TC.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

RETROTRANSPOZONA DAYALI MARKER SİSTEMLERİ KULLANARAK PISTACIA TÜRLERİNİN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

EMRAH KIRDÖK

DOKTORA TEZİ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

GEBZE
2016

TC.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

RETROTRANSPOZONA DAYALI MARKER SİSTEMLERİ KULLANARAK PISTACIA TÜRLERİNİN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

EMRAH KIRDÖK

DOKTORA TEZİ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
DOÇ. DR. YELDA ÖZDEN ÇİFTÇİ

GEBZE
2016

TC.
GEBZE TECHNICAL UNIVERSİTY
GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

CHARACTERIZATION OF PISTACIA SPECIES USING RETROTRANSPOSON BASED MARKER SYSTEMS

EMRAH KIRDÖK

A THESIS SUBMITTED TO DEGREE OF
DOCTOR OF PHILOSOPHY
DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS

THESIS SUPERVISOR
ASSOC. PROF. DR. YELDA ÖZDEN ÇİFTÇİ

GEBZE
2016

GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ	**DOKTORA JÜRİ ONAY FORMU**

GTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 14/01/2016 tarih ve 2016/04 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 05/08/2016 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Emrah Kırdök' ün tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında DOKTORA tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE
(TEZ DANIŞMANI) : Doç. Dr. Yelda Özden Çiftçi

ÜYE : Prof. Dr. Nermin Gözükırmızı

ÜYE : Prof. Dr. İbrahim İlker Özyiğit

ÜYE : Doç. Dr. Funda Şentürk Akfırat

ÜYE : Yrd. Doç. Dr. Sema Tülay Hekimbaşı

ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
...../...../..... tarih ve ...../..... sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR

ÖZET

Retrotranspozonlar, transpozisyon mekanizmaları sayesinde genom içerisinde hareket etme yeteneğine sahip DNA dizileridir. Ayrıca, türler arasındaki benzerlik ve farklılıkların incelenmesinde bir belirteç sistemi olarak kullanılmaktadırlar. Bu bağlamda ara primer bağlanma bölgesi (iPBS), retrotranspozon arası çoğaltım polimorfizmi (IRAP) ve retrotranspozon mikrosatellit çoğaltım (REMAP) retrotranspozon temelli belirteç sistemleri kullanılarak Akdeniz' e özgü 7 farklı *Pistacia* türü (*P. vera* L. cv. Siirt, *P. khinjuk* Stocks, *P. mutica* Fischer, *P. atlantica* Desf., *P. palaestina* Boiss., *P. terebinthus* L. and *P. lentiscus* L) arasındaki genetik ilişkiler açıklanmaya çalışılmıştır. Kullanılan bütün belirteç sistemlerinin yüksek oranda polimorfizm gösterdiği gözlenmiştir. Ayrıca, iPBS belirteç sisteminin hem daha fazla lokus bilgisi sağladığı hem de çeşitlilik indeksleri bakımından diğer belirteç sistemlerine oranla daha üstün olduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte, REMAP belirteç sistemi dışındaki kullanılan sistemlerin birbirleri ile yüksek oranda Mantel korelasyonu gösterdiği tespit edilmiştir. Oluşturulan filogenetik ağaçlarda Akdeniz' e özgü *Pistacia* türlerinin 3 ana gruba ayrıldığı ve ağsı bir evrim örüntüsü sergilediği görülmektedir: (i) *P. vera*-*P. khinjuk*, (ii) *P. mutica*-*P. atlantica* (iii) *P. palaestina*-*P. terebinthus*, *P. lentiscus*. Test edilen türler birincil öz bileşen tahlili yöntemi ile incelendiğinde 4 farklı grup oluştuğu gözlenmiştir: (i) *P. vera*-*P. khinjuk*, (ii) *P. atlantica*-*P. khinjuk*, (iii) *P. terebinthus*-*P. palaestina*, (iv) *P. lentiscus*. Ek olarak çimlenme öncesi ve sonrasında alınan örneklerde, 3 farklı retrotranspozon temelli belirteç sistemi ile incelenmiş ve profillerin gelişimsel evreye bağlı olarak değiştiği gözlenmiştir. Son olarak iPBS belirteç sistemi ile *Pistacia* cinsine özgü olası yeni retrotranspozonal dizilerin belirlenmesine yönelik çalışmalar yapılarak, *Pistacia* türlerine özgü retrotranspozon temelli belirteç sistemleri geliştirilmeye çalışılmıştır. Elde edilen sonuçlar, retrotranspozon temelli belirteç sistemlerinin kullanım kolaylıkları, yüksek oranda polimorfik tabiatı ve genom üzerindeki değişimleri doğrudan göstermeleri yüzünden moleküler karakterizasyon çalışmalarında rahatlıkla kullanılabileceğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: *Pistacia*, Retrotranspozon, Moleküler Çeşitlilik, iPBS, IRAP, REMAP.

SUMMARY

Retrotransposons are DNA sequences that can move one place to another in the genome. Also it is possible to use them a a marker system to analyze differences between species. In this context inter primer binding site (iPBS), inter-retrotransposon amplified polymorphism (IRAP) and retrotransposon-microsatellite amplified polymorphism (REMAP) marker systems were used to resolve genetic differences in 7 Mediterranean *Pistacia* species (*P. vera* L. cv. Siirt, *P. khinjuk* Stocks, *P. mutica* Fischer, *P. atlantica* Desf., *P. palaestina* Boiss., *P. terebinthus* L. and *P. lentiscus* L.). All tested marker systems produced a high level of polymorphism. iPBS marker system was the most superior one in terms of providing more locus information and higher diversity indices. Mantel test showed strong correlations between iPBS and IRAP, except REMAP. Neighbor joining (NJ) method was used to build phylogenetic trees. Mediterranean *Pistacia* species showed a reticulate evolution pattern and may be divided into three clades: (i) *P. vera – P. khinjuk*, (ii) *P. mutica – P. atlantica* and (iii) *P. palaestina – P. terebinthus* with *P. lentiscus*. Principal component analysis (PCA) plots showed 4 distinct clusters: (i) *P. vera-P. khinjuk*, (ii) *P. atlantica-P. khinjuk*, (iii) *P. terebinthus-P. palaestina*, (iv) *P. lentiscus*. Moreover different developmental stages of *P. vera* were analyzed using three different marker systems and the results showed that retrotranspozon profile was changed in different developmental stages such as between embryo and germinated plantlets. Studies were also extended to clone *Pistacia* specific retrotransposonal fragments in order to develop *Pistacia* specific retrotransposon based marker systems. In conclusion, retrotransposon based marker systems could be used for analysis molecular diversity in *Pistacia* genus due to their high polymorphic nature, ease of use and determination of genomic rearrangements directly.

Keywords: Pistacia, Retrotransposon, Molecular Diversity, iPBS, IRAP, REMAP.

TEŞEKKÜR

Akademik çalışmalarımın başlangıcından itibaren, benden desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, bilgisi ve tecrübesiyle beni yönlendiren değerli hocam Doç. Dr. Yelda Özden Çiftçi' ye teşekkür ederim.

Tez çalışmamın başından itibaren değerleri önerileriyle çalışmalarımı yönlendiren Prof. Dr. Nermin Gözükırmızı, Yard. Doç. Dr. Tülay Hekimbaşı' na teşekkür ederim.

Çalışmalarımda kullandığım materyallerin temininde yardımcı olan Veysel Süzerer, İbrahim Koç ve Dr. Limane Abdülkerim' e teşekkür ederim.

Doktora çalışmalarım boyunca aynı laboratuvarı paylaştığımız değerli arkadaşlarım Dr. Hülya Akdemir, Dr. Ergün Kaya, Doğa Kayıhan, İbrahim Koç, Veysel Süzerer, Hamit Ekinci' ye teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında karşılaştığım teknik zorlukları aşmamda yardımcı olan Dr. Mine Gül Şeker ve Dr. Tuğrul Doruk ve Irmak Şah' a teşekkür ederim.

Birlikte aynı binada çalıştığımız Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümü çalışanlarına da bana her zaman yardımcı oldukları için teşekkür ederim.

Çalışmalarım sürecinde beni sürekli destekleyen değerli arkadaşlarım Emrah Özcan, Jafar Khatibipour, Meltem Kasapoğlu Çalık, Ayşe Sagay, Ümit Kutlar, Özlem Akkaya, Ebru Turhanlar,' a teşekkür ederim. Elif Koyuncuk' a destekleri için ayrıca teşekkür ederim.

Son olarak hayatım boyunca aldığım bütün kararların arkasında olan, beni maddi ve manevi açıdan sürekli destekleyen sevgili ailem Aytekin Kırdök, Emine Kırdök ve Ahmet Levent Kırdök' e teşekkür ediyorum.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
TABLOLAR DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
1.1. Moleküler Belirteç Sistemleri ile Bitki Çeşitliliğinin Karakterizasyonu	1
2. Belirteç Sistemleri ve Retrotranspozon Temelli Belirteçler	3
2.1. Restriksiyon Temelli Belirteç Sistemleri	3
2.2. PCR temelli belirteç sistemleri	3
2.2.1. Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA, RAPD	4
2.2.2. Çoğaltılmış Dizi Uzunluk Polimorfizmi (AFLP)	5
2.2.3. Basit Dizi Tekrarları (SSR)	5
2.2.4. Basit Dizi Tekrarları Arası Bölgeler (ISSR)	5
2.3. LTR-Retrotranspozon Temelli Belirteç Sistemleri	6
2.3.1. Transpozonlar ve LTR-Retrotranspozonlar	6
2.3.2. Retrotranspozon Temelli Belirteç Sistemleri	8
2.3.2.1. iPBS Belirteç Sistemi	8
2.3.2.2. IRAP Belirteç Sistemi	9
2.3.2.3. REMAP Belirteç Sistemi	9
2.3.2.4. SSAP Belirteç Sistemi	10
3. Pistacia Cinsi	11
3.1. Taksonomik Tarihçe	11
3.2. Moleküler Belirteç Çalışmaları	12
3.3. Çalışmanın amacı	14
4. MATERYAL ve YÖNTEMLER	15

4.1. Çalışmalarda Kullanılan Bitki Örnekleri 15
4.2. Tohum Örneklerinin Sterilizasyonu ve Çimlendirilmeleri 15
4.3. Farklı Gelişim Evrelerindeki Örneklerin Gösterdiği Değişimler 16
4.4. Bitkiciklerden DNA izolasyonu 16
4.5. Retrotranspozon Temelli Belirteç Sistemleri ile PCR 18
4.6. iPBS Sistemi ile Olası Yeni Retrotranspozonların Araştırılması 21
4.6.1. PCR, Saflaştırma ve Fosforilasyon Aşamaları 21
4.6.2. Kompetan Hücrelerin Hazırlanması 22
4.6.3. Transformasyon Protokolü 23
4.6.4. Plazmit Saflaştırma, Kesim ve Defosforilasyon Aşamaları 23
4.6.5. Ligasyon Protokolü 24
4.6.6. Koloni PCR Yöntemi ile Klonların Doğrulanması 25
4.7. İstatistiksel Yöntem 26
4.8. Tez Çalışması Kapsamında Kullanılan Gereçler 28
5. BULGULAR 33
5.1. Örneklerden Yapılan gDNA izolasyonları 33
5.2. PCR Ardından Jel Görüntülerinin İncelenmesi 36
5.3. Belirteç Sistemlerinin Karşılaştırmalı Olarak İncelenmesi 50
5.4. Türlerin Belirteç Sistemleri ile İncelenmesi 51
5.4.1. Türlerin iPBS Belirteç Sistemi ile İncelenmesi 51
5.4.2. Türlerin IRAP Belirteç Sistemi ile İncelenmesi 57
5.4.3. Türlerin REMAP Belirteç Sistemi ile İncelemesi 61
5.4.4. Türlerin Birleştirilmiş Belirteç Sistemleri ile İncelenmesi 65
5.5. Farklı Gelişim Evresine ait Örneklerdeki Retrotranspozon Profilleri 68
5.6. *Pistacia* Cinsine Özgü Retrotranspozon Dizilerinin Karakterize edilmesi 71
5.6.1. PCR, Saflaştırılması ve Fosforilasyon Sonuçları 71
5.6.2. Plazmit Saflaştırma, Kesim ve Defosforliasyon Basamakları 72
5.6.3. Ligasyon Sonucunda Koloni PCR ile Elde Edilen Bulgular 73
5.6.4. Dizileme Sonuçları 73
6. TARTIŞMA 75
6.1. Belirteç Sistemlerinin Gösterdiği Çeşitlilik Değerlerinin İncelenmesi 75
6.2. Akdeniz' e Özgü *Pistacia* Türlerinde Filogenetik İlişkilerin İncelenmesi 76
6.3. Retrotranspozon Hareketlerinin *Pistacia* Filogenisine Etkisi 78
6.4. Farklı Gelişimsel Evrelerdeki Retrotranspozonal Değişimler 79

6.5. *Pistacia* Cinsine Özgü Olası Retrotranspozon Dizilerinin Araştırılması 80
7. SONUÇLAR 81

KAYNAKÇA 82
ÖZGEÇMİŞ 88
EKLER 88

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler ve Kısaltmalar	Açıklamalar
AFLP:	Çoğaltılmış dizi uzunluk polimorfizmi
AP:	Aspartik proteaz
Bç:	Baz çifti
CTAB:	Setil trimetil amonyum bromid
DAF:	DNA çoğaltım parmakizi
DNA	Deoksiribonukleik asit
EDTA:	Etilen diamin tetra asetik asit
EtOH:	Etanol
GAG:	Kapsid proteini
gDNA	Genomik DNA
IN:	Integraz
IRAP:	Retrotranspozon arası çoğaltım polimorfizmi
ISSR:	Basit tekrar arası dizileri
iPBS:	Ara primer bağlanma bölgesi
LTR:	Uzun uç tekrarları
OD:	Optik yoğunluk
PAGE:	Poliakrilamid jel elektroforezi
PBS:	Primer bağlanma bölgesi
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
pDNA	Plazmit DNA
PPT:	Polypurine tract
PVP:	Polyvinilprilodin
RAPD:	Rastgele çoğaltılmış dizi polimorfizmi
REMAP:	Retrotranspozon mikrosatellit çoğaltım polimorfizmi
RFLP:	Restriksiyon dizi uzunluk polimorfizmi
RH:	Rnase H
RNA:	Ribonukleik asit
RT:	Ters transkriptaz
SCAR:	Dizisi tanımlanmış çoğaltılmış bölgeler

SSR:	Basit tekrar dizileri
TA:	Bağlanma sıcaklığı

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No:		Sayfa
1.1:	LTR retrotranspozon karakteristik özelliklerinin şematik gösterimi.	7
1.2:	iPBS belirteç sistemi ile izlenen strateji.	9
1.3:	IRAP belirteç sistemi ile izlenen strateji.	9
1.4:	REMAP belirteç sistemi ile izlenen strateji.	10
3.5:	MS 0 besiyerinde *in vitro* çimlendirilmiş *Pistacia* bitkicikleri	33
3.6:	İzolasyonun ardından elde edilen gDNA' ların jel görüntüleri.	34
3.7:	Embriyo, gövde, kök ve *in vitro* bitkiciklerinden DNA izolasyonu.	34
3.8:	iPBS-1 primeri kullanılarak elde edilen jel görüntüsü.	36
3.9:	iPBS-2 primeri kullanılarak elde edilen jel görüntüsü.	37
3.10:	iPBS-4 primeri kullanılarak elde edilen jel görüntüsü.	37
3.11:	iPBS-5 primeri kullanılarak elde edilen jel görüntüsü.	38
3.12:	iPBS-6 primeri kullanılarak elde edilen jel görüntüsü.	38
3.13:	iPBS-7 primeri kullanılarak elde edilen jel görüntüsü.	39
3.14:	iPBS-8 primeri kullanılarak elde edilen jel görüntüsü.	39
3.15:	iPBS-9 primeri kullanılarak elde edilen jel görüntüsü.	40
3.16:	iPBS-10 primeri kullanılarak elde edilen jel görüntüsü.	40
3.17:	LTR-2 primeri kullanılarak elde edilen jel görüntüsü.	41
3.18:	LTR-3 primeri kullanılarak elde edilen jel görüntüsü.	41
3.19:	LTR-4 primeri kullanılarak elde edilen jel görüntüsü.	42
3.20:	LTR-5 primeri kullanılarak elde edilen jel görüntüsü.	42
3.21:	LTR-6 primeri kullanılarak elde edilen jel görüntüsü.	43
3.22:	LTR-7 primeri kullanılarak elde edilen jel görüntüsü.	43
3.23:	LTR-10 primeri kullanılarak elde edilen jel görüntüsü.	44
3.24:	REMAP-3 kombinasyonu kullanılarak elde edilen jel görüntüsü.	44
3.25:	REMAP-6 kombinasyonu kullanılarak elde edilen jel görüntüsü.	45
3.26:	REMAP-7 kombinasyonu kullanılarak elde edilen jel görüntüsü.	45
3.27:	REMAP-9 kombinasyonu kullanılarak elde edilen jel görüntüsü.	46
3.28:	REMAP-10 kombinasyonu kullanılarak elde edilen jel görüntüsü.	46
3.29:	REMAP-11 kombinasyonu kullanılarak elde edilen jel görüntüsü.	47
3.30:	REMAP-13 kombinasyonu kullanılarak elde edilen jel görüntüsü.	47

3.31: REMAP-14 kombinasyonu kullanılarak elde edilen jel görüntüsü. 48
3.32: Farklı gelişim evrelerine ait örneklerde iPBS belirteç sistemi ile elde edilen jel görüntüsü. 48
3.33: Farklı gelişim evrelerine ait örneklerde IRAP belirteç sistemi ile elde edilen jel görüntüsü. 49
3.34: Farklı gelişim evrelerine ait örneklerde REMAP belirteç sistemi ile elde edilen jel görüntüsü. 49
3.35: Akdeniz' e özgü *Pistacia* türlerinin, iPBS belirteç sistemi kullanılarak gruplandığı filogenetik ağaç. 56
3.36: iPBS belirteç sistemi verileri kullanılarak yapılan PCA sonucunda Akdeniz' e özgü *Pistacia* türlerinin gruplanması. 57
3.37: Akdeniz' e özgü *Pistacia* türlerinin, IRAP belirteç sistemi kullanılarak gruplandığı filogenetik ağaç. 60
3.38: IRAP belirteç sistemi verileri kullanılarak yapılan PCA sonucunda Akdeniz' e özgü *Pistacia* türlerinin gruplanması. 61
3.39: Akdeniz' e özgü *Pistacia* türlerinin, REMAP belirteç sistemi kullanılarak gruplandığı filogenetik ağaç. 63
3.40: REMAP belirteç sistemi verileri kullanılarak yapılan PCA sonucunda Akdeniz' e özgü *Pistacia* türlerinin gruplanması. 65
3.41: Akdeniz' e özgü *Pistacia* türlerinin, birleştirilmiş belirteç sistemi verisi kullanılarak gruplandığı filogenetik ağaç. 67
3.42: Birleştirilmiş belirteç sistemi verileri kullanılarak yapılan PCA sonucunda Akdeniz' e özgü *Pistacia* türlerinin gruplanması. 67
3.43: Farklı gelişim evrelerindeki örneklerin birleştirilmiş belirteç sistemleri ile incelenmesi. 70
3.44: Farklı gelişim evrelerine ait bütün belirteç sistemleri ile incelenmesi sonucu oluşturulmuş PCA grafiği. 71
3.45: *P. vera* bitkisinde iPBS PCR sonucunda elde edilen bant profiline ait jel görüntüsü. 71
3.46: Plazmit izolasyonları jel görüntüleri. 72
3.47: Koloni PCR sonuçları. 73

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo No:		Sayfa
2.1:	Çalışmalarda kullanılacak olan sterilizasyon çözeltileri.	17
2.2:	Çalışmalarda kullanılacak olan primerler.	19
2.3:	REMAP belirteç sistemi kapsamında kullanılan primer çiftleri.	20
2.4:	Çalışmalarda kullanılacak PCR protokolü.	20
2.5:	Çalışmalarda kullanılacak PCR döngüleri.	20
2.6:	*Pistacia* cinsine özgü yeni retrotranspozonal dizilerin elde edilmesi için kullanılan PCR protokolü.	21
2.7:	PCR ürünlerinin fosforilasyonu için kullanılan reaksiyon bileşenleri.	22
2.8:	Plazmit kesimlerinde kullanılan protokol.	24
2.9:	Restriksiyon kesimi ardından elde edilen pDNA' nın defosforilasyonu.	24
2.10:	PCR saflaştırma sonucunda elde edilen ürünleri klonlama protokolü.	25
2.11:	Koloni PCR protokolü.	25
2.12:	Belirteç sistemlerinin analizlerinde kullanılan istatistiksel yöntemler.	27
2.13	Jaccard benzerlik katsayısı hesaplanırken kullanılan yöntem.	27
2.14:	Çalışma kapsamında kullanolan kimyasal malzemeler.	29
2.15:	Çalışma kapsamında kullanılan cihazlar.	30
2.16:	Tez çalışması kapsamında kullanılan MS besiyeri içeriği.	30
2.17:	Çalışmalarda kullanılan çözeltilerin hazırlanması.	31
2.18:	Jel elektroforez sistemlerinde kullanılan çözeltilerin hazırlanması.	31
2.19:	Kompetan hücre hazırlanırken kullanılan çözeltiler.	31
2.20:	Plazmit izolasyonu için kullanılan çözeltiler.	32
3.21:	Elde edilen gDNA' ların miktar ve saflık ölçümleri.	35
3.22:	Farklı gelişim evrelerine ait örneklerin DNA miktarları.	36
3.23:	Belirteç sistemlerinin çeşitlilik indekslerinin karşılaştırılması.	50
3.24:	1000 permütasyon ile tekrarlanmış Mantel korelasyon testi.	50
3.25:	PCA sonucunda elde edilen göreceli ve kümülatif varyasyonlar.	51
3.26:	iPBS belirteç sistemi ile elde edilen sonuçların değerlendirilmesi.	52
3.27:	iPBS PCR sonunda, tür içindeki benzerlik ve farklılık oranları.	53
3.28:	iPBS PCR sonunda, türler arasındaki benzerlik ve farklılık oranları.	54
3.29:	IRAP belirteç sistemi ile elde edilen sonuçların değerlendirilmesi.	57

3.30: IRAP PCR sonunda, tür içindeki benzerlik ve farklılık oranları. 58
3.31: IRAP PCR sonunda, türler arasındaki benzerlik ve farklılık oranları. 59
3.32: REMAP belirteç sistemi ile elde edilen sonuçların değerlendirilmesi. 62
3.33: REMAP PCR sonunda, tür içindeki benzerlik ve farklılık oranları. 62
3.34: REMAP PCR sonunda, türler arasındaki benzerlik ve farklılık oranları. 64
3.35: Retrotranspozon temelli 3 farklı belirteç sistemi birleştirildiğinde elde edilen benzerlik matrisi. 66
3.36: Farklı gelişme evrelerindeki bitki örneklerinin benzerlik değerleri. 69
3.37: Farklı gelişme evrelerindeki bitki örneklerinin birbirlerine olan ortalama benzerlik değerleri. 70
3.38: iPBS PCR sonucunda elde edilen bantların klonlama aşamasında DNA konsantrasyonları. 72
3.39: Plazmit izolasyonu, RNAz-A ve fenol-kloroform basamaklarının ardından elde edilen DNA konsantrasyonları. 73
3.40: Dizileme sonucunda elde edilen dizilerin uzunlukları. 74

1.GİRİŞ

1.1. Moleküler Belirteç Sistemleri ile Bitki Çeşitliliğinin Karakterizasyonu

Bitki gen kaynaklarının karakterizasyonu çalışmaları; bitki ıslahı, taksonomi, embriyoloji ve genetik mühendisliği gibi farklı temel bilim alanları için bir kaynak oluşturmaktadır. Ayrıca gen kaynaklarının korunması için uygun stratejilerin üretilmesi açısından da önemlidir. Moleküler belirteç sistemleri, sahip oldukları özellikler sayesinde bitki biyoteknolojisi' nin farklı alanlarında sıklıkla kullanılmaktadır [Parveen et al., 2016]:

- Hastalıklara dirençli genler gibi önemli karakterlerin tanımlanması ve bu yolla istenilen varyetelerin seçilerek ıslah çalışmalarına alınması.
- Evrimsel biyoloji ve filogenetik çalışmalar ile türlerden oluşan popülasyonlarının anlaşılarak genetik çeşitliliğin belirlenmesi.
- Islah edilmiş çeşitler ve yabani ataları arasındaki gen akışının belirlenerek genetik çeşitlilik kaybının engellenmesi.
- İstenilen çeşitlerin genotiplenerek somaklonal varyasyonların tespit edilmesi ve çeşitlerin genetik kararlılıklarının korunması.

Belirteçler, incelenen genotipler arasındaki benzerlik veya farklılıkların tespit edilmesinde ve bu örnekler arasındaki çeşitliliğin tayin edilmesinde kullanılan karakterler olarak tanımlanabilir. Belirteçler, tarihsel gelişim ve yapısal özelliklerine göre temel olarak 3 sınıfa ayrılmaktadır [Mondini et al., 2009]:

- Morfolojik belirteçler
- Biyokimyasal belirteçler (izozim ve allozimler)
- Moleküler veya genetik belirteçler (DNA belirteçleri)

Bitkilerdeki farklı fenotipik karakterler (yaprak şekli, çiçek rengi, tüy rengi, kapsül rengi, tohum yapısı, hilum rengi, meyve şekli, kabuk rengi, etsi doku rengi ve gövde uzunluğu) morfolojik belirteçler olarak karakterizasyon çalışmalarında yıllar boyunca kullanılmıştır [Jiang, 2013]. Ancak fenotipik karakterlerin çevresel etkenlere bağımlı olması, genotipte ifade edilen karakterlerin her zaman fenotipte temsil edilmemesi ve fenotipik karakterlerin farklı genetik altyapılara sahip olmaları gibi

sorunlar bu belirteçlerin en büyük dezavantajlarını oluşturmaktadır [Mondini et al., 2009].

Allozimler, aynı enzimatik aktiviteye sahip ancak sahip oldukları aminoasit dizilimlerindeki farklılıklar yüzünden varyasyon gösteren proteinlerdir. Bu farklılık jel elektroforezi ardından allozimlerin tanımlanmasına olanak sağlamış ve biyokimyasal belirteçler olarak kullanılmalarını sağlamıştır [Kephart, 1990]. Bu sayede allozimler kalıtılabilir varyasyonun ifade edilmesi ve popülasyon yapısının anlaşılması gibi karakterizasyon çalışmalarda sıklıkla kullanılmıştır [Gottlieb, 1977], [Hamrick et al., 1979], [Brown, 1979], [Kephart, 1990]. Ancak bu değişimler DNA üzerindeki polimorfizmi dolaylı olarak ifade etmektedir. Ayrıca kısıtlı sayıda allozim lokusu karakterize edilebilmektedir. Bu sorunlar biyokimyasal belirteçlerin dezavantajlarındandır.

Moleküler belirteçler ise bahsedilen diğer tekniklerin aksine, DNA üzerindeki varyasyonu doğrudan ifade etmektedir. Moleküler belirteçler genel olarak genom üzerinde bulunan ve incelenen türler arasındaki benzerlik ve farklıkların tespit edilmesinde kullanılan özel DNA dizileri olarak tanımlanabilir. Moleküler belirteç yöntemlerinin temelinde inversiyon, delesyon, translokasyon, insersiyon ve duplikasyon gibi kromozomal DNA değişimleri sonucu oluşan dizi farklılıklarının incelenmesi yatmaktadır [Yang et al., 2015]. Bu dizi değişimlerinin incelenmesi için; restriksiyon ve polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase chain reaction, PCR) temelli belirteç yöntemleri olmak üzere iki temel teknik geliştirilmiştir. İdeal bir moleküler belirtecin aşağıdaki özelliklere sahip olması beklenmektedir [Parveen et al., 2016]:

- Polimorfik bir tabiata sahip olmalı
- Diploid bir organizmada homozigot ve heterozigot genotipleri ayırabilmeli, yani ko-dominant olmalı
- Genom üzerinde geniş bir yayılım frekansına sahip olmalı
- Kolay erişilebilmeli
- Hızlı sonuç vermeli
- Hızlı ve kolay uygulanmalı
- Tekrar edilebilir olmalı

2. Belirteç Sistemleri ve Retrotranspozon Temelli Belirteçler

Belirteç sistemleri geliştirilme ve uygulama yöntemlerine göre 2 grup altında toplanmaktadır:

- Restriksiyon temelli belirteç sistemleri
- PCR temelli belirteç sistemleri

2.1. Restriksiyon Temelli Belirteç Sistemleri

Restriksiyon temelli belirteç sistemlerinde, gDNA (genomik DNA) üzerinde bulunan özel nükleotid dizilerini tanıyan ve buna göre kesim yapan restriksiyon endonukleazları kullanılmaktadır. İlk olarak insanda genetik haritalandırma çalışmalarında kullanılmıştır [Botstein et al., 1980]. Teknik; gDNA' nın restriksiyon enzimleri ile kesilerek jel üzerinde yürütülmesi, uygun problar ile hibridize edilmesi ve oluşan nükleotid dizi uzunluklarının incelenmesine dayandığı için restriksiyon uzunluk polimorfizmi (restriction fragment length polymorphism, RFLP) olarak adlandırılmıştır. RFLP tekniği (i) yüksek tekrar edilebilirlik, (ii) genom içerisinde yüksek oranda dağılması, (iii) kodlama yapmayan bölgelerdeki çeşitliliğin de incelenebilmesi ve (iv) kodominant yapısı sayesinde heterozigot fenotiplerin de tespit edilebilmesi gibi avantajlara sahiptir. Ancak, (i) görece yüksek gDNA ihtiyacı, (ii) radyoaktif probların kullanımı ve (iii) maliyetli olması da bu tekniğin en büyük dezavantajlarıdır [Grover and Sharma, 2015].

2.2. PCR temelli belirteç sistemleri

PCR temelli belirteç sistemleri, karakterize edilmek istenen bireylere uygun primerler kullanarak, primerlerin bağlanma bölgeleri arasında kalan gDNA bölgesinin çoğaltılması esasına dayanmaktadır. Bu teknik düşük miktarda gDNA ihtiyacı ve düşük bütçeler ile bitki gen kaynaklarının karakterizasyonunu mümkün hale getirmiştir. Kullanılan primerler ve hedef bölgelerin çeşitliliğine göre farklı teknikler geliştirilmiştir [Parveen et al., 2016]:

- Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA (RAPD, Randomly Amplified Polymorphic DNA)
- Çoğaltılmış dizi uzunluk polimorfizmi (AFLP, Amplified Fragment Length Polymorphism)
- Basit dizi tekrarları arası bölge çoğaltımı(ISSR, Inter simple sequence repeats)
- Basit dizi tekrarı çoğaltım polimorfizmi (SSR, Simple sequence repeats)

2.2.1. Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA, RAPD

RAPD tekniği, gDNA' ya rastgele bir şekilde bağlanan primerlerin arasında kalan bölgenin çoğaltılarak, türler arasındaki benzerlik veya farklılıklar tespit edilebilmesi esasına dayanmaktadır [Williams et al., 1990]. Bu tekniğin en önemli özelliklerinden biri çok (i) ucuz olması, (ii) her türlü canlıya kolaylıkla uygulanabilmesi, (iii) aynı anda bir çok lokusu karakterize edebilmesi ve (iv) genom üzerinde geniş bir dağılıma sahip olmasıdır. Dominant bir belirteç sistemi olan RAPD heterozigot genotipleri ayırt edememekte ve düşük miktarda gDNA' ya gereksinim göstermesi nedeniyle de RFLP tekniğindeki olumsuzlukları ortadan kaldırılabilmektedir. Ancak primerlerin düşük bağlanma sıcaklıklarına sahip olması ve rastgele bağlanma örüntüsü yüzünden, yeniden tekrarlanabilirlik açısından dezavantajlıdır [Parveen et al., 2016].

RAPD tekniğinin sahip olduğu avantajlar sayesinde farklı ihtiyaçlara yönelik belirteç sistemleri de geliştirilmiştir. Bu tekniklerden en önemlileri:

- SCAR (Dizisi karakterize edilmiş çoğaltılmış bölge, Sequence Characterized Amplified Regions) sisteminde, RAPD sonrası elde edilen polimorfik bantlar jelden geri alınarak dizilenir ve bu dizilere göre tasarlanan primerler karakterizasyon çalışmalarında kullanılabilir [Martin et al. 1989], [Michelmore et al., 1991].
- DAF (DNA Çoğaltım Parmak izi, DNA Amplification Fingerprinting) tekniğinde ise RAPD primerlerine göre daha küçük (5 bç) uzunluğunda primerler kullanılır ve elde edilen bantlar floresan işaretleme ile incelenirler [Caetano-Anollés et al., 1991].
- AP-PCR (Belirsiz bağlanma PCR, Arbitrary Primed Polymerase Chain Reaction) tekniği de yine benzer ilkelerle çalışmaktadır [Welsh and McClelland, 1991].

2.2.2. Çoğaltılmış Dizi Uzunluk Polimorfizmi (AFLP)

AFLP tekniği genel olarak, RFLP ve PCR temelli belirteç sistemlerinin bir birleşimidir. İki temel aşamadan oluşur: (i) gDNA' nın restriksiyon endonukleazları ile kesimi ve (ii) nükleotid dizilerinin uçlarına bağlanan adaptörler yardımıyla seçici bir PCR gerçekleştirilmesi. Bu aşamalar sonucunda elde edilen ürünler poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE, Polyacrylamide gel electrophoresis) ile yürütülüp gümüş boyama ile analiz edilmektedir [Vos et al., 1995]. AFLP' nin en önemli özellikleri (i) yüksek bir tekrarlanabilirlik göstermesi (ii) otomatik dizileyicilere adapte edilebilmesi, (iii) yüksek oranda polimorfizm sağlaması örnek gösterebilir. Ancak farklı dizi bilgisine sahip ancak boyut açısından homoloji gösteren bantların varlığı bu tekniğin en önemli dezavantajlarındandır.

2.2.3. Basit Dizi Tekrarları (SSR)

Basit dizi tekrarları, çoğunlukla ökaryotik genomlarda bulunan ve 1 ile 5' li nükleotid tekrarlarına sahip bölgelerdir [Powell et al., 1996]. İşlevleri tam olarak aydınlatılmasa da, (i) yüksek derecede çeşitliliğe sahip olmaları, (ii) heterozigot genotipleri göstermeleri, (iii) düşük gDNA ihtiyacına sahip olmaları ve (iv) yeniden tekrarlanabilme olanağı gibi özellikleri yüzünden türler arası benzerlik ve farklılıkların tespit edilmesinde, özellikle popülasyon genetiği çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır. Ancak bu belirteç sistemleri dizi bilgisine bağımlı oldukları için geliştirilmeleri biraz pahalıdır [Parveen et al., 2016].

2.2.4. Basit Dizi Tekrarları Arası Bölgeler (ISSR)

ISSR tekniği, basit dizi tekrarları (SSR) arasında yer alan 100-3000 bç uzunluktaki nükleotid dizileridir [Zietkiewicz et al., 1994]. Basit dizi tekrar bölgelerini hedefleyen 16-18 bç' lik primerler kullanılarak gerçekleştirilen ISSR tekniği, (i) düşük oranda gDNA kullanılması ve (ii) dizi bilgisi gerektirmemesi gibi nedenlerle tercih edilen dominant bir belirteç sistemidir [Parveen et al., 2016].

2.3. LTR-Retrotranspozon Temelli Belirteç Sistemleri

2.3.1. Transpozonlar ve LTR-Retrotranspozonlar

Transpozonlar, genom üzerinde kendilerini bir konumdan başka bir konuma aktarma yeteneğine (transpozisyon) sahip olan DNA dizileridir. İlk olarak mısır bitkisinde kromozom kırıkları oluşturarak tohumların renk değişiminden sorumlu olduğu tespit edilen transpozonlar [McClintock, 1951], ilerleyen yıllarda insan dahil bütün ökaryotik organizmalarda da belirlenmiş ve genom yapısal bütünlüğü içerisindeki önemli öğelerden biri oldukları gösterilmiştir [Bennetzen and Wang, 2014], [Alzohairy et al. 2014], [Grandbastien, 2015]. Bu açıdan bakıldığında transpozonlar, transpozisyon mekanizmaları sayesinde içinde bulundukları genoma akışkanlık kazandırarak genomik varyasyon oluşturan diziler olarak da tanımlanabilirler.

Transpozonlar, replikasyon mekanizmalarına göre iki ana grup altında toplanırlar [Schulman, 2013]:

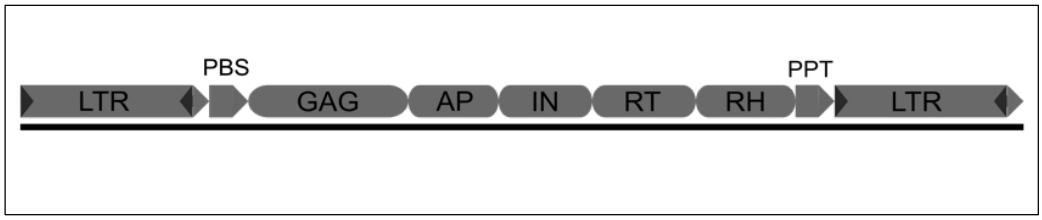
- DNA transpozonları: Transpozisyon mekanizması sadece DNA ara formu ile gerçekleşir. Yani transpozon kendisini genomdaki bir noktadan başka bir noktaya taşır. Bu mekanizma kes-yapıştır mekanizması olarak da adlandırılır.
- RNA transpozonları, Retrotranspozonlar: Önce RNA ara formu olarak transkribe edilen transpozon sonra ters-transkripsiyon ile DNA ara formuna dönüşür ve gDNA' ya entegrasyon gerçekleşir Bu yüzden "kopyala yapıştır" mekanizması olarak ifade edilir. Retrotranspozonlar da yapısal özelliklerine göre iki ana gruba ayrılmaktadırlar: (i) LTR' siz retrotranspozonlar ve (ii) LTR' li retrotranspozonlar

Tipik bir LTR-Retrotranspozon aşağıdaki bölgelerden oluşmaktadır (Şekil 1.1) [Kalendar et al., 2011]:

- LTR Bölgesi: Retrotranspozonların 5' ve 3' uçlarında bulunan, transkripsiyonun başlaması ve sonlanması için gerekli sinyal dizilerini içeren 200 – 1000 baz çifti (bç) uzunluğundaki diziler. LTR bölgesinin 5' ucunda transkripsiyonun başlamasını sağlayan Pol-II protomotörü bulunmaktadır. 3' bölge ise poliadenilasyon ve terminatör sinyallerini içermektedir. Aynı zamanda LTR

bölgelerinin iç kısımlarında TIR (İç ters tekrar) bölgeleri bulunmaktadır [Schulman, 2013].

- PBS (Primer Binding Site, Primer Bağlanma Bölgesi) Bölgesi: mRNA olarak transkribe edilen retrotranspozonun 5' LTR bölgesinin 3' ucunda bulunan ve mRNA' nın cDNA (complementary DNA, tamamlayıcı DNA) haline çevrilmesi için gerekli tRNA primerlerinin bağlandığı ve bütün retrotranspozonlarda bulunan evrensel dizi.
- Protein Kodlayıcı Bölge: Retrotranspozon transkripsiyonunun ardından oluşan RNA molekülünün ters transkripsiyonu için gerekli ters transkriptaz (RT), RNA molekülünün yıkımını sağlayan RNAse H (RH), oluşan DNA' nın genoma yeninde girmesine yardım eden integraz (IN) proteinlerinin kodlandığı bölge.



Şekil 1.1: LTR retrotranspozon karakteristik özelliklerinin şematik gösterimi. Ok yönü 5' 3' yönünü temsil etmektedir.

Transpozonların, özellikle de LTR-retrotranspozonların genoma olan katkısı üç noktada incelenebilmektedir [Grandbastien, 2015], [Bennetzen and Wang, 2014]:

- Sahip oldukları düzenleyici bölgeler sayesinde çevresel stresler ile transkribe olabilmeleri,
- "Kopyala-yapıştır" mekanizması sayesinde genom içerisindeki sayılarını arttırabilmeleri ve genom boyutuna katkı sağlamaları,
- Transpozisyonun gerçekleştiği bölgelerde gen duplikasyonları, yeni düzenleyici gen bölgeleri oluşturmaları ve mutasyona sebep olmaları.

LTR-retrotranspozonları yukarıda da bahsedildiği gibi yaşam döngüleri yüzünden canlıların genom boyutu artışından sorumlu en önemli elementlerden birisidir. Örnek olarak mısır, arpa ve buğday gibi bitkilerde genomun %80 kadarlık bir kısmının LTR-retrotranspozonlardan oluştuğu tespit edilmiştir [Bennetzen et al., 2005]. Ayrıca LTR retrotranspozonların çevresel etkenler (UV, abiyotik stresler) ve

bitki doku kültürü koşullarında aktivasyonları farklı bitki türleri ve farklı stres koşullarında ayrıntılı olarak incelenmiştir [Grandbastien, 2015].

Retrotranspozonlar, hareketli tabiatları sayesinde kromozomal yeniden düzenlenmeler ve genomda yeni düzenleyici bölgeler oluşturmak suretiyle hem organizmanın değişen çevresel şartlara uyumunu sağlayabilirler hem de türleşme için itici bir kuvvet oluştururlar [Biemont and Vieira, 2006], [Kalendar et al. 2011].

2.3.2. Retrotranspozon Temelli Belirteç Sistemleri

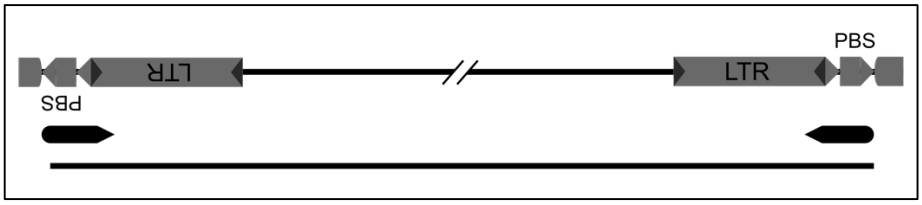
Retrotranspozonlar; (i) genom içerisinde dağınık halde bulunmaları, (ii) ortak yapısal özelliklere sahip dizilerinin olması, (iii) genom çapında düzenlemelere katılmaları gibi özellikleri yüzünden moleküler belirteç olarak kullanılmaya uygundurlar. Bu bakış açısıyla, retrotranspozonların farklı yapısal bölgeleri kullanılarak 3 farklı PCR tabanlı retrotranspozon belirteç sistemi geliştirilmiştir. Bu sistemler çoğunlukla retrotranspozonlar arasındaki LTR bölgelerinin veya bir retrotranspozon ile bir basit dizi tekrarları (SSR) arasındaki bölgenin çoğunlukla PCR ile çoğaltılmasına dayanmaktadır [Kalendar et al., 2011], [Kalendar and Schulman, 2006], [Kalendar et al., 2010], [Kalendar and Schulman, 2014]:

- iPBS (inter retrotransposon binding site, Ara primer bağlanma bölgesi çoğaltım polimorfizmi)
- IRAP (Inter retrotransposon amplified polymorphism, Retrotranspozonlar arası bölge çoğaltım polimorfizmi)
- REMAP (Retrotransposon microsatellite amplified polymorphism, Retrotranspozon mikrosatellit çoğaltım polimorfizmi)
- SSAP (Sequence specific amplified polymorphism, Dizi spesifik çoğaltım polimorfizmi)

2.3.2.1. iPBS Belirteç Sistemi

PBS bölgeleri hedef alınan bu belirteç sisteminde, 5’ uçları karşılıklı olarak hizalanmış iki farklı retrotranspozonun arasındaki bölgenin çoğaltılması amaçlanmıştır (Şekil 1.2). Aynı zamanda PBS bölgesinin sahip olduğu kısıtlı sayıdaki tRNA bağlanma bölgeleri sayesinde, retrotranspozonlar için korunmuş LTR

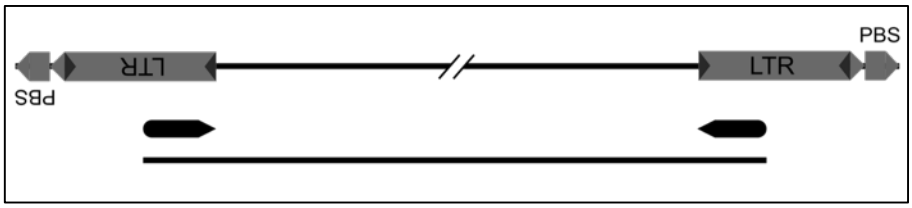
bölgelerinin çoğaltılması ve dizilenerek yeni retrotranspozonal dizilerin elde edilmesi olanaklı olmaktadır [Kalendar et al., 2010].



Şekil 1.2: iPBS belirteç sistemi ile izlenen strateji. Primerler PBS bölgesine uygun bir şekilde tasarlanarak 5' uçları karşılıklı olarak hizalanmış iki retrotranspozonun arasındaki bölge çoğaltılmaktadır.

2.3.2.2. IRAP Belirteç Sistemi

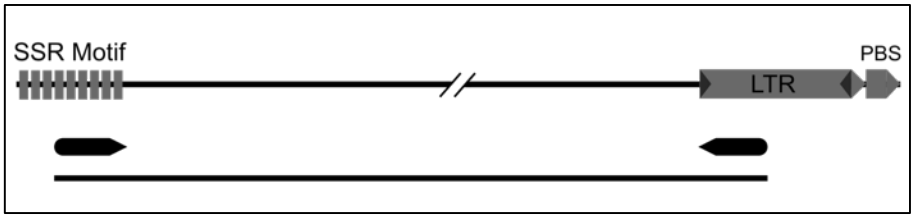
Bu teknikte ise iki tane retrotranspozon arasında kalan bölge çoğaltılmaktadır. Primerler iPBS belirteç sisteminde olduğu gibi 5' uçları karşılıklı olarak hizalanmış iki farklı retrotranspozonun LTR bölgelerine uygun olarak tasarlanmaktadır [Kalendar et al., 1999].



Şekil 1.3: IRAP belirteç sistemi ile izlenen strateji. Primerler retrotranspozonların LTR bölgelerine uygun bir şekilde 5' uçları karşılıklı olarak hizalanmış iki retrotranspozonun arasındaki bölge çoğaltılmaktadır.

2.3.2.3. REMAP Belirteç Sistemi

Retrotranspozonların çoğunlukla SSR gibi yüksek sayıda tekrara sahip olan dizilerle benzer genomik bölgelerde bulunması, bu dizilerin birlikte incelenmesini olanaklı kılmaktadır. Hem LTR bölgesine özgü hem de SSR bölgelerine özgü dizilere sahip olan primerlerin birlikte kullanılması sonucunda, belirli bir retrotranspozon ile bir SSR bölgesi arasında kalan dizi çoğaltılabilmektedir (Şekil 1.4) [Kalendar et al., 1999].



Şekil 1.4: REMAP belirteç sistemi ile izlenen strateji. Primerler retrotranspozonların LTR ve gDNA' nın SSR bölgelerine uygun bir şekilde tasarlanarak SSR ve retrotranspozonal bölge arasındaki DNA dizisi çoğaltılmaktadır.

2.3.2.4. SSAP Belirteç Sistemi

AFLP belirteç sistemine benzer bir strateji izlenen SSAP' ta temel yöntem iki farklı restriksiyon enzimleri (çoğunlukla MseI ve PstI) ile kesilen gDNA parçalarına adaptörler eklenmekte ve LTR bölgeleri ile adaptörlerin arasındaki kısmın çoğaltılması hedeflenmektedir. Bu yöntemin en büyük avantajlarından birisi ise AFLP' ye oranla daha yüksek seviyede polimorfizm ve ko-dominansi göstermesidir [Waugh et al., 1997].

Son yıllarda LTR retrotranspozonları, sahip oldukları karakteristik özellikler sayesinde filogenetik çalışmalar ve genetik çeşitliliğin belirlenmesinde moleküler belirteç sistemi olarak sıklıkla kullanılmaktadır [Kalendar et al., 2011]. Retrotranspozon temelli belirteç sistemleri şu ana kadar akdeniz hurması [Guo et al., 2006], buğday [Carvalho et al., 2010], turunçgiller [Biswas et al., 2010], üzüm türleri ve çeşitleri [Guo et al., 2006], keten [Smykal et al., 2011], yonca [Abdollahi Mandoulakani et al., 2011], cocoyam [Doungous et al., 2015], taro [Doungous et al., 2015], zambak [Lee et al., 2015] ve alıç [Rahmani et al., 2015] gibi bir çok bitkide uygulanmıştır.

3. Pistacia Cinsi

3.1. Taksonomik Tarihçe

Sapindales sınıfı ve *Anacardiaceae* ailesinin bir üyesi olan *Pistacia* cinsi, en az 11 türe sahip, yaprak döken ve dökmeyen dioik ağaçlardan oluşmaktadır [Al-Saghir and Porter, 2012]. *Pistacia* cinsinde iki temel çeşitlilik bölgesi tespit edilmiştir [Parfitt and Badenes 1997], [Kafkas and Perl -Treves 2001]: (i) Güney Avrupa' nın Akdeniz bölgesi, Kuzey Afrika ve Ortadoğu, (ii) Batı ve Orta Asya.

P. vera L., bu takson içerisinde ticari olarak en önemli türü olarak göze çarpmaktadır. Öyle ki, hem anaç olarak yaygın bir kullanıma sahiptir hem de tohumları gıda, tıp ve temizlik gibi bir çok farklı endüstri alanında ihtiyaçları karşılamaktadır. FAO (Besin ve Tarım Örgütü, Food and Agriculture Organization)' ya göre Türkiye, 2013-2014 yılları içinde Dünyada üretilen ortalama 916.921 ton olan antepfıstığı üretiminde 88.600 ton ile üçüncü sırada bulunmaktadır [FAOSTAT, 2016].

Pistacia cinsini ilk olarak Linnaeus [1753] *Species plantarum* isimli kitabında 3 tür olarak tanımlamıştır: *P. vera* L., *P. terebinthus* L. ve *P. lentiscus* L.. İlerleyen yıllarda diğer türler de tespit edilmiştir: *P. atlantica* [Desfontaines, 1799], *P. mexicana* HBK [Humboldt et al., 1824] *P. mutica* Fischer [Fischer and Meyer, 1838] *P. palaestina* [Boissier, 1849], *P. khinjuk* [Stockmans and Hooker, 1852], *P. chinenis* Bunge [Bunge, 1853], *P. integerrima* Stewart [Steward and Brandis, 1874], *P. falcata* Martelli [Martelli, 1886], *P. weinmannifolia* Franchet [Franchet, 1886] ve *P. texana* Swingle [Swingle, 1920].

Pistacia cinsi üzerine yapılan ilk çalışma Engler tarafından gerçekleştirilmiş ve 8 farklı tür incelenmesine rağmen herhangi bir sınıflandırma yapılmamıştır (*P. atlantica*, *P. chinensis*, *P. khinjuk*, *P. lentiscus*, *P. mexicana*, *P. mutica*, *P. terebinthus* ve *P. vera*) [Engler, 1881]. Ancak *Pistacia* genusu üzerine yapılmış en geniş kapsamlı araştırma Zohary [1952] tarafından yaprak ve diğer morfolojik karakterlerin incelendiği ve *Pistacia* cinsini 4 kısma ayırdığı çalışmadır: Lenticella (*P. mexicana* ve *P. texana*), Eu-Lentiscus (*P. lentiscus*, *P. saportae* ve *P. weinmannifolia*), Butmela (*P. atlantica*), Eu-Terebinthus (*P. chinensis*, *P. khinjuk*, *P. palaestina*, *P. terebinthus* ve *P. vera*. Zohary bu çalışmaları sonucunda *P. vera*' nın genus içerisindeki en atasal tür olduğu sonucunda varmıştır. Ayrıca Zohary, fosil kayıtlarına dayanarak *Pistacia* cinsinin 80 milyon yıl önce ayrıldığını öne sürmüştür. Al-Saghir ve Porter [2012]' ın

19 farklı morfolojik belirteç kullanarak yaptığı başka bir çalışmada ise *Pistacia* genusu, Pistacia ve Lentiscella olarak 2 ana kümeye ayrılmıştır.

3.2. Moleküler Belirteç Çalışmaları

İlerleyen dönemlerde moleküler belirteç yöntemlerin geliştirilmesiyle moleküler bağlamda yapılan bir çok çalışma ile *Pistacia* cinsi içindeki filogenetik ilişkiler açıklanmaya çalışılmıştır [Ozden-Tokatli et al., 2010]. Ancak bu çalışmalar hem türler arasında sıklıkla oluşan türler arası melezler yüzünden oluşan yakın ilişkiler sonucunda gerçek türleşmeyi hem de kısıtlı örnek kullanımı ve melez örneklerin dahil edilmemesi yüzünden türler arasındaki genetik ilişkileri açıklamakta yetersiz kalmıştır [Parfitt and Badenes, 1997], [Al-Saghir and Porter 2012], [Xie et al., 2014].

Karakterizasyon çalışmaları moleküler belirteç sistemleri ile devam etmiştir. *P. vera*' nın 55 farklı çeşidinin yaprak örnekleri kullanılarak yapılan bir çalışmada 7 farklı izoenzim sistemi incelenmiş ve en yüksek polimorfizm seviyesinin glukoz fosfat izomeraz enziminde olduğu tespit edilmiştir [Rovira et al., 1998].

İzozim belirteçlerinin kullanımı dışında restriksiyon ve PCR temelli farklı moleküler belirteçlerle de *Pistacia* cinsindeki karakterizasyon çalışmaları devam etmiştir: -

Hormaza ve arkadaşlarının [1994] 15 farklı antepfıstığı çeşidi ile yaptığı RAPD çalışması sonucunda iki ayrı grubun varlığı ortaya çıkartılmıştır. İlk grup Akdeniz, Kuzey Afrika ve Orta Asya iken diğer gruptaki türler Zagros ve Kafkaslardan köken almaktadır. Yine Hormaza et al tarafından yapılan ve 29 farklı *P. vera* çeşidi kullanılarak yapılan başka bir çalışmada [1998] ise yine yüksek seviyede polimorfizm gözlenmiştir.

Kloroplast DNA' sı kullanılarak RFLP belirteç sistemiyle yapılan çalışma sonucunda *Pistacia* cinsi Terebinthus (*P. saportae* dışındaki diğer türler) ve Lentiscus (*P. lentiscus*, *P. weinmannifolia*, *P. mexicana*, *P texana*) olarak iki kısma ayrılmıştır. Ayrıca *P. vera* ve *P. khinjuk* türlerinin *Pistacia* cinsi içerisindeki atasal türler olduğu ve *P. khinjuk'* un P. *vera*' dan köken aldığı bulunmuştur [Parfitt and Badenes, 1997].

Hem morfolojik ve hem de RAPD verilerine dayanarak yapılan çalışmalarda ise *P. vera*' ya en çok benzeyen türün *P. eurycarpa* olduğu tespit edilmiş ve test edilen bütün genotiplerde morfolojik belirteçlerin hem tür içi hem de türler arası bağlamda yüksek çeşitlilik gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca *P. palaestina* ve *P. terebinthus*

arasındaki yakın ilişki ortaya koyulmuştur [Kafkas and Perl -Treves 2001], [Kafkas and Perl -Treves 2002].

Aynı şekilde Akdeniz ve Yunanistan kökenli *P. lentiscus*, *P. terebinthus*, *P. chinensis*, *P. palaestina* ve *P. vera* ile yapılan RAPD ve AFLP çalışmasında da yine iki ayrı grubun oluştuğu tespit edilmiştir. Birinci grup *P. lentiscus*' u içerirken diğer grup ise geri kalan türlerden oluşmaktadır [Katsiotis et al., 2003].

Akdeniz bölgesine özgü *Pistacia* türleri kullanılarak yapılan diğer bir AFLP ve RAPD çalışmasında ise cins iki farklı gruba ayrılmıştır. İlk grup *P. lentiscus*' u içerirken, ikinci grup diğer bütün türleri içermektedir. Ayrıca ikinci grubun da *P. palaestina*, *P. terebinthus* ve *P. vera*, *P. atlantica*, *P. khinjuk* olarak iki farklı kümeye ayrıldığı tespit edilmiştir. Ayrıca türlerin, Zohary [1952]' nin ortaya koyduğu taksonomik sınıflandırma sistemine uygun bir şekilde ayrıldığı tespit edilmiştir [Golan-Goldhirsh et al., 2004].

7 farklı ülkeden 69 farklı *P. vera* çeşidi kullanılarak yapılan AFLP, ISSR ve RAPD çalışmasında ise; çeşitlerin İran kökenli ve Akdeniz kökenli olarak iki farklı gruba ayrıldığı belirlenmiştir [Kafkas et al., 2006].

Moleküler belirteç çalışmaları dışında plastid (*trnL-F*, *ndhF*, *psA-ycf3*, *rps16*, *rpl16*, *atpB-rbcL*, *psbA-trnH*) ve çekirdek (ITS, ETS) dizileri kullanılarak yapılan çalışmalar, daha önce belirtilen ve *Pistacia* cinsini 2 veya 4 gruba ayıran çalışmaların aksine, türler arasında ağsı bir evrim olduğunun ortaya koymuştur. Ayrıca bu çalışma hem türler arası hibritlerin konumlarını belirlemiş hem de *Pistacia* cinsi kapsamında gerçek türleşme örüntüsünü ortaya çıkarmıştır [Yi et al. 2008], [Xie et al. 2014]. Bu çalışma sonucunda *Pistacia* türlerinin 36 milyon yıl önce en yakın akrabalarından ayrıldığı tespit edilmiştir

3.3. Çalışmanın amacı

Bu çalışmada Akdeniz bölgesine ait 7 farklı *Pistacia* türü ve 3 farklı retrotranspozon temelli belirteç sistemi kullanılarak aşağıdaki noktalar aydınlatılmaya çalışılmıştır:

- *Pistacia* cinsinde bulunan genetik çeşitliliği incelemek,
- Kullanılan 3 farklı belirteç sisteminin çeşitlilik indekslerini karşılaştırmak,
- Türler arasındaki filogenetik ilişkileri açıklamak,
- Retrotranspozon temelli belirteç sistemlerinin *Pistacia* cinsi içindeki diğer türlerde de genetik çeşitlilik ve moleküler ıslah çalışmalarında kullanılabileceğini göstermek,
- *Pistacia* türlerine özgü olası yeni retrotranspozonların belirlenmesi.

4. MATERYAL ve YÖNTEMLER

Tez çalışması kapsamında izlenen yöntem ve adımlar aşağıda listelenmiştir:

- Bitki örneklerinin elde edilmesi
- Örneklerin sterilizasyonu ve *in vitro* ortamda çimlendirilmesi
- Hem *in vitro* çimlendirilmiş hem de farklı gelişim evrelerinden alınmış örneklerden gDNA izolasyonu ve elde edilen gDNA' ların kalite ve saflık tayini
- Retrotranspozon belirteç sistemleri kullanılarak örneklere PCR uygulaması ve var-yok matrislerinin oluşturulması
- Kullanılan belirteç sistemlerinin gösterdikleri varyasyon değerlerinin istatistiksel yöntemlerle karşılaştırmalı olarak incelenmesi
- *Pistacia* cinsindeki moleküler ilişkilerin her belirteç sistemi ile ayrı ayrı ve son olarak birlikte incelenmesi
- Farklı gelişim evrelerindeki örneklerin gösterdiği benzerlik ve farklılıkların incelenmesi
- iPBS belirteç sistemi kullanılarak *Pistacia* cinsine özgü olası yeni retrotranspozon dizilerinin belirlenmesi

4.1. Çalışmalarda Kullanılan Bitki Örnekleri

Kontrollü polenizasyon koşullarında üretilen 6 farklı *Pistacia* (*P. vera* cv. Siirt, *P. terebinthus*, *P. khinjuk*, *P. palaestina*, *P. mutica*, *P. lentiscus*) tohumu Antepfıstığı Araştırma Enstitüsünden (Gaziantep) Veysel Süzerer tarafından temin edildi. *P. atlantica* türlerine ait tohumlar ise Cezayir' den Dr. Limane Abdülkerim tarafından temin edildi. Tohum örnekleri soğuk oda (+4 ^{o}C) koşullarında saklanarak ilerleyen çalışmalarda kullanıldı. Sterilizasyon ardından *P. lentiscus* cv. Chia tohumlarında görülen canlılık kaybı yüzünden gDNA elde edilmesinde İbrahim Koç tarafından *in vitro* koşullarda alt kültürlenen gövdecikler kullanıldı.

4.2. Tohum Örneklerinin Sterilizasyonu ve Çimlendirilmeleri

Çalışmalarda kullanılacak olan tohumlar, Ozden-Tokatli et al. [2005] tarafından uygulanan protokole göre (Tablo 2.1) her bir türden en az 5 tohum olacak şekilde

sterilize edildi. Tohumlar, bitki büyüme düzenleyicilerinin bitkilerde stres oluşturarak retrotranspozon profillerinde farklılıklara neden olabileceği göz önünde bulundurularak, herhangi bir bitki büyüme düzenleyicisi eklenmemiş MS 0 (kullanılan besiyeri bileşenleri ve miktarları Tablo 2.14 ve Tablo 2.16' da belirtilmiştir) besiyerinde [Murashige and Skoog, 1962] çimlendirildi. Kök ve gövde ekseni oluşan bitkiler (yaklaşık 3 hafta), besiyerinden alınıp dH_2O ile yıkanarak gDNA izolasyonunda kullanılmak üzere -80 ^{o}C' de saklandılar. Sadece *P. lentiscus* türünde istenen düzeyde çimlenme elde edilemediği için, sürekli olarak alt kültürü yapılan bir *P. lentiscus* hattından alınan *in vitro* gövdeler gDNA izolasyonu için kullanıldı.

4.3. Farklı Gelişim Evrelerindeki Örneklerin Gösterdiği Değişimler

Farklı gelişim evrelerindeki retrotranspozon profil farklılıklarını incelemek için *P. vera*' ya ait embriyo, *in vitro* çimlendirilmiş gövde, kök ve tüm bitkicik örnekleri kullanıldı. Embriyolar, olgun tohumlardan binoküler mikroskop altında çıkartıldıktan sonra gDNA izolasyonu için kullanıldı.

4.4. Bitkiciklerden DNA izolasyonu

Bitkiciklerden ve farklı gelişim evrelerine ait örneklerden yapılacak DNA izolasyonu için Doyle [1987] tarafından geliştirilen ve Lodhi et al. [1994] tarafından modifiye edilen CTAB izolasyon protokolü (izolasyon tamponlarının hazırlanışı Tablo 2.17' de belirtilmiştir) kullanıldı.

Odunsu bitki örneklerinde bulunan yoğun polisakkarit ve fenolik bileşenlerin, DNA izolasyonu sırasında gDNA kararlılığı ve saflığı üzerinde olumsuz etkileri bulunduğu bilinmektedir. Polisakkarit bileşenleri ortadan kaldıran NaCl ve fenolik bileşenleri indirgeme yeteneği olan PVP kimyasalları sayesinde bu modifiye edilmiş yöntem ile bahsi geçen bileşiklerin olumsuz etkileri ortadan kaldırılmaya çalışıldı [Fang et al. 1992], [John 1992].

Elde edilen gDNA örnekleri %1,5 agaroz konsantrasyonuna sahip jel elektroforez sistemine yüklenerek λ/HindIII belirteci ile 80 volt altında 30 dakika yürütülerek incelendi. Örneklerin sahip olduğu gDNA miktarları ise spektrofotometrik (Shimadzu Biotech, Biospec-nano) yöntemle, 1 µl örnek yüklenerek gerçekleştirildi.

Tablo 2.1: Çalışmalarda kullanılacak olan sterilizasyon çözeltileri ve bitki örneklerine uygulanacak süreler.

Sterilizasyon Çözeltisi	Uygulanan Süre (Dakika)
% 70 Et OH	5
% 10 H_2O_2	5
% 20 Domestos	20

CTAB izolasyon protokolü ile bitkiciklerden DNA izolasyonu ise aşağıda belirtilen aşamalarda gerçekleştirildi:

- Bitki parçaları havanda, sıvı azot ile ezilerek toz haline getirilerek tüpe aktarıldı.
- Her 50 mg bitki örneği için 6 ml CTAB izolasyon tamponu ve 50 mg PVP örneğe eklendi.
- 60 ^{0}C su banyosunda 25 dakika inkübasyon yapıldı.
- Eşit hacimde 24 : 1 oranında kloroform : oktanol eklenerek 4000 rpm' de 25 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası oluşan üst sıvı yeni bir tüpe alındı.
- ½ hacim 5 M NaCl ve 1 hacim % 95 EtOH eklenerek +4 ^{0}C' de DNA iplikçikleri görülene kadar bekletildi.
- 3000 rpm' de 5 dakika va 5000 rpm' de 15 dakika santrifüj yapılarak DNA çöktürüldü.
- Oluşan üst sıvı döküldü ve DNA %75 EtOH ile yıkanarak, liyofilizatörde etanol uçana kadar bekletildi.
- Kuruyan DNA ultra saf su ile sulandırıldı.
- Son derişimi 1 mg/ml olacak şekilde RNaz A eklenerek sıcak su banyosunda 45 dakika inkübe edildi.
- Son derişim 0,1 mg/ml olacak şekilde Proteinaz K eklendi ve sıcak su banyosunda 30 dakika inkübe edildi.
- Eşit hacimde 24 : 1 oranında kloroform : oktanol eklenerek 4000 rpm' de 25 dakika santrifüj edildi.
- Oluşan üst sıvı yeni bir tüpe alındı.
- ½ hacim 5 M NaCl ve 1 hacim % 95 EtOH eklenerek +4 ^{0}C' de DNA iplikçikleri görülene kadar bekletildi.

- 3000 rpm' de 5 dakika ve 13000 rpm' de 5 dakika santrifüj yapılarak DNA çöktürüldü.
- Oluşan üst sıvı döküldü ve DNA %75 EtOH ile yıkanarak, liyofilizatörde etanol uçana kadar bekletildi.
- Kuruyan DNA 50 µL ultrasaf dH_2O ile çözülerek -20 ^{0}C' a kaldırıldı.

4.5. Retrotranspozon Temelli Belirteç Sistemleri ile PCR

Tez çalışması kapsamında retrotranspozonların PBS ve LTR evrensel bölgelerine uygun olarak tasarlanmış retrotranspozon temelli 3 farklı belirteç sistemi (iPBS, IRAP ve REMAP) kullanıldı [Kalendar et al., 1999], [Kalendar et al., 2010]. Kullanılan belirteç sistemlerinden biri olan iPBS yönteminde 5' uçları karşılıklı konumlanmış iki retrotranspozonun arasındaki gDNA bölgesinin çoğaltılması amaçlanmaktadır. Diğer bir belirteç sistemi olan IRAP yönteminde ise yine 5' uçları karşılıklı konumlanmış retrotranspozonlar arası bölge çoğaltılmaktadır. REMAP yönteminde ise farklı olarak genom üzerindeki SSR bölgelerine özgü primerler IRAP primerleri ile birlikte kullanılarak bu iki bölge arasındaki gDNA kısmının çoğaltılması amaçlandı.

Bu protokol uyarınca kullanılan primerler Tablo 2.2' de verilmiştir. REMAP belirteç sistemi için ise LTR ve SSR primerlerinin farklı kombinasyonları kullanıldı (

Tablo 2.3). Retrotranspozon temelli belirteç sistemleri için kullanılan PCR protokolü Kalendar et al. [2010]' da belirtilen yöntemin modifiye edilmesi ile elde edilmiştir. PCR protokolü ve PCR döngüleri Tablo 2.4 ve Tablo 2.5' de açıklandı.

Tablo 2.2: Tez çalışması kapsamında kullanılan retrotranspozon belirteç sistemine uygun primerler ve bağlanma sıcaklıkları.

Primer	Dizi (5'→3')	T_A (°C)
iPBS		
S-1	GCTCTGATACCA	53
S-2	CTCATGATGCCA	53
S-3	GCTCCGATGCCA	60
S-4	CTCACGATGCCA	54,3
S-5	GCGGAGTCGCCA	62,9
S-6	AGGTGGGCGCCA	62,9
S-7	GCTCGGATACCA	55
S-8	CCCAGCAAACCA	54,3
S-9	TCGCATCAACCA	53
S-10	TAGATGGCACCA	51,4
S-11	ACTTGGATGCCGATACCA	53,5
S-12	ATCCTGGCAATGGAACCA	55,4
S-13	AGAGAGGCTCGGATACCA	55,4
S-14	CCCCTACCTGGCGTGCCA	55,4
S-15	ACCTAGCTCATGATGCCA	55,4
S-16	ACCTAGGCTCGGATGCCA	55,4
S-17	GACCTAGCTCTAATACCA	51
S-18	CTCTCAATGAAAGCACCA	50,4
S-19	AGAACGGCTCTGATACCA	50,4
S-20	AGAAGAGCTCTGATACCA	60
IRAP		
LTR-1	ACCCCTTGAGCTAACTTTTGGGGTAAG	55
LTR – 2	CTTGCTGGAAAGTGTGTGAGAGG	55
LTR – 3	TGTTAATCGCGCGCTCGGGTGGGAGCA	55
LTR – 2	CTTGCTGGAAAGTGTGTGAGAGG	55
LTR – 3	TGTTAATCGCGCGCTCGGGTGGGAGCA	55
LTR – 4	AGCCTGAAAGTGTTGGGTTGTCG	55
LTR – 5	CTGGCATTTCCATTGTCGTCGATGC	55
LTR – 6	GCATCAGCCTGGACCAGTCCTCGTCC	55
LTR – 7	CACTTCAAATTTTGGCAGCAGCGGATC	55
LTR - 8	TCGAGGTACACCTCGACTCAGG	55
LTR-9	ATTCTCGTCCGCTGCGCCGCCCCTACA	55
LTR-10	TGAGTTGCAAGGTCCAGGCATCA	55
SSR		
ISSR - 10	GAAGAAGAAGAAGAAGG	55
ISSR - 13	AGAGAGAGAGAGAGAGT	55

Tablo 2.3: REMAP belirteç sistemi kapsamında kullanılan primer çiftlerinin kombinasyonları.

Primer Seti	Kombinasyon		Primer Seti	Kombinasyon	
	LTR	ISSR		LTR	ISSR
REMAP 1	2	10	REMAP 8	2	13
REMAP 2	3	10	REMAP 9	3	13
REMAP 3	4	10	REMAP 10	4	13
REMAP 4	5	10	REMAP 11	5	13
REMAP 5	6	10	REMAP 12	6	13
REMAP 6	7	10	REMAP 13	7	13
REMAP 7	10	10	REMAP 14	10	13

PCR sonrasında elde edilen tepkime ürünleri 1 kb ve 100 bp DNA belirteçleri kullanılarak %1,5' lik agaroz jel üzerinde 300 amper akım ve 80 volt altında 6 saat yürütülmüştür. PCR örnekleri, elektroforez tamamlandıktan sonra floresan görüntüleme cihazında (Biorad, Chemidoc) incelenerek fotoğrafları çekildi.

Tablo 2.4: Retrotranspozon temelli belirteç sistemi çalışmalarında kullanılan PCR protokolü.

Bileşen	Stok Konsantrasyon	Son Konsantrasyon	Miktar (µL)
10X PCR Tamponu	10 X	1X	2,5
MgCl2	25 mM	2,5 mM	2,5
dNTP	10 mM	0,4 mM	2
Primer	10 µM	1 µM	2,5
Genomik DNA	50 ng/µL	50 ng	1
Taq Polimeraz	5 u/µL	2 ünite	0,4
dH_2O	-		
Toplam Hacim			**25**

Tablo 2.5: Retrotranspozon temelli belirteç sistemi çalışmaları kapsamında kullanılan PCR döngüleri.

		Sıcaklık (°C)	Süre (Dak.)
	Ön Denatürasyon	95	3
30 Döngü	Denatürasyon	95	1
	Bağlanma	48 - 68	1
	Uzama	68	1
	Son Uzama	72	5

4.6. iPBS Sistemi ile Olası Yeni Retrotranspozonların Araştırılması

Önceki bölümlerde ifade edildiği gibi iPBS yöntemi sayesinde elde edilen DNA dizilerinin karakterize edilmesiyle yeni retrotranspozonal dizilerin tanımlanabilmektedir. *Pistacia* cinsine özgü olası yeni retrotranspozonal dizilerini tanımlanması için iPBS PCR sonucu elde edilen dizilerin pGEM 5Zf(+) (Promega) vektörüne klonlanarak dizilenmesi amaçlandı.

4.6.1. PCR, Saflaştırma ve Fosforilasyon Aşamaları

Olası yeni retrotranspozon dizilerinin belirlenmesi için Tablo 2.2' de belirtilen bütün iPBS primerleri kullanılarak yapılan PCR deneyleri (TabloTablo 2.6) sonrasında elde edilen tepkime ürünleri %1,5' lik agaroz jel üzerinde 300 Amper akım ve 80 volt altında yarım saat yürütüldü.

PCR ürünleri, PureLink™ PCR saflaştırma kiti (Invitrogen) kullanılarak saflaştırıldı. Bu protokol uyarınca; PCR ürünleri 4 farklı ependorf tüpte birleştirilip (en fazla 100 µl hacim olacak şekilde), ayrı ayrı 4 hacim bağlama tamponu (binding buffer) eklenerek, kolona yüklendi ve 10.000 g' de 1 dakika santrifüj edildi.

Tablo 2.6: iPBS belirteç sistemi ile *Pistacia* cinsine özgü yeni retrotranspozonal dizilerin elde edilmesi için kullanılan PCR protokolü

Bileşen	Reaksiyon Konsantrasyonu
10X Dream Taq PCR Tamponu	1X
dNTP	0,2 mM
Primer	1 µM
Genomik DNA	50 ng
Taq Polimeraz (Dream Taq)	1 ünite
Pfu DNA Polimeraz (Fermentas)	0,04 ünite
Toplam Hacim	25µl

Ardından yıkama tamponu ile muamele edilen örnekler tekrar 10.000 g' de 1 dakika santrifüj edilerek yıkandı. Fazla kalan etanol artığının temizlenmesi için de 2-3 dakika kadar santrifüj edilerek kolonlar temiz ependorf tüplere alındı ve 50 µl süzme tamponu (elution buffer) eklenerek santrifüj yapıldı. Ardından tüpler birleştirilerek ve spektrofotometrik yöntemle DNA konsantrasyonu ölçüldü.

Elde edilen örnekteki DNA konsantrasyonunun arttırılması için Na-Asetat çöktürmesi uygulandı. Bu protokol uyarınca; örneğe 0,1 hacim Na-Asetat eklenmiş ve iyice karıştırılmıştır. Ardından 2 hacim Etanol eklenerek -80°C' de 30 dakika bekletildi. 13.000 rpm' de 15 dakika santrifüjün ardından etanol süzülerek örnek kurutuldu ve 50 µl su içinde çözüldü.

Kullanılan PCR tekniği küt uçlu ürünler oluşturduğu için, örneklerin pGEM-5Zf(+) vektörü ile ligasyon tepkimelerine alınmadan önce fosforile edilmesi gerekmektedir. 2.7' de belirtilen protokol ile örnekler 37°C' de 30 dakika inkübe edilerek, 2 µL 0,5 M EDTA ile reaksiyon durduruldu. Fenol-Kloroform saflaştırması ile yoğunlaştırılan ve saflaştırılan örnekler optimal DNA yoğunluğu için uygun miktarda dH_2O sulandırıldıktan sonra spektrofotometrik yöntemle DNA miktarı ölçüldü.

Tablo 2.7: PCR ürünlerinin fosforilasyonu için kullanılan reaksiyon bileşenleri.

Bileşen	Miktar
PCR ürünü	250 ng
10X Kinaz Tamponu	4 µL
0,1 mM ATP	2 µL
T4 Polinukleotid Kinaz	10-20 ünite
dH_2O (Son hacim)	40 µL

4.6.2. Kompetan Hücrelerin Hazırlanması

Klonlama deneylerinde kullanılacak olan kompetan hücreler TFB protokolü uyarınca hazırlanmıştır (kullanılan tamponların hazırlanması

Tablo 2.19' da ifade edilmiştir). Bu protokole göre *E. coli* JM109 hücreleri -80°C gliserol stoktan bir gece önce agarlı LB besiyerine aşılandı ve 37°C' de bir gece boyunca büyümeye bırakıldı. Ertesi gün oluşan tek kolonilerden 5 ml LB besiyerine kürdan ile aşılama yapılarak ve 200 rpm ve 37°C' de 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. Elde edilen hücreler 100 ml LB' ye aktarılarak tekrar 200 rpm ve 37°C' de OD_{600} değeri 0,4-0,5 olana kadar inkübasyona bırakıldı.

Logaritmik faza geçen kültür, 50 ml olacak şekilde tüplere ayrıldı ve 3000 rpm' de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Üst sıvı atılarak elde edilen hücre çökeltisi 40 ml TfbI çözeltisi ile çözülerek 10 dakika boyunca buzda bekletildi. 4 derece 3000 rpm' de 8 dakika santrifüjün ardından tekrar üst sıvı döküldü ve arta kalan hücre çökeltisi 1 ml

TfbII ile çözülerek 100 µl olacak şekilde ependorflara ayrılarak uzun süreli saklama için hemen -80°C' ye aktarıldı.

4.6.3. Transformasyon Protokolü

Klonlama protokolü için 100 µl kompetan hücreler, ligasyon ürünleriyle birlikte buz üstünde 60 dakika süreyle inkübe edilmiş, ardından 42 °C' de 2 dakika ısı şoku uygulamasının ve 1 ml LB besiyeri eklenerek 200 rpm 37 °C' de 1 saat boyunca antibiyotik dirençlilik geninin ekspresyonu sağlandı. Ardından 30 saniyelik kısa santrifüj ardından üst sıvı dökülmüş ve hücre çökeltisi arta kalan sıvı ile çözülerek ampisilin içeren agarlı LB besiyerine yayılarak 1 gece boyunca 37 °C' de inkübe edildi.

4.6.4. Plazmit Saflaştırma, Kesim ve Defosforilasyon Aşamaları

E. coli JM 109 hücrelerine aktarılan pGEM-5zf(+) (Promega) plazmiti aşağıdaki protokol uyarınca saflaştırılmıştır (Çalışmalarda kullanılan çözeltilerin hazırlanma şekilleri Tablo 2.20' de belirtildi).

Agar ile katılaştırılmış LB (1mg/L ampisilin içeren) besiyerinde büyüyen kolonilerden bir tanesi kürdan yardımıyla 2 ml ampisilin içeren sıvı LB besiyerine aşılanarak ve gün boyunca 37°C' de 200 rpm' de inkübasyona bırakıldı. Ampisilin içeren 100 ml sıvı LB besiyerine aktarılan kültür bir gece boyunca aynı koşullarda inkübe edildi.

Ardından 4000 rpm' de 20 dakika santrifüj edilen hücreler üst sıvı atıldıktan sonra yaklaşık 800 µl SOLI ile vortekslenerek oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi. 200 µl' lik parçalara ayrılan karışımın üstüne 400 µl SOLII eklenerek 5 dakika boyunca buz üstünde bekletildi. Ardından 300 µl SOLIII eklendi ve 10 dakika boyunca buz üzerinde bekletildi. Karışım 14000 rpm' de 20 dakika santirfüj (+4 derece) edilerek üst sıvı yeni bir ependorf tüpe aktarılıp, 0,6 hacim izopropanol eklenerek 1 saat boyunca oda sıcaklığında bekletildi. 11000 rpm' de 30 dakika santrifüj yapılarak üst sıvı atılır ve arta kalan çökelti kurutularak 100 µl su içerisinde çözüldü.

Bu aşamanın ardından oluşan RNA kirliliğinin ortadan kaldırılması için plazmit DNA (pDNA)' lar son konsantrasyonu 1 mg/ml olacak şekilde RNAz A ile 37 °C' de 45 dakika inkübe edildi. Elde edilen plazmit DNA' lar bu aşamada kesim

optimizasyonu için kullanılmış ve ilerleyen aşamalarda fenol-kloroform ekstraksiyonu uygulandı.

Örneklere eşit hacimde fenol:kloroform:izoamil alkol (25:24:1) eklenerek ve 1 dakika vortekslenerek 13000 rpm' de 2 dakika santrifüj edildi. Elde edilen üst sıvı yeni bir ependorfa alınarak kloroform:izoamil alkol (24:1) eklenerek 2 dakika boyunca 13000 rpm' de santrifüj edildi ve yine üst sıvı alındı. Ardından 0,1 hacim Na-Asetat ve 2 hacim etanol eklenerek -80 °C' de 30 dakika bekletildi ve 5 dakika santrifüjün ardından arta kalan çökelti 100 µl dH2O ile çözüldü

Saflaştırılmış plazmite PCR ürünlerinin aktarılması için öncelikle plazmitin EcoRV (Promega) restriksiyon enzimi ile tam olarak kesilmesi amaçlandı (Tablo 2.8).

Tablo 2.8: Plazmit kesimlerinde kullanılan protokol. Kesimler 20 µl son hacme göre yapılmıştır.

Kimyasal	Kullanılan miktar (µL)
dH_2O	16,3
Restriksiyon kesim tamponu (10x)	2
Bovine serum albumin	0,2
DNA (1 mikrogram)	1
Restriksyon enzimi (20 u)	0,5

Kesilen plazmit daha sonra Tablo 2.9' da belirtilen protokole göre defosforile edilmiş ve yeniden spektrofotometrik yöntemle DNA konsantrasyonu ölçüldü.

Tablo 2.9: Restriksiyon kesimi ardından elde edilen pDNA' nın CIAP enzimi kullanılarak defosforilasyonu

Kimyasal	Kullanılan miktar (µL)
pDNA (en fazla 10 pmol 5' ucu)	40
CIAP 10X Reaksiyon tamponu	5
Sulandırılmış CIAP (0,01 u/ µL)	En fazla 5 µL
Son hacim	50 µL

4.6.5. Ligasyon Protokolü

PCR ürünlerinin saflaştırılması ve plazmit kesim optimizasyonlarının ardından elde edilen ürünler bu adımda pGEM 5 Zf(+) vektörüne klonlandı. Klonlama protokolünde 150 ng pGEM plazmit ile 1 KB ve 2 KB olacak şekilde optimize edilmeye çalışıldı (Tablo 2.10). Elde edilen ligasyon ürünleri, *E. coli* JM 109

hücrelerine transforme edilerek 1 gece boyunca LB besiyeri üzerinde 37 derecede inkübasyona bırakıldı.

Tablo 2.10: PCR saflaştırma sonucunda elde edilen ürünlerin pGEM 5zf(+) vektörüne klonlanması için uygulanan protokol.

Malzemeler	Stok	Ligasyon	CIAP	Arkaplan	1 KB	2 KB
T4-DNA Ligaz Buffer	10,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
Defos. Plazmit (ng/ µL)	82,96	0,00	1,81	1,81	1,81	1,81
nDefos. Plasmit (ng/ µL)	158,05	0,95	0,00	0,00	0,00	0,00
Insert (ng/ul)	93,65	0,00	0,00	0,00	1,60	4,27
PEG4000 (%)	50,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
T4 DNA Ligaz (u/ul)	3,00	1,00	1,00	0,00	1,00	1,00
dH_2O		14,05	13,19	14,19	11,59	8,92
Son Hacim		20,00	20,00	20,00	20,00	20,00

4.6.6. Koloni PCR Yöntemi ile Klonların Doğrulanması

Ligasyon sonucunda beyaz renkli pozitif kolonilerde bantların varlığının doğrulanması ve ardından belirlenen ürünlerin dizileme aşaması gelmektedir. Bu amaçla, beyaz renkli kolonilerden kürdan yardımıyla alınan örnekler 1 gece boyunca ampisilin içeren besiyerinde inkübe edilip koloni PCR ile klonların doğrulanması amaçlandı (Tablo 2.11).

Tablo 2.11: Pozitif sonuç veren beyaz renkli kolonilerdeki bant varlıklarının doğrulanması için kullanılan koloni PCR protokolü

Bileşen	Reaksiyon Konsantrasyonu
10X PCR Tamponu	1X
25 mM $MgCl_2$	2,5 mM
dNTP	0,2 mM
M13-F	1 µM
M13-R	1 µM
Bakteri	2 µL
Taq Polimeraz (Dream Taq)	2 u
Toplam Hacim	25µl

4.7. İstatistiksel Yöntem

PCR analizlerinde test edilen her tür için 5 farklı örnek kullanılmış ve en az iki kere tekrar yapılmıştır. Farklı gelişim evrelerindeki örnekler için ise 2 farklı tekrar yapıldı. Test edilen 10 farklı iPBS, IRAP ve 14 farklı REMAP belirteç sisteminde en iyi çoğaltım profili sergileyen primerler ilerleyen istatistiksel çalışmalarda kullanıldı.

Agaroz jel elektroforezi sonucunda elde edilen jel görüntülerinde her bir bant iki alleli bir lokus olarak değerlendirilmiş ve bu lokuslar, bantların varlığı (1) ve yokluğu (0) ile işaretlenerek matrisler oluşturulmuştur. Oluşturulan var-yok matrisleri ilerleyen istatistik çalışmalarda kullanılacak temel veriyi de oluşturdu.

Belirteç sistemlerinin gösterdiği çeşitlilik değerleri Tablo 2.12' de gösterildiği gibi R istatistik platformu üzerinde yazılan kodlar ile hesaplanmış ve belirteç sistemlerinin türler arasındaki farklılıkları ayırma güçleri karşılaştırmalı olarak incelendi[Roldan-Ruiz et al., 2000], [Belaj et al. 2003], [Campbell et al., 2010].

Ayrıca hem iki farklı belirteç sistemi arasındaki ilişkinin açıklanması için Mantel testi kullanıldı. Mantel testi iki farklı benzerlik veya uzaklık matrisinin ne kadar korelasyon gösterdiğini analiz etmek için kullanılan bir istatistiksel yöntemdir. Bu yönteme göre iki farklı matristen bir tanesinin bütün elemanları belirli bir sayıda permütasyona (bizim çalışmamızda 1000 permütasyona kullanılmıştır) uğratılarak iki matris arasındaki korelasyon değeri hesaplanmaktadır. Bu amaçla R istatistik platformu üzerine *vegan* isimli kütüphane yüklenmiş ve kütüphane içerisindeki *mantel* fonksiyonu kullanıldı [Legendre and Legendre, 1998] (Hem çeşitlilik sabitleri hesaplanması hem de Mantel testi için kullanılan kodlar EK B' da verilmiştir).

Türler arasındaki benzerlik ve farklılıkların analiz edilmesi için yine var-yok matrisleri kullanılmış ve bu veriler MVSP (MultiVariate Statistical Package) isimli paket program ile analiz edilerek Jaccard benzerlik katsayıları elde edilmiştir. Jaccard benzerlik katsayısı, iki farklı grup arasındaki benzerliği, ortak karakterlerin varlığına dayanarak hesaplamaktadır. Buna göre öncelikle iki tür arasında ortak bantların varlığı (a) hesaplanır. Ardından bu sırayla sadece birinci türde bulunan bantlar (b) ve ardından sadece ikinci türde bulunan bantlar (c) hesaplandı (Tablo 2.13).

Tablo 2.12: Tez çalışması kapsamında kullanılan belirteç sistemlerinin çeşitlilik analizlerinde kullanılan istatistiksel yöntemler.

Çeşitlilik Sabitleri	Hesaplama Yöntemi
Toplam primer sayısı	U
Lokus sayısı	L
Polimorfik lokus sayısı	n_p
Monomorfik lokus sayısı	n_{np}
Polimorfik lokus oranı	P_p:
Primer başına lokus	$n_u=L/U$
Beklenen heterozigosite	$H_e=1-\Sigma p_i^2$
Lokus başına efektif allel (n_e):	$n_e=1/\Sigma p_i^2$
Toplam efektif allel (N_e):	$N_e=\Sigma n_e$
Test verimlilik indeksi (A_i):	$A_i= N_e/U$
Etkin multipleks oranı (E):	$E=n_u \times P_p$
Markör index (M):	$M=H_e \times L$
Ayırma gücü (R_p):	$R_p= \Sigma(1-(2 \times \lvert 0.5 - pi \rvert))$
Polimorfizm bilgi içeriği	$PIC= (\Sigma\ 2fi(1-fi))/L$

Tablo 2.13 Jaccard benzerlik katsayısı hesaplanırken kullanılan yöntem.

		Birey 1	
		Bant Var (1)	Bant Yok (0)
Birey 2	Bant Var (1)	a	b
	Bant Yok (0)	c	d

Ardından aşağıdaki formüle göre iki farklı grup arasındaki Jaccard benzerlik katsayısı hesaplanmıştır (Jaccard, 1908):

$$Jaccard\ Benzerlik\ Katsayısı = \frac{a}{a+b+c} \tag{2.1}$$

Tez çalışması kapsamında incelenen türler arasında moleküler ilişkilerin belirlenmesi ve filogenetik ağaçların oluşturulması için ise tekrar var-yok matrisleri kullanılmdı. DARWIN isimli programa yüklenen veriler daha sonra 900 yineleme (bootstrap) testine tabi tutularak filogenetik ağaçlar oluşturuldu [Perrier and Jacquemoud-Collet, 2006]. Bu yöntem sayesinde 900 farklı ağaç oluşturularak, türlerin bu ağaçlarda yüzde kaç oranında gruplandıkları incelendi.

Kullanılan belirteç sistemlerinin türleri ne kadar ayırabildiğini göstermek için ise MatLab (2013a) platformu kullanılarak Birincil Öz bileşen tahlili, PCA (Principal Component Analysis) istatistik yöntemi uygulandı. PCA, birbirleriyle doğrusal olarak

ilişkide olmayan veri gruplarının birbirleri arasındaki varyasyonun en fazla olduğu görünümü bulmak için kullanılan bir istatistiksel yöntemdir (EK B).

4.8. Tez Çalışması Kapsamında Kullanılan Gereçler

Çalışma kapsamında kullanılan kimyasallar, enzimler ve kitler Tablo 2.14' de cihazlar ise Tablo 2.15' de ayrıntılı olarak belirtilmiştir.

Bitki tohumlarının *in vitro* çimlenmeleri için kullanılan MS besiyerinin içeriği Tablo 2.16' ta belirtilmiştir. Ayrıca DNA izolasyonunda ve jel görüntüleme sistemlerinde kullanılan çözeltilerin hazırlanma şekilleri Tablo 2.17 ve Tablo 2.18' de açıklanmıştır.

Tablo 2.14: Çalışma kapsamında besiyeri, DNA izolasyonu ve jel görüntüleme sistemlerinde kullanılan kimyasal maddelerin isimleri, alınan firmalar ve katalog numaraları.

Kimyasal Adı	Firma Adı	Katalog No
Etil alkol (%96)	Pro-Lab	-
Nikotinik asit	Sigma	N-0765
Tiamin HCl	Sigma	T-3902
Piridoksin HCl	Sigma	P-8666
Myo-inositol	Sigma	I-3011
Agar	Merck	1.01614
Sukroz	Merck	1.07651
BA (Benzil adenin)	Sigma	B-3408
NH_4NO_3 (Amonyum nitrat)	Sigma	A-3795
KNO_3 (Potasyum nitrat)	Sigma	P-8291
KH_2PO_4 (Potasyum fosfat)	Sigma	P-8416
$CaCl_2.2H_2O$ (Kalsiyum klorür)	Sigma	C-2536
$Ca(NO_3)_2.4H_2O$ (Kalsiyum nitrat)	Sigma	C-2786
$MgSO_4.7H_2O$ (Magnezyum sülfat)	Sigma	M-7899
H_3BO_3 (Borik asit)	Sigma	B-9645
KI (Potasyum iyodür)	Riedel-de Haen	03124
$MnSO_4.4H_2O$ (Mangan sülfat)	Sigma	M-7899
$ZnSO_4.7H_2O$ (Çinko sülfat)	Sigma	Z-1001
$Na_2MoO_4.2H_2O$ (Molibdik asit)	Sigma	M-1651
$CuSO_4.5H_2O$ (Bakır sülfat)	Sigma	C-8027
$CoCl_2.6H_2O$ (Kobalt klorür)	Sigma	C-2911
$FeSO_4.7H_2O$ (Demir sülfat)	Sigma	F-8263
Na_2EDTA (Sodyum etilendiamintetraasetik asit)	Sigma	4503
CTAB (Setil Trimetil Amonyum Bromid)	Merck	1.02342
Tris-HCl	AppliChem	A3452
Trizma Base	Sigma	T6066
NaCl	Sigma	S3014
EDTA	Calbiochem	324503
β-Merkaptoetanol	Applichem	A-11080
PVP (Polivinil pirolidon)	Sigma	P-2307
Kloroform	Sigma	372978
Oktanol	AppliChem	A3461
Agaroz	Sigma	T6066
Trizma base	Sigma	S3014
Asetik asit	Calbiochem	324503
Etidyum bromid	Sigma	P-2307
Jel Yükleme boyası	Sigma	372978
Taq DNA polimeraz PCR kiti	Intron Biotechnology	25022
λ DNA-Hind III	AppliChem	A3461
1 kb DNA belirteç (TrackIt™)	Intron Biotechnology	27062
100 bp DNA belirteç (TrackIt™)	Intron Biotechnology	32181
RNaz A	Intron Biotechnology	27062
Proteinaz K	Intron Biotechnology	32181

Tablo 2.15: Çalışma kapsamında kullanılan cihazlar

Cihaz Adı	Cihazın Modeli	Firma
Hassas terazi	TP3030	Denver Instrument
Otoklav	HV-110L	Hirayama
Etüv	DIN 12880	Binder
Bitki büyütme odası	RivaCold	Genpa Mühendislik
pH metre	pH209	Hanna Instrument
Manyetik karıştırıcı	MR3001	Heidolph
Sterilizatör	Steri 350	Swiss Made
Laminar akımlı kabin	Cleanair	PMU Company
İklimlendirme dolabı	WTC	Binder
Derin dondurucu (-20 ºC)	GS26DN13NE	Simens
Buzdolabı (4 ºC)	RG 1380	İndesit
SA tankı	ARPEGE 40	Dmc-airliquide
Havan	H 100 MM	İsolab
Sıcak su banyosu	D-77960	Julabo
Liyofilizatör	RC10.10.	Jouan
Vorteks	AC230	VNR International
Mikrodalga fırın	MW71E	Samsung
Nanodrop	BioSpec-nano	Shimadzu Biotech
Otomatik pipet	3862243	Eppendorf Research
Santrifüj	Universal 32	Hettich
Termal döngü cihazı	PTC-200	MJ Research INC
Jel elektroforezi ve güç kaynağı	MP300	Claver Scientific
Jel görüntüleme cihazı	Universal Hood II	BIO-RAD

Tablo 2.16: Tez çalışması kapsamında tohum örneklerinin çimlendirilmesi için kullanılan MS besiyeri içeriği.

Kimyasal	Miktar (1 L için)	Kimyasal	Miktar (1 L için)
NH_4NO_3	1650 mg	$CoCl_2.6H_2O$	0,025 mg
KNO_3	1900 mg	$CuSO_4.5H_2O$	0,025 mg
KH_2PO_4	170 mg	$FeSo_4$	28 mg
$MgSO_4.7H_2O$	370 mg	Na_2EDTA	37 mg
$CaCl_2.2H_2O$	440 mg	Glycine	2 mg
$MnSO_4.H_20$	16,9 mg	Nicotinic Acid	0,5 mg
$ZnSO_4.7H_2O$	8,6 mg	Thiamin HCl	0,1 mg
$Na_2MO_4.2H_2O$	0,25 mg	Pyridoxine HCl	0,5 mg
KI	0,83 mg	Sukroz	30 gr
H_3BO_4.	6,20 mg	Myo-inositol	100 mg

Tablo 2.17: Örneklerden DNA izolasyonu için kullanılan çözeltilerin hazırlanması ve kullanılacak miktarları.

Kimyasal	Konsantrasyon	Kullanılacak Miktar (1 L)
CTAB İzolasyon Tamponu		
CTAB	% 2	20 g
EDTA	20 mM	7,2 g
Trizma Base	0,1 M	12 g
NaCl	1,4 M	81,8
β-merkaptoetanol	% 0,2	32 µL
NaCl Çözeltisi		
NaCl	5 M	292,2 g
Kloroform-Oktanol (24:1)		
Kloroform	24/25hacim	960 ml
Oktanol	1/25 hacim	40 ml

Tablo 2.18: Jel elektroforez sistemlerinde kullanılan çözeltilerin hazırlanması ve kullanılacak miktarlar.

Kimyasal	Konsantrasyon	Kullanılacak Miktar (1 L)
TAE Tamponu		
Trisbase	-	242 gr
Asetik asit	-	57,1 ml
0,5 M Na EDTA	-	100 ml
Agaroz Jel	% 1,5	15 gr
β-merkaptoetanol	% 0,2	32 µL
Agaroz Jel		
NaCl	5 M	292,2 g
Kloroform-Oktanol (24:1)		
Kloroform	24/25hacim	960 ml
Oktanol	1/25 hacim	40 ml

Tablo 2.19: Kompetan hücre hazırlanırken kullanılan çözeltiler.

		Stok	Stoktan Kullanılacak Miktar (500 ml için)
TFB-I	30 mM KOAc	1M	15 ml
	50 mM $MnCl_2$	1M	25 ml
	100 mM KCl	1M	50 ml
	10 mM $CaCl_2$	1M	5 ml
	15% Gliserol	75%	100 ml
		Stok	Stoktan Kullanılacak Miktar (100 ml için)
TFB-II	10 mM Na-MOPS pH:7	1M	1 ml
	10 mM KCl	1M	1 ml
	75 mM $CaCl_2$	1M	7,5 ml
	15% Gliserol	75%	20 ml

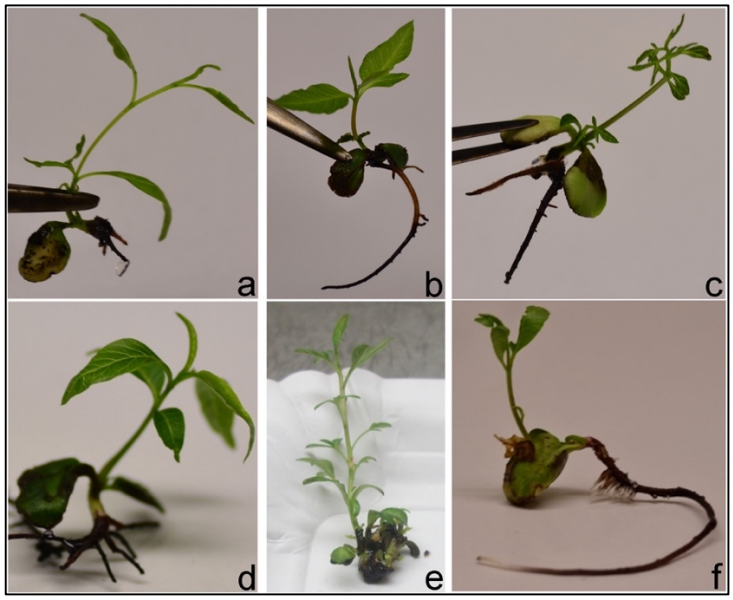
Tablo 2.20: Plazmit izolasyonu için kullanılan çözeltiler.

Çözeltiler	Kimyasallar	Kullanılan Stok	20 ml stok için
SOL I	25 mM TRIS-HCl (pH: 8,0)	2 M	250 µl
	10 mM EDTA (pH: 8,0)	0.5 M	400 µl
	50 mM Glukoz	%20 Glukoz	990 µl
		Kullanılan Stok	10 ml için
SOL II	0,2 NaOH	10 N NaOH	200 µl
	%1 SDS	%20 SDS	500 µl
		Kullanılan Stok	20 ml için
SOL III	%60 KOAc	5 M	12 ml
	Glasiyel Asetik Asit	-	2,3 ml

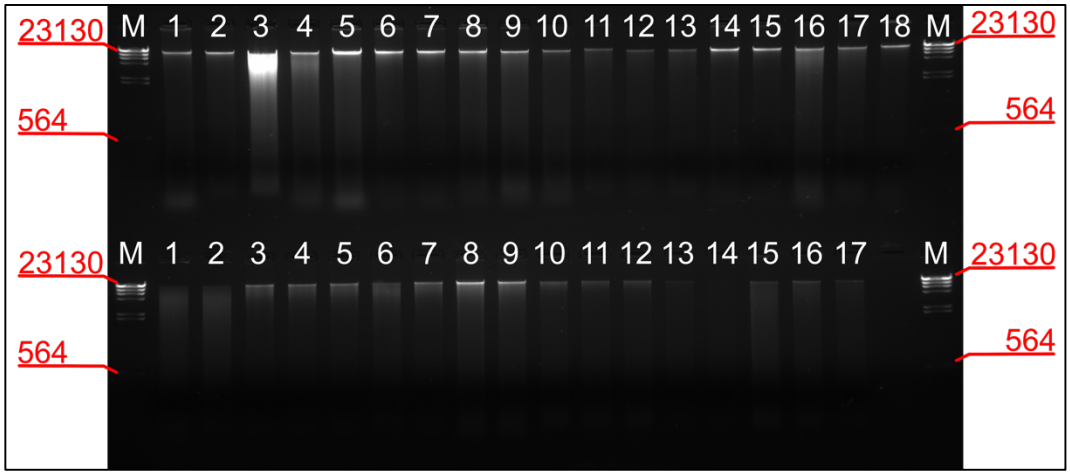
5. BULGULAR

5.1. Örneklerden Yapılan gDNA izolasyonları

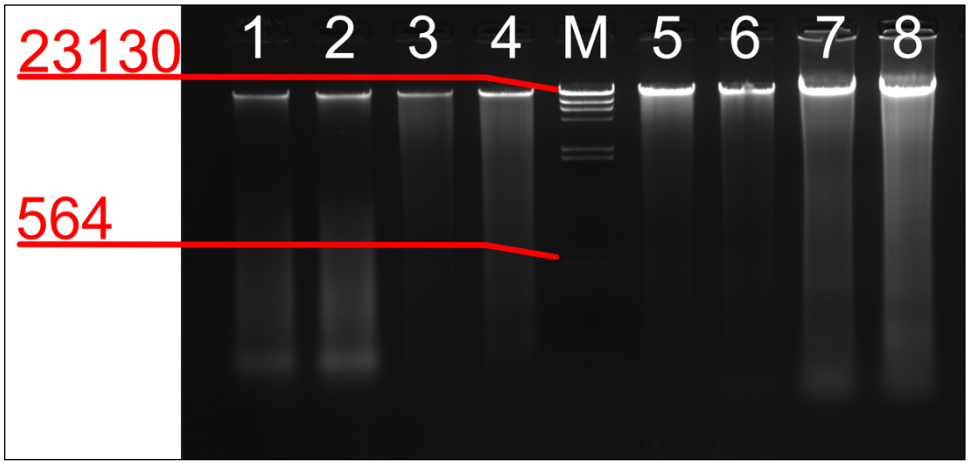
Çalışmalarda öncellikle hem *in vitro* çimlendirilmiş bitkiciklerden (Şekil 3.5) hem de farklı gelişim evresine ait bitki kısımlarından (embriyo, gövde, kök) elde edilen DNA' lar agaroz jel elektroforez (Şekil 3.6 ve Şekil 3.7) sisteminde görüntülenmiş ve spektrofotometrik olarak saflık tayini yapılmıştır (Tablo 3.21 ve Tablo 3.22). Elde edilen sonuçlar incelendiğinde hem görsel olarak hem de spektrofotometrik olarak gDNA' ların moleküler karakterizasyon çalışmalarında kullanılabileceğine karar verilmiştir.



Şekil 3.5: Yaklaşık 4 hafta boyunca MS 0 besiyerinde *in vitro çimlendirilmiş Pistacia* bitkicikleri a) *P. atlantica* Desf., b) *P. palaestina* Boiss., c) *P. mutica* Fischer, d) *P. terebinthus* L., e) *P. vera* L. Siirt. f) *In vitro P. lentiscus* L bitkicikleri.



Şekil 3.6: CTAB protokolüne göre yapılan izolasyonun ardından elde edilen gDNA' ların, %1,5' lik agaroz jelde elde edilen görüntüleri. M: λ DNA (2 µl) Üst Sıra: 1-5, *P. vera*; 6-10, *P. khinjuk*; 11-15, *P. mutica*; 16-18, *P. terebinthus*. Alt Sıra: 1-2, *P. terebinthus*; 3-7, *P. atlantica*; 8-12, *P. palaestina*; 13-17, *P. lentiscus*.



Şekil 3.7: Embriyo, gövde, kök ve *in vitro* bitkiciklerinden DNA izolasyonu sonrasında agaroz jel' e yüklenerek görüntülenen gDNA' lar. 1-2: Embriyo 1-2; 3-4: Gövde 1-2; 5: Lambda HindIII marker; 6-7: Kök 1-2; 8-9: *P. vera* 1-2.

Tablo 3.21: CTAB protokolü soncunda elde edilen gDNA' ların spektrofotometrik olarak miktar ve saflık ölçümleri.

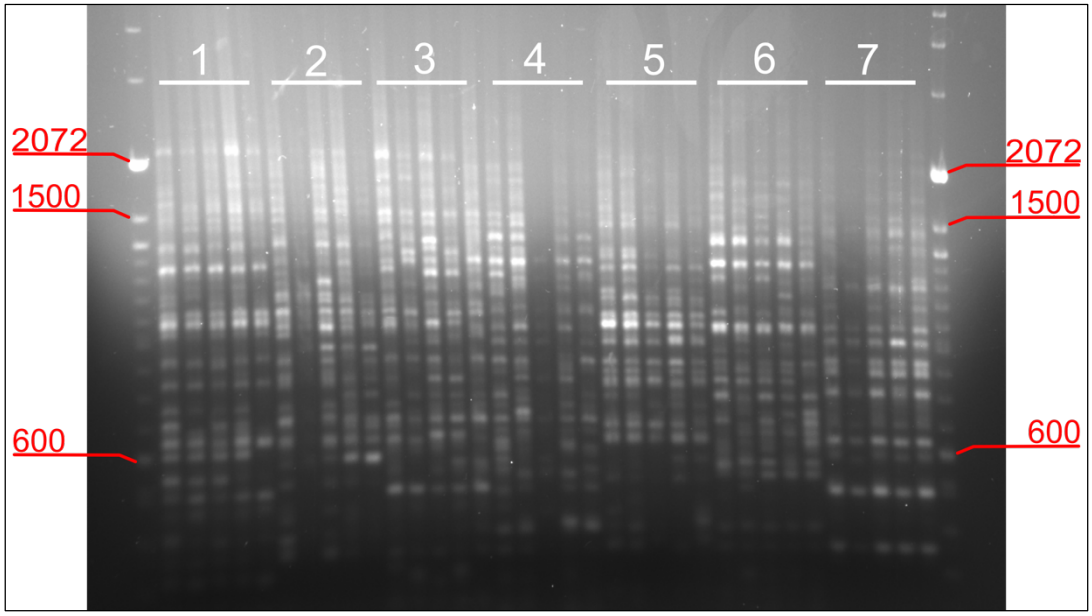
Örnek İsmi	Miktar(ng/µL)	OD260/280	OD260	OD280
P. vera-1	281,24	1,95	5,801	3,062
P. vera-2	146,7	1,95	3,139	1,71
P. vera-3	667,53	1,83	13,693	7,62
P. vera-4	341,32	1,9	6,813	3,583
P. vera-5	755,59	1,95	15,515	8,159
P. khinjuk-1	233,43	1,88	4,695	2,51
P. khinjuk-2	205,31	1,91	4,054	2,096
P. khinjuk-3	195,55	1,87	3,939	2,114
P. khinjuk-4	194,07	1,91	3,888	2,035
P. khinjuk-5	138,65	1,89	3,216	1,912
P. mutica-1	35,78	1,87	1,371	1,037
P. mutica-2	77,66	1,94	1,471	0,72
P. mutica-3	38,89	2,19	0,657	0,234
P. mutica-4	150,31	1,91	3,057	1,624
P. mutica-5	214,61	1,8	5,455	3,553
P. terebinthus-1	134,58	1,92	2,573	1,282
P. terebinthus-2	370,71	1,92	7,443	3,895
P. terebinthus-3	140,01	1,95	2,75	1,388
P. terebinthus-4	96,24	1,96	1,872	0,932
P. terebinthus-5	99,08	2	1,841	0,848
P. atlantica-1	20,57	2,47	0,301	0,056
P. atlantica-2	60,17	2,04	1,133	0,519
P. atlantica-3	92,21	1,8	2,285	1,463
P. atlantica-4	99,71	1,94	1,976	1,011
P. atlantica-5	60,23	1,95	1,132	0,544
P. palaestina-1	176,39	1,87	4,231	2,593
P. palaestina-2	95,34	1,83	2,15	1,285
P. palaestina-3	181,1	1,93	3,488	1,744
P. palaestina-4	51,41	2,04	0,866	0,343
P. palaestina-5	50,3	1,99	0,872	0,371
P. lentiscus-1	42,4	2,11	0,776	0,33
P. lentiscus-2	31,43	2,08	0,514	0,188
P. lentiscus-3	117,17	1,85	2,33	1,253
P. lentiscus-4	63,39	1,95	1,094	0,478
P. lentiscus-5	44,17	1,93	0,832	0,407

Tablo 3.22: Çalışmalarda kullanılan farklı gelişim evrelerine ait örneklerin DNA miktarları.

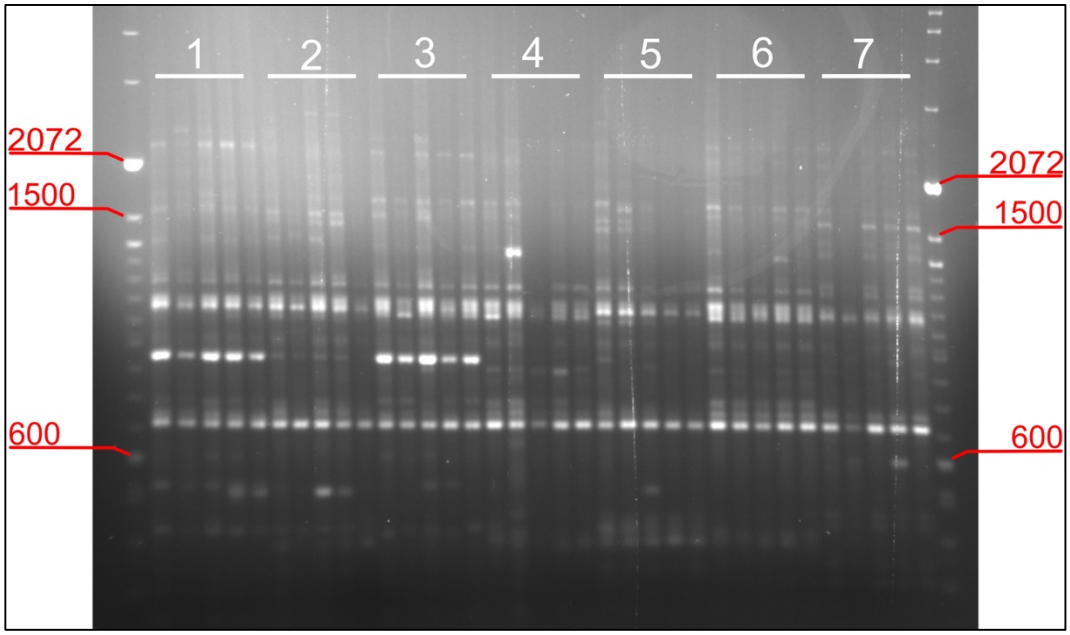
Örnek	Konsantrasyon (ng/µl)	OD260/280	OD260/230
Embriyo-1	411,50	1,81	0,84
Embriyo-2	426,75	1,94	1,42
Gövde-1	157,25	1,89	2,05
Gövde-2	168,61	1,84	2,13
Kök-1	360,39	1,85	2,05
Kök-2	255,97	1,88	2,16
P. vera-1*	341,32	1,90	2,29
P. vera-2*	755,59	1,95	2,30

5.2. PCR Ardından Jel Görüntülerinin İncelenmesi

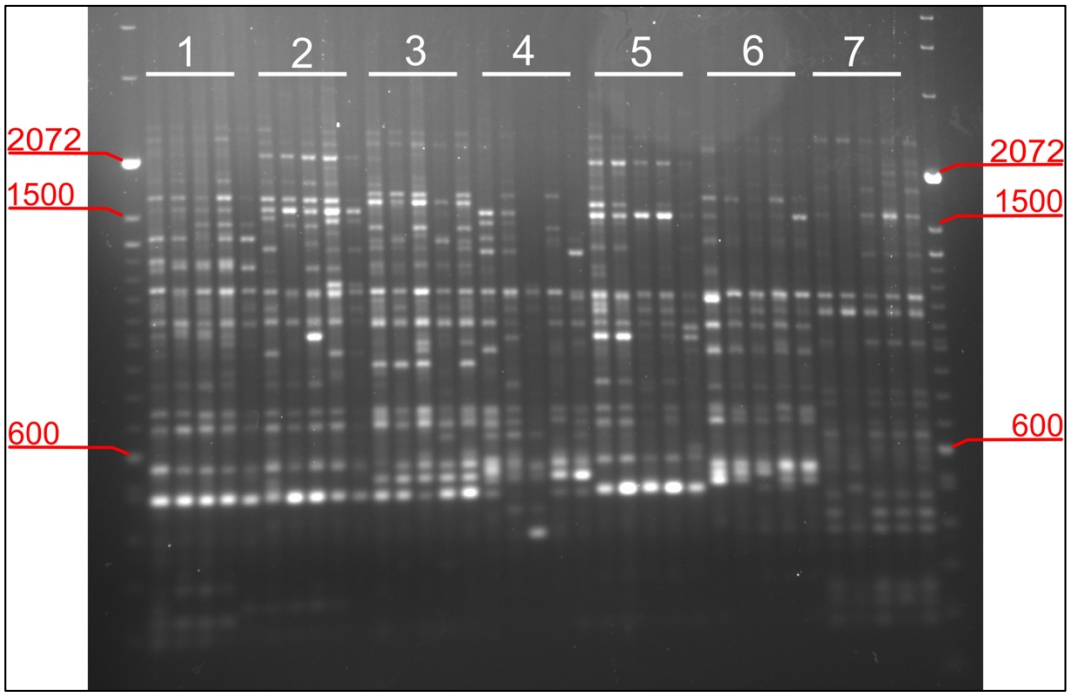
PCR tepkimelerinin ardından iPBS (1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 19; Şekil 3.8-Şekil 3.16), IRAP (2, 3, 4, 5, 6, 7, 10; Şekil 3.17-Şekil 3.23) ve REMAP (3, 6, 7, 9, 10, 11, 13, 14; Şekil 3.24-Şekil 3.31) belirteç sistemlerinde en iyi sonuç veren primerler tespit edilmiş ve ilerleyen çalışmalarda kullanılmıştır. Farklı gelişim evlerinden elde edilen örneklerden yapılan PCR bant profilleri ise Şekil 3.32-Şekil 3.34 arasında verilmiştir.



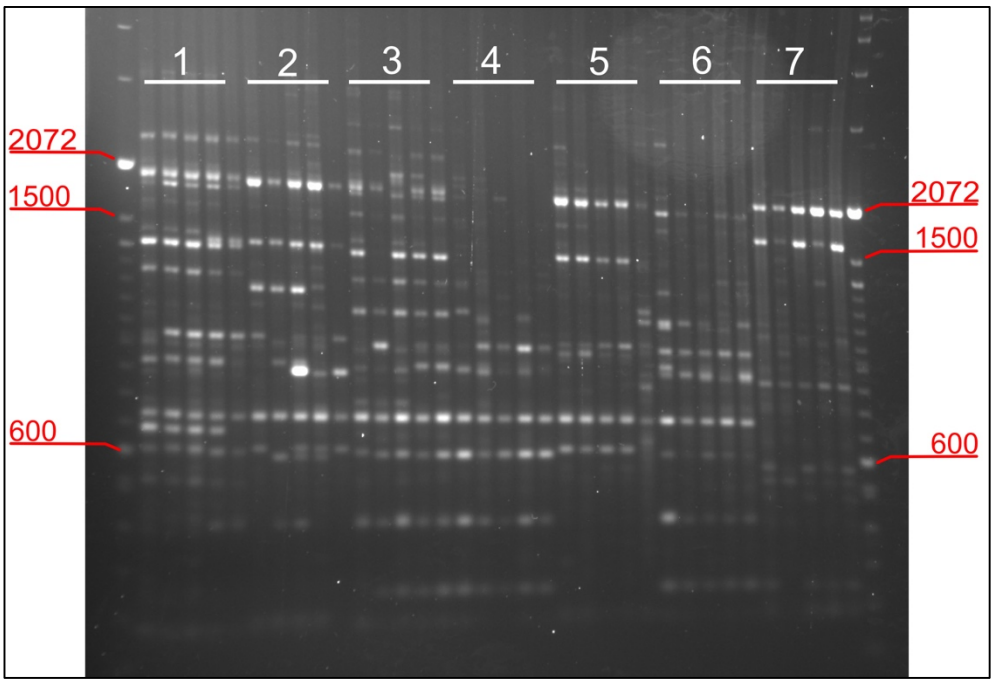
Şekil 3.8: iPBS-1 primeri kullanılarak 6 saat agaroz jel elektroforezi sonucunda elde edilen jel görüntüsü. Örnekler 5' li gruplar halinde yüklenmişlerdir. Sırasıyla: *P. vera* (1), *P. mutica* (2), *P. khinjuk* (3), *P. terebinthus* (4), *P. atlantica* (5), *P. palaestina* (6), *P. lentiscus* (7).



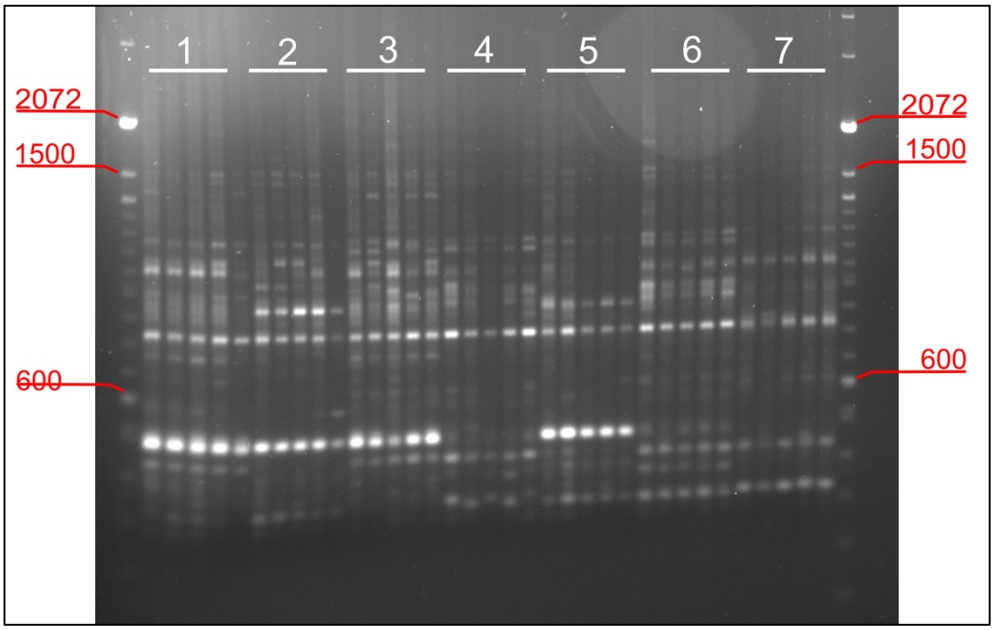
Şekil 3.9: iPBS-2 primeri kullanılarak 6 saat agaroz jel elektroforezi sonucunda elde edilen jel görüntüsü. Örnekler 5' li gruplar halinde yüklenmişlerdir. Sırasıyla: *P. vera* (1), *P. mutica* (2), *P. khinjuk* (3), *P. terebinthus* (4), *P. atlantica* (5), *P. palaestina* (6), *P. lentiscus* (7).



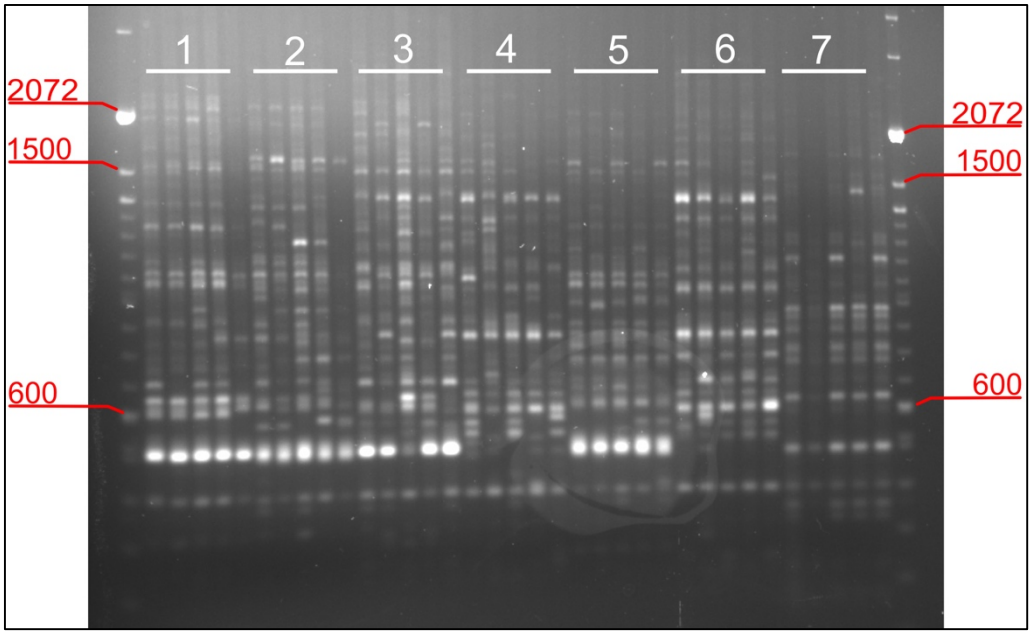
Şekil 3.10: iPBS-4 primeri kullanılarak 6 saat agaroz jel elektroforezi sonucunda elde edilen jel görüntüsü. Örnekler 5' li gruplar halinde yüklenmişlerdir. Sırasıyla: *P. vera* (1), *P. mutica* (2), *P. khinjuk* (3), *P. terebinthus* (4), *P. atlantica* (5), *P. palaestina* (6), *P. lentiscus* (7).



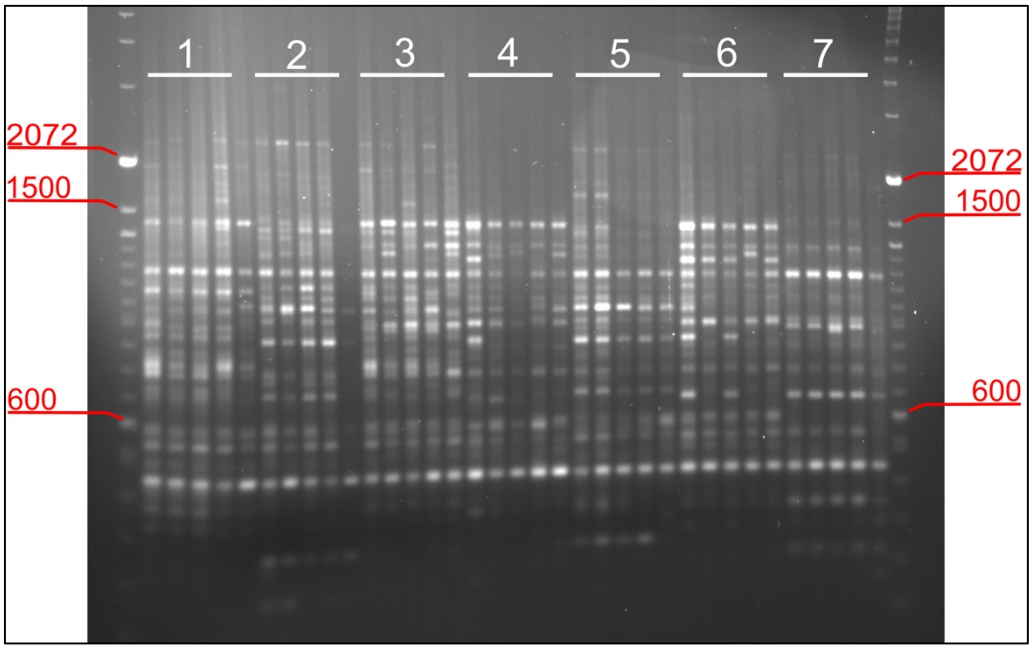
Şekil 3.11: iPBS-5 primeri kullanılarak 6 saat agaroz jel elektroforezi sonucunda elde edilen jel görüntüsü. Örnekler 5' li gruplar halinde yüklenmişlerdir. Sırasıyla: *P. vera* (1), *P. mutica* (2), *P. khinjuk* (3), *P. terebinthus* (4), *P. atlantica* (5), *P. palaestina* (6), *P. lentiscus* (7).



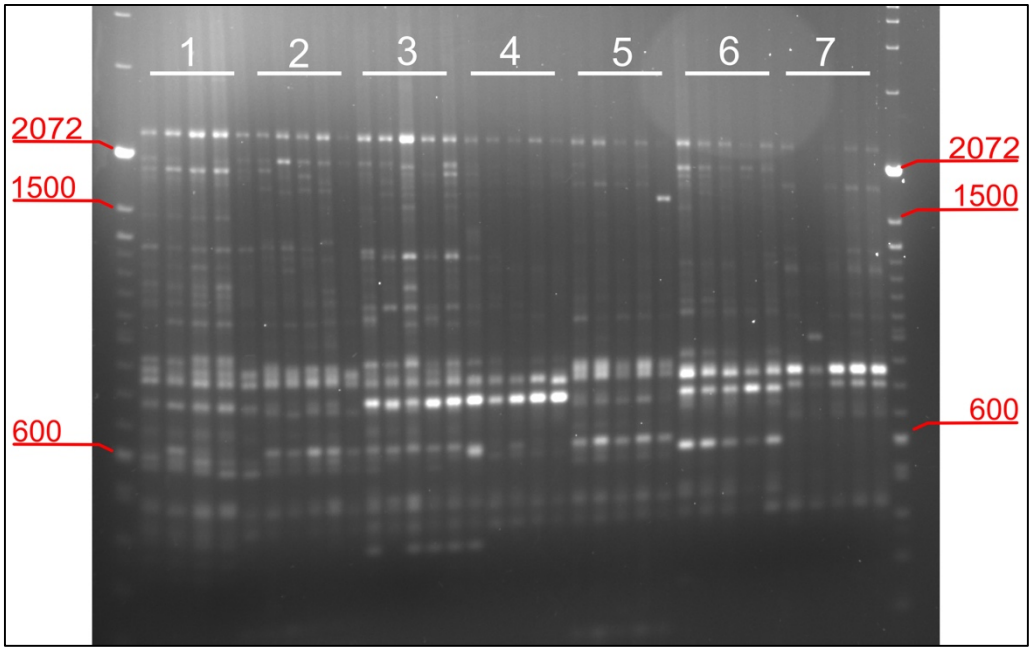
Şekil 3.12: iPBS-6 primeri kullanılarak 6 saat agaroz jel elektroforezi sonucunda elde edilen jel görüntüsü. Örnekler 5' li gruplar halinde yüklenmişlerdir. Sırasıyla: *P. vera* (1), *P. mutica* (2), *P. khinjuk* (3), *P. terebinthus* (4), *P. atlantica* (5), *P. palaestina* (6), *P. lentiscus* (7).



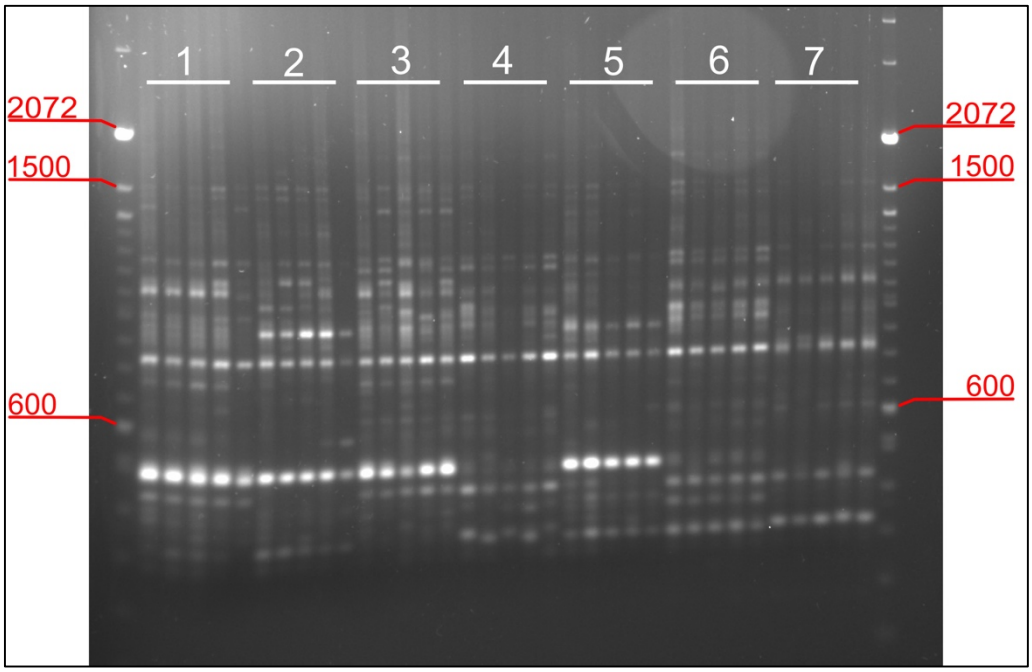
Şekil 3.13: iPBS-7 primeri kullanılarak 6 saat agaroz jel elektroforezi sonucunda elde edilen jel görüntüsü. Örnekler 5' li gruplar halinde yüklenmişlerdir. Sırasıyla: *P. vera* (1), *P. mutica* (2), *P. khinjuk* (3), *P. terebinthus* (4), *P. atlantica* (5), *P. palaestina* (6), *P. lentiscus* (7).



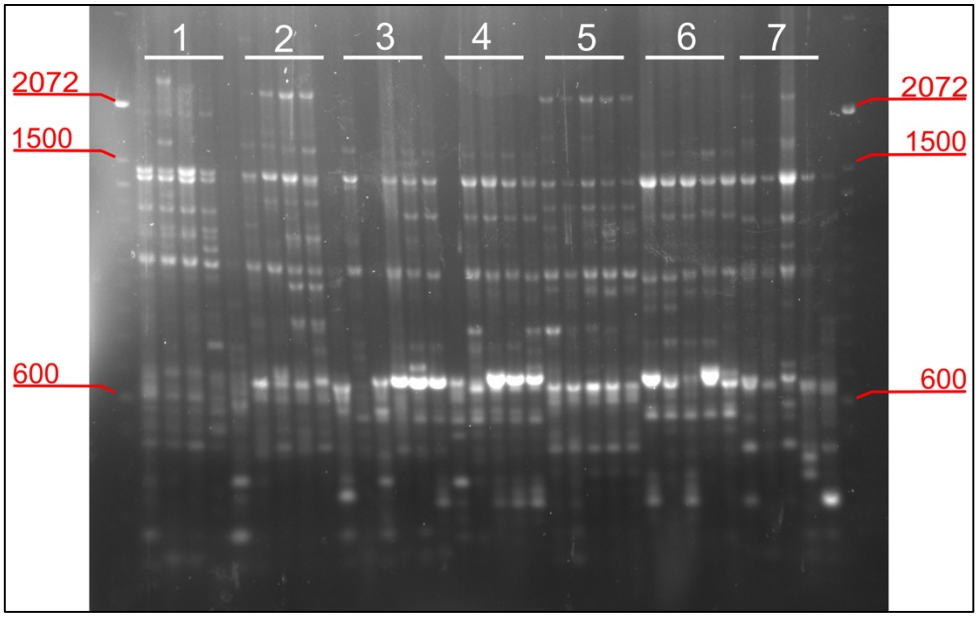
Şekil 3.14: iPBS-8 primeri kullanılarak 6 saat agaroz jel elektroforezi sonucunda elde edilen jel görüntüsü. Örnekler 5' li gruplar halinde yüklenmişlerdir. Sırasıyla: *P. vera* (1), *P. mutica* (2), *P. khinjuk* (3), *P. terebinthus* (4), *P. atlantica* (5), *P. palaestina* (6), *P. lentiscus* (7).



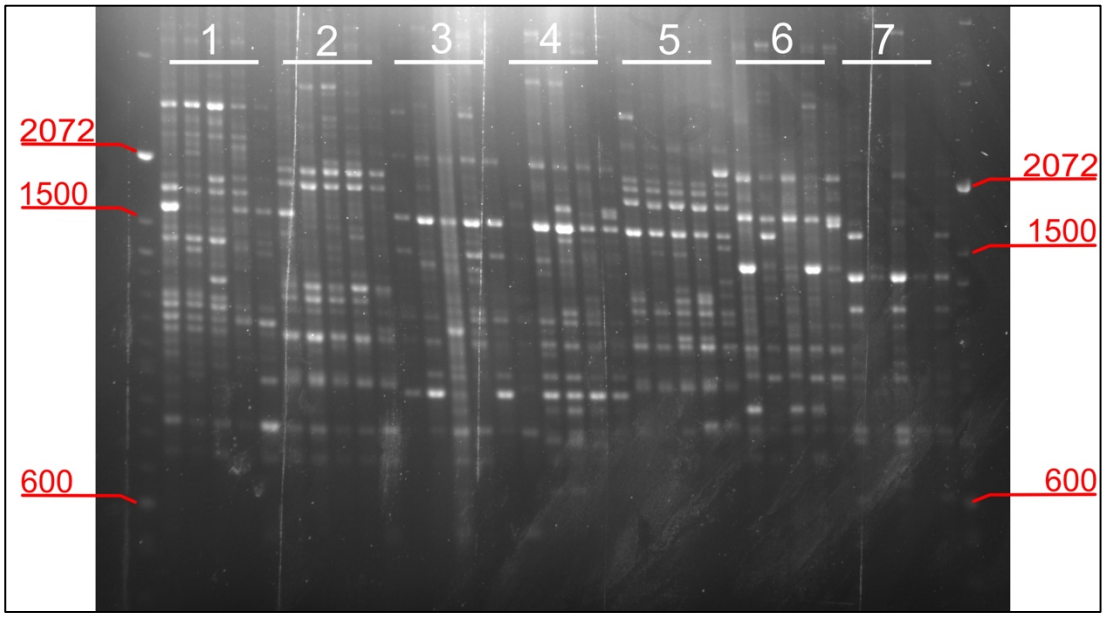
Şekil 3.15: iPBS-9 primeri kullanılarak 6 saat agaroz jel elektroforezi sonucunda elde edilen jel görüntüsü. Örnekler 5' li gruplar halinde yüklenmişlerdir. Sırasıyla: *P. vera* (1), *P. mutica* (2), *P. khinjuk* (3), *P. terebinthus* (4), *P. atlantica* (5), *P. palaestina* (6), *P. lentiscus* (7).



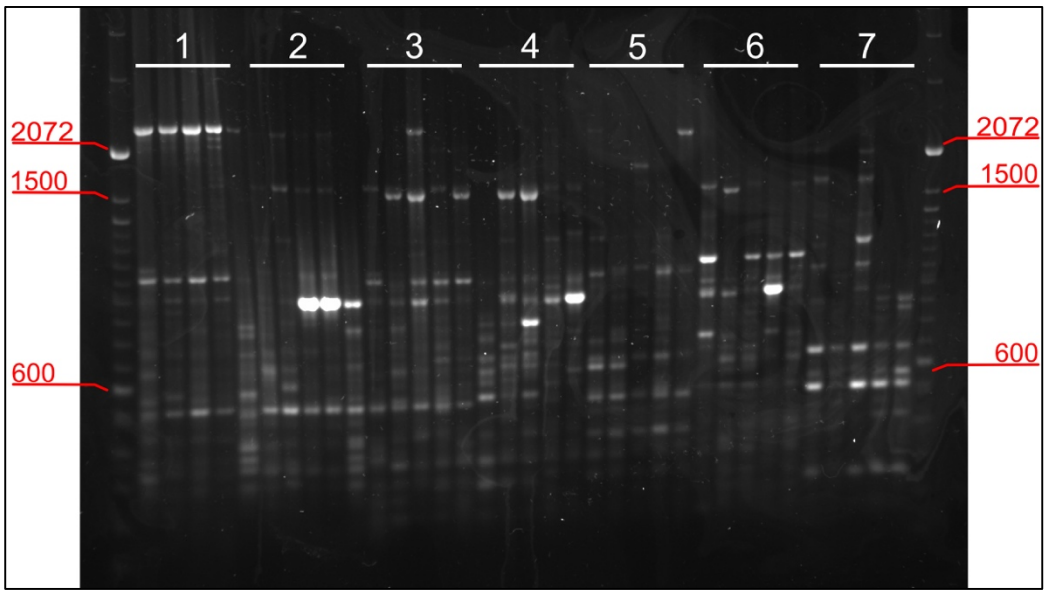
Şekil 3.16: iPBS-10 primeri kullanılarak 6 saat agaroz jel elektroforezi sonucunda elde edilen jel görüntüsü. Örnekler 5' li gruplar halinde yüklenmişlerdir. Sırasıyla: *P. vera* (1), *P. mutica* (2), *P. khinjuk* (3), *P. terebinthus* (4), *P. atlantica* (5), *P. palaestina* (6), *P. lentiscus* (7).



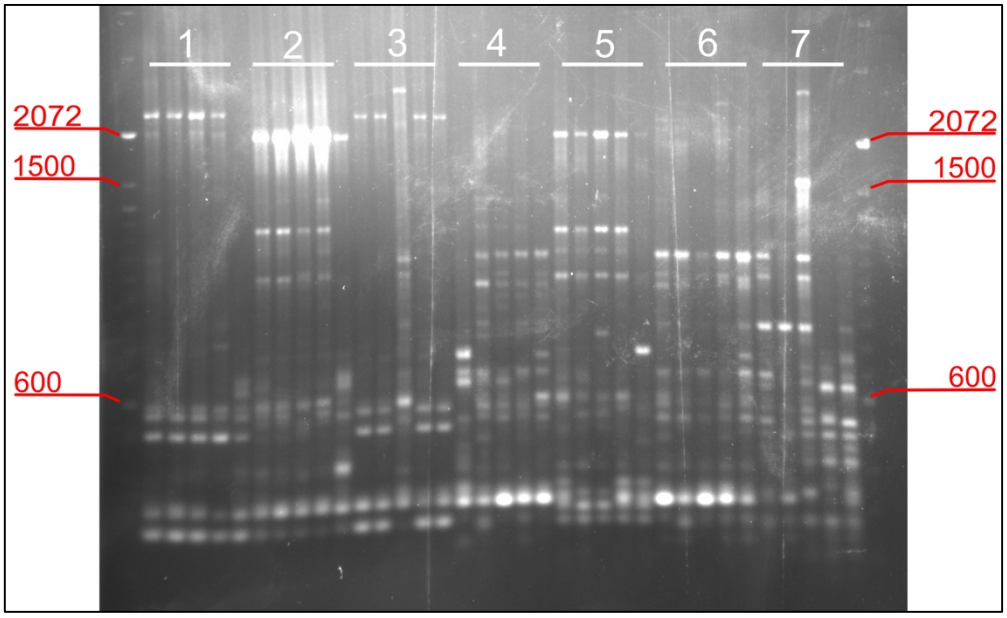
Şekil 3.17: LTR-2 primeri kullanılarak 6 saat agaroz jel elektroforezi sonucunda elde edilen jel görüntüsü. Örnekler 5' li gruplar halinde yüklenmişlerdir. Sırasıyla: *P. vera* (1), *P. mutica* (2), *P. khinjuk* (3), *P. terebinthus* (4), *P. atlantica* (5), *P. palaestina* (6), *P. lentiscus* (7).



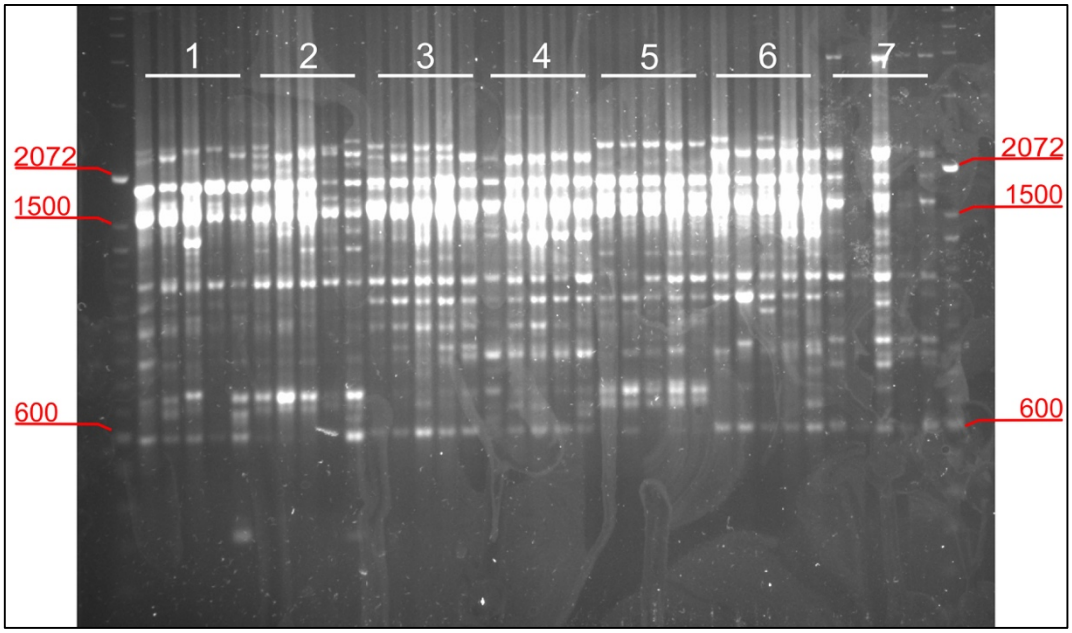
Şekil 3.18: LTR-3 primeri kullanılarak 6 saat agaroz jel elektroforezi sonucunda elde edilen jel görüntüsü. Örnekler 5' li gruplar halinde yüklenmişlerdir. Sırasıyla: *P. vera* (1), *P. mutica* (2), *P. khinjuk* (3), *P. terebinthus* (4), *P. atlantica* (5), *P. palaestina* (6), *P. lentiscus* (7).



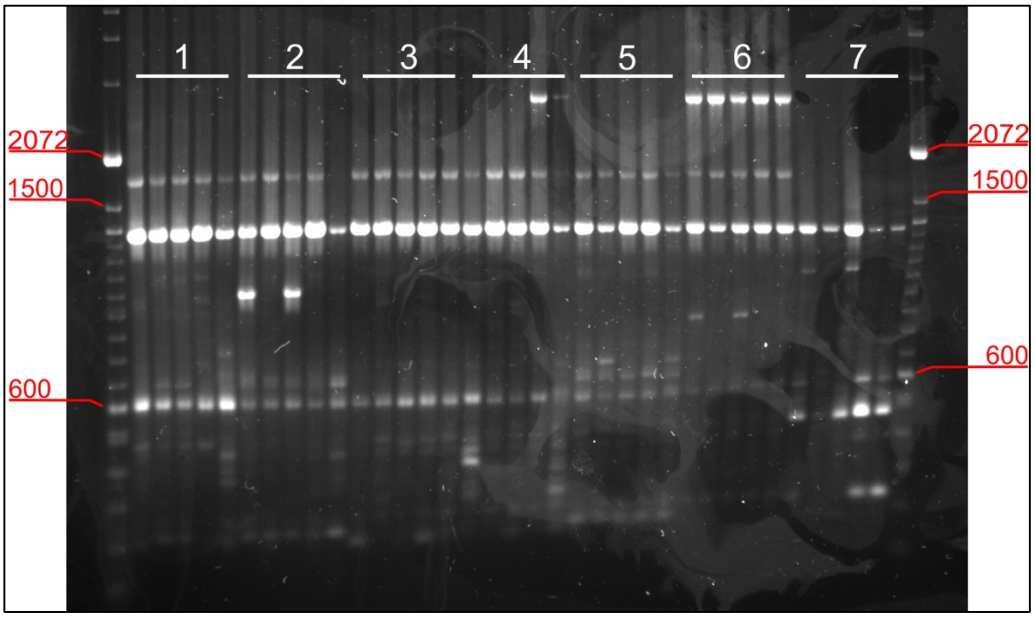
Şekil 3.19: LTR-4 primeri kullanılarak 6 saat agaroz jel elektroforezi sonucunda elde edilen jel görüntüsü. Örnekler 5' li gruplar halinde yüklenmişlerdir. Sırasıyla: *P. vera* (1), *P. mutica* (2), *P. khinjuk* (3), *P. terebinthus* (4), *P. atlantica* (5), *P. palaestina* (6), *P. lentiscus* (7).



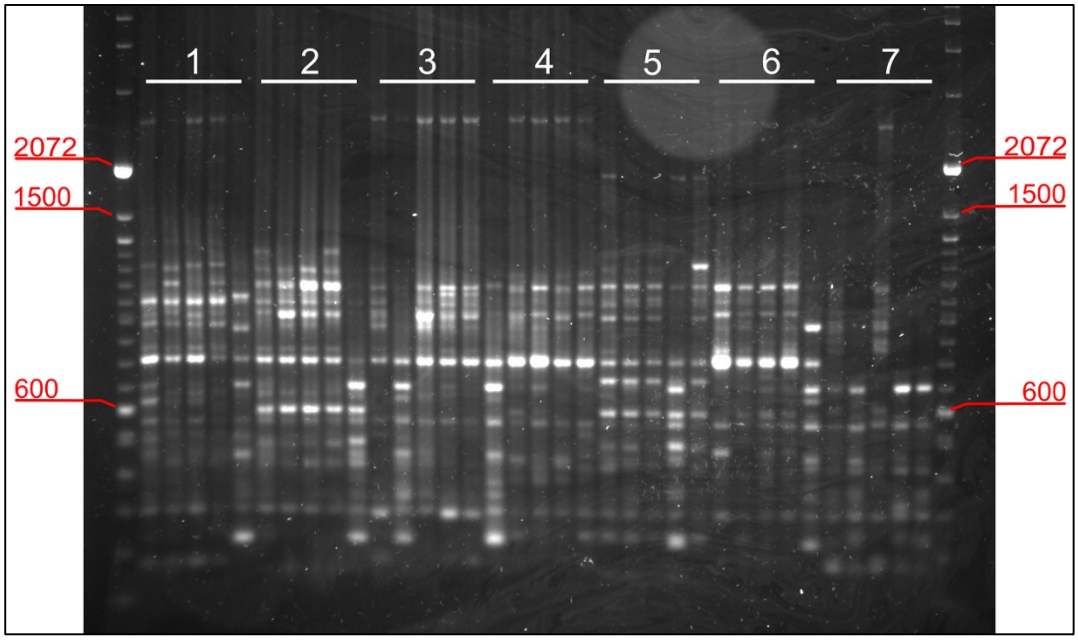
Şekil 3.20: LTR-5 primeri kullanılarak 6 saat agaroz jel elektroforezi sonucunda elde edilen jel görüntüsü. Örnekler 5' li gruplar halinde yüklenmişlerdir. Sırasıyla: *P. vera* (1), *P. mutica* (2), *P. khinjuk* (3), *P. terebinthus* (4), *P. atlantica* (5), *P. palaestina* (6), *P. lentiscus* (7).



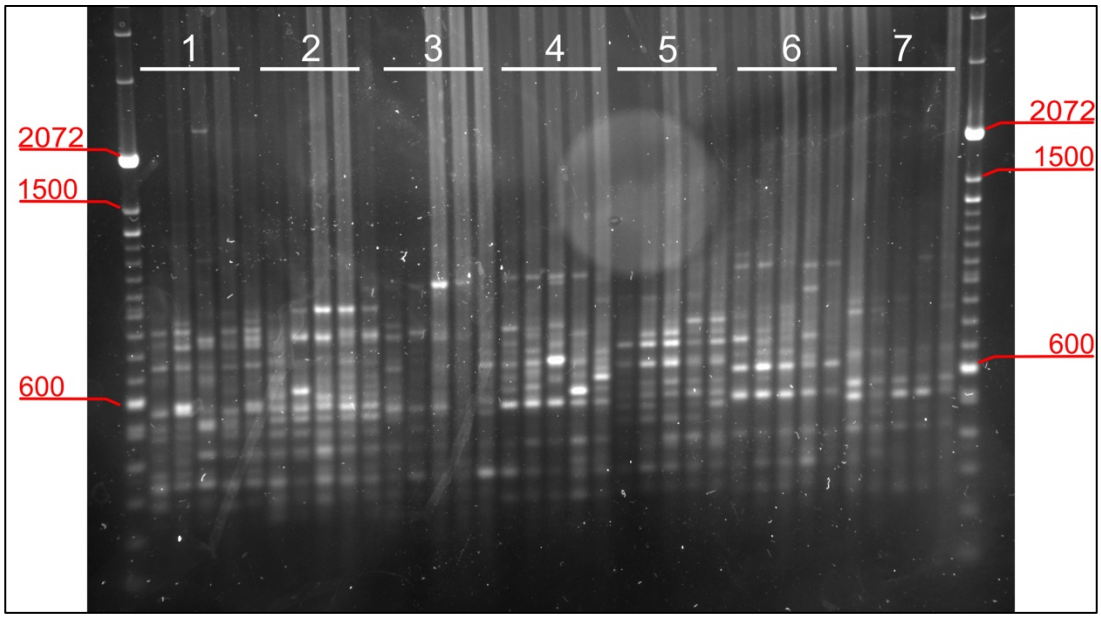
Şekil 3.21: LTR-6 primeri kullanılarak 6 saat agaroz jel elektroforezi sonucunda elde edilen jel görüntüsü. Örnekler 5' li gruplar halinde yüklenmişlerdir. Sırasıyla: *P. vera* (1), *P. mutica* (2), *P. khinjuk* (3), *P. terebinthus* (4), *P. atlantica* (5), *P. palaestina* (6), *P. lentiscus* (7).



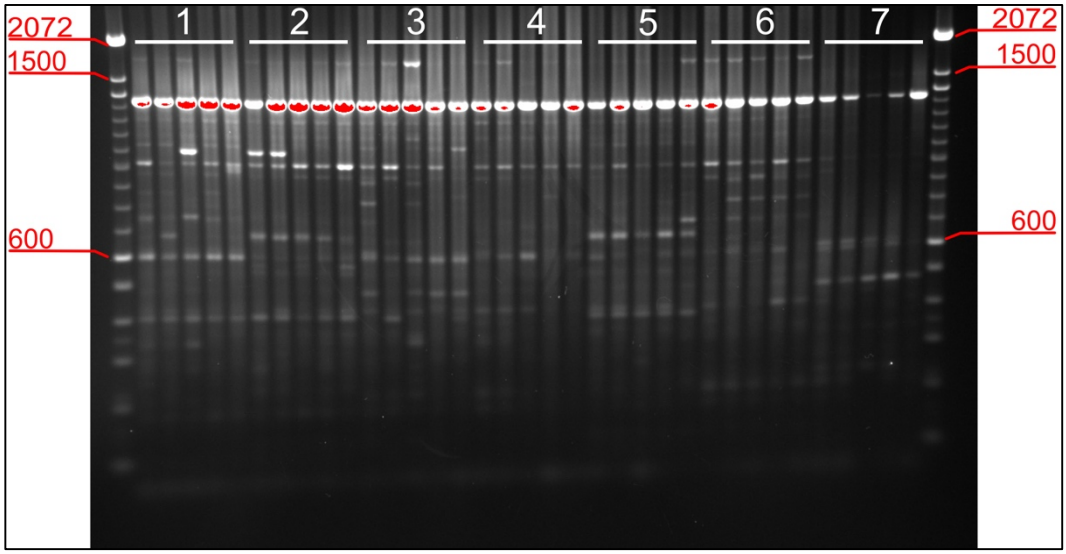
Şekil 3.22: LTR-7 primeri kullanılarak 6 saat agaroz jel elektroforezi sonucunda elde edilen jel görüntüsü. Örnekler 5' li gruplar halinde yüklenmişlerdir. Sırasıyla: *P. vera* (1), *P. mutica* (2), *P. khinjuk* (3), *P. terebinthus* (4), *P. atlantica* (5), *P. palaestina* (6), *P. lentiscus* (7).



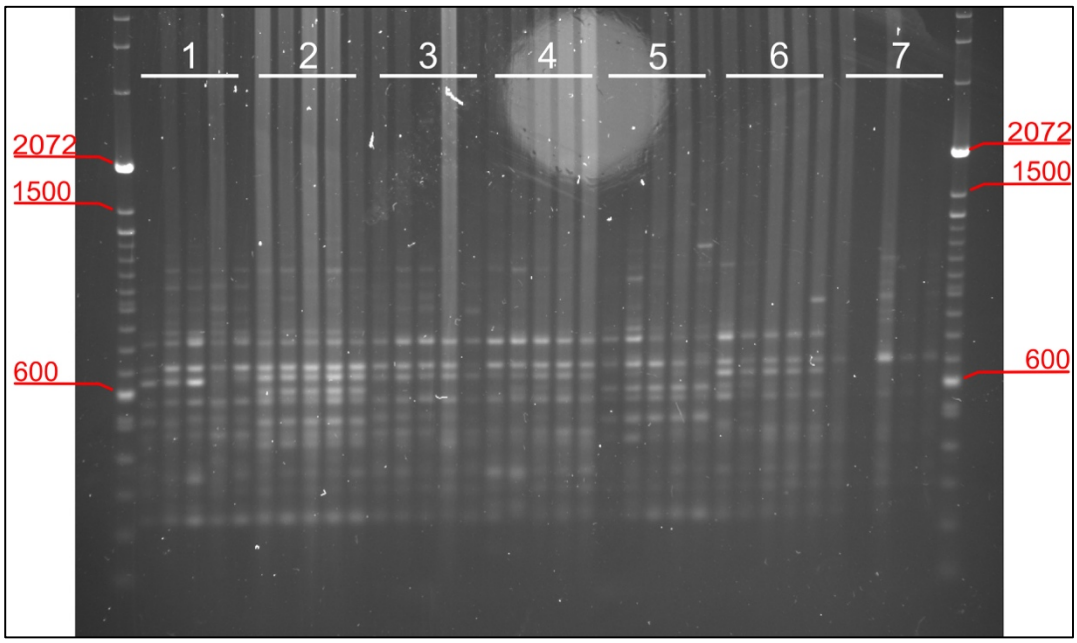
Şekil 3.23: LTR-10 primeri kullanılarak 6 saat agaroz jel elektroforezi sonucunda elde edilen jel görüntüsü. Örnekler 5' li gruplar halinde yüklenmişlerdir. Sırasıyla: *P. vera* (1), *P. mutica* (2), *P. khinjuk* (3), *P. terebinthus* (4), *P. atlantica* (5), *P. palaestina* (6), *P. lentiscus* (7).



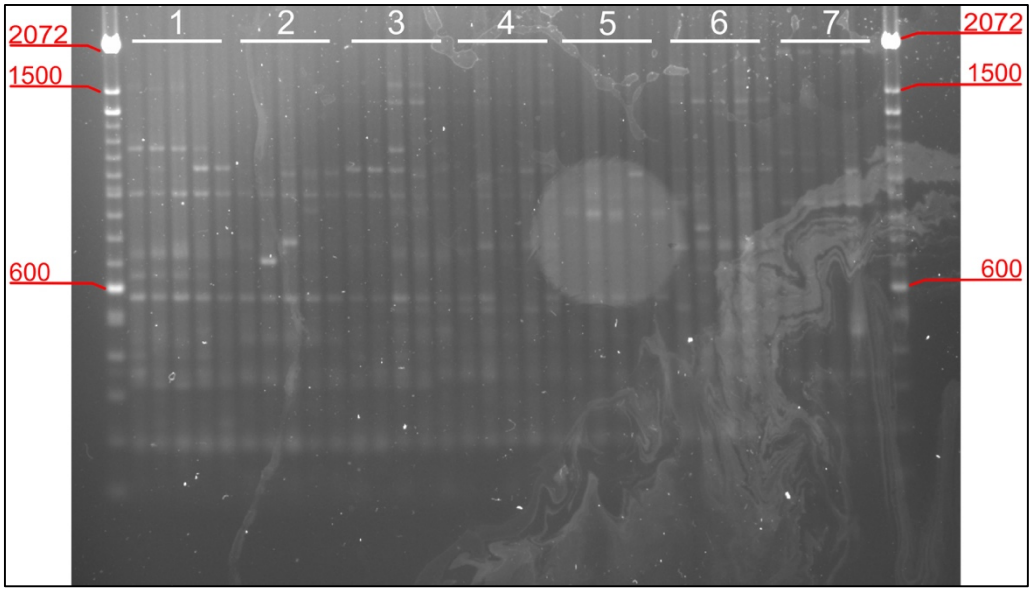
Şekil 3.24: REMAP-3 primer kombinasyonu kullanılarak 6 saat agaroz jel elektroforezi sonucunda elde edilen jel görüntüsü. Örnekler 5' li gruplar halinde yüklenmişlerdir. Sırasıyla: *P. vera* (1), *P. mutica* (2), *P. khinjuk* (3), *P. terebinthus* (4), *P. atlantica* (5), *P. palaestina* (6), *P. lentiscus* (7).



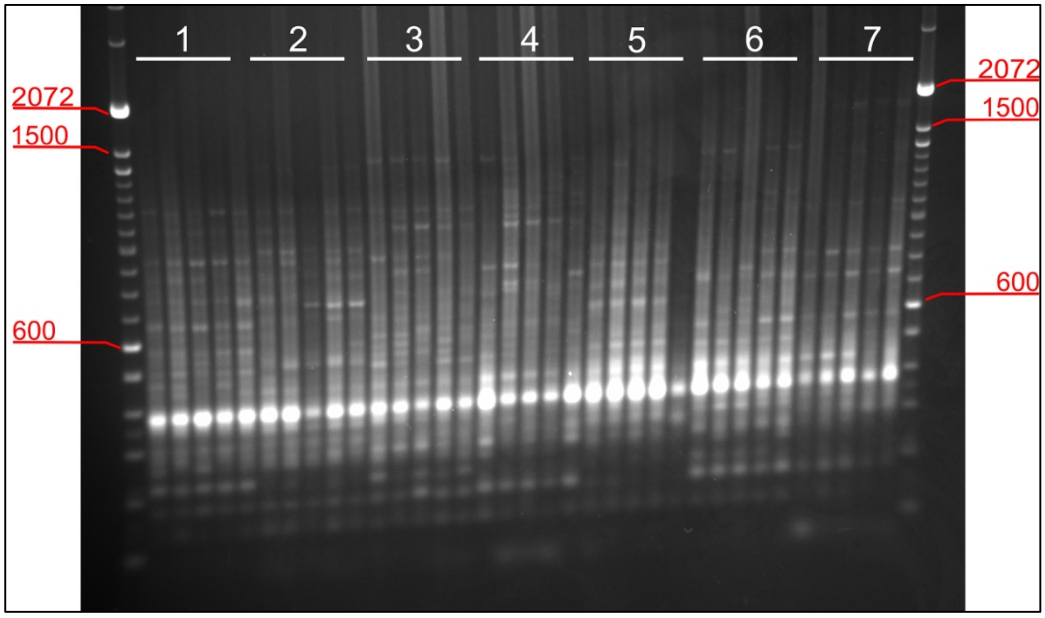
Şekil 3.25: REMAP-6 primer kombinasyonu kullanılarak 6 saat agaroz jel elektroforezi sonucunda elde edilen jel görüntüsü. Örnekler 5' li gruplar halinde yüklenmişlerdir. Sırasıyla: *P. vera* (1), *P. mutica* (2), *P. khinjuk* (3), *P. terebinthus* (4), *P. atlantica* (5), *P. palaestina* (6), *P. lentiscus* (7).



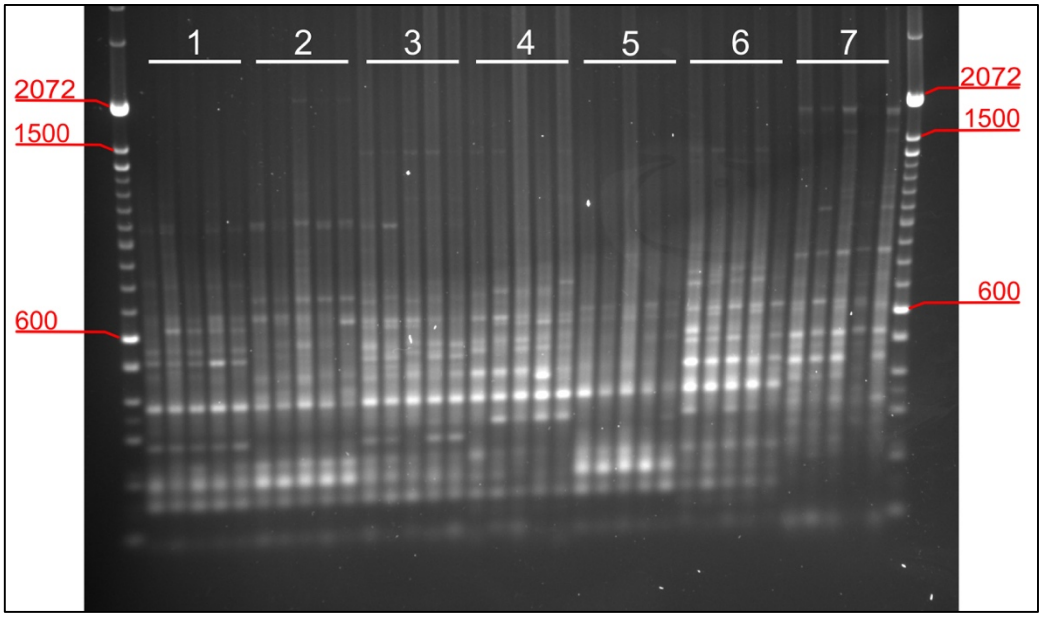
Şekil 3.26: REMAP-7 primer kombinasyonu kullanılarak 6 saat agaroz jel elektroforezi sonucunda elde edilen jel görüntüsü. Örnekler 5' li gruplar halinde yüklenmişlerdir. Sırasıyla: *P. vera* (1), *P. mutica* (2), *P. khinjuk* (3), *P. terebinthus* (4), *P. atlantica* (5), *P. palaestina* (6), *P. lentiscus* (7).



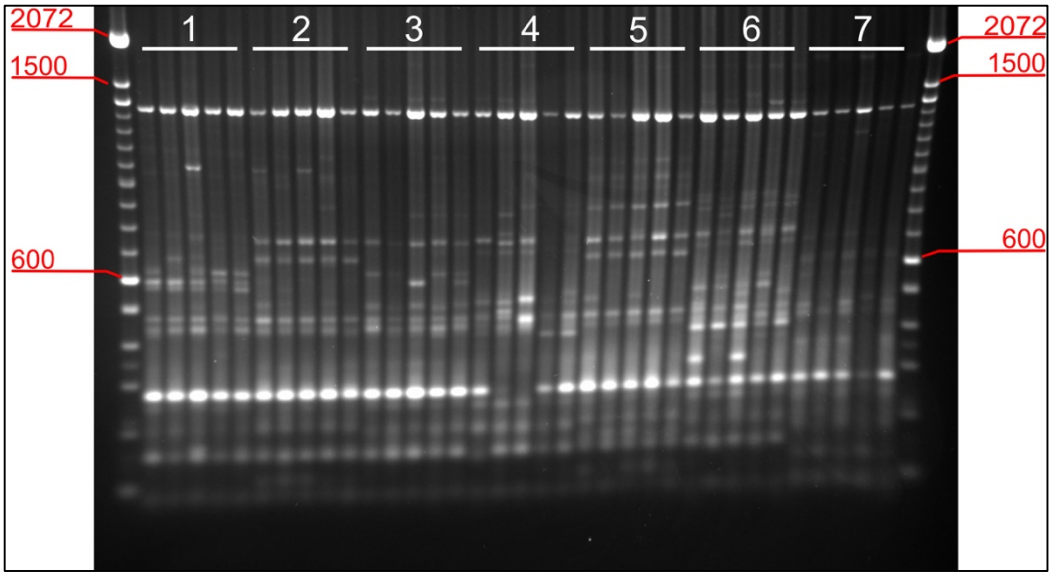
Şekil 3.27: REMAP-9 primer kombinasyonu kullanılarak 6 saat agaroz jel elektroforezi sonucunda elde edilen jel görüntüsü. Örnekler 5' li gruplar halinde yüklenmişlerdir. Sırasıyla: *P. vera* (1), *P. mutica* (2), *P. khinjuk* (3), *P. terebinthus* (4), *P. atlantica* (5), *P. palaestina* (6), *P. lentiscus* (7).



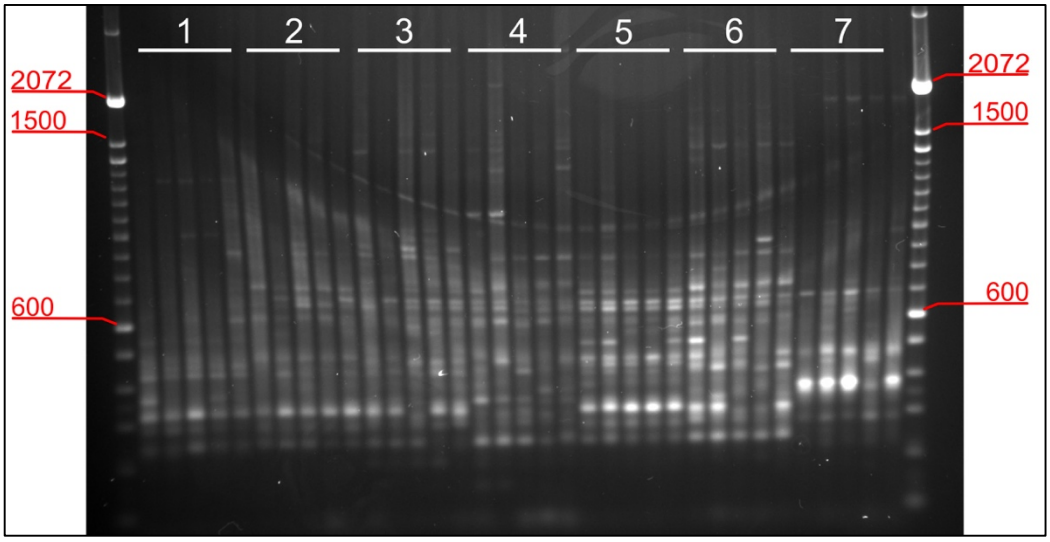
Şekil 3.28: REMAP-10 primer kombinasyonu kullanılarak 6 saat agaroz jel elektroforezi sonucunda elde edilen jel görüntüsü. Örnekler 5' li gruplar halinde yüklenmişlerdir. Sırasıyla: *P. vera* (1), *P. mutica* (2), *P. khinjuk* (3), *P. terebinthus* (4), *P. atlantica* (5), *P. palaestina* (6), *P. lentiscus* (7).



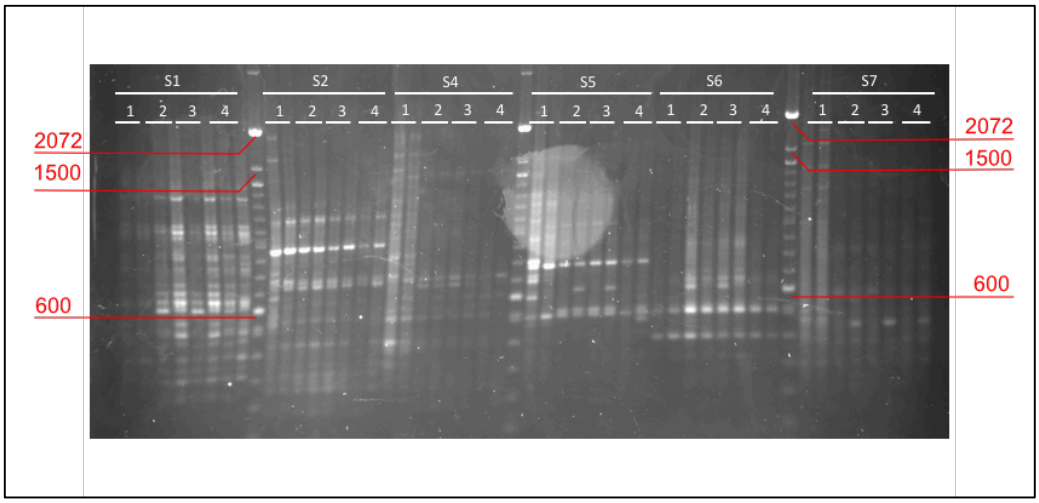
Şekil 3.29: REMAP-11 primer kombinasyonu kullanılarak 6 saat agaroz jel elektroforezi sonucunda elde edilen jel görüntüsü. Örnekler 5' li gruplar halinde yüklenmişlerdir. Sırasıyla: *P. vera* (1), *P. mutica* (2), *P. khinjuk* (3), *P. terebinthus* (4), *P. atlantica* (5), *P. palaestina* (6), *P. lentiscus* (7).



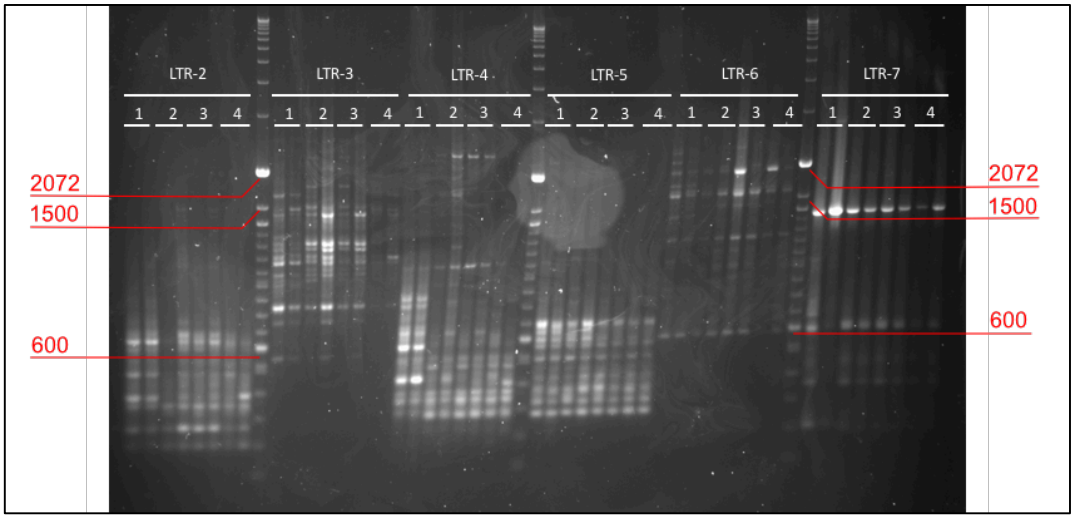
Şekil 3.30: REMAP-13 primer kombinasyonu kullanılarak 6 saat agaroz jel elektroforezi sonucunda elde edilen jel görüntüsü. Örnekler 5' li gruplar halinde yüklenmişlerdir. Sırasıyla: *P. vera* (1), *P. mutica* (2), *P. khinjuk* (3), *P. terebinthus* (4), *P. atlantica* (5), *P. palaestina* (6), *P. lentiscus* (7).



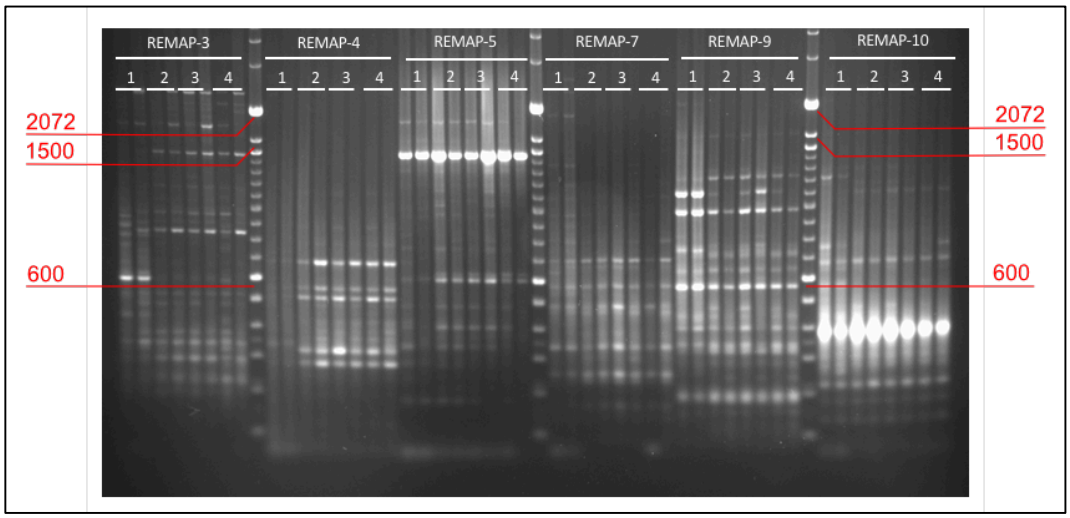
Şekil 3.31: REMAP-14 primer kombinasyonu kullanılarak 6 saat agaroz jel elektroforezi sonucunda elde edilen jel görüntüsü. Örnekler 5' li gruplar halinde yüklenmişlerdir. Sırasıyla: *P. vera* (1), *P. mutica* (2), *P. khinjuk* (3), *P. terebinthus* (4), *P. atlantica* (5), *P. palaestina* (6), *P. lentiscus* (7).



Şekil 3.32: Farklı gelişim evrelerine (1: Embriyo, 2: gövde, 3: kök ve 4: *P. vera*) ait örneklerde iPBS belirteç sistemi ile elde edilen jel görüntüsü (Örnekler 2' li gruplar altında yüklenmiştir).



Şekil 3.33: Farklı gelişim evrelerine (1: Embriyo, 2: gövde, 3: kök ve 4: *P. vera*) ait örneklerde IRAP belirteç sistemi ile elde edilen jel görüntüsü belirlenmesi (Örnekler 2' li gruplar altında yüklenmiştir).



Şekil 3.34: Farklı gelişim evrelerine (1: Embriyo, 2: gövde, 3: kök ve 4: *P. vera*) ait örneklerde REMAP belirteç sistemi ile elde edilen jel görüntüsü (Örnekler 2' li gruplar altında yüklenmiştir).

5.3. Belirteç Sistemlerinin Karşılaştırmalı Olarak İncelenmesi

Bütün belirteç sistemleri incelendiğinde iPBS belirteç sisteminin en fazla lokus bilgisine (319 toplam lokus, 35.44 primer başına düşen lokus) polimorfizm oranına (35.44 primer başına düşen polimorfik lokus) ve diğer primerlere oranla daha fazla ayırt etme yeteneğine (daha fazla toplam allel, verimlilik indeksi ve ayırma gücü) sahip olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte, polimorfizm oranları (0.94, 0.93 ve 0.93), beklenen heterozigosite (0.35, 0.32 ve 0.3) ve PIC değerleri (0.35, 0.35, ve 0.32) bütün belirteç sistemleri için benzer çıkmıştır (Tablo 3.23).

Tablo 3.23: Belirteç sistemlerinin çeşitlilik indekslerinin karşılaştırılması.

Çeşitlilik Sabiti	iPBS	IRAP	REMAP
Toplam primer sayısı	9	7	8
Lokus sayısı	319	145	116
Polimorfik lokus sayısı	21	9	9
Monomorfik lokus sayısı	340	154	125
Polimorfik lokus oranı	0,94	0.94	0,93
Primer başına lokus	35,44	20.71	14,5
Beklenen heterozigosite	37,78	22	15,62
Lokus başına efektif allel (n_e):	0,35	0,32	0,3
Toplam efektif allel (N_e):	1,61	1,53	1,5
Test verimlilik indeksi (A_i):	548,29	235,94	188,01
Efektif multipleks oranı (E):	60,92	33,71	23,5
Marker index (M):	35,51	20,68	14,53
Ayırma gücü (R_p):	180,57	79,89	59,37
Polimorfizm bilgi içeriği	0,35	0,35	0,32

1000 permütasyon kullanılarak yapılan Mantel analizlerinde iPBS ve IRAP belirteç sistemlerinin yüksek oranda korelasyon gösterdikleri tespit edilmiştir (0,789). Ancak diğer belirteç sistemlerinin birbirleri ile olan korelasyon değerlerinin çok yüksek olmadığı görülmüştür (0,392 ve 0,513; sırasıyla iPBS-REMAP ve IRAP-REMAP). (Tablo 3.24).

Tablo 3.24: 1000 permütasyon ile tekrarlanmış Mantel korelasyon testi.

	iPBS	IRAP	REMAP	HEPSİ
iPBS	1			
IRAP	0.7894	1		
REMAP	0.3922	0.5137	1	
HEPSİ	0.9648	0.9062	0.4694	1

İstatistiklerin hesaplanmasının ardından iPBS; IRAP, REMAP ve tüm belirteç sistemlerini içeren ilk üç eksen sırasıyla %45,52; 51,16; 63,39 ve 50,26 oranlarında çeşitliliği kapsamıştır (Tablo 3.25).

Tablo 3.25: PCA sonucunda her primer sistemi için elde edilen göreceli ve kümülatif varyasyonlar.

Koordinatlar		Göreceli Varyans	Birikimli Varyasyon (%)
iPBS	1	0.1948	19.48
	2	0.1542	34.9
	3	0.1303	45,52
IRAP	1	0.2023	20.23
	2	0.1866	38.89
	3	0.1227	51.16
REMAP	1	0.2532	25.32
	2	0.2204	47,39
	3	0.1595	63,39
Bütün Primer Setleri	1	0.1883	18.83
	2	0.1653	35.36
	3	0.1490	50,26

5.4. Türlerin Belirteç Sistemleri ile İncelenmesi

5.4.1. Türlerin iPBS Belirteç Sistemi ile İncelenmesi

Agaroz jel elektroforezi sonunda elde edilen bant profilleri incelendiğinde toplam olarak 340 bant elde edildiği görülmüştür. Elde edilen bu bantlardan 20 tanesi ortak 320 tanesi ise polimorfik olarak tespit edilmiştir. Bant dağılımlarının ise 175 bç - 3800 bç arasında olduğu görülmüştür (Tablo 3.26).

Tablo 3.26: iPBS belirteç sistemi ile elde edilen sonuçların değerlendirilmesi (BP: Bant profili, PM: Polimorfik bant, TB: Toplam bant, POL: Polimorfizm oranı, PIC: Polimorfizm bilgi içeriği).

	BP (bç)	PM	TB	POL (%)	PIC*
iPBS – 1	250-2300	43	44	97	0,345
iPBS – 2	175-2100	21	26	80	0,293
iPBS – 4	490-2500	37	40	92	0,366
iPBS – 5	180-3800	53	53	100	0,366
iPBS – 6	400-3100	43	46	93	0,348
iPBS – 7	330-2200	36	37	97	0,361
iPBS – 8	125-2200	33	35	94	0,310
iPBS – 9	190-2200	29	31	93	0,375
iPBS – 10	290-1600	25	28	89	0,315
Toplam	-	320	340	-	-
Ortalama				93	**0,342**

Elde edilen bant profillerinden türler arası ve türler içi Jaccard benzerlik katsayısı hesaplanarak benzerlik matrisleri oluşturulmuştur. Ardından, hem tür içi hem de türler arasındaki benzerlikleri ve farklılıkların ortalamaları alınarak oluşturulan Tablolar, tür içi ve türler arası yakınlıkların yorumlanmasında kullanılmıştır (Tablo 3.27 ve Tablo 3.28).

Tür içi benzerlik ve farklılık oranları incelendiğinde, türler içinde en fazla benzerlik gösteren primerin iPBS-10 olduğu belirlenmiştir (0,885) (Tablo 3.27). iPBS-5 primeri ise türler içindeki polimorfizmin en fazla olduğu primerdir (0,293). Primerler ayrı ayrı olarak incelendiğinde ise en fazla benzerlik (0,909) gösteren türün *P. palaestina* olduğu görülmüştür (iPBS-9 primeri, 1). Bu da *P. palaestina* türlerinin tür içindeki polimorfizmin çok az olduğunun bir göstergesidir. Tüm primerlerden elde edilen tür içi benzerlik oranları incelendiğinde, en büyük benzerliğin *P. lentiscus* türleri arasında olduğu görülmüştür (0,894). En düşük benzerlik en büyük polimorfizm oranı ise *P. terebinthus* türleri içinde tespit edilmiştir (Sırayla, 0,720 – 0,280). Türler içinde ise ortalama benzerlik 0,824 olarak hesaplanmıştır (Tablo 3.27).

Ayrıca *P. lentiscus, P. palaestina* türünün ardından en fazla benzerliğin olduğu tür olarak tespit edilmiştir (iPBS-9 primeri). Tür içindeki polimorfizm oranları incelendiğinde ise *P. terebinthus*, polimorfizmin en yüksek olduğu türüdür (iPBS-4 primeri, 0,448).

Yine bütün primerler incelendiğinde, türler arasında en yakın benzerlik *P. vera-P. khinjuk* türleri arasında belirlenmiştir (0,635) (Tablo 3.28). *P. terebinthus* ve *P. palaestina* türleri arasında görülen ortalama benzerlik oranı da (0,553) olarak

hesaplanmıştır. Birbirlerine en uzak dolayısıyla birbirine en az benzeyen türler ise *P. terebinthus*-*P. lentiscus* çifti olarak belirlenmiştir (0,618) (Tablo 3.28).

Tablo 3.27: 9 farklı primer kullanılarak yapılan iPBS PCR sonunda, tür içindeki benzerlik ve farklılık oranları. Tablo oluşturulurken, benzerlik matrisi kullanılmış ve tür içi benzerlik oranlarının ortalaması alınmıştır(Ben.: Benzerlik Oranı, Fark.: Farklılık Oranı (Jaccard Uzaklığı), Bütün P.: Bütün Primerler).

	iPBS – 1		iPBS – 2		iPBS – 4		iPBS – 5		iPBS – 6	
	Ben.	Fark.	Ben.	Fark.	Ben.	Fark.	Ben.	Fark.	Ben.	Fark.
P. vera	0,919	0,081	0,951	0,049	0,898	0,102	0,802	0,198	0,766	0,234
P. mutica	0,785	0,215	0,814	0,186	0,797	0,203	0,546	0,454	0,710	0,290
P. khinjuk	0,830	0,170	0,931	0,069	0,809	0,191	0,783	0,217	0,899	0,102
P. terebinthus	0,579	0,421	0,744	0,256	0,552	0,448	0,632	0,368	0,837	0,163
P. atlantica	0,802	0,198	0,803	0,197	0,758	0,242	0,721	0,279	0,839	0,161
P. palaestina	0,832	0,169	0,909	0,091	0,898	0,102	0,711	0,289	0,914	0,086
P. lentiscus	0,979	0,021	0,949	0,051	0,718	0,282	0,750	0,250	0,958	0,042
Ortalama	0,818	0,182	0,872	0,128	0,776	0,224	0,707	0,293	0,846	0,154
	iPBS – 7		iPBS – 8		iPBS – 9		iPBS – 10		Bütün P.	
	Ben.	Fark.	Ben.	Fark.	Ben.	Fark.	Ben.	Fark.	Ben.	Fark.
P. vera	0,711	0,289	0,878	0,122	0,930	0,071	0,877	0,123	0,857	0,143
P. mutica	0,683	0,317	0,661	0,339	0,897	0,103	0,770	0,230	0,732	0,268
P. khinjuk	0,926	0,074	0,940	0,060	0,893	0,107	0,911	0,089	0,880	0,120
P. terebinthus	0,747	0,253	0,827	0,174	0,693	0,308	0,893	0,107	0,720	0,280
P. atlantica	0,915	0,085	0,902	0,098	0,828	0,172	0,781	0,219	0,818	0,182
P. palaestina	0,876	0,124	0,861	0,139	0,851	0,149	1,000	0,000	0,870	0,130
P. lentiscus	0,882	0,118	0,967	0,033	0,885	0,115	0,963	0,037	0,894	0,107
Ortalama	0,820	0,180	0,862	0,138	0,854	0,146	0,885	0,115	0,824	0,176

Tablo 3.28: 9 farklı primer kullanılarak yapılan iPBS PCR sonunda, türler arasındaki benzerlik ve farklılık oranları. Tablo oluşturulurken, benzerlik matrisi kullanılmış ve tür içi benzerlik oranlarının ortalaması alınmıştır. (Ben.: Benzerlik Oranı, Fark.: Farklılık Oranı (Jaccard Uzaklığı), Pol: Türler arası polimorfizmden tür içi polimorfizm çıkartılarak elde edilen polimorfizm oranı. Bütün P.: Bütün Primerler)

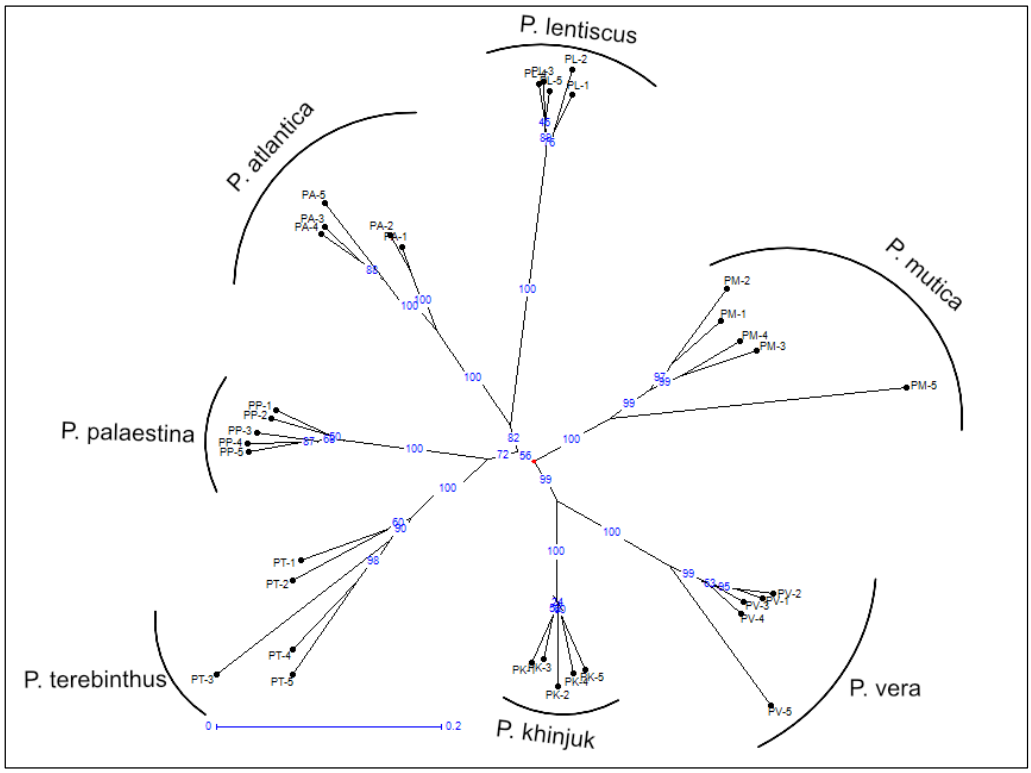
	iPBS – 1		iPBS – 2		iPBS – 4		iPBS – 5		iPBS – 6	
	Ben.	Fark.	Ben.	Fark.	Ben.	Fark.	Ben.	Fark.	Ben.	Fark.
PV-PM	0,567	0,433	0,665	0,335	0,583	0,417	0,306	0,694	0,429	0,571
PV-PK	0,656	0,344	0,798	0,202	0,580	0,420	0,549	0,451	0,517	0,483
PV-PT	0,495	0,505	0,446	0,554	0,357	0,643	0,319	0,681	0,437	0,563
PV-PA	0,539	0,461	0,526	0,474	0,420	0,580	0,307	0,693	0,373	0,627
PV-PP	0,513	0,487	0,603	0,397	0,479	0,521	0,273	0,727	0,384	0,616
PV-PL	0,463	0,537	0,636	0,364	0,347	0,653	0,240	0,760	0,372	0,628
PM-PK	**0,650**	0,350	0,706	0,294	0,494	0,506	0,281	0,719	0,503	0,497
PM-PT	0,435	0,565	0,530	0,470	0,360	0,640	0,338	0,662	0,534	0,466
PM-PA	0,481	0,519	0,652	0,348	0,417	0,583	0,323	0,677	0,500	0,500
PM-PP	0,463	0,537	0,615	0,385	0,492	0,508	0,221	0,779	0,463	0,537
PM-PL	0,400	0,600	0,599	0,401	0,402	0,598	0,244	0,756	0,396	0,604
PK-PT	0,553	0,447	0,529	0,471	0,470	0,530	0,374	0,626	0,541	0,459
PK-PA	0,469	0,531	0,645	0,355	0,409	0,591	0,232	0,768	0,612	0,388
PK-PP	0,543	0,457	0,698	0,302	0,448	0,552	0,275	0,725	0,477	0,523
PK-PL	0,412	0,588	**0,722**	0,278	0,381	0,619	0,229	0,771	0,511	0,489
PT-PA	0,416	0,584	0,567	0,433	0,428	0,572	0,284	0,716	0,555	0,445
PT-PP	0,536	0,464	0,682	0,318	0,540	0,460	0,305	0,695	0,578	0,422
PT-PL	0,397	0,603	0,443	0,557	0,329	0,671	0,254	0,746	0,526	0,474
PA-PP	0,484	0,516	0,690	0,310	0,471	0,529	0,366	0,634	0,507	0,493
PA-PL	0,574	0,426	0,591	0,409	0,339	0,661	0,354	0,646	0,473	0,527
PP-PL	0,417	0,583	0,585	0,415	0,270	0,730	0,320	0,680	0,550	0,450
Ort.	0,498	0,502	0,616	0,384	0,429	0,571	0,305	0,695	0,488	0,512

Şekil 3.28: Devam.

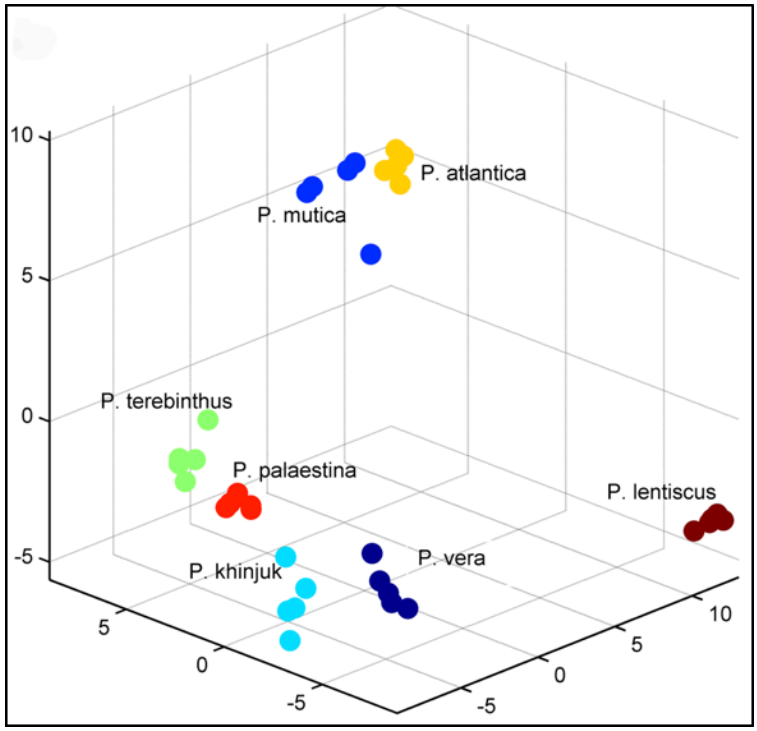
	iPBS – 7		iPBS – 8		iPBS – 9		iPBS – 10		Bütün P.		
	Ben.	Fark.	Ben.	Fark.	Ben.	Fark.	Ben.	Fark.	Ben.	Fark.	Pol.
PV-PM	0,493	0,507	0,560	0,440	0,519	0,481	0,618	0,382	0,518	0,482	0,307
PV-PK	0,523	0,477	0,776	0,224	0,701	0,299	0,708	0,292	0,635	0,365	0,190
PV-PT	0,424	0,576	0,553	0,447	0,446	0,554	0,645	0,355	0,454	0,546	0,370
PV-PA	0,477	0,523	0,612	0,388	0,518	0,482	0,568	0,432	0,472	0,528	0,352
PV-PP	0,493	0,507	0,588	0,412	0,493	0,507	0,702	0,298	0,492	0,508	0,508
PV-PL	0,360	0,640	0,495	0,505	0,328	0,672	0,488	0,512	0,405	0,595	0,419
PM-PK	0,580	0,420	0,622	0,378	0,617	0,383	0,546	0,454	0,550	0,450	0,274
PM-PT	0,499	0,501	0,477	0,523	0,457	0,543	0,616	0,384	0,468	0,532	0,356
PM-PA	0,580	0,420	0,594	0,406	0,535	0,465	0,559	0,441	0,508	0,492	0,316
PM-PP	0,579	0,421	0,609	0,391	0,411	0,589	0,649	0,351	0,492	0,508	0,332
PM-PL	0,478	0,522	0,532	0,468	0,248	0,752	0,388	0,612	0,407	0,593	0,417
PK-PT	0,579	0,421	0,642	0,358	0,630	0,370	0,677	0,323	0,554	0,446	0,270
PK-PA	0,602	0,398	0,759	0,241	0,524	0,476	0,591	0,409	0,532	0,468	0,293
PK-PP	0,679	0,321	0,741	0,259	0,508	0,492	0,683	0,317	0,556	0,444	0,269
PK-PL	0,406	0,594	0,622	0,378	0,349	0,651	0,493	0,507	0,450	0,550	0,374
PT-PA	0,474	0,526	0,629	0,371	0,492	0,508	0,509	0,491	0,481	0,519	0,343
PT-PP	0,620	0,380	0,574	0,426	0,403	0,597	0,768	0,232	0,553	0,447	0,271
PT-PL	0,346	0,654	0,375	0,625	0,303	0,697	0,458	0,542	0,382	0,618	0,442
PA-PP	0,598	0,402	0,664	0,336	0,305	0,695	0,581	0,419	0,518	0,482	0,307
PA-PL	0,498	0,502	0,623	0,377	0,312	0,688	0,434	0,566	0,467	0,533	0,357
PP-PL	0,429	0,571	0,659	0,341	0,421	0,579	0,475	0,525	0,459	0,541	0,365
Ort.	0,510	0,490	0,605	0,395	0,453	0,547	0,579	0,421	0,493	0,507	0,340

900 yineleme tekrarı ile oluşturulan filogenetik ağaçlar incelendiğinde türlerin 3 ana grupta toplandığı görülmektedir: (i) % 99 yineleme oranıyla *P. vera-P. khinjuk*, (ii) %100 yineleme oranıyla *P. mutica* ve (iii) %55 yineleme oranıyla *P.lentiscus-P. atlantica-P.palaestina-P. terebinthus*. Ayrıca oluşan son grup 2 farklı alt gruba ayrılmıştır: %82 yineleme oranı ile *P.lentiscus-P. atlantica* ve %72 yineleme oranı ile *P.palaestina-P. terebinthus* tür çiftleri (Şekil 3.35).

iPBS belirteç sistemi ile oluşturan PCA grafiğinde ise türlerinin 3 ana grup altında toplandığı görülmektedir (Şekil 3.36): (i) *P. vera-P. khinjuk-P. palaestina-P. terebinthus*, (ii) *P. mutica-P. atlantica*, (iii) *P. lentiscus*.



Şekil 3.35: Akdeniz' e özgü *Pistacia* türlerinin, iPBS belirteç sistemi kullanılarak gruplandığı filogenetik ağaç. Yineleme oranları ağacın kollarında belirtilmiştir (PV: *P. vera*, PM: *P. mutica*, PA: *P. atlantica*, PT: *P. terebinthus*, PP: *P. palaestina*, PL: *P. lentiscus)*.



Şekil 3.36: iPBS belirteç sistemi verileri kullanılarak yapılan PCA sonucunda Akdeniz' e özgü *Pistacia* türlerinin gruplanması.

5.4.2. Türlerin IRAP Belirteç Sistemi ile İncelenmesi

Agaroz jel elektroforezi sonunda elde edilen IRAP profilleri incelendiğinde toplam olarak 154 bant elde edilmiştir. Elde edilen bu bantlardan 10 tanesi ortak 320 tanesi ise polimorfik olarak tespit edilmiştir. Bant dağılımlarının ise 175 bç - 2500 bç arasında olduğu görülmüştür (Tablo 3.29).

Tablo 3.29: IRAP belirteç sistemi ile elde edilen sonuçların değerlendirilmesi (BP: Bant profili, PM: Polimorfik bant, TB: Toplam bant, POL: Polimorfizm oranı, PIC: Polimorfizm bilgi içeriği).

	BP (bç)	PB	TB	POL (%)	PIC*
LTR-2	2000-150	25	25	100	0,358
LTR-3	2500-800	29	30	99,6	0,3836
LTR-4	2150-275	25	26	96,15	0,3985
LTR-5	2200-200	14	17	82,35	0,3267
LTR-6	1900-600	17	17	100	0,3358
LTR-7	1800-190	11	14	78,57	0,2293
LTR-10	1400-175	23	25	92	0,3242
Toplam	-	144	154	93,50	-
Ortalama	-	-	-	-	0,3365

Benzerliğin en fazla olduğu primer LTR5 (0,865), polimorfizmin en fazla olduğu primer ise LTR-10 (0,258) olarak belirlenmiştir (Tablo 3.30). Tüm primerler incelendiğinde tür içinde en fazla benzerlik gösteren örnek *P. atlantica* (0,917) olurken, polimorfizmin en yüksek olduğu örnek ise *P. lentiscus* (0,341) olarak belirlenmiştir (Tablo 3.30).

Türler arası benzerlik ve polimorfizm değerleri incelendiğinde; *P. khinjuk* ve *P. terebinthus*' un(0,559) ardından *P. mutica – P. atlantica* (0,555) ve *P. vera* – P. *khinjuk* (0,511) en fazla benzerlik gösteren tür çiftleridir (Tablo 3.31).

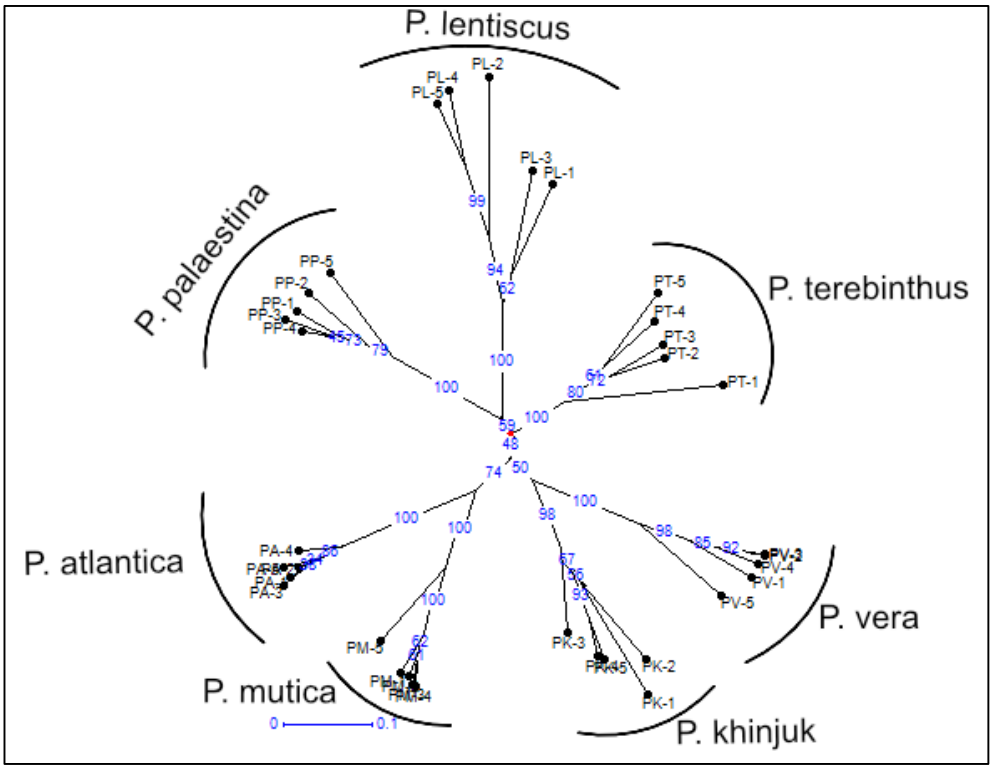
Tablo 3.30: 7 farklı primer kullanılarak yapılan IRAP PCR sonunda, tür içindeki benzerlik ve farklılık oranları. Tablo oluşturulurken, benzerlik matrisi kullanılmış ve tür içi benzerlik oranlarının ortalaması alınmıştır(Ben.: Benzerlik Oranı, Fark.: Farklılık Oranı (Jaccard Uzaklığı), Tüm P.: Tüm Primerler).

	LTR – 2		LTR – 3		LTR – 4		LTR – 5	
	Ben.	Fark.	Ben.	Fark.	Ben.	Fark.	Ben.	Fark.
P. vera	0.817	0.183	0.858	0.142	0.846	0.154	0.735	0.265
P. mutica	0.777	0.223	0.944	0.056	0.869	0.131	0.900	0.100
P. khinjuk	0.734	0.266	0.700	0.300	0.815	0.185	0.800	0.200
P. terebinthus	0.736	0.264	0.763	0.237	0.556	0.444	0.824	0.176
P. atlantica	1.000	0.000	0.954	0.046	0.760	0.240	0.912	0.088
P. palaestina	0.868	0.132	0.864	0.136	0.762	0.238	0.914	0.086
P. lentiscus	0.680	0.320	0.695	0.305	0.614	0.386	0.967	0.033
Ortalama	0.802	0.198	0.826	0.174	0.746	0.254	0.865	0.135
	LTR – 6		LTR – 7		LTR – 10		Tüm P.	
	Ben.	Fark.	Ben.	Fark.	Ben.	Fark.	Ben.	Fark.
P. vera	0.908	0.092	0.711	0.289	0.805	0.195	0.820	0.180
P. mutica	0.907	0.093	0.749	0.251	0.825	0.175	0.852	0.148
P. khinjuk	0.806	0.194	0.776	0.224	0.840	0.160	0.770	0.230
P. terebinthus	0.816	0.184	0.900	0.100	0.779	0.221	0.757	0.243
P. atlantica	0.945	0.055	1.000	0.000	0.850	0.150	0.917	0.083
P. palaestina	0.810	0.190	0.933	0.067	0.673	0.327	0.823	0.177
P. lentiscus	0.363	0.637	0.900	0.100	0.425	0.575	0.659	0.341
Ortalama	0.794	0.206	0.853	0.147	0.742	0.258	0.800	0.200

Tablo 3.31: 7 farklı primer kullanılarak yapılan IRAP PCR sonunda, türler arasındaki benzerlik ve farklılık oranları. Tablo oluşturulurken, benzerlik matrisi kullanılmış ve tür içi benzerlik oranlarının ortalaması alınmıştır. (Ben.:Benzerlik Oranı, Fark.: Farklılık Oranı (Jaccard Uzaklığı), Pol (Türler arası polimorfizmden Tür içi polimorfizm çıkartılarak elde edilen polimorfizm oranı. Bütün P.: Bütün Primerler)

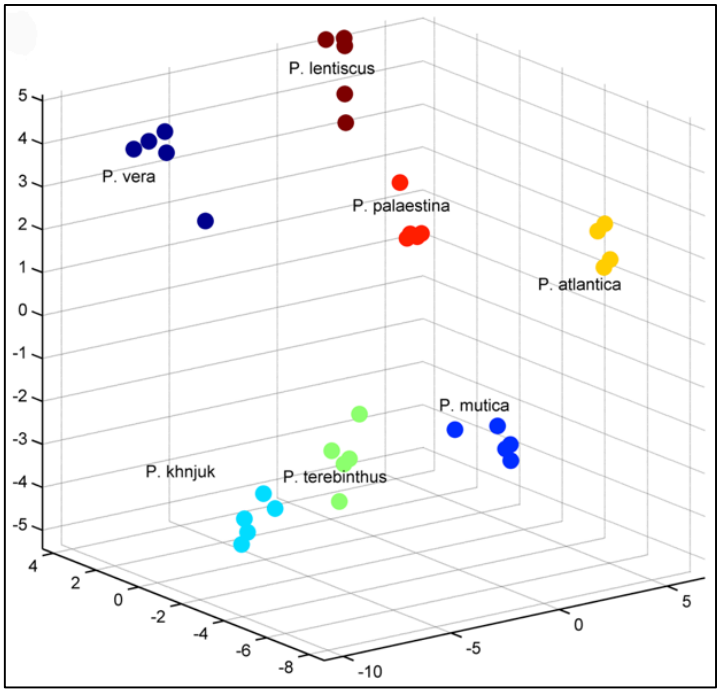
	IRAP – 2		IRAP – 3		IRAP – 4		IRAP – 5		IRAP – 6		IRAP – 7		IRAP – 10		Bütün P.	
	Ben.	Fark.	Ben.	Fark.	Ben.	Fark.	Ben.	Fark.	Ben.	Fark.	Ben.	Fark.	Ben.	Fark.	Ben.	Fark.
PV-PM	0.454	0.546	0.587	0.413	0.341	0.659	0.427	0.573	0.432	0.568	0.616	0.384	0.572	0.428	0.486	0.514
PV-PK	0.634	0.366	0.419	0.581	0.351	0.649	0.455	0.545	0.685	0.315	0.636	0.364	0.548	0.452	0.511	0.489
PV-PT	0.521	0.479	0.339	0.661	0.287	0.713	0.374	0.626	0.549	0.451	0.632	0.368	0.438	0.562	0.429	0.571
PV-PA	0.361	0.639	0.304	0.696	0.208	0.792	0.476	0.524	0.569	0.431	0.672	0.328	0.399	0.601	0.392	0.608
PV-PP	0.294	0.706	0.352	0.648	0.235	0.765	0.390	0.610	0.532	0.468	0.725	0.275	0.379	0.621	0.377	0.623
PV-PL	0.440	0.560	0.221	0.779	0.279	0.721	0.366	0.634	0.368	0.632	0.526	0.474	0.285	0.715	0.335	0.665
PM-PK	0.450	0.550	0.469	0.531	0.555	0.445	0.341	0.659	0.455	0.545	0.656	0.344	0.524	0.476	0.488	0.512
PM-PT	0.461	0.539	0.343	0.657	0.302	0.698	0.597	0.403	0.489	0.511	0.730	0.270	0.448	0.552	0.459	0.541
PM-PA	0.654	0.346	0.307	0.693	0.408	0.592	0.694	0.306	0.733	0.267	0.809	0.191	0.534	0.466	0.555	0.445
PM-PP	0.414	0.586	0.261	0.739	0.295	0.705	0.521	0.479	0.428	0.572	0.611	0.389	0.414	0.586	0.400	0.600
PM-PL	0.309	0.691	0.225	0.775	0.264	0.736	0.530	0.470	0.310	0.690	0.438	0.562	0.269	0.731	0.324	0.676
PK-PT	0.587	0.413	0.491	0.509	0.476	0.524	0.413	0.587	0.707	0.293	0.836	0.164	0.514	0.486	0.559	0.441
PK-PA	0.381	0.619	0.225	0.775	0.253	0.747	0.391	0.609	0.572	0.428	0.794	0.206	0.471	0.529	0.413	0.587
PK-PP	0.276	0.724	0.243	0.757	0.413	0.587	0.429	0.571	0.559	0.441	0.748	0.252	0.490	0.510	0.422	0.578
PK-PL	0.401	0.599	0.192	0.808	0.267	0.733	0.453	0.547	0.424	0.576	0.530	0.470	0.340	0.660	0.358	0.642
PT-PA	0.392	0.608	0.315	0.685	0.171	0.829	0.668	0.332	0.573	0.427	0.912	0.088	0.543	0.457	0.479	0.521
PT-PP	0.379	0.621	0.437	0.563	0.382	0.618	0.801	0.199	0.496	0.504	0.721	0.279	0.543	0.457	0.520	0.480
PT-PL	0.418	0.582	0.247	0.753	0.333	0.667	0.745	0.255	0.395	0.605	0.523	0.477	0.344	0.656	0.423	0.577
PA-PP	0.535	0.465	0.286	0.714	0.320	0.680	0.529	0.471	0.549	0.451	0.703	0.297	0.504	0.496	0.474	0.526
PA-PL	0.304	0.696	0.241	0.759	0.354	0.646	0.624	0.376	0.290	0.710	0.509	0.491	0.313	0.687	0.368	0.632
PP-PL	0.248	0.752	0.230	0.770	0.395	0.605	0.738	0.262	0.338	0.662	0.669	0.331	0.370	0.630	0.405	0.595
Ortalama	0.424	0.576	0.321	0.679	0.328	0.672	0.522	0.478	0.498	0.502	0.666	0.334	0.440	0.560	0.437	0.563

Oluşturulan filogenetik ağaç incelendiğinde ise *Pistacia* türlerinin 3 gruba ayrıldığı görülmüştür (Şekil 3.37): (i) %48 yineleme oranı ile *P. vera-P. khinjuk-P. mutica-P. atlantica*, (ii) %100 yineleme oranı ile *P. terebinthus*, (iii) %59 yineleme oranı ile *P. palaestina-P. lentiscus*. Ayrıca ilk grubun %50 yineleme oranı ile *P. vera-P. khinjuk* ve %74 yineleme oranı ile *P. mutica-P. atlantica* olarak iki alt gruba ayrıldığı tespit edilmiştir.



Şekil 3.37: Akdeniz' e özgü *Pistacia* türlerinin, IRAP belirteç sistemi kullanılarak gruplandığı filogenetik ağaç. Yineleme oranları ağacın kollarında belirtilmiştir(PV: *P. vera*, PM: *P. mutica*, PA: *P. atlantica*, PT: *P. terebinthus*, PP: *P. palaestina*, PL: *P. lentiscus)*.

PCA grafiği türleri oldukça başarılı bir şekilde ayırabilmiştir (Şekil 3.38). Her ne kadar, *P. lentiscus* diğer türlerden ayrı bir konumda yer alsa da, *P. palaestina* ile yakın bir ilişki içerisindedir ve bu gruba en yakın tür ise *P. terebinthus* olmuştur. Filogenetik ağaçta birbirlerinden ayrı şekilde kümelenen *P. vera* ve *P. khinjuk* türleri ise PCA grafiğinde nispeten yakın konumlanmışlardır. Tam tersi olarak filogenetik ağaçta aynı kümede yer alan *P. mutica* ve *P. atlantica* türleri ise PCA grafiğinde uzak şekilde gruplanmışlardır.



Şekil 3.38: IRAP belirteç sistemi verileri kullanılarak yapılan PCA sonucunda Akdeniz' e özgü *Pistacia* türlerinin gruplanması.

5.4.3. Türlerin REMAP Belirteç Sistemi ile İncelemesi

REMAP belirteç sistemi ile yapılan analizler sonucunda toplamda 125 bant elde edilmiştir. Bu bantların 116' sı polimorfizm göstermiştir (%92,8 ortalama polimorfizm). En fazla polimorfizm gösteren primer seti REMAP-11 olmuştur (%100). En düşük polimorfizm ise REMAP-6' da görülmüştür (%62,5). Primer setlerinin ortalama PIC değeri 0,318 olarak belirlenmiştir. PIC değerlerine göre en fazla polimorfizm gösteren primer seti REMAP-3 olurken, en düşük polimorfizm REMAP-13' de belirlenmiştir (0,263) (Tablo 3.32).

Tür içi ve türler arası Jaccard benzerlik ve uzaklık katsayılarının hesaplanması ile elde edilen sonuçlara göre en fazla benzerlik gösteren primer kombinasyonu REMAP-9 olurken, REMAP-3 kombinasyonu en fazla farklılık değerine sahip olmuştur (Tablo 3.33).

Tablo 3.32: REMAP belirteç sistemi ile elde edilen sonuçların değerlendirilmesi (BP: Bant profili, PM: Polimorfik bant, TB: Toplam bant, POL: Polimorfizm oranı, PIC: Polimorfizm bilgi içeriği).

	BP (bç)	PB	TB	POL (%)	PIC*
REMAP-3	1125-350	18	19	94,7	0,388
REMAP-6	1500-200	5	8	62,5	0,268
REMAP-7	1200-250	12	13	92,3	0,351
REMAP-9	1900-150	23	24	95,8	0,279
REMAP-10	1600-175	12	13	92,3	0,310
REMAP-11	850-150	19	19	100	0,359
REMAP-13	1475-150	15	16	93,7	0,263
REMAP-14	900-250	12	13	92,3	0,329
Toplam	**-**	**116**	**125**		
Ortalama				**92,8**	**0,318**

P. lentiscus (0,434), en az tür içi polimorfizm gösteren tür ise *P. vera* (0,163) olarak tespit edilmiştir (Tablo 3.34). Tür arası benzerlik katsayıları incelendiğinde ise *P. khinjuk* ve *P. terebinthus* tür çiftinin en fazla benzerliği (0,658) gösterdiği tespit edilmiştir. Bu tür çiftini ise, *P. terebinthus*-*P. atlantica* (0,651) ve *P. palaestina*-*P. atlantica* (0,624) tür çiftleri takip etmiştir.

Tablo 3.33: 8 farklı primer kombinasyonu kullanılarak yapılan REMAP PCR sonunda, tür içindeki benzerlik ve farklılık oranları. Tablo oluşturulurken, benzerlik matrisi kullanılmış ve tür içi benzerlik oranlarının ortalaması alınmıştır(Ben.: Benzerlik Oranı, Fark.: Farklılık Oranı (Jaccard Uzaklığı), Tüm P.: Tüm Primerler).

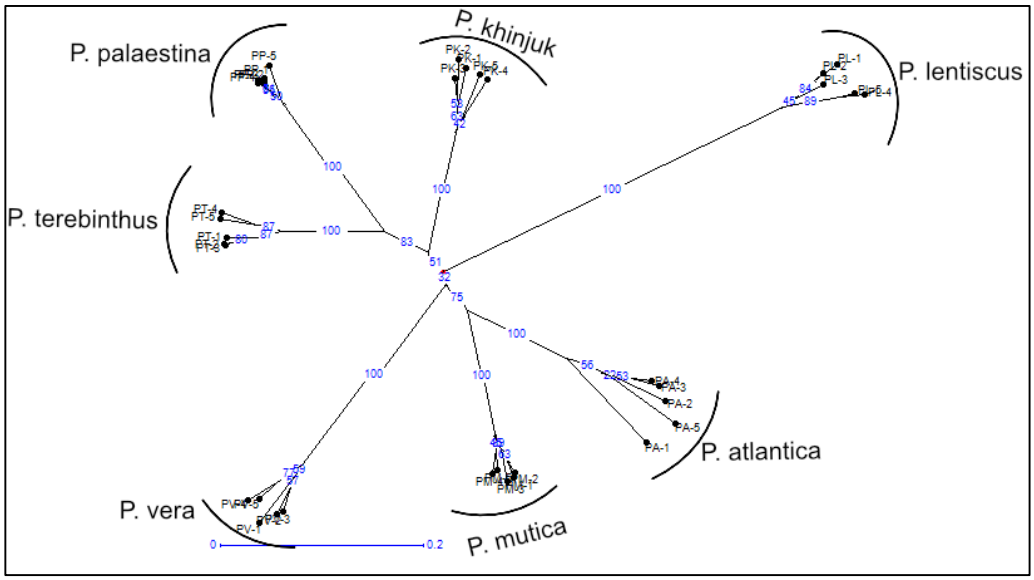
	REMAP-3		REMAP-6		REMAP-7		REMAP-9	
	Ben.	Fark.	Ben.	Fark.	Ben.	Fark.	Ben.	Fark.
P. vera	0,893	0,107	0,733	0,267	0,811	0,189	1,000	0,000
P. mutica	0,964	0,036	0,914	0,086	1,000	0,000	1,000	0,000
P. khinjuk	0,615	0,385	0,867	0,133	0,817	0,183	0,956	0,044
P. terebinthus	0,887	0,113	0,900	0,100	0,956	0,044	1,000	0,000
P. atlantica	0,684	0,316	0,790	0,210	0,858	0,142	1,000	0,000
P. palaestina	0,842	0,158	1,000	0,000	0,893	0,107	1,000	0,000
P. lentiscus	0,925	0,075	1,000	0,000	0,600	0,400	1,000	0,000
Ortalama	0,830	0,170	0,886	0,114	0,848	0,152	0,994	0,006

	REMAP-10		REMAP-11		REMAP-13		REMAP-14		Tüm. P.	
	Ben.	Fark.	Ben.	Fark.	Ben.	Fark.	Ben.	Fark.	Ben.	Fark.
P. vera	0,916	0,084	1,000	0,000	0,925	0,075	0,868	0,132	0,837	0,163
P. mutica	0,811	0,189	0,956	0,044	0,925	0,075	0,925	0,075	0,692	0,308
P. khinjuk	0,950	0,050	1,000	0,000	0,943	0,057	0,911	0,089	0,706	0,294
P. terebinthus	0,795	0,205	0,925	0,075	0,875	0,125	0,940	0,060	0,751	0,249
P. atlantica	0,673	0,327	1,000	0,000	1,000	0,000	0,878	0,122	0,660	0,340
P. palaestina	1,000	0,000	1,000	0,000	0,967	0,033	0,950	0,050	0,660	0,341
P. lentiscus	0,886	0,114	0,914	0,086	0,667	0,333	0,900	0,100	0,566	0,434
Ortalama	0,862	0,138	0,971	0,029	0,900	0,100	0,910	0,090	0,696	0,304

Oluşturulan filogenetik ağaç incelendiğinde ise *Pistacia* türlerinin 3 gruba ayrıldığı görülmüştür (Şekil 3.39): (i) %32 yineleme oranı ile *P. vera*-*P. mutica*-*P. atlantica*, (ii) %51 yineleme oranı ile *P. terebinthus*-*P. palaestina*-*P. khinjuk*, (iii)

%100 yineleme oranı ile *P. lentiscus*. Ayrıca ilk grubun %100 yineleme oranı ile *P. vera* ve %75 yineleme oranı ile *P. mutica-P. atlantica* olarak iki alt gruba ayrıldığı tespit edilmiştir.

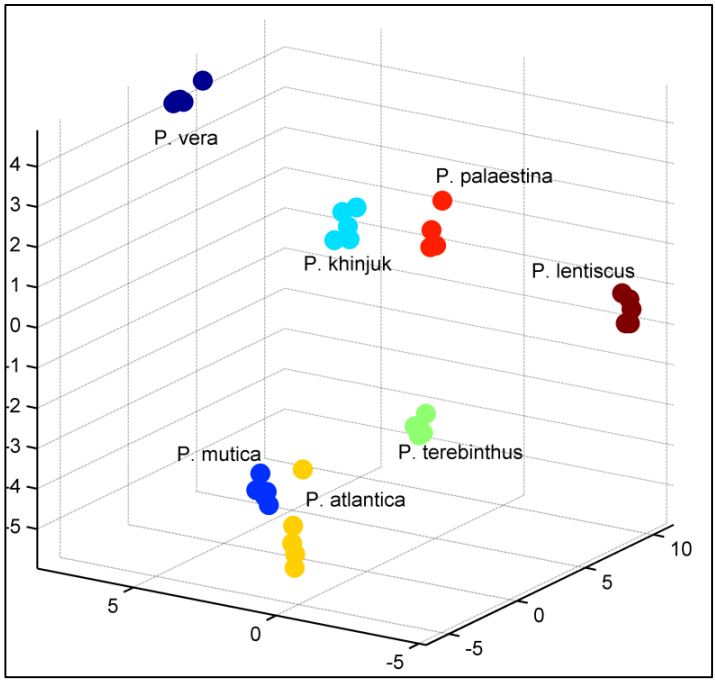
REMAP belirteç sistemi sonucunda elde edilen PCA grafiklerinde ise 4 grup göze çarpmaktadır: (i) *P. vera,* (ii) *P. khinjuk-P. palaestina,* (iii) *P. mutica-P. atlantica-P. terebinthus,* (iv) *P. lentiscus* (Şekil 3.40).



Şekil 3.39: Akdeniz' e özgü *Pistacia* türlerinin, REMAP belirteç sistemi kullanılarak gruplandığı filogenetik ağaç. Yineleme oranları ağacın kollarında belirtilmiştir PV: *P.vera*, PM: *P. mutica*, PA: *P. atlantica*, PT: *P. terebinthus*, PP: *P. palaestina*, PL: *P. lentiscus)*.

Tablo 3.34: 8 farklı primer kombinasyonu kullanılarak yapılan REMAP PCR sonunda, türler arasındaki benzerlik ve farklılık oranları. Tablo oluşturulurken, benzerlik matrisi kullanılmış ve tür içi benzerlik oranlarının ortalaması alınmıştır. (Ben.:Benzerlik Oranı, Fark.: Farklılık Oranı (Jaccard Uzaklığı), Pol (Türler arası polimorfizmden Tür içi polimorfizm çıkartılarak elde edilen polimorfizm oranı. Bütün P.: Bütün Primerler)

	REMAP-3		REMAP-6		REMAP-7		REMAP-9		REMAP-10		REMAP-11		REMAP-13		REMAP-14		**Tüm. P.**	
	Ben.	Fark.	Ben.	Fark.	Ben.	Fark.	Ben.	Fark.	Ben.	Fark.	Ben.	Fark.	Ben.	Fark.	**Ben.**	**Fark.**		
PV-PM	0,541	0,459	0,462	0,538	0,717	0,283	0,455	0,545	0,610	0,390	0,400	0,600	0,585	0,415	0,423	0,577	0,583	0,417
PV-PK	0,205	0,795	0,629	0,371	0,743	0,257	0,391	0,609	0,770	0,230	0,500	0,500	0,535	0,465	0,482	0,518	0,516	0,484
PV-PT	0,289	0,711	0,536	0,464	0,542	0,458	0,462	0,538	0,543	0,457	0,295	0,705	0,445	0,555	0,287	0,713	0,445	0,555
PV-PA	0,324	0,676	0,509	0,491	0,584	0,416	0,333	0,667	0,470	0,530	0,364	0,636	0,560	0,440	0,545	0,455	0,403	0,597
PV-PP	0,199	0,801	0,626	0,374	0,531	0,469	0,375	0,625	0,593	0,407	0,400	0,600	0,363	0,637	0,554	0,446	0,398	0,602
PV-PL	0,405	0,595	0,472	0,528	0,178	0,822	0,105	0,895	0,510	0,490	0,137	0,863	0,379	0,621	0,491	0,509	0,347	0,653
PM-PK	0,180	0,820	0,543	0,457	0,667	0,333	0,580	0,420	0,668	0,332	0,473	0,527	0,800	0,200	0,632	0,368	0,634	0,366
PM-PT	0,459	0,541	0,743	0,257	0,709	0,291	0,700	0,300	0,621	0,379	0,437	0,563	0,667	0,333	0,617	0,383	0,518	0,482
PM-PA	0,554	0,446	0,684	0,316	0,686	0,314	0,750	0,250	0,441	0,559	0,435	0,565	0,817	0,183	0,645	0,355	0,496	0,504
PM-PP	0,332	0,668	0,629	0,371	0,662	0,338	0,429	0,571	0,536	0,464	0,600	0,400	0,483	0,517	0,639	0,361	0,510	0,490
PM-PL	0,334	0,666	0,771	0,229	0,149	0,851	0,267	0,733	0,467	0,533	0,088	0,912	0,379	0,621	0,328	0,672	0,401	0,599
PK-PT	0,283	0,717	0,684	0,316	0,599	0,401	0,880	0,120	0,564	0,436	0,560	0,440	0,784	0,216	0,580	0,420	0,658	0,342
PK-PA	0,162	0,838	0,692	0,308	0,614	0,386	0,580	0,420	0,478	0,522	0,300	0,700	0,645	0,355	0,858	0,142	0,582	0,418
PK-PP	0,336	0,664	0,740	0,260	0,587	0,413	0,580	0,420	0,791	0,209	0,462	0,538	0,500	0,500	0,743	0,257	0,575	0,425
PK-PL	0,234	0,766	0,532	0,468	0,212	0,788	0,300	0,700	0,500	0,500	0,259	0,741	0,419	0,581	0,427	0,573	0,458	0,542
PT-PA	0,429	0,571	0,569	0,431	0,672	0,328	0,545	0,455	0,525	0,475	0,466	0,534	0,540	0,460	0,534	0,466	0,651	0,349
PT-PP	0,562	0,438	0,747	0,253	0,919	0,081	0,643	0,357	0,667	0,333	0,550	0,450	0,550	0,450	0,668	0,332	0,555	0,445
PT-PL	0,253	0,747	0,785	0,215	0,154	0,846	0,294	0,706	0,709	0,291	0,165	0,835	0,325	0,675	0,346	0,654	0,508	0,492
PA-PP	0,307	0,693	0,673	0,327	0,637	0,363	0,333	0,667	0,426	0,574	0,231	0,769	0,574	0,426	0,740	0,260	0,624	0,376
PA-PL	0,353	0,647	0,489	0,511	0,147	0,853	0,267	0,733	0,598	0,402	0,000	1,000	0,361	0,639	0,444	0,556	0,477	0,523
PP-PL	0,149	0,851	0,667	0,333	0,143	0,857	0,250	0,750	0,560	0,440	0,206	0,794	0,265	0,735	0,467	0,533	0,522	0,478
Ortalama	0,328	0,672	0,628	0,372	0,517	0,483	0,453	0,547	0,574	0,426	0,349	0,651	0,523	0,477	0,523	0,477	0,517	0,483



Şekil 3.40: REMAP belirteç sistemi verileri kullanılarak yapılan PCA sonucunda Akdeniz' e özgü *Pistacia* türlerinin gruplanması.

5.4.4. Türlerin Birleştirilmiş Belirteç Sistemleri ile İncelenmesi

Tüm belirteç sistemleri birlikte kullanılarak analiz yapıldığında en yakın tür çiftleri *P. vera-P. khinjuk* (0,587), *P. atlantica-P. mutica* (0,540) ve *P. khinjuk-P. terebinthus* (0,564) olmuştur (Tablo 3.35).

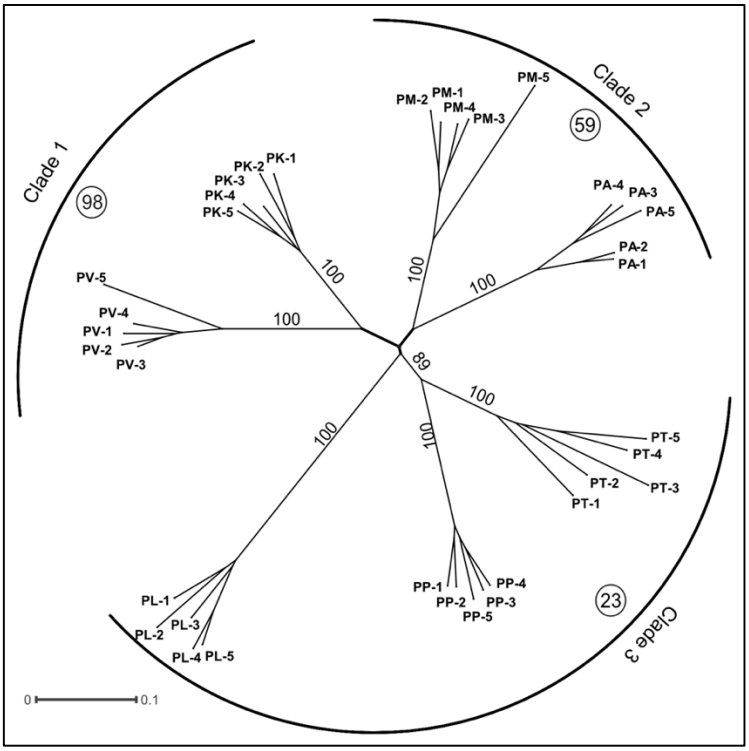
Ayrıca çalışmalar sonucunda tür içi varyasyonların da oluştuğu görülmüştür. *P. vera* en düşük tür içi varyasyonu gösterirken, *P. lentiscus* en yüksek varyasyonu göstermiştir.

Oluşturulan filogenetik ağaçlar incelendiğinde türlerin 3 gruba ayrıldığı görülmüştür (Şekil 3.41): (i) %98 yineleme oranı ile *P. vera-P. khinjuk*, (ii) %59 yineleme oranı ile *P. atlantica-P. mutica*, (iii) %23 yineleme oranı ile *P. terebinthus-P. palaestina-P. lentiscus*

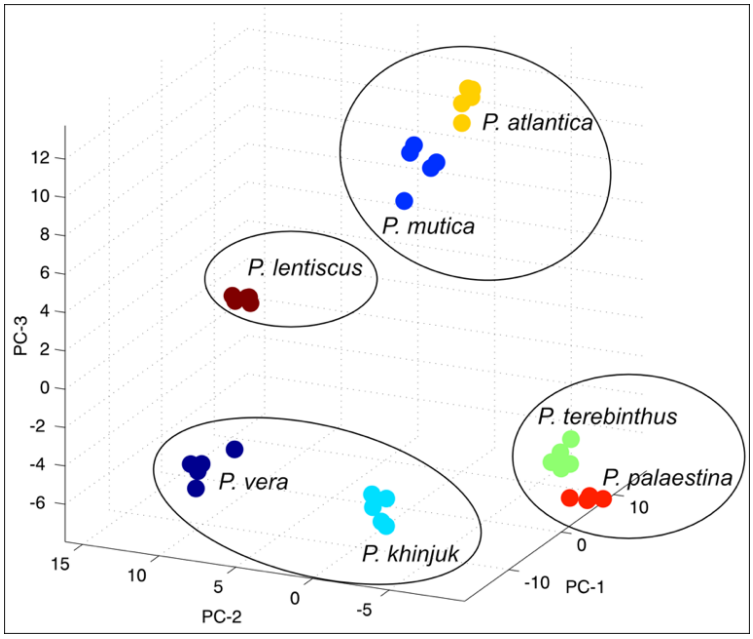
Bütün belirteç sistemleri birleştirilerek oluşturulan PCA grafiğinde ise, iPBS belirteç sistemine benzer bir görünüm ortaya çıkmıştır (Şekil 3.42): (i) *P. vera – P. khinjuk*, (ii) *P. atlantica – P. mutica*, (iii) *P. palaestina – P. terebinthus* ve (iv) *P. lentiscus*

Tablo 3.35: Tez kapsamında kullanılan retrotranspozon temelli 3 farklı belirteç sistemi birleştirildiğinde elde edilen benzerlik matrisi.

Türler	*P. vera*	*P. mutica*	*P. khinjuk*	*P. terebinthus*	*P. atlantica*	*P. palaestina*	*P. lentiscus*
P. vera	0.855						
P. mutica	0.512	0.797					
P. khinjuk	0.587	0.538	0.860				
P. terebinthus	0.439	0.491	0.564	0.767			
P. atlantica	0.449	0.540	0.503	0.490	0.846		
P. palaestina	0.452	0.476	0.532	0.532	0.497	0.878	
P. lentiscus	0.368	0.370	0.414	0.414	0.415	0.414	0.841



Şekil 3.41: Akdeniz' e özgü *Pistacia* türlerinin, birleştirilmiş belirteç sistemi verisi kullanılarak gruplandığı filogenetik ağaç. Yineleme oranları ağacın kollarında belirtilmiştir (PV: *P. vera*, PM: *P. mutica*, PA: *P. atlantica*, PT: *P. terebinthus*, PP: *P. palaestina*, PL: *P. lentiscus)*.



Şekil 3.42: Birleştirilmiş belirteç sistemi verileri kullanılarak yapılan PCA sonucunda Akdeniz' e özgü *Pistacia* türlerinin gruplanması.

5.5. Farklı Gelişim Evresine ait Örneklerdeki Retrotranspozon Profilleri

Farklı gelişme evrelerindeki örnekler hem kendi içlerinde hem de gruplar arasında incelendiğinde, benzerlik oranlarının oldukça yüksek olduğu görülmektedir (Tablo 3.36-Tablo 3.37). Embriyo örnekleri iPBS belirteç sisteminde tamamen eş bir retrotranspozon profili gösterirken, IRAP belirteç sisteminde neredeyse benzerdir (1-0,955). Gövde örnekleri hem iPBS hem de IRAP belirteç sistemlerinde en yüksek oranda polimorfizmi göstermiştir (0,137-0,159). REMAP belirteç sisteminde ise kök örnekleri en fazla benzerlik oranına sahipken (0,973), *P. vera* örneklerinde benzerlik oranı çok düşük çıkmıştır (0,797).

Bütün belirteç sistemleri ile elde edilen sonuçlara bakıldığında ise en yüksek benzerlik oranı embriyo örneklerinde (0,970) görülürken en düşük benzerlik oranı ise gövde (0,887) örneklerindedir (Tablo 3.37).

Örneklerin birbirleri aralarındaki benzerlik oranları incelendiğinde en fazla benzerliğin gövde ve kök örneklerinde (REMAP, 0,925) olduğu görülmüştür (Tablo 3.36). En düşük benzerlik değeri ise embriyo ile *P. vera* örnekleri arasında olduğu belirlenmiştir (REMAP, 0,489). Bütün belirteç sistemleri kullanılarak yapılan benzerlik tabloları incelendiğinde ise, birbirlerine en benzeyen örneklerin gövde ve kök olduğu (0,907) görülmektedir. Embriyo ve *P. vera* örnekleri ise yine birbirlerinden en farklı olarak tespit edilen örneklerdir (0,693).

Benzerlik matrisleri sonunda oluşturulan dendogram incelendiğinde ise, her iki belirteç sisteminde de embriyo ve *in vitro* gövdelerin kendi aralarında gruplandıkları göze çarpmaktadır. Ancak gövde ve kök örnekleri diğer iki örnekten farklı olarak birlikte gruplanmaktadır (Şekil 3.43).

Bütün belirteç sistemleri kullanılarak oluşturulan PCA grafiğinde ise gövde, kök ve *in vitro* bitkicik örneklerinin çok yakın gruplandıkları, ancak embriyo örneklerinin ise bu gruptan ayrıldığı görülebilmektedir (Şekil 3.44).

Tablo 3.36: Farklı gelişme evrelerindeki bitki parçalarının birbirlerine olan benzerlik değerlerini iPBS, IRAP ve REMAP primer setlerine göre gösteren benzerlik Tabloleri (E: Embriyo, G: Gövde, K: Kök, PV: *P. vera*).

iPBS Belirteç Sistemi								
	E-1	E-2	G-1	G-2	K-1	K-2	PV-1	PV-2
E-1	1,000							
E-2	1,000	1,000						
G-1	0,849	0,849	1,000					
G-2	0,755	0,755	0,863	1,000				
K-1	0,736	0,736	0,880	0,978	1,000			
K-2	0,811	0,811	0,922	0,898	0,878	1,000		
PV-1	0,759	0,759	0,830	0,736	0,717	0,827	1,000	
PV-2	0,815	0,815	0,887	0,792	0,774	0,885	0,940	1,000

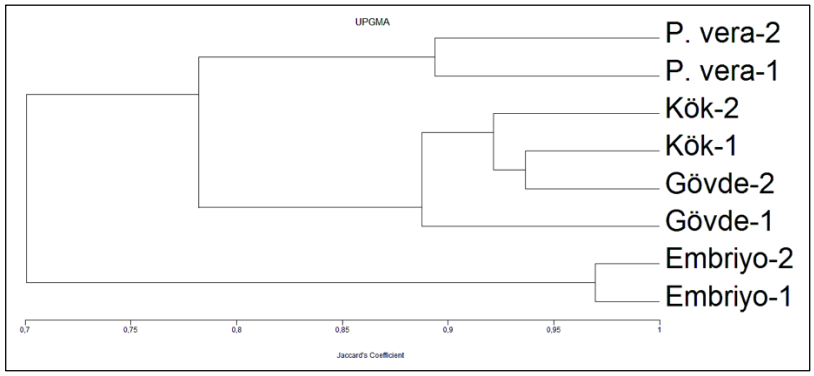
IRAP Belirteç Sistemi								
	E-1	E-2	G-1	G-2	K-1	K-2	PV-1	PV-2
E-1	1							
E-2	0,955	1						
G-1	0,809	0,818	1					
G-2	0,841	0,851	0,841	1				
K-1	0,812	0,821	0,839	0,934	1			
K-2	0,824	0,833	0,794	0,918	0,917	1		
PV-1	0,809	0,818	0,778	0,813	0,839	0,823	1	
PV-2	0,794	0,803	0,762	0,797	0,823	0,806	0,947	1

REMAP Belirteç Sistemi								
	E-1	E-2	G-1	G-2	K-1	K-2	PV-1	PV-2
E-1	1							
E-2	0.951	1						
G-1	0.542	0.542	1					
G-2	0.5	0.5	0.931	1				
K-1	0.507	0.507	0.946	0.905	1			
K-2	0.5	0.5	0.919	0.931	0.973	1		
PV-1	0.5	0.5	0.693	0.699	0.72	0.716	1	
PV-2	0.478	0.478	0.733	0.764	0.784	0.781	0.797	1

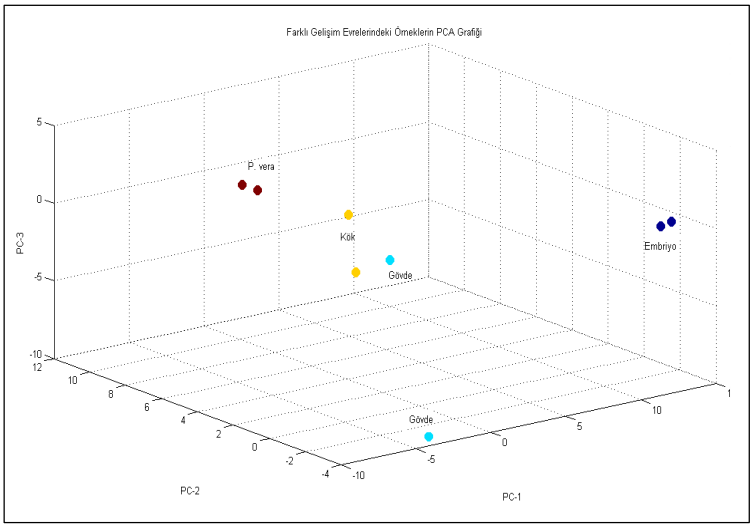
Bütün Belirteç Sistemleri								
	E-1	E-2	G-1	G-2	K-1	K-2	PV-1	PV-2
E-1	1							
E-2	0.97	1						
G-1	0.728	0.73	1					
G-2	0.7	0.701	0.887	1				
K-1	0.684	0.686	0.897	0.937	1			
K-2	0.701	0.703	0.878	0.916	0.927	1		
PV-1	0.692	0.694	0.765	0.754	0.764	0.782	1	
PV-2	0.692	0.694	0.79	0.788	0.798	0.816	0.894	1

Tablo 3.37: Farklı gelişme evrelerindeki bitki parçalarının birbirlerine olan ortalama benzerlik değerlerini iPBS, IRAP, REMAP ve bütün belirteç sistemlerine göre gösteren benzerlik Tabloleri.

iPBS Belirteç Sistemi				
	Embriyo	Gövde	Kök	*P. vera*
Embriyo	1,000			
Gövde	0,815	0,883		
Kök	0,782	0,923	0,879	
P. vera	0,786	0,823	0,805	0,948
IRAP Belirteç Sistemi				
	Embriyo	Gövde	Kök	*P. vera*
Embriyo	0,955			
Gövde	0,830	0,841		
Kök	0,823	0,871	0,917	
P. vera	0,806	0,788	0,823	0,947
REMAP Belirteç Sistemi				
	Embriyo	Gövde	Kök	*P. vera*
Embriyo	0,951			
Gövde	0,504	0,931		
Kök	0,504	0,925	0,973	
P. vera	0,489	0,722	0,750	0,797
Bütün Belirteç Sistemleri				
	Embriyo	Gövde	Kök	*P. vera*
Embriyo	0,970			
Gövde	0,693	0,887		
Kök	0,694	0,907	0,927	
P. vera	0,693	0,774	0,790	0,894



Şekil 3.43: Farklı gelişim evrelerindeki örneklerin birleştirilmiş belirteç sistemleri ile incelenmesi.

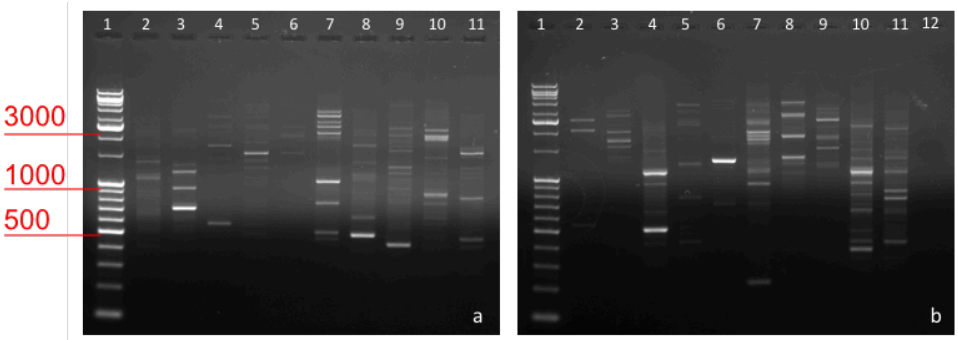


Şekil 3.44: Farklı gelişim evrelerine ait bütün belirteç sistemleri ile incelenmesi sonucu oluşturulmuş PCA grafiği.

5.6. *Pistacia* Cinsine Özgü Retrotranspozon Dizilerinin Karakterize edilmesi

5.6.1. PCR, Saflaştırılması ve Fosforilasyon Sonuçları

P. vera bitkisinde iPBS PCR sonucunda elde edilen bant profillerine ait jel görüntüleri Şekil 3.45' de gösterilmiştir. Saflaştırma, Na-Asetat çöktürmesi ve fosforilasyon basamaklarından sonra elde edilen DNA' ların spektrofotometrik ölçümleri Tablo 3.38' de verilmiştir.



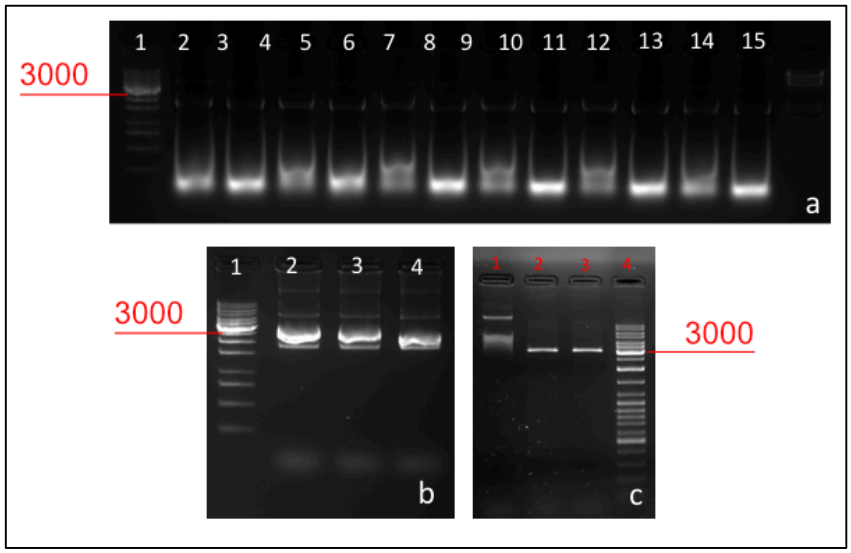
Şekil 3.45: *P. vera* bitkisinde iPBS PCR sonucunda elde edilen bant profiline ait jel görüntüsü. (A) 1- DNA belirteci (1 kb + 100 bp), 2-11: iPBS 1-10 (B) 1- DNA belirteci (1 kb + 100 bp), 2-11: iPBS 1-10, 12: Negatif kontrol (B).

Tablo 3.38: *P. vera* bitkisinde iPBS PCR sonucunda elde edilen bantların saflaştırma, Na-Asetat çöktürmesi ve Fosforliasyon basamakları sonrası elde edilen DNA konsantrasyonları.

	DNA miktarı (ng/µl)	A_{260}/A_{280}
PCR Saflaştırma Sonrası	64,07	1,85
Na-Asetat Çöktürmesi	205,39	1,86
Fosforilasyon Basamağı Ardından, 1. Örnek	93,65	1,81
Fosforilasyon Basamağı Ardından, 2. Örnek	129,12	1,84

5.6.2. Plazmit Saflaştırma, Kesim ve Defosforliasyon Basamakları

Transformasyon aşaması ardından pGEM 5Zf(+) vektörü aktarılan *E. coli* JM109 hücrelerinden yapılan plazmit izolasyonlarına ve restriksiyon kesimlerine ait jel görüntüleri Şekil 3.46' de verilmiştir. Saflaştırma ve kesim basamaklarını ardından yapılan spektrofotometrik ölçümler ise Tablo 3.39' de verilmiştir.



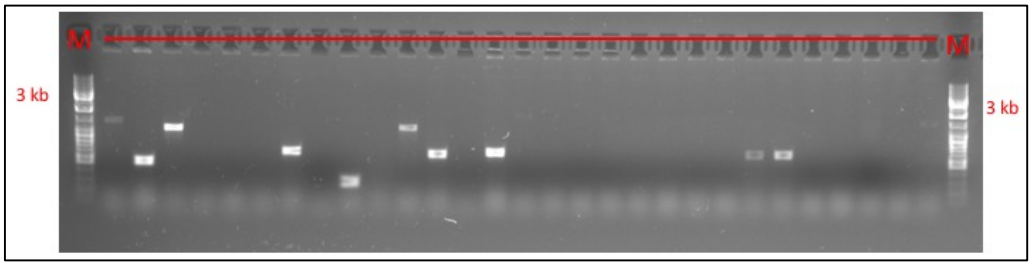
Şekil 3.46: Plazmit izolasyonları; 1: Lambda/HindIII belirteci, 2-13: Plazmit izolasyonları (A), RNAz-A uygulaması; 1: 1kb DNA belirteci, 2-4: RNAz uygulanan plazmitler (B), Restriksiyon Kesimi 1: Kesilmemiş plazmit, 2-3: Kesilmiş plazmit, 4: 1 kb DNA belirteci (C) ardından elde edilen jel görüntüleri.

Tablo 3.39: Plazmit izolasyonu, RNAz-A ve fenol-kloroform basamaklarının ardından elde edilen DNA konsantrasyonları.

	Plazmit DNA miktarı (ng/µl)	A_{260}/A_{280}
Plazmit izolasyonu sonrası	3958,14	1,25
	3974,34	1,91
	3983,73	1,84
	3981,69	1,62
	3991,01	1,64
	3970,26	1,85
RNaz-A basamağının ardından	4000,28	1,58
	4003,79	1,56
	3995,34	1,77
Fenol-kloroform çöktürmesi	3965,49	1,00
EcoRV ile kesim	158,05	1,83
CIAP ile Defosforilasyon	82,96	1,92

5.6.3. Ligasyon Sonucunda Koloni PCR ile Elde Edilen Bulgular

Ligasyon ve transformasyon basamağı ardından 1 gece inkübasyon sonucunda 29 tane beyaz koloni elde edildiği gözlenmiştir. Bu kolonilerden M13 ileri ve geri primerleri kullanılarak yapılan Koloni PCR sonucunda ise sadece 10 tanesinin PCR ürünü içerdiği gözlenmiştir (Şekil 3.47).



Şekil 3.47: *E. coli* JM109 hücrelerine aktarılan ligasyon ürünlerinin M13 primeri ile gerçekleştirilen koloni PCR sonuçları (M: 1 kb DNA belirteci).

5.6.4. Dizileme Sonuçları

Pozitif kolonilerden dizilemeye gönderilen örneklerde gerek dizi kalitesinin gerekse elde edilen DNA uzunluklarının beklendiği kadar iyi olmadığı görülmüştür. Elde edilen dizilerin FAST-PCR programı ile LTR bölgeleri bakımından incelenmesi

sonucu dizilerin herhangi bir LTR bölgesi içermediği tespit edilmiştir (Tablo 3.40) (EK-D).

Tablo 3.40: Dizileme sonucunda elde edilen dizilerin uzunlukları

Dizi İsmi	Uzunluk (nükleotid)
S1	202
S2	938
S3	1027
S4	192
S5	753
S6	199
S7	473
S8	395
S9	222
S10	197

6. TARTIŞMA

6.1. Belirteç Sistemlerinin Gösterdiği Çeşitlilik Değerlerinin İncelenmesi

iPBS retrotranspozon belirteç sistemi, test edilen diğer belirteç sistemlerine oranla daha fazla lokus bilgisi (340 adet) sağlamıştır. Buna rağmen çalışmalar sonucunda kullanılan primer setleri için ortalama olarak %93 oranında polimorfizm elde edilmiştir. Ancak yine iPBS belirteç sistemi her test başına daha fazla polimorfik lokus ve aynı zamanda daha fazla lokus ayırt edebilmiştir (sırasıyla 35,44, 37,78). iPBS belirteç sisteminde kullanılan primerlerin hedeflediği PBS bölgeleri sadece retrotranspozonların değil, aynı zamanda diğer retroviral elementlerinde önemli özelliklerinden birisi olduğu için bu sonuçlar oldukça doğal olarak kabul edilebilir [Kalendar et al., 2010]. Toplam efektif allel, belirteç indeksi ve ayırma gücü indeksleri bakımından da iPBS sistemi en iyi sonuçları vermiştir. Bu sonuçlar iPBS sisteminin diğer belirteçlere oranla daha iyi ayırma gücü olduğunu ifade etmektedir.

Elde edilen sonuçlar daha önceki çalışmalarda kullanılan RAPD (%90,28, 96,35; sırayla Kafkas, 2006 ve Golan-Goldhirsh et al., 2004) ve AFLP (%93,27, Golan-Goldhirsh et al., 2004) belirteç sistemleri ile elde edilen sonuçlar ile uyumludur. Ancak; PIC değerlerinin (0,312-0,345) daha önceki çalışmalarda elde edilen sonuçlara oranla daha düşük olduğu görülmektedir (0,668 ve 0,780; sırayla Kafkas, 2006 ve Karimi et al., 2009). Ayrıca retrotranspozon temelli belirteç sistemleri ile elde edilen heterozigosite ve ayırma gücü daha önce yapılan çalışmalara göre daha yüksektir (Kafkas, 2006, Shanjani et al., 2009).

Literatürde daha önce RAPD ve AFLP belirteç sitemleri ile yapılan analizler yüksek oranda korelasyon gösterse de (0,941 ve 0,9; Katsiotis et al., 2003,Golan-Goldhirsh et al., 2004), bizim çalışmamızda elde edilen korelasyon değerleri literatür ile kıyaslandığında fazla yüksek değildir. Bu, retrotranspozonal belirteç sistemlerinin genomda farklı bölgeleri hedeflemesi yüzünden olabilir. Tüm belirteç sistemleri ile iPBS belirteç sisteminin gösterdiği yüksek orandaki korelasyon ise iPBS belirteç sisteminin diğer belirteç sistemlerine oranla daha fazla lokus, polimorfizm ve heterozigosite bilgisi sağlamasından kaynaklanmaktadır.

Ayrıca; literatür incelendiğinde *Pistacia* türlerinin retrotranspozonal belirteç sistemleri ile karakterizasyonuna ait bir tane IRAP çalışması bulunmaktadır. Ancak bu

çalışma da sadece üç farklı *Pistacia* türünü incelemiştir (*P. vera*, *P. khinjuk* ve *P. atlantica*) ve %89,6 polimorfizm oranı belirlemiştir [Ghaemmaghami et al., 2013].

Türler arasındaki benzerlikler incelendiğin de ise; iPBS belirteç sistemindeki en yakın tür çiftleri *P. vera-P. khinjuk* (0,633), *P. khinjuk-P. palaestina* (0,556) ve *P. palaestina-P. terebinthus* (0,556) olurken, diğer belirteç sistemlerinde farklı sonuçlar alınmıştır. IRAP belirteç sisteminde en yakın tür çiftleri *P. khinjuk-P. terebinthus* (0,559), *P. mutica-P. atlantica* (0,555) ve *P. vera-P. khinjuk* (0,551) olurken REMAP belirteç sisteminde *P. khinjuk-P. terebinthus* (0,658), *P. terebinthus-P. atlantica* (0,651) ve *P. mutica-P. khinjuk* (0,634) olmuştur.

6.2. Akdeniz' e Özgü *Pistacia* Türlerinde Filogenetik İlişkilerin İncelenmesi

Çalışma kapsamında edilen sonuçlar, *Pistacia* cinsinde daha önce ifade edilen gruplaşmalardan [Zohary 1952], [Katsiotis et al. 2003], [Golan-Goldhirsh et al. 2004], [Saghir, 2006], [Al-saghir and Porter 2012] daha çok dizileme çalışmaları [Xie et al., 2014, Yi et al., 2008] tarafından da desteklenen ağsı bir evrim örüntüsü içerdiğini göstermiştir. Belirteç sistemleri tekil olarak incelendiğinde her ne kadar farklı gruplaşmalar görülse de, bütün belirteç sistemlerinin sağladığı veriler analiz edildiğinde Akdeniz' e özgü *Pistacia* türlerinde 3 temel grubun varlığı göze çarpmaktadır: (i) %98 yineleme oranı ile *P. vera-P. khinjuk*, (ii) %59 yineleme oranı ile *P. atlantica-P. mutica*, (iii) %28 yineleme oranı ile *P. terebinthus-P. palaestina-P. lentiscus*

Gerek iPBS ve IRAP belirteç sistemlerinde gerekse de birleştirilmiş belirteç sistemi verisinde *P. vera* ve *P. khinjuk* tür çiftinin çok yakın bir ilişkide olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuç, daha önce RAPD [Golan-Goldhirsh et al., 2004, Kafkas and Perl -Treves, 2002] ve AFLP [Kafkas et al., 2006] belirteç sistemleri ile elde edilen sonuçlarla uyumludur. RAPD [Kafkas et al., 2006] verileri ile elde edilen uzlaşı ağaçlarında bu iki türün yüksek oranda birlikte kümelendiği görülmüştür (100 ağaçtan 87' sinde). Ayrıca kloroplast genomu restriksiyon analizlerine göre de *P. vera* ve *P khinjuk*' un birbirinden ayrılamadığı tespit edilmiştir [Parfitt and Badenes, 1997]. Nitrat redüktaz geni (NIA-i3), çekirdek ribozomal inter transkibal bölge (ITS) ve plastid genleri dizileri ile yapılan başka bir çalışmada ise, *P. vera* ve *P. khinjuk*' un moleküler düzeyde ayrılamadığı tespit görülmüştür [Yi et al., 2008].

P. vera, *P. khinjuk* ile sadece yayılım alanları değil (Afganistan, İran, Irak, Suriye, Filistin ve Mısır) aynı zamanda benzer morfolojik varyasyonlar da göstermektedir (*P. khinjuk* vejetatif formları, *P. vera*' dan zor ayırt edilebilmektedir). Bunun yanında bu iki tür; basit yapraklar, imparipinnat yapraklar, az sayıda yaprakçık, simetrik yapraklar, yuvarlak yaprakçık ayası, basit petiyol, yaprak dökümü ve büyük meyve gibi karakterler bakımından da benzerdir. Ancak *P. vera*, REMAP belirteç sistemlerinde *P. khinjuk*' tan ayrı bir grupta yer almıştır. RAPD [Kafkas and Perl - Treves, 2001] ve AFLP [Kafkas, 2006], [Karimi et al., 2009] belirteç sistemleri ile yapılan çalışmalarda da aynı örüntü gösterilmiştir. REMAP belirteç sisteminde *P. khinjuk* %51 yineleme oranı ile *P. palaestina* ve *P. terebinthus* ile gruplanmıştır.

P. atlantica ve *P. mutica* tür çifti de belirteç sistemlerine göre farklı gruplanma örüntüsü göstermiştir. Bu tür çiftçi, iPBS belirteç sisteminde ayrı grupta yer alsalar da, IRAP ve REMAP belirteç sistemlerinde birlikte gruplanma göstermişlerdir. Zohary, rakis kanadı karakteri bakımından *P. atlantica*' yı, Butmela olarak ayrı bir sınıfın içerisine koymuştur. Ancak Parfitt ve Badenes [1997] Butmela grubunun Terebinthus ile birleştirilmesini teklif etmiştir. Buna karşılık olarak, Golan-Goldhirsh et al., [2004], *P. atlantica*' nın ayrı bir grup olarak kümelendiğini ve Butmela sınıfının kolaylıkla kaldırılamayacağını belirtmiştir. AFLP belirteç sistemi ile yapılan çalışmalarda ise *P. atlantica* ve *P. mutica* türlerinin yüksek benzerlik oranları ile (0,76 – 0,69) birlikte gruplandığı tespit edilmiştir [Kafkas, 2006], [Karimi et al., 2009]. Bütün belirteç sistemleri birlikte kullanılarak oluşturulan ağaçta, *P. atlantica* ve *P. mutica* tür çiftinin %98 oranında birlikte bulunması da bu benzerliği kanıtlamaktadır.

Bütün belirteç verileri kullanılarak yeni bir filogenetik ağaç oluşturulduğunda ise *P. atlantica* ve *P. mutica*' nın birlikte gruplandığı ve Butmela kısmının, Terebinthus ile birleştiği görülmüştür. Ancak bu Butmela sınıfının silinebileceği anlamına gelmemektedir. Çünkü bütün belirteç sistemlerinin verileri ile oluşturulan PCA grafiklerinde bu iki türün hem diğer türlerden farklı olarak konumlandığı hem de birlikte bir grup oluşturduğu görülmektedir.

P. terebinthus ve *P. palaestina* türleri, birlikte gruplanan bir diğer tür çiftidir. Literatürde RAPD [Golan-Goldhirsh et al., 2004], [Kafkas and Perl -Treves, 2002] ve AFLP [Golan-Goldhirsh et al., 2004], [Kafkas, 2006], [Katsiotis et al., 2003] belirteç sistemleri sadece yüksek benzerlik değerleri göstermekle kalmamış (0,5-0,9) aynı zamanda uzlaşı ağaçlarında yüksek oranda birlikte gruplandıkları tespit edilmiştir (100 ağaç içerisinde 70 ve 100 defa; Golan-Goldhirsh et al., 2004). Engler [1881], *P.*

palaestina' nın *P. terebinthus*' un alt türü olabileceğini belirtmiştir. Ancak Zohary [1952] bazı karakterler (terminal yaprakçık varlığı, çiçek durumu vs) yüzünden *P. palaestina*' yı ayrı bir tür olarak sınıflandırmıştır. Ancak dizi analizi çalışmalarına göre bu iki tür birbirlerinden ayrılamamıştır [Yi et al., 2008]. Tez kapsamında bütün belirteç sistemleri birleştirilerek yapılan analizlerde bu iki türün %89 yineleme oranı ile birlikte gruplandıkları görülmektedir.

Zohary [1952], Eu-Lentiscus grubunun kseromorf yapraklar, uç yaprakçığın tamamen kaybolması, kanatlı rakis, indirgenmiş çiçek durumu ve drup meyve karakterleri bakımından en farklı kısım olduğunu belirtmiştir. *P. lentiscus* yapılan bütün çalışmalarda gerek morfolojik gerekse de moleküler açıdan en farklı tür olmuştur [Golan-Goldhirsh et al., 2004], [Katsiotis et al., 2003]. *P. lentiscus* sadece REMAP belirteç sisteminde elde edilen filogenetik ağaçta tek başına diğer türlerden ayrılmıştır. Ancak her ne kadar *P. lentiscus*, bütün belirteç sistemleri birleştirildiğinde, *P. palaestina* ve *P. terebinthus* ile birlikte gruplansa da, elde edilen yineleme tekrarı oldukça düşüktür (%23). Bu sonuç da bu gruplaşmanın çok güvenli olamayabileceğini göstermektedir. Bununla birlikte, elde edilen PCA grafiklerinde *P. lentiscus* her zaman diğer türlerden ayrı bir konumda yer almıştır.

6.3. Retrotranspozon Hareketlerinin *Pistacia* Filogenisine Etkisi

Zohary [1952] *Pistacia* genusunun evrimsel tarihini geniş bir şekilde tartışmış ve genus içerisindeki evrimsel trendin, Eu-Terebinthus-Lenticella ve Butmela yönünde olduğunu belirtmiştir. Ayrıca *P. vera*' nın en atasal tür olduğunu ve *P khinjuk*' un doğrudan *P. vera*' dan köken aldığından bahsetmiştir. Bununla birlikte; Eu-Terebinthus içerisindeki diğer türlerin, *P. khinjuk*' tan köken aldığı ve *P. atlantica*' nın da doğrudan *P. vera* veya *P. khinjuk*' tan köken aldığı belirtilmiştir.

Ancak çekirdek ve plastid belirteçlerinin dizilenmesi sonucu elde edilen filocoğrafya çalışmalarında daha farklı sonuçlara ulaşılmıştır. *Pistacia* türlerinin sahip olduğu ağsı evrimsel örüntü bir kenara, *Pistacia* cinsinin evrimsel tarihinde farklı türleşme ve dağılım noktaları tespit edilmiştir [Xie et al., 2014]. Bu çalışmaya göre *Pistacia* cinsinin daha önce ifade edildiği gibi 80 milyon yıl değil de, yaklaşık 37 milyon yıl önce ayrıldığı ortaya konulmaktadır. Ayrıca Amerika bölgesine özgü

türlerin yaklaşık 20, Asya bölgesine özgü türlerinde yaklaşık 17 milyon yıl önce farklılaştıkları belirlenmiştir.

Son yapılan çalışmalarda Akdeniz havzasındaki çevresel değişimlerin *Pistacia* türlerinin evrimleşmesi üzerine etkileri tartışılmıştır. Ayrıca orta miyosendeki kuraklığın tam olarak *Pistacia* türlerinin evrimleşmesi ile örtüştüğü tespit edilmiştir [Thompson, 2005]. Ayrıca, retrotranspozonal aktivasyonun çoğunlukla çevresel stres koşulları sonucunda oluştuğu da göz önüne alındığında [Grandbastien, 2014], *Pistacia* türlerinin evrimleşmesine retrotranspozonal hareketlerin önemli bir rol oynadığı söylenebilir.

Her ne kadar deneyler sonucunda elde edilen bulgular buradaki varsayımları tam olarak desteklemese de, dizileme çalışmaları sonucunda elde edilecek LTR bölgelerinin hangi stres koşullarında aktive olacaklarının incelenmesi ve bu bölgelerin *P. vera* genomundaki dağılımlarının incelenmesi, bu çalışmalar için bir çıkış noktası oluşturacaktır.

6.4. Farklı Gelişimsel Evrelerdeki Retrotranspozonal Değişimler

Çalışmalar sonucunda embriyo örnekleri ve çimlenmiş bitkicikler arasında farklı retrotranspozon profilleri olduğu tespit edilmiştir. Literatür incelendiğinde retrotranspozonların sadece stres koşullarında değil, aynı zamanda gelişimsel olarak da düzenlendiklerini ortaya koymuştur. Bu mekanizmalardan en önemlisi epigenetik düzenleme mekanizmalarıdır. Çalışmalar, retrotranspozonların çoğunlukla hipermetilasyona uğramış heterokromatik bölgelerde bulunduğunu göstermektedir. Embriyo gibi yüksek derecede genomik stabiliteye ihtiyaç duyan bir dokuda büyük oranda metilasyon görülmektedir [Grandbastien, 2015]. Ayrıca doku kültürü sistemlerinde de farklı gelişim evrelerindeki bitki örneklerinde retrotranspozon profil farklılıkları sıklıkla gözlenmektedir [Bayram et al., 2012], [Yilmaz et al., 2014]. Ancak çimlenme ve ardından gelişen süreçlerde ortadan kalkan metilasyon mekanizmaları sonucunda LTR bölgelerinin aktivasyonu ve retrotranspozon kopya sayısı artışı görülmektedir. Genomik yeniden düzenlenmelere yol açan bu süreç sonunda retrotranspozon profilinde farklılıkların gözlenmesi metilasyon mekanizmalarının da ortadan kalktığının bir göstergesi olabilir.

6.5. *Pistacia* Cinsine Özgü Olası Retrotranspozon Dizilerinin Araştırılması

Elde edilen sonuçlar hem *Pistacia* türlerinde farklı retrotranspozon profilleri olduğunu ortaya koymuştur hem de farklı gelişimsel evrelerde retrotranspozonal hareketlerin olduğunu göstermiştir. Sonuç olarak *Pistacia* türlerine özgü olası yeni retrotranspozonların tanımlanması ve bu diziler yardımıyla belirteç sistemleri geliştirilmesi hem evrimsel biyoloji açısından hem de farklı stres koşullarında ve farklı gelişimsel evrede oluşan hareketlerin incelenmesi açısından büyük bir potansiyel taşımaktadır.

Çalışmalar kapsamında elde edilen diziler incelendiğinde, hem LTR bölgelerinin bulunmadığı hem de çok düşük bir dizi kalitesinin elde edildiği görülmüştür. Bu kötü sonuçların elde edilmesindeki etkenler hem LTR dizilerinin karakteristik yapılarında hem de seçilen klonlama yönteminin sahip olduğu düşük orandaki ligasyon veriminden kaynaklanıyor olabilir.

LTR dizileri karakteristik olarak yaklaşık 1000 baz çiftlik bir bölgeden oluşmaktadır [Schulman, 2013]. Zaten dizileme çalışmaları için en az 1000 bç' lik örneklerin seçilmesi tekniğin başarısı açısında önemli olduğu belirtilmiştir [Ruslan Kalendar, kişisel görüşme]. Ayrıca PBS bölgeleri LTR içeren retrotranspozonlar dışında, LTR içermeyen retrotranspozonlar ve retroviral dizilerde de bulunmaktadır [Kalendar et al., 2010]. Yani iPBS belirteç sisteminin sonunda elde edilen ürünlerin hepsinde LTR bölgesinin bulunması beklenmemelidir. Bununla birlikte klonlanacak dizilerin restriksiyon kesim bölgeleri hakkında bir bilgiye sahip olunmadığı için çalışmalarda küt uçlu klonlama tekniği kullanılmıştır. Bu tekniğin en büyük olumsuz yönlerinden birisi de hem ligasyon verimin yapışkan uçlu klonlamaya göre çok düşük olmasıdır hem de mavi-beyaz seçimi ardından yanlış pozitif sonuç vermesidir. Zaten bulgular incelendiğinde çok düşük bir ligasyon verimi ve yüksek oranda yanlış pozitif sonuçların elde edildiği görülmektedir.

Sonuç olarak düşük ligasyon verimi, 1000 bç' nin altında diziler elde edilmesi gibi sebepler yüzünden klonlama çalışmalarında istenen sonuçlar elde edilememiştir.

7. SONUÇLAR

Bu çalışmanın sonucunda:

- Retrotranspozon temelli belirteç sistemleri ilk defa kapsamlı olarak *Pistacia* türlerinde uygulanmıştır
- Retrotranspozon temelli belirteç sistemlerinin *Pistacia* türlerinin moleküler karakterizasyon çalışmalarında kullanılabileceği
- Akdeniz bölgesine özgü *Pistacia* türlerinde dizileme çalışmalarında gösterildiği gibi ağsı bir evrimsel ilişkinin varlığı
- Farklı gelişimsel evrelerde retrotranspozon hareketlerinin oluştuğu ve farklı retrotranspozon profillerinin elde edildiği

tespit edilmiştir.

Ayrıca dizileme çalışmalarının devam etmesi ile, *Pistacia* türlerine özgü olası yeni retrotranspozonların klonlanabileceği ve *Pistacia* türlerine özgü retrotranspozon temelli belirteç sistemleri geliştirilebileceği gösterilmiştir.

KAYNAKÇA

Abdollahi Mandoulakani B., Piri Y., Darvishzadeh R., Bernoosi I., Jafari, M. (2011). "Retroelement Insertional Polymorphism and Genetic Diversity in Medicago sativa Populations Revealed by IRAP and REMAP Markers." Plant Molecular Biology Reporter, *30* (2), 286–296.

Al-saghir M. G., Porter D. M. (2012). "Taxonomic Revision of the Genus Pistacia L. (Anacardiaceae)." American Journal of Plant Sciences, *3*, 12–32.

Alzohairy A. M., Gyulai G., Ramadan M. F., Edris S., Sabir J. S. M., Jansen R. K., Bahieldin A. (2014). "Retrotransposon-based molecular markers for assessment of genomic diversity." Functional Plant Biology, *41* (8), 781.

Bayram E., Yilmaz S., Hamat-Mecbur H., Kartal-Alacam, G., Gozukirmizi N. (2012). "Nikita retrotransposon movements in callus cultures of barley (Hordeum vulgare L)." Plant Omics Journal, *5* (3), 211–215.

Belaj A., Satovic Z., Cipriani G., Baldoni L., Testolin R., Rallo L., Trujillo I. (2003). "Comparative study of the discriminating capacity of RAPD, AFLP and SSR markers and of their effectiveness in establishing genetic relationships in olive." Theoretical and Applied Genetics. *107* (4), 736–44.

Bennetzen J. L., Ma J., Devos K. M. (2005). "Mechanisms of recent genome size variation in flowering plants." Ann Bot, *95* (1), 127–132.

Bennetzen J. L., Wang H. (2014). "The contributions of transposable elements to the structure, function, and evolution of plant genomes." Annu Rev Plant Biol, *65*, 505–530.

Biemont C., Vieira C. (2006). "Genetics: Junk DNA as an evolutionary force." Nature, *443* (7111), 521–524.

Biswas M. K., Xu Q., Deng X. (2010). "Utility of RAPD, ISSR, IRAP and REMAP markers for the genetic analysis of Citrus spp." Scientia Horticulturae, *124* (2), 254–261.

Boissier E. (1849). "Diagnoses plantarum orientalium novarum." Genevae : Typographia Ferd. Ramboz.

Botstein D., White R. L., Skolnick M., Davis R. W. (1980). "Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms." American Journal of Human Genetics, *32* (3), 314–31.

Brown A. H. D. (1979). "Enzyme polymorphism in plant populations." Theoretical Population Biology, *15* (1), 1–42.

Bunge A. (1853). "Mémoires des savantes étrangers" (Vol. 2). Book, de l'academié de Saint – Pétersbourg.

Caetano-Anollés G., Bassam B. J., Gresshoff P. M. (1991). “DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers.” Bio/technology (Nature Publishing Company), *9* (6), 553–7.

Campbell B. C., LeMare S., Piperidis G., Godwin I. D. (2010). “IRAP, a retrotransposon-based marker system for the detection of somaclonal variation in barley.” Molecular Breeding, *27* (2), 193–206.

Carvalho A., Guedes-Pinto H., Martins-Lopes P., Lima-Brito J. (2010). “Genetic variability of Old Portuguese bread wheat cultivars assayed by IRAP and REMAP markers.” Annals of Applied Biology, *156* (3), 337–345.

Desfontaines R. L. (1799). “Flora atlantica; sive historia platarium quae in atlante, agro Tunetano et Algeriensi crescent.” (Vol. 2). Book, Paris, L. G. Desgranges.

Doungous O., Kalendar R., Adiobo A., Schulman A. H. (2015). “Retrotransposon molecular markers resolve cocoyam (Xanthosoma sagittifolium) and taro (Colocasia esculenta) by type and variety.” Euphytica, *206* (2), 541–554.

Doyle J. J. (1987). “A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue.” Phytochemical Bulletin, *19*, 11–15.

Engler A. (1881). “Ueber die morphologischen Verhaeltnisse und die geographicsche Verbreitung der Gattung Rhus, wie der mti ihr verwandten, lebenden und ausgestorbenen Anacardiaceae.” Bot Jahrb F Pflanzengesh U, Pflanzengeogr, *V* (S), CFE-DBF.

Fang G., Hammar S., Grumet R. (1992). “A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA.” BioTechniques, *13* (1), 52–54,56.

FAOSTAT (2016) http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E

Fischer F. G., Meyer A. (1838). “Enumeratio plantarum quas in Provincia Talysch collegit.” Bulletin de La Sociétè Impérale Des Naturalists de Moscou, *4* (338).

Franchet A. (1886). “Plantas Yunnanenses a Cl. J.M. Delavay collectas enumerat novasque describit.” Bulletin de La Société Botanique de France, *33* (6), 358–467.

Ghaemmaghami L., Attar F., Rahiminejad M. R. (2013). “Distinctness and Inter Relationships of Pistacia L. Species in Iran as Evidenced by Retroelement Insertional Polymorphisms (IRAP Method).” Iranian Journal of Botany, *19* (1), 78–85.

Golan-Goldhirsh A., Barazani O., Wang Z. S., Khadka D. K., Saunders J. A., Kostiukovsky V., Rowland L. J. (2004). “Genetic relationships among Mediterranean Pistacia species evaluated by RAPD and AFLP markers.” Plant Systematics Evolultion, *246* (1–2), 9–18.

Gottlieb L. D. (1977). “Electrophoretic Evidence and Plant Systematics.” Annals of the Missouri Botanical Garden, *64* (2), 161–180.

Grandbastien M. A. (2015). “LTR retrotransposons, handy hitchhikers of plant

regulation and stress response." Biochim. Biophys. Acta., *1849* (4), 403–416.

Grover A., Sharma P. C. (2015). "Development and use of molecular markers: past and present." Critical Reviews in Biotechnology, *8551*, 1–13.

Guo D., Zhang H., Luo Z. (2006). "Genetic relationships of Diospyros kaki Thunb. and related species revealed by IRAP and REMAP analysis." Plant Science, *170* (3), 528–533.

Hamrick J. L., Linhart Y. B., Mitton J. B. (1979). "Relationships Between Life History Characteristics and Electrophoretically Detectable Genetic Variation in Plants." Annual Review of Ecology and Systematics, *10* (1), 173–200.

Hormaza J. I., Dollo L., Polito V. S. (1994). "Determination of Relatedness and Geographical Movements of Pistacia vera (Pistacho: Anacardiaceae) Germplasm by RAPD Analysis." Economic Botany, *48* (4), 349–358.

Humboldt F., Bonpland A. J., Kunth C. (1824). "Nova genera et species plantarum." Sumptibus Librariae Graeco-Latini-Germanicae, *7*, 608.

Jaccardi P. (1908). Nouvelles recherches sur la distribution florale. Bulletin de la Société vaudoise des sciences naturelles, 44: 223-270.

Jiang G. L. (2013). "Molecular Markers and Marker-Assisted Breeding in Plants." In S. B. Andersen (Ed.), Plant Breeding from Laboratories to Fields (pp. 45–83). InTech.

John M. E. (1992). "An efficient method for isolation of RNA and DNA from plants containing polyphenolics." Nucleic Acids Research.

Kafkas S. (2006). "Phylogenetic analysis of the genus Pistacia by AFLP markers." Plant Systematics and Evolution, *262* (1–2), 113–124.

Kafkas S., Özkan H., Ak B. E., Acar İ., Atli H. S. (2006). "Detecting DNA polymorphism and genetic diversity in a wide pistachio germplasm: Comparison of AFLP, ISSR, and RAPD markers." Journal of the American Society for Horticultural Science, *131* (4), 522–529.

Kafkas S., Perl -Treves R. (2001). "Morphological and molecular phylogeny of Pistacia species in Turkey." Theoretical Applied Genetics, 102, 908–915.

Kafkas S., Perl -Treves R. (2002). "Interspecific relationships in Pistacia based on RAPD fingerprinting." HortScience, *37* (1), 168–171.

Kalendar R., Antonius K., Smýkal P., Schulman A. H. (2010). "iPBS: a universal method for DNA fingerprinting and retrotransposon isolation." Theoretical Applied and Genetics, *121* (8), 1419–30.

Kalendar R., Flavell A. J., Ellis T. H. N., Sjakste T., Moisy C., Schulman A. H. (2011). "Analysis of plant diversity with retrotransposon-based molecular markers." Heredity, *106* (4), 520–30.

Kalendar R., Grob T., Regina M., Suoniemi A., Schulman A. H. (1999). "IRAP and

REMAP: two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques." Theoretical Applied and Genetics, *1999* (98), 704–711.

Kalendar R., Schulman A. H. (2006). "IRAP and REMAP for retrotransposon-based genotyping and fingerprinting." Nature Protocols, *1* (5), 2478–2484.

Kalendar R., Schulman A. H. (2014). "Transposon-Based Tagging: IRAP, REMAP, and iPBS." Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.), *1115*, 233–255.

Karimi H. R., Kafkas S., Zamani Z., Ebadi A., Fatahi Moghadam M. R. (2009). "Genetic relationships among Pistacia species using AFLP markers." Plant. Syst. Evol., *279* (1–4), 21–28.

Katsiotis A., Hagidimitriou M., Drossou A., Pontikis C., Loukas M. (2003). "Genetic relationships among species and cultivars of Pistacia using RAPDs and AFLPs." Euphytica, *132*, 279–286.

Kephart S. R. (1990). "Starch Gel Electrophoresis of Plant Isozymes: A Comparative Analysis of Techniques." American Journal of Botany, *77* (5), 693–712.

Lee S. I., Kim J. H., Park K. C., Kim N. S. (2015). "LTR-retrotransposons and inter-retrotransposon amplified polymorphism (IRAP) analysis in Lilium species." Genetica, *143* (3), 343–352.

Legendre P., Legendre L. F. J. (1998). "Numerical Ecology.", Elsevier Science.

Lodhi M. A., Ye G. N., Weeden N. F., Reisch B. I. (1994). "A Simple and Efficient Method for DNA Extraction from Grapevine Cultivars and Vitis Species." Plant Molecular Biology Reporter, *12* (1), 6–13.

Martelli U. (1886). "Florula Bogosensis, Enumerazione Delle Plante Dei Bogos." Firenze: Tipografia di Mariano Ricci.

Martin B., Nienhuis J., King G., Schaefer A. (1989). "Restriction fragment length polymorphisms associated with water use efficiency in tomato." Science (New York, N.Y.), *243* (4899), 1725–8.

McClintock B. (1951). "Chromosome organization and genic expression." Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol., *16*, 13–47.

Michelmore R. W., Paran I., Kesseli R. V. (1991). "Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations." Proceedings of the National Academy of Sciences, *88* (21), 9828–9832.

Mondini L., Noorani A., Pagnotta M. A. (2009). "Assessing Plant Genetic Diversity by Molecular Tools." Diversity, *1* (1), 19–35.

Murashige T., Skoog F. (1962). "A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures." Physiologia Plantarum, *15* (3), 473–497.

Ozden-Tokatli Y., Ozudogru E. A., Akcin A. (2005). "In vitro response of pistachio

nodal explants to silver nitrate.” Sci. Hortic., *106* (3), 415–426.

Ozden-Tokatli Y., Akdemir H., Tilkat E., Onay A. (2010). "Current status and conservation of *Pistacia* germplasm", Biotechnology Advances 28:130-141.

Parfitt D. E., Badenes M. L. (1997). “Phylogeny of the genus Pistacia as detrermined from analysis of the chloroplast genome.” Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *94*, 7987–7992.

Parveen S., Shahzad A., Yadav V. (2016). “Molecular Markers and Their Application in Plant Biotechnology.” In A. Shahzad, S. Sharma, S. A. Siddiqui (Eds.), Biotechnological strategies for the conservation of medicinal and ornamental climbers SE - 16 (pp. 389–413).

Perrier X., Jacquemoud-Collet J. P. (2006). “DARwin software.” http://darwin.cirad.fr/

Powell W., Machray G. C., Provan J. (1996). “Polymorphism revealed by simple sequence repeats.” Trends in Plant Science, *1* (7), 215–222.

Rahmani M. S., Shabanian N., Khadivi-Khub A., Woeste K. E., Badakhshan H., Alikhani L. (2015). “Population structure and genotypic variation of Crataegus pontica inferred by molecular markers.” Gene, *572* (1), 123–129.

Roldan-Ruiz I., Calsyn E., Gilliland T. J., Coll R., van Eijk M. J. T., De Loose M. (2000). “Estimating genetic conformity between related ryegrass (Lolium) varieties . 2 . AFLP characterization.” Molecular Breeding, *6* (593–602).

Rovira, M., Batlle, I., Romero, M., Vargas, F.J., 1995. "Isoenzymic identification of Pistacia species". Acta Horticolturare. 419, 265–271.

Saghir M. Al. (2006). “Phylogenetic Analysis of the Genus Pistacia (Anacardiaceae).” Virginia Technical University.

Schulman A. H. (2013). “Retrotransposon replication in plants.” Current Opinion in Virology, *3* (6), 604–14.

Shanjani P. S., Mardi M., Pazouki L., Hagidimitriou M., Avanzato D., Pirseyedi S. M., Khayam Nekoui S. M. (2009). “Analysis of the molecular variation between and within cultivated and wild Pistacia species using AFLPs.” Tree Genetics and Genomes, *5* (3), 447–458.

Smykal P., Bacova-Kerteszova N., Kalendar R., Corander J., Schulman A. H., Pavelek M. (2011). “Genetic diversity of cultivated flax (Linum usitatissimum L.) germplasm assessed by retrotransposon-based markers.” Theoretical Applied and Genetics, *122* (7), 1385–1397.

Steward J. L., Brandis D. (1874). “The Forest Flora of North-West and Central India.” Book, London: Wm. H. Allen & Co. P.

Stockmans F., Hooker T. (1852). “Notes on Beloochistan plants” (Vol. 4). Book, Hooker’s Journal of Botany and Kew Garden Miscellany.

Swingle W. T. (1920). “A new species of Pistacia native to southwestern Texas, P. texana.” J Arnold Arbor, *2*, 105–110.

Thompson J. D. (2005). "Plant Evolution in the Meditarennan" Oxford University Press, Oxford.

von Linné C. (1753). “Species plantarum” (Vol. 2). Laurentius Salvius.

Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., van de Le, T., Hornes M. (1995). “AFLP: a new technique for DNA fingerprinting.” Nucleic Acids Res, *23* (21), 4407–4414.

Waugh R., McLean K., Flavell A. J., Pearce S. R., Kumar A , Thomas B. B. T. (1997). "Genetic distribution of BARE-1- like retrotransposable elements in the barley genome revealed by sequence-specific amplification polymorphisms (S-SAP)". Molecular and General Genetics 253: 687–694.

Welsh J., McClelland M. (1991). “Genomic fingerprints produced by PCR with consensus tRNA gene primers.” Nucleic Acids Research, *19* (4), 861–866.

Williams J. G., Kubelik A. R., Livak K. J., Rafalski J. A., Tingey S. V. (1990). “DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers.” Nucleic Acids Research, *18* (22), 6531–6535.

Xie L., Yang Z.-Y., Wen J., Li D.-Z., Yi T.-S. (2014). “Biogeographic history of Pistacia (Anacardiaceae), emphasizing the evolution of the Madrean-Tethyan and the eastern Asian-Tethyan disjunctions.” Molecular Phylogenetics and Evolution, *77*, 136–46.

Yang H.-B., Kang W.-H., Nahm S.-H., Kang B. C. (2015). “Methods for Developing Molecular Markers.” In H.-J. Koh, S.-Y. Kwon, & M. Thomson (Eds.), *Current Technologies in Plant Molecular Breeding SE - 2* (pp. 15–50).

Yi T., Wen J., Golan-Goldhirsh A., Parfitt, D. E. (2008). “Phylogenetics and reticulate evolution in Pistacia (Anacardiaceae).” American Journal of Botany., *95* (2), 241–251.

Yilmaz S., Marakli S., Gozukirmizi N. (2014). “BAGY2 retrotransposon analyses in barley calli cultures and regenerated plantlets.” Biochemical Genetics, *52* (5–6), 233–44.

Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. (1994). “Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification.” Genomics, *20* (2), 176–183.

Zohary M. (1952). “A Monographical Study of the Genus Pistacia.” Palestinan Journal of Botany, *5* (3), 187–228.

ÖZGEÇMİŞ

Emrah Kırdök 15 Kasım 1984 yılında Kahramanmaraş' ta doğdu. İlkokul ve lise eğitimini Antalya' da tamamlayan Emrah, 2002 yılında İstanbul Üniversitesi Biyoloji Bölümünde lisans eğitimine başladı. 2006 yılında lisans eğitimini tamamlayarak, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsünde, *Sequoia semperivirens* bitkisinin vitrifikasyon temelli kriyoprezervasyon yöntemleriyle korunması isimli yüksek lisans tezine başladı. 2010 yılında yüksek lisans eğitimini tamamlayarak, aynı yıl Gebze Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim dalında Doktora eğitimine başladı.

EKLER

EK A: Tez Çalışması Kapsamında Yapılan Yayınlar

Kırdök E., Özden-Çiftçi Y. (2016) "Retrotransposon Based Marker Systems as a Tool to Analyze Molecular Diversity of *Pistacia* Species". International Journal on Agriculture and Biology. 18:601-606.

Kırdök E., Özden-Çiftçi Y. (2012) "Characterization of the Pistacia Genus via Retrotransposon Based Marker Systems". In Vitro Cellular and Developlemental Biology-Animal 48 (Suppl 1): 59.

EK B: R Kodları

Tablo B 1.1: Belirteçlerin çeşitlilik analizlerinde kullanılan R kodları.

```
basic<-function(marker, assay){

  #Calculation of basic marker diversity indices

  nP=0 #Number of polymorphic loci
  nM=0 #number of monomorphic loci
  nL=0 #number of loci
  pP=0 #proportion of polymorphic loci
  list_names=c("Number of Polymorphic Loci", "Number of
 Monomorphic Loci", "Number of Loci", "Proportion of
 Polymorphic Loci", "Number of Loci per Assay", "Effective
 Multiplex Ratio")

  nL=dim(marker)[1]
  sS=dim(marker)[2]

  for (i in 1:nL){if (sum((marker[i,])/sS)==1){nM=nM+1}}

  nP=nL-nM
  pP=round(nP/nL,2)
  nU=nL/assay
  emr=nU*pP

  list=c(nP, nM, nL, pP, nU, emr)


  return(t(rbind(list_names, list)))
}
```

EK-C: PCA Kodları

Tablo B 1.2: Belirteçlerin PCA analizlerinde kullanılan MatLab kodları.

```
load pistaciaiPBS.mat
s=ones(35,1)*100
c=ones(35,1);
for i=1:5;
    c(i)=1;
end
for i=6:10;
    c(i)=2;
end
for i=11:15;
    c(i)=3;
end
for i=16:20;
    c(i)=4;
end
for i=21:25;
    c(i)=5;
end
for i=26:30;
    c(i)=6;
end
for i=31:35;
    c(i)=7;
end

group_pistacia=num2cell([ones(35,1)]);
for i=1:5;
    group_pistacia{i}='P. vera';
end
for i=6:10;
    group_pistacia{i}='P. mutica';
end
for i=11:15;
    group_pistacia{i}='P. khinjuk';
end
for i=16:20;
    group_pistacia{i}='P. terebinthus';
end
for i=21:25;
    group_pistacia{i}='P. atlantica';
end
for i=26:30;
    group_pistacia{i}='P. palaestina';
end
for i=31:35;
```

```
    group_pistacia{i}='P. lentiscus';
end

group_ekg=num2cell([ones(8,1)]);
for i=1:2;
    group_ekg{i}='Embriyo';
end
for i=3:4;
    group_ekg{i}='Gˆvde';
end
for i=5:6;
    group_ekg{i}='Kˆk';
end
for i=7:8;
    group_ekg{i}='P. vera';
end

pistaciaiPBS=pistaciaiPBS-repmat(mean(pistaciaiPBS),
length(pistaciaiPBS.'),1);
pistaciaiPBS=pistaciaiPBS./repmat(std(pistaciaiPBS),
length(pistaciaiPBS.'),1);
[C1, AA1, L1]=princomp(pistaciaiPBS');
relative_exp_var1=L1./sum(L1);
figure
gscatter (AA1(:,1), AA1(:,2), group_pistacia)
title('Pistacia Genusu PCA Grafi•i')
xlabel('PC-1')
ylabel('PC-2')

figure
scatter3(AA1(:,1), AA1(:,2), AA1(:,3),s, c, 'filled')
 colorbar('location', 'EastOutside', 'YTickLabel',...
     {'P. vera', 'P. mutica', 'P. khinjuk', 'P. terebinthus',
'P. atlantica', 'P. palaestina', 'P. lentiscus'});
title('Pistacia Genus PCA Plot')
xlabel('PC-1')
ylabel('PC-2')
zlabel('PC-3')
```

EK-C: Klonlama Çalışmaları Sonucunda Elde Edilen DNA Dizileri

Tablo C 1.1: Çalışmaları sonucunda elde edilen DNA dizileri.

>S1 GGGAAAATTTACGATACGTGTCAACGATGATGACTTGGGATGCTTTATGCTACAT GCTTTCATCTACGAAAGCTGAGCTCCAACTTTTTAAAGAGCTTAGGCAACTAGCTC ATTTCATAAAGAACTTATACCAACATTTCCATGGTGATGTATTTTGGGAGCAGGAT TACGAATAGCGTTAATAACTATTGACATTGAGGCT
>S2 NGCCTCTCGGTTTTCGCTAGATGCTCCTCTTTATAACGGAGATATGTCGACAGACT AAGTGAGACCCCTTTTAAGGGCCGTTTTATTTTAGAAGGCTGAGAGCTATACCCG GTCGGTGGAAATCGAACACGGGTGGATGATGGTCATTTGTGAACTGAACTTATGA GTATCTCTCGGATTATGCAGATAAAGCCATCTATTAAGCCGTCTAGGTCATTCCCA TCTACGCCAGCCTTCGCCACTGATCGATATGCAGGAAATCCCTATCTTCTATACCC GGCTGACCCACTCGTATATGCAGGAGCTCCACATCGATACCCCGATGCACCCCAT CCACGTGATCGATACCTATACCGAGTTCTTCCTTATGATCGTAGTAGAGATTCATA CCTCACACGTGATCGAGACCTATAGAGGCGCTTTTAAGCCCTTATCAACGTTATCC TTATCTTTGAGAAGTCCTTAAAGGACTCTATAAAGCATTTAAACGAGAGTTTAGAT ACCCTCATAGTCCCCTACTATGTACTTTTTTATTTATTTGAAGCCCCGCCCCTGCCC TATCACGTAAAGCCGGAACGGAATTAGAAAGGTACCTTCCTCCAGATCCTCTACC TGGGCATCTATCCGATGGTTGCGAATACTGGTGCTTATCTCCTTCTGCTTGTTCCG GTGCCCATCCGAGGGAAGTCATTCTTTATCTGATACAGATGCCCATCAACCACCA GTGGGGAGAAGCAAATGACCCGCCATAGCAATCAATGAAGGAAGGCTCCAACTA GCCATATCTAAAGCCTTGGATACGACGCCCGGCATAACATCCCACTACGGATTCC CCTTCCTCTCCCTGATACCGGAGCAAGGGAGGGAGTAATCCAATGGCACATAGTA GATTATAAGCCCTATCCCTATGATTTCTCTATATTTCTCCTCGTTAGTT
>S3 GGGGACAATACATGACAAGACAATCGGTGAAGGAAGTGTGAGTGGAGTCTGCTT CTCCATGGACTTCCAACATTTCACTCCCATTTAAGAGAGGGGAGATAAATAGACN AAAGGAAGGAAAAGGCCCTAACAGAAAAGAGAGAGGGAAGGAGAGAAANACCA GCAAGCACAGGACGCCACCGAAACGCAGCAAAGGCAACACGAGCGCGCACGACG GGAGAACCGCAGCAAAGGGGAGAAAGAACACCACAAAACACGCCCAAAACCAC CCCACCCGAGCCAACCACCGCCAAGAGAGAGAGGACCCACACACCGAGAGCCCC CACAGCCCCCGGGAAAGCAACAGGAGAAAGGAAACCAAGAAACCCGCAAAGAA CACCCGCCAAGACAGGCGAACGAAAGGAGAACCGAGGACCACCACCCCCAGAAA ACGACGCGGGCACCAGCGAAGCCACACAGAGCAGCCGCCGGAAGACCCACAGGA CAACGGCGCAACCAAGGAAGNGCCCGAAAAACCCCAAAAAGAAGAGCACAAGC CAAGACCGGCCAGACGGCAGACCACGCGCCAAAAGCCGCAAACAGGGAGGGGAC GAAAAAAACAAAAGCCCCGGCACCAAACGAGCCGCCAGAACCCGACGCCCGCAC CAACAGAAAAAGCAACAAAAGCGAAAAGAACACAAGAGAAAGGGAGGAAAAGG CAGGGAAAAACAACCAGGACACCGGAGAACGGCAGCACAACGCAAAAGGACAA AAAAAACGGAAAAGAAAGGCAGACAACCCACAGACCCGGAACCGCAAGCGGAA ACGAGAAGAGGAAGAAAGGGGGAAAACAAAAAAACGAAGACAGCACAACAGAA AGGACGAAAAACNGCCCCCGCCACGAAGCAAAGAGAAAACCCCCACACAAGAGA GACAGCAGCAGGGCAGGCGCGACGCCAGAGAGCACACGACGGAGCAGACGCAA AGAGAGCGCGCGCCCCGGGGACGGCCAAAGAGGCCCAAGGCGGCAGGGAGAGA CACAACAGAG
>S4 GAGAAACTTGATCAGTGCGTCGATGATGGTGATTGCGCTTATGCTTGCCGTGCCCT TACCGACGCCTTGCGGCCCCTAAAAGGGAACATGTTTGTACTTTTTCAGTATTGTT CTGCCCTTCGAACCATGTTCAAAAGTTGTGACAGGGTTTTCGCCATCGGGTTCATA TTGAAATTCATTAAGAACGGAGCA
>S5

GTCCCGAGTCGCGAGCGGAAGTCTCCCTATCATATGGCGAGGCCTCACGTAGATA CGCTTCTTTCCTTCCAATCTAGCGCCCCTCTAGATATGACATCTGTTTGAGTTCTAC GCCTCCTCATTGACTCAGAAGTATTGGGAACCAGGCGCTCTGGACCACTCTTTTTT AATAGCTCCCTCACTCGTCCATCGTCTAATATGGAACGAGACTGATGTGATCCCGA GCGGAAAGGAGGACCCCTAATTCGGGGGCTGAGTTCGAATAATATGCACTGATAG AATAATATACACTGACTACTCGAACATAATAATATGGAGGGGTAACGACTACGGA GTTGGAACACAAGCATCTCAACAGTGATTTGGTTGGAAGACATTTGTGCTAATTCC GTTCTTCTGATTCCTCAATGTACTCATACTCAATTGCTAGAGGTGTAGACTACTAA TAAGGAATGGTACGTACGCTCGTAGCACAACTTATCATGTCTGCCTTTTTCTTTCT CGATCACCTCACAAGCATTCCATATTACATAATGGACTAGTGCGGAAGCTTTTCCC ACTACCTCACCTGAATGACTTGTCTCACAAGGTACTGTATCAAGTGGTATGGCCAC ATCCGTTACCATAGGGAGAAGACGACGATTGCATAAATAGTCATCTCCCTCTGAT CCTGATCGTGGCTTGCTCTTTGGACTTCACACTTCTTTTCTCTTGCATGGAAGTAGC CTCGTCTCTTAGCGCCCACATTATNNN
>S7 GGGGAACGAGGGTACGTCAGTTCTGTCCGCTTCCAACAGTGTGTACCTTGTCTTGG GGCGTCTTTGGCTTTACGAGCCCTACTAAGGCGGAAAAAAAATTCTTTCTCTTCCC GGCCCGGACCATATTCCATTCCGGTGCGTCCACAGAAGAGGAAATCTGAATGTCT CTTGCTCATCTAGCGTAACTTGCACTAAGAATG
>S8 NAGCGAGGGAAAAATTGAAGAGAGTCACAACGACAGCTAATCACTCACAATCCT TAATAAAATGCCCCTTTTTATTAATACCTGCACAGAACAGTACAACCAGAACAAT ACTTCCAGTAGCCTTGCCCTATCAGTACTCACTAAGCAAATGAACTAGAAAAATA CAGCAAGTGCATTAAGAAAAATGGTAACTAAAGACTGACTTCGAGGGTCAGTCAC CTCCCAGAATACTGACTTCGAGGGTCAGCTGCCTCCCTTCCAATTTACTTTTTCCAT CTTGATAATTCTTTCTCTCTCTGTTTTTTTTTTCACCCCTGGCCCCTTTTGTGCTCCT AACCGAATTCCTATATTCACTCCTGTCAAGCCATCTGTCCTTTCTAACAAACTCAA ACCTTTTACACCCAAATGTCAGTACTTATTCCTCTACTTTTTACCCTTGCCCTTCCT ATGGTATCCAAGCAAAAANATNNTNT
>S9 GAGACACAGAGTGCGCGCGATGATTGAACCATGAAAGCAAGGCTNCNGTNNGCA GCNTANNCAGCTNGNNATNTNNCGACAGGGATANCGAAGGGGTTNGTATATATTT GTACACAGACTTATGCCTTGAACGATTTCATACAGCATCATATACCCTTTTTTTTA CTAAGTCGCCGCNCCTCTNGCGTNGNGAATTTTAGTATGTACATGANGNANCNTN CNTNCNCGGCTGACTTAATCGTAGTTCTCGNTCTATTTCACACAGCGATGCGTAGC TTCTTAGTTTCGNNCCTCATNTNGNANTANTCAANATCTGCATTCCGCTCTTTGAA TCACGGCAGCTGCTCGTGANTCAAGAGCGNAATGCAAATTCTGATAATTTCAATA TTGAGNGCGAN
>S10 ACCAGGGAAGATAATGGTGATCACTAGTTGCTTGCGTGTGATGGGTAATTAGATG TGCTAATAAACGGAATGGTCTAGGGAGGCGGTGGCCCTTAATAAGGTTGNGTGNN GTGTGNNTGNNNTGNGGGNNTGTGTGGCCCTTTATAGAGGNTNGGNGNGGNNGG NNGGTGTGGGTGNNGGGGGGNNTGGGGGTTGGGGTGTTGTGGTGGTGGTGGTGN TTG
>S11 AAAACAGAATTATATACATATGGGTGATCGCAGGGCCATGCTTGCCCATCATACA CCTGAAGCCAAAAACGTCCTTCTGCACTTGGACATGCCTTATTTTCTTTGGACCTT ACTGGCTTAATGGTCCCTGATCTTGAAGCCTTGCCCCATAGCCACAGTTCAATATA AGCGGCGCTGATGAATTCTTACACCTCCAA