

AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
REKTÖRLÜĞÜ KÜTÜPHANESİ

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
REKTÖRLÜĞÜ KÜTÜPHANESİ

SUSAMDA KAPALI KAPSÜLLÜLÜK MUTANT KARAKTERİNE BAĞLI
MOLEKÜLER MARKERLERİN BELİRLENMESİ

Bülent UZUN

DOKTORA TEZİ
TARLA BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
REKTÖRLÜĞÜ KÜTÜPHANESİ

ANTALYA

2002

AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
REKTÖRLÜĞÜ KÜTÜPHANESİ

T960

AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
REKTÖRLÜĞÜ KÜTÜPHANESİ

**SUSAMDA KAPALI KAPSÜLLÜLÜK MUTANT KARAKTERİNE BAĞLI
MOLEKÜLER MARKERLERİN BELİRLENMESİ**

Bülent UZUN

**DOKTORA TEZİ
TARLA BİTKİLERİ ANABİLİM DALI**

ANTALYA

2002

AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
REKTÖRLÜĞÜ KÜTÜPHANESİ

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SUSAMDA KAPALI KAPSÜLLÜLÜK MUTANT KARAKTERİNE BAĞLI
MOLEKÜLER MARKERLERİN BELİRLENMESİ

Bülent UZUN

DOKTORA TEZİ

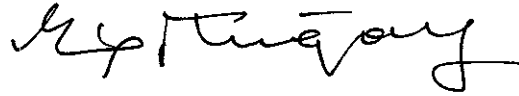
TARLA BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

Bu tez 25.01./2002 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından (100) not takdir edilerek oybirliği / oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

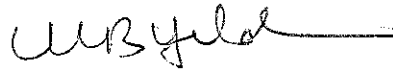
Prof. Dr. M. İlhan ÇAĞIRGAN (Danışman)



Prof. Dr. M. Emin TUĞAY



Prof. Dr. Metin B. YILDIRIM



Doç. Dr. Hüseyin BASIM



Doç. Dr. A. Naci ONUS



ÖZ

SUSAMDA KAPALI KAPSÜLLÜLÜK MUTANT KARAKTERİNE BAĞLI MOLEKÜLER MARKERLERİN BELİRLENMESİ

Bülent UZUN

Doktora Tezi, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. M. İlhan ÇAĞIRGAN

Ocak 2002, 95 sayfa

Susamda kapalı kapsüllülük mutant karakterine bağlı markerler belirlemede AFLP ve RAPD teknikleri, bulk segregant analizi ile ortak olarak kullanılmıştır. Üçü yapay ve biri doğal olmak üzere dört ayrı mutant F₂ populasyonunun hazırlandığı çalışmada, bu populasyonlara ait bireylerden elde edilen bulk DNA'lar, susamda kapalı kapsüllülük mutant karakterine bağlı markerler belirlemede kullanılmıştır. Toplam 72 farklı AFLP primer kombinasyonu ve 12 RAPD primeri, ilgili özellik bakımından farklılık bulmak üzere susam genomunu taramıştır. Sadece AFLP markerleriyle 6840 lokusun tarandığı çalışmada, *EcoRI*+AAG/*MseI*+CAT primer kombinasyonunun, kapalı kapsüllülük mutant karakteri ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Bulkleri meydana getiren bireylerin DNA'larının aynı markerle analizlenmesi sonucunda, 258 bp uzunluğundaki trans markerin, susamda kapalı kapsüllülük mutant karakterine sıkıca bağlı olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, 5'-AGTCGTC CCC sıralamalı "H5" RAPD primerinin kapalı kapsüllülük mutant karakteri ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Sunulan bu çalışmayla, AFLP analizinin uygulanması ve bağlı moleküler markerlerin belirlenmesi susam genusunda ilk defa gerçekleştirilmiştir.

ANAHTAR KELİMELEER: Susam, *Sesamum indicum* L., kapalı kapsüllülük, AFLP, RAPD, bulk segregant analizi, moleküler markerler

JÜRİ: Prof. Dr. M. İlhan ÇAĞIRGAN
Prof. Dr. M. Emin TUĞAY
Prof. Dr. Metin B. YILDIRIM
Doç. Dr. Hüseyin BASIM
Doç. Dr. A. Naci ONUS

ABSTRACT

IDENTIFICATION OF MOLECULAR MARKERS LINKED TO CLOSED CAPSULE MUTANT TRAIT IN SESAME

Bülent UZUN

Ph.D. Thesis in Field Crops

Supervisor: Prof. M. İlhan ÇAĞIRGAN

January 2002, 95 pages

AFLP and RAPD techniques with bulked segregant analysis were used to identify molecular markers linked to *closed capsule* mutant trait in sesame. Four mutant F₂ populations consisting of three induced- and one natural-mutant were developed for the research. Bulk DNA samples made from the individuals belonging to the populations were used to identify molecular markers linked to *closed capsule* mutant trait in sesame. A total of 72 different primer combinations and 12 RAPD primers were screened to reveal polymorphisms for the character of interest on the genome of sesame. The study where 6840 loci screened with only AFLP markers, the association was found out between *closed capsule* mutant trait and *EcoRI*+AAG/*MseI*+CAT primer combination. The association was confirmed by analysing of the AFLP profile from single plants that form the bulks. As a result of the confirmation, the marker in trans sized 258 bp was closely linked to the *closed capsule* mutant trait. In addition, H5 RAPD primer, 5'-AGTCGTC CCC, was also found to be in relation to the character of the interest. With the present study, the use of AFLP and the identification of the linked marker in sesame crop were reported here for the first time.

KEY WORDS: Sesame, *Sesamum indicum* L., *closed capsule*, AFLP, RAPD, bulked segregant analysis, molecular markers

COMMITTEE: Prof. M. İlhan ÇAĞIRGAN
Prof. M. Emin TUĞAY
Prof. Metin B. YILDIRIM
Assoc. Prof. Hüseyin BASIM
Assoc. Prof. A. Naci ONUS

ÖNSÖZ

Susam kültürü yapılan yağ bitkileri içerisinde eski bir geçmişe sahip olmasına rağmen homojen olgunlaşma yerine, aşağıdan yukarıya doğru büyüme seyri göstermesi ve hasat zamanı tohumlarını barındıran kapsüllerinin çatlaması, susamda uygun bir hasat zamanı belirlenmesini güçleştirirken, hasat-harman işlemlerinin tamamen el ile yapılmasına neden olmaktadır. Makinalı hasatın susamda yapılamaması, bitkinin geniş alanlara ekimini kısıtlarken, ikinci ürün tarımındaki rağbetini de her geçen gün azaltmaktadır. Susamın kendi doğal yapısından kaynaklanan bu problemleri aşmada kapalı kapsül susam mutantları umut verici gözükmemektedir. Kapalı kapsüllü mutantlar bulunur bulunmaz, mutasyona eşlik eden negatif özelliklerin iyileştirilmesinde klasik ıslah programları başlatılmışken, sunulan bu çalışmayla birlikte bahis edilen programların hızlandırılması beklenmektedir. Bu kapsamda, susamda kapalı kapsüllülük mutant özelliğine bağlı bir AFLP moleküler markeri belirlenirken, susamda AFLP marker teknolojisinin kullanımı ve bağlı moleküler markerlerin belirlenmesi dünyada ilk defa gerçekleştirilmiştir.

Kapalı kapsüllü ve normal bireylerin melezlenmesi, F_1 bireylerinin yetiştirilmesi ve F_2 açılan populasyonlarının elde edilmesi için uygulanan tarla çalışmalarımı destekleyen Uluslararası Atom Enerjisi Ajansı, IAEA-RC-TUR7855/RB projesine, laboratuvar analizlerinin İngiltere'nin Cambridge kentinde bulunan NIAB enstitüsünde yapılmasına "bench fee" ve benim yaşamsal giderlerimi karşılayarak imkan sağlayan Uluslararası Atom Enerjisi Ajansı, IAEA-C6/TUR/98006P bursuna sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Bütün bu aktivitelerin bulunması, uygulanması ve kazanılmasında bana yollar açan, bizzat destekleyen ve hatta İngiltere'ye gelerek çalışmanın seyrini her aşamada düzenleyen sevgili Hocam sayın Prof. Dr. M. İlhan Çağırğan'a sonsuz müteşekkirim sunmak benim için önemli bir mutluluk kaynağıdır.

AFLP ve RAPD analizleri esnasında derin bilgilerinden faydalandığım, Dr. Vince Lea, Dr. David Lee ve Dr. Paolo Donini'ye, İngiltere'de değişik aşamalarda yardımlarını gördüğüm Uluslararası Atom Enerjisi Ajansı (IAEA) bitki ıslahı kürsüsü başkanı Prof. Mirosław Maluszynski ve British Council temsilcisi Ms. Sue Shaw'a, tez izleme

komitemde yer alarak beni şereflendiren Doç. Dr. Hüseyin Basım ve Doç. Dr. A. Naci Onus'a, yine her aşamada sıcak dostluğunu hissettiğim bölümümüz öğretim üyesi Doç. Dr. Cengiz Toker'e teşekkür ederim. Yurt dışındayken beni sabırla bekleyen ve tez yazım esnasında geç saatlerde eve dönüşüme katlanan eşim Suna Nazlı Uzun'a ayrıca teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa no

ÖZ.....	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	v
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	x
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL BİLGİLER VE KAYNAK TARAMALARI.....	3
2.1. AFLP İle İlgili Bilgiler.....	4
2.2. Bulk Segregant Analizi ve RAPD İle İlgili Bilgiler.....	19
3. MATERYAL VE METOD.....	31
3.1. Araştırma Yeri.....	31
3.2. Genetik Materyal.....	31
3.3. Metod.....	32
3.3.1. Melezleme tekniği.....	32
3.3.2. Materyalin yetiştirilmesi.....	32
3.3.3. Bulk segregant analizi.....	33
3.3.4. DNA izolasyonu.....	33
3.3.4.1. DNA izolasyonunda kullanılan kimyasallar ve çözeltiler.....	35
3.3.5. AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) analizi.....	36
3.3.5.1. Poliakrilamid jelin hazırlanması.....	43
3.3.5.2. AFLP analizinde kullanılan kimyasallar ve çözeltiler.....	45
3.3.6. RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) analizi.....	47
3.3.6.1. Agaroz jel elektroforezi.....	49
3.3.7. Kapalı kapsüllülük mutant karakterine bağlı moleküler markerler belirlemede AFLP ve RAPD markerlerinin kullanılması.....	49

3.3.8. F ₃ döl kontrolü.....	50
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	51
4.1. DNA İzolasyonunun Optimizasyonu.....	51
4.2. Bulk Segregant Analizi.....	52
4.3. AFLP Markerlerinin Susam Bitkisine Uygulanması.....	55
4.3.1. DNA kesimlerinin optimizasyonu.....	56
4.3.2. Adaptör ligasyonunun optimizasyonu.....	57
4.3.3. Ön-seçici amplifikasyonun optimizasyonu.....	59
4.3.4. Seçici amplifikasyonun optimizasyonu.....	60
4.3.5. Poliakrilamid jel analizinin optimizasyonu.....	61
4.4. Kapalı Kapsüllülük Mutant Karakterine Bağlı AFLP Markerinin Belirlenmesi.....	62
4.5. F ₃ Döl Kontrolü.....	69
4.6. RAPD Analizinin Susam Bitkisine Uygulanması.....	72
5. SONUÇ.....	79
6. KAYNAKLAR.....	82
ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

ABA	: Absisik asit
bp	: Baz çifti
°C	: Santigrat derece
cccc	: Yapay kapalı mutant gen
cm	: Santimetre
cM	: Santimorgan
g	: Gram
ha.	: Hektar
HCl	: Hidrojen klorür
idid	: Doğal kapalı mutant gen
K	: Potasyum
KCl	: Potasyum klorür
Mg	: Magnezyum
MgCl ₂	: Magnezyum klorür
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
mM	: Milimolar
N	: Azot
NaCl	: Sodyum klorür
ng	: Nanogram
P	: Fosfor
³² P	: Fosfor 32
³³ P	: Fosfor 33
U	: Ünite
µl	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar
β	: Beta

Kısaltmalar

AFLP	: Amplified fragment length polymorphism-Çoğaltılan parça uzunluğu farklılığı
BSA	: Bulk segregant analysis-Toplu açılım analizi
EP	: European Patent-Avrupa patenti
IRD	: Infrared-Kırmızı ötesi
ISSR	: Inter simple sequence repeats-Geçişli basit dizi tekrarları
M.Ö.	: Milattan önce
NIAB	: National Institute of Agricultural Botany-Ulusal Tarımsal Botanik Enstitüsü
PCR	: Polymerase chain reaction-Polimeraz zincir reaksiyonu
RAPD	: Random amplified polymorphic DNA-Rasgele çoğaltılan DNA farklılığı
RFLP	: Restriction fragment length polymorphism-Kesilmiş parça uzunluğu farklılığı
SCAR	: Sequence characterized amplified region-Diziye özel çoğaltılmış bölge
SRFA	: Selective restriction fragment amplification-Seçici çoğaltılan kesilmiş parça
SSP	: Seed storage protein-Tohum depolama proteinleri
SSR	: Simple sequence repeats-Basit dizi tekrarları
SIS	: Sequence tagged sites-Dizisi etiketlenmiş alanlar
UV	: Ultra viyole
QTL	: Quantitative trait locus-Kantitatif özellik lokusu

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. DNA örneklerinin <i>EcoRI</i> ve <i>MseI</i> restriksiyon enzimleri ile kesilmesi.....	39
Şekil 3.2. Kesilen ve adaptörleri bağlanan DNA örneklerinin 1 seçici bazla amplifikasyonunun kontrolü.....	41
Şekil 4.1. Kapalı ve normal kapsüllü bulk DNA'ların AFLP poliakrilamid jelde altı farklı primer kombinasyonu ile elektroforezi.....	54
Şekil 4.2. Kısmen kesilen bazı DNA örneklerinin AFLP profilinde görülmesi.....	58
Şekil 4.3. Dört ayrı popülasyonda <i>EcoRI</i> +AAG ve <i>MseI</i> +CAT primer kombinasyonunun meydana getirdiği polimorfizm.....	63
Şekil 4.4. Susamda kapalı kapsüllülük mutant karakterine bağlı AFLP markeri.....	66
Şekil 4.5. Susamda yapılan RAPD analizlerinde meydana gelen polimorfizm örneği.....	72
Şekil 4.6. DNA miktarının 1 µl'ye çıkartılmasıyla elde edilen temiz RAPD profili.....	73
Şekil 4.7. Susamda kapalı kapsüllülük mutant karakteri ile ilişkili olabilecek RAPD markeri.....	75
Şekil 4.8. Kapalı kapsüllülük mutant karakteri ile ilişkili olan RAPD markerinin bulguları meydana getiren bireysel DNA'larda kullanılması.....	76

ÇİZELGELER DİZİNİ

- Çizelge 3.1. Susamda kapalı kapsüllülük mutant karakterine bağlı moleküler markerler belirlemede kullanılan seçici AFLP primer kombinasyonları.....37
- Çizelge 4.1. Kapalı kapsüllülük özelliği için açılım gösteren Mug x cc3 populasyonundaki bireylerin F₃ açılım oranları.....70

1. GİRİŞ

Moleküler markerler agronomik olarak önemli özelliklerin genetik analizlerinde iyi bir araç olarak kabul edilmektedir. Bir ıslah programının kullandığı yöntem ne olursa olsun genel olarak kabul edilen prosedür, genetik ilerlemenin sağlanabilmesi için yapılan seleksiyonun mümkün olduğunca erken dönemlerde gerçekleştirilmesidir. Dolayısıyla büyük tarla denemelerinden ve buna bağlı olarak girdilerin azaltılmasından bahis etmek mümkün olabilmektedir. Bu noktada moleküler markerlerin bitki ıslahındaki rolü önem arz etmektedir. Ancak moleküler markerlerin normal gözlem prosedürlerinin ya da klasik bitki ıslahı yöntemlerinin yerini almasından söz edilemez. Yeni ıslah stratejileri geliştirmede veya mevcut programları hızlandırmada markerler etkin bir kaynak olarak değerlendirilebilir. Nitekim moleküler markerler, marker yardımıyla seleksiyon yaklaşımı içerisinde fenotipik seviyeden çok genotipik seleksiyon yapma imkanı sağlayarak, fenotipin genotipe tekabül etmediği durumlarda etkin bir zaman kazandırma mekanizması olarak karşımıza çıkmaktadır.

Marker yardımıyla seleksiyon gibi ister markerlerin bitki ıslahında direkt kullanımı olsun isterse geri melezlemenin hızlandırılması, dayanıklı genlerin bir araya toplanması, kantitatif genlerin analizi, hibridlerin belirlenmesi gibi indirekt kullanımları olsun (Langridge vd 1996), moleküler marker uygulamalarının ülkemiz açısından üzerinde durulacak en önemli noktası, maliyet ve uzman personel olarak nitelendirilebilir. İlgilenilen agronomik karakter(ler)in ekonomik önemi ve alternatif seleksiyon tekniklerinin var olup olmadığı değerlendirmeye tabi tutulduktan sonra moleküler marker kullanımına karar verilmelidir. Zira moleküler marker sistemlerinin kuruluş maliyetleri kadar, işletim maliyetleri de oldukça yüksektir.

Susam (*Sesamum indicum* L.) Hindistan ve Çin başta olmak üzere dünyanın birçok yerinde kültürü yapılan tropik ve subtropik karakterde tek yıllık bir yağ bitkisidir. Dünyada 6.419.371 hektar alanda ekimi yapılan susamın başlıca üreticileri 1.673.200 ha ile Hindistan ve 700.882 ha ile Çin ilk sıralarda yer almaktadır. (Anonymous 2001). Ülkemizde ise susam, 27 bin tonluk üretimini 68.000 ha. alandan sağlamaktadır.

Vejetasyon süresinin kısa olması susamın ülkemizde ikinci ürün bitkisi olarak kullanımına imkan vermektedir. Ancak susamın eski bir kültür bitkisi olmasına rağmen, aşağıdan yukarıya doğru olgunlaşma karakterinde olması ve hasat zamanı kapsüllerinin çatlaması, hasat-harman işlemlerinin tamamen el ile yapılmasına neden olmaktadır. Kapsüllerinin çatlaması nedeniyle makinalı hasatının mümkün olmaması, susamın diğer ikinci ürün bitkileriyle rekabet etme şansının gün geçtikçe azalmasına yol açmaktadır.

Susamın kendi doğal yapısından kaynaklanan bu olumsuz özelliği gidermede ve yoğun tarıma elverişli susam çeşitlerinin ıslahında, yapay olarak ilk kez elde edilen kapalı kapsüllü susam mutantları (Çağırğan 1996, 1997) umut vericidir. Ancak, kısmi kısırlık, kısa kapsül ve düşük verim gibi pleiotropik etkilerin, meydana getirilen mutasyona eşlik etmesi kapalı kapsüllü mutantlar üzerinde değişik ıslah programlarının başlatılmasını gerekli kılmıştır. Yürütülen klasik ıslah programlarına ileri moleküler marker tekniklerinin eklenmesi, makinalı tarıma elverişli susam mutantlarının uygulamaya aktarılmasına çok yönlü ivme kazandırması beklenmektedir.

1990 yılında PCR'a dayalı RAPD (Williams vd 1990, Welsh ve McClelland 1990) markerinin geliştirilmesiyle moleküler genetik ve ıslah alanında birçok ilerlemeler kaydedilirken, RAPD'in dezavantajlarını gideren ve RFLP'nin güvenilirliğini katan diğer bir PCR'a dayalı teknik AFLP (Zabeau ve Vos 1993, Vos vd 1995)'nin geliştirilmesi, bu alanda yapılan çalışmaların büyük bir ivme kazanmasını sağlamıştır. Genetik çeşitliliğin tespiti, yüksek yoğunlukta genetik haritaların oluşturulması ve agronomik olarak önemli özelliklere bağlı moleküler markerler belirleme gibi değişik amaçlarda AFLP analizi kullanım alanı bulurken, birçok genusta da denenmiştir.

Bu araştırmada marker yardımıyla seleksiyon yaklaşımına uygun olarak, susamın makinalı hasatının yapılmasına imkan veren kapalı kapsüllülük mutant karakterine bağlı moleküler markerlerin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu gaye doğrultusunda, ileri moleküler marker teknolojisi olan AFLP, susam genusunda ilk defa kullanılmış ve yine ilk defa susamda bir karaktere bağlı moleküler marker belirlenmiştir. Ayrıca, AFLP ve RAPD teknolojileri susam bitkisine başarıyla adapte edilmiştir.

2. KURAMSAL BİLGİLER VE KAYNAK TARAMALARI

Nayar (1984), arkeolojik bulgulara dayanarak susamın bugünkü Suriye ve Ürdün ülkelerinin bulunduğu bölgelerde, yaklaşık M.Ö 3000 yılında kültüre alındığını ve susamın büyük bir varyasyon gösterdiğini belirtmiştir. Demir (1962) de, Sanskrit lisanında susam ile yağın aynı kelime ile ifade edilmesini dayanak göstererek, susamın insan tarafından ilk olarak tanınan ve kültüre alınan bir yağ bitkisi olduğunu desteklemiştir.

Susam çok eski bir kültür bitkisi olmasına rağmen, orijin merkezi kesin olarak bilinmemektedir (Ashri 1998). Hiltebrandt, Burkill, Dalziel ve Portères gibi eski yazarlar susam türlerinin üçte ikisinin Afrika'da yer almasına ve ekonomik olarak susamın bu kıtada baskın olmasına dayanarak, susamın orijini olarak Afrika'yı göstermişlerdir (Nayar 1984). Aynı şekilde Weiss (1983), susamın Afrika'dan orijin aldığını ve Batı Asya üzerinden Hindistan, Çin ve Japonya'ya yayıldığını ve bu bölgelerin ikincil yayılma merkezleri olduğunu ifade etmiştir.

Temel olarak gelişmekte olan ülkelerin bitkisi olan susam, çok eski bir kültür bitkisi olmasına rağmen ıslahında hala kat edilecek büyük mesafeler bulunmaktadır. Ayrıca kapalı kapsüllülük ve hastalıklara dayanıklılık gibi oldukça aranan özellikler, susamın geniş bir varyabilitiye sahip olmasına rağmen doğal olarak mevcut değildir (Ashri 1998). Susamın bu tür ihtiyaçları mutasyon ıslahı projelerinin başlatılmasına temel teşkil etmiştir (Anonymous 1994, 1996). Bu projeler kapsamında agronomik olarak önemli olabilecek birçok mutant genotip elde edilmiştir. Bunlar içerisinde gamma ışınlarıyla yapay olarak bulunan kapalı kapsüllü mutantlar, susamın makinalı hasatının yapılabilmesi bakımından büyük bir potansiyele sahiptir (Cagirgan 1996, 1997) ve aranan özelliklerin başında gelmektedir.

Birçok kültür bitkisinde moleküler marker teknolojileri geniş bir kullanım alanına sahipken, susamda henüz başlama dönemindedir. 1999 yılında, 58 farklı susam genotipinin RAPD markerleriyle moleküler düzeyde genetik farklılıklarının belirlenmesi

dışında (Bhat vd 1999), susamla ilgili DNA düzeyinde yayınlanmış bir makale bulunmamaktadır. Bununla birlikte, 68 farklı kültürü yapılan susam çeşitlerinin varyasyonunu belirlemek için bir izoenzim çalışması (Isshiki ve Umezaki 1997) ve susam tohumlarından genomik DNA izolasyonunu sağlayan bir protokol (Chung vd 1998) literatürde yer almaktadır.

1953 yılında DNA'nın çift sarmallı moleküler yapısının ortaya çıkarılmasıyla (Watson ve Crick 1953) hızlı bir ivme kazanan moleküler genetik, DNA'nın belki de en önemli fonksiyonu olan kendi replikasyonunu yapma yeteneğini sağlayan DNA polimeraz enziminin 1960 yılında keşfedilmesiyle (Kornberg 1960) yap-boz gibi bir oyun haline gelmiştir. Bitki ıslahında DNA olanaklarından asıl faydalanma ise PCR aletinin ve buna dayalı RAPD (Williams vd 1990, Welsh ve McClelland 1990) ve AFLP (Zabeau ve Vos 1993, Vos vd 1995) moleküler marker tekniklerinin geliştirilmesiyle başlamıştır.

2.1. AFLP İle İlgili Bilgiler

Zabeau ve Vos (1993), bitki ve hayvan ıslahında, çeşit teşhisinde, diagnostik tıpta, hayvan ve bitki hastalıkları teşhisinde, genetik kalıtım ile geçen insan hastalıklarının belirlenmesinde, aile akrabalıklarını analizlemede ve mikrobiyal belirlemede olmak üzere birçok alanda DNA markerlerinin kullanımı ve DNA parmak izi uygulamalarıyla ilgili bir icat olarak Selective Restriction Fragment Amplification (SRFA) tekniğini 1993 yılında ortaya koymuşlardır. Bu teknoloji, RFLP ve PCR tekniklerini birleştirirken, dezavantajlarını ortadan kaldırmaktadır. Teknik; restriksiyon endonükleazları ve bu endonükleaz enzimleriyle kesilen fragmentlere sentetik oligonükleotidlerin ligasyonunu ve sonuçta elde edilen fragmentlerin PCR ile çoğaltılmasını öngörmektedir. 1993 yılında SRFA tekniğini bir patent başvurusu (yayın no: EP 0534858) ile ortaya koyan araştırmacılar, 1995 yılında yine aynı araştırmacıların öncülük ettiği bir grup tarafından (Vos vd 1995) yayınlanan "AFLP: a new technique for DNA fingerprinting" adlı makaleyle, DNA düzeyindeki bu analiz yönteminin tanınması ve birçok alanda yaygın olarak kullanılması başlamıştır. Vos vd (1995), AFLP analizini, (i) genomik DNA'nın restriksiyon enzimleriyle kesimi ve oligonükleotid adaptörlerle bağlanması, (ii) kesilen

fragmentlerin seçici amplifikasyonu ve (iii) çoğaltılan fragmentlerin jel analizi şeklinde üç ana kısma ayırmışlardır. Kalıp DNA'larının kesim bölgeleri ve adaptörlerin sekansları, PCR primerlerinin hedef DNA'ya yapışması için kullanılmıştır. Seçici amplifikasyon ise sekansları bilinen bu bölgelerle aynı sekansa sahip primerlerin kullanılmasıyla gerçekleştirilmiştir. Böylece, nükleotid sekansı bilinmeden kesilen fragmentlerin PCR ile görülmesi, bu metod sayesinde başarılmıştır.

Mohan vd (1997), AFLP analizinin henüz haritalama çalışmalarında geniş bir şekilde kullanılmadığını belirtirken, polimorfik markerler belirlemek adına yaygın olarak kullanıldığını ifade etmektedir. Aynı zamanda, AFLP'nin RFLP ve RAPD markerleriyle karşılaştırıldığında, yüksek oranda polimorfizm vermesi ve tekrarlanabilmesi nedeniyle çok etkili bir teknik olduğunu belirtmişlerdir. Hansen vd (1999), AFLP analizinin DNA izolasyonundan değerlendirmeye kadar tüm aşamalarında yapılan toplam 5088 kıyaslamada % 97.6 oranında tekrarlanabilirlik sağladığını, güvenilirliğini belirlemede kullanılan 3160 ayrı polimorfizmde ise % 0.2 genotipik hata oranı bulunduğunu bildirmişlerdir. Bu sonuçları destekler nitelikte Jones vd (1997) de, RAPD, AFLP ve SSR marker tekniklerinin tekrarlanabilirliklerini belirlemek amacıyla sekiz ayrı laboratuvar arasında yaptıkları deneylerde, AFLP'nin çok yüksek oranlarda tekrarlanabilir olduğunu göstermişlerdir. RAPD tekniğinin ise tekrarlanabilirliğinin 50 RAPD primerinde % 75 olduğunu ancak analizlerinin gerçekleştirilmesinde büyük kolaylık olduğunu vurgulamışlardır. Aynı şekilde, Lin vd (1996a), soyada moleküler markerler belirlemek üzere RFLP, RAPD ve AFLP tekniklerini kıyaslamalı olarak kullandıkları araştırmada, yüksek oranda tekrarlanabilirlik ve belirlenebilir AFLP polimorfizmlerinin yüksek frekanslarda bulunması gibi nedenlerle, AFLP DNA analizinin linkajeler ve polimorfizmler belirlemede cazip bir teknik olduğunu ifade etmişlerdir.

Becker vd (1995), farklı DNA markerlerinin spesifik avantajları ve dezavantajları olduğunu, AFLP marker analizinin RAPD analizleri kadar kolay olmadığını ancak PCR'a dayalı olmayan RFLP ve genom sekans bilgisi gerektiren mikrosatellit kullanımından daha etkili olduğunu belirtirken, haritaya dayalı gen izolasyonu çalışmalarında AFLP markerlerinin RAPD, RFLP ve mikrosatellit tekniklerine göre tek kolon üzerinde çok

daha fazla polimorfik band ortaya çıkarma kapasitesi olduğunu bildirmişlerdir. Bununla birlikte, arpa haritalama populasyonlarında AFLP polimorfizm oranının (% 11.3), genomik klon (% 27.8) ve cDNA klonlarından (%15.8) elde edilen RFLP polimorfizm oranlarından düşük olduğunu ve bu küçük veriler göz önüne alındığında AFLP'nin çok yüksek polimorfizm oranları vermediğini, ama jel başına aynı anda birçok band vermesi yönüyle yüksek oranda etkili bir teknik olduğu ifade edilmiştir. Kasha (1996), AFLP'nin bir tek jelde çok sayıda band ortaya çıkarmasıyla moleküler haritalar geliştirmede hızlı bir teknik olduğunu belirtmiştir. Aynı şekilde Ridout ve Donini (1999), AFLP'nin çok güçlü ve güvenilir bir teknik olduğunu ancak ortaya çıkarılan polimorfizm seviyesinin RFLP ve mikrosatellit tekniklerinkinden daha az olduğunu söylerken, aynı anda çok sayıda polimorfik lokusu analizleme yeteneği olması nedeniyle bahis edilen tekniklerden daha iyi bir yere sahip olduğunu bildirmişlerdir. Eun vd (1998) de, arpada yaptıkları çalışmalarında aynı görüşü destekleyecek şekilde AFLP polimorfizm oranının RFLP markerlerine göre çok düşük olduğunu, buna karşın jel başına birçok bandın aynı anda analizlenmesi nedeniyle çok etkili bir analiz olduğunu ifade etmişlerdir.

Russell vd (1996), RFLP, AFLP, SSR ve RAPD markerleri kullanarak 18 farklı arpa genotipindeki genetik varyasyon seviyelerinin karşılaştırılmasını içeren çalışmalarında; kullanılan dört farklı marker tipinin yalnızca teknik yönden değil, elde edilen polimorfizm miktarı ve seviyesi bakımından da büyük farklılıklar gösterdiğini ortaya koymuşlardır. Çalışmalarında, 6 AFLP primer kombinasyonunun 297 fragment, 114 probe ve enzim kombinasyonunun 299 RFLP fragmenti, 13 SSR primerinin 70 farklı alleli ve 25 tane 10 merlik RAPD primerinin 109 fragment oluşturduğunu bildirmişlerdir. Bununla birlikte, 13 SSR primerinin tamamı polimorfik bulunurken, AFLP fragmentlerinin % 54'ü (158) monomorfik çıkmıştır. Sonuç olarak SSR'in en polimorfik marker sistemi olduğu ancak genetik akrabalıkları belirlemede yararlı olmadığı, RFLP marker sisteminin uygun olmasına rağmen çok sayıda probe ve enzim kombinasyonun gerekli olduğu ve her iki marker sisteminin sekans bilgisi gerektirmesi nedeniyle, AFLP ve RAPD tekniklerinin genetik akrabalıkları belirlemede özellikle kullanılabileceğini rapor etmişlerdir.

Karp vd (1996), son dönemde geliştirilen AFLP analizinin RFLP ve PCR tekniklerini uzlaştırdığını ve RFLP kadar tekrarlanabilir olduğunu belirtirken, RAPD analizine göre teknik olarak daha fazla ekipman ve bilgiye ihtiyaç olduğunu ve daha fazla DNA konsantrasyonunun gerekli olduğunu bildirmişlerdir. Fakat jel başına RAPD'in 20 katı kadar band vermesi bakımından haritalama, fingerprinting ve genetik uzaklık analizleri için iyi bir teknik olduğunu ifade etmişlerdir.

Lin vd (1996b), AFLP'nin bakteri DNA'ları gibi 100 kb kadar küçük DNA fragmentlerini analizleyebileceğini *Escherichia coli* ve *Agrobacterium tumefaciens* ırklarında yaptıkları analizlerde göstermişlerdir. Ayrıca, *A. tumefaciens* ırklarından elde edilen AFLP polimorfizmlerinin Ti plasmid DNA yerine bakteri kromozom DNA'sına bağlı olmasının, fenotipik belirlemeden çok moleküler analizleme imkanı verdiğini belirtmişlerdir. Janssen vd (1996), bakteri taksonomisinde AFLP'nin bir araç olarak kullanılmasında etkinliğini belirlemek üzere yaptıkları çalışmalarında, AFLP'nin birbirine çok yakın bakteri strainlerinde dahi farklılıkları ortaya çıkarmada üstün ayırıcı özelliği olduğunu kanıtlamışlardır.

AFLP analizi, fragmentlerin görülebilmesi için genel olarak primerlerin radyoaktif olarak işaretlenmesini gerektirmektedir. Bu tür görüntüleme sisteminin zararlarından kaçınmak için değişik yöntemler geliştirilmiştir. Lin vd (1999), radyoizotopik yöntem gerektirmeyen "chemiluminescent" yoluyla görüntüleme tekniğini önermiştir. Bu teknikte, poli akrilamid jel üzerinde yürütülen AFLP ürünleri bir naylon membrana blotlama ile aktarıldıktan sonra, alkalın fosfotaz ile hibridize edilmekte ve fragmentler chemiluminescence ile ortaya çıkarılmaktadır. Araştırmacıların radyoaktif olarak işaretli primerlerle ve chemiluminescent yoluyla görüntüleme arasında farklılık olup olmadığını belirlemek amacıyla yaptığı çalışmalarda, hem basit hem de kompleks genomlarda AFLP profilinde herhangi bir farklılık oluşmadığı bildirilmiştir. AFLP'de radyoaktif işaretlemeyen (^{32}P ya da ^{33}P) kaçınmada diğer bir teknik olarak karşımıza "gümüşle boyama" çıkmaktadır (Chalhoub vd 1997). Çalışmada, gümüşle boyama ve radyoaktif işaretleme ile elde edilen AFLP profilleri arasında fark olmadığı ifade edilmiştir. Gümüşle boyamanın en büyük avantajının ise, AFLP analiz jellerinin uzun süre saklanabilmesi ve

gerektiğinde ilgili fragmentlerin jelden klonlanması olarak bildirilmiştir. Flüorışı ışığa bağlı yarı otomatik (GeneScan™) AFLP analizi (Schwarz vd 2000) ve kırmızı ötesi (IRD) ışınlarına bağlı tam otomatik (LiCor) AFLP analizleri (Qiu vd 2001) ise en kolay yöntemler olarak görünmektedir.

AFLP metodunun diğer bir modifikasyonu olarak Suazo ve Hall (1998)'un bal arılarında yaptıkları çalışma örnek gösterilebilir. Vos vd (1995)'nin geliştirdiği AFLP analizini biraz kolaylaştırmayı ve bal arıları için optimize etmeyi amaçlayan modifikasyon; (i) DNA'nın kesilmesi ve adaptörlerin eklenmesi bir tek reaksiyonda, (ii) iki restriksiyon enzimi yerine bir enzim, (iii) iki ayrı PCR reaksiyonu yerine bir reaksiyon, (iv) poli akrilamid jel elektroferezi yerine agaroz-Synergel ve (v) işaretli primerler yerine ethidium bromidli görüntüleme olarak bildirilmektedir.

Öte yandan Okano vd (1998), AFLP'nin seçici amplifikasyon aşamasında çoğunlukla primerle, kalıp DNA arasında tek bazlık yanlış eşleşmelerin meydana geldiğini rapor etmişlerdir. Seçici primerin 3' ucunda bir ya da üç ilave bazla meydana getirilen polimorfizmlerin her bir fragmenti ayırt etmede yeterli olmadığını ve dolayısıyla yanlış pozitif sonuçların ortaya çıktığını belirten araştırmacılar, suni olarak tek bazda meydana getirdikleri yanlış eşleşmeyle bu duruma açıklık getirmeyi planlamışlardır. Yanlış pozitif amplifikasyonları önlemek için 66 °C'de yapılan PCR reaksiyonları sonucunda; AA, AI, TA ve TI seçici bazlarına sahip primer konsantrasyonlarının diğer baz gruplarını içeren primerlerden üç kat daha fazla olduğu görülmüştür. Sebep olarak, anılan bazların T_m değerlerinin diğerlerinden düşük olması gösterilmiştir.

Cervera vd (1996), Kavak ağacının yapraklarında ortaya çıkan pas hastalığına (*Melampsora larici-populina*) bağlı üç ayrı AFLP moleküler markeri belirlemişlerdir. Pas hastalığına dayanıklı *Populus deltoides* ile hassas *P. nigra* melezinden elde edilen açılan populasyon, araştırmannın genetik materyalini teşkil etmiştir. Dayanıklılığın tek bir dominant lokus (*Mer*) tarafından idare edildiği, açılma oranlarından belirlenmiştir. Bu lokusa bağlı moleküler markerler belirlemede AFLP ve Bulk Segregant Analiz yöntemleri kombine edilmiş ve 114 primer kombinasyonu sonucu taranan 11500 DNA

fragmentinden, üçünün *Mer* lokusuna sıkıca bağlı olduğu bulunmuştur. AFLP analizinin, Bulk Segregant Analizi ile kombine edildiği diğer bir araştırma, Bai vd (1999)'nin buğdayda *Fusarium graminearum* mantarına karşı dayanıklılığı sağlayan kantitatif özellik lokusuna bağlı AFLP markerleridir. Yapılan analizlerde primer kombinasyonlarından yirmisinin en azından bir polimorfik band verdiği bulunmuştur. Bu kombinasyonların 133 rekombinant inbred hatta test edilmesiyle, 11 kombinasyonun önemli derecede QTL lokusu ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. Ni vd (2001)'de, çeltikte sap çürüklüğü (*Sclerotium oryzae*) hastalığına bağlı AFLP markerleri belirlemede 900 primer kombinasyonu denemişler ve bir kombinasyonun kök çürüklülüğüne dayanıklılıkla önemli ilişkisinin olduğunu belirtmişlerdir.

Genger vd (2000), arpada mantarı hastalık olan *Rhynchosporium secalis* patojenine dayanıklılık genine bağlı AFLP markerlerini bulk segregant analizi yardımıyla belirledikleri çalışmalarında, 64 AFLP primer kombinasyonu kullanmış ve birçok polimorfizm kayıt etmişlerdir. Elde edilen polimorfizmlerden dördü, PCR'a dayalı markerler elde etmek üzere klonlanmış ve sekanslanmıştır. Bulkları meydana getiren bireylerin, sekans bilgisine göre dizayn edilen PCR primerleri ile denemesi sonucunda bir markerin, AFLP markeri ile aynı polimorfizmi verdiği bildirilmiştir.

Jin vd (1998), yakın izogenik ve rekombinant inbred hatlar kullanarak yulafta, arpa sarı cücelik virüsüne tolerans sağlayan lokusa bağlı markerler bulmak ve haritalama yapmak amacıyla kullandıkları AFLP analizinde, üç büyük kantitatif lokus (QTL) belirlemişlerdir. A, E ve C olarak adlandırdıkları lokuslardan A ve E iki ayrı yılda da tolerans eksprese etmiştir. C lokusunun ise, çevre şartlarına daha hassas olduğu ortaya çıkmıştır. Turuspekov vd (2000) ise, buğdayda yaprakların kıvrılmasıyla gelen şiddetli kış şartlarına dayanıklılığı incelemede, AFLP ve bulk segregant analiz tekniklerinden faydalanmıştır. 48 AFLP primer kombinasyonunun denendiği çalışmada, beş markerin yaprak kıvrıklılığı özelliğine bağlı olduğu tespit edilmiştir. Belirlenen markerlerin 96 double-haploid hat üzerinde araştırılması sonucunda, üç markerin 4AS kromozomu, iki markerin ise 5B kromozomu üzerinde yer aldığı bulunmuştur. Dolayısıyla, iki büyük genin bu özelliği idare ettiği bildirilmiştir.

Pongam vd (1998), kolzada *Leptosphaeria maculans* hastalığına avirülens olan *alm1* genine yakın AFLP markerleri belirlemişlerdir. Genetik haritalama sonucunda, *alm1* avirülens lokusa 3.1 cM uzaklıkta AC/TCC-1 ve 8.1 cM uzaklıkta AC/CAG-5 olmak üzere iki farklı AFLP markeri tespit edilmiştir. "Gen için gen" teorisi *Leptosphaeria-Brassica* sisteminde, AFLP analizine dayalı olarak desteklenmiştir.

Bradshaw vd (1998), otuzdokuz AFLP primer kombinasyonun 3173 tetraploid patates lokusunu taramasına imkan verdiğini, bu lokuslardan 1066 tanesinin popülasyonla birlikte açıldığını ve 573'ünün ise istenilen doğrulukta gerçekleştiğini, *Globodera pallida* hastalığına dayanıklılık lokusunu belirlemek için yaptıkları çalışmalarında ifade etmişlerdir.

Birçok genetik analizde AFLP tekniğinin kullanımının yaygın olmasına karşın, AFLP fragmentlerin klonlanması ve başka bir marker tipine dönüştürülmesi konusunda yeterli araştırma bulunmamaktadır (Shan vd 1999). AFLP'nin başka bir marker sistemine dönüştürülmesinin temel avantajı, maliyetinin az olması ve büyük popülasyonlara rahatlıkla uygulanabilmesi olarak görülmektedir. Shan vd (1999), buğday ve arpada AFLP fragmentlerinin klonlanması ve sekansı bilinen spesifik primerlere dönüştürülmesinin fizibilitesini belirlemek için yaptıkları araştırmalarında, buğdayda AFLP markerlerinin yeterince etkili olmadığını belirtmişlerdir. Buna karşın, havuçta karoten birikimini sağlayan Y_2 lokusuna bağlı AFLP markerleri; basit yapıda, kodominant ve radyoaktif kullanım gerektirmeyen PCR'a dayalı marker tiplerine dönüştürülmüştür (Bradeen ve Simon 1998). Benzer şekilde Paltridge vd (1998), arpa sarı cücelik virüsüne karşı dayanıklılığı sağlayan *Yd2* genine bağlı olan AFLP markerlerini, kodominant PCR markerlere dönüştürmüşler ve programlarında kullanmışlardır.

Lu vd (1999), EAA/MCA10 AFLP markerinin şeftalide kök nematodları olan *Meloidogyne incognita* ve *M. javanica*'ya karşı dayanıklılık markeri olduğunu ve marker yardımıyla seleksiyon yaklaşımını başlatmak için bu markerin klonlandığını, sekanslandığını ve STS (sequence tagged sites) markerlerine başarıyla dönüştürüldüğünü bildirmiştir. Yine, Reamon-Büttner ve Jung (2000), basit, hızlı ve PCR'a dayalı olarak

kuşkonmazda dişi ya da erkek bireylerin belirlenebilmesi için, önceden belirlenen bağlı AFLP markerlerini STS markerlerine dönüştürmüşlerdir. Araştırmacılar, erkek/dişi kuşkonmaz bireylerin PCR'a dayalı STS markerleriyle belirlenmesinin fizibil olduğunu bildirmişlerdir.

AFLP tekniğinin, genetik çeşitliliği analizlemede de güçlü bir araç olduğu bildirilmektedir (Ellis vd 1997). AFLP'nin güvenilir ve güçlü olmasına rağmen, genetik akrabalıkları belirlemede kaç tane markere ihtiyaç duyulduğu konusunda az bilgi bulunmaktadır. Ellis vd 1997'ye göre genetik akrabalıkları tahminlemede gereken bilgi miktarı, kullanılan primer sayısı ile orantılı gözükmektedir. Seçilen en iyi 6 AFLP primer kombinasyonu, araştırmacılara göre % 80 oranında ilişkiyi belirleme imkanı sağlamaktadır.

Hill vd (1996), *Lactuca* alt türleri arasındaki filogenetik ilişkileri belirlemede kullandıkları AFLP tekniğinin güvenilir ve genetik tabanı dar genotipleri dahi ayırmada güçlü olduğunu ifade etmişlerdir. Kültürü yapılan *L. sativa*'nın 44 hattı ile *L. serriola*, *L. saligna*, *L. virosa*, *L. perennis* ve *L. indica* yabancı türlerinin 13 genotipi arasındaki genetik farklılığın tespiti amacıyla AFLP markerleri kullanılmıştır. AFLP'nin sadece üç primer kombinasyonu, taranan 57 genotipte toplam 320 polimorfik lokus belirlenmesine imkan vermiştir.

Mısır bitkisinde genetik çeşitliliği belirlemek ve buna bağlı olarak hibrid performansları iyi olabilecek hatları tahminlemek için AFLP ve RFLP marker tekniklerinin kullanıldığı diğer bir çalışmada, kendilenmiş hatlarda yüksek miktarda RFLP ve AFLP markerleriyle ortaya çıkarılan varyasyonlar elde edilmiştir. RFLP ile kıyasığında AFLP'nin daha etkin polimorfizmler meydana getirdiği, tek bir analizde çok sayıda lokusun taranmasına bağlanmıştır. Sonuçta AFLP teknolojisinin, genetik varyasyonu tahlil lemede güvenilir ve etkili ortalamalar sunduğu ve mısır hibridlerinin heterozis performansını tahminlemede pratik kullanımı olduğu belirtilmiştir (Ajmone Marsan vd 1998).

Hongtrakul vd (1997), ayçiçeği germplazmalarında genetik farklılıkları belirlemede kullandıkları AFLP teknolojisini, analiz başına RFLP'den daha fazla polimorfik marker üreten ancak sonuçları dominant olan bir marker olarak nitelendirmişlerdir. Bununla birlikte, densiyometre kullanılarak allel dozlarının tahminlenmesinin mümkün olduğu, dolayısıyla homozigot ve heterozigot bireylerin ayırt edilmesinde rahatlıkla kullanılabilceği bildirilmiştir.

Hartl ve Seefelder (1998), sekiz ayrı şerbetçiotu çeşidinde genetik farklılıkları AFLP markerleri ile belirlemişlerdir. Şerbetçiotu çeşitleri arasında genetik benzerlik oldukça yüksek bulunurken, en yüksek farklılık küf hastalığına dayanıklı "wye target" ile diğer varyeteler arasında belirlenmiştir. Benzer şekilde, 19 ayrı *Arabidopsis thaliana* ekotipinde genetik çeşitliliği tahmin etmede kullanılan AFLP analizinden, 471 ayrı polimorfizm elde edilmiş ve bu verinin kullanılmasıyla üç ekotipin diğerlerine göre belirgin genetik çeşitlilik gösterdiği bulunmuştur (Erschadi vd 2000).

Srivastava vd (2001), Asya, Avustralya, Kanada, Doğu Avrupa ve Rusya'dan orijin alan 21'i doğal ve 9'u sentetik *Brassica juncea* varyete ve hatlarında genetik farklılığı AFLP markerleriyle tespit etmişlerdir. 21 AFLP primer kombinasyonu 30 genotipte 1251 fragment üretirken, primer çifti başına 37 polimorfik band olmak üzere, 778 polimorfik band elde edilmiştir. Benzerlik katsayılarına göre yapılan cluster analizinde, 30 *B. juncea* hattı üç ayrı cluster'a ayrılmıştır. Hindistan, Çin ve önceden geliştirilen sentetik çeşitler bir cluster (cluster A), son dönemde geliştirilen sentetikler ayrı bir cluster (cluster B), Avustralya, Kanada, Doğu Avrupa ve Rusya orijinli hatlar ise üçüncü clusterı (cluster C) meydana getirmişlerdir.

Abdalla vd (2001), diploid *Gossypium herbaceum* L., *Gossypium arboreum* L. ve *Gossypium raimondii* Ulbrich ile allotetraploid *Gossypium barbadense* L. ve *Gossypium hirsutum* L. türleri arasındaki genetik ilişkileri açıklamada 16 AFLP primer kombinasyonundan faydalanmışlardır. 1180 AFLP bandından 368'inin polimorfik olduğu analizlerde genetik benzerlikler 0.21 ile 0.89 arasında değişmiştir. Buna karşın, Pillay ve Myers (1999), eski ve yeni dünya pamuk türleri arasındaki genetik çeşitliliği ribozom

RNA'larındaki varyasyondan faydalanarak yaptıkları AFLP analizlerinde türler içi bir polimorfizm bulunmadığını belirtirken, *G. hirsutum* ve *G. barbadense* ile *G. arboreum* ve *G. herbaceum* arasında farklar belirlemişlerdir.

Ovesna vd (2000), 69 arpa yerel populasyon ve çeşidinde, varyete profillerinin ve genetik çeşitliliğinin belirlenmesinde AFLP ve SSR markerlerinden yararlanmışlardır. 123 AFLP primer kombinasyonunun ve 27 SSR markerinin analizlendiği çalışmada, 1872 polimorfik band elde edilmiştir. 12 AFLP primer kombinasyonunun modern arpa çeşitlerini ayırt etmede yeterli olduğunu ifade eden yazarlar, AFLP'nin SSR'a göre daha kaliteli DNA istediği ve analizlerinin daha zaman alıcı olduğunu rapor etmişlerdir.

Ayele ve Nguyen (2000), *Eragrostis tef*, *E. pilosa* ve *E. curvula* türleri arasında ve bu türlere ait genotipler arasında genetik çeşitliliği belirlemede AFLP tekniğini kullanmışlardır. 10 primer kombinasyonundan 630 AFLP markeri tespit edilirken, bunlardan %58'i (368) polimorfik olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre üç tür kesin sınırlarla birbirinden ayrılmıştır. Türler arasında genotipler içerisindeki çeşitliliğe bakıldığında, *E. pilosa* en farklı bulunurken onu *E. curvula* ve *E. tef* takip etmiştir.

He ve Prakash (1997), yerfıstığında DNA polimorfizmlerine bağlı olarak genetik varyasyonu tespit etmek amacıyla DNA fingerprinting (DAF) ve AFLP tekniklerini kullanmışlardır. Polimorfik DNA markerleri tespit etmek adına AFLP yaklaşımının % 43, DAF yaklaşımının ise % 3'lük bir katkı sağlaması, AFLP'nin genetik varyasyonu belirlemede yerfıstığı bitkisinde de etkin bir teknik olduğunu göstermiştir. AFLP'nin yüksek sayıda polimorfizmler belirlemesi nedeniyle DAF'a göre üstün olduğu belirtilmesine rağmen, yerfıstığında elde edilen polimorfizm miktarının diğer genoslara göre az olduğu araştırmacılar tarafından bildirilmektedir. Buna neden olarak ise yerfıstığının yakın zamanda tek bir poliploidi olayı geçirmesi gösterilmektedir.

Hayes vd (1996a), coğrafik orijin, gelişme yapısı ve başak morfolojisi esas alınarak topladıkları 42 arpa genotipinde genetik çeşitliliği AFLP markerlerini kullanarak tespit ederken, Russell vd (1996), RFLP, AFLP, SSR ve RAPD markerleri kullanarak 18 ayrı

arpa genotipinde yaptıkları genetik çeşitlilik çalışmalarında, AFLP'nin en yüksek çeşitlilik indeksi verdiğini belirtmişlerdir. Talamc vd (2000) ise, 17 ayrı makarnalık ve ekmeklik buğday çeşidinde genetik çeşitliliği ortaya çıkarmak için AFLP, SSR ve RAPD tekniklerini kullanmışlar ve her bir marker tipinin oluşturduğu dendogramların kısmi farklılıklar gösterdiklerini bildirmişlerdir. Her bir marker tipinin kısmen de olsa genomun farklı bölgelerini taraması, bu duruma sebep olarak gösterilmiştir.

VanToai vd (1997), ebeveynlerden döllere geçen genom oranlarını AFLP'ye dayalı olarak tahmin etmişlerdir. Az sayıda primer çifti ile bile, ebeveynin döldeki genom oranının yeterince güvenilir olarak tahmin edilebileceğini belirten araştırmacılar, böylece ıslahçıların kendi geri melez populasyonlarındaki generasyon sayılarını azaltabileceklerini ve hatta seleksiyon, genetik kayma, tohum karışıklıkları, yabancı dölleme ve buna benzer durumlarda meydana gelen değişiklikleri takip etme fırsatı bulabileceklerini, araştırmacılar tarafından işaret edilmiştir. Yine arpada yapılan bir geri melez populasyonunda (Steptoe x BSR41 BC DH) AFLP analizi kullanılarak donör ebeveynin döllerdeki genom oranı tespit edilmiştir (Powell vd 1996). Döllerdeki donör DNA kompozisyonununun % 8 ile % 60 arasında değiştiği görülmüştür. % 8'lik değere sahip döl, geri melez çalışmasında kullanıldığında, en azından üç generasyon ilerleme kaydedildiği yazarlar tarafından bildirilmiştir.

AFLP analizinin yoğun olarak kullanıldığı alanlardan biri de yüksek yoğunlukta haritalama çalışmalarıdır. Tai vd (1999), biberde *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* bakterisine dayanıklılık sağlayan *Bs2* genini içeren bölgeyi AFLP ve RAPD markerleriyle haritalamışlardır. Haritalamada birinci basamak olarak ilgili gene bağlı markerlerin belirlenmesi olduğundan, araştırmacılar öncelikle yakın izogenik hatlar kullanarak *Bs2* genine sıkıca bağlı AFLP ve RAPD markerleri belirlemişlerdir. Yüksek yoğunlukta linkage haritaları, bulunan markere bağlı olarak geliştirilmiş ve "kromozom walking" ya da "kromozom landing" yaklaşımlarıyla, ilgili genin klonlanabileceği kaynak sağlanmıştır. Benzer şekilde gülde haritalama yine RAPD ve AFLP markerleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Debener ve Mattiesch 1999). 60 F₁ bitkisinde 305 RAPD ve AFLP markerinin analizlendiği haritalamada, petal sayısı (çift ya da tek çiçek) ve çiçek

rengi (pembe veya beyaz) iki ayrı linkage grubu olarak belirlenmiştir. Araştırmacılar, daha ileri genetik analizlerde ve marker yardımıyla ıslah yaklaşımlarında bu iki grubun önemli bir araç olacağını belirtmişlerdir. RAPD ve AFLP markerleriyle diğer bir haritalama mercimek bitkisinde yapılmıştır (Eujayl vd 1998). Uygun markerler arasında ortalama 6 cM mesafe bulunan ve mercimek genomunun 1073 cM'luk kısmını kapsayan haritada rekombinant hatlar, yüksek oranda polimorfizm kaynağı olması, biyotik ve abiyotik stresler için yüksek varyasyon göstermesi ve nispeten az oranda açılım bozukları göstermesi bakımlarından iyi bir materyal olarak işaret edilmiştir.

Sebastian vd (2000), morfolojik olarak kesin sınırlarla ayrılan iki farklı double-haploid haritalama populasyonu kullanarak AFLP ve RFLP markerlerinin kombine edildiği linkage haritasını *Brassica oleracea*'da gerçekleştirmişlerdir. 547 markerin 9 linkage grubuna ayrıldığı haritada toplam uzunluk 893 cM olmuştur. Yine soya bitkisinde yapılan haritalamada, 650 AFLP markeri 28 linkage grubunun oluşmasını sağlamıştır (Keim vd 1997). AFLP markerleriyle elde edilen haritada toplam uzunluk 3441 cM uzunluğa ulaşmıştır.

Hayes vd (1996b), arpada kışa dayanıklılıkla ilgili olan kantitatif özellikleri haritalamada AFLP analizini kullanmışlardır. AFLP'nin kısa zamanda önemli miktarlarda marker sağladığını belirten araştırmacılar, 92 hatta 249 AFLP markerini bir ay gibi bir sürede belirlemişlerdir. JoinMap programı ile ilk haritanın oluşturulmasıyla yedi ayrı linkage grubu belirlenmiştir. Haritanın güvenilirliğini artırmak için LOD değerleri 5'ten 7'ye çıkarılmış ve ayrıca linkage grubunda bulunmayan markerler değerlendirmeden çıkarılmıştır. Araştırmacılar, AFLP'nin yüksek yoğunluktaki haritalamalarda kromozomun belli bölgelerine yoğunlaşma karakterinde olduğunu ama kromozom 1, 2, 3 ve 5 üzerinde yer alan kritik boşlukları doldurduğunu bildirmişlerdir.

Kang vd (2001), RFLP ve AFLP markerlerini kullanarak *Capsicum annuum* x *C. chinese* interspesifik melezinin F₂ linkage haritasını oluşturmuşlardır. 11 büyük ve 5 küçük olmak üzere 16 linkage grubuna ayrılan harita, 1320 cM büyüklüğünde olmuştur. 30 primer kombinasyonun kullanıldığı çalışmada toplam 444 AFLP

fragmenti elde edilmiştir. Araştırmada ayrıca, *Pst*/*Mse*I markerlerinin genomu *Eco*RI/*Mse*I markerlerinden daha iyi dağıldığı tespit edilmiştir.

Nachit vd (2001), makarnalık buğdaylarda intraspesifik rekombinant inbred populasyonlar kullanarak yaptıkları moleküler linkage haritalamada RFLP, SSR, GWM (Gatersleben wheat microsattellites) AFLP ve SSP (seed storage proteins: gliadin ve glutenin) markerlerini kullanmışlardır. 138 RFLP, 26 SSR, 134 AFLP, 5 SSP ve üç bilinen genden oluşan toplamda 306 markerlik ve 3598 cM uzunluğunda bir linkage harita oluşturulmuştur. Yazarlar makarnalık buğdayda oluşturulan bu intraspesifik haritanın marker yardımıyla seleksiyonda kullanılabilir bir araç olduğunu belirtmişlerdir.

Ajmone Marsan vd (2001), mısırdaki dane verimi ve dane verimi ile ilgili kantitatif özelliklerin belirlenmesinde AFLP ve RFLP analizlerini kullanmışlardır. Marker yardımıyla seleksiyon uygulamalarında AFLP'nin hem hız hem de etkinlik bakımından RFLP'den çok daha iyi bir marker sistemi olduğunu bildiren araştırmacılar, ayrıca RFLP'nin dolduramadığı linkage grup bölgelerinin, AFLP ile kapatılabildiği belirtilmiştir. Benzer şekilde Maheswaran vd (1997), double-haploid çeltik populasyonunda AFLP markerlerinin polimorfizmi, dağılımı ve açılımını inceledikleri çalışmalarında, sadece 20 primer çiftinin 945 AFLP bandı ortaya çıkardığını, bunlardan 208'inin polimorfik olduğunu ve 12 kromozomun hepsine dağıldığını belirtirken, AFLP'nin RFLP'ye göre yüksek oranda polimorfik ve çok hızlı olduğunu belirtmiştir.

Patateste *Phytophthora infestans* mantari hastalığına dayanıklılık sağlayan *RI* lokusu AFLP ve RFLP markerleriyle haritalanmıştır (Meksem vd 1995). RFLP markerleriyle çevrelenen lokus, bulk segregant ve AFLP analiz yöntemleri kullanılarak *RI* lokusuna sıkıca bağlı markerler belirlenmiştir. Trans şeklinde bağlı AFLP markerlerini cis haline dönüştürmek için klonlanıp sekanslanan 29 AFLP fragmantinden altısında başarı sağlanmıştır.

Zhang ve Stommel (2000), domates meyvesinde β -karoten birikimini sağlayan Beta (*B*) ve Beta modifier (*MOB*) adlı iki gene bağlı AFLP ve RAPD markerleri bularak ilgili lokusları haritalamışlardır. 1018 RAPD primeri ve 64 AFLP primer kombinasyonun tarandığı çalışmada, 100 bp'lik E-ACA/M-CTG AFLP markeri ile 1100 bp'lik OPAR18 ve 830 bp'lik UBC792 RAPD markerlerinin ilgili lokuslara sıkıca bağlı olduğu ve bölgenin haritalandığı yazarlar tarafından bildirilmiştir.

Vuylsteke vd (1999), mısırdaki iki ayrı yüksek yoğunlukta AFLP linkage haritası oluşturmuşlardır. B73 x Mo17 rekombinant inbred populasyon ve D32 x D145 F₂ populasyonu olmak üzere iki ayrı populasyon üzerinde yapılan iki ayrı haritalama çalışmasında, sırasıyla 1539 ve 1355 AFLP markeri haritalanmıştır. Her iki populasyonda da AFLP markerlerinin aynı kromozom bölgelerini haritalaması, AFLP markerlerinin tek lokus markerleri olduğunu bir kez daha göstermiştir. Çalışmada ayrıca AFLP markerlerinin mısır kromozomunun sentromerik bölgelerine yığıldığı ifade edilmiştir.

Remington vd (1999) ise, AFLP markerleri kullanarak *Pinus taeda* genomunun yaklaşık tamamını kapsayan bir genetik harita oluşturmuşlardır. 21 AFLP primer çiftinden elde edilen 521 adet polimorfik fragment 12 linkage grubuna ayrılmıştır ki bu *Pinus* haploid kromozom sayısına eşittir. Yaklaşık 1700 cM uzunluğunda olan haritanın, genomu tam olarak kapsadığı araştırıcılar tarafından ifade edilmektedir. Bununla birlikte Smilde vd (1999), pırasada AFLP linkagelerinin ancak genomun üçte birini kapsayabildiğini bildirmektedirler.

Pellio vd (2000), arpa sarı mozaik virüsüne dayanıklılık sağlayan *rym5* genini AFLP ve RAPD markerleri ile haritalamışlardır. 1026 F₂ bitkisinin, 1536 AFLP primer kombinasyonu ve 1200 RAPD primeri ile analizlenmesiyle, bir RAPD ve yedi AFLP markerinin % 0.049 rekombinasyon aralığında ve *rym5* geninden % 0.880 rekombinasyon uzaklığında yer aldığı belirlenmiştir.

Arcade vd (2000), Avrupa ve Japon karaçam melezinin açılan döllerinde AFLP, RAPD ve ISSR markerlerini kullanarak bir genetik linkage harita

oluşturmuşlardır. 114 AFLP, 149 RAPD ve 3 ISSR olmak üzere toplam 266 polimorfik marker haritalamada kullanılmıştır. *Larix decidua* (Avrupa karaçamı) 1152 cM uzunluğunda 17 linkage grubuna ayrılırken, *Larix kaempferi* (Japon karaçamı) 1206 cM uzunluğunda 21 linkage grubuna ayrılmıştır. Dolayısıyla Avrupa karaçam genomunun % 79.6'sı Japon karaçamının ise % 80.8'i haritalanmıştır.

Simpson (1998), mısırdaki antezis oluşum aralığı ile kuraklığa tolerans arasında güçlü bir bağlantı olduğunu belirterek, değişik mısır hatlarını farklı su stres şartlarında hem agronomik hem de moleküler olarak analizlemiştir. 102 RFLP ve 14 AFLP primer kombinasyonunun çiçeklenmeyle ilişkili olabilecek markerler belirlemek için kullanıldığı araştırmada, toplamda 261 polimorfik band elde edilirken, moleküler ve tarla verileri ortak olarak değerlendirilmiştir. Sonuçta, çiçeklenme ve verim özellikleriyle ilişkili markerlerin oluşturduğu bir harita elde edilmiştir.

AFLP analizinin yoğun olarak kullanıldığı diğer bir durum ise, mevcut haritaların AFLP markerleriyle zenginleştirilmesidir. RFLP markerleriyle oluşturulan bir makarnalık buğday haritasına ilave edilen 80 AFLP lokusu önceki haritada bulunan boşlukları doldururken, bir boşluğun tamamen AFLP markerleriyle tamamlandığı belirtilmiştir (Lotti vd 2000). Çalışmada ayrıca, AFLP markerlerinin kromozomun belirli bölgelerinde yoğunlaşmadığı ifade edilmiştir. Eck vd (1995), AFLP markerlerinin kromozomal lokasyonlarını ve kalıtımını inceledikleri araştırmalarında, genelde AFLP markerlerinin genom üzerinde rasgele dağıldığı, ancak bazı durumlarda kromozomun belli bölgelerinde yoğunlaştığı ifade edilmiştir. Waugh vd (1996) de, araştırmalarında kullandıkları arpa populasyonlarının birinde AFLP markerlerinin çoğunlukla kromozomun sentromer bölgesinde yoğunlaştığını bildirmişlerdir.

Barcaccia vd (1998), çayır üçgülünde olan partenogenezin kalıtımını AFLP ve RAPD linkage analizi ile açıklamaya çalıştıkları araştırmalarında, apomiktik gene 6.6 cM uzaklıkta bir AFLP markeri ve 15.4 cM uzunluğunda ilgili geni içeren bir bölge belirlemeyi başarmışlardır. İlgili geni çevreleyen kromozom bölgesi ilave AFLP ve RAPD

markerleriyle haritalanarak, AFLP markerleri ile partenogenez arasında sıkı bir linkage olduğu araştırmacılar tarafından bildirilmiştir.

Talame vd (2000), ekmeklik buğdayda mevcut RFLP haritası üzerine AFLP markerlerini yerleştirdikleri çalışmalarında, en iyi polimorfizm veren 13 primer kombinasyonu, 50 rekombinant kendilenmiş hat üzerinde test edilmiş ve 81 AFLP markeri, mevcut RFLP haritası üzerine ilave edilmiştir. AFLP markerlerinin A, B, D genomlarına dağıldığı tespit edilirken, dağılışın uniform olmadığı rapor edilmiştir. 1D, 4A, 4D, 5D, 6A, 6B ve 6D kromozomlarında hiç bir AFLP markeri yer almazken, diğer kalan kromozomlara ortalama 6.3 AFLP markeri dağılmıştır.

2.2. Bulk Segregant Analizi ve RAPD İle İlgili Bilgiler

Herhangi bir gen veya genomik bölgeye bağlı moleküler markerler belirlemede hızlı bir tarama imkanı sağlayan metod, Bulk Segregant Analizi olarak anılmaktadır. İlk defa 1991 yılında Michelmores vd (1991) tarafından marul bitkisi üzerinde geliştirilen metod, temel olarak bir melezden köken alan açılan bireylerin DNA örneklerini iki zıt havuz şeklinde karşılaştırmayı öngörmektedir. Her iki zıt havuzu oluşturan bireyler ilgili gen veya özellik için özdeştir. Metodu uygulamak için sadece çalışılan özellik için açılım gösteren bir F₂ populasyonunun varlığıdır. Dolayısıyla yakın izogenik ya da rekombinant hatlar gibi oluşturulması uzun süre gerektiren populasyonlara ihtiyaç duyulmamaktadır. Michelmores vd (1991), marulda küf hastalığına karşı dayanıklılık genlerine bağlı RAPD markerleri belirledikleri çalışmalarında, F₂ bitkilerini iki gruba ayırmışlardır: Homozigot dayanıklı ve homozigot hassas (heterozigotlar projeni testi ile önceden tespit edilmiştir). Dayanıklı ve hassas bireylerin DNA'ları iki ayrı havuzda toplanmış ve RAPD primerleri kullanılarak bu iki havuz arasında polimorfizm elde etmek amaçlanmıştır. Araştırmada üç RAPD polimorfizmi belirlenmiş ve üçünün de dayanıklılık genine bağlı olduğu bulkları oluşturan bireyler üzerinde gösterilmiştir. Diğer taraftan bulk segregant analiziyle yakından ilişkili bir metod Giovannoni vd (1991) tarafından geliştirilmiştir. Bu metotta bulk DNA'lar, haritalanmış moleküler markerlerden faydalanarak oluşturulmaktadır (Kochert 1994). İlgili geni içeren ya da daha fazla marker bulunmak istenen genom

segmentinin seçildiği bu metotta, RFLP analizi ile belirlenen ilgili kromozom segmentini içeren F₂ bireyleri ile içermeyenler olmak üzere iki ayrı bulk yapılmakta ve RAPD analizleriyle ortaya çıkarılan polimorfizmler, hedef segmente lokalize olan markerleri ifade etmektedir.

Bulk segregant analiz metodu, ilgili gene bağlı marker ya da markerler belirlemede RAPD tekniği ile iyi bir ikili oluşturmuştur. İki analiz yönteminin ortak kullanıldığı birçok örnek literatürde mevcuttur. Poulsen vd (1995), arpada pas hastalığına dayanıklılık genine bağlı bir RAPD markerini bulk segregant analizini kullanarak belirlemiştir. Q21861 ile Galleon arpalarının melezinden elde edilen F₂ popülasyonu bireyleri, dayanıklı ve hassas DNA bulklarına ayrılmışlardır. DNA bulklarının RAPD primerleri ile taranması sonucu 2700 bp uzunluğunda ve ilgili gene 12 cM uzaklıkta bir RAPD markeri belirlenmiştir. Barua vd (1993) de, yine arpada *Rhynchosporium secalis* hastalığına dayanıklılık sağlayan *Rh* lokusuna bağlı RAPD markerleri belirlemiştir. 300 RAPD primerinin tarandığı çalışmada bir primerin ilgili lokusa sıkıca bağlı olduğu bildirilmiştir. Çalışmanın ileriki aşamasında 700 RAPD primeri, iki zıt bulk DNA'yı ve double-haploid ebeveyn hatlarını *Rh* lokusuna bağlı daha fazla moleküler marker belirlemede kullanılmıştır. Yedi markerin daha ilgili lokusa bağlı olduğu yazarlar tarafından belirtilmiştir.

Hormaza vd (1994), bulk segregant analizini kullanarak, antep fıstığında erkek ve dişi bireyleri fide döneminde belirlemiştir. Diösi bir bitki olan antep fıstığında eşey organlarının oluşması 5 ila 8 yılı bulmaktadır. Dolayısıyla ıslah programlarında erkek ya da dişi çiçeklerin belirlenmesi için en az sekiz yıl beklenmesi gerekmektedir. Çalışmada erkek ve dişi bireylerden alınan eşit ağırlıktaki yapraklar ayrı ayrı havuzlanarak DNA izolasyonuna tabi tutulmuşlardır. Ayrıca her bireyin kendi DNA'sı da izole edilmiştir. 700 farklı oligonükleotid, antep fıstığında eşeyi belirleyen lokusa bağlı markerler bulmak üzere taranmış ve 945 bp'lik bir RAPD primeri belirlenmiştir. 945 bp'lik bandın sadece dişi bulklarda mevcut olduğu erkek bulklarda bulunmadığı belirtilmiştir. Konfirmasyon için bulkları meydan getiren tüm bireylerde ve 14 farklı çeşitte denenen markerin ilgili lokusa sıkıca bağlı olduğu görülmüştür.

Delourme vd (1994), kolzada fertilitiyi dzenleyen *Rfo* genine bağlı RAPD markerleri belirledikleri çalışmalarında, 138 RAPD primerini 3 ayrı bulk DNA üzerinde denemişler ve 6 primerin tekrarlanabilen polimorfizmler verdiğini belirtmişlerdir. Bulkları meydana getiren bireylerin DNA'ları ile polimorfizm veren 6 primerin analizlenmesi sonucunda ise 4 primerin fertilitiyi dzenleyen gene sıkıca bağlı olduğu ifade edilmiştir.

Wang ve Paterson (1994), DNA örneklerinin bulk yapılarak kullanılmasının kantitatif özellik lokuslarına bağlı markerler belirlemede büyük kolaylık sağladığını belirtmişlerdir. Nitekim Chalmers vd (1993), arpada malt kalitesini etkileyen kantitatif karakterlerden birisi olarak gösterdikleri danenin öğütülmesi için gerekli enerji miktarını kontrol eden genetik faktörlere bağlı RAPD markerlerini bulk segregant analiz yöntemini kullanarak belirlemişlerdir. 440 RAPD primerinin iki bulk DNA üzerinde ilgili özelliğe bağlı markerler bulmak üzere tarandığı çalışmada, 5 primerin açık polimorfizmler verdiği belirtilirken bir primerin (OPE11) iki polimorfik band verdiği bildirilmiştir.

Ding vd (1998), çeltikte tuzluluğa tolerans sağlayan gen lokusunu RAPD ve bulk segregant analizini kullanarak belirlemişlerdir. Tuz içeren ortamlarda yetiştirilen EMS'ye tabii tutulmuş eltik anterlerinden seçilen tuzluluğa toleranslı genotipleri, melezlenerek F₂ populasyonu oluşturulmuş ve bu populasyona ait bireylerden tuzluluğa toleranslı ve hassas olan bulklar meydana getirilmiştir. 220 RAPD primerinin tuzluluğa toleransı idare eden lokusa bağlı markerler belirlemek üzere bulkların tarandığı çalışmada, üç primerin polimorfizm verdiği görülmüştür. Bu polimorfizmlerin F₂ populasyonuna ait 80 bireyle test edilmesi sonucu bir primerin ilgili lokusa bağlı olduğu bulunmuştur.

Szücs vd (2000), buğdayda donmaya dayanıklılığı sağlayan lokusa bağlı RAPD markerlerini bulk segregant analizinden faydalanarak belirlemişlerdir. Soğuktan zarar gören 15 hat ile en iyi ayakta kalan diğer 15 bitkinin iki ayrı bulk DNA'yı oluşturduğu çalışmada 540 farklı RAPD primeri kullanılmıştır. Bunlardan dördünün RAPD markeri olarak tespit edildiği çalışmada, sonuçlar bulkları meydana getiren bireylerin kendi DNA'larının kıyaslanmasıyla konfirme edilmiştir.

Bhattacharyya ve Mandal (1999), *Brassica campestris*'te bölmesiz pod oluşumuna bağlı moleküler markerler belirlemişlerdir. İki ayrı *B. campestris* çeşidinin incelendiği makalede, her iki genotipin de tüylü ya da tüsüz yaprak, daha az tohuma sahip olan bölmeli pod ya da daha fazla tohuma sahip bölmeli pod, dik ya da yatık pod gibi özelliklerle birbirinden ayrıldığı belirtilen çalışmada bölmesiz podun, tohum verimi ve çatlamaya dayanıklılık karakterleri bakımından bazı avantajları olduğu bildirilmiştir. Bölmeli pod ve tüylü yaprağın tek bir genle idare edildiği ve tek bir linkage grubunda olduğu klasik genetik analizlerle belirlenmiştir. Bölmesiz poda bağlı markerler belirlemede 45 RAPD primeri ve 30 RFLP probu kullanılmış ancak RFLP problemleri monomorfik bulunurken, altı RAPD primerinin 15 polimorfik band verdiği görülmüştür. Bulk segregant analizini oluşturan bireylerin polimorfik bantları veren primerlerle incelenmesi sonucunda üç RAPD primerinin bölmesiz pod özelliğine, bir primerin ise tüylülük özelliğine bağlı olduğu bulunmuştur.

Page vd (1997), üçgül bitkisinde *Sclerotinia trifoliorum* fungusuna dayanıklılık genine bağlı RAPD markerlerini bulk segregant analizi uygulayarak belirlemişlerdir. F₂ popülasyonundan köken alan sekizer genotipin meydana getirdiği dayanıklı ve hassas olmak üzere iki ayrı bulk, 200 primerle taranmıştır. Üç RAPD primerinin (Q4, I4, ve I7) oluşturduğu dört fragmentin dayanıklı ve hassas tipleri ayırabildiği araştırmacılar tarafından ifade edilirken, açık polimorfizm 1000 bp'lik Q4 primeri tarafından sağlanmıştır. Yine bir hastalığa dayanıklılık kaynağına bağlı RAPD markerlerinin belirlendiği çalışma, Miklas vd (1993)'nin fasulyede pas hastalığı (*Uromyces appendiculatus*) için gerçekleştirdiğidir. Fasulyede *Uromyces appendiculatus* hastalığına dayanıklılık *Up₂* dominant lokusu ile sağlanmaktadır. 167 primerin denendiği çalışmada 1.1 kb uzunluğunda A14 RAPD primerinin *Up₂* lokusuna sıkıca bağlı olduğu bulunmuştur. Haley vd (1993) de, yine fasulye bitkisinde *Uromyces phaseoli* pasına dayanıklılık sağlayan gen blokuna bağlı RAPD markerleri belirlemişlerdir. İki ayrı RAPD markerinin ilgili lokusa sıkıca bağlı olduğu saptanan araştırmada, OF10₉₇₀ markeri 2.15 cM uzaklıkta bulunurken, OI19₄₆₀ markerinin ilgili lokusa çok sıkı bağlı olduğu bildirilmiştir. James vd (1996) ise, arpada *Pyrenophora teres* mantari hastalığına dayanıklılık genini belirledikleri çalışmalarında,

500 RAPD primeri kullanmışlardır. Bulklar üzerinde primerlerin taranması sonucunda 7 primerin, dayanıklılık geniyle ilişkili üç ayrı lokusa bağlı olduğu belirlenmiştir.

Subudhi vd (1997), çeltikte sıcaklığa bağlı olarak ortaya çıkan genetik erkek kısırlık geninin moleküler haritalamasını bulk segregant analizini kullanarak yapmışlardır. İlgili geni içeren mutant hat ile normal bir hattın melezlenmesiyle elde edilen F₂ popülasyonuna ait bireyler fertil ve steril bulkları oluşturmada kullanılmıştır. 389 RAPD primerinin kullanıldığı çalışmada *tms3(t)* genine üçü "repulsion" ve biri "coupling" olmak üzere 4 ayrı RAPD markeri belirlenmiştir. Bu markerler klonlanıp sekanslanarak, "marker yardımıyla seleksiyon" yaklaşımı için PCR primerleri dizayn edilmiştir. Zhang vd (1996) da, çeltikte yanıklığa neden olan *Xanthomonas oryzae pv oryzae* hastalığına dayanıklılık sağlayan *xa-13* genini, bulk segregant analizinden faydalanarak haritalamışlardır. 260 primerin kullanıldığı araştırmada 0.9 kb uzunluğunda bir markerin ilgili gene bağlı olduğu ve yaklaşık 5.3 cM uzağında yer aldığı saptanmıştır. Bulk segregant analizinden faydalanılarak diğer bir haritalamanın yapıldığı çalışma ayçiçeği bitkisinde *Plasmopara halstedii* küf hastalığına dayanıklılık sağlayan *P/1* lokusu için düzenlenmiştir (Mouzeyar vd 1995). İki RFLP ve bir RAPD markerinin belirlendiği araştırmada, RFLP markerleri ilgili genden 5.6 cM ve 7.1 cM uzaklıkta yer alırken, RAPD markeri 43.7 cM uzaklıkta bulunmuştur.

O'Donoghue vd (1996), kültürü yapılan yulafta *Puccinia graminis* pas hastalığına dayanıklı olan *Pg9* ve *Pg13* genlerine bağlı moleküler markerler belirlemiş ve haritalamışlardır. Yakın izogenik hatların 200, bulk edilmiş örneklerin ise 127 RAPD primeri ile tarandığı çalışmada, beş yeni markerin ilgili lokuslar için belirlendiği bildirilmiştir. Ronald vd (1996) ise, yulaf danesinin kabuk oranını kontrol eden genlere bağlı RAPD markerleri belirledikleri çalışmalarında, 300 primer kullanılmışlar ve bunların 12'sinin polimorfik olduğu belirlenmiştir.

Weyen vd (1996), arpa sarı mozaik virüs kompleksine dayanıklılık sağlayan *ym4* genine bağlı dört RAPD primerini bulk segregant analizi kullanarak belirlemişlerdir. 310 primerin test edildiği çalışmada, 2 primerin ilgili gene sıkıca bağlı olduğu görülürken,

diğer iki markerin yaklaşık 24 cM uzakta yer aldığı bulunmuştur. Sıkıca bağlı olan iki RAPD markeri, sarı mozaik virüsüne dayanıklı bireylerin fide döneminde belirlenmesinde başarıyla kullanılmıştır.

Sweeney ve Danneberger (1994), RAPD ve bulk segregant analizlerini kullanarak iki ayrı çok yıllık çim bitkisini karakterize ettiği çalışmalarında, bulk örneklerinden elde edilen amplifikasyon ürünlerinin çeşitler arasında bulunan genetik çeşitliğinin tamamını göstermediğini bildirmişlerdir. 30 fidenin bulk örnekleri, iki primerin ürettiği üç RAPD markeri ile belirleyen araştırmacılar, bireyleri taradıklarında bulk örneklerinden elde edilen fragment sayısından daha fazla miktarda fragmentin belirlendiğini bildirmişlerdir. Dolayısıyla, heterojen populasyonların ya da sentetik çeşitlerin genotipik kompozisyonunun doğru bir şekilde incelenmesi söz konusu olduğunda, bulklar yerine bireylerin gözlenmesinin gerekli olduğu yazarlar tarafından iletilmektedir.

RAPD analizinin kolay uygulanabilmesi, radyoaktif madde kullanımı olmaması ve kısa sürede tamamlanabilmesi gibi birçok avantajının olması yanında, farklı PCR analizlerinin farklı sonuçlar vermesi, tekrarlanan DNA sekansları içermesi ve bunun sonucunda hibridizasyon probu olarak kullanımının kısıtlı olması ve reaksiyon şartlarındaki değişimlere hassas olması nedenleriyle, ilgili genlere bağlı markerler elde etme yeteneğinde ve bağlı markerlerin rutin olarak ıslah programlarında gözlemlenmesinde bazı boşluklar bulunmaktadır. Bu problemleri aşmak amacıyla RAPD markerleri SCAR markerlerine dönüştürülmüştür (Paran ve Michelmore 1993). SCAR, RAPD ürünlerinin klonlanıp sekanslanmasıyla oluşturulan bir markerdir. Elde edilen sekans bilgisi SCAR primerlerinin oluşturulmasında kullanılmaktadır. SCAR, sadece tek bir lokus üretmesi, reaksiyon şartlarının daha az hassas olması ve kodominant olması gibi yönlerden RAPD analizinden üstündür. Paran ve Michelmore (1993), marulda küf hastalığına dayanıklılık genine (*Dm*) bağlı 9 RAPD markerini klonlamış, sekanslamış ve SCAR primerleri oluşturmuşlardır. 9 RAPD primerinin üçü kodominant ve beşi dominant olmak üzere sekiz SCAR markeri dönüştürülmüşken, bir RAPD primerinde başarı sağlanamamıştır. Barret vd (1998) de, kolzada cücelik genine (*Bzh*) bağlı RAPD markerini kodominant SCAR markerine dönüştürmüşlerdir. Çalışmada ilgili band

klonlanıp sekanslanmış ve fragmentin 830 bp uzunluğunda olduğu görülmüştür. Bu sekans bilgisi kullanılarak dizayn edilen SCAR primerleri, 40 *B. napus* genotipinde test edilmiş ve genin üç allelik formu tespit edilmiştir. Araştırmacılar, SCAR markerlerinin en büyük avantajının heterozigot bitkilerin belirlenmesi olarak göstermişlerdir.

Cao vd (2001), makarnalık buğdayda *Septoria nodorum* hastalığına dayanıklılık sağlayan gene bağlı iki RAPD markerini, bulk segregant analizi kullanarak belirledikleri çalışmalarında, marker yardımıyla seleksiyonda kullanılmak üzere bir SCAR markerine dönüştürmüşlerdir. Benzer şekilde Fang vd (1997), mandarinde meyve asitliğini kontrol eden gene bağlı üç RAPD markerini bulk segregant analizi kullanarak belirlemişler ve asitlik seviyesi yüksek veya düşük progenileri belirlemede bu markerleri dominant ve kodominant olan bir SCAR markerine çevirmişlerdir.

Jiang ve Sink vd (1997), kuşkonmaz bitkisinde eşeyi belirleyen *M* lokusuna bağlı RAPD markerlerini bulk segregant analizi ile belirlemişler ve kuşkonmazın çiçeklenmesi beklenmeden erkek ya da dişi bireylerin saptanmasını sağlayacak SCAR markerlerine çevirmişlerdir. 10 erkek ve 10 dişi bireyin eşit miktardaki DNA'ları birleştirilerek erkek ve dişi bulguların meydana getirildiği çalışmada, 760 RAPD primeri ilgili lokusa bağlı markerler belirlemek üzere kullanılmıştır. OPC15 adlı primerin *M* lokusuna 1.6 cM uzaklıkta bulunan iki RAPD markeri belirlediği analizlerde, markerin biri SCAR markerlerine dönüştürülmek üzere klonlanmış ve sekanslanmıştır. Sentezlenen SCC15-1 ve SCC15-2 adlı SCAR markerinin her ikisi de RAPD markeriyle aynı olan 980 bp uzunluğunda tek bir fragment üretmiştir.

Zhuang vd (1998), çeltikte *Pyricularia oryzae* yanıklığına dayanıklılık genlerinin belirlenmesinde RAPD ve bulk segregant analizlerinden faydalanmışlardır. 199 primerin kullanıldığı araştırmada altı fragment polimorfik bulunmuştur. Fragmentlerin F_2 bireyleriyle test edilmesi sonucunda üç RAPD primerinin ilgili lokusa sıkıca bağlı olduğu tespit edilmiştir. Bu primerler klonlanmış ve F_2 bireylerinin RFLP analizinde probe olarak kullanılmışlardır. 1.3 kb ve 560 bp'lik fragmentlerin tekrar eden sekanslar içerdiği görülürken, 350 bp'lik fragmentin tek kopya sekans içerdiği bulunmuştur. 350 bp'lik

markerin RFLP analizi sonuçlarıyla RAPD analiz sonuçları aynı bulunmuş ve spesifik primerlerin (SCAR) dizayn edilmesi için 560 ve 350 bp'lik markerler sekanslanmıştır. Bu markerlerin spesifik amplifikasyonları sonucunda, 560 bp'lik SCAR markerinin RAPD analiz sonuçları ile eşleştiği görülürken, 350 bp'lik markerin RAPD analiz sonuçlarıyla özdeş olması için, PCR ürünlerinin 4 bazlık enzimle kesilmesinin gerekli olduğu rapor edilmiştir.

Lecoals vd (1999), erik bitkisinin köklerinde zarar yapan *Meloidogyne* spp nematoduna dayanıklılık kaynağı olan *Mal* lokusuna bağlı RAPD ve SCAR markerleri belirledikleri çalışmalarında, toplamda 660 RAPD primeri kullanmışlar ve üç markerin ilgili lokusa bağlı olduğu bulunmuştur. Üç markerin ikisi, SCAR markerlerine dönüştürülebilirken, bir markerde başarı sağlanamamıştır. Dönüşümü yapılan iki SCAR markerinin marker yardımıyla seleksiyonda başarıyla kullanılabileceği yazarlar tarafından bildirilmiştir.

Haley vd (1994), monogenik pest dayanıklılık özelliklerinde, "coupling" ve "repulsion" fazında bulunan RAPD markerlerini kullanmışlar ve kıyaslamışlardır. Fasulyede, BCMV virüsüne dayanıklılık alleli *bc-3* lokusuna, biri coupling ve diğerinde repulsion fazında bağlı olan iki RAPD markerinin belirlendiği araştırmada, repulsion fazındaki RAPD markerinin coupling faza göre daha fazla homozigot dayanıklı bireyler seçtiğini göstermişlerdir. % 81.8 oranında homozigot dayanıklı bireylerin seçimini sağlayan repulsion fazındaki markerin, marker yardımıyla seleksiyonda coupling fazındaki RAPD markerine göre daha faydalı olacağı bildirilmiştir.

Williams vd (1990), DNA polimorfizmlerinin belirlenmesinde PCR'a dayalı bir teknik olan RAPD markerlerini geliştirmişlerdir. RAPD; basit oluşu, radyoaktif madde kullanımı ve sekans bilgisi gerektirmemesi, nispeten maliyetinin az olması gibi özellikleri nedeniyle kısa zamanda tüm moleküler biyoloji laboratuvarlarında ve geniş bir organizma yelpazesinde kullanım alanı bulmuştur. Bitki ve hayvan ıslahında, genetik haritalamada, populasyon genetiğinde, kromozom spesifik DNA markerlerinin belirlenmesinde olmak üzere birçok alanda RAPD analizi kullanılabilmektedir. Welsh ve McClelland (1990) da

Williams grubundan bağımsız olarak, rasgele primerlerle uygulanan PCR (AP-PCR) adını verdikleri ama metodolojisi aynı olan marker tekniğini, aynı dergide ve aynı yılda yayınlamışlardır. Rafalski vd (1994), RAPD analizinin genetik haritalamalarda, ilgili gene bağlı markerler belirlemede, genetik diagnostikte ve populasyon genetiği gibi konularda geniş bir şekilde kullanım alanı bulduğunu bildirmişlerdir. RAPD markerleriyle ortaya çıkan polimorfizmlerin dominant karakterde olduğunu belirten yazarlar, az miktarda DNA'nın (5-25 ng) yeterli olması ve radyoaktif madde kullanımına ihtiyaç duymaması gibi nedenlerle, ıslah uygulamalarında cazip bir yerinin olduğunu vurgulamışlardır. Castiglione vd (1994) de, RAPD tekniğinin bitki genom analizlerinde, taksonomik çalışmalarda, genetik haritalamalarda ve genlerin belirlenmesinde önemli bir yer tuttuğunu bildirmişlerdir. Ayrıca, diğer tekniklere göre basit oluşu, bir günde yüzlerce örneği analizleme imkanı, maliyetinin düşük olması, zararlı manipulasyonları içermemesi gibi nedenleri de, araştırmacılar analiz için ilave getirisi olarak ifade etmişlerdir.

Diğer taraftan Schierwater ve Ender (1993), farklı DNA polimeraz enzimlerinin, farklı RAPD fragmentleri verdiğini ispatlamışlardır. 13 ayrı Taq DNA polimeraz enziminin denendiği araştırmada, *Thermus aquaticus*'tan elde edilen polimeraz grubunun meydana getirdiği RAPD fragmentleri, özdeş olmamakla birlikte birbirine benzerken, değişik kaynaklardan gelen Taq polimerazların oluşturduğu RAPD profillerinde, tamamen farklılıkların olduğu bildirilmiştir. Jones vd (1997) de, RAPD markerlerinin AFLP ve SSR gibi diğer PCR'a dayalı tekniklere göre tekrarlanabilirliğinin az olduğunu, birçok farklı laboratuvar analiz sonuçlarına dayanarak ifade etmişlerdir. RAPD profillerinde meydana gelen farklılıkların; primer oranı, Taq polimeraz ve Mg konsantrasyonları gibi faktörlerin etkisi altında olduğunu vurgulayan araştırmacılar, ancak reaksiyon koşullarının standardize edilmesi ve tıpa tıp uygulanmasıyla RAPD profillerinin tekrarlanabileceğini bildirmişlerdir.

Martin vd (1991) RAPD markerleri ile bağlı genler belirlemede bulk segregant analizi yanında, yakın izogenik hatların kullanımının da hızlı ve etkili olduğunu göstermişlerdir. Bir bitki ıslahı ürünü olan yakın izogenik hatlar, sadece ilgili gen bakımından farklılık gösteren bireyler olarak nitelendirilebilir. *Pseudomonas syringae* pv.

tomato hastalığına dayanıklılık sağlayan *Pto* genine bağlı RAPD markerlerinin belirlenmesiyle, metodun fizibilitesinin ortaya konduğu çalışmada, 144 primer kullanılmış ve bunların yedisi polimorfik olarak rapor edilmiştir. Yedi markerin dördünün ilave analizlerle test edilmesi sonucunda, üç markerin *Pto* genine sıkıca bağlı olduğu bildirilmiştir.

Noli vd (1996), arpa yapraklarındaki absisik asit (ABA) konsantrasyonunu kontrol eden kantitatif özellik lokuslarına bağlı moleküler markerler belirlemeyi amaçladıkları çalışmalarında, 60 RAPD, 25 RFLP ve 7 STS polimorfizmi elde etmişlerdir. Dataların değerlendirilmesi sonucunda ABA ekspresyonunu kontrol eden kantitatif lokuslar üzerinde çevre şartlarının etkisinin yüksek olduğu ve bu lokusların tatmin edici olarak belirlenebilmesi için çok sayıda çevrede test edilmesinin gerekliliği vurgulanmıştır.

Ammiraju vd (2000), buğdayda dane büyüklüğüne bağlı moleküler markerler belirlemede ISSR ve RAPD tekniklerini kullanmışlardır. 480 RAPD ve 100 ISSR primerinin ilgili lokus için tarandığı çalışmada, üç ISSR markerinin küçük dane büyüklüğü ile ilişkili olduğu görülürken, dört ISSR ve iki RAPD markerinin iri danelerle ilişkili olduğu bulunmuştur. Yine buğdayda, dane protein içeriğine bağlı moleküler markerler belirlemede ISSR ve RAPD markerleri kullanılmıştır (Dholakia 2000). 85 ISSR ve 350 RAPD primerinin, 106 rekombinant kendilenmiş hatta test edilmesiyle toplamda dokuz markerin ilgili özelliğe bağlı olduğu bulunurken, bunlardan üç primerin her bir lokasyonda stabil olduğu bulunmuştur. Özelliğin kantitatif olması nedeniyle, kalan altı markerin lokasyona özel olduğu bildirilmiştir.

RAPD tekniği, ilgili gene bağlı markerler belirlemeden sonra en çok genetik varyasyonların belirlenmesinde kullanılmaktadır. Shah vd (1994), Afrika'dan toplanan hurma ağacı örneklerinde genetik varyasyonu belirlemede RAPD markerlerinden faydalanmışlardır. 20 RAPD primerinin kullanıldığı ve dokuzunun 0.2 kb ve 2.3 kb arasında değişen polimorfizmler ürettiği çalışmada genotipler arasında yüksek oranlarda polimorfizmler tespit edilmiştir. Hurma ağacının doğal dağılışı göz önünde bulundurularak, Nijerya ve Kamerun genotiplerinin çok daha fazla farklılık göstermesi

beklenirken, Kamerun en az değişkenlik gösteren grup olarak belirlemiştir. Iqbal vd (1997), elit pamuk varyetelerinin genetik çeşitliliklerini değerlendirdikleri çalışmalarında, *Gossypium hirsutum* L. türüne ait 22 varyete ile, *G. arboreum* türüne ait bir genotip 50 RAPD primeri ile analiz edilmiştir. Bir primer hariç 49'unun polimorfik olduğu analizlerde, 349 band ortaya çıkarılmış ve 17 varyetenin iki gruba ayrılmasını sağlamıştır. CIM-1100 adlı varyetenin % 57.02 benzerlikle en farklı varyete olduğu belirlenirken, % 55.7 lik benzerlikle diploid *G. arboreum* L. var. Ravi'nin diğer tetraploidlerden oldukça farklı olduğu görülmüştür. Bu sonuçlara göre, varyeteler arası genetik ilişkinin, varyetelerin orijin merkezleri ile yakından ilişkili olduğu ve beklendiği gibi çoğu varyetenin genetik tabanının dar olduğu belirlenmiştir.

Papa vd (1996), yabani ve kültürü yapılan arpa genotiplerindeki genetik çeşitliliği RAPD analizi ile belirlemişlerdir. 18 primerin 31 genotipte 177 polimorfik band ürettiği çalışmada, 78 bandın (% 44) tekrarlanabilir olduğu belirlenmiştir. Sonuçta, yabani arpaların kültürü yapılanlardan daha fazla polimorfik olduğu, yerel populasyonların ise yabaniler ile kültürü yapılan arpaların arasında yer aldığı bildirilmiştir. Yerel ve yabani germplasmların genetik çeşitlilik bakımından ne kadar önemli olduğu ve korunması gerektiği yazarlar tarafından ayrıca ifade edilmiştir.

Ordon vd (1996), arpa mozaik virüsüne dayanıklı olan arpa çeşit ve türlerinin genetik çeşitliliğini inceledikleri araştırmada, 32 *H. vulgare* ve 12 *H. spontaneum* türü 20 RAPD primerinin ürettiği 544 fragment ile karakterize edilmiştir. RAPD analizinin büyük oranlarda genetik çeşitlilik ortaya çıkardığı çalışmada, virüse dayanıklı olan genotipler yedi ayrı gruba ayrılmıştır.

Atanassov vd (1998), arpada somaklonal varyasyonların belirlenmesi için yaptıkları çalışmalarında, protein ve RFLP analizlerine ilave olarak RAPD markerlerini de kullanmışlardır. 20 primerin kullanıldığı araştırmada, OPA08 ve OPA17 primerlerinin somaklonlarda DNA polimorfizmleri verdiği ve bunların tekrarlanabilir olduğu tespit edilmiştir. Somaklonal varyasyonları ortaya çıkarmada RAPD'in ilk defa kullanıldığını

belirten yazarlar, OPA17 markerinin somaklon 34 ve 19'da diğer somaklonlarda olmayan polimorfizmler ortaya çıkardığını bildirmişlerdir.

Farooq vd (1998), Basmati ve Basmati olmayan çeltik genotiplerini ayırt etmede RAPD analizini kullanmışlardır. S-13, S-19 ve S-18 olmak üzere üç ayrı primerin, Basmati olmayan varyeteler içerisinde Basmati genotiplerini seçmede başarılı olduğu bulunmuştur. Üç primerin verdiği beş RAPD fragmentinden birinin Basmati-Pak, ikisinin Jhona-349 ve IR-16 isimli Basmati grubu genotipleri için spesifik olduğu bildirilmiştir. Öte yandan, S-13, R-15, R-17 ve R-18 adlı dört RAPD primeri Basmati genotipi içerisinde yer alan Basmati-Pak, Basmati-198, Kashmir Basmati ve Basmati-370 genotiplerini ayırt etmede başarılı bulunmuştur.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Araştırma Yeri

Araştırmada kullanılan F_2 populasyonlarının elde edilmesinde ve konfirmasyon için kullanılan F_3 populasyonlarının yetiştirilmesinde Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümüne ait olan üç numaralı parsel kullanılmıştır. DNA izolasyonlarının yapıldığı F_2 populasyonun yetiştirilmesi ise, İngiltere'nin Cambridge kentinde yer alan National Institute of Agricultural Botany (NIAB) isimli enstitüye ait seralarda gerçekleştirilmiştir. Araştırmanın tüm DNA analizleri yine bu enstitüye bağlı Molecular Biology and Diagnostic seksiyonunda yapılmıştır.

3.2. Genetik Materyal

Araştırma materyali olarak kapalı kapsüllülük özelliği için açılım gösteren F_2 populasyonlarından elde edilen DNA'lar kullanılmıştır. Bu populasyonları elde etmek amacıyla, 1995 yılında Gamma ışınları kullanılarak oluşturulan ilk yapay kapalı kapsüllü mutantlar (cc1, cc2, cc3; Çağırğan 1996, 1997) ile 1942 yılında Venezuela'da bulunan doğal mutant (idid), 1998 yılında Muganlı-57 çeşidi ile melezlenmiştir. Bu melezlemelerden elde edilen tohumlar F_1 olarak 1999 yılında üretilmiştir. Dört ayrı melez populasyona ait F_1 bitkileri İngiltere'nin Cambridge kentinde bulunan National Institute of Agricultural Botany adlı enstitüye ait seralarda yetiştirilmek üzere hasat edilmiştir. Bulk segregant analizine (BSA; Michelmore vd 1991) uygun olarak en az 30 kapalı ve 30 normal bitkinin elde edilebilmesi için her bir melez populasyona ait 150 tohum 7 Ekim 1999 tarihinde F_2 olarak ekilmiştir. Yine bulk segregant analiz yöntemine uygun olması bakımından kapalı kapsüllülük özelliği için açılım gösteren bu melez populasyonların ebeveynleri de aynı tarihte ekilmiştir. Sonuç olarak, dört ayrı kapalı kapsüllü melez populasyonu ile bunların ebeveynleri olmak üzere toplam 670 bitki serada yetiştirilmiş ve yapraklarından elde edilen DNA örnekleri moleküler analizlerde kullanılmak üzere eşit miktarlarda havuzlanarak bulk DNA'lar oluşturulmuştur.

3.3. Metod

3.3.1. Melezleme tekniği

Susam çiçeklerinde biri fonksiyonel olmayan toplam beş erkek organ ve bir dişi organ bulunmaktadır. Emaskulasyon işlemi, taç yaprağın kopartılmasıyla birlikte aynı anda erkek organların da çiçekten ayrılması nedeniyle kolaylıkla yapılabilmektedir. Melezlemelerde ana ebeveyn olarak seçilen bitkiler, melezlemeden bir gün önce akşam saatlerine (16:00-18:00) doğru taç yaprağın kopartılmasıyla emasküle edilmiştir. Açığa çıkan dişi organın yabancı polen tozlarına karşı izolasyonu, sıvı içecekleri içmede kullanılan ince plastik pipetlerle sağlanmıştır. Bunun için, yaklaşık 2 cm uzunluğunda kesilen pipetler, dişi organa çanak yaprakları da içine alacak şekilde uzunlamasına geçirilmiş ve küçük kuyumcu etiketleriyle fişlenmiştir. Ertesi gün sabah erken saatlerde (05:00-08:00) baba ebeveyn olarak seçilen bitkilerin bol polen içeren çiçekleri alınarak, izole edilen dişi organın tepeciğine sürülmüştür. Yeterince polenin tepeciğe bulaştırılmasının ardından dişi organ yine aynı pipetle izole edilmiştir ve babanın genotipi etiketin üzerine yazılmıştır. Melezlemeden iki gün sonra pipetler toplanarak melez kapsülün olgunlaşması beklenmiştir.

3.3.2. Materyalin yetiştirilmesi

Melezlemelerden elde edilen F_1 ve confirmasyon için kullanılan F_3 populasyonlarına ait her bitki 2 m uzunluğundaki tek sıralarda yetiştirilmiştir. Parseller sıra arası 70 cm olacak şekilde düzenlenmiştir. Çıkıştan 10-15 gün sonra F_1 'lerde sıra üzeri mesafesi 10-15 cm'e teklenmiştir. N, P, K makro besin elementleri ekimle birlikte dekara 6 kg saf madde üzerinden, 15 : 15 : 15 kompoze gübresi formunda verilmiştir. Tohumlar kuruya ekilmiş ve ekim tamamlandıktan sonra yağmurlama sistemi kurularak bitkilerin düzgün bir çıkış yapması sağlanmıştır. Sulama aralığı bitkilerin ve toprağın durumuna bakılarak belirlenmiştir. Yabancı ot mücadelesi el ile yapılmış ve bitkiler 25 cm oluncaya kadar ot alımı sürdürülmüştür.

F₂ populasyonları ise sera şartlarında saksılarda yetiştirilmiştir. Her bir saksıdan en az bir sağlıklı fide elde edebilmek için saksı başına üç tohum ekilmiştir. Bunlardan iyi gelişen ve sağlıklı olan fide dışındakiler kopartılmıştır. Saksı toprakları 3 : 1 oranında kompost-kum karışımı şeklinde hazırlanmıştır. Sera sıcaklığı mevcut şartlar içerisinde gelişmenin ilk dönemleri için 17-19 °C, çiçeklenme döneminde ise 24 °C olarak ayarlanmıştır. Sulama aralığı bitki ve saksıdaki toprak durumuna bakılarak belirlenmiştir. Işıklanma süresi 16 saat aydınlık ve 8 saat karanlık olacak şekilde programlanmıştır.

3.3.3. Bulk segregant analizi

Bitki fenotipleri öncelikle bulk segregant analizine (BSA; Michelmore vd 1991) uygun olarak kapalı kapsüllü (resesif : cccc) ya da normal (dominant : Cc/-) olarak belirlenmiştir. Her bir melez kombinasyonundan (Muganlı-57 x cc1, Muganlı-57 x cc2, Muganlı-57 x cc3 ve idid x Mug) 3 kapalı kapsüllü ve 3 normal bulk olmak üzere toplam 24 bulk elde edilmiştir. Her bir populasyona ait 10'ar bitkiden oluşan üçü kapalı ve üçü normal olmak üzere toplam 6 bulk yapılmıştır. Bunun için aynı genotipe sahip (kapalı ya da normal) bitkilerin eşit ağırlıktaki (0.1 g) yaprakları havuzlanmıştır ve bu yapraklar DNA izolasyonu için kullanılmıştır. Bunlara ilaveten, izole edilen 10 ayrı kapalı kapsüllü ve 10 ayrı normal bireysel DNA'ların her birinden 0.5 µl DNA (25 ng)'nın çekilip karıştırılmasıyla da bulk DNA (250 ng)'lar elde edilmiştir. Böylece yaprak havuzlanmasıyla, DNA havuzlanmasının arasında fark olup olmadığı gözlemlenmiştir.

3.3.4. DNA izolasyonu

Bitkiler, fenotiplerinin belirlenebileceği yeterli olgunluğa eriştiğinde, bulk segregant analizine uygun olarak kapalı kapsüllü ya da normal olarak belirlenerek DNA izolasyonlarına başlanmıştır. DNA izolasyonları hem 10'ar kapalı kapsüllü ve normal bitkilerin eşit ağırlıktaki yapraklarının kendi içlerinde bulk edilmesiyle hem de bireysel DNA'lar elde etmek üzere iki şekilde yapılmıştır. DNA izolasyonları Dellaporta vd (1985) metodunun aşağıdaki şekilde modifiye edilmesiyle gerçekleştirilmiştir.

1. 10 bitkiden alınan eşit ağırlıktaki (her bir bitki için ortalama 0.1 g.) taze ve genç yapraklar, sıvı nitrojende hücre duvarlarının iyice kırılmasını sağlayacak toz kıvamı elde edilinceye kadar ezilir.
2. İyice ezilen yapraklara 15 ml ekstraksiyon buffer (100 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM EDTA pH 8.3, 500 mM NaCl ve β -mercapthoethanol) eklenerek, homojen bir karışım elde edilinceye kadar karıştırılır.
3. Oluşan süspansiyona % 10'luk 2 ml SDS eklenerek dikkatle karıştırılır ve 65 °C'de 12 dakika su banyosunda bekletilir. Su banyosundaki tüpler ara sıra ters düz etmek suretiyle karıştırılır.
4. Örnekler 5 M Potasyum asetat çözeltisinden 4.5 ml eklenip karıştırılmasından sonra, beş dakika süreyle inkübasyona bırakılır.
5. İnkübasyon sonrası 10 ml kloroform : oktanol (24:1) eklenir ve maksimum hızda 10 dakika santrifüj yapılır. Santrifüj sonrası supernatant dikkatle alınır. Susam yaprakları musilajlı olduğundan, elde edilecek DNA'ların protein tabiatlı bileşikler ve polisakkaritlerden arı olmasını sağlamak için kloroform : oktanol ekstraksiyonu birkaç kez daha yapılabilir. Ayrıca, fenol ekstraksiyonunun da bu aşamada yapılması fenolik bileşiklerin de uzaklaştırmasını sağlayacağından, DNA'nın yeter düzeyde temiz olması beklenebilir.
6. Ekstraksiyon işlemine tabi tutulan örnekler -20 °C'de 30 dakika inkübe edilir.
7. Soğukta bekletilen örnekler, hacimlerinin iki katı kadar yüzde yüzlük etanol eklenerek dikkatlice karıştırılır.
8. Etanolde çöken DNA, bir kancal vasıtasıyla solüsyon içerisinden alınır ya da santrifüj edilerek pelet oluşturulması sağlanır. Oluşan pelet % 80'lik alkolle birkaç kez yıkanarak, oda sıcaklığında kurumaya bırakılır.

9. Kuruyan pelet TE+RNase içerisinde çözülür ve gerektiğinde kullanılmak üzere -20 °C'de saklanır.

Yukarıdaki protokole göre elde edilen bulk, ebeveyn ve bireysel DNA örneklerinin konsantrasyonları standart bir DNA (calf thymus) kullanılarak 50 ng/μl'ye ayarlanmıştır.

3.3.4.1. DNA izolasyonunda kullanılan kimyasallar ve çözeltiler

- Sıvı Azot

- Ekstraksiyon buffer (50 mM EDTA, 500 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl ve 10 mM β-mercapthoetanol): 100 ml'lik ekstraksiyon buffer hazırlamak için; 2 M stok Tris-HCl (pH 8.3) çözeltisinden 5 ml, 0.5 M stok EDTA (pH 8.3) çözeltisinden 10 ml ve 5 M stok NaCl çözeltisinden 10 ml çekilip, su ile 100 ml'ye tamamlanır. Kullanmadan hemen önce 70 μl β-mercapthoetanol eklenir.

- SDS (% 10): 10 gr SDS 100 ml'den az olan bir su miktarı içerisinde eritilip, hacmi 100 ml'ye tamamlanarak elde edilmiştir.

- 5 M Potasyum asetat: 49.07 g potasyum asetata hacmi 100 ml olacak şekilde destile suyun ilave edilip otoklavlanmasıyla elde edilmiştir.

- Kloroform-oktanol (24:1): 96 ml kloroform ve 4 ml oktanol'un karıştırılmasıyla 100 ml'lik solüsyon elde edilmiştir.

- Etanol (% 100 ve % 80) ve fenol (% 100)

- Tris/EDTA (TE) buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.3 ve 1 mM EDTA pH 8.3): 2 M Tris-HCl'den 0.5 ml ve 0.5 M EDTA'den 0.2 ml çekilip hacimlerinin 100 ml'ye tamamlanmasıyla elde edilmiştir.

- TE+RNase: 10 ml TE buffer çözeltisine 10 mg/ml'lik RNase'dan 1 µl ilave edilerek elde edilmiştir.
- 2 M Tris-HCl: 24.22 g tris base'e hacmi 100 ml olacak şekilde destile su ve pH'sının 8.3 olana dek HCl asit eklenip, otoklavlanmasıyla elde edilmiştir.
- 0.5 M EDTA: 18.71 g EDTA kimyasalına, hacmi 100 ml olacak şekilde destile su ve pH'sının 8.3 olana dek NaOH eklenip, otoklavlanmasıyla elde edilmiştir.
- 5 M NaCl: 29.22 g NaCl'e hacmi 100 ml olacak şekilde destile suyun ilave edilip otoklavlanmasıyla elde edilmiştir.
- 5 x TBE Buffer: 108 g tris base, 55 g Borik asit ve 40 ml 0.5 M EDTA (pH 8.3)'nın karıştırılıp hacimlerinin su ilave edilerek 2 litreye tamamlanmasıyla elde edilmiştir.
- 0.5 x TBE Buffer: 100 ml 5 x TBE buffer solüsyonuna 900 ml su eklenmesiyle elde edilmiştir.
- Agaroz jel (% 1): 100 ml 0.5 x TBE buffer içerisine 1 g agaroz eklenip mikrodalga fırında eritilmesi sonucunda % 1'lik agaroz jel elde edilmiştir.
- Ficoll Orange G dye [FOG dye; DNA yükleme boyası (% 10 Ficoll, % 0.05 Orange G ve 100 mM EDTA)]: 10 ml Ficoll, 0.05 ml Orange G ve 20 mM EDTA üzerine hacim 100 ml olacak şekilde su eklenmesiyle elde edilmiştir.

3.3.5. AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) analizi

DNA örneklerinin izole edilip konsantrasyonlarının 50 ng/µl'ye ayarlanmasından sonra kapalı kapsüllülük mutant karakterine bağlı markerler bulmak üzere AFLP analizlerine başlanmıştır. Bunun için, mevcut AFLP teknolojisi (Zabeau ve Vos 1993, Vos vd 1995) bazı modifikasyonlarıyla birlikte ilk defa susam bitkisine adapte edilmiştir.

Toplamda 72 farklı AFLP primer kombinasyonu (Çizelge 3.1) susam için modifiye edilen aşağıdaki protokol takip edilerek denenmiştir.

Çizelge 3.1. Susamda kapalı kapsüllülük mutant karakterine bağlı moleküler markerler belirlemede kullanılan seçici AFLP primer kombinasyonları.

AFLP primer kombinasyonları	<i>Eco</i> RI primerleri	<i>Mse</i> I primerleri
AFLP1	GACTGCGTACCAATTCAAC	GATGAGTCCTGAGTAACAA
AFLP2	GACTGCGIACCAATTCAAG	GATGAGTCCTGAGIAACAA
AFLP3	GACTGCGIACCAATTCAGC	GAIGAGTCCTGAGIAACAA
AFLP4	GACTGCGIACCAATTCAGG	GAIGAGTCCTGAGIAACAA
AFLP5	GACTGCGIACCAATTCACA	GATGAGTCCTGAGIAACAA
AFLP6	GACTGCGIACCAATTCACC	GAIGAGTCCTGAGIAACAA
AFLP7	GACTGCGIACCAATTCACG	GAIGAGTCCTGAGIAACAA
AFLP8	GACTGCGIACCAATTCACT	GAIGAGTCCTGAGIAACAA
AFLP9	GACTGCGIACCAATTC AAC	GAIGAGTCCTGAGIAACAC
AFLP10	GACTGCGIACCAATTC AAG	GATGAGTCCTGAGIAACAC
AFLP11	GACTGCGIACCAATTC AGC	GATGAGTCCTGAGIAACAC
AFLP12	GACTGCGIACCAATTC AGG	GAIGAGTCCTGAGIAACAC
AFLP13	GACTGCGIACCAATTC ACA	GAIGAGTCCTGAGIAACAC
AFLP14	GACTGCGIACCAATTC ACC	GATGAGTCCTGAGIAACAC
AFLP15	GACTGCGIACCAATTC ACG	GAIGAGTCCTGAGIAACAC
AFLP16	GACTGCGIACCAATTC ACT	GAIGAGTCCTGAGIAACAC
AFLP17	GACTGCGTACCAATTC AAC	GAIGAGTCCTGAGIAACAG
AFLP18	GACTGCGIACCAATTC AAG	GAIGAGTCCTGAGIAACAG
AFLP19	GACTGCGIACCAATTC AGC	GAIGAGTCCTGAGIAACAG
AFLP20	GACTGCGIACCAATTC AGG	GAIGAGTCCTGAGIAACAG
AFLP21	GACTGCGIACCAATTC ACA	GAIGAGTCCTGAGIAACAG
AFLP22	GACTGCGIACCAATTC ACC	GAIGAGTCCTGAGIAACAG
AFLP23	GACTGCGIACCAATTC ACG	GAIGAGTCCTGAGIAACAG
AFLP24	GACTGCGIACCAATTC ACT	GAIGAGTCCTGAGIAACAG
AFLP25	GACTGCGTACCAATTC AAC	GAIGAGTCCTGAGIAACAT
AFLP26	GACTGCGIACCAATTC AAG	GAIGAGTCCTGAGIAACAT
AFLP27	GACTGCGIACCAATTC AGC	GAIGAGTCCTGAGIAACAT
AFLP28	GACTGCGIACCAATTC AGG	GAIGAGTCCTGAGIAACAT
AFLP29	GACTGCGIACCAATTC ACA	GAIGAGTCCTGAGIAACAT
AFLP30	GACTGCGIACCAATTC ACC	GAIGAGTCCTGAGIAACAT
AFLP31	GACTGCGIACCAATTC ACG	GAIGAGTCCTGAGIAACAT
AFLP32	GACTGCGIACCAATTC ACT	GAIGAGTCCTGAGIAACAT
AFLP33	GACTGCGIACCAATTC AAC	GAIGAGTCCTGAGIAACTC
AFLP34	GACTGCGIACCAATTC AAG	GAIGAGTCCTGAGIAACTC
AFLP35	GACTGCGIACCAATTC AGC	GAIGAGTCCTGAGIAACTC
AFLP36	GACTGCGIACCAATTC AGG	GAIGAGTCCTGAGIAACTC
AFLP37	GACTGCGIACCAATTC ACA	GAIGAGTCCTGAGIAACTC

AFLP38	GACTGCGIACCAATTCACC	GATGAGTCCTGAGTAACTC
AFLP39	GACTGCGIACCAATTCACG	GATGAGTCCTGAGTAACTC
AFLP40	GACTGCGIACCAATTCACT	GATGAGTCCTGAGTAACTC
AFLP41	GACTGCGIACCAATTC AAC	GATGAGTCCTGAGTAACTG
AFLP42	GACTGCGIACCAATTC AAG	GATGAGTCCTGAGTAACTG
AFLP43	GACTGCGIACCAATTC AGC	GATGAGTCCTGAGTAACTG
AFLP44	GACTGCGIACCAATTC AGG	GATGAGTCCTGAGTAACTG
AFLP45	GACTGCGIACCAATTC ACA	GATGAGTCCTGAGTAACTG
AFLP46	GACTGCGIACCAATTC ACC	GATGAGTCCTGAGTAACTG
AFLP47	GACTGCGIACCAATTC ACG	GATGAGTCCTGAGTAACTG
AFLP48	GACTGCGIACCAATTC ACT	GATGAGTCCTGAGTAACTG
AFLP49	GACTGCGIACCAATTC AAC	GATGAGTCCTGAGTAACTT
AFLP50	GACTGCGIACCAATTC AAG	GATGAGTCCTGAGTAACTT
AFLP51	GACTGCGIACCAATTC AGC	GATGAGTCCTGAGTAACTT
AFLP52	GACTGCGIACCAATTC AGG	GATGAGTCCTGAGTAACTT
AFLP53	GACTGCGIACCAATTC ACA	GATGAGTCCTGAGTAACTT
AFLP54	GACTGCGIACCAATTC ACC	GATGAGTCCTGAGTAACTT
AFLP55	GACTGCGIACCAATTC ACG	GATGAGTCCTGAGTAACTT
AFLP56	GACTGCGIACCAATTC ACT	GATGAGTCCTGAGTAACTT
AFLP57	GACTGCGIACCAATTC AAC	GATGAGTCCTGAGTAAACA
AFLP58	GACTGCGIACCAATTC AAG	GATGAGTCCTGAGTAAACA
AFLP59	GACTGCGIACCAATTC AGC	GATGAGTCCTGAGTAAACA
AFLP60	GACTGCGIACCAATTC AGG	GATGAGTCCTGAGTAAACA
AFLP61	GACTGCGIACCAATTC ACA	GATGAGTCCTGAGTAAACA
AFLP62	GACTGCGIACCAATTC ACC	GATGAGTCCTGAGTAAACA
AFLP63	GACTGCGIACCAATTC ACG	GATGAGTCCTGAGTAAACA
AFLP64	GACTGCGIACCAATTC ACT	GATGAGTCCTGAGTAAACA
AFLP65	GACTGCGIACCAATTC AAC	GATGAGTCCTGAGTAAACC
AFLP66	GACTGCGIACCAATTC AAG	GATGAGTCCTGAGTAAACC
AFLP67	GACTGCGIACCAATTC AGC	GATGAGTCCTGAGTAAACC
AFLP68	GACTGCGIACCAATTC AGG	GATGAGTCCTGAGTAAACC
AFLP69	GACTGCGIACCAATTC ACA	GATGAGTCCTGAGTAAACC
AFLP70	GACTGCGIACCAATTC ACC	GATGAGTCCTGAGTAAACC
AFLP71	GACTGCGIACCAATTC ACG	GATGAGTCCTGAGTAAACC
AFLP72	GACTGCGIACCAATTC ACT	GATGAGTCCTGAGTAAACC

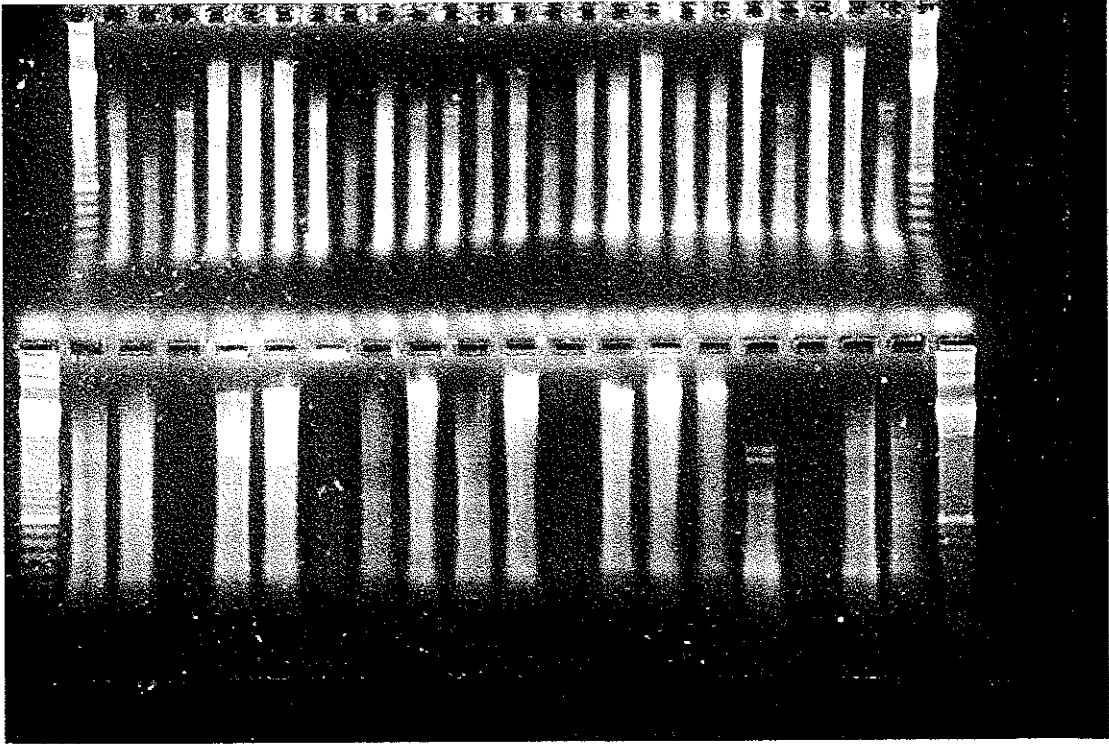
1. DNA'ların kesimi

50 ng/ μ l'lik DNA örnekleri aşağıdaki gibi 25 μ l'lik reaksiyon hazırlanarak, 4 saat süreyle bir PCR'da ya da 37 °C'ye ayarlanabilen bir etüvde inkübe edilerek kesime tabi tutulurlar. Diğer taraftan 4 saatlik süreyi tam bir kesim elde etmek amacıyla uzatmak mümkündür.

	<u>Miktar</u>
50 ng/ μ l DNA örneği (250 ng/ μ l)	5 μ l
10 x One Phor All Buffer (Pharmacia)	2.5 μ l
<i>Eco</i> RI (2.5 U) (NEB)	0.125 μ l
<i>Mse</i> I (2.5 U) (NEB)	0.625 μ l
AFLP için yüksek kaliteli su (Sigma)	<u>16.8 μl</u>
	25 μ l

37 °C'de 4 saat süreyle inkübasyon

Kesime tabi tutulan ve toplam hacmi 25 μ l olan DNA örneklerinin kesilip kesilmediğini görmek amacıyla, tüplerden 5 μ l çekilir ve 1 μ l bromophenol blue ya da Ficoll Orange G (FOG) dye ile karıştırılır. Daha sonra % 1.5'luk agaroz jele yüklenerek, yürütülür (Şekil 3.1). Şekil 3.1'deki gibi DNA'lar "smear" şeklinde görülüyorsa kesim gerçekleşmiş demektir. DNA'ların kesildiği görüldüğünde, adaptörlerin bağlanması için aşağıdaki master mix hazırlanır.



Şekil 3.1. DNA örneklerinin *Eco*RI ve *Mse*I restriksiyon enzimleri ile kesilmesi

2. Adaptörlerin bağlanması

	<u>Miktar</u>
10 x One Phor All Buffer	0.5 µl
10 mM ATP	0.5 µl
<i>Eco</i> RI adaptörü	0.5 µl
<i>Mse</i> I adaptörü	0.5 µl
T4 DNA Ligase (1U) (Pharmacia)	0.18 µl
AFLP için yüksek kaliteli su (Sigma)	<u>2.82 µl</u>
	5.0 µl

Her bir kesilmiş DNA örneğine yukarıdaki gibi hazırlanan master mix'den 5 µl eklenir ve 37 °C'de, en az 12 saat inkübasyona bırakılarak *Eco*RI ve *Mse*I adaptörlerinin spesifik uçlara bağlanması sağlanır.

3. Ön-seçici amplifikasyon

DNA'ların *Eco*RI ve *Mse*I enzimleri ile kesilmesi ve bunların adaptörlerinin protokole uygun olarak bağlanmasının ardından, elde edilen reaksiyonlar, 1 seçici baza sahip primerlerle aşağıdaki protokol uyarınca amplifiye edilir.

	<u>Miktar</u>
Adaptör bağlı DNA	2 µl
2 x core mix (20 mM Tris-HCl pH 8.3, 3 mM MgCl ₂ , 100 mM KCl, 0.2 mM dNTPs)	10 µl
Taq polymerase (0.4 U)	0.08 µl
Ön-seçici primer çifti: Her bir primer 30 ng/µl	1.0 µl
AFLP için yüksek kaliteli su	<u>6.92 µl</u>
	20 µl

Adaptör bağı DNA'dan 2 µl kullanmak suretiyle hazırlanan ön-seçici amplifikasyon aşağıdaki programa göre PCR (Perkin Elmer) yapılır.

PCR programı

25 döngü:

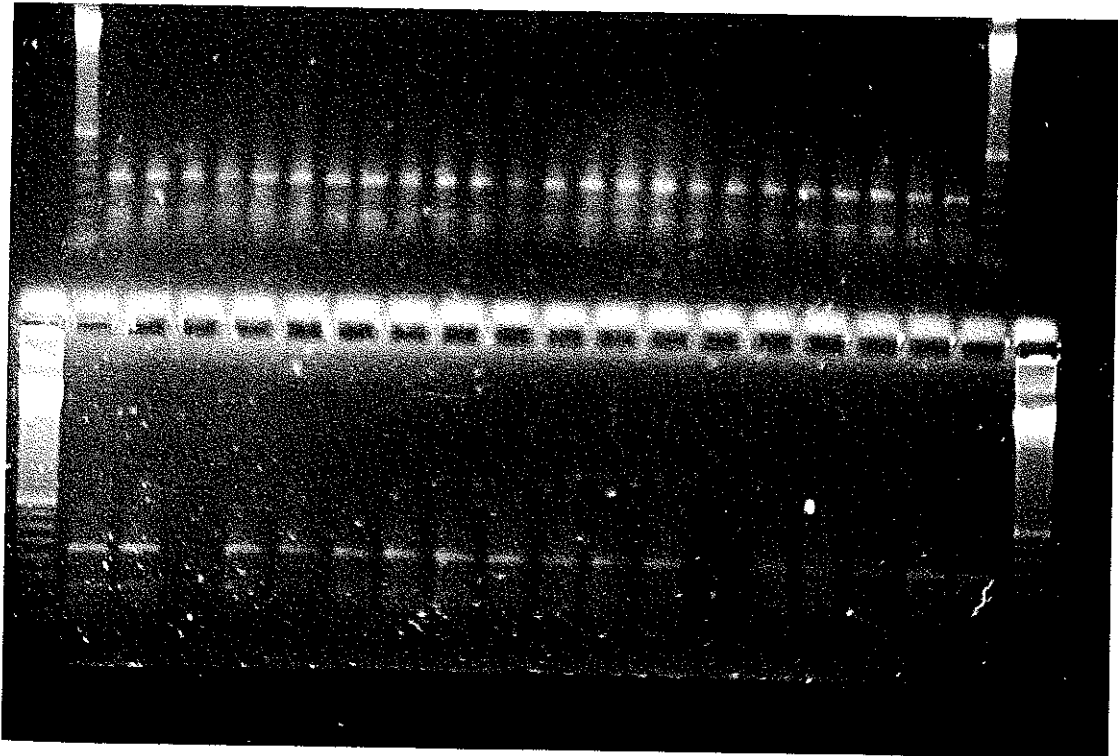
94 °C'de 30 saniye

56 °C'de 30 saniye

72 °C'de 60 saniye

+4 °C ∞

Elde edilen 20 µl'lik PCR ürünlerinden 3 µl çekilerek % 1.5'luk agaroz jelde amplifikasyonun olup olmadığı kontrol edilir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Kesilen ve adaptörleri bağlanan DNA örneklerinin 1 seçici bazla amplifikasyonunun kontrolü.

Şekil 3.2'deki gibi smear görüntüsünün oluşmasına göre kontrol edilen ön-seçici PCR ürünleri, oldukça konsantre olduklarından 1:10 oranında TE₀₁ ile sulandırılır. Yani kalan 17 µl'lik reaksiyona 153 µl TE₀₁ eklenir.

4. Seçici amplifikasyon

Sulandırılan ön-seçici PCR ürünlerinden 2.5 µl alınarak aşağıdaki reaksiyon hazırlanır ve seçici PCR yapılır.

	<u>Miktar</u>
Sulandırılmış PCR ürünleri	2.5 µl
2 x PCR core mix	5 µl
1 µM <i>EcoRI</i> * primerleri (3 seçici bazlı)	0.4 µl
(* <i>EcoRI</i> , IRD (kırmızı ötesi) 700 Dye ile işaretlenmiştir (MWG Biotech, Milton Keynes, UK)	
5 µM <i>MseI</i> primerleri (3 ya da 2 seçici bazlı)	0.6 µl
Taq polymerase (0.2 U)	0.04 µl
AFLP için yüksek kaliteli su	<u>1.5 µl</u>
	10 µl

PCR programı

1 döngü:

94 °C'de 30 saniye

65 °C'de 30 saniye

72 °C'de 60 saniye

Bu program 12 kez tekrar edilir ve her döngüde annealing sıcaklığı 0.7 °C düşürülür (65'den, 56.6 °C'ye kadar). Ardından 23 döngü aşağıdaki program takip edilir.

PCR programı

23 döngü:

94 °C'de 30 saniye

56 °C'de 30 saniye

72 °C'de 60 saniye

+4 °C ∞

5. LiCor otomatik sekanslayıcı

Elde edilen seçici amplifikasyon ürünlerinin her birinden 2 µl alınır ve 1 µl LiCor yükleme tamponu (% 0.05 w/v pararosaniline, 10 mM EDTA ve % 95 v/v formamid) ile karıştırılır. Bu karışım 95 °C'de 2 dakika denature edilir edilmez hemen buz üzerine yerleştirilir. En az iki saat öncesinden hazırlanmış LiCor poliakrilamid jele 1 µl olarak yüklenir ve 40 W sabit güçte LiCor Gene ReadIR 4200 otomatik sekanslayıcı sistemde (LiCor, Nebraska, USA) elektroferiz yapılır. Sonuçlar dijital olarak bir CD'ye kaydedilir.

Takip edilen bu protokol ışığı altında, susamda kapalı kapsüllülük mutant karakterine bağlı moleküler markerler elde etmek amacıyla yapılan AFLP analizini kısaca özetlemek gerekirse: 250 ng genomik susam DNA'ları dört saat süreyle *EcoRI* ve *MseI* restriksiyon enzimleriyle kesime tabi tutulmuşlardır. *EcoRI* (GACTGCGTACCAATTC) ve *MseI* (GATGAGICCTIGAGTAA) adaptörlerinin kesilen DNA fragmentlerine ligasyonunun ardından, 3' uçlarında birer seçici nükleotid taşıyan *EcoRI* (GACTGCGIACCAATTCA) ve *MseI* (GATGAGICCTIGAGTAAC) primerleriyle ön-seçici amplifikasyon yapılmıştır. Bu amplifikasyonu 3' ucunda üç seçici bazlı *EcoRI* ve hem üç hem de 2 seçici baza sahip olan *MseI* primerleriyle yapılan ikinci bir amplifikasyon takip etmiştir (seçici amplifikasyon). *EcoRI* seçici primerlerinin ucu IRD-700 Dye (MWG Biotech, Milton Keynes, UK) ile işaretlenmiştir. 10 µl'lik seçici amplifikasyon reaksiyonundan 2 µl çekilerek, 1 µl yükleme boyası (% 0.05 w/v pararosaniline, 10 mM EDTA ve %95 v/v formamid) ile karıştırılmış ve 94 °C'de 2 dakika denature edilmiştir. Denaturasyon sonrası 1 µl DNA ve yükleme boyası karışımı %6'lık poli akrilamid jele [SequaGel-6 (National Diagnostics)] yüklenerek 40 W sabit güç altında LiCor Gene ReadIR 4200 otomatik sekanslayıcıda (LiCor, Nebraska, USA) elektroferiz edilmiştir. Sonuçlar dijital olarak CD'ye kaydedilerek, yorumlanmıştır.

3.3.5.1. Poliakrilamid jelin hazırlanması

LiCor otomatik sekanslayıcıya uygun poliakrilamid jelin hazırlanması için gerekli ekipman ve kimyasallar şöyledir:

- a. İki adet orta boy cam ekipman (Yaklaşık 35 cm uzunluk, 20 cm genişlik ve 4 mm kalınlık)
- b. 0.25 mm'lik plastik jel kalınlık verici.
- c. 0.25 mm'lik tarak boşluğu oluşturucu
- d. Cam ekipmanı sıkacak iki adet vidalı mengene
- e. Lif bırakmayan beyaz peçete
- f. % 50 etanol
- g. SequaGel-6 ve SequaGel Complete Buffer (National Diagnostics)
- h. Amonyum persülfat (Sigma)
- ı. Kalınlığı 0.25 mm'den az olan bir adet plastik kancal
- j. 50 ml'lik şırınga

İki adet orta boy cam ekipman %50'lik alkol ve lif bırakmayan peçete kullanılarak iyice temizlenir. Özellikle camların jel dökülecek iç yüzeylerinde hiç bir kir lekesi ve toz parçasının kalmamasına dikkat edilir. Aksi takdirde, AFLP profili üzerinde bu lekeler büyük siyah noktalar şeklinde görülebilir ve o bölgedeki bandın görülmesi engellenir. Ayrıca, toz parçaları ya da peçete lifleri jelin dökülürken cam ekipman içerisinde ilerlemesini durdurup, o bölgelerde hava kabarcıklarının oluşmasına neden olabilir. Elektroferez esnasında bu kabarcıklar DNA'nın bloke edilmesine neden olarak yürütülmesine engel olabilir. Cam üzerindeki toz veya lekeler ışığın cam yüzey üzerinde yansıtılmasıyla görülebilir.

İyice temizlenen iki cam ekipmanın arasına 0.25 mm'lik jel kalınlık verici yerleştirilir ve mengenelelerle sıkıştırılır. Jel tabakalar böylece hazır hale getirilmiş olur ve jel hazırlamak üzere bırakılır.

50 ml % 6'lık poli akrilamid jel hazırlamak için 40 ml SequaGel-6 ve 10 ml Buffer Reagent (National Diagnostics) karıştırılır. Amonyum persülfat bir efendorf tüpünde hazırlanır (1.5 mg amonyum persülfat : 1.5 ml su). Hazırlanan solüsyonlarla jel tabakanın yanına gidilir ve amonyum persülfatın SequaGel-6 karışımına eklenmeden önce her türlü ekipmanın bulunduğundan emin olunur (Tarak boşluğu oluşturucu, plastik kancal şırınga,

vs.). Zira, amonyum persülfatın eklenmesiyle birlikte kimyasal polimerizasyonun hemen oluşması, gerekli ekipmanın yokluğunda, jeli dökmeden jelin donmasına neden olur. 400 µl amonyum persülfat SequaGel-6 karışımına eklenir ve şırınga içerisine çekilir. Şırınga öncelikle jel tabakanın uç tarafından son tarafına doğru hızlıca sıkıldıktan sonra jelin orta kısmına gelinir ve ağır ağır sıkılmaya devam edilir. Jel bir toz parçasına takılıp ilerlemesi durduğu takdirde, o toz parçasının üstüne hafifçe vurularak jelin yeniden cam tabakalar arasında ilerlemesi sağlanır. Cam tabakanın tabanına kadar jelin yerleşmesinin ardından, eğer hava kabarcığı oluştuysa, bunlar plastik kancal vasıtasıyla jelden uzaklaştırılır ve tarak boşluk oluşturucu yerleştirilerek mengenenin en üst vidası da sıkıştırılır. Son olarak arta kalan katılaşmış akrilamid jel, hava kabarcığı oluşumunu engellemek amacıyla cam tabakaların açıkta kalan kısımlarını kapatmada kullanılır ve jel, polimerizasyonun tam olması amacıyla en az iki saat süreyle bekletilir.

Jelin iki saat bekletilmesinin ardından tarak boşluğu oluşturucunun üzerine saf su sıkılarak gevşetilir ve dikkatlice çıkartılır. Tarak boşluğu içerisinde kalan akrilamid parçaları su ve kancal vasıtasıyla boşluktan dikkatlice uzaklaştırılır. Bu aşamada jele hiç bir zarar verilmemesi önem taşımaktadır. Çünkü kancalın jele ufak bir teması dahi, AFLP profilinde DNA bandlarının kaymasına neden olabilmektedir. Cam tabakaların dış yüzeylerinde hiç bir kir ve leke kalmayana dek temizlenir ve jel, DNA'ları yüklemek ve yürütmek üzere LiCor otomatik sekanslayıcıya yerleştirilir.

3.3.5.2 AFLP analizinde kullanılan kimyasallar ve çözeltiler

- 10 x One Phor All Buffer (Pharmacia)
- 2.5 Ünite *EcoRI* restriksiyon enzimi (NEB)
- 2.5 Ünite *MseI* restriksiyon enzimi (NEB)
- AFLP için yüksek kaliteli su (Sigma)

- 10 mM ATP (Pharmacia)

- *EcoRI* adaptörü (MWG, Milton Keynes, UK): Çift sarmallı *EcoRI* adaptörü yapmak için adaptör çiftinin konsantrasyonları 2.5 µM olacak şekilde sulandırılır. 95 °C'lik sıcak bir blokta birkaç dakika ısıtılır. Oda sıcaklığında birkaç saatliğine soğumaya bırakılan adaptörler birleşerek çift sarmallı *EcoRI* adaptörünü oluştururlar.

- *MseI* adaptörü (MWG, Milton Keynes, UK): Çift sarmallı *MseI* adaptörü yapmak için adaptör çiftinin konsantrasyonları 25 µM olacak şekilde sulandırılır. 95 °C'lik sıcak bir blokta birkaç dakika ısıtılır. Oda sıcaklığında birkaç saatliğine soğumaya bırakılan adaptörler birleşerek çift sarmallı *MseI* adaptörünü oluştururlar.

- 1 Ünite T4 DNA Ligaz (Pharmacia)

- 2 x Core Mix (20 mM Tris-HCl pH 8.3, 3 mM MgCl₂, 100 mM KCl, 0.2 mM dNTPs):
1 ve 100 reaksiyon için aşağıdaki gibi hazırlanır.

Stok solüsyonlar	1 reaksiyon için	100 reaksiyon için
Tris-HCl (200 mM)	1 µl	100 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1.2 µl	120 µl
KCl (2M)	0.5 µl	50 µl
dNTP (20 mM)	0.2 µl	20µl
Su	7.1 µl	710µl
Toplam	10 µl	1000 µl

- Taq polimeraz (0.4 ve 0.2 Ünite)

- Ön-seçici primer çifti (30 ng/µl): 100 µM ve 514.46 ng/µl yoğunluğundaki stok *EcoRI* ön seçici primerinden 6.4 µl; 100 µM ve 522.19 ng/µl yoğunluğundaki stok *MseI* ön-seçici primerinden ise 6.3 µl çekilip, toplam hacmin 110 µl olmasını sağlayacak kadar destile suyun ilave edilmesiyle elde edilmiştir.

- TE₀₁ buffer: 10 ml TE buffer içersine 90 ml su eklenmesiyle elde edilmiştir.
- 1 µM *EcoRI* seçici primeri (MWG, Milton Keynes, UK)
- 5 µM *MseI* seçici primeri (MWG, Milton Keynes, UK)
- Agaroz jel (% 1.5): 100 ml 0.5 x TBE buffer içersine 1.5 g agaroz eklenip mikrodalga fırında eritilmesi sonucunda % 1.5'luk agaroz jel elde edilmiştir.
- Ficoll Orange G dye [FOG dye; DNA yükleme boyası (% 10 Ficoll, % 0.05 Orange G ve 100 mM EDTA)]: 10 ml Ficoll, 0.05 ml Orange G ve 20 mM EDTA üzerine hacim 100 ml olacak şekilde destile su eklenmesiyle elde edilmiştir.
- LiCor poli akrilamid jel için DNA yükleme buffer (% 0.05 pararosaniline, 10 mM EDTA, % 95 formamid): 0.025 g pararosaniline, 0.5 M EDTA stok çözeltiden 1 ml ve 47.5 ml formamid karıştırılıp hacmin destile su eklenerek 50 ml'ye tamamlanmasıyla elde edilmiştir.
- 10 x LiCor TBE Buffer: 162 g tris base, 25.5 g borik asit ve 9.3 g EDTA'nın karıştırılıp hacmin destile su eklenerek 1 litreye tamamlanmasıyla elde edilmiştir.
- 1 x LiCor TBE Buffer: 100 ml 10 x LiCor Buffer solüsyonuna 900 ml su eklenerek elde edilmiştir.
- LiCor poliakrilamid jel

3.3.6. RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) analizi

Kapalı kapsüllülük mutant özelliğine bağlı moleküler markerler belirlemede AFLP analizi yanında RAPD (Welsh ve McClelland 1990, Williams vd 1990) analizi de kullanılmıştır. 12 farklı RAPD primeri (# 70, UCD 58, H5, Primer 9, UCD 3, UCD 11,

UCD 60, Primer 4, ATC 61, H8, G19, UCD 57) ilgili özelliğe bağlı marker ya da markerler bulmak üzere denenmiştir. Bunun için RAPD reaksiyonları aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır.

Master miks	1 reaksiyon için	25 reaksiyon için	100 reaksiyon için
dH ₂ O	16.6875 µl	417.1875 µl	1668.75 µl
4 mM MgCl ₂	4 µl	100 µl	400 µl
10 x PCR Buffer	2.5 µl	62.5 µl	250 µl
0.2 mM dNTP	0.25 µl	6.25 µl	25 µl
BSA (1:100)	0.25 µl	6.25 µl	25 µl
Taq polimeraz (1:100)	0.25 µl	6.25 µl	25 µl
0.5 µM Primer	0.0625 µl	1.5625 µl	6.25 µl
Toplam	24 µl	600 µl	2400 µl

Bir reaksiyon için hazırlanan 24 µl master miks karışımı, 1 µl bulk DNA kalıbına eklenerek 25 µl hacme sahip RAPD örneği, PCR yapmaya hazır hale getirilmiştir. RAPD analizleri için PCR döngü parametreleri şu şekilde benimsenmiştir:

Öncelikle iyi bir denaturasyonun olması amacıyla, DNA örnekleri 94 °C'de 2 dakika bekletilmişlerdir. Ardından 40 döngü aşağıdaki program takip edilmiştir.

1 döngü:

94 °C'de 30 saniye

37°C'de 30 saniye

72 °C'de 60 saniye

+4 °C ∞

Nükleotidlerin iyice sentezlenmesini sağlamak amacıyla da 40 döngü sonunda örnekler 72 °C'de 5 dakika bekletilmişlerdir. PCR döngülerinin bu şekilde tamamlanmasıyla agaroz jel elektroferez yapılmaya hazır RAPD ürünleri elde edilmiştir.

3.3.6.1 Agaroz jel elektroferezi

RAPD analizleri için % 1.5 olarak hazırlanan agaroz jel, jel elektroferez kabına dikkatlice dökülmüş ve en az 30 dakika polimerizasyona bırakılmıştır. 0.5 x TBE içeren elektroferez tankına, polimerizasyonunu tamamlamış jel dikkatlice yerleştirilmiş ve dikkatlice tarak çıkartılarak, DNA örneklerinin yükleneceği kuyucuklar oluşturulmuştur. Burada, jelin üst yüzeyinin 0.5 x TBE buffer ile tamamen kaplandığından emin olunmuştur. PCR sonucu oluşan 25 µl hacimli RAPD ürünlerine 10 µl Orange G DNA yükleme boyası eklenmiş ve yürütülmek üzere bu karışımdan (RAPD ürünü + Orange G) 20 µl jele yüklenmiştir.

80 voltta yaklaşık bir saat yürütülen DNA örnekleri, etidium bromid ile bir shaker üzerinde 30 dakika süresince boyanmıştır. Bilgisayara bağlı UV transiluminatöre yerleştiren örnekler, kamera vasıtasıyla resimleri çekilmiş ve dijital data olarak bilgisayara kaydedilmiştir. Sonuçlar elde edilen resim üzerinde ilgili özellik bakımından bir farklılık olup olmamasına göre yorumlanmıştır.

3.3.7 Kapalı kapsüllülük mutant karakterine bağlı moleküler markerler belirlemede AFLP ve RAPD markerlerinin kullanılması

Bulk segregant analizine uygun olarak, aynı fenotipe sahip (kapalı ya da normal) bireylerin meydana getirdiği her bir açılan popülasyona ait 6 bulk DNA örneği ve bunların ebeveynleri AFLP ve RAPD analizlerinde, ilgili özelliğe bağlı markerler belirlemek üzere kullanılmışlardır. Herhangi bir polimorfizmin kolaylıkla AFLP ve RAPD profillerinden görülebilmesi için kapalı kapsüllü ebeveyn, kapalı kapsüllü bulklar (bir popülasyonun 3 bulk DNA'sı), normal bulklar (aynı popülasyonun normal fenotipli 3 ayrı bulk DNA'sı) ve normal ebeveyn sırası takip edilerek yükleme yapılmıştır. Dolayısıyla ilk 4 sütunun kapalı, sonraki 4 sütunun normal fenotipli DNA'ların oluşturduğu analizlerde, muhtemel bir polimorfizm kolaylıkla görülebilmektedir. AFLP için 72 farklı primer kombinasyonu, RAPD için ise 12 farklı primer, sırasıyla ilgili özelliğe bağlı marker ya da markerler bulmak üzere susam genomunu taramıştır.

3.3.8. F₃ döl kontrolü

Markerlerin belirlendiği populasyonlardan Muganlı x cc3 populasyonuna ait olan ve DNA örneklerinin alındığı bireylerin tohumları, bulunan markerin bir de tarla şartlarında konfirmasyonu için F₃ olarak yetiştirilmiştir. Her bir F₂ bireyinin tohumları tek sıralara ekilmiş ve açılım oranlarında meydana gelebilecek sapmalardan kaçınmak için çıkıştan sonra susam yetiştiriciliğinde normal olarak uygulanan tekleme yapılmamıştır. Bitkilerin çiçeklenmesinin ardından her bir sıradaki bitkilerin kapalı ya da açık olmasına göre açılımları belirlenmiş ve F₂'deki genotipik yapısı hakkında karar verilerek, moleküler analiz sonuçlarıyla uyumu değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. DNA İzolasyonun Optimizasyonu

Susamın taze yapraklarından DNA izolasyonu sorunlu ve zahmetli olmaktadır. Bhat vd (1999) -80 °C'de dondurulmuş yaprak örneklerinden DNA izolasyonlarını Saghai-Marooif vd (1984)'nin protokolünü kullanarak başarırken, Chung vd (1998) susam tohumlarından DNA izolasyonunun yapılabileceğini göstermişlerdir. Bununla birlikte, susamın taze yapraklarından DNA izolasyonunun gerçekleştirildiği bir literatür bilgisi mevcut değildir. Susamın bu konuda da ihmal edilmiş olması, çalışmanın daha DNA izolasyonları aşamasında sıkıntıların yaşanmasına neden olmuştur. CTAB gibi, miniprep DNA izolasyonu gibi geniş oranda kabul gören ve birçok bitki türüne uygulanan yöntemler, bu çalışmada kullanılmasına rağmen susamın taze yapraklarından DNA izolasyonunun gerçekleştirilmesine olanak vermemiştir. Sonunda Dellaporta vd (1985)'nin protokolü kullanılarak susamın taze yapraklarından DNA izolasyonu başarılabilmektedir.

Dellaporta vd (1985)'nin metoduna göre izole edilen DNA'lar *EcoRI* ve *MseI* enzimleri ile kesime tabi tutulmuş ancak kesim meydana gelmemiştir. DNA örnekleri PCR ile amplifiye olmalarına rağmen, restriksiyon enzimleri ile kesime cevap vermemiştir. Susam yapraklarının musilajlı olması, fenolik bileşiklerin ve polisakkaritlerin DNA örneklerinde muhtemelen bol miktarda bulunmasına neden olmuş ve bu durum, restriksiyon enzimlerinin aktivasyonunu engellemiştir.

Bu aşamada, bazı ticari DNA temizleme kiti, DNA örneklerinin kesilmesini sağlayacak düzeyde fenolik bileşik ve polisakkaritlerden arındırılmasında kullanılmış, ancak sonuç istenen düzeyde olmamıştır. Susam DNA'ları, kiti kullanarak temizlenmiş ancak bu kez DNA miktarlarında büyük kayıpların meydana geldiği görülmüştür. Muhtemelen, polisakkarit ve fenolik bileşikler, DNA ile iç içe geçerek kompakt bir yapı haline gelmişler ve kit kolumlarının üzerinde yer alırken, kompakt halde bulunmayan az miktardaki DNA kısımları kolumdan geçmeyi başarabilmişlerdir. Ne var ki, az miktardaki DNA ile genomun büyük bir bölümünün ilgili özellik için

taranması mümkün değildir. Bu nedenle, değişik temizleme teknikleri formüle edilmeye çalışılmıştır. Birçok kez tekrar edilen kloroform ve fenol ekstraksiyonları ile birlikte, DNA örneklerinin sürekli çözülüp tekrar çökertilmesi, DNA'nın yeter düzeyde temizlenmesine olanak vermiştir.

DNA'ların iyice çözülmesi, kompakt yapının ayrılmasını sağlamıştır. Burada yapılan fenol ve kloroform ekstraksiyonları ayrılan fenolik bileşikleri ve polisakkaritleri uzaklaştırmıştır. Tekrar çökertilen DNA'nın yeniden çözülmesi sonucunda serbest kalan fenolik ve polisakkaritlerin tekrar ekstrakte edilerek bir grup daha istenmeyen bileşiğin uzaklaştırılması mümkün olmuştur. Bu prosedürün birkaç kez tekrarı restriksiyon enzimleri ile kesimi sağlayacak kadar temiz DNA'nın elde edilmesini sağlamıştır. Çalışmada kullanılan bütün DNA'lar bu şekilde temizlenerek marker analizlerinde kullanılmıştır. Ancak, işin zaman boyutundan bakıldığında, DNA'ların temizlenmesinde uzun bir süre uğraşmıştır. Bu yüzden, susam DNA'larının izolasyonunda Dellaporta vd (1985) metodu uygulanacaksa, potasyum asetat inkübasyonundan sonra birkaç kez kloroform-oktanol (24:1) ve fenol ekstraksiyonlarının yapılması, DNA'nın yeter düzeyde protein tabiatlı bileşik ve polisakkaritlerden arı olmasını sağlayacaktır. Diğer taraftan, çalışmanın uygunluğuna göre DNA izolasyonunda kullanılacak taze yaprağın bitki gelişiminin mümkün olan en erken döneminde alınması, izolasyonun temiz olmasına katkıda bulunacaktır. Fakat çalışılan karakter bitki gelişiminin ileriki dönemlerinde ortaya çıkıyorsa, yaşlı yapraklarda yapılacak DNA izolasyonlarında fazla sayıda kloroform-oktanol ve fenol ekstraksiyonlarının yapılması gereklidir.

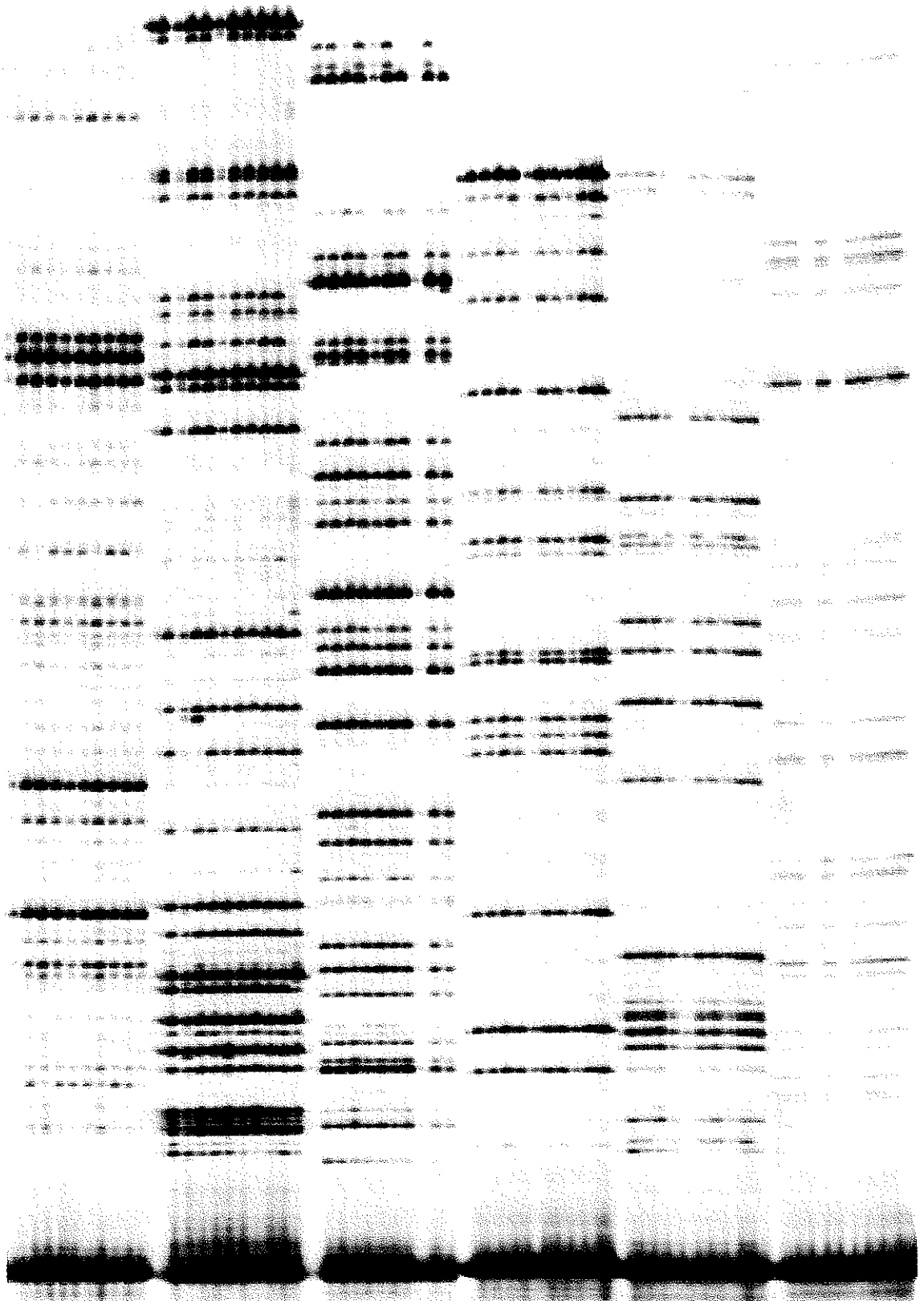
4.2. Bulk Segregant Analizi

Herhangi bir gen veya genomik bölgeye bağlı markerler belirlemede bulk segregant analizi; hızlı, basit ve güvenilir bir metod olarak karşımıza çıkmaktadır. Metodun uygulanmasında tek gereklilik, arzu edilen gen ya da karakter için açılan bir populasyonun varlığıdır. Açılan bir populasyon arzu edilen gen ya da karaktere sahip olan ve olmayan iki ebeveyn arasında melezleme yapılarak elde edilir. Bu populasyondan ilgili geni içeren ile içermeyen bireylerin DNA'ları ayrı ayrı havuzlanarak iki zıt bulk DNA elde edilir. Sonuçta arzu edilen gen bakımından özdeş

ama diğerk lokuslar bakımından tamamen rasgele dağılan bir kaynak elde edilmiş olur ki, bu kaynaktaki ilgili gene bağı moleküler markerler kolaylıkla belirlenir.

Bu amaç doğrultusunda, kapalı kapsüllülük mutant karakterine bağı moleküler markerler belirlemede bulk segregant analizi kullanılmıştır. Bunun için tek bir populasyon kullanma yerine, 1995 yılında gamma ışınlarıyla elde edilen üç ayrı mutant (cc1, cc2, cc3) ve bir doğal mutant (idid) olmak üzere dört ayrı populasyon kullanılmıştır. Bu mutantlar, kapsülleri çatlayan yöresel çeşit Muganlı-57 ile melezlenmiş ve elde edilen progeni kendilenecek açılan F₂ populasyonuna ulaşılmıştır. Dört ayrı F₂ populasyonunun her birinden otuz kapalı ve otuz normal fenotipli bitkiler belirlenmiş ve aynı fenotipli onar bitkininin eşit ağırlıktaki yaprakları havuzlanarak DNA izolasyonu yapılmıştır. Sonuçta her bir populasyon için üç kapalı ve üç normal fenotipli bulk DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, 10 kapalı ve 10 normal kapsüllü bitkinin yaprakları karıştırılmadan bireysel DNA izolasyonu gerçekleştirilmiş ve eşit ağırlıktaki DNA'ları bulk yapılmıştır.

Kapalı kapsüllülük mutant karakterine bağı markerler belirlemede bulk segregant analiz yaklaşımının kullanılması, uygun populasyon geliştirmede harcanan zamanı azaltırken, moleküler markerlerle genomun taranmasına hız ve kolaylık ta getirmiştir. Zira, F₂ populasyon kullanımını temel alan bulk segregant analizi yerine, yakın izogenik hatlar veya rekombinant hatların kullanılması, uygun populasyon geliştirmede ihtiyaç duyulan iki yıl yerine, 7-9 yılın harcanmasını gerektirirdi. Diğerk taraftan, kullanılan bulkların ilgili özellik bakımından özdeş olması, zıt bulklar arasında oluşan herhangi bir polimorfizmin, ilgili gene bağı olma olasılığını artırma şansını vermektedir. Yani yanlış polimorfizm çıkma oranını bulk segregant analizi en aza indirmektedir. Ayrıca bireysel DNA yerine bulk DNA'ların kullanılması, analiz sayısını azaltarak araştırmaya hız kazandırırken, on ayrı DNA yerine tek bir bulk DNA yüklemekle de araştırmanın daha kolay yürütülmesine imkan vermiştir. Bunlara ilaveten, Şekil 4.1.'deki gibi kapalı kapsüllü DNA'ların ilk sütunlarda, normal kapsüllü DNA'ların ise onları takip eden sütunlarda elektroferez edilmesi, aralarında oluşacak muhtemel polimorfizmin kolaylıkla görülebilmesini sağlamıştır.



Şekil 4.1. Kapalı ve normal kapsüllü bulk DNA'ların AFLP poliakrilamid jelde altı farklı primer kombinasyonu ile elektroferesi

Bulk DNA'lar iki farklı şekilde elde edilmiş ve analizlerde kullanılmıştır. Aynı fenotipe sahip 10 bitkinin eşit ağırlıktaki yaprakları karıştırılmış ve bundan DNA izolasyonu yapılarak, 10 farklı DNA ekstraksiyonu yerine bir DNA ekstraksiyonu yapılmıştır. İkinci olarak 10 ayrı bireyin DNA'sı ayrı ayrı izole edilmiş ve eşit miktardaki DNA'ları karıştırılmıştır. AFLP analizlerinde hem yaprakların karıştırılmasıyla hem de bireysel DNA'ların karıştırılmasıyla elde edilen bulk DNA'lar kullanılmış ve aralarında hiçbir farkın olmadığı görülmüştür. Her iki bulk DNA da aynı AFLP profilini vermiştir (Şekil 4.1.). Bu noktadan hareketle, bu türden çalışmaların sonraki aşamalarında bireysel DNA örneklerine ihtiyaç duyulmayacaksa ya da, sonradan ilgili bireysel DNA'ların izole edilme şansı var ise, arzu edilen özellik bakımından aynı fenotipe sahip birçok bireyin yaprakları karıştırılabilir ve ondan tek bir DNA izolasyonu gerçekleştirilebilir. Böylece, birçok bireysel DNA'nın tek tek izolasyonu ile vakit kaybedilmezken, bu uygulamayla kullanılacak birçok pahalı kimyasaldan da tasarruf sağlanmış olur. Nitekim, AFLP analizlerinde ortaya çıkan profillerin aynı olması bu yolu her zaman açık tutmaktadır.

Bulk segregant analizi kapalı kapsüllülük mutant karakterine bağlı marker belirlemede etkin bir rol oynamış ve başarılı sonuçlar almanın en büyük anahtarı olmuştur. Nitekim, bireyler üzerinden polimorfizmler aranmaya çalışılırdı, büyük ihtimalle gerçek polimorfizm yakalama şansı çok düşücekti. Ayrıca ilgili kromozom segmentinde bir farklılık bulunsa dahi, bireyler üzerinden yapılacak DNA analizlerinde, farklılığın bantlara yansımaları düşük ihtimalken, aynı farklılığı içeren bireylerin DNA'larının bir araya getirilmesi ile küçük farklılıkların dahi bant olarak gözükmesi mümkün hale gelmiştir.

4.3. AFLP Markerlerinin Susam Bitkisine Uygulanması

AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) PCR'a dayalı olan yeni bir moleküler tekniktir. Bitki ve hayvan ıslahında agronomik özelliklerin kalıtımının incelenmesi, kalıtsal hastalıkların teşhisi, pedigrî analizleri, genetik özelliklere bağlı markerler belirleme gibi birçok değişik alanda AFLP markerleri kullanım alanı bulabilmektedir (Bleas vd 1998). AFLP'nin diğer marker sistemlerine göre birçok

avantajının bulunmasına rağmen, tek bir analizde fazla sayıda lokusun taranabilmesi ve tekrarlanabilirliğinin yüksek olması, analizin en cazip tarafı olarak görülmektedir (Thomas vd 1995, Qu vd 1998, Breyne vd 1997).

AFLP; genetik çeşitliliği belirleme (Maughan vd 1996, Ajmone Marsan vd 1998), yüksek yoğunlukta genetik haritalar oluşturma (Qi ve Lindhout 1997, Becker vd 1995), ve bağlı moleküler markerler belirleme (Thomas vd 1995, Bai vd 1999) gibi konularda, geliştirildiği günden bu yana en çok kullanılırken birçok bitki genusunda da denenmiştir. Ancak susam gibi ihmal edilmiş bir bitkide, bugüne kadar AFLP analizinin kullanıldığı bir çalışma mevcut değildir. AFLP'den daha eski olarak geliştirilen RAPD (Williams vd 1990, Welsh ve McClelland 1990) analizi dahi, susamda ilk moleküler marker çalışması olarak, 1999 yılının sonlarında literatürde yer almıştır (Bhat vd 1999) ve başka bir örneği yoktur. Susamda AFLP analizinin ilk defa kullanılması nedeniyle, tekniğin bitkiye uygulanmasında birtakım sıkıntılar yaşanmış ancak, AFLP analizlerinin yoğun olarak yürütüldüğü bir laboratuvarında çalışmanın avantajıyla, sıkıntıları aşmak nispeten kolay olmuştur.

AFLP tekniği kabaca DNA'nın kesimi, kesilen DNA'nın adaptörlerle birleşimi, bunların PCR amplifikasyonu ve jel analizi adımlarından meydana gelmektedir. Dolayısıyla, her bir aşamanın kendi içinde optimize edilmesi gerekmektedir.

4.3.1. DNA kesimlerinin optimizasyonu

DNA kesimlerini ve daha da önemlisi AFLP profillerini etkileyen en önemli faktör DNA konsantrasyonudur. Her bir DNA örneğinin konsantrasyonu mutlaka eşit olmalıdır. Aksi takdirde, kesim reaksiyon şartları değişeceği gibi, AFLP profilinde her bir örneğin çözünürlüğü de değişecektir. Şöyle ki, DNA konsantrasyonu düşük bir örneğin ilgili bandı gözükmeyebilirken, konsantrasyonu yüksek olan bir örneğin ilgili yerde bant oluşturması beklenebilir ki, bu da yanlış polimorfizmin oluşmasına neden olur. Dolayısıyla, analizlerde kullanılan bütün DNA'ların konsantrasyonları eşit olmak durumundadır. Susamda kesim için uygun DNA konsantrasyonu 250 ng olarak

belirlenmiş ve 50 ng'a ayarlanan DNA örneklerinden 5 µl kullanılarak hedeflenen miktara ulaşılmıştır.

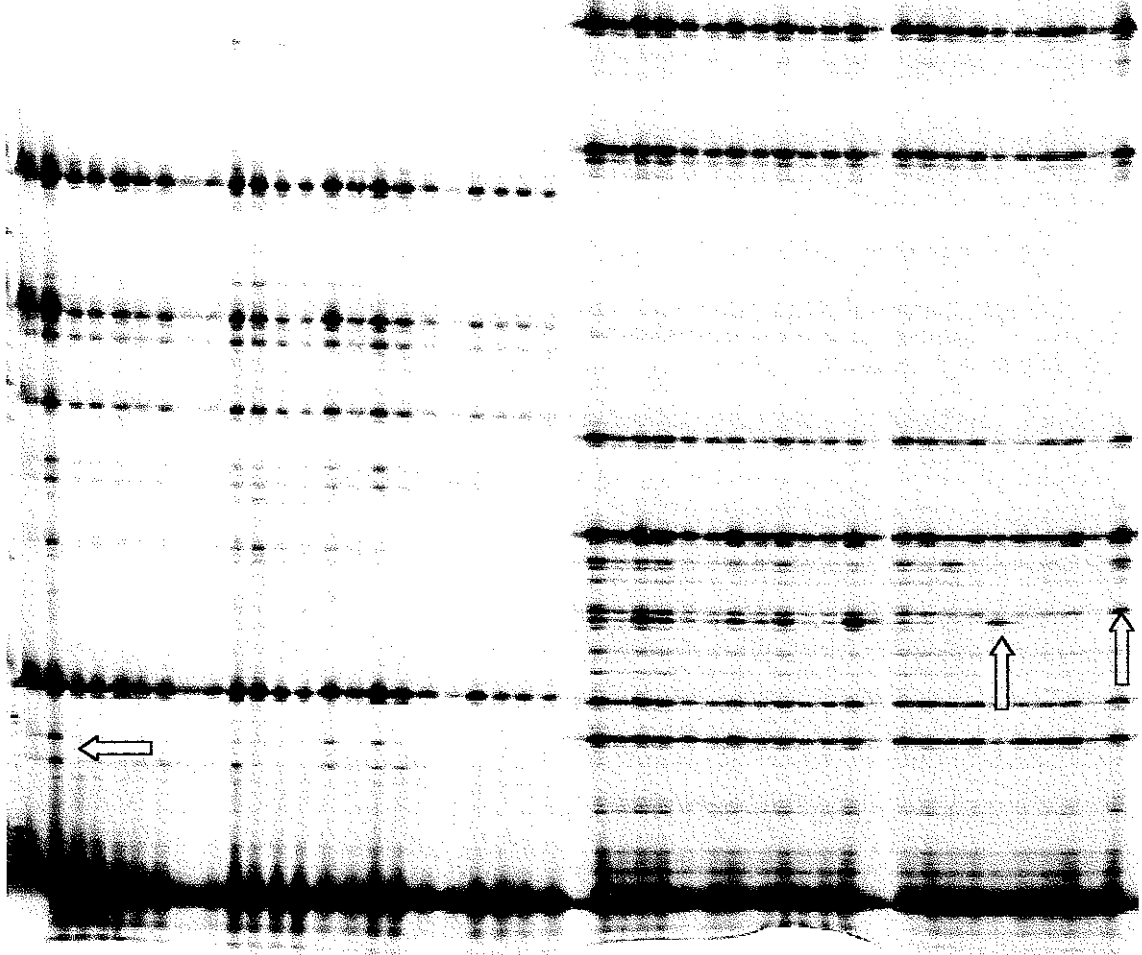
EcoRI ve *MseI* restriksiyon enzimlerinin kesim için en uygun miktarının 2.5 Ünite olduğu belirlenmiştir. Yabancı maddelerden arı, ticari olarak satılan yüksek kaliteli su, reaksiyonun toplam hacmini 25 µl'ye tamamlayacak kadar kullanılmıştır. Susam DNA'larının kesiminde önemli olan diğer bir faktör kesim süresi olmuştur. Başlangıçta, DNA'lar iki saat süreyle 37 °C'de inkübe edilmişler ama bazı DNA'ların agaroz jel elektroferezi sonucu kesilmediği görülmüştür. Ayrıca, agaroz jel elektroferezi sonucu kesildiği düşünülen bazı DNA'ların ise, AFLP analizleri sonucunda kısmen kesime uğradıkları görülmüştür (Şekil 4.2.). Bu amaçla, kesim süresi dört saate çıkarılmıştır. Dört saat kesime tabi tutulan DNA'larda hiçbir kısmi kesime rastlanmamıştır. Dolayısıyla, susam genotipi için en uygun kesim süresi dört saat olarak belirlenmiştir.

4.3.2. Adaptör ligasyonunun optimizasyonu

AFLP sekans bilgisi gerektirmeyen bir tekniktir. Çift iplikli adaptörler, restriksiyon enzimleri ile kesilen bölgelerle uyuşan nükleotid sıralamalara sahiptir ve DNA ligaz ile ATP varlığında kolaylıkla birleşir. Adaptörlerin sekansları ve enzim kesim bölgeleri PCR amplifikasyonunda primer bağlanma bölgesi olarak kullanılmaktadır.

Susamda kullanılan adaptörler Vos vd (1995) ile aynı sıralamaya sahiptirler. Ligasyon reaksiyonunun toplam hacmi 5 µl'ye ayarlanırken, 10 mM ATP ve 1 Ünite T4 DNA ligaz konsantrasyonu ligasyon için uygun bulunmuştur. Elde edilen 5 µl'lik ligasyon miksi her kesilen DNA örneğine ilave edilmiştir. Bu karışım 37 °C'de, 12 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Genellikle susamda 12 saatlik inkübasyon sorun çıkarmamış, tüm kesilmiş DNA'lar adaptörlerle bu süre zarfında birleşebilmişlerdir. Ancak birleşme olmaması durumunda süreyi biraz daha uzatmak ilk başvurulacak çözüm yolu olarak kabul görmektedir.

Ligasyon sonunda DNA'lar, *EcoRI-EcoRI*, *EcoRI-MseI* ve *MseI-MseI* olmak üzere üç farklı fragment olarak ayrılmışlardır. Kimi DNA'lar sadece *EcoRI* enzimi ile kesime



Şekil 4.2. Kısmen kesilen bazı DNA örneklerinin AFLP profilinde görülmesi*

* Oklar kısmi kesim olan blokları göstermektedir

uğrarken, kimileri *MseI* ve kimileri de her iki enzim tarafından kesime uğramıştır. Adaptörler ise kesim bölgelerine spesifik olduğundan tek enzimle kesilen bölgeye o enzimin adaptörü bağlanırken, iki enzim tarafından da kesime uğrayan kalıp DNA her iki adaptörle de birleşerek, yukarıda anılan üç farklı fragmenti meydana getirmiştir. Ancak susam genomunun AFLP ile taranmasında, yalnız *EcoRI* seçici primerinin IRD-700 ile işaretlenmesi, sadece *EcoRI-EcoRI* ve *EcoRI-MseI* fragmentlerini görmemizi sağlamıştır. Bu yol ile de, *MseI* sık kesen enziminin fazla sayıda ürettiği fragment

sonucunda, çok sayıda bantın ortaya çıkmasından kaynaklanabilecek smear görüntüsünden kaçmak mümkün olmuştur.

4.3.3. Ön-seçici amplifikasyonun optimizasyonu

Ön-seçici amplifikasyonun kullanılmaması mümkün ise de, kompleks genomlarda (10^8 - 10^9 bp) iki basamaklı amplifikasyon yapılması uygun görülmektedir. Susam da, yüksek organizmaların biri olduğundan, bir seçici baza sahip primerlerle ön-seçici amplifikasyonun yapılması gerekli görülmüştür. Ön-seçici amplifikasyon genellikle bir seçici bazla ya da seçici baz kullanılmadan yapılırken, susamda bir seçici baz kullanılmıştır. *EcoRI* primeri, A nükleotidini seçici baz olarak kullanırken, *MseI*, C nükleotidi ile bir seçici primer olmuştur. Her iki primerin 30 ng/ μ l olarak kullanılması uygun bulunmuştur.

Kesilen ve adaptörleri takılan DNA örneklerinin ön-seçici amplifikasyonu için gerekli görülen miktar 2 μ l olarak belirlenirken, reaksiyonun toplam hacmi 20 μ l'ye su ile tamamlanmıştır. PCR programı 94 °C'de 30 saniye, 56 °C'de 30 saniye ve 72 °C'de 1 dakika olarak geliştirilmiştir. Elde edilen amplifikasyon ürünleri oldukça yoğun olduklarından 1:10 oranında sulandırılması uygun görülmüştür.

Susamda ön-seçici amplifikasyon uygulanarak geri plandaki smear görüntülerinden kaçınmak planlanmıştır. Ön-seçici amplifikasyon, bazlarda meydana gelebilecek muhtemel yanlış eşleşmeleri en düşük seviyeye indirgeyerek, susam AFLP profillerinde smear görüntüsünün oluşmasını engellemiştir. Diğer taraftan, iki basamaklı amplifikasyon stratejisi, bize sınırsız kalıp DNA kullanma imkanı vermiştir. Şöyle ki, ön-seçici amplifikasyonda 2 μ l olarak kullanılan kesilmiş ve adaptörleri takılmış DNA örnekleri, PCR sonucu 20 μ l olarak çıkmaktadır. Ayrıca, bu amplifikasyonun 1:10 oranında sulandırılması sonucu, ki bunun seçici amplifikasyonda 2.5 μ l olarak kullanıldığı düşünülürse, gerçekten ön-seçici amplifikasyon sınırsız kalıp DNA kullanma imkanı sağlamıştır. Dolayısıyla, iki basamaklı amplifikasyonun özellikle kompleks genomlarda kullanılmasında büyük fayda olduğu kanısına varılmıştır.

4.3.4. Seçici amplifikasyonun optimizasyonu

AFLP seçici primerleri, adaptör sekansına özgü 5' kısmı, restriksiyon enziminin kesim bölgesi ve 3' seçici primerler olmak üzere üç farklı DNA sekansından meydana gelmektedir. Çalışmada iki farklı seçici AFLP primeri dizayn edilmiştir. Birincisi, adaptör sekansı ve az kesen *EcoRI* enziminin kesim bölgesine ilaveten 3' ucunda üç seçici nükleotidden oluşurken, ikincisi, adaptör sekansı ve sık kesen *MseI* enziminin kesim bölgesine ilaveten 3' ucunda üç ya da iki seçici nükleotidden meydana gelmiştir.

DNA'ların kesimi ve adaptörlerin eklenmesini takiben yapılan ön-seçici amplifikasyondan sonra, sulandırılmış ürünlerden 2.5 µl, seçici amplifikasyon için yeterli bulunmuştur. Seçici amplifikasyonun PCR şartları özenle hazırlanmıştır. Zira, çalışmada kullanılan iki ayrı primerin iki ayrı "annealing" sıcaklığı bulunmaktadır. *EcoRI*, yüksek annealing sıcaklığı isterken *MseI* daha düşük sıcaklıklarda kalıp DNA'ya anneal olabilmektedir. Bu yüzden annealing sıcaklığı PCR'm ilk döngüsünde 65 °C ile başlamış, her döngüde 0.7 °C düşürülmüştür. Bu işlem 12 döngü devam ettirilmiş ve 12. döngüde 56.6 °C'ye ulaşılmıştır. Daha sonra 13 döngü 56 °C'de PCR'a devam edilmiştir. Bu yol ile, her iki enzim için de ideal annealing sıcaklığının kullanılması sağlanmış ve bunun sonucunda nükleotidlerde oluşabilecek yanlış eşleşmelerden ve "loop" yapılardan uzaklaşmıştır.

Vos vd (1995) küçük genomlarda (10^6 - 10^7) bir ya da iki seçici nükleotidli primerlerin, polimorfizm üretmede yeterli olduğunu belirtirken, kompleks genomlarda (10^8 - 10^9) 3 seçici nükleotidli primerlerin daha iyi polimorfizmler verdiğini bildirmişlerdir. Genel olarak, 50 ile 100 arasındaki fragment, AFLP için ideal kabul edilmektedir. Susamda öncelikli olarak üç seçicili *EcoRI* ve *MseI* primerleri kullanılmıştır. Gerçekten de tüm primer kombinasyonlarından elde edilen fragment sayısı 50-100 arasında değişmiştir. Daha sonraki analizlerde, kombinasyon sayısını artırmak amacıyla iki seçici nükleotidli *MseI* primerleri kullanılmıştır ki, bunlardan da elde edilen fragment sayısı 50-100 arasında değişmiştir. Susamda yapılacak AFLP analizlerinde, genellikle üç seçici nükleotidli primerlerin kullanımının uygun olduğu bulunmuştur.

4.3.5. Poliakrilamid jel analizinin optimizasyonu

AFLP amplifikasyonlarının jel analizinde % 6'lık poliakrilamid jel kullanılmıştır. Çift bantların (doublet) oluşumunu engellemek için sadece *EcoRI* primerinin tek sarmalı IRD-700 dye ile işaretlenmiştir. Amplifikasyon ürünleri poliakrilamid jele yüklenmezden önce 94 °C'de 2 dakika denatüre edilerek, jele tek sarmal olarak yüklenmişlerdir. Jel analizi 40 °C'de üç saat yapılarak, 50-100 arasındaki kesilmiş fragmentin elde edilmesi sağlanmıştır. Jel analizleri LiCor Gene Reader 4200 otomatik sekanslayıcı sistemde (LiCor, Nebraska, USA) yapılmıştır. Sistem, floresans ışık sistemine göre çalışması, radyoizotop kullanımını gerektirmemesi ve sonuçların direkt bilgisayar ortamında değerlendirilebilmesi bakımından oldukça avantajlı olmuştur. Fakat jelden ilgili DNA segmentinin izolasyonunu yapmak mümkün değildir. Bu durumda gümüşle boyama yöntemi (Chalhoub vd 1997) yararlı olmaktadır. Susamda kapalı kapsüllülük mutant karakterine bağlı olarak belirlenen AFLP markerinin jelden izolasyonu için gümüşle boyama yöntemi kullanılmış (data verilmemiştir) ve LiCor jel analizi ile aynı AFLP profili sağladığı görülmüştür.

LiCor gene reader sistemi ile jel analizlerinin gerçekleştirilmesi hem gümüşle boyama hem de radyoaktif sistemlere göre avantajlı görülmektedir. Radyoaktif izotop kullanılmaması, bilgisayar ortamında AFLP bandlarının istenildiği kadar büyütülüp küçültülebilmesi ve okumanın lazer ile yapılması sistemin temel nitelikleri arasında yer almaktadır. Bununla birlikte, jelden ilgili fragmentin çıkartılmasının söz konusu olmaması, klonlama, sekanslama, probe dizaynı ve SCAR markerlerinin geliştirilmesi gibi ileriki çalışmalarda kullanımını engellemektedir. Bu gibi durumlarda, LiCor sisteminin kolaylığı ve avantajları nedeniyle, arzu edilen fragmentler, LiCor sistemi ile belirlenebilir, klonlama ve sekanslama gibi ileriki çalışmalar; jelden arzu edilen fragmentin izolasyonunu mümkün kılan gümüşle boyama prosedürü uygulanarak başarılabılır. Benzer şekilde, Cho vd (1996) gümüşle boyama ile boyanmış poliakrilamid jellerden AFLP fragmentlerini klonlandığı ve haritaladığı çalışmalarında, gümüşle boyama ve ³²P ile elde edilen AFLP profillerinin aynı olduğunu göstermişlerdir. Buna ilaveten, gümüşle boyama yönteminin radyoaktif olarak işaretli

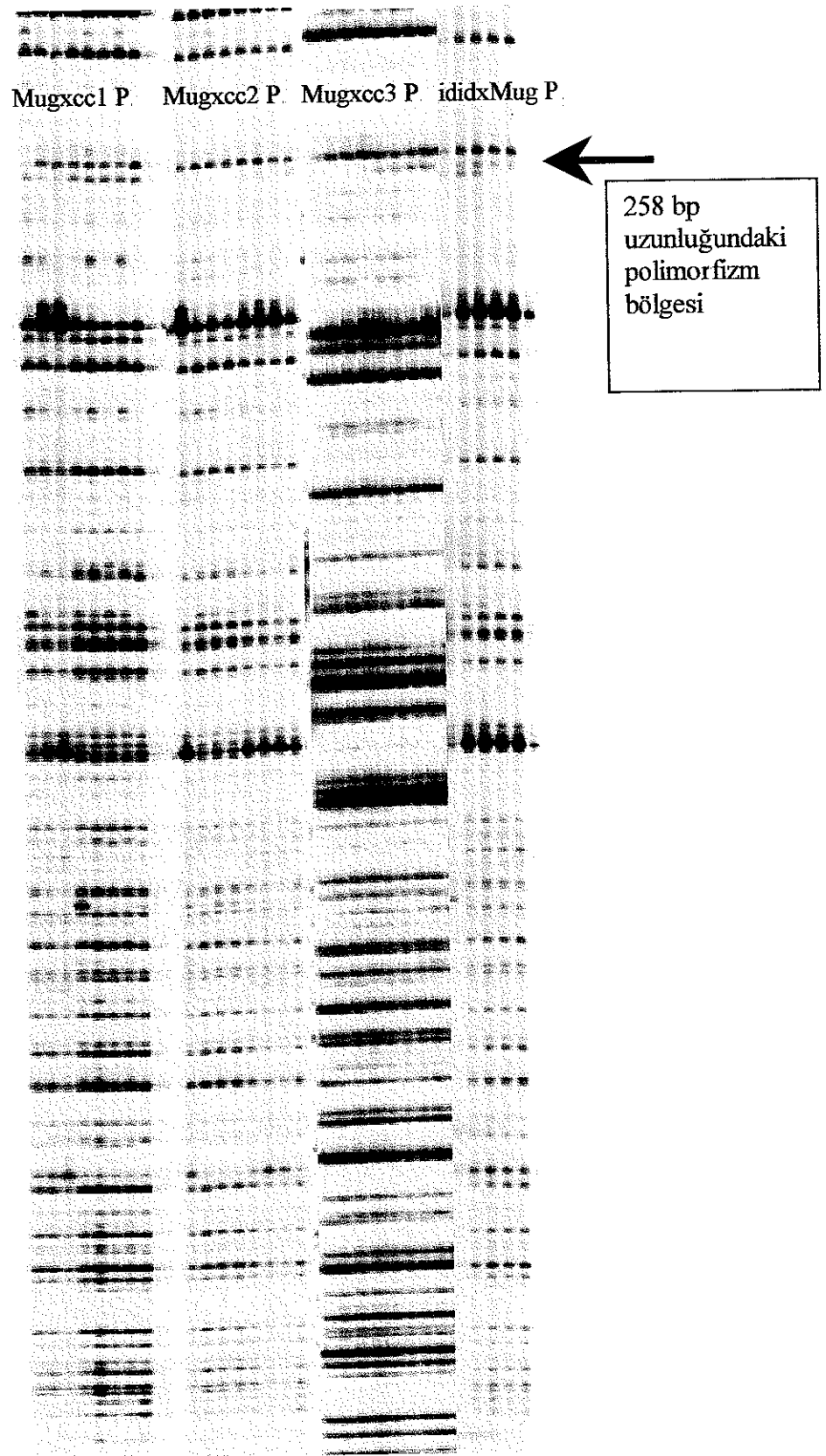
jellerden daha iyi resolüsyon sağladığı ve ilgili bandın jelden direkt olarak çıkartılması nedeniyle daha yararlı bir teknik olduğu belirtilmiştir.

4.4. Kapalı Kapsüllülük Mutant Karakterine Bağlı AFLP Markerinin Belirlenmesi

Üç seçici nükleotidli sekiz farklı *EcoRI* primeri ile yine üç seçici nükleotidli yedi *MseI* primerine ilaveten iki seçici nükleotidli iki *MseI* primerinin kullanımıyla toplamda 72 farklı AFLP primer kombinasyonu kapalı kapsüllülük mutant karakterine bağlı markerler belirlemek üzere susam genomunu taramıştır. Primer kombinasyonu başına taranan lokus sayısı ortalama 95 olmuştur. 72 primer sonucunda, susam genomunun kapalı kapsüllülük mutant karakteri bakımından 6840 lokusu taranmıştır.

AFLP primer kombinasyonları bulk DNA'lar ve onların ebeveynleri üzerinde denenmiş, polimorfizm oluşturan primer kombinasyonlarını konfirme etmek için bulkları meydana getiren bireysel DNA'lar kullanılmıştır. Kapalı kapsüllülük mutant karakterine bağlı markerler bulmada çok sayıda fragment oluşturulmasına karşın, bir gerçek polimorfizm bulunmuştur. 72 farklı primer kombinasyonundan bir tanesi (*EcoRI*+AAG ve *MseI*+CAT) kapalı kapsüllülük için açılım gösteren dört farklı populasyonun bulk ve ebeveyn DNA'larında farklılık ortaya çıkarmıştır (Şekil 4.3).

Şekil 4.3.'de görüldüğü gibi AFLP profilinin 258 bp uzunluğundaki kısmı, kapalı kapsüllülük mutant karakteri ile ilişkilidir. Ancak bu ilişki popülasyona göre değişmektedir. Muganlı x cc1 popülasyonunda ilgili özellik bakımından bir polimorfizm görülmezken, Mug x cc2 ve Mug x cc3 popülasyonlarının 258 bp'lik kromozom segmentinin kapalı kapsüllülük mutant karakteri ile yakından ilişkili olduğu gözükmektedir. Diğer taraftan doğal mutant popülasyon idid x Mug, 258 bp'lik kısımda ilgili özellik bakımından farklılık sergilemezken bu bölgenin hemen altında, yaklaşık 257 bp uzunluğundaki bölgede diğer popülasyonların (Mug x cc2 ve Mug x cc3) aksi bir polimorfizm görüntülenmektedir. Mug x cc2 ve Mug x cc3 popülasyonlarındaki linkage "trans" şeklinde, yani kapalı kapsüllü ebeveyn ve bulklarda bant oluşumu yok,



Şekil 4.3. Dört ayrı populasyonda *EcoRI*+AAG ve *MseI*+CAT primer kombinasyonunun meydana getirdiği polimorfizm.

buna karşın normal kapsüllü ebeveyn ve bulklarda bant söz konusu iken, doğal mutant popülasyonda (idid x Mug) linkage, "cis" şeklinde oluşmuştur.

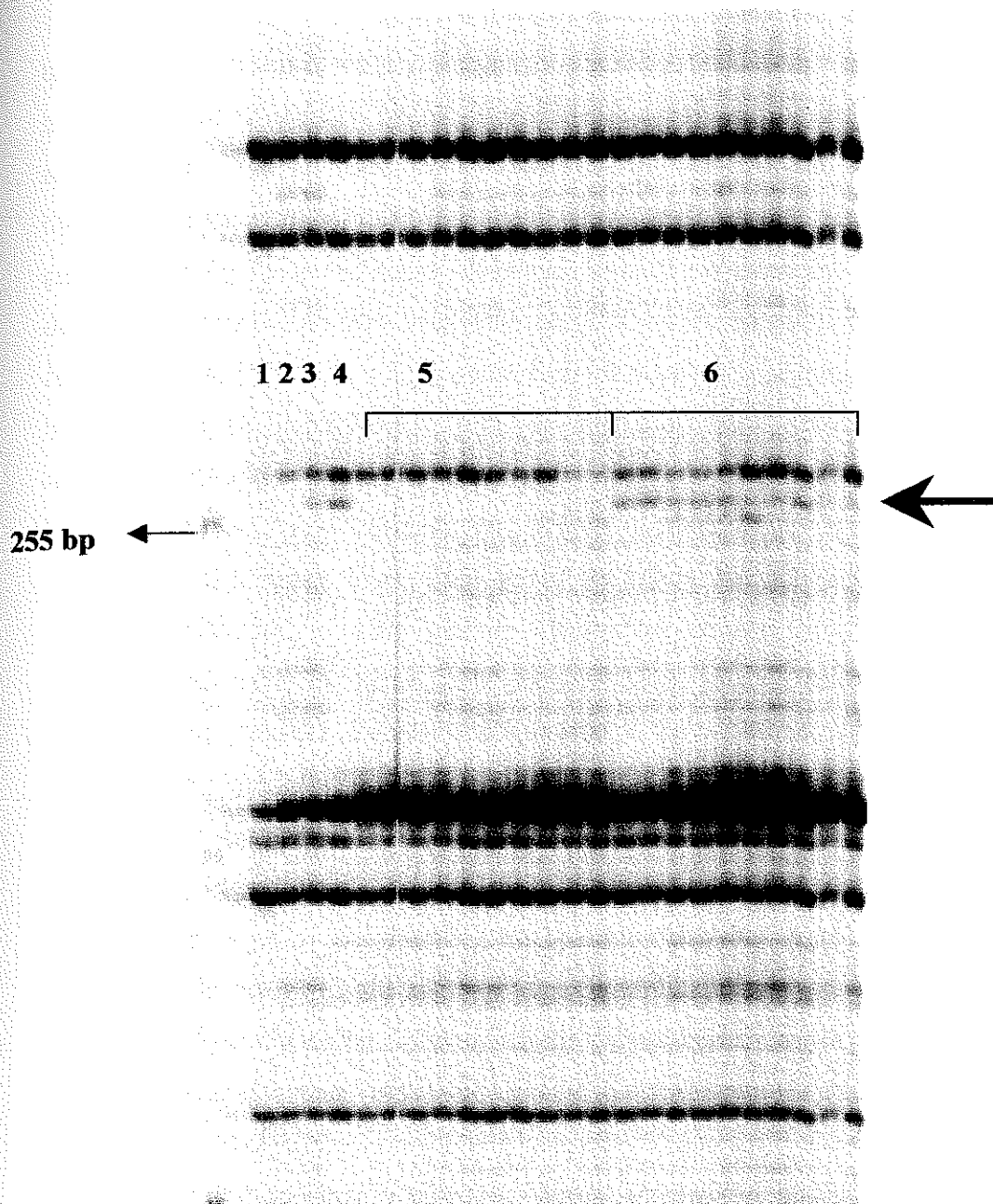
Kapalı kapsüllülük mutant karakteri için açılım gösteren dört ayrı popülasyondan Mug x cc1'in, ilgili kromozom segmentinde (258 bp) farklılık göstermemesi buna karşın, Mug x cc2 ve Mug x cc3 popülasyonlarının ilgili bölgede polimorfik olması daha da ötesi, idid x Mug popülasyonunun 258 bp uzunluğundaki segmentte değil de, hemen onun altındaki bölgede polimorfizm vermesi kolaylıkla açıklanacak türden değildir. Temel olarak, her bir popülasyondaki kapalı ebeveynin, farklı backgroundlardan gelmesi neden olarak gösterilebilirse de, yeterince açıklayıcı olmamaktadır. Her bir popülasyonun polimorfik bandları teker teker sekanslanıp karşılaştırılması konuya açıklık getirebilir. Ancak, polimorfik olmayan Mug x cc1 popülasyonu için karşılaştırma yapmak mümkün değildir. Doğal mutant (idid) hariç diğer kapalı ebeveynlerin (cc1, cc2, cc3) gamma ışınları (⁶⁰Co) ile oluşması ve mutasyonların çoğunlukla delesyon şeklinde meydana gelmesi, kapalı kapsüllülük mutant özelliğinin de bir delesyon ürünü olduğu görüşünü güçlendirmektedir. Ayrıca, kapalı kapsüllü yapay mutantların ilgili segmentte band oluşturmayıp, bunun aksine normal bireylerin band vermesi delesyon ihtimalini güçlendirmektedir. Bu nedenle, eğer delesyon tipi bir mutasyon ise, popülasyonlardaki farklılıkların delesyon büyüklüklerinden ileri geldiğini söylemek mümkün olabilir. Örneğin, Mug x cc1 popülasyonunda delesyon büyük olmadığından, *EcoRI*+AAG ve *MseI*+CATI markeri 258 bp'lik bölgede bir polimorfizm üretememiştir. Buna karşın, Mug x cc2 ve Mug x cc3 popülasyonlarında nispeten büyük delesyonun olması farklılığın ilgili marker ile görülebilmesine izin vermiştir. Büyük bir olasılıkla Mug x cc1 popülasyonu, diğer iki popülasyonla aynı olarak kapsüllerin çatlamasını sağlayan DNA sekansını yitirmesine rağmen, delesyonun küçük ve bunun sonucunda bölgenin 258 bp'in altında bir uzunlukta olması, ilgili bölgede linkage oluşmasını engellemiştir.

Doğal mutant popülasyon (idid x Mug) ise, tamamen farklı bir profil sergilemektedir. 258 bp'lik segmentte Mug x cc1 popülasyonu gibi polimorfizm sergilemezken, hemen onun altındaki bölge polimorfik olmuştur. Resim 4.3'den izlendiğinde, polimorfik olan bölgenin üç yapay mutant popülasyonda da herhangi bir

band oluşturmadığı görülmektedir. Diğer üç yapay mutant popülasyonla kıyaslandığında doğal mutant popülasyon ekstra lokus ile karşımıza çıkmaktadır ki bu, kapsüllerin çatlamasını engelleyen lokustur. Doğrusu, sekans bilgisi olmadan popülasyonlar arasındaki farklılığı kesin olarak açıklamak mümkün değilse de, doğal mutantta inversiyon gibi başka bir tip mutasyondan bahsedilebilir ya da, ikinci bir lokus susamda kapsüllerin çatlamasını engellemektedir.

Markerin belirlenmesinden sonra, başka markerler belirlemek üzere de ilave primer kombinasyonları test edilmiştir. Hatta, 56. primer kombinasyonundan sonra *MseI* primerinin seçici nükleotid sayısı üçten ikiye düşürülmüştür ve 16 primer kombinasyonu *EcoRI*+3-*MseI*+2 seçici nükleotidli olarak AFLP analizleri yürütülmüştür. Böylece, AFLP analizlerinde oluşacak fragment sayısının artırılması düşünülmüştür. Ancak, genomun hiç küçümsenmeyecek kadar büyük bölümünün ilgili karakter bakımından taranmasına rağmen ilave marker tespit edilememiştir. Bu olguyu açıklamak güç olsa da, delesyonun küçük bir bölgede oluşması konuya açıklık getirebilir.

Bulk ve ebeveyn DNA'ların toplamda 72 farklı primer kombinasyonu ile taranması sonucunda oluşan polimorfizm, bulkları meydana getiren bireylerin DNA'larının aynı primer kombinasyonu (*EcoRI*+AAG-*MseI*+CAT) ile analizlenmesiyle, kapalı kapsüllülük mutant karakterine bağlı olup olmadığı konfirmasyonu edilmiştir. Bunun için, Mug x cc3 popülasyonunun iki ayrı bulk DNA'sı ve onları meydana getiren 10 ar bireyin DNA'ları kullanılmıştır. Aynı marker ile yapılan AFLP analizi sonucunda bulk ve ebeveyn DNA'ları ile uyumlu olarak, 10 ayrı kapalı birey 258 bp uzunluğundaki bölgede fragment oluşturmazken, normal bireyler ilgili bölgede band vermişlerdir (Şekil 4.4). Bu analiz sonucunda anlaşılmıştır ki, 258 bp uzunluğundaki AFLP markeri susamda kapalı kapsüllülük mutant karakterine sıkıca bağlıdır. Şekil 4.4'ten de görüldüğü gibi kapalı kapsüllü ebeveyn (1), kapalı bulk (2) ve kapalı bireylerde (5) 258 bp'lik DNA segmentinde band oluşmazken, normal ebeveyn (3), normal bulk (4) ve normal kapsüllü bireylerin ilgili bölgelerinde bant oluştuğu görülmektedir. AFLP markerinin % 100 linkage halinde olduğu, bireysel DNA'ların fenotipsel görüntülerinin DNA bandlarına fidesiz yansımalarından anlaşılmaktadır.



Şekil 4.4. Susamda kapalı kapsüllülük mutant karakterine bağlı AFLP markeri.

1. Kapalı kapsüllü ebeveyn
2. Kapalı kapsüllü bulk
3. Normal kapsüllü bulk
4. Normal kapsüllü ebeveyn
5. Kapalı kapsüllü bireyler
6. Normal kapsüllü bireyler

Sıkı linkage trans şeklinde de oluşsa, susamda kapalı kapsüllülük için yürütülen bitki ıslahı programına marker yardımıyla seleksiyon yaklaşımı içerisinde destek olacak güçtedir. Neden marker kapalı kapsüllülerde değil de normal kapsüllülerde çıktı sorusuna ise, yine en güzel cevap delesyon tipi mutasyondur. Hatta markerin trans olması delesyon teorisini destekler niteliktedir. Kapalı kapsüllü mutantlarda, kapsüllerin çatlamasını sağlayan bölgenin delesyon sonucu kopmasıyla, DNA sekansı yok olmuştur. Normal kapsüllü bireylerde ise 258 bp'lik bölgenin varlığı, *EcoRI*+*AAG-MseI*+*CAT* AFLP markeri ile polimorfizm oluşturmasını sağlamıştır. Dolayısıyla ilgili bölgenin, kapalı kapsüllülerde olmayışı markerin trans şeklinde ortaya çıkmasını sağlamıştır. Buradan kapalı kapsüllülük diye bir genin olmadığı sonucu çıkarılmaktadır. Delesyon sonucu kromozomun bir bölgesi kaybolmuştur. Bu bölge muhtemelen kapsüllerin çatlamasını idare eden genin de içinde bulunduğu bir DNA sekansıdır. Kapalı kapsüllülük, çatlama geninin kaybolması sonucu ortaya çıkan mutant bir özelliktir ama böyle bir genin varlığı sonucu değil, çatlama geninin mutasyon sonucu fonksiyonunu kaybetmesinden doğmuştur. Bu çalışma, bitkilerin evriminde mutasyonların ne kadar büyük rol oynadığına güzel bir örnek teşkil etmektedir.

Kapalı kapsüllülerde moleküler markerler belirlendikten sonra, bu çalışmayı takiben ilgili genin de klonlanması planlanmaktaydı. Ancak, marker belirleme çalışmalarında ortaya çıkan bulgular, kapalı kapsüllülüğü meydana getiren mutasyonun delesyon olma ihtimalini güçlendirmiştir. Dolayısıyla, kapalı kapsüllülük geninin olmadığı, bunun yerine başka bir genin fonksiyonunun kaybolması sonucu kapalı kapsüllülük özelliğinin oluştuğu kanısına varılmıştır. Genin olmadığı yerde klonlamadan bahsedilemeyeceğinden, ileride klonlamayı planladığımız çalışma iptal edilmiştir.

Bu çalışmada susamda agronomik olarak önemli olan kapalı kapsüllülük mutant karakterine bağlı AFLP markerinin belirlenmesi gösterilmiştir. AFLP markeri kapalı kapsüllü genotipleri ayırt etmede PCR'a dayalı hızlı teknikler geliştirme imkanı sunmaktadır. Markerin klonlanmasıyla elde edilecek sekans bilgisi, probe olarak kullanılarak, sentetik primerlerin dizayn edilmesini sağlayacaktır. Bu primerlerin basit ve ucuz PCR reaksiyonlarında kullanılmasıyla, kapalı kapsüllülük mutant özelliğinin

yeni backgroundlara katılımını planlayan bitki ıslahı programlarında karakterin erken dönemde teşhisini sağlayarak büyük yarar sağlayacaktır. Aslında AFLP markeri bu haliyle istenilen amaçlarda kullanılabilir. Ancak, sadece basit PCR reaksiyonu isteyen sisteme göre AFLP'nin pahalı ve biraz uzun olması, birçok örneğin test edilmesini gerektiren ıslah programında uygun olmayabilir. Hiç şüphe yok ki AFLP tekniği, marker yardımıyla bitki ıslahından yüksek yoğunluktaki genetik haritaların oluşturulmasına kadar çok geniş yelpazede etkin kullanım alanına sahiptir. Diğer PCR'a dayalı metotlara göre birçok polimorfik bandın elde edilmesi daha kolay, hızlı ve güvenilirdir. Analiz başına çok sayıda lokusu tarayabilmesi nedeniyle AFLP, RAPD ve mikrosatelit markerlerinden üstündür. Özellikle bağlı markerler belirlemede tek reaksiyonda 100 kadar lokusun taranabilmesi AFLP markerlerinin bu alanda daha çok tercih edilmesini sağlamaktadır. Ancak marker yardımıyla seleksiyon çerçevesi içerisinde, moleküler markerlerin bitki ıslahında hızlı, kolay ve ucuza mal edileceği kullanımlara ihtiyaç duyulmaktadır. Özellikle gelişmekte olan ülkelerde bu ihtiyaç daha çok hissedilmektedir. Bu yüzden AFLP markerinin SCAR (sequence characterised amplified region) markerlerine çevrilmesi, genotiplerin moleküler markerlerle erken teşhisini ucuz ve basit kılacağından önem arz etmektedir. Bu yüzden çalışmanın gelecekteki projesi, kapalı kapsüllülük mutant karakterine bağlı AFLP markerinin, SCAR markerlerine dönüştürülmesi olarak planlanmaktadır.

Kapalı kapsüllülük, susamın yoğun tarım şartlarına uyumunu sağlayacak önemli bir karakterdir. Doğal olarak indeterminant büyüyen ve hasat zamanı kapsülleri çatlayan susam bitkisinin kapsüllerinin çatlaması sonucu, tohumları dökülmekte ve makinalı hasatı yapılamamaktadır. Hasat ve harman işlemlerinin tamamen el emeğine dayanması, susamın geniş alanlara ekimini kısıtlarken, mısır gibi makinalı tarıma uygun bitkiler, her geçen gün susam ekilen arazilerin yerini doldurmaktadır. Bu noktada kapalı kapsüllü susam mutantları umut vericidir. Mutant bitkilerin kapsüllerinin kapalı olması tohum kayıplarını önlerken, biçerdöverle hasat-harman işlemlerinin yapılabilmesi mümkün gözükmektedir. Ancak kapalı kapsüllülük mutasyonuna eşlik eden düşük verim gibi istenmeyen özellikler genotipin çiftçi şartlarda kullanımını engellemektedir. Verimi artırmak üzere yoğun ıslah çalışmaları başlatılmış ve çok yönlü olarak yürütülmektedir. Bu aşamada moleküler markerlerin kullanımı verimli kapalı kapsüllü bitkilerin elde

edilme hızını ve şansını artıracığından, kapalı kapsüllülük mutant karakterine bağlı AFLP markerinin önemi büyüktür. Bu markerle bitkilerin tarlada yetiştirilmeden genotiplerini daha fide döneminde teşhis etmek beklenmektedir. Böylece, geniş tarla denemelerinden tasarruf sağlanacağı gibi, harcanacak zamandan da kaçınılmış olacaktır. Verimi normal değerlere ulaşmış kapalı kapsüllü genotipler ıslah edildiği takdirde, susamın ikinci ürün şartlarında yetiştirilme potansiyeli gerçek değerine ulaşacaktır.

4.5. F₃ Döl Kontrolü

Kapalı kapsüllülük mutant karakterine bağlı AFLP markerleri belirlenmesinde bulk segregant analizine uygun olarak F₂ populasyonları kullanılmıştır. Bunlar kapalı ile normal kapsüllü ebeveynlerin melezlenmesiyle oluşan F₁ progenisinin kendilenmesiyle elde edilmiştir. F₂ bireylerinin fenotiplerine bakılarak kapalı ya da normal kapsüllü olduğuna karar verilmiş ve bunlardan elde edilen bireysel ve bulk DNA'lar AFLP analizlerinde ilgili özellik bakımından bağlı markerler elde edilmek üzere kullanılmıştır. Fenotipe dayalı olarak bireylerin hangi özelliğe sahip olduğuna karar verildiğinden, genotiplerin genetik yapısı hakkında bilgi edinilememiştir. En önemlisi, markerin kapalı kapsüllülük özelliğine bağlı olup olmadığının ikinci bir kontrolü F₂ döllерinin test edilmesiyle sağlanacağından, her bir bireyin tohumları F₃ olarak yetiştirilmiştir.

Her bir F₂ bitkisinden alınan tohumlar tek sıralara 70 cm sıra arası mesafesinde ekilmişlerdir. Açılım oranlarında meydana gelebilecek sapmalardan kaçınmak için çıkıştan sonra susam yetiştiriciliğinde normal olarak uygulanan tekleme yapılmamıştır. Populasyondaki bireylerin genotiplerini belirlemek için bitkilerin tam çiçeklenmesi beklenmiş ve bitkilerin çiçeklenmesinin ardından, her bir sıradaki bitkilerin kapalı ya da açık kapsüllü olmalarına göre açılımları belirlenmiştir. Çizelge 4.1' de Mug x cc3 populasyonuna ait F₂ bireylerinin F₃ generasyonundaki açılım oranları gösterilmiştir. Çizelge 4.1'de görüldüğü gibi F₂ generasyonunda kapalı kapsüllü fenotipine sahip tüm bitkiler F₃ generasyonunda da, sıradaki tüm bitkiler itibarıyla kapalı kapsüllü olarak belirlenmiştir. Bu durum iki ayrı beklenen sonucu vermiştir. Birincisi, bu çalışmayla doğrudan ilgili olarak, F₂ açılan populasyonundan seçilen ve AFLP analizlerinde kullanılan kapalı kapsüllü bireyler homozigot kapalı olarak belirlenmiş ve 258 bp

uzunluğundaki AFLP markerinin kapalı kapsüllülük özelliği ile birlikte açıldığı bir kez daha konfirme edilmiştir. İkinci sonuç ise, önceki tarla gözlemlerinden de belirlendiği gibi kapalı kapsüllülük mutant özelliği tek genle idare edilen, resesif kalıtım göstermektedir.

Çizelge 4.1. Kapalı kapsüllülük özelliği için açılım gösteren Mug x cc3 populasyonundaki bireylerin F₃ açılım oranları.

Bitki no	F ₂ 'deki durumu	Kapalı kap. bitki sayısı	Normal kap. bitki sayısı	Toplam bitki sayısı	Değerlendirme
301	Kapalı	4	-	4	Homozigot
302	Normal	-	10	10	Homozigot
304	Kapalı	7	-	7	Homozigot
305	Normal	-	24	24	Homozigot
308	Normal	-	20	20	Homozigot
321	Normal	-	14	14	Homozigot
326	Kapalı	2	-	2	Homozigot
327	Normal	3	9	12	Heterozigot
328	Normal	5	15	20	Heterozigot
329	Kapalı	11	-	11	Homozigot
342	Normal	-	3	3	Homozigot
343	Kapalı	24	-	24	Homozigot
349	Kapalı	5	-	5	Homozigot
352	Normal	-	7	7	Homozigot
355	Normal	-	10	10	Homozigot
356	Normal	-	9	9	Homozigot
357	Normal	4	16	20	Heterozigot
359	Normal	1	1	2	Heterozigot
360	Normal	2	4	6	Heterozigot
362	Kapalı	3	-	3	Homozigot
363	Normal	-	6	6	Homozigot
365	Kapalı	3	-	3	Homozigot
367	Normal	-	3	3	Homozigot
369	Normal	-	14	14	Homozigot
370	Normal	-	1	1	Homozigot
371	Normal	2	14	16	Heterozigot
374	Normal	2	4	6	Heterozigot
380	Normal	5	13	18	Heterozigot
381	Normal	4	9	13	Heterozigot
385	Normal	-	5	5	Homozigot
386	Normal	-	3	3	Homozigot
389	Normal	2	6	8	Heterozigot
393	Normal	4	10	14	Heterozigot
399	Kapalı	8	-	8	Homozigot

F₂ generasyonunda normal fenotipe sahip bitkiler ise yine beklenildiği gibi değişik açılma oranları sergilemişlerdir. Bazı sıralar sadece normal kapsüllü fenotipe sahipken, kimileri F₂ generasyonunda normal fenotipte olmalarına rağmen, kapalı ve normal kapsüllü olarak açılmışlardır. Bu durum, F₂ generasyonunda normal kapsül fenotipinde olan ve AFLP analizlerinde kullanılan bireylerin bir bölümünün homozigot yapıda, diğer bir bölümünün ise heterozigot yapıda olduğunu göstermektedir. Heterozigot bireylerin açılma oranlarına bakıldığında, yaklaşık 3:1 oranında açılma gösterdiği fark edilmektedir. Bu durum yine göstermektedir ki, üzerinde durduğumuz kapalı kapsüllülük özelliği Mendel Kurallarına uygun olarak basit kalıtım göstermektedir.

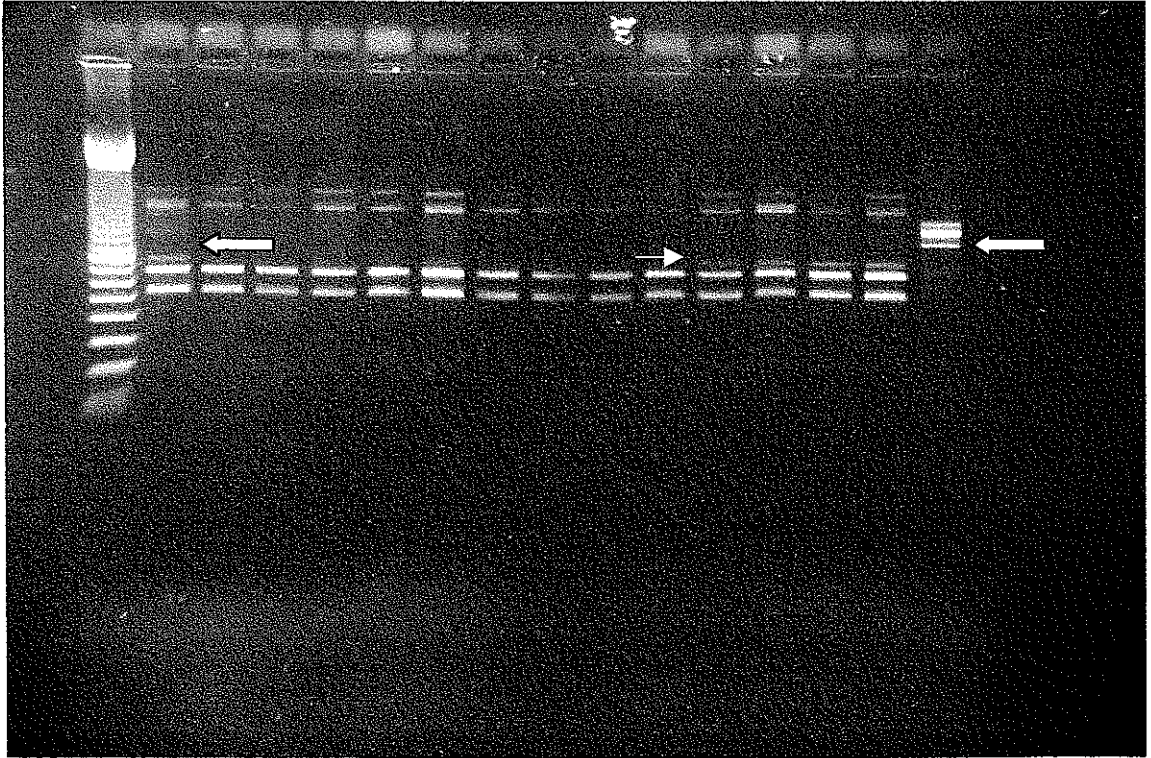
F₂ bireylerinin bir kısmının heterozigot yapıda olması aslında AFLP profillerine de yansımış gibi görünmektedir. Nitekim, Şekil 4.4 incelendiğinde 6 ile numaralandırılan normal kapsüllü bireylerin dokuzuncu ve onuncu genotiplerinin band koyuluğu diğer genotiplere göre az olmuştur. Kapalılık allelinin heterozigot bireylerde yer alması muhtemelen band koyuluğunun azalmasına neden olmuştur.

F₃ bireylerinin konfirmasyonda kullanılmasının ardından, moleküler haritalama gibi ileri çalışmalarda faydalı olabilecek populasyonların geliştirilmesinin uygun olacağı düşünülmüştür. F₂ populasyonları diğer populasyonlara göre daha kolay ve çabuk elde edilebilmesine karşın, haritalama çalışmalarının bir tek o F₂ populasyonu için geçerli olması, haritalama çalışmalarında pek tercih edilmemesine yol açmaktadır. Tercih edildiği durumlarda ise, bu populasyonlar ancak rekombinant inbred hatların oluşturduğu populasyonlarla karşılaştırmalı olarak kullanılmaktadır. Double haploid bitkilerin elde edilemediği genuslarda rekombinant inbred hatların haritalama çalışmaları için en uygun populasyonlar olduğu bilinmektedir. Kapalı kapsüllülük mutant karakterinin haritalanmasında mevcut populasyonlar rekombinant inbred hatlar geliştirmede uygun birer kaynak olarak gözükmektedir. Bu amaçla, F₃ populasyonundaki bireyler tek tohum aktarımı yöntemine uygun olarak hasat edilmişlerdir. Tek tohum aktarımı yöntemi devam ettirilerek, birkaç yıl sonra bu çalışmanın üzerine ek olarak kapalı kapsüllülük karakterinin haritalanmasına uygun bir populasyonun elde edilmesi amaçlanmaktadır. İlgili bölgenin hangi kromozomda yer aldığı ve yakınındaki genlerin neler olduğu hakkında bilgi edinmek mümkün

olabilecektir. Böylece, kapalı kapsüllülük mutant karakterine bağlı bir AFLP markeri belirlenirken, bu çalışma kapsamında karakterin haritalanması için de uygun bir populasyon geliştirilmiştir.

4.6. RAPD Analizinin Susam Bitkisine Uygulanması

En çok kullanılan DNA markerlerinden olan RAPD; kullanımındaki kolaylığı, PCR'a dayalı olması, bir günde yüzlerce örneğin analizlenebilmesi, nispeten düşük maliyetli oluşu, radyoaktif madde gibi zararlı uygulamalar içermemesi gibi özellikleri nedeniyle bugüne kadar hemen hemen bütün kültür bitkilerinde değişik amaçlara hizmet etmede kullanılmıştır. Genomik DNA'nın rasgele oligonükleotid primerlerle amplifikasyonuna dayanan teknik, etidium bromid ile boyanmış agaroz jel üzerinde görüntülemeyi öngörmektedir. Gümüşle boyama veya radyoaktiflerle işaretlenmiş (^{33}P , ^{32}P) RAPD analizi de yapmak mümkündür (Rafalski vd 1994). RAPD analizleri sonucunda oluşan polimorfizm, primerlerin bağlanma bölgelerindeki farklı sekanslardan ileri gelmektedir ve ilgili bandın var veya yok olmasına göre ayırt edilmektedir (Şekil 4.5).

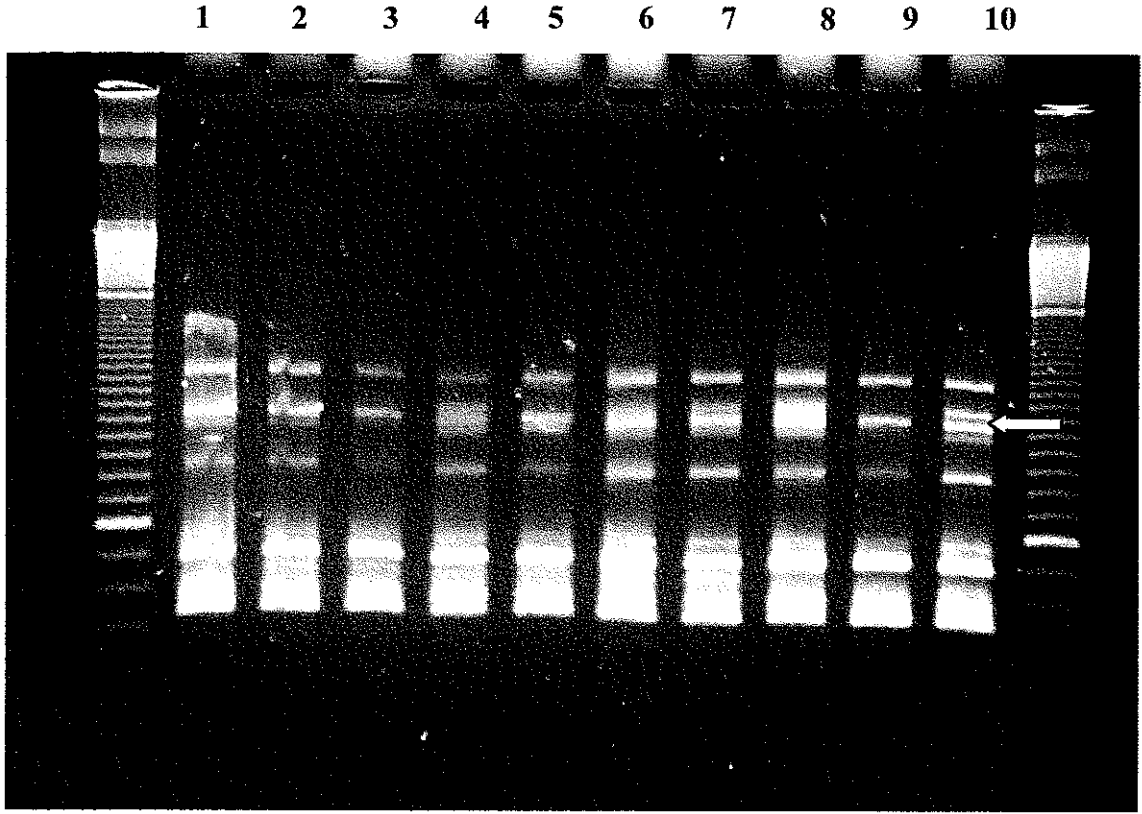


Şekil 4.5. Susamda yapılan RAPD analizlerinde meydana gelen polimorfizm örneği.

MgCl₂ miktarı, RAPD analizlerinin tekrarlanabilirliğini artırmak için 4 mM olarak kullanılmıştır. Bilindiği üzere MgCl₂, taq polimeraz ve primerin biraz fazla miktarda kullanımı RAPD'in tekrarlanabilirliğini ve amplifiye olan DNA fragment sayısını artırmaktadır. Taq polimeraz, BSA, dNTP konsantrasyonları ise, toplam reaksiyon hacminin 1 / 100 oranında, yani 2.5 µl olarak kullanılmıştır. RAPD reaksiyonları için öncelikle 24 µl'lik master miks hazırlanmış ve 1 µl'lik DNA örneklerine eklenmiştir.

Bulk DNA'lar yukarıdaki şekilde hazırlanan reaksiyona eklenerek değişik primerlerle kapalı kapsüllülük mutant karakterine bağlı markerler belirlemek üzere PCR yapılmıştır. PCR ürünleri % 1.5'lük agaroz jelde yürütülmüş ve etidium bromid ile boyanmıştır. UV transilüminatörde okunan jellerde ilgili özellik bakımından bir polimorfizm olup olmadığı gözlenmiştir.

12 farklı RAPD primerinin denenmesi sonucunda 5'-AGTCGTCCCC sıralamalı "H5" adlı primerin susamda kapalı kapsüllülük mutant karakteri ile ilişkili olabileceği görülmüştür (Şekil 4.7). Şekil 4.7'de görüldüğü gibi, okla gösterilen 1400 bp'lik bölgede kapalı kapsüllülük mutant karakteri ile ilişkili olabilecek bir polimorfizm elde edilmiştir. Kapalı ebeveyn (1), yaprakların havuzlanmasıyla oluşturulan kapalı ilk iki bulk (2 ve 3) ve bireysel DNA'ların havuzlanmasıyla oluşturulan bulku (9), ilgili bölgelerinde (1400 bp) band oluşumu yok iken, yaprakların havuzlanmasıyla oluşturulan normal kapsüllü bulklar (6 ve 7), normal ebeveyn (8) ve bireysel DNA'ların havuzlanmasıyla oluşturulan bulk DNA'nın (10) ilgili bölgelerinde band oluşmuştur. İlginçtir ki, diğer bir kapalı kapsüllü bulk (4) ve diğer bir normal kapsüllü bulk DNA'da (5) öteki bulk DNA'lardan ayrı olarak bir polimorfizm oluşmuştur. Yani şekil 4.7'de 4 ile gösterilen bulk DNA'da, band oluşumu beklenmemesine rağmen oluşmuş, 5 ile gösterilen bulk DNA'da ise band oluşumu beklenirken, oluşmamıştır. Bu durumun açıklanması güç olsa da, kapalı kapsüllülük mutant karakteri ile 1400 bp uzunluğundaki RAPD markeri arasında oluşan ilişkinin % 100 olmadığından ileri geldiği düşünülmüştür. Gerçekte, 1400 bp uzunluğundaki RAPD markerinin kapalı kapsüllülük karakteri ile ilişkili olduğu gözükse de, marker ile ilgili özellik arasında tam bir linkage olmadığı iki farklı bulk DNA'nın (4 ve 5) diğer bulk DNA'lardan aykırı RAPD profili vermesinden anlaşılmaktadır.

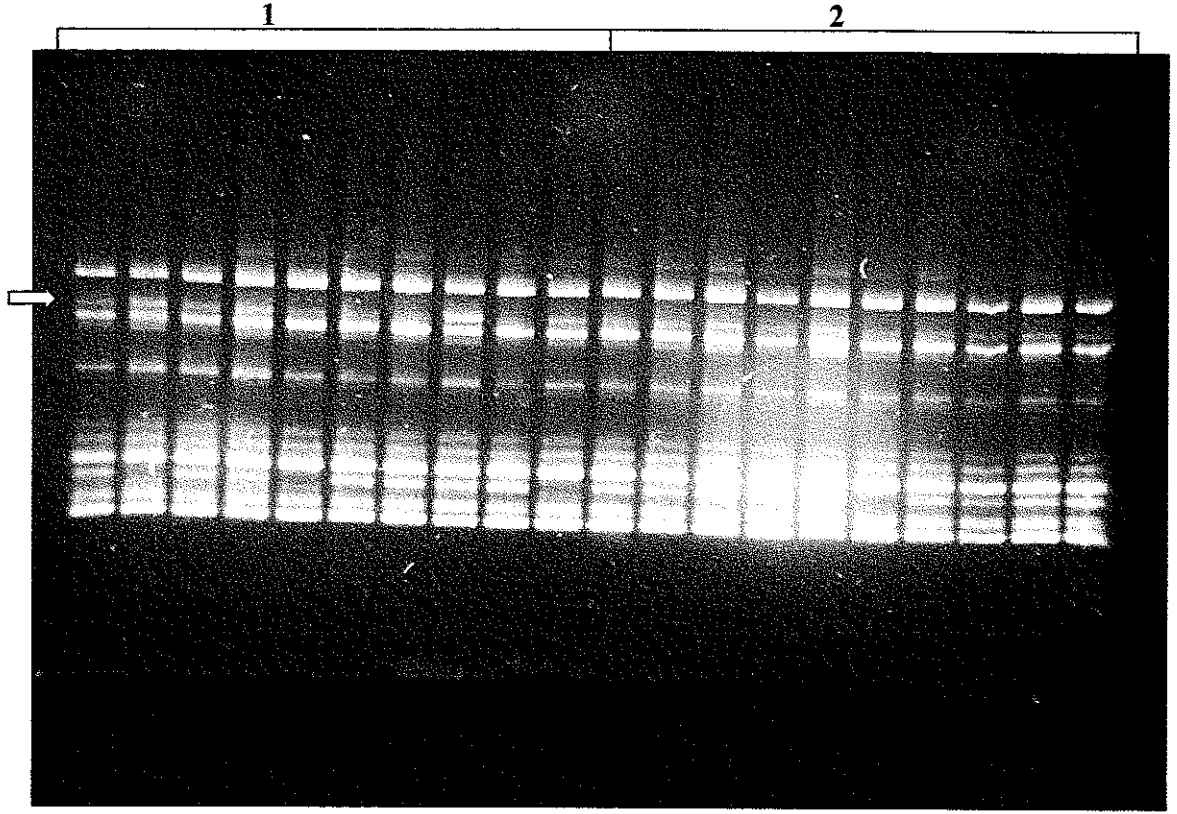


Şekil 4.7. Susamda kapalı kapsüllülük mutant karakteri ile ilişkili olabilecek RAPD markeri.

- | | |
|--|---------------------------------|
| 1. Kapalı kapsüllü ebeveyn | 5. Normal kapsüllü birinci bulk |
| 2. Kapalı kapsüllü birinci bulk | 6. Normal kapsüllü ikinci bulk |
| 3. Kapalı kapsüllü ikinci bulk | 7. Normal kapsüllü üçüncü bulk |
| 4. Kapalı kapsüllü üçüncü bulk | 8. Normal kapsüllü ebeveyn |
| 9. Bireysel DNA'ların birleştirilmesiyle elde edilen kapalı kapsüllü bulk | |
| 10. Bireysel DNA'ların birleştirilmesiyle elde edilen normal kapsüllü bulk | |

1400 bp uzunluğundaki RAPD markeri ile kapalı kapsüllülük mutant karakteri arasında oluşan ilişkinin ne derecede olduğunu tespit etmek amacıyla ilgili RAPD primeri, bulkları oluşturan bireysel DNA'lar üzerinde test edilmiştir (Şekil 4.8). Bireysel DNA'ların ilgili marker ile RAPD analizi sonucunda linkage oranının çok düşük olduğu görülmüştür. Şekil 4.8'in ilk dört, sekizinci ve onuncu sırasında yer alan kapalı kapsüllü bireylerin 1400 bp'lik bölgede band vermemesi beklenirken, band oluşturmuştur. Diğer taraftan şekil 4.8'de 2 ile gösterilen normal kapsüllü bireylerin

hepsi ilgili bölgede beklenildiği gibi band oluşturmuştur. Ancak kapalı kapsüllü bireylerin hepsinin ilgili bölgede band vermemesi beklenirken bir kısmının vermesi, markerle özellik arasında oluşan linkajın sıkı olmadığını göstermiştir.



Şekil 4.8. Kapalı kapsüllülük mutant karakteri ile ilişkili olan RAPD markerinin bulkları meydana getiren bireysel DNA'larda kullanılması

1. Kapalı kapsüllü bireyler
2. Normal kapsüllü bireyler

Normal kapsüllü bireylerin tamamının normal bulk DNA'larda olduğu gibi band vermesi, kapalı kapsüllü bireylerin ise dördünün kapalı bulklarda olduğu gibi band vermemesi, özellik ile marker arasında toplamda % 70'lik bir ilişkinin olduğunu göstermektedir.

RAPD markeri ile kapalı kapsüllülük mutant karakteri arasında % 70'lik ilişkinin açık olmasına rağmen, marker yardımıyla seleksiyon yaklaşımı içerisinde yürütülecek

olan kapalı kapsüllülerin ıslahında ilişkinin çok sıkı olmamasından (% 100) kaynaklanabilecek hatalı sonuçların muhtemel olması, bu markerin kapalı kapsüllülük mutant karakteri için yürütülecek olan ıslah programlarında kullanılması pek sağlıklı görünmemektedir. Ne var ki, RAPD markerin jelden izole edilip, klonlanması ve sekanslanması sonucunda, bu sekansa uygun bazı SCAR primerleri dizayn edilebilir. Bu primerlerle kapalı ve normal kapsüllü bireyler test edilebilir ve % 100'lük bir linkage oluştursa, % 70 ilişkili bir RAPD markeri %100 ilişkili bir SCAR markerine dönüştürülmüş olur.

Bu çalışmada RAPD markerleri susam bitkisine kolaylıkla uygulanabilmiştir. Tekniğin susam bitkisinde optimizasyonunda fazlaca bir süre harcanmamış, sadece kullanılacak DNA konsantrasyonunda ufak düzenlemeler yapılmıştır. Diğer RAPD parametreleri ise genellikle biraz yüksek tutulmuştur ki, tekniğin tekrarlanabilirliğinde bir problem oluşmasın. Nitekim, % 70 düzeyinde kapalı kapsüllülük mutant karakteri ile ilişkide olduğu belirlenen 5'-AGTCGICCCC sıralamalı "H5" oligonükleotidi, bulk DNA'lar üzerinde birden fazla olarak denenmiş ve hep aynı RAPD profili alınmıştır. Burada MgCl₂, taq polimeraz ve primerin biraz fazla kullanımının tekrarlanabilirlikte önemli rolü olduğu görülse de, her analizde aynı PCR ve aynı şartların kullanılması, reaksiyonların hazırlanmasında kullanılan master miksin ilk kullanıldığı anda olduğu gibi 12 reaksiyonluk hazırlanması, aynı RAPD profilinin alınmasında büyük katkı sağladığına inanılmaktadır.

Yaprakların havuzlanmasıyla elde edilen bulk DNA örneği ile, her bir bireyin DNA'sının havuzlanması ile elde edilen bulk DNA arasında RAPD analizleri sonucunda da hiçbir fark olmadığı görülmüştür. Dolayısıyla bu tür çalışmalarda DNA izolasyonlarına ayrılacak zamanı kısaltmak ve bu uğurda kullanılacak kimyasal giderlerini azaltmada yaprakların havuzlanması rahatlıkla kullanılabilir. Ancak dikkat edilecek hususlardan bir tanesi, her bireyden alınan yaprak örneğinin eşit ağırlıkta olması gerekliliğidir.

Bulk segregant metodu, RAPD analizlerinde de büyük kolaylık sağlamıştır. Bireysel DNA'lar yerine onların oluşturduğu bulk DNA'lar, analiz edilen örnek sayısını

azaltırken, oluşacak polimorfizmin kolaylıkla görülebilmesini sağlamıştır. Özellikle bağlı markerler belirlemede bulk segregant analizi, RAPD ile iyi bir uyum göstermektedir. Nitekim literatürde iki analizin ortak kullanıldığı ve arzu edilen özelliklere bağlı moleküler markerlerin belirlendiği yüzlerce makale mevcuttur. Metodun güvenilirliği bulkları oluşturan birey sayısı arttıkça yükselmektedir. Örneğin 10 bireyden meydana gelen bir bulk örneğinde, ilgili lokusa bağlı olmadığı halde bağlanmış gibi gözükebilecek polimorfik band sayısı 2×10^{-6} 'dır. Ayrıca birden fazla bulk örneğinin kullanılması bu kadar küçük oranda da olsa oluşabilecek gerçek olmayan polimorfizmlerin görülme olasılığını oldukça düşürmektedir.

5. SONUÇ

Susamda kapalı kapsüllülük mutant karakterine bağlı moleküler markerler belirlemede AFLP ve RAPD teknikleri, bulk segregant analizi ile ortak olarak kullanılmıştır. Bulk segregant analizinin susamda bağlı markerler belirlemede kullanılması, her iki moleküler tekniğin etkinliğini ve hızını artırmıştır. AFLP ve bulk segregant analizi bu çalışmayla birlikte susamda ilk defa uygulanmıştır. Buna ilaveten susamda bağlı bir markerin belirlenmesi ilk kez yine bu çalışmayla başarılmıştır.

Susamın 90-120 gün gibi kısa sürede vejetasyonunu tamamlaması, ülkemizde buğdaydan sonra ikinci ürün olarak yetiştirilebilmesini mümkün kılmaktadır. Ne var ki hasat zamanı kapsüllerin çatlayarak tohumların dökülmesi susamın makinalı hasatının yapılmasını engellemektedir. Susamın yoğun tarıma elverişli ve makinalı hasatı yapılabilecek duruma getirilmesinde, kapalı kapsüllü mutantlar büyük önem arz etmektedir. Kapalı kapsüllü mutantların az olan verimlerinin artırılmasında klasik ıslah programlarına moleküler yaklaşımları dahil etmeyi amaçlayan bu çalışmada, marker yardımıyla seleksiyon yaklaşımının ilk ve en önemli basamağı olan bağlı markerin belirlenmesi başarılmıştır. 72 farklı AFLP primer kombinasyonunun denendiği ve susam genomunun 6840 lokusunun bu primerlerle tarandığı çalışmada, *EcoRI*+*AAG-MseI*+*CAT* markeri 258 bp uzunluğundaki bölgede polimorfizm vermiştir. Bu polimorfizmin bulk DNA örneklerini meydana getiren bireylerle test edilmesi sonucunda, 258 bp uzunluğundaki markerin susamda kapalı kapsüllülük mutant karakterine sıkıca bağlı olduğu teyit edilmiştir.

AFLP markerinin kapalı kapsüllülük mutant karakterine “trans” şeklinde bağlı olması ve mutasyonların genellikle delesyon şeklinde ortaya çıkması, yapay olarak elde edilen kapalı kapsüllü mutantların bir delesyon ürünü olduğu kanısını doğurmuştur. Delesyon sonucunda bir genin fonksiyonunu kaybetmesi söz konusudur ki muhtemelen bu, kapsüllerin çatlamasını sağlayan genidir. Dolayısıyla, kapalı kapsüllülük mutant karakteri bir genin ürünü olarak değil de, kapsüllerin çatlamasını sağlayan genin fonksiyonunu kaybetmesi sonucu oluşan bir özelliktir. Bu yüzden, AFLP moleküler

markeri gene değil karaktere bağlıdır. Buradan elde edilen sonuç bir kez daha göstermiştir ki, kültür bitkilerinin oluşumunda mutasyonların büyük rolü vardır.

258 bp uzunluğundaki AFLP markeri, kapalı kapsüllülük mutant karakteri için yürütülen ıslah programlarında, genotiplerin daha fide dönemindeyken önceden teşhisinde rahatlıkla kullanılabilir. Ancak, genin klonlanıp, ticari olarak kabul gören çeşitlere aktarılması mümkün değildir. Çünkü kapalı kapsüllülüğü kodlayan bir genin varlığı söz konusu değildir. Diğer taraftan, polimorfik olan bandın klonlanıp sekanslanmasıyla dizayn edilebilecek SCAR markerleri, susam genotiplerinin analizlenmesini daha kolay ve ucuza mal edebileceklerinden, faydalı gözükmektedirler.

Bu çalışmada kapalı kapsüllülük mutant karakteri için açılan dört farklı populasyon kullanılmıştır. Tarla şartlarında yapılan allelism testleri sonucunda bu populasyonları meydana getiren kapalı kapsüllü ebeveynlerin birbirine allelik olduğu çıksa da, her bir populasyon 258 bp'lik bölgedeki AFLP bandlarında farklı görüntüler sergilemişlerdir. Hatta doğal mutant populasyonda ilgili bölgede bir farklılık oluşmazken, onun hemen altındaki 257 bp'lik bölgede polimorfizm oluşmuştur. Bu sonuç, bazı kapalı kapsüllü mutantların birbirine allelik olmadığı şüphesini uyandırmıştır.

Bulk segregant analizine uygun olarak hazırlanan F₂ populasyonlarından bulk DNA'lar, eşit ağırlıktaki taze yaprakların ve eşit yoğunluktaki bireysel DNA'ların havuzlanması olmak üzere iki şekilde elde edilmiştir. İki farklı yoldan elde edilen bulk DNA'ların, AFLP ve RAPD profilleri tamamen aynı olmuştur. Yaprakların havuzlanmasıyla oluşturulan bulk DNA'larda tek bir DNA izolasyonu yapılmakta ve bunun bir sonucu olarak zaman ile kullanılan kimyasaldan tasarruf sağlanmaktadır. Dolayısıyla, bireysel DNA'lara ihtiyaç duyulmayan ya da bireylerden DNA izolasyonunun sonraki dönemlerde yapılabilme imkanı bulunan çalışmalarda, eşit ağırlıktaki yaprakların havuzlanmasıyla elde edilen bulk DNA'ların kullanımı yararlı olacaktır.

Susam yapraklarının musilajlı olması, taze yapraklarda yapılan DNA izolasyonunu zorlaştırmıştır. Dellaporta vd (1985) metodu kullanılarak DNA izolasyonu susamda

başarılabilse de, DNA'lar da bulunan yoğun polisakkarit ve fenolik bileşikler, restriksiyon enzimleri ile kesimi engellemiştir. Hatta, DNA'lar PCR'da amplifiye olmalarına rağmen, AFLP analizinin ilk basamağı olan kesime cevap vermemişlerdir. Ekstra olarak birkaç kloroform-oktanol (24:1) ve fenol ekstraksiyonun gerçekleştirilmesi, DNA'ların yeter düzeyde temizlenmesine olanak vermiştir. Dolayısıyla susamda DNA izolasyonu planlandığında, çok genç yaprakların kullanımı ile ilave kloroform-oktanol ve fenol ekstraksiyonu yapılması yararlı olacaktır.

Analizlerde kullanılan F₂ bireylerinin döller, belirlenen AFLP markerinin kapalı kapsüllülük mutant karakterine sıkıca bağlı olduğunu ikinci kez teyit etmiştir. Susamda haritalama çalışmalarına temel olması bakımından, F₂ döller olarak yetiştirilen F₃ bireyleri yararlı olacaktır. F₃ popülasyonunun bireyleri tek tohum aktarımı yöntemine uygun olarak ayrı ayrı hasat edilmiştir. Bu şekilde birkaç yıl ilerletilecek olan bu döllerden haritalama çalışmalarına uygun "rekombinant inbred hatların" elde edilmesi planlanmaktadır. Dolayısıyla bu çalışmanın indirekt bir sonucu olarak, susamda haritalama çalışmalarına uygun bir popülasyonun temelleri atılmıştır.

RAPD markerleri de, susamda kapalı kapsüllülük mutant karakterine bağlı markerler belirlemede başarıyla kullanılmıştır. 12 farklı oligonükleotidin test edilmesi sonucunda 5'-AGTCGICCCC sıralamalı "H5" primerinin kapalı kapsüllülük mutant karakteri bakımından polimorfik olduğu bulunmuştur. Bulkları meydana getiren bireysel DNA'ların bu RAPD primeri ile test edilmesi sonucunda, marker ile kapalı kapsüllülük mutant karakteri arasında % 70'lik linkage olduğu belirlenmiştir. Ancak, markerin bu haliyle marker yardımıyla seleksiyon ıslahında kullanılması mümkün gözükmemektedir. RAPD markerinin klonlanıp sekanslanarak SCAR primerlerine dönüştürülmesi, küçük bir ihtimal dahilinde de olsa ilgili karaktere sıkıca bağlı markerin elde edilmesini sağlayabilir.

6. KAYNAKLAR

- ABDALLA, A.M., REDDY, O.U.K., EL-ZIK, K.M. and PEPPER, A.E. 2001. Genetic diversity and relationships of diploid and tetraploid cottons revealed using AFLP. *Theor. Appl. Genet.*, 102: 222-229.
- AJMONE MARSAN, P., CASTIGLIONI, P., FUSARI, F., KUIPER, M. and MOTTO, M. 1998. Genetic diversity and its relationship to hybrid performance in maize as revealed by RFLP and AFLP markers. *Theor. Appl. Genet.*, 96: 219-227.
- AJMONE MARSAN, P., GORNI, C., CHIITTO, A., REDAELLI, R., VAN VIJK, R., STAM, P. and MOTTO, M. 2001. Identification of QTLs for grain yield and grain-related traits of maize (*Zea mays* L.) using an AFLP map, different testers, and cofactor analysis. *Theor. Appl. Genet.*, 102: 230-243.
- AMMIRAJU, J.S.S., DHOLAKIA, B.B., SANTRA, D.K., SINGH, H., LAGU, M.D., IAMHANKAR, S.A., DHALIWAL, H.S., RAO, V.S., GUPTA, V.S. and RANJEKAR, P.K. 2000. Identification of molecular markers associated with seed size in wheat. 6th International wheat conference, pp. 122, Ed: Dr Z. Bedö, Budapest, Hungary.
- ANONYMOUS 1994. Mutation breeding of oil seed crops. Proceedings of a final research co-ordinated research programme organized by the joint FAO/IAEA division of nuclear techniques in food and agriculture, p. 179, Vienna, Austria.
- ANONYMOUS 1996. Report of the second FAO/IAEA research co-ordination meeting on induced mutations for sesame improvement. 9-13 September 1996, p. 120, Antalya, Turkey.
- ANONYMOUS 2001. www.fao.org
- ARCADE, A., ANSELIN, F., FAIVRE RAMPANT, P., LESAGE, M.C., PAGUES, L.E. and PRAT, D. 2000. Application of AFLP, RAPD and ISSR markers to genetic mapping of European and Japanese larch. *Theor. Appl. Genet.*, 100: 299-307.
- ASHRI, A. 1998. Sesame Breeding. *Plant Breeding Reviews* (Ed.: Jules Janick). 16: 179-228.
- ATANASSOV, A., IODOROVSKA, E., TRIFONOVA, A., PEIROVA, M., MARINOVA, E., GRAMATIKOVA, M., VALCHEVA, D., ZAPRIANOV, S. and MERSINKOV, N. 1998. Investigation of the somaclonal and mutagen induced variability in barley by the application of protein and DNA markers. Application of DNA based marker mutations for improvement of cereals and other sexually reproduced crop plants. Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture, pp. 21-31, Vienna, Austria.

- AYELE, M. and NGUYEN, I. 2000. Evaluation of amplified fragment length polymorphism markers in tef, *Eragrostis tef* (Zucc.) Trotter, and related species. *Plant Breeding*, 119: 403-409.
- BAI, G., KOLB, F.L., SHANER, G. and DOMIER, L.L. 1999. Amplified fragment length polymorphism markers linked to a major quantitative trait locus controlling scab resistance in wheat. *Phytopathology*, 89: 343-348.
- BARCACCIA, G., MAZZUCATO, A., ALBERTINI, E., ZETHOF, J., GERATS, A., PEZZOTTI, M. and FALCINELLI, M. 1998. Inheritance of parthenogenesis in *Poa pratensis* L.: auxin test and AFLP linkage analyses support monogenic control. *Theor. Appl. Genet.*, 97: 74-82.
- BARRET, P., DELOURME, R., FOISSET, N. and RENARD, M. 1998. Development of a SCAR (sequence characterised amplified region) marker for molecular tagging of the dwarf BREIZH (*Bzh*) gene in *Brassica napus* L. *Theor. Appl. Genet.*, 97: 828-833.
- BARUA, U.M., CHALMERS, K.J., HACKETT, C.A., THOMAS, W.I.B., POWELL, W. and WAUGH, R. 1993. Identification of RAPD markers linked to a *Rhynchosporium secalis* resistance locus in barley using near-isogenic lines and bulked segregant analysis. *Heredity*, 71: 177-184.
- BECKER, J., VOS, P., KUIPER, M., SALAMINI, F. and HEUN, M. 1995. Combined mapping of AFLP and RFLP markers in barley. *Mol. Gen. Genet.*, 248: 65-73.
- BHAI, K.V., BABREKAR, P.P. and LAKHANPAUL, S. 1999. Study of genetic diversity in Indian and exotic sesame (*Sesamum indicum* L.) germplasm using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Euphytica*, 110: 21-33.
- BHATTACHARYYA, S. and MANDAL, R.K. 1999. Identification of molecular marker for Septumless bold pod in *Brassica campestris*. *J. Plant Biochemistry & Biotechnology*, 8: 93-97.
- BLEARS, M.J., DE GRANDIS, S.A., LEE, H. and TREVORS, J.I. 1998. Amplified fragment length polymorphism (AFLP): a review of the procedure and its applications. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 21: 99-114.
- BRADEEN, J.M. and SIMON, P.W. 1998. Conversion of an AFLP fragment linked to the carrot *Y₂* locus to a simple, codominant, PCR-based marker form. *Theor. Appl. Genet.*, 97: 960-967.
- BRADSHAW, J.E., HACKETT, C.A., MEYER, R.C., MILBOURNE, D., McNICOL, J.W., PHILLIPS, M.S. and WAUGH, R. 1998. Identification of AFLP and SSR markers associated with quantitative resistance to *Globodera pallida* (Stone) in tetraploid potato (*Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*) with a view to marker-assisted selection. *Theor. Appl. Genet.*, 97: 202-210.

- BREYNE, P., BOERJAN, W., GERATS, I., VAN MONTAGU, M. and VAN GYSEL, A. 1997. Applications of AFLP™ in plant breeding, molecular biology and genetics. *Belg. Journ. Bot.*, 129: 107-117.
- CAGIRGAN, M.I. 1996. A preliminary report on the first induced indehiscent capsule mutants in sesame. Meeting on Tropical Plants, 11-15 March, CIRAD, pp.248, Montpellier, France.
- CAGIRGAN, M.I. 1997. Mutation breeding of sesame for intensive management. Report of the second FAO/IAEA research co-ordination meeting on induced mutation for sesame improvement, IAEA, pp. 85-95.
- CAO, W., HUGHES, G.R., MA, H. and DONG, Z. Identification of molecular markers for resistance to *Septoria nodorum* blotch in durum wheat. *Theor. Appl. Genet.*, 102: 551-554.
- CASTIGLIONE, S., WANG, G., BAO, P.H., LI, W., GIORDANI, C., DE STANCHINA, E., DAMIANI, G., BANDI, C., BISOFFI, S. and SALA, F. 1994. RAPDs for the assessment of DNA plasticity and genetic diversity: Experiences with rice, poplar and apple. *Current Topics in Mol. Genet. (Life Sci. Adv.)*, 2: 219-243.
- CERVERA, M.I., GUSMAO, J., STEENACKERS, M., PELEMAN, J., STORME, V., VANDEN BROECK, A., VAN MONTAGU, M. and BOERJAN, W. 1996. Identification of AFLP molecular markers for resistance against *Melampsora larici-populina* in Populus. *Theor. Appl. Genet.*, 93: 733-737
- CHALHOUB, B.A., THIBAUTI, S., LAUCOU, V., RAMEAU, C., HOFTE, H. and COUSIN, R. 1997. Silver staining and recovery of AFLP™ amplification products on large denaturing polyacrylamide gels. *BioTechniques*, 22: 216-220.
- CHALMERS, K.J., BARUA, U.M., HACKETT, C.A., THOMAS, W.I.B., WAUGH, R. and POWELL, W. 1993. Identification of RAPD markers linked to genetic factors controlling the milling energy requirement of barley. *Theor. Appl. Genet.*, 87: 314-320.
- CHO, Y.G., BLAIR, M.W., PANAUD, O. and McCOUCH, S.R. 1996. Cloning and mapping of variety-specific rice genomic DNA sequences: amplified fragment length polymorphisms (AFLP) from silver-stained polyacrylamide gels. *Genome*, 39: 373-378
- CHUNG, C.H., KWON, O.C., YI, Y.B., and LEE, Y. 1998. Isolation of quality genomic DNA from tenacious seeds of sesame and perilla. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 4: 42-48.
- DEBENER, I. and MATTIESCH, L. 1999. Construction of a genetic linkage map for roses using RAPD and AFLP markers. *Theor. Appl. Genet.*, 99: 891-899.

- DELLAPORTA, S.L., WOOD, J. and HICKS, J.B. 1985. Maize DNA miniprep. In: *Molecular Biology of Plants: A laboratory course manual*, Cold Spring Harbor Press, pp.36-37.
- DELOURME, R., BOUCHEREAU, A., HUBERT, N., RENARD, M. and LANDRY, B.S. 1994. Identification of RAPD markers linked to a fertility restorer gene for the *Ogura* radish cytoplasmic male sterility of rapeseed (*Brassica napus* L.). *Theor. Appl. Genet.*, 88: 741-748.
- DEMİR, İ. 1962. Türkiye'de yetiştirilen önemli susam çeşitlerinin başlıca morfolojik, biyolojik ve sitolojik vasıfları üzerinde araştırmalar. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları: 53, Bornova, İzmir, ss. 160.
- DHOLAKIA, B.B., AMMIRAJU, J.S.S., SANTRA, D.K., SINGH, H., KAITI, M.V., LAGU, M.D., TAMHANKAR, S.A., RAO, V.S., GUPTA, V.S., DHALIWAL, H.S. and RANJEKAR, P.K. 2000. Molecular marker analysis of grain protein content in wheat. 6th International wheat conference, pp. 124, Ed: Dr Z. Bedö, Budapest, Hungary.
- DING, H., ZHANG, G., GUO, Y. and CHEN, S. 1998. RAPD tagging of a salt tolerance gene in rice. Application of DNA based marker mutations for improvement of cereals and other sexually reproduced crop plants. Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture, pp. 63-66, Vienna, Austria.
- ELLIS, R.P., McNICOL, J.W., BAIRD, E., BOOTH, A., LAWRENCE, P., THOMAS, B. and POWELL W. 1997. The use of AFLPs to examine genetic relatedness in barley. *Molecular Breeding*, 3: 359-369.
- ERSCHADI, S., HABERER, G., SCHÖNIGER, M. and TORRES-RUIZ, R.A. 2000. Estimating genetic diversity of *Arabidopsis thaliana* ecotypes with amplified fragment length polymorphisms (AFLP). *Theor. Appl. Genet.*, 100: 633-640.
- EUJAYL, I., BAUM, M., POWELL, W., ERSKINE, W. and PEHU, E. 1998. A genetic linkage map of lentil (*Lens* sp.) based on RAPD and AFLP markers using recombinant inbred lines. *Theor. Appl. Genet.*, 97: 83-89.
- EUN, M.Y., CHO, Y.G., HAHN, J.H., YOON, U.H., YI, B.Y. and CHUNG, I.Y. 1998. Rice genome mapping and its application in rice genetics and breeding. Application of DNA based marker mutations for improvement of cereals and other sexually reproduced crop plants. Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture, pp. 67-84, Vienna, Austria.
- FANG, D.Q., FEDERICI, C.I. and ROOSE, M.L. 1997. Development of molecular markers linked to a gene controlling fruit acidity in citrus. *Genome*, 40: 841-849.

- FAROOQ, S., IQBAL, N. and ARIF, M. 1998. Detection of genetic variability in basmati and non-basmati rice varieties and their radiation induced mutants through random amplified polymorphic DNA (RAPD). Application of DNA based marker mutations for improvement of cereals and other sexually reproduced crop plants. Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture, pp. 85-95, Vienna, Austria.
- GENGER, R.K., BROWN, A.H.D. and BURDON, J.J. 2000. Molecular markers for wild barley-derived scald resistance genes. 8th International Barley Genetics Symposium, pp. 117-119, Ed: Susan Logue, Adelaide, South Australia.
- GIOVANNONI, J.J., WING, R.A., GANAL, M.W. and TANKSLEY, S.D. 1991. Isolation of molecular markers from specific chromosomal intervals using DNA pools from existing mapping populations. *Nucleic Acids Research*, 19: 6553-6558.
- HALEY, S.D., MIKLAS, P.N., STAVELY, J.R., BYRUM, J. and KELLY, J.D. 1993. Identification of RAPD markers linked to a major rust resistance gene block in common bean. *Theor. Appl. Genet.*, 86: 505-512.
- HALEY, S.D., AFANADOR, L. and KELLY, J.D. 1994. Selection for monogenic pest resistance traits with coupling- and repulsion-phase RAPD markers. *Crop Science*, 34: 1061-1066.
- HANSEN, M., KRAFT, T., CHRISTIANSSON, M. and NILSSON, N.O. 1999. Evaluation of AFLP in Beta. *Theor. Appl. Genet.*, 98: 845-852.
- HARTL, L. and SEEFELDER, S. 1998. Diversity of selected hop cultivars detected by fluorescent AFLPs. *Theor. Appl. Genet.*, 96: 112-116.
- HAYES, P.M., CERONO, J. WITSENBOER, H., KUIPER, M. and ZABEAU, M. 1996a. Application of AFLP markers to diversity analysis in barley. V. International Oat Conference & VII. International Barley Genetics Symposium. Eds: Al Slinkard, Graham Scoles and Brian Rossnagel, pp. 262-264, Canada.
- HAYES, P.M., PAN, A., POWELL, W., BAIRD, E., THOMAS, B., WAUGH, R. and DUNCAN, N. 1996b. Application of AFLP markers to QTL detection in barley. V. International Oat Conference & VII. International Barley Genetics Symposium. Eds: Al Slinkard, Graham Scoles and Brian Rossnagel, pp. 265-267, Canada.
- HE, G. and PRAKASH, C.S. 1997. Identification of polymorphic DNA markers in cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Euphytica*, 97: 143-149.
- HILL, M., WITSENBOER, H., ZABEAU, M., VOS, P., KESSELI, R. and MICHELMORE, R. 1996. PCR-based fingerprinting using AFLPs as a tool for

- studying genetic relationship in *Lactuca* spp. *Theor. Appl. Genet.*, 93: 1202-1210.
- HONGIRAKUL, V., HUESTIS, G.M. and KNAPP, S.J. 1997. Amplified fragment length polymorphisms as a tool for DNA fingerprinting sunflower germplasm: genetic diversity among oilseed inbred lines. *Theor. Appl. Genet.*, 95: 400-407.
- HORMAZA, J.I., DOLLO, L. and POLITO, V.S. 1994. Identification of a RAPD marker linked to sex determination in *Pistacia vera* using bulked segregant analysis. *Theor. Appl. Genet.*, 89: 9-13.
- IQBAL, M.J., AZIZ, N., SAEED, N.A., ZAFAR, Y. and MALIK, K.A. 1997. Genetic diversity evaluation of some elite cotton varieties by RAPD analysis. *Theor. Appl. Genet.*, 94: 139-144.
- ISSHIKI, S. and UMEZAKI, I. 1997. Genetic variations of isozymes in cultivated sesame (*Sesamum indicum* L.). *Euphytica*, 93: 375-377.
- JAMES, L.E., KASHA, K.J. and MOLNAR, S.J. 1996. Tagging net blotch resistance in barley using RAPDs. V. International Oat Conference & VII. International Barley Genetics Symposium. Eds: Al Slinkard, Graham Scoles and Brian Rossnagel, pp. 268-270, Canada.
- JANSSEN, P., COOPMAN, R., HUYS, G., SWINGS, J., BLEEKER, M., VOS, P., ZABEAU, M. and KERSIERS, K. 1996. Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy. *Microbiology*, 142: 1881-1893.
- JIANG, C. and SINK, K.C. 1997. RAPD and SCAR markers linked to the sex expression locus *M* in asparagus. *Euphytica*, 94: 329-333.
- JIN, H., DOMIER, L.L., KOLB, F.L. and BROWN, C.M. 1998. Identification of quantitative loci for tolerance to barley yellow dwarf virus in oat. *Phytopathology*, 88: 410-415.
- JONES, C.J., EDWARDS, K.J., CASTAGLIONE, S., WINFIELD, M.O., SALA, F., WIEL, C.V.D., BREDEMEIJER, G., VOSMAN, B., MATTHES, M., DALY, A., BRETTSCHEIDER, R., BETTINI, P., BUIATTI, M., MAESTRI, E., MALCEVSCHI, A., MARMIROLI, N., AERT, R., VOLCKAERT, G. RUEDA, J., LINACERO, R., VAZQUEZ, A. and KARP, A. 1997. Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. *Molecular Breeding*, 3: 381-390.
- KANG, B.C., NAHM, S.H., HUH, J.H., YOO, H.S., YU, J.W., LEE, M.H. and KIM, B.D. 2001. An interspecific (*Capsicum annuum* x *C. chinese*) F₂ linkage map in pepper using RFLP and AFLP markers. *Theor. Appl. Genet.*, 102: 531-539.

- KARP, A., SEBERG, O. and BUIATTI, M. 1996. Molecular techniques in the assessment of botanical diversity. *Annals of Botany*, 78: 143-149.
- KASHA, K.J. 1996. Biotechnology and cereal improvement. V. International Oat Conference & VII. International Barley Genetics Symposium. Eds: Graham Scoles and Brian Rossnagel, pp. 133-140, Canada.
- KEIM, P., SCHUPP, J.M., TRAVIS, S.E., CLAYTON, K., ZHU, T., SHI, L., FERREIRA, A. and WEBB, D.M. 1997. A high-density soybean genetic map based on AFLP markers. *Crop Science*, 37: 537-543.
- KOCHERT, G. 1994. RFLP technology. In: DNA-Based Markers in Plants, pp. 8-38, Eds: Ronald L. Phillips and Indra K. Vasil.
- KORNBERG, A. 1960. Biologic synthesis of deoxyribonucleic acid. *Science*, 131: 1503-1508.
- LANGRIDGE, P., LANCE, R. and BARR, A. 1996. Practical application of marker assisted selection. V. International Oat Conference & VII. International Barley Genetics Symposium. Eds: Graham Scoles and Brian Rossnagel, pp. 141-149, Canada.
- LECOULS, A.C., RUBIO-CABETAS, M.J., MINOT, J.C., VOISIN, R., BONNET, A., SALESSES, G., DIRLEWANGER, E., ESMENJAUD, D. 1999. RAPD and SCAR markers linked to the Mal root-knot nematode resistance gene in Myrobalan plum (*Prunus cerasifera* Ehr.). *Theor. Appl. Genet*, 99: 328-335.
- LIN, J.J., KUO, J., MA, J., SAUNDERS, J.A., BEARD, H.S., MacDONALD, M.H., KENWORTHY, W., UDE, G.N. and MATTHEWS, B.F. 1996a. Identification of molecular markers in soybean comparing RFLP, RAPD and AFLP DNA mapping techniques. *Plant Molecular Biology Reporter*, 14: 156-169.
- LIN, J.J., KUO, J. and MA, J. 1996b. A PCR-based DNA fingerprinting technique: AFLP for molecular typing of bacteria. *Nucleic Acids Research*, 24: 3649-3650.
- LIN, J.J., MA, J. and KUO, J. 1999. Chemiluminescent detection of AFLP markers. *BioTechniques*, 26: 344-348.
- LOTTI, C., SALVI, S., PASQUALONE, A., TUBEROSA, R. and BLANCO, A. 2000. Integration of AFLP markers into an RFLP-based map of durum wheat. *Plant Breeding*, 119: 393-401.
- LU, Z.X., SOSSEY-ALAOUI, K., REIGHARD, G.L., BAIRD, Wm.V. and ABBOTT, A.G. 1999. Development and characterization of a codominant marker linked to root-knot nematode resistance, and its application to peach rootstock breeding. *Theor. Appl. Genet*, 99: 115-122.

- MAHESWARAN, M., SUBUDHI, P.K., NANDI, S., XU, J.C., PARCO, A., YANG, D.C. and HUANG, N. 1997. Polymorphism, distribution, and segregation of AFLP markers in a doubled haploid rice population. *Theor. Appl. Genet.*, 94: 39-45.
- MARTIN, G.B., WILLIAMS, J.G.K. and TANKSLEY, S.D. 1991. Rapid identification of markers linked to a *Pseudomonas* resistance gene in tomato by using random primers and near-isogenic lines. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 88: 2336-2340.
- MAUGHAN, P.J., SAGHAI MAROOF, M.A., BUSS, G.R. and HUESTIS, G.M. 1996. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) in soybean: Species diversity, inheritance, and near-isogenic line analysis. *Theor. Appl. Genet.*, 93: 392-401.
- MEKSEM, K., LEISTER, D., PELEMAN, J., ZABEAU, M., SALAMINI, F. and GEBHARDI, C. 1995. A high-resolution map of vicinity of the *R1* locus on chromosome V of potato based on RFLP and AFLP markers. *Mol. Gen. Genet.*, 249: 74-81.
- MICHELMORE, R.W., PARAN, I. and 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. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 88: 9828-9832.
- MIKLAS, P.N., STAVELY, J.R. and KELLY, J.D. 1993. Identification and potential use of a molecular marker for rust resistance in common bean. *Theor. Appl. Genet.*, 85: 745-749.
- MOHAN, M., NAIR, S., BHAGWAT, A., KRISHNA, T.G. and YANO, M. 1997. Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants. *Molecular Breeding*, 3: 87-103.
- MOUZEYAR, S., ROECKEL-DREVEI, P., GENIZBITTEL, L., PHILIPPON, J., DE LABROUHE, D.T., VEAR, F. and NICOLAS, P. 1995. RFLP and RAPD mapping of the sunflower *P/1* locus for resistance to *Plasmopara halstedii* race 1. *Theor. Appl. Genet.*, 91: 733-737.
- NAYAR, N.M. 1984. Sesame. In: Evolution of Crop Plants. Ed: N.W. Simmonds, Longman, pp:231-233, London.
- NACHII, M.M., ELOUAFI, I., PAGNOTTA, A., EL SALEH, A., IACONO, E., LABHILILI, M., ASBATI, A., AZRAK, M., HAZZAM, H., BENSCHER, D., KHAIRALLAH, M., RIBAUT, J.M., TANZARELLA, O.A., PORCEDDU, E. and SORRELLS, M.E. 2001. Molecular linkage map for an intraspecific recombinant inbred population of durum wheat (*Triticum turgidum* L. var. durum). *Theor. Appl. Genet.*, 102: 177-186.

- NI, J., COLOWIT, P.M., OSTER, J.J., Xu, K. and Mackill, D.J. 2001. Molecular markers linked to stem rot resistance in rice. *Theor. Appl. Genet.*, 102: 511-516.
- NOLI, E., SANGUINETI, M.C., TUBEROSA, R., MELCHIORRE, R., STEFANELLI, S. and CONTI, S. 1996. Identification of QTLs controlling abscisic acid concentration in barley leaves. V. International Oat Conference & VII. International Barley Genetics Symposium. Eds: Al Slinkard, Graham Scoles and Brian Rossnagel, pp. 277-279, Canada.
- O'DONOUGHUE, L.S. 1996. The identification, localization and utilization of molecular markers for rust resistance genes in oat. V. International Oat Conference & VII. International Barley Genetics Symposium. Eds: Graham Scoles and Brian Rossnagel, pp. 150-156, Canada.
- OKANO, K., UEMATSU, C., MATSUNAGA, H. and KAMBARA, H. 1998. Characteristics of selective polymerase chain reaction (PCR) using two-base anchored primers and improvement of its specificity. *Electrophoresis*, 19: 3071-3078.
- ORDON, F., SCHIEMANN, A. and FRIEDI, W. 1996. RAPD characterization of barley germplasms resistant to soil-borne mosaic inducing viruses (BaMMV, BaYMV, BaYMV-2). V. International Oat Conference & VII. International Barley Genetics Symposium. Eds: Al Slinkard, Graham Scoles and Brian Rossnagel, pp. 283-285, Canada.
- OVESNA, J., POLAKOVA, K., KUCERA, L. and LEISOVA, L. 2000. The use of AFLP and SSR analysis for variety profiling and diversity study. 8th International Barley Genetics Symposium, pp. 47-49, Ed: Susan Logue, Adelaide, South Australia.
- PAGE, D., DELCLOS, B., AUBERTI, G., BONAVENTI, J.F. and MOUSSET-DECLAS, C. 1997. *Sclerotinia* rot resistance in red clover: Identification of RAPD markers using bulked segregant analysis. *Plant Breeding*, 116: 73-78.
- PALTRIDGE, N.G., COLLINS, N.C., BENDAHDANE, A. and SYMONS, R.H. 1998. Development of YLM, a codominant PCR marker closely linked to the *Yd₂* gene for resistance to barley yellow dwarf disease. *Theor. Appl. Genet.*, 96: 1170-1177.
- PAPA, R., BARCACCIA, G. and ZUCCARELLO, V. 1996. Genetic diversity in wild and cultivated barley (*Hordeum vulgare* L.) revealed by RAPD analysis. V. International Oat Conference & VII. International Barley Genetics Symposium. Eds: Al Slinkard, Graham Scoles and Brian Rossnagel, pp. 203-205, Canada.
- PARAN, I. and MICHELMORE, R.W. 1993. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theor. Appl. Genet.*, 85: 985-993.

- PELLIO, B., STRENG, S., GRANER, A., FRIEDI, W. and ORDON, F. 2000. Construction of a high-resolution map of *rym5* conferring resistance to BaMMV, BaYMV and BaYMV-2. 8th International Barley Genetics Symposium, pp. 157-159, Ed: Susan Logue, Adelaide, South Australia.
- PILLAY, M. and MYERS, G.O. 1999. Genetic diversity in cotton assessed by variation in ribosomal RNA genes and AFLP markers. *Crop Science*, 39: 1881-1886.
- PONGAM, P., OSBORN, I.C. and WILLIAMS, P.H. 1998. Genetic analysis and identification of amplified fragment length polymorphism markers linked to the *alm1* avirulence gene of *Leptosphaeria maculans*. *Phytopathology*, 88: 1068-1072.
- POULSEN, D.M.E., HENRY, R.J., JOHNSTON, R.P., IRWIN, J.A.G. and REES, R.G. 1995. The use of bulk segregant analysis to identify a RAPD marker linked to leaf rust resistance in barley. *Theor. Appl. Genet*, 91: 270-273.
- POWELL, W., BAIRD, E., BOOTH, A., LAWRENCE, P., MacAULAY, M., BONAR, N., YOUNG, G., THOMAS, W.T.B., McNICOL, J.W. and WAUGH, R. 1996. Single locus and multi-locus molecular assays for barley breeding and research. V. International Oat Conference & VII International Barley Genetics Symposium. Eds: Graham Scoles and Brian Rossnagel, pp. 174-181, Canada.
- QI, X. and LINDHOUT, P. 1997. Development of AFLP markers in barley. *Mol. Gen. Genet*, 254: 330-336.
- QIU, J., BROMLEY, R., OSTERMAN, H., KUO, J. and LIN, J.J. 2001. AFLP analysis using LI-COR IR² DNA automated systems. www.licor.com.
- QU, L.J., FOOTE, I.N., ROBERTS, M.A., MONEY, T.A., ARAGON_ALCAIDA, L., SNAPE, J.W. and MOORE, G. 1998. A simple PCR-based method for scoring the *phl1b* deletion in wheat. *Theor. Appl. Genet.*, 96: 371-375.
- RAFALSKI, J.A., HANAFEY, M.K., TINGEY, S.V. and WILLIAMS, J.G.K. 1994. Technology for molecular breeding: RAPD markers, microsatellites and machines. In: Plant Genome Analysis, Ed: P.M. Gresshoff, pp. 19-27.
- REAMON-BUTTNER, S.M. and JUNG, C. 2000. AFLP-derived STS markers for the identification of sex in *Asparagus officinalis* L. *Theor. Appl. Genet.*, 100: 432-438.
- REMINGTON, D.L., WHETTEN, R.W., LIU, B.H. and O'MALLEY, D.M. 1999. Construction of an AFLP genetic map with nearly complete genome coverage in *Pinus taeda*. *Theor. Appl. Genet.*, 98: 1279-1292.
- RIDOUT, C.J. and DONINI, P. 1999. Use of AFLP in cereals research. *Trends in plant science*, 4: 76-79.

- RONALD, P.S., PENNER, G.A. and BROWN, P.D. 1996. Identification of RAPD markers linked to genetic factors controlling hull content in oat (*Avena sativa* L.). V. International Oat Conference & VII. International Barley Genetics Symposium. Eds: Al Slinkard, Graham Scoles and Brian Rossnagel, pp. 292-294, Canada.
- RUSSELL, J.R., FULLER, J.D., MACAULAY, M., HATZ, B.G., JAHOOOR, A., POWELL, W. and WAUGH, R. 1996. Direct comparisons of levels of genetic variation among barley accessions detected by RFLPs, AFLPs, SSRs and RAPDs. V. International Oat Conference & VII. International Barley Genetics Symposium. Eds: Al Slinkard, Graham Scoles and Brian Rossnagel, pp. 295-297, Canada.
- SAGHAI-MAROOF, M.A., SOLIMAN, K.M., JORGENSEN, R.A. and ALLARD, R.W. 1984. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 81: 8014-8018.
- SCHIERWATER, B. and ENDER, A. 1993. Different thermostable DNA polymerases may amplify different RAPD products. *Nucleic Acids Research*, 21: 4647-4648.
- SCHWARZ, G., HERZ, M., HUANG, X.Q., MICHALEK, W., JAHOOOR, A., WENZEL, G. and MOHLER, V. 2000. Application of fluorescence-based semi-automated AFLP analysis in barley and wheat. *Theor. Appl. Genet.*, 100: 545-551.
- SEBASTIAN, R.L., HOWELL, E.C., KING, G.J., MARSHALL, D.F., KEARSEY, M.J. 2000. An integrated AFLP and RFLP *Brassica oleracea* linkage map from two morphologically distinct doubled-haploid mapping populations. *Theor. Appl. Genet.*, 100: 75-81.
- SHAH, F.H., RASHID, O., SIMONS, A.J., DUNSDON, A. 1994. The utility of RAPD markers for the determination of genetic variation in oil palm (*Elaeis guineensis*). *Theor. Appl. Genet.*, 89: 713-718.
- SHAN, X., BLAKE, I.K. and TALBERT, L.E. 1999. Conversion of AFLP markers to sequence-specific PCR markers in barley and wheat. *Theor. Appl. Genet.*, 98: 1072-1078.
- SIMPSON, J. 1998. Determination of molecular markers associated with anthesis-silking interval in maize. Application of DNA based marker mutations for improvement of cereals and other sexually reproduced crop plants. Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture, pp. 41-46, Vienna, Austria.
- SMILDE, W.D., VAN HEUSDEN, A.W. and KIK, C. 1999. AFLPs in leek (*Allium porrum*) are not inherited in large linkage blocks. *Euphytica*, 110: 127-132.

- SRIVASTAVA, A., GUPTA, V., PENTAL, D. and PRADHAN A.K. 2001. AFLP-based genetic diversity assessment amongst agronomically important natural and some newly synthesized lines of *Brassica juncea*. *Theor. Appl. Genet.*, 102: 193-199.
- SUAZO, A. and HALL, H.G. 1999. Modification of the AFLP protocol applied to Honey Bee (*Apis mellifera* L.) DNA. *BioTechniques*, 26: 704-709.
- SUBUDHI, P.K., BORKAKATI, R.P., VIRMANI, S.S. and HUANG N. 1997. Molecular mapping of a thermosensitive genetic male sterility gene in rice using bulked segregant analysis. *Genome*, 40: 188-194.
- SWENEY, P.M. and DANNEBERGER, T.K. 1994. Random amplified polymorphic DNA in perennial ryegrass: A comparison of bulk samples vs. individuals. *HortScience*, 29(6): 624-626.
- SZÜCS, P., KARSAI, I., VEISZ, O., LANG, L. and BEDÖ, Z. 2000. Determination of DNA markers linked to frost resistance in *Triticum durum* (Desf.) genotypes using bulk segregation. 6th International wheat conference, pp. 305, Ed: Dr Z. Bedö, Budapest, Hungary.
- TAI, T., DAHLBECK, D., STALL, R.E., PELEMAN, J. and STASKAWICZ, B.J. 1999. High-resolution genetic and physical mapping of the region containing the BS2 resistance gene of pepper. *Theor. Appl. Genet.*, 99: 1201-1206.
- TALAMC, V., DE FROIDMONT, D., MESSMER, M.M. and TUBEROSA, R. 2000. Comparative analysis of genetic diversity among European spelt and wheat accessions using AFLP, RFLP, and SSR markers. 6th International wheat conference, pp. 104, Ed: Dr Z. Bedö, Budapest, Hungary.
- TALAME, V., SALVI, S., MESSMER, M.M. and TUBEROSA, R. 2000. Addition of AFLP markers into an RFLP-based map of a wheat x spelt cross. 6th International wheat conference, pp. 223, Ed: Dr Z. Bedö, Budapest, Hungary.
- THOMAS, C.M., VOS, P., ZABEAU, M., JONES, D.A., NORCOTT, K.A., CHADWICK, B.P. and JONES, J.D.G. 1995. Identification of amplified restriction fragment polymorphism (AFLP) markers tightly linked to the tomato Cf-9 gene for resistance to *Cladosporium fulvum*. *The Plant Journal*, 8: 785-794.
- TURUSPEKOV; Y., ABUGALIEVA, S. and QUARRIE, S. 2000. Identification of AFLP markers for rolling leaf in wheat. 6th International wheat conference, pp: 212, Ed: Dr Z. Bedö, Budapest, Hungary.
- VAN ECK, H.J., VAN DER VOORT, J.R., DRAAISTRA, J., VAN ZANDVOORT, P., VAN ENCKEVORT, E., SEGERS, B., PELEMAN, J., JACOBSEN, E., HELDER, J. and BAKKER, J. 1995. The inheritance and chromosomal

- localization of AFLP markers in a non-inbred potato offspring. *Molecular Breeding*, 1: 397-410.
- VANTOAI, T.T., PENG, J. and MARTIN, S.K.St. 1997. Using AFLP markers to determine the genomic contribution of parents to populations. *Crop Science*, 37: 1370-1373.
- VOS, P., HOGERS, R., BLEEKER, M., REIJANS, M., LEE, T.V.D., HORNES, M., FRIJTERS, A., POT, J., PELEMAN, J., KUIPER, M. and ZABEAU, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting *Nucleic Acids Research*, 23: 4407-4414.
- VUYLSTEKE, M., MANK, R., ANTONISE, R., BASTIAANS, E., SENIOR, M.L., STUBER, C.W., MELCHINGER, A.E., LUBBERSTIEDT, I., XIA, X.C., STAM, P., ZABEAU, M. and KUIPER, M. 1999. Two high-density AFLP[®] linkage maps of *Zea mays* L.: analysis of distribution of AFLP markers. *Theor. Appl. Genet.*, 99: 921-935.
- WANG, G.L. and PATERSON, A.H. 1994. Assessment of DNA pooling strategies for mapping of QTLs *Theor. Appl. Genet.*, 88: 355-361.
- WANG, Y.H., THOMAS, C.E. and DEAN, R.A. 1997. A genetic map of melon (*Cucumis melo* L.) based on amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers. *Theor. Appl. Genet.*, 95: 791-798.
- WATSON, J.D. and CRICK, F.H.C. 1953. Molecular structure of nucleic acids. *Nature*, 171: 737-740.
- WAUGH, R., BONAR, N., BAIRD, E., LAWRENCE, P., HARROWER, B., BOOTH, A., KHALIL, W., HAYES, P., GRANER, A., THOMAS, W.I.B., ELLIS, R.P. and POWELL, W. 1996. Conservation of AFLP marker order in different barley populations. V. International Oat Conference & VII. International Barley Genetics Symposium. Eds: Al Slinkard, Graham Scoles and Brian Rosnagel, pp. 397-399, Canada.
- WEISS, E.A. 1983. Sesame. In: Oilseed Crops. Longman, pp. 282-340, London.
- WELSH, J. and McCLELLAND, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*, 18: 7213-7218.
- WEYEN, J., BAUER, E., GRANER, A., FRIEDT, W. and ORDON, F. 1996. RAPD tagging of barley chromosome 3L with special consideration of the BaMMV/BaYMV resistance gene ym4. V. International Oat Conference & VII. International Barley Genetics Symposium. Eds: Al Slinkard, Graham Scoles and Brian Rosnagel, pp. 307-309, Canada.

- WILLIAMS, J.G.K., KUBELIK, A.R., LIVAK, K.J., RAFALSKI, J.A. and TINGEY, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18: 6531-6535.
- ZABEAU, M. and VOS, P. 1993. Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting. European Patent Application Number: 92402629.7, Publication number: 0 534 858 A1.
- ZHANG, G., ANGELES, E.R., ABENES, M.L.P., KHUSH, G.S. and HUANG, N. 1996. RAPD and RFLP mapping of the bacterial blight resistance gene *xa-13* in rice. *Theor. Appl. Genet.*, 93: 65-70.
- ZHANG, Y. and STOMMEL, J.R. 2000. RAPD and AFLP tagging and mapping of *Beta* (*B*) and *Beta* modifier (*MOB*), two genes which influence β -carotene accumulation in fruit of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Theor. Appl. Genet.*, 100: 368-375.
- ZHUANG, J.Y., LU, J., QIAN, H.R., LIN, H.X. and ZHENG, K.L. 1998. Tagging of blast resistance gene(s) to DNA markers and marker-assisted selection (MAS) in rice improvement. Application of DNA based marker mutations for improvement of cereals and other sexually reproduced crop plants. Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture, pp. 55-61, Vienna, Austria

ÖZGEÇMİŞ

Bülent UZUN 1973 yılında Ankara'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Ankara'da tamamladı. 1991 yılında Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü'nde lisans eğitimine başladı ve 1995 yılında Ziraat Mühendisi olarak mezun oldu. Aynı yıl Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Yüksek Lisans Programı İngilizce Hazırlık Sınıfına katılmaya hak kazandı. 1996 yılında Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarla Bitkileri Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimine başladı ve Araştırma Görevlisi olarak atandı. 1997 yılında "Susamda Verim, Verim Komponentleri ve Yağ Miktarının Varyasyonu ve Verimle İlişkili Özellikler" isimli master tezini savunarak Ziraat Yüksek Mühendisi unvanını almaya hak kazandı. 1998 yılının Şubat ayında Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarla Bitkileri Anabilim Dalı'nda doktora programına başladı. 27 Aralık 2001 tarihinden itibaren Tarla Bitkileri Anabilim Dalı'nda Öğretim Görevlisi olarak çalışmakta olan Bülent UZUN, evli ve bir kız çocuk babasıdır.