

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BAZI ELMA (*Malus x domestica* Borkh.) GENOTİPLERİNİN SSRs (SIMPLE
SEQUENCE REPEATS)' A DAYALI GENETİK KARAKTERİZASYONU

Ali Emre AKPINAR

Danışman Öğretim Üyesi
Doç.Dr. Ali ERGÜL

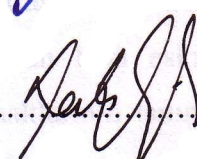
ANKARA
2009

Doç. Dr. Ali ERGÜL danışmanlığında Biyolog A. Emre AKPINAR tarafından hazırlanan bu çalışma 1/7/2009 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoteknoloji Anabilim Dalı' nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Doç. Dr. Ali ERGÜL

İmza:.....

Üye : Prof.Dr. Hatice DUMANOĞLU

İmza:.....

Üye : Prof.Dr.Gökhan SÖYLEMEZOĞLU

İmza:.....

Üye : Prof. Dr. Sezai ERCİŞLİ

İmza:.....

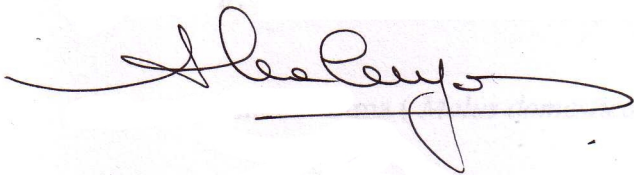
Üye : Doç. Dr. Sümer ARAS

İmza:.....

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Asuman KARAKAYA

Enstitü Müdürü



Bazı Elma (*Malus x domestica* Borkh.) Genotiplerinin SSRs (Simple Sequence Repeats)'a Dayalı Genetik Karakterizasyonu

ÖZET

Türkiye, dünya elma üretiminde yaklaşık % 4 lük payla dördüncü sırada yer almaktadır. Alan ve üretim potansiyelinin yanında, zengin bir elma genetik çeşitliliğine sahiptir. Ancak, farklı isimlendirmelerden ve çeşit içi varyasyonlardan kaynaklanan çeşit karmaşası yaşanmaktadır. Bu nedenle, yetiştiricilikte kullanılmayan bazı eski elma çeşitlerinin kaybolma riski görülmektedir. Ülkemiz bitki gen kaynaklarının tanımlanması amacıyla; meyve türlerindeki tanımlamaların morfolojik özelliklere dayandığı, DNA düzeyinde yürütülen çalışmalar ise sınırlı sayıda olduğu görülmektedir.

Bu çalışmada, söz edilen olumsuzlukların azaltılması amacıyla, “Atatürk Bahçe Kùltürleri Araştırma Enstitüsü-Yalova” elma koleksiyonundan alınan 35 yerli ve 2 referans elma genotipi, 17 SSR's (Simple Sequence Repeats) markör kullanılarak tanımlanmıştır. Elde edilen verilerde benzer ve sinonim genotiplere rastlanmazken, Tavşanbaşı, Tokat, Yaz Elması ve Demir gruplarında homonim durum tespit edilmiştir. CH01d08 lokusu, tanımlama olasılığı en yüksek lokus olarak göze çarparken, genotipler arası en yüksek benzerlik oranı % 94 olarak tespit edilmiştir.

Ülkemiz elma kaynaklarının SSR düzeyinde tanımlanmasına yönelik, ilk kez gerçekleştirilen bu çalışma bulguları, ileride yürütülecek diğer çalışmalara ön veri oluşturacaktır. Aynı zamanda, bitki genetiği (genetik haritalama, gen klonlama v.b.), ıslahı (kombinasyon ıslahında kullanılacak olan ebeveynlerin genetik benzerliklerinin belirlenmesi, mevcut çeşitlerde ana-baba-hibrid olası ilişkilerinin ortaya çıkarılması v.b.) ve yetiştiricilik (bitkilerin tanısı ve DNA düzeyinde kontrol v.b.) alanlarında katkılar sağlayacaktır.

Anahtar Kelimeler: Elma (*Malus domestica*), SSR, Moleküler Tanımlama, Türkiye

Genetic Characterization of Some Apple (*Malus x domestica* Borkh.) Genotypes Based on SSR Markers

ABSTRACT

Turkey takes place in the fourth place with approximately 4% of overall world apple production. Along with the area and production, Turkey also has a strong potential for apple genetic variation. However, disorders in assortment of apple occur due to different denomination and diversity within the variety. Thus, there break out a vanishing risk of some old kinds of apples which have not used in agriculture. It has been observed that there exists limited number of DNA based studies carried out with the purpose of identification of our country plant gene resources. Specially, it appears that identifications in fruit species are based on morphological features. In our country, the identification of fruit species is mainly based on their morphological features, and a very few number of DNA-based studies are carried out to determine the gene resources of plants.

In this study, in order to diminish the aforementioned negativities, 35 domestics and 2 reference apple genotypes obtained from “Atatürk Garden Culture Research Institution” apple collection have been defined by using 17 SSR’s (Simple Sequence Repeats) marker. While any synonym and identical genotype were not observed, in Tavşanbaşı, Tokat, Yaz Elması, Demir groups were determined homonym condition. It was observed that the CH01d08 loci showed the highest probability for defining and similarity ratio between the genotypes, and it was recorded as 94%.

This is the first study in which region apple gene resources has been defined in terms of SSR. Obtained data belonging to SSR loci will be beneficial to other study to be carried out in the future. At the same time, these data will contribute to plant genetics (genetical mapping, gene cloning, e.g.), plant reform (identification of genetical similarities of parents to be used in combination reform, detection of mother-father-hybrid possible relations) and agriculture (plant definition and control based on DNA e.g.) areas.

Key Words: Apple (*Malus domestica*), SSR, Molecular Characterization, Turkey

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimine başladığım ilk günden itibaren bilgi ve desteğini esirgemeyerek beni yönlendiren ve bundan sonraki akademik hayatım boyunca bilgi, destek ve yardımına aynı derecede ihtiyaç duyacağım danışman hocam Doç. Dr. Ali ERGÜL'e,

Hep yanımda olan Bitki Biyoteknolojisi ekibi başta olmak üzere, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü ailesine,

Çalışmalarım sırasında maddi ve manevi desteğiyle her zaman arkamda olan, sevgili anneme ve babama en içten şükran ve teşekkürlerimi sunuyorum.

Ali Emre AKPINAR

Ankara, Haziran 2009

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	v
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vii
SİMGELER DİZİNİ.....	viii
1.GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	4
2.1. Elma Mikrosatellit Çalışmaları.....	4
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	7
3.1. Materyal	7
3.2. Yöntem.....	9
3.2.1. DNA İzolasyonu ve ölçümleri.....	9
3.2.2. PCR reaksiyonlarının hazırlanması ve PCR.....	10
3.2.3. Kapilleri elektroforez ve Allel görüntülerinin alınması.....	12
3.2.4 Genetik analizler	12
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	14
4.1. DNA İzolasyonu ve ölçümleri.....	14
4.2. SSR lokuslarının PCR reaksiyonu ve Allel görüntülerinin Alınması.....	16
4.3. Genetik analizler.....	23
4.4. Benzerlik Oranı İndeksi.....	36
4.5. Genetik İlişki Dendogramı.....	37
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	39
5.1. SSR analizleri.....	39
5.2. Genotip-SSR İlişkilendirmeleri.....	41
KAYNAKLAR.....	43
ÖZGEÇMİŞ.....	47

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1. Araştırmada kullanılan çeşitlere ait DNA'ların, agaroz Jel (% 1) görüntüleri.....	14
Şekil 4.2. CH01d08 lokusuna ait allelerin PCR sonrası jel görüntüsü.....	16
Şekil 4.3. CH01e12 lokusuna ait allelerin PCR sonrası jel görüntüsü.....	17
Şekil 4.4. CH01f02 lokusuna ait allelerin PCR sonrası jel görüntüsü.....	17
Şekil 4.5. CH01h01 lokusuna ait allelerin PCR sonrası jel görüntüsü.....	17
Şekil 4.6. CH01h10 lokusuna ait allelerin PCR sonrası jel görüntüsü.....	18
Şekil 4.7. CH02b03b lokusuna ait allelerin PCR sonrası jel görüntüsü.....	18
Şekil 4.8. CH02b10 lokusuna ait allelerin PCR sonrası jel görüntüsü.....	18
Şekil 4.9. CH02b12 lokusuna ait allelerin PCR sonrası jel görüntüsü.....	19
Şekil 4.10. CH02c06 lokusuna ait allelerin PCR sonrası jel görüntüsü.....	19
Şekil 4.11. CH02d11 lokusuna ait allelerin PCR sonrası jel görüntüsü.....	19
Şekil 4.12. CH02d12 lokusuna ait allelerin PCR sonrası jel görüntüsü.....	20
Şekil 4.13. CH02f06 lokusuna ait allelerin PCR sonrası jel görüntüsü.....	20
Şekil 4.14. CH03g07 lokusuna ait allelerin PCR sonrası jel görüntüsü.....	20
Şekil 4.15. CH04e03 lokusuna ait allelerin PCR sonrası jel görüntüsü.....	21
Şekil 4.16. CH04g10 lokusuna ait allelerin PCR sonrası jel görüntüsü.....	21
Şekil 4.17. CH05e03 lokusuna ait allelerin PCR sonrası jel görüntüsü.....	21
Şekil 4.18. COL lokusuna ait allelerin PCR sonrası jel görüntüsü.....	22
Şekil 4.19. Lokus-allel profillerinin kapilleri elektroforezdeki farklı görünüşleri.....	23
Şekil 4.20. CH01e12 lokusuna ait allel frekansları.....	29
Şekil 4.21. CH02b12 lokusuna ait allel frekansları.....	29
Şekil 4.22. CH04g10 lokusuna ait allel frekansları.....	29
Şekil 4.23. CH02b10 lokusuna ait allel frekansları.....	30
Şekil 4.24. CH02f06 lokusuna ait allel frekansları.....	30
Şekil 4.25. COL lokusuna ait allel frekansları.....	30
Şekil 4.26. CH01h10 lokusuna ait allel frekansları.....	31
Şekil 4.27. CH01f02 lokusuna ait allel frekansları.....	31
Şekil 4.28. CH01h01 lokusuna ait allel frekansları.....	31
Şekil 4.29. CH05e03 lokusuna ait allel frekansları.....	32
Şekil 4.30. CH02d11 lokusuna ait allel frekansları.....	32

Şekil 4.31. CH01d08 lokusuna ait allel frekansları.....	32
Şekil 4.32. CH02c06 lokusuna ait allel frekansları.....	33
Şekil 4.33. CH02b03b lokusuna ait allel frekansları.....	33
Şekil 4.34. CH03g07 lokusuna ait allel frekansları.....	33
Şekil 4.35. CH04e03 lokusuna ait allel frekansları.....	34
Şekil 4.36. CH02d12 lokusuna ait allel frekansları.....	34
Şekil 4.37. Elma çeşitlerine ait genetik ilişki dendogramı.....	37

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Araştırmada kullanılan elma genotipleri.....	8
Çizelge 3.2. SSR lokuslarına ait primerlerin baz dizileri, işaretleme boyası ve PCR T_m değerleri.....	11
Çizelge 4.1. Araştırmada kullanılan elma çeşitlerine ait DNA'ların spektrofotometrik değerleri.....	15
Çizelge 4.2. Elma çeşitlerinin 17 lokustaki allel büyüklükleri (bp).....	24
Çizelge 4.3. Çalışılan lokuslardaki allel sayıları (n), beklenen heterozigotluk (H_e), gözlenen heterozigotluk (H_o), tespit olasılığı (PI) değeri ve sessiz (null) allel frekansı.....	28
Çizelge 4.4. Araştırma sonucunda tespit edilen benzer, sinonim ve homonim genotipler....	35
Çizelge 4.5. Genotiplere ve referans çeşitlere ait benzerlik oranları (%).....	36

SİMGELER DİZİNİ

AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism (Çoğaltılan parça uzunluğu farklılığı)
bp	Base pair (Baz çifti)
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)
mM	Milimolar
µl	Mikrolitre
M	Molar
n	The number of alleles (Allel 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 tekrarları)
TBE	Tris-Borik Asit-EDTA Çözeltisi
TE	Tris-EDTA Çözeltisi
T _m	Primerin DNA'ya bağlanma sıcaklığı

1. GİRİŞ

Türkiye birçok bitki türünün yetiştiriciliği açısından, sahip olduğu ekolojik koşullar ile zengin bir gen potansiyeline sahiptir. Çoğunluğu Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü Araştırma Enstitüleri ve belirli oranlarda da Ziraat Fakülteleri bünyesinde yürütülen çalışmalar sonucu birçok türde koleksiyon ve seleksiyon çalışmaları tamamlanmıştır. Bu türlerden en önemlilerinden biri olan elma (*Malus x domestica* Borkh.) yetiştirme alanları, üretim miktarı ve ihracattaki payı ile önemli bir meyve olarak dikkat çekmektedir. Rosaceae familyasının Pomoidae alt familyasında yer alan elma *Malus* cinsi, içerisinde türler arası bir hibrit kompleksi olmakla birlikte dünyada bilinen önemli bir meyve türüdür. Geneolojisi günümüzde hala tam olarak açıklanamasa da, yerel Çin türleri olan *M. prunifolia*, *M. baccata*, *M. mandshurica*, *M. sieboldii* ile batının yeren türleri olan *M. sylvestris* ve *M. orientalis* ile hibritleşerek *Malus x domestica* kompleksinin ortaya çıktığı düşünülmektedir (Luby 2003). Bu şekilde doğal gen akışı (gene flow) ve vejetatif çoğaltılması sonucu çeşitliliği oldukça fazla olan türlerden birisidir.

Dünyada elmanın da içinde yer aldığı yumuşak çekirdeklielerin üretim alanı 7 287 210 ha olup, 75 315 918 ton'luk üretimi vardır. Elma ise 5 428 069 ha'lık alanda ve 57 938 065 ton'luk üretimiyle grup içerisinde %76.93'lük oranı ile birinci sırayı alırken, dünya meyve üretimi içerisindeki payı ise % 9.48'dir. Dünyada en fazla elma üretiminin yapıldığı ülkeler ise; Çin, A.B.D., İran ve Türkiye'dir (Anonim 2007).

Türkiye'nin 2003 yılı elma üretimi 2 500 000 ton ve üretim alanı 108 600 ha'dır. Yumuşak çekirdeklieler üretimimizin % 83.89'unu elma oluşturmaktadır (Anonim 2004). 2004 yılında 2 300 000 ton üretim ve 108 900 ha alan; 2005 yılında ise 2 550 000 ton üretim ve 116 551 ha alan olarak gerçekleşmiştir. 2005 yılı Türkiye elma ihracatı 29 752 ton, ithalatı ise 3 461 ton olarak gerçekleşmiştir (Anonim 2006).

Ülkemizde elma üretiminin coğrafik dağılımına bakıldığında, Marmara Bölgesi (Bursa, Balıkesir ve Çanakkale illeri); Karadeniz-İç Anadolu geçit bölgesi (Kocaeli, Kastamonu, Amasya, Tokat illeri); Akdeniz-İç Anadolu geçit bölgesi (Isparta, Burdur, Denizli illeri) ve kurak ekolojik koşullara sahip İç Anadolu Bölgesi (Karaman, Niğde, Nevşehir, Konya illeri) elma yetiştiriciliğinin yoğun yapıldığı merkezleri oluşturmaktadır (Özçağırın ve ark. 2004). Isparta ili elma üretiminde ilk sırada yer almakta ve Türkiye üretiminin %

21.1'ini karşılanmaktadır. Elma ihracatında yıllara göre önemli değişiklik görölmektedir. 2001 yılı ihracatı 21.124 ton ve değeri de 7.534 bin dolardır. Ülkemizin elma ihracatı, üretimin % 0.9' unu oluşturmaktadır. Türkiye, elma üreticisi ölkeler arasında dünyada dördüncü sırada yer almakla birlikte, üretim miktarı içerisinde ihracat oranının düşük olması nedeniyle beklenen döviz geliri sağlanamamaktadır.

Birim alandan sağlanan verim ve kaliteyi artırmak amacı ile değişik boyutlarda üretimle ilgili çalışmalar sürdürölürken, gen kaynaklarının zenginliğini değerlendirmek yönünde yürütölen en önemli araştırmalar ise koleksiyon oluşturma aşamalarıdır. Yöresel bazı küçük koleksiyonların yanında elma genetik potansiyelinin tanımlanması ve korunması amacıyla Mustafa Kemal Atatürk tarafından, 1929 yılında kurulan Yalova Atatürk Bahçe Kùltürleri Araştırma Enstitüsü bünyesinde, diğer türlerin yanı sıra, ölkenin değişik bölgelerinden 240'ı yerli olmak üzere yaklaşık 300 çeşit toplanmıştır. Diğer taraftan koleksiyonlardaki gen kaynaklarının zenginliğini korumada veya ıslah amaçlı değerlendirmede, morfolojik özelliklere bağlı tanımlamaların son derece yetersiz kaldığı bilinmektedir. Ancak bilindiği üzere bu tür tanımlamaların yetersiz kaldığı, bu amaçla son yıllarda DNA'ya dayalı tanımlamaların ön plana çıktığı görölmektedir. Birçok ölkede elma gen kaynaklarının moleküler tanıları, diğer bazı teknikler kullanılmakla birlikte RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) and AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism (Watillon *et al.* 1991; Harada *et al.* 1993; Dunemann *et al.* 1994; Gardiner *et al.* 1996; Goulão *et al.* 2001) temel olarak SSR (Simple Sequence Repeats, mikrosatellit) markörlere dayalı olarak sürdürölmektedir.

Doğal seleksiyonla, yabancı formlardan kùltür bitkilerinin gelişimi ve daha sonraki aşamalarda kùltür bitkileri arasındaki yabancı tozlanma ve melezlenmeler, elma genomuna yüksek oranda bir heterozigotluk kazandırmıştır (Özbek 1978). Bölgede yer alan çeşitliliğin bir sonucu olarak, aynı çeşidin değişik isimlerle yetiştirilmesi yanında, farklı bazı çeşitlere aynı ismin verildiği, henüz tanımlanmamış ve numaralarla isimlendirilmemiş çeşitlerin varlığı, yine çeşit içi varyasyonlardan dolayı bir çeşit karmaşasının yaşandığı görölmektedir. Ayrıca yetiştiricilikte bazı elma çeşitlerinin ön plana çıkması sonucu, bölge koşullarına adapte olmuş ve yetiştiriciliği yapılan çeşitlerin giderek kaybolma riski bulunmaktadır. Bu nedenle, elma çeşitlerinin hızlı ve güvenilir bir şekilde tanımlanması elma yetiştiriciliği, ıslahı, endüstrisi, uluslararası veri paylaşımı vb. açısından büyük önem taşımaktadır.

Ülkemizde yakın zamanda bazı bitki türlerinin genetik tanımlama çalışmalarına başlanmasına karşın (Bayazit *et al.* 2007, Ayanoglu *et al.* 2007), elma gen kaynaklarının tanımlanmasına yönelik araştırmalara rastlanmamıştır.

Atatürk Bahçe Kùltürleri Araştırma Enstitüsü elma koleksiyonundaki elma gen kaynaklarımızın toplu tanımlanmasının bir bölümü olarak gerçekleştirilen bu tezde; 35 yerli ve 2 referans genotipin, 17 SSR (Simple Sequence Repeat) lokusundaki allel büyüklükleri (DNA kimlik verileri) tespit edilirken, çeşitler arası genetik ilişkiler, homonim ve sinonim durumları belirlenmiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Günümüzde farklı bitki türlerinde gerçekleştirilen genetik çalışmalar sonucu elde edilen sonuçlar, ilgili tür için maksimum allelik varyasyonu içeren bir koruma stratejisi geliştirilmesinin yanında, özel çalışmalara yönelik uygun fonksiyonel allellerin belirlenmesine de olanak sağlamaktadır. Elma gibi türlerde etkin ve seri araştırmaya olanak sağlayan moleküler markör sistemlerinin kullanılması oldukça önemlidir. Elmada kullanılan moleküler markörlerin en önemlilerinden birisi ise; Simple Sequence Repeats (SSR) veya mikrosatellit markörlerdir.

Simple Sequence Repeats (SSR) veya mikrosatellit 1–6 baz uzunluğunda kısa tekrar dizileri olup, yüksek canlılarda (ökaryotik) genoma özgünlük göstermektedir (Litt and Luty 1989). Genotipler arası allelik varyasyonları replikasyon kaymasındaki (replikasyon slippage) mutasyonlara dayandırılan SSR markörler (Schlotterer and Tautz 1992), kodominatlık ve diğer DNA markörlere göre yüksek polimorfiklik özelliği ile bitki tanımlama ve diğer genomik çalışmalarda önemli avantajlar sağlamaktadır. Bitkilerde tanımlandığı hücre komponentlerine göre nSSR(nuclear=çekirdek SSR) ve cpSSR(kloroplast SSR)'lara ek olarak bitki genom projeleri çerçevesinde oluşturulan EST(Expressed Sequence Tag) verilerinin transkripsiyona giren ve girmeyen bölgelerden (UTR) tespit edilen EST kökenli SSR'ların katılımı ile birçok bitki türünde geniş bir SSR veri tabanı oluşmuştur (Scott 2001, Dirlewanger *et al.* 2003, Decroocq *et al.* 2003).

Genetik kimlik tanımlarını belirleyen tek markör özelliğine sahip SSR markörler, başta genetik tanımlama olmak üzere, elmada birçok amaçla (moleküler evrim, genetik haritalama gibi) kullanılmıştır. SSR markörler kullanılarak elmada gerçekleştirilen önemli araştırmalara ait kaynak özetleri aşağıda sunulmuştur.

2.1. Elma Mikrosatellit Çalışmaları

Guilford *et al.* (1997), başlangıçta elma genomik kütüphanesini (GA)₁₅ ve (GT)₁₅ tekrarları açısından tarayarak, daha sonra (GA)-zenginleştirilmiş kütüphanelerini kullanarak 14 SSR lokusu tespit etmişlerdir. Araştırmacılar elde edilen lokusların polimorfik oranlarının yüksek olduğunu ve bunlardan üçünün 21 genotipi tanımladığını belirtmişlerdir.

Gianfranceschi *et al.* (1998) geliştirdikleri 16 SSR markörünü kullanarak 19 elma genotipini tanımlamışlar ve bu markörlerden ikisinin ‘Starking’ ve ‘Red Delicious’ çeşitleri hariç diğer genotipleri tanımlamakta yeterli olduğunu bildirmişlerdir.

Goulao and Oliveira (2001) ise, Guilford *et al.* (1997) tarafından geliştirilen SSR lokuslarını kullanarak SSR tekniğini, AFLP tekniği ile karşılaştırmalı olarak elma genotiplerinde uygulamışlardır. Kırkbir ticari elma çeşidini karşılaştıran araştırcılar; SSR markörlerin bu türde çok polimorfizm gösterdiğini ve tekrarlanma olasılığının ise AFLP markörlerinden daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir.

Elmada Amerika Birleşik Devletlerin’de yürütölen bir çalışmada ise değişik araştırcılar tarafından elma için tespit edilen SSR markörleri kullanılarak 142 genotipin tanımlanması yapılmıştır. Locus başına ortalama polimorfiklik oranını 26.4 allel olarak bildiren araştırcılar, kullanılan primerlerden 8’inin tanımlamada yeterli olduğunu vurgulamışlardır (Hokanson *et al.* 2002).

şüphesiz elma’nın SSR markörlerle tanımlanmasında Liebhard *et al.*(2002) tarafından geliştirilen 140 yeni locus bundan sonraki çalışmalarda büyük kolaylıklar sağlamıştır. Araştırcılar geliştirilen 140 yeni locusun 17 kromozomda 17 bağlantı grubu olduğunu ve her kromozomun en az 2 locus içerdđini belirtmişler ve yeni lokusları test amacıyla 7 elma çeşidi ile bir hibrit bitkisi de kullanmışlardır.

Genomik ve kloroplast DNA verilerine ait SSR markörler kullanılarak gerçekteşirilen çalışmaların sonucunda ise elmanın kültüre alınması ile ilgili ilk önemli bulgulara ulaşılmıştır (Harris *et al.* 2002). Goulão *et al.* (2001) 41 elma çeşidinde RAPD ve AFLP tekniklerini kullanarak genetik tanımlama çalışmaları yapmışlardır. Sekiz AFLP primerini kullandıkları araştırmalarında; 41 elma çeşidine ait genetik ilişkilerin yetiştirilme bölgelerine göre dağılım gösterdiğini ve 4 Portekiz çeşidinin ise kendi aralarında gruplandığını belirtmişlerdir.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda Oraguzie *et al.* (2005), 66 elma anacın genetik tanımlamalarına yönelik yaptıkları çalışmalarında; 7 SSR lokusu kullanmışlar ve Aotea40 ve Aotea106 anaçlarının dışındaki bütün genotiplerde tam ayırım sağlamışlardır.

Fransa'da yapılan bir diğerk çalışmada, 142 yerel elma çeşidi, 9 SSR lokusu kullanılarak tanımlanmıştır. Bu çeşitlerden 122' sinde monomorfik allelik profille tanımlanmıştır. Yedi çeşidin genetik aıdan aynı olduğu, 5 tanesinin ise sinonim olduğu belirtilmiştir. Ortalama 15.3 olmak üzere 139 polimorfik allel elde edilirken, heterozigotluk oranları 0.68 ile 0.95 arasında belirlenmiştir (Laurens *et al.* 2004).

Galli *et al.* (2005), 66 ticari elma çeşidini 6 SSR lokusu bazında tanımlamışlardır. Araştırıcılar toplam 55 polimorfik allel belirlerken (ortalama 9.2 allel), mutant çeşitler dışındaki genotiplerin temel olarak 4 SSR lokusu (CH03g07, CH04e03, CH05d11 ve CH05e03) ile ayırt edilebildiğini belirlemişlerdir.

Silfverberg-Dilworth *et al.* (2006), haritalama ve genetik analizler üzerine yoğunlaştırdıkları çalışmalarında; GA, GT, AAG, AAC ve ATC zenginleştirilmiş kütüphanelerinden ve 31 EST bölgesinden toplam 148 adet SSR lokusu belirlemişler ve elma SSR database olarak (<http://www.hidras.unimi.it>) kullanıma sunmuşlardır.

Guarino *et al.* (2006), İtalya' nın Campania bölgesinde yetiştirilen ve iıerisinde homonim grupların yer aldığı 48 elma çeşidi ile 6 referans çeşidi, 9 SSR lokusu kullanarak tanımlamaları sonucu, 95 polimorfik allel elde etmişlerdir. Kullanılan lokusların her bir çeşidin ayırımında etkin olduğu görölürken, lokusların ortalama heterozigotluk oranları 0.148 ile 0.926 arasında değerler göstermiştir.

Garkava-Gustavsson *et al.* (2008), 68 İsveç elma çeşidini 10 SSR lokusu kullanarak tanımlamıştır. Çalışmada toplam 113 polimorfik allel elde edilirken (ortalama 10.27), lokusların heterozigotluk oranları 0.36 ile 0.88 arasında değiştiği belirtilmiştir.

Pereira-Lorenzo *et al.* (2008), yaptıkları çalışmada 27 La Palma ve 66 İspanyol elma çeşidinde 10 SSR lokusu kullanmışlardır. La Palma elmaları için 75, İspanyol elmaları için ise toplam 122 polimorfik allel elde edilmiştir. Her iki bölge için lokuslarda belirlenen beklenen ve gözlenen heterozigotluk değerlerinin benzer olduğu görölmüştür. Değerlerin sırasıyla 0.28-0.86 ve 0.11-0.93 arasında değiştiği tespit edilmiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu araştırma, 2008-2009 yıllarında Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarı'nda yürütülmüştür.

3.1. Materyal

Araştırmada 35 yerli elma genotipi kullanılmıştır. Çeşitlere ait sürgün ucu ve genç yapraklar Yalova Atatürk Bahçe Kùltürleri Araştırma Enstitüsünden sağlanmıştır (Çizelge 3.1.). Sonuçların laboratuvarlar arası karşılaştırılabilmesi açısından Florina ve Golden Delicious çeşitleri referans olarak kullanılmıştır.

Çizelge 3.1. Araştırmada kullanılan elma genotipleri

No	Elma Genotipi
1	E-70
2	E-42
3	E-71
4	E-40
5	E-45
6	Batum
7	Demir (2562)
8	Demir (2486)
9	Demir
10	Demir (2514)
11	Susuz Elma
12	Tavşanbaşı (2531)
13	Güz Tavşanbaşı
14	Yaz Tavşanbaşı
15	42-KP-1 (Mayhoş Tavşanbaşı)
16	42-C-3 (Tatlı Tavşanbaşı)
17	Tokat-1
18	Tokat-2
19	Tokat-4
20	Yaz Elması (2384)
21	Yaz Elması (2484)
22	Yaz Elması(2563)
23	42-A-1 (Yaz Elması)
24	372-E
25	383-E
26	384-E
27	385-E
28	392-E
29	473-E
30	496-E
31	542-E
32	546-E
33	Kalkandelen
34	Uzun Yorma
35	Yenişehir
36	Florina*
37	Golden Delicious*

*: Referans çeşitler

3.2. Yöntem

Tezde uygulanan yöntem aşağıdaki aşamalardan oluşmaktadır;

- DNA izolasyonu ve ölçümleri
- PCR reaksiyonlarının hazırlanması ve PCR
- Kapilleri elektroforez
- Allel görüntülerinin alınması
- Genetik analizler

3.2.1. DNA İzolasyonu ve Ölçümleri

Araştırmada çalışılan 37 elmanın DNA izolasyonları aşağıda metot açıklaması verilen Lefort *et al.* (1998) yöntemine göre yapılırken, DNA kalite ve miktar ölçümleri %1'lik jel ve Nanodrop ND-1000 spektrofotometre kullanılarak yapılmıştır.

DNA izolasyon protokolü:

- Genç yaprak veya sürgün ucu sıvı azotla ezildi,
- 100mg alınarak 2 µl ependorf tüplere aktarıldı,
- Tüplerin üzerine 1 ml DNA ekstraksiyon solüsyonu eklendi,
- 65 °C su banyosunda ara sıra çalkalanarak 15 dk bekletildi,
- Örnekler oda sıcaklığına geldiğinde, 0,7 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,
- 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 etanol eklenerek, 14.000 rpm'de 2 dk santrifüj edildi,
- DNA, 50-100 µl H₂O'da çözüldü,
- Her 100 µl için 1 µl RNase-A eklenerek, 37 °C'de 30 dk bekletilerek, RNA uzaklaştırıldı.

İzolasyon çözeltilisinin içeriği (50 ml için):

10 ml LiCl (4M)

4 ml EDTA (50 mM, pH 8,0)

2 ml TRIS (50 mM, pH 8,0)

0,5 ml TWEEN 20 (% 0,5)

1 g CTAB (% 1)

2 g PVP (% 2)

%0,2 β-Merkapto etanol

Kloroform/isoamil alkol;(hacim: hacim) 24:1

3.2.2. PCR Reaksiyonlarının Hazırlanması ve PCR

PCR reaksiyonu; 15–200 ng DNA, 5 pmol floresan işaretlenmiş ileri (forward) primer, 5 pmol ters (revers) primer, 0.5 mM toplam dNTP, 0.5 ünite Go Taq DNA Polymerase (Promega) (1.5 mM MgCl₂ içermekte), 3 µl 5x buffer olmak üzere toplam 15 µl'de gerçekleştirilmiştir.

PCR reaksiyonu için kullanılan PCR programı:

1. 94 °C' de 3 dk,

2. 94 °C' de 1 dk

3. 50 – 64 °C' de 1 dk

4. 72 °C' de 2 dk

5. 72 °C' de 10 dk

} (2-4) 35 döngü

olacak şekilde uygulanmıştır.

PCR sonrası lokuslara ait PCR ürünleri % 2'lik agaroz jelde kontrol edildikten sonra, amplifikasyonu gerçekleşmiş örneklerde kapilleri elektroforez aşaması gerçekleştirilmiştir.

SSR lokuslarına ait primerler:

Genetik kimlik tanıları amacıyla; toplam 17 SSR lokusu kullanılmıştır. İleri primerler D4 (mavi), D3 (yeşil) ve D2 (siyah) (Proligo, Fransa) renklere floresan işaretlenmiş olup

primerlere ait baz dizileri, kullanılan floresan boya ve Tm değerleri Çizelge 3.2.'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. SSR lokuslarına ait primerlerin baz dizileri, işaretleme boyası ve PCR Tm değerleri.

No	Lokus adı	Primer dizileri(5'...3')	İşaretleme boyası	Tm(°C)
1	CH01d08-F*	ctccgccgctataacacttc	Mavi	60
	CH01d08-R	tactctggagggtatgcaaag		
2	CH01e12-F*	aaactgaagccatgagggc	Mavi	60
	CH01e12-R	ttccaattcacatgaggctg		
3	CH01f02-F*	accacattagagcagttgagg	Siyah	60
	CH01f02-R	ctggtttgtttcctccagc		
4	CH01h01-F*	gaaagactgcagtgggagc	Yeşil	60
	CH01h01-R	ggagtgggttgagaaggtt		
5	CH01h10-F*	tgcaaagataggtagatatgccca	Mavi	60
	CH01h10-R	aggagggattgtttgtgcac		
6	CH02b03b-F*	ataaggatacaaaaaccctacacag	Mavi	60
	CH02b03b-R	gacatgtttggttgaacttg		
7	CH02b10-F*	caaggaaatcatcaagattcaag	Yeşil	62
	CH02b10-R	caagtggcttcggatagttg		
8	CH02b12-F*	ggcaggctttacgattatgc	Siyah	60
	CH02b12-R	cccactaaaagttcacaggc		
9	CH02c06-F*	tgacgaaatccactactaatgca	Yeşil	60
	CH02c06-R	gattgcgcgcttttaacat		
10	CH02d11-F*	agcgtccagagcaacagc	Yeşil	55
	CH02d11-R	aacaaaagcagatccgttgc		
11	CH02d12-F*	aaccagatttgcttgcac	Siyah	60
	CH02d12-R	gctggtggttaacgtggtg		
12	CH02f06-F*	ccctcttcagacctgatatg	Yeşil	64
	CH02f06-R	actgtttccaagcgatcagg		

Çizelge 3.2. (devam)

No	Lokus adı	Primer dizileri(5'...3')	İşaretleme boyası	Tm(°C)
13	CH03g07-F*	aataagcattcaaagcaatccg	Siyah	50
	CH03g07-R	ttttccaaatcgagtttcgtt		
14	CH04e03*	ttgaagatggttgctgtgc	Yeşil	60
	CH04e03	tgcattgtctctcctccat		
15	CH04g10*	caaagatgggtggaagagga	Yeşil	55
	CH04g10	ggaggcaaaaagagtgaacct		
16	CH05e03*	cgaatatttcactctgactggg	Siyah	60
	CH05e03	caagttgttactgctccgac		
17	COL*	aggagaaaggcgttacctg	Mavi	62
	COL	gactcattcttcgctgactg		

*: Floresan işaretli

3.2.3. Kapilleri Elektroforez ve Allel Görüntülerinin Alınması

Kapilleri elektroforez amacıyla Beckman CEQ™ 8800 Genetik Analiz Sistemi kullanılmıştır. PCR ürünleri işaretlemede kullanılan floresan (Prologo, wellred işaretli primerler, Fransa) boyalara göre değişik oranlarda (1:5, 1:10 gibi) 20 µl SLS (Sample Loading Solution) ile seyreltilmiştir. Üzerlerine 0,2-0,4 µl size standart-400 eklendikten sonra CEQ™ 8800 Genetik Analiz Sistemi'nde elektroforez edilmiştir. Daha sonra her bir lokusa ait pikler; tipleri ve renkleri göz önüne alınarak heterozigot ve homozigot olarak görüntülenmiştir. Verilerin doğruluğundan emin olmak için reaksiyonlar en az iki kez tekrar edilmiştir.

3.2.4. Genetik Analizler

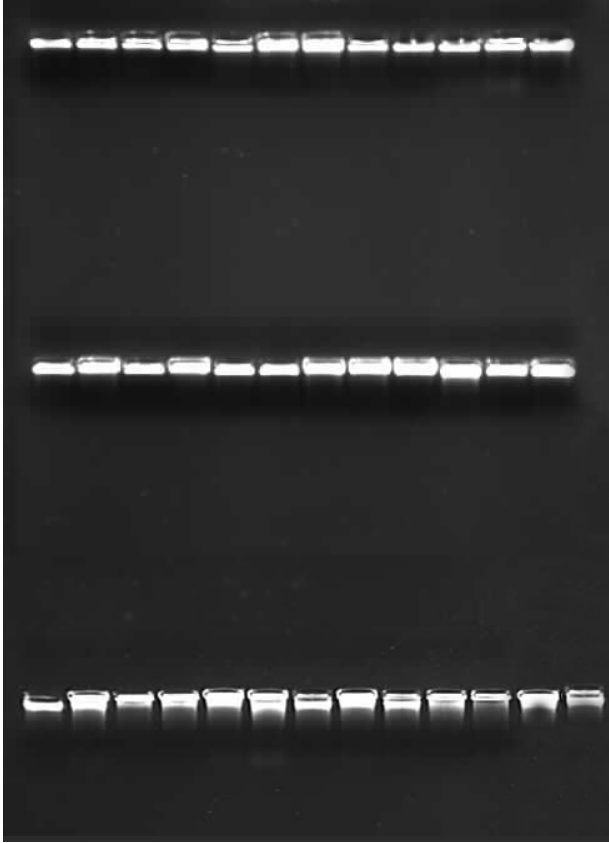
Araştırmadaki 2 referans çeşit dahil toplam 37 genotipin genetik analizleri Şelli *et al.* (2007)'de belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Buna göre; genetik parametreler (her lokusa ait allel sayısı (n), allel frekansı, beklenen heterozigotluk (He), gözlenen heterozigotluk (Ho) oranı, sessiz (null) allel frekansı (r) ve tespit olasılığı (Probability of Identity) (PI) IDENTITY 1.0 (Wagner and Sefc 1999) yazılım programı ile, benzerlik

oranı indeksi ise Microsat (Minch *et al.* 1995) programı kullanılarak tespit edilmiştir. Genotiplere ait dendogram NTSYS (versiyon 2.02g, Exeter Software, Setauket, NY) yazılım programıyla oluşturulmuş ve görüntülenmiştir. Dendogram için UPGMA (Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic means) yöntemi kullanılmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. DNA İzolasyonu ve Ölçümleri

Araştırmada kullanılan çeşitlere ait DNA'ların, agaroz jel görüntüsü Şekil 4.1'de, spektrofotometrik değerleri ise Çizelge 4.1.'de sunulmuştur.



Şekil 4.1. Araştırmada kullanılan elma çeşitlerine ait DNA'ların, agaroz jel (% 1) görüntüleri

Çizelge 4.1. Araştırmada kullanılan elma çeşitlerine ait DNA'ların spektrofotometrik değerleri.

No	ÇEŞİT ADI	Miktar ng/ul	260/280	260/230
1	E-70	1762.29	2.08	0.72
2	E-42	960.45	1.98	1.22
3	E-71	683.97	1.9	0.26
4	E-40	1824.56	2.05	1.65
5	E-45	1405.79	1.96	1.56
6	Batum	1646.17	1.89	1.26
7	Demir (2562)	1359.11	1.98	1.37
8	Demir (2486)	2386.49	2.07	1.6
9	Demir	1531.26	2.04	1.56
10	Demir (2514)	1349.62	2.07	1.63
11	Susuz Elma	1474.38	2.04	1.79
12	Tavşanbaşı (2531)	1817.62	2.08	1.64
13	Güz Tavşanbaşı	2100.33	2.07	1.85
14	Yaz Tavşanbaşı	1083.3	2.04	1.63
15	42-KP-1 (Mayhoş Tavşanbaşı)	2094.26	1.99	1.75
16	42-C-3 (Tatlı Tavşanbaşı)	827.47	1.98	1.35
17	Tokat-1	2473.82	2.1	1.86
18	Tokat-2	1097.77	2.04	1.31
19	Tokat-4	1116.56	2.05	1.42
20	Yaz Elması (2384)	1015.56	2.06	1.47
21	Yaz Elması (2484)	1304.55	2.05	1.55
22	Yaz Elması(2563)	1822.38	1.92	1.47
23	42-A-1 (Yaz Elması)	2651	2.09	1.92
24	372-E	1977.45	2.08	1.82
25	383-E	1253.74	2.02	1.55
26	384-E	3752.64	2.01	1.62
27	385-E	2745.72	2.04	1.75
28	392-E	2366.9	2.06	1.73

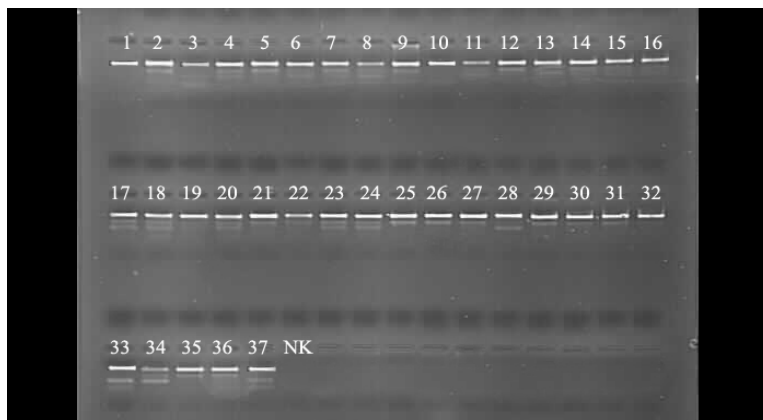
Çizelge 4.1. (devam)

No	ÇEŞİT ADI	Miktar ng/ul	260/280	260/230
29	473-E	2043.99	2.08	1.77
30	496-E	1965.77	2.07	1.88
31	542-E	1984.86	2.07	1.7
32	546-E	934.17	2	1.52
33	Kalkandelen	552.62	1.99	1.49
34	Uzun Yorma	1389.13	2.03	1.54
35	Yenişehir	1665.98	2.06	1.7
36	Florina	2027.18	2.08	1.81
37	Golden Delicious	2006.18	2.08	1.68

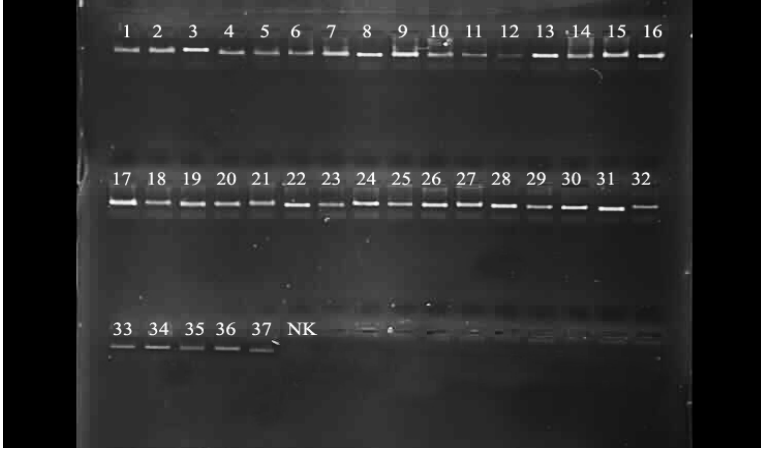
PCR reaksiyonlarında kullanılacak nükleik asitlerde; saflık (A260/A280) oranının yaklaşık 1.8–2.0 olması tercih edilmektedir. Bulgulardaki DNA saflık oranları genel olarak bu sınırlar içerisinde yer alırken, jel görüntülerinde kırksız bir bant oluşumu kaliteli DNA izolasyonunun bir diğer göstergesidir (Şekil 4.1.).

4.2. SSR Lokuslarının PCR Reaksiyonu ve Allel Görüntülerinin Alınması

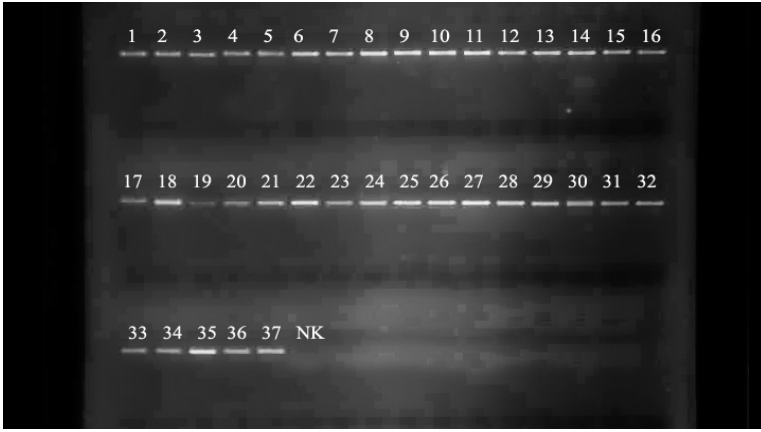
SSR lokuslarına ait PCR sonrası örnek jel (% 2) görüntüleri aşağıda görülmektedir.



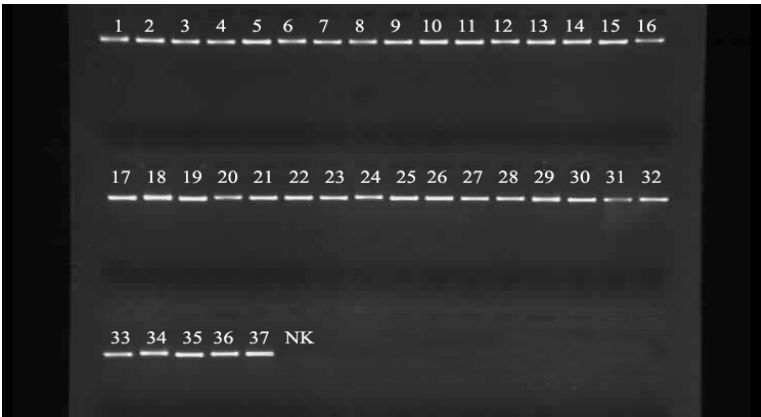
Şekil 4.2. CH01d08 lokusuna ait allelerin agaroz jel görüntüsü (NK: Negatif kontrol)



Şekil 4.3. CH01e12 lokusuna ait allelerin agaroz jel görüntüsü (NK: Negatif kontrol)



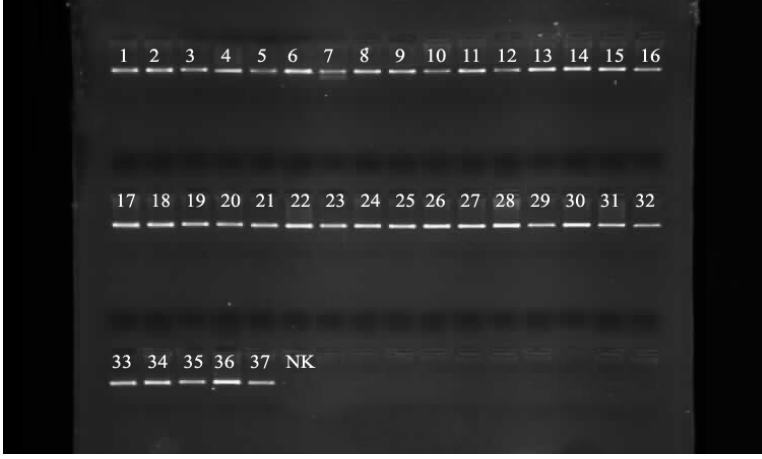
Şekil 4.4. CH01f02 lokusuna ait allelerin agaroz jel görüntüsü (NK: Negatif kontrol)



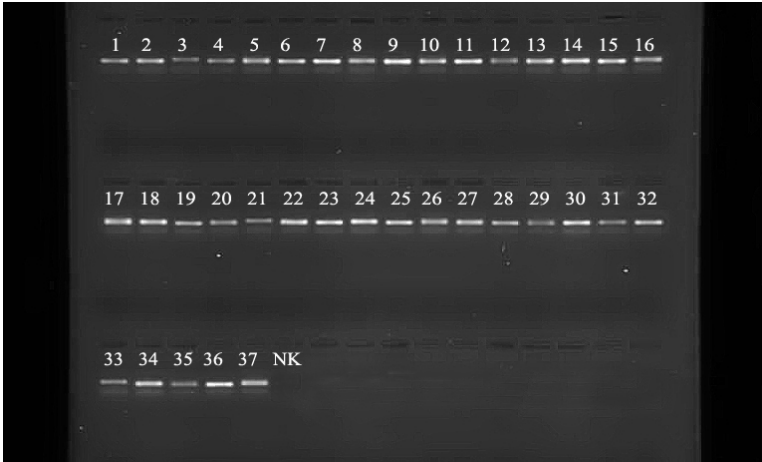
Şekil 4.5. CH01h01 lokusuna ait allelerin agaroz jel görüntüsü (NK: Negatif kontrol)



Şekil 4.6. CH01h10 lokusuna ait allelerin agaroz jel görüntüsü (NK: Negatif kontrol)



Şekil 4.7. CH02b03b lokusuna ait allelerin agaroz jel görüntüsü (NK: Negatif kontrol)



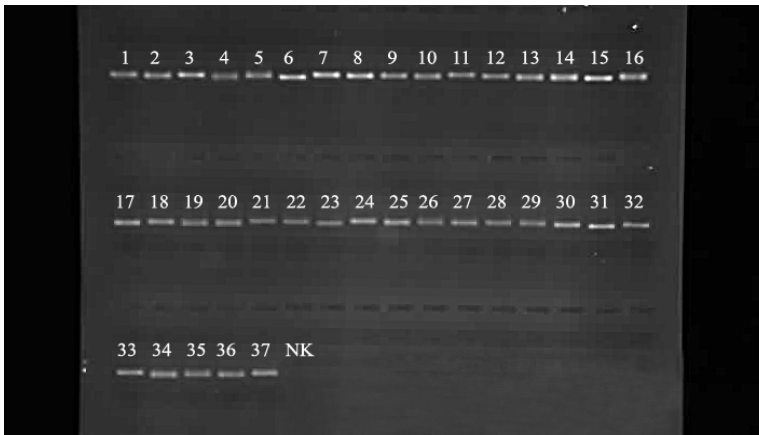
Şekil 4.8. CH02b10 lokusuna ait allelerin agaroz jel görüntüsü (NK: Negatif kontrol)



Şekil 4.9. CH02b12 lokusuna ait allelerin agaroz jel görüntüsü (NK: Negatif kontrol)



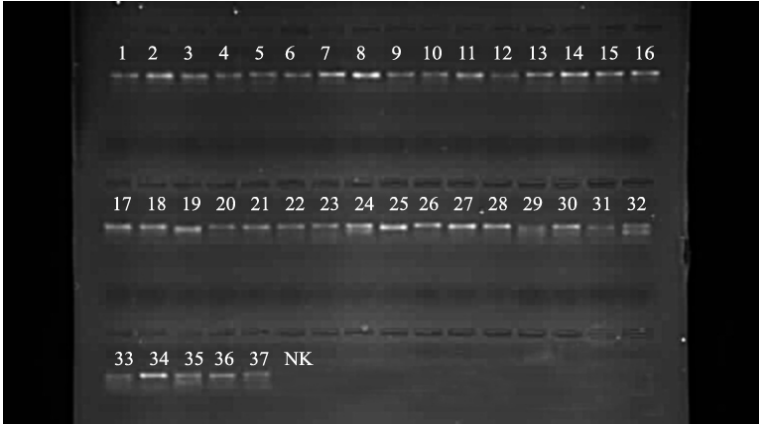
Şekil 4.10. CH02c06 lokusuna ait allelerin agaroz jel görüntüsü (NK: Negatif kontrol)



Şekil 4.11. CH02d11 lokusuna ait allelerin agaroz jel görüntüsü (NK: Negatif kontrol)



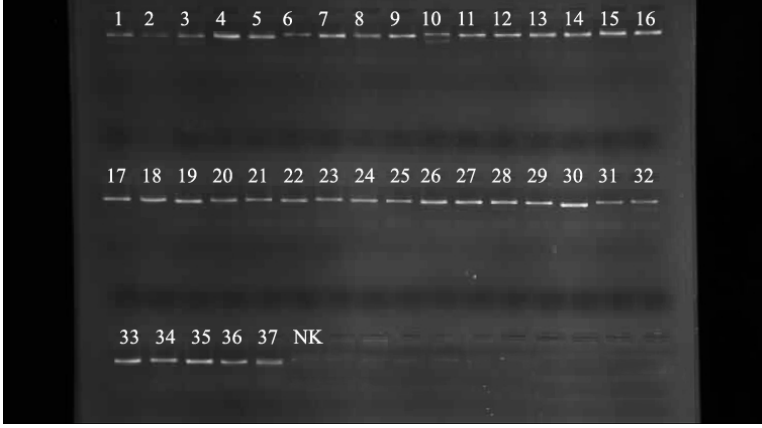
Şekil 4.12. CH02d12 lokusuna ait allelerin agaroz jel görüntüsü (NK: Negatif kontrol)



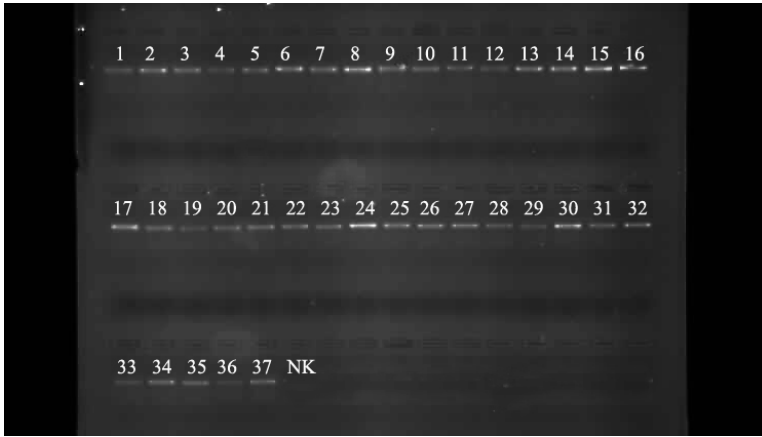
Şekil 4.13. CH02f06 lokusuna ait allelerin agaroz jel görüntüsü (NK: Negatif kontrol)



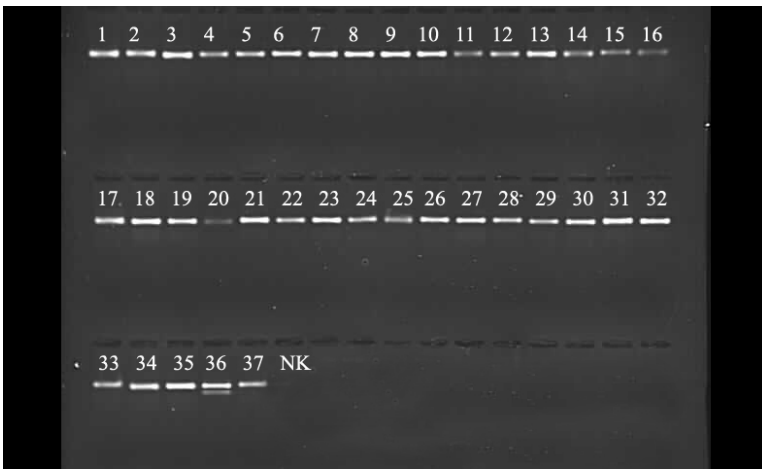
Şekil 4.14. CH03g07 lokusuna ait allelerin agaroz jel görüntüsü (NK: Negatif kontrol)



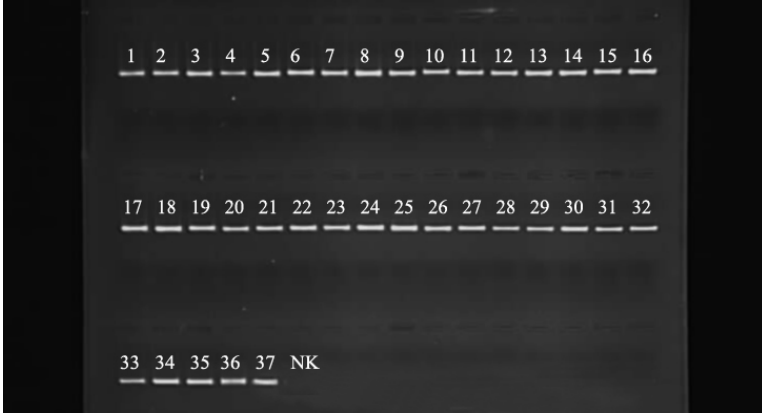
Şekil 4.15. CH04e03 lokusuna ait allelerin agaroz jel görüntüsü (NK: Negatif kontrol)



Şekil 4.16. CH04g10 lokusuna ait allelerin agaroz jel görüntüsü (NK: Negatif kontrol)



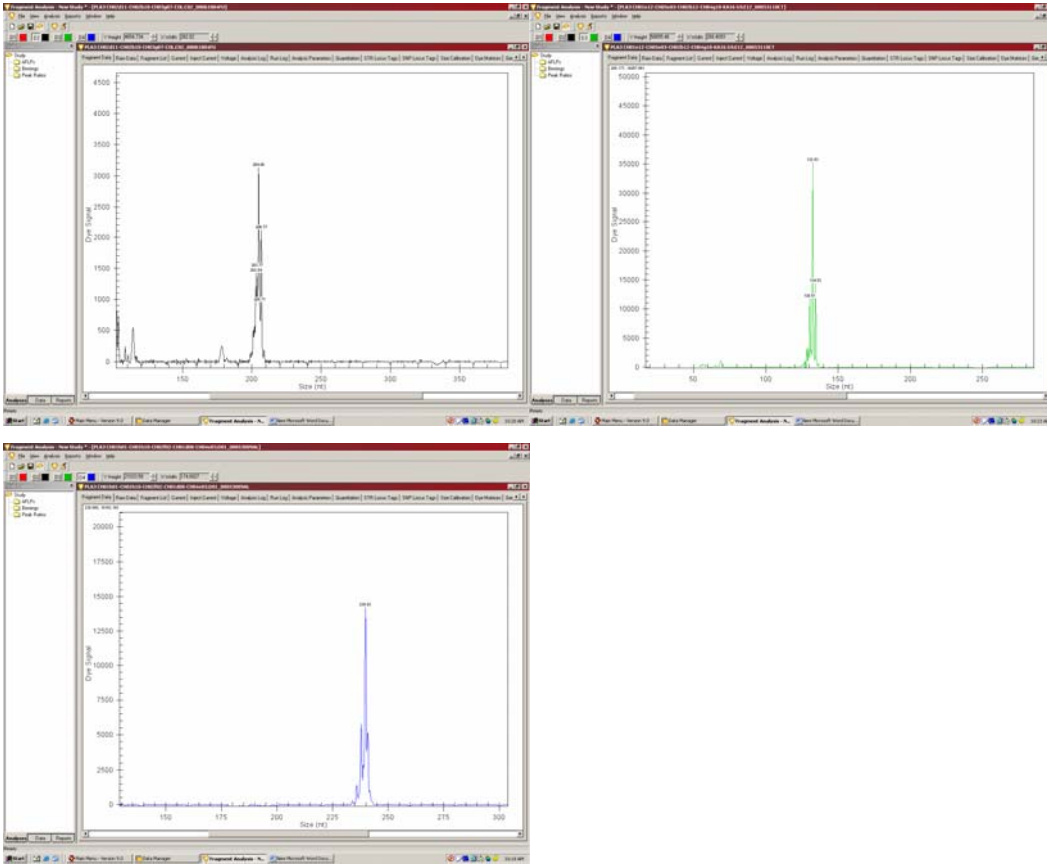
Şekil 4.17. CH05e03 lokusuna ait allelerin agaroz jel görüntüsü (NK: Negatif kontrol)



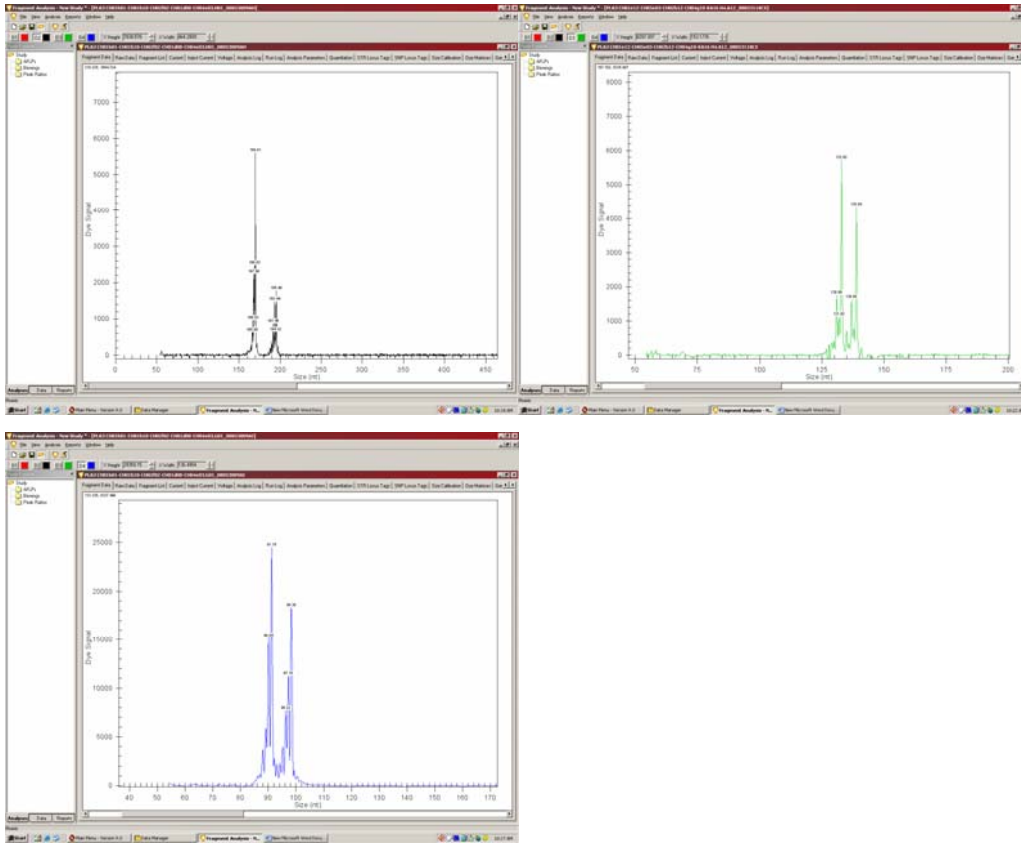
Şekil 4.18. COL lokusuna ait allelerin agaroz jel görüntüsü (NK: Negatif kontrol)

Her lokustaki allel büyüklükleri pik verisi olarak sistemin fragment analiz programı ile belirlenmiştir. Lokus-allel profillerinin kapilleri elektroforezdeki farklı görünüşleri Şekil 4.19.'de sunulmuştur.

(A)



(B)



Şekil 4.19. Lokus-allel profillerinin kapilleri elektroforezdeki farklı görünüşleri. Farklı boylarla işaretlenmiş homozigot allel görünüşleri (A), farklı boylarla işaretlenmiş heterozigot allel görünüşleri (B)

PCR aşamasından sonra agaroz jelde elde edilen net bant görüntüleri ile lokus-allel profillerinin kapilleri elektroforezdeki (Şekil 4.19.) rahat görüntülenebilen pikleri tezin metod aşamalarında iyi optimizasyonların göstergesi olup, tüm lokuslardaki allel tiplerinin (homozigot ve heterozigot) ve büyüklüklerinin başarılı bir şekilde tespit edilmesine olanak sağlamıştır.

4.3. Genetik Analizler

Araştırmada 17 SSR lokusu ait allel büyüklükleri baz çifti (bp, basepair) olarak Çizelge 4.2.'de sunulmuştur. Ayrıca Florina ve Golden Delicious çeşitleri de referans çeşit olarak örneklerle beraber analiz edilmiştir.

Çizelge 4.2. Elma çeşitlerinin 17 lokustaki allel büyüklükleri (bp)

No	Genotip	CH02b03b	CH01f02	CH01h01	CH01h10	CH05e03
1	E-70	99:99	170:204	109:125	98:108	162:162
2	E-42	97:97	170:194	117:117	98:98	172:172
3	E-71	93:109	178:208	107:129	98:100	162:202
4	E-40	99:107	178:182	117:117	92:98	190:190
5	E-45	95:95	178:182	109:117	98:98	162:162
6	Batum	95:99	206:206	115:131	92:98	162:182
7	Demir (2562)	79:99	182:188:208	115:115	96:104	148:180:200
8	Demir (2486)	79:99	182:188:208	115:115	96:104	148:180:200
9	Demir	79:99	182:188	115:115	96:104	148:180:200
10	Demir (2514)	97:97	170:194	115:119	98:102	190:190
11	Susuz Elma	93:99	170:184	111:117	100:100	190:190
12	Tavşanbaşı (2531)	95:99	188:188	117:117	98:116	158:172
13	Güz Tavşanbaşı	95:99	170:182	117:117	96:100	158:158
14	Yaz Tavşanbaşı	97:97	170:192	115:115	102:102	158:162
15	42-KP-1 (Mayhoş Tavşanbaşı)	97:97	172:192	117:117	98:102	158:184
16	42-C-3 (Tatlı Tavşanbaşı)	97:101	184:192	117:117	100:100	162:190
17	Tokat-1	81:99	170:172	109:119	98:98	172:190
18	Tokat-2	95:95	170:194	115:115	100:100	158:162
19	Tokat-4	81:99	168:172	109:109	98:98	166:180
20	Yaz Elması (2384)	79:91:97	180:180	113:117:131	92:98	162:168
21	Yaz Elması (2484)	97:97	170:182	115:115	92:98	160:160
22	Yaz Elması(2563)	79:91:97	180:180	113:131	92:100	162:166
23	42-A-1 (Yaz Elması)	75:95	188:206	119:119	98:110	188:188
24	372-E	79:95	172:182	111:131	98:98	158:190
25	383-E	99:99	170:182	117:117	98:98	162:188
26	384-E	91:95	172:194	115:115	98:98	168:172
27	385-E	91:97	180:206	119:119	98:98	158:162
28	392-E	81:91:97	180:188:206	117:131	92:98	170:192
29	473-E	95:95	182:204	131:131	92:98	162:162
30	496-E	81:91:97	180:188:204	119:131	92:98	170:190
31	542-E	97:97	170:182	115:115	92:98	160:160
32	546-E	95:95	188:208	117:117	100:100	162:188
33	Kalkandelen	81:91:97	180:188:206	117:131	92:98	170:192
34	Uzun Yorma	95:95	192:206	115:131	92:98	160:174:182
35	Yenişehir	95:95	170:172	119:119	98:98	162:190
36	Florina	95:99	182:206	117:131	92:112	162:188
37	Golden Delicious	79:99	168:178	117:117	92:110	176:182

Çizelge 4.2. (devam)

No	Genotip	CHO2d11	CHO1d08	CHO3g07	CH02d12
1	E-70	128:128	250:266	124:126	197:205
2	E-42	120:128	238:272	120:126	177:179
3	E-71	120:132	254:272	118:118	179:193
4	E-40	128:144	240:254	126:126	177:193
5	E-45	144:148	238:292	124:124	177:207
6	Batum	118:128	240:272	118:120	191:199
7	Demir (2562)	122:128	240:272	120:124	189:199
8	Demir (2486)	122:128	240:272	120:124	189:199
9	Demir	122:128	240:272	120:124	189:199
10	Demir (2514)	122:128	254:272	118:124	179:199
11	Susuz elma	118:144	272:292	118:120	177:205
12	Tavşanbaşı (2531)	118:128	238:240	118:118	177:183
13	Güz Tavşanbaşı	118:144	238:292	120:120	183:207
14	Yaz Tavşanbaşı	140:140	238:268	118:118	177:177
15	42-KP-1 (Mayhoş Tavşanbaşı)	124:142	244:268	118:120	177:179
16	42-C-3 (Tatlı Tavşanbaşı)	118:140	238:242	118:122	177:207
17	Tokat-1	124:128	240:292	118:180	177:201
18	Tokat-2	132:144	272:272	120:126	177:177
19	Tokat-4	142:146	276:292	120:120	177:179
20	Yaz Elması (2384)	116:144	250:272	118:126	183:191:199
21	Yaz Elması (2484)	116:128	240:272	120:126	191:199
22	Yaz Elması(2563)	116:144	250:272	118:126	183:191:199
23	42-A-1 (Yaz Elması)	118:128	240:264	128:128	177:211
24	372-E	118:146	238:254	118:128	177:183
25	383-E	118:132	242:272	118:122	205:205
26	384-E	118:142	240:240	124:124	177:199
27	385-E	128:144	238:250	118:128	199:207
28	392-E	126:144	240:254	118:128	177:199
29	473-E	124:128	242:256	128:178	177:207
30	496-E	128:144	240:254	118:128	177:199
31	542-E	118:128	240:272	120:128	191:199
32	546-E	128:128	240:274	126:128	177:199
33	Kalkandelen	124:142	240:254	116:126	177:199
34	Uzun Yorma	118:128	240:272	116:120	191:199
35	Yenişehir	126:126	264:264	124:124	193:199
36	Florina	128:128	254:278	120:126	189:199
37	Golden Delicious	116:128	250:272	118:128	195:199

Çizelge 4.2. (devam)

No	Genotip	CH04e03	CH01e12	CHO2b12	CHO4g10
1	E-70	195:207	243:249	125:125	132:140
2	E-42	185:197	249:249	123:127	166:166
3	E-71	197:203	247:251	117:129	144:144
4	E-40	197:201	249:249	139:139	134:166
5	E-45	201:201	251:273	123:135	132:132
6	Batum	185:195	275:275	123:123	132:132
7	Demir (2562)	191:209	241:245:253	127:131	132:144
8	Demir (2486)	191:207	241:245:253	131:131	132:144
9	Demir	191:209	241:245:253	127:131	132:132
10	Demir (2514)	209:209	251:251	117:131	132:132
11	Susuz elma	195:201	252:276	131:139	132:134
12	Tavşanbaşı (2531)	197:203	251:251	135:135	128:132
13	Güz Tavşanbaşı	197:197	249:275	117:125	126:134
14	Yaz Tavşanbaşı	195:203	247:271	123:127	126:134
15	42-KP-1 (Mayhoş Tavşanbaşı)	201:201	247:251	131:135	126:134
16	42-C-3 (Tatlı Tavşanbaşı)	185:203	247:261	121:121	128:134
17	Tokat-1	185:197	249:249	123:139	132:136
18	Tokat-2	191:201	251:251	127:141	126:134:154
19	Tokat-4	197:205	239:275	123:127	126:132
20	Yaz Elması (2384)	195:195	245:251:275	125:139	134:134
21	Yaz Elması (2484)	195:195	247:247	127:139	120:124:140
22	Yaz Elması(2563)	195:195	249:255:275	125:139	128:134
23	42-A-1 (Yaz Elması)	197:203	249:249	129:135	132:132
24	372-E	185:197	275:275	123:139	128:134
25	383-E	185:201	261:275	125:133	128:134:154
26	384-E	207:207	251:275	137:141	124:132
27	385-E	195:207	245:249	127:127	132:132
28	392-E	197:197	245:245	127:139	124:132:152
29	473-E	195:195	249:251	123:127	120:124:140
30	496-E	197:197	245:245	127:139	124:132:152
31	542-E	197:201	247:247	127:139	120:124:140
32	546-E	185:185	249:249	121:127	134:166
33	Kalkandelen	197:197	245:254	125:141	124:132:152
34	Uzun Yorma	185:195	275:275	121:135:143	132:132
35	Yenişehir	195:195	249:249	115:121	134:134
36	Florina	195:195	249:275	125:139	132:132
37	Golden Delicious	197:197	245:251	139:139	132:132

Çizelge 4.2. (devam)

No	Genotip	CHO2b10	CH02f06	COL	CH02c06
1	E-70	130:130	142:146	240:240	248:248
2	E-42	144:144	144:156	230:240	254:254
3	E-71	118:134	144:156	240:240	232:250:268
4	E-40	130:156	136:148	220:232	218:248
5	E-45	118:118	156:156	232:240	268:268
6	Batum	124:132	148:156	230:230	238:252
7	Demir (2562)	126:132:136	130:148:156	232:236	208:232:258
8	Demir (2486)	126:132:136	130:148:156	232:236	208:258
9	Demir	126:132:136	130:148:156	232:236	208:258
10	Demir (2514)	128:142	156:156	230:234	230:254
11	Susuz elma	132:134	152:156	232:240	234:256
12	Tavşanbaşı (2531)	120:130	130:136	232:240	250:250
13	Güz Tavşanbaşı	134:134	130:156	232:232	236:254
14	Yaz Tavşanbaşı	130:138	136:146	230:240	234:252
15	42-KP-1 (Mayhoş Tavşanbaşı)	128:138	142:156	224:232	234:256
16	42-C-3 (Tatlı Tavşanbaşı)	130:134	146:152	232:240	236:250
17	Tokat-1	128:144	148:148	230:230	230:252
18	Tokat-2	126:134	136:148	230:230	234:234
19	Tokat-4	126:132	136:144	234:234	256:256
20	Yaz Elması (2384)	124:130	144:156	220:242	230:250
21	Yaz Elması (2484)	122:126	136:144	230:230	230:244
22	Yaz Elması(2563)	124:130	136:156	220:240	230:250
23	42-A-1 (Yaz Elması)	148:148	136:144	234:242	218:254
24	372-E	126:134	142:156	220:232	236:250
25	383-E	118:134	148:152	234:234	236:252:268
26	384-E	112:128	148:148	232:232	208:230
27	385-E	132:132	142:148	240:240	236:250
28	392-E	128:154	144:156	222:230:238	218:244
29	473-E	136:152	148:154	232:232	218:232
30	496-E	128:152	144:156	222:230:238	218:244
31	542-E	122:126	144:156	230:230	230:244
32	546-E	120:138	144:156	232:232	258:258
33	Kalkandelen	128:152	144:156	224:240	218:240
34	Uzun Yorma	124:132	148:156	230:230	236:250
35	Yenişehir	132:142	148:156	230:230	228:254
36	Florina	130:130	148:148	220:232	250:250
37	Golden Delicious	120:124	142:156	220:232	236:240

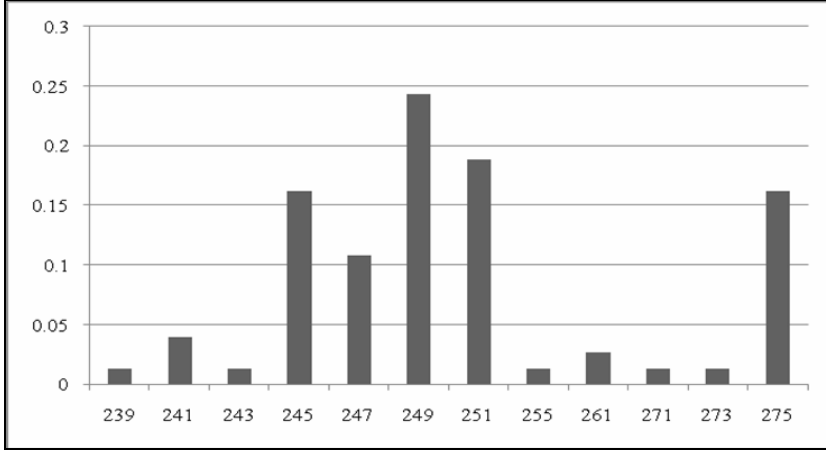
Araştırmada 12 SSR lokusunun, (CH01e12, CH01f02, CH01h01, CH02b03b, CH02b10, CH02b12, CH02c06, CH02d12, CH02f06, CH04g10, CH05e03, COL lokusları) bazı genotiplerde (sırası ile 5, 5, 1, 4, 3, 1, 3, 2, 3, 8, 4, 2 genotipte) üçlü allellere rastlanmıştır (Çizelge 4.2.).

37 elma genotipinin her bir SSR lokusundaki analizleri sonucu, lokuslardaki genetik parametreler; allel sayıları, beklenen-gözlenen heterozigotluk oranları, tespit olasılıkları ve sessiz (null) allel frekansları Çizelge 4.3.'de sunulmuştur.

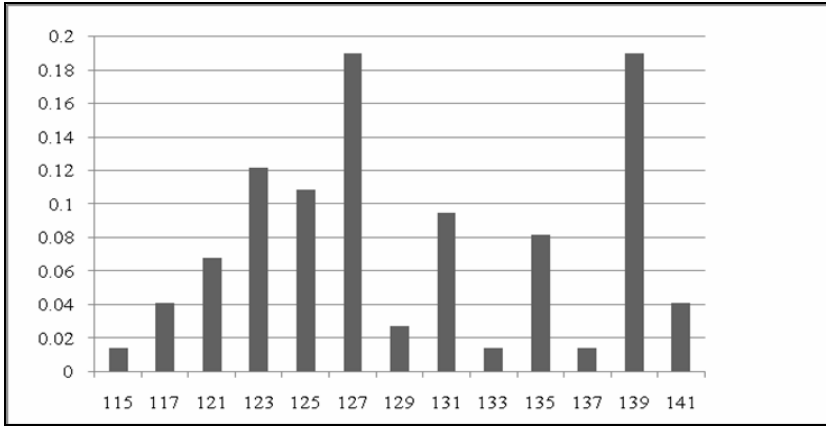
Çizelge 4.3. Çalışılan lokuslardaki allel sayıları (n), beklenen heterozigotluk (He), gözlenen heterozigotluk (Ho), tespit olasılığı (PI) değeri ve sessiz (null) allel frekansı(r)

Lokuslar	n	He	Ho	PI	r
CH01d08	14	0.850	0.918	0.069	-0.0369
CH01e12	12	0.837	0.540	0.086	0.1615
CH01f02	13	0.892	0.891	0.040	0.0003
CH01h01	10	0.794	0.432	0.126	0.2017
CH01h10	10	0.727	0.621	0.159	0.0611
CH02b03b	11	0.827	0.621	0.094	0.1127
CH02b10	17	0.912	0.864	0.027	0.0248
CH02b12	13	0.877	0.783	0.051	0.0498
CH02c06	17	0.922	0.783	0.021	0.0721
CH02d11	13	0.844	0.864	0.065	-0.0108
CH02d12	13	0.838	0.918	0.076	-0.0439
CH02f06	9	0.820	0.864	0.099	-0.0244
CH03g07	9	0.815	0.729	0.109	0.0472
CH04e03	9	0.829	0.594	0.090	0.1283
CH04g10	10	0.788	0.675	0.112	0.0629
CH05e03	17	0.883	0.702	0.041	0.0959
COL	10	0.820	0.567	0.100	0.1390
Toplam	207	14,27	12,36		
Ortalama	12.17	0.839	0.727		

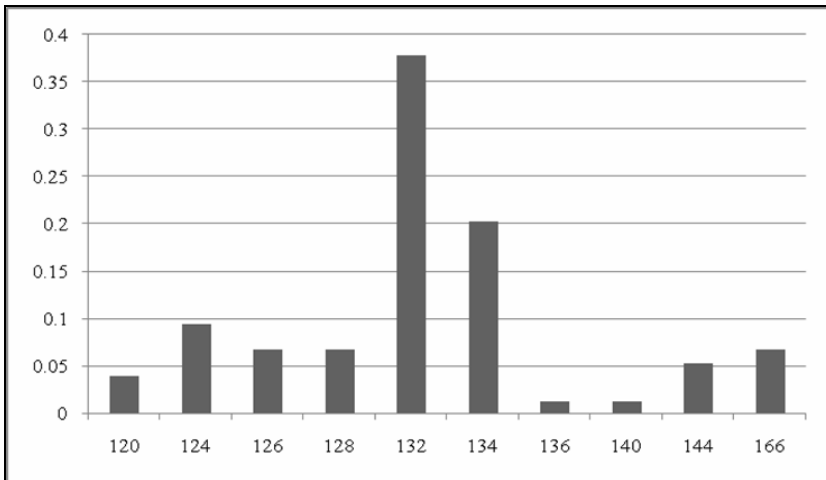
Türkiye elma koleksiyonlarında bulunan 35 yerel ile 2 referans elmanın 17 SSR lokusu ile analizi sonucu toplam 207 polimorfik allel belirlenmiştir. Çizelge 4.3.'de allel sayılarına bakıldığında en yüksek allel sayısı CH02b10, CH02c06 ve CH05e03 lokuslarında 17 olarak elde edilirken, bu lokusları 14 allelle CH01d08 ve 13'er allelle CH01f02, CH02b12, CH02d11 ve CH02d12 lokusları izlemektedir. Ortalama allel sayısı 12.17 olup, allel büyüklükleri Çizelge 4.2'de sunulmuştur. Beklenen heterozigotluk (He) 0.839 ortalama ile, 0.727 (CH01h10) ile 0.922(CH02c06) arasında değişirken, gözlenen heterozigotluk (Ho) ise 0,727 ortalama ile, 0,432 (CH01h01) ile 0,918 (Ch01d08) arasında belirlenmiştir. Tanımlama olasılığı (PI) 0,021 (CH02c06) ile 0,159 (CH01h10) arasında değişmiştir (Çizelge 4.3.). Her bir lokusta allel sayılarının oranlarını gösteren frekans değerleri Şekil 20. - Şekil 36.' de sunulmuştur.



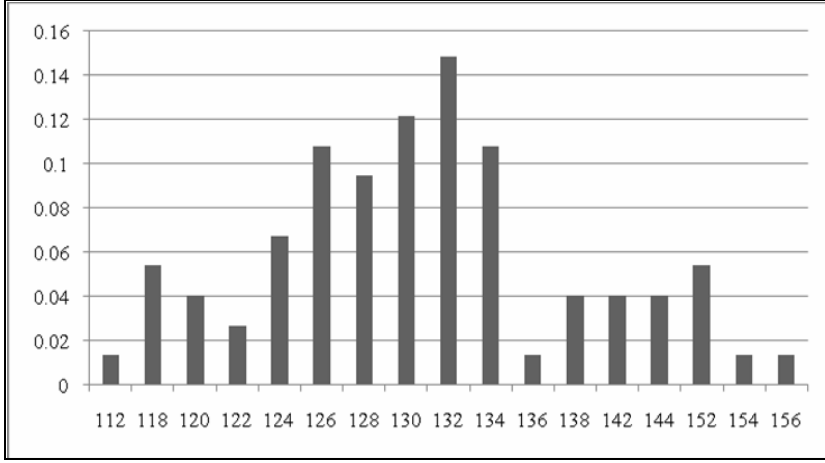
Şekil 4.20. CH01e12 lokusuna ait allel frekansları



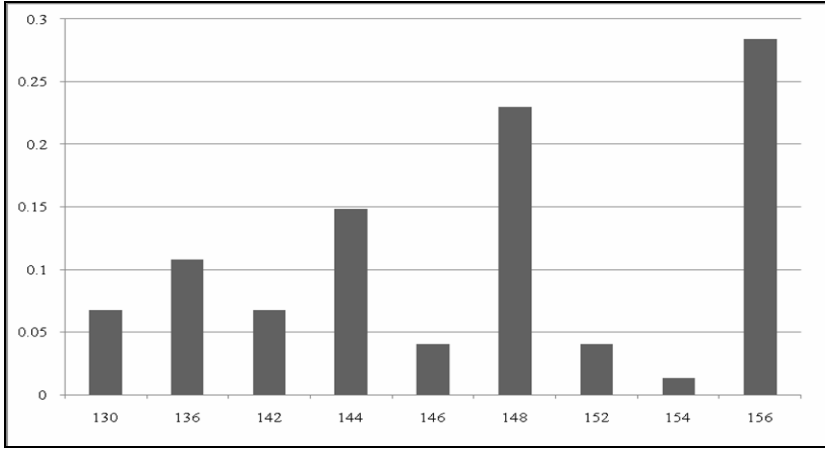
Şekil 4.21. CH0b12 lokusuna ait allel frekansları



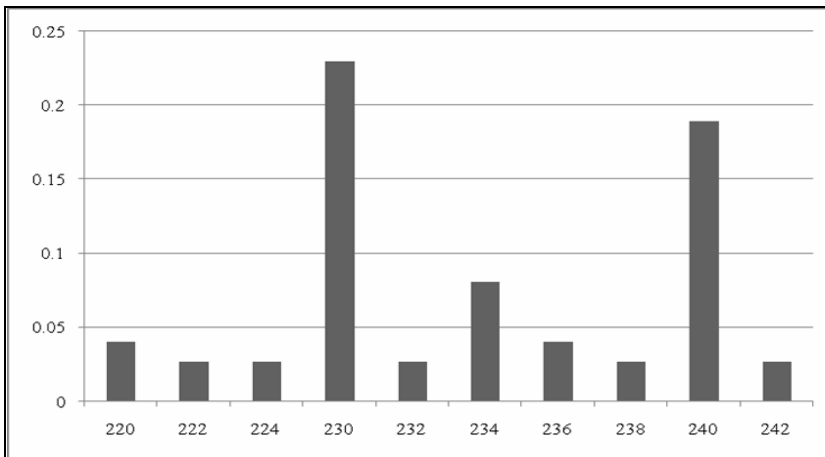
Şekil 4.22. CH04g10 lokusuna ait allel frekansları



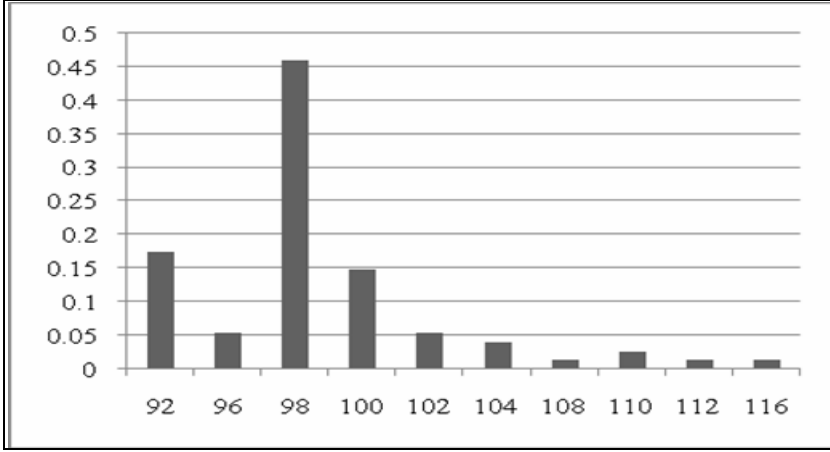
Şekil 4.23. CH02b10 lokusuna ait allel frekansları



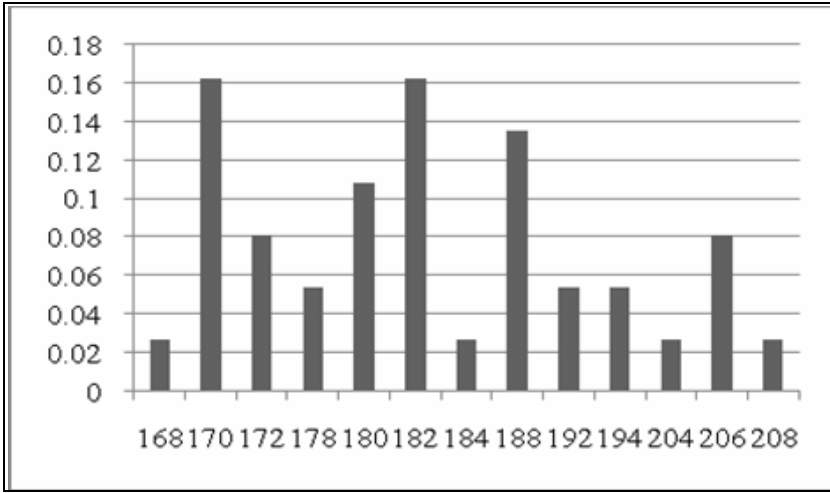
Şekil 4.24. CH02f06 lokusuna ait allel frekansları



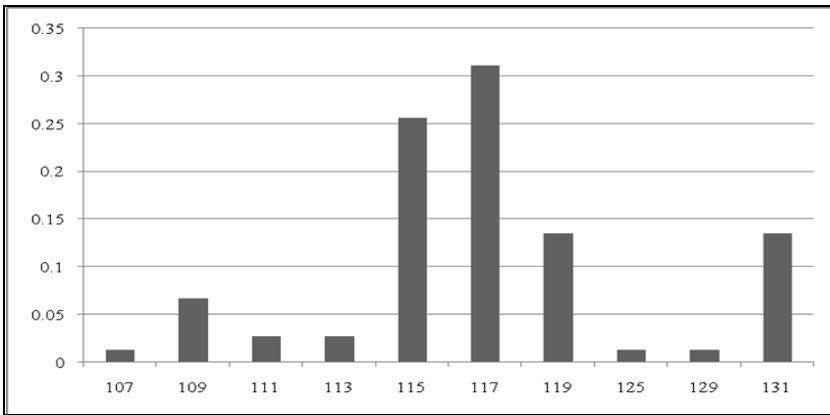
Şekil 4.25. COL lokusuna ait allel frekansları



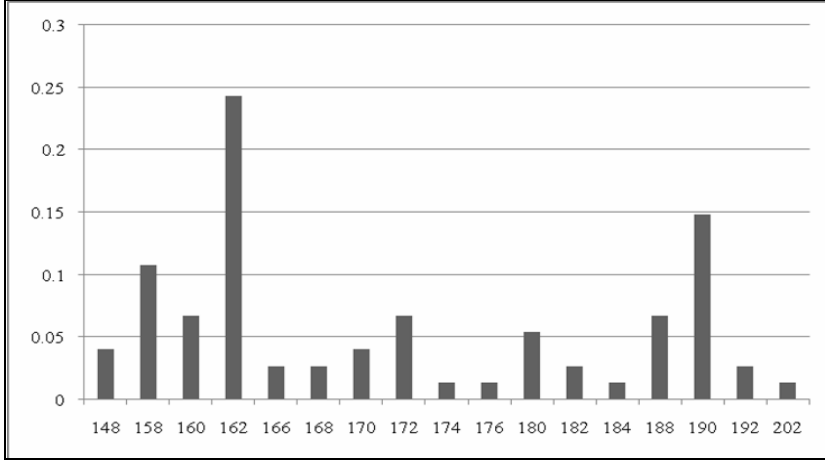
Şekil 4.26. CH01h10 lokusuna ait allel frekansları



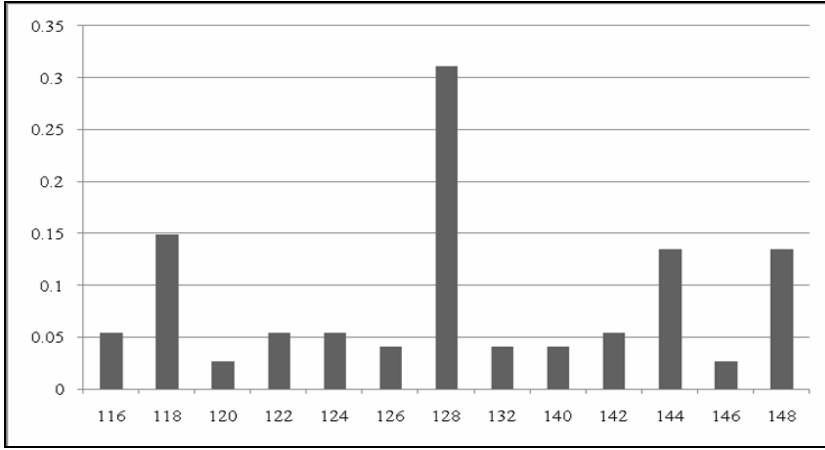
Şekil 4.27. CH01f02 lokusuna ait allel frekansları



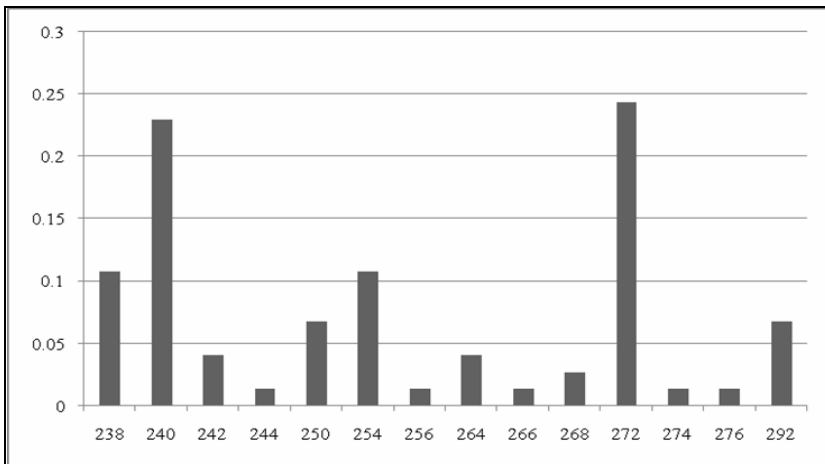
Şekil 4.28. CH01h01 lokusuna ait allel frekansları



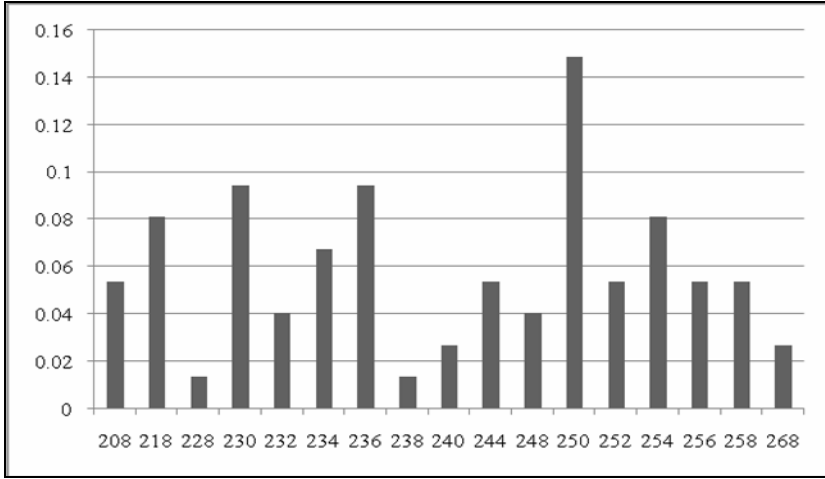
Şekil 4.29. CH05e03 lokusuna ait allel frekansları



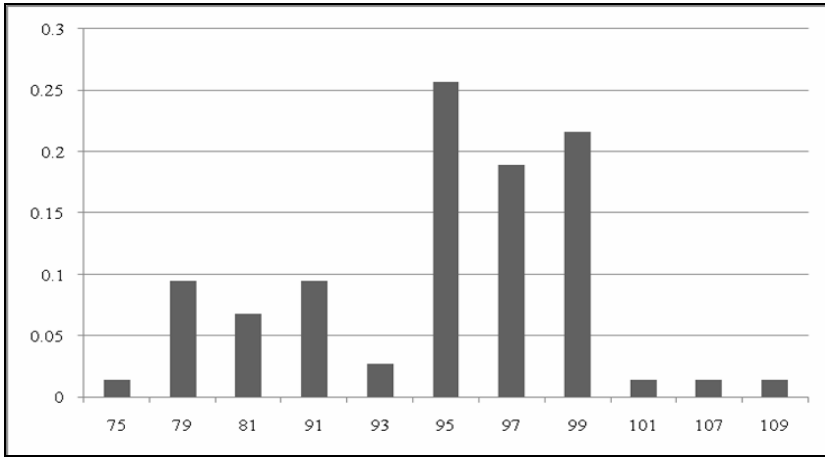
Şekil 4.30. CH02d11 lokusuna ait allel frekansları



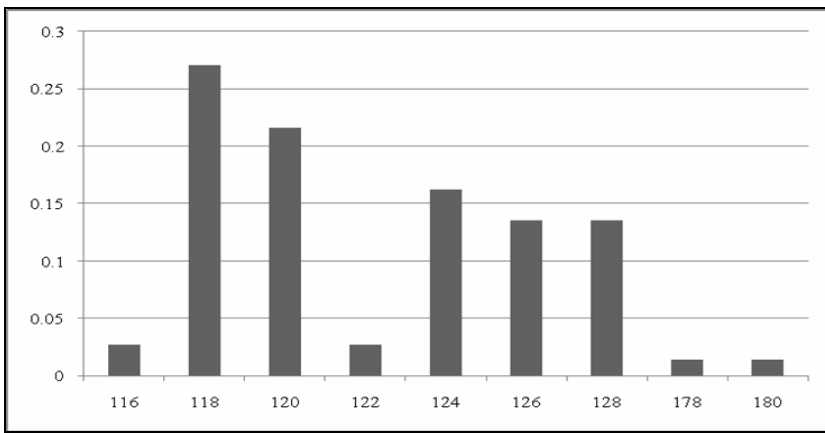
Şekil 4.31. CH01d08 lokusuna ait allel frekansları



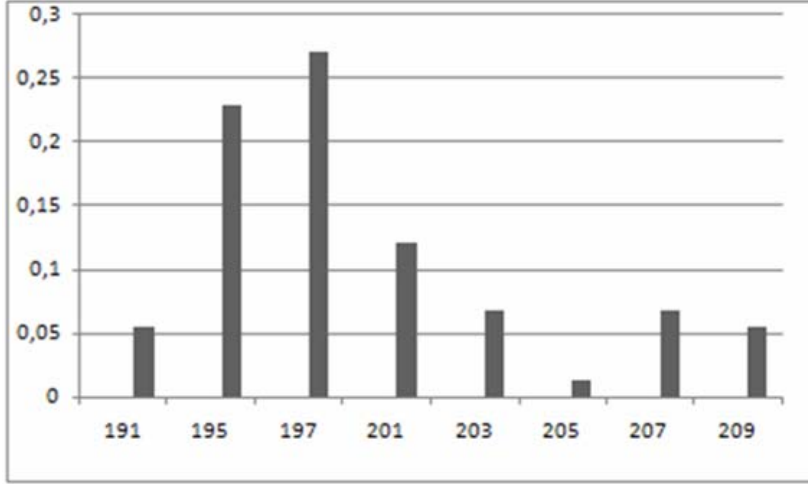
Şekil 4.32. CH02c06 lokusuna ait allel frekansları



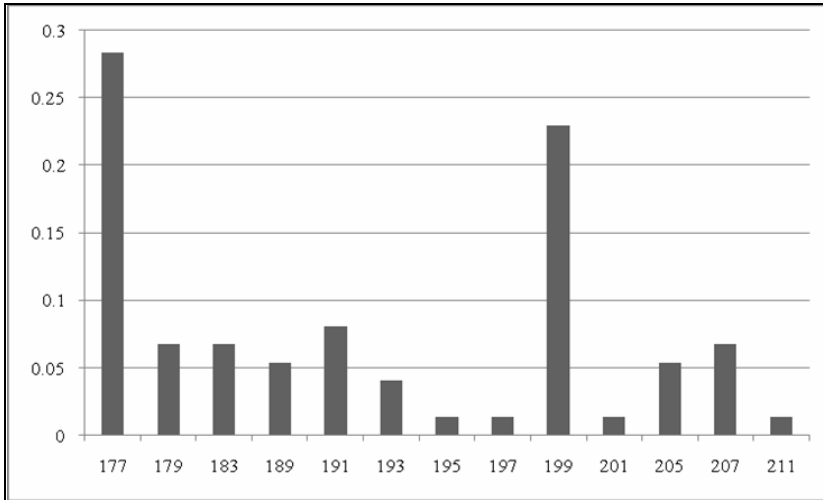
Şekil 4.33. CH0b03b lokusuna ait allel frekansları



Şekil 4.34. CH03g07 lokusuna ait allel frekansları



Şekil 4.35. CH04e03 lokusuna ait allel frekansları



Şekil 4.36. CH02d12 lokusuna ait allel frekansları

Genel olarak allelerin lokuslardaki dağılımlarına bakıldığında, en yüksek allel frekansları; CH01d08'de 272, CH01e12'de 249, CH01f02'de 170-182, CH01h01'de 117, CH01h10'da 98, CH02b03b'de 95, CH02b10'da 132, CH02b12'de 127-139, CH02c06'da 250, CH02d11'de 128, CH02d12'de 177, CH02f06'da 156, CH03g07'de 118, CH04e03'de 197, CH04g10'da 132, CH05e03'de 162 ve COL' da 232 olarak belirlenmiştir.

Kullanılan elma genotipleri arasındaki homonim, sinonim ve benzerlikler belirlenmiştir. Aynı isimle adlandırılan ve genetik açıdan farklılık gösteren çeşitler homonim olarak

adlandırılırken, farklı isimlerle adlandırılırken genetik açıdan aynı olan bireyler sinonim adını alır. İsim ve genetik açıdan da aynı olan çeşitler benzer (identical, ayırt edilemeyen) olarak isimlendirilir. Elma genotipleri arasındaki homonim sinonim ve benzerlik durumları Çizelge 4.4.'te sunulmuştur.

Çizelge 4.4. Araştırma sonucunda tespit edilen benzer, sinonim ve homonim genotipler

Homonimler	Benzer çeşitler	Sinonimler
1.Demir (2562) Demir (2486) Demir Demir (2514)	Bulunmamaktadır.	Bulunmamaktadır.
2.Tavşanbaşı (2531) Güz Tavşanbaşı Yaz Tavşanbaşı 42-KP-1 (Mayhoş Tavşanbaşı) 42-C-3 (Tatlı Tavşanbaşı)		
3.Tokat-1 Tokat-2 Tokat-4		
4.Yaz Elması (2384) Yaz Elması (2484) Yaz Elması(2563) 42-A-1 (Yaz Elması)		

SSR analizleri sonucu benzer ve sinonim çeşitlere rastlanmazken, 4 homonim grup tespit edilmiştir. homonim gruplardaki en yakın benzerlik oranlarına bakıldığında, birinci grupta % 94, ikinci grupta % 38, üçüncü grupta % 32 ve dördüncü grupta % 77 olduğu görülmektedir.

SSR allel büyüklüklerine dayalı benzerlik indeksi ve ilişki dendogramı sırası ile Çizelge 4.5. ve Şekil 4.8.' de sunulmuştur.

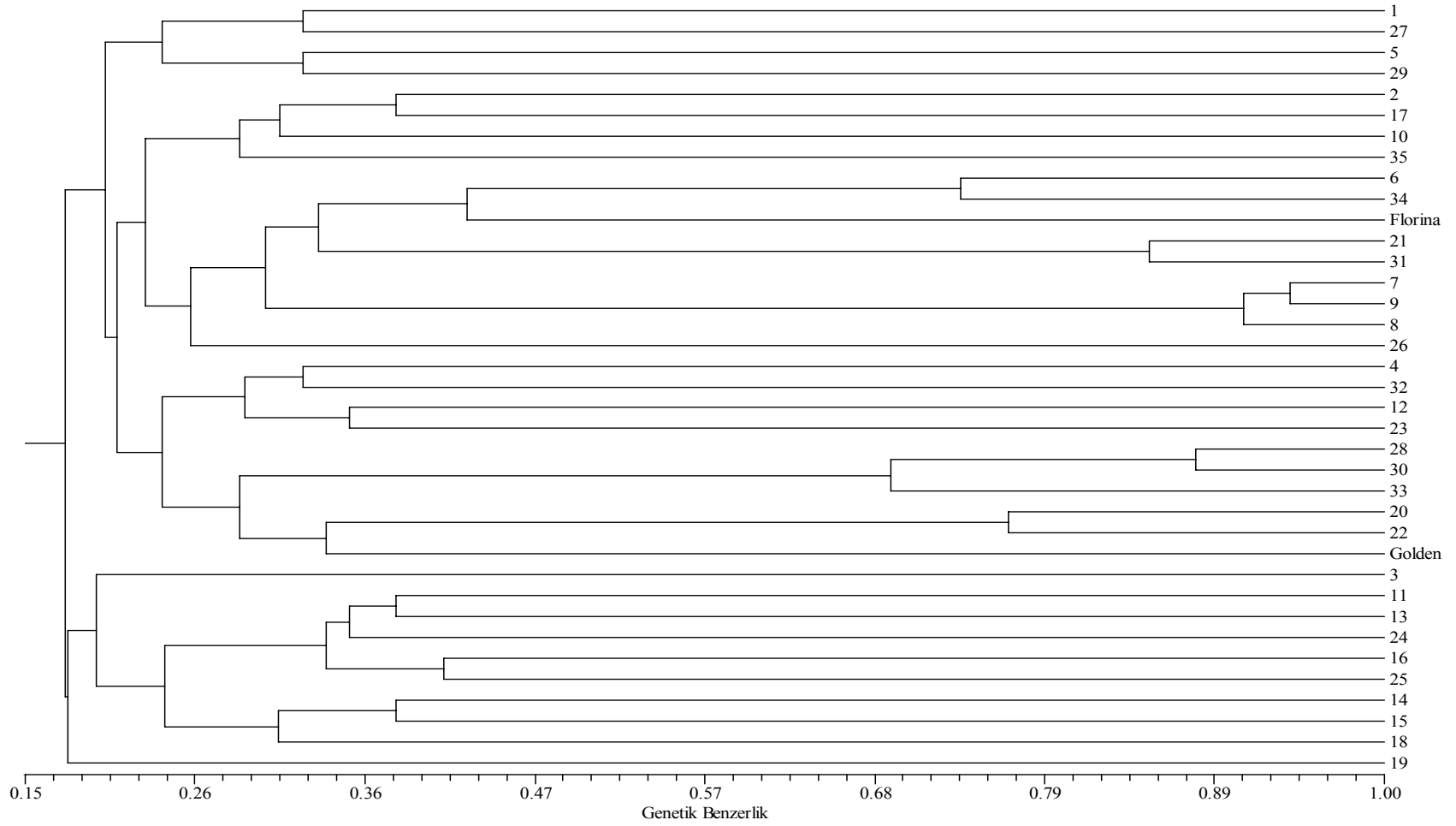
4.4. Benzerlik Oranı İndeksi

Çizelge 4.5. Genotiplere ve referans çeşitlere ait benzerlik oranları (%)

	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	Florina	Golden	
1	1																																					
2	0,18	1																																				
3	0,12	0,24	1																																			
4	0,21	0,29	0,15	1																																		
5	0,21	0,24	0,21	0,24	1																																	
6	0,18	0,24	0,15	0,18	0,21	1																																
7	0,12	0,12	0,09	0,18	0,12	0,29	1																															
8	0,15	0,09	0,06	0,18	0,12	0,29	0,91	1																														
9	0,12	0,12	0,03	0,18	0,15	0,32	0,94	0,91	1																													
10	0,15	0,32	0,24	0,15	0,21	0,29	0,27	0,24	0,29	1																												
11	0,18	0,21	0,24	0,29	0,29	0,29	0,21	0,21	0,21	0,27	1																											
12	0,18	0,27	0,24	0,32	0,29	0,24	0,21	0,21	0,21	0,18	0,27	1																										
13	0,12	0,27	0,15	0,27	0,27	0,18	0,18	0,18	0,18	0,12	0,38	0,32	1																									
14	0,18	0,27	0,18	0,12	0,15	0,21	0,09	0,06	0,09	0,21	0,21	0,27	0,15	1																								
15	0,06	0,27	0,18	0,21	0,27	0,12	0,09	0,09	0,09	0,29	0,35	0,27	0,24	0,38	1																							
16	0,12	0,21	0,24	0,21	0,21	0,12	0,03	0,03	0,03	0,09	0,38	0,35	0,29	0,38	0,27	1																						
17	0,21	0,38	0,09	0,32	0,21	0,35	0,15	0,15	0,15	0,29	0,24	0,27	0,15	0,18	0,18	0,12	1																					
18	0,09	0,24	0,18	0,21	0,21	0,24	0,24	0,21	0,24	0,21	0,35	0,18	0,27	0,38	0,24	0,18	0,15	1																				
19	0,12	0,27	0,12	0,15	0,21	0,21	0,21	0,18	0,21	0,12	0,24	0,18	0,21	0,15	0,24	0,03	0,32	0,18	1																			
20	0,21	0,18	0,24	0,27	0,18	0,27	0,09	0,09	0,09	0,18	0,27	0,21	0,18	0,15	0,18	0,18	0,12	0,18	0,06	1																		
21	0,15	0,32	0,12	0,24	0,06	0,35	0,29	0,27	0,29	0,29	0,15	0,12	0,09	0,29	0,15	0,06	0,24	0,32	0,18	0,32	1																	
22	0,24	0,15	0,21	0,27	0,12	0,27	0,06	0,06	0,06	0,12	0,27	0,21	0,21	0,21	0,09	0,24	0,12	0,21	0,06	0,77	0,29	1																
23	0,12	0,24	0,15	0,27	0,18	0,24	0,12	0,12	0,15	0,24	0,09	0,35	0,15	0,09	0,09	0,09	0,27	0,09	0,21	0,09	0,15	0,06	1															
24	0,06	0,24	0,21	0,29	0,27	0,29	0,12	0,12	0,12	0,15	0,32	0,35	0,38	0,18	0,27	0,35	0,29	0,18	0,27	0,27	0,12	0,29	0,18	1														
25	0,21	0,21	0,21	0,24	0,21	0,29	0,12	0,12	0,12	0,15	0,35	0,21	0,32	0,15	0,18	0,41	0,24	0,24	0,18	0,21	0,12	0,18	0,12	0,32	1													
26	0,12	0,15	0,06	0,15	0,27	0,27	0,27	0,29	0,27	0,27	0,18	0,27	0,15	0,09	0,21	0,09	0,32	0,24	0,21	0,15	0,21	0,06	0,18	0,24	0,15	1												
27	0,32	0,24	0,18	0,15	0,27	0,32	0,21	0,21	0,24	0,24	0,18	0,24	0,18	0,24	0,15	0,24	0,24	0,15	0,15	0,29	0,18	0,29	0,27	0,27	0,18	0,21	1											
28	0,06	0,21	0,18	0,29	0,18	0,24	0,18	0,15	0,18	0,21	0,21	0,24	0,15	0,09	0,18	0,09	0,27	0,09	0,21	0,32	0,27	0,24	0,27	0,27	0,09	0,24	0,29	1										
29	0,21	0,18	0,12	0,27	0,32	0,27	0,18	0,12	0,15	0,09	0,12	0,18	0,18	0,15	0,15	0,15	0,21	0,21	0,12	0,18	0,27	0,18	0,24	0,24	0,15	0,24	0,27	0,24	1									
30	0,09	0,21	0,18	0,32	0,15	0,27	0,21	0,18	0,21	0,29	0,21	0,24	0,12	0,09	0,15	0,09	0,35	0,09	0,21	0,29	0,29	0,24	0,35	0,29	0,06	0,24	0,35	0,88	0,29	1								
31	0,09	0,35	0,18	0,24	0,12	0,38	0,29	0,27	0,29	0,32	0,21	0,15	0,18	0,24	0,21	0,09	0,27	0,29	0,18	0,24	0,85	0,18	0,21	0,24	0,18	0,24	0,18	0,35	0,24	0,38	1							
32	0,15	0,35	0,15	0,32	0,21	0,21	0,18	0,18	0,21	0,09	0,21	0,27	0,27	0,15	0,21	0,29	0,18	0,27	0,09	0,18	0,18	0,18	0,29	0,21	0,18	0,18	0,18	0,27	0,29	0,27	0,21	1						
33	0,15	0,24	0,18	0,27	0,18	0,21	0,15	0,15	0,15	0,18	0,15	0,24	0,15	0,06	0,24	0,09	0,24	0,09	0,21	0,29	0,21	0,24	0,27	0,18	0,09	0,29	0,21	0,71	0,24	0,68	0,24	0,24	1					
34	0,12	0,21	0,12	0,15	0,21	0,74	0,27	0,27	0,29	0,27	0,24	0,24	0,18	0,12	0,15	0,18	0,24	0,24	0,15	0,24	0,38	0,24	0,27	0,29	0,21	0,27	0,32	0,21	0,24	0,24	0,41	0,24	0,24	1				
35	0,18	0,24	0,12	0,21	0,24	0,29	0,12	0,12	0,12	0,29	0,18	0,06	0,18	0,15	0,12	0,12	0,32	0,24	0,12	0,21	0,21	0,18	0,27	0,21	0,18	0,24	0,29	0,12	0,24	0,15	0,18	0,27	0,09	0,32	1			
Florina	0,29	0,21	0,15	0,41	0,21	0,44	0,35	0,35	0,35	0,18	0,29	0,29	0,29	0,09	0,09	0,15	0,24	0,15	0,18	0,29	0,24	0,32	0,21	0,29	0,27	0,24	0,29	0,24	0,29	0,24	0,24	0,29	0,24	0,24	0,24	1		
Golden	0,15	0,15	0,18	0,29	0,21	0,32	0,24	0,24	0,27	0,27	0,27	0,27	0,21	0,03	0,18	0,12	0,21	0,06	0,12	0,38	0,18	0,29	0,21	0,29	0,15	0,12	0,32	0,32	0,15	0,35	0,24	0,21	0,27	0,27	0,09	0,32	1	

4.5. Genetik İlişki Dendogramı

37



Şekil 4.37. Çeşitlere ait genetik ilişki dendogramı

Genetik ilişki dendogramına (şekil 4.37.) bakıldığında temel olarak iki ana dallanma grlmektedir. On çeşidin yer aldığı birinci grupta 19 numaralı genotip (Tokat-4) diğer gruplardan ayrı bir dallanma göstermiştir. Referans çeşitlerin içinde yer aldığı diğer 27 çeşit ise ikinci grupta kendi aralarında farklı dallanmalar göstermiştir. İkinci grup yine kendi içinde iki dallanma göstermiştir.

Çeşitler arasındaki genetik benzerlik oranları %0.3-94 arasında değişiklik göstermiştir. Çalışmadaki en yüksek benzerlik oranı (% 94) Demir(2562) ile Demir(2486) eşitleri arasında gözlenirken, bu oranı % 91 lik değerle yine Demir(2562) ile Demir(2486) elmaları izlemektedir. nc en yüksek benzerlik oranı ise % 88'le Yaz Tavşanbaşı ile Mayhoş Tavşanbaşı ve Tatlı Tavşanbaşı elmalarında gözlenmiştir (izelge 4.5.).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

5.1. SSR Analizleri

SSR' a dayalı tanımlama araştırmalarında, veri paylaşımı yüksek heterozigotluk sahte allel olasılığının düşürülmesi vb. amaçla uygun lokus seçimi büyük önem taşımaktadır. Bu amaçla, değişik türlerde (üzüm, kakao, zeytin vb.) “core set” olarak adlandırılan SSR lokusları belirlenmektedir. Ayrıca referans çeşitlerin ve bunlara ait allel değerlerinin belirlenmesi uluslararası paylaşımında son derece önem taşımaktadır. Bu amaçla araştırmadaki SSR lokusları ve referans çeşitler uluslararası veri paylaşımına uygun olarak seçilmiştir.

Sonuçlarımıza göre; 10 allel sayısı ile CH01h01 (PI: 0,129) ayırım gücü en düşük lokus; CH02d11 (PI; 0,065) ise 16 allel sayısı ile en etkin ayırım gücüne sahip lokus olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.3.) Bu lokusun allel sayısı ve heterozigotluk oranı (n:16, He: 0,85, Ho: 0,89), 66 İspanya genotipinin çalışıldığı Pereira-Lorenzo *et al.* (2008) ile (n:14 He: 0,86, Ho: 0,88) oldukça benzer bulunmuştur.

CH02b10 lokusunda; yüksek heterozigotluk ve fazla allel (Ho: 0,930, n:16) belirlenmesine karşın, 0.049'lık PI değeri ile tanımlama olasılığının düşük olduğu tespit edilmiştir. (Çizelge 4.3.). Bulgularımız, 68 genotipte 15 allel ve 0.960 heterozigotluk (Ho) tespit eden Garkava-Gustavson *et al.* (2008) ile uyumlu bulunmuştur. Benzer şekilde CH01f02 (PI: 0.040), CH02b10 (PI: 0.027), CH02c06 (PI: 0.021) ve CH05e03 (PI: 0.041) lokuslarında PI değerleri 0.05 den düşük olduğu gözlenmiştir. Diğer taraftan; elmada tanımlama olasılığı yüksek bir lokusun heterozigotluk derecesinin 41-83% (ortalama; 70%) arasında değişebileceği beklenmektedir (Galli *et al.* 2005). Dolayısıyla bu lokuslardaki yüksek heterozigotluk oranının, popülasyondaki ayırım gücünü azalttığı düşünülmektedir.

CH02c06 lokusunda 17 allel tespit edilirken, Garkava-Gustavson *et al.* (2008), tarafından da bu lokusta yüksek sayıda allel (15 allele) tespit edilmiştir. Araştırmada COL lokusunun allel verileri(10 allel) Guarino *et al.* (2006) (7allel), Garkava-Gustavson *et al.* (2008) (10 allel) ve Pereira-Lorenzo *et al.* (2008) (10 allel) ya göre benzer bulunurken, heterozigotluk oranı da Guarino *et al.* (2006) ve Pereira-Lorenzo *et al.* (2008) değerlerine benzer şekilde düşük bulunmuştur. CH03g07 lokusunun allel sayısı (9 allel) ve heterozigotluk oranı

(H_o : 0.720) ise; 66 İspanya çeşidinde (Pereira-Lorenzo *et al.* 2008) gerçekleştirilen analizlerle uyumlu bulunmuştur (Çizelge 4.3.).

Diğer SSR lokuslarına ait genetik parametrelerin (allele büyüklükleri etc.) elmada yürütülen araştırma sonuçları ile düşük benzerlik göstermesi, coğrafik dolayısıyla genotip farklılığından kaynaklanabileceği gibi analiz edilen çeşit sayısından da kaynaklanabilir.

CH01d08, CH02d11, CH02d12 ve CH02f06 dışındaki lokuslarda null allel frekansları pozitif bulunmuştur. H_e nin H_o dan yüksek olduğu durumlarda null allel frekansının pozitif olduğu görülmektedir. Daha önce yayınlanan verilere göre de, COL (Pereira-Lorenzo *et al.* 2008; Guarino *et al.* 2006; Garkava-Gustavson *et al.* 2008) ve CH03g07 (Pereira-Lorenzo *et al.* 2008) H_e nin yüksek olduğu elma lokusları rapor edilmiştir. Onüç lokusta H_e nin H_o dan yüksek olmasına sebep olarak allel frekanslarının popülasyonda eşit dağılım göstermemesi, P_I değerini etkileyerek, null allel frekansını değiştirmektedir. Ancak, null allel değerlerinin düşük olması, null allel varlığı şüphesini gidermektedir.

Bu çalışmada; referans çeşitlerin olarak kullanılan “Golden Delicious” ve “Florina” allel verileri Liebhard *et al.* (2002), Galli *et al.* (2005), Guarino *et al.* (2006), Garkava-Gustavson *et al.* (2008) sonuçları ile karşılaştırıldığında; allel büyüklüklerinin 4 bp farka kadar artıp azaldığı ancak her bir lokustaki alleller arası farkın değişmediği ve korunduğu görülmektedir. Bu durum ise sonuçlarımızın uluslar arası elma SSR verileri ile karşılaştırma olanağı sunmaktadır.

Araştırmada kullanılan elma genotipleri diploid olmalarına rağmen bazı genotiplerde tri-alleliğe rastlanmıştır (Çizelge 4.2.). Elma ile ilgili yapılan diğer çalışmalarda da diploid genotiplerde ikiden fazla allel varlığı görülmektedir (Liebhard *et al.* 2002; Galli *et al.* 2005; Guarino *et al.* 2006; Garkava-Gustavson *et al.* 2008). Bu konuda elma ile ilgili bir çalışma yapılmamakla birlikte, üzümde yapılan bir SSR temelli çalışmada diploid genotiplerde üçlü alleller rapor edilmiş ve buna sebep olarak kimerizm varlığı gösterilmiştir (Vouillamoz *et al.* 2006). Yapılan diğer bir çalışmada; üzümde meristem yapısında periklinal kimerizm olduğu rapor edilmiştir. Somatik mutasyon sonucunda yaprak üst ve alt dokusunda genetik olarak farklı hücre tabakaları oluştuğu ve microsatellit bölgelerinde meydana gelen mutasyona sebep olarak, replikasyon sırasında DNA polimeraz kayması nedeniyle meydana gelebileceği rapor edilmiştir (Martinez *et al.* 2006).

5.2. Genotip-SSR İlişkilendirmeleri

Homonim olarak tespit edilen graplardan Tokat grubu, kendi içinde oldukça düşük benzerlik oranları göstermiştir. Bu grupta; en yüksek benzerlik, %33 lük değerle Tokat4(19)-Tokat1(17) çeşitleri arasında gözlenmiştir. Bu durum Tokat grubundaki elmaların, kendi aralarında bir grup olarak değerlendirilemeyecek kadar düşük benzerlikler göstererek diğer çeşitlere daha yüksek oranla yakınlık göstermeleri her birinin farklı çeşitler olabileceğini göstermektedir. Demir grubu elmalarında Demir(2562)(7)-Demir(9) arasında çalışmadaki en yüksek benzerlik oranı (%94) gözlenirken, Demir(2514) çeşidin diğer Demir grubu elmalarına olan düşük benzerliği (ortalama % 25) dikkat çekmektedir. Tavşanbaşı grubu elmaları kendi içlerinde düşük benzerlik göstermiştir. Bu gruptaki en yüksek benzerlik oranı, %38 lik değerle Yaz Tavşanbaşı(14) ile Mayhoş Tavşanbaşı(15) ve Yaz Tavşanbaşı(14) ile Tatlı Tavşanbaşı(16) çeşitleri arasında görülmektedir. Bu grupta yer alan çeşitlerin de birbirlerinden genetik olarak uzak çeşitler oldukları görülmektedir. Yaz elması grubunda % 77 lik değerle Yaz elması(2384)(20) ile Yaz elması(2563) çeşitleri arasındaki benzerlik en yüksek benzerlik derecesidir. Bu grupta Yaz elması(2384)(20) ile 42-A-1(Yaz elması)(23) ve Yaz elması(2563)(22) ile 42-A-1(Yaz elması)(23) çeşitlerinin birbirlerine sırasıyla %0.9 ve %0.6 değerdeki benzerlikleri yine dikkat çeken diğer bir farklılıktır. Bu fark, aynı grup içerisinde adlandırılmayacak kadar büyük olması sebebiyle, isimlendirmede bir yanılgı olduğunu göstermektedir (Çizelge 4.5.).

Çalışmada kullanılan Demir grubu elmalarının kendi içlerindeki benzerlik oranlarının diğer gruplara göre daha yüksek olmasının nedeni, yakın coğrafik bölgelerden alınması olarak gösterilebilir.

Çalışmada referans olarak kullanılan iki yabancı çeşidin, yerli çeşitlere olan uzaklığı dikkat çekmektedir. Golden Delicious çeşidine en yakın benzerlik gösteren çeşit Yaz elması(2384) (%38), en uzak benzerlik gösteren çeşit Yaz Tavşanbaşı(14) (%0.3) olurken, Florina çeşidine en yakın benzerlik gösteren çeşit Batum(6) (%44), en uzak benzerlik gösteren çeşitler ise Yaz Tavşanbaşı(14) ve Mayhoş Tavşanbaşı(15) (%0.9) olarak belirlenmiştir. Bizim genotiplerimiz arasında gözlenen düşük benzerlik değerlerinin, referans çeşitlere olan benzerliklere oranla daha az olması ve homonim grupların varlığı, gen kaynaklarımızın zenginliğini ispatlamakla beraber çok eski zamanlardan bu yana doğal olarak meydana gelen bir gen akışının göstergesi olabilir.

Sonuç olarak; elde edilen bulgular ileride yapılacak elma gen kaynaklarının değerlendirilmesi, ıslahı ve yetiştiriciliği gibi tarımsal ve genetik çalışmalara yardımcı olacaktır. Ayrıca elde edilen bulgular, konuda ülkemiz araştırcılarının karşılaştırma yapabilecekleri n bilgi niteliği taşımaktadır.

KAYNAKLAR

- Anonim 2006. <http://www.fao.org>. FAO Statistical Databases, Agriculture, Agriculture and Food Trade, Apple Export in The World.
- Anonim 2007. <http://www.fao.org>. FAO Statistical Databases, Agriculture, Agriculture and Food Trade, Apple Export in The World.
- Ayanoğlu, H., Bayazıt, S., İnan G., Bakır, M., Akpınar, A.E., Kazan, K., and Ergül, A. 2007. AFLP and Morphological Analyses of Genetic Diversity in Turkish Green Plum Accessions (*Prunus cerasifera* L.) Adapted to the Mediterranean Region. *Scientia Horticulturae*, 114: 263-267
- Bayazıt,S., Kazan, K., Gülbitti, S., Cevik, V., Ayanoğlu, H., Ergül, A. 2007. AFLP analysis of genetic diversity in low chill requiring walnut (*Juglans regia* L.) genotypes from Hatay,Turkey” *Scientia Horticulturae* 111: 394–398.
- Decroocq V., Fave M.G., Hagen G., Bordenave L., Decroocq S. 2003. Development and transferability of apricot and grape EST microsatellite markers across taxa, *Theor Appl Genet*, 106: 912-922.
- Dirlewanger E., Cosson P., Tavaud M., Aranzana M.J., Poizat C., Zanetto A., Arus P., Laigret F. 2003. Development of microsatellite markers in peach (*Prunus persica* L.) and their uses in genetic diversity analysis in peach and sweet cherry (*Prunus avium* L.), *Theor Appl Genet* 105: 127-138 .
- Dunemann, F., Kahnau R., and Schmidt H. 1994. Genetic relationships in *Malus* evaluated by RAPD ‘fingerprinting’ of cultivars and wild species. *Plant Breeding*, 113: 150–159.
- Galli, Z., Halász, G., Kiss, E., Heszky, L., and Dobránszki, J. 2005. Molecular identification of commercial apple cultivars with microsatellite markers. *HortScience*, 40: 1974-1977.
- Gardiner, S.E., Bassett, H.C.M., Madie, C., and Noiton, D.A.M. 1996. Isozyme, random amplified polymorphic DNA (RAPD), restriction fragment-length polymorphism (RFLP) markers to deduce a putative parent for the ‘Braeburn’ apple. *J Am Soc Hort Sci*. 121: 996–1001.
- Garkava-Gustavsson L., Kolodinska Brantestam A., Sehic J., and Nybom H. 2008. Molecular characterisation of indigenous Swedish apple cultivars based on SSR and S-allele analysis. *Hereditas*, 145: 99-112

- Gianfranceschi, L., Seglias, N., Tarchini, R., Komjanc, M., Gessler, C. 1998. Simple sequence repeats for the genetic analysis of apple. *Theor. Appl. Genet.* 96: 1069-1076.
- Goulao, L., Oliveira, C. M. 2001. Molecular characterisation of cultivars of apple (*Malus-domestica* Borkh.) using microsatellite (SSR and ISSR) markers. *Euphytica* 122: 81-89.
- Goulão, L., Cabrita, L., Oliveira, C.M., Leitão, J.M. 2001. Comparing RAPD and AFLP analysis in discrimination and estimation of genetic similarities among apple (*Malus domestica* Borkh.) cultivars. *Euphytica*, 199, 259–270.
- Guarino, C., Santoro, S., De Simone, L., Lain, O., Cipriani, G., and Testolin, R. 2006. Genetic diversity in a collection of ancient cultivars of apple (*Malus-domestica* Borkh.) as revealed by SSR-based fingerprinting. *J. Hort. Sci. Biotechnol.* 81: 39-44.
- Guilford, P., Prakash, S., Zhu, J.M., Rikkerink, E., Gardiner, S., Bassett, H., and Forster, R. 1997. Microsatellites in *Malus×domestica* (apple): abundance, polymorphism and cultivar identification. *Theor. Appl. Genet.* 94:249–254.
- Harada, T., Matsukawa, K., Sato, T., Ishikawa, R., Niizeki, M., and Saito, K. 1993. DNA-RAPD detect genetic variation and paternity in *Malus*. *Euphytica*, 65: 87–91.
- Harris, S. A. Robinson, J.P., Juniper, B.E. 2002. Genetic clues to the origin of the apple. *Trends in Genetics.* 18: 426-430.
- Hokanson, S.C., Lamboy, W.F., Szewc-McFadden, A.K., McFerson, J.R. 2002. Microsatellite (SSR) variation in a collection of *Malus* apple species and hybrids. *Euphytica* 118: 281-294.
- Laurens, F., Durel, C. E., Lascostes, M. 2004: Molecular characterization of French local apple cultivars using SSRs. *Acta Hort.* 663:639-642.
- 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 Tuallynally, Ireland. *Silvae Genetica* 47: 5-6.
- Liebhart, R., Gianfranceschi, L., Koller, B., Ryder, C.D., Tarchini, R., van de Weg, E., Gessler, C. 2002. Development and characterisation of 140 new microsatellites in apple (*Malus domestica* Borkh.). *Mol Breed* 10:217–241.
- Litt, M. and Luty, J.A. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am J Hum Genet.*, 44: 397-401.

- Luby, J.J. 2003. Taxonomic classification and brief history. In: Ferree DC, Warrington I.J (eds) *Apple: botany production and uses*. CABI, Cambridge, pp 1-14
- Martínez, L.E., Cavagnaro, P.F., Masuelli, R.W., and Zuñiga, M. 2006. SSR-based assessment of genetic diversity in South American *Vitis vinifera* varieties. *Plant Sci.* 170: 1036–1044.
- 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.
- Oraguzie, N. C., Yamamoto, T., Soejima, J., Suzuki T., De Silva, H.N. 2005. DNA fingerprinting of apple (*Malus* spp.) rootstocks using Simple Sequence Repeats. *Plant Breed.* 124: 197-202.
- Özbek, S. 1978. Özel Meyvecilik (Kışın Yaprağını Döken Meyve Türleri). Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Yayınları, No: 128, Ders kitabı: 11, Adana.
- Özçağiran, R., Ünal, A., Özeker, E., İsfendiyaroğlu, M. 2004. İliman İklim Meyve Türleri (Yumuşak Çekirdekli Meyveler). Cilt:2, E.Ü. Ziraat Fakültesi Yayınları, No: 556, Bornova/İzmir.
- Pereira-Lorenzo, S., Ramos-Cabrera, A.M., and Díaz-Hernández, M.B. 2008. Genetic assessment of local apple cultivars from La Palma, Spain, using simple sequence repeats (SSRs) *Scientia Horticulturae*, 117: 160-166.
- Schlotterer, C. and Tautz, D. 1992. Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Res*: 20: 211-215.
- Scott K.D. 2001. Microsatellites Derived from ETSSs, and Their Comparison with those Derived by Other Methods. In: *Plant Genotyping: the DNA Fingerprinting of Plants* (ed: R.J. Henry). CABI International, UK., 225-237.
- Silfverberg-Dilworth, E., Matasci, C.L., Van de Weg, W.E., Van Kaauwen, M.P.W., Walser, M., Kodde, L.P., Soglio, V., Gianfranceschi, L., Durel C-E., Costa, F., Yamamoto, T., Koller, B., Gessler, C., Patocchi, A. 2006. Microsatellite markers spanning the apple (*Malus-domestica* Borkh.) genome. *Tree Genet. Genomics* 2: 202-224.
- Şelli, F., Bakır, M., İnan, G., Aygün, H., Boz, Y., Yaşasın, A.S., Özer, C., Akman, B., Söylemezoğlu, G., Kazan, K., and Ergül, A. 2007. Simple sequence repeat-based assessment of genetic diversity in Dimrit and Gemre grapevine accessions from Turkey. *Vitis*, 46(4):182-187.

- Vouillamoz, J.F., McGovern, P.E., Ergul, A., Söylemezoğlu, G., Tevzadze, G., Meredith, C.P., and Grando, M. S. 2006. Genetic characterization and relationships of traditional grape cultivars from Transcaucasia and Anatolia. *Plant Genetic Resources: Characterization & Utilization*, 4(2): 144-158.
- Wagner, H. W., Sefc, K. M. 1999. *Identity 1.0*. Centre for Applied Genetics, University of Agricultural Science, Vienna.
- Watillon, B., Druart P., Du Jardin, P., Kettmann, R., Boxus, P., and Burny, A. 1991. Use of a random cDNA probes to detect restriction fragment length polymorphisms among apple clones. *Sci. Horticulturae*, 46: 235–243.
- Weber, J.L., and May, P.E. 1989. Abundant class of human DNA polimorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am. J. Hum. Genet.*, (44);388-396
- Yıkar, E. 2003. Elma. *Tarımsal Ekonomi Araştırma Enstitüsü Yayınları*, T.E.A.E-Bakış, Sayı 4, Nühsa 7.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Ali Emre AKPINAR

Doğum Yeri : Ankara

Doğum Tarihi : 21.09.1983

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Selçuk Anadolu Lisesi, Sivas (1994-2001)

Lisans: Cumhuriyet Üniversitesi Fen- Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, Sivas (2001-2005)

Yüksek Lisans: Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü- Temel Biyoteknoloji (2007-)

Çalıştığı Kurum ve Yıl:

Cumhuriyet Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü(Araştırma Görevlisi) (2006)

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü (Araştırma Görevlisi) (2007-)

Yayınları (SCI):

Ayanoğlu,H., S. Bayazıt, G. İnan, M. Bakır, A. E. Akpınar, K. Kazan, A. Ergül. 2207.AFLP Analyses of Genetic Diversity in Turkish Green Plum Accessions (*Prunus cerasifera* L.) Adapted to the Mediterranean Region. *Scientia Horticulturae* 114 263-267

Mehmet Ali AKPINAR, Salih GÖRGÜN, Ali Emre AKPINAR. 2009. A Comparative Analysis of The Fatty Acid Profiles In The Liver and Muscles of Male and Female *Salmo Trutta Macrostigma*. *Food Chemistry* 112 6-8

Dumanoğlu H., Güneş N. T., Aygün A., Şan B., Akpınar A. E. Bakır M. 2009. Evaluation of the Diversity of Quince (*Cydonia oblonga* Mill.) Cultivar ‘Kalecik’ based on Fruit Characteristics an Microsatellite Analyses. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 2009, Vol. 37: 113–120