

T.C.
ISPARTA UYGULAMALI BİLİMLER ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

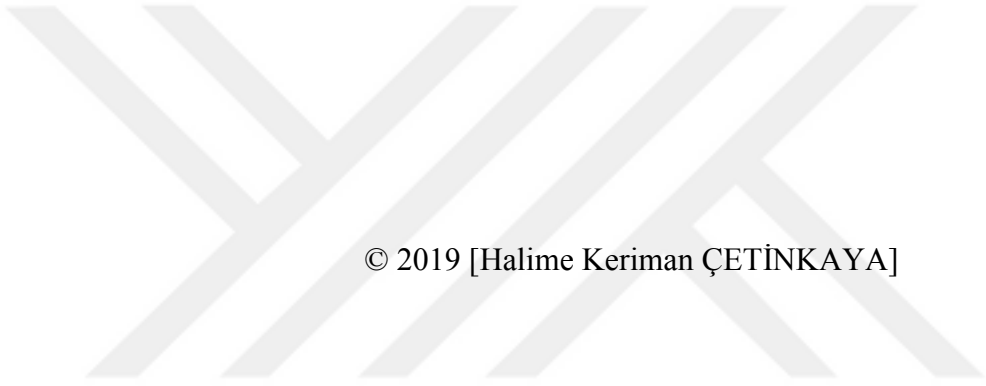
YÜKSEK LİSANS TEZİ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

NAR (*Punica granatum* L.) ÇEŞİTLERİNİN SSR
BELİRTEÇLERİYLE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

Halime Keriman ÇETİNKAYA

Danışman
Prof. Dr. Yaşar KARAKURT

ISPARTA - 2019



© 2019 [Halime Keriman ÇETİNKAYA]

TEZ ONAYI

**NAR (*Punica Granatum L.*) ÇEŞİTLERİNİN SSR
BELİRTEÇLERİYLE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU**

Halime Keriman ÇETİNKAYA tarafından hazırlanan bu tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Başkan **Prof. Dr. Yaşar KARAKURT**
Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi

Üye **Prof. Dr. Semra KILIÇ**
Süleyman Demirel Üniversitesi

Üye **Doç. Dr. Halime ÜNLÜ**
Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi

İmza

.....
.....
.....

Yukarıdaki Jüri kararı Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/..../....
tarih ve/..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof.Dr. Yusuf UÇAR
Enstitü Müdürü

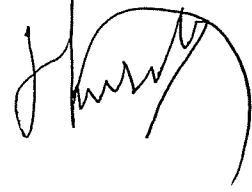
ETİK BEYANI

Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak ve bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yol ve yardıma başvurmaksızın hazırladığım bu tez çalışmasında;

Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, kullanılan verilerde ve ortaya çıkan sonuçlarda herhangi bir değişiklik yapmadığımı, bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu, tezimle ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara katlanacağımı bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

27/06/2019

Halime Keriman ÇETİNKAYA



İÇİNDEKİLER

Sayfa

İÇİNDEKİLER	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	v
ÇİZELGELER DİZİNİ	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	vii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	3
3. MATERYAL VE YÖNTEM	9
3.1. Materyal	9
3.2. Yöntem	9
3.2.1. DNA izolasyonu için yaprak örneklerinin alınması.....	9
3.2.2. DNA izolasyonu.....	9
3.2.3. SSR analizi	10
3.2.4. Moleküler verilere ait analizler	11
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	13
4.1. Nar Genotiplerinde SSR Analiz Sonuçları.....	13
5.SONUÇ VE ÖNERİLER	17
KAYNAKLAR	20
ÖZGEÇMİŞ	24

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

NAR (*Punica granatum* L.) GENOTİPLERİNİN SSR MARKÖRLERİ İLE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

Halime Keriman ÇETİNKAYA

Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Yaşar KARAKURT

Bu tez çalışmasında moleküler markörlerden SSR tekniği kullanılarak nar genotipleri arasındaki farklılıkları ortaya koymak amaçlanmıştır. Nar *Lythraceae* familyasına ait tropik ve subtropik iklim kuşağında yetiştirilen bir meyve olduğu bilinmektedir. Çalışma kapsamında Akdeniz Bölgesi Antalya ilinde yer alan Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nden 10 çeşit nar ve küçük özel mülk bahçesinden 1 çeşit nar alınarak moleküler analizler için kullanılmıştır. Bu amaçla nar türünde yer alan genotiplere ait numuneler uygun koşullarda alındıktan sonra Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Tarım Bilimleri ve Teknolojileri Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Laboratuvarında moleküler analizleri gerçekleştirilmiştir.

SSR markörleri ile yapılan analizler sonucunda UPGMA metoduna göre nar çeşitleri arasında iki ana grup ortaya çıkmış ve %65 oranında benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. İlk ana grup kendi içinde 4 alt gruptan meydana gelmiştir. İlk alt grupta Hicaz, ikinci alt grupta Aşı, Batem Onur, Ernar, Batem Hicaz, üçüncü alt grupta Beynarı ve dördüncü alt grupta Batem Esin, Batem Yılmaz ve Ekşilik yer almıştır. İkinci ana grup 2 alt gruba ayrılmıştır. İlk alt grupta Katırbaşı, ikinci alt grupta Fellahyemez yer almıştır. Batem Onur ve Ernar çeşitlerini birbirlerinden ayırt edecek polimorfizmler üretilmemiş ve bu iki çeşit bir arada gruplanmıştır. Hicaz, Beynar, Ekşilik, Katırbaşı ve Fellahyemez çeşitleri tek başına bir alt grup oluşturmuştur. Çalışmada Aşınar ve Batem Onur-Ernar, Batem Esin ve Batem Yılmaz arasında yakın korelasyon olduğu gözlemlenmiştir.

Nar türüne ait SSR bulguları, bölgede bundan sonraki ıslah çalışmalarına ebeveyn seçiminde bir basamak oluştururken, nar genotiplerinin yayılma alanlarının belirlenmesinde, genetik koleksiyonların karşılaştırılmasında, nar genotiplerinin karakterizasyonunda kullanılabilir.

Anahtar Kelimeler: Markör, Moleküler Karakterizasyon, SSRs, Nar

2019, 24 sayfa

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF POMEGRANATE (*Punica granatum* L.) GENOTYPES WITH SSR MARKERS

Halime Keriman Çetinkaya

Isparta University of Applied Sciences
The Institute of Graduate Education
Department of Agricultural Biotechnology

Supervisor: Prof. Dr. Yaşar KARAKURT

In this thesis, it is aimed to determine the differences between pomegranate genotypes from molecular markers by using SSR technique. Pomegranate is known to be a fruit grown in tropical and subtropical climate zone belonging to Lythraceae family. Within the scope of the study, 10 kind of pomegranates and a pomegranate from a small private garden have been used for molecular analyzes from the Western Mediterranean Agricultural Research Institute in the Antalya Region of the Mediterranean Region. To accomplish this objective, samples of genotypes in pomegranate species were taken under appropriate conditions and molecular analyzes were carried out in Isparta University of Applied Sciences Agricultural Sciences and Technologies Agricultural Biotechnology Laboratory.

As a result of analysis with SSR markers, pomegranate assortment has emerged as two main groups and 65% of the similarity has been detected between the groups as per the UPGMA method. The first main group consisted of 4 sub-groups. In the first sub-group Hicaz, in the second sub-group Asi, Batem Onur, Ernar, Batem Hicaz, the third sub-group Beynarı and the fourth sub-group Batem Esin, Batem Yılmaz and Ekşilik took place. The second main group is divided into 2 sub-groups. In the first sub-group Katırbaşı and in the second sub-group Fellahyemez took place. Polymorphisms that distinguish Batem Onur and Ernar from each other could not be produced hence these two assortments were grouped together. Hicaz, Beynar, Ekşilik, Katırbaşı and Fellahyemez types formed a subgroup alone. In the study, a close correlation between Aşınar and Batem Onur-Ernar, Batem Esin and Batem Yılmaz has been observed.

SSR findings of pomegranate species, creating a step in the selection of the next breeding parents in determining the span of pomegranate genotypes for comparison of the genetic collection can be used in the characterization of pomegranate genotypes.

Key Words: Marker, Molecular Characterization, SSRs, Pomegranate

2019, 24 page

TEŞEKKÜR

Bu araştırma için beni ynlemdiren, karşılaştığım zorlukları bilgi ve tecrübesi ile aşmamda yardımcı olan değerli Danışman Hocam Prof. Dr. Yaşar KARAKURT'a teőkrlerimi sunarım.

Bu çalışmanın başlangıç aşamasından bitişine kadar her zaman yardımcı olan, sabır gösteren ve desteklerini esirgemeyen hocam Sayın Doç. Dr. Dudu DEMİR, arazi çalışmalarımnda yardımlarını esirgemeyen Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nde (Batem) görev alan Ziraat Mühendisi Mehmet zdemir ve Alpaslan ŞAHİN'e teőkr ederim.

Tezimin her aşamasında beni yalnız bırakmayan eşime ve aileme sonsuz sevgi ve saygılarımı sunarım.

Halime Keriman ÇETİNKAYA
ISPARTA, 2019

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 4.1. SSR primer çiftleri ile nar genotip/çeşitlerinin UPGMA metodu ile gruplandırılması	14
---	----



ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 2.1. Türkiye ve Antalya’da yıllara göre nar üretimi	4
Çizelge 2.2. Şehirlere göre nar üretim miktarları (Ton).....	4
Çizelge 3.1. Nar genotipleri için kullanılan primer çiftleri.....	10
Çizelge 4.1. Nar SSR primer kombinasyonlarından elde edilen allel sayısı, bant büyüklüğü, gözlenen (H_o) ve beklenen (H_e) heterozigotluk durumu, tespit olasılığı (TO) ve polimorfik bilgi içeriği (PBI) değerleri	13
Çizelge 4.2. Nar genotipleri arasında Dice coefficient metoduna göre hesaplanan benzerlik değerleri	16



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

A	Adenin
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
B-merc	β -mercaptoethanol
Bp	Baz çifti
C	Sitozin
CTAB	Cetyltrimethylammonium bromür
dATP	Deoxyadenosine Triphosphate
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Deoxy- Nucleoside Triphosphate
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Acid
FAO	Food and Agriculture Organization (Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü)
g	Gram
GD	Çeşitler arasındaki ortalama genetik mesafe
He	Beklenen heterozigotluk
HCl	Hidrojen klorür
Ho	Gözlenen heterozigotluk
Kb	Kilobaz
M	Molar
MgCl ₂	Magnesium Chloride
ml	Mililitre
mM	Milimolar
NaCl	Sodyum klorür
ng	Nanogram
PCR	Polymerase Chain Reaction
PI	Ortalama kimlik
PVP	Polyvinylpyrrolidone
SCAR	Sequenced Characterized Amplified Region
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SRAP	Sequence-Related Amplified Polymorphism
SSR	Simple Sequence Repeat
TBE	Tris-borate-edta
Tris	(Hydroxymethyl) aminomethane
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu
UPGMA	Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Mean
μ	Mikro

1. GİRİŞ

Nar, *Lythraceae* familyasının (Kınagiller) *Punica* cinsinden çok yıllık çalı formuna sahip bir bitki olup, ticari değeri kadar kültürel hayatta da önemli bir yeri bulunan meyve türü olarak bilinmektedir. Narın kültür tarihi oldukça eskilere uzanmaktadır. Yetiştiricilik geçmişinin yaklaşık olarak 5000 yıl öncesine dayandığı çeşitli kaynaklarda belirtilmektedir (Glozer ve Ferguson, 2008).

Bu tür çok çeşitli iklim ve toprak koşullarına kolayca adapte olabildiği için deniz seviyesinden 1000 m yüksekliğe kadar her türlü ılıman iklimlerde ve toprak tipinde yetişebilmektedir. Genellikle fizyolojik özellikleri arasında boylarının çoğunlukla 2 ila 5 m. arasında olması, meyvelerinin 5-12 cm çapında olması, tane renklerinin beyazdan koyu kırmızıya kadar değişebilmesi, tatlarının ise çeşide bağlı olarak ekşi, mayhoş ve tatlı olması gibi özellikler yer almaktadır (Newman vd., 2007).

Nar bitkisinin meyveleri sofralık tüketimin yanı sıra, endüstri, gıda, temizlik, sağlık ve peyzaj gibi birçok alanda kullanılmaktadır. Dünya çapında en çok nar üretimi yapılan ülke Hindistan'dır. Bu ülkeyi İran, Türkiye, ABD ve Irak izlemektedir. Ülkemizde ise nar üretimi en fazla Akdeniz Bölgesinde yapılmakta olup bunu sırasıyla, Ege ve Güneydoğu Anadolu Bölgesi izlemektedir. Günümüzde bu denli önemli bir yeri olan bu meyvenin artan dünya nüfusuna karşı talepleri karşılama konusunda daha verimli çeşitlerin geliştirilmesi ve üretimi konusunda çalışmalar yapılması gerekmektedir. Geçmişte kullanılan klasik yöntemlere göre günümüzde kullanılan modern yöntemler zamandan, iş gücünden tasarruf ederek çalışmaların daha kısa sürede sonuçlanmasını sağlamaktadır.

DNA markörlerinin geliştirilmesi, bitki türleri arasında çeşitlerin belirlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. DNA markörleri hibridizasyona dayalı Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) ve Polimeraz Zincir Reaksiyonuna (PCR) dayalı Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD), Simple Sequence Repeat (SSR), Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP), Sequence Characterized Amplified Regions (SCAR) vb. olarak iki gruba ayrılmaktadır.

Bu tez çalışmasında 11 nar genotipi kullanılıp 11 SSR (Simple Sequence Repeats) primeri ile genetik tanımlamaları yapılmıştır. Elde edilen bulgular, populasyon içi genetik benzerlikler, akrabalık derecelerine ait DNA kimlik bilgilerinin (allel verileri) tespit edilmesi amaçlanmıştır. Bu tez çalışmasının amacı; SSR tekniği kullanılarak nar genotipleri arasındaki genetik farklılıkları ortaya koymaktır.

Türkiye’de nar türüne ait SSR bulguları, bölgede bundan sonraki ıslah çalışmalarına bir basamak oluşturacağı gibi, nar genotiplerinin yayılma alanlarının belirlenmesinde, genetik koleksiyonların karşılaştırılmasında da kullanılabilir. Son yıllarda PCR’a dayalı yeni markör sistemlerinin geliştirilmesi birçok meyve türünde olduğu gibi nar meyvesinde de yapılacak olan moleküler ıslah çalışmalarında stratejik rol oynayacaktır. Teknolojinin gelişmesiyle analiz başına harcanan emek, maliyet ve ıslah süreci azaltılarak çalışılan meyvelere ait detaylı kesin bilgiler elde edilecektir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Nar (*Punica granatum L.*), *Lythraceae* familyasına ait tropik ve subtropik iklim kuşağında yetiştirilen bir meyvedir. *Punica granatum*, vitamin ve mineral bakımından zengindir. Nar dünyanın birçok bölgesinde şifa, bereket olarak tanımlanmıştır. Geçmiş zamanlarda kutsal bir meyve olarak varsayılan nar, Yunan mitolojisinde, Hristiyanlarda ve İslam dininin çok eski zamanlarından beri varlığını sürdürmektedir (Şahin, 2013).

Nar uzun ömürlü bir bitkidir. Ağaçlar çalı benzeri ve yaklaşık 9 m. yüksekliğe kadar büyüyebilir. Nar bitkisi az çok dikenlidir. Ağacın kabuğu, bitki gençken kahverengi kırmızımsıdır ve olgunlaştıkça grimsi tona döner. Nar ağaçları toprağa dikilmesinden yaklaşık 5 yıl sonra verimli bir şekilde meyve vermeye başlarlar ve bu meyve verimi 15 yıl sonra azalır. Bir nar ağacının üretim miktarı çeşidine, yetiştirildiği coğrafi bölgeye ve üretim uygulamalarına bağlı olarak beşinci yılda 60-100 kg'a kadar çıkabilir. (Şahin, 2013).

Son yıllarda nar üretimindeki artışla beraber narın kullanım alanlarında bir çeşitlilik olmuştur. Nar genellikle taze olarak kullanılmakta olup bunun yanı sıra, nar ekşisi, meyve suyu, sirke, nar pekmezi, konserve, ilaç, boya, sitrik asit, hayvan yemi üretimi ve ilaç sanayi gibi çok çeşitli endüstri kollarında kullanılmaktadır. Nar, çeşitli iklim koşullarına adapte edilmiştir; bu nedenle geniş bir coğrafi dağılıma sahiptir. Nar yetiştiriciliği yaygın olarak Kuzey ve Güney Amerika, Güneybatı Asya ve Akdeniz Havzası'nda yapılmaktadır (Martínez-Romero vd., 2007).

Dünya genelinde 500'den fazla çeşidi bilinmektedir, ancak ticari olarak sadece birkaç (yaklaşık 50) çeşidin olduğu bilinmektedir (IPGRI 2001). Dünya çapında en çok nar üretimi yapılan ülke Hindistan'dır. Bu ülkeyi İran, Türkiye, ABD ve Irak izlemektedir. İran nar koleksiyonundan 700'den fazla nar alınmıştır (Zamani ve vd., 2007). Hindistan'da National Research Centre on Pomegranate (NRCP) Ulusal Nar Araştırma Merkezi, 2005 yılında Yeni Delhi'deki Hindistan Tarımsal Araştırma Konseyi tarafından kurulmuştur.

Günümüzde EUROSTAT ve Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) tarafından düzenli tutulan resmi istatistikler henüz mevcut değildir. Türkiye’de nar kıyıda 1000 m. yüksekliğe kadar hemen hemen her bölgede yetiştirilmesine rağmen, özellikle Akdeniz, Ege ve Güney Doğu Anadolu Bölgeleri nar yetiştiriciliğine en uygun koşulları sağlamaktadır. (Özgüven ve Yılmaz, 2000).

Türkiye’de yaklaşık olarak 50 ilde nar yetiştirilmektedir. Türkiye’de nar dikim alanlarının hızlı artışıyla birlikte, üretilen ve depolanan ürün miktarında da önemli artışlar olmuştur. Türkiye’de 2000’li yıllarla birlikte önemli miktarda kapalı nar bahçeleri kurulmasıyla üretim sürekli artmış ve 2018 yılında 537.847 tona ulaşmıştır (TÜİK, 2018). Bu yetiştiricilik içerisinde 55.172 dekar alanda 123.880 ton üretim ile Antalya ilk sırada yer almaktadır (Çizelge 2.1), (Çizelge 2.2).

Çizelge 2.1. Türkiye ve Antalya’da yıllara göre nar üretimi (Anonim, 2018)

Yıllar	Türkiye’deki nar üretim miktarı (Ton)	Antalya nar üretim miktarı (Ton)
2010	208.502	79.112
2011	217.572	82.933
2012	310.550	104.421
2013	383.085	104.815
2014	397.335	108.786
2015	445.750	107.237
2016	465.200	111.041
2017	502.606	113.040
2018	537.847	123.880

Çizelge 2.2. Şehirlere göre nar üretim miktarları (Ton) (Anonim, 2018)

İller	Üretim miktarı (Ton)
Antalya	123.880
Muğla	87.306
Mersin	83.159
Adana	67.688
Denizli	44.129
Hatay	22.012
Gaziantep	19.376
Aydın	15.122

Son zamanlarda PCR'a dayalı markörlerin kullanımı yaygınlaşmıştır. Bu markörlerden birisi olan RAPD tekniğinin tür ve çeşitlerin tanımlanmasında, SSR tekniğinin tür ve çeşitlerin ekolojik dağılım-genetik ilişkilerinin incelenmesinde, hibrit bitki tanısında, AFLP tekniğinin ise çok yakın bireylerin tanımlanmasında daha etkili sonuç verdiği saptanmıştır (Yıldırım ve Kandemir, 2001).

Bu tez çalışmasının amacı moleküler markörlerden SSR tekniği kullanılarak nar genotipleri arasındaki genetik farklılıkları ortaya koymaktır.

Zarei vd. (2018), çalışmalarında, İran'ın Fas eyaletindeki beş bölgeden 50 nar çeşidini ve 16 SSR markörü kullanılarak analizlerini yapmışlardır. Çalışmada kullanılan her SSR markörü polimorfiktir ve çalışılan numunelerde 48 fragman üretilmiştir. 16 SSR lokusunun beklenen ve gözlenen ortalama heterozigotluğu sırası ile 0.33 ve 0.48'dir. Polimorfik bilgi içeriği, ortalama olarak 0.41, 0.18 ve 0.58 arasında değişmiştir. Popülasyonlar arasında çeşitlilik endeksleri konusunda bazı farklılıklar olduğu belirtilmiş, farklı popülasyonlarda bazı özel aleller tespit edilmiş ve bu katılımların genetik korunma için önemini ortaya konulmuştur. Sonuç olarak farklı bölgelerden gelen nar çeşitleri arasında nispeten yüksek genetik farklılıklar görülmüştür. Bu çalışma; Fars eyaletinde narın genetik çeşitliliğini, popülasyon yapısını değerlendirerek gelecekteki koruma ve üreme programlarına yardımcı olmuştur.

Bir diğer çalışmada Luo vd. (2018), 13 SSR markörü kullanarak 136 nar çeşidinin genetik çeşitliliğini ve popülasyon yapısını tespit etmişlerdir. Locus başına ortalama alel sayısı 6.31 iken, gen çeşitliliği ortalama 0.28, 0.16 ve 0.37 arasında değişmiştir. Polimorfik bilgi içeriği (PIC), ortalama 0.22 değerinde 0.14 ve 0.29 arasında değişmiştir. Çeşitler arasındaki ortalama genetik mesafe (GD) 0.32 olarak tesbit edilmiştir. Analiz çeşitlerini ülkelere göre iki farklı alt gruba ayırmışlardır (Çin ve Myanmar). Sonuçlar 13 SSR markörünün polimorfik olduğunu göstermiştir. Aynı coğrafi bölgeden gelen çeşitler birbirine daha yakın; fakat farklı bölgelerden gelen çeşitler arasında yoğun gen akışı yaşanmıştır. Sonuçlar, verimli seçim ıslahı ve çeşitliliğin korunması için önemli bilgiler sağlamıştır.

Türkiye nar için birçok değerli genetik kaynağa sahiptir. Bunun yanı sıra, önemli genetik kaynakların tanımlanması ve karakterizasyonu hakkında çok fazla çalışma yapılmamıştır. Bu konu üzerine çalışmalarında Türkiye'den 78 adet nar çeşidinin karakterini belirlemek amacıyla yeni mikrosatellit markörler kullanılmıştır. 6 SSR primerini kullanarak, toplam 41 alel, lokus başına ortalama 4.6 alel ve 0.366 ortalama kimlik (PI) değeri olasılığı ile karakterize edilmiştir. Bu veriler, nar germplazmasında yüksek seviyede polimorfizm olduğunu göstermiştir. 30 çeşit arasında 5 benzer grup tespit edilmiştir. Bu marköre dayalı çalışma, Türkiye'de nar girişimlerinin belirgin bir şekilde tanımlanması için veri tabanına doğru atılan ilk adımdır. Nar yetiştirme programlarını sürdürülebilir bir şekilde yönetmek ve yerel nar genetik kaynaklarını korumak için stratejiler oluşturulmuştur. Bu stratejiler sonucunda, bitki materyali çoğaltılmadan bir nar çekirdeği germplazm koleksiyonu geliştirmek için temel bilgiler sunulmuştur (Çalışkan vd., 2017).

Zhang vd. (2017), çalışmalarında; EST-SSR markörlerinin geliştirilmesini amaçlamıştır. Yumuşak tohumlu nar yetiştirilmesi nar ıslahında önemlidir. Yumuşak çekirdekli nar oluşumunda yer alan moleküler mekanizmaları kapsamlı şekilde anlamak için bir dizi etiketi (EST) kaynağı oluşturulmuştur. CLUSTALX programı kullanılarak 907 ortak genin elde edildiği 2000 geçerli dizi üretilmiştir. Bu ortak genler arasında 51'i benzerlik göstermiştir. 433'ünde bilinmeyen fonksiyonlarla protein eşleşmesi olmuştur. 423 ortak gen bilinmeyen 13 ileri kategori ile sınıflandırılmıştır. Bu kategorilerin arasında, protein sentezi, hücre yapısı, proteinin hedef ve depolaması, ikincil metabolizma, sinyal iletimi ve taşıyıcılar arasında, sırasıyla,%8, %8, %4, %7, %6 ve%17 olarak gerçekleşmiştir. Ayrıca, nar için 10 adet polimorfik sekans EST-SSR markörü başarıyla geliştirilmiştir. Sonuçlar, nar yetiştiriciliğinde gelecekteki faaliyetler için yeni bir yöntem sunmaktadır.

Bu araştırma Ürdün'de 14 nar çeşidi üzerinde RAPD ve SSR markörleri kullanılarak yapılmıştır. Çalışılan nar toprakları arasındaki Öklid mesafesi 12.01 ile 3.33 arasındadır. Ortalaması da 7.65'dir. Meyve özellikleri 1. birleşende %28.92 olurken 2. de %17.15, 3. de %12.81 olmuştur. Bu yüzden daha az değişikliğe sebep olmuştur.

RAPD deney sonucuna dayanarak genetik mesafe 0.24 ile 0.66 arasında değişmekte olup çalışılan nar tarlalarının arasında önemli düzeyde genetik sapma olmuştur. Çalışılan nar çeşitlerini belirlemek için mevcut polimorfik SSR markörleri çok az olduğu için monomorfik markörler kullanılmıştır. Meyve özelliklerini temel alan dendegrom sonuçları RAPD sonuçları ile karşılaştırıldığında tutarlı olmadığını göstermiştir. Meyve ve aril özellikleri nar çeşitlerinde narın ticari kullanılmasında gen kaynağı olarak düşünülebilir (Owais vd., 2016).

Pakistan, nar genetik kaynakları bakımından zengin olmasına rağmen; ülkedeki üretimi az olan bir meyvedir. Bu alışma ülkedeki morfolojik ve moleküler çeşitlilik, meyvelerin 13 morfolojik özelliği, 29 SSR markörü ve 42 nar kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Meyve uzunluğu (mm), meyve çapı (mm), ta uzunluğu (mm), gövde kalınlığı (mm), aril ve tohum ölçüleri (mm) temel bileşen analizi (PCA), ilk altı prensipte toplam morfolojik çeşitliliğin %93,9'unu açıklamıştır. Meyve ağırlığı ve boyutları, birbirinden oldukça farklı ve birbirleriyle uyum içerisindeydi. Genetik analiz, MAF, GD, HZ ve PIC'nin, seçilen erişimlerin genomik DNA'sında sırasıyla 0.5981, 0.497 0.404 ve 0.425 ortalama değerini göstermekte; ayrıca, POM_AAC1 primerinin maksimum PIC değeri 0.550 olan çok polimorfik olduğu kanıtlanmıştır. Sonuç olarak, morfolojik ve moleküler alışmalar, Pakistan'ın nar germplazmasının geniş genetik katkı sağlamıştır. Bu eşitlilik genotip gelişimi için ışlah programlarında verimli bir Şekilde kullanılabilereği ifade edilmiştir (Nafees vd., 2015).

Bu alışmada, 454-GS-FLX Titanyum teknolojisini kullanarak iki fenotipik açıdan farklı erişimden bir transkriptomu yeniden oluşturmuştur. Bu veriler, 45.187 fonksiyonel işlevlerini keşfetmek için kullanılmıştır. Ayrıca, 7.115 basit sekans tekrarlı (SSR'ler) ve 6.500 tek nükleotid polimorfizminin (SNP) genetik çeşitlilik kaynağı derlenmiştir. Dünyadaki farklı coğrafi bölgelerden girişleri içeren, Tarımsal Araştırmalar rgt'ndeki (ARO) geniş nar germplazm koleksiyonunun genetik yapısını araştırmak için 480 SNP'den oluşan bir alt küme örneklendirilmiştir. Bu SNP alt kümesinin polimorfik olduğu, minör allel frekansı %10,7 lokus ile (MAF, 0,05) tespit edilmiştir. Bu SNP alt kümesinin polimorfik olduğu, minör allel frekansı

%10,7 lokus ile (MAF, 0,05) tespit edilmiştir. Bu SNP'ler, ARO nar sınıflandırılmasında başarıyla kullanılmıştır. 2 büyük sınıfın grubun sınıflandırılmasında bu SNP ler kullanılmıştır. 1.si Hindistan, diğeri ise Çin ve İran'dır. 2.si ise çoğunlukla bilinmeyen ülke kökenli olan Akdeniz havzasındaki ülkelerdir. Bu çalışma, yüksek verimli bir transkriptom ve genetik markör altyapısı oluşturmaktadır. Bununla birlikte, dünyadaki nar türleri arasındaki genetik ilişkilere yeni bir ışık tutmakta ve genetik yapılarını daha doğru bir şekilde tanımlamaktadır (Ophir vd., 2014).

Bu çalışmanın amacı; (a) Güneydoğu İtalya'nın Puglia bölgesinde toplanan bir dizi nar genotipinin morfolojik ve biyokimyasal karakterizasyonunu sürdürmek ve (b) mikrosatellit markörler ile genetik çeşitliliği araştırmaktır. İtalyan ve İsrail kökenli, tatlı ve ekşi 13 narın genotipinin değerlendirilmesi için iki yıllık bir çalışma yapılmıştır. İncelenen parametrelerin çoğunda, özellikle meyvelerin büyüklük ve olgunluk indeksleri, titre edilebilir asitlik, toplam polifenol içeriği, meyve sularının antioksidan aktivitesi, tohumların yağ içeriği için önemli farklılıklar gözlenmiştir. Nar koleksiyonundaki genetik analiz, farklı genotipleri ayırt edebilen ve genetik mesafeleri tahmin edebilen 53 SSR lokusu tanımlamıştır. Dendrogramda nar genotipleri, hem coğrafi orjin ve morfolojik-kimyasal özelliklere (cilt rengi, ebat, tat, polifenolik içerik) göre kümelenmiştir, hem de SSR markörlerinin narın genetik çeşitliliğinin keşfedilmesinde etkili olabileceğini öne sürmektedir (Ferrara vd., 2014).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu çalışma, 2017-2019 yıllarında Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Tarım Bilimleri ve Teknolojileri Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.1. Materyal

Araştırmada bitkisel materyal olarak; ülkemiz nar gen kaynaklarına ait 11 nar genotipi kullanılmıştır. Araştırmada kullanılan 11 nar genotip, küçük özel mülk bahçelerinden ve Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü (Batem)'den temin edilmiştir.

BATEM'den seçilmiş genotipler: Hicaz nar, Katırbaşı, Aşınar, Batem Esin nar, Batem Hicaz nar, Batem Yılmaz nar, Batem Onur nar, Ekşilik, Ernar, Fellahyemez Küçük özel mülk bahçesinden seçilmiş genotipler: Bey narı .

3.2. Yöntem

3.2.1. DNA izolasyonu için yaprak örneklerinin alınması

DNA izolasyonu için hastalık ve zararlılardan uzak ve yeni açmakta olan genç yapraklar kullanılmıştır. Yapraklar uygun koşullarda laboratuvara getirildikten sonra DNA izolasyonu yapılınca kadar -80°C 'de saklanmıştır.

3.2.2. DNA izolasyonu

Nar DNA'sı 50-60 mg yaprak materyalinden, CTAB ekstraksiyon protokolü kullanılarak izole edilmiştir (Weising vd., 1991). Bu amaçla, yaprak örnekleri porselen havan içinde sıvı azot kullanılarak parçalanmıştır. Örnekler üzerine 500 µl DNA izolasyon tampon çözeltisi (1M Tris-HCl pH 8.0, 0.5 M EDTA, 5 M NaCl, 20 g CTAB) ve 0.8 g PVP, 100µl β-mercaptoethanol ilave edilmiş ve örnekler bir müddet daha tampon çözeltisi içinde ezildikten sonra eppendorf tüplerine alınmıştır. Homojenize örnekler 55°C su banyosu içerisinde 1 saat süreyle inkübe edilmiş ve inkübasyon boyunca örnekler belli aralıklarla karıştırılmıştır. İnkübasyondan sonra örneklere 500 µl kloroform eklenip tüpler yavaşça karıştırıldıktan sonra 16 rcf'de 7 dakika santrifüj edilerek, süpernatant yeni eppendorf tüplerine aktarılmıştır.

Süpernatant üzerine 0.08 hacminde soğuk 7.5 M amonyum asetat ve 0.54 hacminde soğuk izopropanol ilave edilerek karıştırılmış ve 30-40 dakikalık süreyle buz üstünde inkübe edilmiştir. Çözelti 16 rcf'de 3 dakika santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırılmıştır. Sonra çökelti (pellet) önce 700 µl %70'lik soğuk etanol ilave edilerek karıştırılmış, sonra 16 rcf'de 1 dakika santrifüj edilerek sıvı kısmı atılmıştır. Pelete 700 µl %95'lik soğuk etanol ilave edilerek karıştırılmış ve 16 rcf'de 1 dakika santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırılmıştır. Daha sonra peletin ağız kısmı aşağıya gelecek şekilde 15 dakika kurutulmuştur ve kuruyan DNA'nın üzerine 50 µl TE tampon çözeltisi (1 M Tris-HCl pH 8.0, 0.5 M EDTA) konularak DNA oda sıcaklığında çözülmüştür. DNA kalitesi ve konsantrasyonu her örneğin %1,2'lik agaroz jel elektroforezinde koşturulan standart λ-DNA' larla mukayese edilmesi suretiyle ve de spektrofotometre de 260 ile 280 nm dalga boylarında okumayla kontrol edilmiştir.

3.2.3. SSR analizi

Çalışmada daha önceden gerçekleştirilen birçok araştırma kapsamında kullanılan ve başarılı sonuçların alındığı SSR primerleri arasından seçilen 16 SSR primer çifti kullanılmıştır.

Çizelge 3.1. Nar genotipleri için kullanılan primer çiftleri

SSR	Forward (İleri)	Reverse (Geri)
UDO99	AAA AAC ACA ACC CGT GCA AT	AAA TTC CTC CAA GCC GAT CT
DCA4	TTAACTTTGTGCTTCTCCA	CC AGTGACAAAAGCAAAAG
GAPU59	CCCTGCTTTGGTCTTGCTAA	CAAAGGTGCACTTTCTCTCG
GAPU103	TGAATTTAACTTTAAACCCACACA	GCATCGCTCGATTTTATCC
GAPU47	GATCAGCTTAGTCTCATATTCTCTCTC	CCTCGACTGATTTACACACCA
Ch05e03	CGAATATTTTCACTCTGACTGGG	CAAGTTGTTGTAAGTCTCCGAC
GD147	TCCCGCCATTTCTCTGC	AAACCGCTGCTGCTGAAC
GD15	CGAAAGTGAGCAACGAACTCC	ACTCCATCATCGGGTGGTG
RİM019	ATTCAAGAGCTTAACTGTGGGC	CAATATGCCATCCACAGAGAAA
RİM036	AGCAACCACCACCTCAACTAAT	CTAGCAGAATCACCTGAGGCTT
RHM003	CCATCTCCAATTCAGTTCTTCC	AGCAGAATCGGTTCTTACAAGC
CHO49	TGGAGAGATGGCTCGAGGTT	TGGTTGCTGGGAATTGAACTC
DCA16	TTAGGTGGGATTCTGTAGATGGTTG	TTTTAGGTGAGTTCATAGAATTAGC
RİM015	CGACACCGATCAGAGCTAATTC	ATAGTTGCATTGGCAGGCTTAT
UDO24	GGATTTATTTAAAAGCAAAACATACAAA	CAATAACAAATGAGCATGATAAGACA
RHM001	GGTTCGGATAGTTAATCCTCCC	CCAATGTTGTAATGCAGGAA

UDO99, UDO24, DCA4, DCA16, RHM001, RHM003 primer çiftleri için PCR reaksiyonu: PCR reaksiyonu toplam hacim 50 µl olacak şekilde aşağıdaki bileşenlerden oluşmuştur. Reaksiyon koşulu 3 µl DNA, 1 µl dNTPs, 4 µl MgCl₂ , 1 µl Taq DNA polimeraz, 2 µl her bir primer, 1 X PCR buffer'dan (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH: 8.3, 1.1 mM MgCl₂ , 0.01% gelatin) 5 µl ve son konsantrasyon ddH₂ O ile tamamlanarak oluşturulmuştur. PCR protokolü, 95°C'de 3dk, ardından 35 döngü olacak şekilde, 95°C'de 60 sn, 52°C'de 60 sn, 72°C'de 60 sn ve son olarak 72°C'de 10 dk şeklinde yapılmıştır. PCR işleminden sonra PCR ürünleri %2,2'lik agaroz jel içerisinde 90 volt elektrik akımı altında 1 saat 15 dakika süreyle yürütülmüştür (Dirlewanger vd., 2002).

GAPU59, GAPU103, GAPU47, Ch05e03, GD147, GD15, RİM019, RİM020, RİM036, CHO49 primer çiftleri için PCR reaksiyonu: PCR reaksiyonu toplam hacim 20 µl olacak şekilde aşağıdaki bileşenlerden meydana gelmiştir. Reaksiyon koşulu 1,2 µl DNA, 1 µl dNTPs, 1,2 µl MgCl₂ , 0,5 µl Taq DNA polimeraz, 0,8 µl her bir primer, 1 X PCR buffer'dan (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH: 8.3, 1.1 mM MgCl₂ , 0.01% gelatin) 2 µl ve son konsantrasyon ddH₂ O ile tamamlanarak oluşturulmuştur. PCR protokolü, 95°C'de 3dk, ardından 35 döngü olacak şekilde, 95°C'de 60 sn, 52°C'de 60 sn, 72°C'de 60 sn ve son olarak 72°C'de 10 dk şeklinde yapılmıştır. PCR işleminden sonra PCR ürünleri %2,2 'lik agaroz jel içerisinde 90 volt elektrik akımı altında 1 saat 15 dakika süreyle yürütülmüştür (Dirlewanger vd., 2002; Fathi vd., 2008).

3.2.4. Moleküler verilere ait analizler

Araştırmada kullanılan genotiplere ait genetik analizler Sell vd. (2007)'de belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Buna göre; genetik parametreler (her lokusa ait allel sayısı (n), beklenen heterozigotluk (He), gözlenen heterozigotluk (Ho) oranı, allel frekansı, sessiz (null) allel frekansı (r) ve tespit olasılığı (Probability of Identity) (PI) IDENTITY 1.0 (Wagner ve Sefc, 1999) yazılım programı ile, benzerlik oranı indeksi ise Microsat (Minch ve ark., 1995) programı kullanılarak bulunmuştur. Genotiplere ait dendogram NTSYS (versiyon 2.02g, Exeter Software, Setauket, NY) yazılım programı kullanılarak oluşturulmuş ve görüntülenmiştir. Dendogram için ise

UPGMA (Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic means)
yöntemi kullanılmıştır.



4. BULGULAR VE TARTIŞMA

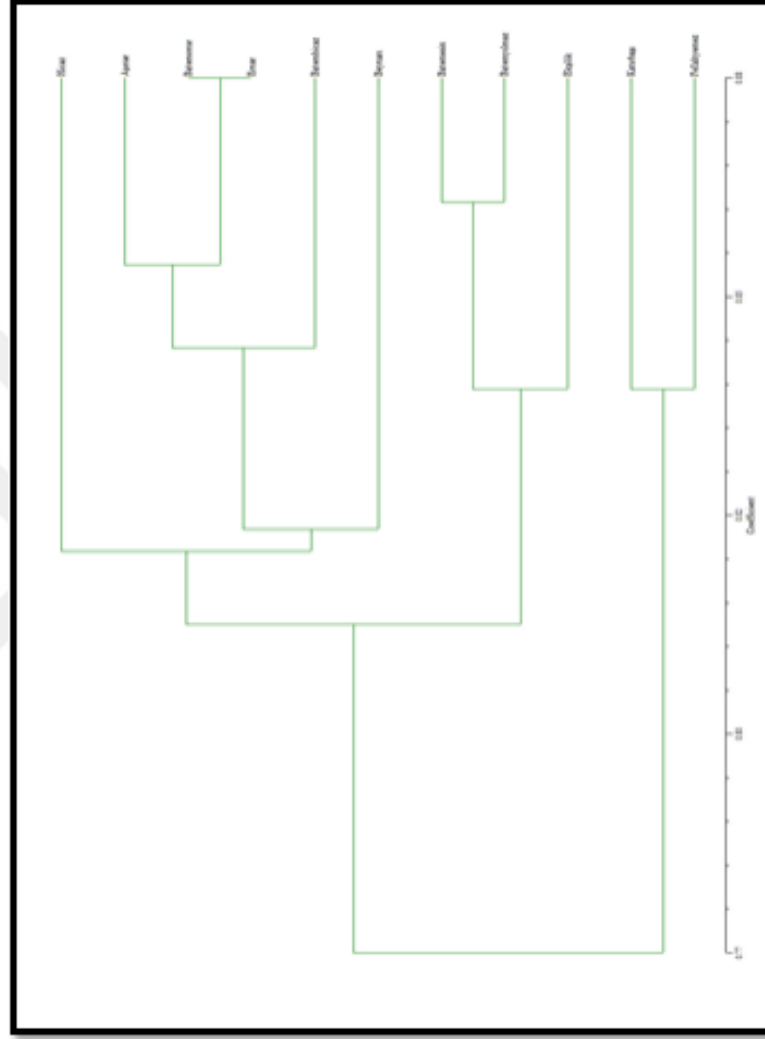
4.1. Nar Genotiplerinde SSR Analiz Sonuçları

Çizelge 4.1. Nar SSR primer kombinasyonlarından elde edilen allel sayısı, bant büyüklüğü, gözlenen (Ho) ve beklenen (He) heterozigotluk durumu, tespit olasılığı (TO) ve polimorfik bilgi içeriği (PBİ) değerleri

Primer	Allel sayısı	Spesifik Allel sayısı	Bant büyüklüğü (bç)	Ho	He	TO	PBİ
UDO99	12	4	220-441	0,682	0,703	0,08	0,83
DCA4	11	3	145-386	0,75	0,79	0,37	0,632
GAPU59	8	3	224-341	0,68	0,76	0,796	0,75
GAPU103	12	5	141-322	0,709	0,796	0,280	0,649
GAPU47	9	3	133-251	0,62	0,64	0,32	0,574
Ch05e03	13	4	161-215	0,742	0,715	0,082	0,824
GD147	16	5	121-172	0,856	0,831	0,069	0,82
GD15	3	1	142-159	0,021	0,023	0,951	0,04
RİM019	15	5	162-234	0,541	0,876	0,223	0,452
RİM036	15	6	221-363	0,641	0,849	0,162	0,424
RHM003	16	6	210-291	0,63	0,82	0,06	0,72
CHO49	11	4	172-224	0,751	0,709	0,076	0,811
DCA16	12	5	139-392	0,71	0,707	0,29	0,711
RİM020	14	6	215-376	0,529	0,853	0,215	0,461
UDO24	13	5	231-462	0,672	0,692	0,09	0,81
RHM001	15	6	207-312	0,71	0,79	0,08	0,76
Toplam	195	71					
Ortalama	12,19	4,44	178-309	0,64	0,722	0,259	0,642

16 SSR primer çifti kullanılarak genotipler arasındaki genetik farklılık belirlenmiştir: SSR analizi sonucunda toplam allel sayısı 195, spesifik allel sayısı 71 adet ve bant büyüklüğü ise ortalama 178-309 bç arasında belirlenmiştir. Locus başına allel sayısı 3-16 arasında, ortalama 12,19 olarak belirlenmiştir. Ayrıca, çoğu primer çifti için beklenen heterozigotluğun (He) gözlenen heterozigotluktan (Ho) daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ch05e03, GD147, CH049 ve DCA16 primerlerinde beklenen heterozigotluk (He) gözlenen heterozigotluktan (Ho) daha düşük görülmüştür. En fazla allel sayısı GD147 (16 adet) ve RHM003 (16 adet), en yüksek beklenen heterozigotluk RİM019 (0,876) primerinde, gözlenen heterozigotluk değeri ise GD147 (0,856) primerinde tespit edilmiştir. Polimorfik bilgi içeriği (PBİ) 0,04 ve 0,83 arasında değişim göstermiştir. En düşük PBİ değeri

(0,04) GD15 primerinde, en yüksek (0,83) ise UDO99 primerinde elde edilmiştir. En düşük tespit olasılığı (0,06) ile RHM003 en yüksek (0,951) GD15 primer çiftinde belirlenmiştir.



Şekil 4.1. SSR primer çiftleri ile nar genotip/çeşitlerinin UPGMA metodu ile gruplandırılması

Dice benzerlik değeri kullanılarak çeşit ve genotiplerin birbirleri ile olan ilişkilerini açığa çıkarmak için gruplandırma analizi UPGMA metodu kullanılarak NTSYS-pc programı ile yapılmıştır. Elde edilen gruplandırmanın benzerlik değerleri 0.77-0.88 arasında değişmiştir. Nar genotipleri arasında yapılan grup analizinde iki ana grup olduğu görülmüştür. İlk ana grup kendi içinde 4 alt gruptan meydana gelmiştir. İlk alt grupta Hicaz, ikinci alt grupta Aşı, Batem Onur, Ernar, Batem Hicaz, üçüncü alt

grupta Beynarı ve dördüncü alt grupta Batem Esin, Batem Yılmaz ve Ekşilik yer almıştır. İkinci ana grup 2 alt gruba ayrılmıştır. İlk alt grupta Katırbaşı, ikinci alt grupta Fellahyemez yer almıştır. Batem Onur ve Ernar çeşitlerini birbirlerinden ayırt edecek polimorfizmler üretilmemiş ve bu iki çeşit bir arada gruplanmıştır. Hicaz, Beynar, Ekşilik, Katırbaşı ve Fellahyemez çeşitleri tek başına bir alt grup oluşturmuştur. Çalışmada Aşınar ve Batem Onur-Ernar, Batem Esin ve Batem Yılmaz arasında yakın korelasyon olduğu gözlemlenmiştir.

Nar genotipler için benzerlik matrisi Dice coefficient metodu kullanılarak NTSYS-pc programı yardımıyla hesaplanmıştır. Tüm genotipler kullanılarak hesaplanan Dice coefficient değerleri Çizelge 4.2'de verilmiştir.

Bulunan benzerlik katsayıları 0.700-0.883 arasında değişim göstermiştir. Elde edilen en düşük değer Ernar ile Katırbaşı arasında 0.700 olarak belirlenmiştir. Batem Onur ile Ernar arasındaki benzerlik katsayısı 0.883 olarak en yüksek benzerlik değeri olarak tespit edilmiştir. Benzerlik katsayısı 0.700 olan 1 adet, 0,717-0,775 arasında değişen 14 adet, 0,783-0,850 arasında 32 adet 0,858-0,883 arasında 8 adet örnek bulunmuştur. En yüksek sayıda benzerlik katsayısına 0,783-0,850 değerleri arasında ulaşılmıştır.

Çizelge 4.2. Nar genotipleri arasında Dice coefficient metoduna göre hesaplanan benzerlik değerleri

	Hicaz	Katırbaşı	Aşmar	Batem Esin	Batem Hicaz	Batem Yılmaz	Batem Onur	Eksilik	Ernar	Fellah Yemez	Bey Narı
Hicaz	1.000										
Katırbaşı	0,767	1.000									
Aşmar	0,858	0,742	1.000								
Batem Esin	0,775	0,808	0,800	1.000							
Batem Hicaz	0,833	0,767	0,858	0,825	1.000						
Batem Yılmaz	0,825	0,792	0,850	0,867	0,808	1.000					
Batem Onur	0,833	0,800	0,875	0,842	0,867	0,858	1.000				
Eksilik	0,767	0,817	0,792	0,858	0,817	0,825	0,833	1.000			
Ernar	0,767	0,700	0,842	0,775	0,817	0,808	0,883	0,783	1.000		
Fellah Yemez	0,725	0,842	0,750	0,817	0,758	0,800	0,775	0,808	0,725	1.000	
Bey Narı	0,808	0,725	0,833	0,783	0,792	0,833	0,842	0,808	0,825	0,717	1.000

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Değişen çevre şartlarına karşın hızla büyümekte olan dünya nüfusunun beslenmesi sorunu, iklim değişikliği ve küresel ısınma şeklinde kendini gösteren küresel sorunlar, bitki genetik kaynaklarının önemini ve değerini ortaya koymaktadır. Artan dünya nüfusunun gıda gereksinimi günümüze kadar bir ölçüde girdi kullanımı ve yüksek verimli çeşitler geliştirmek yolu ile karşılanmaktadır (Rao ve Hodgkin, 2002; Güleç vd., 2010).

Çevre sorunlarının sınır aşan niteliğinin tüm dünyada belirgin bir şekilde hissedilmesine paralel olarak, çözümlerin geliştirilmesine yönelik çalışmaların geçtiğimiz yüzyılın ikinci yarısı uluslararası düzeyde yoğunlaştığı bir dönemdir. Bitki Biyoteknolojisi ve Genetik Mühendisliğindeki gelişmeler 1990'lı yıllardan itibaren klasik ıslah yöntemlerinin yanı sıra DNA ile ilişkili moleküler çalışmaların hızını artırmıştır. Klasik ıslah metotlarının dışında geliştirilen biyoteknolojik ıslah yöntemleri ile istenilen hedeflere uygun ürünlerin elde edilmesi mümkün hale gelmiştir. Birtakım morfolojik kriterler ya da proteinler temelinde yapılan karakterizasyonlar yerini tamamen moleküler temelli olarak yapılan DNA çalışmalarına bırakmıştır (Bradshaw, 2017).

Genetik kaynaklar, canlıların gelişimini yönlendiren genleri içermektedirler. Bu genlerin farklı kombinasyonları şimdiye kadar yapılmış, gelecekte yapılacak bitki ve meyve ıslahı çalışmaları için son derece önemli olan genetik çeşitliliğin kaynağını oluşturmaktadır.

Genetik çeşitliliğin bitkilerde nesiller boyunca sürdürülebilmesi açısından kullanılan bitki gen kaynakları ve gen havuzları oldukça kritik öneme sahiptirler. Bitki genetik kaynaklarının tarımsal ve ekonomik açıdan değer kazanabilmesi için bunların çeşitli ürünlerin ve özelliklerin elde edilmesinde kullanılabilmesi amacıyla doğru ve uygun tekniklerle değerlendirilmesi gereklidir.

Zirai açıdan verim ve kalitenin artırılmasında, çeşitli hastalıklara ya da çevresel patojenlere dirençli hatların elde edilmesinde, istenilen karakterlerin sağlanmasında bitki genetik kaynaklarının doku ve hücre kültürü, gen transferi, Moleküler Markör Destekli Seleksiyon (MAS), Kantitatif Karakter Lokusu (QTL) haritalama vb. gibi birçok yeni biyoteknolojik yöntemlerin kullanılarak yeni klonların ve nesillerin oluşturulması sağlanmaktadır (Henry, 2017).

Yüksek organizmalarda henüz görevleri bilinmeyen, ancak düzenleyici rollere sahip olduğu düşünülen rastgele tekrarlanan DNA bölgeleri bulunmaktadır. Tekrarlanan DNA'ların sağındaki ve solundaki zincirler o diziyeye spesifiktir. Bu dizinler SSR primerlerini dizayn etmek için kullanılarak belli bir lokus PCR'le klonlanıp çoğaltılırlar. PCR ürünleri ise jeller üzerinde büyüklüklerine göre ayrıldıktan sonra gümüş nitrat, floresan veya etidium bromid yöntemlerinden birisi ile belirlenir. Polimorfizm, kaynağını tekrar sayıdan alır ve aynı sayıdaki tekrarları temsil eden her bant, farklı bir allele işaret eder. Tekrar sayısındaki farklılıklar ise DNA replikasyonu sırasındaki kaymalardan kaynaklanır. SSR markörleri genetik haritalama ve genetik çeşitliliğin belirlenmesinde kullanılmaktadır (Gülşen ve Mutlu, 2005).

Mikrosatelitler (SSR markörleri), bitki türlerinde genetik çeşitlilik ve akrabalık ilişkilerinin belirlenmesinde özel bir yere ve öneme sahiptirler. Her tür için geliştirilen mikrosatelitler tür içi genetik çeşitlilik ve akrabalığı daha objektif olarak tespit edebilmektedir. Ayrıca, bir tür için geliştirilen mikrosatelitler yakın akraba türleri için de transfer edilebilir veya kullanılabilir özelliktedirler.

Yapılan bu çalışmada nar genotiplerinin akrabalık ilişkilerini belirlemek amacı ile SSR moleküler markör tekniği kullanılmış olup, 11 nar genotipinin moleküler karakterizasyonu yapılmış, genotipler arasındaki genetik ilişki ortaya konulmuştur. Moleküler incelemeye alınan 11 nar genotipinin birbirleri içerisinde benzerlikleri olmasıyla birlikte farklılıkları da ortaya çıkmıştır.

Çalışmadan elde edilen verilere göre toplam allel sayısı 195, spesifik allel sayısı 71 adet ve bant büyüklüğü ise ortalama 178-309 bp arasında belirlenmiştir. Lokus

başına allel sayısı 3-16 arasında, ortalama 12,19 olarak belirlenmiştir. Ayrıca, çoğu primer çifti için beklenen heterozigotluğun (He) gözlenen heterozigotluktan (Ho) daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Benzerlik dendrogramı incelendiğinde çalışmada kullanılan çeşitlerin en az %65 oranında benzerlik gösterdiği belirlenmiştir.

Nar genotipleri arasında yapılan grup analizinde iki ana grup ortaya çıkmıştır. İlk ana grup kendi içinde 4 alt gruptan meydana gelmiştir. İlk alt grupta Hicaz, ikinci alt grupta Aş1, Batem Onur, Ernar, Batem Hicaz, üçüncü alt grupta Beynarı ve dördüncü alt grupta Batem Esin, Batem Yılmaz ve Ekşilik yer almıştır. İkinci ana grup 2 alt gruba ayrılmıştır. İlk alt grupta Katırbaşı, ikinci alt grupta Fellahyemez yer almıştır. Batem Onur ve Ernar çeşitlerini birbirlerinden ayırt edecek polimorfizmler üretilmemiş ve bu iki çeşit bir arada gruplanmıştır. Hicaz, Beynar, Ekşilik, Katırbaşı ve Fellahyemez çeşitleri tek başına bir alt grup oluşturmuştur. Çalışmada Aşınar ve Batem Onur-Ernar, Batem Esin ve Batem Yılmaz arasında yakın korelasyon olduğu gözlemlenmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre nar genotiplerinin tanımlama ve sınıflandırmalarının yapılabilmesi için SSR markörlerinin kullanışlı olduğu sonucuna varılmıştır. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, nar genotiplerinin yayılma alanlarının belirlenmesinde, genetik koleksiyonların karşılaştırılmasında, nar genotiplerinin karakterizasyonunda ve gelecekte yapılacak ıslah programlarında ebeveyn seçiminde kullanılabilirliğine sahiptir.

Çalışmalar sonucunda, SSR markörleri, nar meyvesinin genetik çeşitliliğini değerlendirmek amacıyla kullanılabilir. Sonuç olarak, nar genotiplerinin karakterizasyonuna ve gelecekte yapılabilecek ıslah çalışmalarına ışık tutabilir.

KAYNAKLAR

- Anonim (2001). International Plant Genetic Resources Institute. IPGRI, https://www.bioversityinternational.org/fileadmin/_migrated/uploads/tx_news/IPGRI_thematic_report_2000-2001_861.pdf (Erişim Tarihi:17.02.2019)
- Anonim (2018). Veri tabanı. Türkiye İstatistik Kurumu, <https://biruni.tuik.gov.tr/medas/?kn=92&locale=tr> (Erişim tarihi: 25 NİSAN 2019)
- Anonim (2019). National research centre on pomegranate (NRCP), https://www.researchgate.net/profile/N_Singh9 (Erişim tarihi: 19 NİSAN 2019)
- Bassil, N. V., Ferna'ndez-Ferna'ndez, F., Graham, J., Castillo, N. R. F. & Reed, B. M. (2010). Microsatellite markers for raspberry and blackberry. *American society for horticultural science*, 135(3), 271–278.
- Bradshaw, J. E. (2017). Plant Breeding Past. Switzerland. Springer.
- Çalışkan, O., Bayazıt, S., Öktem, M. & Ergül, A. (2017). Evaluation of the genetic diversity of pomegranate accessions from Turkey using new microsatellite markers. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 41, 142-153. <https://doi:10.3906/tar-1606-124>
- Dirlewanger, E., Cosson, P., Tavaud, M., Aranzana, M., Poizat, C., Zanetto, A., Arús P. & Laigret P.(2002). Development of microsatellite markers in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] and their use in genetic diversity analysis in peach and sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 105(1),127-138. <https://doi.org/10.1007/s00122-002-0867-7>
- Ercişli, S., Ipek, A. & Barut, E. (2011). SSR marker bazlı DNA parmak izi ve zeytin türlerinin tanımlanması (*Olea europaea*). *Biochemical Genetics*, 49 (9-10), 555-61. <https://doi.org/10.1007/s10528-011-9430-z>.
- Ferrara, G., Giancaspro, A., Mazzeo, A., Giove, S. L., Matarrese, A. M. S., Pacucci, C., Punzi, R., Trani, A., Gambacorta, G., Blanco, A. & Gadaleta A. (2014). Characterization of pomegranate (*Punica granatum* L.) genotypes collected in Puglia region, Southeastern Italy. *Scientia Horticulturae*, 178, 70-78. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2014.08.007>
- Glozer, K. & Ferguson, L. (2008). Pomegranate Production in Afghanistan, *UCDAVIS College of Agricultural & Environmental Sciences*, 1-32.
- Güleç Solak, S. (2017). Mekân-kimlik etkileşimi: kavramsal ve kuramsal bir bakış. *Manas sosyal araştırmalar dergisi*, 6, 13-37

- Gülşen, O. & Mutlu, N. (2005). Bitki biliminde kullanılan genetik markırlar ve kullanım alanları. *Alata Bahçe Kùltürleri Araştırma Enstitüsü*, 4(2), 27-37.
- Henry, A., Catolos, M., Sandhu, N., Dixit, S., Shamsudin, N. A. A., Naredo, M. E. B., McNally, K. L., Diaz, M. G. & Kumar, A. (2017). Genetic Loci Governing Grain Yield and Root Development under Variable Rice Cultivation Conditions. *Frontiers in Plant Science*, 1-63 <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01763>
- Henry, R. (2017). Application of Genomics to Enhance Utilization of Plant Genetic Resources. *Indian Journal of Plant Genetic Resources*, 30, 1-24.
- IPGRI 2001 Regional report CWANA 1999–2000. *International Plant Genetic Resources Institute, ROME, ITALY*, 15-18
- İlhan, D. (2017). Bitki biyoteknolojisinde genetik kaynakların önemi. Kafkas Üniversitesi *Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 10(2), 134-144.
- Kahramanoğlu, İ. & Usanmaz, S. (2016). Pomegranate Production and Marketing. European university of lefke faculty of agricultural sciences and technologies department of horticultural production and marketing Güzelyurt, Cyprus. CRC Press
- Luo, X., Hao, Z., Cao, S. & Hou, L (2018). Analysis of genetic structure in a large sample of pomagranate (*Punica granatum L.*) using fluorescent SSR markers. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 93(6), 659- 665. <https://doi.org/10.1080/14620316.2018.1432994>
- Martínez-Romero, D., Mirdehghan, S. H., Rahemi, M., Guillén, F., Valverde, J. M., Zapata, P. J., Serrano, M. & Valero D. (2007). Reduction of pomegranate chilling injury during storage after heat treatment: Role of polyamines. *Postharvest Biology and Technology*, 44(1), 19-25
- Martínez-Romero, D., Mirdehghan, S. M., Valverde, J. M., Serrano, M. & Guillén, F. (2012). Reduction of chilling injury of pomegranate by heat treatment before cold storage. *Options Méditerranéennes*, 241-244
- Minch, E., Ruiz-Linares, A., Goldstein, D.B. & Feldman, M., (1995). Microsat (Version 1.4d): a Computer Program for Calculating Various Statistics on Microsatellite Allele Data. Stanford University Medical Center, Stanford
- Nafees, M., Jaskani, M. J., Ahmed, S. & Awan F. S. (2015). Morpho-molecular characterization and phylogenetic relationship in pomegranate germplasm of Pakistan. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, 52(1) 97-106.
- Newman, R. B., Lansky, E. P. & Block, M. L. (2007). Pomegranate: The Most Medicinal Fruit. *Basic Health Publications*, 1-120.

- Oğuz, H. İ., Ukav, İ. & Eroğlu, D. (2011). Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde Nar (*Punica Granatum* L.) Üretimi ve Pazarlanması. *GAP VI. Tarım Kongresi*, 1-5.
- Ophir, R., Sherman, A., Rubinstein, M., Eshed., Schwager, M. S., Harel-Beja, R., Bar-Ya'akov, I. & Holland, D. (2014). Single-Nucleotide Polymorphism Markers from De-Novo Assembly of the Pomegranate Transcriptome Reveal Germplasm Genetic Diversity. *United States Department of Agriculture*, 9(2), 1-13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088998>
- Owais, S. J. & Abdel-Ghani, A. H. (2016). Evaluation of genetic diversity among jordanian pomegranate landraces by fruit characteristics and molecular markers. *International journal of agriculture & Biology*, 18, 393-422. <https://doi.org/10.17957/IJAB/15.0101>
- Özgüven, A. I. & Yılmaz, C. (2000). Pomegranate growing in Turkey. *Options Méditerranéennes*, 41-48.
- Rao, V. R. & Hodgkin, T. (2002). Genetic diversity and conservation and utilization of plant genetic resources. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 68, 1-19.
- Sell, S. M., Bittel, D.C., Kibiryeve, N., Güçlü, T. V. & Butler, M. G. (2007). Whole genome microarray analysis of gene expression in Prader-Willi syndrome. *American journal of medical genetics*, 430-442.
- Sharma, J., Ramchandra, K. K., Sharma, D. & Meshram, D.T. (2014). Pomegranate: Cultivation, marketing and utilization. National research centre on pomegranate (NRCP), 1-20
- Şahin, A. (2013). Nar Yetiştiriciliği. *Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü*, 1-11.
- Şenocak, E. (2015). Halk Anlatı Ve İnanışlarında Mitolojik Bir Meyve: Nar. *AVRASYA Uluslararası Araştırmalar Dergisi*, 4(8), 228-251.
- Wagner, H. W. & Sefc, K. M. (1999). Identity 1.0. Centre for Applied Genetics, *University of Agricultural Science, Vienna*, 3(9).
- Weising, K., Kaemmer, D., Eppelen, J. T., Weigand, F., Saxena, M. & Kahl, G. (1991). DNA fingerprinting of *Ascochyta rabiei* with synthetic oligodeoxynucleotides. *Current Genet*, 19(6), 483-489.
- Yıldırım, A. & Kandemir, N. (2001). Genetik Markörler ve Analiz Metodları. Bitki Biyoteknolojisi II. Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları. *Selçuk Üniversitesi Basımevi*. 334- 363

- Yılmaz, M. (2009). Bazı Fındık Çeşit ve Genotiplerinin Pomolojik, Morfolojik ve Moleküler Karakterizasyonu. *Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, 1-140.
- Zamani, Z., Sarkhosh, A., Fatahi, R. & Ebadi, A. (2007). Genetic Relationships Among Pomegranate Genotypes Studied by Fruit Characteristics and RAPD markers. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 82, 11-18.
- Zarei, A. & Sahraroo, A. (2017). Molecular characterization of pomegranate (*Punica granatum* L.) accessions from Fars Province of Iran using microsatellite markers. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 149, <https://doi.org/10.1007/s13580-018-0019-x>
- Zarei, A. & Sahraroo, A. (2018). Molecular Characterization of Pomegranate (*Punica granatum* L.). Accessions From Fars Province Of Iran Using Microsatellite Markers. *Genetics and Breeding*. 59(2), 1-11.
- Zhang, S., Chen, L., Huang, R., Isha, A. & Dong L. (2017). Generation and analysis of expressed sequence tag sequences from a soft-seeded pomegranate cDNA library. *Plant Breeding*, 136, 994-999. <https://doi.org/10.1111/pbr.12525>

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Halime Keriman ÇETİNKAYA

Doğum Yeri ve Yılı : Konya, 1993

Yabancı dili : İngilizce

E-posta : halimesarikaya93@gmail.com

Eğitim Durumu

Lise : Başak Koleji

Lisans : SDÜ, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji, 2016

Mesleki Deneyim

Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesinde laboratuvar stajyeri olarak hücre duvarını parçalayıcı enzimlerin analizinde görev aldım. (2015)