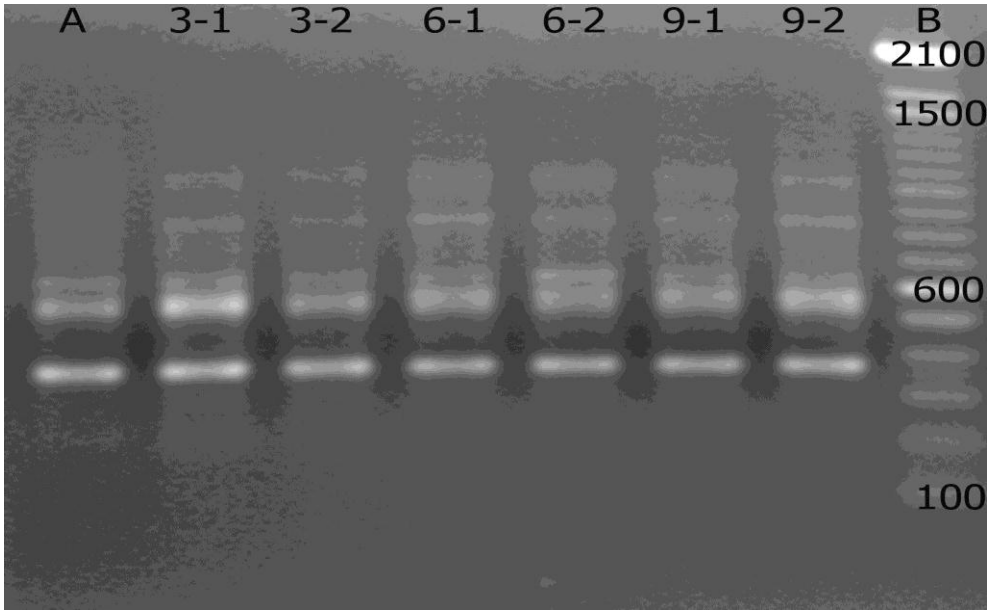
Şekil 3.13. *P. dulcis* 'Ferrastar' çeşidinin 6 klonundan, 10 RAPD primeri ile elde edilen 96 banttan UPGMA analizi ile oluşturulan dendogram. [A: Ana bitki, 3-1 ve 3-2: mikroaşılamadan sonra 3. alt kültüre ait klonlar, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar].

3.2.2. *P. dulcis* 'Nonpareil' Çeşidi İçin RAPD-PZR Analizlerinin Değerlendirilmesi

RAPD-PZR analizleri için denemeye alınan 20 primer (K-01-K-20) arasından 'Nonpareil' çeşidi için K-02, K-04, K-06, K-07, K-10, K-12, K-13, K16, K18 ve K-20 primerleri ana bitki gDNA' sının çoğaltımı çalışmalarında az bant üretmesi veya hiç bant üretmemesi nedeniyle diğer klonlar için değerlendirmeye alınmamıştır. K-01, K-03, K-05, K-08, K-09, K-11, K-14, K-15, K-17 ve K-19 primerleri ise ana bitkide vermiş oldukları yeterli bant üretkenliğinden dolayı değerlendirmeye alınarak (Şekil 3.14), klonlara ait gDNA' ların çoğaltımı yapılmış ve çoğaltım ürünleri (ana bitki ve klonlar) bir belirteç ile birlikte jele yüklenerek, jel görüntüleri sırasıyla Şekil 3.15, Şekil 3.16, Şekil 3.17, Şekil 3.18, Şekil 3.19, Şekil 3.20, Şekil 3.21, Şekil 3.22, Şekil 3.23, Şekil 3.24' de verilmiştir. Her RAPD primer jel görüntüsü için yapılan bant yorumları var olan bant için 1; olmayan bant için 0 değeri verilmiş ve bu değerler sırasıyla Çizelge 3.16, Çizelge 3.17, Çizelge 3.18, Çizelge 3.19, Çizelge 3.20, Çizelge 3.21, Çizelge 3.22, Çizelge 3.23, Çizelge 3.24, Çizelge 3.25' de sunulmuştur. Değerlendirme sonucunda 'Nonpareil' çeşidi için ana bitki ve klonlara ait gDNA' ların çoğaltılması sonrası her RAPD primeri için bantlar belirlenerek oluşan bant sayısı, polimorfik bant sayısı, polimorfizm yüzdesi ve PIC değeri Çizelge 3.26' da verilmiştir.



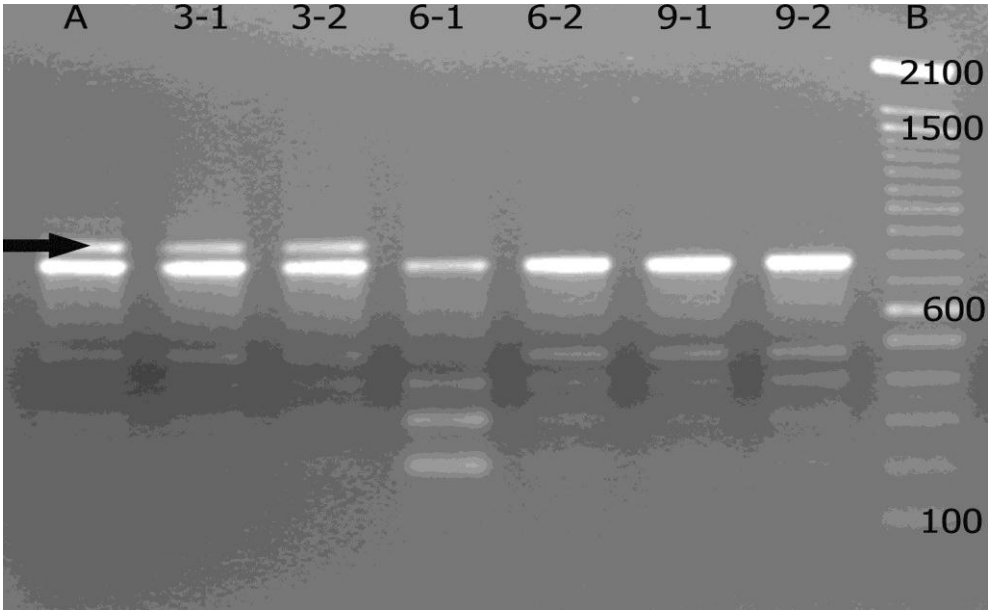
Şekil 3.14. 'Nonpareil' ana materyaline ait gDNA' nın seçilen RAPD primerleri ile yapılan PZR reaksiyonu ile elde edilen bant profili.



Şekil 3.15. 'Nonpareil' çeşidine ait, K-01 primeri ile elde edilen RAPD-PZR jel görüntüsü. B: 100 bç + 1 kb Ladder DNA A: Ana bitki, 3-1 ve 3-2: mikroaşılamadan sonra 3. alt kültüre ait klonlar, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar.

Çizelge 3.16. 'Nonpareil' çeşidine ait, K-01 primeri ile elde edilen RAPD-PZR bant sonuçları.

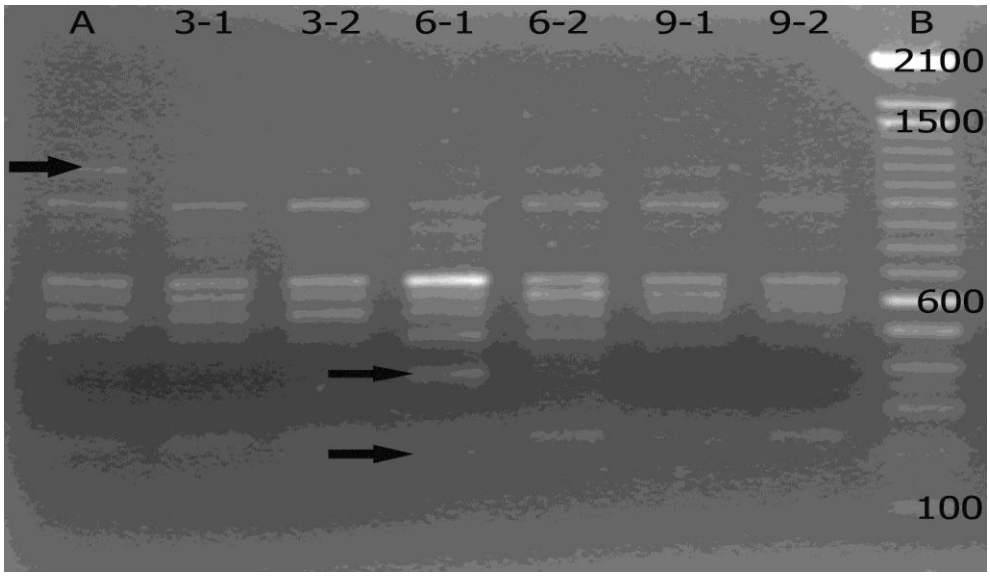
K-01 Primeri							
Bant (bç)		**Klonlar**					
	Ana	**3-1**	**3-2**	**6-1**	**6-2**	**9-1**	**9-2**
1050	1	1	1	1	1	1	1
850	1	1	1	1	1	1	1
620	1	1	1	1	1	1	1
565	1	1	1	1	1	1	1
520	1	1	1	1	1	1	1
450	1	1	1	1	1	1	1
380	1	1	1	1	1	1	1



Şekil 3.16. 'Nonpareil' çeşidine ait, K-03 primeri ile elde edilen RAPD-PZR jel görüntüsü. B: 100 bç + 1 kb Ladder DNA A: Ana bitki, 3-1 ve 3-2: mikroaşılamadan sonra 3. alt kültüre ait klonlar, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar. Şekilde gösterilen ok polimorfik olan bantı göstermektedir.

Çizelge 3.17. 'Nonpareil' çeşidine ait, K-03 primeri ile elde edilen RAPD-PZR bant sonuçları.

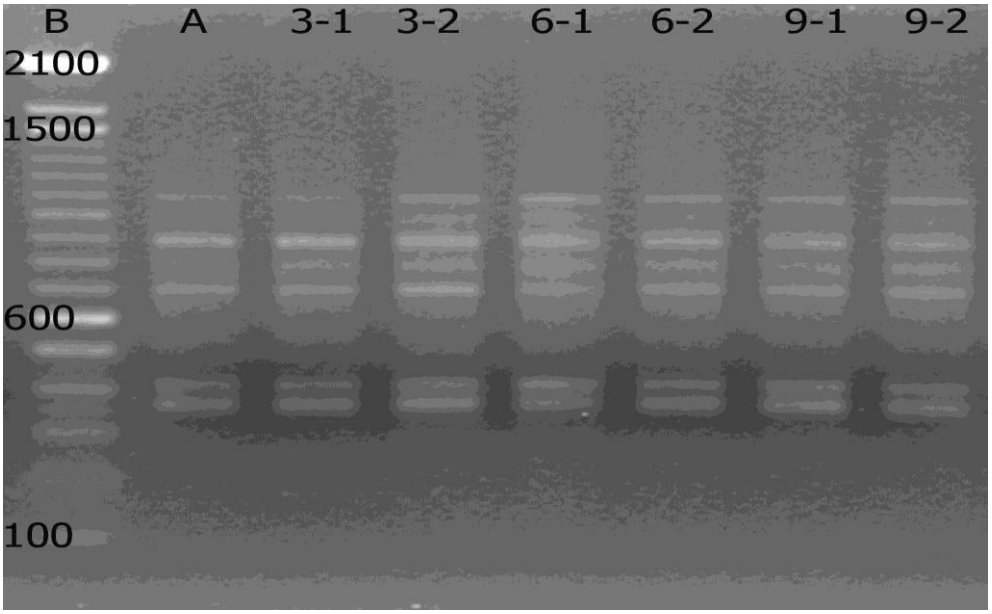
K-03 Primeri							
Bant (bç)		**Klonlar**					
	Ana	**3-1**	**3-2**	**6-1**	**6-2**	**9-1**	**9-2**
850	1	1	1	0	0	0	0
780	1	1	1	1	1	1	1
480	1	1	1	1	1	1	1
400	1	1	1	1	1	1	1
310	1	1	1	1	1	1	1
220	1	1	1	1	1	1	1



Şekil 3.17. 'Nonpareil' çeşidine ait, K-05 primeri ile elde edilen RAPD-PZR jel görüntüsü. B: 100 bç + 1 kb Ladder DNA A: Ana bitki, 3-1 ve 3-2: mikroaşılamadan sonra 3. alt kültüre ait klonlar, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar. Şekilde gösterilen oklar polimorfik olan bantları göstermektedir.

Çizelge 3.18. 'Nonpareil' çeşidine ait, K-05 primeri ile elde edilen RAPD-PZR bant sonuçları.

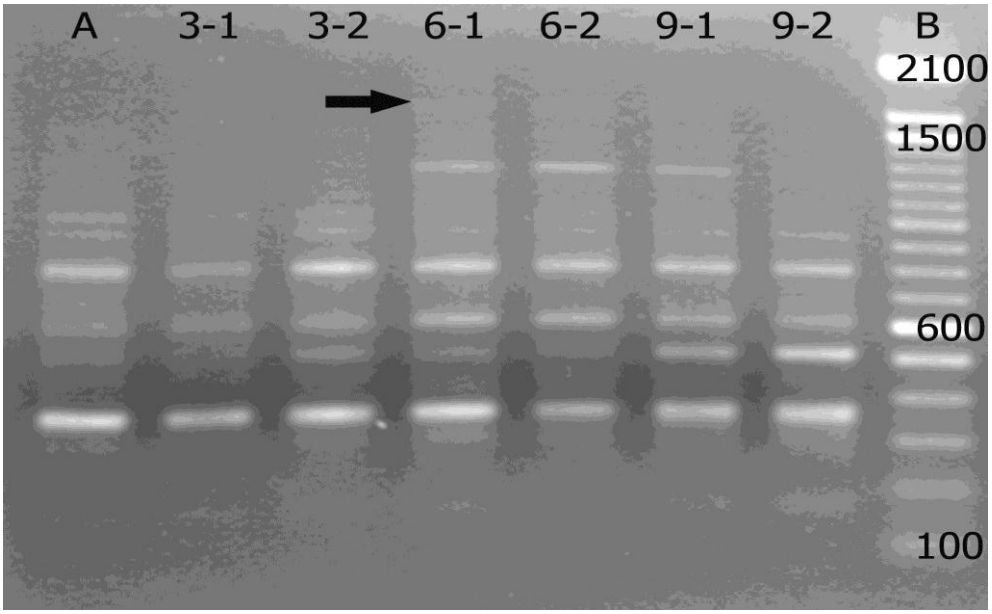
K-05 Primeri							
Bant (bç)		**Klonlar**					
	Ana	**3-1**	**3-2**	**6-1**	**6-2**	**9-1**	**9-2**
1290	1	1	1	1	0	0	0
1190	1	1	1	1	1	1	1
990	1	1	1	1	1	1	1
890	1	1	1	1	1	1	1
790	1	1	1	1	1	1	1
650	1	1	1	1	1	1	1
610	1	1	1	1	1	1	1
560	1	1	1	1	1	1	1
490	1	1	1	1	1	1	1
380	0	0	0	1	1	0	0
250	1	1	1	1	1	1	1
210	0	0	0	1	0	0	0



Şekil 3.18. 'Nonpareil' çeşidine ait, K-08 primeri ile elde edilen RAPD-PZR jel görüntüsü. B: 100 bç + 1 kb Ladder DNA A: Ana bitki, 3-1 ve 3-2: mikroaşılamadan sonra 3. alt kültüre ait klonlar, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar.

Çizelge 3.19. 'Nonpareil' çeşidine ait, K-08 primeri ile elde edilen RAPD-PZR bant sonuçları.

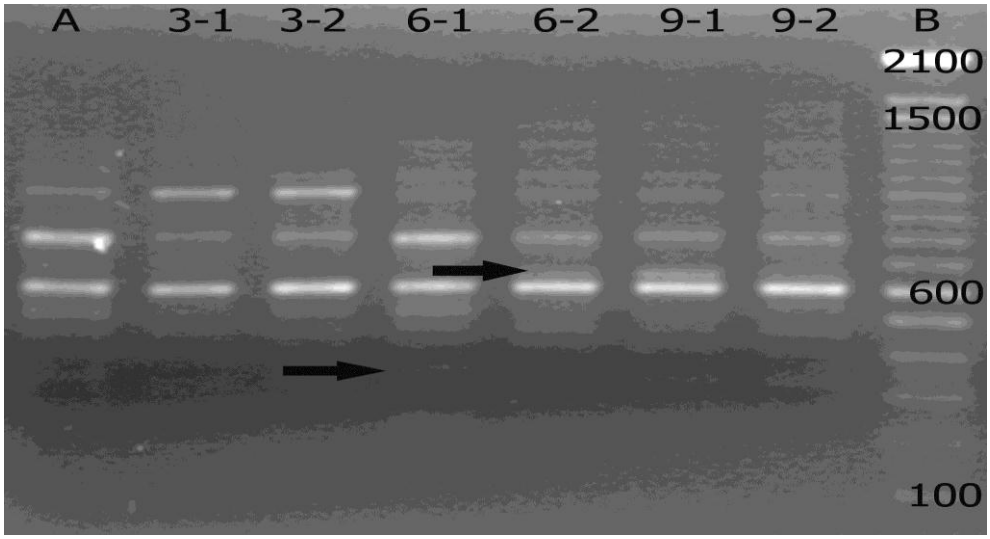
K-08 Primeri							
Bant (bç)		**Klonlar**					
	Ana	**3-1**	**3-2**	**6-1**	**6-2**	**9-1**	**9-2**
1100	1	1	1	1	1	1	1
1000	1	1	1	1	1	1	1
890	1	1	1	1	1	1	1
800	1	1	1	1	1	1	1
700	1	1	1	1	1	1	1
600	1	1	1	1	1	1	1
420	1	1	1	1	1	1	1
370	1	1	1	1	1	1	1



Şekil 3.19. 'Nonpareil' çeşidine ait, K-09 primeri ile elde edilen RAPD-PZR jel görüntüsü. B: 100 bç + 1 kb Ladder DNA A: Ana bitki, 3-1 ve 3-2: mikroaşılamadan sonra 3. alt kültüre ait klonlar, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar. Şekilde gösterilen ok polimorfik olan bantı göstermektedir.

Çizelge 3.20. 'Nonpareil' çeşidine ait, K-09 primeri ile elde edilen RAPD-PZR bant sonuçları.

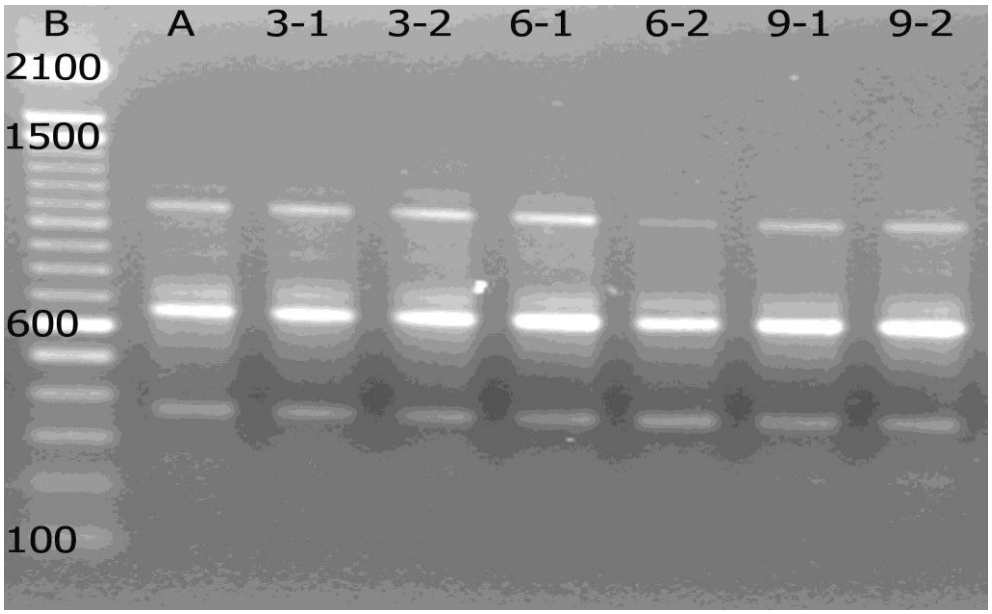
K-09 Primeri							
Bant (bç)		**Klonlar**					
	Ana	**3-1**	**3-2**	**6-1**	**6-2**	**9-1**	**9-2**
1670	0	0	0	1	1	1	0
1480	1	1	1	1	1	1	1
1250	1	1	1	1	1	1	1
1000	1	1	1	1	1	1	1
930	1	1	1	1	1	1	1
800	1	1	1	1	1	1	1
620	1	1	1	1	1	1	1
520	1	1	1	1	1	1	1
370	1	1	1	1	1	1	1
330	1	1	1	1	1	1	1
190	1	1	1	1	1	1	1



Şekil 3.20. 'Nonpareil' çeşidine ait, K-11 primeri ile elde edilen RAPD-PZR jel görüntüsü. B: 100 bç + 1 kb Ladder DNA A: Ana bitki, 3-1 ve 3-2: mikroaşılamadan sonra 3. alt kültüre ait klonlar, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar. Şekilde gösterilen oklar polimorfik olan bantları göstermektedir.

Çizelge 3.21. 'Nonpareil' çeşidine ait, K-11 primeri ile elde edilen RAPD-PZR bant sonuçları.

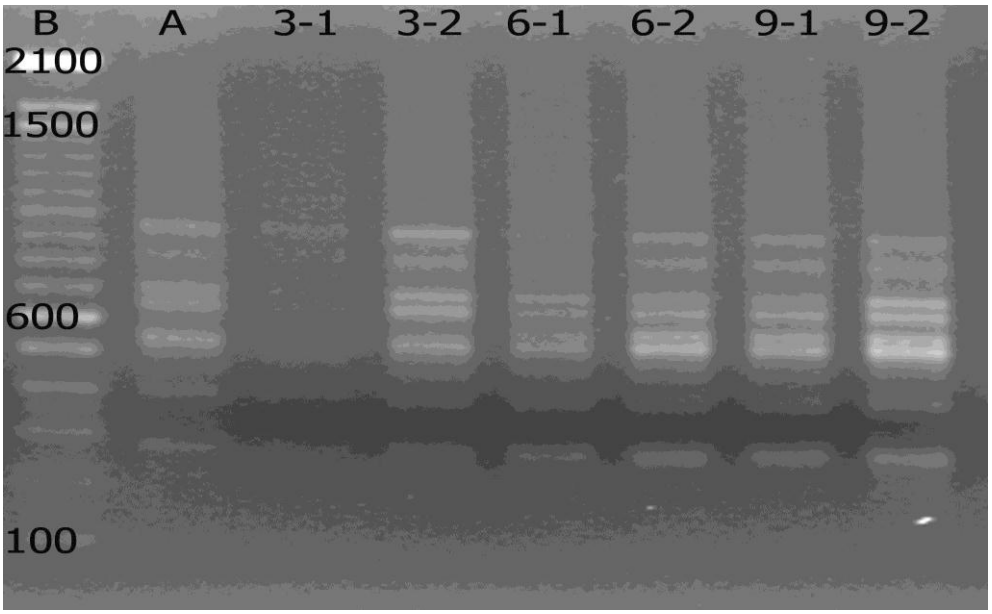
K-11 Primeri							
Bant (bç)		**Klonlar**					
	Ana	**3-1**	**3-2**	**6-1**	**6-2**	**9-1**	**9-2**
1400	1	1	1	1	1	1	1
1300	1	1	1	1	1	1	1
1100	1	1	1	1	1	1	1
1000	1	1	1	1	1	1	1
800	1	1	1	1	1	1	1
700	1	1	1	1	1	1	1
650	0	0	0	0	1	1	1
600	1	1	1	1	1	1	1
520	1	1	1	1	1	1	1
480	1	1	1	1	1	1	1
350	1	0	0	1	1	1	1
330	1	1	1	1	1	1	1



Şekil 3.21. 'Nonpareil' çeşidine ait, K-14 primeri ile elde edilen RAPD-PZR jel görüntüsü. B: 100 bç + 1 kb Ladder DNA A: Ana bitki, 3-1 ve 3-2: mikroaşılamadan sonra 3. alt kültüre ait klonlar, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar.

Çizelge 3.22. 'Nonpareil' çeşidine ait, K-14 primeri ile elde edilen RAPD-PZR bant sonuçları.

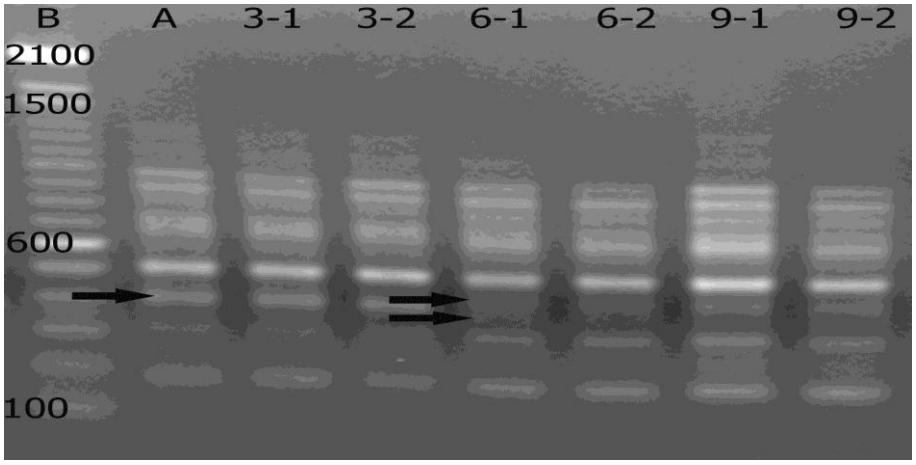
K-14 Primeri							
Bant (bç)		**Klonlar**					
	Ana	**3-1**	**3-2**	**6-1**	**6-2**	**9-1**	**9-2**
1200	1	1	1	1	1	1	1
1100	1	1	1	1	1	1	1
890	1	1	1	1	1	1	1
780	1	1	1	1	1	1	1
720	1	1	1	1	1	1	1
650	1	1	1	1	1	1	1
550	1	1	1	1	1	1	1
380	1	1	1	1	1	1	1



Şekil 3.22. 'Nonpareil' çeşidine ait, K-15 primeri ile elde edilen RAPD-PZR jel görüntüsü. B: 100 bç + 1 kb Ladder DNA A: Ana bitki, 3-1 ve 3-2: mikroaşılamadan sonra 3. alt kültüre ait klonlar, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar.

Çizelge 3.23. 'Nonpareil' çeşidine ait, K-15 primeri ile elde edilen RAPD-PZR bant sonuçları.

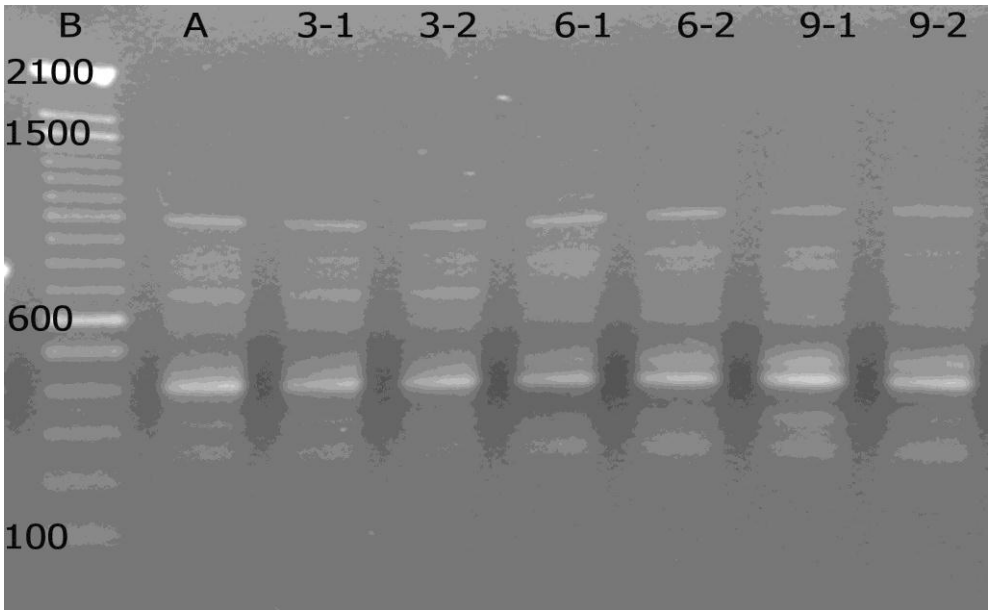
K-15 Primeri							
Bant (bç)		**Klonlar**					
	Ana	**3-1**	**3-2**	**6-1**	**6-2**	**9-1**	**9-2**
960	1	1	1	1	1	1	1
850	1	1	1	1	1	1	1
700	1	1	1	1	1	1	1
650	1	1	1	1	1	1	1
600	1	1	1	1	1	1	1
550	1	1	1	1	1	1	1
400	1	1	1	1	1	1	1
290	1	1	1	1	1	1	1



Şekil 3.23. 'Nonpareil' çeşidine ait, K-17 primeri ile elde edilen RAPD-PZR jel görüntüsü. B: 100 bç + 1 kb Ladder DNA A: Ana bitki, 3-1 ve 3-2: mikroaşılamadan sonra 3. alt kültüre ait klonlar, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar. Şekilde gösterilen oklar polimorfik olan bantları göstermektedir.

Çizelge 3.24. 'Nonpareil' çeşidine ait, K-17 primeri ile elde edilen RAPD-PZR bant sonuçları.

K-17 Primeri							
Bant (bç)		**Klonlar**					
	Ana	**3-1**	**3-2**	**6-1**	**6-2**	**9-1**	**9-2**
1250	1	1	1	1	1	1	1
1150	1	1	1	1	1	1	1
990	1	1	1	1	1	1	1
900	1	1	1	1	1	1	1
800	1	1	1	1	1	1	1
720	1	1	1	1	1	1	1
680	1	1	1	1	1	1	1
520	1	1	1	1	1	1	1
450	0	0	0	1	1	1	1
410	1	1	1	0	0	0	0
350	0	0	0	1	1	1	1
310	1	1	1	1	1	1	1
250	1	1	1	1	1	1	1
185	1	1	1	1	1	1	1



Şekil 3.24. 'Nonpareil' çeşidine ait, K-19 primeri ile elde edilen RAPD-PZR jel görüntüsü. B: 100 bç + 1 kb Ladder DNA A: Ana bitki, 3-1 ve 3-2: mikroaşılamadan sonra 3. alt kültüre ait klonlar, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar.

Çizelge 3.25. 'Nonpareil' çeşidine ait, K-19 primeri ile elde edilen RAPD-PZR bant sonuçları

K-19 Primeri							
Bant (bç)		**Klonlar**					
	Ana	**3-1**	**3-2**	**6-1**	**6-2**	**9-1**	**9-2**
1100	1	1	1	1	1	1	1
1000	1	1	1	1	1	1	1
850	1	1	1	1	1	1	1
810	1	1	1	1	1	1	1
690	1	1	1	1	1	1	1
590	1	1	1	1	1	1	1
480	1	1	1	1	1	1	1
430	1	1	1	1	1	1	1
410	1	1	1	1	1	1	1
320	1	1	1	1	1	1	1
250	1	1	1	1	1	1	1

‘Nonpareil’ çeşidi için seçilen primerler ile yapılan RAPD-PZR’ lara ait jel görüntüleri değerlendirilerek oluşturulan ve oluşan bantlarla ilgili yapılan yorumlara ait değerlendirmeler Çizelge 3.26’ da verilmiştir. Çizelgeye göre değerlendirmeye alınan primerlere ait bantlar irdelendiğinde, bantların 185 bç ile 1670 bç arasında olduğu görülmektedir. Denenen primerler arasında 14 bantla en fazla bant üreten primer K-17 primeri olup, çoğaltımda kullanılan 10 primer ile toplamda 98 bant oluşmuştur. Çoğaltımda kullanılan primerler arasında 5 primer de (K-03, K-05, K-09, K-11 ve K-17) polimorfik bantların oluştuğu gözlenirken, bu primerler ile toplamda 10 adet polimorfik bant elde edilmiştir. Dolayısıyla oluşan bantların % 10.2’ si polimorfiktir. Primerler arasında en yüksek PIC değerleri (0.4898) K-03, K-09 ve K-17 primerlerinde elde edilmiştir. Ayrıca RAPD-PZR analizlerinde kullanılan primerler arasındaki polimorfik bant üreten primerlerin ortalama PIC değeri ise 0.4490 olarak hesaplanmıştır.

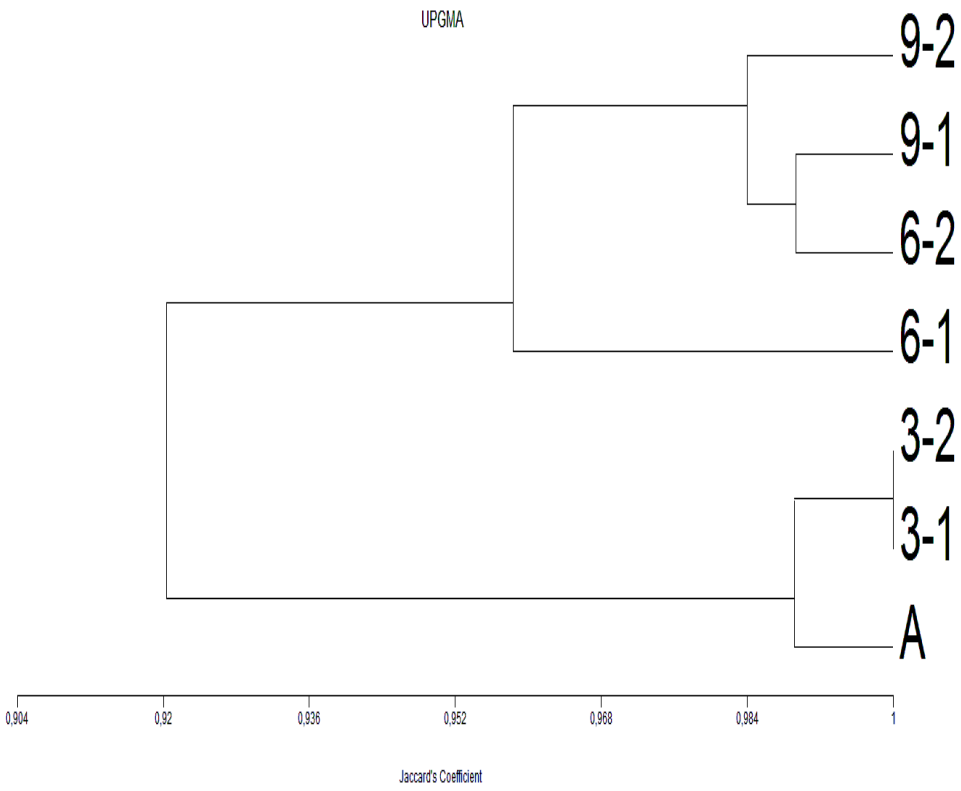
Çizelge 3.26. *P. dulcis* 'Nonpareil' çeşidinin ana bitki ve klonlarının genetik kararlılığının belirlenmesinde kullanılan RAPD primer dizileri ve bu primerlerden elde edilen değerlendirilmiş bant ve polimorfik bant sayısı, yüzdesi ve PIC değerleri.

Primer İsmi	Primer Dizisi (5´-3´)	Bant Uzunluğu (bç)	Bant Sayısı	Polimorfik Bant Sayısı	Polimorfizm Yüzdesi	PIC Değeri (Ort)
K-01	CAT TCG AGC C	380-1050	7	0	0.0	-
K-03	CCA GCT TAG G	220-850	6	1	16.6	0.4898
K-05	TCT GTC GAG G	210-1290	12	3	25.0	0.3810
K-08	GAA CAC TGG G	370-1100	8	0	0.0	-
K-09	CCC TAC CGA C	190-1670	11	1	9.1	0.4898
K-11	ATT GCC CCA G	330-1400	12	2	16.6	0.4490
K-14	CCC GCT ACA C	380-1200	8	0	0.0	-
K-15	CTC CTG CCA A	290-960	9	0	0.0	-
K-17	CCC AGC TGT G	185-1250	14	3	21.4	0.4898
K-19	CAC AGG CGG A	250-1100	11	0	0.0	
	Toplam		**98**	**10**	**10.2**	**0.4490**

‘Nonpareil’ çeşidine ait jel profillerinin yorumlanması sonucu elde edilen verilerle hazırlanan benzerlik matriksi (Çizelge 3.27) ve dendogram (Şekil 3.25) irdelendiğinde benzerlik matriksinde benzerliklerin 0.907 ile 1.000 arasında değiştiği görülmekte olup, benzerlik matriks ortalaması 0.9455 olarak hesaplanmıştır. Ana materyale en yakın klonun 3. alt kültüre ait 3-1 ve 3-2 klonları iken, ana bitkiye en uzak olan 6. alt kültüre ait olan klon 6-2 olarak görülmektedir. Ayrıca ‘Ferrastar’ çeşidinde elde edilen sonuca benzer şekilde ana bitkiden benzerlik olarak uzaklaşmalar mikroaşılama sonrası 3. alt kültürden sonra başlamış olup, 6. alt kültür sonrası (klon 6-2) en fazla kararsızlık oluşmuştur.

Çizelge 3.27. *P. dulcis* ‘Nonpareil’ çeşidine ait ana bitki ile klonları arasında RAPD-PZR analizi ile elde edilen benzerlik matriksi.

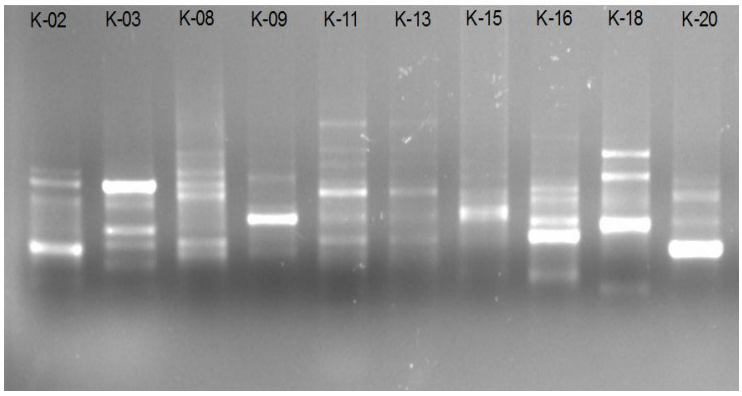
	A	**3-1**	**3-2**	**6-1**	**6-2**	**9-1**	**9-2**
A	1,000						
3-1	0,989	1,000					
3-2	0,989	1,000	1,000				
6-1	0,928	0,918	0,918	1,000			
6-2	0,918	0,907	0,907	0,969	1,000		
9-1	0,927	0,917	0,917	0,958	0,989	1,000	
9-2	0,937	0,926	0,926	0,948	0,979	0,989	1,000



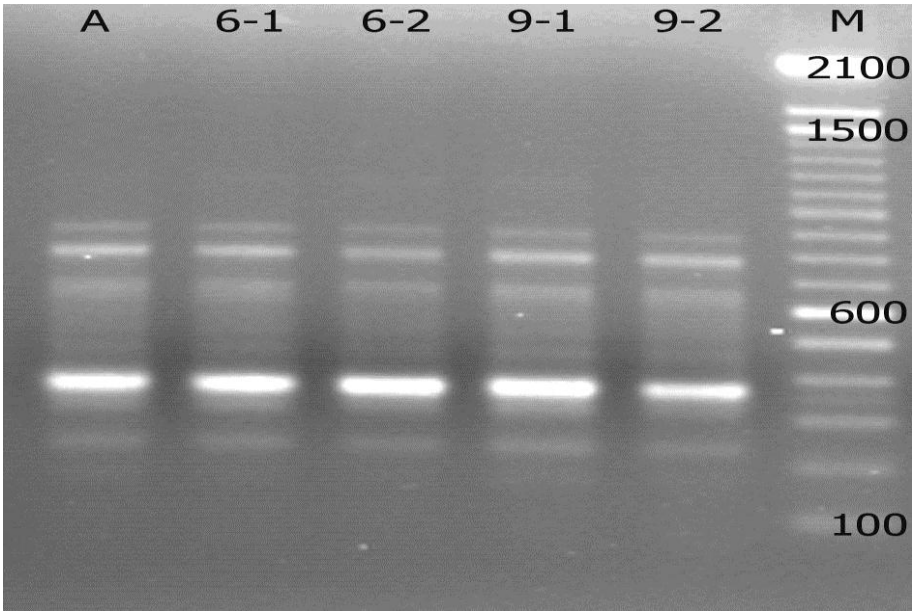
Şekil 3.25. *P. dulcis* 'Nonpareil' çeşidinin 6 klonundan, 10 RAPD primeri ile elde edilen 98 banttan UPGMA analizi ile oluşturulan dendogram. [A: Ana bitki, 3-1 ve 3-2: mikroaşılamadan sonra 3. alt kültüre ait klonlar, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar].

3.1.2. *P. dulcis* 'Teksas' Çeşidi İçin RAPD-PZR Analizlerinin Değerlendirilmesi

RAPD-PZR analizleri için denemeye alınmış olan 20 primer (K-01-K-20) arasından 'Teksas' çeşidi için K-01, K-04, K-05, K-06, K-07, K-10, K-12, K-14, K-17 ve K-19 primerleri ana bitki gDNA' sının çoğaltımı çalışmalarında az bant üretkenliği veya bant üretkenliğinin görülmemesi nedeniyle diğer klonlar için değerlendirmeye alınmamıştır. K-02, K-03, K-08, K-09, K-11, K-13, K-15, K-16, K-18, K-20 primerleri ise ana bitkide vermiş oldukları yeterli bant üretkenliğinden dolayı değerlendirmeye alınarak (Şekil 3.26), klonlara ait gDNA' ların çoğaltımı yapılmış ve çoğaltım ürünleri ana bitki ve klonlara ait belirteçlerle jele yüklenerek jel görüntüleri sırasıyla Şekil 3.27, Şekil 3.28, Şekil 3.29, Şekil 3.30, Şekil 3.31, Şekil 3.32, Şekil 3.33, Şekil 3.34, Şekil 3.35, Şekil 3.36' da verilmiştir. Her RAPD primer jel görüntüsü için yapılan bant yorumları var olan bant için 1; olmayan bant için 0 değeri verilerek yorumlanmış ve bu yorumlar sırasıyla Çizelge 3.28, Çizelge 3.29, Çizelge 3.30, Çizelge 3.31, Çizelge 3.32, Çizelge 3.33, Çizelge 3.34, Çizelge 3.35, Çizelge 3.36, Çizelge 3.37' de sunulmuştur. Değerlendirme sonucunda 'Teksas' çeşidi için ana bitki ve klonlara ait gDNA' ların çoğaltılması sonrası her RAPD primeri için oluşan bant sayısı, polimorfik bant sayısı, polimorfizm yüzdesi ve PIC değeri ise Çizelge 3.38' de verilmiştir.



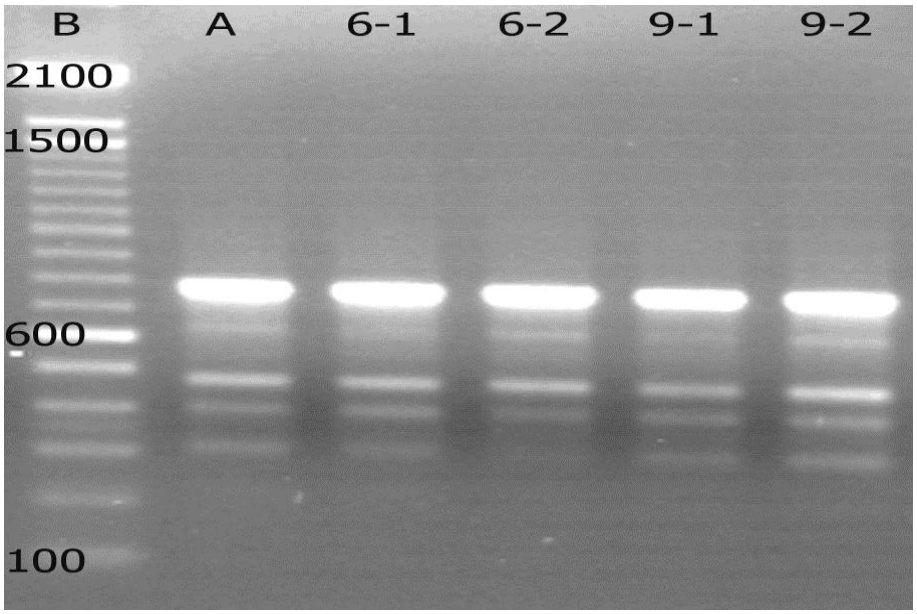
Şekil 3.26. 'Teksas' ana materyaline ait gDNA' nın seçilen RAPD primerleri ile yapılan PZR reaksiyonu ile elde edilen bant profili.



Şekil 3.27. 'Teksas' çeşidine ait, K-02 primeri ile elde edilen RAPD-PZR jel görüntüsü. B: 100 bç + 1 kb Ladder DNA A: Ana bitki, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar.

Çizelge 3.28. 'Teksas' çeşidine ait, K-02 primeri ile elde edilen RAPD-PZR bant sonuçları.

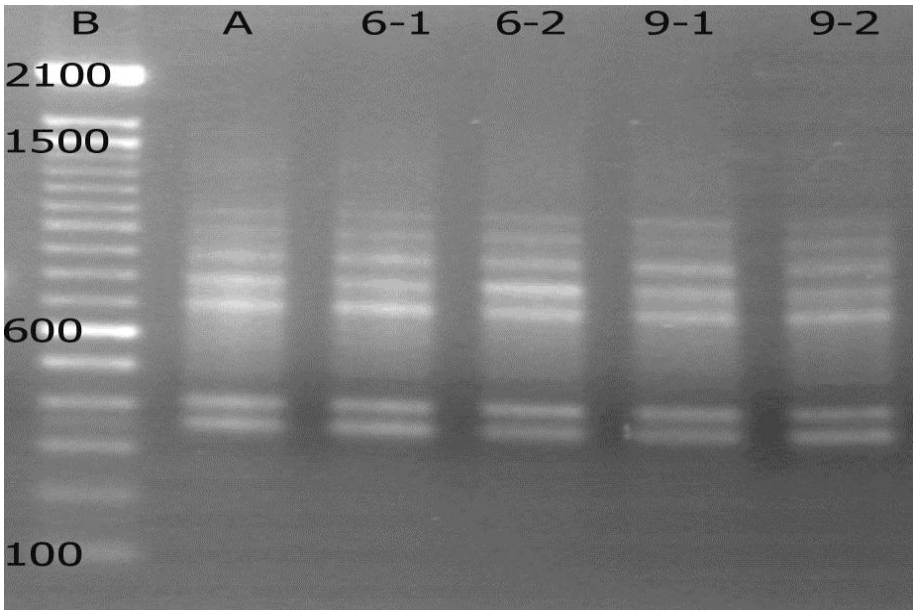
K-02 Primeri					
Bant (bç)		**Klonlar**			
	Ana	**6-1**	**6-2**	**9-1**	**9-2**
880	1	1	1	1	1
790	1	1	1	1	1
650	1	1	1	1	1
500	1	1	1	1	1
450	1	1	1	1	1
360	1	1	1	1	1
310	1	1	1	1	1
225	1	1	1	1	1
195	1	1	1	1	1



Şekil 3.28. 'Teksas' çeşidine ait, K-03 primeri ile elde edilen RAPD-PZR jel görüntüsü. B: 100 bç + 1 kb Ladder DNA A: Ana bitki, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar.

Çizelge 3.29. 'Teksas' çeşidine ait, K-03 primeri ile elde edilen RAPD-PZR bant sonuçları.

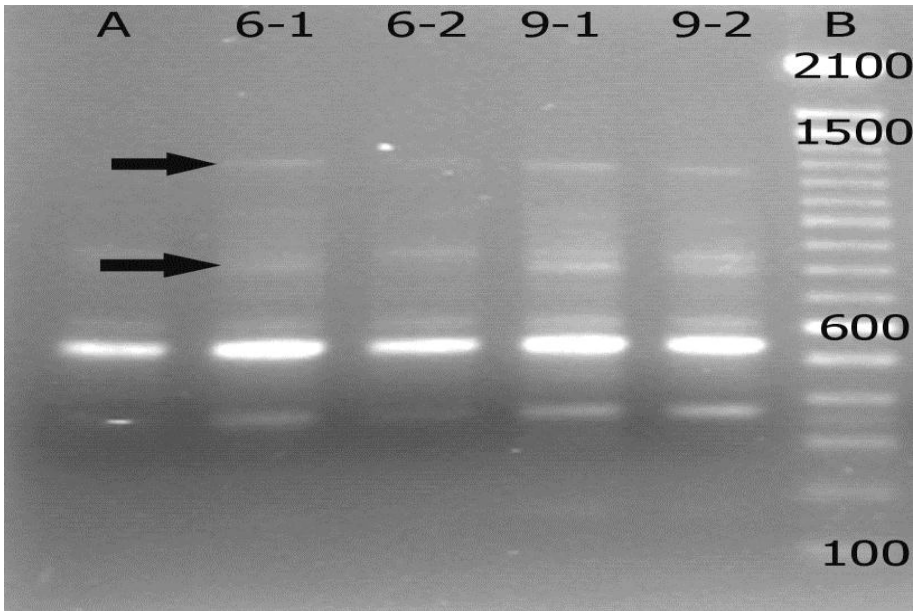
K-03 Primeri					
Bant (bç)		**Klonlar**			
	Ana	**6-1**	**6-2**	**9-1**	**9-2**
780	1	1	1	1	1
650	1	1	1	1	1
550	1	1	1	1	1
490	1	1	1	1	1
400	1	1	1	1	1
310	1	1	1	1	1
240	1	1	1	1	1



Şekil 3.29. ‘Teksas’ çeşidine ait, K-08 primeri ile elde edilen RAPD-PZR jel görüntüsü. B: 100 bç + 1 kb Ladder DNA A: Ana bitki, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar.

Çizelge 3.30. ‘Teksas’ çeşidine ait, K-08 primeri ile elde edilen RAPD-PZR bant sonuçları.

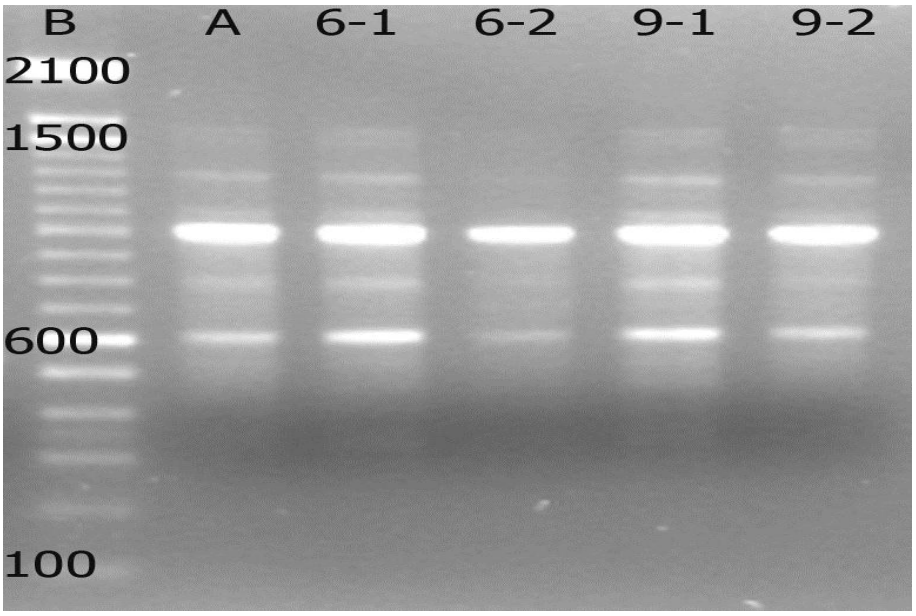
K-08 Primeri					
Bant (bç)		**Klonlar**			
	Ana	**6-1**	**6-2**	**9-1**	**9-2**
1100	1	1	1	1	1
1000	1	1	1	1	1
890	1	1	1	1	1
800	1	1	1	1	1
700	1	1	1	1	1
590	1	1	1	1	1
490	1	1	1	1	1
420	1	1	1	1	1
350	1	1	1	1	1



Şekil 3.30. ‘Teksas’ çeşidine ait, K-09 primeri ile elde edilen RAPD-PZR jel görüntüsü. B: 100 bç + 1 kb Ladder DNA A: Ana bitki, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar. Şekilde gösterilen oklar polimorfik olan bantları göstermektedir.

Çizelge 3.31. ‘Teksas’ çeşidine ait, K-09 primeri ile elde edilen RAPD-PZR bant sonuçları.

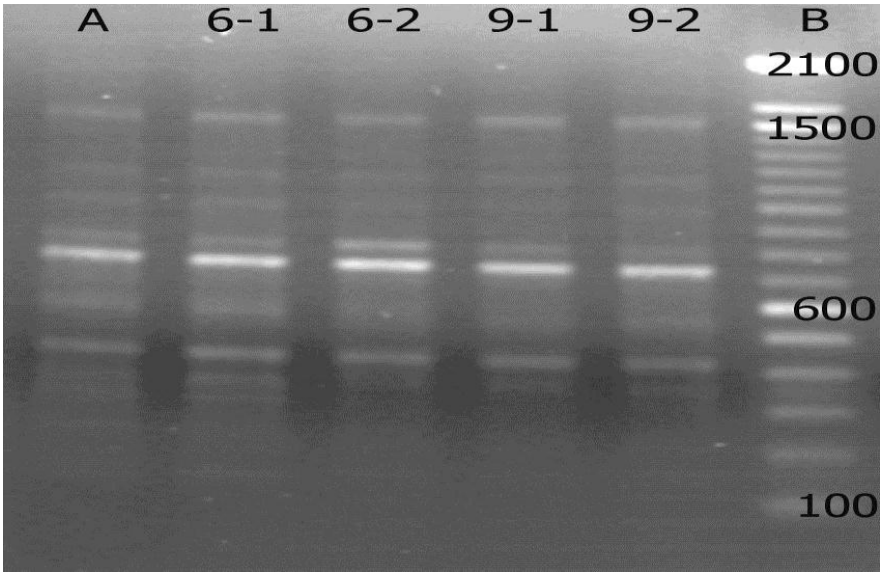
K-09 Primeri					
Bant (bç)		**Klonlar**			
	Ana	**6-1**	**6-2**	**9-1**	**9-2**
1250	0	1	1	1	1
1000	1	1	1	1	1
830	1	1	1	1	1
800	0	1	1	1	1
600	1	1	1	1	1
550	1	1	1	1	1
380	1	1	1	1	1



Şekil 3.31. 'Teksas' çeşidine ait, K-11 primeri ile elde edilen RAPD-PZR jel görüntüsü. B: 100 bç + 1 kb Ladder DNA A: Ana bitki, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar.

Çizelge 3.32. 'Teksas' çeşidine ait, K-11 primeri ile elde edilen RAPD-PZR bant sonuçları.

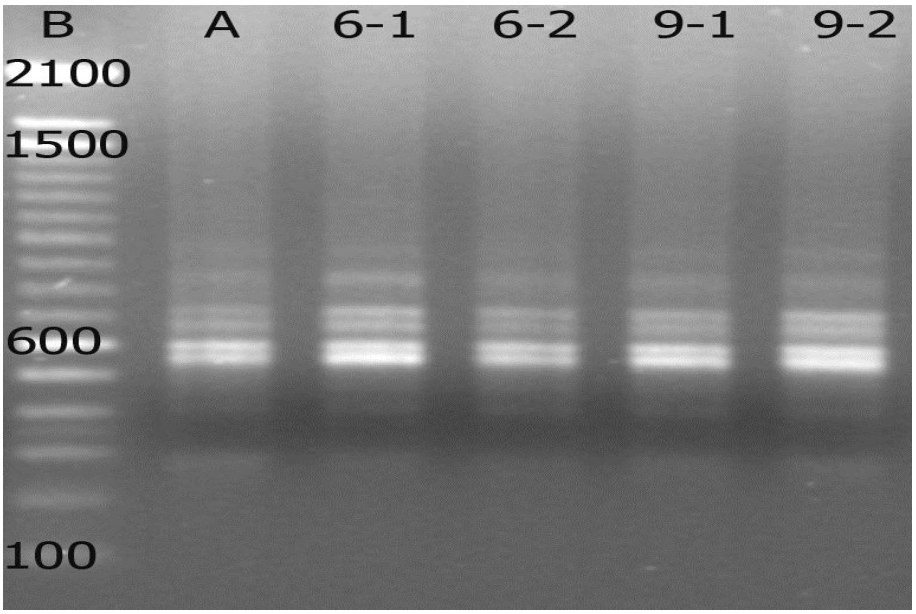
K-11 Primeri					
Bant (bç)		**Klonlar**			
	Ana	**6-1**	**6-2**	**9-1**	**9-2**
1550	1	1	1	1	1
1500	1	1	1	1	1
1300	1	1	1	1	1
1250	1	1	1	1	1
1100	1	1	1	1	1
1000	1	1	1	1	1
900	1	1	1	1	1
800	1	1	1	1	1
600	1	1	1	1	1
470	1	1	1	1	1



Şekil 3.32. 'Teksas' çeşidine ait, K-13 primeri ile elde edilen RAPD-PZR jel görüntüsü. B: 100 bç + 1 kb Ladder DNA A: Ana bitki, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar.

Çizelge 3.33. 'Teksas' çeşidine ait, K-13 primeri ile elde edilen RAPD-PZR bant sonuçları.

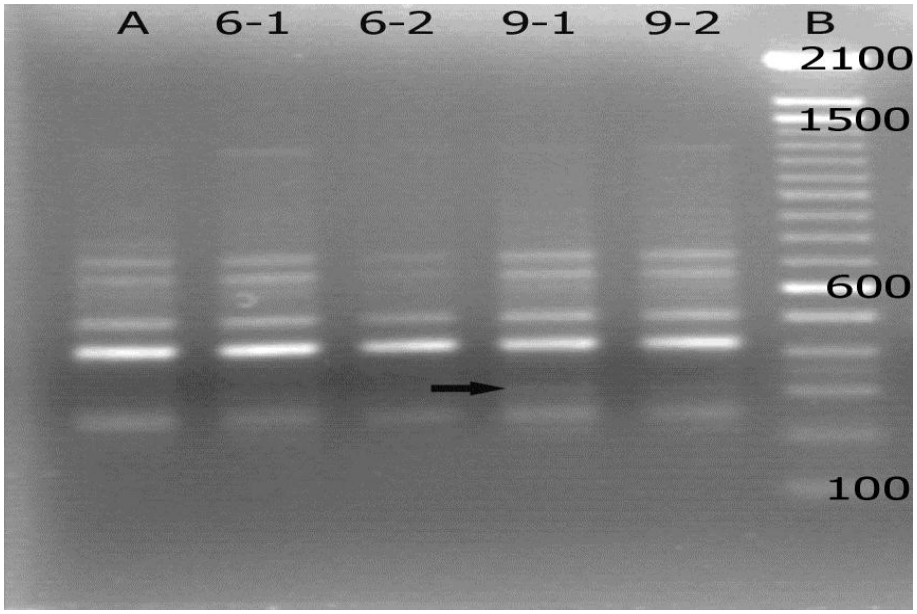
K-13 Primeri					
Bant (bç)		**Klonlar**			
	Ana	**6-1**	**6-2**	**9-1**	**9-2**
1560	1	1	1	1	1
1250	1	1	1	1	1
1150	1	1	1	1	1
990	1	1	1	1	1
790	1	1	1	1	1
750	1	1	1	1	1
550	1	1	1	1	1
420	1	1	1	1	1
350	1	1	1	1	1
300	1	1	1	1	1
290	1	1	1	1	1
220	1	1	1	1	1
140	1	1	1	1	1



Şekil 3.33. 'Teksas' çeşidine ait, K-15 primeri ile elde edilen RAPD-PZR jel görüntüsü. B: 100 bç + 1 kb Ladder DNA A: Ana bitki, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar.

Çizelge 3.34. 'Teksas' çeşidine ait, K-15 primeri ile elde edilen RAPD-PZR bant sonuçları.

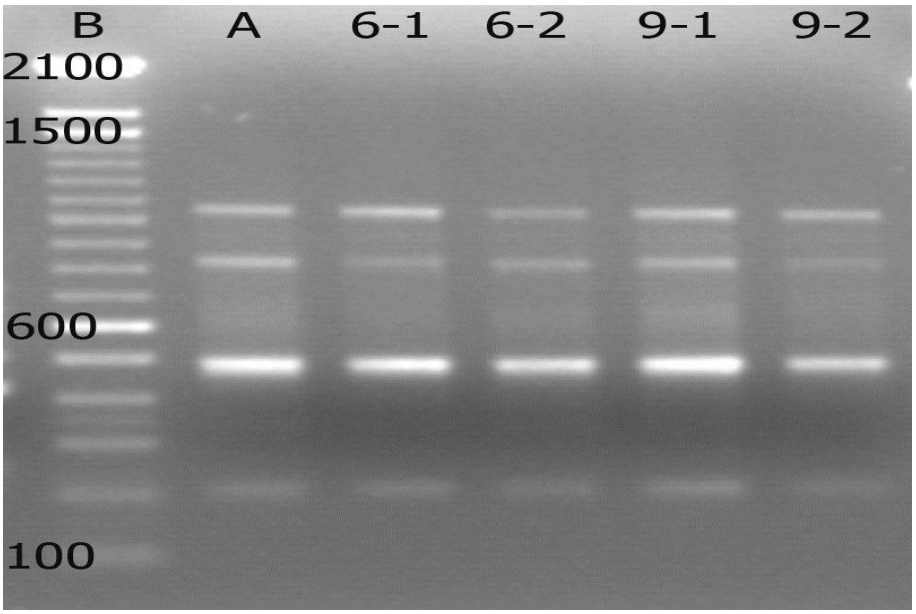
K-15 Primeri					
Bant (bç)		**Klonlar**			
	Ana	**6-1**	**6-2**	**9-1**	**9-2**
980	1	1	1	1	1
850	1	1	1	1	1
720	1	1	1	1	1
680	1	1	1	1	1
590	1	1	1	1	1
550	1	1	1	1	1
410	1	1	1	1	1
280	1	1	1	1	1



Şekil 3.34. 'Teksas' çeşidine ait, K-16 primeri ile elde edilen RAPD-PZR jel görüntüsü. B: 100 bç + 1 kb Ladder DNA A: Ana bitki, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar. Şekilde gösterilen ok polimorfik olan bantı göstermektedir.

Çizelge 3.35. 'Teksas' çeşidine ait, K-16 primeri ile elde edilen RAPD-PZR bant sonuçları.

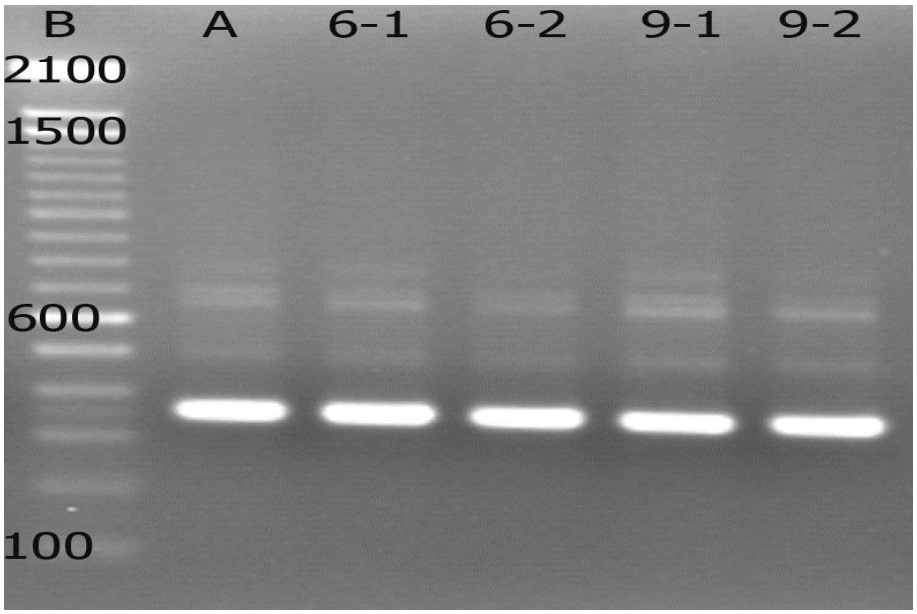
K-16 Primeri					
Bant (bç)		**Klonlar**			
	Ana	**6-1**	**6-2**	**9-1**	**9-2**
1250	1	1	1	1	1
750	1	1	1	1	1
650	1	1	1	1	1
600	1	1	1	1	1
510	1	1	1	1	1
420	1	1	1	1	1
290	0	1	0	1	1
250	1	1	1	1	1



Şekil 3.35. ‘Teksas’ çeşidine ait, K-18 primeri ile elde edilen RAPD-PZR jel görüntüsü. B: 100 bç + 1 kb Ladder DNA A: Ana bitki, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar.

Çizelge 3.36. ‘Teksas’ çeşidine ait, K-18 primeri ile elde edilen RAPD-PZR bant sonuçları.

K-18 Primeri					
Bant (bç)		**Klonlar**			
	Ana	**6-1**	**6-2**	**9-1**	**9-2**
1050	1	1	1	1	1
950	1	1	1	1	1
650	1	1	1	1	1
600	1	1	1	1	1
480	1	1	1	1	1
210	1	1	1	1	1



Şekil 3.36. 'Teksas' çeşidine ait, K-20 primeri ile elde edilen RAPD-PZR jel görüntüsü. B: 100 bç + 1 kb Ladder DNA A: Ana bitki, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar.

Çizelge 3.37. 'Teksas' çeşidine ait, K-20 primeri ile elde edilen RAPD-PZR bant sonuçları.

K-20 Primeri					
Bant (bç)		**Klonlar**			
	Ana	**6-1**	**6-2**	**9-1**	**9-2**
760	1	1	1	1	1
700	1	1	1	1	1
650	1	1	1	1	1
500	1	1	1	1	1
360	1	1	1	1	1

‘Teksas’ çeşidi için seçilen primerler ile yapılan RAPD-PZR’ lara ait jel görüntüleri değerlendirilerek oluşturulan ve oluşan bantlarla ilgili yapılan yorumlara ait değerlendirmeler Çizelge 3.38’ de verilmiştir. Çizelgeye göre değerlendirmeye alınan primerlere ait bantlar irdelendiğinde, bantların 140 bç ile 1560 bç arasında olduğu görülmektedir. Denenen primerler arasında 12 bantla en fazla bant üreten primer K-13 primeri olup, çoğaltımda kullanılan 10 primer ile toplamda 81 bant oluşmuştur. Çoğaltımda kullanılan primerler arasında 2 primerde (K-09 ve K-16) polimorfik bantların oluştuğu gözlenirken, toplamda 3 adet polimorfik bant elde edilmiştir. Buna göre oluşan bantların % 3.7’ si polimorfiktir. Primerler arasında en yüksek PIC değeri (0.4800) K-16 primerinde hesaplanmıştır. Ayrıca RAPD-PZR analizlerinde kullanılan primerler arasındaki polimorfik bant üreten primerlerin ortalama PIC değeri 0.3733 olarak hesaplanmıştır.

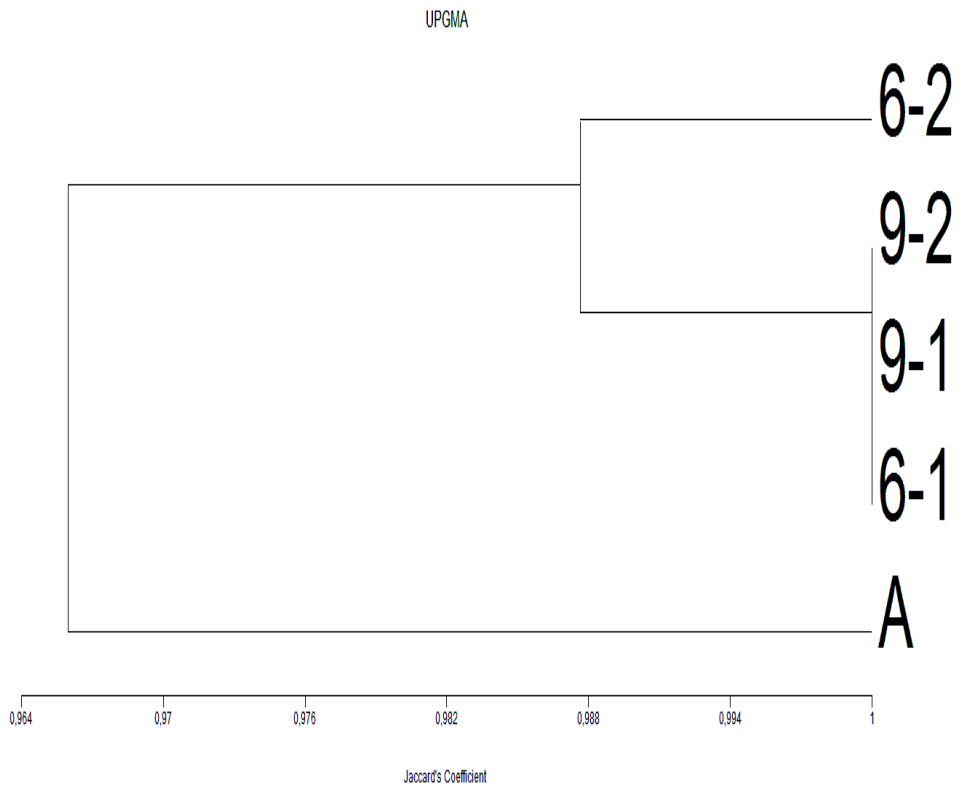
Çizelge 3.38. *P. dulcis* 'Teksas' çeşidinin ana bitki ve klonlarının genetik kararlılığının belirlenmesinde kullanılan RAPD primer dizileri ve bu primerlerden elde edilen değerlendirilmiş bant ve polimorfik bant sayısı, yüzdesi ve PIC değerleri.

Primer İsmi	Primer Dizisi (5´-3´)	Bant Uzunluğu (bç)	Bant Sayısı	Polimorfik Bant Sayısı	Polimorfizm Yüzdesi	PIC Değeri (Ort)
K-02	GTC TTC GCA A	195-880	9	0	0.0	-
K-03	CCA GCT TAG G	240-780	7	0	0.0	-
K-08	GAA CAC TGG G	350-1100	9	0	0.0	-
K-09	CCC TAC CGA C	380-1250	7	2	28.6	0.3200
K-11	ATT GCC CCA G	470-1550	10	0	0.0	-
K-13	GGT TGT ACC C	140-1560	12	0	0.0	-
K-15	CTC CTG CCA A	280-980	8	0	0.0	-
K-16	GAG CGT CGA A	250-1250	8	1	12.5	0.4800
K-18	CCT AGT CGA G	210-1050	6	0	0.0	-
K-20	GTG TCG CGA G	360-760	5	0	0.0	-
	Toplam		**81**	**3**	**3.7**	**0.3733**

‘Teksas’ çeşidine ait jel profillerinin yorumlanması sonucu elde edilen verilerle hazırlanan benzerlik matriksi (Çizelge 3.39) ve dendogram (Şekil 3.37) irdelendiğinde, benzerlik matriksinde benzerliklerin ana bitki ve klonlar arasında 0.963 ile 1.000 olarak değiştiği görülmekte olup, benzerlik matriks ortalaması 0.9828 olarak hesaplanmıştır. ‘Ferrastar’ ve ‘Nonpareil’ çeşitlerine ait ana bitki ve klonlar arasında genetik karasızlıkların benzerliğe 3. altkültür sonrası olması nedeniyle, ‘Teksas’ çeşidi için 6. alt kültür ve 9. alt kültür sonrası oluşan klonlarla ana bitki arası genetik benzerlik irdelenmiştir. ‘Teksas” çeşidinde elde edilen benzerlik matriksi ve dendograma göre ana materyale en yakın klonun 6. alt kültür sonrası elde edilen 6-2 klonu olduğu, ana bitkiye en uzak olan klonun ise yine 6. alt kültüre ait olan diğer klon 6-1 ve 9. alt kültüre ait klonlar olan 9-1 ve 9-2‘dir. Bunun yanında 6. alt kültüre ait 6-1 klonu ve 9. alt kültüre ait 9-1 ve 9-2 klonu genetik olarak birbirleri arasında benzerlik göstermektedir.

Çizelge 3.39. *P. dulcis* ‘Teksas’ çeşidine ait ana bitki ile klonları arasında RAPD-PZR analizi ile elde edilen benzerlik matriksi.

	A	**6-1**	**6-2**	**9-1**	**9-2**
A	1,000				
6-1	0,963	1,000			
6-2	0,975	0,988	1,000		
9-1	0,963	1,000	0,988	1,000	
9-2	0,963	1,000	0,988	1,000	1,000

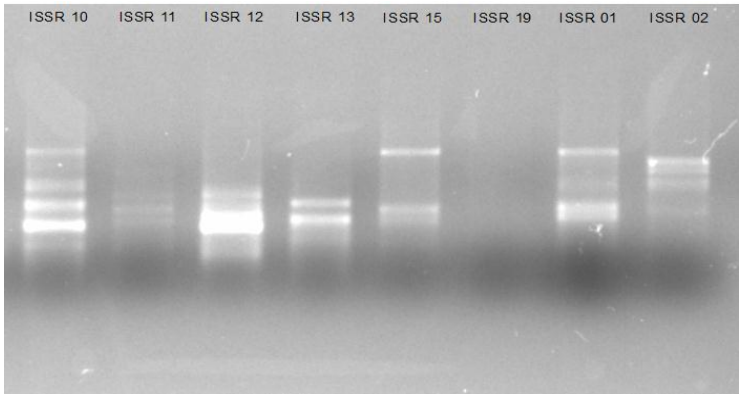


Şekil 3.37. *P. dulcis* 'Teksas' çeşidinin 6 klonundan, 10 RAPD primeri ile elde edilen 81 banttan UPGMA analizi ile oluşturulan dendogram. [A: Ana bitki, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar].

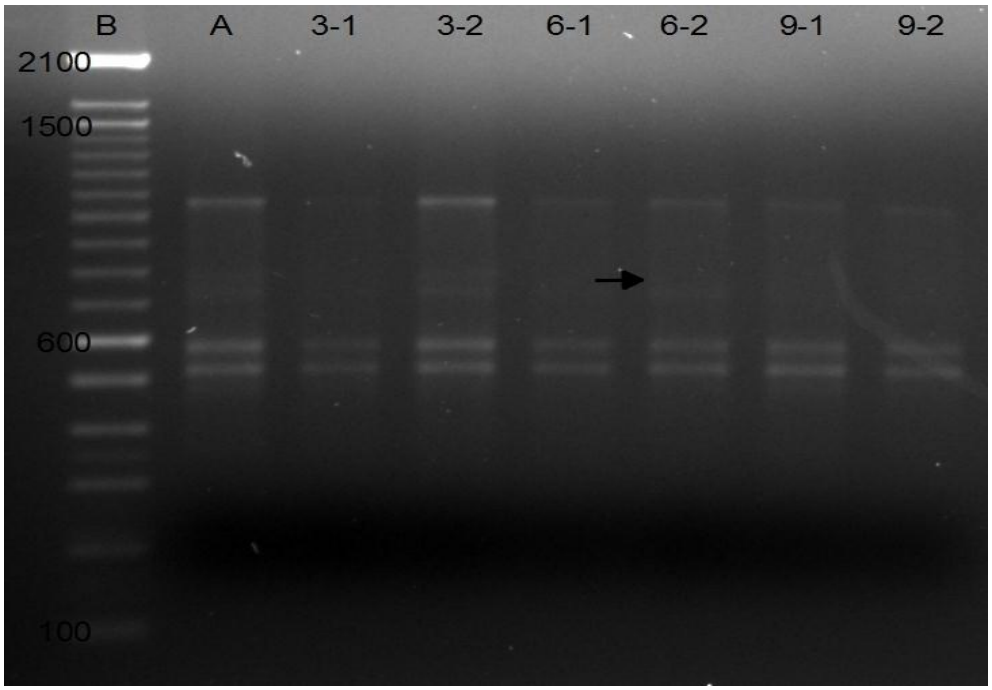
3.2. ISSR-PZR Analizlerinin Değerlendirilmesi

3.2.1. *P. dulcis* 'Ferrastar' Çeşidi İçin ISSR-PZR Analizleri nin Değerlendirilmesi

ISSR-PZR analizleri için denemeye alınan 16 primer (ISSR01-ISSR06 ve ISSR10-ISSR19) arasından 'Ferrastar' çeşidi için ISSR03, ISSR04, ISSR05, ISSR06, ISSR14, ISSR16, ISSR17 ve ISSR18 primerleri, ana bitki gDNA' sının çoğaltımı çalışmalarında az bant üretkenliği veya bant üretkenliğinin görülmemesi nedeniyle diğer klonlar için değerlendirmeye alınmamıştır. ISSR01, ISSR02, ISSR10, ISSR11, ISSR12, ISSR13, ISSR15 ve ISSR19 primerleri ana bitkide vermiş oldukları yeterli bant üretkenliğinden dolayı değerlendirmeye alınarak (Şekil 38), klonlara ait gDNA' ların çoğaltımı yapılmış ve çoğaltım ürünleri ana bitki ve klonlara ait belirteçler ile jele yüklenerek, jel görüntüleri sırasıyla Şekil 3.39, Şekil 3.40, Şekil 3.41, Şekil 42, Şekil 3.43, Şekil 3.44, Şekil 3.45, Şekil 3.46' da verilmiştir. Her ISSR primer jel görüntüsü için yapılan bant yorumları var olan bant için 1; olmayan bant için 0 değeri verilerek değerlendirilmiş ve bu değerlendirmeler sırasıyla Çizelge 3.40, Çizelge 3.41, Çizelge 3.42, Çizelge 3.43, Çizelge 3.44, Çizelge 3.45, Çizelge 3.46, Çizelge 3.47' de sunulmuştur. Değerlendirme sonucunda 'Ferrastar' çeşidi için ana bitki ve klonlara ait gDNA' ların çoğaltılması sonrası her ISSR primeri için oluşan bant sayısı, polimorfik bant sayısı, polimorfizm yüzdesi ve PIC değeri ise Çizelge 3.48' de verilmiştir.



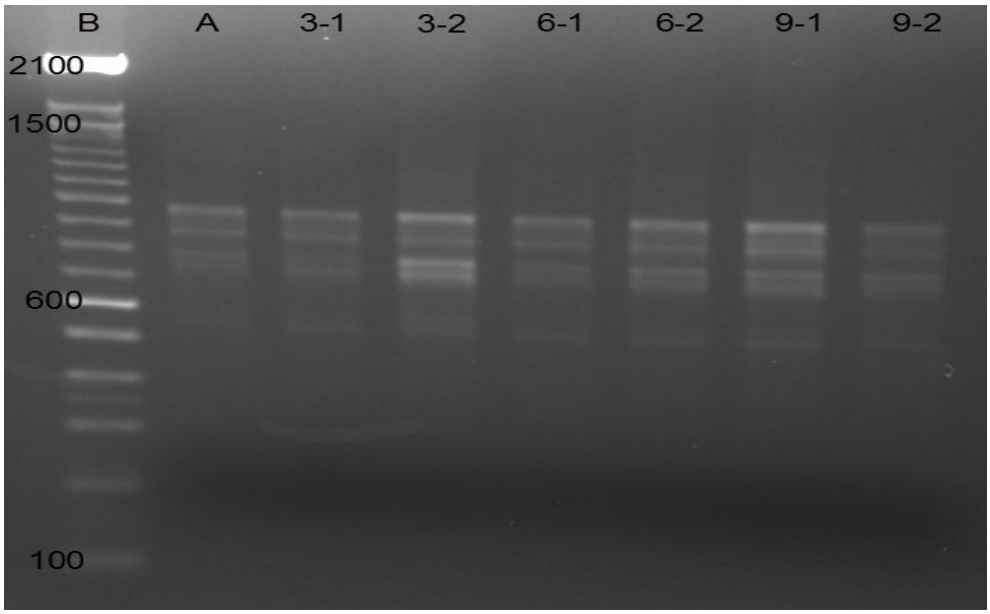
Şekil 3.38. 'Ferrastar' ana materyaline ait gDNA' nın seçilen ISSR primerleri ile yapılan PZR reaksiyonu ile elde edilen bant profili.



Şekil 3.39. 'Ferrastar' çeşidine ait, ISSR01 primeri ile elde edilen ISSR-PZR jel görüntüsü. B: 100 bç + 1 kb Ladder DNA A: Ana bitki, 3-1 ve 3-2: mikroaşılamadan sonra 3. alt kültüre ait klonlar, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar. Şekilde gösterilen ok polimorfik olan bantı göstermektedir.

Çizelge 3.40. 'Ferrastar' çeşidine ait, ISSR01 primeri ile elde edilen ISSR-PZR bant sonuçları.

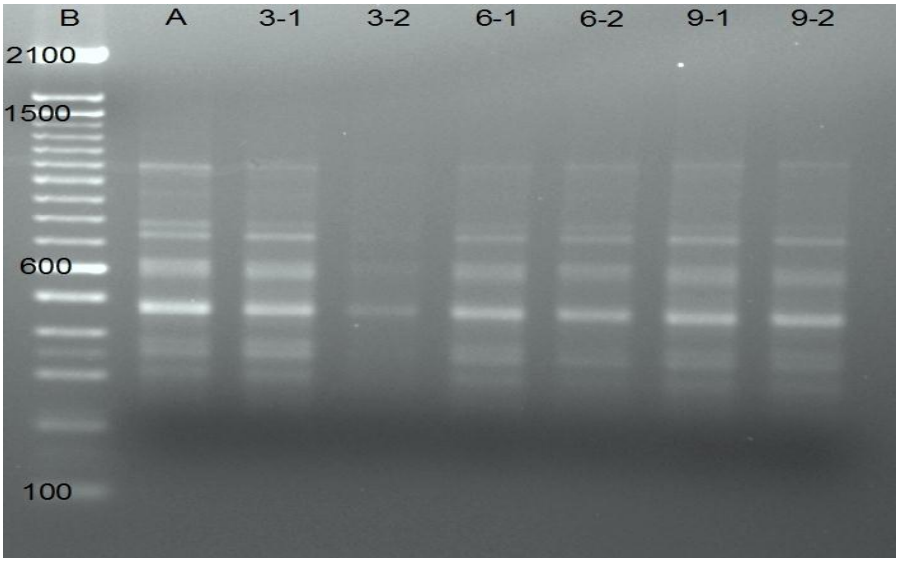
ISSR01 Primeri							
Bant (bç)		**Klonlar**					
	Ana	**3-1**	**3-2**	**6-1**	**6-2**	**9-1**	**9-2**
1060	1	1	1	1	1	1	1
800	1	1	1	1	1	0	0
700	1	1	1	1	1	1	1
580	1	1	1	1	1	1	1
520	1	1	1	1	1	1	1



Şekil 3.40. 'Ferrastar' çeşidine ait, ISSR02 primeri ile elde edilen ISSR-PZR jel görüntüsü. B: 100 bç + 1 kb Ladder DNA A: Ana bitki, 3-1 ve 3-2: mikroaşılamadan sonra 3. alt kültüre ait klonlar, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar.

Çizelge 3.41. 'Ferrastar' çeşidine ait, ISSR02 primeri ile elde edilen ISSR-PZR bant sonuçları.

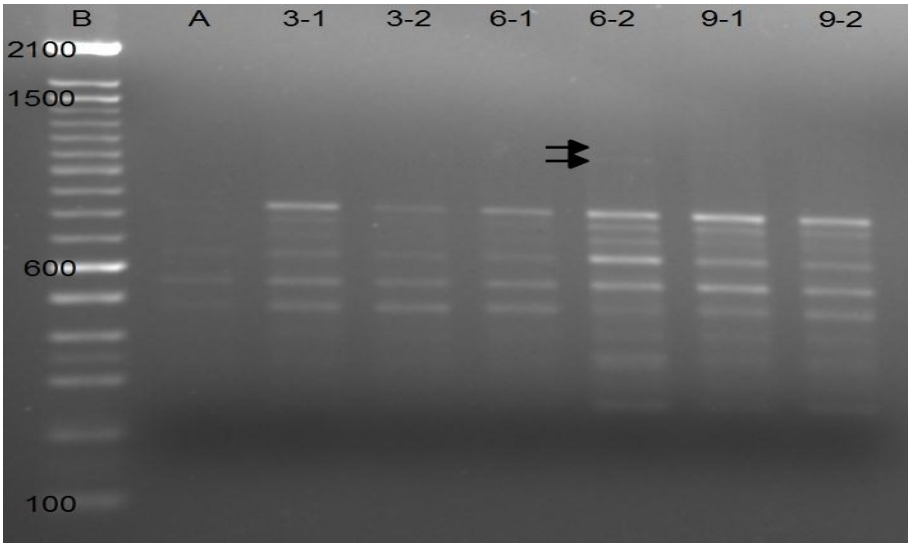
ISSR02 Primeri							
Bant (bç)		**Klonlar**					
	Ana	**3-1**	**3-2**	**6-1**	**6-2**	**9-1**	**9-2**
980	1	1	1	1	1	1	1
920	1	1	1	1	1	1	1
850	1	1	1	1	1	1	1
780	1	1	1	1	1	1	1
750	1	1	1	1	1	1	1
550	1	1	1	1	1	1	1
520	1	1	1	1	1	1	1



Şekil 3.41. 'Ferrastar' çeşidine ait, ISSR10 primeri ile elde edilen ISSR-PZR jel görüntüsü. B: 100 bç + 1 kb Ladder DNA A: Ana bitki, 3-1 ve 3-2: mikroaşılamadan sonra 3. alt kültüre ait klonlar, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar.

Çizelge 3.42. 'Ferrastar' çeşidine ait, ISSR10 primeri ile elde edilen ISSR-PZR bant sonuçları.

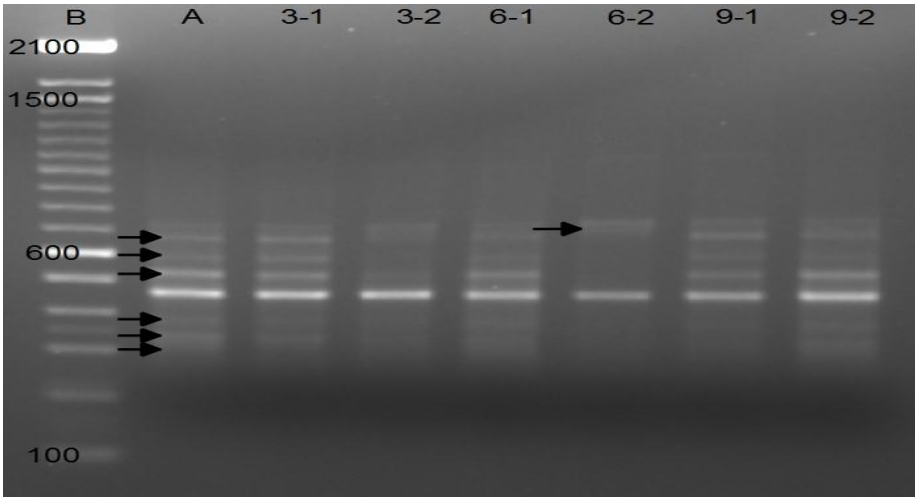
ISSR10 Primeri							
Bant (bç)		**Klonlar**					
	Ana	**3-1**	**3-2**	**6-1**	**6-2**	**9-1**	**9-2**
1100	1	1	1	1	1	1	1
1080	1	1	1	1	1	1	1
910	1	1	1	1	1	1	1
800	1	1	1	1	1	1	1
750	1	1	1	1	1	1	1
650	1	1	1	1	1	1	1
620	1	1	1	1	1	1	1
600	1	1	1	1	1	1	1
480	1	1	1	1	1	1	1
370	1	1	1	1	1	1	1
350	1	1	1	1	1	1	1
320	1	1	1	1	1	1	1



Şekil 3.42. 'Ferrastar' çeşidine ait, ISSR11 primeri ile elde edilen ISSR-PZR jel görüntüsü. B: 100 bç + 1 kb Ladder DNA A: Ana bitki, 3-1 ve 3-2: mikroaşılamadan sonra 3. alt kültüre ait klonlar, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar. Şekilde gösterilen oklar polimorfik olan bantları göstermektedir.

Çizelge 3.43. 'Ferrastar' çeşidine ait, ISSR11 primeri ile elde edilen ISSR-PZR bant sonuçları.

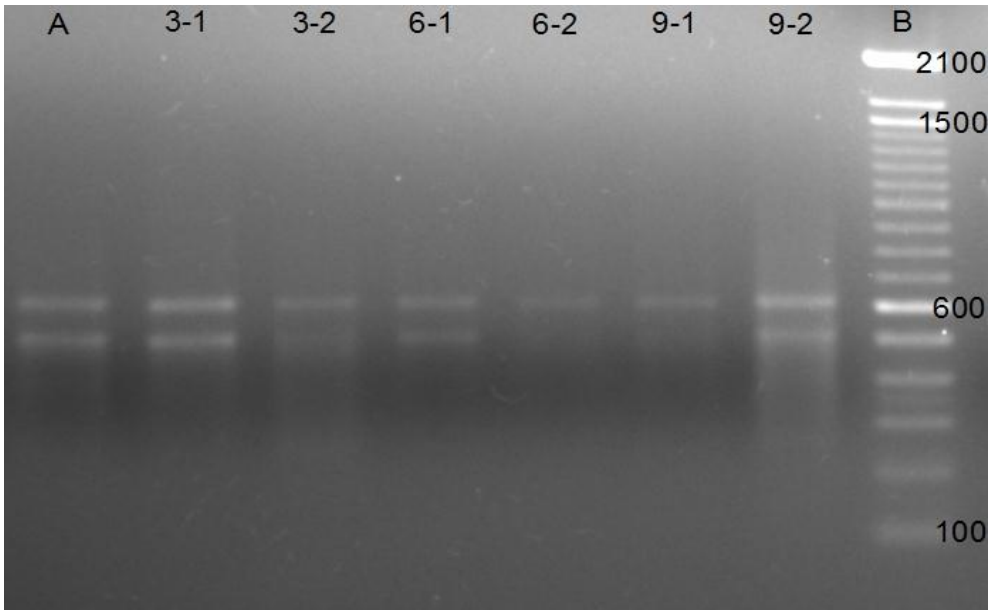
ISSR11 Primeri							
Bant (bç)		**Klonlar**					
	Ana	**3-1**	**3-2**	**6-1**	**6-2**	**9-1**	**9-2**
1150	0	0	0	0	1	1	1
1080	0	0	0	0	1	1	1
850	1	1	1	1	1	1	1
800	1	1	1	1	1	1	1
700	1	1	1	1	1	1	1
650	1	1	1	1	1	1	1
550	1	1	1	1	1	1	1
480	1	1	1	1	1	1	1
400	1	1	1	1	1	1	1
344	1	1	1	1	1	1	1
320	1	1	1	1	1	1	1
300	1	1	1	1	1	1	1
250	1	1	1	1	1	1	1



Şekil 3.43. 'Ferrastar' çeşidine ait, ISSR12 primeri ile elde edilen ISSR-PZR jel görüntüsü. B: 100 bç + 1 kb Ladder DNA A: Ana bitki, 3-1 ve 3-2: mikroaşılamadan sonra 3. alt kültüre ait klonlar, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar. Şekilde gösterilen oklar polimorfik olan bantları göstermektedir.

Çizelge 3.44. 'Ferrastar' çeşidine ait, ISSR12 primeri ile elde edilen ISSR-PZR bant sonuçları.

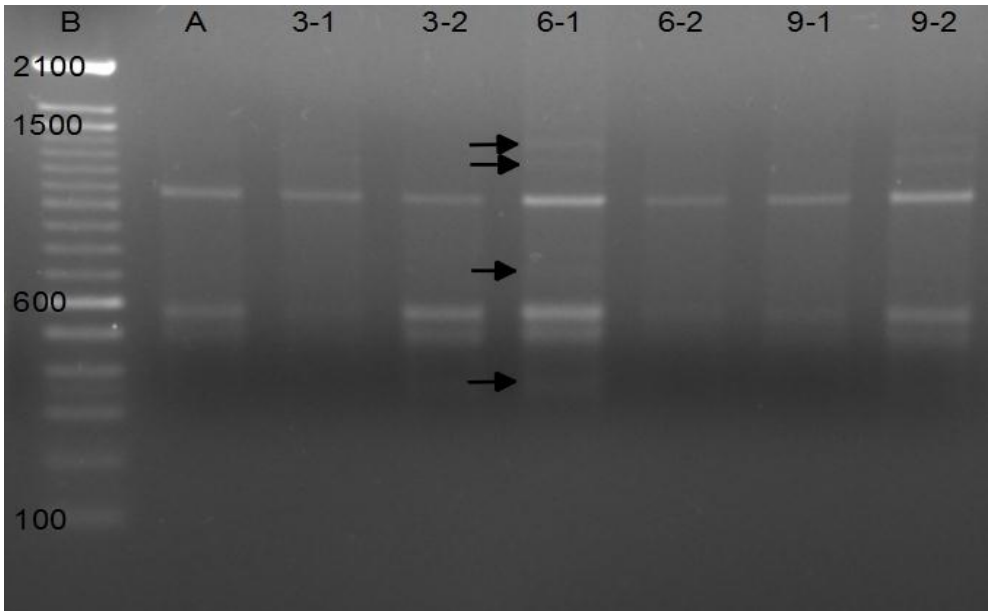
ISSR12 Primeri							
Bant (bç)		**Klonlar**					
	Ana	**3-1**	**3-2**	**6-1**	**6-2**	**9-1**	**9-2**
1100	1	1	1	1	1	1	1
980	1	1	1	1	1	1	1
880	1	1	1	1	1	1	1
720	1	1	1	1	1	1	1
700	0	0	0	0	1	0	0
650	1	1	1	1	0	1	1
610	1	1	1	1	0	1	1
590	1	1	1	1	0	1	1
530	1	1	1	1	0	1	1
450	1	1	1	1	1	1	1
370	1	1	1	1	1	1	1
320	1	1	1	1	1	1	1
310	1	1	1	1	0	1	1
300	1	1	1	1	0	1	1



Şekil 3.44. 'Ferrastar' çeşidine ait, ISSR13 primeri ile elde edilen ISSR-PZR jel görüntüsü. B: 100 bç + 1 kb Ladder DNA A: Ana bitki, 3-1 ve 3-2: mikroaşılamadan sonra 3. alt kültüre ait klonlar, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar.

Çizelge 3.45. 'Ferrastar' çeşidine ait, ISSR13 primeri ile elde edilen ISSR-PZR bant sonuçları.

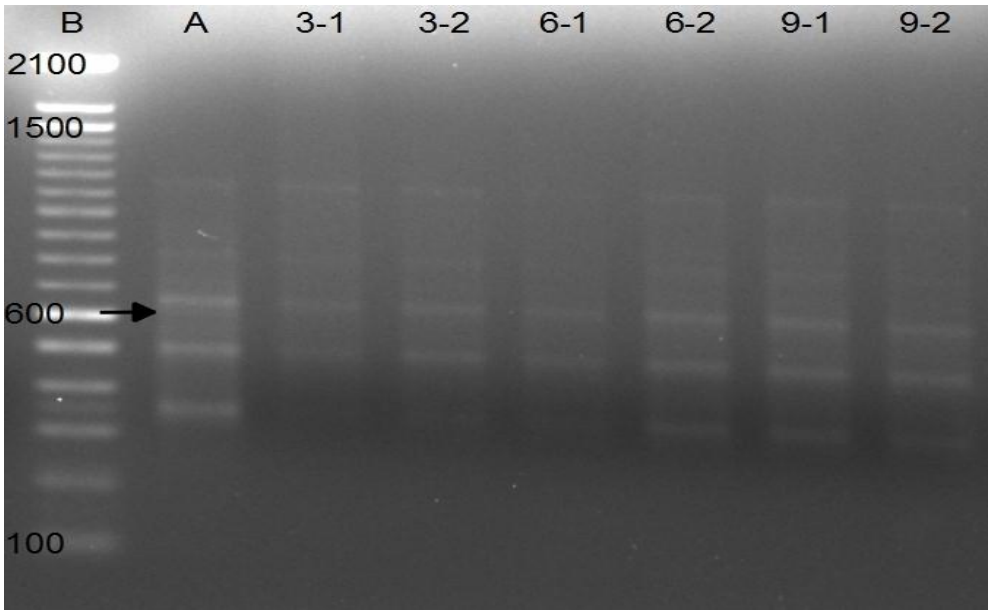
ISSR13 Primeri							
Bant (bç)		**Klonlar**					
	Ana	**3-1**	**3-2**	**6-1**	**6-2**	**9-1**	**9-2**
620	1	1	1	1	1	1	1
520	1	1	1	1	1	1	1



Şekil 3.45. 'Ferrastar' çeşidine ait, ISSR15 primeri ile elde edilen ISSR-PZR jel görüntüsü. B: 100 bç + 1 kb Ladder DNA A: Ana bitki, 3-1 ve 3-2: mikroaşılamadan sonra 3. alt kültüre ait klonlar, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar. Şekilde gösterilen oklar polimorfik olan bantları göstermektedir.

Çizelge 3.46. 'Ferrastar' çeşidine ait, ISSR15 primeri ile elde edilen ISSR-PZR bant sonuçları.

ISSR15 Primeri							
Bant (bç)		**Klonlar**					
	Ana	**3-1**	**3-2**	**6-1**	**6-2**	**9-1**	**9-2**
1450	1	1	0	1	0	0	1
1350	1	1	0	1	0	0	1
1100	1	1	1	1	1	1	1
770	0	0	0	1	0	0	1
580	1	1	1	1	1	1	1
500	1	1	1	1	1	1	1
380	0	0	1	1	0	0	1



Şekil 3.46. 'Ferrastar' çeşidine ait, ISSR19 primeri ile elde edilen ISSR-PZR jel görüntüsü. B: 100 bç + 1 kb Ladder DNA A: Ana bitki, 3-1 ve 3-2: mikroaşılamadan sonra 3. alt kültüre ait klonlar, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar. Şekilde gösterilen ok polimorfik olan bantı göstermektedir.

Çizelge 3.47. 'Ferrastar' çeşidine ait, ISSR19 primeri ile elde edilen ISSR-PZR bant sonuçları.

ISSR19 Primeri							
Bant (bç)		**Klonlar**					
	Ana	**3-1**	**3-2**	**6-1**	**6-2**	**9-1**	**9-2**
1180	1	1	1	1	1	1	1
820	1	1	1	1	1	1	1
750	1	1	1	1	1	1	1
650	1	1	1	1	1	1	1
630	1	0	0	0	0	1	0
500	1	1	1	1	1	1	1
350	1	1	1	1	1	1	1

‘Ferrastar’ çeşidi için seçilen primerler ile yapılan ISSR-PZR’ lara ait jel görüntüleri değerlendirilerek oluşturulan ve oluşan bantlarla ilgili yapılan değerlendirmeler Çizelge 3.48’ de verilmiştir. Çizelgeye göre değerlendirmeye alınan primerlere ait oluşan bantlara irdelendiğinde, oluşan bantların 250 bç ile 1450 bç arasında olduğu görülmektedir. Denenen primerler arasında 14 bantla en fazla bant üreten primer ISSR12 primeri olup, çoğaltımda kullanılan 8 primer ile toplamda 67 bant oluşmuştur. Çoğaltımda kullanılan primerler arasında 5 primerde (ISSR1, ISSR11, ISSR12, ISSR15, ISSR19) polimorfik bantların oluştuğu gözlenirken, toplamda 15 adet polimorfik bant elde edilmiştir. Buna göre oluşan bantların %22.38’ i polimorfiktir. Primerler arasında en yüksek PIC değeri (0.4898) ISSR11 primerinde hesaplanmıştır. Ayrıca ISSR-PZR analizlerinde kullanılan primerler arasındaki polimorfik bant üreten primerlerin ortalama PIC değeri ise 0.3592 olarak hesaplanmıştır.

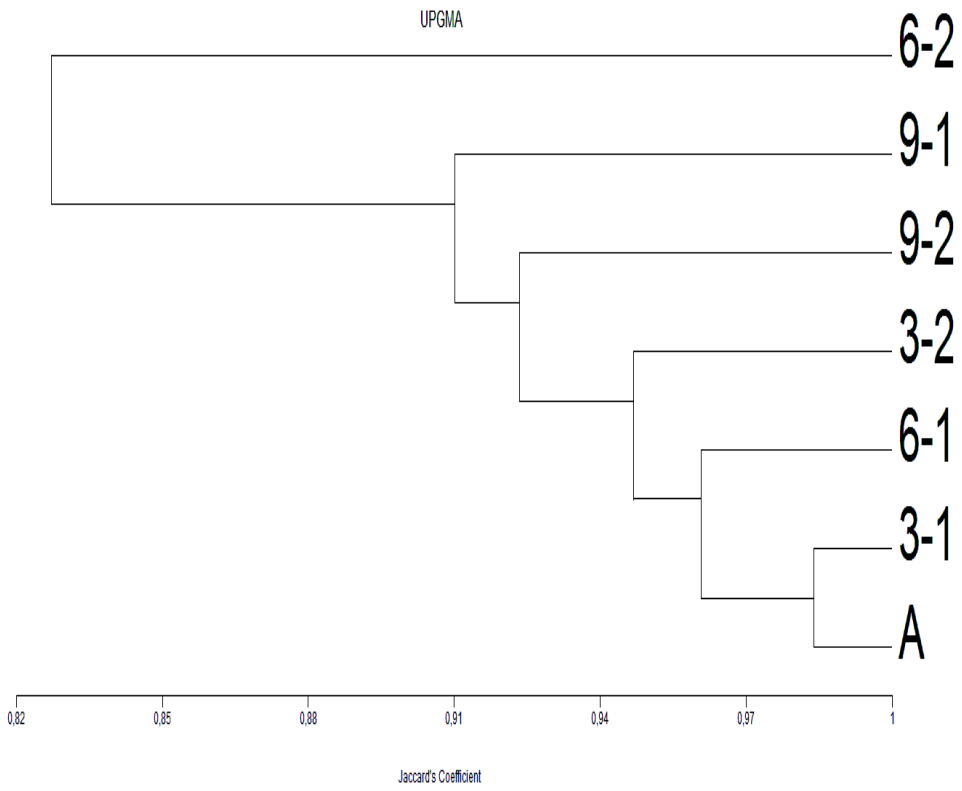
Çizelge 3.48. *P. dulcis* 'Ferrastar' çeşidinin ana bitki ve klonlarının genetik kararlılığının belirlenmesinde kullanılan ISSR primer dizileri ve bu primerlerden elde edilen değerlendirilmiş bant ve polimorfik bant sayısı, yüzdesi ve PIC değerleri.

Primer İsmi	Primer Dizisi (5´-3´)	Bant Uzunluğu (bç)	Bant Sayısı	Polimorfik Bant Sayısı	Polimorfizm Yüzdesi (%)	PIC Değeri (Ort)
ISSR01	GAG AGA GAG AGA GAG AT	520-1060	5	1	20.0	0.4082
ISSR02	GAG AGA GAG AGA GAG AC	520-980	7	0	0.0	-
ISSR10	GAG AGA GAG AGC	320-1100	12	0	0.0	-
ISSR11	CAC ACA CAC AGT	250-1150	13	2	15.3	0.4898
ISSR12	GAA GAA GAA GAA GAA GC	300-1100	14	7	50.0	0.2449
ISSR13	GAA GAA GAA GAA GAA GG	520-620	2	0	0.0	
ISSR15	CTC TCT CTC TCT CTC TA	380-1450	7	4	57.1	0.4694
ISSR19	AAC TCT CTC TCT CTC T	350-1180	7	1	14.3	0.4082
Toplam			**67**	**15**	**22.38**	**0.3592**

‘Ferrastar’ çeşidine ait jel profillerinin yorumlanması sonucu elde edilen verilerle hazırlanan benzerlik matriksi (Çizelge 3.49) ve dendogram (Şekil 3.47) irdelendiğinde, benzerlik matriksinde ana bitki ve klonlar arasında benzerliklerin 0.815 ile 0.984 arasında değiştiği görülmekte olup, benzerlik matriks ortalaması 0.9025 olarak hesaplanmıştır. Ana materyale en yakın klon 3. alt kültüre ait klon (3-1)’ dir. ISSR-PZR analizlerine göre ana bitkiden benzerlik olarak uzaklaşmalar başladığı klon (3-1) dir. Ana bitkiye en uzak olan klon ise 6. alt kültüre ait olan klon 6-2 olarak görülmektedir.

Çizelge 3.49. *P. dulcis* ‘Ferrastar’ çeşidine ait ana bitki ile klonları arasında ISSR-PZR analizi ile elde edilen benzerlik matriksi.

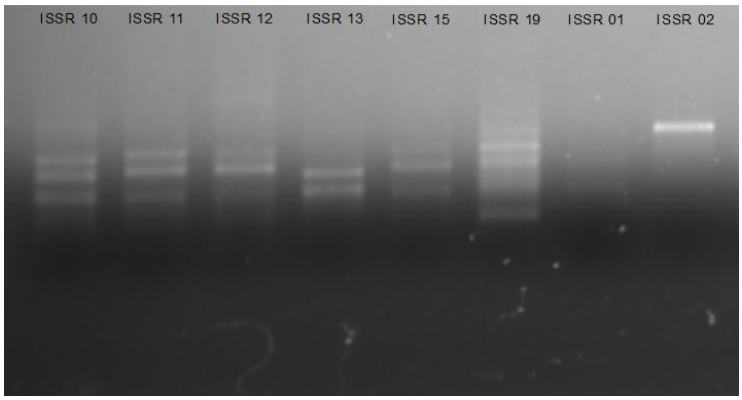
A	**3-1**	**3-2**	**6-1**	**6-2**	**9-1**	**9-2**	
A	1,000						
3-1	0,984	1,000					
3-2	0,937	0,952	1,000				
6-1	0,953	0,968	0,952	1,000			
6-2	0,815	0,828	0,841	0,803	1,000		
9-1	0,922	0,906	0,921	0,879	0,857	1,000	
9-2	0,909	0,923	0,908	0,954	0,818	0,923	1,000



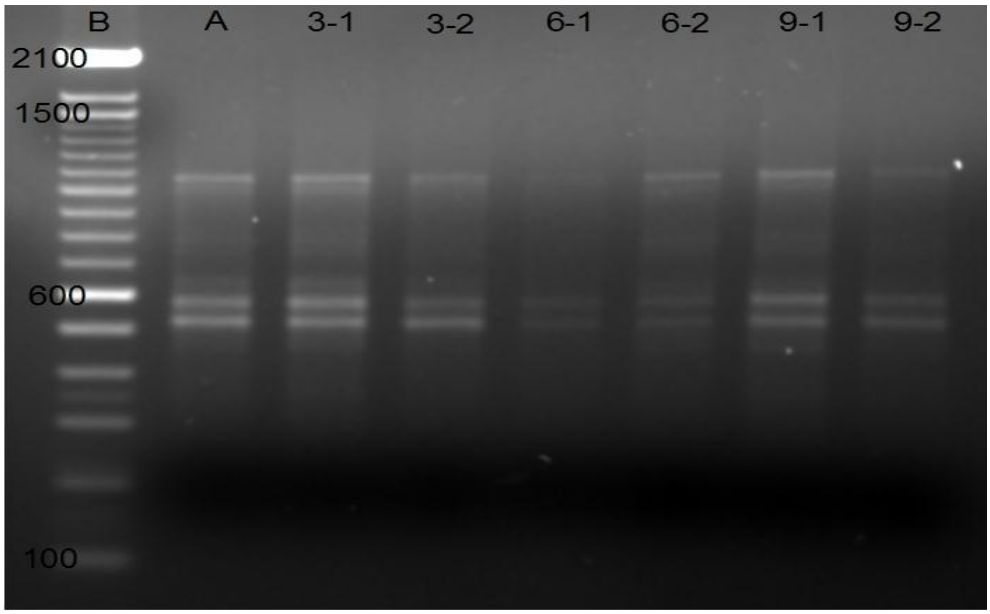
Şekil 3.47. *P. dulcis* 'Ferrastar' çeşidinin 6 klonundan, 8 ISSR primeri ile elde edilen 67 banttan UPGMA analizi ile oluşturulan dendogram. [A: Ana bitki, 3-1 ve 3-2: mikroaşılamadan sonra 3. alt kültüre ait klonlar, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar].

3.2.2. *P. dulcis* 'Nonpareil' Çeşidi İçin ISSR-PZR Analizlerinin Değerlendirilmesi

ISSR-PZR analizleri için denemeye alınan 16 primer (ISSR01-ISSR06 ve ISSR10-ISSR19) arasından 'Nonpareil' çeşidi için ISSR03, ISSR04, ISSR05, ISSR06, ISSR14, ISSR16, ISSR17 ve ISSR18 primerleri ana bitki gDNA' sının çoğaltımı çalışmalarında az bant üretkenliği veya bant üretkenliğinin görülmemesi nedeniyle diğer klonlar için değerlendirmeye alınmamıştır. ISSR01, ISSR02, ISSR10, ISSR11, ISSR12, ISSR13, ISSR15 ve ISSR19 primerleri ise ana bitkide vermiş oldukları yeterli bant üretkenliğinden dolayı değerlendirmeye alınarak (Şekil 48), klonlara ait gDNA' ların çoğaltımı yapılmış ve çoğaltım ürünleri, ana bitki ve klonlar bir belirteçle jele yüklenerek, jel görüntüleri sırasıyla Şekil 3.49, Şekil 3.50, Şekil 3.51, Şekil 3.52, Şekil 3.53, Şekil 3.54, Şekil 3.55, Şekil 3.56' da verilmiştir. Her ISSR primer jel görüntüsü için yapılan bant yorumları var olan bant için 1; olmayan bant için 0 değeri verilerek değerlendirilmiş ve bu değerlendirmeler sırasıyla Çizelge 3.50, Çizelge 3.51, Çizelge 3.52, Çizelge 3.53, Çizelge 3.54, Çizelge 3.55, Çizelge 3.56, Çizelge 3.57' de sunulmuştur. Değerlendirme sonucunda 'Nonpareil' çeşidi için ana bitki ve klonlara ait gDNA' ların çoğaltılması sonrası her ISSR primeri için bantlar belirlenerek oluşan bant sayısı, polimorfik bant sayısı, polimorfizm yüzdesi ve PIC değeri ise Çizelge 3.58' de verilmiştir.



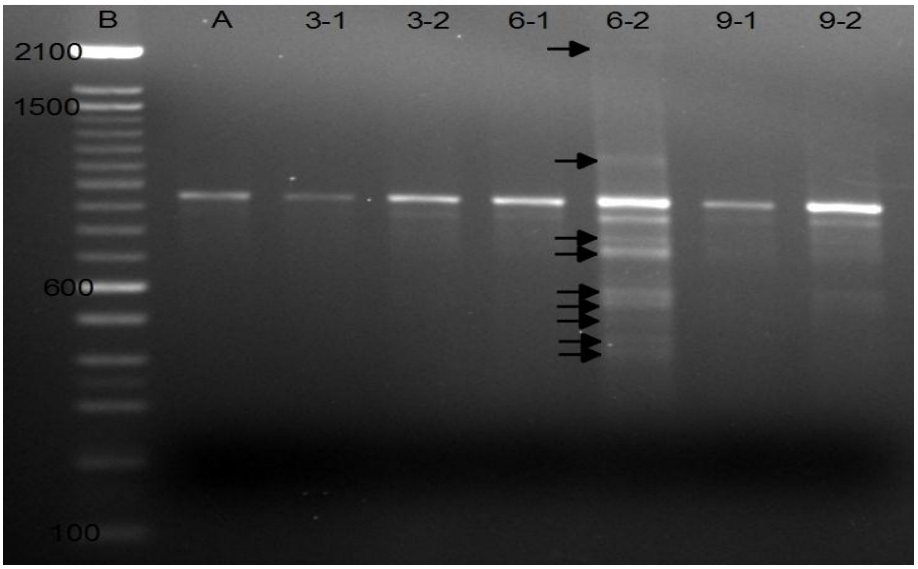
Şekil 3.48. 'Nonpareil' ana materyaline ait gDNA' nın seçilen ISSR primerleri ile yapılan PZR reaksiyonu ile elde edilen bant profili.



Şekil 3.49. 'Nonpareil' çeşidine ait, ISSR01 primeri ile elde edilen ISSR-PZR jel görüntüsü. B: 100 bç + 1 kb Ladder DNA A: Ana bitki, 3-1 ve 3-2: mikroaşılamadan sonra 3. alt kültüre ait klonlar, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar.

Çizelge 3.50. 'Nonpareil' çeşidine ait, ISSR01 primeri ile elde edilen ISSR-PZR bant sonuçları.

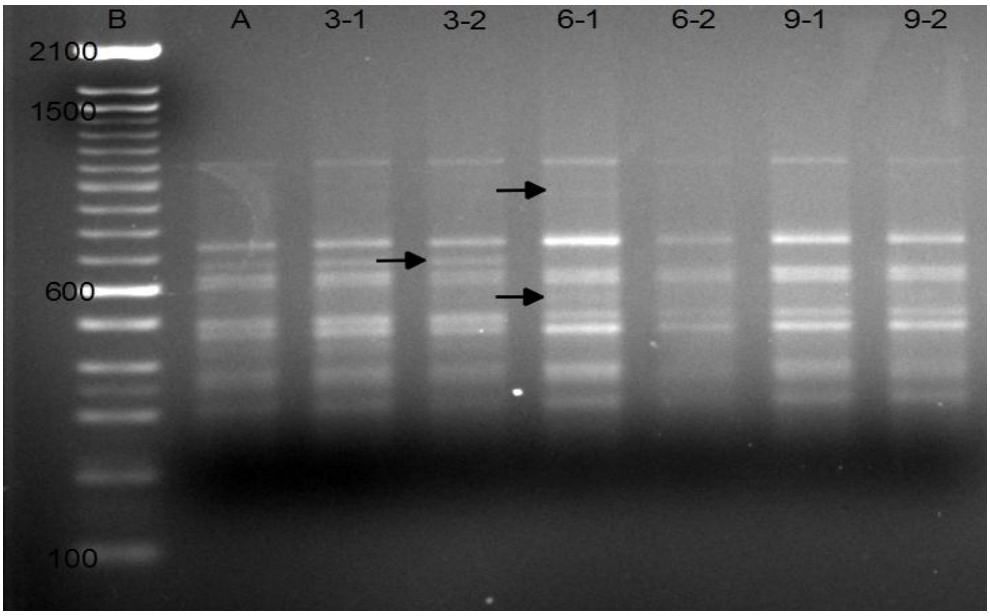
ISSR01 Primeri							
Bant (bç)		**Klonlar**					
	Ana	**3-1**	**3-2**	**6-1**	**6-2**	**9-1**	**9-2**
1080	1	1	1	1	1	1	1
1050	1	1	1	1	1	1	1
800	1	1	1	1	1	1	1
750	1	1	1	1	1	1	1
650	1	1	1	1	1	1	1
580	1	1	1	1	1	1	1
520	1	1	1	1	1	1	1
460	1	1	1	1	1	1	1



Şekil 3.50. 'Nonpareil' çeşidine ait, ISSR02 primeri ile elde edilen ISSR-PZR jel görüntüsü. B: 100 bç + 1 kb Ladder DNA A: Ana bitki, 3-1 ve 3-2: mikroaşılamadan sonra 3. alt kültüre ait klonlar, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar. Şekilde gösterilen oklar polimorfik olan bantları göstermektedir.

Çizelge 3.51. 'Nonpareil' çeşidine ait, ISSR02 primeri ile elde edilen ISSR-PZR bant sonuçları.

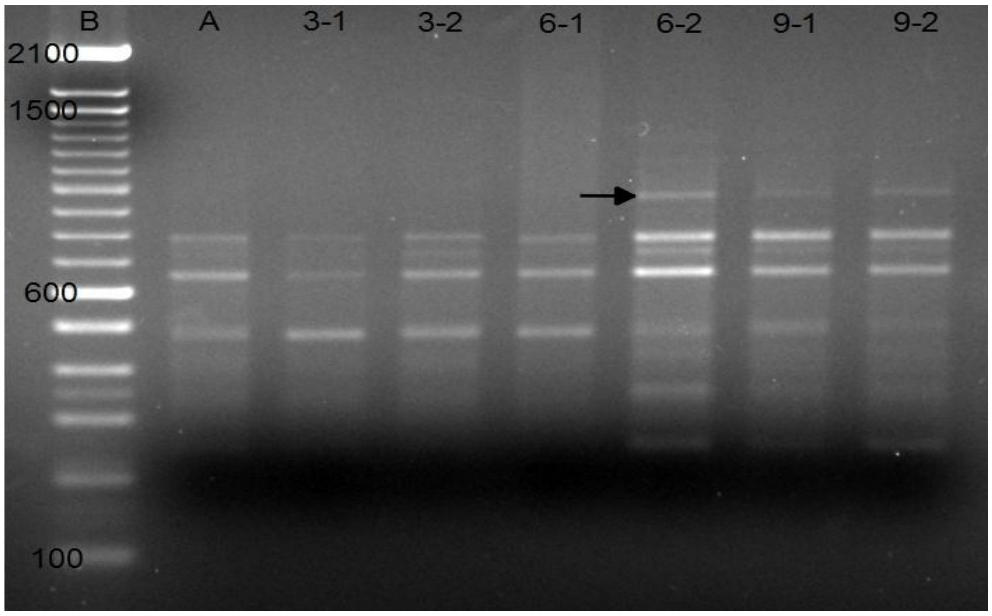
ISSR02 Primeri							
Bant (bç)		**Klonlar**					
	Ana	**3-1**	**3-2**	**6-1**	**6-2**	**9-1**	**9-2**
2150	0	0	0	0	1	0	0
1170	0	0	0	0	1	0	0
950	1	1	1	1	1	1	1
920	1	1	1	1	1	1	1
750	0	0	1	1	1	1	1
720	0	0	1	1	1	1	1
600	0	0	0	0	1	0	1
580	0	0	0	0	1	0	1
500	0	0	0	0	1	0	0
450	0	0	0	0	1	0	0
420	0	0	0	0	1	0	0



Şekil 3.51. 'Nonpareil' çeşidine ait, ISSR10 primeri ile elde edilen ISSR-PZR jel görüntüsü. B: 100 bç + 1 kb Ladder DNA A: Ana bitki, 3-1 ve 3-2: mikroaşılamadan sonra 3. alt kültüre ait klonlar, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar. Şekilde gösterilen oklar polimorfik olan bantları göstermektedir.

Çizelge 3.52. 'Nonpareil' çeşidine ait, ISSR10 primeri ile elde edilen ISSR-PZR bant sonuçları.

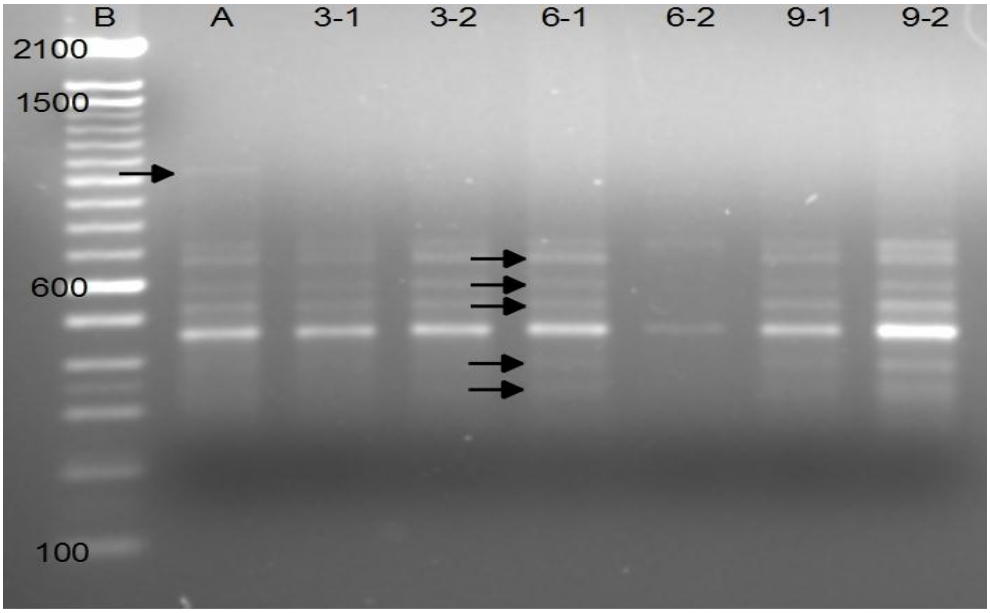
ISSR10 Primeri							
Bant (bç)		**Klonlar**					
	Ana	**3-1**	**3-2**	**6-1**	**6-2**	**9-1**	**9-2**
1100	1	1	1	1	1	1	1
950	0	0	0	1	0	0	0
750	1	1	1	1	1	1	1
670	1	1	1	0	0	0	0
630	1	1	1	1	1	1	1
550	0	0	0	1	0	0	0
500	1	1	1	1	1	1	1
480	1	1	1	1	1	1	1
370	1	1	1	1	1	1	1
350	1	1	1	1	1	1	1
210	1	1	1	1	1	1	1



Şekil 3.52. 'Nonpareil' çeşidine ait, ISSR11 primeri ile elde edilen ISSR-PZR jel görüntüsü. B: 100 bç + 1 kb Ladder DNA A: Ana bitki, 3-1 ve 3-2: mikroaşılamadan sonra 3. alt kültüre ait klonlar, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar. Şekilde gösterilen ok polimorfik olan bantı göstermektedir.

Çizelge 3.53. 'Nonpareil' çeşidine ait, ISSR11 primeri ile elde edilen ISSR-PZR bant sonuçları.

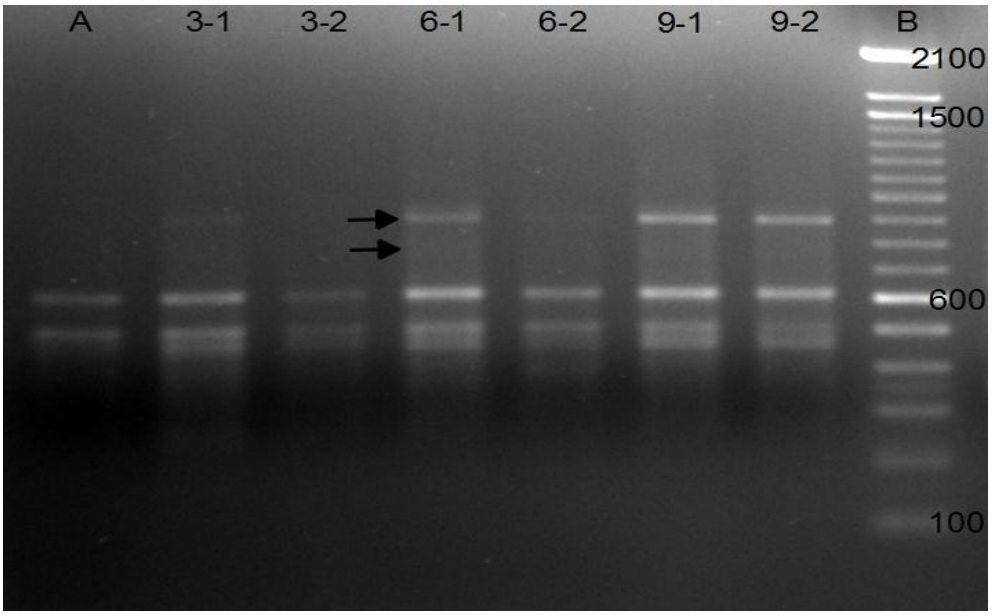
ISSR11 Primeri							
Bant (bç)		**Klonlar**					
	Ana	**3-1**	**3-2**	**6-1**	**6-2**	**9-1**	**9-2**
980	0	0	0	0	1	1	1
800	1	1	1	1	1	1	1
750	1	1	1	1	1	1	1
650	1	1	1	1	1	1	1
480	1	1	1	1	1	1	1
420	1	1	1	1	1	1	1
340	1	1	1	1	1	1	1
250	1	1	1	1	1	1	1



Şekil 3.53. 'Nonpareil' çeşidine ait, ISSR12 primeri ile elde edilen ISSR-PZR jel görüntüsü. B: 100 bç + 1 kb Ladder DNA A: Ana bitki, 3-1 ve 3-2: mikroaşılamadan sonra 3. alt kültüre ait klonlar, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar. Şekilde gösterilen oklar polimorfik olan bantları göstermektedir.

Çizelge 3.54. 'Nonpareil' çeşidine ait, ISSR12 primeri ile elde edilen ISSR-PZR bant sonuçları.

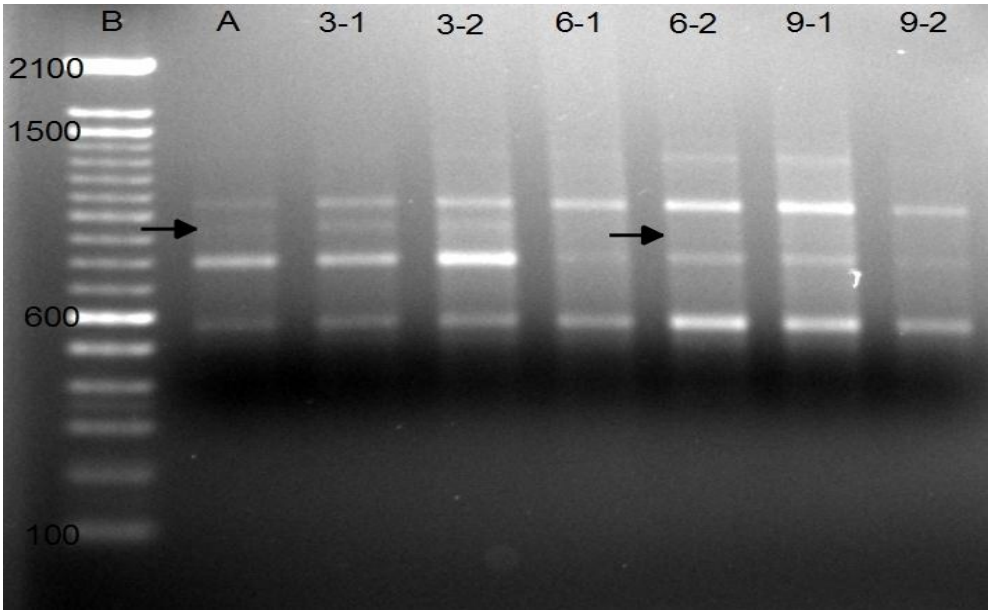
ISSR12 Primeri							
Bant (bç)		**Klonlar**					
	Ana	**3-1**	**3-2**	**6-1**	**6-2**	**9-1**	**9-2**
1100	1	0	0	0	0	0	0
730	1	1	1	1	1	1	1
680	1	1	1	1	1	0	1
600	1	1	1	1	1	0	1
550	1	1	1	1	1	0	1
480	1	1	1	1	1	1	1
400	1	1	1	1	1	0	1
340	1	1	1	1	1	0	1



Şekil 3.54. 'Nonpareil' çeşidine ait, ISSR13 primeri ile elde edilen ISSR-PZR jel görüntüsü. B: 100 bç + 1 kb Ladder DNA A: Ana bitki, 3-1 ve 3-2: mikroaşılamadan sonra 3. alt kültüre ait klonlar, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar. Şekilde gösterilen oklar polimorfik olan bantları göstermektedir.

Çizelge 3.55. 'Nonpareil' çeşidine ait, ISSR13 primeri ile elde edilen ISSR-PZR bant sonuçları.

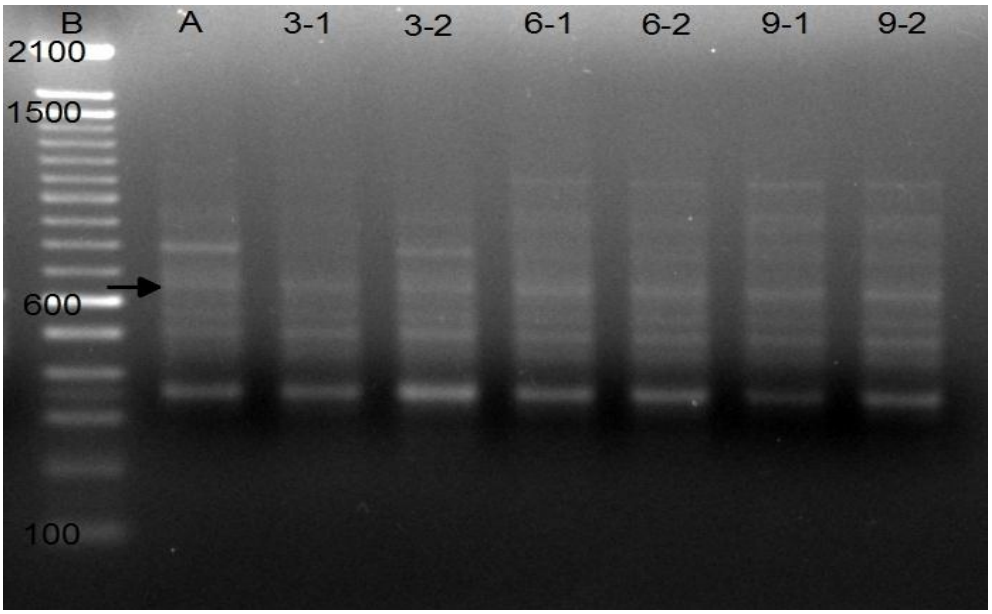
ISSR13 Primeri							
Bant (bç)		**Klonlar**					
	Ana	**3-1**	**3-2**	**6-1**	**6-2**	**9-1**	**9-2**
900	0	1	0	1	1	1	1
750	0	1	0	1	1	1	1
610	1	1	1	1	1	1	1
500	1	1	1	1	1	1	1
480	1	1	1	1	1	1	1
390	1	1	1	1	1	1	1



Şekil 3.55. 'Nonpareil' çeşidine ait, ISSR15 primeri ile elde edilen ISSR-PZR jel görüntüsü. B: 100 bç + 1 kb Ladder DNA A: Ana bitki, 3-1 ve 3-2: mikroaşılamadan sonra 3. alt kültüre ait klonlar, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar. Şekilde gösterilen oklar polimorfik olan bantları göstermektedir.

Çizelge 3.56. 'Nonpareil' çeşidine ait, ISSR15 primeri ile elde edilen ISSR-PZR bant sonuçları.

ISSR15 Primeri							
Bant (bç)		**Klonlar**					
	Ana	**3-1**	**3-2**	**6-1**	**6-2**	**9-1**	**9-2**
1380	1	1	1	1	1	1	1
1050	1	1	1	1	1	1	1
980	1	1	1	0	1	0	0
960	0	0	0	0	1	0	0
810	1	1	1	1	1	1	1
580	1	1	1	1	1	1	1
560	1	1	1	1	1	1	1



Şekil 3.56. 'Nonpareil' çeşidine ait, ISSR19 primeri ile elde edilen ISSR-PZR jel görüntüsü. B: 100 bç + 1 kb Ladder DNA A: Ana bitki, 3-1 ve 3-2: mikroaşılamadan sonra 3. alt kültüre ait klonlar, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar. Şekilde gösterilen ok polimorfik olan bantı göstermektedir.

Çizelge 3.57. 'Nonpareil' çeşidine ait, ISSR19 primeri ile elde edilen ISSR-PZR bant sonuçları.

ISSR19 Primeri							
Bant (bç)		**Klonlar**					
	Ana	**3-1**	**3-2**	**6-1**	**6-2**	**9-1**	**9-2**
1150	1	1	1	1	1	1	1
980	1	1	1	1	1	1	1
970	1	1	1	1	1	1	1
800	1	1	1	1	1	1	1
700	1	1	1	1	1	1	1
690	1	0	1	1	1	1	1
560	1	1	1	1	1	1	1
500	1	1	1	1	1	1	1
450	1	1	1	1	1	1	1
360	1	1	1	1	1	1	1

‘Nonpareil’ çeşidi için seçilen primerler ile yapılan ISSR-PZR’ lara ait jel görüntüleri değerlendirilerek oluşturulan ve oluşan bantlarla ilgili yapılan yorumlara ait değerlendirmeler Çizelge 3.58’ de verilmiştir. Çizelgeye göre değerlendirmeye alınan primerler ile oluşan bantlar irdelendiğinde, bantların 210 bç ve 2150 bç arasında oluştuğu görülmektedir. Denenen primerler arasında 11’ er bantla en fazla bant üreten primerler ISSR02 ile ISSR10 primerleri olup, çoğaltımda kullanılan 8 primer ile toplamda 69 bant oluşmuştur. Çoğaltımda kullanılan primerler arasında 7 primerde (ISSR02, ISSR10, ISSR11, ISSR12, ISSR13, ISSR15, ISSR19) polimorfik bantların oluştuğu gözlenirken, toplamda 24 adet polimorfik bant elde edilmiştir. Dolayısıyla oluşan bantların %34.78’ i polimorfiktir. Primerler arasında en yüksek PIC değeri (0.4898) ise ISSR11 primerinde hesaplanmıştır. Ayrıca ISSR-PZR analizlerinde kullanılan primerler arasındaki polimorfik bant üreten primerlerin ortalama PIC değeri ise 0.3231 olarak hesaplanmıştır.

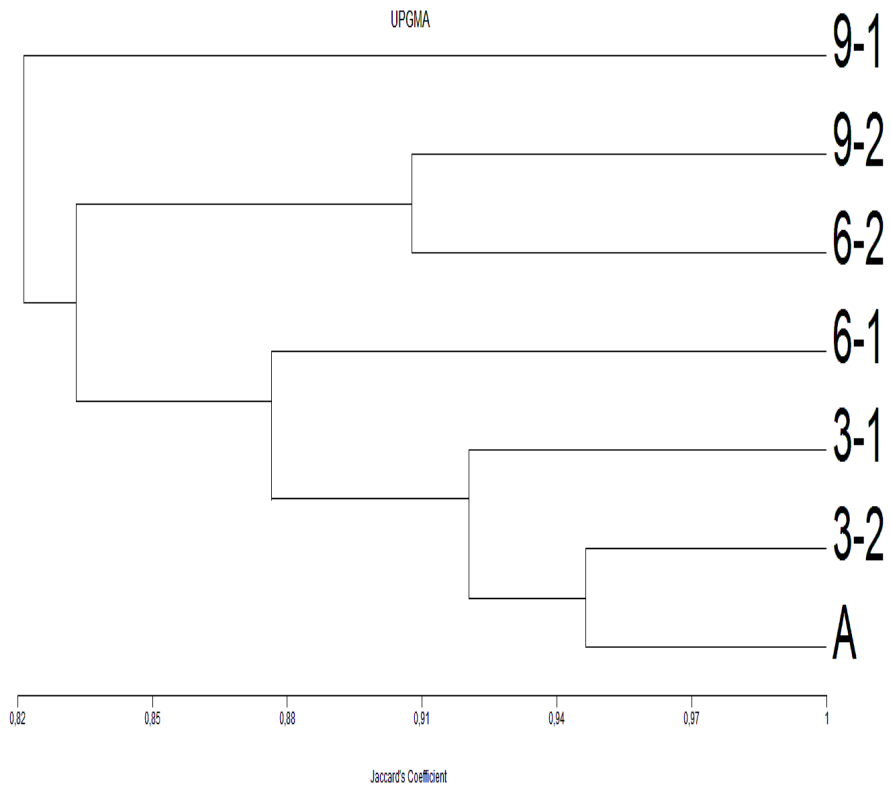
Çizelge 3.58. *P. dulcis* 'Nonpareil' çeşidinin ana bitki ve klonlarının genetik kararlılığının belirlenmesinde kullanılan ISSR primer dizileri ve bu primerlerden elde edilen değerlendirilmiş bant ve polimorfik bant sayısı, yüzdesi ve PIC değerleri.

Primer İsmi	Primer Dizisi (5´-3´)	Bant Uzunluğu (bç)	Bant Sayısı	Polimorfik Bant Sayısı	Polimorfizm Yüzdesi	PIC Değeri (Ort)
ISSR01	GAG AGA GAG AGA GAG AT	460-1080	8	0	20.0	-
ISSR02	GAG AGA GAG AGA GAG AC	420-2150	11	9	81.8	0.3356
ISSR10	GAG AGA GAG AGC	210-1100	11	3	27.3	0.3265
ISSR11	CAC ACA CAC AGT	250-980	8	1	12.5	0.4898
ISSR12	GAA GAA GAA GAA GAA GC	340-1100	8	6	75.0	0.2449
ISSR13	GAA GAA GAA GAA GAA GG	390-900	6	2	33.3	0.4082
ISSR15	CTC TCT CTC TCT CTC TA	560-1380	7	2	28.6	0.3673
ISSR19	AAC TCT CTC TCT CTC T	360-1150	10	1	10.0	0.2449
	Toplam		**69**	**24**	**34.78**	**0.3231**

‘Nonpareil’ çeşidine ait jel profillerinin yorumlanması sonucu elde edilen verilerle hazırlanan benzerlik matriksi (Çizelge 3.59) ve dendogram (Şekil 3.57) irdelendiğinde, benzerlik matriksinde ana bitki ve klonlar arasında benzerliklerin 0.776 ile 0.946 arasında değiştiği görülmekte olup, benzerlik matriks ortalaması 0.8532 olarak hesaplanmıştır. Ana materyale en yakın klon 3. alt kültüre ait 3-2 klonudur. Ana bitkiye en uzak olan klon ise 6. alt kültüre ait olan 6-2 bireyidir.

Çizelge 3.59. *P. dulcis* ‘Nonpareil’ çeşidine ait ana bitki ile klonları arasında ISSR-PZR analizi ile elde edilen benzerlik matriksi.

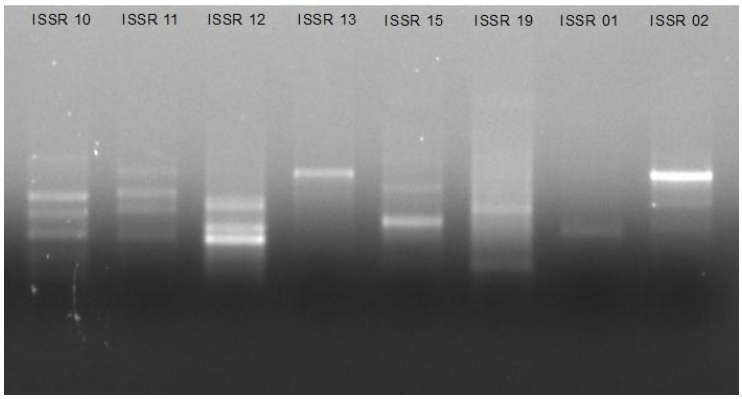
	A	**3-1**	**3-2**	**6-1**	**6-2**	**9-1**	**9-2**
A	1,000						
3-1	0,929	1,000					
3-2	0,946	0,912	1,000				
6-1	0,850	0,881	0,898	1,000			
6-2	0,776	0,803	0,818	0,821	1,000		
9-1	0,780	0,810	0,828	0,862	0,785	1,000	
9-2	0,823	0,852	0,869	0,902	0,908	0,864	1,000



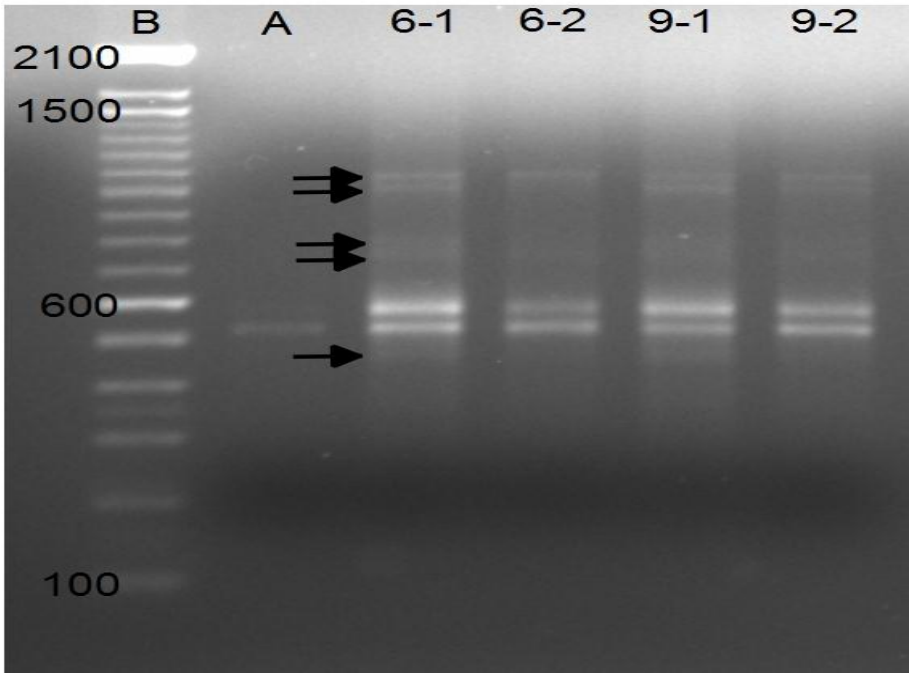
Şekil 3.57. *P. dulcis* 'Nonpareil' çeşidinin 6 klonundan 8 ISSR primeri ile elde edilen 69 banttan UPGMA analizi ile oluşturulan dendogram. [A: Ana bitki, 3-1 ve 3-2: mikroaşılamadan sonra 3. alt kültüre ait klonlar, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar].

3.2.3. *P. dulcis* 'Teksas' Çeşidi İçin ISSR-PZR Analizlerinin Değerlendirilmesi

ISSR-PZR analizleri için denemeye alınan 16 primer (ISSR01-ISSR06 ve ISSR10-ISSR19) arasından 'Teksas' çeşidi için ISSR03, ISSR04, ISSR05, ISSR06, ISSR14, ISSR16, ISSR17 ve ISSR18 primerleri ana bitki gDNA' sının çoğaltımı çalışmalarında az bant üretkenliği veya bant üretkenliğinin görülmemesi nedeniyle diğer klonlar için değerlendirmeye alınmamıştır. ISSR01, ISSR02, ISSR10, ISSR11, ISSR12, ISSR13, ISSR15 ve ISSR19 primerleri ise ana bitkide vermiş oldukları yeterli bant üretkenliğinden dolayı değerlendirmeye alınarak (Şekil 58), klonlara ait gDNA' ların çoğaltımı yapılmış ve çoğaltım ürünleri, ana bitki ve klonlar bir belirteçle birlikte jele yüklenmiş ve jel görüntüleri sırasıyla Şekil 3.59, Şekil 3.60, Şekil 3.61, Şekil 3.62, Şekil 3.63, Şekil 3.64, Şekil 3.65, Şekil 3.66' da verilmiştir. Her ISSR primer jel görüntüsü için yapılan bant yorumları var olan bant için 1; olmayan bant için 0 değeri verilerek değerlendirilmiş ve bu değerlendirmeler sırasıyla Çizelge 3.60, Çizelge 3.61, Çizelge 3.62, Çizelge 3.63, Çizelge 3.64, Çizelge 3.65, Çizelge 3.66, Çizelge 3.67' de sunulmuştur. Değerlendirme sonucunda 'Teksas' çeşidi için ana bitki ve klonlara ait gDNA' ların çoğaltılması sonrası her ISSR primeri için bantlar oluşan bant sayısı, polimorfik bant sayısı, polimorfizm yüzdesi ve PIC değeri ise Çizelge 3.68' de verilmiştir.



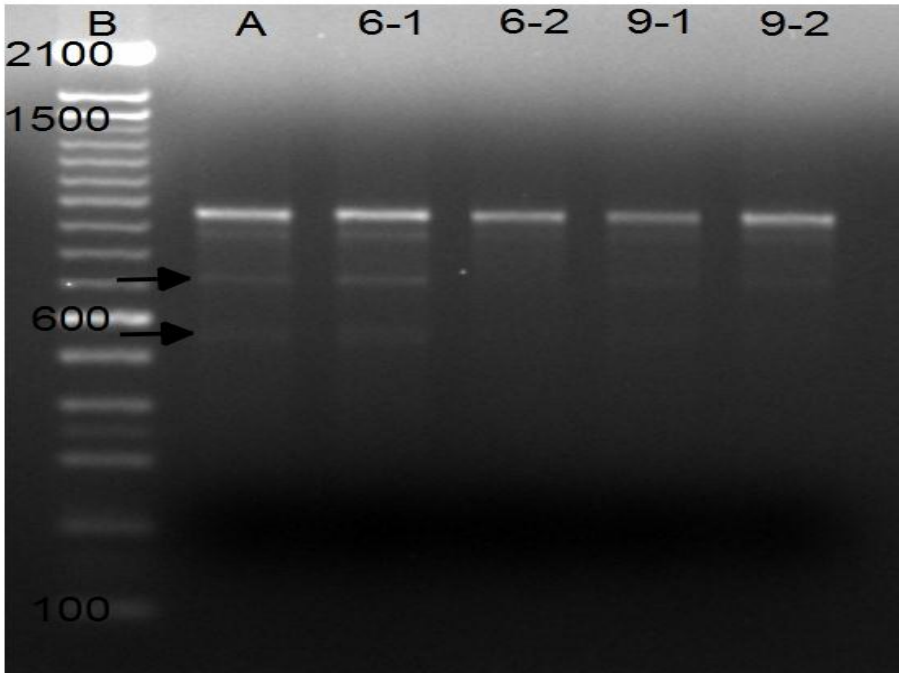
Şekil 3.58. 'Teksas' ana materyaline ait gDNA' nın seçilen ISSR primerleri ile yapılan PZR reaksiyonu ile elde edilen bant profili.



Şekil 3.59. ‘Teksas’ çeşidine ait, ISSR01 primeri ile elde edilen ISSR-PZR jel görüntüsü. B: 100 bç + 1 kb Ladder DNA A: Ana bitki, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar. Şekilde gösterilen oklar polimorfik olan bantları göstermektedir.

Çizelge 3.60. ‘Teksas’ çeşidine ait, ISSR01 primeri ile elde edilen ISSR-PZR bant sonuçları.

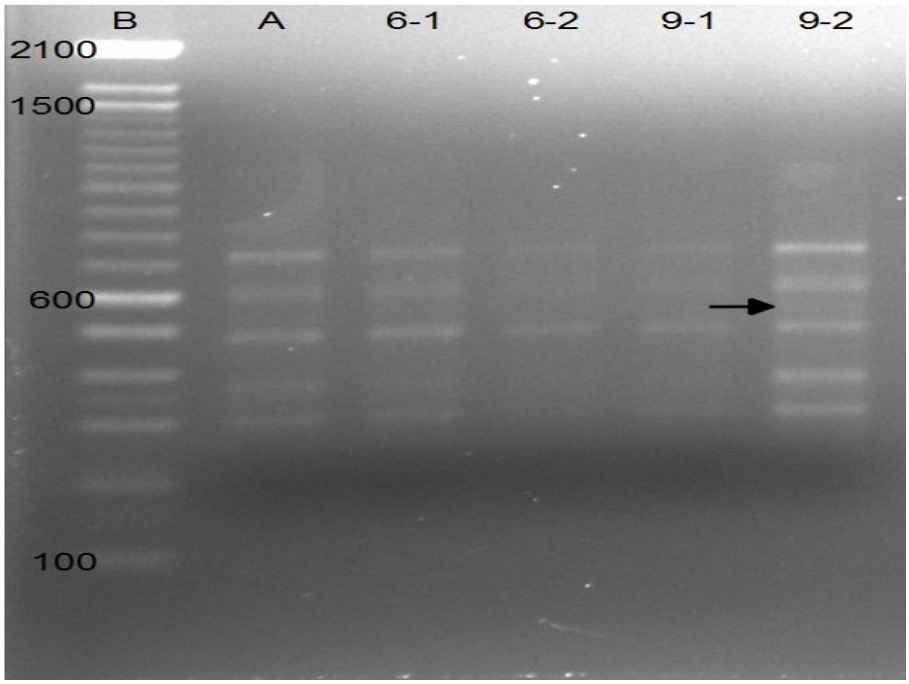
ISSR01 Primeri					
Bant (bç)		**Klonlar**			
	Ana	**6-1**	**6-2**	**9-1**	**9-2**
1070	0	1	1	1	1
1020	0	1	0	1	1
780	0	1	1	1	1
750	0	1	1	1	1
580	1	1	1	1	1
520	1	1	1	1	1
450	0	1	1	1	1



Şekil 3.60 'Teksas' çeşidine ait, ISSR02 primeri ile elde edilen ISSR-PZR jel görüntüsü. B: 100 bç + 1 kb Ladder DNA A: Ana bitki, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar. Şekilde gösterilen oklar polimorfik olan bantları göstermektedir.

Çizelge 3.61. 'Teksas' çeşidine ait, ISSR02 primeri ile elde edilen ISSR-PZR bant sonuçları.

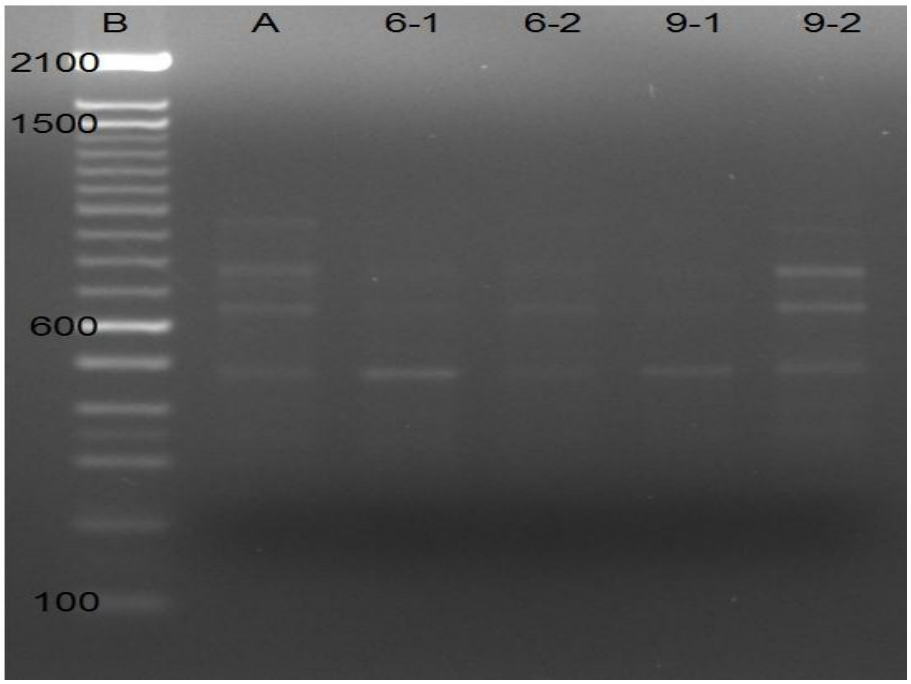
ISSR02 Primeri					
Bant (bç)		**Klonlar**			
	Ana	**6-1**	**6-2**	**9-1**	**9-2**
980	1	1	1	1	1
880	1	1	1	1	1
710	1	1	1	0	1
550	1	1	1	0	1



Şekil 3.61. ‘Teksas’ çeşidine ait, ISSR10 primeri ile elde edilen ISSR-PZR jel görüntüsü. B: 100 bç + 1 kb Ladder DNA A: Ana bitki, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar. Şekilde gösterilen ok polimorfik olan bantı göstermektedir.

Çizelge 3.62. ‘Teksas’ çeşidine ait, ISSR10 primeri ile elde edilen ISSR-PZR bant sonuçları.

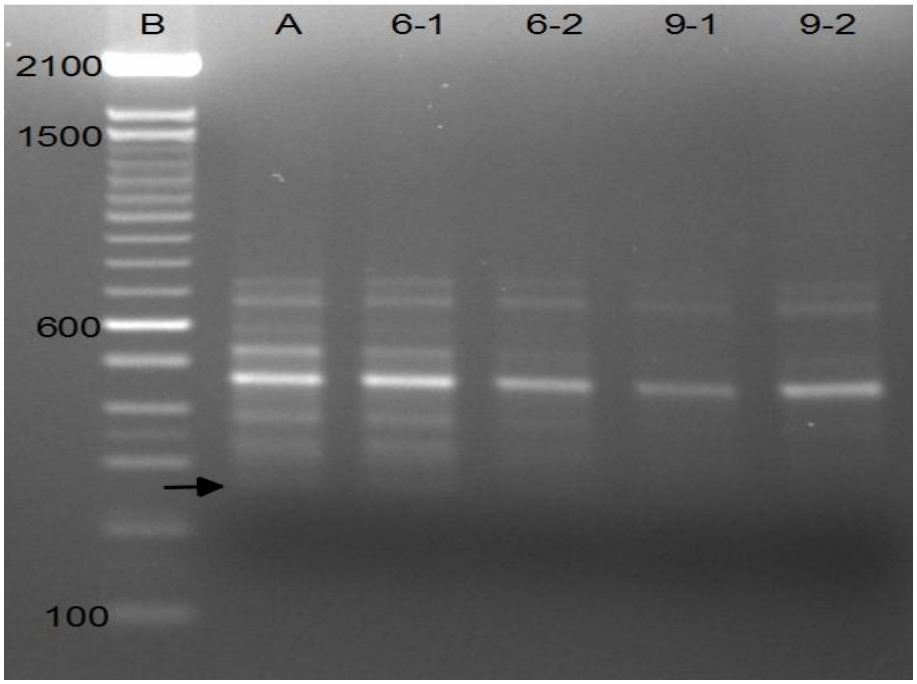
ISSR10 Primeri					
Bant (bç)		**Klonlar**			
	Ana	**6-1**	**6-2**	**9-1**	**9-2**
750	1	1	1	1	1
650	1	1	1	1	1
630	1	1	1	1	1
550	0	0	0	0	1
490	1	1	1	1	1
360	1	1	1	1	1
300	1	1	1	1	1



Şekil 3.62. ‘Teksas’ çeşidine ait, ISSR11 primeri ile elde edilen ISSR-PZR jel görüntüsü. B: 100 bç + 1 kb Ladder DNA A: Ana bitki, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar.

Çizelge 3.63. ‘Teksas’ çeşidine ait, ISSR11 primeri ile elde edilen ISSR-PZR bant sonuçları.

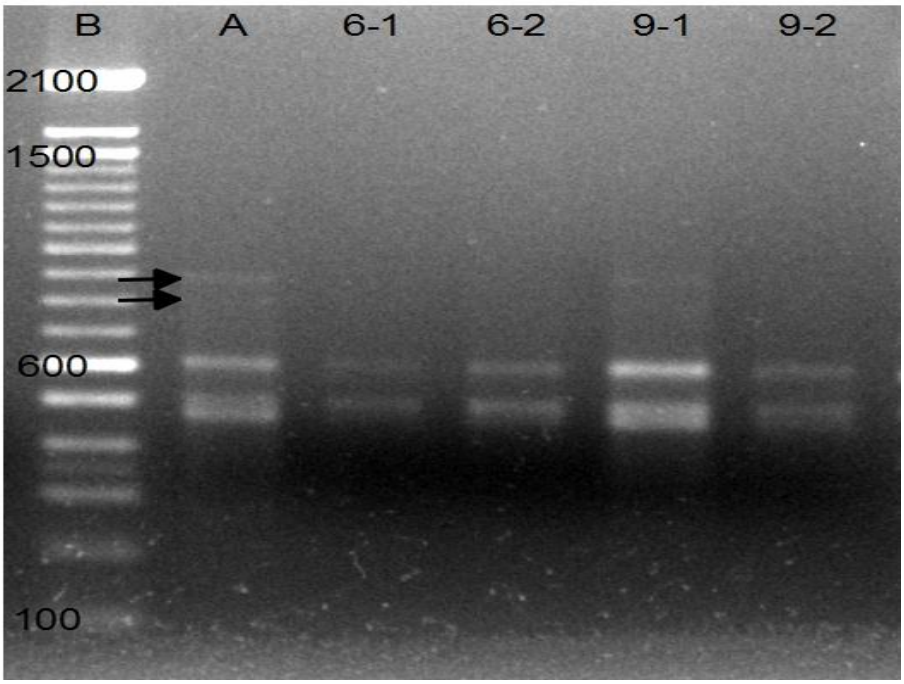
ISSR11 Primeri					
Bant (bç)		**Klonlar**			
	Ana	**6-1**	**6-2**	**9-1**	**9-2**
1100	1	1	1	1	1
980	1	1	1	1	1
780	1	1	1	1	1
650	1	1	1	1	1
480	1	1	1	1	1
400	1	1	1	1	1
340	1	1	1	1	1



Şekil 3.63. ‘Teksas’ çeşidine ait, ISSR12 primeri ile elde edilen ISSR-PZR jel görüntüsü. B: 100 bç + 1 kb Ladder DNA A: Ana bitki, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar. Şekilde gösterilen ok polimorfik olan bantı göstermektedir.

Çizelge 3.64. ‘Teksas’ çeşidine ait, ISSR12 primeri ile elde edilen ISSR-PZR bant sonuçları.

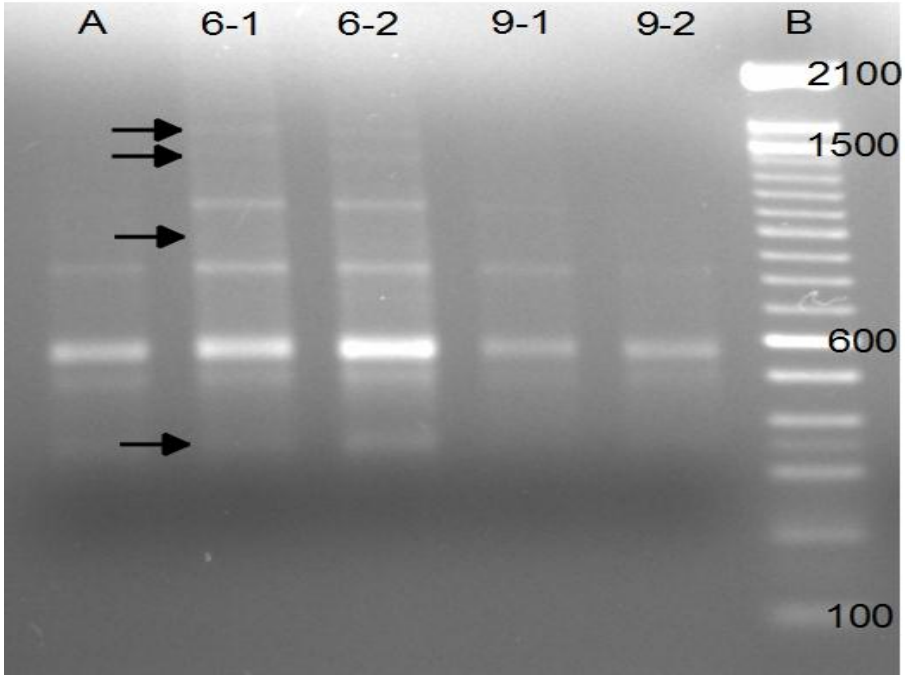
ISSR12 Primeri					
Bant (bç)		**Klonlar**			
	Ana	**6-1**	**6-2**	**9-1**	**9-2**
750	1	1	1	1	1
680	1	1	1	1	1
580	1	1	1	1	1
535	1	1	1	1	1
450	1	1	1	1	1
370	1	1	1	1	1
320	1	1	1	1	1
280	1	1	0	0	0



Şekil 3.64. 'Teksas' çeşidine ait, ISSR13 primeri ile elde edilen ISSR-PZR jel görüntüsü. B: 100 bç + 1 kb Ladder DNA A: Ana bitki, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar. Şekilde gösterilen oklar polimorfik olan bantları göstermektedir.

Çizelge 3.65. 'Teksas' çeşidine ait, ISSR13 primeri ile elde edilen ISSR-PZR bant sonuçları.

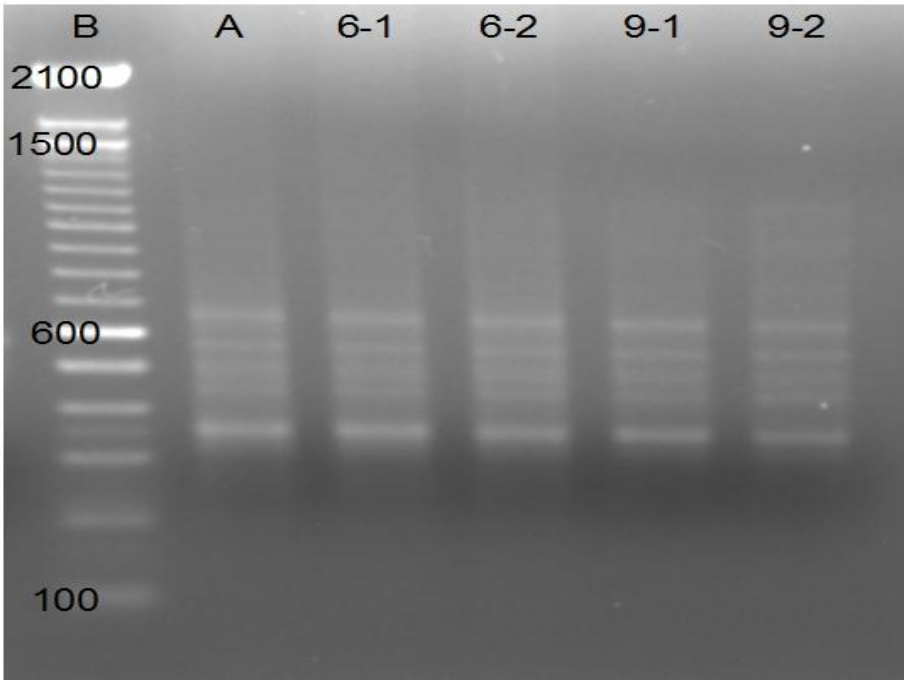
ISSR13 Primeri					
Bant (bç)		**Klonlar**			
	Ana	**6-1**	**6-2**	**9-1**	**9-2**
880	1	0	0	1	0
800	1	0	0	1	0
600	1	1	1	1	1
500	1	1	1	1	1
400	1	1	1	1	1



Şekil 3.65. 'Teksas' çeşidine ait, ISSR15 primeri ile elde edilen ISSR-PZR jel görüntüsü. B: 100 bç + 1 kb Ladder DNA A: Ana bitki, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar. Şekilde gösterilen oklar polimorfik olan bantları göstermektedir.

Çizelge 3.66. 'Teksas' çeşidine ait, ISSR15 primeri ile elde edilen ISSR-PZR bant sonuçları.

ISSR15 Primeri					
Bant (bç)		**Klonlar**			
	Ana	**6-1**	**6-2**	**9-1**	**9-2**
1600	0	1	1	0	0
1420	0	1	1	0	0
1100	1	1	1	1	1
950	1	1	1	0	0
850	1	1	1	1	1
580	1	1	1	1	1
500	1	1	1	1	1
350	1	1	1	0	0



Şekil 3.66. 'Teksas' çeşidine ait, ISSR19 primeri ile elde edilen ISSR-PZR jel görüntüsü. B: 100 bç + 1 kb Ladder DNA A: Ana bitki, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar.

Çizelge 3.67. 'Teksas' çeşidine ait, ISSR19 primeri ile elde edilen ISSR-PZR bant sonuçları.

ISSR19 Primeri					
Bant (bç)		**Klonlar**			
	Ana	**6-1**	**6-2**	**9-1**	**9-2**
1150	1	1	1	1	1
980	1	1	1	1	1
960	1	1	1	1	1
780	1	1	1	1	1
660	1	1	1	1	1
650	1	1	1	1	1
500	1	1	1	1	1
450	1	1	1	1	1
350	1	1	1	1	1
340	1	1	1	1	1

‘Teksas’ çeşidi için seçilen primerler ile yapılan ISSR-PZR’ lara ait jel görüntüleri değerlendirilerek oluşturulan ve oluşan bantlarla ilgili yapılan yorumlara ait değerlendirmeler Çizelge 3.68’ de verilmiştir. Çizelgeye göre değerlendirmeye alınan primerlere ait oluşan bantlar irdelendiğinde, bantların 280 bç ile 1600 bç arasında oluştuğu görülmektedir. Denenen primerler arasında 10 bantla en fazla bant üreten primerler ISSR19 primerleri olup, çoğaltımda kullanılan 8 primer ile toplam da 56 bant oluşmuştur. Çoğaltımda kullanılan primerler arasında 6 primerde (ISSR01, ISSR02, ISSR10, ISSR12, ISSR13, ISSR15) polimorfik bantların oluştuğu gözlenirken, toplamda 15 adet polimorfik bant elde edilmiştir. Bu sonuçlara göreoluşan bantların % 26.78’ i polimorfiktir. Primerler arasında en yüksek PIC değerleri ISSR12, ISSR13 ve ISSR15 primerlerinde 0.4800 olarak hesaplanmıştır. Ayrıca ISSR-PZR analizlerinde kullanılan primerler arasındaki polimorfik bant üreten primerlerin ortalama PIC değeri ise 0.4160 olarak hesaplanmıştır.

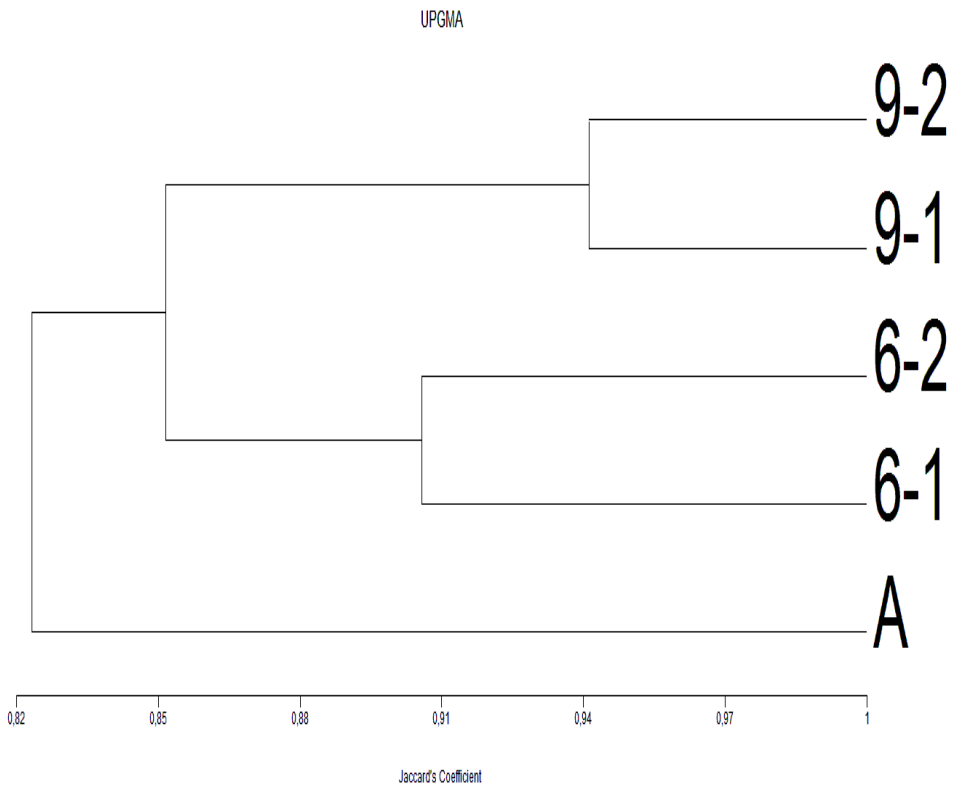
Çizelge 3.68. *P. dulcis* 'Teksas' çeşidinin ana bitki ve klonlarının genetik kararlılığının belirlenmesinde kullanılan ISSR primer dizileri ve bu primerlerden elde edilen değerlendirilmiş bant ve polimorfik bant sayısı, yüzdesi ve PIC değerleri.

Primer İsmi	Primer Dizisi (5´-3´)	Bant Uzunluğu (bç)	Bant Sayısı	Polimorfik Bant Sayısı	Polimorfizm Yüzdesi	PIC Değeri (Ort.)
ISSR01	GAG AGA GAG AGA GAG AT	450-1070	7	5	71.4	0.3840
ISSR02	GAG AGA GAG AGA GAG AC	550-980	4	2	50.0	0.3200
ISSR10	GAG AGA GAG AGC	300-750	7	1	14.3	0.3200
ISSR11	CAC ACA CAC AGT	340-1100	7	0	0.0	-
ISSR12	GAA GAA GAA GAA GAA GC	280-750	8	1	12.5	0.4800
ISSR13	GAA GAA GAA GAA GAA GG	400-880	5	2	40.0	0.4800
ISSR15	CTC TCT CTC TCT CTC TA	350-1600	8	4	50.0	0.4800
ISSR19	AAC TCT CTC TCT CTC T	340-1150	10	0	0.0	
	Toplam		**56**	**15**	**26.78**	**0.4160**

‘Teksas’ çeşidine ait jel profillerinin yorumlanması sonucu elde edilen verilerle hazırlanan benzerlik matriksi (Çizelge 3.69) ve dendogram (Şekil 3.67) irdelendiğinde, benzerlik matriksinde ana bitki ve klonlar arasındaki benzerliklerin 0.796 ile 0.811 arasında değiştiği görülmekte olup, benzerlik matriks ortalaması 0.8546 olarak hesaplanmıştır. ‘Ferrastar’ ve ‘Nonpareil’ çeşitlerine ait verilerde ana bitki ve klonlar arasındaki genetik kararsızlıkların 3. altkültür sonrası elde edilen klonlarda olması nedeniyle, RAPD-PZR analizinde olduğu gibi ‘Teksas’ çeşidi için 6. alt kültür ve 9. alt kültür sonrası oluşan klonlarla ana bitki arasındaki genetik kararlılık bakılmıştır. Ana materyale en yakın klonun 9. alt kültürden sonra elde edilen klon (9-1) olup, ana bitkiye en uzak olan birey ise yine 9. alt kültüre ait olan klon 9-2’ dir. Elde edilen dendogramda 6. altkültüre ait klonlar bir arada; 9. altkültüre ait klonlar ise yine bir arada ancak farklı grupta bulunmaktadır.

Çizelge 3.69. *P. dulcis* ‘Teksas’ çeşidine ait ana bitki ile klonları arasında ISSR-PZR analizi ile elde edilen benzerlik matriksi.

	A	**6-1**	**6-2**	**9-1**	**9-2**
A	1,000				
6-1	0,836	1,000			
6-2	0,811	0,906	1,000		
9-1	0,849	0,873	0,815	1,000	
9-2	0,796	0,889	0,830	0,941	1,000



Şekil 3.67. *P. dulcis* 'Teksas' çeşidinin 4 klonundan, 8 ISSR primeri ile elde edilen 56 banttan UPGMA analizi ile oluşturulan dendogram. [A: Ana bitki, 6-1 ve 6-2: mikroaşılamadan sonra 6. alt kültüre ait klonlar, 9-1 ve 9-2: mikroaşılamadan sonra 9. alt kültüre ait klonlar].

4.TARTIŞMA

4.2. gDNA İzolasyon Yönteminin Seçimi

Odunsu bitkilerin birçoğunda polisakkarit, protein ve polifenol bileşikleri, izole edilen gDNA' nın saflığını etkilemekte ve bu durum sonrasında yapılacak olan gDNA amplifikasyon çalışmalarında sorun oluşturmaktadır (Ramirez ve ark., 2004; Özden Tokatlı, 2005). Bu nedenle, literatürde özellikle odunsu bitkilere ait gDNA izolasyonu örneğin, guavo, avakado, mango (Ramirez ve ark., 2004) ve antepfıstığı bitkilerinde (Özden-Tokatlı, 2005; Akdemir ve ark., 2012), kit yerine genellikle CTAB yöntemi kullanılarak, manuel olarak yapılmıştır. Ancak, tez kapsamında yapılan badem bitkisine ait örneklerde "*i-genomic* Plant DNA extraction Mini Kit" ile gDNA izolasyonu yapılmış ve uygun saflıkta ve miktarda DNA elde edilmiştir. Bu nedenle, kit kullanımına göre daha fazla zaman alan ve görece daha çok iş gücü gerektiren manuel gDNA izolasyonunun gerçekleştirilmesine gerek kalmamıştır. Tez kapsamında kullanılan ilgili kitin içerdiği spin kolonların kullanımı ile gDNA yukarıda adı geçen safsızlıklardan arındırılmıştır.

4.1. Klonların Genetik Kararlılıklarının İrdelenmesi İçin Yapılan RAPD-PZR ve ISSR-PZR Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Özellikle badem gibi *Prunus* çeşitlerinin kendine döllenmeyip, başka bir birey tarafında döllenmesi geleneksel üretimde meyve kalitesi ve verimini değiştirmektedir (Işıkalan ve ark., 2011). Bunun yanı sıra badem çeşitlerinin geleneksel yollar ile üretiminde birçok sorunla karşılaşılmaktadır ve bunların başında ağacın köklenme problemi gelmektedir (Tereso ve ark., 2008; Yıldırım ve ark., 2010, Namlı ve ark., 2011; Işıkalan ve ark., 2011). Bu sorunların giderilmesi ve üretimde miktar ve kalite artışı için *in vitro* mikroçoğaltım tekniklerinden biri olan mikroaşılama tekniği geliştirilmiştir. Dicle Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Bitki Biyoteknolojisi Laboratuvarı' nda Yıldırım ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen 'Ferragnes' ve 'Ferraduel' çeşitlerine ait mikroaşılama tekniğinin başarılı sonuçlar vermesinin ardından (Yıldırım ve ark., 2010) aynı ekip

tarafından bu defa da özellikle birbirlerinin tozlaştırıcısı durumunda olan ticari öneme sahip 'Nonpareil', 'Ferrastar' ve 'Texas' çeşitleri aynı yöntem kullanılarak, başarılı bir şekilde mikroaşılanmıştır. Tez kapsamında ise mikroaşılama çalışmalarının ardından ana bitki ve elde edilen klonların mikroaşılama ve bunu takiben mikroçoğaltma sonrasında oluşan bitkiciklerin genetik kararlılıkları moleküler belirteçler kullanılarak, irdelenmiştir.

Biyoteknolojik yöntemlerle geleneksel üretimde karşılaşılan sorunlar giderilmeye çalışılsa da, bu yöntemlerde kullanılan yöntemin, genotipin, kimyasallar (bitki büyüme düzenleyicileri, besiyeri hazırlanmasında kullanılan maddeler vb) özellikle mikroçoğaltımdaki kültür kabı içerindeki ortam şartları (kaptaki nem, besiyerine saldığı maddeler ve bunun öncesi ve sonrasında gelişen stres) alt kültür süre ve sıklığı nedeniyle *in vitro* çoğaltılan klonlarda morfolojik ve genetik değişimler görülebilmektedir (Pierik, 1987; Bairu ve ark., 2011). Bu nedenle, literatürde de belirtildiği gibi *in vitro* şartlarda çoğaltılan bitkilerin genetiksel olarak çoğaltımın başlatıldığı ana (verici) bitkiye göre varyasyon içermesini beklemek olasıdır (Kaya, 2011). Mikroçoğaltım sonucu yüksek oranda tespit edilen somaklonal varyasyon özellikle ticari olarak kullanılan çeşitler için önemlidir. Somaklonal varyasyonlar, morfolojik (Rodriguez ve ark., 1998); biyokimyasal (Wang ve ark., 2007); moleküler [sitolojik, protein, izozim, hibridizasyona dayanan (RFLP) ve PZR tabanlı (RAPD, AFLP ve mikrosatellit gibi)] yöntemler ile belirlenebilir (Bairu ve ark., 2011). Özellikle PZR tabanlı belirteçlerin geliştirilmesiyle literatürde somaklonal varyasyonun belirlenmesinde genellikle bu belirteçlerin tek başına veya diğer belirteçlerle birlikte kullanımı tercih edilmiştir (Martins ve ark., 2004; Bairu ve ark., 2011).

Olası somaklonal varyasyonun belirlenmesinde ilk olarak ucuz ve etkili bir PZR tabanlı teknik olan RAPD ile ilgili çalışmalar bulunmaktadır (Munthali ve ark., 1996; Mondal ve Chand, 2002). Ayrıca daha sonraki zamanlarda geliştirilen PZR tabanlı teknikler de (örneğin; ISSR, SSR ve AFLP) somaklonal varyasyonun belirlenmesi çalışmalarında kullanılmıştır (Bairu ve ark., 2011). Ancak son yıllarda somaklonal varyasyonların belirlenmesi için geliştirilen PZR tabanlı belirteçlerin kullanıldığı çalışmalarda bu tekniklerin tek başına kullanımlarının klonlarda bulunan olası genetik kararsızlıkların belirlenmesinde yeterli olmadığı ve bu tip çalışmaların

birden fazla moleküler belirteç kullanılarak yapılması gerektiği ortaya çıkmıştır (Martins ve ark., 2004). Bu nedenle, başta badem olmak üzere farklı bitkilerde mikroçoğaltım sonrası varyasyonların belirlenmesinde en az 2 farklı moleküler belirteç kullanılmıştır (örneğin; Martins ve ark., 2004; Leva ve Petruccelli, 2011; Bhatia ve ark., 2011). Olası somaklonal varyasyonların belirlenmesi için moleküler belirteçler arasından RAPD ve ISSR belirteçleri, uygulanmalarının görece kolaylığı ve ucuzluğu nedeniyle çokça tercih edilmektedir (Bhatia ve ark., 2011). Tez kapsamında yapılan çalışmada da *in vitro* koşullarda mikroaşılanan ticari öneme sahip badem çeşitlerinin belirlenen zaman dilimi içerisinde ('Ferrastar' ve 'Nonpareil' çeşidi için; 3., 6. ve 9. altkültür sonrası; 'Teksas' çeşidi için ise 6. ve 9. altkültür sonrası) alınan yaprak örneklerinden yapılan gDNA izolasyonunun ardından RAPD ve ISSR teknikleri kullanılarak, klonlarda bulunan olası genetik varyasyon irdelenmiştir. Yapılan moleküler analizler sonucunda bireylerde oluşan bant profillerinden elde edilen verilerle, polimorfizm oranı hesaplanmıştır. Buna ek olarak, tez kapsamında elde edilen polimorfik bantların görüldüğü birey sayısını da göz önüne alan ve son zamanlarda polimorfizm çalışmalarında kullanılan PIC değerleri de Botstein adlı araştırıcıya (1980) göre hesaplanmıştır.

Mikroaşılanan 'Ferrastar' çeşidine ait klonlarda yapılan RAPD analizleri sonucunda 6 primer ile çoğaltım sonucunda ana bitki ve klonlar arasında monomorfik bant elde edilirken, denenen 4 primer ile bireyler arasında polimorfik bantlar belirlenmiştir. Bu analiz sonucunda elde edilen ortalama polimorfizm oranı %6.25 olup, ortalama PIC değeri 0.2585' dir. Aynı bireylerin genetik kararlılıklarının ISSR ile irdelenmesi sonucunda ise 5 primer ile polimorfik bantlar elde edilmiş ve RAPD analizlerine göre görece fazla ortalama polimorfizm oranı (%22.38) ve yüksek ortalama PIC değeri (0.3592) elde edilmiştir. 'Nonpareil' çeşidinde ise mikroaşılama sonrası mikroçoğaltılan klonlar ve ana bitki arasında 5 primer ile monomorfik bant üretimi gerçekleşmiştir. Denenen diğer 5 primer ile bireyler arasında polimorfik bantlar belirlenmiştir. RAPD analizleri sonucunda bu çeşidin mikroaşılanan ve mikroçoğaltılan bireyleri arasındaki toplam polimorfizm oranı %10.2 olup, ortalama PIC değeri 0.4490' dir. Aynı bireylerin genomları ISSR belirteci kullanılarak, değerlendirildiğinde ise denenen 8 primerden 7 tanesinde polimorfik bantlar elde edilmiş ve 'Ferrastar' çeşidine ait klonlar ile elde edilen sonuçlara benzer şekilde 'Nonpareil' çeşidine ait klonlarda da ISSR belirteci ile

RAPD analizlerine göre daha yüksek polimorfizm oranı (%22.38) ve PIC değeri (0.3231) hesaplanmıştır.

Tez kapsamında mikroaşılama ve mikroçoğaltım sonrası genetik kararlılıkları irdelenen 'Texas' çeşidine ait bireylerin RAPD analizlerinde denenen 8 primer tamamen monomorfik bant oluşumu ile sonuçlanmış ve sadece 2 primer ile polimorfizm elde edilmiştir. Bu çeşide ait ana bitki ve klonlar arasındaki ortalama polimorfizm oranı %3.7 olup, PIC değeri 0.3733' dir. Tersine, bu bireylerin ISSR analizleri ile irdelenmesi sonucu, 8 primerden 6' sında polimorfik bantlar görülmüş ve tez kapsamında kullanılan diğer iki badem çeşidinde elde edilen sonuç ile benzer şekilde ISSR belirteçleri ile 'Texas' çeşidine ait klonlarda da daha yüksek polimorfizm oranı (%26.78) ve PIC değeri (0.4160) bulunmuştur.

Tez kapsamında kullanılan 3 çeşide ait bireylerde elde edilen bu sonuçlara göre mikroçoğaltım sonucunda çoğaltılan klon bitkiciklerin genetik kararlılıklarının birden fazla moleküler teknik ile irdelenmesi ve olası varyasyonun belirlenmesi için RAPD analizleri yerine ISSR belirtecinin tercih edilmesi gerekmektedir. Literatürde de ISSR belirteci ile RAPD analizine göre bireylerde daha fazla polimorfizm belirlendiğinden (Devarumath, 2002; Palombi ve Damiano, 2002; Borchetia ve ark., 2009; Alizadeh ve Singh, 2009; Mehrotra ve ark., 2012), tez kapsamında elde edilen bu bulgu literatür ile uyumludur. Ayrıca RAPD analizinde kullanılan rastgele tasarlanan primerlere göre ISSR primerlerinin tekrarlanan dizi bölgelerine yönelik olması yani çoğaltımın rastgele yerine belirli bir bölgeye hedeflenmesi ve ayrıca ISSR primerlerinin bağlanmasında kullanılan görece yüksek bağlanma sıcaklıkları bu belirtecin genoma spesifik bağlanmasını (Bhatia ve ark., 2011) ve dolayısıyla bireylerde var olan varyasyonun belirlenme olasılığını arttırmaktadır.

Yapılan moleküler analizler sonucunda ana bitki ile klonlar arasındaki varyasyonların 3. alt kültüre ait klonlardan sonra meydana geldiği ve varyasyonun 6. alt kültüre ait klonlarda genellikle artış gösterdiği görülmektedir. Uygulanan aşılama protokolü sonunda 3. alt kültüre kadar minimum düzeyde seyreden polimorfizmin 6. alt kültüre doğru artmasının nedeni, bitkilerin yapay bir besi ortamında ve sürekli bitki büyüme düzenleyicisi varlığında uzun süreli altkültürlenmesi olabilir. Bununla birlikte, PIC değeri>0.5 (örneğin, *Tylophora rotundifolia*' da; Sebastian ve ark.,

2010) ise polimorfizm yüksek derecedir, eğer 0.25<PIC<0.5 (örneğin, *Swertia chirata*' da; Chaudhuri ve ark., 2009) ise makul bir polimorfizm, eğer ki 0.25>PIC (örneğin, arpada (*Hordeum vulgare*)' de Campbell ve ark., 2011) ise zayıf polimorfizm varlığından bahsetmek gerekir (Botstein ve ark., 1980; Borchetia ve ark., 2009). Tez kapsamında kullanılan üç çeşide ait klonlarda elde edilen polimorfik bantlara bağlı olarak hesaplanan PIC değerlerine bakıldığında, bu değerlerin 0.5' ten küçük olması klonlarda ortaya çıkan varyasyonun makul bir düzeyde olduğunu ve polimorfizmin yüksek olmadığını ortaya çıkarmaktadır (Chaudhuri ve ark., 2009; Borchetia ve ark., 2009). PIC değeri ile ilgili derlenen çalışmalarda da bu oranın önemi sıkça vurgulanmaktadır (Borchetia ve ark., 2009; Naghavi ve ark., 2009; Sharma ve ark., 2012).

Tez kapsamında somaklonal varyasyonların tespiti için, RAPD ve ISSR belirteçleri kullanılmıştır. Mikroaşılama ve mikroçoğaltım sonrası elde edilen klonlarda olası genetik kararsızlık AFLP ile epigenetik varyasyonlar ise MSAP gibi farklı moleküler belirteçler kullanılarak, irdelenebilir. Ancak yine de tez kapsamında kullanılan moleküler belirteçlerle tespit edilen polimorfizm oranı, uygulanan mikroaşılama ve mikroçoğaltım protokollerinin badem bitkisinde uygulanabilir olduğunu göstermektedir.

5. SONUÇ

Yıldırım ve arkadaşları tarafından 2010 yılında 'Ferragnes' ve 'Ferraduel' çeşitleri için geliştirilen mikroaşılama tekniği, ticari öneme sahip 'Nonpareil', 'Ferrastar' ve 'Texas' badem çeşitlerinin de mikroaşılanmasında başarılı sonuçlar vermiştir. Ancak yöntemin ve sonrasında seçilen elit klonların uzun süreli *in vitro* çoğaltımının klonlar ve ana bitki arasında genetik kararsızlığa neden olma olasılığı tez kapsamında bu bireylerin iki farklı moleküler belirteç ile irdelenme gerekliliğini ortaya çıkartmıştır. Bu nedenle, tez kapsamında her üç çeşide ait ana bitki ve klon bireyler, RAPD ve ISSR belirteçleri ile analiz edilmiş ve elde edilen sonuçlar maddeler halinde aşağıda sıralanmıştır:

- 'Ferrastar' çeşidi için RAPD analizi sonucunda ana bitki ve klonlarda toplam 96 bant elde edilmiştir. Bu bantların 6 tanesi polimorfik olup, bireyler arasındaki ortalama polimorfizm oranı %6.25 ve ortalama PIC değeri 0.2585' dir. ISSR belirtecinin kullanımı ile ise toplamda 67 bant elde edilmiştir. Bu bantların 15' i polimorfik olup, ortalama polimorfizm oranı %22.38 ve ortalama PIC değeri 0.3592'dir.

- 'Nonpareil' çeşidi için RAPD analizi sonucunda ana bitki ve klonlarda toplam 98 bant elde edilmiştir. Bu bantların 10 tanesi polimorfik olup, bireyler arasındaki ortalama polimorfizm oranı %10.2 ve ortalama PIC değeri 0.4490' dır. ISSR belirtecinin kullanımı ile ise toplamda 69 bant elde edilmiştir. Bu bantların 24' ü polimorfik olup, ortalama polimorfizm oranı %37.38 ve ortalama PIC değeri 0.3231' dir.

- 'Texas' çeşidi için RAPD analizi sonucunda ana bitki ve klonlarda toplam 81 bant elde edilmiştir. Bu bantların 3 tanesi polimorfik olup, bireyler arasındaki ortalama polimorfizm oranı %3.7 ve ortalama PIC değeri 0.3733' dir. ISSR belirtecinin kullanımı ile ise toplamda 56 bant elde edilmiştir. Bu bantların 15' i polimorfik olup, ortalama polimorfizm oranı %26.78 ve ortalama PIC değeri 0.4160' dir.

- Tez kapsamında denenen her üç çeşitte de ISSR analizi ile RAPD belirtecine göre daha yüksek polimorfizm oranı ve PIC değeri elde edilmiştir.

- Ana bitki ve klonlar arasında elde edilen polimorfizm oranı ve PIC değerlerine göre mikroaşılama sonrası her üç türün bireylerinde de uygulanan çoğaltım metodu azda olsa genetik kararsızlığa neden olmuştur. Ancak, bu varyasyon, her üç türde de iki moleküler belirteç ile irdelenme sonucunda hesaplanan PIC değerlerinin 0.5' ten küçük olması nedeniyle, makul bir polimorfizm olarak görülmektedir.

- Gerçekleştirilen başarılı mikroaşılama protokolünü takiben uygulanan mikroçoğaltım yönteminin klonlarda önemli bir varyasyona neden olmadığı ortaya çıkartılmış ve diğer badem çeşitlerine de yöntemin uygulanabilir olduğu görülmüştür.

- Tez kapsamında elde edilen sonuçlar, 2012 yılında SCI kapsamında bulunan "Biotechnology and Biotechnological Equipment" dergisinde yayınlanmıştır (Yıldırım ve ark., 2012).

6. KAYNAKLAR

1. **Ainsley, P.J., Collins, G.C. and Sedgley, M.** 2000. Adventitious shoot regeneration from leaf explants of almond (*Prunus dulcis* Mill.). In Vitro Cell Dev. Biol. Plant. 36, 470–474.

2. **Ainsley, P.J., Collins, G.G. and Sedgley, M.** 2001. *In vitro* rooting of almond (*Prunus dulcis* Mill.). In Vitro Cell Dev. Biol. Plant. 37, 778–785.

3. **Akbas, F., Işıkalan, Ç., Namlı, S. and Ak, B.E.** 2009. Effects of plant growth regulators on *in vitro* shoot multiplication of *Amygdalus communis* L. cv. Yalsinki. African Journal of Biotechnology. Vol. 8 (22):6168-6174.

4. **Akdemir, H., Süzerer, V., Tilkat, E., Yıldırm, H., Onay, A. and Özden-Çiftçi, Y.** 2012. *In vitro* conservation and cryopreservation of mature pistachio (*Pistacia vera* L.) germplasm. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology (DOI 10.1007/s13562-012-0109-2).

5. **Aktürk, Z.** 2009. Kiraz' ın (Prunus avium) *in vitro* mikroçoğaltımı, Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Ensititüsü, Doktora Tezi, s. 190.

6. **Alizadeh, M. and Singh, S.K.** 2009. Molecular assessment of clonal fidelity in micropropagated grape (*Vitis* spp.) rootstock genotypes using RAPD and ISSR markers. Iranian J. of Biotech. 7(1): 37-44.

7. **Amiri, M.E.** 2006. *In vitro* technique to study the shoot tip grafting of *Prunus avium* L. (Cherry) var. Seeyahe Mashad. *J. Food Agriculture & Environment*, 4(1): 151-154.

8. **Anonim (Kütevin, Z. ve Kütevin, E.)** 1990. Genel Meyve Tarım Prensipleri ve Pratik Meyvecilik Yöntemleri, Sf. 247-249.

9. **Anonim, (Özsu B.,)** 2003. Badem derlemesi.

10. **Anonim, 2000.** Devlet Planlama Teşkilatı, VIII.Beş Yıllık Kalkınma Planı, Bitkisel Üretim Özel İhtisas Komisyonu, Meyvecilik Grubu Badem Raporu.

11. **Antonelli, M.** 1992. Regeneration from almond cotyledons: induction of proembryonal masses. Acta Hortic 300:255–260.

12. **Bairu, W.M., Aremu, A.O. and Van Staden, J.** 2011. Somaclonal variation in plants: causes and detection methods, Plant Growth Regul., 63:147-173.

13. **Bhat, K.V.** 2002. Molecular data analysis. In: Proceedings of the Short-Term Training Course on Molecular Marker Application in Plant Breeding. ICAR, New Delhi.

14. **Bhatia, R., Singh, K.P., Sharma, T.R. and Jhang, T.** 2011. Evaluation of thegenetic fidelity of *in vitro* propagated gerbera (*Gerbera jamesonii* Bolus) using DNA-based markers. Plant Cell Tissue Organ Cult., 104: 131-135.

15. **Borchetia, S., Das, S.C., Handique, P.J. and Das, S.** 2009. High multiplication frequency and genetic stability for commercialization of the three varieties of micropropagated tea plants (*Camellia* spp.), Scient. Hortic., 120:544-550.

16. **Borkowska, B.** 1985. Micropropagation of Sour Cherry Cultivar Schattenmorelle". *Acta Horticulturae,* 169: 329-333.

17. **Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M. and Davis, R.W.** 1980. Construction of a genetic linkage map using restriction fragment length polymorphisms. Am. J. Human Genet. 32, 314–331.

18. **Caboni, E. and Damiano, C.** 1994. Rooting in two almond genotypes. Plant Sci. 96:163–165.

19. **Campbell, B.C., LeMare, S., Piperidis, G. and Godwin, I.A.** 2011. IRAP, a retrotransposon-based marker system for the detection of somaclonal variation in barley. Mol Breeding 27:193–206.

20. **Channuntapipat, C., Sedgley, M. and Collins, G.** 2003. Micropropagation of almond cultivars Nonpareil and Ne Plus Ultra and the hybrid rootstock TitanxNemaguard. Sci. Hort. 98: 473–484.

21. **Chaudhuri, R.K., Pal, A. and Jha, T.B.** 2009. Regeneration and characterization of Swertia chirata Buch.-Ham. ex Wall. Plants from immature seed cultures, Scient. Hortic., 120:107-114.

22. **Cheong, E.J.** 2012. Biotechnological approaches for improvement and conservation of Prunus species, Plant Biotech. Rep., 6:17-28.

23. **Colin, J. and Verhoyen, M.** 1975. Identification des virüs chez les *Prunus* ornementaux en Belgique. Rev. Agric., 28:935-951.

24. **Damiano, C., Esposito, P., Curir, P. and Ruffoni, B.,** 1988. Micrografting in *Genista monosperma* Lam. Abstracts, International symposium on vegetative propagation of woody species, Pisa, İtaly.

25. **Devarumath, R.M., Nandy, S., Rani, V., Marimuthu, S., Muraleedharan, N. and Raina, S.N.** 2002. RAPD, ISSR and RFLP fingerprints as useful markers to evaluate genetic integrity of micropropagated plants of three diploid and triploid elite tea clones representing *Camellia sinensis* (China type) and C. assamica ssp. Assamica (Assam-India type). Plant Cell Rep 21:166–173.

26. **El-Maarri,** O. 2003. "Methods: DNA methylation"., Advances in Experimental Medicine and Biology 544: 197–204.

27. **Evans, D.A.** 1988. Applications of Somaclonal Variation . Biotechnology in Agriculture, 203-223.

28. **FAOSTAT,** 2009. http://faostat.fao.org.

29. **Felipe, A.J.** 1989. Patrones para frutales de pepita y hueso. Ediciones Tecnicas Europeas, S.A. Barcelona, Spain.

30. **Felipe, A.J.** 2000. *El almendro. I. El material vegetal*. Integrum, Lleida, Spain.

31. **George, E.F.,** 1993. Plant Propagation by Tissue Culture, Part 1, The Technology, Exegetics Ltd., England.

32. **Ghorbel, A., Chatibi, A., Thaminy, S. and Kchouk, M.L.** 1998. Micrografting of almond (*Prunus dulcis* Mill.) cv Achak. Acta Hort. (ISHS) 470:429–433.

33. **Gomez, M.P. and Segura, J.** 1995. Axillary shoot proliferation in cultures of explants from mature juniperus oxycedrus trees, Tree Physiol. 15(9):625-628.

34. **Grant, N.J. and Hammat, N.** 1999. Increased root and shoot production during micropropagation of cherry and apple rootstocks: effect of subculture frequency. Tree Physiol. 19:899-903.

35. **Gülcan, R.** 1976. Aegea University, publication of Agriculture Science No:310, İzmir/Turkey, 72s.

36. **Haberlandt, G.,** 1902. Kültürversuche mit isolierten Pflanzenzellen. Sitzungsber. Akad. Wiss. Wien. Math.-Naturwiss. Kl., Abt. J. 111, 69–92.

37. **Hammatt, N.** 1999. Delayed flowering and reduced branching in micropropagated mature wild cherry (*Prunus avium* L.) compared with rooted cuttings and seeling. Plant Cell Rep. 18:478-484.

38. **Hammatt, N. and Grant N.J.** 1997. Micropropagation of Mature British Wild Cherry. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture,* 47: 103-110.

39. **Hammerschlag, F.A. and Scorza, R.** 1991. Field performance of micropropagated, own-rooted peach trees. J. Am. Soc. Hort. Sci. 116:1089-1091.

40. **Harada, H. and Murai, Y.** 1996. Micropropagation of Prunus mume. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 46, 265–267.

41. **Hashmi, G., Huettel, R., Meyer, R., Krusberg, L. and Hammerschlag, F.** 1997. RAPD analysis of somaclonal variants derived from embryo callus cultures of peach. Plant Cell Rep 16:624–627.

42. **Henry, P.H., Blazich, F.A. and Hinesley, L.E.** 1992. Vegetative Propagation of eastern red cedar by stem cuttings, Hort. Sci. 27(12):1272-1274.

43. **Hokanson, K.E. and Pooler, M.R.** 2000. regeneration of ornamental cherry (*Prunus*) taxa from mature stored seed. *HortScience*, 35: 745-748.

44. **Işıkalan, Ç., Namlı, S., Akbas, F. and Ak, B.E.** 2011. Micrografting of almond (*Amygdalus communis*) cultivar 'Nonpareil'. Australian Journal of Crop Science, 5(1):61-65.

45. **Jaccard, P.** 1908. Nouvelles recherches sur la distribution florale. Bull. Soc. Vaudoise Sci. Nat. 44:223-270.

46. **Kaeppler, S.M., Kaeppler, H.F. and Rhee, Y.** 2000. Epigenetic aspects of somaclonal variation in Matzke, M.A. and Matzke, A.J.M. (Eds.), Plant Gene Silencing. Plant Molecular Biology 43: 179–188. Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands.

47. **Kaya, E.** 2011. Kekik (*Thymus* v*ulgaris* L.) Bitkisinin *in vitro* Doku Kültürü Yöntemleriyle Mikroçoğaltımı ve Tek Aşamalı Dondurma Yöntemleriyle Kriyoprezervasyonu, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, s. 201.

48. **Kester D.E., Gradziel T.M. and Grasselly C.** 1990. Almonds (*Prunus*). Acta Hort. 290:699–758.

49. **Kester, D.E. and Asay, R.** 1975. Almonds, In: J. Janick and J.N. Moore (eds.):Advances in fruit breeding. Purdue Univ. Press, West Lafayette, IN, USA ,387–419.

50. **Kester, D.E. and Gradziel, T.M.** 1996. Almonds, In: J. Janick and J.N. Moore (eds.): Fruit breeding, vol 3, John Wiley & Sons, New York, USA 1–97.

51. **Kester, D.E. and Grasselly, C.** 1987. Almond rootstocks, p. 265–293. In: R.C. Rom and R.F. Carlson (eds.). Rootstocks for fruit crops. Wiley, New York, USA.

52. **Kochba, J.P. and Spiegel-Roy, P.** 1976. 'Alnem 1', 'Alnem 88', 'Alnem 201' almonds: Nematoderesistant rootstock seed source. HortScience 11:270.

53. **Kovach, W.L. 1999.** MVSP-A Multi Variante Statistical Package for Windows, ver. 3.1. Kovach Computing Services, Pentraeth, Wales, UK.

54. **Kramarenko, L.A.** 1999. Micropropagation of Apricot and Field Performance of *in vitro* Propagated Plants. *Acta Horticulturae*, 488: 417-420.

55. **Küden, A.B.** 1998. Almond Germplasm and Production in Turkey; Future of Almond cultivation in the GAP Area. Acta Hort. (ISHS), 470:29-33.

56. **Ladizinsky, G.** 1999. On the origin of almond. Genet. Resour. Crop Evol. 46:143–147.

57. **Larkins, P. and Scowcroft W.R.** 1981. Somaclonal variation, a novel source of variability frommcell cultures for plant improvement. Theor. Appl. Gent. 60:197-214.

58. **Leva, A.R. and Petruccelli, R.** 2012. Monitoring of cultivar identity in micropropagated olive plants using RAPD and ISSR markers, Biologia Plantarum, 56(2):373-376.

59. **Li, Y., Shan, X., Liu, X., Hu, L., Guo, W. and Liu, B.** 2008. Utility of the methylation-sensitive amplified polymorphism (MSAP) marker for detection of DNA methylation polymorphism and epigenetic population structure in a wild barley species (*Hordeum brevisubulatum*), Ecol. Res., 23:927-930.

60. **Marin, J.A., Catillo, M., Garcia, E. and Andreu, P.** 2003. Field performance of grafted fruit-tree rootstock was not affected by micropropagation. Acta Hort. 616:295-299.

61. **Martinez, R., Cintron, G. and Encarnacion, L.A.** 1979. Mangroves in Puerto Rico: *A Structural Inventor*y. San Juan, Department of Natural Resources, (Final Report office of Coastal Zone Management, NOAA), 149 p.

62. **Martínez-Gómez, P., Sánchez-Pérez, R.., Dicenta, F. and Gradziel, T.M.** 2005. Improved technique for Counting Chromosomes in Almond. Scientia Horticulturae, 105: 139-143.

63. **Martins, M., Sarmento, D. and Oliveira, M.M**. 2004. Genetic stability of micropropagated almond plantlets as assessed by RAPD and ISSR markers. Plant Cell Reports 23 (7):492-496.

64. **Mehrotra, S., Khwaja, O., Kukreja, A.K. and Rahman, L.** 2012. ISSR and RAPD based evaluation of genetic stability of encapsulated microshoots of *Glycyrrhiza glabra* following 6 months of storage. Mol Biotechnol, 52:262–268.

65. **Miguel, C.M., Druart, P. and Oliveira, M.** 1996. Shoot regeneration from adventitious buds induced on juvenile and adult almond (*Prunus dulcis* Mill.) explants. In Vitro Cell Dev Biol Plant 32:148-153.

66. **Molassiotis, A.N., Dimassi, K., Therios, I. and Diamantidis, G.** 2003. Fe-EDDHA promotes rooting of rootstock GF-677 (*Prunus amygdalus* X *P. persica*) explants *in vitro*. Biol. Plant. 47:141-144.

67. **Mondal, T.K. and Chand, P.K.** 2002. Detection of genetic variation among micropropagated tea [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze] by RAPD analysis. In Vitro Cell Dev Biol Plant 38:296–299.

68. **Mosella Chance L.L., Signoret P.A. and Jonar D.J.** 1980. Sur la mise au point de techniques de microgreffage d'apex en vue de l'élimination de deux types de particules virales chez le pecher (*Prunus persica* Batsch.). C. R. Academie Sciences, Series D, *290*: 287–290.

69. **Munthali, M.T., Newbury, H.J., and Ford-Lloyd, B.V.** 1996. The detection of somaclonal variants of beet using RAPD. Plant Cell Rep 15:474–478.

70. **Murashige T., Skoog F.** 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15: 473-497.

71. **Naghavi, M.R., Maleki, M. and Tabatabaei, S.F.** 2009. Efficiency of Floristic and Molecular Markers to Determine Diversity in Iranian Populations of *T. boeoticum*. Int. J. Biol. Life Sci., 5(1): 71-73.

72. **Namlı, S., Işıkalan, Ç., Akbas, F. and Basaran, D.** 2011. Improved *in vitro* rooting of almond (*Amygdalus communis*) cultivar "Nonpareil". Plant Omics Journal, 4(1):14-18.

73. **Navarro, L., Roistacher, C.N. and Murashige, T.** 1985. Improvement of shoot-tip grafting *in vitro* for virus-free citrus. Journal of American Society and for Horticultural Science, 100:471–479.

74. **Nemeth, G.** 1979. Benzyl Adenine Stimulated Rooting in Fruit Tree Rootstocks Cultured in-Vitro. Zeitschrift fuer Pflanzenphysiologie 95, 389-96.

75. **Nowak, B., Miczynski, K., and Hudy, L.** 2004. Sugar uptake and utilization during adventitious bud differantion on *in vitro* leaf explants of "Wegierka Zwykla" plum (*Prunus domestica*). Plant Cell Tiss. Organ Cult. 76:255-260.

76. O**nay, A., Pirinç, V., Işıkalan, C., Adıyaman, F., Tilkat, E. and Başaran, D.** 2003. *In vivo* and *in vitro* micrografting of pistachio, *Pistacia vera* L. cv."Siirt". *Tur. J Biol*, 27: 95-100.

77. **Onay, A., Pirinç, V., Yıldırım, H. and Başaran, D.** 2004. *In vitro* micrografting of pistachio (*Pistacia vera* L. var. Siirt). *Plant Cell. Tiss. Org Cult*. 77: 215-219.

78. **Özçağıran, R., Ünal, A., Özeker, E. ve İsfendiyaroğlu, M.** 2003. Ilıman iklim Meyve Türleri: Sert çekirdekli meyveler, Ege Üniversitesi Yayınları, 1:553 s 208.

79. **Özden-Tokatlı, Y.** 2005. Antepfıstığı (*P. vera* L.) bitkisinin doku kültürü yöntemleri ile *in vitro* rejenerasyonu ve mikroçoğlatımı, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Fen Bilimleri Enstittüsü, Doktora Tezi, s 195.

80. **Palombi, M.A. and Damiano, C.** 2002. Comparison between RAPD and SSR molecular markers in detecting genetic variation in kiwifruit (*Actinidia deliciosa* A. Chev). Plant Cell Rep. 20:1061-1066.

81. **Pathirana, R. and McKenzie, M.J.** 2005. Early detection of grapevine leafroll virus in *Vitis vinifera* L. using in vitro micrografting Plant Cell, Tissue Org Cult, 81:11–18.

82. **Pérez-Tornero, O., L. Burgos, and J. Egea.** 1999. Introduction and establishment of apricot *in vitro* through regeneration of shoots from meristem tips. In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant 35: 249-253.

83. **Piagnani, C., Iacona, C., Intrieri, M.C. and Muleo, R.** 2005. Somaclonal variant in 'Hedelfinger' sweet cherry. Acta Hortic 667:93–99

84. **Pierik, R.L.M.** 1987. In vitro culture of higher plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

85. **Pruski, K.W., Lewis, T., Astatkie, T. and Nowak, J.** 2000. Micropropagation of chokecherry and pincherry cultivars. Plant Cell Tiss. Organ Cult. 63:93-100.

86. **Quoirin, M. and Lepoivre, P.** 1977. Improved media for *in vitro* culture of *Prunus* sp., Acta Horticulturae 78:437-442.

87. **Ramirez, I.M., Rodriguez, N.N., Valdez-Infante, J., Capote, M., Becker, D and Rohde, W.** 2004. Isolation of Genomic DNAs from tropical fruit trees avocado, coconut, guavo and mango for PCR-based DNA marker application, Cultivos Tropicales, 25:(1)33-38.

88. **Reyna-Lopez, G.E., Simpson, J. and Ruiz-Herrera, J.** 1997. Differences in DNA methylation patterns are detectable during the dimorphic transition of fungi by amplification of restriction polymorphisms, Mol. Gen. Genet, 253:703-710.

89. **Rodrigues, P.H.V.** 2008. Somaclonal variation in micropropagated Heliconia bihai cv. Lobster Claw I plantlets (Heliconiaceae). Sci Agric 65:681–684.

90. **Rogalski, M., Moraes L.K.A., Feslibino C., Crestani L., Guerra M.P. and Silva A.L.** 2003. Aclimatizacao de Porta-Enxertos de *Prunus* sp. Micropropagados. *Revista Brasileira de Fruticultura*. 25(2): 279-281.

91. **Rohlf, F.J.** 1993. NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system. Exeter Publishing Ltd, New York.

92. **Rugini, E. and Verma D.C.** 1983. Micropropagation of difficult-to-propagate almond (*Prunus amygdalus*, Batsch) cultivar. Plant Sci. Lett. 8:273–281.

93. **Sarmento, D., Martins, M., Oliveira, M.M.** 2005. Evaluation of somaclonal variation in almond using RAPD and ISSR markers. - Option Méditerranéennes 63: 391-395, 2005.

94. **Sebastian, V.A., Cruz, L.D., Subramanian, R.B. and Braganza, V.J.** 2010. Assessment of genetic diversity within and among populations of *Tylophora rotundifolia* using RAPD markers, Gene Conserve, 36, 94-117.

95. **Sharma, D., Kaur, R., Kumar, K. and Bhardwaj, S. 2012.** Genetic diversity among selected genotypes of almond *Prunus dulcis* Miller D.A. Webb assessed by random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers, African Journal of Biotechnology Vol. 11(83):14877-14883.

96. **Socias is Company, R., Alonso, J.M., Kodad, O. and Graidzel, T.M.** 2012. Almond, In: Badenes, M.L. (Ed.), Fruit Breeding, 701-732.

97. **Soliman, H.I.A.** 2012. *In vitro* propagation of Apricot (*Prunus armeniaca* L.) and Assessment of Genetic Stability of Micropropagated Plants Using RAPD Analysis, World Applied Sciences Journal 19(5): 674-687.

98. **Soylu, A.** 2003. Ilıman iklim meyveleri II. Uludağ Ziraat Fakültesi Ders Notları, Bursa, 72:204-220.

99. **Tabacknik, L. and Kester, D.E.** 1977. Shoot culture for almond and almond-peach hybrid clones *in vitro*. HortScience 12:545-547.

100. **Teixeira, P.T., Silva A.L., Ducroquet J.P and Guerra M. P.** 2004. Multiplicacao *in vitro* do Porta-Enxerto de *Prunus* spp. 'Carelli'. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 26(2): 377-379.

101. **Tereso, S., Miguel, C.M., Mascarenhas, M., Roque, A.,Trindade, H., Maroco, J. and Oliveira, M.M.** 2008. Improved *in vitro* rooting of *Prunus dulcis* Mill. cultivars. Biol. Plant., 52: 437–444.

102. **Theiler-Hedtrich, C.M. and Feucht, W.** 1985. Micropropagation of *Prunus cerasus* Rootstocks: Influence of Culture Medium Constituents on Growth in Stage I and II. *Acta Horticulturae,* 169: 335-340.

103. **Thorpe, T.** 2007. History of Plant Tissue Culture. Molecular Biotechnology. 37: 169-180.

104. **Tilkat, E.** 2006. "Erkek Antepfıstığı (*Pistacia vera L. cv. 'Atlı'*) Ağaçlarının *in vitro* Mikroçoğaltılması., Doktora Tezi, Dicle üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 144 pp. Eylül 2006.

105. **Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. and Zabeau, M.** 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Res. 23:4407–4414.

106. **Wang, Y., Wang, F., Zhai, H. and Liu, Q.** 2007. Production of a useful mutant by chronic irradiation in sweetpotato. Sci Hortic 111:173–178.

107. **Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Liva, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey S.V.** 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucl. Acid Res. 18:6531-6535.

108. **Wu, H.C., du Toit ES and Reinhardt, C.F.** 2007. Micrografting of *Protea cynaroides*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 89:23–28.

109. **Yıldırım. H., Onay, A., Süzerer, V., Tilkat, E., Özden-Tokatlı, Y. and Akdemir, H.** 2010. Micrografting of almond (*Prunus dulcis* Mill.) cultivars "Ferragnes" and "Ferraduel". Scientia Horticulturae 125:361-367.

110. **Zeitkiewicz, E., Rafalski, A. and Labuda, D.** 1994. Genome finger printing by simple sequence repeat (SSR)-anchored PCR amplification. Genomics 20:176-183.

ÖZGEÇMİŞ

Veysel SÜZERER

Doğum Tarihi: 26.10.1986 Gaziantep

Eğitim

İlköğretim

Ahmet Çelebi İlköğretim Okulu-Gazi İlköğretim Okulu

1992-2000

Lise

Gaziantep Lisesi YDA

2000-2004

Lisans

Dicle Üniversitesi, Biyoloji Bölümü

2005-2010

Fen Fakültesi ve Biyoloji Bölümü Birinciliği

Kimya Bölümü

2006-2012

Yüksek Lisans

Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü

2011-2013

Yayınlar

SCI (Science Citation Index) ve SCI Expanded, SSCI (Social Science Citation Index) kapsamındaki dergilerde yayınlanan makaleler

1. Onay A. , Tilkat E. , Yıldırım, H. and **Süzerer V.** (2007) Indirect somatic embryogenesis from mature embryo of Pistachio, *Pistacia vera* L. Propagation of Ornamental Plants, 7(2):68-74.

2. Yıldırım H., Onay A., **Süzerer V.,** Tilkat E., Ozden-Tokatlı Y., Akdemir H. (2010). Micrografting of almond (*Prunus dulcis* Mill.) cultivars "Ferragnes" and "Ferraduel". Scientia Horticulture, 125:361-367.

3. Hülya Akdemir, **Veysel Süzerer,** Engin Tilkat, Hakan Yildirim, Ahmet Onay, Yelda Özden-Çiftçi (2012). *In vitro* conservation and cryopreservation of mature pistachio (*Pistacia vera* L.) germplasm. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology (DOI 10.1007/s13562-012-0109-2).

4. Hakan Yıldırım, Hülya Akdemir, **Veysel Süzerer,** Yelda Özden, Ahmet Onay (2012). *In vitro* micrografting of the almond cultivars “Texas”, “Ferrastar” and “Nonpareil”. Biotechnology and Biotechnological Equipment, (DOI: 10.5504/bbeq.2012.0087).

Uluslararası kongrelerde sunulan, SCI, SCI Expanded, SSCI ve AHCI kapsamındaki dergi özel sayılarında veya aynı kapsamlardaki kongre kitabında tam metni yayınlanmış bildiriler

1. Onay A., **Süzerer V.,** Akdemir H., Yildirim H., Ozden Tokatlı Y, Tilkat E. 2011. Somatic Embryogenesis in Pistachios. Acta Horticulturea (V. ISHS International Symposium on Pistachios and Almonds. September, Şanlıurfa, Turkey). Acta Hortic. 912:587-592.

2. Onay A., **Süzerer V.,** Akdemir H., Yildirim H., Ozden Tokatlı Y, Tilkat E. 2011. Micropropagation of Pistachio: "The Wave of the Future Acta Horticulturea (V. ISHS International Symposium on Pistachios and Almonds. September, Şanlıurfa, Turkey). Acta Hortic. 912:553-559.

3. Tilkat E., Akdemir H., Yildirim H., Ozden Tokatlı Y., **Süzerer V.,** Onay A. 2011. Plant Production Through Adventive Organogenesis of Mature Pistachio, “*Pistacia vera* L. Cultivars Atlı and Siirt". Acta Horticulturea (V. ISHS International Symposium on Pistachios and Almonds. September, Şanlıurfa, Turkey). Acta Hortic. 912:567-574.

Uluslararası kongrelerde sunulan, SCI, SCI Expanded, SSCI ve AHCI kapsamındaki dergi özel sayılarında veya aynı kapsamlardaki kongre kitabında özeti yayınlanmış bildiriler

1. Ahmet Onay, Hakan Yildirim, Yelda Ozden Tokatli, Hulya Akdemir, **Veysel Suzerer** 2011. Plant tissue culture techniques — Tools in plant micropropagation. Current Opinion in Biotechnology Volume 22, Supplement 1, September 2011, p 130 European Biotechnology Congress, İstanbul, Turkey.

2. **Veysel Süzerer,** Hülya Akdemir, Hakan Yıldırım, Ahmet Onay, Yelda Özden Çiftçi, 2012. "Assesment of genetic stability of *in vitro* micrografted and micropropagated almond cv. Texas". June 2012, *In vitro* Biology Meeting of the SIVB, pp 77-78, Seattle, Washington, USA.

3. Doğa Gümüşel, Hülya Akdemir, **Veysel Süzerer,** Yelda Özden Çiftçi, 2012. "Influences of different medium compositions and cytokinins on micropropagation of fraser photinia". June 2012, In vitro Biology Meeting of the SIVB, pp 76-77, Seattle, Washington, USA.

Ulusal konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında özetleri yer alan bildiriler

1. Tilkat E., V. Okumuş, **V. Süzerer** ve A. Onay, "Olgun Antepfıstığı Rejenerantlarının in vitro köklenmesinin iyileştirilmesi" 19. Ulusal Biyoloji Kongresi, s 435. Haziran 2008, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Trabzon.

2. Onay A., E. Tilkat, V. Okumuş ve **V. Süzerer** "Antepfıstığının Mikroçoğaltılmasındaki Yeni Metodlar" 19. Ulusal Biyoloji Kongresi, s 141, Haziran 2008, Karadeniz Teknik Universitesi, Trabzon.

3. Ahmet Onay, Hakan Yıldırım, Barış Eren, **Veysel Süzerer,** Doğa Gümüşel, İbrahim Koç, Veysi Okumuş, Zafer Aktürk, Engin Tilkat, Yelda Özden. Sakız Ağacının (*Pistacia Lentiscus* L.) *In vitro* Mikroçoğaltımı. 20. Ulusal Biyoloji Kongresi, ss 158-159, Haziran 2010, Denizli, Türkiye.

4. Yelda Özden Çiftçi, Hülya Akdemir, **Veysel Süzerer,** Engin Tilkat, Ahmet Onay Olgun Antepfıstığı Mikrosürgünlerinin Orta Süreli *in vitro* Saklanması, Uluslararası katılımlı Bilim ve Kültür Sempozyumu, ss 395-402, Batman Üniversitesi-Batman, Nisan 2012.

5. Ahmet Onay, Hakan Yıldırım, Vedat Pirinç, Engin Tilkat, Yelda Özden Çiftçi, Hülya Akdemir, **Veysel Süzerer,** Nazan Çalar, Mahir Binici, Ömer Faruk Akdemir, Fatih Mehmet Kılınç. Bitkilerin biyoteknolojik yöntemlerle

ticari çoğaltımı, mevcut ve gelecekteki durum. Uluslararası katılımlı Bilim ve Kültür Sempozyumu, ss 11-28, Batman Üniversitesi-Batman, Nisan 2012.

6. Engin Tilkat, Yusuf Ersalı, Ayşe Hoşer, **Veysel Süzerer,** Emine Ayaz Tilkat, Hülya Akdemir, Yelda Özden Çiftçi, Hakan Yıldırım, Ahmet Onay. Antepfıstığı anaçlarının *(Pistacia terebinthus, Pistacia vera, Pistacia khinjuk ve Pistacia paleastina) in vitro* mikroçoğaltılması. 21.Ulusal Biyoloji Kongresi, ss 714-715, İzmir, Eylül 2012.

7. Ahmet Onay, Hakan Yıldırım, Yelda Özden Çiftçi, Engin Tilkat, Mahir Binici, Nazan Çalar, Fatih Mehmet Kılınç, Hülya Akdemir, Ömer Faruk Akdemir, **Veysel Süzerer,** İbrahim Koç. Bitkilerin *in vitro* mikroçoğaltım teknikleri, 21.Ulusal Biyoloji Kongresi, ss 152-153, İzmir, Eylül 2012.

8. Hakan Yıldırım, Nazan Çalar, Mahir Binici, Fatih Mehmet Kılınç, Engin Tilkat, **Veysel Süzerer,** Yelda Özden Çiftçi, Ahmet Onay. Sakız ağacının (*Pistacia lentiscus* L.) organogesisle çoğaltımı, 21.Ulusal Biyoloji Kongresi, s 153, İzmir, 3-7 Eylül 2012.

Projeler

Tübitak **TBAG 209T030** 2010 (Mayıs)-2013 (Mayıs). Proje Asistanı."Antepfıstığının (*Pistacia vera* L.) Juvenil ve Olgun 'Siirt' ve Olgun 'Atlı' Çeşitlerinin TİS Biyoreaktör Sistemleri Kullanılarak Mikroçoğaltımı, Kriyoprezervasyonu ve Çoğaltılan/Kriyoprezerve Edilen Bitkilerin Genetik Kararlılıklarının Belirlenmesi İçin Biyoteknolojik Yöntemlerin Geliştirilmesi"

Kitap Çeviri

Veysel Süzerer, Yelda Özden Çiftçi, İbrahim Koç (2012). Botany: An Introduction to Plant Biology; Editor; James D. Mauseth Part3. Genetic and Evoulition Section 16. Genetic (Botanik: Bitki Biyolojisine Giriş; Kısım 3: Genetik ve Evrim Bölüm 16: Genetik), Palme Yayıncılık, 978-605-133-302-1.

EKLER

EK-1: Hakan Yıldırım, Hülya Akdemir, **Veysel Süzerer,** Yelda Özden, Ahmet Onay (2012). *In vitro* micrografting of the almond cultivars "Texas", "Ferrastar" and "Nonpareil". Biotechnology and Biotechnological Equipment, (DOI: 10.5504/bbeq.2012.0087).

ARTICLE DOI: 10.5504/BBEQ.2012.0087 A&EB
AGRICULTURE AND ENVIRONMENTAL BIOTECHNOLOGY

IN VITRO MICROGRAFTING OF THE ALMOND CULTIVARS "TEXAS", "FERRASTAR" AND "NONPAREIL"

Hakan Yıldırım[1], Hülya Akdemir[2], Veysel Süzerer[2], Yelda Ozden[2], Ahmet Onay[3]
[1]Dicle University, Faculty of Agriculture, Diyarbakır, Turkey
[2]Gebze Institute of Technology, Faculty of Science, Kocaeli, Turkey
[3]Dicle University, Faculty of Science, Diyarbakır, Turkey
Correspondence to: Hakan Yıldırım
E-mail: hakany@dicle.edu.tr, hakanyildirim75@hotmail.com

ABSTRACT

A successful micrografting technique for the almond cultivars (cvs) "Texas", "Ferrastar" and "Nonpareil" was developed using in vitro germinated seedlings as rootstocks and axenic shoot cultures established from mature tree sources as microscions. In vitro germinated seedlings, which developed 14 days after culturing in the modified Murashige and Skoog (MS) medium, were decapitated and used as rootstock. Shoot culture initiation from three almond cvs ("Texas", "Ferrastar" and "Nonpareil") was successfully achieved by culturing mature shoot tips from forced nodal buds, about 4–6 mm, on a modified MS medium containing 1 mg·L^{-1} benzyl adenin (BA). Slit micrografting on epicotyl and on hypocotyls were equally successful (83.3 % to 100 %). Grafting success was dependent on the rootstock type and lenght of the scion. Grafting success varied between 83.33 % and 100 % depending on the cultivar, when the scion contained 1, 2, and 3 nodes. When almond scions, about 1.5 cm long, were micrografted on germinated seedling and cultured on proliferation medium (PM), the mean shoot length was 19.84 mm, 16.50 mm, 26.93 mm for the cvs "Texas", "Ferrastar" and "Nonpareil" respectively. Micrografts could be easily cultured on a hormone-free semi-solid MS medium and were potted out after 4 to 6 weeks of culture growth. Rooted micrografted plantlets were successfully acclimatized and transferred to potting mix with 100 % survival. Although low percentages of variation were obtained in tested cvs (3.70 %, 6.25 % and 10.2 % in "Texas", "Ferrastar" and "Nonpareil"), molecular analysis showed that the developed micrografting technique produces genetically stable plantlets, at least up to 6 months of sub-culturing in cvs "Ferrastar" and "Nonpareil". The described micrografting technique could be used for rejuvenation of shoot explants of mature elite almond cultivars and it also has potential use in the commercial production of other almond cultivars.

Biotechnol. & Biotechnol. Eq.

Keywords: almond, restoring, slit micrografting

Abbreviations: BA: benzyl adenin; IBA: indole-3-butyric acids; MS: Murashige and Skoog; PM: proliferation medium; RAPD: random amplified polimorphic DNA; RM: rooting medium

Introduction

Almond (*Prunus dulcis* Mill.) is one of the nut crops cultivated widely in the USA, the Mediterranean region and Australia. The majority of commercial almonds are self-incompatible (autogamy), and typically require cross-pollination (32). However, a continuous genetic variation has occurred across species through the ages, which has led to the formation of different types of trees in terms of crop development, fruit quality and yield, and tolerance to environmental stresses (15). To reduce the problem of immense genetic variation in populations and to obtain genetically identical populations, vegetative propagation via layering, cutting, division, and budding/grafting is applied. However, for almond like many other woody plants, these techniques are inefficient due to the large number of problems faced in this fruit species in *in vivo* rooting of cuttings. Micropropagation techniques are being applied to address the mass propagation needs and to bring about rapid improvement of this important crop species. Although successful tissue culture protocols have been reported for the juvenile explant of some almond cultivars (3, 5, 21, 23, 31), the published reports, especially for mature almond cultivars (1, 3, 7, 23, 33) still need to be improved due to the problems faced with *in vitro* rooting of micropropagated microshoots. Attempts to improve the *in vitro* rooting of "Nonpareil" and "Ne Plus Ultra" cultivars by assessing the influences of several culture requirements was reported by Ainsley et al. (2). Sixty percent rooting have been observed in both "Nonpareil" and "Ne Plus Ultra" cultivars using explants immersed for 12 h in water–agar 6 mg·L^{-1} with 1.0 mmol·L^{-1} indole-3-butyric acids (IBA) followed by incubation of microshoots in auxin-free basal media including 100.0 mol·L^{-1} pholoroglucinol (PG). Effectively overcoming the recalcitrance structure of the rooting can also be overcome by applying a micrografting technique to the almond cultivars in the same manner as the rooting of "Ferragnes" and "Ferraduel" (37). Micrografting is an effective technique especially for rejuvenation, which was investigated in the 1980s (6, 17). It has the potential to combine the advantages of rapid *in vitro* multiplication of healthy plants with the increased productivity that results from grafting superior rootstock–scion combinations (12). This technique is an accommodation of the well-known

grafting concept and procedures except that it could only be practiced on a very small scale (microsurgery) and requires exceptional manual dexterity. Micrografting can be achieved either *in vivo* or *in vitro*. *In vivo* micrografting consists of grafting a relatively small scion originating from a desirable mother plant onto a young rootstock obtained either from a seedling or from an herbaceous cutting grown in a nursery or under aseptic conditions. On the other hand, in the case of *in vitro* micrografting the scion is surface sterilized before use and the rootstock is either a seedling obtained from aseptically germinated seed or a micropropagated microcutting (26, 27).

The first attempts to rejuvenate mature trees by micrografting of *in vitro* mature almond scions onto hybrid almonds was carried out by Martinez-Gomez and Gradziel (20), who grafted buds of "Nonpareil" seedlings onto different rootstocks with bud survival varying from 30 % to 90 %, while Ghorbel et al. (13) micrografted apical buds from *in vitro* shoots of the same cultivar with 60 % to 80 % success. *In vitro* micrografting in which almond scions were grafted on rootstock stems and cultured on a rooting medium with 50 % and 65 % survival for "Nonpareil 15-1" and "Ne Plus Ultra", respectively, was also investigated by Channuntapipat et al. (8). Micrografting of seedling shoot tips and buds on *in vitro* germinated rootstock has also been described by Ramanayake and Kovoor (29). Although several studies have been published regarding *in vitro* micrografting of almond cultivars, until now, none of these publications may be used for mass commercial production of selected almond cultivars. The regeneration protocols described in these publications tend to be difficult to replicate and no use of the protocol described in these publications may be made for any other commercially important almond cultivars. Recently, Yıldırım et al. (37) reported a successful micrografting technique using embryo-germinated seedlings as a roostock and a mature regenerated shoot as a scion of the almond cvs "Ferragnes" and "Ferraduel". The described micrografting technique resulted in 100 % regeneration in both of the tested almond cultivars, indicating that the success of the protocol was not cultivar dependent.

In the present paper the previously developed micrografting technique was applied on different commercially variable almond cvs "Texas", "Ferrastar" and Nonpareil. In addition, the genetic stability of the clones was also assessed, as somaclonal variation can be a real problem when *in vitro* propagation is used for mass propagation. Since in the almond micrografting process no adventitious formation of new buds is involved, and only the natural system of axillary bud re-growth is used for the production of new buds, no genetic changes are expected to occur in the micrografted trees. Therefore, the objectives of this study were: 1) to determine the applicability of the previously developed micrografting technique to different almond cultivars; 2) to reveal the optimum development conditions for the almond cvs "Texas", "Ferrastar" and "Nonpareil"; and 3) to test if the developed propagation methodology is useful for producing true-to-type planting material.

Materials and Methods

Plant Materials

The details of the rootstock development were reported by Yıldırım et al. (37). In short, dehusked mature almond seeds were surface-sterilized for 15 min in commercial bleach (1.2% sodium hypochlorite, NaOCl) at a volume fraction of 10 %. Then, the seed coats were removed and the kernels were washed three times with sterile distilled water. After washing the intact kernels, the half of the kernels was cut and the kernels with the embryogenic axes were cultured in Magenta GA-7 vessels (Chicago Corp.) containing 50 ml plant growth regulator-free MS medium. Fourteen-day-old *in vitro* seedlings were decapitated above the cotyledons, and used as rootstocks for grafting.

In vitro shoot cultures of almond scions (*Prunus dulcis* cvs "Texas", "Ferrastar" and "Nonpareil") were initiated from 6-year-old almond trees grown in the Diyarbakır Province of southeastern Turkey. Fifteen to 20 mm shoot tips were surface-sterilized for 10 min in 10 % commercial bleach. After four to five rinses in sterile distilled water, shoot tips were cultured in Magenta GA 7 vessels containing 50 mL of Murashige and Skoog (24) medium with Gamborg vitamins (11) supplemented with 1.0 mg·L^{-1} BA and 30 g·L^{-1} sucrose to induce shoot proliferation. Stock cultures of "Texas", "Ferrastar" and "Nonpareil" were maintained in a fresh MS medium supplemented with 1.0 mg L^{-1} BA.

Effects of scion type on the success of the micrografts

In order to evaluate the effect of the type of scions on the grafting success and shoot length, microscions of the following types were used: shoot tip, shoot tip plus 1 node, shoot tip plus 2 nodes, and shoot tip plus 3 nodes. Semi-solid MS medium supplemented with 30 g·L^{-1} sucrose was used to maintain the micrografts *in vitro*.

Effect of rootstock type on micrografting

Successful slit micrografting was developed for the almond cvs "Ferragnes" and "Ferraduel" by Yıldırım et al. (37). In order to further develop this method, the following rootstock types were used: 1) seedlings were decapitated (1–1.5) cm above the cotyledonary joint and the expanded cotyledons were excised, and 2) the rootstock seedling was decapitated 0.5 cm below the cotyledonary joint and a vertical slit was made on the stump. The base of the shoot tip or shoot tip plus 2 nodes, cut in v-shape, was then fitted into the slit.

Effects of media on the micrograft development

Due to the results of the experiments regarding the above mentioned two micrografting procedures, shoot tip plus 1 node was used in this micrografting trial. Micrografts were cultured in three different media: 1) proliferation medium (PM) with Gamborg vitamins containing 0.5 mg·L^{-1} BA and 0.1 mg·L^{-1} IBA, 30 g·L^{-1} sucrose and 7 g·L^{-1} agar; 2) rooting medium (RM) with Gamborg vitamins containing 0.5 mg·L^{-1} IBA and 0.1 mg·L^{-1} BA, 30 g·L^{-1} sucrose and 7 g·L^{-1} agar; and 3) a hormone-free medium consisting of Gamborg vitamins, 30 g·L^{-1} sucrose and 7 g·L^{-1} agar.

All the media used throughout the above experiments were prepared by a modified MS medium solidified with 7 $g \cdot L^{-1}$ agar and adjusted to pH 5.7 with NaOH and HCl before autoclaving at 121 °C. All cultures were maintained in Magenta GA-7 vessels containing 50 ml culture media with subculturing every 3 or 4 weeks. All the cultures were placed and maintained for at least 3 weeks in a growth room under 16 h photoperiod (40 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$) with day and night temperatures of (25 ± 2) °C. Fifteen to 20 mm shoot tips were micropropagated and subcultured every 4 weeks for more than a 1-year period.

Acclimatization

The successful micrografts were carefully removed from the culture vessels, and rinsed with tap water to remove the remaining agar from the root system. Then, they were transplanted into individual commercial plastic pots filled with an autoclaved mix of equal volumes of peat and perlite (1:1), enriched with a ¼ strength MS salt solution, covered with a plastic bag to maintain high relative humidity, and transferred to a growth room at (25 ± 2) °C. During the first 2 weeks, plants were gradually acclimatized by making holes in a plastic bag. The pots were grown in a culture room with 40 $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ photosynthetic photon flux density (PPFD) at a photoperiod of 16 h. Following a 4- or 5-week period of acclimatization by progressive reduction of the humidity approximately from 95 % to 65 %, the micrografted plantlets were maintained under *in vitro* conditions for another 4 weeks in the earthen pots and kept in a shade house for further growth and observation.

DNA extraction and PCR amplification

The pair clones of 3 (3-1 and 3-2), 6 (6-1 and 6-2) and 9 (9-1 and 9-2) months subcultured plants from micrografted *P. dulcis* cvs "Nonpareil" and "Ferrastar" donor plants (D) and the pair clones of 6 (6-1 and 6-2) and 9 (9-1 and 9-2) months subcultured plants from micrografted cultivar (cv.) "Texas" donor plants (D) were selected randomly for genetic stability analysis by RAPD markers. Genomic DNA was extracted from frozen leaves by using i-genomic Plant DNA extraction Mini Kit (Intron Biotechnology, Inc.) following the manufacturer's instructions and stored at -20 °C until further use. The DNA was quantified by both agarose gel electrophoresis by using λ -DNA as a marker and spectrometric measurements. Totally, 15 primers were assessed for their reproducibility in donor plants and only 10 primers that gave clear and reproducible bands were used in RAPD PCR analysis for each cultivar (**Table 1**). The optimized RAPD protocol was carried out in a volume of 25 µl of reaction mixture containing 50 ng template DNA, 50 ng primer, 1×PCR reaction buffer (10 mM Tris-HCl [pH 8.3], 50 mM KCl), 2.5 mM $MgCl_2$, 2 mM dNTP mix and 2 units of Taq DNA polymerase (Intron Biotechnology, *i*-Taq™). The amplification reaction consisted of an initial denaturation step at 95 °C for 5 min, followed by 35 cycles for 30 s at 95 °C for denaturation, 1 min at 35 °C for primer annealing, 1 min 40 s at 72 °C for the extension step. The final extension step was done for 8 min at 72 °C and reactions were kept at 4 °C.

The RAPD amplification products were electrophoresed in 1 $g \cdot L^{-1}$ agarose with 1×TAE buffer (Tris-asetic acid-EDTA buffer) at a constant voltage (80 V) and detected with ethidium bromide. The amplified products were visualized and photographed digitally on a UV transilluminator.

Statistical analysis

All the experiments were conducted using a completely randomized block design. Each experiment was carried out using at least 12 replicants and repeated at least twice. Significance was determined by analysis of variance, with the least significant ($P \leq 0.05$) differences, among mean values of grafting success (%), mean shoot length (mm), and the percentage of rooting, the percentage of viable regenerants (%) 4 weeks and 52 weeks after transplanting were estimated by using Duncan's new multiple range tests. For RAPD analysis, only clear and reproducible amplified bands were scored. Data was scored as "1" for the presence and "0" for the absence of a given DNA band of each plant material. The similarity matrix and dendogram were constructed using MVSP 3.1 software package (18). Genetic similarities between samples were measured by the Jaccard's similarity coefficient (16). Similarity coefficients were used to construct a dendogram using the UPGMA (unweighted pair-group method with arithmetical average) (30).

Results and Discussion

***In vitro* morphogenic responses of almond microscions ("Texas", "Ferrastar", "Nonpareil") and rootstocks**

Dehusked mature almond seeds were harvested from one tree (**Fig. 1A**). *In vitro* germinated almond seedlings (**Fig. 1B**) derived from the embryos with half kernels were decapitated and used as rootstocks. The *in vitro* regenerated mature shoots were initiated according to Yıldırım et al. (37) from the forced shoot tips of mature almond cultivars and the proliferated microshoots were micropropagated, and subcultured every 4 weeks for more than a 1-year period. Shoot formation was observed within 10 days of explanting of the apical tips from the forced shoot tips (**Fig. 1C**). On the modified MS medium, microshoots were micropropagated (**Fig. 1D**), and subcultured every 4 or 5 weeks. After 2 or 3 weeks, the newly formed leafy shoot tips (shoot tip alone, shoot tip plus 1 node, shoot tip plus 2 nodes, and shoot tip plus 3 nodes) were removed from the shoots before they were used as microscions. The scion base of shoot tips was cut in the form of a v-shape (**Fig. 2A**). The upper portion of the rootstock was decapitated in order to use the germinated seeds as rootstocks and a vertical slit was made on the stump (**Fig. 2B**). Grafts where the scion was semi-hard produced very successful grafts depending on the cultivar 3 days after micrografting to the seedling rootstocks (**Fig. 2C**). Successful grafts occurred when scions with stems were used. Two weeks after micrografting, apical or axillar shoot development was evident on the micrografts (**Fig. 2D**). Then, the micrografts were transferred to pots and acclimatized under a transparent nylon-bag cover for 4 to 6 weeks (**Fig. 3A**).

Micrografts also exhibited substantially new shoot growth with several new leaves after six months of the acclimatization period (**Fig. 3B**). However, slow growth and a lack of shoot development were noticed when the micrografts were grown in a hormone-free MS medium.

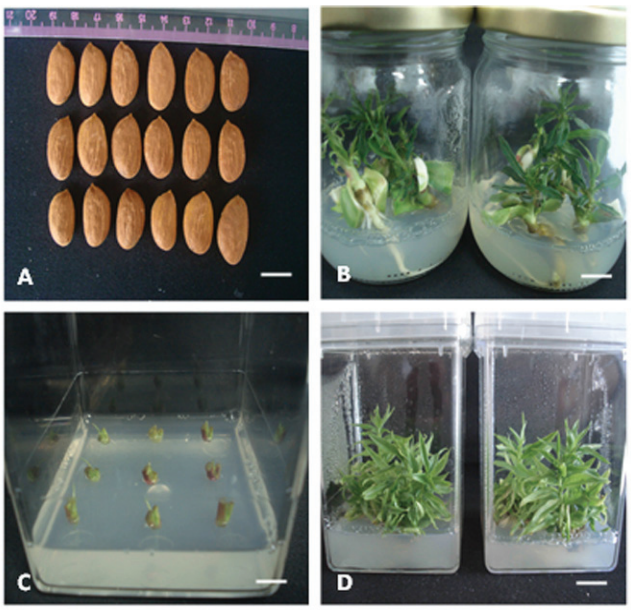


Fig. 1. *In vitro* production of almond rootstocks and microscions: dehusked mature-wild almond seeds, bar = 12 mm (**A**); 14-day-old *in vitro* propagated seedlings on a MS medium containing 1 mg·L^{-1} BA, bar = 9.5 mm (**B**); *in vitro* culture initiation from mature shoot tips of the almond cultivars, bar = 8.5 mm (**C**); multiple shoots differentiated on MS medium supplemented with 1 mg·L^{-1} BA, bar = 12 mm (**D**).

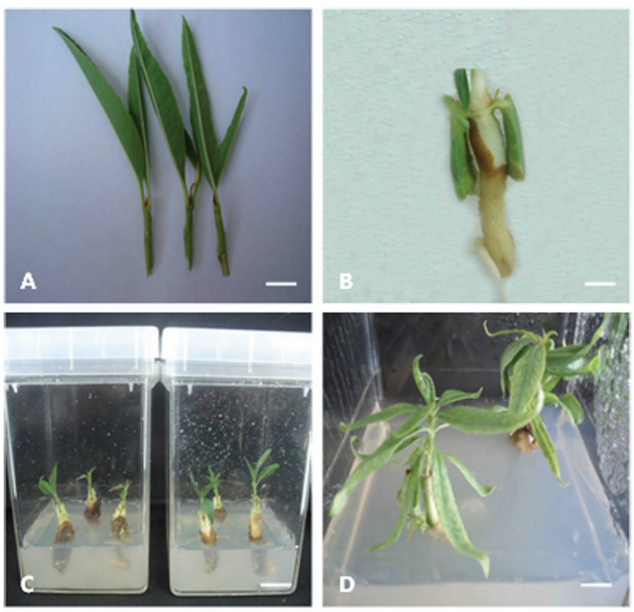


Fig. 2. Stages of micrografting: scion bases cut in a v-shape, bar = 9 mm (**A**); germinated seeds used as rootstock and a vertical slit was made on the stump, bar = 4 mm (**B**); cv. "Nonpareil", 3 days old after micrografting to the wild seedling rootstocks, bar = 15 mm (**C**); micrografted plant (arrow: the point of graft union) with new emerged axillary shoots, 3 weeks of culture, bar = 6 mm (**D**).

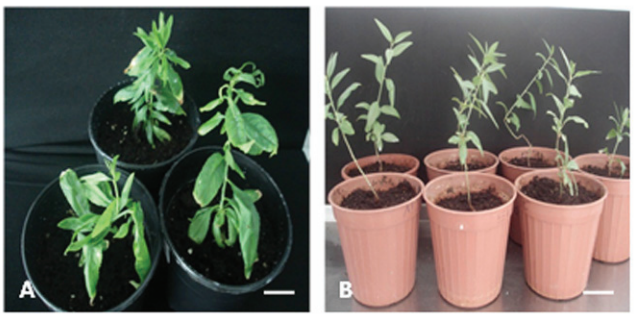


Fig. 3. The growth of micrografts of cv. "Ferragnes" under *in vitro* and *in vivo* conditions: micrografted plantlets successfully acclimatized 4 weeks after potting under a transparent nylon cover, bar = 16.5 mm (A); plantlets with in pots 1 year after transfer to *in vivo* conditions, bar = 42 mm (**B**).

The rate of successful grafted shoots was influenced by the type of scions (**Table 2**). The scions of shoot tips plus 3 nodes gave the best results with 100 % successful grafts for the cvs "Ferrastar" and "Nonpareil", whereas only 85.71 % successful grafts were obtained for the scion of the cv. "Texas". Scions of a single shoot tip also gave 100 % successful grafts for the cvs "Texas" and "Nonpareil". Similarly, there were significant differences in the shoot length between the treatments tested. In cvs "Texas" and "Ferrastar" the single shoot tip plus 2 nodes produced the highest mean shoot number, but a single shoot tip also gave relatively longer shoots for cv "Nonpareil". In general, the growth and development for the cv "Texas" was very poor when a single shoot tip and a single shoot tip plus one node was used, but the cv "Nonpareil" gave better results for the development of the shoot length among the cultivars studied.

The grafting success of both the tested rootstock types varied from 83.33 % to 100 % (**Table 3**). Relatively higher grafting success was observed in shoot tip grafting on epicotyl grafts than in shoot tip grafting on hypocotyls for all the cultivars tested. The increased success achieved in the former may be due to better cambial contact and absence of competition from buds that are present in the latter. Similarly, the length of the scion showed a significant effect on the graft. The shoot length was the highest (17.66 mm) when shoot tip plus 2 nodes was used for the cv "Ferrastar", and the lowest (8.8 mm) for the cv "Nonpareil".

Table 4 shows the effects of the medium in which the grafted plantlets were cultured on growth of micrografted scions. After 4 weeks significant differences in mean shoot length (mm) and root development of successful micrografts were observed between the treatments. Four weeks after growth, the highest mean shoot length of the micrografts were 19.84 mm, 16.50 mm and 26.93 mm for the cvs "Texas", "Ferrastar" and "Nonpareil" grown in the PM medium, respectively. In this medium, however, the secondary root development was not as good as the shoot length development. Micrografts grown in the hormone-free medium gave a mean shoot length of 15.25 mm, 14.37 mm and 26.53 mm for "Texas", Ferrastar" and "Nonpareil", respectively (**Table 4**). The micrografts in the MS0 media also exhibited the highest root development percentages

TABLE 1

Total number and size range of amplified fragments and number of polymorphic fragments generated by RAPD with 10 random primers in P. dulcis cvs "Ferrastar", "Nonpareil", "Texas", donor plants and their clones

Primer	Primer sequence (5´- 3´)	Cultivars											
		Ferrastar				Nonpareil				Texas			
		Size range (bp)	Number of amplified fragments	Number of polymorphic fragments	Polymorphism percentage (%)	Size range (bp)	Number of amplified fragments	Number of polymorphic fragments	Polymorphism percentage (%)	Size range (bp)	Number of amplified fragments	Number of polymorphic fragments	Polymorphism percentage (%)
K-01	CAT TCG AGC C	-	-	-	-	380-1050	7	0	0.0	-	-	-	-
K-02	**GTC TTC GCA A**	**190-1300**	**11**	**1**	**9.1**	**-**	**-**	**-**	**-**	**195-880**	**9**	**0**	**0.0**
K-03	CCA GCT TAG G	120-830	8	2	25.0	220-850	6	1	16.6	240-780	7	0	0.0
K-05	**TCT GTC GAG G**	**230-1100**	**11**	**2**	**18.1**	**210-1290**	**12**	**3**	**25.0**	**-**	**-**	**-**	**-**
K-08	GAA CAC TGG G	200-1100	12	1	8.3	370-1100	8	0	0.0	350-1100	9	0	0.0
K-09	**CCC TAC CGA C**	**180-1200**	**10**	**0**	**0.0**	**190-1670**	**11**	**1**	**9.1**	**380-1250**	**7**	**2**	**28.6**
K-11	ATT GCC CCA G	220-1200	9	0	0.0	330-1400	12	2	16.6	470-1550	10	0	0.0
K-12	**TGG CCC TCA C**	**320-1200**	**11**	**0**	**0.0**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**
K-13	GGT TGT ACC C	-	-	-	-	-	-	-	-	140-1560	12	0	0.0
K-14	**CCC GCT ACA C**	**-**	**-**	**-**	**-**	**380-1200**	**8**	**0**	**0.0**	**-**	**-**	**-**	**-**
K-15	CTC CTG CCA A	-	-	-	-	290-960	9	0	0.0	280-980	8	0	0.0
K-16	**GAG CGT CGA A**	**220-1250**	**7**	**0**	**0.0**	**-**	**-**	**-**	**-**	**250-1250**	**8**	**1**	**12.5**
K-17	CCC AGC TGT G	190-1300	11	0	0.0	185-1250	14	3	21.4	-	-	-	-
K-18	**CCT AGT CGA G**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**210-1050**	**6**	**0**	**0.0**
K-19	CAC AGG CGG A	**240-1000**	**6**	**0**	**0.0**	250-1100	11	0	0	-	-	-	-
K-20	**GTG TCG CGA G**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**	**360-760**	**5**	**0**	**0.0**
		Total	**96**	**6**	**6.25**	**Total**	**98**	**10**	**10.2**	**Total**	**81**	**3**	**3.70**

TABLE 2

Effect of the type of scions on grafting success and shoot length on the grafts in MS medium containing 30 $g \cdot L^{-1}$ sucrose*

Explant type (Length of scion)	Grafting success (%)			Mean Shoot Length (mm)		
	Texas	Ferrastar	Nonpareil	Texas	Ferrastar	Nonpareil
Shoot tip	100.0 ± 0.00 a	83.33 ± 11.23 b	100.0 ± 0.00 a	5.80 ± 0.24 c	5.00 ± 0.25 d	16.00 ± 0.68 a
Shoot tip plus 1 node	100.0 ± 0.00 a	100.0 ± 0.00 a	83.33 ± 11.23 b	8.25 ± 0.79 b	7.75 ± 0.21 c	10.90 ± 0.48 c
Shoot tip plus 2 nodes	85.71 ± 9.70 b	83.33 ± 11.23 b	100.0 ± 0.00 a	9.83 ± 0.54 a	16.70 ± 1.22 a	12.83 ± 0.63 b
Shoot tip plus 3 nodes	85.71 ± 9.70 b	100.0 ± 0.00 a	100.0 ± 0.00 a	9.25 ± 0.37 a	13.58 ± 0.63 b	10.66 ± 0.68 c

* Different lowercase letters above any two columns indicate that the means are statistically different at $P \leq 0.05$ according to the Duncan multiple test. Data are means of 2 experiments with 12 replicates.

with some new axillary roots but shoot formation was reduced within 4 weeks of the development period. In general, relatively shorter shoots were obtained when the RM media was used for micrograft development. However, new root development in the RM media was as high as that in the PM media.

Acclimatization

Four weeks after acclimatization, the survival rates from the micrografts were 100 %, 85 % and 90 % for the cvs "Texas", "Ferrastar" and "Nonpareil", respectively, when sterile compost was used for the acclimatization (**Table 5**). The micrografts from the three cultivars acclimatized in the non-sterile compost gave the lowest level of viable regenerants. The micrografts grown in the semi-sterile compost gave survival rates of 75.0 %, 70.0 % and 75 % for the cvs "Texas", "Ferrastar" and "Nonpareil", respectively. Micrografts also exhibited substantially new shoot growth with at least three to five new leaves within 4 weeks of the acclimatization period. After 4 weeks of successful acclimatization, the micrografts were transferred to bigger pots containing a mix composed of peat and perlite. There was no evidence of a significant difference in the frequencies of viable regenerants between those that had undergone treatments after one year of transplanting. This compost was found to be satisfactory for survival of plantlets from *in vitro* cultures of micrografted plantlets. At least 85 % of the plants propagated *in vitro* were recovered and grown as normal plants (**Fig. 3B**).

Analysis of genetic stabilities in regenerants of *P. dulcis* cvs "Nonpareil", "Ferrastar" and "Texas" by RAPD

Amplified DNA bands were scored with all of the selected RAPD primers (**Table 1**) and each primer yielded amplification products ranging in size from 185 bp to 1670 bp in cv. "Nonpareil", from 120 to 1300 in cv. "Ferrastar", and from 140 to 1560 in cv. "Texas". The number of bands for each primer varied from 6 in primer K-03 to 14 in primer K-17 in cv. "Nonpareil", from 6 in primer K-19 to 12 in primer K-08 in cv. "Ferrastar", and from 5 in primer K-20 to 12 in primer K-13 in cv. "Texas". These 10 primers used in RAPD analysis yielded a total of 98 scorable bands with an average of 9.8 bands per primer in cv. "Nonpareil", 96 scorable bands detected in cv. "Ferrastar" with an average of 9.6 bands and 81 scorable bands detected in cv. "Texas", with an average of 8.1 bands per each primer. Totally, 88 monomorphic and 10 polymorphic (10.2 %) bands in cv. "Nonpareil", 90 monomorphic and 6 polymorphic (6.25 %) bands in cv. "Ferrastar" and 78 monomorphic and 3 polymorphic (3.70 %) bands in cv. "Texas" were produced with all the tested primers. The highest number of three polymorphic bands was detected by primer K-3 and K-17, whereas primers K-01, K-08, K-14, K-15 and K-19 resulted in monomorphic bands in cv. "Nonpareil". In the case of cv. "Ferrastar", the highest number of polymorphic bands (two) was obtained by primer K-03 and K-05; and the lowest (no bands), by primers K-09, K-11, K-12, K-16, K-17, and K-19. The highest number of polymorphic bands (two) was obtained by primer K-09 and, except for primer K-16, the other primers did not give any polymorphic bands in cv "Texas". RAPD amplification patterns of *P. dulcis* cvs "Nonpareil" and "Ferrastar" are shown by representative gel profiles of primers K-05 and K-09 (**Fig. 4**), K-03 and K-05 (**Fig. 5**), respectively. Cluster analysis was carried out on the basis of Jaccard's similarity coefficients between 7 individuals (6 micropropagated and 1 donor plant) for cv. "Nonpareil" and "Ferrastar" and 5 individuals (4 micropropagated and 1 donor plant) for cv. "Texas" by means of UPGMA. The similarity values ranged from 0.907 to 1.000 with a mean of 0.945 in cv. "Nonpareil", they ranged from 0.948 to 1.000 with a mean of 0.976 in cv. "Ferrastar", and from 0.963 to 1.000 with a mean of 0.982 in cv. "Texas". As shown in the dendogram for cv. "Nonpareil" (**Fig. 6**), the donor plant and 3 month subcultured plants (3-1 and 3-2) clustered together, while the other clones (6-1, 6-2, 9-1 and 9-2) were closest related with a similarity value of 0.968 and generated another group. In cv. "Ferrastar", although the donor plant and all clones had 97 % level of similarity, clone 6-1 had the lowest similarity value (94 %) and formed another group. Clones 9-1 and 9-2 were in the same group with the donor plant, but clones 3-1, 3-2 and 6-2 were more close to the donor plant (**Fig. 7**). In the case of cv "Texas", the donor plant and all the other clones clustered in two groups and clone 6-2 had the highest similarity value (97.5 %) to the donor plant. Other clones (6-1, 9-1 and 9-2) had the same similarity value (96.3 %) with the donor plant (**Fig. 8**). Overall, the molecular analysis showed that the genetic instability of the micrografted clones, although with a small percentage, started after 6 months of subculturing in cvs "Ferrastar" and "Nonpareil".

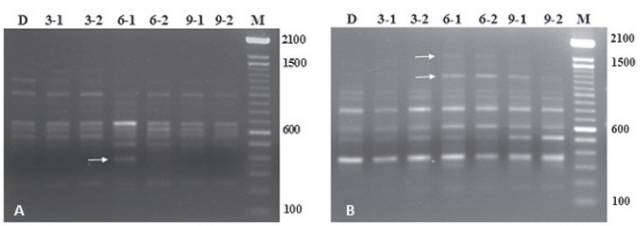


Fig. 4. RAPD analysis using primers K-05 (**A**) and K-09 (**B**) in *P. dulcis* cv. "Nonpareil" donor plant (**D**) and its clones. M: molecular size marker (100 bp + 1 kb, Invitrogen).

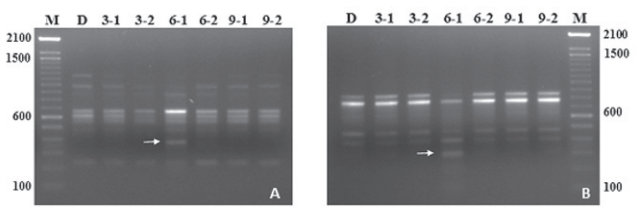


Fig. 5. RAPD analysis using primers K-03 (**A**) and K-05 (**B**) in *P. dulcis* cv. "Ferrastar" donor plant (**D**) and its clones. M: molecular size marker (100 bp + 1 kb, Invitrogen).

Effects of scission type, rootstock type and media on the micrografts

Micrografting was applied successfully to some woody species such as *Pistacia vera* Onay et al. (26), *Hevea brasiliensis*

TABLE 3

Effect of micrografting (rootstock type) on grafting success and shoot length on the grafts in MS medium containing 30 g·L^{-1} sucrose and 0.5 mg·L^{-1} BA + 0.1 mg·L^{-1} IBA*

Micrografting type	Grafting success (%)			Mean Shoot Length (mm)		
	Texas	Ferrastar	Nonpareil	Texas	Ferrastar	Nonpareil
On hypocotyl						
Shoot-tip grafting	83.33 ± 11.23 b	100.00 ± 0.00 a	100.00 ± 0.00 a	10.00 ± 0.47 b	12.33 ± 0.68 b	12.25 ± 0.57 b
Shoot tip plus 2 nodes	100.00 ± 0.00 a	100.00 ± 0.00 a	83.33 ± 11.23 b	13.16 ± 0.32 a	17.66 ± 0.68 a	8.80 ± 0.35 c
On epicotyl						
Shoot-tip grafting	100.00 ± 0.00 a	100.00 ± 0.00 a	100.00 ± 0.00 a	11.91 ± 0.41 b	13.58 ± 0.75 b	12.41 ± 0.58 b
Shoot tip plus 2 nodes	83.33 ± 11.23 b	100.00 ± 0.00 a	100.00 ± 0.00 a	14.10 ± 0.69 a	9.58 ± 0.39 c	16.83 ± 0.53 a

* Different lowercase letters above any two columns indicate that the means are statistically different at P ≤ 0.05 according to the Duncan multiple test. Data are means of 2 experiments with 12 replicates.

TABLE 4

Effect of culture medium on micrograft development*

Culture medium	Mean shoot length (mm)			Root development (%)		
	Texas	Ferrastar	Nonpareil	Texas	Ferrastar	Nonpareil
PM**	19.84 ± 1.72 a	16.50 ± 1.33 a	26.93 ± 1.64 a	66.67 ± 12.59 a	66.67 ± 12.59 a	46.67 ± 13.33 b
RM***	14.13 ± 1.27 b	16.33 ± 1.88 a	14.97 ± 1.89 b	66.67 ± 12.59 a	66.67 ± 12.59 a	60.00 ± 13.09 ab
MS0****	15.25 ± 1.28 b	14.37 ± 2.06 a	26.53 ± 2.07 a	80.00 ± 10.69 a	73.33 ± 11.81 a	86.67 ± 9.08 a

* Data are mean values from at least 20 micrografts. Different lowercase letters above any two columns indicate that the means are statistically different at P ≤ 0.05
according to the Duncan multiple test (P < 0.05). Data were taken 4 weeks after culture to the micrografting development medium.
** PM + 3 % sucrose + 0.7 % agar + 0.5 mg·L^{-1} BA + 0.1 mg·L^{-1} IBA;
*** RM + 3 % sucrose + 0.7 % agar + 0.5 mg·L^{-1} IBA + 0.1 mg·L^{-1} BA;
**** MS0, Hormone-free MS+ 3 % sucrose + 0.7 % agar.

TABLE 5

The effects of compost on acclimatization of almond plantlets in sand peat and perlite (1:1) mixture*

Compost	Viable regenerant (%)					
	4 weeks after transplanting**			52 weeks after transplanting***		
	Texas	Ferrastar	Nonpareil	Texas	Ferrastar	Nonpareil
Sterile	100.00 ± 0.00 a	85.00 ± 8.19 a	90.00 ± 6.88 a	95.00 ± 5.00 a	90.00 ± 6.88 a	100.00 ± 0.00 a
Semi-sterile	75.00 ± 9.93 b	70.00 ± 10.51 a	75.00 ± 9.93 a	90.00 ± 6.88 a	85.00 ± 8.19 a	90.00 ± 6.88 a
Non-sterile	30.00 ± 10.51 c	25.00 ± 9.93 b	40.00 ± 11.23 b	100.00 ± 0.00 a	85.00 ± 8.19 a	90.00 ± 6.88 a

* Data are mean values from at least 20 micrografts. Different lowercase letters above any two columns indicate that the means are statistically different at P ≤ 0.05 according to the Duncan multiple test (P < 0.05).
** Data taken 4 weeks after transplanting to growth room conditions;
*** Data taken 52 weeks after transplanting to glass house conditions.

Perrin et al. (28) and *Quercus* Ewald and Naujoks (9) and some almond cultivars, i.e. (8, 13, 20, 37), for the rejuvenation of adult tissues. Among them, Ghorbel et al. (13) achieved 60 % to 80 % success with micrografting "Nonpareil" apical buds excised from *in vitro* shoots. Later, Martinez-Gomez and Gradziel (20) grafted seedlings of the same cultivar onto different rootstock with 30 % to 90 % bud survival. When 1.5 cm long almond scions were micrografted on rootstock stems and cultured on a rooting medium, 60 % and 65 % survival ("Nonpareil 15-1" and "Ne-Plus Ultra", respectively) were also achieved (8). Very recently, Yıldırım et al. (37) micrografted apical buds (approximately 1 cm) from *in vitro* shoots of the almond cvs "Ferragnes" and "Ferraduel" onto rootstocks derived from zygotic embryos of the cultivars with 100 % success. In order to assess the applicability of this technique to different almond cultivars, *in vitro* shoots obtained from elite mature trees of "Texas", "Ferrastar" and "Nonpareil" were micrografted on *in vitro* germinated rootstock. In this study scions of a shoot tip plus 3 nodes gave the best results with 100 % successful grafts for the cvs "Ferrastar" and "Nonpareil", whereas only 85.71 % successful grafts were obtained for the scion of the cv. "Texas". As in the previous publication (37), in this study the successful micrografts were obtained without need of pre-treatment of the microscions. This result was also in

agreement with the results of Navarro (25) and Wu et al. (36), who obtained higher micrografting success with several woody species by using untreated microscions. It should also be noted that the micrografting success rates obtained in this study with the three cvs "Texas", "Ferrastar" and "Nonpareil" microscions gave similar results in comparison with the previous study of Yıldırım et al. (37), in which 100 % micrografting success rate was achieved with the "Ferragnes" and "Ferraduel" almond cultivars by utilizing mature shoot tip microscions. There was significant difference between the two types of micrografting, as the grafting success was higher in the shoot tip grafting on epicotyl grafts than that in the shoot tip grafting on hypocotyls for all the cultivars tested (**Table 3**). The increased shoot length in the hypocotyls may be due to cambial contact and absence of competition from axillary buds that are present in the epicotyls. Although several authors have previously reported that in the micrografting of different plant species, e.g., cashew (34), pistachio (26), cherry (4) and King Protea (36), including almond (13), the size of the scion affects the success rate of micrografts, no significant difference in the frequency of successful micrografts was obtained in the three of the almond cultivars tested when the microscion was applied to different sizes.

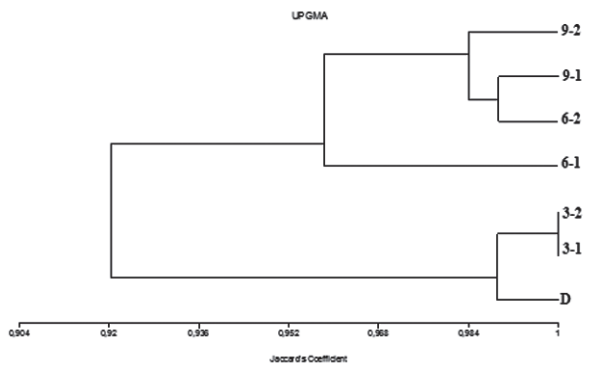


Fig. 6. Dendogram illustrating the similarity coefficients among 6 micropropagated plantlets and the donor plant of *P. dulcis* cv. "Nonpareil" by UPGMA analysis derived from a total of 98 bands produced by the 10 RAPD primers.

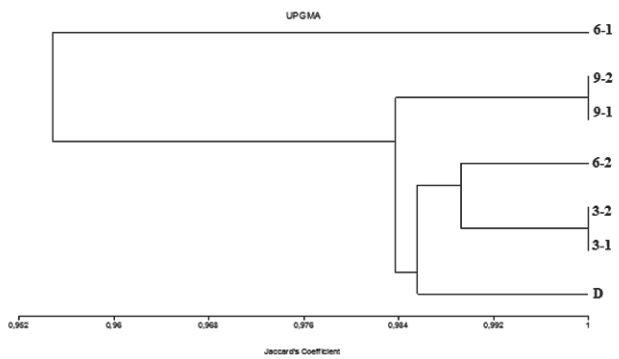


Fig. 7. Dendogram illustrating the similarity coefficients among 6 micropropagated plantlets and the donor plant of *P. dulcis* cv. "Ferrastar" by UPGMA analysis derived from a total of 96 bands produced by the 10 RAPD primers.

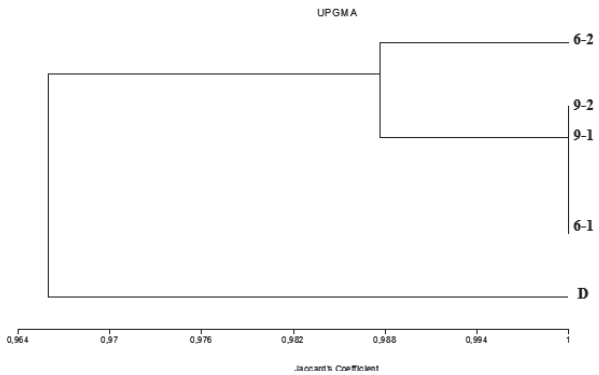


Fig. 8. Dendogram illustrating the similarity coefficients among 4 micropropagated plantlets and the donor plant of *P. dulcis* cv. "Texas" by UPGMA analysis derived from a total of 81 bands produced by the 10 RAPD primers.

The culture medium also showed a significant effect on the graft success (**Table 4**). In the present study, the micrografts in rooting medium showed a good root system but reduced shoot formation. New shoot elongation was observed when the PM medium was used for the development of the grafts. Similarly, Yıldırım et al. (37) reported that MS0 permitted good growth and branching of the roots and resulted in the development of axillary branching of the scion of cvs "Ferragnes" and "Feraduel". Moreover, it was also previously stated that the composition of the media that grafts are established in can also have an effect on micrografting success (10). In this study, there was no significant difference in the means of micrografting success in the three cultivars, as 100 % frequency was obtained in a hormone-free MS medium, as well as in PM and in RM (data not shown). However, it should also be noted that relatively lower plant survival was obtained in micrografts established in MS0 medium during acclimatization. Hormone-free semi-solid MS medium with 3 % sucrose was found to be ideal for culturing of micrografts. Similarly, Onay et al. (26, 27) in pistachio, Mantell et al. (19) and Ramanayake and Kovoor (29) in cashew, and Yıldırım et al. (37) in almond have used solid medium for the establishment of micrografts. This result probably shows that the transfer of endogenous cytokinins or auxins to the scion on the part of the rootstock was not adequate in the hormone-free medium and absorption of plant growth regulators from the medium and transfer to the microscion is needed for a higher survival after transfer to *in vivo* conditions (37).

To the best of our knowledge, this is the first report which includes assessment of the genetic integrity in micrografted almond cultivars. However, genetic analysis of almond plantlets propagated with axillary branching (21) and adventitious regeneration and meristem culture (22) showed genetic integrity of the plantlets. But it is well-known that tissue culture conditions result in physiological stress that can lead to impairment of normal developmental controls and trigger the mechanism of somaclonal variation (14). Somaclonal variation can be detected by using different molecular techniques. Among them, randomly amplified

polymorphic DNA (RAPD) (35) is one of the mostly used molecular markers as it is relatively fast, easy and cheap. Thus, in order to confirm that micrografting is a reliable propagation method, RAPD molecular marker technique was carried out in *P. dulcis* cvs "Ferrastar", "Nonpareil" and "Texas" donor plants and their regenerants. In this study, five of the 10 primers in cv. "Nonpareil" and six of 10 primers in cv. "Ferrastar" generated monomorphic patterns among the donor plants and its clones, confirming the genetic uniformity of the micropropagated materials. However, other primers produced polymorphism (**Fig. 4** and **Fig. 5**) although at a low percentage. RAPD analysis showed that subculturing of micrografted plantlets especially more than 6 months lead to increase of polymorphism for cvs "Ferrastar" and "Nonpareil". In the case of cv. "Texas", as somaclonal variation was observed after a 6 months' subculturing period, in cvs "Ferrastar" and "Nonpareil" evaluation of only 6 and 9 months subcultured plants was assessed in this study. The overall polymorphism frequency detected in *P. dulcis* cv. "Texas" was relatively lower (3.70 %) in comparison with cv. "Ferrastar" (6.25 %) and cv "Nonpareil" (10.2 %). We showed that the developed micrografting protocol can be safely applied in almond cultivars up to 6 months of subculture but a longer subculture period may result in somaclonal variation although at low level in almond cultivars.

Conclusions

A standardized micrografting technique using *in vitro* raised seedlings as rootstock and shoot scions from mature elite trees was successfully applied to almond cvs "Texas", "Ferrastar" and "Nonpareil". The results of the RAPD analysis strongly suggest that in the three tested almond cultivars, the optimized micrografting protocol may not induce genetic variability until 6 months. To the best of our knowledge, this is the first study on assessment of the genetic stability of micrografted almonds by RAPD analysis.

Acknowledgements

The authors are grateful to DUBAP (Dicle University Research Project Councel) #DUBAP-09-ZF-80.

REFERENCES

1. **Ainsley P.J., Collins GC., Sedgley M.** (2000) In Vitro Cell Dev. – Pl., **36**, 470-474.
2. **Ainsley P.J., Collins GC., Sedgley M**. (2001) In Vitro Cell Dev. – Pl., **37**, 778-785.
3. **Ainsley P.J., Hammerschlag F.A., Bertozzi T., Collins G.G., Sedgley M.** (2001) Plant Cell Tiss. Org., **67**, 221-226.
4. **Amiri M.E.** (2006) J. Food Agric. Environ., **4**, 151-154.
5. **Antonelli M.** (1992) Acta Hortic., **300**, 255-260.
6. **Burger D.W.** (1985) Comb. Proc. Int. Plant Prop. Soc., **34**, 244-253.
7. **Caboni E., Damiano C.** (1994) Plant Sci., **96**, 163-165.
8. **Channuntapipat C., Sedgley M., Collins G.** (2003) Sci. Hort., **98**, 473-484.
9. **Ewald D., Naujoks G.** (1996) In: Development of Integrated Systems for Large Scale Propagation of Elite Plants Using In Vitro Techniques – Report of Activities (F. O'Riodain, Ed.), COST 822, European Commission, Directorate General for Science, Research and Development, Brussels, 156-160.
10. **Fotopoulos S., Sotiropoulos T.E.** (2005) New Zealand J. Crop Hort. Sci., **33**, 75-79.
11. **Gamborg O.L., Miller R.A., Ojima K.** (1968) Exp. Cell Res., **50**, 151-158.
12. **Gebhardt K., Goldbach H.** (1988) Physiol. Plant, **72**, 153-159.
13. **Ghorbel A., Chatibi A., Thaminy S., Kchouk M.L.** (1998) Acta Hort., (ISHS) **470**, 429-433.
14. **Guo W., Gong L., Ding Z., Li Y., Li F., Zhao S., Liu B.** (2006) Plant Cell Rep., **25**, 896-906.
15. **Gürel S., Gülsen Y.** (1998) Turk. J. Bot., **22**, 363-373
16. **Jaccard P.** (1908) Bull. Soc. Vaudoise Sci. Nat., **44**, 223-270.
17. **Jonard R.** (1986) In: Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 1, Trees I (Y.P.S. Bajaj, Ed.), Springer-Verlag, Berlin, 31- 48.
18. **Kovach W.L.** (1999) MVSP-A Multi Variante Statistical Package for Windows, ver. 3.1. Kovach Computing Services, Pentraeth, Wales, UK.
19. **Mantel S.H., Boggett B., Bessa A.M.S., Lemos E.E.P., Abdelhad A.R., Mneney E.E.** (1998) In: Proceedings of the International Cashew and Coconut Conference, Dar es Salaam, 17-21 February, 1997 (C.P. Topper, P.D.S. Caligari, A.K. Kullaya, S.H. Shomari, L.J. Kasuga, P.A.L. Masawe, A.A. Mpunami, Eds.), BioHybrids International, Reading, UK, 95-107.
20. **Martínez-Gómez P., Gradziel T.M.** (2001) In vivo micrografts in almond and their application in breeding programs. HortTechnology, **11**, 313-315.
21. **Martins M., Sarmento D., Oliveira M.M.** (2004) Plant Cell Rep., **23**, 492-496.
22. **Martins M., Tenreiro R., Oliveira M.M.** (2003) Plant Cell Rep., **22**, 71-78.
23. **Miguel C.M., Druart P., Oliveira M.** (1996) In Vitro Cell Dev. – Pl., **32**, 148-153.
24. **Murashige T., Skoog F.** (1962) Physiol. Plant., **15**, 473-497.
25. **Navarro L.** (1988) Acta Hort., **227**, 43-55.
26. **Onay A., Pirinc V., Yildirim H., Basaran D.** (2004) Plant Cell Tiss. Org., **77**, 215-219.
27. **Onay A., Tilkat E., Isıkalan C., Namli S.** (2007) In: Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits

(S. Mohan Jain, H. Häggman, Eds.), Springer, Netherlands, 289-298.

28. **Perrin Y., Lardet L., Enjalric F., Carron M.** (1994) Can. J. Plant Sci., 74, 623-630.
29. **Ramanayake S.M., Kovoor S.D.** (1999) J. Hort. Sci. Biotechnol., **74**, 265-268.
30. **Rohlf F.J.** (1993) NTSYS-pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Exeter Publishing, New York.
31. **Rugini E., Verma D.C.** (1983) Plant Sci. Lett., **8**, 273-281.
32. **Socias I., Company R., Gomez Aparas J., Alanso J.M.** (2005) Year and enclosure effects on fruit set in an autogamous almond. Scientia Horticulturae, **104**, 369-377.
33. **Tabacknik L., Kester D.E.** (1997) HortScience, **12**, 545-547.
34. **Thimmappaiah Puthra G.T., Anil S.R.** (2001) Sci. Hort., **92**, 177-182.
35. **Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A., Tingey S.V.** (1990) Nucleic Acids Res., **18**, 6531-6535.
36. **Wu H.C., du Toit E.S., Reinhardt C.F.** (2007) Plant Cell Tiss. Org. Cult., **89**, 23-28.
37. **Yıldırım H., Onay A., Süzerer V., Tilkat E., Özden-Tokatlı Y., Akdemir H.** (2010) Sci. Hortic. – Amsterdam, **125**, 361-367.