

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

**ZEYTİN (*Olea europaea* L.) GENOTİPLERİNİN DNA
MARKÖRLERİ YARDIMI İLE
KARAKTERİZASYONU**

Öznur ÇETİN

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Adalet MISIRLI

Tez İkinci Danışmanı: Prof. Dr. M. Bahattin TANYOLAÇ

Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu: 501.01.01

Sunuş Tarihi: 14.09.2012

Bornova-İZMİR

2012

Ziraat Yüksek Mühendisi Öznur ÇETİN tarafından **doktora tezi** olarak sunulan “**Zeytin (*Olea europaea* L.) Genotiplerinin DNA Markörleri Yardımı İle Karakterizasyonu** ” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve **14.09.2012** tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı	: Prof. Dr. Adalet MISIRLI
İkinci Danışman	: Prof. Dr. Bahattin TANYOLAÇ
Raportör Üye	: Prof. Dr. Serra HEPAKSOY
Üye	: Prof. Dr. Hülya İLBİ
Üye	: Yrd. Doç. Dr. Zeynel DALKILIÇ

ÖZET**ZEYTİN (*Olea europaea* L.) GENOTİPLERİNİN DNA MARKÖRLERİ YARDIMI İLE KARAKTERİZASYONU**

ÇETİN, Öznur

Doktora Tezi, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Adalet MISIRLI

Tez İkinci Danışmanı: Prof. Dr. M. Bahattin TANYOLAÇ

14 Eylül 2012, 85 sayfa

Genetik kaynakların tanımlanmasında moleküler teknikler etkili bir biçimde kullanılmaktadır. Bu çalışmada ulusal zeytin arazi gen bankasındaki 96 genotip DNA'ya dayalı yöntemler olan RAPD, AFLP ve SSR markör teknikleri uygulanarak moleküler düzeyde tanımlanmıştır. RAPD markör analizinde 52 primerden 215 polimorfik bant, AFLP markör analizinde 26 primerden 919 polimorfik bant ve SSR markör analizinde ise 14 primerden 62 polimorfik bant elde edilmiştir. Her teknikten elde edilen veriler ile genetik uzaklık matrisi ve dendrogram oluşturulmuştur. Ayrıca üç tekniğin verilerinin birleştirilmesi sonucunda toplam 1196 adet polimorfik bant değerlendirilerek dendrogram ve genetik uzaklık matrisi elde edilmiştir.

İncelenen 96 genotipte RAPD markör analizinde en düşük genetik uzaklık değeri 0.05, en yüksek genetik uzaklık değeri 0.84 olarak tesbit edilmiştir. AFLP markör analizinde popülasyonda genetik uzaklık bakımından en düşük değer 0.15, en yüksek değer 0.71'dir. SSR markör analizinde ise en düşük ve en yüksek genetik uzaklık değerleri ise 0.00 ile 0.87 olarak saptanmıştır.

RAPD, AFLP ve SSR markör analizi verileri birlikte değerlendirilerek elde edilen genetik uzaklık matrisinde, en düşük değer 0.14 ile Kuşadası orijinli Yağ zeytini ve Kuşadası orijinli Yerli yağlık genotipleri arasında, en yüksek değer ise 0.70 ile Artvin orijinli Satı ve Nizip orijinli Yün çelebi genotipleri arasında belirlenmiştir. Nizip orijinli Yün çelebi genotipi hem RAPD ve AFLP markör analizlerinde ve hem de üç tekniğin birlikte değerlendirilmesinde diğer genotiplere en uzak genotip olarak saptanmıştır.

Anahtar Sözcükler: Zeytin, RAPD, AFLP, SSR.

ABSTRACT**CHARACTERIZATION OF OLIVE GENOTYPES (*Olea europaea* L) BY
MEANS OF DNA MARKERS**

ÇETİN, Öznur

PhD Thesis, Department of Horticulture

Supervisor 1: Prof. Dr. Adalet MISIRLI

Supervisor 2: Prof. Dr. M. Bahattin TANYOLAÇ

14 September 2012, 85 pages

Molecular markers are effectively used in the characterization of genetical sources. In this study, 96 genotypes in the National Ex-situ Olive Germplasm Bank have been characterized by DNA-based marker techniques such as RAPD, AFLP and SSR. In the marker analyses, 215 polymorphic bands from 52 primers in RAPD, 919 polymorphic bands from 26 primers in AFLP and 62 polymorphic bands from 14 primers in SSR have been obtained. A dendrogram and a genetic distance matrix have been established with the data of each technique separately. Besides, the dendrogram and the genetic distance matrix have also been constructed by evaluating totally 1196 polymorphic bands as a result of combining the data of these techniques.

In the studied ninety-six genotypes, it has been determined that the lowest genetic distance value was 0.05 and the highest genetic distance value was 0.84 in RAPD marker analysis. In AFLP marker analysis, the lowest value was 0.15 and the highest value was 0.71 within the population in the context of genetic distance. As for SSR, the lowest and highest genetic distance values have been determined as 0.00 and 0.87 respectively.

Evaluating the data of RAPD, AFLP and SSR marker analyses together, it has been determined that the lowest genetic matrix value was 0.14 between the Kuşadası originated Yağ zeytini and Yerli yağlık genotypes, and the highest genetic matrix value was 0.70 between Artvin originated Satı and Nizip originated Yün çelebi genotypes. Nizip originated Yün çelebi has been found to be the furthest genotip to the other ones both in RAPD and AFLP marker analyses and in evaluating the three techniques together.

Key words: Olive, RAPD, AFLP, SSR.

TEŞEKKÜR

Doktora çalışmam boyunca değerli düşünce ve katkılarıyla beni yönlendiren, desteğini her zaman yanımda hissettiğim Sayın hocam Prof. Dr. Adalet MISIRLI'ya çok teşekkür ederim.

Tez konumun belirlenmesinde ve araştırmalar sırasındaki katkılarıyla çalışmama yön veren tez ikinci danışmanım Sayın Prof. Dr. M. Bahattin TANYOLAÇ'a gösterdiği anlayış ve desteği için teşekkürlerimi sunarım.

Tez İzleme Komitesi'nde yer alan ve önerileri ile çalışmanın tüm aşamalarında katkılarda bulunan değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Hülya İLBİ ve Yrd. Doç. Dr. Zeynel DALKILIÇ'a çok teşekkür ederim.

Çalışma, TÜBİTAK tarafından desteklenen 108G016 nolu projenin bir bölümü olarak yürütülmüş olup bütçe desteği nedeniyle TÜBİTAK'a teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamın yürütülmesinde her aşamada destek vererek yanımda olan Zeytincilik Araştırma İstasyonu Müdürü Sayın Dr. Seyfi ÖZİŞİK'a teşekkür ederim. Doktora eğitimine beni teşvik eden ve daima yanımda hissettiğim Sayın Dr. Filiz SEFER'e; fikir ve katkılarıyla bana yön veren Sayın Zir. Yük. Müh. Haluk ARSEL'e çok teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarında hep yanımda olan ve çalışmayı keyifli hale getiren değerli dostlarım Sayın Zir. Yük. Müh. Hülya KAYA ve Sayın Zir. Yük. Müh. Mustafa ŞAHİN'e teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmasının her aşamasında bilgisini, emeğini ve zamanını büyük bir özveri ile paylaşan, değerli arkadaşım Sayın Biyomühendis H. Betül KAYA'ya katkıları için çok teşekkür ederim. Doktora çalışmasına birlikte başladığım ve her zaman desteğini aldığım Sayın Zir. Yük. Müh. Nurengin METE'ye ve katkıları için Sayın Zir. Yük. Müh. Mehmet HAKAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Her zaman desteklerini yanımda hissettiğim annem Hamide EROL ve babam Abdülkadir EROL'a, eşim Soner ÇETİN'e, kızım Özge ve oğlum Arda'ya hayatıma kattıkları pozitif enerjiden dolayı yürekten teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLERSayfa

ÖZET	v
ABSTRACT	vii
TEŞEKKÜR	ix
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	5
3. MATERYAL ve YÖNTEM	17
3.1. Materyal	17
3.2. Yöntem	20
3.2.1. Yaprak örneklerinin toplanması	20
3.2.2. DNA izolasyonu	20
3.2.3. DNA saflığının belirlenmesi	21
3.2.4. Moleküler markör teknikleri	24
3.2.4.1. RAPD markör analizi	24
3.2.4.1.1. RAPD markör analizi için DNA seyreltme oranının belirlenmesi	24
3.2.4.1.2. RAPD markör analizi PCR uygulamaları	24
3.2.4.2. AFLP markör analizi	26
3.2.4.2.1. AFLP markör analizi PCR uygulamaları	26
3.2.4.2.2. Genomik DNA'nın restriksiyon enzimleri ile kesilmesi	26

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.2.4.2.3. Adaptörlerin bağlanması.....	27
3.2.4.2.4. Pre-amplifikasyonun gerçekleştirilmesi.....	27
3.2.4.2.5. Selektif amplifikasyonun gerçekleştirilmesi.....	28
3.2.4.2.6. Jel elektroforezi ve jellerin görüntülenmesi.....	30
3.2.4.3. SSR markör analizi.....	31
3.2.4.3.1. SSR primerlerinin bağlanma sıcaklığının belirlenmesi.....	34
3.2.4.3.2. Jel elektroforezi ve jellerin görüntülenmesi.....	35
3.2.4.3.3. İstatistiksel analizler ve verilerin toplanması.....	35
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	36
4.1. RAPD markör analizi.....	36
4.1.1. RAPD markör analizi için DNA seyreltme oranının belirlenmesi.....	36
4.2. AFLP markör analizi.....	46
4.3. SSR markör analizi.....	57
4.4. RAPD, AFLP ve SSR markör teknikleri verilerinin birlikte değerlendirilmesi.....	65
5. SONUÇ.....	73
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	76
ÖZGEÇMİŞ.....	85

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.1. Saflık analizi sonucunda elde edilen jel görüntüsü.....	21
3.2. Proteinaz K ve RNAz muamelesinden sonra saflık analizi sonucunda elde edilen jel görüntüsü.....	22
3.3. OPC08-OPC14 RAPD primerleri ile yapılan PCR analizi sonucunda elde edilen jel görüntüsü (oklar polimorfik bantları göstermektedir).....	25
3.4. OPC15-OPC20 RAPD primerleri ile yapılan PCR analizi sonucunda elde edilen jel görüntüsü (oklar polimorfik bantları göstermektedir).....	26
3.5. SSR primerlerinin bağlanma sıcaklığını belirlemek amacıyla yapılan gradient PCR çalışması gösterimi.....	34
4.1 OPI15 primeri ile 1/100, 1/200, 1/300 ve 1/400 DNA seyreltmelerinde yapılan per sonucunda elde edilen jel görüntüsü.....	36
4.2. OPN13 primeri ile 1/100, 1/200, 1/300 ve 1/400 DNA seyreltmelerinde yapılan PCR sonucunda elde edilen jel görüntüsü.	36
4.3. OPC01 primeri ile yapılan PCR sonucunda elde edilen jel görüntüsü (oklar polimorfik bantları göstermektedir).	38
4.4. OPC15 primeri ile yapılan PCR sonucunda elde edilen jel görüntüsü (oklar polimorfik bantları göstermektedir).	38
4.5. OPE07 primeri ile yapılan PCR sonucunda elde edilen jel görüntüsü (oklar polimorfik bantları göstermektedir).	39
4.6. RAPD markör analizi verileri ile cluster analizi sonucunda elde edilen dendrogram.....	43
4.7. M _{CAC} -E _{ACG} primer kombinasyonu ile 1-48 no'lu genotiplerden elde edilen jel görüntüsü, (m: ırdye 700 ve ırdye 800 marker (50- 700 bp), oklar ise jel üzerinde skorlanan polimorfik bantlardan bazılarını göstermektedir).....	48

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.8. M_{CAC} - E_{ACG} primer kombinasyonu ile 49-96 no'lu genotiplerden elde edilen jel görüntüsü, (m: ırdye 700 ve ırdye 800 marker (50- 700 bp), oklar ise jel üzerinde skorlanan polimorfik bantlardan bazılarını göstermektedir).	48
4.9. M_{CAC} - E_{ACC} primer kombinasyonu ile 1-48 no'lu genotiplerden elde edilen jel görüntüsü, (m: ırdye 700 ve ırdye 800 marker (50- 700 bp), oklar ise jel üzerinde skorlanan polimorfik bantlardan bazılarını göstermektedir).	49
4.10. M_{CAG} - E_{ACA} primer kombinasyonu ile 49-96 no'lu genotiplerden elde edilen jel görüntüsü, (m: ırdye 700 ve ırdye 800 marker (50- 700 bp), oklar ise jel üzerinde skorlanan polimorfik bantlardan bazılarını göstermektedir).	49
4.11. AFLP markör analizi verileri kullanılarak yapılan cluster analizi sonucunda elde edilen dendrogram.....	54
4.12. GAPU71B SSR primeri kullanılarak elde edilen jel görüntüsü.....	58
4.13. DCA7 SSR primeri kullanılarak elde edilen jel görüntüsü.....	58
4.14. SSR markör analizi verileri kullanılarak yapılan cluster analizi sonucunda elde edilen dendrogram.....	62
4.15. RAPD, AFLP ve SSR markör analizi verileri kullanılarak yapılan cluster analizi sonucunda elde edilen dendrogram.	69

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Dünya tane zeytin üretimi (2007-2010 ort.).....	2
3.1. Zeytin genotiplerinin bazı özellikleri.....	17
3.2. Zeytin genotiplerinin nanodrop 1000 kullanılarak ölçülen DNA miktarları.....	23
3.3. RAPD analizinde uygulanan PCR kokteyl bileşenleri ve miktarları.....	24
3.4. RAPD analizi için PCR işleminde uygulanan sıcaklık döngüleri.	25
3.5. Restriksiyon enzimi kesim kokteyli bileşenleri ve miktarları.	27
3.6. Adaptörlerin bağlanması için hazırlanan kokteyl bileşenleri ve miktarları.....	27
3.7. Pre-amplifikasyonda kullanılan kokteyl bileşenleri ve miktarları.....	28
3.8. Uygulanan PCR sıcaklık döngüleri.	28
3.9. Selektif amplifikasyon primer kombinasyonları.	29
3.10. Selektif amplifikasyonda kullanılan kokteyl bileşenleri ve miktarları.	29
3.11. AFLP analizi için PCR işleminde uygulanan sıcaklık döngüleri.	30
3.12. Akrilamid çözeltisinde (%8'lik) yer alan bileşenler ve miktarları.	31
3.13. SSR markör analizinde kullanılan bileşenler ve miktarları.	31
3.14. SSR markör analizinde uygulanan sıcaklık döngüleri ve süreleri.....	32
3.15. SSR markör analizinde kullanılan forward ve reverse primer ile tekrarlayan dizi ve sayıları.....	33
4.1. Kullanılan RAPD primerleri ve polimorfik bant sayıları.	37

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.2. RAPD veri matrisi.....	40
4.3. AFLP primerleri ve polimorfik bant sayıları.	47
4.4. AFLP veri matrisi.....	51
4.5. SSR primerleri için tespit edilen bağlanma sıcaklıkları ve elde edilen polimorfik bant sayıları.....	57
4.6. SSR veri matrisi	59
4.7. RAPD, AFLP ve SSR verileri ile oluşturulan veri matrisi	66

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
AFLP	Amplified Fragment Length Polimorphism
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate
EDTA	Etilen Diamine Tetra Asetik Asit
ISSR	Inter Simple Sequence Repeat
MgCl ₂	Magnezyum Klorür
µl	Mikrolitre
ng	Nanogram
PCR	Polymerase Chain Reaction
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RNaz	Ribonukleaz
rpm	Dakikadaki dönüş sayısı
SSR	Simple Sequence Repeat
SRAP	Sequence Related Amplified Polymorphism
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
TBE	Tris-Borik Asit-EDTA çözeltisi
TE	Tris-EDTA çözeltisi
PIC	Polymorphic Information Content
UP	Ultra Pure

1. GİRİŞ

Zeytin *Oleaceae* familyasının *Olea* cinsine dahil bir meyve türüdür (Flahault, 1986; Morettini, 1972). *Olea* cinsi çok sayıda tür ve alt türleri içermekte olup, bunların çoğu çalı formundadır. Ekonomik değeri en yüksek olan tür *Olea europaea*'dır (Baldoni et al., 2006). Bu tür *O. europaea var. sylvestris* ve *O. europaea var. sativa* adlı iki ana gruba bölünmüştür. Bunlardan birincisi yabani zeytinler olarak tanımlanan bütün tipleri, ikincisi ise kültür zeytinlerini içermektedir (Turrill, 1951). Kültür ve yabani zeytin genotipleri aynı kromozom sayına ($2n = 46$) sahiptir (Green and Wickens 1989).

Bazı araştırmacılar ise *O. europaea* türünün morfolojik ve coğrafi dağılımına göre 6 alt türü olduğunu bildirmişlerdir. Bu alt türler;

- 1) *O. europaea subsp. europaea*, Akdeniz Bölgesi kültür ve yabani zeytini
- 2) *O. europaea subsp. cuspidata*, Güneydoğu Asya, Güneybatı Çin, Arabistan, Doğu ve Güney Afrika
- 3) *O. europaea subsp. laperrinei*, Sahra bölgesi
- 4) *O. europaea subsp. maroccana*, Fas
- 5) *O. europaea subsp. cerasiformis*, Madeira Adası
- 6) *O. europaea subsp. guanchica*, Kanarya Adaları olarak sınıflandırılmıştır (Green and Wickens, 1989; Gren, 2002).

Zeytinin kültüre alınması 5500 yıl kadar önce "*Oleaster*" olarak bilinen yabani Akdeniz zeytininin, Güney Avrupa ve Kuzey Afrika boyunca görülen insan göçlerini takip ederek başladığı düşünülmektedir (Besnard et al., 2001). Zeytin, M.Ö. 3000 yıllarında Akdeniz'in doğu kıyılarında kültüre alınmaya başlamış olup, bu bölgede kültüre alınan ilk meyve türlerindedir (Zohary and Spiegel-Roy, 1975). Günümüze kadar yapılan arkeolojik çalışmalardan elde edilen bulgular, zeytin yetiştiriciliğinin kökeninin Suriye-İsrail-Filistin bölgesi olduğunu göstermektedir (Zohary and Hopf, 1993; Remesal- Rodríguez, 1996).

Zeytin, dünyanın belirli bölgelerinde ekolojik açıdan kendine uygun yaşam alanları bulmuştur. Genel olarak Kuzey ve Güney yarım kürenin 30°-45° enlemleri arasındaki bölge zeytinin üretim kuşağı olarak nitelendirilmektedir (Rallo et al., 1997). Ekonomik anlamda 38 ülkede zeytin üretimi yapılmakta olup bu ülkelerin 30'u kuzey yarım kürede, 8'i ise güney yarım kürede yer almaktadır (Öztürk, 2006). Kuzey yarım kürede bulunan üretim alanları Akdeniz Havzası'nda yoğunlaşmakta ve dünya zeytin üretiminin % 99'unu karşılamaktadır. Bu nedenle, zeytin, Akdeniz ülkelerinin ekonomisinde, beslenmesinde ve kültüründe önemli bir yere sahiptir (Zamora et al., 2001).

Dünya zeytin üretiminde önemli bir payı olan Türkiye'de 81 ilin 37'sinde zeytin yetiştiriciliği yapılmakta olup zeytin ağacı varlığı 157.155.819 adettir (Anonymous, 2012). Türkiye'nin ham tane zeytin üretimi ise 2007-2010 yılları ortalamasına göre 1.311.438 tondur. Bu üretim düzeyi ile dünya zeytin üretiminin %7'sini gerçekleştiren ülkemiz bu alanda dünyada 4. sırada yer almaktadır (Anonymous, 2012). Dünya zeytin üretiminde öne çıkan ülkeler ve üretim miktarları Çizelge 1.1'de verilmiştir.

Çizelge 1.1. Dünya tane zeytin üretimi (2007-2010 ort.).

Dünya tane zeytin üretimi (2007-2010 ort.)		
Ülkeler	Miktar (ton)	%
İspanya	6.911.995	36.6
İtalya	3.295.175	17.5
Yunanistan	2.245.715	11.9
Türkiye	1.311.438	7.0
Tunus	976.850	5.2
Fas	939.498	5.0
Suriye	805.796	4.3
Portekiz	304.561	1.6
Mısır	524.756	2.8
Cezayir	373.350	2.0
Libya	177.722	0.9
Arjantin	158.750	0.8
Filistin	87.962	0.5
Ürdün	132.872	0.7
Lübnan	85.075	0.5
Diğer ülkeler	533.596	2.8
TOPLAM	18.865.110	100.0

Dünyada geniş bir alanda yetiştiriciliği yapılmakta olan zeytin türünün, 2000'den çok çeşide sahip olduğu bildirilmiştir (Bartolini et al., 1998). Ancak, yerel çeşitler hakkındaki bilgi eksikliği sebebiyle bu rakamın düşük olduğu ifade edilmektedir (Cantini et al., 1999).

Genotiplerin tanımlanmasında, morfolojik (çiçek rengi gibi), biyokimyasal (izoenzimler gibi) ve DNA düzeyinde (moleküler markörler) izlenebilen genetik markörler kullanılmaktadır (Yıldırım ve Kandemir 2001). Morfolojik markörler bir bireyi diğerlerinden ayıran kalıtsal özellikler içerirler ve fiziksel görüntüde meydana gelen farklılıkları esas alırlar. Yaprak şekli, çiçek rengi, ağaç yapısı gibi fenotipik özellikleri içeren morfolojik markörler, çok uzun zamandır bilinmelerine rağmen sayılarının az oluşu, çevresel ve diğer genetik faktörlerden etkilenmeleri nedeniyle fazla kullanılmamaktadır (Staub and Sequen, 1996).

Morfolojik markörlerin yeterli seviyede olmaması nedeniyle biyokimyasal markör teknikleri geliştirilmiş olup en çok kullanılanları izoenzimlerdir. Maliyetinin düşük olması ve kolay uygulanabilirliği nedeniyle taksonomik analizlerde, genotiplerin tanımlanmasında, genom haritalama çalışmaları gibi bir çok alanda kullanılırlar (Staub et al., 1982; Bernatzky and Tanksley, 1989).

Moleküler markörler, kaynağını kendilerinin üretildiği bitkilerin hücrelerinde bulunan DNA'lardan alır. Canlıların yapısını belirleyen şifre de DNA zincirlerinde olduğundan moleküler markörler, bitki popülasyonundaki çeşitlilik veya o popülasyondaki bitki genotipleri arasındaki ilişkilerin tespitinde %100'e yakın güvenilirlikle değerlendirilirler (Gülşen ve Mutlu, 2005).

Günümüzde sürekli gelişen moleküler markör teknikleri bitki sistematğinde, genetik kaynaklarının tanımlanmasında, ıslahında, genetik haritaların oluşturulmasında ve hastalıklara dayanımın belirlenmesinde kullanılmaktadır (Gülşen ve Mutlu, 2005). Ülkelerin en büyük zenginliği olan gen kaynaklarının korunması, değerlendirilmesi ve adına doğru olarak kayıt altına alınması son derece önemlidir. Diğer bitki türlerinde olduğu gibi zeytinde de genetik kaynaklarının tanımlanmasında morfolojik karakterlerden yararlanılmaktadır. Ancak son yıllarda morfolojik özelliklere göre yapılan tanımlamaların yanında daha güvenilir bulgulara ulaşılabilmesi bakımından moleküler teknikler ile yapılan tanımlamalar yoğun olarak kullanılmaya başlanmıştır.

Morfolojik özelliklerine göre yapılan çeşit tanımlamada; bazı çeşitlerin birbirine benzemesi, bazılarında ise aynı çeşidin farklı çevresel koşullarda yetiştirilmesine bağlı olarak doğru adlandırılmadığı ve bunun da çeşit tanımlamada karışıklıklara yol açtığı belirtilmiştir (Vergari et al., 1996). Geleneksel ıslah uygulamalarına alternatif olarak sürekli gelişen moleküler markör teknikleri, çevre faktörlerinden etkilenmemeleri, genetik değişiklikleri daha fazla yansıtmaları, her bir ebeveynden gelen farklı karakterleri ortaya çıkarmaları, bitkilerin genetik orijininin belirlenmesine yardımcı olması ve çok sayıda markörün elde edilebilir olması nedeniyle önemli avantajlar sağlamaktadır (Yıldırım ve Kandemir, 2001). Birçok ülkede zeytin genotiplerinin DNA'ya dayalı moleküler markör teknikleri ile tanımlanması konusunda araştırmalar yapılmaktadır (Belaj et al. 2003b; Cordeiro et al., 2008; Shahriari et al., 2008).

Zeytinin orijin merkezlerinden birisi olarak kabul edilen Türkiye zeytin çeşitliliği bakımından son derece zengindir. Zeytinin ülkemiz için önemi Cumhuriyet'in ilk yıllarında fark edilerek 26.01.1939 tarihinde 3573 sayılı 'Zeytinciliğin ıslahı ve yabanilerinin aşılattırılması hakkında kanun' ile ilk kez bir ürün kanunla koruma altına alınmıştır. Bu amaçla, Zeytincilik Araştırma İstasyonu tarafından zeytin genetik kaynaklarının toplanması, muhafazası ve değerlendirilmesi için zeytin yetiştiriciliği yapılan Ege, Marmara, Akdeniz, Güneydoğu Anadolu ve Karadeniz Bölge'lerinde belirli aralıklarla surveyler yapılmaktadır. Morfolojik farklılıklara dayalı olarak yapılan bu surveyler neticesinde 88 genotip tescil ettirilmiştir. Bu genotipler, İzmir ilinin Kemalpaşa ilçesinde bulunan Zeytin Arazi Gen Bankası'nda koruma altına alınmıştır. Ancak, zeytin yetiştiriciliği yapılan bölgelerde bazı genotiplerde yöresel adlandırmalar nedeniyle sinonim ve homonim durumlarının varlığı bilinmektedir.

Yukarıdaki açıklamalar ışığında planlanan bu çalışmada, zeytin arazi gen bankasındaki 96 genotipin DNA'ya dayalı yöntemler olan RAPD, AFLP ve SSR markör teknikleri ile tanımlanması amaçlanmıştır. Her teknikten elde edilen verilerin ayrı ayrı ve birlikte değerlendirilmesi herhangi bir teknikle belirlenemeyecek bir polimorfizmin diğer bir teknikle ortaya çıkarılmasına olanak sağlaması açısından önem taşımaktadır. Çeşit zenginliği ve üç farklı moleküler markör tekniğinin birlikte uygulandığı bu çalışma Türkiye'de ilk olarak zeytinde gerçekleştirilmiş diğer moleküler karakterizasyon çalışmalarından farklı bir yapıya sahiptir.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Moleküler markör teknikleri genetik varyasyonun belirlenmesinde, bitki sistematiğinde, ıslahında, genetik haritaların oluşturulmasında ve markör yardımıyla seleksiyon amaçlı olarak kullanılmaktadır. Son yıllarda sistematik çalışmalarında yaygın olarak kullanılan moleküler markörlerin çeşitli avantajları aşağıda yer almaktadır:

-Çevre faktörlerinden etkilenmezler,

-Çekirdek ve farklı kalıtım şekline sahip kloroplast ve mitokondri gibi organel genomlar ayrı ayrı çalışılabilir,

-Genetik değişiklikleri daha fazla yansıttıkları için daha az pleiotropiktir (bir genin birden fazla karakteri kontrol etmesi),

-Her bir ebeveynden gelen farklı karakterler tespit edilebildiği için bitkilerin genetik orijini tespit edilebilir,

-Sonsuz sayıda moleküler markör elde edilebilir (Gülşen ve Mutlu, 2005).

Bitki ıslahında DNA markör sisteminin seçimi; araştırmanın amacına, popülasyonun yapısına, çalışılan türün genomik çeşitliliğine, markör sisteminin bulunma durumuna, DNA ekstraksiyonu süresine, analiz için gerekli DNA miktarına, klonlama ve dizi belirlemesinin gerekliliğine, elde edilen genetik bilginin potansiyel kullanım düzeyine, genetik bilgi tipine, allel varyasyonunun açıklanma durumuna (dominant/kodominant), elektroforez sisteminin otomasyonuna, genetik haritaların kullanım potansiyeli ve tekniğin uygunluğuna, analiz için gerekli zaman ve birim maliyetine bağlı olarak değişim göstermektedir (Staub and Sequen, 1996).

DNA markörleri farklı genotiplere ait DNA nükleik asit dizilişini genel olarak iki değişik yöntemle ortaya koymaktadır. Bunlar; hibridizasyonuna dayalı RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), ve PCR'a (Polymerase Chain Reaction) dayalı RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), SSR (Simple Sequence Repeat), ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat), SRAP (Sequence-Related Amplified

Polymorphism) ve SNP (Single Nucleotide Polymorphism) gibi moleküler yöntemlerdir.

Hibridizasyona dayalı moleküler markörlerden ilk olarak RFLP tekniği geliştirilerek çeşitlerin tanımlanmasında ve genetik haritaların oluşturulmasında kullanılmıştır. Bu teknik çeşitli şekillerde etiketlenmiş bir DNA parçasının (prob DNA) araştırılan bir DNA dizinindeki benzer veya aynı dizilişteki DNA'ya melezlenmesini esas almaktadır (Staub and Sequen, 1996). RFLP, kodominant moleküler markör tekniği olmasına karşın, uzmanlık ve bilgi gerektirmesi, yüksek işgücü istemesi, radyoaktif madde kullanımı, laboratuvar alt yapısı ve uzun zamana ihtiyaç göstermesi gibi dezavantajlara sahiptir (Tanksley et al., 1989; Malyshev and Kartel, 1997).

PCR (Polymerase Chain Reaction), DNA polimeraz enziminin kullanılmasıyla yapay koşullarda DNA üretilmesini ifade etmektedir. Bu üretim için 6-25 nükleotid uzunluğunda başlatıcı DNA'lar (primerler), reaksiyon ortamında pH ve tuz konsantrasyonu optimizasyonu için tampon çözelti, polimeraz enziminin aktivasyonu için $MgSO_4$ ve A, T, G, C nükleotidlerinin bulunması gerekmektedir. Polimeraz enzimi başlatıcı DNA'nın bir kalıp DNA üzerine bağlanmasından sonra, DNA'yı bir uçtan uzatmaya başlar ve kalıp DNA'nın aynısını üretir. DNA üretim işlemi birbirini izleyen bir seri çok spesifik sıcaklık devrelerinde gerçekleşmektedir (Yıldırım ve Kandemir, 2001).

DNA'ya dayalı markör tekniklerinden biri olan RAPD ilk olarak 1990 yılında rastgele seçilmiş primerlerin kullanıldığı ve PCR'ı temel alan bir teknik olarak ortaya çıkmıştır. Bu teknikte az miktarda DNA kullanılmakta, uygulaması kolay ve maliyeti düşük olmaktadır. Buna karşılık dominant özellik göstermesi ve tekrarlanabilirlik özelliğinin az olması kullanımını sınırlamaktadır (Williams et al., 1990; 1993). Bu teknikte 6-10 nükleotid uzunluğundaki başlatıcı DNA'lar kullanılarak genom üzerinde rastgele bölgelerin DNA amplifikasyonu gerçekleştirilmektedir. Reaksiyon şartlarının spesifik olmaması rasgele çoğaltıma izin vermektedir. Yaygın olarak diğer PCR uygulamalarının aksine iki değil bir primer yer almaktadır. Ancak bu primer her iki yöndeki DNA üretimi için de kullanılmaktadır. Böylece primerin DNA üzerinde birbirine yakın iki bölgeye yapışabildiği genom bölgelerinin amplifikasyonu yapılmaktadır. Bunu takiben üretimi yapılan DNA parçaları bir agaroz jel üzerinde elektroforeze tabi tutulduğunda bazı parçaların bazı genotiplerde üretilip bazılarında ise üretilmediği gözlenmektedir (Welsh and McClelland, 1990).

Diğer bir markör tekniği olan AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphisms)'de genomik DNA önce birisi 6, diğeri 4 baz tanıyan iki kesim enzimi tarafından kesilmektedir. Oluşan bu DNA parçacıklarına adaptörlerle birleştirme (ligasyon) yapılmaktadır. Ligasyon ürünleri birer baz ilave edilmiş primerlerle PCR yapılmakta ve elde edilen PCR ürünleri 3 baz ilave edilmiş primerlerle (primerlerin birisi radyoaktif veya floresent ile işaretlenmekte) seçici PCR'a tabi tutulmaktadır. Bu aşamadan sonra PCR ürünleri poliakrilamid jelde yürütülerek oluşan polimorfizme göre veriler değerlendirilmektedir. AFLP tekniğinde, tek bir reaksiyonda 30-150 bölge tanımlanabilmesi, sonuçların tekrarlanabilir olması bu tekniğin en önemli avantajını oluşturmaktadır. Diğer taraftan tekniğin dezavantajları dominant markör olması, laboratuvar ekipmanına gereksinim duyulması ve maliyetinin yüksek olması şeklinde sıralanmaktadır (Vos et al., 1995; Ridout and Donini, 1999). Yapılan çalışmalarda AFLP tekniğinin diğer yöntemlere göre daha etkili ve daha tutarlı olduğu vurgulanmaktadır (Després et al., 2002).

Günümüzde moleküler çalışmalarda yaygın bir teknik olan SSR (Simple Sequence Repeat) veya mikrosatellitler ökaryotik genomlar boyunca dağılmış bulunan ve ardışık olarak tekrarlanmakta olan 2-6 nükleotid gruplarından oluşmaktadır. Bu gruplar $(AT)_n$, $(GT)_n$, $(ATT)_n$ veya $(GACA)_n$ şeklinde gösterilmekte ve n ardışık tekrar sayısını belirtmektedir. Mikrosatellitleri çevreleyen DNA dizilerinin genellikle aynı türün bireyleri arasında korunduğu bildirilmektedir (Gupta et al., 1994). Bu teknikte genomda tekrarlanan baz dizilerinin bulunduğu bölgeler amplifiye edilmektedir. Bunun için çalışılan genomda tekrarlanan baz dizilerinin sağında ve solunda primer dizisi olarak kullanılacak DNA dizilerinin belirlenmesi ve bunların primer olarak kullanılması ön koşul olarak gerekmektedir. Bu durumun doğal bir sonucu olarak maliyeti yüksek olmakla birlikte PCR'a dayalı diğer tekniklere göre daha güvenilir bilgi içermektedir. Kodominant markör sistemidir ve polimorfizm oranı oldukça yüksektir (Powell et al., 1996).

Birçok ülkenin genetik kaynaklarının ve introduksiyon materyalinin karakterizasyonunda RAPD markör analizi ile gerçekleştirilen çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Örneğin; Suriye zeytin gen bankası bünyesindeki 32 çeşit İspanya'da bulunan Dünya Zeytin Gen Bankası'na gönderilmeden önce RAPD markörleri ile tanımlanmıştır. Uygulanan 13 RAPD primerinden 79 polimorfik bant tesbit edildiği, elde edilen dendrogramda 3 ana grubun oluştuğu ve her

grubun genellikle aynı coğrafi bölgeden elde edilen genotipleri içerdiği ifade edilmiştir (Belaj et al., 2003a).

İsrail’de yetiştiriciliği yapılan zeytin çeşitleri arasındaki genetik ilişki RAPD markör analizi uygulanarak belirlenmiştir. Elde edilen bulgular, Nabali çeşidinin çoğunlukla kendi çiçek tozları ile tozlanmasına ve uyuşmazlık sorunu olmamasına rağmen genetiksel açılım meydana geldiğini göstermiştir. İsrail’in kuzey bölgelerinden seçilen çeşitlerin (Manzanilla-IT, Sourı, Barnea, 80-B-69, Muhasan ve Maalot) genetiksel bakımdan benzer yönlerinin olduğu ve bu çeşitlerin bazı klonlarının çevre faktörlerinin etkisiyle farklılaştığı bildirilmiştir (Wiesman et al., 1998).

Akdeniz Havzası ve İberik Yarımadası zeytin bölgelerinin genetik ilişkisinin RAPD markörleri ile araştırıldığı çalışmada, Türk zeytin çeşitlerinin de yer aldığı 51 zeytin çeşidinin coğrafi orijinlerine göre gruplaşma eğilimi gösterdiği ve zeytin çeşitlerinin kendilerine özgü spesifik bir orijine sahip olduğu, orijin bölgeleri dışında sınırlı bir dağılım gösterdiği bildirilmiştir (Belaj et al., 2002b).

Korsika ve Sardunya adalarının kültür ve yabani zeytin çeşitlerinin ilişkilerinin yanı sıra, bazı İtalyan çeşitlerinin bu adalara ait çeşitler üzerindeki etkileri RAPD tekniği ile araştırılmıştır. Araştırmacılar elde ettikleri bulgulara dayanarak yabani ve kültür çeşitleri arasındaki genetik farkı belirlerken, Korsika çeşitlerinin Sardunya çeşitlerinin aksine muhtemelen mahalli yabani formlardan seçildiğini ve her iki adada da yabani ve kültür çeşitleri arasındaki melezlemelerden oluşan geçiş formlarının bulunduğunu ortaya koymuşlardır (Caraffa et al., 2002).

RAPD ve RFLP teknikleri kullanılarak Akdeniz zeytin çeşitlerinin farklı coğrafi alanlarda bulunan yabani akrabaları ile genetik ilişkilerini belirlemeye yönelik çalışmada, Türkiye’den temin edilen oleasterlerin diğer Akdeniz popülasyonlarından ayrıldığı; ‘*Olea laperrinei*’, ‘*Olea maroccana*’ ve ‘*Olea ceraciformis*’in Akdeniz zeytini ile en ilişkili türler olduğu, ‘*Olea africana*’nın ise en uzak tür olduğu ifade edilmiştir (Besnard and Bervillé, 2002).

Arnavutluk’a ait 19 zeytin genotipi ile 2 yabani tip arasındaki genetik ilişki RAPD markör tekniği ile 16 primer kullanılarak araştırılmıştır. Elde edilen

bantların 76'sının polimorfik olduğu ve bant sayısının primer başına 4 ile 10 arasında değiştiği tesbit edilmiştir (Belaj et al., 2003b).

RAPD tekniğini kullanarak 11 zeytin genotipi arasındaki ilişkinin belirlendiği çalışmada 17 primerden 610 bant elde edilmiştir. Bu bantların 444'ünün polimorfik olarak belirlendiği çalışma sonunda bazı primerlerin spesifik bant vermesinden dolayı çeşitlerin tanımlanmasında kullanılmalarının uygun olabileceği ifade edilmiştir (Sheidai et al., 2007).

Çeşitli koleksiyonlardan ve farklı bahçelerden elde edilen 102 çeşit ve klonun 45 polimorfik RAPD markörü yardımıyla ayrımlarının gerçekleştirildiği çalışma sonucunda, tüm çeşitlerin hızlı bir şekilde belirlenmesinde 3 primerden oluşan bir kombinasyon önerilmiştir (Besnard et al., 2001).

İtalya'nın Puglia ve Basilicata bölgelerine ait 24 geleneksel zeytin çeşidinde RAPD metoduyla yapılan çalışmada, çeşitlerin benzerlik indekslerinin 0.29 ile 0.97 arasında değiştiği belirlenmiştir (Perri et al., 2002).

Pakistan'da 5 zeytin genotipi ile yapılan RAPD markör analizinde 18 primer kullanılmıştır. Primer başına ortalama 15.5 allel tesbit edildiği ve genetik uzaklık değerlerinin 0.158 ile 0.512 arasında olduğu bildirilmiştir. Ferugenia ve Coratina çeşitlerinin gelecekteki zeytin üretim programlarında yer alabileceği ifade edilmiştir (Awan et al., 2011).

Yaptıkları çalışmada 100 zeytin çeşidinde 4 RAPD primeri ve 9 SSR primeri uygulayan araştırmacılar RAPD markör analizi sonucunda 26 polimorfik bant elde etmişler, 100 çeşit içerisinde 15 tanesinin farklı isimlere ancak aynı parmakizi analizine sahip olmasından dolayı bu çeşitlerin sinonim olduğunu belirtmişlerdir. Uygulanan 9 SSR primerinden ise 64 allel elde etmişlerdir. RAPD ve SSR verileri ile elde ettikleri sonuçlar benzerlik göstermesine rağmen, Frantoio ve Cellina çeşitlerinde RAPD tekniği ile farklılık belirleyememişlerdir. Ancak SSR markör tekniği ile bu iki çeşidi ayırmayı başarmışlardır (La Mantia et al. 2005).

Ülkemizde de yerli ve yabancı çeşitler ile yabancı genotiplerde genetik bağlantıların ortaya konmasında RAPD tekniğinin kullanıldığı çalışmalar dikkat çekmektedir. Örneğin morfolojik ve biyolojik özellikleri daha önce belirlenmiş olan 9 standart yerli zeytin çeşidi ile Türkiye'de yetiştiriciliği yapılan Manzanilla

çeşidinin RAPD-PCR tekniği ile moleküler karakterizasyonu yapılmıştır. Uygulanan 14 primerden 57 polimorfik bant elde edilmiştir. Araştırma sonucunda Domat, Gemlik, Kilis Yağlık, Manzanilla ve NizipYağlık zeytin çeşitlerinin aynı genetik benzerlik grubu içinde değerlendirilebileceği, buna karşılık Halhalı çeşidinin ise diğer tüm çeşitlerden farklı bir genetik yapıya sahip olduğu bildirilmiştir (Ergülen et al., 2002).

Mardin ilinin Derik yöresindeki zeytin genotiplerinin fenolojik ve morfolojik farklılıklarını belirlemek üzere, bölgenin önemli çeşidi Derik Halhalı'nın tipleri olduğu tahmin edilen örneklerde RAPD tekniği uygulanmıştır. Derik Halhalı tipleri arasında ve ulusal koleksiyonda yer alan referans bölge çeşitleri yapılan karşılaştırma sonucunda iki tipin diğerlerinden farklılık gösterdiği, öteki genotiplerin ise iki benzerlik grubu içerisinde yer aldığı, ancak hiçbirinin Derik Halhalı'nın referans değerleri ile %58'den fazla bir benzerlik göstermediği ortaya konulmuştur (Özkaya et al., 2006).

Marmara Bölgesi'nde yetiştirilen bazı zeytin çeşitlerinin RAPD-PCR tekniği kullanılarak genetik benzerlik ya da farklılıkların belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmada 7 farklı primer ile 12 çeşit arasında % 46.42 oranında polimorfizm elde edilmiştir. Primerlerden toplam 84 bant elde edilmiş ve bu bantların 39 tanesi polimorfik bulunmuştur. PAUP (Phylogenetic Analysis Using Parsimony and Other Methods) verilerine göre, birbirine en yakın genetik uzaklık değeri 0.03571 ile Gordal ve Karamürsel su çeşitleri arasında, en uzak genetik uzaklık değeri ise 0.17857 ile Arbequina ile Ascolana, Manzanilla hermandos, Gemlik, Verdial ve Vegrall çeşitleri arasında belirlenmiştir (Parlak, 2007).

Ülkemizde yetiştiriciliği yapılan en önemli çeşitlerden olan Domat, Gemlik, Memecik, Uslu, Edremit ve Manzanilla zeytin çeşitleri arasındaki genetik ilişki RAPD-PCR tekniği ile araştırılmıştır. Uygulanan 60 primerden 36 adedinde değerlendirmeye uygun 291 polimorfik bant elde edilmiştir. Genetik uzaklık değerleri Memecik ve Edremit çeşitleri arasında 0.0455, Manzanilla ve Domat çeşitleri arasında ise 0.1666 olarak tesbit edilmiştir (Sesli and Yeğenoğlu 2009).

Araştırmacıların diğer bir çalışmasında İspanya orijinli Manzanilla çeşidi ile Manisa, İzmir ve Muğla illerinden toplanan 8 yabancı zeytin tipi arasındaki genetik ilişki RAPD-PCR tekniğini kullanarak belirlenmiştir. Uygulanan 60 primerden 346 polimorfik bant elde edilmiştir. Genetik uzaklık değeri 0.0665 ve 0.2863,

genetik benzerlik değerleri ise 0.9356 ve 0.7511 olarak belirlenmiştir (Sesli and Yeğenoğlu, 2010).

Türkiye'nin batı kıyılarından örneklenen 84 yabancı zeytin genotipi ve yine bu bölgede yetiştiriciliği yapılan 8 kültür çeşidinin kendi aralarında ve birbirleriyle olan genetik uzaklıklarını ve gen akış düzeylerini saptamak amacıyla geręekleřtirilen çalışmada 20 RAPD primeri kullanılmıştır. Yabancı populusyonlarda 441 polimorfik lokus, kültür çeşitlerinde ise 137 polimorfik lokus tesbit edilmiştir. Yabancı populusyonlar için hesaplanan gen akış düzeyi değeri (N_m) 0.76 olarak belirlenmiştir (Işık, 2011).

Moleküler karakterizasyonda AFLP markör analizi de etkin olarak kullanılan tekniklerden biri olarak kabul görmektedir. Bu konuda *Olea* cinsinin coğrafik dağılımını genetik ilişkiler düzeyinde incelemek amacıyla İtalya, İtalya-Sicilya, İspanya, Yunanistan, Türkiye, Suriye, Lübnan, İsrail, Mısır, Tunus, Fas, Cezayir, Portekiz ve Hırvatistanı kapsayan çok geniş bir coğrafyadan toplanan kültür çeşitleri ve İtalya'dan elde edilen yabancı zeytin genotiplerinde yürütölen çalışmada 5 AFLP primer kombinasyonu kullanılarak 288 polimorfik bant elde edilmiştir. Verilere göre yapılan değerlendirme sonucunda yabancı zeytin genotipleri ile Kuzey-Batı Afrika çeşitleri dendrogramın aynı alt grubunda dağılım gösterirken, Doğu Afrika ve Asya grupları ise birlikte ancak ilk gruptan farklı bir dağılım göstermiştir. Ayrıca Okyanusya ve Avustralya grupları ise bu gruplardan tamamen uzak bir genetik benzerlik göstermiştir (Angiolillo et al., 1999).

Doğu Akdeniz Bölgesi'nden ve Batı Akdeniz Bölgesi'nden Türkiye, Yunanistan ve Orta Doğu'ya ait zeytin genotiplerinde kullanılan 5 AFLP primer kombinasyonundan 119 polimorfik bant elde edilmiştir. Aynı coğrafyada yer alan Türk ve Yunan zeytin genotipleri birbirinden farklı gruplarda yer alırken, Türk ve Suriye çeşitlerinin ise aynı genetik grupta yer aldığı dikkat çekmektedir (Owen et al., 2005).

İtalya'nın Sardunya Adası, Sicilya ve Umbria bölgelerini kapsayan çok geniş bir coğrafi bölgeden hem kültür çeşitleri ve hem de yabancı tipleri içeren 292 genotip ile yapılan çalışmada 5 AFLP primer kombinasyonundan primer başına ortalama 77.6 polimorfik bant elde edilmiştir (Baldoni et al., 2006). Benzer şekilde Tunus ve diğer bazı Akdeniz ölkelerinde yetişen 29 zeytin genotipinde aynı yöntemle yapılan çalışmada primer kombinasyonu başına 19 polimorfik bant

elde edilmiştir. En düşük genetik uzaklık değeri 0.26 ile Chemlali Sfax ve Zalmati çeşitleri arasında belirlenmiştir (Grati-Kamoun et al., 2006).

Dünyada en kuzeyde yer alan zeytin bölgelerinden biri olan Garda gölü bölgesinde yetiştirilen zeytin çeşitlerinin morfolojik özellikler, kimyasal analizler ve AFLP-DNA markörleri kombinasyonu ile karakterizasyonları araştırılmıştır. Kullanılan iki AFLP primerinden 92 polimorfik bant elde edilmiştir. Sonuçta bazı özel durumlarda daha etkili bir çeşit ayırımı yapabilmek için fenotipik özellikleri belirleyen DNA markörlerinin bulunmasının gerekliliği ortaya konulmuştur (Bassi et al., 2002).

Hırvatistan'da aynı ve farklı bölgelerde yetişen "Oblica" çeşidinde gözlenen morfolojik değişiklikleri, genetik açıdan incelemek için 9 AFLP primer kombinasyonu kullanılmış ve primer kombinasyonu başına 27.6 polimorfik bant tesbit edilmiştir. "Oblica" çeşidinde benzerlik değerleri 0.85 ve 0.99 arasında belirlenmiştir (Strikic et al., 2010).

Ülkemizde de AFLP markör tekniği kullanılarak, Çoruh Vadisi'nden seçilen 6 zeytin genotipinde (Tavlı Satı, Satı, Görvela, Saçaklı Otur, Butko, ve Otur) genetik çeşitlilik ve ilişkinin araştırıldığı çalışmada 6 AFLP primer kombinasyonundan 66 adet polimorfik bant elde edilmiş ve primer kombinasyonu başına ortalama olarak 11 polimorfik bant tesbit edilmiştir. En yüksek genetik benzerlik değeri 0.74 ile Tavlı Satı ve Satı genotipleri arasında, en düşük genetik benzerlik değeri ise 0.37 ile Görvela ve Otur genotipleri arasında belirlenmiştir (Ercişli et al., 2009).

Gökçeada zeytin çeşidi ile Ayvalık, Gemlik, Domat ve Memecik zeytin çeşitleri pomolojik ve genetik özellikleri bakımından karşılaştırılmıştır. Çeşitler arasındaki genetik ilişki AFLP yöntemi kullanılarak araştırılmış ve elde edilen dendrogramda zeytin çeşitleri iki ana gruba ayrılmıştır. İlk ana grupta Gemlik ve Memecik zeytin çeşitlerinin birbirlerine daha yakın akraba olarak görüldüğü, ikinci ana grupta ise Domat ve Ayvalık zeytin çeşitlerinin birbirlerine daha yakın olduğu belirlenmiştir. Her bir ana gruptaki çeşitler arasında da önemli derecede farklılıklar bulunduğu ifade edilmiştir (Ekinci, 2010). Aynı markör analizi ile 5 primerin kullanıldığı yerli ve yabancı 33 zeytin genotipinde 173 polimorfik bant elde edilmiştir. Genotipler arasında %52 oranında benzerlik tesbit edilmiştir (Şeker ve ark., 2008).

Meyve türlerinin genetik olarak tanımlanmasında yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biri de SSR markör analiz tekniğidir. Bu bağlamda Güney İtalya'da 6 farklı bölgede kültüre alınan 211 zeytin çeşidinde 11 SSR primerini kullanarak genetik karakterizasyon çalışması yapılmış ve toplamda 75 allel elde edilmiştir. Primer başına 6.8 allel tesbit edilmiştir. En yüksek genetik benzerlik değeri 0.94'den büyük bulunmuştur. Genetik benzerlik değeri 0.94'den büyük olan çeşitler sinonim olarak kabul edilmiştir. Sinonim olarak kabul edilen çeşitlerin yalnızca bir allel bakımından birbirinden farklılık gösterdiği saptanmıştır. Buna göre, Coratina-Racemo (Genetik benzerlik:1.00), Giarraffa-Pizzo di Corvo (Genetik benzerlik:0.941), Majorca-Manna (Genetik benzerlik:1.00), Nera di Gonnos-Tonda di Cagliari (Genetik benzerlik:1.00), Nera di Oliena-Terza piccola (Genetik benzerlik:1.00), Nera di Oliena-Paschixedda (Genetik benzerlik:0.941) genotiplerinin sinonim olduğu görülmüştür. SSR markör tekniğinin, zeytin germplasm koleksiyonu oluşturmak ve çeşit karakterizasyonu yapmak amacıyla veritabanı eldesi için elverişli bir teknik olduğu bildirilmiştir (Muzzalupo et al., 2009). Aynı bölgede 30 zeytin çeşidinde 16 SSR markörü ile yapılan başka bir çalışmada toplam 140 allel elde edilmiştir. Primer başına 4 ile 14 arasında değişmekle birlikte ortalama 8.8 allel belirlenmiştir. Genotipler arasında sinonim ya da homonim durumlarına rastlanmamış ve SSR tekniğinin genotipleri ayırtmada başarılı olduğu sonucuna ulaşılmıştır (Alba et al., 2009).

İtalya'nın Liguria lokasyonu orijinli 23 zeytin çeşidi ve 40 Akdeniz çeşidinin yer aldığı çalışmada, Liguria çeşitlerinin farklılığını ortaya koymak amacıyla SSR markör tekniği uygulanmıştır. Kümeleme analizi sonucunda İtalyan genotiplerinin çoğu aynı grupta yer alarak diğer Akdeniz ülkelerinin genotiplerinden ayrılmış olup Liguria bölgesi genotipleri arasında yüksek oranda genetik çeşitlilik belirlenmiştir (Bracci et al., 2009).

Sardunya Adası yabani ve kültür tiplerine ait 78 genotipte 13 SSR primeri ile yapılan çalışmada Erre et al. (2010), primer başına 10.46 polimorfik bant elde etmişlerdir. Polimorfizm oranı yüksek bulunmuş olup 5 genotip sinonim olarak değerlendirilmiştir.

Tunus'ta 20 zeytin genotipinde 10 SSR primeri kullanarak yapılan analiz sonucunda 43 allel elde edilmiştir. Primer başına düşen allel sayısı 4.3 olarak belirlenmiştir. En yüksek genetik uzaklık değeri Tounsi ve Kemlali çeşitleri arasında 0.85, en düşük genetik uzaklık değeri ise Chemlali Sfax ve Zalmati çeşitleri arasında 0.07 olarak tesbit edilmiştir. Bu bağlamda Tounsi ve Kemlali

çeşitlerinin agromorfolojik özellikleri ve kimyasal karakteristikleri birbirinden tamamen farklı iken, Chemlali Sfax ve Zalmati çeşitlerinin ise Tunus'un güneyine ait çeşitler olduğu ve çok benzer morfolojik ve kimyasal karakteristiklere sahip oldukları görülmüştür. Bu durumun doğal sonucu olarak Chemlali Sfax ve Zalmati çeşitlerinin ortak genetik orjinden geldikleri yorumu yapılmıştır (Rekik et al., 2008).

Hırvatistan zeytin gen bankasında yer alan 27 zeytin genotipinde 12 SSR primeri ile yapılan moleküler karakterizasyon çalışmasında 81 polimorfik bant tesbit edilmiştir. Bilica genotipinin Bjankera genotipi ile ve Buga genotipinin Črna genotipi ile sinonim olduğu, buna karşılık Buz'a ve Buga genotiplerinin ise homonim olduğu belirlenmiştir (Poljuha et al., 2008).

Frantoio çeşidinden kaynaklanan bir genetik kütüphaneden yaklaşık 60 adet klondan 52 adet mikrosatellit veya SSR izole edilmiş; çalışma sonunda 'Casaliva' çeşidinin 'Frantoio' çeşidinin bir mutasyonu olduğu, buna karşılık zaman zaman 'Leccino'nun benzeri olduğu ileri sürülen lokal 'Less'in genotipinin büyük ölçüde farklılık gösterdiği ifade edilmiştir (Marrazzo et al., 2002).

Zeytinde çeşit tanımlamada kullanılan SSR yönteminin farklı labortuarlarda standardizasyonunu belirleyebilmek amacıyla 17 zeytin genotipi 8 SSR primeri kullanılarak 4 farklı laboratuvarında test edilmiştir. Primer başına 3 ile 15 arasında değişmekle birlikte toplam 54 allel tesbit edilmiştir. Kullanılan primerlerden DCA3, DCA8, DCA11, DCA13, DCA14 ve DCA15'in tüm laboratuvarlarda yüksek derecede benzer sonuçlar verdiği, buna karşılık DCA4 ve DCA9 primerlerinin sonuçlarının benzerliğinin ise daha düşük olduğu bildirilmiştir (Doveri et al., 2008).

Mardin ve Şırnak illerinde seleksiyon ile belirlenmiş olan 47 zeytin genotipi ile 4 yerli ve 1 yabancı zeytin genotipinin SSR markör analizi ile genetik ilişkileri araştırılmış ve kullanılan 5 primerden 6-10 arasında değişmekle birlikte toplam 41 allel tesbit edilmiştir. Araştırma sonucunda bölgenin gen kaynakları bakımından zenginliğinin yüksek olduğuna dikkat çekilmiştir (Özkaya ve ark., 2007).

Adıyaman, Mardin, Şanlıurfa ve Şırnak illerinde yapılan seleksiyonda çeşit adayı olarak seçilmiş olan 38 genotip (20 sofralık ve 18 yağlık) ile 6 yerli ve 4 yabancı referans çeşit arasındaki genetik ilişki SSR tekniği ile araştırılmıştır. Uygulanan 10 primerden sofralık tiplerde 7-16, yağlık tiplerde ise 4-15 arasında

değişen sayıda allel tesbit edilmiştir. Kümeleme analizi sonucu oluşturulan dendrogramda hem sofralık ve hem de yağlık tiplerde 2 ana grubun ortaya çıktığı, yapılan AFLP analizi ile de bu bulgunun desteklendiği belirtilmiştir. Genotipler arasında homonim ve sinonim durumunun olmadığı ifade edilmiştir. Seçilen sofralık tiplerden Amak-1 ve Yedi kardeşler-3, yağlık tiplerden ise Zinnar-5 ile Yurteri-4 ve Gürmeşe-1 ile Gürmeşe-2 arasında yakın bir benzerlik saptanmıştır (Çakır, 2009).

Kilis ilinden seleksiyon ıslahı yolu ile elde edilen 13 tip ile 8 adet yerli standart ve 4 adet yabancı çeşit referans olmak üzere toplam 25 zeytin genotipi SSR markör tekniği kullanarak test edilmiştir. Genetik analizleri sonucunda toplam 30 allel elde edilmiş ve ortalama allel sayısı 6 olarak tespit edilmiştir. Genel olarak standart zeytin çeşitleri ile Kilis ilinden elde edilen zeytin çeşitleri arasında çok düşük bir benzerlik belirlenmiştir (Akansu, 2008).

Atatürk Bahçe Kùltürleri Merkez Araştırma Enstitüsü'nün koleksiyon bahçesinde yer alan zeytin çeşitleri ve Gemlik çeşidi ve klonlarından oluşan toplam 38 genotipin SSR markör analizi ile genetik ilişkilerinin belirlendiği. çalışmada 23 SSR primerinden 10 tanesinde polimorfizm görülmüş ve genotipler arasında 36 polimorfik bant elde edilmiştir. Genotipler arası genetik benzerlik Simple Matching yöntemi ile 0.41-1.00 sınırlarında ortaya çıkmıştır. Klon seleksiyonunun Gemlik çeşidinde yapılması nedeniyle klonların tamamının Gemlik ile aynı genetik yapıda olduğu belirlenmiştir (İpek ve ark., 2008).

Yerli ve yabancı orijinli 27 zeytin genotipinde SSR markör analizi uygulandığında Kargaburnu, Savrani ve Yamalak sarısı genotiplerinde SSR reaksiyonlarının çalışmadığı belirlenmiştir. Uygulanan 5 primerden toplamda 20 polimorfik bant elde edilmiş olup genotipler arasındaki farklılık % 33 olarak belirlenmiştir. Dendrogramda iki ana grup oluşmuş ve Karadeniz Bölgesi orijinli Satı, Otur ve Butko genotipleri aynı alt grupta yer almıştır (Şeker ve ark. 2008).

Moleküler markör teknikleri ayırım kapasitesi ve etkinlik bakımından farklılık göstermektedir. Herhangi bir teknikle belirlenemeyecek bir polimorfizm diğer bir teknikle ortaya çıkabilmektedir. Bu konuda, zeytinde RAPD, AFLP ve SSR markörlerinin ayırım kapasitesini ve bu üç tekniğin genetik akrabalığın ortaya çıkarılmasındaki etkinliğini belirleyebilmek amacıyla İtalya ve İspanya'da kültüre alınan 32 zeytin genotipinde analiz yapılmıştır. RAPD analizinde 21 adet primerden 109 polimorfik bant, AFLP analizinde 5 primer kombinasyonundan

261 polimorfik bant, SSR analizinde ise 8 primerden 61 polimorfik bant elde edilmiştir. Her bir teknik sonucu elde edilen verilerden genetik benzerlik matrisi ve dendrogram oluşturulduğunda her üç tekniğin de birbirlerine benzer sonuçlar verdikleri belirlenmiştir. Çalışmada benzerlik değerleri SSR için 0.36, RAPD için 0.56 ve AFLP için 0.68 olarak saptanmıştır. RAPD, AFLP ve SSR verilerini birleştirilerek elde edilen dendrogram ile her bir markör tekniğinden elde edilen dendrogramların benzerlik gösterdiği kaydedilmiştir. Ancak SSR tekniğinin diğer tekniklerden farklı olarak Frantoio ve Cellina çeşitlerinin ayrımını gerçekleştirebildiği ve bu durumun SSR tekniğinin ayırım gücünün daha yüksek olmasından kaynaklandığı bildirilmiştir (Belaj et al., 2003c). Ülkemizde yapılan benzer bir çalışmada farklı coğrafi bölge orijinli zeytin genotiplerinin SSR ve SRAP markör tekniğinden elde edilen verilerin birlikte değerlendirilmesi sonucunda genotiplerin akrabalık durumları ortaya konulmuştur (Işık et al., 2011).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

Bu çalışma 2010-2012 yıllarında Zeytincilik Araştırma İstasyonu moleküler genetik laboratuvarında yürütülmüştür. Zeytincilik Araştırma İstasyonu Müdürlüğü tarafından 1968 yılında Kemalpaşa/İzmir’de kurulan Türkiye zeytin çeşit varlığının tamamını kapsayan Ulusal Zeytin Koleksiyon bahçesinde yer alan tescilli 88 çeşit ve bu çeşitlerin bazılarında belirlenmiş tipleri de içeren toplam 96 zeytin genotipi çalışmanın materyalini oluşturmaktadır.

Çalışmada kullanılan zeytin genotiplerinin bazı özellikleri Çizelge 3.1’de yer almaktadır.

Çizelge 3.1. Zeytin genotiplerinin bazı özellikleri.

No	Genotip adı	Orijini	Meyve sayısı (adet/kg)	Meyve et oranı (%)	Meyve yağ oranı (%)
1	Trabzon yağlık	Trabzon	288	87.6	26.7
2	Samsun yağlık	Samsun	413	86.5	15.9
3	Görvele	Samsun	392	85.3	30.4
4	Marantelli 1	Trabzon	195	89.4	16.9
5	Marantelli 2*	Trabzon	197	89.0	19.8
6	Patos	Trabzon	366	84.0	26.8
7	Samsun kırmızı tuzlamalık	Samsun	186	89.2	23.7
8	Butko	Artvin	212	91.7	20.7
9	Otur	Artvin	174	88.6	32.9
10	Sinop no 5	Sinop	246	84.3	22.6
11	Sinop no 2	Sinop	253	86.7	29.3
12	Satı	Artvin	181	88.7	29.7
13	Samsun ufak tuzlamalık	Samsun	322	80.0	19.8
14	Sinop no 4	Sinop	241	88.2	20.6
15	Siyah salamuralık	Tekirdağ	392	90.2	33.0
16	Sinop no 6	Sinop	174	87.6	30.0
17	Sinop no 7	Sinop	214	89.3	23.6
18	Sinop no 1	Sinop	416	84.5	32.3
19	Samsun salamuralık	Samsun	174	87.3	21.3
20	Beyaz yağlık 1	Tekirdağ	224	85.2	25.6
21	Beyaz yağlık 2*	Tekirdağ	159	79.0	18.0
22	Çizmelik	Tekirdağ	189	89.8	22.6
23	Eşek zeytini	Tekirdağ	204	89.5	27.6
24	Erdek yağlık	Erdek	202	89.4	30.5
25	Edincik	Edincik	202	89.4	16.7

*Tescilli olmayan genotip

Çizelge 3.1.'in devamı. Zeytin genotiplerinin bazı özellikleri.

No	Genotip adı	Orijini	Meyve sayısı (adet/kg)	Meyve et oranı (%)	Meyve yağ oranı (%)
26	Eşek zeytini	Ödemiş	142	86.8	22.8
27	Gemlik	İzник	268	85.9	29.0
28	Karamürsel su	Karamürsel	141	87.1	18.6
29	Şam	İzник	277	85.3	15.5
30	Samanlı	İzник	188	84.5	20.8
31	Çelebi	İzник	140	87.0	20.4
32	Ağaç no 31	-	279	91.0	18.0
33	Büyük topak ulak	Tarsus	206	88.3	20.2
34	Sarı ulak	Tarsus	266	71.9	18.8
35	Küçük topak ulak	Tarsus	471	85.9	27.1
36	Çelebi	Silifke	288	87.7	14.9
37	Halhalı	Hatay	288	91.4	23.7
38	Sarı habesi	Hatay	340	85.5	24.7
39	Saurani	Hatay	338	86.6	29.2
40	Sayfi	Hatay	400	88.7	28.4
41	Karamani	Hatay	330	87.9	32.6
42	Elmacık	Hatay	265	86.1	29.6
43	Yağlık sarı zeytin	K.Maraş	320	90.3	24.7
44	Kilis yağlık	Kilis	566	82.3	31.8
45	Maraş no 7	K.Maraş	315	89.0	23.0
46	Nizip yağlık	Nizip	460	81.3	27.4
47	Kan çelevi	Nizip	163	88.9	16.9
48	Halhalı çelevi	Nizip	196	90.3	20.9
49	Hazma çelevi	Nizip	207	85.5	21.7
50	Yuvarlak halhalı	Nizip	195	88.8	18.7
51	Kalembezi	Nizip	450	84.3	31.5
52	Yağlık çelevi	Nizip	164	89.1	24.5
53	Yün çelevi	Nizip	156	83.4	20.4
54	Eğriburun	Nizip	388	86.1	20.8
55	Tespih çelevi	Nizip	231	88.0	20.9
56	Eğriburun	Tatayn	391	87.7	22.9
57	Yuvarlak çelevi	Tatayn	273	84.1	20.7
58	Hırhalı çelevi	Tatayn	164	79.1	21.5
59	İri yuvarlak	Tatayn	151	84.4	20.4
60	Yağ çelevi	Tatayn	226	84.6	21.1
61	Zoncuk	Derik	164	87.9	21.4
62	Halhalı 1	Derik	261	82.8	21.1
63	Halhalı 2*	Derik	195	89.8	14.0
64	Halhalı 3*	Derik	850	77.2	13.0
65	Hursuki	Derik	144	89.6	22.9
66	Belluti	Derik	187	80.5	22.9
67	Melkabazı	Derik	159	92.1	22.5

*Tescilli olmayan genotip

Çizelge 3.1.'in devamı. Zeytin genotiplerinin bazı özellikleri.

No	Genotip adı	Orijini	Meyve sayısı (adet/kg)	Meyve et oranı (%)	Meyve yağ oranı (%)
68	Mavı	Derik	137	92.4	23.5
69	Samsun tuzlamalık	Samsun	278	75.5	20.5
70	Ayvalık	Ayvalık	241	88.5	24.7
71	Hurma karaca	İzmir	277	85.0	31.0
72	Hurma kara	İzmir	287	15.1	30.4
73	Erkence	İzmir	329	86.2	25.4
74	Çilli	İzmir	204	89.0	20.6
75	İzmir sofralık	İzmir	133	87.5	20.2
76	Çakır	İzmir	393	86.1	19.4
77	Memeli	İzmir	216	88.6	21.3
78	Dilmit	Bodrum	302	84.6	24.7
79	Girit zeytini	Bodrum	1000	90.0	24.9
80	Tavşan yüreği	Milas	114	86.4	20.2
81	Ak zeytin	Milas	310	83.0	13.9
82	Çekişte	Ödemiş	185	85.2	26.9
83	Kara yaprak	Kuşadası	242	89.1	27.8
84	Yağ zeytini	Kuşadası	337	85.5	20.6
85	Yerli yağlık	Kuşadası	254	85.7	23.8
86	Aşyeli	Aydın	177	92.9	20.6
87	Taşarası	Aydın	225	87.2	23.9
88	Taşarası	Kuşadası	175	88.4	24.3
89	Memecik	Milas	229	87.2	28.6
90	Domat	Akhisar	142	87.7	20.6
91	Kiraz	Akhisar	242	87.7	19.8
92	Uslu	Akhisar	224	87.7	21.5
93	0*	-	207	88.0	18.0
94	A*	-	177	87.1	22.5
95	B*	-	208	89.0	18.7
96	L*	-	203	88.8	15.2

*Tescilli olmayan genotip

3.2. Yöntem

3.2.1. Yaprak örneklerinin toplanması

Zeytincilik Araştırma İstasyonu'nun Kemalpaşa/İzmir'de yer alan Ulusal Zeytin Koleksiyonu'ndaki 96 zeytin genotipinden yaprak örnekleri alınmıştır. Örnekler sürgün uçlarındaki en genç yapraklardan alınarak eppendorf tüplere konulmuş ve sıvı azot içerisinde laboratuvara taşınmıştır. DNA izolasyonu yapıncaya kadar -80 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.2. DNA izolasyonu

Yaprak örnekleri havan içerisinde sıvı azot yardımıyla ezilerek 2 ml'lik eppendorf tüplere aktarılmıştır. DNA izolasyonu Doyle and Doyle (1990) DNA izolasyon protokolü modifiye edilerek gerçekleştirilmiştir.

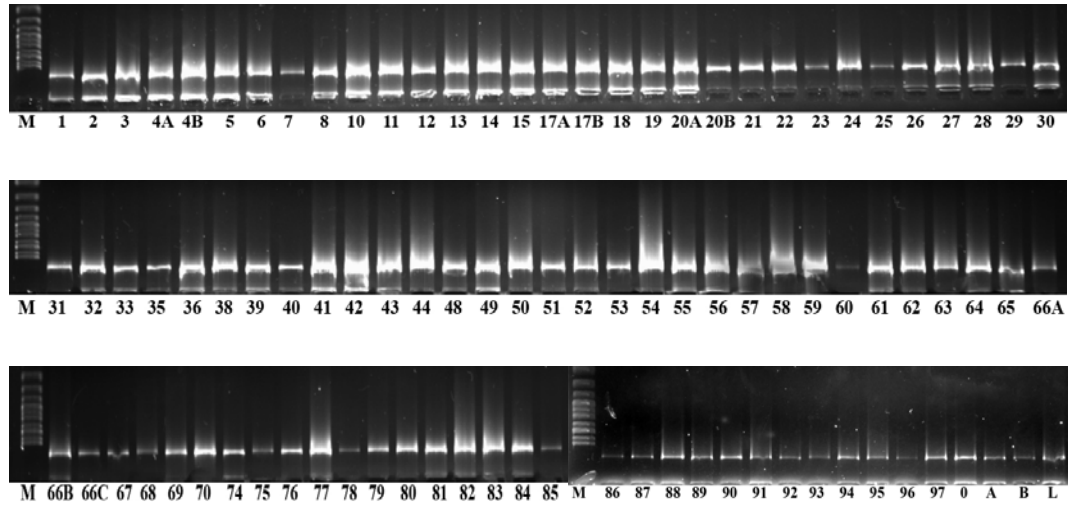
Bu yöntemde 0.2 g yaprak örneği eppendorf tüp içerisinde sıvı azot kullanılarak cam çubuk aracılığıyla ezilmiştir. 375 µl mikro-prep buffer ilave edilerek, matkap yardımıyla örnek ve bufferın karışması sağlanmıştır. Karışım üzerine 375 µl mikro-prep buffer ilave edilerek karıştırılmış ve 65°C'de 1 saat su banyosunda bekletilmiştir. Bu esnada eppendorf tüpler her 15 dakikada bir karıştırılmıştır. Su banyosundan çıkan örneklerin üzerine 750 µl fenol: kloroform: izoamilalkol (25:24:1) karışımından eklenmiş ve çok yavaş bir şekilde (DNA'nın zarar görmemesi için) karıştırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Örnekler 5000 rpm'de 15 dakika +4 °C'de santrifüjlenerek üst faz temiz bir eppendorf tüpe aktarılmıştır. Alınan üst fazın 2.5 katı miktarda -20 °C'de bulunan %100 etanol eppendorf tüpe ilave edilerek pellet oluşumu gözleninceye kadar yavaşça karıştırılmıştır. Örnekler 5000 rpm'de 5 dakika 4°C'de santrifüjlenerek üst faz dibe çöken pellet düşmeyecek şekilde uzaklaştırılmıştır. Pellet üzerine 500 µl - 20°C'de bekletilen 2 M Na-Ac/%70'lik etanol karışımından ilave edilerek pellet eppendorf tüp dibinden çıkıncaya kadar karıştırılmıştır. 5000 rpm'de 5 dakika 4°C'de santrifüjlenerek yine dibe çöken pellet düşmeyecek şekilde üst faz dökülmüştür. Son yıkama işlemi olarak 500 µl -20°C'de bekletilen %70'lik etanolden eklenmiş ve 5000 rpm'de 3 dakika +4°C'de santrifüjlenerek dipteki pellet düşmeyecek şekilde üst faz uzaklaştırılmıştır. Örnekler alkolün tamamen uzaklaştırılması için 1 gece boyunca oda sıcaklığında bekletilmiştir. Alkol tamamen uzaklaştıktan sonra 50 µl ultra pure (UP) su ilave edilerek, 65°C'de 1 saat süreyle her 15 dakikada bir karıştırılarak DNA pelletinin su içerisinde çözünmesi gerçekleştirilmiştir. İzolasyonu tamamlanan örnekler denemeler süresince +4°C'de saklanmıştır.

3.2.3. DNA saflığının belirlenmesi

Elde edilen DNA'nın saflığının belirlenmesi için UP su içerisinde çözdürülen örneklerden 2 µl alınmış, üzerine 8 µl UP su ve 2 µl brom fenol blue boyası eklenerek, 1x TAE tamponu içerisinde yer alan %1'lik agaroz jele her örnekten 12 µl alınarak kuyulara yükleme yapılmıştır. İlk kuyucuğa 2 µl 1 kb boyutunda moleküler ağırlık markörü (DNA ladder, Fermentas GeneRuler™) koyulmuştur. Elektroforez işlemi 60 volt uygulamasında 2 saat süre ile gerçekleştirilmiştir.

Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra jel boyama tankına alınarak, üzerine 300 µl UP su içerisinde 15 µl etidyum bromid (EtBr) boyası eklenmiştir. Boyama tankı çalkalayıcı üzerine konularak 30 dakika boyunca beklenmiştir. Bu esnada EtBr'in ışıktan etkilenmemesi için boyama tankının üzeri kapatılmıştır. 30 dakika sonunda EtBr içeren çözelti jellerden uzaklaştırılmış ve jeller EtBr kalıntısını uzaklaştırmak için 5 dakika süre boyunca saf su ile çalkalanmıştır.

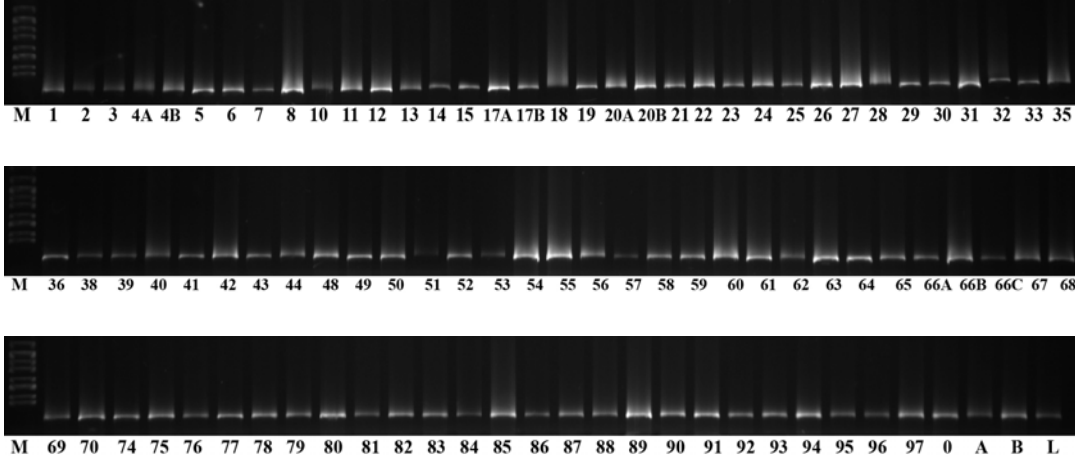
Boyama işlemi sonunda jeller G-box, SYNGENE jel görüntüleme sistemi kullanılarak ultraviyole ışık aracıyla görüntülenerek (Şekil 3.1) bilgisayara aktarılmıştır.



Şekil 3.1 Saflık analizi sonucunda elde edilen jel görüntüsü.

Saflık görüntüsü sonucunda örnek DNA'larında protein ve RNA kontaminasyonu tespit edildiğinden örneklere proteinaz K ve RNaz ilave edilerek 1 saat süresince 37°C'de inkübe edilmiş daha sonra 15 dakika 70°C'de bekletilerek enzim inaktivasyonu sağlanmıştır.

Örnekler daha sonra %1'lik agaroz jele yüklenerek görüntülenmiş, protein ve RNA'ların uzaklaştırıldığı görülmüştür (Şekil 3.2).



Şekil 3.2 Proteinaz K ve RNaz muamelesinden sonra saflık analizi sonucunda elde edilen jel görüntüsü.

DNA'ların miktarını ve kalitesini belirleyebilmek amacıyla Nanodrop 1000 (ND-1000, Thermo Co.) kullanılarak ölçüm yapılmıştır. 96 genotipe ait ölçümlenen DNA miktarları Çizelge 3.2'de yer almaktadır.

Çizelge 3.2. Zeytin genotiplerinin Nanodrop 1000 kullanılarak ölçülen DNA miktarları.

	Genotip Adı	Miktar(ng/µl)	260/280		Genotip Adı	Miktar(ng/µl)	260/280
1	Trabzon yağlık	533,6	2,0	49	Hamza çebebi	217,5	1,9
2	Samsun yağlık	434,2	1,9	50	Yuvarlak halhalı	864,1	1,8
3	Görvele	436,2	1,9	51	Kalembezi	767,9	1,8
4	Marantelli 1	503,5	1,9	52	Yağlık çebebi	478,6	2,0
5	Marantelli 2	496,4	2,0	53	Yün çebebi	914,0	1,7
6	Pastos	490,3	2,0	54	Eğriburun	393,1	1,9
7	Samsun kırmızı tuzlamalık	523,5	2,0	55	Tespih çebebi	474,3	2,0
8	Butko	366,2	2,0	56	Eğriburun	555,7	1,9
9	Otur	655,4	2,0	57	Yuvarlak çebebi	634,2	1,8
10	Sinop no 5	483,3	1,9	58	Hırhalı çebebi	412,0	1,9
11	Sinop no 2	567,2	1,9	59	İri yuvarlak	633,8	1,9
12	Satı	666,1	2,0	60	Yağ çebebi	595,1	2,0
13	Samsun ufak tuzlamalık	427,4	1,9	61	Zoncuk	904,9	1,9
14	Sinop no 4	264,2	1,9	62	Halhalı 1	439,2	1,9
15	Siyah salamuralık	267,0	2,4	63	Halhalı 2	567,0	1,9
16	Sinop no 6	471,2	2,0	64	Halhalı 3	266,6	1,9
17	Sinop no 7	470,5	1,9	65	Hursuki	589,7	2,0
18	Sinop no 1	519,7	1,9	66	Belluti	767,9	2,0
19	Samsun salamuralık	454,4	2,0	67	Melkabazı	666,9	2,0
20	Beyaz yağlık 1	513,2	2,0	68	Mavı	625,3	1,9
21	Beyaz yağlık 2	741,1	1,9	69	Samsun tuzlamalık	385,9	1,9
22	Çizmelik	794,0	1,9	70	Ayvalık yağlık	713,2	1,9
23	Eşek zeytini	766,3	1,9	71	Hurma karaca	442,8	1,9
24	Erdek yağlık	382,6	2,0	72	Hurma kara	469,5	2,0
25	Edincik	615,3	1,9	73	Erkençe	491,9	1,9
26	Eşek zeytini	584,4	2,0	74	Çilli	378,9	1,9
27	Gemlik	561,1	2,0	75	İzmir sofralık	585,5	1,9
28	Karamürsel su	877,7	1,9	76	Çakır	495,6	1,9
29	Şam	533,7	1,9	77	Memeli	460,3	1,9
30	Samanlı	414,7	1,9	78	Dilmit	721,3	1,9
31	Çelebi	594,2	2,0	79	Girit zeytini	1043,1	2,0
32	Ağaç no 31	686,6	2,0	80	Tavşan yüreği	1026,9	2,0
33	Büyük topak ulak	475,7	2,0	81	Ak zeytin	293,5	1,9
34	Sarı ulak	635,6	1,9	82	Çekişte	725,2	1,9
35	Küçük topak ulak	788,6	1,9	83	Kara yaprak	647,9	1,9
36	Çelebi	557,4	2,0	84	Yağ zeytini	772,9	1,9
37	Halhalı	598,5	1,9	85	Yerli yağlık	627,2	1,9
38	Sarı habeşi	547,5	1,9	86	Aşı yeli	797,7	1,9
39	Saurani	611,5	2,1	87	Taşarası	437,7	1,9
40	Sayfi	371,5	1,9	88	Taşarası	373,4	1,9
41	Karamani	803,6	1,9	89	Memecik	900,5	1,9
42	Elmacık	340,2	2,0	90	Domat	436,9	1,9
43	Yağlık sarı zeytin	434,6	1,9	91	Kiraz	435,9	1,9
44	Kilis yağlık	409,3	1,8	92	Uslu	897,7	1,9
45	Maraş no 7	547,1	2,0	93	0	595,6	1,9
46	Nizip yağlık	471,2	2,0	94	A	698,7	1,9
47	Kan çebebi	183,7	1,8	95	B	693,6	1,9
48	Halhalı Çelebi	381,9	1,9	96	L	563,1	1,9

3.2.4. Moleküler markör teknikleri

3.2.4.1. RAPD markör analizi

3.2.4.1.1. RAPD markör analizi için DNA seyreltme oranının belirlenmesi

RAPD markör analizinde kullanılacak DNA seyreltmesini belirlemek amacıyla 1/100, 1/200, 1/300 ve 1/400 DNA seyreltmelerinde OPI15 ve OPN13 primerleri ile PCR yapılmış ve en iyi sonuç 1/400 DNA seyreltmesinde elde edilmiştir. RAPD primerleri ile yapılan tüm PCR analizlerinde 1/400 DNA seyreltmesi kullanılmıştır.

3.2.4.1.2. RAPD markör analizi PCR uygulamaları

RAPD markör analizinde çalışan ve polimorfizm gösteren primerleri belirleyebilmek amacıyla 4 adet örnek üzerinde 10 bazlık 300 adet primer OPA01-20, OPB01-20, OPC01-20, OPD01-20, OPE01-20, OPF01-20, OPG01-20, OPH01-20, OPI01-20, OPJ01-20, OPM01-20, OPP01-20, OPQ01-20, OPR01-20, OPS01-20 (Operon Technologies, USA) kullanılmıştır. Polimorfizm gösteren primerlerin belirlenmesi için 21, 22, 23 ve 24 no'lu genotipler kullanılarak 1/400 DNA seyreltmesinde PCR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. PCR reaksiyonunda kullanılan bileşenler ve miktarları ile reaksiyon için uygulanan sıcaklık döngüleri sırasıyla Çizelge 3.3 ve 3.4'te yer almaktadır.

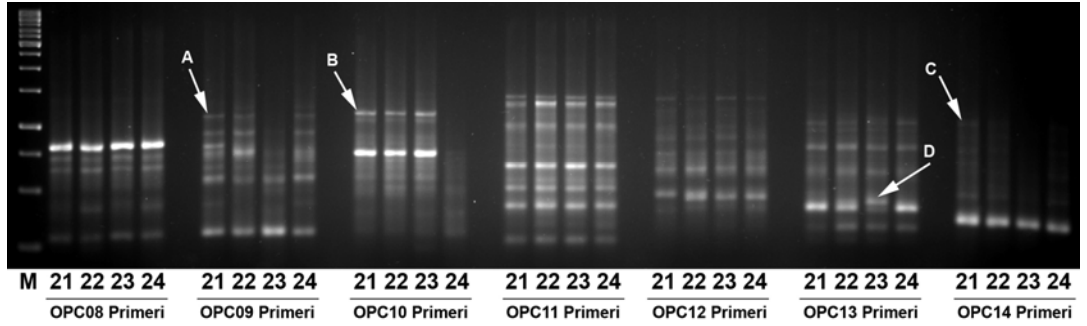
Çizelge 3.3. RAPD analizinde uygulanan PCR kokteyl bileşenleri ve miktarları.

Bileşen	Miktar (μ l)
10x buffer	1,5 μ l
MgCl ₂ (20 mM)	1,2 μ l
dNTP (1 mM)	2,0 μ l
Primer (10 pM)	1,0 μ l
ddH ₂ O	4,1 μ l
Enzim (Taq polimeraz)(1U/ μ l)	0,2 μ l
DNA (5ng/ μ l)	5,0 μ l
Toplam hacim	15,0 μ l

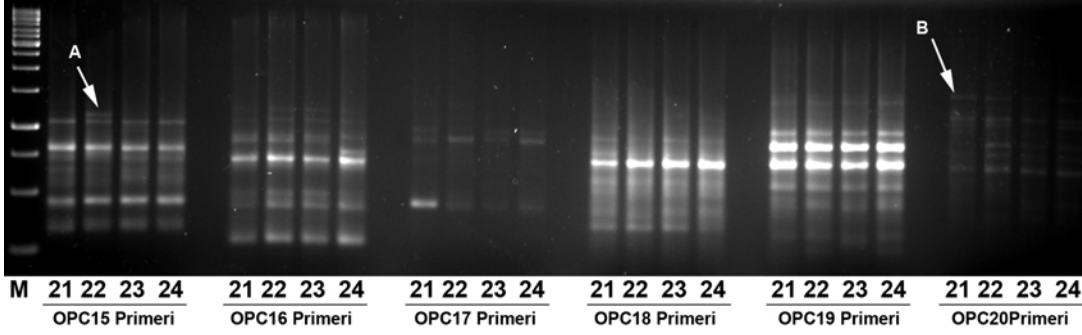
Çizelge 3.4. RAPD analizi için PCR işleminde uygulanan sıcaklık döngüleri.

	Sıcaklık	Süre
1	94 °C	30 s
2	94 °C	25 s
3	35 °C	45 s
4	72 °C	1 dakika
5	2'den başlayarak 4'e kadar olan basamaklar 35 kez tekrarlanır.	
6	72 °C	5 dakika
7	+4 °C	∞
8	Son	

PCR sonucunda örnekler %2'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülerek, EtBr ile boyanmış ve jel görüntüleme sisteminde (G-box, SYNGENE) görüntülenmiştir. Polimorfik ve skorlanabilir bant veren primerler belirlenmiştir. Çalışma sonucunda elde edilen jel görüntülerinden bazıları Şekil 3.3 ve 3.4'da yer almaktadır.



Şekil 3.3. OPC08-OPC14 RAPD primerleri ile yapılan PCR analizi sonucunda elde edilen jel görüntüsü (Oklar polimorfik bantları göstermektedir).



Şekil 3.4. OPC15-OPC20 RAPD primerleri ile yapılan PCR analizi sonucunda elde edilen jel görüntüsü (Oklar polimorfik bantları göstermektedir).

Polimorfik ve skorlanabilir bant veren primerler belirlendikten sonra tüm polimorfizm gösteren primerler ile 96 genotipte 1/400 DNA seyreltmesi ve 10 pM primer konsantrasyonunda PCR yapılmış, %2'lik agaroz jel elektroforezinden sonra EtBr ile boyanmış ve jel görüntüleme sisteminde (G-box, SYNGENE) görüntülenmiştir.

3.2.4.2. AFLP markör analizi

AFLP analizi için 96 genotipe ait tüm DNA'lar 40 ng/µl olacak şekilde seyreltilmiştir.

3.2.4.2.1. AFLP markör analizi PCR uygulamaları

AFLP analizi için Li-Cor IRDye Fluorescent AFLP Kit (Katalog Numarası: 830-06197 AFLP 2-DYE Selective Amplification Kit) kullanılmıştır. 96 genotipe ait 40 ng/µl oranında seyreltilmiş DNA, Li-Cor IRDye Fluorescent AFLP Kit protokolü referans alınarak reaksiyona tabi tutulmuş ve elde edilen ampliconlar, Li-Cor 4300s DNA Analyzer cihazı kullanılarak ayrımlanmıştır.

3.2.4.2.2. Genomik DNA'nın restriksiyon enzimleri ile kesilmesi

Çalışmada yer alan 96 genotipe ait 40 ng/µl oranında seyreltilmiş DNA, *EcoRI/MseI* restriksiyon enzimleri kullanılarak kesilmiştir. Reaksiyonda kullanılan bileşenler ve miktarları Çizelge 3.5'te yer almaktadır. Reaksiyon bileşeni hazırlandıktan sonra sıcaklık döngüleri 37°C'de 2 saat, 70°C'de 15 dakika olacak şekilde programlanmış Thermal Cycler cihazında reaksiyon gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.5. Restriksiyon enzimi kesim kokteyli bileşenleri ve miktarları.

Bileşen	Miktar (µl)
5x reaksiyon buffer	2,5 µl
Kalıp DNA (40 ng/ µl)	5,0 µl
<i>EcoRI/MseI</i> enzim karışımı	1,0 µl
ddH ₂ O	4,0 µl
Toplam hacim	12,5 µl

3.2.4.2.3. Adaptörlerin bağlanması

Restriksiyon enzimleri ile kesim sonrasında adaptörlerin bağlanması amacıyla kit içerisinde yer alan adaptör karışımının eklenmesi için yeni bir kokteyl hazırlanmıştır. Adaptörlerin bağlanması amacıyla hazırlanan reaksiyon bileşimi Çizelge 3.6'da yer almaktadır.

Çizelge 3.6. Adaptörlerin bağlanması için hazırlanan kokteyl bileşenleri ve miktarları.

Bileşen	Miktar (µl)
1:10 Seyreltilmiş adaptör karışımı	12,0 µl
T4 DNA ligaz enzimi	0,5 µl
Toplam birleşik hacim	25,0 µl

Elde edilen kokteyl, reaksiyonun gerçekleşmesi için 2 saat süresince 20 °C'de bekletilmiştir. Reaksiyon gerçekleştikten sonra karışım TE (Tris-EDTA) buffer ile 1:10 oranında seyreltilmiştir.

3.2.4.2.4. Pre-amplifikasyonun gerçekleştirilmesi

TE (Tris-EDTA) buffer ile 1:10 oranında seyreltilen karışım pre-amplifikasyon işlemine tabi tutulmuştur. Pre-amplifikasyon işlemi için kit içerisinde yer almayan *Taq* polimeraz enzimi (5 units/µl, Roche, katalog no: 1146173) ile buffer (10X, Roche, katalog no: 1271318) kullanılmıştır. Pre-amplifikasyon için kullanılan reaksiyon bileşenleri ve miktarları Çizelge 3.7'de yer almaktadır.

Çizelge 3.7. Pre-amplifikasyonda kullanılan kokteyl bileşenleri ve miktarları.

Bileşen	Miktar (μ l)
Adaptör karışımı (1:10 seyreltilmiş)	2.5 μ l
AFLP [®] Pre-amp primer karışımı	20.0 μ l
PCR reaction buffer (10X) (Roche, katalog no: 1271318)	2.5 μ l
<i>Taq</i> DNA polymerase (5 units/ μ l)(Roche, katalog no: 1146173)	0.5 μ l
Toplam hacim	25.5 μ l

Pre-amplifikasyonun gerçekleşmesi için uygulanan PCR döngüleri Çizelge 3.8’de görülmektedir.

Çizelge 3.8. Uygulanan PCR sıcaklık döngüleri.

	Sıcaklık	Süre
1	94 °C	30 s
2	56°C	1 dakika
3	72°C	1 dakika
4	1’den başlayarak 3’e kadar olan basamaklar 20 kez tekrarlanır.	
5	+4°C	∞

Pre-amplifikasyon sonrasında elde edilen karışım ddH₂O kullanılarak 1:40 oranında seyreltilmiştir.

3.2.4.2.5. Selektif amplifikasyonun gerçekleştirilmesi

Selektif amplifikasyon için 26 primer kombinasyonu (Çizelge 3.9) kullanılmıştır.

Çizelge 3.9. Selektif amplifikasyon primer kombinasyonları.

Primer kombinasyonu	Primer kombinasyonu
MCAA-EAAC	MCAC-EACA
MCAA-EACG	MCAC-EACT
MCAA-EACA	MCAC-EACC
MCAA-EAGC	MCAC-EACG
MCAA-EAGG	MCAG-EACC
MCAC-EAAG	MCAG-EAGG
MCAC-EAGC	MCAT-EACG
MCAC-EACA	MCAT-EAAG
MCAC-EACG	MCAT-EACT
MCAG-EAAC	MCAT-EACC
MCAG-EACG	MCTA-EAAC
MCAG-EAAG	MCTA-EACT
MCAG-EACT	MCTA-EAAG

Bir adet *MseI* primeri ile bir adet IRDye 700 veya 800 işaretli *EcoRI* primerleri kullanılarak PCR kokteyli hazırlanmıştır. PCR kokteyl bileşenleri ve miktarları Çizelge 3.10’da ve selektif amplifikasyonda uygulanan PCR sıcaklık döngüleri Çizelge 3.11’de yer almaktadır.

Çizelge 3.10. Selektif amplifikasyonda kullanılan kokteyl bileşenleri ve miktarları.

Bileşen	Miktar
Taq DNA polimeraz working mix	6.0 µl
1:40 seyreltilmiş pre-amp DNA	2.0 µl
dNTPs içeren <i>MseI</i> primeri	2.0 µl
IRDye 700 veya 800 işaretli <i>EcoRI</i> primer A	0.5 µl
Toplam hacim	10.5 µl

Çizelge 3.11. AFLP analizi için PCR işleminde uygulanan sıcaklık döngüleri.

	Sıcaklık	Süre
1	94 °C	30 s
2	65 °C	30 s
3	72°C	1 dakika
4	94°C	30 s
5	65°C (her basamakta sıcaklık 0.7°C azalmaktadır).	30 s
6	72°C	1 dakika
7	4'den başlayarak 6'ya kadar olan basamaklar 12 kez tekrarlanır.	
8	94°C	30 s
9	56°C	30 s
10	72°C	1 dakika
11	8'den başlayarak 10'a kadar olan basamaklar 23 kez tekrarlanır.	
12	+4°C	∞

Reaksiyon gerçekleştikten sonra poliakrilamid jele yükleme yapılmadan önce tüm örnekler kit içerisinde yer alan 5 µl 'blue stop solution'dan ilave edilmiştir.

3.2.4.2.6. Jel elektroforezi ve jellerin görüntülenmesi

Selektif amplifikasyon sonrasında örnekler Li-Cor 4300s DNA Analyzer cihazı kullanılarak bilgisayarda eş zamanlı olarak görüntülenmiştir. Poliakrilamid jel elektroforezi için %8'lik akrilamid kullanılmıştır (Çizelge 3.12).

Çizelge 3.12. Akrilamid çözeltisinde (%8'lik) yer alan bileşenler ve miktarları.

Bileşen	Miktar
Üre	8.4 g
10x TBE	2.0 ml
% 40 akrilamid	4.0 ml
ddH ₂ O	Son hacim 20 ml'ye tamamlanır

Kuyucukların oluşması için 48'lik tarak kullanılarak elde edilen boşluklara her bir örnekten 1 µl yükleme yapılmıştır. PCR örnekleri 1500 V'da 3 saat süresince yürütülmüştür. Tampon çözelti olarak 1x TBE çözeltisi kullanılmıştır.

3.2.4.3. SSR markör analizi

SSR markör analizi için 96 genotipe ait DNA'lar, 20 ng/µl olacak şekilde seyreltilmiştir. SSR analizi için Carriero et al. (2002), Muzzolupo et al. (2006), Sefc et al. (2000), Rekik et al. (2008), makaleleri referans alınarak çalışmada kullanılacak SSR primerleri belirlenmiştir. SSR markör analizinde kullanılan kokteyl bileşen ve miktarları ile uygulanan sıcaklık döngüleri Çizelge 3.13 ve 3.14'de verilmektedir.

Çizelge 3.13. SSR markör analizinde kullanılan bileşenler ve miktarları.

Bileşen	Miktar (µl)
Buffer 5x	4.00 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1.60 µl
dNTPs(25 mM)	0.16 µl
Primer F _{tail}	0.20 µl
Primer R	0.80 µl
M13 (10 mM)	0.80 µl
H ₂ O	7.40 µl
GoTaq polimeraz(5U/µl) (Promega, M830B)	0.04 µl

Çizelge 3.14. SSR markör analizinde uygulanan sıcaklık döngüleri ve süreleri.

	Sıcaklık	Süre
1	94°C	5 dakika
2	94°C	45 s
3	65°C -51°C (-0.5/s)	45 s
4	72°C	1 dakika
5	2'den başlayarak 4'e kadar olan basamaklar 20 kez tekrarlanır.	
6	94°C	45
7	T _{bağlanma} °C	45 s
8	72°C	1 dakika
9	6'dan başlayarak 8'e kadar olan basamaklar 24 kez tekrarlanır.	
10	72°C	5 dakika
11	+4°C	∞

SSR markör analizinde, literatürden tespit edilen 27 adet SSR primerinden (Çizelge 3.15), forward primerlere universal M13 primer baz dizisi (5'-CACGACGTTGTAACGAC-3') 5'-3' yönünde ligaz enzimi kullanılarak eklenmiş ve böylelikle IRdye 700 ve 800 işaretli M13 kullanılarak, poliakrilamid jel elektrofezinde 700 nm ve 800 nm dalga boyunda görüntüleme yapılmıştır.

Çizelge 3.15. SSR markör analizinde kullanılan forward ve reverse primer ile tekrarlayan dizi ve sayıları.

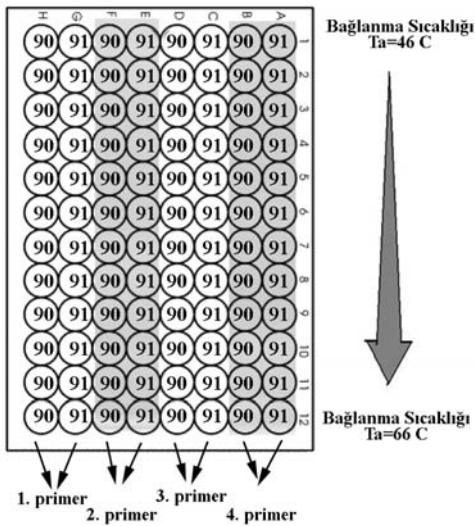
Primer No	Primer Adı	Tekrarlayan dizi ve sayısı	Primer Forward (5'-3') M13 işaretli	Primer Reverse (5'-3')
1	DCA1	(GA) ₂₂	CACGACGTTGTAAAACGACCCTCTG AAAATCTACACTCACATCC	ATGAACAGAAAG AAGTGAACAATGC
2	DCA3	(GA) ₁₉	CACGACGTTGTAAAACGACCCCAA GCGGAGGTGTATATTGTTAC	TGCTTTTGTCTGTG TTGAGATGTTG
3	DCA5	(GA) ₁₅	CACGACGTTGTAAAACGACAACAA ATCCCATACGAAGTCC	CGTGTTGCTGTGA AGAAAATCG
4	DCA7	(AG) ₁₉	CACGACGTTGTAAAACGACGGACA TAAAACATAGAGTGCTGGGG	AGGGTAGTCCAAC TGCTAATAGACG
5	DCA9	(GA) ₂₃	CACGACGTTGTAAAACGACAATCA AAGTCTTCCTTCTCATTTTCG	GATCCTTCCAAAA GTATAACCTCTC
6	DCA10	(TA) ₁₄ (GA) ₁₇	CACGACGTTGTAAAACGACCGTGA CCACCTAAATCCGCCCC	CTGTCCAGAGCTA AAGGTTTCG
7	DCA11	(GA) ₂₆ (GGGA) ₄	CACGACGTTGTAAAACGACGATCA AACTACTGCACGAGAGAG	TTGTCTCAGTGAA CCCTTAAACC
8	DCA13	(CA) ₁₅	CACGACGTTGTAAAACGACGATCA GATTAATGAAGATTTGGG	AACTGAACCTGTG TATCTTGCATCC
9	DCA14	(CA) ₁₈ A ₆ (TAA) ₇	CACGACGTTGTAAAACGACAATTTT TTAATGCACTATAATTTAC	TTGAGGTCTCTAT ATCTCCCAGGGG
10	DCA15	(CA) ₃ G(AC) ₁₄	CACGACGTTGTAAAACGACGATCTT GTCTGTATATCCACAC	TATACCTTTTCCA TCTTGACGC
11	DCA18	(CA) ₄ CT (CA) ₃ (GA) ₁₉	CACGACGTTGTAAAACGACAAGAA AGAAAAAGGCAGAATTAAGC	GTTTTCGTCTCTCT ACATAAGTGAC
12	GAPU11E 17	(CT) ₂ (TT) (CT) ₇	CACGACGTTGTAAAACGACCGCGTT ACCATACCTTAGCC	TTGAATCTGACGT GGATGGA
13	GAPU14	(CT) ₂ C(CT) ₅	CACGACGTTGTAAAACGACCACGC CAAGTCACTTTTCAA	CCCAGTAGCATGT TGTGAGC
14	GAPU19	(CCT) ₉	CACGACGTTGTAAAACGACGATCA GTGTACTACGGTTC	TCTGTCACAACCTG CGGTA
15	GAPU45	(AG) ₇	CACGACGTTGTAAAACGACATCGG GAGGGATGTGATGTA	CATCGCATCGCCT GTAAATA
16	GAPU59	(CT) ₉	CACGACGTTGTAAAACGACCCCTGC TTTGGTCTTGCTAA	CAAAGGTGCACTT TCTCTCG
17	GAPU62	(CT) ₄	CACGACGTTGTAAAACGACGATCA CGAATCCCCAAATAA	TGCGTTCCTGTAT AATTGCATC
18	GAPU71A	(AG) ₁₀	CACGACGTTGTAAAACGACGATCAT TTAAAATATTAGAGAGAGAGA	TCCATCCATGCTG AACTT
19	GAPU71B	GA(AG) ₆ (AAG) ₈	CACGACGTTGTAAAACGACGATCA AAGGAAGAAGGGGATAAA	ACAACAAATCCGT ACGCTTG
20	GAPU72	(TC) ₅ C(CT) ₄	CACGACGTTGTAAAACGACGAGGC TTTTTAATCCGAGCA	AAAAAGAGGGGA GGAGAGAG

Çizelge 3.15'in devamı. SSR markör analizinde kullanılan forward ve reverse primer ile tekrarlayan dizi ve sayıları.

21	GAPU82	(AG) ₅ TC (AG) ₃	CACGACGTTGTAAAACGACTGAATC AACCCGTCAATAAGG	TGCTATTTGCACA TCATTGTTT
22	GAPU89	(AG) ₁₆ (G) ₃ (GA) ₉	CACGACGTTGTAAAACGACGATCAT TCCACACACGAGAG	AACACATGCCCAC AAACTGA
23	GAPU90	(CT) ₈ GTCT	CACGACGTTGTAAAACGACGCTGA GCAGCGAAAAATGAT	GCGACATATCTCT ATGAGCAAGAA
24	GAPU92	(CT) ₄ ATCT G (TC) ₆	CACGACGTTGTAAAACGACATTGA GCGGCTCCTCAGTTA	TGCAACAAGCTAT AACGCAAA
25	GAPU101	(GA) ₈ (G) ₃ (AG) ₃	CACGACGTTGTAAAACGACCATGA AAGGAGGGGGACATA	GGCACTTGTGTG CAGATTG
26	GAPU103 A	(TC) ₂₆	CACGACGTTGTAAAACGACTGAATT TAACTTTAAACCCACACA	GCATCGCTCGATT TTTATCC
27	GAPU108	(GT) ₅ -(GA) ₅ - (GA) ₄	CACGACGTTGTAAAACGACGATCCT TAGAGGATTCAATGAGAA	GCAAGTCCACCAT CTTCAGAC

3.2.4.3.1. SSR primerlerinin bağlanma sıcaklığının belirlenmesi

SSR primerlerinin bağlanma sıcaklıklarını belirleyebilmek amacıyla Gradient PCR çalışması yapılmıştır. Bunun için 90 ve 91 no'lu genotipler kullanılarak tüm primerler için 46°C ile 66°C arasında deneme yürütülmüştür (Şekil 3.5). Aynı anda 4 farklı primerin bağlanma sıcaklığının tespit edilebilmesi için 2 adet örnekte çalışma gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.5. SSR primerlerinin bağlanma sıcaklığını belirlemek amacıyla yapılan gradient PCR çalışması gösterimi.

Primer bağlanma sıcaklıkları tespit edildikten sonra, polimorfik bant profili gösteren primerleri belirlemek amacıyla 21, 22, 23, 24 no'lu genotipler ile 27 adet SSR primerinde deneme yapılmıştır. Bu primerlerden amplifikasyon gerçekleşen ve polimorfizm gösteren primerler seçilerek 96 genotipe uygulanmıştır.

3.2.4.3.2. Jel elektroforezi ve jellerin görüntülenmesi

Amplifikasyon ürünleri, Li-Cor 4300s DNA Analyzer cihazı kullanılarak bilgisayarda eş zamanlı olarak görüntülenmiştir. Poliakrilamid jel elektroforezi için %8'lik akrilamid (Çizelge 3.12) kullanılmıştır. Kuyucukların oluşması için 48'lik tarak kullanılarak elde edilen boşluklara her bir örnekten 1 µl yükleme yapılmıştır. PCR örnekleri 1500V'da 3 saat süresince yürütülmüştür. Tampon çözelti olarak 1× TBE çözeltisi kullanılmıştır.

3.2.4.3.3. İstatistiksel analizler ve verilerin toplanması

Değerlendirme, denemede kullanılan RAPD, AFLP ve SSR markör teknikleri için ayrı ayrı elde edilen veriler ve üç tekniğin verilerinin birleştirilmesine dayanmaktadır. Buna göre, 96 genotip ile yapılan çalışma sonucunda elde edilen polimorfik DNA bantları "1" (DNA bantı var) ve "0" (DNA bantı yok) olacak şekilde Microsoft Excel çizelgesine yazılmış ve veri matrisi oluşturulmuştur. JMP Paket programı (SAS, 1995) kullanılarak cluster (kümeleme) analizi sonucunda dendrogram elde edilmiştir.

PHYLIP 3.67 (Felsenstein 2007) paket programı kullanılarak gen frekansları ile çeşitler arasındaki genetik uzaklık hesaplanmıştır. Elde edilen matris Nei'nin (Nei, 1978) D_A genetik uzaklığına göre popülasyonların birbirlerine olan genetik uzaklık değerlerini içermektedir.

Çalışmada her bir primer için PIC (polymorphic information content) değerlerini hesaplamak amacıyla; $PIC = 1 - \sum (P_{ij})^2$ (Botstein et al., 1980) denklemi kullanılmıştır. Bu denklemde P_{ij} , her bir lokus için j'ninci popülasyondaki i'ninci allelin frekansıdır. Hesaplamalarda Microsoft Excel programı kullanılmıştır.

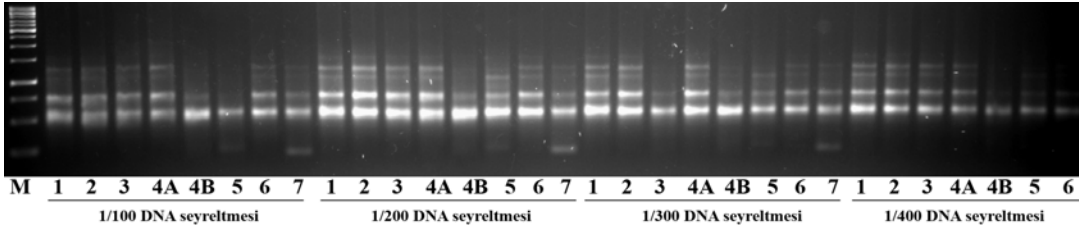
4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Ülkemizin en önemli tarımsal ürünlerinden biri olan zeytinde çeşitler arasındaki genetik ilişkilerin DNA düzeyinde net bir şekilde ortaya konulması amacıyla yürütülen bu çalışmada zeytin genomunun farklı kısımlarını temsil eden farklı markör teknikleri uygulanarak çok sayıda markör elde edilmiş ve istatistiksel analizler yapılarak çeşitler arasındaki genetik ilişki ortaya çıkarılmıştır. Uygulanan markör teknikleri ile elde edilen bulgular aşağıda ayrıntılı bir şekilde yer almaktadır.

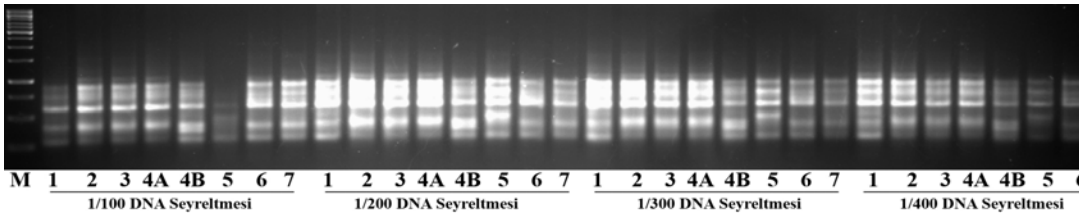
4.1. RAPD markör analizi

4.1.1. RAPD markör analizi için DNA seyreltme oranının belirlenmesi

RAPD markör analizinde kullanılacak DNA seyreltmesini belirlemek amacıyla 1/100, 1/200, 1/300 ve 1/400 DNA seyreltmelerinde OPI15 ve OPN13 primerleri ile PCR yapılmış ve en iyi sonuç 1/400 DNA seyreltmesinde elde edilmiştir (Şekil 4.1 ve Şekil 4.2). RAPD primerleri ile yapılan tüm PCR analizlerinde 1/400 DNA seyreltmesi kullanılmıştır.



Şekil 4.1. OPI15 primeri ile 1/100, 1/200, 1/300 ve 1/400 DNA seyreltmelerinde yapılan PCR sonucunda elde edilen jel görüntüsü.



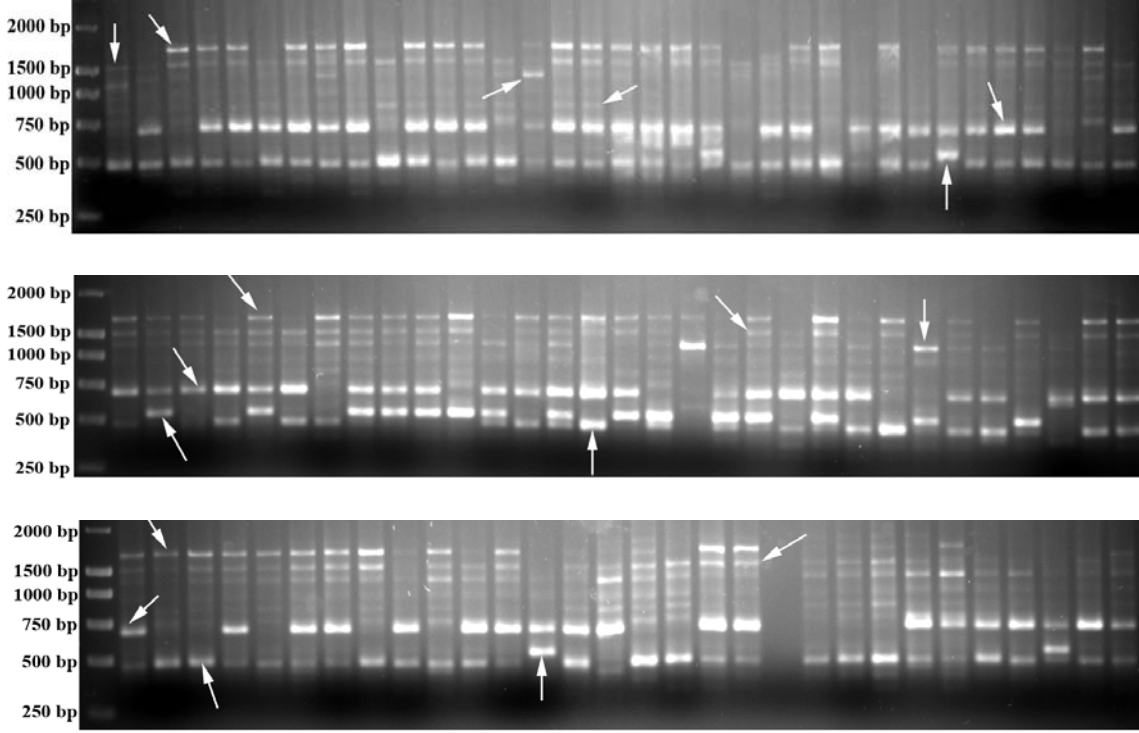
Şekil 4.2. OPN13 primeri ile 1/100, 1/200, 1/300 ve 1/400 DNA seyreltmelerinde yapılan PCR sonucunda elde edilen jel görüntüsü.

RAPD markör analizi sonucunda polimorfizm gösteren 52 RAPD primerinden toplam 215 adet polimorfik bant elde edilmiştir (Çizelge 4.1). Her bir primerle yapılan PCR sonucunda elde edilen polimorfik bant sayısı 1 ile 10 arasında değişmektedir. En fazla polimorfik bant (10 polimorfik bant) OPA12 ve OPC15 primerlerinde tesbit edilmiştir. En az polimorfik bant (1 polimorfik bant) veren primerler ise OPA03, OPA16, OPA20, OPB16, OPE01 ve OPE16 olarak belirlenmiştir. Primer başına düşen ortalama polimorfik bant sayısı 4'tür.

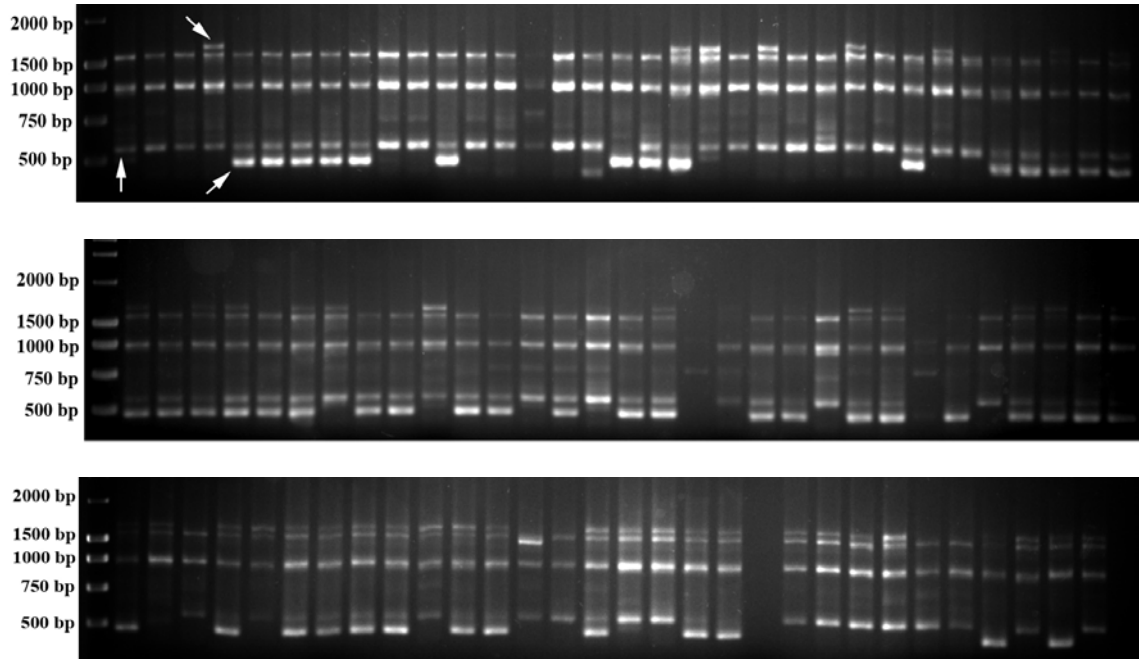
Çizelge 4.1. Kullanılan RAPD primerleri ve polimorfik bant sayıları.

No	Primer	Polimorfik bant sayısı	PIC	No	Primer	Polimorfik bant sayısı	PIC
1	OPA01	4	0.07	27	OPB20	2	0.57
2	OPA02	7	0.27	28	OPC03	2	0.63
3	OPA03	1	0.64	29	OPC04	4	0.39
4	OPA04	2	0.52	30	OPC05	2	0.01
5	OPA05	8	0.33	31	OPC06	2	0.70
6	OPA06	7	0.42	32	OPC07	5	0.29
7	OPA07	5	0.30	33	OPC08	3	0.37
8	OPA11	3	0.03	34	OPC10	2	0.56
9	OPA12	10	0.55	35	OPC11	7	0.26
10	OPA13	2	0.02	36	OPC12	7	0.34
11	OPA14	6	0.57	37	OPC13	4	0.41
12	OPA15	2	0.08	38	OPC14	2	0.51
13	OPA16	1	0.16	39	OPC15	10	0.52
14	OPA19	4	0.16	40	OPC20	6	0.19
15	OPA20	1	0.02	41	OPD10	8	0.53
16	OPB01	9	0.35	42	OPD12	2	0.44
17	OPB03	3	0.22	43	OPD15	4	0.46
18	OPB06	2	0.61	44	OPD16	4	0.47
19	OPB08	9	0.41	45	OPE01	1	0.63
20	OPB10	3	0.13	46	OPE05	4	0.45
21	OPB14	5	0.45	47	OPE07	5	0.28
22	OPB15	4	0.38	48	OPE11	2	0.84
23	OPB16	1	0.04	49	OPE16	1	0.67
24	OPB17	2	0.33	50	OPEG09	7	0.3
25	OPB18	6	0.36	51	OPEG12	2	0.52
26	OPB19	7	0.36	52	OPEG16	3	0.16

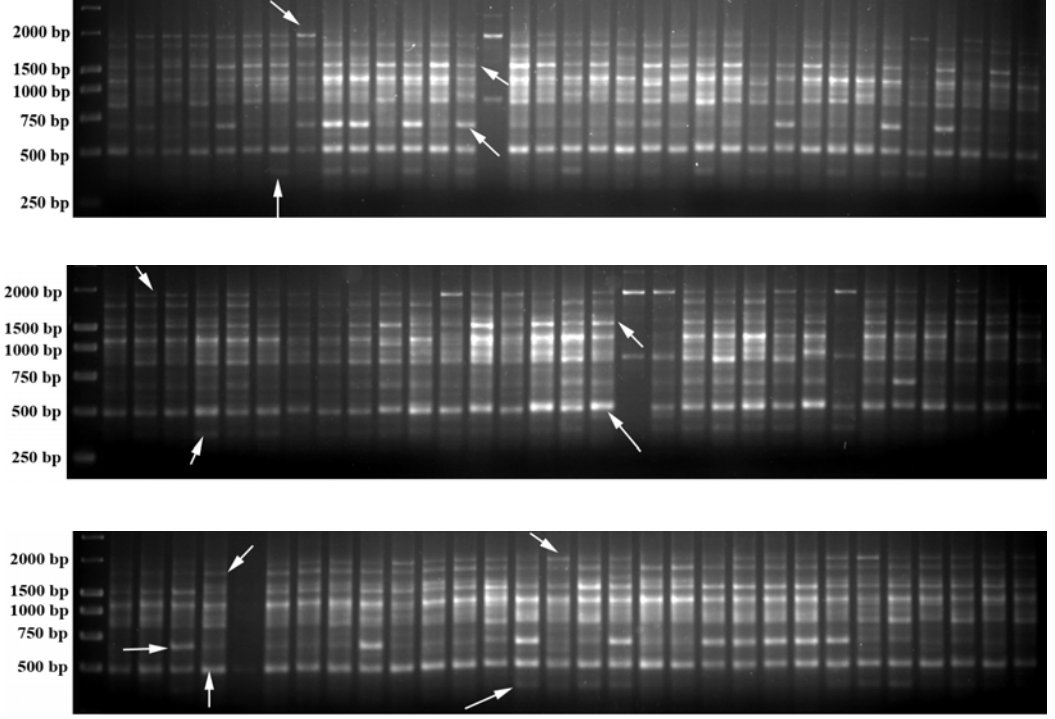
Uygulanan primerlerden OPC01, OPC15 ve OPE07 primerleri ile yapılan PCR sonucunda elde edilen polimorfik bant profili gösteren örnek jel görüntüleri sırasıyla Şekil 4.3., 4.4 ve 4.5'te takip edilmektedir.



Şekil 4.3. OPC01 primeri ile yapılan PCR sonucunda elde edilen jel görüntüsü (oklar polimorfik bantları göstermektedir).

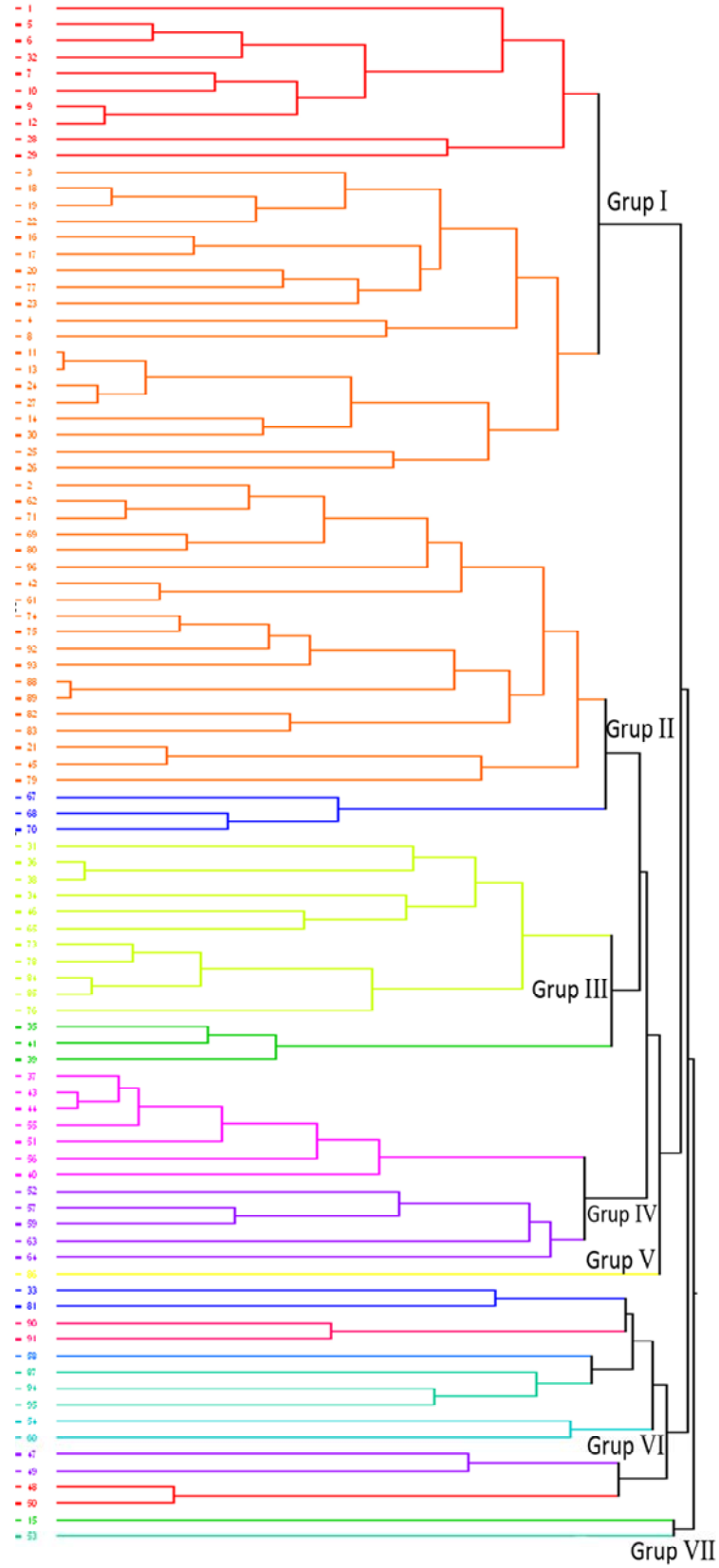


Şekil 4.4. OPC15 primeri ile yapılan PCR sonucunda elde edilen jel görüntüsü (oklar polimorfik bantları göstermektedir).



Şekil 4.5. OPE07 primeri ile yapılan PCR sonucunda elde edilen jel görüntüsü (oklar polimorfik bantları göstermektedir).

RAPD markör tekniğinde elde edilen verilerin değerlendirilmesi ile belirlenen genetik uzaklık değerleri Çizelge 4.2’de ve kümeleme analizi sonucu oluşturulan dendrogram Şekil 4.4’te yer almaktadır.



Şekil 4.6. RAPD markör analizi verileri ile cluster analizi sonucunda elde edilen dendrogram.

RAPD markör analizinde incelenen 96 genotipte en düşük genetik uzaklık değeri 0.05 olarak Sinop no:2 (11 nolu genotip) ve Samsun ufak tuzlamalık (13 nolu genotip) arasında belirlenmiştir. En yüksek genetik uzaklık değeri 0.84 ise Otur (9 nolu genotip) ve Yün çelebi (53 nolu genotip) arasında tesbit edilmiştir. Otur genotipi Artvin ili orijinli, Yün çelebi genotipi ise Gaziantep ili Nizip ilçesi orijinlidir.

Genetik ilişkiyi gösteren dendrogram incelendiğinde, 96 örneğin, 7 grup oluşturduğu görülmektedir. Bu 7 grup da kendi arasında alt gruplara ayrılmaktadır. Dendrogramda genetik uzaklık değeri minimum olan genotipler Grup 1 içerisinde yer alan Sinop no:2 (11 nolu genotip) ve Samsun ufak tuzlamalık (13 nolu genotip) genotipleridir. Bu genotiplerin birbirlerine olan yakınlık dereceleri genetik uzaklık matrisinde elde edilen değer ile paralellik göstermektedir. Genetik uzaklık değeri maksimum 0.84 olan Otur (9 numaralı genotip) Grup 1’de yer alırken, Yün çelebi (53 numaralı genotip) ise Grup 7’de yer almaktadır.

Grup 1 içerisinde 3 alt grup yer almaktadır. Alt grup 1.1 ve 1.2’de yer alan genotiplerin büyük bir kısmı Karadeniz Bölgesi genotiplerinden oluşmaktadır. Farklı coğrafi bölgelere ait zeytin genotipleri ile yapılan RAPD analizlerinde aynı bölge veya yakın bölgelere ait zeytin genotiplerinin genellikle birbirleri ile aynı grupta yer aldıkları araştırmacılar tarafından ifade edilmiştir (Belaj et al., 2001). Alt grup 1.3’te yer alan Gemlik (27 nolu genotip) ve Erdek yağlık (24 nolu genotip) genotipleri morfolojik olarak da benzer genotipler olup genetik uzaklık değeri 0.11 olarak belirlenmiştir. Zeytin gen bankasında yer alan Memecik, Gemlik, Erkence genotipleri ülkemizde yaygın olarak yetiştiriciliği yapılan çeşitler arasında yer almaktadır. Morfolojik tanımlama kriterleri açısından bu çeşitlere çok benzeyen ve farklı bölgelerde değişik adlandırmaların yapıldığı (sinonim) genotiplerin olduğu düşünülmektedir. RAPD analizi sonucu elde edilen bulgular ile de bu durum örtüşmektedir.

Grup 2 ise 4 alt gruptan meydana gelmektedir. Alt grup 2.2’de yer alan Ege Bölgesi’nin önemli zeytin çeşitleri olan Taşarası-Kuşadası (88 nolu genotip) ve Memecik (89 nolu genotip) arasında 0.05 genetik uzaklık değeri belirlenmiştir.

Grup 3 içerisinde 3 alt grup yer almıştır. Alt grup 3.1’de yer alan genotipler morfolojik karakterler bakımından birbirine çok benzeyen Erkence (73 nolu genotip), Dilmit (78 nolu genotip), Yağ zeytini (84 nolu genotip) ve Yerli yağlık (85 nolu genotip) genotipleridir. Bu genotipler arasında 0.10-0.17 arasında değişen genetik uzaklık değerleri tesbit edilmiştir.

Grup 4'de iki alt grup yer almaktadır. Alt grup 4.1 Hatay, Kahramanmaraş, Şanlıurfa (Tatayn) ve Gaziantep (Nizip) illeri orijinli genotiplerden oluşmaktadır. Alt grup 4.2 ise Mardin (Derik), Şanlıurfa (Tatayn) ve Gaziantep (Nizip) illeri orijinli genotipler bulunmaktadır. Grup 4 içerisinde yer alan genotiplerin orijinleri itibari ile birbirlerine yakın ve komşu illerden oluştuğu anlaşılmaktadır.

Grup 5 ve Grup 7 birer alt gruptan oluşmaktadır. Grup 6 ise beş alt grup ile en fazla alt grubu oluşturmuştur. Bu grupları oluşturan genotipler, Güneydoğu Anadolu (Şanlıurfa, Gaziantep), Akdeniz (Hatay) ve Ege Bölgesi (Manisa, Muğla, Aydın) gibi farklı coğrafik bölgeler ve birbirine uzak illerden alınan genotiplerden oluşmaktadır.

Birçok türde çeşitlerin tanımlanmasında başarıyla uygulanan RAPD markör analizi, zeytinde de genetik çeşitliliğin belirlenmesinde etkin bir şekilde kullanılmıştır. Arnavutluk (Belaj et al., 2003b), Suriye (Belaj et al., 2003a), İtalya (Perri et al., 2002), İsrail (Wiesman et al., 1998), Portekiz (Cordeiro et al., 2008; Gemas et al., 2004; Martins-Lopes et al., 2007), İran (Shahriari et al., 2008), Tunus (Zitoun et al., 2008) ve Pakistan (Awan et al., 2011) gibi farklı ülkelerde yetiştirilmekte olan zeytin genotipleri RAPD markör analizi kullanılarak karakterize edilmiştir. Ülkemiz zeytin gen bankasında yer alan tüm genotiplerin yer aldığı bu araştırma hem kullanılan primer ve hem de genotip sayısı bakımından yapılan çalışmalar arasında en geniş kapsamlı olup genotiplerin ayrımlanmasında başarılı bir şekilde uygulanmıştır.

Araştırmada RAPD markör analizinde 96 zeytin genotipinde 52 primer ile yapılan uygulamada 252 polimorfik bant elde edilmiştir. Aynı yöntemle Suriye orijinli 32 çeşitte 13 primerden 79 polimorfik bant tesbit edilirken (Belaj et al., 2003a), Arnavutluk orijinli 19 genotip ve 2 yabancı tipte 16 primer ile 76 polimorfik bant belirlenmiştir (Belaj et al., 2003b). Benzer şekilde, ülkemizde Manzanilla ve 9 yerli zeytin çeşidinde 14 primerden 57 polimorfik bant elde edilmiştir (Ergülen et al., 2002). Manzanilla çeşidi ile Ege ve Marmara Bölgesi orijinli kültür çeşitlerinde ise 36 primer ile 291 polimorfik bant bulunmuştur (Sesli ve Yeğenoğlu, 2009). Bu konuda yürütülen araştırmalarda kullanılan genotiplerin gen merkezlerinin farklılığı, yabancı ve kültür tiplerinin bulunması, RAPD primer yapısı ve sayısı ile laboratuvar koşullarının etkisi ile farklı bulgulara ulaşıldığı düşünülmektedir.

Bu çalışmada RAPD tekniği ile 96 zeytin genotipinde yapılan uygulamada genotiplerin genetik uzaklık değerleri 0.05 ile 0.84 arasında değişmiştir. Ülkemiz

zeytin genetik kaynaklarında yer alan Memecik ve Ayvalık çeşitleri arasında genetik uzaklık değeri 0.28 olarak hesaplanmıştır. Diğer yandan, Sesli ve Yeğenoğlu (2009) tarafından yapılan RAPD analizinde aynı çeşitler için bu değer 0.0455 olarak bildirilmektedir. Aynı yöntem ve genotiplerde farklı bulgulara ulaşılmasında genotiplerin klonal farklılığının, çalışmada yer alan toplam genotip sayısının azlığı, uygulanan primerlerin farklılığı, PCR ve laboratuvar şartlarının etkili olabileceği düşünülmektedir.

RAPD analiz yönteminde ülkemiz gen kaynaklarında yer alan genotiplerle oluşturulan dendrogramda genellikle aynı coğrafi bölge çeşitlerinin aynı gruplarda yer aldığı görülmektedir. Bu bulguyu destekler biçimde, farklı ülkelerin ve farklı coğrafi bölge orijinli genotiplerin ayrı gruplar oluşturduğu bildirilmektedir (Belaj et al., 2002a,b; Belaj et al., 2003b).

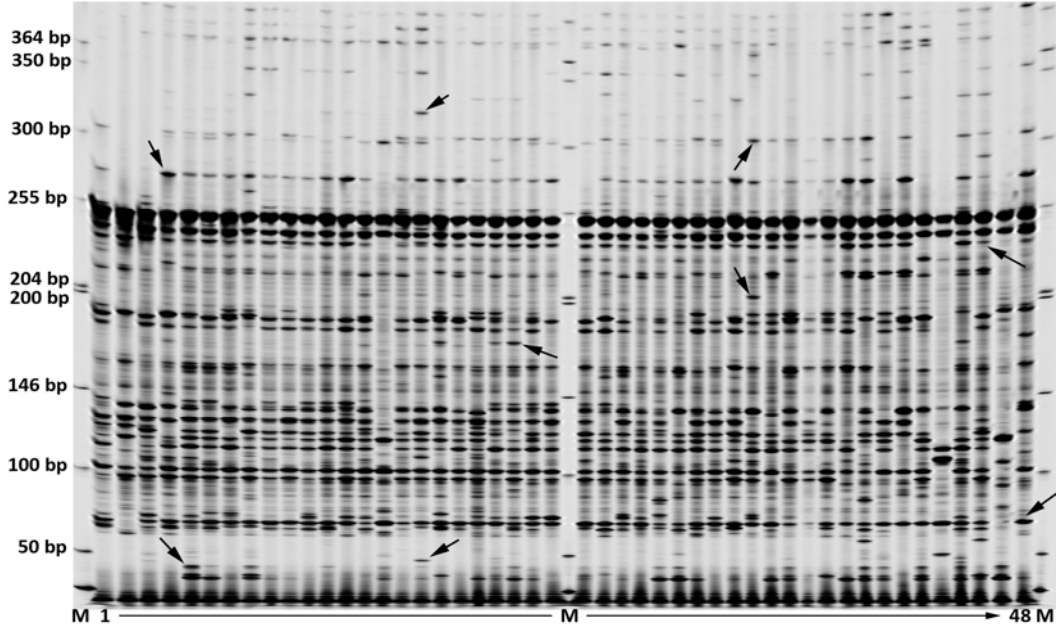
4.2. AFLP markör analizi

AFLP markör analizi 96 zeytin genotipinde 26 primer kombinasyonu uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonucunda 26 primer kombinasyonundan toplam 919 adet polimorfik bant elde edilmiştir. Primer kombinasyonu başına düşen polimorfik bant sayısı 9 ile 62 arasında değişmekte ve ortalama polimorfik bant sayısı 35 olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.3). En fazla polimorfik bant (62 polimorfik bant) MCTA-EACT primer kombinasyonundan elde edilirken, en az polimorfik bant (9 polimorfik bant) MCAA-EAGC primer kombinasyonundan elde edilmiştir.

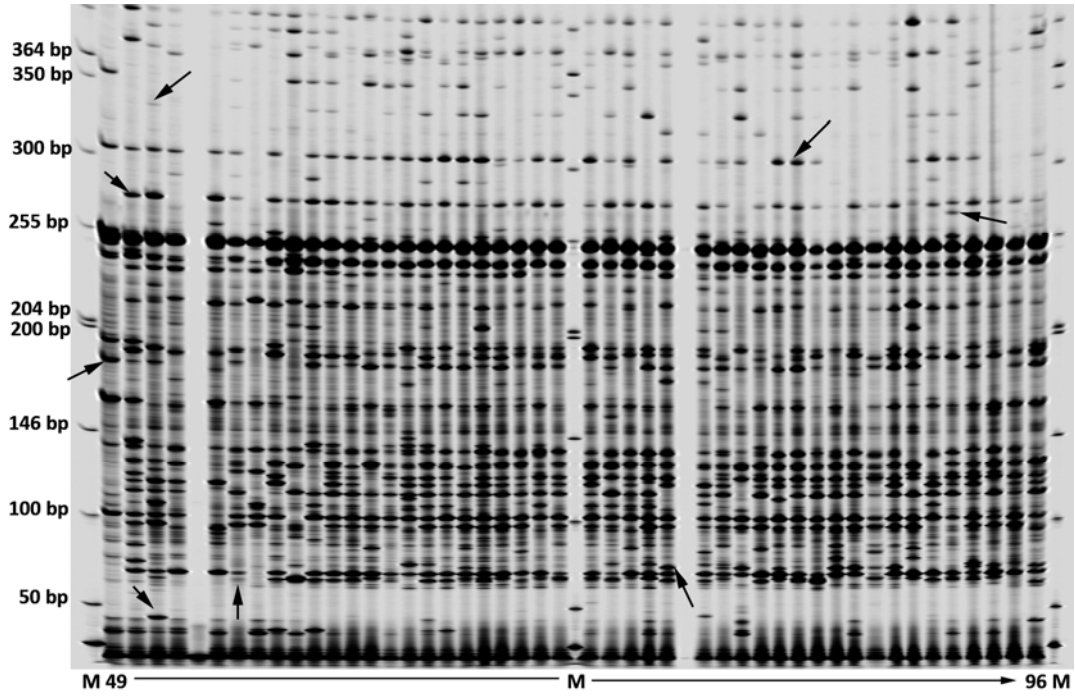
Çizelge 4.3. AFLP primerleri ve polimorfik bant sayıları.

No	Primer	Polimorfik bant Sayısı	PIC	No	Primer	Polimorfik bant sayısı	PIC
1	MCAA-EAAC	21	0.22	14	MCAC-EACA	38	0.55
2	MCAA-EACG	28	0.35	15	MCAC-EACT	59	0.54
3	MCAA-EACA	50	0.52	16	MCAC-EACC	61	0.55
4	MCAA-EAGC	9	0.34	17	MCAC-EACG	57	0.57
5	MCAA-EAGG	24	0.49	18	MCAG-EACC	43	0.39
6	MCAC-EAAG	21	0.60	19	MCAG-EAGG	43	0.72
7	MCAC-EAGC	26	0.50	20	MCAT-EACG	22	0.20
8	MCAC-EACA	30	0.64	21	MCAT-EAAG	42	0.63
9	MCAC-EACG	34	0.53	22	MCAT-EACT	21	0.57
10	MCAG-EAAC	51	0.68	23	MCAT-EACC	51	0.54
11	MCAG-EACG	38	0.59	24	MCTA-EAAC	32	0.45
12	MCAG-EAAG	19	0.54	25	MCTA-EACT	62	0.43
13	MCAG-EACT	17	0.56	26	MCTA-EAAG	20	0.25

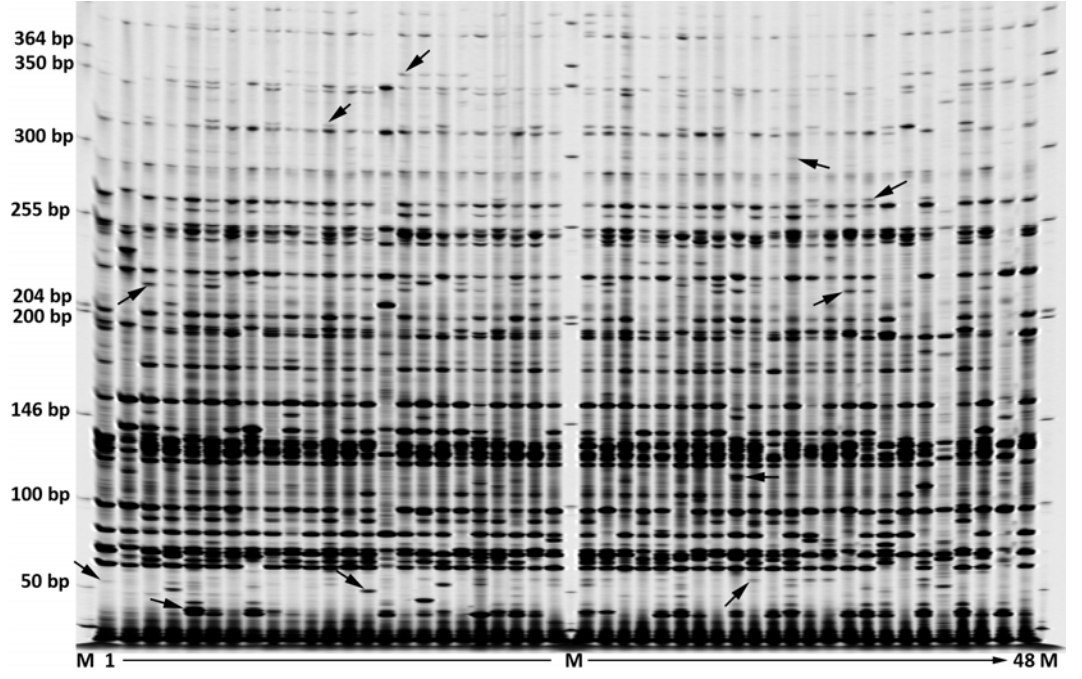
AFLP markör analizi sonucunda 96 genotipte 26 primer kombinasyonu kullanılarak elde edilen jel görüntülerinden bazıları Şekil 4.7-4.10'da gösterilmektedir.



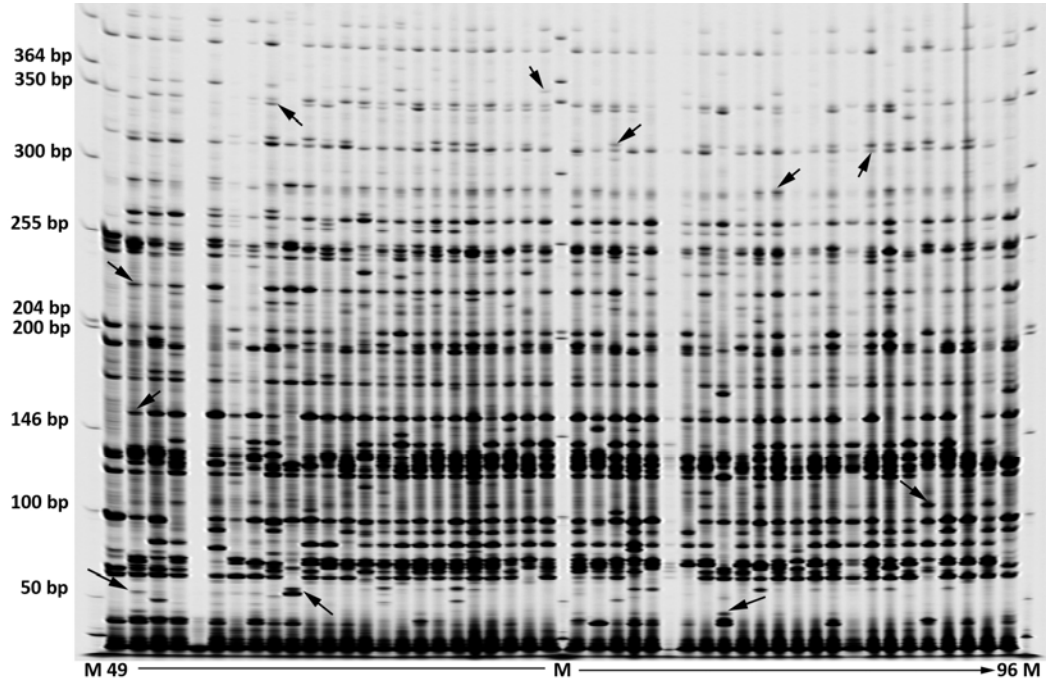
Şekil 4.7. $M_{CAC-E_{ACG}}$ primer kombinasyonu ile 1-48 no'lu genotiplerden elde edilen jel görüntüsü, (M: IRDye 700 ve IRDye 800 Marker (50- 700 bp), oklar ise jel üzerinde skorlanan polimorfik bantlardan bazılarını göstermektedir).



Şekil 4.8. $M_{CAC-E_{ACG}}$ primer kombinasyonu ile 49-96 no'lu genotiplerden elde edilen jel görüntüsü, (M: IRDye 700 ve IRDye 800 Marker (50- 700 bp), oklar ise jel üzerinde skorlanan polimorfik bantlardan bazılarını göstermektedir).

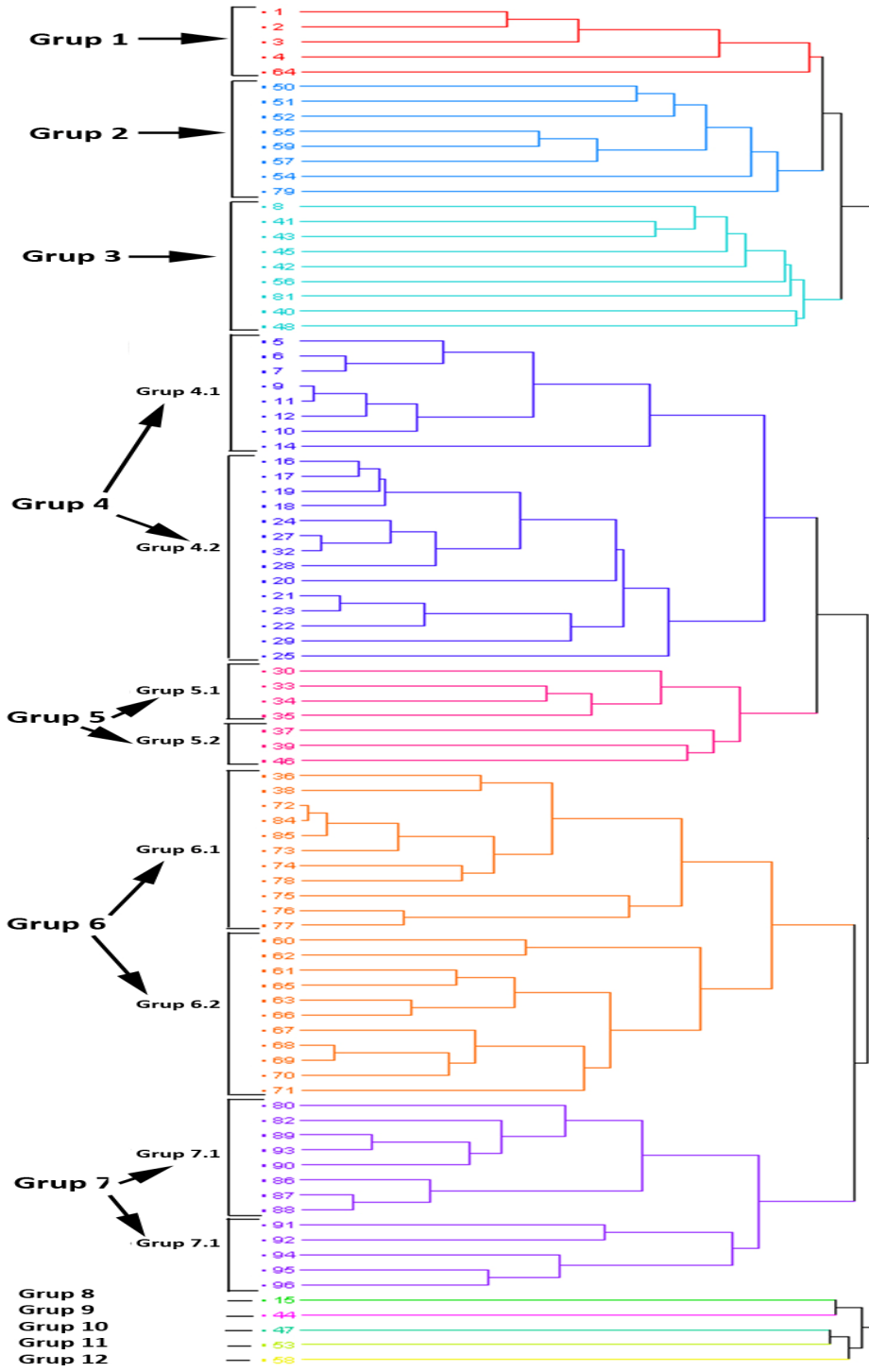


Şekil 4.9. M_{CAC} - E_{ACC} primer kombinasyonu ile 1-48 no'lu genotiplerden elde edilen jel görüntüsü, (M: IRDye 700 ve IRDye 800 Marker (50- 700 bp), oklar ise jel üzerinde skorlanan polimorfik bantlardan bazılarını göstermektedir).



Şekil 4.10. M_{CAG} - E_{ACA} primer kombinasyonu ile 49-96 no'lu genotiplerden elde edilen jel görüntüsü, (M: IRDye 700 ve IRDye 800 Marker (50- 700 bp), oklar ise jel üzerinde skorlanan polimorfik bantlardan bazılarını göstermektedir).

AFLP markör analizi verileri ile belirlenen genetik uzaklık matrisi Çizelge 4.4'te izlenmektedir. Kümeleme analizi ile oluşturulan dendrogram ise Şekil 4.11'de yer almaktadır. AFLP markör analizi verilerinin değerlendirilmesi sonucunda en düşük genetik uzaklık değeri 0.15 olarak 72 ve 84 nolu genotipler arasında görülmektedir. Bu genotipler; 72 nolu İzmir ili orijinli 'Hurma kara' ve 84 nolu Aydın ili Kuşadası orijinli 'Yağ zeytini' olarak belirlenmiştir. En yüksek genetik uzaklık 0.71 değeri ile 53 ve 68 nolu genotipler arasında tesbit edilmiş olup 53 numara Gaziantep-Nizip ilçesi orijinli 'Yün çelebi' ve 68 numara ise Mardin ili Derik ilçesi orijinli Mavı genotipini temsil etmektedir.



Şekil 4.11. AFLP markör analizi verileri kullanılarak yapılan cluster analizi sonucunda elde edilen dendrogram.

Genetik ilişkiyi gösteren dendrogram incelendiğinde, 96 genotipin, 12 grup oluşturduğu görülmektedir. Bu gruplardan 4 grup kendi arasında alt gruplara ayrılmaktadır. Dendrogramda genetik uzaklık değeri minimum olan genotipler grup 6 içerisinde yer alan alt grup 6.1' deki Hurma kara (72 nolu genotip) ve Yağ zeytini (84 nolu genotip) genotipleridir. Bu sonuçlar genetik uzaklık matrisinde elde edilen veriler ile uyum sağlamaktadır. Aralarındaki genetik uzaklık değeri maksimum 0.71 olan Yün çelebi (53 nolu genotip) grup 11'de yer alırken, Mavi (68 nolu genotip) ise grup 6 içerisinde yer alan alt grup 6.2' de yer almaktadır. Grupları oluşturan genotipler genellikle aynı ya da yakın coğrafi bölge orijinli genotipleri içermektedir.

Grup 1 Karadeniz Bölgesi orijinli genotipleri kapsamaktadır. Grup 2'de Muğla/Bodrum orijinli Girit zeytini (79 nolu genotip) hariç, Gaziantep/Nizip ve Şanlıurfa/Tatayn orijinli genotipler yer almaktadır. Grup 3'te toplam 9 genotip bulunmaktadır. Milas orijinli 81 nolu Ak zeytin genotipi ve Artvin orijinli 8 nolu Butko genotipi dışındaki diğer 7 genotip Hatay ve Kahramanmaraş illeri orijinli genotiplerdir. Grup 4, iki alt gruba ayrılmıştır. Grup 4.1 Karadeniz Bölgesi'ndeki Artvin, Trabzon, Samsun ve Sinop illeri orijinli toplam 8 genotipten oluşmaktadır. Grup 4.2' de 14 genotip yer almakta ve bunlardan 10 genotip Marmara, 4 genotip ise Karadeniz Bölgesi orijinelidir. Grup 5 iki alt gruba ayrılmıştır. Grup 5.1'de 4 genotip yer almaktadır. İznik orijinli Samanlı (30 nolu genotip) hariç diğer 3 genotip Mersin/Tarsus orijinelidir. Grup 5.2 Hatay ve Gaziantep/Nizip orijinli genotiplerden oluşmaktadır. Grup 6 iki alt gruba ayrılmıştır ve dendrogramda benzerlik derecesi en yüksek olan genotipler bu grup içinde yer almıştır. Alt grup 6.1'de yer alan İzmir orijinli Hurma kara (72 nolu genotip) ve Aydın/Kuşadası orijinli Yağ zeytini (84 nolu genotip) genetik benzerliği en yüksek genotipler olarak belirlenmiştir. Bu grupta yer alan Yağ zeytini, Yerli yağlık, Dilmit, Erkence, Hurma kara genotipleri morfolojik olarak birbirlerine çok benzeyen genotipler olup genetik uzaklık değerleri 0.15-0.23 arasında değişmektedir. Grup 6.2'de yer alan 7 genotip Mardin/Derik orijinli olup, Şanlıurfa, Samsun, Balıkesir, İzmir illeri orijinli birer genotip de bu grupta yer almaktadır. Grup 7 iki alt gruba ayrılmıştır. Grup 7.1 Ege Bölgesi orijinli genotipleri içermektedir. Ege Bölgesi'nde yetiştiriciliği yapılan en önemli zeytin çeşidi olan Memecik ve bu çeşide morfolojik olarak çok benzeyen Aşıyeli, Taşarası-Aydın, Taş arası-Kuşadası genotipleri bu grupta yer almış olup genetik uzaklık değerleri 0.19-0.23 arasında belirlenmiştir. Grup 7.2'de Manisa/Akhisar orijinli 2 genotip ve gen bankasında yer alan ve orijinleri bilinmeyen 3 tip yer almaktadır. Grup 8 Tekirdağ orijinli Siyah salamuralık, Grup 9 Kilis orijinli Kilis yağlık, Grup 10

Gaziantep/Nizip orijinli Kan çeleti, Grup 11 Gaziantep/Nizip orijinli Yün çeleti ve Grup 12 Şanlıurfa orijinli Hırhalı çeleti genotiplerinden oluşmaktadır.

Ulusal zeytin koleksiyonunda yer alan 96 genotipte 26 primer kombinasyonu ile yapılan AFLP markör analizi sonucunda 919 polimorfik bant tesbit edilmiştir. Zeytinde bu yöntemle yapılan genetik karakterizasyon çalışmalarında, Çoruh Vadisi genotiplerinde 6 AFLP primer kombinasyonu ile 66 polimorfik bant elde edilmiş ve primer kombinasyonu başına 11 polimorfik bant tesbit edilmiş olup (Ercişli et al., 2009), polimorfizm oranının düşük olmasının Türkiye'nin kuzeydoğu bölgesine ait sınırlı bir lokasyondan toplanan örneklerde analiz yapılmasından kaynaklanabildiği düşünülmektedir.

AFLP markör analizinde primer kombinasyonu başına 35 polimorfik bant belirlenmiştir. Bu markör tekniğinin uygulandığı diğer çalışmalarda, primer kombinasyonu başına ortalama polimorfik bant sayısı Akdeniz Havza'sında yetiştirilmekte olan 29 zeytin genotipinde 19 (Grati-Kamoun et al., 2006), Hırvatistan'da aynı ve farklı bölgelerde yetişen "Oblica" çeşidinde 27.6 (Strikic et al., 2010), Sardunya Adası ve Sicilya bölgesinde yetiştirilen genotiplerde 77.6 polimorfik bant (Baldoni et al., 2006) elde edildiği ifade edilmektedir. Baldoni et al. (2006)'un çalışmasında yabancı ve kültür zeytinlerinin birlikte yer almasından dolayı yüksek polimorfizm belirlenmiştir. Diğer araştırma bulguları ile karşılaştırıldığında, bu çalışmada primer kombinasyonu başına tesbit edilen ortalama polimorfik bant sayısının yüksek olduğu görülmektedir.

AFLP markör analizi zeytin genotiplerinin moleküler karakterizasyonu yanı sıra coğrafi orijinini belirlemeye yönelik olarak da kullanılmıştır. Bu çalışmada, ulusal zeytin gen bankasında yer alan genotiplerle oluşturulan dendrogramda bazı farklılıklar ortaya çıkmakla birlikte genellikle farklı coğrafi bölgeleri temsil eden genotiplerin ayrı ayrı gruplarda yer aldığı görülmektedir. Bu bulguyu destekler biçimde, farklı kıtalara ait genotipler değişik gruplar oluşturduğu (Angiolillo et al., 1999) gibi Akdeniz Havza'sı ve Orta Doğu zeytin genotiplerinin de coğrafi bölge orijinlerine bağlı olarak farklı gruplarda toplandığı (Owen et al., 2005) belirtilmektedir.

Yukarıdaki açıklamalar ışığında, zeytin genotiplerinin moleküler karakterizasyonunda AFLP markör analizinin ayırım gücü yüksek bir teknik olduğu ve çeşitleri ayırmada başarılı sonuçlar verdiği görülmektedir. Ulusal

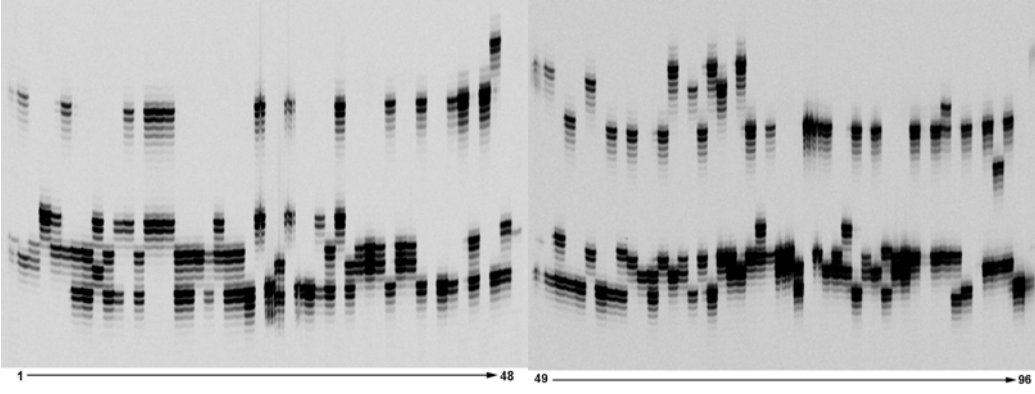
zeytin gen bankasında yer alan genotiplerde yürütülen bu çalışmada da AFLP tekniğinin tanımlamada başarılı bir şekilde kullanılabileceği belirlenmiştir.

4.3. SSR markör analizi

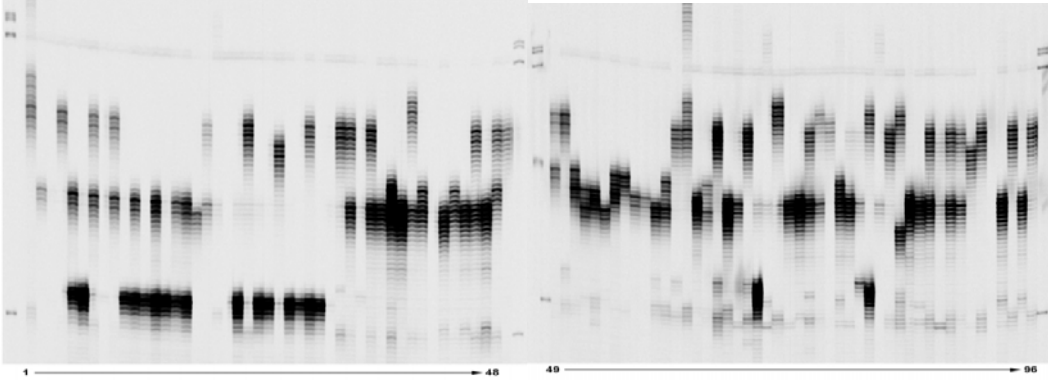
SSR markör analizinde 96 zeytin genotipine 27 SSR primeri uygulanmış, 14 tanesinde amplifikasyon gerçekleşmiştir. 14 adet SSR primerinden toplamda 62 polimorfik bant tesbit edilmiştir. Her bir primerle yapılan PCR sonucunda elde edilen polimorfik bant sayısı 2 ile 8 arasında değişim göstermiştir. En fazla polimorfik bant (8 polimorfik bant) GAPU89 ve GAPU103A primerlerinde, en az polimorfik bant (2 polimorfik bant) ise primer ise GAPU82 primerinden elde edilmiştir (Çizelge 4.5). Primer başına düşen ortalama polimorfik bant sayısı 4.4 olarak hesaplanmıştır. SSR primerlerinden elde edilen jel görüntüleri Şekil 4.12 ve 4.13'te yer almaktadır.

Çizelge 4.5. SSR primerleri için tespit edilen bağlanma sıcaklıkları ve elde edilen polimorfik bant sayıları.

No	Primer	Primer bağlanma sıcaklığı	Polimorfik bant sayısı	PIC	No	Primer	Primer bağlanma sıcaklığı	Polimorfik bant sayısı	PIC
1	DCA1	60 °C	-		15	GAPU45	54 °C	-	
2	DCA3	60 °C	-		16	GAPU59	50 °C	-	
3	DCA5	58 °C	-		17	GAPU62	64 °C	-	
4	DCA7	54 °C	3	0.70	18	GAPU71A	60 °C	3	0.82
5	DCA9	60 °C	-		19	GAPU71B	62 °C	4	0.66
6	DCA10	48 °C	-		20	GAPU72	58 °C	-	
7	DCA11	60 °C	7	0.73	21	GAPU82	60 °C	2	0.48
8	DCA13	64 °C	5	0.76	22	GAPU89	54 °C	8	0.76
9	DCA14	48 °C	-		23	GAPU90	48 °C	4	0.89
10	DCA15	54 °C	4	0.61	24	GAPU92	46 °C	3	0.53
11	DCA18	50 °C	3	0.57	25	GAPU101	62 °C	4	0.76
12	GAPU 11E17	58 °C	-		26	GAPU 103A	66 °C	8	0.80
13	GAPU14	64 °C	-		27	GAPU108	48 °C	4	0.84
14	GAPU19	48 °C	-						



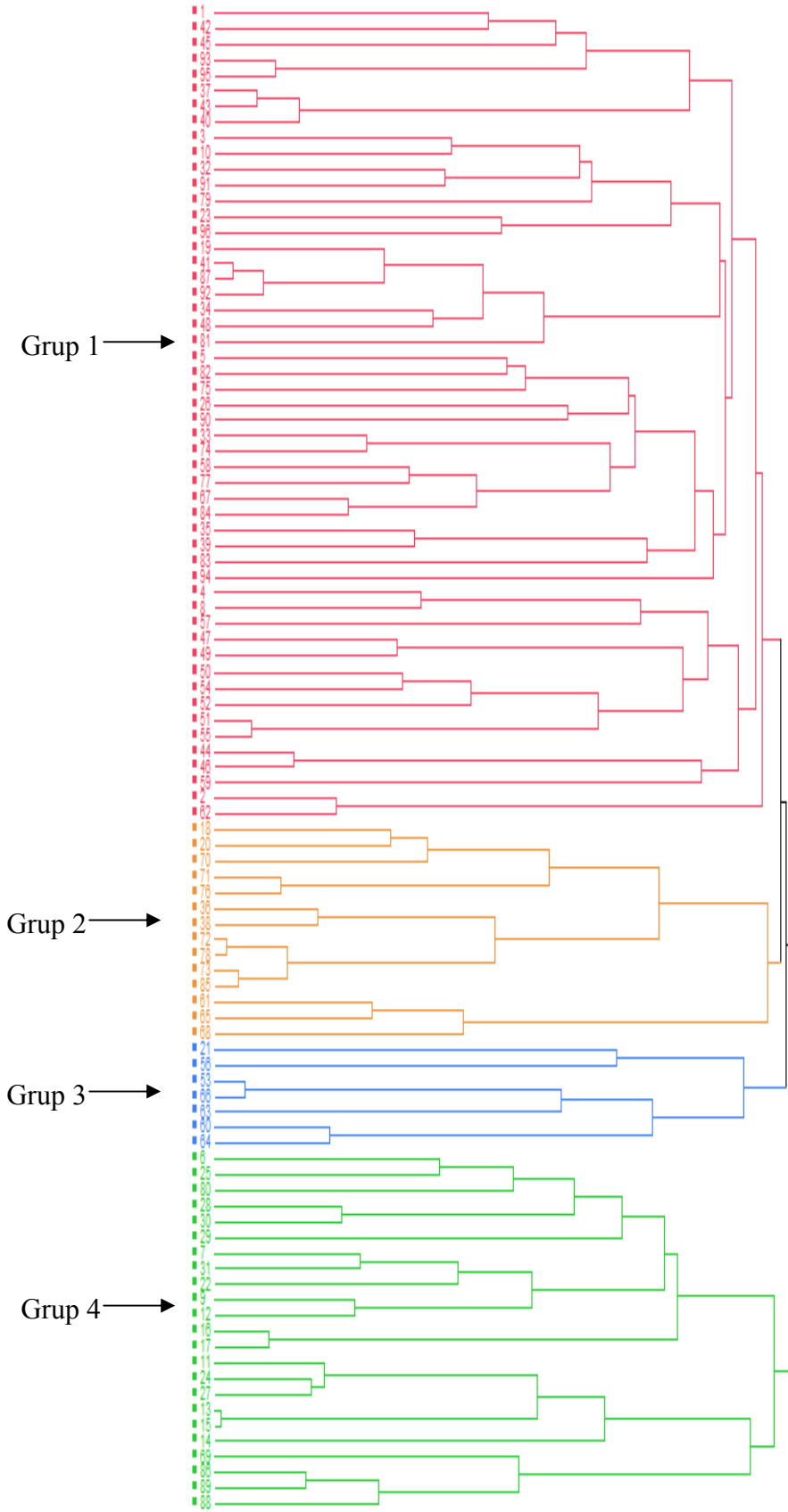
Şekil 4.12. GAFU71B SSR primeri kullanılarak 96 genotipte elde edilen jel görüntüsü.



Şekil 4.13. DCA7 SSR primeri kullanılarak 96 genotipte elde edilen jel görüntüsü.

Genotipler arasında belirlenen genetik uzaklık değerleri Çizelge 4.6'da verilmektedir. Kümeleme analizi ile elde edilen dendrogram Şekil 4.14'de izlenmektedir.

Genotipler arasında en düşük genetik uzaklık değeri 0.00 ve en yüksek genetik uzaklık değeri 0.87 olarak belirlenmiştir. Genetik ilişkiyi gösteren dendrogram incelendiğinde, 96 genotipin, 4 grup oluşturduğu görülmüştür. Bu gruplar da farklı alt gruplara ayrılmıştır.



Şekil 4.14. SSR markör analizi verileri kullanılarak yapılan cluster analizi sonucunda elde edilen dendrogram.

Genotipler arasında en düşük genetik uzaklık değeri Samsun orijinli Samsun ufak tuzlamalık (13 nolu genotip) ile Tekirdağ orijinli Siyah salamuralık (15 nolu genotip); Hatay orijinli Karamani (41 nolu genotip) ile Aydın orijinli Taşarası (87 nolu genotip) ve İzmir orijinli Hurma kara (72 nolu genotip) ile Bodrum/Muğla orijinli Dilmit (78 nolu genotip) genotipleri arasında 0.00 olarak belirlenmiştir. En yüksek genetik uzaklık değeri olan 0.87 ise Tekirdağ orijinli Beyaz yağlık 2 (21 nolu genotip) ile Sinop orijinli Sinop no 4 (14 nolu genotip); Tatayn/Şanlıurfa orijinli Eğriburun (56 nolu genotip) ile Sinop orijinli Sinop no 4 (14 nolu genotip) arasında belirlenmiştir.

Genetik uzaklık matrisi verileri ile dendrogram birlikte değerlendirildiğinde bulguların uyumlu olduğu görülmektedir. Dendrogramda 4 grup oluşmakta ve bu gruplar da alt gruplara ayrılmaktadır. Grup 1’de en düşük genetik uzaklık değerine sahip olan Aydın orijinli Taşarası genotipi ile Hatay orijinli Karamani genotipleri yer almaktadır. Genetik uzaklık değerleri 0.02-0.05 arasında değişim gösteren Hatay orijinli Halhalı (37 nolu genotip), Sayfi (40 nolu genotip) ve Kahramanmaraş orijinli Yağlık sarı zeytin (43 nolu genotip) genotipleri de yakın genetik benzerlik göstermiştir. Nizip orijinli olan Tesbih çelebi ve Kalembezi genotipleri arasında da genetik uzaklık değeri 0.02 olarak tesbit edilmiştir. Benzer şekilde, Nizip orijinli Yuvarlak halhalı, Eğriburun, Yağlık çelebi ve Hazma çelebi genotipleri arasında da 0.16-0.20 arasında değişen genetik uzaklık değerleri saptanmıştır. Güneydoğu Anadolu Bölgesi’nin en önemli zeytin çeşitleri olan Kilis yağlık ve Nizip yağlık genotipleri arasında da 0.05 gibi oldukça yakın bir genetik uzaklık değeri belirlenmiştir. Morfolojik olarak benzer özellikler gösteren Büyük topak ulak ve Çilli genotipleri arasında 0.12; Tekirdağ orijinli Eşek zeytini ile orijini bilinmeyen L kodlu genotipler arasında ise 0.1 genetik uzaklık değerleri saptanmıştır.

Grup 2’de yer alan Hurma kara (72 nolu genotip) ve Dilmit (78 nolu genotip) genotipleri arasında genetik uzaklık değeri 0.00 olarak belirlenmiştir. Erkence genotipi ve ona morfolojik olarak çok benzer olan Çelebi (Silifke), Sarı habeşi, Hurma kara, Dilmit ve Yerli yağlık genotipleri arasında 0.02-0.12 arasında değişen genetik uzaklık değerleri tesbit edilmiştir.

Grup 3 içerisinde en düşük genetik uzaklık değeri Güneydoğu Anadolu Bölgesi orijinli Yun çelebi (53 nolu genotip) ile Belluti (66 nolu genotip) genotipleri arasında 0.02 olarak saptanmıştır. Bu grup, Tekirdağ orijinli Beyaz yağlık 2 hariç Güneydoğu Anadolu Bölgesi orijinli genotiplerden oluşmaktadır.

Grup 4’de Samsun ufak tuzlamalık (13 nolu genotip) ile Siyah salamuralık (15 nolu genotip) genotipleri arasında genetik uzaklık değeri 0.00 olarak belirlenmiştir. Dendrogramda bu iki genotip ile birlikte yer alan Gemlik (27 nolu genotip) genotipinin morfolojik olarak benzerleri olan Sinop no:2 (11 nolu genotip), Samsun ufak tuzlamalık (13 nolu genotip), Siyah salamuralık (15 nolu genotip) ve Erdek yağlık (24 nolu genotip) genotipleri arasında 0.07 ile 0.14 arasında değişen genetik uzaklık değerleri saptanmıştır. Bu grupta yer alan Ege Bölgesi’nin önemli zeytin çeşitlerinden olan ve morfolojik olarak benzer olan Memecik (89 nolu genotip), Taşarası (88 nolu genotip) ve Aşiyeli (86 nolu genotip) genotipleri arasında 0.07 ile 0.10 arasında değişen genetik uzaklık değerleri tesbit edilmiştir. En yüksek genetik uzaklık değeri olan 0.87 ise Sinop orijinli Sinop no 4 (14 nolu genotip) ile Tekirdağ orijinli Beyaz yağlık 2 (21 nolu genotip) genotipleri arasında ve yine Sinop no 4 (14 nolu genotip) ile Tatayn/Şanlıurfa orijinli Eğriburun (56 nolu genotip) genotipleri arasında belirlenmiştir.

SSR markör analizinde genetik uzaklık değeri 0.00 olarak belirlenen genotiplerin RAPD, AFLP ve SSR markör sistemlerinin birlikte değerlendirilmesi sonucu elde edilen veri matrisinde 0.00 değerini vermemeleri nedeniyle sinonim olarak ifade edilmelerinin uygun olamayacağı düşünülmektedir.

Zeytin genotiplerinin SSR markör analizi ile karakterizasyonunun yapıldığı bu çalışmada 14 primerden 62 polimorfik bant elde edilmiş ve her primer başına ortalama 4.4 polimorfik bant belirlenmiştir. Bu bulguyu destekler biçimde, aynı yöntemin kullanıldığı diğer bir çalışmada, Tunus kökenli 20 çeşitte 10 SSR primeri ile 43 polimorfik bant tesbit edilmiştir (Rekik et al., 2008). Diğer yandan, 78 genotipte 13 SSR primeri kullanılarak primer başına 10.5 polimorfik bant elde edilmesinin (Erre et al., 2010) çalışmada yer alan yabani genotiplerin yüksek polimorfizm belirlenmesine neden olacağı düşünülmektedir.

Ulusal zeytin gen bankasındaki 96 genotipin tanımlandığı bu çalışmada yer alan bazı SSR primerlerinin (DCA9, DCA4, DCA13, DCA14, DCA15, DCA16, DCA17, DCA18, GAPU101, GAPU45 ve GAPU71B) Alba et al. (2009) tarafından 30 zeytin genotipinde yapılan çalışmada da genotipleri tanımlamada başarılı bir şekilde kullanıldığı bildirilmektedir.

SSR markör analizi ile zeytin genetik kaynaklarının tanımlandığı bu çalışmada genellikle aynı ya da yakın coğrafi bölge orijinli genotiplerin genetik olarak da yakın bir ilişki içinde olduğu belirlenmiştir. Benzer şekilde, yerli 66 zeytin genotipinde SSR ve SRAP markör tekniklerinin birlikte değerlendirildiği

çalışmada Güneydoğu Anadolu ve Marmara Bölge'lerini temsil eden çeşitlerin diğerlerinden farklı grupta yer aldığı bildirilmektedir (Işık et al., 2011).

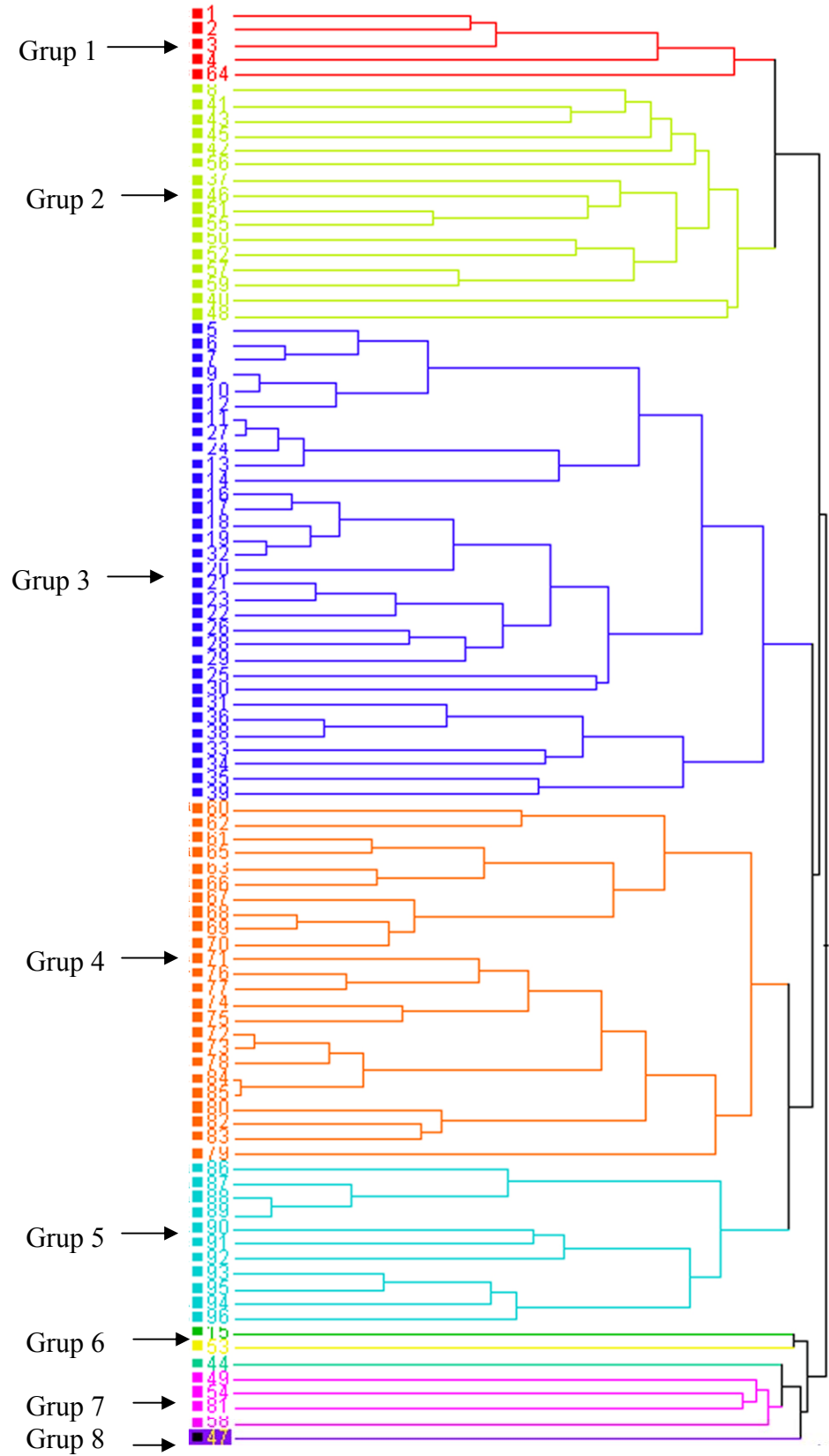
Bu çalışmada, zeytin genetik kaynaklarının moleküler yöntemlerle tanımlanmasında SSR tekniğinin; ayırım gücünün yüksekliği, polimorfik ve tekrarlanabilir olması nedeniyle zeytin genotiplerini ayırmada başarılı bir biçimde kullanılabileceği sonucuna ulaşılmıştır. Bu bulgu Tunus (Rekik et al., 2008), İtalya ve Akdeniz Havzası (Bracci et al., 2009) orijinli zeytin genotiplerinde diğer araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalardan elde edilen bulgularla desteklenmektedir. Bu bağlamda, SSR markör tekniğinin RAPD ve AFLP markör tekniklerine göre özellikle birbirine morfolojik olarak daha benzer olan genotiplerin ve coğrafi olarak yakın lokasyonlardan elde edilen genotiplerin ayırımında daha başarılı sonuçlar verdiği düşünülmektedir.

4.4. RAPD, AFLP ve SSR markör teknikleri verilerinin birlikte değerlendirilmesi

Çalışmada yer alan RAPD, AFLP ve SSR markör tekniklerinden elde edilen sırasıyla 215, 919 ve 62 polimorfik bant aynı Excel matris dosyasında birlikte değerlendirilerek analiz yapılmıştır. Buna göre, toplam olarak 1196 polimorfik bantın yer aldığı veriler ile genetik uzaklık matrisi (Çizelge 4.7) ve kümeleme analizi ile dendrogram oluşturulmuştur (Şekil 4.15).

Çizelge 4.7. RAPD, AFLP ve SSR verileri ile oluşturulan veri matrisi (devam).

49	0,00
50	0,41 0,00
51	0,42 0,30 0,00
52	0,42 0,32 0,30 0,00
53	0,38 0,53 0,57 0,53 0,00
54	0,36 0,38 0,37 0,36 0,37 0,00
55	0,44 0,33 0,23 0,32 0,55 0,34 0,00
56	0,36 0,38 0,34 0,36 0,46 0,37 0,29 0,00
57	0,41 0,34 0,31 0,34 0,52 0,36 0,31 0,33 0,00
58	0,36 0,45 0,44 0,43 0,43 0,37 0,44 0,37 0,37 0,00
59	0,43 0,34 0,32 0,33 0,53 0,39 0,29 0,36 0,28 0,41 0,00
60	0,41 0,38 0,35 0,33 0,48 0,36 0,31 0,37 0,35 0,42 0,32 0,00
61	0,46 0,36 0,33 0,31 0,59 0,40 0,32 0,39 0,33 0,46 0,30 0,29 0,00
62	0,43 0,38 0,35 0,32 0,52 0,38 0,34 0,37 0,36 0,44 0,34 0,28 0,26 0,00
63	0,52 0,38 0,30 0,34 0,70 0,44 0,28 0,39 0,38 0,51 0,31 0,30 0,26 0,30 0,00
64	0,50 0,44 0,40 0,38 0,59 0,46 0,35 0,42 0,38 0,47 0,36 0,39 0,33 0,33 0,31 0,00
65	0,50 0,33 0,32 0,34 0,67 0,42 0,32 0,40 0,33 0,50 0,32 0,34 0,24 0,31 0,25 0,34 0,00
66	0,54 0,36 0,33 0,32 0,64 0,44 0,31 0,40 0,33 0,49 0,33 0,32 0,27 0,31 0,21 0,33 0,22 0,00
67	0,47 0,40 0,36 0,31 0,67 0,44 0,34 0,40 0,33 0,43 0,33 0,31 0,29 0,30 0,28 0,34 0,26 0,24 0,00
68	0,54 0,41 0,36 0,36 0,68 0,46 0,34 0,42 0,38 0,51 0,30 0,32 0,24 0,30 0,27 0,35 0,21 0,26 0,24 0,00
69	0,49 0,37 0,33 0,33 0,64 0,44 0,31 0,39 0,34 0,51 0,29 0,31 0,25 0,26 0,27 0,34 0,23 0,25 0,26 0,19 0,00
70	0,46 0,37 0,34 0,32 0,57 0,40 0,33 0,38 0,34 0,45 0,33 0,31 0,31 0,27 0,32 0,35 0,26 0,28 0,25 0,24 0,22 0,00
71	0,45 0,37 0,31 0,33 0,59 0,41 0,30 0,38 0,31 0,45 0,30 0,32 0,29 0,28 0,27 0,33 0,27 0,26 0,25 0,26 0,26 0,24 0,00
72	0,49 0,40 0,34 0,33 0,61 0,43 0,31 0,42 0,34 0,44 0,32 0,31 0,28 0,31 0,28 0,33 0,25 0,24 0,27 0,24 0,25 0,22 0,22 0,00
73	0,48 0,38 0,35 0,32 0,61 0,42 0,33 0,40 0,33 0,46 0,33 0,35 0,27 0,31 0,31 0,34 0,24 0,25 0,27 0,24 0,24 0,24 0,23 0,16 0,00
74	0,51 0,41 0,36 0,36 0,64 0,47 0,34 0,41 0,36 0,51 0,32 0,32 0,28 0,29 0,29 0,36 0,26 0,27 0,29 0,26 0,22 0,27 0,28 0,23 0,22 0,00
75	0,48 0,40 0,34 0,36 0,64 0,42 0,34 0,39 0,32 0,47 0,33 0,36 0,31 0,31 0,30 0,37 0,31 0,29 0,31 0,31 0,27 0,29 0,27 0,29 0,26 0,23 0,00
76	0,44 0,41 0,34 0,39 0,57 0,39 0,34 0,39 0,35 0,44 0,37 0,37 0,33 0,32 0,34 0,37 0,30 0,32 0,31 0,31 0,29 0,27 0,24 0,26 0,24 0,29 0,27 0,00
77	0,48 0,38 0,32 0,37 0,62 0,42 0,31 0,39 0,34 0,45 0,37 0,36 0,32 0,33 0,30 0,38 0,29 0,27 0,28 0,30 0,27 0,29 0,27 0,23 0,24 0,29 0,24 0,23 0,00
78	0,44 0,39 0,34 0,34 0,54 0,40 0,28 0,38 0,34 0,43 0,34 0,34 0,29 0,32 0,31 0,37 0,29 0,28 0,31 0,29 0,30 0,28 0,26 0,20 0,21 0,26 0,26 0,25 0,23 0,00
79	0,44 0,42 0,36 0,40 0,53 0,43 0,35 0,43 0,33 0,44 0,38 0,41 0,38 0,37 0,39 0,40 0,36 0,36 0,37 0,37 0,35 0,37 0,33 0,36 0,34 0,35 0,32 0,33 0,32 0,30 0,00
80	0,47 0,39 0,35 0,35 0,60 0,44 0,30 0,38 0,34 0,48 0,33 0,33 0,30 0,29 0,30 0,37 0,30 0,33 0,32 0,29 0,26 0,33 0,30 0,30 0,29 0,25 0,27 0,32 0,31 0,27 0,32 0,00
81	0,40 0,42 0,42 0,41 0,40 0,42 0,40 0,40 0,39 0,43 0,42 0,41 0,42 0,44 0,46 0,44 0,42 0,41 0,41 0,44 0,40 0,39 0,38 0,35 0,36 0,39 0,43 0,36 0,36 0,34 0,39 0,41 0,00
82	0,52 0,40 0,36 0,35 0,58 0,45 0,32 0,40 0,36 0,50 0,34 0,34 0,30 0,31 0,31 0,35 0,33 0,32 0,32 0,30 0,28 0,30 0,29 0,27 0,28 0,26 0,29 0,32 0,28 0,28 0,35 0,25 0,39 0,00
83	0,50 0,39 0,34 0,35 0,61 0,46 0,32 0,39 0,35 0,48 0,34 0,34 0,30 0,31 0,31 0,38 0,31 0,32 0,31 0,29 0,28 0,31 0,29 0,27 0,30 0,27 0,32 0,31 0,29 0,28 0,33 0,26 0,42 0,25 0,00
84	0,52 0,38 0,33 0,35 0,66 0,45 0,30 0,40 0,35 0,49 0,33 0,33 0,28 0,31 0,27 0,34 0,24 0,27 0,27 0,25 0,25 0,27 0,25 0,16 0,19 0,27 0,29 0,26 0,24 0,22 0,35 0,27 0,38 0,25 0,25 0,00
85	0,52 0,41 0,34 0,34 0,62 0,44 0,31 0,41 0,36 0,50 0,36 0,33 0,27 0,32 0,30 0,33 0,26 0,27 0,28 0,27 0,27 0,26 0,25 0,19 0,20 0,28 0,31 0,24 0,26 0,21 0,34 0,30 0,38 0,25 0,29 0,14 0,00
86	0,50 0,42 0,36 0,35 0,57 0,43 0,32 0,39 0,34 0,48 0,35 0,32 0,32 0,30 0,32 0,35 0,34 0,32 0,31 0,31 0,29 0,32 0,29 0,31 0,30 0,31 0,30 0,30 0,32 0,28 0,36 0,28 0,40 0,28 0,31 0,26 0,26 0,00
87	0,44 0,39 0,35 0,34 0,53 0,39 0,34 0,38 0,35 0,44 0,35 0,35 0,35 0,33 0,36 0,39 0,37 0,32 0,34 0,37 0,31 0,32 0,30 0,29 0,31 0,33 0,31 0,30 0,29 0,30 0,36 0,31 0,34 0,30 0,34 0,31 0,28 0,23 0,00
88	0,48 0,38 0,35 0,32 0,56 0,42 0,30 0,38 0,36 0,45 0,33 0,31 0,32 0,31 0,32 0,39 0,33 0,32 0,30 0,33 0,28 0,30 0,29 0,27 0,28 0,28 0,28 0,32 0,28 0,27 0,37 0,27 0,40 0,26 0,31 0,26 0,27 0,20 0,19 0,00
89	0,48 0,37 0,34 0,35 0,56 0,42 0,31 0,40 0,36 0,48 0,31 0,33 0,29 0,27 0,29 0,34 0,31 0,31 0,29 0,29 0,25 0,29 0,28 0,25 0,27 0,26 0,29 0,30 0,29 0,27 0,36 0,25 0,39 0,24 0,28 0,24 0,24 0,22 0,24 0,18 0,00
90	0,46 0,40 0,35 0,34 0,55 0,41 0,31 0,42 0,36 0,45 0,32 0,32 0,35 0,34 0,32 0,40 0,35 0,36 0,34 0,33 0,30 0,30 0,30 0,25 0,30 0,31 0,30 0,30 0,30 0,29 0,34 0,29 0,40 0,30 0,30 0,26 0,27 0,30 0,30 0,28 0,24 0,00
91	0,44 0,39 0,40 0,35 0,48 0,39 0,37 0,41 0,37 0,46 0,36 0,36 0,34 0,36 0,39 0,42 0,37 0,37 0,38 0,40 0,35 0,37 0,32 0,32 0,32 0,36 0,37 0,35 0,36 0,34 0,38 0,33 0,41 0,35 0,35 0,33 0,33 0,34 0,35 0,34 0,32 0,30 0,00
92	0,44 0,39 0,35 0,36 0,56 0,41 0,32 0,38 0,35 0,44 0,36 0,34 0,35 0,32 0,36 0,40 0,35 0,36 0,35 0,33 0,31 0,32 0,31 0,32 0,30 0,32 0,33 0,31 0,31 0,32 0,38 0,29 0,41 0,33 0,32 0,33 0,32 0,33 0,32 0,28 0,30 0,30 0,28 0,00
93	0,46 0,36 0,36 0,35 0,57 0,42 0,32 0,41 0,36 0,44 0,34 0,33 0,30 0,29 0,32 0,37 0,32 0,34 0,33 0,30 0,28 0,29 0,30 0,27 0,27 0,27 0,31 0,29 0,29 0,28 0,34 0,28 0,39 0,28 0,29 0,24 0,26 0,28 0,28 0,26 0,22 0,27 0,31 0,25 0,00
94	0,46 0,40 0,39 0,37 0,57 0,43 0,35 0,41 0,40 0,42 0,36 0,36 0,35 0,36 0,39 0,44 0,37 0,38 0,35 0,34 0,32 0,36 0,33 0,30 0,31 0,34 0,37 0,36 0,37 0,34 0,41 0,32 0,40 0,32 0,37 0,33 0,34 0,35 0,32 0,31 0,30 0,31 0,35 0,30 0,25 0,00
95	0,42 0,39 0,34 0,37 0,54 0,39 0,33 0,40 0,39 0,40 0,37 0,37 0,37 0,35 0,35 0,37 0,35 0,37 0,35 0,35 0,33 0,33 0,36 0,30 0,32 0,34 0,33 0,33 0,31 0,32 0,36 0,36 0,39 0,38 0,36 0,31 0,33 0,35 0,30 0,31 0,30 0,30 0,36 0,33 0,21 0,25 0,00
96	0,44 0,37 0,40 0,35 0,51 0,42 0,36 0,37 0,37 0,45 0,35 0,38 0,34 0,32 0,37 0,38 0,38 0,37 0,35 0,36 0,34 0,36 0,33 0,35 0,33 0,33 0,34 0,33 0,34 0,33 0,38 0,32 0,41 0,35 0,34 0,32 0,34 0,33 0,32 0,30 0,33 0,36 0,33 0,34 0,27 0,29 0,26 0,00



Şekil 4.15. RAPD, AFLP ve SSR markör analizi verileri kullanılarak yapılan cluster analizi sonucunda elde edilen dendrogram.

RAPD, AFLP ve SSR markör analizi verileri kombine edilerek elde edilen genetik uzaklık matrisinde, en düşük genetik uzaklık değeri (0.14) Kuşadası orijinli genotipler olan Yağ zeytini (84 nolu genotip) ve Yerli yağlık (85 nolu genotip) genotipleri arasında, en yüksek genetik uzaklık değeri (0.70) ise Artvin orijinli Satı (12 nolu genotip) genotipi ile Nizip orijinli Yün çelebi (53 nolu genotip) genotipleri arasında belirlenmiştir. Morfolojik olarak benzer genotipler olan Yağ zeytini ve Yerli yağlık genotipleri arasında SSR markör tekniğinde de 0.10 genetik uzaklık değeri tesbit edilmiştir. Benzer şekilde bu iki genotipe morfolojik olarak benzeyen Erkence, Dilmit, Hurma kara genotipleri arasında da genetik uzaklık değerleri düşük olarak saptanmıştır. Bu durum bu çeşitlerin ortak genetik orijinden geldikleri bulgu ile desteklenmektedir (Rekik et al., 2008). Yine, Nizip orijinli Yün çelebi genotipi RAPD ve AFLP markör analizlerinde ve her üç tekniğin birlikte değerlendirilmesinde diğer genotiplere en uzak olan genotip olarak bulunmuştur. Artvin orijinli Satı genotipi ile aralarındaki genetik uzaklık en yüksek değere sahiptir. Bu genotiplerin morfolojik farklılıkları ve genotiplerin ait olduğu bölgelerin de birbirinden uzak olması bu sonuçları doğrulamaktadır.

Çalışmada yer alan RAPD, AFLP ve SSR markör sistemlerinden elde edilen genetik uzaklık matrisleri ve dendrogramlar incelendiğinde, grup oluşturan genotipler arasında bazı istisnalar ortaya çıkmakla beraber paralel durumun varlığı dikkat çekmektedir. RAPD, AFLP ve SSR markör teknikleri ile elde edilen veriler birlikte değerlendirilerek yapılan dendrogramda 96 genotipin 8 grup oluşturduğu ve 4 grubun alt gruplara ayrıldığı görülmektedir. Buna göre, Grup 1'de Derik orijinli Halhalı-3 genotipi dışında, Karadeniz Bölgesi'nden Samsun ve Trabzon illeri orijinli genotipler yer almaktadır. Grup 2 ise iki alt gruba ayrılmakta olup, alt grup 2.1 Artvin orijinli Butko genotipi hariç Güneydoğu Anadolu ve Akdeniz Bölgesi orijinli genotiplerden oluşmaktadır. Bu grupta yer alan genotiplerin büyük çoğunluğunun AFLP markör analizinde de aynı grupta bulunduğu dikkat çekmektedir. Alt grup 2.2 Hatay orijinli genotipleri içermektedir. Grup 3 de iki alt gruptan oluşmakta ve genetik uzaklık değeri düşük genotipleri bir arada bulundurmaktadır. Bu durumu destekler şekilde, genetik uzaklık değerleri, Erdek yağlık ve Gemlik genotipleri arasında 0.16, Gemlik ve Sinop no:2 arasında 0.17, Erdek yağlık ve Sinop no:2 arasında 0.20 olarak belirlenmiştir. Sinop no:1, Sinop no:6, Sinop no: 7 genotipleri arasında 0.19-0.22 arasında değişen genetik uzaklık değeri saptanmıştır. İki alt grubun yer aldığı Grup 4'te alt grup 4.1'i oluşturan genotiplerden Samsun tuzlamalık ve Ayvalık genotipleri dışında kalan genotipler Derik/Mardin ve Tatayn/Şanlıurfa orijinli genotipleri temsil etmektedir. Alt grup 4.2'de yer alan Kuşadası orijinli genotipler olan Yağ zeytini ile Yerli yağlık

genotipleri arasında 0.14 olan en düşük genetik uzaklık değeri tesbit edilmiştir. Morfolojik olarak birbirine benzer özellikler gösteren Erkence, Hurma kara, Dilmit, Yağ zeytini ve Yerli yağlık genotipleri arasında 0.14-0.21 arasında değişen genetik benzerlikler saptanmıştır. RAPD analizinde Yağ zeytini ve Yerli yağlık genotipleri arasındaki genetik ilişki 0.10, AFLP analizinde 0.15 ve SSR analizinde ise 0.10 olarak belirlenmiştir. Grup 5 iki alt gruba ayrılmıştır. Grup 5.1'de yer alan Memecik, Taşarasi-Aydın, Taşarasi-Kuşadası ve Aşiyeli genotipleri morfolojik olarak benzer özellikler sergilemektedir. Uygulanan bütün tekniklerde, Memecik ve Taşarasi-Kuşadası genotipleri arasında yakın bir benzerlik değerine ulaşılmış olup RAPD analizinde 0.05, AFLP analizinde 0.21 ve SSR analizinde 0.10 değerleri saptanmıştır. RAPD, AFLP ve SSR teknikleri birlikte değerlendirildiğinde de benzer şekilde bu genotipler arasında 0.18 genetik uzaklık değeri elde edilmiştir.

RAPD, AFLP ve SSR markör tekniğini karşılaştırmak amacıyla 32 zeytin çeşidinde yapılan benzer bir çalışmada, ortalama genetik benzerlik değeri SSR markör tekniği için 0.36, RAPD markör tekniği için 0.56, AFLP tekniği için ise 0.68 olarak hesaplanmıştır. Yapılan değerlendirmeler doğrultusunda her 3 teknik zeytin çeşitlerinin karakterizasyonunu sağlamakla beraber SSR tekniğinin diğerlerinden farklı olarak Frantoio ve Cellina çeşitlerinin de ayrımını gerçekleştirebildiğinden daha etkin olduğu vurgulanmaktadır (Belaj et al., 2003c) Bu durum SSR tekniğinin ayırım gücünün daha yüksek olduğunu göstermektedir. Ulusal zeytin gen bankasında yer alan 96 zeytin genotipinde yürütülen bu çalışmadan elde edilen bulgular Belaj et al. (2003c) tarafından gerçekleştirilen çalışma ile benzerlik göstermekte olup, SSR tekniğinin AFLP ve RAPD tekniğine göre genotipleri ayırlama özelliği daha fazla bulunmuştur.

Zeytin genetik kaynaklarında yer alan genotiplerin RAPD, AFLP ve SSR markör tekniklerinden elde edilen verilerin ayrı ayrı ve kombine edilerek değerlendirilmesi sonucu elde edilen düşük genetik uzaklık değeri belirlenen genotipler morfolojik özellikler bakımından da benzer özellikler göstermektedir. Örneğin Erdek yağlık, Gemlik ve Sinop no:2 genotipleri; Memecik, Taşarasi-Aydın, Taşarasi-Kuşadası ve Aşiyeli genotipleri; Yağ zeytini, Yerli yağlık, Dilmit, Erkence, Hurma kara genotipleri morfolojik karakterler bakımından büyük ölçüde benzerlikler göstermektedir. Uygulanan üç teknikten yalnızca SSR markör analizi sonucunda en yakın genetik uzaklık değeri bazı genotipler arasında 0.00 olarak belirlenmesine rağmen söz konusu genotiplerin üç yöntemin birlikte değerlendirilmesinde sinonim oldukları sonucuna ulaşılammıştır. Çeşitler arasında sadece 1 veya 2 allel bakımından farklılık olması durumunda, çeşitlerin

sinonim olarak kabul edilebilmesinin mümkün olabileceği belirtilmiştir (Muzzalupo et al., 2003); La Mantia et al., 2005). Buna göre çalışmada Kuşadası orijinli Yerli yağlık ve Kuşadası orijinli Yağ zeytini genotipleri 2 allelden daha fazla allel bakımından birbirlerinden farklılık göstermesi nedeniyle bu iki genotipin % 100 sinonim olduklarını ifade etmek doğru olmayacaktır. Ancak DNA markör analizleri sonucunda genetik olarak birbirlerine çok yakın olması sinonim olduklarını düşündürmektedir. Grati Kamoun et al. (2006), Rekik et al. (2008)'ların çalışmalarında kullandığı Tunus çeşitleriyle AFLP markör analizi yapmışlar ve en düşük genetik uzaklık değerini (0.26), yine aynı genotipler (Chemlali Sfax ve Zalmati) arasında belirlemişlerdir. Muzzalupo et al. (2009), 211 zeytin çeşidinde yaptıkları SSR markör analizi sonucunda 75 allel elde etmişler ve en yüksek genetik benzerlik değerini 0.94'den büyük bulmuşlardır. Genetik benzerlik değeri 0.94'den büyük olan çeşitleri sinonim olarak kabul etmişlerdir. Sinonim olarak kabul ettikleri çeşitler yalnızca bir allel bakımından birbirinden farklılık göstermektedir.

Çalışmada markör analizinde kullanılan primerler için primerin genotipleri ayırtılabilmek özelliğinin bir ölçüsü olan PIC değerleri hesaplanmıştır. En yüksek PIC değeri 0.89 GAPU90 SSR primerinden elde edilirken, en düşük PIC değeri 0.01 ise C5 RAPD primerinden elde edilmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda zeytin genotiplerinin karakterizasyonunda SSR primerlerinden GAPU90 primerinin kullanılmasının avantaj sağlayacağı belirlenmiştir.

5. SONUÇ

Bu çalışma ile son yıllarda çeşitlerin karakterizasyonunda etkili bir şekilde kullanılan DNA'ya dayalı yöntemler olan RAPD, AFLP ve SSR markör teknikleri uygulanarak ulusal zeytin arazi gen bankasındaki 96 genotipin moleküler düzeyde tanımlanması gerçekleştirilmiştir. Karakterizasyonda üç farklı moleküler markör tekniği birlikte uygulanarak, herhangi bir teknikte belirlenemeyen polimorfizmin diğer bir teknikte belirlenebilmesi sağlanmıştır.

RAPD markör analizinde 52 primerden 215 polimorfik bant, AFLP markör analizinde 26 primerden 919 polimorfik bant ve SSR markör analizinde 14 primerden 62 polimorfik bant elde edilmiştir. Çalışma sonucunda uygulanan her teknikten elde edilen verilerden ayrı ayrı genetik uzaklık matrisi ve dendrogram oluşturulmuştur. Ayrıca üç tekniğin verilerinin birleştirilmesi sonucunda elde edilen toplam 1196 adet polimorfik bantlar aynı Excel matris dosyasında değerlendirilerek dendrogram ve genetik uzaklık matrisi elde edilmiştir.

RAPD markör analizinde 96 genotipte en düşük genetik uzaklık değeri 0.05 ile Sinop no:2 (11 nolu genotip) ve Samsun ufak tuzlamalık (13 nolu genotip) genotipleri arasında belirlenmiştir. En yüksek genetik uzaklık değeri olan 0.84 ise Otur (9 nolu genotip) ve Yun çelebi (53 nolu genotip) genotipleri arasında tesbit edilmiştir. Otur genotipi Artvin ili orijinli, Yun çelebi genotipi ise Gaziantep ili Nizip ilçesi orijinlidir.

AFLP markör analizinde genotipler arasında en düşük genetik uzaklık değeri 0.15 olarak 72 ve 84 numaralı genotipler arasında belirlenmiştir. Buna göre, 72 numara İzmir ili orijinli Hurma kara, 84 numara ise Aydın ili Kuşadası orijinli Yağ zeytini genotipini temsil etmektedir. En yüksek genetik uzaklık değeri olan 0.71 ise 53 ve 68 numaralı genotipler arasındadır. Nizip/ Gaziantep orijinli 53 numaralı genotip Yun çelebi ve 68 numaralı genotip ise Derik/ Mardin orijinli Mavi genotipidir.

SSR markör analizi ile 96 genotip arasında en düşük genetik uzaklık değeri Samsun orijinli Samsun ufak tuzlamalık (13 nolu genotip) ile Tekirdağ orijinli Siyah salamuralık (15 nolu genotip); Hatay orijinli Karamani (41 nolu genotip) ile Aydın orijinli Taşarası (87 nolu genotip) ve İzmir orijinli Hurma kara (72 nolu genotip) ile Bodrum/Muğla orijinli Dilmit (78 nolu genotip) genotipleri arasında 0.00 olarak belirlenmiştir. En yüksek genetik uzaklık değeri olan 0.87 ise

Tekirdağ orijinli Beyaz yağlık 2 (21 nolu genotip) ile Sinop orijinli Sinop no 4 (14 nolu genotip); Tatayn/Şanlıurfa orijinli Eğriburun (56 nolu genotip) ile Sinop orijinli Sinop no 4 (14 nolu genotip) arasında belirlenmiştir.

RAPD, AFLP ve SSR markör analizi verileri kombine edilerek elde edilen genetik uzaklık matrisinde, en düşük genetik uzaklık değeri 0.14 Kuşadası orijinli genotipler olan Yağ zeytini (84 nolu genotip) ve Yerli yağlık (85 nolu genotip) genotipleri arasında, en yüksek genetik uzaklık değeri 0.70 ise Artvin orijinli Satı (12 nolu genotip) genotipi ile Nizip orijinli Yün çelebi (53 nolu genotip) genotipleri arasında belirlenmiştir.

Uygulanan üç moleküler tekniğin verilerinin birlikte değerlendirilmesi ile elde edilen genetik uzaklık değerleri ve oluşturulan dendrograma ait bulgular Zeytincilik Araştırma İstasyonu'nda daha önce oluşturulmuş morfolojik veri tabanı ile karşılaştırıldığında genotipler arasındaki genetik ilişkilere yönelik önemli sonuçların elde edildiği görülmüştür. Zeytin gen bankasında yer alan ve morfolojik açıdan benzer görünüşleri ile sinonim oldukları düşünülen genotipler arasında genetik olarak da düşük genetik uzaklık değerleri belirlenmiştir. Özellikle ülkemizin en yaygın standart çeşitleri arasında yer alan ve geniş bir coğrafi alanda yayılım gösteren Gemlik, Memecik ve Erkence genotiplerine morfolojik olarak benzer görünümlü genotiplerin hemen hemen tamamı dendrogramlarda aynı grup içerisinde yer almış ve çok yakın genetik uzaklık değerleri saptanmıştır. Oldukça düşük orandaki genetik uzaklık değerlerinin, bu genotipler arasındaki klonal farklılıklardan kaynaklandığı düşünülmektedir. Oluşturulan dendrogramlarda genotiplerin genellikle orijin bölgeleri ile bağlantılı olarak gruplandığı görülmektedir.

Üç farklı moleküler tekniğin uygulandığı bu çalışmada genotiplere özgü markörler belirlenmemiştir. Ancak; SSR markör tekniğinin diğerlerine göre genotipleri tanımlamada daha güvenilir sonuçlar verdiği belirlenmiştir. Primerin genotipleri ayırtılabilmek için özelliğinin bir ölçüsü olan PIC değerleri hesaplandığında en yüksek PIC değeri 0.89 GAPU90 SSR primerinden elde edilirken, en düşük PIC değeri 0.10 ise C5 RAPD primerinden elde edilmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda zeytin genotiplerinin karakterizasyonunda GAPU90, GAPU108, GAPU71A ve GAPU103A SSR primerinin kullanılmasının avantaj sağlayabileceği belirlenmiştir.

Bu çalışmadan elde edilen bulguların zeytinde ileride yapılacak olan ıslah ve melezleme çalışmalarında araştırcılara yardımcı olacağı düşünölmektedir. Melezleme çalışmalarında birbirine genetik olarak uzak olduğu belirlenen genotiplerin amaca uygun olarak kullanılması geniş bir varyasyon oluşturulması açısından yararlı olacaktır. Uygulanan RAPD, AFLP ve SSR markör tekniklerinde oldukça fazla sayıda primer kullanılmasına rağmen zeytin genotiplerini ayırmada spesifik markörler belirlenememiştir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Akansu, F.**, 2008, Bazı standart ve Kilis ili zeytin (*Olea Europaea* L.) çeşitlerinin SSRs (Simple Sequence Repeats) markörler aracılığıyla genetik tanımlanması. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi.
- Alba, V., Sabetta, W., Blanco, A., Pasqualone, A., Montemurro, C.**, 2009, Microsatellite markers to identify specific alleles in DNA extracted from monovarietal virgin olive oils. *Eur Food Res Technol* 229:375–382.
- Angiolillo, A., Mencuccini, M. and Baldoni, L.**, 1999, Olive genetic diversity assessed using amplified fragment length polymorphisms, *Theor. Appl. Genet*, 10, 411-421.
- Anonymous, 2012**, www.fao.org, February (Erişim tarihi 20.02.2012).
- Awan, A.A., Zubair, M., Iqbal, A., Abbas, S.J. and Ali, N.**, 2011, Molecular analysis of genetic diversity in olive cultivars. *African Journal of Agricultural Research* 6 (21), 4937-4940.
- Baldoni, L., Tosti, N., Ricciolini, C., Belaj, A., Arcioni, S., Panelli, G., Germana, M.A., Mulas, M., Porceddu, A.**, 2006. Genetic structure of wild and cultivated olives in the central Mediterranean basin. *Annals of Botany (Lond)* 98:935–942.
- Bartolini, G., Prevost, G., Messeri, C., Carignani, G., Menini, UG.**, 1998, Olive germplasm. Cultivars and World-Wide collections. FAO, Rome, Italy.
- Bartolini, G. and Petrucelli, R.**, 2002, Classification, origin, diffusion and history of the olive. Food and Agriculture Organization of the United Nation. pp. 74.
- Bassi, D., Tura, D., Geuna, F., Failla, O., Pedò, S.**, 2002, Characterisation of local olive (*Olea europaea* L.) accessions by oil composition, morphological and molecular markers methods. *Acta Hort.* 586: 57-60.
- Belaj, A., Caballero, J. M., Barranco, D., Rallo, L. and Trujillo I.**, 2003a, Genetic characterization and identification of new accessions from Syria in an olive germplasm bank by means of RAPD markers. *Euphytica* 134: 261-268.
- Belaj A., Satovic Z., Ismaeli H., Panajoti D., Rallo L. and Trujillo I.** 2003b, RAPD genetic diversity of Albanian olive germplasm and its relationships with other Mediterranean countries. *Euphytica* 130: 387-395.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Belaj A, Satovic Z, Cipriani G, Baldoni L, Testolin R, Rallo L, Trujillo I,** 2003c, Comparative study of the discriminating capacity of RAPD, AFLP and SSR markers and of their effectiveness in establishing genetic relationships in olive, *Theor Appl Genet* 107:736-744.
- Belaj, A., Satovic, Z., Rallo, L., Trujillo, I.,** 2002 a, Genetic Diversity and Relationships in Olive (*Olea europaea* L.) Germplasm Collections as Determined by Randomly Amplified Polymorphic DNA. *Theor Appl Genet*, 105: 638-644.
- Belaj, A., Trujillo, I., de la Rosa, R., Rallo, L. and Giménez, M.J.,** 2001, Polymorphism and discrimination capacity of randomly amplified polymorphic markers in olive germplasm bank. *J Am Soc Hortic Sci* 126:64-71.
- Belaj, A.; Trujillo, L. and Rallo, L.,** 2002 b, RAPD's analysis support the autochthon origin of olive cultivars. *Acta Horticulturae*, 586 (1); 83-86.
- Bernatzky, R. and Tanksley, S.D.,** 1989, Restriction fragments as molecular markers for germplasm analysis and utilization in: Brown A.D.H., Marshall, D.R., Frankel, O.H. Williams J. T (eds). *The Use of Plant Genetic Resources*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 353-362.
- Besnard, G., Breton, C., Baradat, P., Khadari, B. and Bervillé, A.,** 2001, Cultivar identification in olive based on RAPD markers. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 126(6):668-675.
- Besnard, G. and Bervillé, A.,** 2002, On chloroplast DNA variations in the olive (*Olea europae* L.) complex: comparison of RFLP and PCR polymorphisms. *Theor Appl Genet* 102; 1157-1163.
- Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M., Davis, R.W.,** 1980, Construction of a genetic map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet* 32:314-331.
- Bracci, T., Sebastiani, L., Busconi, M., Fogher, C., Belaj, A., Trujillo, I.,** 2009, SSR markers reveal the uniqueness of olive cultivars from the Italian region of Liguria. *Sci Hortic* 122:209-215.
- Cantini, C., Cimato, A., Sani, G.,** 1999, Morphological evaluation of olive germplasm present in Tuscany region. *Euphytica*, 109: 173-181.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Caraffa, V.B., Giannettini, J., Gambotti, C., Maury, J.,** 2002, Genetic relationships between cultivated and wild olives of Corsica and Sardinia using RAPD markers. *Euphytica*, 123 263–271.
- Carriero, F., Fontanazza, G., Cellini, F. and Giorio G.,** 2002, Identification of simple sequence repeats (SSRs) in olive (*Olea europaea* L.). *Theor. Appl. Genet.* 104: 301–307.
- Cordeiro, A.I.; Sanchez-Sevilla, J.F.; Alvarez-Tinaut, M.C. & Gomez-Jimenez, M.C.,** 2008, Genetic diversity assessment in Portugal accessions of *Olea europaea* by RAPD markers. *Biologia Plantarum*, 52, (4), 642-647.
- Çakır, S. E.,** 2009, Adıyaman, Mardin, Şanlıurfa ve Şırnak illeri zeytinlerinin (*Olea europaea* L.) seleksiyon yolu ile ıslahı ve seçilen tiplerin moleküler markörler aracılığı ile tanımlanması. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı Doktora Tezi.
- Després, L. Gielly, B. Redoutet, P. Tabarlet.,** 2002, Using AFLP to resolve phylogenetic relationships in a morphologically diversified plant species complex when nuclear and chloroplast sequences fail to reveal variability, *molecular phylogenetics and evolution*, 185-196p.
- Doyle, J.J., Doyle, J.L.,** 1990, Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12, pp. 13–15.
- Doveri S, Sabino Gil F, Diaz A and Reale S.,** 2008, Standardization of a set of microsatellite markers for use in cultivar identification studies in olive (*Olea europaea* L.). *Sci. Hortic.* 116: 367-373.
- Ekinci, E.,** 2010, Gökçeada zeytininin önemli zeytin çeşitleriyle morfolojik, pomolojik ve genetik özellikler bakımından karşılaştırılması. Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi.
- Ercişli S, Barut E, Ipek A.,** 2009, Molecular characterization of olive cultivars using amplified fragment length polymorphism markers, *Genet. Mol. Res.* 8 (2): 414-419.
- Ergülen, E., Ozkaya, M.T., Ulger, S., Ozilbey.,** 2002, Identification of some Turkish olive cultivars by using RAPD-PCR technique. *Acta Hort.* 586, 91-95.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Erre, P., Chessa, I., Munoz-Diez, C., Belaj, A., Rallo, L. and Trujillo, I., 2010,** Genetic diversity and relationships between wild and cultivated olives (*Olea europaea* L.) in Sardinia as assessed by SSR markers, *Genet Resour Crop Evol* 57:41-54.
- Fabbri, A.; Hormaza, J.I. & Polito, V.S., 1995,** Random amplified polymorphic DNA analysis of olive (*Olea europaea* L.) cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 120, (3), 538-542.
- Faccoli P., Pechionii N., Stanca, A.M. and Terzi V., 1999,** Amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers for barley malt fingerprinting. *J.Cereal Sci.*, 29: 257-260.
- Felsenstein J., 2007,** PHYLIP (Phylogeny Inference Package) Version 3.67. Distributed by the author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle. <http://evolution.gs.washington.edu/phylip.html>.
- Flahault, R., 1986,** L' Olivier , *Ann. Ecole Nat. Agric. t. II. Montpellier*.
- Gemas, V.J.V., Almadanim, M.C., Tenreiro, R., Martins, A. & Fevereiro, P., 2004,** Genetic diversity in the Olive tree (*Olea europaea* L. subsp. *europaea*) cultivated in Portugal revealed by RAPD and ISSR markers. *Genetic Resource and Crop Evolution*, Vol.5, pp. 501-511.
- Grati-Kamoun, N., Mahmoud, F., Rebai, A. and Gargouri, A., 2006,** Genetic diversity of Tunisian olive tree (*Olea europaea* L.) cultivars assessed by AFLP markers. *Genet. Resour. Crop Evol.* 53: 265-275.
- Green, P.S., 2002.** A revision of *Olea* L. (*Oleaceae*). *Kew Bull.* 57, 91–140.
- Green PS, Wickens GE., 1989,** The *Olea europaea* complex. In: Kit Tan (ed) *The Davis & Hedge Festschrift*. Edinburgh University Press, Edinburgh, pp 287-299.
- Gupta M, Chyi Y-S, Romero-Severson J, Owen JL., 1994,** Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. *Theoretical and Applied Genetics*, 89, 998-1006.
- Gülşen, O. ve Mutlu, N., 2005,** Bitki biliminde kullanılan genetik markırlar ve kullanım alanları. *Alatarım* 4(2):27-37.
- Hillis, D. M., Moritz, C., 1990,** *Molecular Systematics*, Sinauer Associates, Inc. Publishers, USA)

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Işık, D.**, 2011, Türkiye'nin batı kıyılarından örneklenen yabani zeytin (*Olea europaea* L. subsp. *europaea* var. *oleaster*) populasyonlarındaki genetik çeşitliliğin RAPD (Rastgele Çoğaltılan Polimorfik DNA) belirteçleri yardımıyla belirlenmesi ve yaygın olarak kullanılan kültür zeytini (*O. europaea* L. subsp. *europaea* var. *sativa*) çeşitlerinin bu belirteçlerle genetik karakterizasyonu. Muğla Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi. 73 s.
- Işık, N., Doğanlar, S. and Frary, A.**, 2011, Genetic diversity of Turkish olive varieties assessed by simple sequence repeat and sequence-related amplified polymorphism markers. *Crop Sci.* 51:1646-1654.
- İpek, A., Gülen, H., Barut, E., Yalçınkaya, E., Öz, A.T. ve A.Tangu, N.**, 2008, Moleküler markörler kullanılarak önemli bazı standart zeytin çeşit ve melezlerinin dna profillerinin belirlenmesi ve gen haritasının çıkarılması. Proje No: TOVAG-105 O 071. 67s.
- Janick J, Moore J.N.**, 1996, Fruit breeding, John Wiley & Sons, New York.
- La Mantia, M., Lain, O., Caruso, T., Testolin, R.**, 2005, SSR based DNA fingerprints reveal the genetic diversity of Sicilian olive (*Olea europaea* L.) germplasm. *J. Hort. Sci. Biot.* 80:628-632.
- Lavee, S.**, 1998, Zeytinin biyoloji ve fizyolojisi. Dünya Zeytin Ansiklopedisi Uluslararası Zeytinyağı Konseyi, İspanya, s: 61-110.
- Malyshev, S.V. and Kartel, N.A.**, 1997, Molecular markers in mapping plant genomes, *Molecular Biology*, 31(2): 163-171.
- Marrazo, T., Cipriani, G., Marconi, R., Testolin, R., Cimato, A.**, 2002, Isolation and characterisation of microsatellite DNA in olive (*Olea europaea* L.) *Acta Hort.* 586; 61-64.
- Martins-Lopes, P., Lima-Brito, J., Gomes, S., Meirinhos, J., Santos, L. and Guedes-Pinto, H.**, 2007, RAPD and ISSR molecular markers in *Olea europaea* L.: Genetic variability and cultivar identification. *Genetic Resource and Crop Evolution*, 54,117-128.
- Morettini, A.**, 1972, Olivicoltura. Rama Editoriale Delgi Agricoltori.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Muzzalupo, I., Lombardo, N., Musacchio, A., Noce, M.E., Pellegrino, G., Perri, E. and Sajjad, A.**, 2006, DNA sequence analysis of microsatellite markers enhances their efficiency for germplasm management in an Italian olive collection, *J Am Soc Hortic Sci* 131(3):352-359.
- Muzzalupo, I., Stefanizzi, F., Perri, E.**, 2009, Evaluation of olives cultivated in southern Italy by simple sequence repeat markers, *HortScience* 44(3):582-588.
- Nei, M.**, 1978, Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89, 583–590.
- Owen, CA., Bitá, EC., Banilas, G., Hajjar, SE., Sellianakis, V., Aksoy, U., Hepaksoy, S., Chamoun, R., Talhook, SN., Metzidakis, I., Hatzopoulos, P and Kalaitzis, P.**, 2005, AFLP reveals structural details of genetic diversity within cultivated olive germplasm from the eastern Mediterranean. *Theor. Appl. Genet.* 110: 1169-1176.
- Özkaya, M.T., Çakır, E., Gökbayrak, Z., Ercan, H. and Taşkın, N.**, 2006, Morphological and molecular characterization of Derik-Halhalı olive (*Olea europaea* L.) accessions grown in Derik-Mardin province of Turkey. *Scientia Horticulturae*, 108 (2) 205-209.
- Özkaya, M.T., Çakır, E., Ulaş, M., Çelik, M., Bakır, M., Ergül, A.**, 2007, Mardin, Şırnak illeri zeytinlerinin (*Olea europaea* L) seleksiyon yolu ile ıslahı ve seçilen tiplerin moleküler markörler aracılığıyla genetik tanınlanması üzerine araştırmalar. Türkiye V. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi. Cilt 1, s:692-701.
- Öztürk, F.**, 2006, Türkiye’de ve Dünya’da zeytincilik sektörünün genel görünümü. TAYEK, Ege tarımsal araştırma enstitüsü müdürlüğü, yayın no: 125, 45-62.
- Parlak, S.**, 2007, Marmara bölgesinde yetiştirilen bazı zeytin (*Olea europaea* L). kültürlerinin moleküler sistematik analizi. Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi. 58s.
- Perri, E., Palopoli, A. and Pellegrino, M.**, 2002, The use of RAPD markers for the study of olive germplasm from Apulia and Basilicata. *Acta Hort.* 586 (1) 87-90.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Poljuha, D., Sladonja, B., Setic, E., Milotic, A., Bandelj, D., Jakse, J. and Javornik, B.,** 2008, DNA fingerprinting of olive varieties in Istria (Croatia) by microsatellite markers, *Scientia Horticulturae* 115:223-230.
- Powell, W., Machray, G.C., and Provan, J.,** 1996, Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends in Plant Science*, 1(7): 215-221.
- Rafalaski, J.A., J.M. Vogel, M. Morgante, W. Powell, C. Andre and S.V. Tingey,** 1996, Generating and using DNA markers in plants. In: B. Birren & E. Lai (Eds.), *Analysis of Non-mammalian Genomes: A Practical Guide*, pp. 75–134, Academic Press, Boca Raton, FL.
- Rafalski, J.A., Tingey, S.V.,** 1993, Genetic Diagnostics in Plant Breeding: RAPDs, Microsatellites, and Machines. *Trends Genet.* 9:275-279.
- Rallo, L., Barranco, D. and Escobar, F.,** 1997, El cultivo del olivo. Ediciones mundi prensa. pp. 701.
- Rekik, I., Salimonti, A., Grati-Kamoun, N., Muzzalupo, I., Perri, E., Rebai, A.,** 2008, Characterisation and identification of Tunisian olive tree varieties by microsatellite markers. *HortScience* 43:1371-1376.
- Remesal-Rodríguez, J.,** 1996, Economía oleícola: En la antigüedad, p. 47–58. In: consejo oleícola internacional (Ed.), ‘Enciclopedia mundial del olivo, plaza & Janes Editores S.A., Barcelona, Spain.
- Ridout, C.R. and P, Donini.,** 1999, Use of AFLP in cereals research. *Trends in Plant Science.* 4:76-79.
- SAS,** 1995, SAS/STAT user’s guide. Version 6.12. SAS Institute, Cary, North Carolina.
- Sefc KM, Lopes MS, Mendonca D, Dos Santos MR.,** 2000, Identification of microsatellite loci in olive (*Olea europaea*) and their characterization in Italian and Iberian olive trees. *Mol. Ecol.* 9: 1171-1173.
- Sesli, M., Yeğenoğlu, E. D.,** 2009, RAPD-PCR analysis of cultured type olives in Turkey. *African Journal of Biotechnology* Vol. 8 (15), pp. 3418-3423.
- Sesli, M., Yeğenoğlu, E. D.,** 2010, Comparison of Manzanilla and wild type olives by RAPD-PCR analysis. *African Journal of Biotechnology* 9(7), pp. 986-990.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Shahriari, M., Omrani, A., Falahati-Anbaran, A., Ghareyazei, B. & Nankali, A.,** 2008, Identification of Iranian olive cultivars by using RAPD and microsatellite markers. *Acta Hort.* 791:109-115.
- Sheidai M, Vaezi-Joze, S., Shahriari, ZH., Noormohammadi, Z., Parsian, H., Farahanei, F.,** 2007, Study of genetic diversity in some olive (*Olea europaea* L.) cultivars by using RAPD markers. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 10(17):2972-2975.
- Staub, J.E. and Sequen. F.C.,** 1996, Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding. *Hortscience*, 31(5): 729-741.
- Staub, J.E., Kuhns, J. J., May, B. and Grun, P.,** 1982, Stability of potato tuber isozymes under different storage regimes. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 107: 405 - 408.
- Strikic, F., Mavsar, D.B., Perica, S., Cmelik, Z., Satovic, Z., Javornik, B.,** 2010, Genetic variation within the olive (*Olea europaea* L.) cultivar Oblica detected using amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers, *African Journal of Biotechnology* 9(20), 2880-2883.
- Şeker, M., Gül, M.K., İpek, M., Kaleci, N., Yücel, Z., Yılmaz, E., Topal, U.,** 2008, Zeytin (*Olea europaea* L.) çeşitlerinin AFLP ve SSR markörleri polimorfizminin yağ asitleri ve tokoferol düzeyleri ile ilişkilendirilmesi. TÜBİTAK TOVAG-3358 sonuç raporu. 122 s.
- Tanksley, S.D., Young, N.D., Paterson, A.H. And Bonierbale, M.W.,** 1989, RFLP mapping in plant breeding, new tools for an old science. *Biotechnology*, 7: 257-264.
- Terral JF and Arnold-Simard G.,** 1996, Beginnings of olive cultivation in eastern Spain in relation to Holocene bioclimatic changes. *Quaternary Res* 46:176-85.
- Turrill, W.B.,** 1951, Wild and cultivated olives. *Brit. Ass. Adv. Sci. Kew Bull.*, 3, 437.
- Vergari G., Patumi M., Fontanazza G.,** 1996, Use of RAPDs markers in the characterisation of olive germplasm. *Olivae*, 60: 19-22.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijnhabs, M., Van De Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. Zabeau, M., 1995, AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. Nuc Acid Res, 21: 4407-4414.**
- Weisman, Z., Avidan, N., Lavee, S., Quebedeaux, B., 1998, Molecular characterization of common olive varieties in Israel and the west bank using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. J. Am. Soc. Hort. Sci. 123: 837-841.**
- Welsh, J. and McClelland, M., 1990, Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Res, 18; 7213-7218.**
- Williams, J.G.K., Hanafey, M.K., Rafalski, J.A. And Tingey, S.V., 1993, Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. Methods in enzymology, 218: 704-740.**
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. And Tingey, S.V., 1990, DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucl. Acids Res., 18 (22): 6531-6535.**
- Yıldırım, A., Kandemir, N., 2001, Bitki biyoteknolojisi-II genetik mühendisliği ve uygulamaları, genetik markörler ve analiz metodları. Selçuk Üniversitesi Basımevi s:334- 363.**
- Zamora, R., Alaiz, M., Hidalgo, F. J., 2001, Influence of cultivar and fruit ripening on olive (*Olea europaea*) fruit protein content, composition, and antioxidant activity. J. Agric. Food Chem, 49 (9), 4267-4270.**
- Zitoun, B., Caraffa, V.B., Giannettini, J., Breton, C., Trigui, A., Maury, J., Gambotti, C., Marzouk, B., Berti, L., 2008, Genetic diversity in Tunisian olive accessions and their relatedness with other Mediterranean olive genotypes. Scientia Horticulturae 115: 416–419.**
- Zohary, D., Spiegel-Roy, P., 1975, Beginning of fruit growing in the old world. Science, 187: 319-327.**
- Zohary, D., Hopf, M., 1993, Domestication of plants in the old world. Oxford clarendon press, 137-143.**

ÖZGEÇMİŞ

Öznur ÇETİN 1976 yılında Balıkesir’de doğmuştur. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü’nden 2000 yılında mezun olmuştur. Aynı bölümde yüksek lisansını 2003 yılında tamamlamıştır. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Zeytincilik Araştırma İstasyonu’nda 2003 yılından itibaren Islah ve Genetik bölümünde görev yapmaktadır. Yabancı dili İngilizce olup, evli ve iki çocuk annesidir.