

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

EKONOMİK ÖNEME SAHİP YERLİ KİRAZ (*Prunus avium* L.) GENOTİPLERİNİN
SSRs (Simple Sequence Repeats)' A DAYALI GENETİK KARAKTERİZASYONU

Sema ACUNALP

Danışman Öğretim Üyesi
Prof. Dr. Ali ERGÜL

ANKARA

2012

Ekonomik Öneme Sahip Yerli Kiraz (*Prunus avium* L.) Genotiplerinin SSRs (Simple Sequence Repeats)'a Dayalı Genetik Karakterizasyonu

ÖZET

Anavatanı güney Kafkasya, Hazar denizi ve kuzey-doğu Anadolu bölgesi olan kiraz (*Prunus avium* L.), ülkemizde ise yabancı olarak kuzey Anadolu (Karadeniz) dağlarında, Toroslar'da ve özellikle doğu Toroslar'da bol miktarda yetişmektedir (Özbek, 1978). Isparta Bahçe Kültürleri Araştırma İstasyonu kiraz koleksiyonuna ait önemli kiraz çeşitlerinin bulunduğu bu tez çalışmasında, 9 SSR (Simple Sequence Repeats) lokusu ile 42 yerli ve 3 referans çeşitten oluşan toplamda 45 genotipin genetik tanımlamaları gerçekleştirilmiştir.

Prunus türlerinden geliştirilmiş 9 SSR lokuslarının kullanıldığı bu çalışmada, en düşük alel sayısı 5 alel ile UCD-CH13 ve CPSCT-010 lokuslarında tespit edilirken, en yüksek alel sayısı 11 olarak UCD-CH17 lokusunda tespit edilmiş, lokuslardaki alel ortalaması ise 6.77 olarak bulunmuştur. 45 genotipde elde edilen toplam alel sayısı 61'dir. Çalışmada 0900Ziraat ve Ömerli çeşitleri sinonim olarak tespit edilmiştir. M.Kemal Paşa Napolyonu-Dereçine Napolyonu- Yalancı Napolyon-0881 Erkenci Napolyonu- Akşehir Napolyonu; Turfanda Kara (2)- Turfanda- Turfanda Kara; Karakiraz- Karakiraz (2); 0905 Ziraat-0900 Ziraat; 0849 Beyaz Turani-0888 Karaturani çeşitleri homonim olarak belirlenmiştir.

Elde edilen genetik bulgular ile populasyon içi genetik benzerlikler, sinonim/homonim çeşitler belirlenmiş ve populasyona ait DNA kimlik bilgileri (alel verileri) tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Prunus spp., kiraz, SSR, Isparta Bahçe Kültürleri Araştırma İstasyonu, Türkiye

Genetic Characterization of Domestic Sweet Cherry (*P. avium* L.) Germplasms Based on SSR's

ABSTRACT

The homeland of the sweet cherry is southern Caucasus, the Caspian Sea and the north-eastern Anatolia region. As wild type of sweet cherries they are grown in abundance in the northern Anatolia in Turkey (Black Sea), especially in the eastern Taurus and Taurus (Özbek, 1978). In this thesis, important cherry cultivars belonging to the Isparta Horticultural Research Station, with 42 domestic and 3 reference varieties were described by the 9 SSR (Simple Sequence Repeats) genetic locus.

In this research 9 SSR loci from *Prunus* were used; UCD-CH13 and CPSCT-010 loci showed the lowest number of alleles (5) and UCD-CH17 loci showed the highest number of alleles (11). Average number of alleles is found as 6.77. The total number of allele numbers of for 45 genotypes are found as 61. According to research 0900Ziraat and Ömerli cultivars have been demonstrated as synonyms and M.Kemal Paşa Napolyonu-Dereçine Napolyonu- Yalancı Napolyon-0881 Erkenci Napolyonu- Akşehir Napolyonu; Turfanda Kara (2)- Turfanda- Turfanda Kara; Karakiraz- Karakiraz (2); 0905 Ziraat-0900 Ziraat; 0849 Beyaz Turani-0888 Karaturani cultivar have been demonstrated as homonymous.

Genetic similarities within population, synonym/homonym cultivars and also DNA identity information of the population have been described according to the genetic findings.

Keywords: Prunus spp., cherry, SSR, Isparta Horticultural Research Station, Turkey.

TEŐEKKÜRLER

Tezimdaki tekniği öğreten, her türlü kaynak temininde yardımlarını esirgemeyen ve tezimin her aşamasında bilgisine başvurduğum Sayın Hocam Prof. Dr. Ali ERGÜL'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca, tezimin kontrolü ve yazımı aşamasında, yardım ve katkılarından dolayı öncelikle Uzm. Bio. Canan YÜKSEL ve Uzm. Bio. Pelin ÇELİKKOL başta olmak üzere, Hatice ALTINBAY'a ve yardıma ihtiyaç duyduğumda hep yanımda olan Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarı Bitki Biyoteknolojisi ekibine desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Yüksek lisansım boyunca yanımda olan ve desteğini hep hissettiğim İbrahim ERDOĞAN'a,

Çalıőmalarım sırasında maddi ve manevi desteğiyle her zaman arkamda olan, başta sevgili ablam İlksen ACUNALP ERLEBLEBİCİ'ye ve çok değerli aileme en içten teşekkürlerimi sunuyorum.

Sema ACUNALP

Ankara, Eylül 2012

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vii
SİMGELER DİZİNİ	viii
1.GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER	4
2.1. DNA MARKÖRLER.....	5
2.1.1 Hibridizasyona dayalı DNA markörler	6
2.1.2 PCR (Polymerase Chain Reaction) = PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)'a dayalı DNA markörler.....	7
2.1.2.1 RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) (Rastgele Çoğaltılmış DNA Farklılığı)	7
2.1.2.2 AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) (Çoğaltılan Parça Uzunluğu Farklılığı)	7
2.1.2.3 Mikrosatelitler (SSR, Simple Sequence Repeats)	7
3. KAYNAK ÖZETLERİ.....	9
3.1 Kiraz Genetik Tanımlamasına Yönelik SSR ve Diğer DNA Markörlerle Yürütülen Araştırmalar.....	9
3.2 <i>Prunus</i> Türlerinin Genetik Tanımlanmalarında SSR Markörlerin Türlerarası Geçişkenliğine (Cross-Transferable) Yönelik Çalışmalar	12
3.3 Kiraz ve <i>Prunus</i> Türlerine Yönelik Genetik Haritalama Çalışmaları	16
4. MATERYAL ve YÖNTEM	19
4.1. Materyal	19
4.2. Yöntem.....	20
4.2.1. DNA izolasyonu ve ölçümleri	21
4.2.2. SSR alel bölgelerinin PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ile çoğaltılması	23

4.2.2.1 SSR lokuslarına ait primerler	23
4.2.3. PCR Ürünlerinin Kapilleri elektroforezi	25
4.2.4. Genetik analizler	25
5. ARAŞTIRMA BULGULARI	27
5.1. DNA İzolasyonu	27
5.2 SSR lokuslarının PCR reaksiyonu	33
5.3 SSR lokuslarına ait alel büyüklüklerinin belirlenmesi	34
5.4. Genetik analizler	36
6. TARTIŞMA ve SONUÇ	47
KAYNAKLAR	50
ÖZGEÇMİŞ	57

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1 Tezde uygulanan yöntem aşamalarının genel görünümü	21
Şekil 5.1 Araştırmada kullanılan bazı çeşitlere ait DNA'ların %1'lik agaroz jel elektroforez görünümü	27
Şekil 5.2. PSA12-A02 lokusuna ait alelerin PCR sonrası jel görüntüsü	33
Şekil 5.3. UCD-CH17 lokusuna ait alelerin PCR sonrası jel görüntüsü	33
Şekil 5.4. Lokus alel profillerinin kapiller elektroforezindeki genel alel görünümleri.....	34
Şekil 5.5. UCD-CH13 primeri kapiller elektroforezdeki heterozigot	35
Şekil 5.6. CPSCT-010 primeri kapiller elektroforezdeki homozigot	35
Şekil 5.7. Kiraz çeşitlerine ait genetik ilişki dendogramı	45

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Kiraz ve Prunus türlerinin tanımlanmalarında kullanılan moleküler markörlerin bazı özellikleri.....	8
Çizelge 4.1 Araştırmada kullanılan kiraz çeşitleri ve referans çeşitler	19
Çizelge 4.2 SSR lokuslarına ait primerlerin baz dizileri, işaretleme boyası ve Tm (°C) değerleri.....	24
Çizelge 5.1 Araştırmada kullanılan çeşitlere ait DNA'ların spektrofotometrik Değerleri	28
Çizelge 5.2. Kiraz çeşitlerinin 9 SSR lokusundaki alel büyüklükleri (bp).....	37
Çizelge 5.3 Çalışılan lokuslardaki alel sayıları (n),beklenen heterozigotluk (He), gözlenen heterozigotluk (Ho), tespit olasılığı (PI) değeri ve sessiz (null) alel frekansı	39
Çizelge 5.4. SSR lokuslarına ait alel frekansları	41
Çizelge 5.5 Aynı, sinonim ve homonim kiraz çeşitleri	43
Çizelge 5.6 Genetik benzerlik indeksi.....	44

SİMGELER DİZİNİ

AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism (Çoğaltılan Parça Uzunluğu Farklılığı)
bp	Base pair (Baz çifti)
CAPS	N-cyclohexyl-3-aminopropanesulfonic acid, a buffering agent in biochemistry
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksi-Nükleotit Trifosfat
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
H _e	Expected heterozygosity (Beklenen heterozigotluk)
H _o	Observed heterozygosity (Gözlenen heterozigotluk)
LG	Linkage Group
mM	Milimolar
µl	Mikrolitre
M	Molar
n	The number of allele (Alel sayısı)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
PI	Probability of Identity (Tanımlama Olasılığı)
PVP	Polyvinylpyrrolidone
RAPD	Random Amplified Polymorphism DNA (Rastgele Çoğaltılmış DNA Farklılığı)
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism (Kesilmiş Parça Uzunluğu Farklılığı)
RNase	Ribonükleaz
rpm	Dakikadaki dönüş sayısı
SSR	Simple Sequence Repeats (Basit Dizi Tekrarı)
Tm	Primerin DNA'ya bağlanma sıcaklığı

1.GİRİŞ

Anadolu'nun bir çok bitkinin gen merkezi olması ve tarım açısından uygun ekolojik koşullar göstermesi, bitki gen kaynaklarının çeşitliliği açısından da zengin bir gen potansiyelini doğurmuştur. Bahçe Bitkileri'ne ait türleri arasında önemli bir grubu oluşturan meyveler; üretim değerleri, yetiştirilme alanları, beslenmedeki ve ihracattaki payı ile büyük önem taşımaktadır. Yumuşak çekirdekli, sert çekirdekli, sert kabuklular, turunçgiller, üzüm, meyveler, diğer subtropik meyveler şeklinde sınıflandırılan meyvelerden, sert çekirdekli grubunda yer alan kiraz dünyada gen kaynağı çeşitliliği, üretim oranı ve değişik tüketim şekilleri açısından önemli meyve türlerinin başında gelmektedir.

Kirazın (*Prunus avium* L.) anavatanı güney Kafkasya, Hazar denizi ve kuzey-doğu Anadolu bölgesidir (Özbek 1978). Bu gen merkezinden doğuya ve batıya doğru yayılarak dünya üzerinde geniş bir alanı kaplamıştır. Bugün yabani olarak doğuya doğru İran ve Afganistan'dan, batıya doğru Balkanlar, İsveç ve hatta İskandinavya'da yetiştiriciliği yapılmaktadır. Bu bölgelere çok eski çağlarda ve hayvan göçleri (kuşlar vb) aracılığı ile götürüldükleri, İsviçre'de göller üstü artıklarının arasında yer aldığı ve yine İskandinavya'daki höyüklerde bulunmasıyla anlaşılmıştır. Ülkemizde yabani olarak kuzey Anadolu (Karadeniz) dağlarında, Toroslar'da ve özellikle doğu Toroslar'da bol miktarda yabani kiraza rastlanmaktadır (Özbek 1978).

Kiraz, vişne ve mahlep birçok ılıman iklim meyve türünün yer aldığı *Rosaceae* familyasına dahildir. Bu türler bitkiler aleminde *Rosales* takımı, *Rosaceae* familyası, *Prunoideae* alt familyası, *Prunus* cinsi ve *Cerasus* alt cinsi içerisinde yer almaktadır. *Cerasus* alt cinsinde *Eucerasus*, *Microcerasus*, *Pseudocerasus* ve Mahaleb grupları bulunmaktadır. Kiraz (*Prunus avium* L.) ve vişne (*Prunus cerasus* L.) *Eucerasus* grubu, mahlep (*Prunus mahaleb* L.) ise mahaleb grubu içerisinde yer almaktadır. Kiraz kökeninin haploit sekiz (n=8) kromozoma sahip olan yabani kirazlar olduğu, bunlardan yapılan seleksiyonlarla kültür

çeşitlerinin elde edildiği ve vişnenin de kirazdan doğan tetraploit bir tip olduğu kabul edilmiştir.

Ağaç habitüsü ve meyve özellikleri dikkate alındığında, kiraz (*Prunus avium* L.)'ın anavatanı olan, kuzey Anadolu ve güney Kafkasya'da ağaç boyları 15 metreye ulaşmaktadır. Ağaçları dikine ve dağınık büyür, dallar düzgün, yapraklar açıldığı sırada yapışkan reçinelidir. Çiçekler beyaz, ikili veya üçlü demetler halindedir. Meyveler birçok şekil ve renkte olup çekirdek ete yarı yapışkıdır. Meyve suyu renkli veya renksiz, meyve eti tatlıdır (Özbek 1978).

Kirazlar olgunluk zamanlarına göre çok erkenci, erkenci, orta mevsim ve geççiler olmak üzere ayrılabilir. Türkiye de yetişen ve yetiştirilmeleri tavsiye edilen önemli kiraz ve vişne çeşitleri ise; *Turfanda Kara*, *Kara Bodur*, *Dalbastı Kirazı*, *Napolyon*, *Bing*, *Windsor*, *Lambert*, *Black Eagle*, *Black Tartarian*, *Bigarreau Jaboulay* ve *Turca* dır.

Dünyada kirazın ekonomik olarak yetişebileceği alanlar yaygın olmayıp, kiraz yetiştiriciliği belli ülkelerin sınırlı alanlarında yapılmaktadır. Ülkemizde ise kiraz yetiştiriciliği için ekolojik koşulların uygun olduğu geniş sayılabilecek bölgeler bulunmaktadır. Kiraz yetiştiriciliğinde ekolojik yönden büyük bir potansiyele sahip olan ülkemizde gerek ağaç sayısı ve gerekse üretim bakımından son yıllarda hızlı artışların olduğu gözlenmektedir. Dünya kiraz üretiminde ilk sırada yer alan Türkiye'yi (417.905 ton) ABD 287.305, İran 255.500, İtalya 115.476 ve İspanya 80.300 tonla takip etmektedir (FAOSTAT 2010).

Bitki gen kaynaklarımız, ülkemiz florasındaki yabani türler, tarımı yapılan bitki türlerinin yabani akrabaları, geçit formları, yerel çeşitler, ıslah edilmiş ya da geliştirilmiş çeşitler ve bazı önemli karakterlere sahip ıslah hatlarından oluşmaktadır (Tan ve İnal 2003). Dünya kiraz ve vişne üretiminde çok önemli konumda olan ülkemiz, bu meyve türlerinin gen kaynağı olma bakımından da önemini halen korumaktadır. Sert çekirdekli meyveler

içerisinde kiraz-vişne grubunda yer alan kültür ve yabani türlere ait bitkiler ülkemizin hemen bütün bölgelerinde bulunmaktadır.

Dünya nüfusunun artmasıyla, özellikle gelişmemiş ülkelerde baş gösteren gıda sıkıntısı ve gıda güvenliği gibi problemler, insanlığın geleceği açısından, meyve genetik kaynaklarının korunmasını daha da önemli hale getirmiştir. Son yıllarda biyoteknolojide görülen hızlı gelişmeler, bitki genetik kaynaklarına ait çalışma alanlarının tümünde, özellikle genetik çeşitliliğin muhafazası, üretimi, yenilenmesi, karakterizasyonu, ıslah ve çeşit geliştirme gibi amaçlar doğrultusunda kullanımında doğrudan ve çok büyük katkılar sağlamıştır.

Gen kaynaklarının korunması için yapılan morfolojik ve biyokimyasal çalışmalar yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle son zamanlarda gerçekleştirilen moleküler markör çalışmaları önem kazanmıştır. Mikrosatellit veya bitkideki kullanımı ile SSR (Simple Sequence Repeat) markörlerin; uluslararası veri paylaşımı, ko-dominant, yüksek polimorfizm göstermesi, tekrar edilebilir olması, türler arası geçişkenlik özelliklerine sahip olması genetik kaynakların tanımlanmasında bu markörleri ön plana çıkarmaktadır (Weber and May 1989, Yamamoto vd 2001, Wünsch and Hormaza 2002).

Bu tezde, önemli kiraz çeşitlerinin bulunduğu Isparta Bahçe Kùltürleri Araştırma İstasyonu'nu kiraz koleksiyonlarına ait 42 yerli ve 3 referans çeşidinin 9 SSR (Simple Sequence Repeats) lokusu ile genetik tanımlamaları gerçekleştirilmiştir. Elde edilen genetik bulgular ile populasyon içi genetik benzerlikler, sinonim/homonim çeşitler belirlenmiş ve populasyona ait DNA kimlik bilgileri (allel verileri) tespit edilmiştir.

2.KURAMSAL TEMELLER

Sert çekirdekli meyve türleri (*Prunus* sp.) *Rosaceae* familyasının *Prunoideae* alt familyasında bulunan önemli meyve türlerindedir. *Prunus* cinsi temel olarak *Prunophora* (erikler ve kayısılar), *Amygdalus* (şeftaliler ve bademler) ve *Cerasus* (kiraz ve vişneler) olmak üzere temel olarak 3 ana alt cinse (subgenera) ayrılmaktadır. Alt cins (subgenus) *Prunophora* ise erikleri kapsayan *Euprunus* ve kayısıların yer aldığı *Armeniaca* olmak üzere iki seksiyona ayrılmaktadır (Rehder 1947). Kiraz ise birçok ılıman iklim meyve türünün yer aldığı *Rosaceae* familyasına dahildir. Bu türler bitkiler aleminde *Rosales* takımı, *Rosaceae* familyası, *Prunoideae* alt familyası, *Prunus* cinsi ve *Cerasus* alt cinsi içersinde yer almaktadır. *Cerasus* alt cinsinde *Eucerasus*, *Microcerasus*, *Pseudocerasus* ve Mahaleb grupları bulunmaktadır.

Prunus avium L. insanların tüketimi için, kiraz ağacı yetiştiriciliğinde kullanılıp, yabani tip kirazlar ise sadece odunları için yetiştirilir ve mazzards denilir (Webster 1996). Kiraz Asya kıtasının bir kısmı, özellikle kuzey Irak, Ukrayna ve Kafkasya dağlarının güneyinde doğal olarak yetişmektedir. Avrupa da, Romanya ve Gürcistan yabani kiraz ağaçları batı Avrupa ve merkezde farklılaşarak ortaya çıkmıştır (Tavaud 2001). Modern tarzda yetiştirilmiş kiraz soylarının Hazar ve Karadeniz etrafında ilk orijine alındığına da inanılır ve kuşlar aracılığı ile yayılmıştır. Kirazlar, Akdeniz dolaylarında, subtropikal bölgelerde, İspanya'nın kuzey bölgelerinden Rusya'nın güneydoğusuna kadar dünya genelinde 40'dan fazla ülkede yaygın şekilde yetiştirilmektedir (Hedrick vd 1915).

Prunus avium diploid bir genoma (AA, $2n=2x=16$) ve küçük haploid genom boyutuna (338 Mb) sahiptir (Arumuganathan and Earle 1991). Genomu en küçük *Prunus* genomuna sahip olan şeftalinin genomundan (290Mb) büyüktür. *Prunus fruticosa*'nın ise kiraz ağacının, tetraploid yabani tür ($2n=4x=32$) olduğuna inanılır. Genom büyüklüğü hala bilinmemektedir.

Prunus cerasus allotetraploid bir türdür (AAFF, $2n=4x=32$) 599Mb genom büyüklüğüne sahiptir. *P. avium* ve *P. fruticosa* arasındaki doğal hibridizasyonla elde edilmiştir. İzoenzim analizleri, genomik in situ hibridizasyon ve çekirdek analizleri *P.cerasus*'un hibrit olduğunu kanıtlamıştır (Hancock and lezzoni 1988, Santi and Lemoine 1990, Schuster and Schreiber 2000). Vişne (*Prunus cerasus* L.) ağacı meyveleri genel olarak reçel ya da likör yapımında kullanılır. Vişne yetiştirilme alanı kiraza çok benzerdir, Hazar denizi çevresi ve İstanbul yakınlarıdır.

Yumru kirazlar, *P. avium* ve *P. cerasus* arasındaki çaprazlama sonucu oluşturulmuştur ve daha dar bir alanda yetiştirilirler. *Prunus acida Dum*, *Cerasus regalis*, *Prunus avium ssp. regalis* gibi farklı isimlerde isimlendirilir ama günümüzde *P. xgondouinii Rehd.* olarak kalmıştır (Faust and Suranyi 1997, Saunir and Claverie 2001). Yumru kirazlar atalarına göre ağaç ve meyve karakteri olarak daha üstündür.

Biyoteknoloji, uygulamada gösterdiği hızlı gelişme ile her geçen gün önemini arttırarak, günümüzde bilimin en popüler dallarından biri haline gelmiştir. Temel bilim uygulamalarının yanında, biyoteknolojinin değişik bilim dallarına yönelik pratik sonuçları günümüzde büyük ilgi uyandırmaktadır. Biyoteknoloji kapsamında incelenen ve DNA düzeyindeki farklılıkları değişik hassaslık oranlarında ortaya çıkaran DNA markörlerin bitki tanımlaması uygulamaları da bu kapsamda görülen konular arasındadır.

2.1 DNA Markörler

Bitkilerde tanımlamalara yönelik moleküler markör kullanımının ilk uygulamaları izoenzim uygulamaları ile başlamıştır. İzoenzim markörlerde ortaya çıkan yetersizlikler ise, DNA markörlerin kullanımına yol açmıştır. Aynı DNA bölgesinin bireyler arasında bulunup bulunmaması, bulunması halinde o bölgenin aynı büyüklükte olup olmamasını tespit eden DNA markörlerin (DNA ayraçların) en önemli avantajları ise; genetik tanımlamalarda değişik hücresel koşullardan etkilenmemeleri ve tekrarlanabilme

özelliklerinin yüksek olması ve zengin bir bilgi tabanı oluşturmasıdır. DNA markörlerin bitkilerde kullanımı hibridizasyona dayalı DNA markör olan RFLP (restriction fragment length polymorphism) markörlerle başlamış ve PCR (PZR) (Polymerase Chain Reaction = Polimeraz Zincir Reaksiyonu) tekniğinin ortaya çıkması ile birlikte PCR'a dayalı DNA markörler genetik tanımlamada kullanılmaya başlanmıştır. Bu amaçla kullanılan markörlerin başında ise, RAPD, AFLP, SSR, SNP gibi markörler gelmektedir (Çelikkol 2011).

Son yıllarda kiraz (*Prunus avium*) ve vişne (*Prunus cerasus*) gruplarında yer alan diğer yabancı türlerin tanımlanmasında DNA markörleri kullanılmaya başlanmıştır. DNA markörler hibridizasyona dayalı DNA markör olan RFLP markörlerle başlamış ve PCR'ın (Polymerase Chain Reaction) = PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) kullanımı ile birlikte PCR'a dayalı DNA markörler genetik tanımlamada kullanılmaya başlanmıştır. Bu amaçla kullanılan markörlerin başında ise, RAPD (Gerlach and Stosser, 1998), AFLP (Tavaud vd 2001), SSR (Wünsch vd 2004), ISSR (Piagnani vd 2005) ve SNP gibi markörler gelmektedir.

2.1.1. Hibridizasyona dayalı DNA markörler

Bu grupta yer alan markörlerin en önemlisi RFLP tekniğidir. Restriksiyon endonükleazlarla kesilen genomik DNA fragmentlerinin (parçacıklarının), agaroz jel elektroforezi ile ayrılarak, 'Southern Blot' tekniği ile uygun bir membrana aktarılması ve radyoaktif işaretlenmiş bir prob ile hibridizasyonunun yapılarak bitki tür veya çeşidine özgü restriksiyon bantlarının 'fragmentlerinin' belirlenmesi, yöntemin başlıca aşamalarını oluşturmaktadır.

2.1.2 PCR (Polymerase Chain Reaction) = PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)'a dayalı DNA markörler

2.1.2.1 RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) (Rastgele Çoğaltılmış DNA Farklılığı)

Yöntem 9-10 baz uzunluğundaki rastgele primerlerin, kalıp (template) DNA'nın iki iplikçığı üzerinde, birbirine karşıt iki farklı noktada tamamlayıcılarını (komplementlerini) bularak, bu ara bölgenin PCR çoğaltılmasını esas alan polimorfizmden oluşmaktadır (Welsh and McClelland 1990). Teknik ucuz ve kolay uygulanabilir olmakla birlikte sonuç tekrarlanabilirliği düşük bir tekniktir.

2.1.2.2 AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) (Çoğaltılan Parça Uzunluğu Farklılığı)

Vos vd (1995) tarafından geliştirilen teknikte yöntem, iki farklı enzim sistemi ile kesim (PstI-MseI veya EcoRI-MseI), kesim bölgelerine adaptör takılması ve bu bölgelerin çoğaltılması aşamalarından oluşmaktadır. Polimorfizm oranı yüksek olan teknik aynı bitki türlerine ait sinonim ve klonların ayrımında önemli avantajlar sağlamaktadır.

2.1.2.3 Mikrosatellitler (SSR, Simple Sequence Repeats)

SSR markörler (mikrosatellit), bitki genomu boyunca rasgele dağılmış penta-, tetra-, tri-, ve dinükleotit gibi kısa tekrar dizileridir. Ökaryotik genoma özgünlük gösteren mikrosatellitlerin, ko-dominant, yüksek polimorfizm göstermesi, her lokus için çok sayıda allel üretebilir olması, tekrar edilebilir olması, aynı cinse ait türler ve aynı familyaya ait cinsler arasında transfer edilebilir olması, uluslar arası veri tabanlarının karşılaştırmasına olanak sağlaması gibi özellikleri bulunmaktadır. SSR markörlerin bu avantajları, bitki

tanımlamada diğer DNA markörlere (RFLP, RAPD, AFLP vb) göre daha çok tercih edilmesini sağlamıştır.

DNA markörler (RFLP, RAPD, AFLP vb) kiraz dahil *Prunus* türlerinde; evrimsel analizlerde, çeşit, anaç, ekotip, klon vd. tanımlanması, sinonim ve homonimlerin tespit edilmesi, hibrit bitki tanısı, markör yardımı ile seleksiyon gibi değişik amaçlara yönelik olarak kullanılmaktadır. Kiraz ve *Prunus* türlerinin tanımlanmalarında kullanılan DNA markörlerin bazı özellikleri Çizelge 2.1’de sunulmuştur.

Çizelge 2.1 Kiraz ve *Prunus* türlerinin tanımlanmalarında kullanılan moleküler markörlerin bazı özellikleri

DNA markör	PCR kullanımı	Polimorfizm tespit derecesi	Kalıtım
RFLP	-	Düşük-Orta	Kodominant
RAPD	+	Orta-Yüksek	Dominant
SSR	+	Yüksek	Kodominant
ISSR	+	Yüksek	Dominant
AFLP	+	Yüksek	Dominant
Protein/izoenzim	-	Düşük	Kodominant
STS	+	Yüksek	Kodominant
SNP	+	Yüksek	Kodominant
SCARS/CAPS	+	Yüksek	Kodominant

3. KAYNAK ÖZETLERİ

3.1. Kiraz Genetik Tanımlamasına Yönelik SSR ve Diğer DNA Markörlerle Yürütülen Araştırmalar

Boritzki vd (2000), 13 SSR primeri ve 10 AFLP primer çifti kombinasyonlarını Neighbour– Joining analiz metodu kullanılarak toplanan 128 kiraz genotipinin genetik karakterizasyonlarını belirlemek için kullanmışlardır. Analiz sonucunda kullanılan AFLP lokuslarında 5-26 arasında farklı allel sayıları belirlenmiştir.

Downey and Lezzoni (2000), ABD, Meksika ve Ekvator bölgelerine ait Kara Kiraz genetik kaynaklarına ait 66 Kara Kiraz çeşidini 8 SSR primeri ile taramışlardır. Çalışmada 8 SSR markörden 4'ünde başarılı çoğaltım sağlanmış ve toplamda 54 allel bulunmuştur.

Struss vd (2002) tarafından yapılan çalışmada, GI-4, GI-5, GI-6, GI-7, GI-8, GI-12, 195/20 ve 148/13 olmak üzere toplam 8 Giessen anacı 14 DNA primer çifti ile taranmış ve sadece 2 anaç (PMS 13, PMS 18 ve PMS 30 primerleri ile) birbirinden ayırt edilebilmiştir.

Zhou vd (2002), 67 kiraz genotipi arasında genetik uzaklık ve ilişkileri bulmak amacı ile farklı primer kombinasyonlarına sahip 6 AFLP primeri ile taramıştır. Bulunan 118 polimorfik DNA fragmentine bağlı filogenetik benzerlikler bulunmuştur.

Clarke and Tobutt (2003), Napolyon kiraz çeşidinden izole edilen 21 mikrosatellite geliştirmişlerdir. Geliştirilen 21 SSR markör 14 kiraz çeşidinde denenmiş ve 3 SSR primerinin (EMPA 014-015 ve 018) yüksek oranda ayırım yaptığı belirtilmiştir.

Struss vd (2003) 15 SSR ve 4 AFLP (EcoRI-Msel) markör kullanarak 12 farklı 'Bing' kiraz çeşidini de içeren genotiplerde yaptıkları çalışmada; sayıları 1-5 arasında değişen toplam 48 SSR alleli bulmuşlardır. AFLP analizleri sonucunda ise toplam 63 (%21) polimorfik lokus tespit edilmiştir. Çalışma sonucunda SSR ve AFLP moleküler markörlerinin pomolojik çalışmaların tamamlayıcısı olarak kiraz çeşitlerinin tanımlanması ve gruplanmasında kullanılabileceğini göstermiştir.

Vaughan and Russell (2004) 14 SSR primeri kullanarak 16 yabani kirazda yaptıkları çalışmada, 4 SSR lokusunun monomorfik olduğunu belirlemişlerdir. Çeşitler arasındaki gözlenen heterozigotluk değeri 0,00–0,81 (ort. 0,61), beklenen heterozigotluk değeri 0,22–0,75 (ort.0,60) ve lokuslara ait ayırım değerlerinin ise 0,22–0,87 (ort. 0,69) arasında değiştiği belirlenmiştir.

Gulen vd (2005) tarafından Türkiye' de yapılan çalışmada, yerli ve yabancı toplam 22 kiraz genotipinin 4 EcoRI ve Msel primer kombinasyonu ile AFLP markör tekniği kullanarak moleküler düzeyde genotipler arası karakterizasyon yapılmıştır.

Kaçar vd (2006), Kuzey ile Doğu Avrupa ülkeleri ve Rusya'dan toplanan germplazmların Türkiye'den toplananlar ile birlikte genetik ilişkilerini karşılaştırmak için vişne (*Prunus cerasus*) ve *P. fruticosa* Pall. içeren 81 tetraploid kiraz seleksiyonunu 5 SSR primeri kullanılarak karşılaştırmışlardır. Araştırmacılar her primer çiftinde 5-20 farklı olası allel ile yüksek seviyede polimorfizm elde etmişlerdir. Kirazdan izole edilen PMS 49 primeri, 20 olası allel ile en yüksek seviyede polimorfizm göstermiştir. Bu çalışma bir germplazm koleksiyonu oluştururken vişnenin anavatanı olan Türkiye'deki germplazmı da dahil etmenin önemini ortaya koymuştur.

Pedersen (2006) kiraz ve vişne olmak üzere 51 genotipte 10 PCR lokus çifti kullanılarak genotipler arası farklılıklar belirlenmeye çalışılmıştır. Araştırmada kullanılan lokuslar 14

ile 40 allel sayısı göstermiş olup, genotipler arası ayırım güçleri ise 0,480-0,967 arasında değiştiği tespit edilmiştir.

Öz vd (2007), Doğu Anadolu gen kaynaklarından seçilen 18 erik (*Prunus domestica* L.) ve 17 kiraz (*Prunus avium* L.) genotipi, DNA genetik kimliklerinin araştırılması amacı ile SSR analizleri gerçekleştirilmiş ve araştırma sonucunda kiraz ve erik arasında ve çeşitlerin kendi aralarındaki benzerlikler dendogram düzeyinde değerlendirilmiştir.

Cai vd (2007) tarafından Çin’ de yapılan çalışmada 23 kiraz çeşidi arasındaki genetik yakınlık ilişkileri RAPD markörleri kullanılarak araştırılmış ve %68 oranında polimorfizm bulunmuştur.

Demirsoy vd (2008) tarafından yapılan çalışmada 14 kiraz çeşidinin RAPD markör ile analizi yapılmıştır. Çalışma sonucunda %64 oranında polimorfizm elde edilmiştir

Lacis vd (2009) tarafından yapılan çalışmada 2 farklı germplazm koleksiyonlarında bulunan (İsveç Üniversitesi Ziraat Fakültesi Genetik ve Bitki Islahı Bölümü koleksiyonu ve Letonya Meyve Yetiştiriciliği Enstitüsü koleksiyonu) toplam 126 kiraz çeşidinin genetik benzerliklerini karşılaştırmak amacıyla 3 SSR primeri ile hızlı ve güvenilir bir şekilde taranmıştır. Çalışma sonucunda her 2 koleksiyonda da aynı allel profili ile 16 aynı grup belirlenmiştir.

Wünsch (2009b), 10 *Prunus* türünde (*P. persica*, *P. dulcis*, *P. armeniaca*, *P. domestica*, *P. insititia*, *P. salicina*, *P. cerasifera*, *P. avium*, *P. Cerasus*, *P. mahaleb*) önceki çalışmalarda polimorfik olduğu bildirilen 13 SSR primerini kullanmıştır. Primerlere ait çoğalma aralığı, polimorfizm ve çeşitlilik değerleri tespit edilmiştir. Araştırmacı bu çalışmanın *Prunus* germplazm kaynaklarının korunmasının yanı sıra *Prunus* türlerine ait genetik çalışmalarda da yararlı olabileceğini bildirmiştir.

Jing-Yong vd (2009), 15 SSR markör ile 11 kiraz çeşidinin genetik benzerliklerini hesaplamışlardır. 15 SSR primerinden 10 tanesinde sağlıklı çoğalma gözlemlenmiştir.10

SSR lokusuna göre bulunan genetik parametrelerden heterozigoluk 0.6584 ile 0.8413 arasında değişkenlik göstermiştir. Genetik benzerlik ise 0.5625 ve 0.8636 arasında bulunmuştur. UPGMA cluster analizi sonucunda ise 11 kiraz genotipi 3 gruba ayrılmıştır.

3.2. *Prunus* Türlerinin Genetik Tanımlanmalarında SSR Markörlerin Türler arası Geçişkenliğine (Cross-Transferable) Yönelik Çalışmalar

PCR'a dayalı genetik markörlerin kullanımı polimorfik markörlerin elde edilmesini sağlamıştır. RAPD markörleri, uygulanmasındaki kolaylık, sentetik oligonükleotidlerin çok fazla sayıda bulunması ve kolay olması, düşük miktarda ve düşük kalitede DNA'ya gereksinim duyulması gibi nedenlerden ötürü tercih edilen markörlerdir. SSR markörleri ise yüksek oranda polimorfizm göstermesi, araştırmacılar arasında primer değişiminin kolay olması, *Prunus* türleri arasında primer bölgelerinin korunmuş olması ve hatta *Malus* ve *Prunus* türleri arasında gen kaynaklarının tanımlanması için aynı primerlerin sonuç verebilmesi nedeniyle yaygın olarak kullanılmaya başlamıştır (Cipriani vd 1999).

Diğer taraftan *Prunus* türleri geniş bir aileyi (şeftali, erik, kayısı vd.) oluşturmakta olup her bir tür için SSR markörü geliştirme çabaları aynı oranda gerçekleştirilmemiştir, bu nedenle bir türde bulunan SSR markörlerin diğer *Prunus* türlerinde kullanımı (cross-transferable=geçişkenliği) bazı araştırmalarda ön plana çıkmaktadır.

Cipriani vd (1999), SSR markörlerinin yüksek oranda polimorfizm gösterdiğini ve SSR lokuslarının korunmuş bölgeler oldukları için yakınlık gösteren *Prunus* türleri arasında transferlerinin rahatlıkla yapılabileceğini açıklamıştır.

Sosinski vd (2000), şeftalinin (*Prunus persica* (L.) Batsch) genetik çalışmalarında kullanmak için mikrosatellit potansiyelini değerlendirmişlerdir. Çalışmada şeftalide mikrosatellit veritabanı taramalarının yanı sıra mikrosatellit için primer dizileri *Rosaceae*

türlerinden elma (*Malus domestica*) ve vişnede (*Prunus cerasus* L.) test edilmiştir. cDNA kütüphanesinde (CT)_n- ve (CA)_n- içeren klonlarda, CT, CA ve AGG genomik kütüphane tekrarları taranmıştır. Mikrosatellit frekans tahminleri genomik kütüphanede belirlenmiş ve şeftali genomunda her 100kb'de CT, her 420 kb'de CA ve her 700 kb'de AGG tekrarlandığı görülmüştür. Araştırmada 28 şeftali çeşidinde her primer çiftinde 1-4 allel arasında olan mikrosatellit polimorfizm seviyesi incelenmiştir.

Cantini vd (2001), yaptıkları çalışmada, vişne çeşitlerinden (*P.cerasus* L.), *P. fruticosa* Pall. çeşidi ve bunların hibritlerinin de bulunduğu toplam 75 genotipin genetik tanımlanmasını yapmak amacı ile kiraz, vişne ve şeftali genomlarından elde edilmiş 10 SSR markör ile taramışlardır. Çalışma sonunda her SSR lokusunda 4-16 arasında allel sayıları elde edilirken SSR verileri baz alınarak DNA parmak izi analizleri de yapılmıştır.

Wünsch and Hormaza (2002), 76 kiraz genotipini, daha önce şeftalide geliştirilmiş 34 mikrosatellit primer çifti ile taramışlardır. Araştırmada kullanılan 34 SSR primerin 24 tanesinde SSR bölgelerinin çoğaltımı yapılmış ve bu primerlerden ise 14 tanesinde yüksek oranda polimorfizm gözlemlenmiştir.

Dirlewanger vd (2002) tarafından yapılan çalışmada şeftaliden elde edilen mikrosatellit markörlerin polimorfizmi başta kiraz olmak üzere birçok yakın türde denenmiş (*Prunus avium* L. (sweet cherry and mazzard), *Prunus cerasus* L. (sour cherry), *Prunus domestica* L. (European plum), *Prunus amygdalus* Batsch. (almond), *Prunus armeniaca* L. (apricot), *Prunus cerasifera* Ehrh. (Myrobalan plum)) ve yakın türler arası SSR markörlerin kullanılabilmesi açıklanmıştır.

Wünsch vd (2004) tarafından yapılan çalışmada şeftaliden geliştirilmiş 9 SSR markörü, kirazda anaç olarak kullanılan *P. avium*, *P. cerasifera*, *P. cerasus* ve *P. mahaleb*'i kapsayan 17 genotip ve türler arası hibritler olan, *P. mahaleb* x *P. avium*, *P. avium* x *P. pseudocerasus*, ve *P. cerasus* x *P. canescens*'in tanımlanmasında kullanmışlardır.

Araştırmada çalışılan tüm genotipler elde edilen 62 allel kombinasyonu ile net bir biçimde ayırt edilmiştir.

Kaçar vd (2005), Türkiye’de yetişen 7 kiraz çeşidinde, kiraz (*P. avium*), vişne (*P. cerasus*) ve şeftali (*P. persica*)’den izole edilen 13 SSR primeri kullanarak genetik benzerliği araştırmışlardır. 8 SSR primerinin hepsinde polimorfik bantlarının oluştuğunu tespit etmişlerdir. Her primerde 1-6 arasında allel ve toplamda 38 allel elde edildiğini bildirmişlerdir.

Ohta vd (2005), çiçeklenmiş kirazlar (*Prunus subgenus cerasus*) arasındaki genetik çeşitliliği şeftali, kiraz ve vişneden geliştirilen 85 SSR markörü ile 144 bireyde karakterize etmişlerdir. Araştırmacılar SSR’ların % 29’unun çiçeklenmiş kirazlara taşınabileceğini ve 85 SSR marköründen 25’inin tüm örneklerde çoğaldığını belirlemişlerdir.

Clarke and Tobutt (2009), 5’i *Prunus avium* ve 3’ü akraba türden olmak üzere toplam 8 genotipte kiraz genomunu kapsamlı bir şekilde tarayan, polimorfik farklı *Prunus* türlerine ait 16 SSR primeri kullanarak yaptıkları çalışmada, CPPCT006- 022 ve EMPA002- 017 primerlerinin *Prunus* içindeki türler arasında büyük oranda transfer edilebilecek evrensel primerler olduklarını bildirmişlerdir.

Wünsch (2009a), bazı *Prunus* türlerinde polimorfik olan bir grup aday mikrosatellit markörü *P. persica*, *P. dulcis*, *P. armeniaca*, *P. cerasifera*, *P. domestica*, *P. salicina*, *P. insititia*, *P. avium*, *P. cerasus*, *P. mahaleb* olmak üzere 10 *Prunus* türünde test etmiştir. Bu çalışmada test edilen türlerdeki polimorfik SSR markör grubu seçilmiş ve bu markörlerin *Prunus* cinsindeki genetik çalışmalarda kullanılabilirlik durumu tartışılmıştır.

Demir vd (2010) yaptıkları çalışmada Giresun ilinden selekte edilmiş 44 kiraz çeşidi, şeftali ve kiraz kaynaklı 10 SSR markör kullanılarak genetik karakterizasyonları

tanımlamışlardır. Kullanılan SSR primeri tüm genotiplerde düzenli bir çoğalma göstermemiş olup, geriye kalan 4 SSR primerinde ise 7 ile 11 allel sayıları arasında toplamda 33 allel gözlenmiştir. Analiz sonucunda 44 çeşit arasındaki benzerlik oranı 0.32 ile 0.98 arasında bulunmuştur.

Türkoğlu vd (2010) tarafından yapılan çalışmada, *Prunus*'lardan geliştirilmiş 10 SSR lokusu ile *P. avium*, *P. cerasus*, *P. mahaleb*, *P. angustifolia*' ya ait 23 anaç arasındaki genetik benzerliği araştırmışlardır. Araştırmada her SSR lokusunda 8 ile 112 arasında allel bulunurken genetik benzerliklerine dayalı çizilen dendogramda ise, *P.avium*'un *P.cerasus* ile en yakın genetik ilişkiye sahip bulunmuştur.

Ercisli vd (2011) Çoruh vadisinden elde edilmiş yabancı kiraz ağaçlarına (*Prunus avium* L.) ait 18 kiraz çeşidini 10 SSR primeri ile analiz ederek toplamda 46 allel bulmuşlardır. Çalışmada en yüksek polimorfizmi PSA12A02 primeri, en düşük polimorfizmi ise CPSCT010, UDAp-404 primerleri göstermiştir. Morfolojik ve fenolojik özelliklere göre net bir ayırım göstermeyen 18 kiraz çeşidine ait çizilen dendogramda 7 farklı dallanma gözlenmiştir.

Turet-Sayar vd (2012) Türkiye'de yetiştirilen çeşitler de dahil olmak üzere toplam 31 kiraz genotipini 23 SSR marköründe analiz ederek polimorfizm gösteren 9 SSR primerinde toplam 56 allel bulunmuştur. 4 SSR primerinde ise (Pchgms 3, UDP97-401, UDP97-405 and UDP98-409) monomorfik özellik gözlenmiştir. En düşük allel sayıları PMS2 ve PceGA59 lokuslarında, en yüksek allel sayısı ise PSA12A02 lokusunda gözlenmiştir. Benzerlik indekslerine göre Türkiye'de yetiştirilen 7 kiraz genotipinin genetik çeşitliliği düşük bulunmuş ve dendogramda bu çeşitler birbirine yakın olarak konumlanmıştır.

3.3 Kiraz ve *Prunus* Türlerine Yönelik Genetik Haritalama Çalışmaları

Prunus' larda genom haritalamalarına, geniş coğrafik yayılım ve ekonomik önemi nedeni ile şeftali (*Prunus persica* L. Batsch) ile başlanmıştır (Mowrey vd 1990). Ağaç şekli, meyve et rengi, çiçek şekli, petal sayısı ve rengini kontrol eden genler üzerine yapılan genetik haritalama çalışmasında ise (Rajapakse vd 1995) NewJersey Pillar x KV 77119 çeşitlerinin melezlenmesiyle elde edilmiş olan F1 bireylerinden kendileme yaparak elde ettikleri 71 F2 bireyi ile segregasyon analizleri yapmışlardır. Populasyon için yapılan haritalamada RFLP ve RAPD markörleri kullanılmış 47 bağlantı markörü ve 8 bağlantı grubu bulunmuştur. Araştırma sonucunda dikine büyümeyi kontrol eden genler ile petal sayısını kontrol eden genlerin bağlantı grubu üzerinde 17.6 cM uzaklıkta olduğu belirlenmiştir.

Diğer bir haritalama çalışmasında ise, şeftalide meyve kalitesi ve soğuğa dayanıklılık gen özelliklerinin araştırılması yapılmıştır. Baird (1996) tarafından yapılan bu çalışmada "Sun Crest" ve "Bailey" arasında yapılan melezlemelerden elde edilmiş olan F1 bireylerinin kendine melezlemesinden oluşturulan 200 F2 bireyi kullanılarak, cDNA klonları, RFLP ve RAPD markörlerini içeren 80 markör tanımlanmıştır. cDNA klonları prob olarak kullanarak genomik klonlarla karşılaştırıldıklarında % 15 ile % 20 arasında polimorfik bulunmuştur.

Prunus' larda Avrupa *Prunus* haritalama grubu (Arus vd 1994a), Güney Carolina ve California haritalama gruplarının çalışmalarında kullandıkları problemleri (Rajapakse vd 1994; Bliss vd 1994) kullanarak vişnelerde RFLP haritası oluşturmuşlardır (Wang and Iezzoni, 1996).

Bliss vd (2002), tarafından badem (*Prunus dulcis* D.A. Webb) ve şeftalinin (*Prunus persica* L. Batsch) F2 melezlerinde meyve özellikleriyle ilgili genetik haritalama yapılmış ve bunun için SSR, RAPD ve CAPS markörleri kullanılmış ve bunlardan 4 SSR, 1 RAPD

ve 1 CAPS bandı aranan gen bölgeleri ile ilişkili bulunmuştur. Ayrıca; şeftali BAC kütüphanesi kullanarak AFLP markörleri ile gen haritasını oluşturan ve Prunus türleri için bu verilere dayalı SSR markörleri geliştiren Wang vd (2000), çalışmalarında kayısı dahil diğer Prunus türlerinde kullanılabilecek değişik tekrar motiflerini içeren ((TG)13 (AG)22, (GA)9 vb.) 17 SSR lokusu tespit etmişlerdir.

Prunus türlerinde bağlantı haritalama çalışmalarına bakılacak olursa; bağlantı haritalama çalışmaları yoğun olarak şeftali (*P. persica*), badem (*P. amgdalus*, syn. *P. dulcis*), şeftali x badem türlerarası melez populasyonlarında gerçekleştirilmiştir (Arús vd 1994b, Chapparo vd 1994, Dirlevanger and Bodo 1995, Rajapakse vd 1994, Viruel vd 1995, Bliss vd 2002; Dirlewanger vd 2002, Arus vd 2005). Foolad vd (1995) tarafından yapılan çalışmada, şeftali melezlerinde 107 markör içeren genetik bağlantı haritası oluşturulmuştur. Dirlewanger vd (1998) tarafından yapılan diğer bir şeftali bağlantı haritası çalışmasında ise; 50 RFLP markörü ile birlikte izoenzim, RAPD, AFLP markörlerden yararlanılarak 11 bağlantı grubu oluşturulmuş ve markör çiftleri arasındaki ortalama uzaklık 4,5 cM bulunmuştur. *Prunus* türlerinde yapılan diğer bağlantı haritaları çalışmalarında ise;

Joobeur vd (2000) bademlerde yapılan çalışmada RAPD markörleri yardımıyla genetik bağlantı haritaları oluşturulmuştur. Araştırmada 325 primer kullanılmış olup, RAPD markörlerinin polimorfizmi yüksek oranda bulunduğu kanısına varılmıştır.

Jun vd (2002) tek bir gen bölgesi ile kontrol edilen bir özellik olan şeftalilerde meyve etinin çekirdeğe yapışıklık durumu ile ilgili bir çalışmada RAPD analizleriyle bu genle ilişkili markörler bulunmaya çalışılmıştır. Çalışma neticesinde aranan özelliğin takibi için 4 RAPD markörü elde edilmiştir. Böylece yapılan araştırmada bulunan markörlerin marköre dayalı seleksiyon (MAS) yöntemlerinin geliştirilmesinde yararlı olacağı kanısına varılmıştır.

Hurtado vd (2006) tarafından yapılan çalışmada AFLP ve RAPD markörlerden faydalanılarak, Goldrich ve Valenciano kayısı çeşitlerinin çaprazlanması sonucunda elde edilen 81 F1 bireyi üzerinde genetik bağlantı haritaları oluşturulmaya çalışılmıştır. Çalışmada, RAPD markörleriyle %9 ve AFLP markörleriyle %17 oranında parçacıklarda farklılık bulunmuştur.

4. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu çalışma, 2011-2012 yılları arasında Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

4.1. Materyal

Araştırmada bitkisel materyal olarak; ülkemiz kiraz gen kaynaklarına ait 42 kiraz çeşidi ile birlikte 3 adet referans çeşit (Lapins, Bing, Rainer) olmak üzere toplam 45 genotip kullanılmıştır. Araştırmada kullanılan 42 kiraz çeşidi ve 3 referans çeşide ait genç yapraklar Isparta- Eğirdir Meyvecilik Araştırma İstasyonu' ndan temin edilmiştir. Çalışılan kiraz çeşitleri ve referans çeşitler Çizelge 4.1'de sunulmuştur.

Çizelge 4.1 Araştırmada kullanılan kiraz çeşitleri ve referans çeşitler

No	Çeşit Adı	No	Çeşit Adı
1	0898 Bademli	24	Aydın Siyahı
2	0895 Kamañçayırı	25	Edirne
3	0913 Trakana	26	0881 Erkenci Napolyonu
4	Tabanlı	27	Kazancıoğlu
5	0893 Kara Zeydali	28	Karakiraz (2)
6	Kırdar	29	Sapıkısa
7	0905 Ziraat	30	0888 Karaturani
8	Karabodur	31	0849 Beyaz Turani
9	Siyah Gözüme	32	Akşehir Napolyonu
10	0906 Seyitali	33	Sultani
11	0878 Kadi	34	Turfanda Kara (2)
12	M.Kemal Paşa Napolyonu	35	Turfanda
13	0912 Tezce	36	Turfanda Kara
14	0922 Acıkara	37	Elifli
15	Dereçine Napolyonu	38	Karagevrek

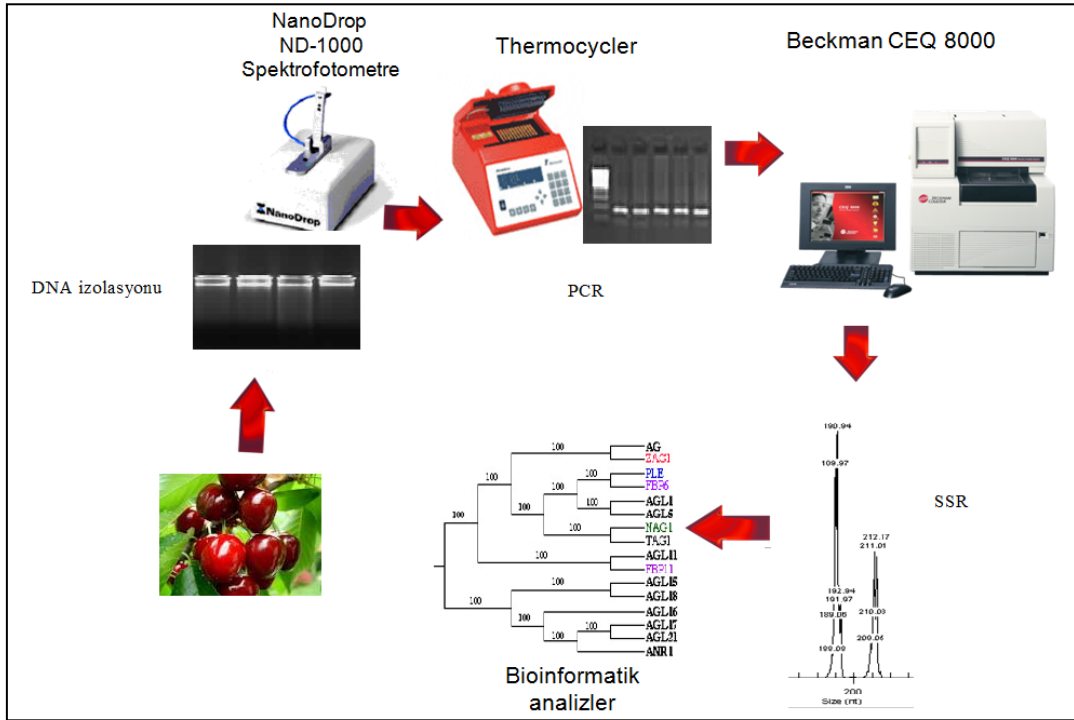
16	0885 Erice	39	0900 Ziraat
17	Karakiraz	40	Niğde
18	Yalancı Napolyon	41	Ömerli
19	Gilli	42	Uluborlu
20	Halil Efendi	43	Lapins
21	Allah Diyen	44	Bing
22	Şekerpare	45	Rainer
23	Dalbastı		

4.2. Yöntem

Araştırmada kullanılan yöntem temel olarak 4 aşamadan oluşmaktadır:

- DNA izolasyonu
- SSR allel bölgelerinin PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ile çoğaltılması
- PCR ürünlerinin kapiller elektroforezi
- SSR lokuslarına ait allel verilerinin belirlenmesi ve genetik analizler

Kapilleri elektroforez yöntemi uygulama aşamalarının genel görünümü, Şekil 4.1' de gösterilmiştir.



Şekil 4.1 Tezde uygulanan yöntem aşamalarının genel görünümü

4.2.1. DNA izolasyonu ve ölçümleri

Araştırmada kullanılan 45 genotipe ait genç yapraklar soğuk ortamda Ankara Üniversitesi Merkez Laboratuvarına getirilerek -80°C ' de muhafaza edilmiştir. Genotiplere ait DNA izolasyonları Lefort vd (1998) yöntemine göre yapılmıştır. Bu yöntemine göre;

- Genç yapraklar sıvı azotla ezildi,
- Toz haline gelen yaprak örneklerinden yaklaşık 100mg alınarak 2 μl ependorf tüplere aktarıldı,
- Tüplerin üzerine 1 ml DNA ekstraksiyon solüsyonu (örnek başına 10 μl 2-Merkaptoethanol içerir) eklendi,
- 65°C 'de ara sıra çalkalanarak 15 dk bekletildi,
- 0,5 ml kloroform/isoamil alkol (24:1) karışımı eklenerek, 30 dk buz üzerinde bekletildi,

- Oda sıcaklığında, 14.000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi,
- Üst sıvı, temiz bir ependorf tüpe aktarıldı ve üzerine 0,8 ml isopropanol eklendi,
- Örnekler, 15–20 dk buz üzerinde tutularak 14.000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi,
- Üst sıvı tekrar yeni bir ependorf tüpe aktarıldı,
- Pellet (alt katı) üzerine 1 ml % 70'lik ethanol eklenerek, 14.000 rpm'de 2 dk santrifüj edildi,
- DNA, 50–100 µl H₂O'da çözüldü,
- Her 100 µl için 1 µl RNase-A(Applichem; 100mg/ml) eklenerek, 37°C'de 15 dk bekletilerek, RNA uzaklaştırıldı.

DNA ekstraksiyon solüsyonunun içeriği (50 ml için):

- 2 ml TRIS (50 mM, pH 8,0)
- 4 ml EDTA (50 mM, pH 8,0)
- 10 ml LiCl (4M)
- 1 g CTAB (% 1)
- 2 g PVP (% 2)
- 0,5 ml TWEEN 20 (% 0,5)
- %0,2 β-Mercapto Ethanol

DNA izolasyonu sonucunda elde edilen DNA'ların, saflık ve miktar değerleri önce %1'lik agaroz jelde kontrol edilip, daha sonra NanoDrop ND-1000 spektrofotometre kullanılarak belirlenmiştir.

4.2.2. SSR allel bölgelerinin PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ile çoğaltılması

PCR ile SSR bölgelerinin çoğaltılması; 15–200 ng DNA, 5 pmol ileri (forward) primer, 5 pmol floresan işaretlemiş ters (revers) primer, 0.5 mM toplam dNTP, 0.5 ünite Go Taq DNA Polymerase (Promega, Madison, WI) (1,5 mM MgCl₂ içermekte), 3 µl buffer (5x buffer) olmak üzere 10 µl PCR karışımı ile gerçekleştirilmiştir. PCR reaksiyonu için kullanılan PCR programı ise:

1. 94 °C' de 3 dk,
2. 94 °C' de 1 dk
3. 55 – 60 °C'de 1 dk
4. 72 °C' de 2 dk
5. 72 °C' de 10 dk 2-4. basamaklar 34 tekrar olmak üzere toplam 35 döngü olacak şekilde uygulanmıştır.

PCR sonrası SSR lokuslarına ait PCR ürünleri %2'lik agaroz jel elektroforezinde kontrol edildikten sonra, amplifikasyonu gerçekleşmiş örneklerde kapilleri elektroforez aşaması gerçekleştirilmiştir.

4.2.2.1. SSR lokuslarına ait primerler

Çalışmada; UDAp-401, Pchgms1, UDP96-005, UCD-CH13, UCD-CH17, UCD-CH21, UCD-CH31, PSA12A02 ve CPSCT010 olmak üzere toplam 9 SSR primeri kullanılmıştır. Her SSR lokusuna ait ileri (forward) primer D4 (mavi), D3 (yeşil) ve D2 (siyah) renklerde floresan işaretlenmiş olup primerlere ait baz dizileri, kullanılan floresan boya (işaretleme boyası) ve Tm (°C) değerleri Çizelge 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.2 SSR lokuslarına ait primerlerin baz dizileri, işaretleme boyası ve Tm (°C) değerleri.

No	Lokus Adı	Primer Dizileri (5'..3')	Floresan boya rengi	Tm (°C)
1	UDAp-401 F**	aaa ccc tag ccg cca taa ct	D3 (Yeşil)	60
	UDAp-401 R	gct aaa ggc ctt ccg ata cc		
2	Pchgms1 F**	ggg taa ata tgc cca ttg tgc aat c	D2 (Siyah)	55
	Pchgms1 R	gga tca ttg aac tac gtc aat cct c		
3	UDP96-005 F**	gta acg ctc gct acc aca aa	D3 (Yeşil)	55
	UDP96-005 R	cct gca tat cac cac cca g		
4	UCD-CH13 F**	acc cgc tta ctc agc tga ac	D3 (Yeşil)	58
	UCD-CH13 R	tta gca cta agc ctt tgc tgc		
5	UCD-CH17 F**	tgg act tca ctc att tca gag a	D4 (Mavi)	58
	UCD-CH17 R	act gca gag aat ttc cac aac ca		
6	UCD-CH21 F**	ttg ttg acc atc gaa tat gaa g	D2 (Siyah)	58
	UCD-CH21 R	gaa ggt aca tgg cgt gcc		
7	UCD-CH31 F**	tcc gct tct ctg tga gtg tg	D3 (Yeşil)	58
	UCD-CH31 R	cga tag ttt cct tcc cag acc		
8	PSA12A02 F**	gcc acc aat ggt tct tcc	D4 (Mavi)	55
	PSA12A02 R	agc acc aga tgc acc tga		
9	CPSCT010 F**	ttg ggt aaa tac ttt atc att tcc	D4 (Mavi)	60
	CPSCT010 R	tcc ctg aat aag ggt tgt gc		

** : Floresan işaretli

4.2.3 PCR ürünlerinin kapiller elektroforezi

Amplifikasyonu gerçekleştiren SSR lokuslarına ait PCR ürünleri işaretlemeye kullanılan floresan boyalar (ProLigo, Wellred, Fransa) esas alınarak uygun oranlarda (20µl) SLS (Sample Loading Solution) ile seyreltildikten sonra üzerlerine, Genomelab DNA Size Standard Kit-400 (0.4µl) eklenmiştir. Örnekler için karışımlar CEQ™ 8000 Genetik Analiz Sistemi'nde elektroforez edilmiştir. SSR lokuslarına ait pik büyüklükleri sisteme ait fragment analizi yazılımları ile belirlenerek, her bir lokusa ait pikler; tipleri ve renkleri göz önüne alınarak heterozigot ve homozigot olarak görüntülenmiştir. Araştırmada Lapins, Bing ve Rainer çeşitleri referans çeşit olarak kullanılmış olup, piklere ait verilerin doğruluğundan emin olmak için reaksiyonlar 2 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

4.2.4 Genetik analizler

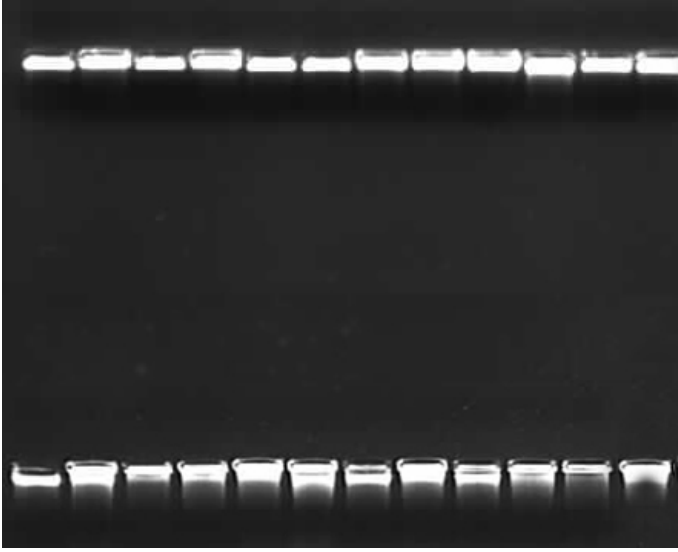
Araştırmada, genetik parametreler olarak; allel sayısı (n), allel frekansı (%), beklenen (He) ve gözlenen heterozigotluk (Ho), tahmin edilen sessiz allel (null) frekansı (r) ve tespit olasılığı (PI) değerleri belirlenmiştir. Beklenen heterozigotluk $1 - \sum p_i^2$ şeklinde hesaplanarak genetik farklılık ölçümü yapılmıştır. Buradaki p_i değeri, çalışılan örnekteki "i" ninci allelin frekansını göstermektedir (Nei 1987). Gözlenen heterozigotluk ise, heterozigot genotiplerle analiz edilen toplam genotip arasındaki orandır. Null allel varlığının tahmini, $(He - Ho)/(1 + He)$ şeklinde hesaplanmıştır (Brookfield 1996). Tespit olasılığı (PI) iki rastgele seçilmiş bireylerin aynı SSR profile sahip olma olasılığını ifade etmektedir (Paetkau vd 1995). Bu değer, $\sum p_i^4 + \sum \sum (2p_i p_j)^2$ şeklinde hesaplanır. Burada p_i ve p_j , sırasıyla "i" ve "j" allellerinin frekansını göstermektedir. Sonraki basamak olarak ise, genotipler arası benzerlik indeksleri belirlenerek, genetik ilişki dendogramı oluşturulmuştur. İncelenen parametrelere göre kullanılan programlar ise şu şekilde sıralanabilir:

- **Genetik parametreler:** Her lokusa ait allel sayısı, allel frekansı, beklenen ve gözlenen heterozigotluk oranı, sessiz (null) allel frekansı ve tespit olasılığı (PI, Probability of Identity) IDENTITY 1.0 (Wagner and Sefc 1999) programı ile,
- **Benzerlik oranı indeksi:** Microsat (Minch vd 1995) programı ile,
- **Dendogram:** UPGMA (Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic means) yöntemi kullanılarak NTSYS (versiyon 2.02g, Exeter Software, Setauket, NY) programı (Rohlf 2004) ile belirlenmiştir.

5. ARAŞTIRMA BULGULARI

5.1. DNA İzolasyonu

Araştırmada kullanılan çeşitlere ait DNA'ların %1'lik agaroz jel elektroforezi görüntüleri Şekil 5.1'de, spektrofotometrik ölçümleri (NanoDrop ND-1000) ise Çizelge 5.1' de verilmiştir. Spektrofotometrik ölçümlerde A260 değeri DNA miktarını, A260/280 oranı ise DNA'nın saflığını belirlemede kullanılmakta olup, oranın 1.8-2.1 arasında olması DNA'nın PCR reaksiyonları için kullanılabilir düzeyde olmasını ifade etmektedir.



Şekil 5.1 Araştırmada kullanılan bazı çeşitlere ait DNA'ların %1'lik agaroz jel elektroforez görünümü

Çizelge 5.1 Araştırmada kullanılan çeşitlere ait DNA'ların spektrofotometrik değerleri

No	Miktar ng/µl	A260	A280	Safılık A260/280
1	1701,77	34,035	17,084	1,99
	1759,85	35,197	17,997	1,96
2	1794,94	35,899	19,412	1,85
	1804,34	36,087	19,606	1,84
3	783,13	15,663	7,941	1,97
	453,01	9,06	4,706	1,93
4	1050,48	21,01	11,054	1,9
	1053,96	21,079	11	1,92
5	1732,73	34,655	17,581	1,97
	1700,25	34,005	17,25	1,97
6	495,39	9,908	5,265	1,88
	504,05	10,081	5,427	1,86
7	1499,38	29,988	15,751	1,9
	1472,12	29,442	15,411	1,91
8	1425,62	28,512	14,705	1,94
	1420,99	28,42	14,64	1,94
9	1732,73	34,655	17,581	1,97
	1700,25	34,005	17,25	1,97
10	2374,04	47,481	23,303	2,04
	2376,57	47,531	23,358	2,03

Çizelge 5.1 (devam)

No	Miktar ng/µl	A260	A280	Saflık A260/280
11	2325,25	46,505	22,623	2,06
	2336,26	46,725	22,824	2,05
12	482,74	9,655	5,65	1,71
	475,07	9,501	5,501	1,73
13	2796,47	55,929	28,061	1,99
	2802,09	56,042	28,171	1,99
14	809,37	16,187	8,902	1,82
	705,92	14,118	7,376	1,91
15	327,74	6,555	3,348	1,96
	340,5	6,81	3,593	1,9
16	1733,58	34,672	17,519	1,98
	1739,6	34,792	17,523	1,99
17	2087,87	41,757	21,471	1,94
	2133,35	42,667	21,881	1,95
18	2546,15	50,923	26,116	1,95
	2547,7	50,954	25,981	1,96
19	143,04	2,861	1,689	1,69
	141,53	2,831	1,653	1,71
20	2426,27	48,525	24,525	1,98
	2366,57	47,331	23,578	2,01

Çizelge 5.1 (devam)

No	Miktar ng/µl	A260	A280	Saflık A260/280
21	2936,78	58,736	30,124	1,95
	2918,27	58,365	30,06	1,94
22	1678,76	33,575	16,982	1,98
	1673,79	33,476	16,941	1,98
23	2382,96	47,659	23,929	1,99
	2322,67	46,453	23,397	1,99
24	2779,19	55,584	27,775	2,00
	2779,46	55,589	27,838	2,00
25	3016,28	60,326	29,829	2,02
	3049,96	60,999	29,988	2,03
26	2931,41	58,628	29,469	1,99
	2918,36	58,367	29,382	1,99
27	1550,03	31,001	15,771	1,97
	1568,49	31,37	15,93	1,97
28	809,37	16,187	8,902	1,82
	705,92	14,118	7,376	1,91
29	760,32	15,206	9,313	1,63
	739,26	14,785	8,918	1,66
30	1644,56	32,891	16,331	2,01
	1650,39	33,008	16,396	2,01

Çizelge 5.1 (devam)

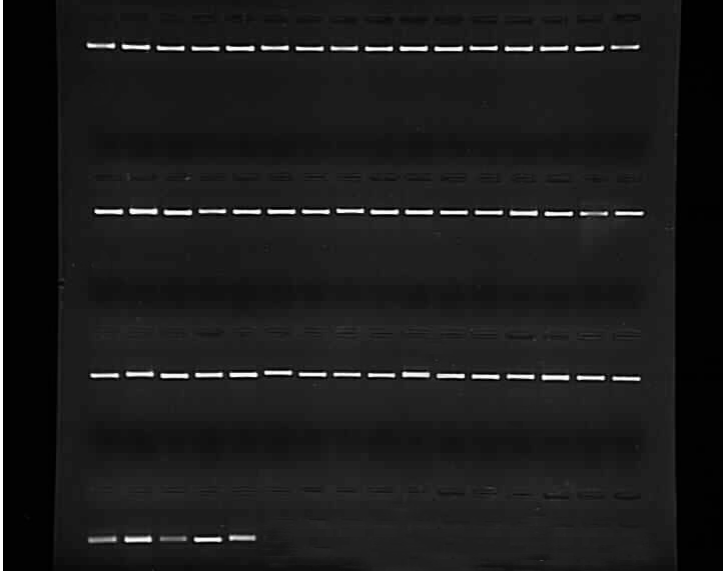
No	Miktar ng/µl	A260	A280	Saflık A260/280
31	2547,45	50,949	25,388	2,01
	2579,35	51,587	25,676	2,01
32	2898,8	57,976	29,098	1,99
	2892,46	57,849	28,961	2,00
33	177,99	3,56	1,684	2,11
	3731,26	74,625	37,342	2,00
34	2426,27	48,525	24,525	1,98
	2366,57	47,331	23,578	2,01
35	1274,11	25,482	12,699	2,01
	1276,02	25,52	12,689	2,01
36	2259,02	45,18	21,958	2,06
	2318,5	46,37	22,723	2,04
37	1794,94	35,899	19,412	1,85
	1804,34	36,087	19,606	1,84
38	1810,36	36,207	17,765	2,04
	1817,78	36,356	17,864	2,04
39	1571,85	31,437	15,868	1,98
	1555,88	31,118	15,616	1,99
40	2234,61	44,692	21,881	2,04
	2305,81	46,116	23,118	1,99

Çizelge 5.1 (devam)

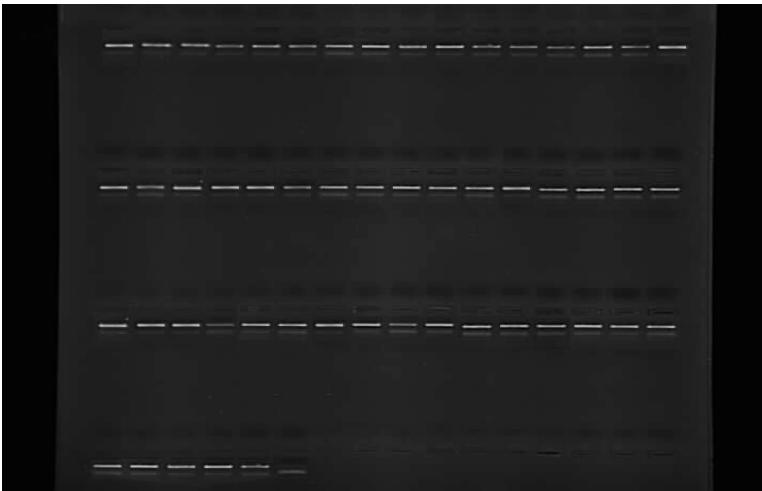
No	Miktar ng/µl	A260	A280	Saflık A260/280
41	1530,62	30,612	15,431	1,98
	1549,27	30,985	15,684	1,98
42	524,31	10,486	5,545	1,89
	547,49	10,95	5,767	1,9
43	1810,35	36,207	17,763	2,04
	1817,78	36,355	17,864	2,04
44	1274,11	25,485	12,697	2,01
	1276	25,51	12,689	2,01
45	1733,57	34,671	17,513	1,98
	1739,5	34,793	17,523	1,99

5.2 SSR lokuslarının PCR reaksiyonu

Bazı SSR lokuslarına ait PCR sonrası %1 agaroz jel görüntüleri Şekil 5.2, 5.3'de verilmiştir.



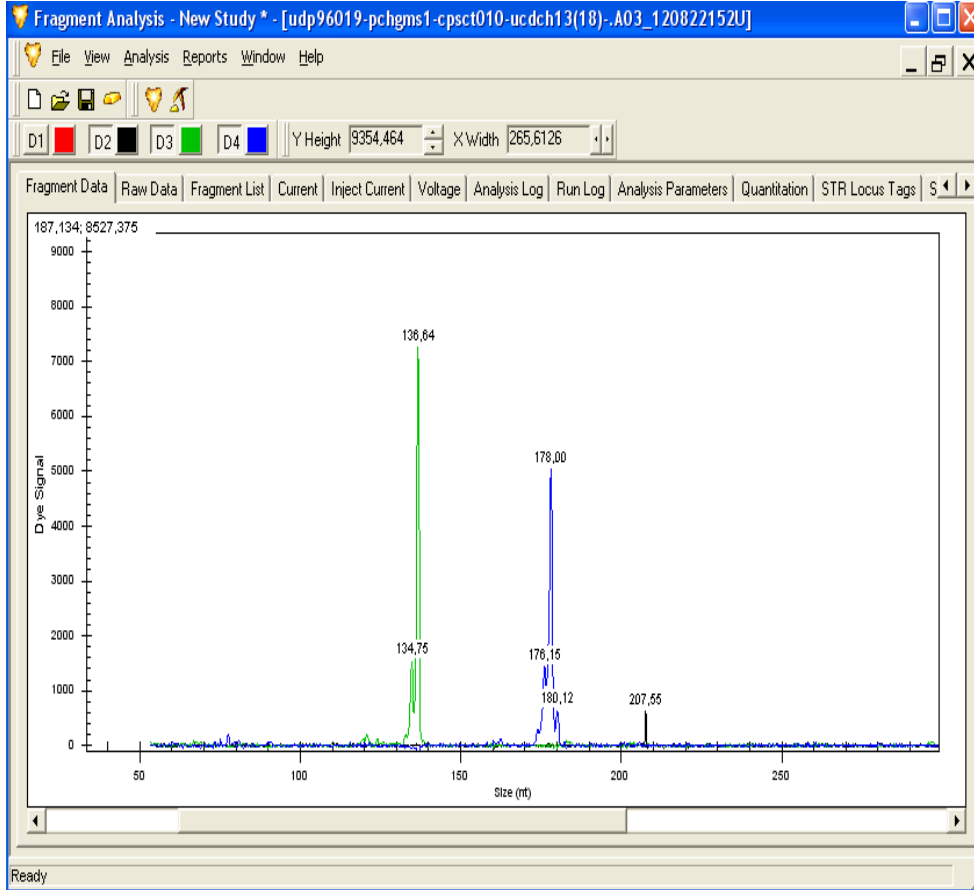
Şekil 5.2. PSA12A02 lokusuna ait allelerin PCR sonrası jel görüntüsü



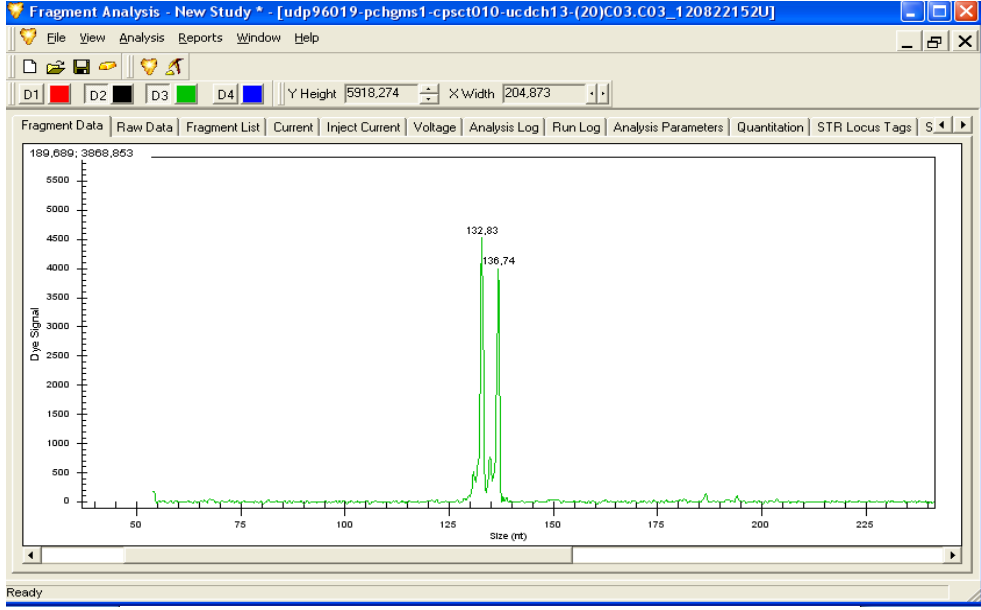
Şekil 5.3. UCD-CH17 lokusuna ait allelerin PCR sonrası jel görüntüsü

5.3 SSR lokuslarına ait allel büyüklüklerinin belirlenmesi

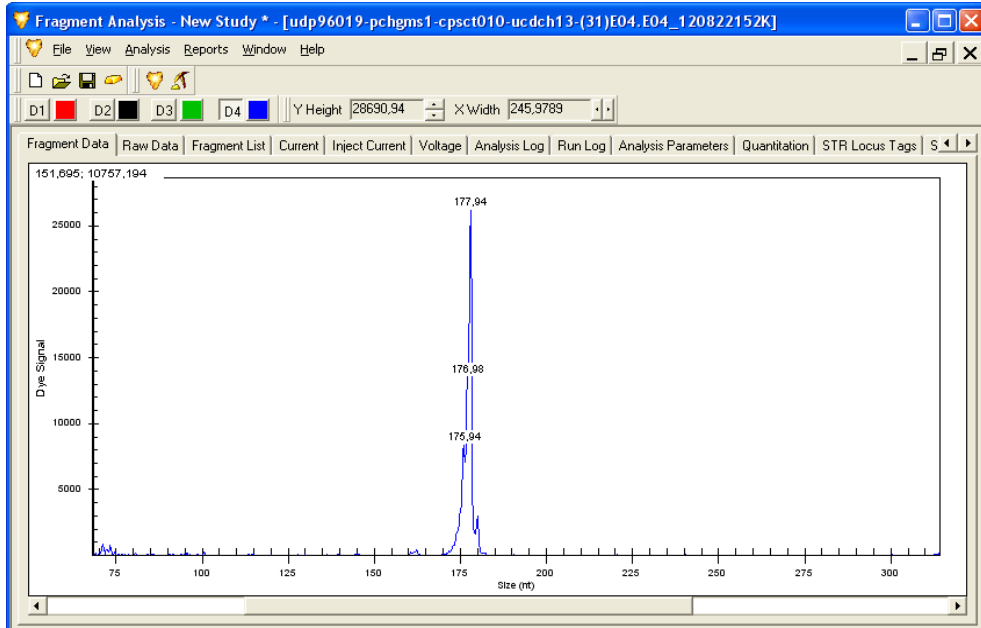
Lokus-allel profillerinin kapilleri elektroforezdeki farklı görünüşleri Şekil 5.4'de sunulmuştur.



Şekil 5.4. Lokus allel profillerinin kapiller elektroforezindeki genel allel görüntüleri



Şekil 5.5. UCD-CH13 primeri kapiller elektroforezdeki heterozigot allel görüntüsü



Şekil 5.6. CPSCT010 primeri kapiller elektroforezdeki homozigot allel görüntüsü

5.4 Genetik analizler

Araştırmada 9 SSR lokusuna ait allel büyüklükleri baz çifti (bp, basepair) olarak izelge 5.2’de sunulmuştur. Ayrıca Lapins, Bing ve Rainer eşitleride referans çeşitler olarak rneklelerle beraber analiz edilmiştir.

Çizelge 5.2. Kiraz çeşitlerinin 9 SSR lokusundaki allel büyüklükleri (bp)

No	UCD-CH 31		Pchgms-1		UCD-CH13		CPSCT010		UDAp-401	
1	124	132	130	138	122	136	178	178	260	260
2	124	132	138	138	120	136	156	178	260	260
3	130	134	138	138	120	136	178	182	262	272
4	124	124	130	138	122	136	178	178	262	262
5	124	124	138	138	120	136	162	178	262	272
6	124	132	130	144	120	136	178	178	262	262
7	124	124	140	140	136	136	178	178	266	266
8	124	124	140	184	132	136	178	178	266	266
9	124	132	138	138	120	136	178	178	262	272
10	124	124	138	138	120	136	178	178	262	272
11	124	124	140	184	120	136	178	178	266	266
12	124	142	140	184	132	136	178	178	266	266
13	124	134	130	138	122	136	178	182	262	262
14	130	134	130	138	120	136	178	178	260	260
15	142	142	138	138	120	136	178	182	262	266
16	132	134	138	138	120	136	178	178	260	260
17	124	132	130	138	136	136	162	178	260	260
18	124	142	140	184	132	136	178	178	266	296
19	124	124	140	140	120	136	178	178	262	266
20	124	142	138	144	120	136	176	176	262	266
21	140	142	138	138	136	136	178	182	262	266
22	130	132	130	138	120	136	178	178	260	260
23	124	124	138	138	136	136	178	178	260	260
24	124	132	130	130	136	136	178	178	260	260
25	134	142	142	140	120	136	178	178	260	266
26	124	132	138	138	136	136	178	178	262	272
27	142	142	138	138	120	136	178	182	262	266
28	124	132	130	130	120	136	178	178	260	260
29	124	134	130	130	116	136	178	178	260	260
30	132	134	138	138	136	136	178	178	260	260
31	132	132	138	138	136	136	178	178	260	260
32	142	142	138	138	120	136	178	182	262	262
33	122	134	138	136	136	136	178	178	260	260
34	124	134	138	136	120	136	178	178	296	296
35	130	134	130	130	120	136	178	182	260	272
36	130	134	130	130	136	136	178	182	260	272
37	124	124	138	138	132	136	162	178	296	296
38	124	124	138	138	132	136	178	178	272	298
39	142	142	138	138	120	136	178	182	262	266
40	130	132	130	130	136	136	178	178	262	262
41	142	142	138	138	120	136	178	182	262	266
42	142	142	138	138	120	136	178	182	262	266
43	124	142	142	140	132	132	162	178	260	260
44	124	124	142	140	120	136	162	178	260	266
45	124	132	130	130	136	136	162	178	260	260

Çizelge 5.2 (devam)

No	UDP96-005		PSA12A02		UCD-CH17		UCD-CH21	
1	115	135	160	176	188	204	109	111
2	119	137	176	176	188	202	111	111
3	137	137	158	164	188	206	111	119
4	119	137	150	160	188	188	111	111
5	119	135	160	168	188	204	109	111
6	115	119	160	160	194	204	111	117
7	119	137	160	164	190	190	109	109
8	119	135	160	176	192	214	109	109
9	115	137	160	166	190	190	109	109
10	119	135	160	164	188	202	109	111
11	119	135	160	164	190	190	109	109
12	119	135	160	176	194	214	109	109
13	115	135	158	158	200	204	109	119
14	115	137	160	176	204	204	111	113
15	119	131	158	158	190	204	109	119
16	137	115	160	168	202	206	111	111
17	137	115	166	176	188	202	109	111
18	119	135	160	176	194	214	109	109
19	115	135	168	176	200	206	119	119
20	115	119	160	160	190	190	115	117
21	119	137	158	158	190	202	109	119
22	137	113	156	176	188	200	111	113
23	119	137	156	176	188	200	109	111
24	115	135	160	176	188	202	109	111
25	135	135	150	160	202	208	107	111
26	115	135	160	166	190	190	109	109
27	119	135	158	158	190	202	109	109
28	115	135	160	176	188	202	109	111
29	135	119	168	176	188	206	109	109
30	115	135	176	176	188	206	111	111
31	115	135	176	176	188	202	111	111
32	119	131	158	158	190	202	109	119
33	131	119	160	176	198	202	111	111
34	135	119	176	176	202	202	111	111
35	119	135	160	160	190	190	111	113
36	119	137	160	160	190	190	111	113
37	135	119	164	164	190	214	109	119
38	119	135	160	176	190	214	107	119
39	119	135	158	158	190	202	109	119
40	137	137	158	158	188	188	107	111
41	119	135	158	158	190	202	109	119
42	119	135	158	158	190	202	109	111

43	119	135	176	176	192	214	117	119
44	119	131	164	164	190	190	109	109
45	115	137	160	160	188	202	109	111

Çalışılan lokuslardaki allel sayıları (n), heterozigotluk oranları (He, Ho), tespit olasılığı değeri (PI) ve sessiz (null) allel frekansı (r) Çizelge 5.3’de sunulmuştur.

Çizelge 5.3 Çalışılan lokuslardaki allel sayıları (n), beklenen heterozigotluk (He), gözlenen heterozigotluk (Ho), tespit olasılığı (PI) değeri ve sessiz (null) allel frekansı

Lokuslar	Allel sayıları (n)	Beklenen Heterozigotluk (He)	Gözlenen Heterozigotluk (Ho)	Tespit olasılığı değeri (PI)	Sessiz (null) Allel Frekansı (r)
UCD-CH 31	7	0.699	0.600	0.241	0.05
Pchgms1	6	0.636	0.466	0.240	0.103
UCD-CH13	5	0.540	0.711	0.382	-0.110
CPSCT010	5	0.375	0.400	0.463	-0.018
UDAp-401	6	0.736	0.422	0.198	0.180
UDP96-005	6	0.758	0.933	0.179	-0.099
PSA12A02	8	0.775	0.533	0.152	0.136
UCD-CH17	11	0.825	0.733	0.094	0.050
UCD-CH21	7	0.699	0.600	0.241	0.058
Toplam	61	6.043	5.398	-	-
Ortalama	6.77	0.671	0.599	-	-

Bulunan genetik parametrelerden, allel sayılarına bakıldığında, en yüksek allel UCD-CH17 (11 allel) lokusunda elde edilirken bunu 8 allel ile PSA12A02 lokusu ve 7 allel ile UCD-CH21 ve UCD-CH31 lokusları izlemektedir. En düşük allel ise 5 allel ile UCD-CH13 ve CPSCT010 lokuslarında gözlemlenmiştir. Geriye kalan SSR lokuslarındaki allel sayıları ise ortalama 6 (UDAp-401, Pchgms1, UDP96-005) arasında değişkenlik göstermiştir. 9 SSR lokusunda toplamda 61 allel bulunmuştur.

Genel heterozigotluk incelendiğinde; beklenen heterozigotluk (He) ve gözlenen heterozigotluk (Ho) ortalama değerleri sırası ile 0.67 ve 0.59 olarak bulunmuştur. Beklenen heterozigotluk 0.375 ile 0.825 arasında bulunurken, gözlenen heterozigotluk 0.40 ile 0.93 arasındadır. UCD-CH31, Pchgms1, UDAp-401, PSA12A02, UCD-CH17, UCD-CH21 lokuslarında beklenen heterozigotluk değerleri (He) gözlenen heterozigotluk değerlerine (Ho) oranla yüksek bulunurken, UCD-CH13, CPSCT010, UDP96-005 lokuslarında ise gözlenen heterozigotluk (Ho) değerleri, beklenen heterozigotluk (He) değerlerine göre daha yüksek bulunmuştur.

Tespit olasılığı değerlerinin tamamı (PI) (Sefc vd 2001) tarafından belirlenen 0.05 eşik değerinin üzerinde, 0.152 ile 0.463 arasında bulunmuştur. Null allel değerleri 3 lokusta (UCD-CH13, CPSCT010, UDP96-005) negatif, diğer lokuslarda ise sıfıra yakın pozitif tespit edilmiştir. Herbir lokusda allel sayılarının oranlarını gösteren frekans değerleri Çizelge 5.4'de sunulmuştur.

Çizelge 5.4. SSR lokuslarına ait allel frekansları

No	UCD-CH 31	Allel Frekansı	Pchgms1	Allel Frekansı	UCD-CH13	Allel Frekansı
1	122	0.01	130	0.15	116	0.01
2	124	0.42	136	0.04	120	0.25
3	130	0.06	138	0.55	122	0.03
4	132	0.16	140	0.15	132	0.07
5	134	0.12	144	0.02	136	0.62
6	140	0.11	184	0.06		
7	142	0.20				

Çizelge 5.4. (devam)

No	CPSCT010	Allel Frekansı	UDAp-401	Allel Frekansı	UDP96-005	Allel Frekansı
1	156	0.01	260	0.37	113	0.01
2	162	0.06	262	0.25	115	0.16
3	176	0.02	266	0.21	119	0.31
4	178	0.77	272	0.08	131	0.04
5	182	0.12	296	0.05	135	0.28
6			298	0.01	137	0.17

Çizelge 5.4. (devam)

No	PSA12A02	Allel Frekansı	UCD-CH17	Allel Frekansı	UCD-CH21	Allel Frekansı
1	150	0.02	188	0.20	107	0.03
2	156	0.02	190	0.27	109	0.40
3	158	0.21	192	0.02	111	0.34
4	160	0.31	194	0.03	113	0.04
5	164	0.08	198	0.01	115	0.01
6	166	0.03	200	0.04	117	0.03
7	168	0.04	202	0.20	119	0.13
8	176	0.26	204	0.07		
9			206	0.05		
10			208	0.01		
11			214	0.06		

Lokuslar itibari ile frekansı en yüksek olan alleler dikkate alındığında en yüksek allel frekansı; UCD-CH31’de 124 (0.42), Pchgms1’de 138 (0.55), UCD-CH13 136 (0.62), CPSCT010’da 178 (0.77), UDAp-401’ de 260 (0.37), UDP96-005’ da 119 (0.31), PSA12A02’ de 160 (0.31), UCD-CH17’ de 190 (0.27), UCD-CH21’ de 109 (0.40) olarak tespit edilmiştir.

45 genotip içerisinde tespit edilen; aynı genotip (isim ve SSR lokuslarındaki allel büyüklükleri aynı) sinonim (farklı isimle adlandırılan fakat genetik olarak birbiri ile aynı genotipler) ve homonim (aynı isimle adlandırılan fakat genetik olarak birbirinden farklı genotipler) durumları Çizelge 5.5’de sunulmuştur.

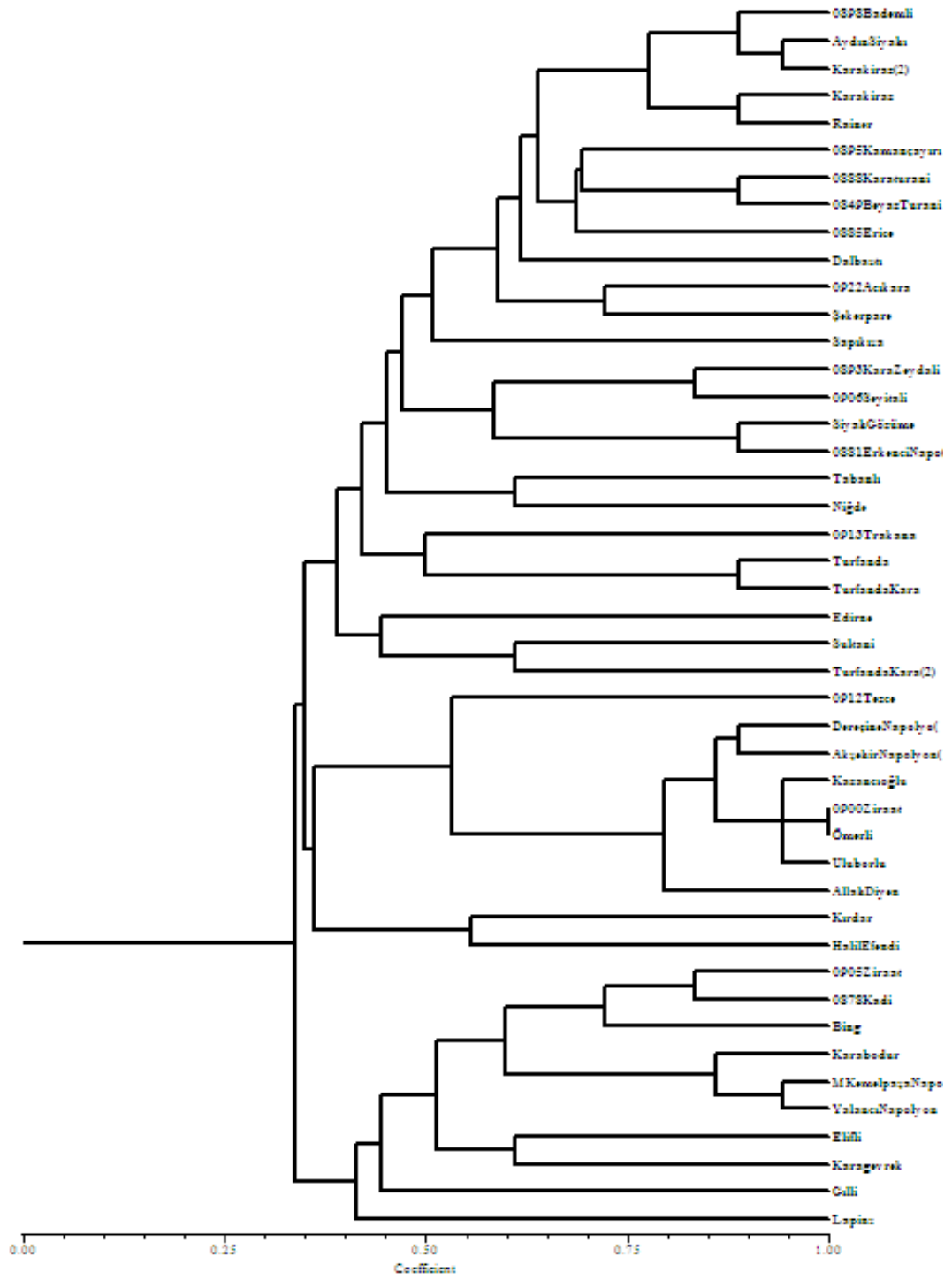
Çizelge 5.5 Aynı, sinonim ve homonim kiraz çeşitleri

Homonim Çeşitler
M.Kemal Paşa Napolyonu- Dereçine Napolyonu- Yalancı Napolyon-0881 Erkenci Napolyonu- Akşehir Napolyonu
Turfanda Kara (2)- Turfanda- Turfanda Kara
Karakiraz- Karakiraz (2)
0905 Ziraat-0900 Ziraat
0849 Beyaz Turani-0888 Karaturani
Sinonim Çeşitler
Ömerli-0900Ziraat
Aynı Çeşitler
-

Genotiplere ait genetik benzerlik indeksi ve genetik ilişki dendogramı sırası ile çizelge 5.6 ve şekil 5.7’de sunulmuştur.

Çizelge 5.6. Genetik benzerlik indeksi

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X	Y	Z	AA	AB	AC	AD	AE	AF	AG	AH	AI	AJ	AK	AL	AM	AN	AO	AP	AQ	AR	AS	AT									
2		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45									
3	1	1																																																					
4	2	0,556	1																																																				
5	3	0,278	0,444	1																																																			
6	4	0,556	0,5	0,389	1																																																		
7	5	0,556	0,5	0,5	0,556	1																																																	
8	6	0,556	0,389	0,278	0,556	0,5	1																																																
9	7	0,333	0,278	0,222	0,444	0,389	0,333	1																																															
10	8	0,444	0,278	0,111	0,389	0,444	0,333	0,667	1																																														
11	9	0,5	0,444	0,444	0,444	0,556	0,5	0,556	0,389	1																																													
12	10	0,556	0,556	0,556	0,611	0,833	0,5	0,5	0,5	0,611	1																																												
13	11	0,389	0,278	0,222	0,389	0,5	0,389	0,833	0,778	0,556	0,611	1																																											
14	12	0,444	0,278	0,111	0,333	0,389	0,389	0,611	0,889	0,389	0,444	0,722	1																																										
15	13	0,556	0,222	0,444	0,444	0,444	0,444	0,222	0,278	0,389	0,389	0,278	0,278	1																																									
16	14	0,667	0,5	0,444	0,444	0,389	0,5	0,278	0,278	0,444	0,389	0,278	0,278	0,389	1																																								
17	15	0,278	0,333	0,5	0,278	0,5	0,333	0,333	0,278	0,444	0,444	0,389	0,333	0,556	0,278	1																																							
18	16	0,556	0,667	0,5	0,444	0,444	0,444	0,278	0,222	0,556	0,5	0,278	0,222	0,278	0,667	0,278	1																																						
19	17	0,722	0,667	0,333	0,444	0,444	0,389	0,333	0,278	0,5	0,444	0,222	0,278	0,389	0,556	0,222	0,556	1																																					
20	18	0,444	0,278	0,111	0,333	0,389	0,389	0,556	0,833	0,389	0,444	0,667	0,944	0,278	0,278	0,333	0,222	0,278	1																																				
21	19	0,389	0,278	0,333	0,333	0,444	0,389	0,444	0,5	0,389	0,444	0,5	0,444	0,444	0,333	0,333	0,389	0,278	0,444	1																																			
22	20	0,278	0,278	0,222	0,333	0,389	0,556	0,389	0,278	0,5	0,389	0,444	0,333	0,278	0,278	0,444	0,278	0,222	0,333	0,333	1																																		
23	21	0,222	0,389	0,5	0,333	0,389	0,222	0,444	0,278	0,444	0,444	0,333	0,333	0,5	0,222	0,778	0,333	0,389	0,333	0,278	0,389	1																																	
24	22	0,611	0,611	0,444	0,444	0,333	0,389	0,222	0,222	0,389	0,389	0,222	0,222	0,278	0,722	0,222	0,556	0,611	0,222	0,333	0,167	0,222	1																																
25	23	0,611	0,667	0,389	0,556	0,556	0,333	0,5	0,444	0,444	0,611	0,389	0,389	0,333	0,5	0,333	0,5	0,667	0,389	0,389	0,222	0,444	0,667	1																															
26	24	0,889	0,611	0,278	0,5	0,5	0,5	0,389	0,444	0,5	0,611	0,389	0,444	0,444	0,611	0,222	0,611	0,833	0,444	0,389	0,278	0,333	0,611	0,667	1																														
27	25	0,389	0,333	0,278	0,333	0,333	0,333	0,333	0,444	0,278	0,444	0,5	0,5	0,222	0,444	0,278	0,5	0,278	0,5	0,389	0,278	0,278	0,333	0,278	0,444	1																													
28	26	0,556	0,333	0,333	0,389	0,556	0,444	0,556	0,444	0,889	0,611	0,556	0,444	0,444	0,333	0,389	0,444	0,5	0,444	0,389	0,444	0,444	0,278	0,444	0,611	0,278	1																												
29	27	0,278	0,389	0,444	0,278	0,5	0,278	0,389	0,389	0,5	0,556	0,5	0,444	0,5	0,222	0,833	0,333	0,278	0,444	0,333	0,444	0,778	0,222	0,333	0,333	0,389	0,5	1																											
30	28	0,889	0,667	0,333	0,5	0,556	0,556	0,333	0,444	0,556	0,667	0,444	0,444	0,444	0,667	0,278	0,667	0,778	0,444	0,444	0,333	0,278	0,667	0,611	0,944	0,5	0,556	0,389	1																										
31	29	0,611	0,444	0,278	0,389	0,444	0,333	0,444	0,556	0,333	0,444	0,5	0,556	0,389	0,444	0,222	0,444	0,5	0,556	0,5	0,167	0,222	0,444	0,556	0,611	0,389	0,389	0,333	0,611	1																									
32	30	0,667	0,667	0,444	0,389	0,389	0,333	0,222	0,278	0,389	0,444	0,222	0,278	0,333	0,556	0,222	0,722	0,611	0,278	0,389	0,167	0,278	0,556	0,611	0,722	0,389	0,5	0,278	0,667	0,556	1																								
33	31	0,667	0,722	0,333	0,389	0,389	0,333	0,222	0,278	0,389	0,5	0,222	0,278	0,278	0,5	0,222	0,667	0,667	0,278	0,333	0,167	0,333	0,556	0,611	0,778	0,389	0,5	0,333	0,722	0,444	0,889	1																							
34	32	0,222	0,389	0,5	0,333	0,444	0,333	0,278	0,222	0,444	0,5	0,333	0,278	0,556	0,222	0,889	0,333	0,278	0,278	0,278	0,389	0,778	0,222	0,333	0,278	0,278	0,389	0,833	0,333	0,222	0,222	0,278	1																						
35	33	0,444	0,5	0,222	0,389	0,278	0,333	0,333	0,333	0,222	0,389	0,278	0,333	0,167	0,5	0,222	0,556	0,444	0,333	0,222	0,167	0,278	0,389	0,5	0,556	0,444	0,278	0,222	0,5	0,444	0,556	0,556	0,278	1																					
36	34	0,389	0,556	0,278	0,389	0,389	0,389	0,278	0,389	0,278	0,5	0,389	0,389	0,278	0,389	0,222	0,444	0,333	0,444	0,389	0,222	0,222	0,333	0,389	0,444	0,444	0,278	0,333	0,5	0,444	0,5	0,5	0,278	0,611	1																				
37	35	0,444	0,389	0,5	0,389	0,5	0,444	0,333	0,278	0,444	0,5	0,444	0,278	0,389	0,611	0,389	0,444	0,333	0,278	0,222	0,444	0,333	0,5	0,333	0,444	0,444	0,444	0,444	0,5	0,389	0,389	0,333	0,389	0,389	0,389	1																			
38	36	0,389	0,389	0,5	0,444	0,389	0,389	0,444	0,222	0,444	0,389	0,333	0,222	0,333	0,611	0,333	0,444	0,444																																					



Şekil 5.7. Kiraz çeşitlerine ait genetik ilişki dendogramı

Dendogram genel olarak incelendiğinde, genel olarak 2 ana dallanma gözlemlenmektedir. 0905 Ziraat, 0878 Kadi, Bing, Karabodur, M.K. Paşa Napolyonu, Yalancı Napolyon, Elifli, Karagevrek, Gıllı, Lapins genotipleri bir grupta yer alırken, geriye kalan 35 örnek kendi aralarında farklı gruplar oluşturmuştur Referans çeşitler kendi içlerinde homojenlik göstermeyip dendogram boyunca Türk çeşitleri içinde dağılmış durumdadırlar.

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

Ülkemiz kiraz ve vişnenin doğal yayılma alanları içerisinde yer almakta ve bu nedenle zengin bir gen potansiyeline sahiptir. Gen kaynaklarının ulusal koleksiyonlar olarak saklanması ve tanımlanması büyük bir önem arz etmektedir. Bu tez çalışmasında; kiraz genetik kaynaklarının belirlenmesi, tanımlanması ve korunması amacı ile Isparta- Eğirdir Meyvecilik Araştırma İstasyonu'ndan alınan 45 kiraz genotipinin DNA markörlerden SSR (mikrosatellit)' a dayalı genetik karakterizasyonu yapılmıştır.

Mikrosatellitler kirazda; gen kaynaklarının karakterizasyonu (Lacis vd 2009), genetik ilişkilendirme (Dirlewanger vd 2002, Wünsch vd 2004), ebeveyn tayini (Schueler vd 2003), çeşit tanımlaması (Xuan vd 2009, Gulen vd 2010) ve haritalama çalışmalarında (Olmstead vd 2008) yoğun olarak kullanılmaktadır.

Tez çalışmasında, erikten geliştirilen CPSCT010 (Messina vd 2004, Mnejja vd 2005), şeftaliden geliştirilen Pchgms1 (Sosinski vd 2000), UDP96-005 (Cipriani vd 1999), kayıtsızdan geliştirilen UDAp-401 (Messina vd 2004), kirazdan geliştirilen UCDCH-13, UCDCH-17, UCDCH-21, UCDCH-31 (Struss vd 2003) ve PSA12A02 (Sosinski vd 2000) SSR primerleri 45 kiraz genotipinin moleküler tanımlanmasında kullanılmıştır. Bu durum diğer araştırmalarda olduğu gibi (Mnejja vd 2005, Wünsch and Hormanza 2002, Dirlewanger vd 2002, Wünsch 2009, Ercisli vd 2011, Turet-Sayar vd 2012) SSR markörlerin Prunus türleri arası geçişkenliğini (cross-amplication) göstermektedir.

Dokuz SSR lokusu kullanılarak 45 genotipde elde edilen toplam allel sayısı 61'dir. En düşük allel sayısı 5 allel ile UCD-CH13 ve CPSCT010 lokuslarında tespit edilirken, en yüksek allel sayısı 11 olarak UCD-CH17 lokusunda tespit edilmiş, lokuslardaki allel ortalaması ise 6.77 olarak bulunmuştur.

Beklenen heterozigotluk (He) ve gözlenen heterozigotluk (Ho) oranı ortalaması sırasıyla 0.67 ve 0.59 olarak bulunmuştur. UCD-CH13, CPSCT010, UDP96-005 lokuslarında gözlenen heterozigotluk (Ho) yüksek bulunurken, UCD-CH31, Pchgms1, UDAp-401, PSA12A02, UCD-CH17, UCD-CH21 lokuslarında ise beklenen heterozigotluk (He) yüksek bulunmuştur. Bu lokuslarda, null allellerin frekansı (r) pozitif olmakla birlikte değerlerinin düşük olması null allel varlığı olasılığını düşürmektedir (Çizelge 5.3).

Tespit olasılığı (PI) değeri tüm lokuslarda, Sefc vd (2001)'nin belirttiği 0.05 değerinden yüksek bulunmuştur. Bu da, bu seçilen mikrosatellit markörlerin kirazda gerçekten yüksek derecede polimorfik olduklarını göstermektedir. En düşük PI değeri UCD-CH17 (0.094) olup en yüksek PI değeri ise CPSCT010 (0.463) markörlerinde gözlenmiştir. Çalışmada kullanılan UCD-CH17 markörü çalışılan mikrosatellit markörler arasında en fazla bilgi verici markör olup araştırmamızdaki genotipleri en iyi şekilde ayırt etmiştir.

Tespit edilen genetik parametreler (n, He, Ho, vd.) diğer araştırmalar ile karşılaştırıldığında; tezde kullanılan Pchgms1 lokusu, şeftalide 4 allel verirken (Sosinski vd 2000), yapılan diğer bir kiraz çalışmasında ise 2 allel vermiştir (Wünsch and Hormaza 2002). Bizim çalışmamızda ise 6 allel vermiştir. Aynı çalışmada UDP96-005 primeri ise 5 allel verirken (Wünsch and Hormaza 2002) bizim çalışmamızda ise 6 allel vermiştir.

Kullanılan kayısı kökenli SSR lokusu UDAp-401 Türk kayısı çeşitlerinde sırası ile 7 (Ho: 0.379) ve 10 allel (Ho: 0.568) verirken (Akpınar vd 2010), Turet-Sayar ve ark. (2012) tarafından yapılan çalışmada 15 kiraz genotipinde monomorfik bulunmuştur. Tez çalışmasında ise 45 kiraz genotipinde 6 allel vererek yeterli bir polimorfizm göstermiştir.

Genetik parametrelerden benzerlik indeksine bakıldığında; %100 benzer sinonim çeşitlerin (0900 Ziraat ve Ömerli) dışında en yüksek benzerlik %94 oranı ile M.Kemal Paşa Napolyonu-Yalancı Napolyon, Karakiraz (2)-Aydın Siyahı, Ömerli-Kazancıoğlu,

Kazancıoğlu-0900 Ziraat, Kazancıoğlu-Uluborlu, Uluborlu-0900 Ziraat, Uluborlu-Ömerli çeşitleri arasında bulunmuştur. En düşük benzerlik; %11 benzerlik oranı ile 0913 Trakana çeşidinin Karabodur - M.Kemal Paşa Napolyonu - Yalancı Napolyon çeşitlerine olan benzerliği, Lapins çeşidinin 0913 Trakana – Siyah Gözüme çeşitlerine olan benzerliği ve Bing çeşidinin Niğde çeşidi ile olan benzerliğidir.

Homonim çeşitler arasındaki benzerlik ilişkilerine bakıldığında; %94 M.Kemal Paşa Napolyonu- Yalancı Napolyon, %88 Dereçine Napolyonu- Akşehir Napolyonu,%88 Turfanda- Turfanda Kara, %77 Karakiraz (2)- Karakiraz, %88 0849 Beyaz Turani-0888 Karaturani, %33 0905 Ziraat-0900 Ziraat şeklinde benzerlik gözlenmiştir. Aynı isimle adlandırılan homonim çeşitlerin birbirine aynı olmaması yanlış adlandırmadan kaynaklanabileceği gibi her bir çeşit içerisinde zamanla ortaya çıkan varyasyonları (klon, tip vb) göstermektedir. 0900 Ziraat ve Ömerli genotipleri %100 benzerlik oranı ile sinonim çeşitler olarak belirlenmiştir.

Referans çeşitlere bakıldığında; yapılan bir çalışmada Lapins ve Bing benzerliği %62 bulunurken (Turet-Sayar vd 2012) bu tezde ise %38 oranında bulunarak hemen hemen her iki çalışma birbirini destekler niteliktedir. Aynı çalışmada kullanılan 0900 Ziraat çeşidi Lapins çeşidine %33 ve Bing çeşidine %37 oranında benzerlik göstermiş olup bizim çalışmamızdaki benzerlik oranında ise 0900 Ziraat çeşidi Lapins çeşidine %27 ve Bing çeşidine %38 benzer olarak bulunmuştur.

Sonuç olarak; Isparta- Eğirdir Meyvecilik Araştırma İstasyonu'dan alınan 45 kiraz genotipinin kapsamlı genetik tanımlanmasına yönelik yapılan bu tezde, çeşitler arası benzerlik oranları bulunarak, sinonim ve aynı çeşitler belirlenmiştir. Tez bulgularının, günümüzde ve gelecekte yürütülecek benzer kapsamlı çalışmalara ve diğer kiraz araştırmalarına ışık tutacağı ümit edilmektedir.

KAYNAKLAR

- Akpınar, A.E., Koçal, H., Ergül, A., Kazan, K., Şelli, M.E., Bakır, M., Aslantaş, Ş., Kaymak, S., Sarıbaş, R. 2010. SSR-based molecular analysis of economically important Turkish apricot cultivars. *Genetic Molecular Research* 9 (1); 324-332.
- Arumuganathan, K., Earle, E.D. 1991. Nuclear DNA Content of some important plant species. *Plant Molecular Biology Reporter*, 9; 208-219.
- Arús, P., Messeguer, R., Viruel, M., Tobutt, K., Dirlevanger, E., Santi, F., Quarta, R., Ritter, E., 1994a. The European Prunus mapping project. *Euphytica* 77; 97-100.
- Arús, P., Olarte, C., Romero, M., Vargas, F., 1994b. Linkage Analysis of Tenisozyme Genes in F1 Segregating Almond Progenies. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 119; 339-344.
- Arús, P., Yamamoto, Y., Dirlewanger, E., Abbott, A.G. 2005. Synteny in the Rosaceae. In: Janick Jules (ed) *Plant Breeding Reviews* Vol 27. Pp 175-211.
- Baird, W.V., Ballard, R.E., Rajapakse, S., Abbott, A.G., 1996. Progress in Prunus Mapping and Application of Molecular Markers to Germplasm Improvement. *Hort Sci.* 31 (7); 1099-1106
- Bliss, F.A., Arulsekhar, S., Dandekar, A.M., 1994. Identification of Woody Plant Cultivars Using DNA Fingerprinting p. 1-8 In: *Research Reports, California Peaches and Nectarines*. California Tree Fruit Agreement, Sacramento.
- Bliss, F.A., Arulsekhar, S., Foolad, M.R., Becerra, V., Gillen, A. M., Warburton, M. L., Dandekar, A. M., Kocsisne, G. M., And Mydin, K. K., 2002. An Expanded Genetic Linkage Map Of Prunus Based On An Interspecific Cross Between Almond And Peach. *Genome.* 45 (3); 520 – 529.
- Boritzki, M., Plieske, J., Struss, D. 2000. Cultivar identification in sweet cherry (*Prunus avium* L.) using AFLP and microsatellite markers. *Acta Horticulturae*, 538; 505-510.
- Brookfield, J.F.Y. 1996. A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. *Molecular Ecology*, 5; 4534–4555.
- Cai, Y.L., Cao, D.W., Zhao, G.F. 2007. Studies on genetic variation in cherry germplasm using RAPD analysis. *Scientia Horticulturae* 111 (2007); 248–254.
- Cantini, C., Iezzoni, A.F., Lamboy, W., Boritzki, M., Struss, D. 2001. DNA fingerprinting of tetraploid cherry germplasm using simple sequence repeats. *Journal of the American Society for Horticultural Science.*, 126; 205-209.
- Chapparo, JX, Werner DJ, O'malley, D. Sederoff, RR, 1994. Targeted Mapping and Linkage Analysis in Peach. *Proc. Plant Genome I*: 21.(Abstr. 23).

- Cipriani, G., Lot, G., Huang, W.G., Marrazzo, M.T., Peterlunger, E., Testoline, R. 1999. AC/GT and AG/CT microsatellite repeats in peach [*Prunus persica* (L) Batsch] isolation, characterisation and cross-species amplification in *Prunus*. *Theoretical and Applied Genetics*, 99; 65-72.
- Clarke, J. B., Tobutt K. R. 2003. Development and characterization of polymorphic microsatellites from *Prunus Avium* 'Napoleon.' *Molecular Ecology Notes* 3; 578–580.
- Clarke, J. B., Tobutt K. R. 2009. A standard set of accessions, microsatellites and genotypes for harmonising the fingerprinting of cherry collections for the ECPGR. *Acta Horticulturae*, 814; 615-618.
- Çelikkol, B.P. 2011. Önemli erik (*Prunus* sp.) gen kaynaklarının SSRs (simple sequence repeats)'a dayalı genetik karakterizasyonu.
- Demir, T., Demirsoy, L., Demirsoy, L., Aka-Kaçar, Y., Yılmaz, M., Macit, I. 2010. Determination of sweet cherry genetic resources in Giresun (Turkey) and their identification with SSR markers. *Fruits*, 66; 53-62.
- Demirsoy, L., Demir, T., Demirsoy, H., Okumuş, A., Kaçar, Y.A. 2008. Identification Of Some Sweet Cherry Cultivars Grown In Amasya By Rapid Markers. *Acta Horticulturae* 795; 147-153.
- Dirlewanger, E., Bodo, C., 1995. Molecular Genetic Map of Peach. *Euphytica* 77; 101-103.
- Dirlewanger, E., Pronier, V., Parvery, G., Rothan, G., Guye, A. And Monet, R., 1998, Genetic, Linkage Map of Peach [*Prunus persica* (L) Batsch] Using Morphological and Molecular Markers, *Theoretical and Applied Genetics*, 97; 888-895.
- Dirlewanger, E., Crosson, A., Tavaud, P., Aranzana, M.J., Poizat, C., Zanetto. A., Arús, P. and Laigret, L. 2002. Development of microstellite markers in peach and their use in genetic diversity analysis in peach and sweet cherry. *Theoretical and Applied Genetics*, 105; 127-138.
- Downey, S.L., Iezzoni, A.F. 2000. Polymorphic DNA markers in black cherry (*Prunus serotina*) are identified using sequences from sweet cherry, peach and sour cherry. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 125(1); 76-80.
- Ercisli, S., Agar,G., Yildirim,N., Duralija, B., Vokurka, A., Karlidag, H. 2011. Genetic diversity in wild sweet cherries (*Prunus avium*) in Turkey revealed by SSR markers. *Genetic Molecular Research*, 10 (2); 1211-1219.
- FAO 2010. FAOSTAT statistics database on the World Wide Web. <http://faostat.fao.org>
- Faust, M., Suranyi, D. 1997. Origin and dissemination of cherry. *Hort Rev* 19; 263-317.

- Foolad, MR, Arulsekhar, S., Becerra, V., Bliss, FA, 1995. A Genetic Map of *Prunus* Based on Interspecific Cross Between Peach and Almond. *Theor. Appl. Genet.* 91; 262-269.
- Gerlach, H.K., Stosser, R., 1998. Sweet cherry cultivar identification using RAPD derived DNA fingerprints. *Acta Horticulturae*, 468; 63-70.
- Gulen, H., İpek, A., Burak, M., Eriş, A. 2005. Assessment of Genetic Diversity and Relationship Among Some Sweet Cherry Cultivars Using AFLP/PTM Markers. 5th International Cherry Symposium, June 08-10.2005, Bursa-Turkey.
- Gulen, H., Ipek, A., Ergin, S., Akcay, M.E. 2010. Assessment of genetic relationships among 29 introduced and 49 local sweet cherry accessions in Turkey using AFLP and SSR markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 85; 427-431.
- Hancock, A.M., Iezzoni, A.F. 1988. Malate dehydrogenase isozyme patterns in seven *Prunus* species. *HortScience* 23(2); 381-383
- Hedrick, U.P. 1915. The history of cultivated cherries. In: Hedrick UP(ed.) *The Cherries of New York*, JB Lyon, Albany, USA, pp 3964.
- Hurtado, M.A., Llacer, G., Badenes, M.L. and Abbott, A.G., 2006, Genetic Linkage Maps of Two Apricot Cultivars (*Prunus armeniaca* L) Based on RAPD and AFLP Markers, ISHS Acta Horticulture 701:XII International Symposium on Apricot Culture and Decline (Abst.), February 2006, France
- Jing-Yong, Z., Xiu-Lan, L., Ren-Dao, L., Hong-Qiang, C. 2009. Genetic Relationship of Sweet Cherry (*Prunus avium* L.) Based on SSR Markers. *Plant Science Research* 2(1); 6-10.
- Joobeur, T., Periam, N., De Vincente, M.C., King, G.J. and Arus, P., 2000, Development of A Second Generation Linkage for Almond Using RAPD and SSR Markers , *Genome* 43; 649-655.
- Jun, J.H., Chung, K.H., Jeong, S.B. and Lee, H.V., 2002, Identification of RAPD and SCAR Markers Linked to The Flesh Adhesion Gene F In Peach [*Prunus persica* (L.) Batsh], *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* , 77 (5); 598-603.
- Kaçar, Y. A., Lezzoni, A., Çetiner, S. 2005. Sweet cherry cultivar identification by using SSR markers. *Journal of Biological Sciences*, 5(5); 616-619.
- Kaçar, Y. A., Çetiner, M. S., Cantini, C., Lezzoni, A. F., 2006. Simple sequence repeat (SSR) markers differentiate Turkish sour cherry germplasm. *Journal of the American Pomological Society*, 60(3); 136-143.
- Lacis, G., Rashal, I., Ruisa, S., Trajkovski, V. 2009. Assessment of genetic diversity of Latvian and Swedish sweet cherry (*Prunus avium* L.) genetic resources collections by using SSR (microsatellite) markers. *Scientia Horticulturae* 121; 451-457.

- Lefort, F., Lally, M., Thompson, D., Douglas, G.C. 1998. Morphological traits microsatellite fingerprinting and genetic relatedness of a stand of elite oaks (*Q. Robur* L.) at Tuallnally, Ireland. *Silvae Genetica* 47; 5-6.
- Messina, R., Lain, O., Marrazzo, M.T., Cipriani, G. 2004. New set of microsatellite loci isolated in apricot. *Molecular Ecology, Notes* 4; 432-434.
- Minch, E., Ruiz-Linares, A., Goldstein, D. B., Feldman, M., Cavalli-Sforza, L. L., 1995. *Microsat* (version 1.4d): a computer program for calculating various statistics on microsatellite allele data. Stanford, California, Stanford University.
- Mowrey, BD, Werner, DJ, Byrne, DH, 1990. Inheritance Of Isocitrate Dehydrogenase, Malate Dehydrogenase, and Shikimate Dehydrogenase in Peach and Peach X Almond Hybrids. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 115; 312-319
- Mnejja, M., Garcia-Mas, J., Howad, W., Arús, P. 2005. Development and transportability across *Prunus* species of 42 polymorphic almond microsatellites. *Molecular Ecology, Notes* 5; 531-535.
- Nei, M. 1987. *Molecular evolutionary genetics* / Masatoshi Nei. New York ; Columbia.
- Ohta, S., Katsuki, T., Tanaka, T., Hayashi, T., Sato, Y. I., Yamamoto, T. 2005. Genetic variation in flowering cherries (*Prunus* subgenus *Cerasus*) characterized by SSR markers. *Breeding Science*, 55; 415-424.
- Olmstead, J.W., Sebolt, A.M., Cabrera, A., Sooriyapathirana, S.S. 2008. Construction of an intra-specific sweet cherry (*Prunus avium* L.) genetic linkage map and synteny analysis with the *Prunus* reference map. *Tree Genetics and Genomics*. 4; 897-910.
- Öz, M.H., Aygün, H., Soydam, S., Çukadar, K., Bakır, M., Yılmaz, F., Ünlü, H.M., Karadoğan, B., Vurgun, H., Ergül, A. 2007. Doğu anadolu erik ve kiraz gen kaynaklarının SSR' a dayalı moleküler analizi. V. Bahçe Bitkileri Kongresi, Erzurum.
- Özbek, S. 1978. Özel Meyvecilik (Kışın Yaprğını Döken Meyve Türleri). Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları 128, Ders Kitabı, 486.
- Paetkau, D., Calvert, W., Stirling, I., Strobeck, C. 1995. Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. *Molecular Ecology*, 4; 347-354.
- Pedersen, B. H. 2006. DNA Fingerprints of 51 Sweet and Sour *Prunus* Accessions Using Simple Sequence Repeats. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 81(1); 118-124.
- Piagnani, C., Iacona, C., Intrieri, M.C., Muleo, R., 2005. A somaclonal variant in Hedelfinger sweet cherry. *Acta Horticulturae*, 667; 131-137.

- Rajapakse, S., Belthoff, LE, Scorza, R., Ballard, RE, Baird, WV, Monet, R., Abbott, AG, 1994. Genetic linkage mapping in peach. Hort Science 264; 699-703.
- Rajapakse, S., Belthoff, LE, He, G., Estager, AE, Scorza, R., Verde, I., Ballard, RE, Baird, WV, Callahan, A., Monet, R., Abbott, AG, 1995. Genetic Linkage Mapping in Peach Using Morphological, RFLP and RAPD Markers. Theor. Appl. Genet. 90; 503-510.
- Rehder, A. 1947. Prunus p. 452-481. In: Manual of cultivated trees and shrubs hardy in North America. 2nd ed. MacMillan, New York.
- Rohlf, F. J. 2004. Preface. Pp vii-viii in Morphometrics-applications in biology and paleontology. A. M. T. Elewa (ed.). Springer-Verlag: New York.
- Santi, F., Lemoine, M. 1990. Genetic markers for *Prunus avium* L. 2. Clonal identification and discrimination from *P. cerasus* and *P. cerasus* x *P. avium*. Annales des Science Forestieres 47; 219-227
- Saunier, R., Claverie, J. 2001. Le cerisier: evolution de la culture en France et dans le monde. Point sur les varietes, les portegreffe. Le fruit belge 490; 50-62.
- Schueler, S., Tusch, A., Schuster, M., Ziegenhagen, B. 2003. Characterization of microsatellites in wild and sweet cherry (*Prunus avium* L.) - markers for individual identification and reproductive processes. Genome 46; 95-102.
- Schuster, M., Schreiber, H. 2000. Genome investigation in sour cherry, *P. cerasus* L. Acta Hort 538; 375-379.
- Sefc, K.M., Lefort, F., Grando, M.S., Scott, K.D., Steinkellner, H. and Thomas, M.R. 2001. Microsatellite markers for grapevine: A state of the art. In "Molecular Biology and Biotechnology of the Grapevine". Roubelakis-Angelakis K.A. ed., Kluwer Academic Publishers. The Netherlands, 1-29.
- Sosinski, B., Gannavarapu, M., Hager, L.D., Beck, L.E., King, G.J., Ryder, C.D., Rajapakse, S., Baird, W.V., Ballard, R.E., Abbott, A.G. 2000. Characterization of microsatellite markers in peach (*Prunus persica* (L) Batsch). Theoretical and Applied Genetics 101; 421-428.
- Struss, D., Boritzki, M., Karle, R., Lezzoni, A. F. 2002. Microsatellite markers differentiate eight Giessen cherry rootstocks. HortScience, 37(1); 191-193.
- Struss, D., Ahmad, R., Aman, M., Southwick, S.M. 2003. Analysis of sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars using SSR and AFLP markers. Journal of the American Society for Horticultural Science, 128(6); 904-909.
- Tan, A., İnal, A., 2003. Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü bitki genetik kaynakları çalışmaları. Yayın No:112, Menemen, İzmir.

- Tavaud, M., Zanetto, A., Santi, F., Dirlewanger, E., 2001. Structuration of genetic diversity in cultivated and wild cherry trees using AFLP markers. *Acta Horticulturae*, 546; 263-269.
- Turet-Sayar, M., Turkeç, A., Demir, T. 2012. Identification of sweet cherry cultivars (*Prunus avium* L.) and analysis of their genetic relationship using microsatellite DNA fingerprinting. *Journal of Agricultural Science*, Vol. 4; No. 8.
- Turkoglu, Z., Bilgener, S., Ercisli, S., Bakir, M., Koc, A., Akbulut, M., Gerçekcioglu, R., Gunes, M., Esitken, A. 2010. Simple sequence repeat-based assessment of genetic relationships among *Prunus* rootstocks. *Genetics Molecular Research* 9(4);2156-2165.
- Vaughan, S.P., Russell, K. 2004. Characterization of novel microsatellites and development of multiplex PCR for large-scale population studies in wild cherry, *Prunus avium* *Molecular Ecology Notes* 4; 429–431.
- Viruel, M.A., Messeguer, R., De Vicente, M.C., Garcia-Mas, J., Puigdomenech, P., Vargas, F., Arús, P., 1995. A Linkage Map with RFLP and Isozyme Markers for Almond. *Theor. Appl. Genet* 91; 964-971.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, 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. *Nucleic Acids Research*, 11; 4407–4414.
- Wang, D., Iezzoni, A.F., 1996. A Genetic Linkage Map of Sour Cherry (*Prunus cerasus* L.) *Plant and animal genome*. San Diego, P273, pg. 121.
- Wang, D., Karle, R., Iezzoni, A.F. 2000. QTL analysis of flower and fruit traits in sour cherry using RFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics* 97;1217-1224.
- Wagner, H.W., Sefc, K.M., 1999. IDENTITY 1.0. Centre for Applied Genetics, University of Agricultural Sciences, Vienna.
- Weber, J.L., May, P.E. 1989. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *American Journal of Human Genetics*, 44; 388-396.
- Webster, A.D., Looney, N.E., 1996. *Cherries crop physiology, production and uses*. CAB International Pres, 513, UK.
- Welsh, J., McClelland, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research* 18 (24);7213-7218.
- Wünsch, A., Hormaza, J.I. 2002. Molecular characterisation of sweet cherry (*Prunus avium* L.) genotypes using peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] SSR sequences. *Heredity*, 89(1); 56-63.

- Wünsch A., Gella R., Hormaza J. I., 2004. Molecular characterization of rootstocks for sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Acta Horticulturae*, 658; 599-602.
- Wünsch, A., Hormaza, J.I., 2004. Molecular evaluation of genetic diversity and S-allele composition of local Spanish sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 51; 635–641.
- Wünsch A. 2009a. SSR markers for fingerprinting *Prunus* species. *Acta Horticulturae*, 814; 689-694.
- Wünsch A. 2009b. Cross-transferable polymorphic SSR loci in *Prunus* species. *Scientia Horticulturae*, 120; 348–352.
- Xuan, H., Wang, R., Buchele, M., Moller, O., 2009. Microsatellite markers (SSR) as a tool to assist in identification of sweet (*Prunus avium*) and sour cherry (*Prunus cerasus*). *Acta Horticulturae*, 839; 507-514.4
- Yamamoto, Y., Kobayashi, Y., Matsumoto, H. 2001. Lipid peroxidation is an early symptom triggered by aluminum, but not the primary cause of elongation inhibition in pea roots. *Plant Physiol*, 125; 199–208.
- Zhou, L., Kappel, F., Hampson, C., Wiersma, P. A., Bakkeren, G. 2002. Genetic analysis and discrimination of sweet cherry cultivars and selections using amplified fragment length polymorphism fingerprints. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 127; 786–792.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Sema ACUNALP

Doğum Yeri : Divriğ / SİVAS

Doğum Tarihi : 01.01.1985

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Çankaya Milli Piyango Anadolu Lisesi (1999-2003)

Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü (2005-2009)

Yüksek Lisans: Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü - Temel Biyoteknoloji
Anabilim Dalı (2009-2012)