

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOKTORA TEZİ**

**MOLEKÜLER MARKÖRLERİN BAĞCILIKTA KÜLLEME VE MİLDİYÖ  
HASTALIKLARINA DAYANIKLI ÇEŞİT ISLAHINDA, MARKÖRE DAYALI  
SELEKSİYON (MARKER ASSISTED SELECTION-MAS) AMAÇLI  
KULLANILMASI**

**Mina SHİDFAR**

**BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI**

**ANKARA**

**2014**

**Her hakkı saklıdır**

## **ETİK**

Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

24.06.2014

Mina SHİDFAR

## ÖZET

Doktora Tezi

MOLEKÜLER MARKÖRLERİN BAĞCILIKTA KÜLLEME VE MİLDİYÖ HASTALIKLARINA DAYANIKLI ÇEŞİT ISLAHINDA, MARKÖRE DAYALI SELEKSİYON (MARKER ASSISTED SELECTION-MAS) AMAÇLI KULLANILMASI

Mina SHİDFAR

Ankara Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Gökhan SÖYLEMEZOĞLU

“Bağcılıkta Külleme ve Mildiyö Hastalıklarına Dayanıklı Çeşit Islahında, Marköre Dayalı Seleksiyon (MAS) Kullanılması” konulu bu doktora çalışması, Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Kalecik Bağcılık Araştırma ve Uygulama istasyonu ve Bak şarapçılığa ait Kalecik’teki bağlar ile Bahçe Bitkileri Bölümü, Moleküler Biyoloji ve Ankara Üniversitesi Bioteknoloji Enstitüsü laboratuvarında 2010-2012 yılları arasında gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada Regent (dayanıklı) × Boğazkere (dayanıksız) ve Regent (dayanıklı) × Kalecik Karası (dayanıksız) üzüm çeşitlerinin melezlenmesi yoluyla elde edilen F1 bitkilerinde, moleküler markörleri kullanarak külleme ve mildiyö hastalığına dayanımlarının incelenmesi amaçlanmıştır. Çalışmada kodominant markörlerden SSR (VMC8g9, UDV-15, VMC7F2, VMCNG2F12 ve UDV-305, VMC1g3.2), SCAR markörlerinden (ScoRA7, ScoRN3-32 ve ScoR A14) ve CAPS markörü GLP1-12’den faydalanılmıştır. Çalışmada, F1 populasyonlarından seçilen 168 adet (BR) ve 25 adet (KR) bitki üzerinde analizler gerçekleştirilmiştir. Araştırmada SSR primerlerine ait amplifikasyon ürünleri, CEQ 8800 DNA kapiller dizi analiz cihazında elektroforez edilmiş ve elde edilen pikler incelenmiştir. Marköre dayalı seleksiyon (MDS) yöntemi kullanılan bu çalışmada, toplam 168 F1 (BR) genotiplerinde, SSR markörleri sonucunda (UDV-305, UDV-15) toplam 27 adet bitkide ortak dayanıklılık alleli bulunmuştur. 168 F1 bitkisi üzerinde yapılan ScoRA7-760, ScoRA14 ile analizler sonunda, toplam 17 adet bitkide ortak dayanıklılık alleli bulunmuştur. Yapılan SSR ve SCAR analizleri sonucunda toplam 2 adet ortak F1 dayanıklılık alleli bulunmuştur. KR F1 populasyonunda seçilen 25 adet F1 bitkide toplam genotiplerinde, SSR markörleri sonucunda (UDV-305, UDV-15) toplam 2 adet bitkide ortak dayanıklılık alleli bulunmuştur. 25 adet F1 bitkisi üzerinde yapılan ScoRA7-760, ScoRA14 ve SSR ile analizler sonunda, toplam 1 adet bitkide ortak dayanıklılık alleli bulunmuştur.

**Haziran 2014, 163 sayfa**

**Anahtar Kelimeler:** *Vitis vinifera* L., SSR, CAPS, SCAR, Külleme, Mildiyö, MAS.

## ABSTRACT

Ph.D. Thesis

USE OF MOLECULAR MARKERS FOR DEVELOPING NEW CULTIVARS  
TOLERANT TO *PLASMOPARA VITICOLA* AND (*erysiphe- uncinula necator*)  
DISEASES BASED ON MARKER ASSISTED SELECTION-(MAS) ON *VITIS*  
*VINIFERA*

Mina SHIDFAR

Ankara University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Horticulture

Supervisor: Prof.Dr. Gökhan SÖYLEMEZOĞLU

This research was performed at Ankara University, Faculty of Agriculture, experimental field at Kalecik, BAK and laboratories of Department of Horticulture from 2010 until 2012. The aim of the current thesis is to establish the resistance of F1 population grape varieties to the fungal (Powdery and Downy mildew) diseases. The grape varieties developed by crossbreeding of Regent × Boğazkere (BR) and Regent × Kalecik Karası (KR) (*Vitis vinifera* L.) in which they were used as a paternal and maternal cultivars for the first time in Turkey. 168 of (BR) F1 and 25 of (KR) progenies were screened. This screening was performed for the powdery and downy mildew diseases by 6 SSR (Simple Sequence Repeat)-markers (VMC8g9, UDV-15, VMC1g3.2, VMCNG2f12, VMC7F2, UDV-305), 3 SCAR-markers (ScoRA7, ScoRN3-32 and ScoR A14) and 1 CAPS (GLP1-12) primer. In this study, Marker Assisted Selection (MAS) technique was carried out on 168 (BR) and 25 (KR) F1 populations. Amplification products relative to SSR primers analysed in the CEQ 8800 DNA capillary electrophoresis and the peaks of samples were examined. The application of marker assisted selection for the fungus resistance related markers leads to a pyramiding of resistance progenies. Taking into account both mildew diseases, genotypic screening led to 27 BR individuals which were totally common between SSR (UDV 15 and UDV305) primers and 17 BR progenies were common between SCAR (ScoRA7, ScoRA14) primers. By using marker assisted selection (MAS), just two BR genotypes could be identified as a resistance between UDV 15, UDV305, ScoRA7 and ScoRA14) primers. Inside 25 F1 KR population 5 progenies were common between SSR (UDV 15 and UDV305) markers, 2 were common between SCAR (ScoRA7, ScoRA14) markers and just 1 genotype was common between these four markers.

**June 2014, 163 pages**

**Key Words :** *Vitis vinifera* L., SSR, CAPS, SCAR, Powdery, downy mildew, MAS.

## TEŞEKKÜR

Türkiye’de bulunduğum Yüksek lisans ve Doktora öğrenimimin her aşamasında, çalışmamın planlanmasında, yürütülmesinde, yönlendirilmesinde, öneri ve yardımlarını esirgemeyerek akademik ortamda engin fikirleri ile hem ilmi hem de insani olarak tüm zenginliği ile bana kattığı değerlerden ve hiç bitmeyeceğini hissettirdiği desteğinden dolayı Sayın Prof. Dr. Gökhan SÖYLEMEZOĞLU (Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölüm Başkanı), hocama yürekten teşekkürlerimi sunuyorum.

Türkiye çapında biyoteknoloji konusunda çok önemli ve değerli çalışmalarda bulunan ve moleküler araştırmalarım sırasında gerek laboratuvar aşamasında gerekse bilgi ve tecrübesiyle bana yol gösteren ve zaman ayıran, sayın Prof. Dr. Ali ERGÜL (Ankara Üniversitesi, Bioteknoloji Bölümü); sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Yine çalışmalarımın başlangıcından bitişine dek bağdaki çalışmalarımın ve laboratuvar aşamasında, her zaman devamlı bilgi, yardım ve desteklerinden dolayı Sayın Doç. Dr. Murat AKKURT (Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü), yürekten teşekkür ediyorum. Tez jüri Komitesi toplantısında bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım Sayın Prof. Dr. Birhan KUNTER ve Sayın Prof. Dr. Cihat TÜRK BEN hocalarıma sonsuz saygılarımı ve teşekkürlerimi sunuyorum.

Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri arkadaşlarım, Asistan arkadaşlarım, personel ve çalışanlarına teşekkür ediyorum.

Tez projemizi finans eden Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi’ne teşekkür ederim.

Hiçbir zaman ödeyemeyeceğim yalnız çalışmalarım süresince değil, belki bütün hayatım boyu uzaktan da olsa hep fedakârlıkları ve maddi, manevi destekleri için, her zaman sevgi, güç ve umut veren, sevgili annem, babam ve kız kardeşlerim Fareeba ve Paria SHİDFAR’a sonsuz teşekkür ederek, şükranlarımı sunuyorum.

Mina SHİDFAR

Ankara, Haziran 2014

## İÇİNDEKİLER

### TEZ ONAY SAYFASI

ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ .....	5
2.1 Asmanın Tarihçesi .....	5
2.2 Dünya ve Türkiye Bağcılığı .....	6
2.3 Asma Islahı ve Tarihçesi .....	8
2.4 Islah Yöntemleri .....	11
2.4.1 Seleksiyon ıslahı .....	11
2.4.2 Melezleme (kombinasyon) ıslahı.....	13
2.4.2.1 Tür içi melezlemeler.....	15
2.4.2.2 Türler arası melezlemeler.....	16
2.4.3 Poliploidi ıslahı.....	18
2.4.4 Homozigot asma ıslahı.....	19
2.4.5 Transgenik çeşit Islah.....	19
2.4.6 Mutasyon ıslahı.....	20
2.5 Asmada Hastalık Etmenleri.....	21
2.5.1 Asmalarda abiotik stres.....	21
2.5.2 Asmalarda biotik stres.....	23
2.5.2.1 Asma zararlıları.....	27
2.5.3 Külleme hastalığının kısaca tanımı.....	28
2.5.3.1 Bağda külleme hastalığı.....	29
2.5.4 Bağ mildiyözü.....	31
2.6 Moleküler Markörlerin Tarihçesi.....	32

2.6.1 Bitki ıslah çalışmalarında moleküler markörlerin önemi ve avantajları.....	33
2.6.2 Moleküler markörlerin uygulama alanları .....	35
2.7 Moleküler Markör Teknikler .....	36
2.7.1 Morfolojik markörler .....	36
2.7.2 Protein markörler (İzoenzimler) .....	36
2.7.3 DNA markörler.....	37
2.7.3.1 RFLP tekniği.....	37
2.7.3.2 PCR'a dayalı DNA markörler .....	38
2.7.3.2.1 RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) tekniği.....	39
2.7.3.2.2 AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) tekniği.....	40
2.7.3.2.3 SSRs (Simple Sequence Repeats) tekniği.....	41
2.7.3.2.4 Organel Mikrosatellitleri (cpSSR, mtSSR).....	43
2.7.3.2.5 ISSR (Inter- Simple Sequence Repeats) tekniği.....	43
2.7.3.2.6 SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) tekniği.....	44
2.7.3.2.7 CAPS (Cleaved Amplified Polimorphic Sequence) tekniği .....	45
2.7.3.2.8 SNP (Single/simple Nükleotit Polimorfizm) tekniği.....	46
2.7.3.2.9 SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) tekniği.....	47
2.7.3.2.10 EST (Expressed Sequence Tag) tekniği.....	48
2.8 MAS ve Bitki Islahındaki Uygulama Alanları .....	49
2.9 Genetik Linkage (bağlantı) Kavramı.....	52
2.9.1 Genetik bağlantı haritalama ve harita birimi.....	53
2.9.2 Kantitatif özellik lokuslar (QTL).....	54
2.10 Külleme ve Mildiyö Hastalığına Karşı Dayanıklılık Islahında Yapılan Çalışmalar .....	56
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	79
3.1 Materyal (Çeşitlerin Kısaca Tanıtımı).....	79
3.1.1 Regent çeşidinin özellikleri (Baba ebeveyn olarak kullanılan).....	80
3.1.2 Boğazkere çeşidinin özellikleri .....	81
3.1.3 Kalecik Karası çeşidinin özellikleri .....	82
3.2 Gereç ve Yöntem.....	83
3.2.1 Babalık çeşitten çiçek tozlarının izole edilerek alınması.....	83
3.2.1.1 Ana çeşitlerde salkımların izole edilmesi.....	84

3.2.1.2 Analık çeşitlere ait salkımların kastrasyonu ve kastre edilmiş salkımların izolasyonu.....	85
3.2.1.3 Salkımların tozlanması ve tozlanan salkımların izolasyonu.....	86
3.2.1.4 Melez salkımlarda tane tutumunun takibi ve salkımların etiketlenmesi....	87
3.2.1.5 Melez salkımlarda olgunluğun takibi.....	88
3.2.1.6 Melezlenen salkımların hasadı ve çekirdeklerin çıkartılması.....	88
3.2.1.7 Hibrit tohumların katlanması.....	89
3.2.1.8 Hibrit tohumların katlamadan çıkarılması.....	90
3.2.1.9 Hibrit tohumların çimlendirilmesi.....	91
3.2.1.10 F1 Bitkilerinin şaşırtılması.....	92
3.2.1.11 F1 Bitkilerinden yaprak örneklerinin toplanması ve muhafazası.....	94
3.3 DNA izolasyonu.....	94
3.3.1 İzole edilen DNA'ların agaroz jel'de görüntülenmesi.....	96
3.3.2 Örneklerin jele yüklenmesi.....	97
3.3.3 DNA Miktar ve saflık ölçümleri.....	98
3.3.4 PCR Analizleri.....	98
3.3.5 PCR ürünlerinin görüntülenmesi.....	99
3.3.6 PCR Ürünlerinin jele yüklenmesi.....	100
3.3.7 PCR çoğaltım ürünlerinin görüntülenmesi ve kapiller elektroforezde allel verilerinin görüntülenmesi.....	100
4.ARAŞTIRMA BULGULARI.....	102
4.1 Melezleme ıslah çalışmaları .....	102
4.2 Marköre Dayalı Seleksiyon.....	103
4.2.1 DNA izolasyonu ve nanodrop sonuçları.....	103
4.2.2 PCR Uygulamaları .....	108
4.2.3 Genetik analizler .....	112
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	122
5.1 Dayanıklılıkla ilişkili SCAR ve CAPS markörlerin MDS analizlerin değerlendirilmesi.....	123



<b>5.2 Dayanıklılıkla ilişkili olarak seçilen SSR markörlerin MDS amaçlı değerlendirilmesi.....</b>	<b>127</b>
<b>5.2.1 UDV-15.....</b>	<b>127</b>
<b>5.2.2 VMC8G9.....</b>	<b>128</b>
<b>5.2.3 VMCNG2F12.....</b>	<b>129</b>
<b>5.2.4 VMC1g3.2.....</b>	<b>130</b>
<b>5.2.5 UDV 305 .....</b>	<b>131</b>
<b>5.2.6 VMC7F2.....</b>	<b>132</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>136</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>159</b>

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
BR	Boğazkere × Regent
BC	Backcross
BSA	Bulked Segregant Analysis
CAPS	Cleaved Amplified Polymorphic Sequence
CTAB	Hekzadesil Trimetil-Amonyum Bromür
cM	CentiMorgan
cDNA	cloned DNA
dNTP	Deoksi-Nüklozid trifosfat
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
EB	Ethidium Bromide
EDTA	Etilen Diamine Tetra Asetik Asit
EMS	Ethyl methane sulphonate
FAO	Food and Agriculture Organization
ISSR	Inter Simple Sequence Repeat
KR	Kalecik karası × Regent
LOD	Maximum Likelihood Odds Value
MAS	Marker Assisted Selection
MDS	Marköre Dayalı Seleksiyon
Mbp	Mega base pair
MgCl <sub>2</sub>	Magnezyum Klorür
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimol
M	Mol
µl	Mikrolitre
ng	Nanogram
OIV	Organisation Internationale de la Vigne et du Vin (Uluslararası Bağcılık ve Şarapçılık Organizasyonu)
PAGE	Poliakrilamid Jel Elektroforez

PCR	Polymerase Chain Reaction
PVPP	Polyvinylpolypyrrolidone
QTL	Quantitative Trait Locus / Loci
rpm	Dakikada Dönüş Sayısı
RAPD	Random Amplified Polymorphism DNA
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
Ren	Resistance <i>erysiphe necator</i>
Rpv	Resistance <i>plasmopora viticola</i>
Run	Resistance <i>uncinula necator</i>
RGA	Resistance Gene Analogs
RNase	Ribonükleaz
RNA	Ribonükleik asit
SCAR	Sequence Characterized Amplified Region
SNP	Single/simple Nükleotit Polimorfizm
SSCP	Single Strand Comformation Polymorphism
SSR	Simple Sequence Repeat (Basit dizi tekrarları)
STS	Sequence Tagged Sites
TBE	Tris-Borik Asit- EDTA Çözeltisi
TE	Tris-EDTA Çözeltisi
VMC	Vitis Microsatellite Consortium
VNTR	Variable Number Tandem Repeats (Farklı basit dizi tekrarları)

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Bağda görülen külleme hastalığının salkımda ve yapraktaki görünümü.....	30
Şekil 2.2 Bağda görülen mildiyö hastalığının salkımda ve yapraktaki görünümü .....	31
Şekil 3.1 Regent üzüm çeşidinin soy ağacı.....	80
Şekil 3.2 Regent çeşidine ait salkımın görünümü.....	81
Şekil 3.3 Boğazkere üzüm çeşidine ait omcanın görünümü.....	81
Şekil 3.4 Kalecik karası üzüm çeşidine ait salkım görünümü.....	82
Şekil 3.5 ‘Regent’ üzüm çeşidine ait kese içerisinde izole edilmiş ait görüntü.....	84
Şekil 3.6 Üzerinde çalışılan ana çeşitlerde çiçekler açılmadan önce parşomen kese kâğıtlarına alınarak izole edilmesi.....	84
Şekil 3.7 Ana çeşite ait salkımda taç halkası (korolla) ve (stamen)’lerin kesilip atılmasına ait görüntü.....	85
Şekil 3.8 Boğazkere üzüm çeşidinde kastrasyon işlemi tamamlanmış bir salkımın görünümü.....	86
Şekil 3.9 Kastrasyon sonrası parşomen kese kâğıdı ile izole edilmiş Kalecik Karası salkımın deneme omcası üzerindeki görünümü.....	86
Şekil 3.10 Tane tutumundan sonra keseden çıkarılmış Boğazkere çeşidine ait salkım görünümü.....	87
Şekil 3.11 Melez salkımın, kese çıkartıldıktan sonra etiketlenmiş görünümü.....	87
Şekil 3.12 Olgunluk takibi yapılan “Boğazkere x Regent” melezlemesine ait bir hibrit salkımın omca üzerindeki görünümü.....	88
Şekil 3.13 Hasat edilen melezleme ürünü salkım görünümü.....	89
Şekil 3.14 Hasat edilen salkımlardan hibrit çekirdeklerin çıkartılmasına ait görüntü.....	89
Şekil 3.15 Nemli dere kumu içerisinde katlamaya alınan hibrit tohumların görünümü.....	90
Şekil 3.16 Tohumların katlama işleminin gerçekleştirildiği inkübatörler içerisindeki görünümü.....	90

Şekil 3.17 Boğazkere x Regent melezleme kombinasyonuna ait hibrit tohumların katlamadan sonra kumdan arındırılmaları.....	91
Şekil 3.18 F1 hibrit tohumlarının viyollere ekim işlemine ait görüntü.....	91
Şekil 3.19 Regent x Boğazkere kombinasyonuna ait bitkilerin köklendirme serasındaki görünümü.....	92
Şekil 3.20 Hibrit bitkilerin plastik saksılara şaşırtma işleminin görüntüsü.....	93
Şekil 3.21 Şaşırtılan bitkilerin köklendirme serasındaki görüntüsü.....	93
Şekil 3.22 Köklendirme serasında hibrit F1 bitkilerinin etiketlenmesine ait görüntü.....	93
Şekil 3.23 F1 bitkilerinin sürgün ucundan ilk üç genç yaprağın analiz için alınması.....	94
Şekil 3.24 Havanda sıvı azot ile yaprak örneklerinin DNA ekstraksiyonu amacıyla öğütülmesine ait görünümü.....	96
Şekil 3.25 Polimerize olması için çeker ocak altında bekletilen agaroz jelin görünümü.....	97
Şekil 3.26 Örneklerin agaroz jele yüklenmesine ait görünümü.....	97
Şekil 4.1 “Boğazkere × Regent” F1 bitkilerde izole edilen DNA’ların görünümü.....	103
Şekil 4.2 BR popülasyonuna ait GLP1-12 primerine ait PCR ürünlerinin görünümü .....	108
Şekil 4.3 BR popülasyonuna ait F1 bitkilerinin GLP1-12 PCR ürünlerin <i>EcoR1</i> enzimi ile kesilm sonrası bant görüntüleri .....	108
Şekil 4.4 BR popülasyonuna ait F1 bitkilerde ScORA7-760 primerinin PCR görünümü.....	109
Şekil 4.5 BR popülasyonuna ait F1 bitkilerde ScORN3-32 primerinin PCR görünümü .....	109
Şekil 4.6 BR popülasyonuna ait F1 bitkilerde ScORA14 primerinin PCR görünümü .....	110
Şekil 4.7 BR popülasyonuna ait F1 bitkilerde VMC8g9 primerinin PCR görünümü .....	110
Şekil 4.8 BR popülasyonuna ait F1 bitkilerde VMC7f2 Primerinin PCR görünümü .....	111
Şekil 4.9 BR popülasyonuna ait F1 bitkilerde UDV-15 Primerinin PCR görünümü .....	111

Şekil 4.10 BR populasyonuna ait F1 bitkilerde UDV-305 Primerinin PCR görünümü .....	111
Şekil 4.11 BR populasyonuna ait F1 bitkilerde VMC1g3.2 Primerin PCR görünümü .....	112
Şekil 4.12 BR populasyonuna ait F1 bitkilerde VMCNG2f12 primerinin PCR görünümü .....	112
Şekil 5.1 Boğazkere × Regent popülasyonunda MDS yöntemi ile külleme ve mildiyöye F1 BR bitkilerinde genotiplerin değerlendirilmesi.....	134
Şekil 5.2 Kalecik Karası × Regent popülasyonunda MDS yöntemi ile külleme ve mildiyöye F1 BR bitkilerinde genotiplerin değerlendirilmesi.....	134

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Dünya’da üzüm üretim miktarı (T) ve bağ alanı (Ha).....	8
Çizelge 2.2 Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü, klon seleksiyonu.....	11
Çizelge2.3 Manisa Bağcılık Araştırma Enstitüsü, klon seleksiyonu.....	12
Çizelge2.4 Alata Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü, klon seleksiyonu.....	12
Çizelge2.5 Erzincan Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü, klon seleksiyonu.....	12
Çizelge2.6 Tekirdağ Bağcılık Araştırma Enstitüsü, klon seleksiyonu.....	12
Çizelge2.7 Malatya Zirai Araştırma Enstitüsü, klon seleksiyonu.....	12
Çizelge2.8 Gaziantep Zirai Araştırma Enstitüsü, klon seleksiyonu.....	13
Çizelge2.9 Yalova Atatürk Bahçe Kültürleri Merkez Araştırma Enstitüsü, klon seleksiyonu.....	13
Çizelge 2.10 Yalova, Manisa Atatürk Bahçe Kültürleri Merkez Araştırma Enstitüsü ve Tekirdağ Bağcılık Araştırma Enstitüsü’nde ıslah edilen sofralık üzüm çeşitlerinin bazı özellikleri .....	14
Çizelge 2.11 Abiotik strese dayanıklı genleri taşıyan asma çeşitleri.....	23
Çizelge 2.12 Biotik strese dayanıklı genleri taşıyan asma çeşitleri .....	26
Çizelge 2.13 Zararlılara dayanıklı genleri taşıyan asma çeşitleri.....	28
Çizelge 2.14 Mildiyö, külemeye dayanıklılık ıslahında, Marköre Dayalı Seleksiyon yardımı ile yapılan çalışmalar yer almaktadır .....	51
Çizelge 3.1 Regent üzüm çeşidine ait özellikler.....	80
Çizelge 3.2 Boğazkere üzüm çeşidinin özellikleri.....	82
Çizelge 3.3 Kalecik Karası üzüm çeşidinin özellikleri.....	83
Çizelge 3.4 Çalışmada kullanılan Markör Teknikleri ve Analizlerde Kullanılacak Primer Sekansları.....	98
Çizelge 4.1 Melezlenen çiçek sayısı ve elde edilen F1 bitki sayısı.....	102
Çizelge 4.2 “Boğazkere x Regent” ve “Kalecik Karası x Regent” kombinasyonundan eldedilen örneklere ait DNA miktar ve saflık ölçümleri.....	102
Çizelge 4.3’de BR ve KR genetik analiz sonuçları.....	113

Çizelge 4.4 “Regent x Boğazkere” melezleme kombinasyonunda (SCAR) markörleri ile elde edilen PCR ürünlerinin allelik dağılımı.....	114
Çizelge 4.5 Regent x Boğazkere melezleme kombinasyonunda (SCAR) markörleri ile elde edilen PCR ürünlerinin allelik dağılımı .....	118
Çizelge 4.6 Regent x Kalecikkarası melezleme kombinasyonunda (SSR) markörleri ile elde edilen PCR ürünlerinin allelik dağılımı .....	120
Çizelge 4.7 Regent x Kalecikkarası melezleme kombinasyonunda (SCAR) markörleri ile elde edilen PCR ürünlerinin allelik dağılımı.....	121



## 1. GİRİŞ

Dünya nüfusunun sürekli artışı, buna karşın dünya üzerindeki tarıma uygun alanların sınırlı oluşu, özellikle geri kalmış ve gelişmekte olan ülkelerde yetersiz beslenme, ciddi bir açlık sorununa neden olmaktadır. Ayrıca erozyon, yeni yerleşim yerlerinin açılması, yeni fabrikalar kurulması, yeni yollar açılması gibi nedenlerle mevcut tarıma elverişli alanlar giderek azalmaktadır. Tüm bunların yanı sıra dünyada her yıl alınan ürünün yaklaşık 1/3'nün hastalık ve zararlılar nedeniyle kaybolması, beslenme problemine önemli bir boyut kazandırmaktadır. Tarımsal faaliyetlerin ana amacı, bitkisel ürünü hastalıkların, zararlıların ve yabancı otların etkilerinden ekonomik ölçüler içinde korumak, ürün kayıplarını en aza indirmek ve kaliteyi yükseltmektir. Asma ürünlerinin verimini kısıtlayan faktörlerin başında gelen hastalık ve zararlılara karşı en etkili ve hızlı çözüm olarak çeşitli tarımsal savaş yöntemleri uygulanmaktadır. Bu yöntemler kültürel, fiziksel, biyolojik, karantina, kimyasal, biyoteknoloji ve moleküler yöntemler olarak sıralanabilir. Her ne kadar modern bitki korumada, entegre savaşın görüşüyle yukarıda sözü edilen yöntemler dengeli ve bilinçli bir biçimde beraberce uygulanmaktaysa da ülkemizde tarımsal savaşın karşılığı hep kimyasal yöntemler olmuştur. Kimyasal yöntemlerin temelini ise, kısaca pestisit adını verdiğimiz tarım ilaçlarının uygulanması oluşturmaktadır. Tarım ilacı olarak genellikle herbisitler, fungusitler ve insektisitler kullanılmaktadır. Bu sorunlar kısaca, insan sağlığına, çevre kirlenmesi, gıdaların güvenli olmaması, hastalık, zararlı ve yabancı otların pestisitlere dayanıklılık kazanması, tarım ürünü dış ticaretimizin etkilenmesi olarak özetlenebilir (Çelen 2001).

Bitki hastalıkları ile kimyasal savaşında fungusitlerin etki mekanizmaları ile mikroorganizmalarda oluşturabilecekleri dayanıklılık arasında önemli bir ilişki vardır. Uygulamada, patojenlerin bir kimyasal maddeye duyarlılıkları azaldıkça etkinlikleri düşmektedir. Bu durum karşısında, yüksek etkililiği yeniden elde edilebilmek amacıyla, dozu yükseltme uygulamasına başlanır. Sonuçta, patojenin fungusitlere hızla dayanıklılık kazanmasına, sorunun çözümsüz hale gelmesine ve kalıntının da giderek yükselmesine yol açmaktadır. Dayanıklılık, bir organizmanın bir fungusite duyarlılığının

giderek azalması ve bu duyarlılık azalışının genetik bir mekanizma ile kontrol edilmesidir (Delen vd. 2005).

Bütün bunları bir araya getirdiğimizde, başta külleme ve mildiyö olmak üzere önemli asma hastalıklarına, karşı dayanıklı üzüm çeşitlerinin geliştirilmesi, sadece çevresel açıdan değil, ayrıca gelecekte yüksek ekonomik içerikler anlamında da önemlidir. Spreysiz yetiştiricilik biyotik ve abiyotik faktörlere yüksek derecede dayanıklı üzüm çeşitlerinin yetiştirilmesini gerektirir. Dayanıklı üzüm yetiştiriciliğinin başında da ıslah çalışmaları gelmektedir. Doğal seleksiyonla ortaya çıkmış bireylerin korunması, bunlardan daha üstün özellikleri taşıyanların ortaya çıkarılması, ya da istenen özelliklerin bir bitkide toplanması ancak belirli ıslah yöntemlerini uygulamakla elde edilebilir. Çok eski çağlardan beri diğer kültür bitkilerinde olduğu gibi, bağcılıkta da ıslah çalışmaları, eski belgelere göre ilk olarak Columella tarafından gerçekleştirilmiştir. M.Ö. 50 yıllarında Columella asmalarda üretimin daima en iyi omcalardan kalem alınarak yapılması gerektiği fikrini savunmuş ve uygulamalarında bu şekilde yapılmasını önermiştir. Bu nedenle Columella bugünkü seleksiyon ıslahının temelini atan kişi olarak tanımlanabilir (Gülcan ve İltter 1975).

Günümüzde standartlar arasında yer alan ve üretimi yapılan üzüm çeşitlerinin çoğu tabi popülasyon içerisinden asma bitkisini kültüre alanlar tarafından seçilmiş ve sonraki nesillere belirli yönde ıslah edilerek aktarılmıştır. Günümüze kadar ulaşan çeşitlerin bir kısmı kontrollü melezlemelerle elde edilirken büyük bir kısmı da seleksiyonlar sonucunda elde edilmiştir. Asma ıslah programlarında doğal seleksiyondan sonra kullanılan en yaygın yöntem melezleme ıslahıdır. Bağcılıkta, mevcut olan tür ve çeşitler içerisinden amaca göre; verimli, kaliteli, hastalık ve zararlılara dayanıklı ve çevre şartlarına iyi uyum sağlayan bireylerin seçilmesi ile istenilen karakterlerin bir çeşitte kombine edilmesi amacıyla yapılan çalışmalara “asma ıslahı çalışmaları” denir. Diğer bir söyleyiş ile elverişli, dominant genleri en yüksek oranda, en çabuk ve en kolay şekilde toplamaya olanak veren bu yöntem, Fransa ve İtalya gibi bağcılık yönünden ileri ülkelerde, 19. yüzyılın ikinci yarısından itibaren yeni asma anacı ve üzüm çeşitleri elde etmek amacıyla yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Son yüzyıldaki pratik uygulaması düşünüldüğünde, bitki ıslahı yöntemleri arasında hiçbir ıslah yöntemi F1

hibrit gücü kadar önem kazanmamıştır. Ülkemizde 1973 yılında geleneksel melezleme ıslahı yöntemi ile yeni üzüm çeşitlerinin geliştirilmesine yönelik proje çalışmalarına başlanmıştır. Islahın seleksiyon kriterlerini oluşturan verim, kalite, çekirdeksizlik, olgunlaşma zamanı, tane rengi, salkım şekli, anacın gelişme kuvveti, abiotik ve biyotik stres koşullarına dayanıklılığın belirlenmesi, hastalıklara dayanımı gibi özelliklerin tespiti uzun yıllar almaktadır. Amaca uygun F1'lerin seleksiyonu uzun yıllar alması, melezleme ıslahının en önemli dezavantajını oluşturmaktadır. Bilindiği gibi bitkilerde kendine döllenmenin sonucunda generasyonlar ilerledikçe homozigoti oranı artmakta bunun sonucunda da bitkilerde zayıflama görüldüğü bu olay kendileme depresyonu olarak bilinmektedir. Bunun gibi olaylar, somatik mutasyonlar ve himeyreler bu süreçte karşılaşılan diğer problemler arasında gösterilmektedir. Uygun genetik stokların eksikliği ve asma genomu hakkındaki bilgilerin sınırlı olması da asmanın melezleme ıslahı çalışmalarında en önemli problemler arasındadır. Bu olumsuz koşulları en aza indiren yeni strateji olarak kullanılan bitki biyoteknolojisi; genomik, gen transferleri, moleküler yöntemleri, doku kültürü tekniklerin ıslah çalışmalarında kullanılmaya başlaması ve biyoteknolojinin yarattığı olanakların asma ıslahında etkin bir şekilde kullanılmaya başlaması ile birlikte, günümüzde çok daha kısa sürede etkin sonuçlar alınabilmekte ve böylece ıslah kavramı önemli bir değişim süreci içerisine girmektedir (Uslu vd.1995).

Klasik bitki ıslahı, melezleme sonucu elde edilen ve açılım gösteren döller arasından üstün genotiplerin fenotipik seleksiyonuna dayanmaktadır. Ancak genotip ile çevrenin etkileşiminden dolayı bu uygulama oldukça zorlaşmaktadır. Bunun yanı sıra fenotipik seleksiyon pahalıdır ve bazı karakterler için (abiyotik stres koşullarına tolerans ile bağlantılı karakterler gibi) çoğu zaman uygulanabilir değildir. Markör destekli seleksiyon (MAS), klasik bitki ıslahında karşılaşılan sorunları çözmek için kullanılan alternatif ve yardımcı bir tekniktir. Markör destekli seleksiyon agronomik olarak önem arz eden ve birden fazla gen veya lokus tarafından kontrol edilen karakterlerin hızlı bir şekilde aktarılmasını sağlamaktadır. Bu teknik klasik ıslahı tamamlayıcı, oldukça hızlı, etkin, doğru ve ekonomik bir seleksiyon yöntemidir (Francia 2004).

Marköre Dayalı Seleksiyon (MDS) olarak tanımlanan, hastalıklara dayanıklılık özelliği ile bağlantılı moleküler markörlerin geliştirilmesi ve elde edilen markörlerin asma ıslah çalışmalarında erken seleksiyonda kullanılması; dünyada bağcılık araştırmaları içerisinde öncelikli olarak yer almaktadır. Bu şekilde moleküler markör teknikleri ile ıslah çalışmalarında seleksiyonun çok daha hızlı ve etkin bir şekilde yapılması hedeflenmiştir. Bu yöntem ile, arzu edilen özelliklerle bağlantılı moleküler markörlerin, seleksiyonda kullanılması uzun yıllar gerektiren geleneksel melezleme ıslah çalışmalarının süresinin kısaltılarak, zamandan, alandan ve iş gücünden tasarruf sağlanması amaçlanmaktadır. Tüm bu hedefler doğrultusunda, bu doktora çalışmasında, “Moleküler Markörlerin “Boğazkere x Regent” ve “Kalecik Karası x Regent” çeşitlerinin melezlenmesinden elde edilen F1 popülasyondan seçilen bireyler kullanılarak Külleme (*Uncinula-erysiphe necator*) ve Mildiyö (*Plasmopara viticola*) hastalıklarına dayanıklı çeşit ıslahında, Marköre Dayalı Seleksiyon (MDS) amaçlı Kullanılması” konulu proje kapsamında yürütülmüş ve sonuçlar ortaya çıkarılmıştır. Çalışma sonucunda (Marker Assisted Selection= MAS) Markör Yardımı ile Seleksiyon yöntemi ülkemizde, asmalarda külleme ve mildiyö hastalığına dayanıklılık ile ilgili seleksiyonda kullanılmıştır.

Bu araştırmanın devamında 168 F1 BR ve 25 F1 KR bitkilerinde generatif sonuçların ortaya çıkarılmasının ardından, fenotipik incelemeler sonrası, külleme ve mildiyö hastalıklarına dayanım özelliklerini içeren fenotiplerin belirlenmesi, genotipik seleksiyon ile fenotipik seleksiyonun karşılaştırılarak markörlerin kullanılabilirliğinin ispatı yönünde çalışmalara devam edilmelidir.

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

### 2.1 Asmanın Tarihçesi

Cilalitaş devrinin ilk yıllarından (M.Ö. 8000-7000 yıllarına doğru) itibaren, göçebelikten yerleşik yaşama geçen halkların besin gereksinimlerini karşılama olanağı veren ilkel tarım teknikleri oluşmuş ve bu teknikler değişik kıtalarda çeşitlilik göstererek gelişmiştir. Yakındoğu'da bitki topluluğunun zenginliği, toprakların verimliliği, iklimin yumuşaklığı son derece gelişmiş bir kırı uygarlığı oluşturmuştur. Türkiye ve Suriye tarih çağlarının ilk yıllarından başlayarak çok verimli yerler olmuşlar ve yörede bol miktarda tahıl, zeytin, incir, nar, hurma, üzüm gibi çeşitli meyveler ve sebzeler yetiştirilmiştir. Asmanın, sık ağaçlarla kaplı ormanda, kol kalınlığındaki gövdesiyle, kıvrıla kıvrıla ulu ağaçların tepelerine dolandığı, sürgünlerini ağaç tepelerine uzatıp ya da yüklü salkımlarını sarkıtarak insanları cezbedtiği tasvir edilmiştir. Kraliçe Semiramis'in Babil'deki asma bahçeleri bereket ve bolluğun simgesi olarak büyük ün kazanmıştır. Yazılardan; üzüm bağlarının dört yöne göre yol yol bölünmesi doğudan batıya ve güneyden kuzeye sınır çizgisi çekilmesi suretiyle yetiştiricilik yapıldığı, önce çotuğun sonra da şarabın toprağa yerleştirilmesi gibi işlemlerin yapıldığı anlaşılmaktadır. Bu bölge, turunç sarısı rengi, insanı mest eden kokusuyla, şurup gibi tatlı üzümlere, suyu yoğun lal renginde olan ve “erken olgunlaşan ve iri” denilen en has Kahetia asmasına ev sahipliği yapmıştır (Zohary 2000).

Süryaniler, Selçuklular ve Osmanlılar ise asma figürlerinin bina ve seramik süslemelerinde yaygın olarak kullanılmışlardır. Frigya Bölgesi kalıntılarında, Roma ve Yunan Medeniyetine ait sikkeler, heykeller, seramik eşyalar ve binalarda asma figürünün önemli yer tuttuğu görülmektedir. Ayrıca içki kapları kutsal törenlerde şarap sunumunda kullanılmıştır. Anadolu'da asmanın tarihçesi incelendiğinde, kayıtlı bilgilerin Anadolu'da medeniyet ile başladığı görülmektedir. Türkiye'de bitki genetik kaynaklarının toplanması ve değerlendirilmesi konusunda çalışmalar XX. Yüzyılın ilk çeyreğinde başlamıştır. Bu yüzden ülkemizde önemli bir kültür bitkisi olan asmanın Anadolu'da köklü bir geçmişe sahip olduğu, kültürü yapılarak yetiştirildiği ve Anadolu kültüründe önemli bir yere sahip olduğunu bilinmektedir (Önder 1989).

## 2.2 Dünya ve Türkiye Bağcılığı

*Vitis vinifera*'nın evcilleşmesi Orta Asya'nın M.Ö. 6000-5000 yıllarında Kafkasya ve Anadolu'da kültüre alınması ile başlamıştır. Zaman içinde güneyde Nil deltasına (Mısır ve Kuzey Afrika), doğuda Çin'e ve batıda Avrupa kıtasına yayılmıştır. Amerika kıtasının keşfinden sonra bu kıtaya ve 1600'lerden sonra da Güney Afrika, Avustralya ve Yeni Zelanda'ya taşınmıştır. Tarih öncesi çağlarda kültüre alınan ve dünya üzerinde çok geniş bir alana yayılmış olan asma türleri içerisinde en fazla sayıda çeşidi içeren tür *Vitis vinifera* L. Rhamnales takımına bağlıdır. Rhamnales takımın üç familyasından yalnızca *Vitaceae* familyasına ait bitkiler, bilinen anlamda asmaları tanımlamaktadır. *Vitaceae* yerine 1821 yılında Ampelidaceae KUNTH ve 1868 yılında Ampelidaceae LOWE ve 1887 yılında PLANCHON olarak adlandırılmıştır. Ama en son uluslararası botanik terimoloji kodlamasından sonra *Vitaceae* familyası olarak kabul edilmiştir. Bu familya, 16 cinsi ve yaklaşık 700 türü kapsamaktadır. Asmanın familyasını adlandırmak için Kültür asmalarının tümü *Vitis* cinsine aittir. Bunun da, *Euvinis* ve *Muscadinia* olmak üzere iki alt cinsi vardır. *Vitis* cinsi, kromozom sayısı  $2n=38$  olan *Euvinis* ve  $2n=40$  *Muscadinia*'ya aittir. *Muscadinia* alt cinsine; *V. rotundifolia*, *V. munsoniana* ve *V. popenoei* olmak üzere 3 tür dâhildir. Oysa *Euvinis* alt cinsi, üzümünden yararlanılan asmaların büyük çoğunluğunun girdiği *V. vinifera* ile birlikte, toplam 109 'tan fazla türü içermektedir (Mullins vd. 1992).

Fakat günümüzde Çin başta olmak üzere, bazı ülkelerde yeni türler ortaya çıkarılmaktadır. Dolayısıyla, mevcut tür sayısının da artma olasılığı vardır. *Vitis vinifera* türü içerisinde belirtilen çeşit sayısı 10.000'in üzerinde olup, bunlar dünya üzüm üretiminin %90'ından fazlasını oluşturmaktadır. Bu nedenle asma, son derece köklü bir kültüre sahipken, aynı zamanda dünyada en fazla ekonomik öneme sahip meyve türlerinin başında gelmektedir (Ağaoğlu vd. 1999).

Asma yetiştiriciliği; Kuzey yarımkürede 11°-53° ve Güney yarımkürede 20°- 40° enlem dereceleri arasında ekonomik olarak yapılabilir. 36°-42° Enlem dereceleri arasında bulunan ülkemiz bu yönden çok uygun bir konumda bulunmaktadır. Bu bağlamda ülkemizin hemen her yöresinde bağcılık yapılabilir, hatta toprak yapısı

ve iklim koşulları bakımından diğer tarım ürünlerinin yetişmesine veya istenilen düzeyde kaliteli ürün eldesine elverişli olmayan bölgeler bu tarım koluna ayrılarak değerlendirilmektedir (Oraman 1970).

Anadolu'nun Kuzey Doğu bölümünü içine alan Karadeniz ve Hazar denizi arasındaki Kafkasya geçiş bölgesi (Transcaucasia), kültür (*Vitis vinifera* ssp. *Sativa*) ve yabani (*Vitis vinifera* ssp. *Sylvestris*) asmanın gen merkezi ve kültüre alındığı yer olarak kabul edilmektedir (Mc Govern 2003).

Bu nedenle, ülkemiz yaklaşık 6000 yıllık bir bağcılık kültürü ile çok zengin bir asma gen potansiyeline sahiptir. Türkiye bağcılık potansiyelinin yanında, zaman içerisinde ortaya çıkmış çeşit, tip ve klondan oluşan zengin bir genetik çeşitliliğe sahiptir. İç ve Doğu Anadolu'da yüksekliğin 1.500 mm'yi aşan yöreleri ile yıllık yağışın 1.200 mm'nin üzerinde olduğu Doğu Karadeniz bölgesi dışında kalan bütün bölgelerde ekonomik olarak bağcılık yapılabilmektedir (Arroyo-Garcia vd. 2006, Ergül vd. 2006).

Asmanın meyvesi olan üzüm, halkın beslenmesinde ve toplumsal yaşamda önemli rol alarak, çok farklı şekillerde değerlendirilmektedir. Ülkemiz bağ alanlarının %56.6'sında sofralık üzüm üretimi yapılmakta ve üretilen üzümün yaklaşık %53.6'sı sofralık olarak değerlendirilmektedir. Yaş üzüm üretimimizin ikinci önemli grubunu %34 ile çekirdekli ve çekirdeksiz kuru üzüm üretimi, bunun da %75'ini çekirdeksiz kuru üzüm üretimi oluşturmaktadır. Ülkemiz, 300.000 tonluk çekirdeksiz kuru üzüm üretimi ile dünya kuru üzüm üretiminin %36.3'ünü tek başına karşılamakta ve yıllara göre ABD ile birlikte ilk sırayı paylaşmaktadır. Çekirdeksiz kuru üzüm üretimimizin tamamını, Ege bölgesinde yetiştirilen ve dünyaca tanınan Sultani Çekirdeksiz (Sultani) çeşidi sağlamaktadır. Ülkemiz, şaraplık üzüm çeşitlerinin başarı ile yetiştirilmesi için çok elverişli yörelere sahip olmasına karşın, üretilen yaş üzümün yalnızca %3'lük bölümü (yaklaşık 120.000 ton) şaraba işlenmektedir. Ayrıca sanayi ve endüstri alanında örneğin üzüm çekirdeği yağı, antosiyanin pigmentleri ve etanol ürünlerinde bile değerlendirilmektedir. Ülkemiz 2011 yılı FAO verilerine göre dünya bağ alanları arasında üretim miktarı yönünden 4.296.350 ton ile 6. Sırada, üretim alanı yönünden 472.545 (ha) ile 5. Sırada yer almaktadır. Dünya bağ alanı 7086022 (ha) olup, üzüm üretimi ise 66.413.393 ton dur.

Üzüm üretiminde söz sahibi olan ülkelerin başında ise; Çin, İtalya, Fransa, İspanya, ABD, Türkiye, Arjantin, İran, Şili ve Avustralya gelmektedir. Bu on ülke 44.424.100 tonluk üzüm üretimiyle dünya üzüm üretiminin %70'ini gerçekleştirmektedir. Alan olarak İspanya ilk sırada yer alırken, İspanya'yı Fransa, İtalya, Çin ve Türkiye izlemektedir (Anonymous 2011).

Çizelge 2.1 Dünya'da üzüm üretim miktarı (T) ve bağ alanı (Ha) (Anonymous 2011).

Sıra	Ülke	Üretim Miktarı (T)	Sıra	Ülke	Üretim Alanı (Ha)
1	Çin	9.174.280	1	İspanya	1.000.000
2	İtalya	7.115.500	2	Fransa	764.164
3	ABD	6.692.950	3	İtalya	725.353
4	Fransa	6.590.810	4	Çin	568.450
5	İspanya	6.100.000	5	<b>Türkiye</b>	<b>472.545</b>
6	<b>Türkiye</b>	<b>4.296.350</b>	6	ABD	388.580
7	Şili	3.149.380	7	İran	227.461
8	Arjantin	2.837.810	8	Arjantin	218.000
9	İran	2.241.300	9	Şili	202.000
10	Avustralya	1.715.720	10	Avustralya	167.422
11	Dünya	66.413.393	11	Dünya	7.086.022

### 2.3 Asma Islahı ve Tarihiçesi

Dünya nüfusunun 2025 yılında yaklaşık 8 milyar olacağı tahmin edilmektedir. Bu durumda giderek artan nüfusun besin ihtiyacını karşılamak ancak temel besin maddelerinin üretimi her yıl % 1.2 artırmakla mümkün olacaktır (Anonim 2009).

Yeni alanların tarıma açılmasının mümkün olmadığı düşünüldüğünde, üretimi artırmanın en etkili yolunun bitki ıslahı olması kaçınılmazdır. Aynı zamanda birçok bitki türünde genetik varyasyonun daralması sonucu istenen özellikleri taşıyan çeşitlerin geliştirilmesi zorlaşmıştır. Islah çalışmaları için gerekli varyasyon tescilli çeşitlerden, yerel çeşitlerden ve yabancı akrabalardan sağlanmaktadır. Bu nedenle, bu materyallerin taranması ve belirlenen uygun genlerin geliştirilmiş tekniklerle kültür çeşitlerine aktarılması gerekmektedir. Ancak bitki ıslahında başarı öncelikle etkin, doğru ve hızlı



bir seleksiyona bağılıdır. Uluslararası ıslah çalışmaları 1800 yularından belgelenmiştir. Esas olarak asma ıslahı 19. yy'ın 2. yarısından itibaren buyk önem kazanmış ve sistemli olarak yapılmaya başlanmıştır. Bu dönemde Fransa, İtalya ve Almanya gibi bağıcılıkta ileri ülkelerde genetik bilgisi asma ıslahında da kullanmaya başlanmış ve seleksiyon bilimsel esaslara göre yapılmıştır. Asma gibi yüksek oranda heterozigotik kalıtsal yapıya sahip olan türlerin çoğaltılmasında vegetatif yöntemler kullanılmaktadır. Kökeni çok eski tarihlere dayanan çeşitlerin günümüze kadar korunmaları bu şekilde sağlanmıştır. En eski ıslah eşitleri Isabella ve Catawba olarak *V. labrusca* ve *V. vinifera* arasında 1816 yılında ve 1819 yılında yapılmıştır. Norton eşidi *V. aestivalis* × *V. vinifera* arasında 1830 yıllarında gerçekleşmiştir. Concord eşidi 1849 yılında Masachuset'te *V. labrusca* ile *V. vinifera* melezlerinden ortaya çıkmıştır (Di Gaspero vd. 2012).

1850'li yıllarda külleme hastalığı (*Uncinula necator*) Amerika'dan getirilen çeşitlerle Fransa bağlarına bulaştırılmıştır. Bu hastalığın zararını kontrol etmek amacıyla küllemeye dayanıklı olduğu düşünülen ve Amerika kıtasından getirilen materyaller ile 1860'larda filoksera, bundan hemen sonra mildiyö (*Plasmopora viticola*) da Avrupa bağlarına girmiş ve kısa sürede bağları tahrip etmeye başlamışlardır. Daha sonra kimyasal yöntemlerle külleme ve mildiyö ile mücadele mümkün olduğu halde filoksera ile mücadelenin mümkün olmadığı grlmştir. 30 yıl içerisinde Avrupa bağların %75'inden fazlası kurumuş ve elden çıkmıştır. Filokseranın mevcut olduğu yerlerde *vinifera* bağıcılığının yapılmasının mümkün olmadığı, Avrupa'da bağıcılığın devam edilmesi için aşı yapmak suretiyle Amerikan asma türlerinin *V. vinifera* L ile ve birbiriyle kombine edilmesi fikri ortaya çıkmıştır. Islah alışmaları, başlangıçta filokseraya yüksek düzeyde dayanımlı, geniş adaptasyon yeteneğine sahip ve *Vitis vinifera* L. ile iyi uyuşan, yüksek oranda köklenen Amerikan türlerini belirlemek ve bu türler arasında amaca en uygun olanlarını seçmek veya bu türler arasında ve bu türlerle *Vitis vinifera* L. arasında melezlemeler yaparak istenilen karakterlerin kombine edildiği yeni asma anaçları elde etmek amacıyla başlatılmıştır. Daha sonra külleme, mildiyö ve kurşuni küf gibi hastalıklar ile biotik ve abiotik stres koşullarına dayanıklı ve *vinifera*'nın verim ve kalite özelliklerini taşıyan çeşitlerin elde edilmesi konularına yönelik ıslah çalışmaları ile devam etmiştir (Alleweedt 1997).

Ülkemizde klon seleksiyonu çalışmaları 1979 yılında ülkesel proje kapsamında yürütülerek, 1606 üzüm çeşidinin büyük ölçüde tamamlanarak, bir araya getirilmesine yönelik Tekirdağ Bağcılık Araştırma Enstitüsü bünyesinde 1150 üzüm çeşidini içeren “Milli Koleksiyon Bağı” kurulmuştur ve yine aynı dönemde koleksiyondaki çeşitlerin koleksiyonun DNA düzeyinde tanımlanmasına yönelik bazı araştırmaların (Ergül vd. 2002a, Şelli vd. 2007) yanı sıra, 1150 çeşidin SSR markörler kullanılarak tanımlanmasına yönelik Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü yöneticiliğinde 20 SSR lokusu ile veri tabanları oluşturularak, hem çeşit koruma hem de uluslararası veri karşılaştırması mümkün olacaktır (Ergül vd. 2006).

Ayrıca Bölgesel çeşit koleksiyonları olarak adlandırılan değişik üniversitelerin Ziraat Fakülteleri ile Tarım ve Köyişleri Bakanlığı'na bağlı araştırma ve üretim kuruluşlarında, başta bölgesel çeşitler olmak üzere daha küçük çaplı koleksiyonlar oluşturulmaktadır. Örnek olarak, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi'nin Kalecik'teki Araştırma İstasyonu'nda 1994 yılından bugüne kadar koleksiyona alınan çeşit sayısı 130'a ulaşmıştır.

Yalova Atatürk Bahçe Kùltürleri Merkez Araştırma Enstitüsü'nde 1973 yılında başlatılan “Melezleme yolu ile yeni sofralık üzüm çeşitlerinin elde edilmesi” projesinin ilk aşaması 1995 yılında tamamlanmış ve 9 çeşit tescillenerek ülkemiz bağcılığına kazandırılmıştır. Tekirdağ Bağcılık Araştırma Enstitüsü'nde tescil edilen 9 çeşidin yanı sıra, halen günümüze kadar yeni asma çeşitlerin tescili devam etmektedir.

Manisa Bağcılık Araştırma Enstitüsü'nde 2001 yılında başlamış olan melezleme yoluyla yeni çeşit geliştirme çalışmalarında, ilk olarak klasik melezleme ve embriyo kültürü yöntemiyle Sultani Çekirdeksiz üzüm çeşidinin ana ebeveyn olarak kullanıldığı çalışmalar yapılmıştır. 2005 yılında çekirdekli çeşitlerle başlatılan melezleme çalışmaları sonucunda 2008 yılında melezlerin değerlendirilmesi yapılmıştır. Böylece asma ıslahında amaç, verimi arttırmak, kaliteyi yükseltmek, asmanın genetik yapısını insanların gereksinimlerini karşılayacak biçimde değiştirmek, iyileştirmek ve hastalık ve zararlılar ile çevre koşullarına dayanıklılık yeni çeşitler elde etmektir.

## 2.4 Islah Yöntemleri

Asma ıslah çalışmalarında genel olarak 6 metot uygulanmaktadır.

### 2.4.1 Seleksiyon ıslahı

Mevcut bir populasyon içerisinde iyi olanların seçilmesi veya kötü özelliktekinin elemine edilmesi yöntemine seleksiyon ıslahı denir. İşte bağcılıkta klon seleksiyonu yönteminin uygulanmasındaki amaç, bir çeşit içerisinde var olan farklılıklardan yararlanarak çeşidin özellikleri bakımından üstünlük gösteren tipleri seçmektir. Bu farklılıklar; çevre şartları, mutasyonlar, klonların değişik orijinlerden gelmiş olmaları, virüs enfeksiyonları gibi nedenlerden ortaya çıkmaktadır. Bu amaçla ülkemizde en yaygın kullanılan yöntem “klon seleksiyonu”dur. Bağcılıkta ticari öneme sahip üzüm çeşitlerinin verim ve kalite performanslarının kalıcı olarak yükseltilmesi, ancak klon seleksiyonu ile mümkündür. Ülkemizde ise bağcılıkta seleksiyon çalışmaları, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bağ-Bahçe Bölümünde 1972 yılında Ankara'nın Kalecik ilçesinde Kalecik Karası üzüm çeşidinde toptan seleksiyon çalışması olarak başlatılmış ve 3 yılın sonunda 45 klon bağ omcası seçilmiştir. Daha sonra elde kalan 23 klon aday üzerinde 1983- 1989 yıllarında Kalecik ve Tekirdağ koşullarında gerçekleştirilen teksel seleksiyon çalışması sonucunda, Kalecik koşulları için 12 ve 21, Tekirdağ koşulları için ise 10, 12 ve 13 nolu klonlar önerilmiştir (Fidan vd. 1986, 1991).

Çizelge 2.2-2.9'de ülkemizde yürütülen klon seleksiyonu çalışmalarından örnekler yer almaktadır (Kunter 2011).

Çizelge 2.2 Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü

Şaraplık	Seçilen Klon No
Kalecik Karası	9, 12, 15, 16, 23

Çizelge 2.3 Manisa Bağcılık Araştırma Enstitüsü

Sofralık	Seçilen klon No	Kurutmalık	Seçilen klon No	Şaraplık-Şıralık	Seçilen klon No
Osmanca	39, 26, 40, 21, 38	Yuvarlak Çekirdeksiz	5, 7, 8	Çal Karası	1, 12, 18, 29, 10
Pembe Gemre	6, 11, 12				
İpek (Pek üzümü)	4, 13, 25				
Sultani (Altın) Çekirdeksiz	33				
Razakı	16, 21, 18				

Çizelge 2.4 Alata Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü

Sofralık	Tarsus Beyazı, Tilkikuyruğu, Işıklı, Burdur Dimriti, Siyah Gemre

Çizelge 2.5 Erzincan Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü

Sofralık	Seçilen klon No
Karaerik	13, 15, 18, 19, 23, 30

Çizelge 2.6 Tekirdağ Bağcılık Araştırma Enstitüsü

Sofralık	Seçilen klon No,	Şaraplık-Şıralık	Seçilen klon No
Amasya Beyazı	175, 259	Clairette	124, 156, 377
Bozcaada Çavuşu	98, 275, 161	Gamay	192, 365, 212
Hafızali	20, 183, 293	Karacakız	7, 160, 64, 103
Hamburg Misketi	58, 13, 6	Papazkarası	289, 194, 207
Kozak Beyazı	292, 270, 222	Semillon	225, 197. 171, 169
		Yapıncak	175, 132, 13

Çizelge 2.7 Malatya Zirai Araştırma Enstitüsü

Sofralık	Şaraplık-Şıralık
Şilfoni	Öküzgözü
Karaerik	Boğazkere

Çizelge 2.8 Gaziantep Zirai Araştırma Enstitüsü

Sofralık	Kurutmalık	Şaraplık-Şıralık
Dımişkı	Rumi	Horoz Karası
Hönüsü	Besni	Dökülgen
Tahannebi		
Sultani Çekirdeksiz		
Razakı		

Çizelge 2.9 Yalova Atatürk Bahçe Kültürleri Merkez Araştırma Enstitüsü

Sofralık	Seçilen klon No	Şaraplık-Şıralık	Seçilen klon No
Beyaz Çavuş	13,36, 41	Beylerce	32, 59
Değirmendere Siyahı	6, 31, 80		
Erenköy Beyazı	27, 29		
Hafızali	6, 9, 18		
Hamburg Misketi	52, 58		
Müşküle	58, 59		
Razakı	1, 65, 73		
Bilecik İrikarası	108		

#### 2.4.2 Melezleme (kombinasyon) ıslahı

Yukarıda bahis ettiğimiz gibi seleksiyon ıslahıyla, bir çeşidin genetik yapısına bağlı olan maksimum kapasite aşılamaz. Islah çalışmalarında varyabilitenin sınırları genişletilmek istediği zaman kombinasyon ıslahına baş vurulur. Bu ıslah yöntemiyle ayrı ayrı fertlerde bulunan iki veya daha fazla karakterin tek bir bireyde birleştirilmesi sağlanmış olur. Diğer bir ifade ile tür içi ve türler arasında, ayrı ayrı çeşit veya türlerde bulunan iki veya daha fazla karakterin tek bir bireyde kombine edilmesi ile yeni üzüm çeşitleri ve asma anaçlarının elde edilmesi, bazı uygun olmayan özelliklerin düzeltilmesi ve varyasyon sınırlarını genişletmek amacıyla yapılan ıslah çalışmalarına kombinasyon (melezleme) ıslahı denilmektedir. Ülkemizde Yalova ve Manisa Atatürk Bahçe Kültürleri Merkez Araştırma Enstitüsü ve Tekirdağ Bağcılık Araştırma Enstitüsü'nde Islah Edilen Sofralık Üzüm çeşitlerinin bazı özellikleri çizelge 2.10'da gelmektedir (Fidan 1985, Eriş 1992, Ergül 1997, Kunter 2011).

Çizelge 2.10 Yalova ve Manisa Atatürk Bahçe Kùltürleri Merkez Araştırma Enstitüsü ve Tekirdağ Bağcılık Araştırma Enstitüsü'nde ıslah edilen sofralık üzüm çeşitlerinin bazı özellikleri

Çeşidin Adı	Ebeveynler	Olgunlaşma Zamanı	Çekirdeklik Durumu	Tane Rengi
<b>Yalova Atatürk Bahçe Kùltürleri Merkez Araştırma Enstitüsü</b>				
Uslu	Hönüsü x Siyah Gemre	Çok Erkenci	2-3	Kırmızı
Yalova İncisi	Hönüsü x Siyah Gemre	Erkenci	6 – 7	Beyaz
Yalova Misketi	Royal x Perle de Csaba	Erkenci	2 – 3	Koyu Kırmızı
Yalova Çekirdeksizi	Beyrut Hurması x Perlette	Erkenci	2-3 (rudimenter)	Beyaz
Yalova Ata Sarısı	Beyaz Çavuş x Cardinal	Orta - Geç	2 – 4	Beyaz
ErginÇekirdeksiz	BeyrutHurması x Perlette	Erkenci	2-3(rudimenter)	Beyaz
Yalova Beyazı	Beyaz Çavuş×Cardinal	Erkenci	2-5	Yeşil- Sarı
Samancı çekirdeksizi	Beyaz Şam x Perlette	Erkenci	Çekirdeksiz	Beyaz
İsmetbey(95/3)	Siyah Gemre X Royal	Orta	Çekirdekli	Koyu mavi-siyah
Pembe 77 (91/3)	AlphonseLavallee X MuscatReinnedes Vignes	Geç	Çekirdekli	koyu kırmızı menekşe
Atak 77 (ÇH/1)	Beyaz Çavuş X Hamburg Misketi	Geç	Çekirdekli	yeşil sarı
<b>Manisa Atatürk Bahçe Kùltürleri Merkez Araştırma Enstitüsü</b>				
Sultan 7	Manisa Merkez arazi bağlarında	-	Çekirdeksiz	Sarı
Sultan 1	Manisa Merkez Horozköy mevkiinde	-	Çekirdeksiz	Sarı
Altın Sultani	Manisa Merkez Arazi Bağlarında	-	Çekirdeksiz	Sarı
Saruhan Bey	Saruhanlı ilçesi bağlarında	-	Çekirdeksiz	Sarı
Manisa Sultani	Alaşehir-Kemaliye mevkiinde	Erkenci	Çekirdeksiz	Sarı

Çizelge 2.10 Yalova ve Manisa Atatürk Bahçe Kùltürleri Merkez Araştırma Enstitüsü ve Tekirdağ Bağcılık Araştırma Enstitüsü'nde ıslah edilen sofralık üzüm çeşitlerinin bazı özellikleri (devam)

Tekirdağ Bağcılık Araştırma İstasyonu				
3/A – 261 (Güz üzümü)	Emperor x S. Çekirdeksiz	Geç	Rudimenter	Sarı – Yeşil
2/B – 56 (Reçel Üzüümü)	Hönüsü x Perlette	Orta	Rudimenter	Kırmızı
Barış (19/C - 20)	Cardinal x Beauty Seedless	Erkenci	Rudimenter	Sarımsı yeşil
Trakya İlkeren (6/B - 254)	A. Lavallée x Pelette	Erkenci	Çekirdekli	Kırmızı
Tekirdağ Çekirdeksizi (6/A - 41)	A.Lavalée x S. Çekirdeksiz	Erkenci	Çekirdeksiz	Koyu Kırmızı
Tekirdağ Sultani	Italia x Superior Seedless	Orta-erken	Çekirdekli	Yeşil-sarı
Tekirdağ Misketi	İskenderiye Misketi x Sultani Ç.	Orta-erken	Çekirdeksiz	Yeşil-sarı
Bozbey	Queen x Beauty Seedless	Orta	Çekirdekli	Yeşil-sarı
Güz Gülü	Kırmızı Şam x Barış	Geç	Çekirdeksiz	Pembe
Özer karası	Italia x Favli	Geç	Çekirdekli	Siyah

#### 2.4.2.1 Tür içi melezlemeler

*Vitis* cinsi içinde mevcut olan türlerin herbirinde bulunan çeşitlerin kendi türleri içindeki çeşitlerle yapılan melezlenmeleri bu gruba girmektedir. Asma ıslahında tür içi melezlemeler daha çok *Vitis vinifera* L. varyeteleri arasında yapılmaktadır. Filoksera va mantari hastalıklara dayanıklı kùltür çeşitlerinin melezlenmesiyle, bu iki dayanıklık geni, elde edilen yeni çeşitler üzerinde birleştirilebilmiştir. *V. vinifera* tür içi melezler şu amaçlara yöneliktir (Fidan 1985).

1. İki ayrı üzüm çeşidinde var olan, çok beğenilen özellikleri bir çeşit üzerinde toplamak,
2. Çok beğenilen bir çeşitte mevcut olan, fakat arzu edilmeyen bir veya birkaç karakter ıslah etmek,
3. Sofralık, şaraplık, kurutmalık çeşitlere kullanma amacına uygun, arzulanan aromayı kazandırmak, verimini ve kalitesini artırmak,

4. Çekirdeksiz yeni çeşitler elde etmek,
5. Üzümün Pazar süresini artırmak üzere elde olanlardan erken ve geç oluma ulaşan çeşitler elde etmek,
6. Eldeki çeşitlerden daha iyi özellikler taşıyan örneğin; daha iri taneli, daha iyi salkımlar, daha kaliteli çeşitler elde etmek,

#### 2.4.2.2 Türler arası melezlemeler

*Vitis* cinsi içindeki yaklaşık 60 tür bulunmaktadır. Bunlar arasında değişik amaçlarla yapılan melezleme ıslahı çalışmalarına türler arası melezlemeler denilmektedir. Türler arası melezlemeler en çok; Tuza toleranslı, kurağa ve kirece dayanıklı, soğuk koşullara dayanıklı, filoksera nematod gibi zararlılara ve hastalıklara, dayanıklı geniş adaptas yeteneği olan, kolay köklenen, kolay aşıya gelen asma anaçları elde etmek amacıyla yapılmaktadır (Fidan 1985, Eriş 1992, Ergül 1992).

Son yıllarda *Muscadinia* alt cinsine ait türlerde bulunan üstün özelliklerin *vinifera* çeşitlerine aktarılması amacıyla yönelik de türler arası melezlemeler yapılmaktadır.

Türler arası melezlemeler 3 gruba ayrılır:

1. *Vinifera* x Amerikan melezleri (V x A);

Fransa ve Almanya'da V x A melezleri arasında, kendileme ve geriye melezlemelerle başarıya ulaşılmıştır. Elde edilen bireylerin filokseraya ve mantari hastalıklara dayanıklı, verimli, kaliteli oldukları görülmüştür. Anaç ıslahından farklı olarak verimli melez elde etmek için yapılan V x A melezlemesinde Amerikan türlerinin buruk tadı melezlere geçirdiğinden kaliteleri düşük olmakta, diğer taraftan filokseraya yeterince dayanıklılık göstermemektedir. Bu yönlü çalışmalarda melezleri pek kullanılmamaktadır.

Anaç ıslah konusunda başarılı V x A melezleri şunlardır:

- 41 B .....Chasselas x Berlandieri
- 333 .....Cabernet Sauvignon x Berlandieri
- ARG 1 .....Aramon noir x Rupestris Ganzin



- 1202 C .....Mourvedre x Rupestris
- Fercal .....(Berlandieri x Colombard) x 333 EM

-İkiden Fazla *Vitis* Türü Arasındaki Melezler

- 44 – 53 M\* .....Riparia x (Cordifolia x Rupestris )
  - 1616 C.....Solonis (riparia x rupestris x candicans) x Riparia
  - 1613 C.....Solonis x Othello (Labrusca x Riparia x Vinifera)
  - Harmony.....Dog Ridge x 1613 C
  - 196 – 17 Castel.....(Mourvedre x Rupestris) x Riparia
- \*M: Malegue

2. Amerikan x Amerikan melezleri (A x A);

Özellikle anaç ıslahı konusunda iki farklı Amerikan türünün melezlenmesi çok kullanılan bir yoldur.

-*Riparia X Rupestris* Melezleri;

3309 C<sup>1</sup>            101-14 Mgt.  
 3306 C<sup>1</sup>            Mgt: Millardet et de Grasset  
<sup>1</sup>C: Couderc

-*Berlandieri X Rupestris* Melezleri;

99 R                    775 P  
 110 R                  779 P  
 140 Ru                1103 P  
 R: Richter            1447 P  
 Ru: Ruggeri           P: Paulsen

-*Berlandieri X Riparia* Melezleri

8 B                    SO 4  
 5 BB                  34 EM  
 5 C                    420 A  
 161- 49 C            EM: Ecole de Montpellier  
 157- 11 C

### 3. *Vitis vinifera* x *Vitis rotundifolia* melezleri (*V* x *R*);

*Vitis rotundifolia*'nın filokseraya, nematoda. mantari hastalıklara, zararlılara dayanıklı, olduğundan bu konuda melezleme çalışmaları yapılmaktadır. *Muscadina Rotundifolia* (2n-40) olduğundan dolayı melezlerinde elde edilen bireyler stril olduğundan, melezleri poliploidi hale getirerek verimli ve bazı hastalıklara dayanıklı melezler elde ediliyor.

#### 2.4.3 Poliploidi ıslahı

Kromozom sayılarının katlanması esasına dayanan ıslah tekniğidir. Bunlar doğada kendiliğinden olabildiği gibi, bazı kimyasal maddelerin kromozom sayısını katlama etkisinin yardımıyla da elde edilebilir. Bu amaçla kullanılan kimyasal maddelerin en bilineni kolhisin uygulamalarıdır. Kolhisinin bitkilere uygulanışı, tohumlara ya da fidelerin büyüme ucuna sürülmesi şeklinde olmaktadır. Kolhisin bitki büyüme ucundaki bölünmekte olan hücrelere uygulandığında, ortadan ikiye bölünen kromozomlar hücrenin kutuplarına çekilmekte ve hücrede ikiye bölünmektedir. Bu da kolhisin uygulanan hücrede kromozom sayısının iki katına çıkmasına sebep olmaktadır. Bağcılıkta poliploidi ıslahının amacı verimi arttırmak ve iri taneli salkımlar elde etmektir. Ancak bazı poliploidler, iri meyvenin tersine küçük meyve de oluşturabilmektedir. Bunun nedeni, çekirdek oluşumunun engellenmesi ile meyvelerin küçülmesidir. Poliploid bitkilerde iri meyve oluşmasının nedeni meristem hücrelerinin, diploid bitkilere oranla daha iri olmasındandır (Çelik 2009, Fidan 1985).

Triploid Formlar: 2n=38 kromozomlu ana fertlerin 2n=76 kromozomlu asmaların çiçek tozlarıyla tozlanması sonucu triploid formlar meydana gelmektedir. Bazı hallerde diploid formların kendilenmesi sonrası da, triploid formların ortaya çıktığı görülmektedir. Triploid formlar yüksek oranda steril olduklarından verimli değildir. Ancak, bu tip çeşitlerin vegetatif gelişmeleri iyi olduğu ve aynı zamanda, erken olgunlaştıkları için iyi bir anaç materyali olarak değerlendirilebilmektedirler. Örnek olarak, Japonya'nın önemli çeşidi Kyoto, (*Vitis vinifera* x *Vitis labrusca*) türlerinden, Ishiharawase ve Centennial iki çeşidin melezidir. Yeni bir diğer triploid "Bea-Ke"

çekirdeksiz çeşidi, “Muscat Bailey A” x “Kyoho” melezinden elde edilmiştir (Wakana vd. 2008, Fidan 1985).

**Tetraploid Formlar ( $2n=4x=76$ ):** Bu tür formlar doğal veya suni olarak ortaya çıkmaktadırlar. Tetraploid formlarda salkım ve taneler gösterişli olduklarından bu tip çalışmalara önem verilmiştir. İlk olarak 1914 yılında kalifornia eyaletinde ticari amaç için bulunmuş ve daha sonra 1937 yılında ıslah yöntemi ile Muscat of Alexandria çeşidinden Muscat of Cannon tetraploid çeşidini oluşturmuşlardır ve böylece diğer çeşitler ile ilgili daha iyi sonuçlar almışlardır. Amerika’da oldukça fazla çeşidi bulunan tetraploid formlar daha iri taneli ve erkenci olduklarından dolayı ticari üretimi ilgi alanı olmuştur. Önceki çalışmalarda spordan yapılan seleksiyon çalışmalarıyla tetraploid Muscat gigas ve Sultanina gigas çeşitleri elde edilmiştir. Elde edilen bazı tetraploid çeşitler; Otsubu Catawba, Benika wachi, Otsubu Niagara, Otsubu Koshu, Muscat of Cannon, Erly Giant, Black King, Wallis Giant, Aki Queen, Fujiminori, Pione, Sunny Rouge, Dark Ridge, Honey Venus ve Suihou da Japonya ve Amerika’da ıslah edilen tetraploid üzüm çeşitleridir. Hatta pentaploid ile ilgili ıslah çalışmaları yapılmaktadır (Yamada vd. 2008, Olmo 1951).

#### **2.4.4 Homozigot asma ıslahı**

Asmalarda poliploidi ıslahı yanında homozigot omcalar elde etmek için de çalışmalar yapılmaktadır. Bilindiği gibi asmalar da diğer meyve türleri gibi heterozigot yapıdadır. Bu nedenle asmalarda gen analizi yapmak karakterlerin kalıtımını izlemek oldukça zordur. Bu tür çalışmaları kolaylıkla yapabilmek için haploid fertler ( $2n=19$  kromozomlu) elde edilmek istenmekte ve bunlardan poliploidi yoluyla homozigot diploid asmalar elde etmeye yönelik çalışmalardır. Ancak, polen kültürü metodu ile çalışmalar sürmektedir (Fidan 1985).

#### **2.4.5 Transgenik çeşit ıslahı**

Son birkaç yıl içinde, *Vitis* cinsinde yetiştiricilik açısından önemli bazı genlerin anaçlara, sofralık ve şaraplık üzüm çeşitlerine genetik transformasyonunda önemli

gelişmeler sağlanmıştır. Bu genler daha çok virüslere, mantari hastalıklara ve herbisitlere dayanımla ilgilidir. Bu alanda, transgenik anaçlarla ilk tarla testleri Fransa'daki COLMAR Ulusal Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nde gerçekleştirilmiştir. Kaliforniya'daki Dry Creek Laboratuvarı da anaçları nematodlara dayanıklı kılma yönünde çalışmalar yapmaktadır. Yine United States Tobacco Company de transgenik üzüm çeşitlerinin eldesine yönelik bir projeye destek vermektedir. Ancak söz konusu çalışmalar, henüz pratiğe aktarılacak düzeye ulaşmamıştır (Çakır 2011).

#### 2.4.6 Mutasyon ıslahı

Mutagenlerle meydana getirilen ıslah tekniğidir. Asmalarda mutant formlar da aynı poliploid formlarda olduğu gibi, ya spontan olarak ya da röntgen ışınları, kobalt ışınları, kolhisin vb. mutagenler yardımı ile elde edilirler. Radyasyonlar verdikleri enerji ile bünyesinde elektronların ayrılmasına neden olmakta ve bunun sonucunda bazı kimyasal değişikliklerle mutasyonlar sağlanmaktadır. Asmada mutagenik uygulamaların temel amacı, spesifik çeşitlerin genetik arka planlarında agronomik olarak ilişkili fenotiplerin seçimi için, somatik varyasyon seviyesini artırmak olmuştur. Bu sebeple vejetatif tomurcuklar, hem arazide hem de doku kültüründe mutagenesisin konusu olmuştur. Fiziksel mutagenler arasında gama ışınları (Botta vd. 1987), hem *Vitis* hibrit ve anaçlarının, hem de *V. vinifera*'nın tomurcuklarında kullanılmıştır (Charbaji ve Nabulsi 1999).

Botta vd. (1987) beş farklı çeşidi ışına tabi tutmuş ve Dolcetto çeşidinde düşük tane dökümü, poliploit Barbera çeşidinde *Botrytis cinerea* enfeksiyona daha az duyarlı geniş taneler, Delight çeşidinin geniş tanelerindeki somatik varyantlar ve Queen of Vineyards çeşidindeki çekirdeksizlik gibi birçok ilginç mutant fenotipi tanımlamıştır. In vitro koşullarda gelişen tomurcukların kimyasal mutagenesisleri üzerine yayınlanmış tek rapor, Pusa Seedless çeşidi üzerine EMS (ethyl methane sulphonate) ve EB (ethidium bromide) kullanılmış deneylerden oluşmaktadır (Khawale vd. 2007).

Mutagenesis asmada fonksiyonel çalışmalar için bir varyasyon kaynağı olarak kullanılmamıştır. Populasyonlar içerisinde gerçekleşen somatik mutasyonlar çoğunlukla

tane şekli ve rengi bakımından meydana gelen değişimleri kapsamaktadır. Asmalarda tane kabuğu rengi, antosiyaninler olarak isimlendirilen kırmızı renk pigmentlerinin birikmesi ile oluşmaktadır. Beyaz çeşitlerin kırmızı çeşitlerden bağımsız mutasyonlar sonucu oluştuğu bilinmektedir. Tane rengi konusundaki değişimler daha çok şaraplık çeşitlerde görülmekle birlikte, en tipik örneği, çok büyük oranda çeşit ve klon zenginliğine sahip “Pinot noir” üzüm çeşidi oluşturmaktadır. Günümüzde Pinot grubu çok büyük çeşit ve klon zenginliğine sahiptir. Pinot noir’dan somatik mutasyonla oluşmuş ve oldukça yaygın yetiştiriciliği yapılmakta olan “Pinot blanc” ve “Pinot gris” ile Pinot gris’den somatik mutasyonla oluşmuş “Pinot meunier” örnek olarak verilebilir (Hocquigny vd. 2004).

Etkili üretim ve mutant popülasyonların kullanımına dair sorunun bir kısmı homozigot hatların eksikliği ve birçok genotip için çimlenme potansiyelinin azlığından kaynaklanmaktadır. Kunter vd. (2011) yılında Sultani Çekirdeksiz ve Kalecik Karası üzüm çeşitlerinde uyarılmış mutasyon etkilerinin sitolojik incelenmesini yapmışlardır.

## **2.5 Asmada Hastalık Etmenleri**

### **2.5.1 Asmalarda abiotik stres**

Abiotik stres koşullarının başında asmanın dona dayanıklılığı, kurağa, tuzluluk, düşük ve yüksek sıcaklıklar, rüzgâra, yüksek ışık, hava kirliliği, toksik metallerin varlığı, radyasyonlar, besin elementlerinin eksikleri veya fazlalıkları gibi abiyotik kökenli de olabilmektedir. Herhangi bir stres faktörü ile karşılaşan bitkilerde biyokimyasal ve fizyolojik olarak çeşitli tepkiler oluşmaktadır. Kuraklık dünyanın birçok bölgesinde görülmekte ve yeryüzünün yarısına yakın bir kısmını etkilemektedir. Kuraklık en önemli çevresel streslerden birisi olup, bitkisel gelişim ve üretimi sınırlandırmaktadır. Bitkiler kuraklığa hüresel ve moleküler düzeyde tepki göstermektedir. Diğer birçok olumsuz çevre faktörlerinde görüldüğü gibi, kuraklık bitki dokularında etilen üretimini artırarak anormal bitki gelişmesine neden olmaktadır (Mayak vd. 2004b).

Bağcılık yapılan alanlarda, tuzluluk ve bor toksisitesi önemli stres faktörleridir. Sulama suyundaki tuzluluğa ve B (bor) düzeylerine bağlı olarak dünyanın pek çok yerinde topraklar tuzlanmakta ve bunun sonucu olarak verim ve gelişmede önemli gerilemeler kaydedilmektedir. Tuzluluğa tolerans bakımından hem *Vitis* spp. içinde ve hem de *Vitis vinifera* L. çeşitleri arasında önemli farklılıklar görülmektedir. Bu nedenle özellikle tuzlanma sorunu olan alanlarda tuzluluğa toleranslı anaçların ve üzüm çeşitlerinin seçilmesi ve yetiştirilmesi büyük önem taşımaktadır. Bunun da yolu stres koşullarına dayanıklı bireylerin seçilmesi veya ıslahıdır (Sivritepe ve Eriş 1998).

Abiotik strese dayanıklılık ıslah çalışmaları anaçlar arasında (Carbonneau 1985) tarafından *V. rupestris* × *V. berlandieri* melezinden sera koşullarında kurağa dayanıklılık amacı için yapılmıştır. Pouget (1980) tarafından *V. vinifera* × *V. berlandieri* gerçekleştirilen melezlem demir klorozuna dayanıklı yeni bir anaç için geliştirilmiştir. Daha sonra toprağın asiditesine dayanıklı anaçlar oluşturmak için *V. riparia*, *V. rupestris* ve *V. berlandieri* ıslahından gerçekleştirilmiştir (Pouget ve Ottenwaelter 1986). *V. riparia*, *V. labrusca* ve *V. amurensis* Soyuğa dayanıklı çeşitler olarak bulunmuştur (Reisch vd. 1996) ve ıslah programlarında bu çeşitler Amerika (Hemstad ve Luby 2000) ve Avrupa'da (Korbuly 1999) kullanılmaktadır. Çizelge 2.11'de Abiotik strese dayanıklı genleri taşıyan asma çeşitleri gelmektedir (Owens 2008).

Söylemezoğlu vd. (2010) Amerikan asma anaçlarında bor ve tuz stresine tolerans mekanizmalarının stres ile ilgili fizyolojik parametreler ve antioksidan enzimler ile belirlenmesi üzerine yapmış oldukları çalışmada, sekiz farklı Amerikan asma anacı üzerine aşılı Sultani Çekirdeksiz üzüm çeşidine ait tüm bulgular değerlendirildiğinde, tuz ve bor konsantrasyonu yüksek olan bağ alanlarında 110 R ve 41 B Amerikan asma anaçları üzerine aşılı Sultani Çekirdeksiz üzüm çeşidinin kullanılmasının uygun olmayacağı, bu anaçlar yerine 1103 P, 140 Ru, 99 R gibi *Vitis Rupestris* geni taşıyan anaçları üzerine aşılı Sultani Çekirdeksiz üzüm çeşidinin kullanılmasının uygun olduğu bildirmişlerdir. Tuz toksisitesinin görüldüğü bağ alanlarında ise 110 R ve 41 B anaçları üzerine aşılı Sultani Çekirdeksiz üzüm çeşidi yerine 140 Ru, 99 R ve SO4 anaçları

üzerine aşılı Sultani Çekirdeksiz üzüm çeşidinin kullanılmasının daha uygun olduğu tespit etmişlerdir.

Sıcaklık stresi ile ilgili; bitkiler sıcaklık değişmelerine hassastır. Mevsimsel varyasyon ve daha çok günlük değişmelere tepki gösterirler. Global ısınma olarak adlandırılan sıcaklık stresi dünya tarım alanları için ciddi bir tehlikedir. Sıcaklığın yükselip alçalması bitkide hormonal dengesizliğe neden olmakta ve bitki gelişimini önemli düzeyde etkilemektedir (Cheikh ve Jones 1994).

Oluşan stres faktörleri, genlerin fizyolojik etkileri ile hücrel metabolizma değişimlerinin, büyüme oranları ve ürün miktarlarının değişimine kadar çok çeşitli tepkilere neden olurlar. Stres koşullarının genetik anlamda düzenlenmesi yönünde değişik bitkilerde yürütülen çalışmalar sonucu, bu koşullarla direk ilgili bazı genler tespit edilmiş olup bu genlerin stres koşullarındaki ekspresyonu ile ilgili çalışmalar devam etmektedir (Zyprian 1997, Bray vd. 2000).

Çizelge 2.11 Abiotik strese dayanıklı genleri taşıyan asma çeşitleri (Owens 2008).

Stres	Çeşit	Referance
Soğuk zararı	<i>V. riparia</i> , <i>V. labrusca</i> . <i>V. amurensis</i> , <i>V. acerifolia</i> . <i>V. vulpina</i> , <i>V. adstricta</i>	Alleweldt vd. 1990, He and Lixin 1989
Kuraklık stresi	<i>V. vinifera</i> , <i>V. rupestris</i> , <i>V. champinii</i> , <i>V. cinerea var. helleri</i>	Alleweldt vd. 1990, During 1986
Demir klorozu	<i>V. vinifera</i> , <i>V. cinerea var. helleri</i>	Alleweldt vd. 1990, Pouget 1980
Tuzluluk	<i>V. cinerea var. helleri</i> . <i>V. acerifolia</i> , <i>V. vinifera</i> × <i>Champinii</i> .	Alleweldt et al. 1990, Antcliff vd. 1980, Galet 1988

### 2.5.2 Asmalarda biotik stres

Asmada biotik stres, hastalık etmenleri olan bakteri, virüs, fungus ve parazitler tarafından oluşturulmaktadır. Bu yönde oluşan hastalık ve zararlılara karşı yinede en ön sırada amaca uygun dayanıklı çeşit kullanmamız gerekmektedir ve dayanıklı çeşit

geliştirmek amacıyla ıslah çalışmaları gerekmektedir. Asma ıslah çalışmalarında hastalıklarla ilgili olarak Külleme (*Uncinula-Erysiphe necator*) (Bouquet 1986) ve Mildiyö (*Plasmopara viticola*) (Bellin vd. 2009) ağırlıklı olarak çalışılmaktadır.

Bu iki önemli bağ mantari hastalığının yanı sıra;

- Antraknoz (*Elsinoe ampelina*), bir çeşit mantari hastalıktır (Pearson ve Goheen 1988),
- Ölü kol (*Phomopsis viticola*), adlı mantardır (Barış 1988),
- Pas kastalığı (*Physopella ampelopsidis*) (D.& P.Syd.) Cum.&Ram
- Kurşuni küf (*Botrytis cinerea*), adlı mantardır (Emmett vd. 1992),
- Beyaz Çürüklük (*Coniella diplodiella* (Speg.) Petr. & Syd
- Kızıl Yanıklık (*Pseudopezicula tracheiphila* (Müll-Thurg) Korf & Zhuang
- Siyah Çürüklük (*Guignardia bidwellii*), ve

#### **Bakteriyel hastalıklar ise;**

- Asma Taç uru (*Agrobacterium vitis*) (Emmett vd. 1992).
- Asma vebası (Pierce's Disease: *Xylella fastidiosa* subsp, fastidiosa) (Mortensen 1968 ),
- Bakteriyel yanıklık (Isılık marazi) (*Xanthomonas ampelina* sp, Nov) (Pearson ve Goheen 1988),

#### **-Virüs hastalıkları**

- [(kısa boğum hastalığı, *fanleaf* virüsü (GFLV)] (Raski vd. 1983),
- Bağ Krome Mozaik Virüsü (Grapevine Chrome Mosaic Virus =GCMV).
- Asma Sarılığı (*Grapevine Yellow*s =MLO)
- Bağ sarı benek hastalığı, yellow speckle, Grapevine Yellow Speckle Viroid= GYSVd virüsü) yapraklarda sarı beneklerin fotosentezi engellediği bundan dolayı da ürün kayıpları oluşturduğu bildirilmiştir (Randles 2003). Çizelge 2.12'de biotik strese dayanıklı genleri taşıyan asma çeşitleri gelmektedir (Owens 2008).

Bütün bu hastalıkların dayanıma yönelik farklı ülkelerde ıslah çalışmaları yürütülmektedir. Almanya'da Geilweilerhof'da yapılan ıslah çalışmalarında kaliteli şaraplık çeşitlerden, hastalıklara (külleme ve mildiyö) ve dona dayanıklılıkları iyi olan çeşitler seçilmiştir. Bu çeşitler:



B-6-18 (Pollux): (Oberlin 595) F1 x Foster's (beyaz çekirdekli)  
B-7-2 (Easter): (Oberlin 595) F1 Foster's (beyaz çekirdekli)  
C-97-45: [(Gamay noir x *Vitis riparia*) F2 x (Riesling)] x Foster' (beyaz çekirdekli)  
Ga-58-30: [(Silvaner x Riesling) x Müller-Thurgou] x S.V12-375  
Ga-49-22: [(Silvaner x Riesling) x Müller-Thurgou] x S.V12-375  
Regent : [Diana (Sylvaner x Muller-Thurgau) x Chambourcin]  
VRH3082-1-42 : [Muscadinia rotundifolia G52 x Malaga seedling No 1]  
GfGa 48-12 (Beyaz şaraplık) : [Bacchus x Villard blanc]  
GfGa 47-42 (Külleme ve mildiyö'ya dayaklı) : [Bacchus x Seyval]  
Orion: (Villard Blanc x Optima)  
Phoenix : (Villard Blanc x Bacchus)  
Rondo (Geisenheim) : [(Precose de Malingre x *Vitis Amurensis*) x St. Laurent],  
Noblessa (sinonimleri ise; Geilweilerhof 32-16-74 ve Prisma) : [Madeleine Angevine x  
Silvaner]  
Optima (Beyaz şaraplık) (sinonimleri ise; Geilweilerhof 33-13-113. Optima 113) :  
[Muller-Thurgau x (Riesling x Silvaner)]  
Bacchus, Früher Scheurebe, Geilweilerhof 33-29-133 : [(Silvaner x Riesling) x Müller-  
Thurgau].

Çizelge 2.12 Biotik strese dayanıklı genleri taşıyan asma çeşitleri (Owens 2008).

Hastalık	Çeşit	Referans
<b>FUNGAL HASTALIKLARI</b>		
Külleleme	<i>V. riparia</i> , <i>V. aestivalis</i> , <i>V. cinerea</i> , <i>V. cinerea</i> var. <i>helleri</i> . <i>V. rotundifolia</i>	Alleweldt vd. 1990 Pearson vd. 1988
Mildiyö	<i>V. riparia</i> , <i>V. rupestris</i> , <i>V. aestivalis</i> var. <i>Lincecumii</i> , <i>V. labrusca</i> , <i>V. amurensis</i> , <i>V. rotundifolia</i> , <i>V. yenshanensis</i> , <i>V. pseudoreticulata</i> , <i>V. piasezkii</i> , <i>V. romanetii</i> , <i>V. flexuosa</i> , <i>V.</i> <i>bryoniifolia</i>	Alleweldt vd. 1990 Eibach vd. 1989 He and Wang 1986
Siyah çürüklük	<i>V. riparia</i> , <i>V. mustangensis</i> , <i>V.</i> <i>rotundifolia</i> , <i>V. cinerea</i> , <i>V. rupestres</i>	Alleweldt vd. 1990 Jabco vd. 1985 McGrew 1976
Antraknoz	<i>V. cinerea</i> var. <i>floridana</i> , <i>V. aestivalis</i> var. <i>Aestivalis</i> , <i>V. shuttleworthii</i> , <i>V.</i> <i>labrusc</i> , <i>V. rotundifolia</i> , <i>V. rotundiolia</i> var. <i>munsoniana</i>	Mortenson 1981 Olmo 1986
Botritis	<i>V. vinifera</i> , <i>V. riparia</i> , <i>V. rupestres</i>	Alleweldt vd. 1990.
Pas hastalığı	<i>V. shuttleworthii</i> , <i>V. cinerea</i> var. <i>floridana</i> . <i>V. rotundifolia</i> , <i>V. tiliifolia</i>	Fennell 1948
Kızıl Yanıklık	<i>V. vinifera</i> , <i>V. cinerea</i>	Alleweldt vd. 1990
<b>BAKTERİYEL HASTALIKLARI</b>		
Pierce's Hastalığı (Asma vebası)	<i>V. rotundifolia</i> , <i>V. mustangensis</i> , <i>V. ×</i> <i>Champinii</i> , <i>V. vulpine</i> , <i>V.</i> <i>shuttleworthii</i> , <i>V. cinerea</i> var. <i>floridana</i> , <i>V. aestivalis</i> var. <i>Aestivalis</i> , <i>V. arizonica</i>	Mortenson 1977 Olmo 1986 Stover 1960 Krivanek vd. 2005
Asma Kök Uru	<i>V. amurensis</i> , <i>V. labrusca</i>	Alleweldt vd. 1990 Szegedi vd. 1984 Pearson vd. 1988
Asma Sarılığı	<i>V. labrusca</i> , <i>V. rupestris</i>	Pearson vd. 1988
<b>ASMA VİRÜS HASTALIKLARI</b>		
Fanleaf virüsü	<i>V. aestivalis</i> var. <i>aestivalis</i> , <i>V. ×</i> <i>slavinii</i> . <i>V. mustangensis</i> , <i>V. riparia</i>	Walker vd. 1985 Walker and Meredith 1990, Bouquet 1981

### 2.5.2.1 Asma zararlıları

Böcek, akar ve nematod gruplarına ait çeşitli zararlılar, asmaların toprakaltı ve topraküsü organlarında beslenerek omçaların zayıflanmasına ve ürünün azalmasına, ya da doğrudan salkımlarda beslenerek ürünün kalitesini ve Pazar değerini düşmesine neden olmaktadır. Toprak altı zararlılar ise;

-Filoksera: Dünya bağcılığının ortak ve en önemli zararlısı Filoksera (*Daktulosphaira vitifoliae* Fitch)'dır.

Nematodlar, Kök ur nematodu (*Meloidogyne spp.*), Kamalı nematodlar (*Xiphinema spp.*), Kök yara nematodları (*Pratylenchus spp.*), Turunçgil nematodu (*Tylenchulus semipenetrans*), Amerikan türleri içerisinde nematoda en yüksek dayanımı gösteren tür *Vitis champini* dir. Toprak üstü zararlılar ise; Asmanın topraküstü organlarında (tomurcuk, yaprak, gövde, çiçek salkımı ve tane) zarar meydana getiren böcek ve akarlar çok geniş bir zararlı grubunu oluştururlar. Ayrıca beslenen kuşlar ve arılarda önemli zararlara neden olmaktadır.

Salkım güvesi (Ödemis): (*Lobesia botrana*), Bağ pıralı (Dürmece): (*Sparganothis pilleriana* Schiff), Tripsler, Bağ uyuzu (Erinose): (*Colomerus vitis* Pgst), Kırmızı örümcekler, Maymuncuk: (*Otiiorhynchus spp*) Larva ve erginleri gözlerin sürmesi sırasında tomurcuk ve genç yaprakları yiyerek zarar meydana getirmektedirler. Haziran Böcekleri: Bağlarda zarar yapan önemli türleri *Polyphylla full* L., *Polyphylla oliveri* Cast ve *Polyphylla Tuerkmenoglui* Petro dur (Çelik vd. 2009).

Loubser (1983), bir grup anaç üzerinde yaptığı çalışmalarda nematodlara en dayanıklı melez anaç olarak Ramsey (Salt Creek), 99 R ve 110 R bulmuştur. Ayrıca, *M. rotundifolia* çok sayıda asma zararlılarına karşı çok güçlü dayanıma sahiptir. Bu yüzden *M. rotundifolia* çeşidinden oluşan melezler asma zararlılarına dayanıklı genleri taşımaktadırlar. Bu yüzden ıslah çalışmalarında çok önemli baz materyali olarak değerlendirilmektedirler. Gupta ve Pandey (2013)'nin söylediğine göre, bütün dünyada zararlılar ile ilgili pestisit kullanıldığı halde oranla baktığımızda sadece böcekler

yaklaşık %15'lik bir ürün kaybına neden olmaktadır. Bu yüzden şuan bütün dünyada hastalık ve zararlılara karşı dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesi ile ilgili geniş çaplı araştırmalar sürdürülmektedir (Bouquet 1980, Hwang vd. 2010, Xu vd. 2008). Çizelge 2.13'de zararlılara dayanıklı genleri taşıyan asma çeşitleri gelmektedir (Owens 2008).

Çizelge 2.13 Zararlılara dayanıklı genleri taşıyan asma çeşitleri (Owens 2008).

Stres	Çeşit	Referance
Kök Nematodları	<i>V. × champinii</i> , <i>V. mustangensis</i> . <i>V. rotundifolia</i> , <i>V. nesbittiana</i> . <i>V. ×slavinii</i> , <i>V. aestivalis</i> var. <i>Aestivalis</i> , <i>V. vulpina</i>	Lider 1954, Firoozabady ve Olmo 1987. Bloodworth vd. 1980, Cousins ve Walker 2002, Boyden 2005, Anwar vd. 2002
Kamalı Nematod	<i>V. aestivalis</i> var. <i>aestivalis</i> , <i>V. cinerea</i> , <i>V. rotundifolia</i>	Alleweldt vd. 1990, Meredith vd. 1982. Becker ve Sopp 1990
Filoksera	<i>V. riparia</i> , <i>V. rupestris</i> , <i>V. cinerea</i> <i>Varhelleri</i> , <i>V. cinerea</i> , <i>V. ×champinii</i> <i>V. rotundifolia</i>	Alleweldt vd. 1990, Olmo 1986

### 2.5.3 Külleme hastalığının kısaca tanımı

Külleme mantarlarının Fungi Alemi içerisindeki taksonomik olarak yeri son literatür bilgilerine göre (Bilanger vd. 2002) aşağıda gösterilmiştir.

**Alem:** Fungus

**Bölüm:** Ascomycota

**Sınıf:** Ascomycetes

**Takım:** Erysiphales

**Familya:** Erysiphaceae

**Cinsle:** Oidium, Erysiphe (*Uncinula necator*, *Microsphaera*).

### 2.5.3.1 Bağda külleme hastalığı

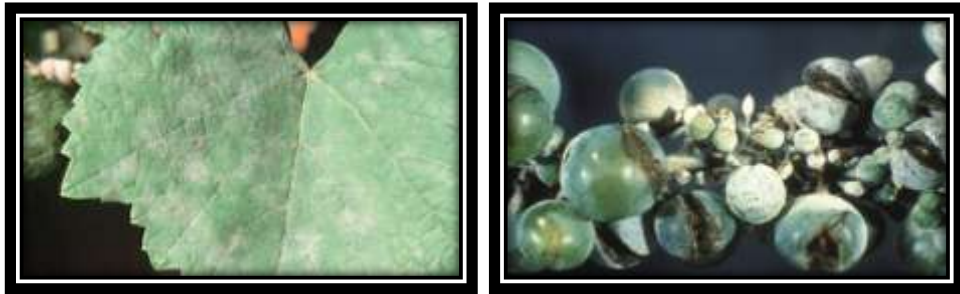
#### **Etmen: *Uncinula necator***

Bağlarda külleme hastalığına yol açan, *Erysiphe necator*, *Uncinula necator* ilk olarak 1834 yılında Kuzey Amerika’da Shweinita tarafından kaydedilmiştir. Hastalık yerli Amerikan asmalarında önemli bir zarar yapmazken hasta çubuklar üzerinde Avrupa Kıtasına ulaştığında kısa bir sürede tehlikeli bir sorun halini almıştır. İngiltere’de, ilk kez 1845 yılında rastlanmış ve Tucker tarafından *Oidium tuckeri* olarak adlandırılmıştır. Hastalık lkemizde ilk kez 1851 yılında görülmüş ve muhtemelen hava yoluyla ulaştırılmıştır. Etmen 1 asır içinde Türkiye’nin her tarafına yayılmıştır. Lokal olarak yapılan bir çalışmada Manisa’da, ilaçlı savaşım yapılmayan parsellerde üründe % 66 oranında azalma olduğu, kuru üzüm kalitesinin ise 9-10 numaradan 7.5 numaraya düştüğü saptanmıştır. Bu rakamlar etmenin üzüm üretimi ve kalitesini önemli oranda etkileyebileceğini göstermektedir (Kiss 1998).

Salkımlar gelişmelerinin her dönemlerinde etmene karşı duyarlıdırlar. Erken dönemde hastalığa yakalanan salkım iskeleti kolayca kırılan bir yapı kazanıp düşebilir. iek ncesi ve hemen sonrasında olan enfeksiyonlar meyve tutumunu azaltır ve önemli verim kaybına yol açabilirler. Taneler çeker içerikleri yaklaşık %8 oluncaya kadar enfeksiyona duyarlıdırlar. Bundan sonra (ben düşme) enfeksiyona yakalanmazlar; çünkü etmenin besleneceği epidermis hücreleri artık aktivitelerini kaybetmişlerdir, onu besleyemezler. Ancak çeker içeriği %8’e erişmeden önce hastalanmış taneler üzerinde etmen çeker içeriği %15 oluncaya kadar sporlanmaya devam edebilir. İnce koruk döneminde hastalığa yakalanan salkımlarda taneler gelişmeden kırılırlar. Eğer taneler henüz tam büyüklüklerini almadan hastalığa yakalanırsa epidermis hücreleri ölür ve böylelikle kabuğun gelişimi durur. Bu durumda tane içi gelişmeye devam ettiğinden, oluşan i basınç sonucu tane çatlar ve çekirdekleri görünür. Çatlama ekirdeksiz çeşitlerde olmaz. Çatlayan taneler ya kurur ya da *Botrytis cinerea* gibi fungusların etkisiyle rrler. Renkli eşitler olgunlaşma henüz başlamadan hastalığa yakalanırlarsa renklerini tam alamazlar, hasat sırasında yamalı bir görünüm alırlar. Beyaz çeşitlerde ise tanenin üzerinde kahverengi kırmızı bir renk oluşur. Böyle salkımların taze üzüm

olarak satış değerleri düştüğü gibi kurutulduklarında da normal kehribar sarısı renklerini alamazlar, kalite değerleri düşer ve aroması da iyi olmaz (Çelik 1998).

Asma küllemesi daha çok yazları kurak geçen bölgelerde önemli olan bir hastalıktır. Bu bölgelerde külleme her yıl görülebilir ve önlem alınmazsa verim ve kaliteyi oldukça düşürebilir. Çevre koşullarından sıcaklık, hastalık gelişimi üzerinde en önemli etki yapan çevre faktörüdür. Enfeksiyon ve hastalık gelişimi için optimal sıcaklık 20-27 °C arasındır. Bununla birlikte 6-32 °C arasında fungal gelişme olabilir. Sıcaklık 35 °C'nin üzerine çıktığında konidium çimlenmesi engellenir. 40°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda ise bunlar 24 saat içinde ölürler. Konidiumlar 25°C'de yaklaşık 5 saat içinde çimlenirler. İnkubasyon süresi 7-14 gündür, ancak 23-30°C arasında bu süre kısalarak 5-6 güne iner. Buna karşılık 7°C'de bu süre 32 günden fazla olur. Çimlenmede rol oynayan diğer bir faktör de nemdir. Genellikle gündüz sıcak, akşam serin havalarda hastalık artışı görülür. Akşam saatlerinde nispeten nemli ve güneş ışığından korunmuş salkımlar üzerinde sporlanan fungus, gündüz saatlerinde bu sporlarını (konidiumlarını) doğaya salar. Akşam saatlerinde ise bu konidiumlar çimlenme fırsatını bulurlar. Çimlenme yüzeyinde yağış veya çığ vb gibi nedenlerle muhtemelen aşırı turgor basıncından dolayı patlamasına yol açar. Yağmur konidiumları yıkayarak veya miselyumu tahrip ederek hastalık gelişimini engeller. Genelde % 40-100 orantılı hava nemi konidiumların çimlenmesi için yeterlidir. Nemin sporulasyon üzerine olan etkisi çimlenme üzerine olan etkisinden daha önemli görünmektedir. Işık şiddetinin az olduğu bulutlu günler hastalık gelişimini teşvik edicidir. Parlak güneş ışığının konidium çimlenmesini engellediği bilinmektedir. Yapılan bir çalışmada güneş ışığı altında yalnızca %16 oranında çimlenme görülürken, diffuz ışık (gölgeli ışık) altında bu oran %47 olarak belirlenmiştir (Şekil 2.1), (Larsen ve Caspari 2001).



Şekil 2.1 Bağda görülen külleme hastalığının salkımda ve yapraktaki görünümü

#### 2.5.4 Bağ mildiyösü (*Plasmopara viticola*)

Etmeni: *Plasmopara viticola* [(Berk. & M.A. Curtis) Berl. & De Toni 1888].

**Alem:** Fungus

**Bölüm:** Oomycetes

**Sınıf:** Leotiomyces

**Takım:** Peronosporales

**Familiya:** Peronosporaceae

**Cinsle:** Plasmopara

Belirtileri: Hastalık asmanın tüm yeşil kısımlarında, ilk olarak yaprakların üzerinde sarımsı, yuvarlak, şeffaf zeytin yağ lekeleri halinde kendini gösterir. Lekeler gittikçe büyür, hatta tüm yaprağı sarabilir. Mildiyö yağmurlu havalardan sonra veya çiğ olduğu zaman salgın yapar. Yaprakta önce yağ lekeleri, daha sonra bunların alt kısmında beyazımsı bir küf tabakası oluşur. Bu lekeler sonradan esmerleşir, bazen kızarır ve sonuçta kururlar. Hava fazla yağışlı geçerse hastalık genç sürgünlere, çiçeklere ve koruklara geçer. Mildiyö salkımlara geçerse daha tehlikelidir. Salkımlar uçlarından itibaren çürümeye başlar. Sürgünler üzerinde elips şeklinde lekeler meydana gelir. Mildiyö küllemedekine benzeyen bir küf oluşturur. Fakat bu küf küllemedeki gibi yaprağın her iki yüzünde değil sadece alt yüzündedir. Ben düştükten sonra küllemede olduğu gibi mildiyöde de artık tanelerde gelişemez. Genç salkımlar çok hassastır ve özellikle kayıplar bu dönemde meydana gelir (Uzun 2004).



Şekil 2.2 Bağda görülen mildiyö hastalığının salkımda ve yapraktaki görünümü

## 2.6 Moleküler Markörlerin Tarihçesi

Gregor Mendel'in 1866'da bezelyeler üzerinde yaptığı çalışmalar ile genetik biliminin temelleri atılırken biyoteknolojinin ilk uygulaması olarak kabul edilebilecek seçilmiş tohumlar ile çaprazlama yönteminin de ilk adımları atılmıştır. 1950'li yıllarda kalıtım materyalinin DNA olduğunun anlaşılması ve Watson Crick tarafından DNA'nın yapısının aydınlatılması ile 20. yüzyılda genetik biliminde ivmesel gelişmeler yaşanmıştır (Eriş ve Gülen 2004).

İlk biyoteknolojik uygulamalar 1970'li yılların sonunda genetik mühendisliği, hücre kültürü ve hücre füzyonu alanlarında sağlanan gelişmelerin sonucunda yeni bir endüstrinin ortaya çıkmasına neden olacak bir değişim geçirmiştir. Biyoteknolojideki gelişmeleri takip eden yıllarda moleküler genetik alanında yeni gelişmeler olmuştur. 1980'lerde PCR geliştirilmiş ve 1983 yılında ABD'de bir grup şirket tarafından bitki üzerinde ilk gen nakli gerçekleştirilmiştir. 2000'li yıllara gelindiğinde ise biyoteknoloji ile ilgili gelişmeler altın çağını yaşamaktadır. Bitkisel üretim biyoteknolojik uygulamaların en yaygın olarak kullanıldığı alandır. Çünkü değişen çevre şartları, artan nüfus bu alandaki çalışmaların hızlandırılmasına neden olmaktadır. Bitki ıslahı ile başlayan süreç, yüksek verime sahip ürün yetiştirmek için yapılan bilimsel araştırmalarla devam etmiştir (Özcan vd. 2001).

Geleneksel bitki ıslahı ve üretim çalışmalarını biyoteknoloji ile desteklemek son yıllarda öncelikli konulardan biri olmuştur. Bilindiği gibi 20.yüzyılın ikinci yarısından itibaren tarımsal uygulamalarda DNA teknolojisinin kullanımı ile gelişen tarımsal biyoteknoloji, bitki biyolojisi; yetiştiricilik ve ıslahı ile ilgili çalışan pek çok araştırmacı için yeni ve oldukça geniş bir çalışma alanı oluşturmuş ve devrim etkisi yapmış uygulamalardır. Bütün canlılarda hayatsal olayların şifresinin taşındığı DNA, bir hücrenin kontrol merkezi olup, bir canlının fenotipi, metabolik yetenekleri, makromoleküler bileşenleri ve morfolojik değişikliklerini tayin etmektedir. Yapılan ilk çalışmalarda, depo proteinlerinin markör olarak kullanılabilmesi ortaya konulurken, daha sonra DNA'nın kendisinin doğrudan markör olarak kullanılma fikri ortaya çıkmıştır. Genetik markörler; bireyde, belli bir genetik özelliğin ya da hastalığın



varlığına işaret eden gen (genetik belirleyici) ismi verilir. DNA markörleri, teorik olarak genomun her noktasını temsil etme yeteneğine sahiptirler ve sonsuz sayıdadırlar. Bu karakterlerin markör olarak isimlendirilmelerinin nedeni, çalışılan organizmadaki ilgilenilen özelliklerin genetiği hakkında, bilgi sağlamalarıdır. Moleküler markörler genomda herhangi bir gen bölgesi ya da gen bölgesi ile ilişkili DNA parçasıdır, aslında DNA'nın aktif bölgelerinden (genler) veya herhangi bir genetik kodlama fonksiyonuna sahip olmayan DNA dizilerinden geliştirilebilirler (Özcan 2001).

Asmalarda da tür ve çeşit karakterizasyonu, genetik bağlantı haritalarının oluşturulması ve melezleme çalışmalarında erken seleksiyon imkanlarının araştırılması gibi çeşitli amaçlara yönelik olarak gerçekleştirilmiş birçok moleküler markör çalışması vardır (Grando vd. 2000, Riaz vd. 2004, Regner 2007).

### **2.6.1 Bitki ıslah çalışmalarında moleküler markörlerin önemi ve avantajları**

Moleküler markörler, genom içinde bir DNA parçasının farklılıklarını temsil eder ve bu farklılıklar eklenmeler, silinmeler, yer değiştirmeler, duplikasyonlar gibi olaylardan meydana gelebilir. DNA temelli moleküler markörler taksonomi, fizyoloji, embriyoloji, genetik mühendisliği vb. alanlarda kullanılan çok yönlü araçlardır. Islah programlarında ilgili genle bağlantılı markörlerin kullanılmasının potansiyel faydaları son yıllarda anlaşılmaya başlanmıştır. 1970'lerin sonlarında DNA markörlerinin geliştirilmesiyle ıslah programları yön değiştirmiş ve araştırmacılar karakter ile bağlantılı markör geliştirme yoluna gitmişlerdir. Bu durum akademik araştırmalar için yeni bir çalışma sahası ortaya çıkarmıştır. Moleküler markörlerin geliştirilmesi, kantitatif karakterlerle çalışmayı daha kolay hale getirdiği için büyük ilgiyle karşılanmıştır (Ruana ve Sonnio 2003).

Bitki ıslahının amacı, ıslah popülasyonunda istenen allelerin frekansını arttırmaktır. Bu da fenotip ile allelin varlığı arasında korelasyon olmasını gerektiren seleksiyonla yapılabilir. Genetik markörler, fenotip ve genotip arasında bir korelasyon kurulmasını mümkün kılmaktadır. Islah çalışmalarında istenilen hedefe ulaşılabilmesi için öncelikle üzerinde çalışılan genotipik varyasyon potansiyelinin belirlenmesi gereklidir. Mevcut

genotipler içerisindeki genetik ilişkilere ait bilgiler, morfolojik bilgileri tamamlayıcı olarak ıslah populasyonlarının geliştirilmesinde büyük yarar sağlayacaktır. Bağcılıkta moleküler markör teknikleri ile ilgili çalışmaları yaklaşık 40 yıldır hızla ilerlemektedir. DNA markörlerinin teorik olarak sonsuz sayıda olduğu ve bireyin genomunun tamamını temsil edebilecek özellikte olduğu kabul edilmektedir. Bu markör teknikleri bağcılık araştırmalarında başlıca, parmak izi analizleri, genetik haritaların hazırlanması, doğrudan gen etiketlenmesi, genlerin klonlanması, gen transferi çalışmaları, evrimsel değişikliklerin takip edilmesi, kromozomlardaki yapısal farklılıkların saptanması, bitki genetik kaynaklarının muhafazası ve genetik çeşitliliğin artırılması gibi temel amaçlara yönelik olarak kullanılmaktadır (Weising vd. 2005).

DNA markörleri bireyler (çeşit, hat, tür vb.) arasındaki DNA seviyesindeki farklılıkları ortaya çıkarmaktadır. Eğer bu farklılık genomda tek bir bölgeyi gösteriyorsa bu bir allel olarak adlandırılır. Moleküler markörler, genomda çok fazla bulunmaları ve güvenilirlik açılarından oldukça büyük öneme sahiptir. Moleküler markörler, kaynağını bitkilerin hücrelerinde bulunan DNA'lerden alır. Günümüzde moleküler markörler bitki sistematğinde, ıslahında ve gen kaynaklarının değerlendirilmesinde etkin olarak kullanılmaktadır (Özcan 2001).

Sonuç olarak bitki ıslahında; moleküler markörler ile, markörler yardımıyla seleksiyon (MAS), QTL analizleri, genetik haritalama, gen izolasyon stratejileri, gen kaynaklarının karakterizasyonu, filogenetik analizler, kültür çeşitlerinin tanımlanması ve genetik akrabalığın belirlenmesi, ebeveynlerin belirlenmesi gibi analizler yapılabilmektedir.

Moleküler markörler morfolojik ve biyokimyasal markörlere göre birçok avantajlara sahiptirler. Bunlar;

1. Yüksek derecede polimorfik davranış,
2. Dominat ve kodominat özellik,
3. Genomda sıkça bulunma,
4. Genomda düzgün dağılım ve birden fazla bölgeyi belirleme imkânı,
5. Seçici nötr davranış,
6. Kolay ulaşım (satın alma veya hızlı işlemler sonucunda),

7. Kolay ve hızlı değerlendirme,
8. Tekrarlanabilir ve laboratuvarlar arasında standardize edilebilme,
9. Güvenilirlik,
10. Markörler öldürücü etkiye sahip değildirler,
11. Bütün dokularda tanımlanabilmektedirler,
12. Çevre koşullarından etkilenmemektedirler,

Bu özelliklerin hepsi bir moleküler markörde bulunmamaktadır. Ancak çalışmanın amacına en uygun olanı seçerken yukarıdaki özelliklerden en azından bir kaçının bir arada bulunması istenir (Botstein vd. 1980, Williams vd. 1990, Weising vd. 1995).

### **2.6.2 Moleküler markörlerin uygulama alanları**

1. Genetik kaynakların korunması, tür ve çeşit tanımlama,
2. Çeşitli hastalık ve zararlıların tanımında ve dayanıklılığına yönelik çalışmalarda,
3. Büyüme ve gelişmenin fizyolojik olayların mekanizmalarının açıklanmasında,
4. Çeşit ve anaç ıslahında, yeni ve üstün kalite ve verimlilik özelliklerine sahip çeşit geliştirilmesinde ve transgenik bitkilerin elde edilmesinde,
5. Embriyo transferi çalışmalarında,
6. Bitkide moleküler evrim ve evcilleştirilme prosesinin araştırmasında,
7. Meyve, sebzelerde tat ve aroma maddeleri ile beslenme değeri yüksek çeşitlerin geliştirilmesinde,
8. Kendine uyumsuzluk ve kısırlık görülen bitkilerde verimli çeşitlerin elde edilmesinde,
9. Küresel ısınmaya paralel olarak bu türlerin yetiştirilmesine yönelik araştırmalarda,
10. Meyve, sebze ve süs bitkilerinde muhafaza ve raf ömrünün modern biyoteknolojik yöntemler ile uzatılmasında,
11. Bitkilerde abiyotik stres faktörlerine dayanıklılığın, fizyolojik, biyokimyasal, genetik ve moleküler esaslarının belirlenmesinde kullanılması (Eriş ve Gülen 2004).

### **2.7 Moleküler Markör Teknikleri**

Tarih boyunca bir bölgedeki mevcut potansiyelin tanımlanması belli morfolojik özelliklere göre yapılmaya çalışılmıştır. Ancak bu özelliklerde kişiye ve çevre

koşullarına göre değişebilen tanımlamalardan dolayı araştırmacılar arasında zaman zaman görüş ayrılığının doğmasına neden olmuştur. Bu nedenle, son zamanlarda araştırmacılar, daha kesin sonuçlar elde edilebilen ve doğrudan DNA özelliklerinin incelenmesine imkan sağlayan yöntemlerin geliştirilmesi üzerine yoğunlaşmışlardır. Genomun özgün bir bölgesini tanımlamak amacıyla birçok markör sistemi kullanılmaktadır. Genom analizleri ve genetik çalışmalar başta olmak üzere moleküler çalışmalarda morfolojik, protein ve DNA markörleri olmak üzere 3 tip markör kullanılmaktadır (Liu 1998).

### **2.7.1 Morfolojik markörler**

Morfolojik markörler, genotipik tanımlama amacıyla kullanılabilir. Çok sayıdaki morfolojik markör insan, hayvan ve bitki genetik çalışmalarında kullanılmaktadır. Genler ve kromozomlar hakkındaki bilgi eksikliğinden dolayı ilk çalışmalar basit Mendel kalıtımı gösteren özellikler üzerinde yapılmıştır. Morfolojik karakterler, özgün genler için güvenilir indikatörler olarak kullanılabilirler ve bu özellikleri kodlayan genlerin kromozom üzerinde yerlerinin tanımlanmasında faydalı olmaktadır. Fenotipik özelliklerin genetik kontrol mekanizmasının tam bilinmemesi, yetersiz varyasyon ve bitkilerde aranan bazı fenotipik özelliklerin ortaya çıkışının uzun zaman alması, morfolojik markörlerin gözlenmesi kolay olmasına rağmen allel sayılarının nispeten az olmasından dolayı, bitki ıslahçıları daha hızlı ve doğru karar vermekte yardımcı olan, DNA markör sistemlerine yönelen diğer etkenlerdir (Liu 1998).

### **2.7.2 Protein markörler (izoenzimler)**

Hücreye özgü bir enzimin aynı biyokimyasal olayları katalize eden ve değişik genler tarafından kodlanan, farklı elektrik yüklü çoklu formları izoenzim olarak tanımlanmaktadır (Rothwell 1988). Bir enzimin uygun substrat ve kofaktörler ile gerçekleştirilen reaksiyon ürünlerinin, ürüne özgü uygun boyama ve elektroforez yöntemleri ile açığa çıkarılması izoenzim/protein markörlerin araştırılma tekniğinin temelini oluşturmaktadır. Bitkilerde ekstraksiyon kaynağına göre genel olarak, total protein (non enzimatik) veya izoenzim (enzimatik) analizi şeklinde uygulama alanı bulan bu markörler, son 20-30 yıllık dönemde genetik markörler alanında sağlanan

gelişmenin temelini oluşturmaktadır. İzoenzimlerin bitkilerde kullanımı; çeşit tanımlama, hibrit bitkilerin analizi, genetik haritalamalarda belirlenen izoenzim lokuslarına dayalı bağlantı (linkage) analizlerinin ortaya çıkarılması, izoenzim formlarının katılımının incelenmesi şeklinde gruplandırılmaktadır. Asmalarda ise izoenzim polimorfizmi, melezleme ile elde edilen ve birbirine yakın olan çeşit ve tiplerin tanımlamasında izoenzim teknikleri yaygın olarak kullanılmıştır (Wolfe 1976, Weeden vd. 1988, Uzun vd. 1996, Söylemezoğlu vd. 1998, Agaoğlu vd. 1999).

Morfolojik karakterlere göre çok daha etkili kullanılabilmeyle birlikte sıcaklık, stres koşulları, hastalık vb. faktörlerden etkilenmeleri, ayrıca etkili oldukları yer ve mevsimsel değişimlere göre farklılık göstermeleri ile izoenzim sistemlerinin (lokus ve allellerin) sayıca azlığı, bu markörlerin başlıca dezavantajları olarak kabul edilmektedir.

### **2.7.3 DNA markörler**

İki guruba ayrılmaktadır:

1. Hibridizasyona dayalı DNA markörler.
2. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)'a dayalı DNA markörler.

#### **2.7.3.1 RFLP tekniği (hibridizasyona dayalı DNA markörler),**

Bu grupta yer alan markörlerin en önemlisi RFLP tekniğidir. (RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism =Kesilmiş parça uzunluğu farklılığı). RFLP (Botstein vd. 1980), genomik DNA'yı belli nükleotid dizilerinden (restriksiyon bölgesi) kesen ve böyle değişik uzunlukta DNA parçaları oluşturan restriksiyon enzimlerinin kullanımı ile saptanmaktadır. Oluşan DNA parçalarının elektroforezde ayrıldıktan sonra naylon veya nitroselüloz membrana transfer edilerek DNA proplarıyla etiketlenmesi esasına dayanır. RFLP markörleri ile türler arasındaki ve içindeki farklılık belirlenir. Güvenilir, eşbaskın (ko-dominant) özellikte olup polimorfizm oranı orta düzeydedir (Yıldırım vd. 2001).

En önemli dezavantajı ise analizlerinin pahalı olması, fazla zaman alması, işgücü gerektirmesi ile fazla miktarda ve yüksek kalitede DNA'ya gereksinim duyulmasıdır. RFLP gibi kodominant markörler MAS ve evrim çalışmaları için yararlıdır ancak çok zaman gerektirir, nispeten pahalı olabilir ve yüksek oranda teknik uzmanlık gerektirir. Bağcılıkta RFLP çalışmalarının başlangıcı, F1 melez bireylerde 17 RFLP probu kullanarak segregasyon analizi yapan (Mauro vd. 1992), *Vitis* türlerinde bu tekniğin etkili sonuçlar ortaya koyabileceğini belirtmişlerdir. Kısaca RFLP tekniğinin uygulama alanı aşağıda gösterilmiştir (Çalışkan 2005).

**RFLP** → Prob tanımlama → Enzimle kesim → Southern blotting →  
Probla işaretleme → Hibridizasyon → Markör taraması

### **2.7.3.2 PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)'a dayalı DNA markörler**

1982 yılında PCR aletinin geliştirilmesi sayesinde canlıların doğrudan genomları hakkında geniş ve güvenli bilgilerin elde edilebilmesinde önemli gelişmeler kaydedilmiştir. Bu tarihten itibaren çeşitli amaçlara hizmet edebilecek yöntemlerin geliştirilmesi üzerine çok sayıda araştırma yapılmış ve günümüzde tür ve çeşitlerin genetik özellikleri hakkında DNA düzeyinde bilgilere ulaşılması sağlanmıştır. Tür ve çeşitlere ait DNA bilgileri çevre faktörlerinden etkilenmeksizin tüm dünyada benzer sonuçları verebilmektedir. Bu gelişmeler sayesinde dünyada bugün var olan birçok tür ve çeşidin genotipik özellikleri tanımlanmıştır. Bu gelişme ile bitki türlerinin DNA dizin haritalarının çıkarılması, genom üzerinde bulunan ve belli bazı karakterleri belirleyen genlerin yerlerinin saptanması ve ıslah çalışmalarında istenilen genlerin hedef bireyin genomuna aktarılması mümkün hale gelmiştir. Son yıllarda, DNA'yı oluşturan nükleik asit zincirlerinin arzu edilen herhangi bir noktadan ayrılması, çeşitli enzimlerden faydalanılarak farklı moleküler büyüklüklere sahip DNA parçaları elde edilmesi ve bu parçaların tekrar birleştirilmesi ve belli işlevlere sahip nükleik asit dizisinin (gen) bir hücreden başka bir hücreye aktarılmasına yönelik çalışmalara yoğun olarak rastlanmaktadır. PCR kaynaklı markör sistemlerinde oligonükleotidler 10-25 bp uzunluğunda primer olarak adlandırılır. Bu primerler genomda bağlandıkları yerlerin arasını, eğer 3-4 kb'nin altında olursa 1-1.5 milyon defa çoğaltırlar (Saiki vd. 1985).

Genomdaki değişik yerlerdeki polimorfizmi bulmak için primerler değişik şekilde tasarlanabilir. Farklı primerler veya primer kombinasyonları kullanılarak farklı markörler geliştirilebilir ve günümüzde sayıca çok miktarda bulunmaktadır. Aşağıda bitki biyoteknolojisinde kullanışlı olan bazılarını açıklamaktayız. Bunlar;

- RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)
- AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)
- SSRs (Simple Sequence Repeats)
- (cpSSR, mtSSR) Organel Mikrosatellitleri
- ISSR (Inter Simple Sequence Repeats)
- SCAR (Sequence Characterized Amplified Region)
- CAPS (Cleaved Amplified Polimorphic Sequence)
- SNP (Single/simple Nucleotide Polymorphism)
- SSCP (Single-strand Conformation Polymorphism)
- EST (Expressed Sequence Tag)

#### **2.7.3.2.1 RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) tekniği**

Williams vd. (1990) tarafından geliştirilen ve genellikle 10 (8-12 arası) bazdan oluşan rastgele seçilmiş primerlerin kullanıldığı RAPD, özellikle üzüm çeşit ve tiplerinin tanımlanmasına yönelik çalışmalarda sıkça tercih edilen tekniklerdendir. RAPD tekniğinin en yaygın uygulamalarından birisini, genomda haritalamaya gerek duyulmadan, istenilen bir özellik (morfolojik, fizyolojik veya biyokimyasal) ilişkili markörlerin tanımlanması oluşturmaktadır. Uygulamasının nispeten kolay ve maliyetinin düşük olması, az miktar ve orta kalitede DNA gerektirdiği, radyoaktif işaretleme gerektirmediği, görsel yönden kolay, DNA dizi bilgisi gerektirmediği, Otomasyon için uygun olması ve genomu iyi ifade ettiği için fazlaca tercih edilmesinin başlıca nedenleridir. Ancak bu yöntem, araştırmacılar arasında tekrarlanılabilirliği düşük olan yöntemler arasında gösterilmektedir. Bu sorunun çözümüne yönelik olarak reaksiyon karışımı, PCR reaksiyonu optimizasyonu ve elektroforez işlemi sonuçlarının değerlendirilmesi hususunda çeşitli araştırmalar yürütülmüştür. İlk çalışmalarda (Regner ve Messner 1993), 12 üzüm çeşidinin 16 RAPD primeri ile moleküler

karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Araştırmacılar, çalışılan üzüm çeşitleri arasında saptanan moleküler benzerliklerin ampelografik özelliklerinden bağımsız olarak ortaya çıktığını bildirmişlerdir. RAPD bantlarının sayısının asmalarda genotipik farklılıkların değerlendirilmesi amacıyla oluşturulan soyağacı üzerine etkilerini araştıran Fanizza vd. (2003), 10 üzüm çeşidi ile çalışarak 320 primerden 1683 bant (932'si polimorfik) elde etmişlerdir. Araştırmacılar bant sayısının 100-150'nin altına düşmesi durumunda genetik ilişki dendogramında önemli farklılıkların meydana geldiğini bildirmişlerdir.

Ergül vd. (2002) çalışmalarında 17 üzüm çeşidi 22 RAPD primeri ile tanımlanmış, kullanılan çeşitlerin genetik ilişkileri ortaya koyulmuş ve çalışılan çeşitlerin genetik benzerliklerinin temelde orijinleri ile ilgili olduğu sonucuna varılmıştır.

#### **2.73.2.2 AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) tekniği**

AFLP tekniği RAPD tekniğinin dezavantajlarını gidermek üzere geliştirilmiştir.

1. DNA'nın restriksiyon enzimleri ile kesilmesi (EcoRI/MseI) ve biyotinle işaretlenmesi,
2. Adaptör kullanılarak restriksiyon fragmentlerinin uygun bir DNA ligaz ile birleştirilmesi,
3. Ligaz edilen bu adaptörlere uygun primer ile restriksiyon fragmentlerinin preamplifikasyonu,
4. Bu fragmentlerin özel oluşturulan ve radyoaktif işaretlenmiş primerlerle gerçek amplifikasyonu ve PAGE (poliakrilamid jel elektroforez) koşulmasıdır (Ergül 2000).

Her iki primer çiftinin sonundaki seçici bazlar değiştirilerek veya değişik kombinasyonlar da kullanarak her seferinde yeni fragmentler klonlanır ve bu yolla yeni polimorfizm elde edilir ki bu özellik bu yöntemin en büyük avantajını oluşturur. Polimorfizm oranı çok yüksektir, bütün türlerde uygulanabilir, DNA dizi bilgisi gerektirmez, küçük RFLP parçacıkları ile çalışabilmesi ve RAPD ve RFLP yöntemleri arasındadır, karşılaştırılırsa RAPD tekniğine göre kolay olmasa da RFLP tekniğine göre çok kolay olduğu için bu tekniğin en büyük avantajlarından sayılır. Dezavantajlarına baktığımızda, kuruluş aşamasında maliyet gerektirir. Çok hassas olması, bant desenlerini etkileyebilir. İyi seçilmiş primerler gerektirir. Kararlı haritalar oluşturmaz.



Masraf, iş gücü gereksinimi ve güvenilirliği RAPD ve RFLP arasında yer alır. Pahalı olmasından dolayı, bu teknolojinin MAS (Markör Aracılığıyla Seleksiyon)'da kullanılabilmesi için otomasyonu gerekmektedir. Ergül vd. (2002) Klonların kullanıldığı bir çalışmada, Kalecik Karası klonlarının genetik analizlerinde 3 primerin klonal polimorfizm sağladığını bildirmişlerdir. Morfolojik farklılıklar gösteren misket aromalı çeşitlerin AFLP tekniğine dayalı genetik ilişkilerini araştıran (Söylemezoğlu vd. 2005a) 13 primer kombinasyonundan % 35.5 oranında polimorfizm elde ettiklerini ve UPGMA analizlerine göre, kullanılan genotiplerin İskenderiye Misketi'nin doğal melezlenmelerinden oluşabileceğini ileri sürmüşlerdir. Söylemezoğlu vd. (2005b) başka bir çalışmalarında 5 *EcoRI/MseI* enzim kombinasyonuna dayalı AFLP tekniği ile UPGMA analizleri ile asma anaçlarının benzerlik oranlarını elde ederek bu anaçlar arasındaki akrabalık ilişkilerini ortaya koymuşlardır. Ergül vd. (2006), önemli sofralık üzüm çeşitlerimizin bulunduğu misket ve parmak grubu üzüm çeşitlerinin genetik benzerliklerini AFLP yöntemi ile araştırılarak homonim ve sinonimleri belirlemişlerdir.

#### **2.7.3.2.3 SSRs (Simple Sequence Repeats) tekniği**

STR (short tandem repeats) ya da "*Hipervariable Sequences*" denilen, mikrosatellit olarak da bilinen tekrarlı nükleotid dizileridir (2-4 baz uzunluğundaki bitki genomunda bulunan (GA)<sub>n</sub>, (CA)<sub>n</sub>, (AT)<sub>n</sub>, (ATA)<sub>n</sub>, (CTT)<sub>n</sub> ve (GATA)<sub>n</sub> gibi çekirdek dizilerini içeren) markörleri içermektedir. SSRs (bitkilerde mikrosatellit) olarak bilinmektedir (Kochert 1994, Staub ve Serquen 1996). Bu dizilerin kullanıldığı tekniklerden olan SSR, son yıllarda bağcılıkta en fazla kullanılan mikrosatellit markör tekniği olmuştur. Genom üzerinde bol miktarda bulunması, yüksek oranda polimorfizm göstermesi, hızlı, kolay olması, Mendel kalıtımına uygunluğu, ko-dominant ve kararlı markör sistem olması ve farklı laboratuvarlarda tekrar üretilebilir olması, bilgilendirici bir markör sistemi oluşundan dolayı populasyon genetiği ve gen haritalama çalışmalarında etkin olarak kullanılabilir ve bu teknik özellikleri sayesinde bu markör teknikleri çalışmalarda daha çok tercih edilmektedir (Scott vd. 2000b). Bu markör sisteminin dezavantajı ise mikrosatellit bölgelerinin mutasyon oranlarının yüksek olması primer bağlanma bölgelerinde değişmeye neden olmakta ve böylece anlamsız allellerin oluşmasına imkân sağlamaktadır. Böylece genotipik ve allelik frekasların doğru

yorumlanmaması bazı tartışmalara da yol açmaktadır. Asmada son yıllarda yapılan çalışmalarla değişik araştırmacılar tarafından 400'e yakın SSR lokusu tespit edilmiş olup (Thomas ve Scott 1993, Sefc vd. 1997), bu yöndeki çalışmalar devam etmektedir. SSR markörlerinin diğer dezavantajı ise, bir türe ait yeni mikrosatelitlerin elde edilmesi, klonlama ve dizi analizi çalışmalarını gerektirmesidir (Büyükunal-Bal 2003).

*Vitis vinifera* türüne ait Sultana ve Cabernet Sauvignon çeşitleri ile *V.berlandieri* türüne dahil olan bazı genotiplerin 5 SSR primeri ile karakterizasyonunu yapan Thomas ve Scott (1993), asma genomunun kısa tekrar dizileri bakımından zengin olduğunu belirlemişlerdir. Araştırmanın sonuçlarında, bu kısa tekrar dizilerinin bireye özgü olarak değişebileceği ve bu sayede genotipler arasında polimorfizm elde edilebileceği bildirilmiştir. Sefc vd. (1997), 51 üzüm çeşidinin 24 SSR markörü ile genotipik yapılarını incelemişlerdir. Analiz edilen genom bölgelerinin olasılık oranlarının toplamı sonucunda elde edilen genetik benzerliklerinin değerlendirilmesi ile Cabernet Sauvignon çeşidinin, Cabernet Franc ile Sauvignon Blanc melezi olduğu belirtilmiştir.

Vouillamoz ve Grando (2006), Avrupa'nın farklı coğrafi bölgelerinde yetiştirilmekte olan 89 üzüm çeşidinin akrabalık ilişkilerini 60 SSR markörü ile araştırmışlardır. Çalışmada, Fransa ve İtalya'da yetiştirilen bazı çeşitler arasında muhtemel yakın akrabalık dereceleri belirlenmiş ve elde edilen sonuçlar genotiplerin ampelografik özellikleri ile paralel sonuçlar ortaya koymuştur.

SSR tekniği uygulamalarında; genom boyunca tekrarlanan dizilerin iki yanından primerlerce PCR'da çoğaltılması ve jel ortamında görüntülenmesi veya kapilar elektroforez büyüklüklerine göre sıralanması esasına dayanır. Sonuçların görüntülenmesi ise, radyoaktif işaretleme, gümüş boyama veya otomatik dizi analizi sistemi ile olur. Otomatik dizi analizi sisteminde allel büyüklükleri, fluoresan işaretli primer yardımıyla pikler şeklinde görülür (Najafi vd. 2006, Di Gaspero vd. 2007, Şelli vd. 2007, Boz vd. 2011, Ergül vd. 2011, Doulati-Baneh vd. 2013, Emanuelli vd. 2013).

#### **2.7.3.2.4 Organel Mikrosatellitleri (cpSSR, mtSSR)**

Bitki organel genomları (kloroplast DNA-mitokondriyal DNA) populasyon genetiği çalışmaları ve filogenetik akrabalık ilişkilerinin ortaya çıkarılmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Organel genom kalıtımı pek çok bitkide anneye bağlı olarak gerçekleşmekte, kloroplast ve mitokondri allelleri çekirdek allellere göre farklı bir genetik yapı sergilemektedir. Çekirdek mikrosatellitleri yanında, bitki populasyon genetiği, filogenetik ve evrimsel genetik çalışmalarında kullanılmak amacıyla kloroplast mikrosatellit (cpSSR) ve mitokondri mikrosatellit (mtSSR) temelli markörler geliştirilmiştir. Kloroplast mikrosatellitleri, pek çok bitki türünde sitoplazmik varyasyonların ortaya çıkarılmasında kullanılan etkili birer araçlardır (Provan vd. 2001).

Kloroplast mikrosatellitler, üreme sistemleri çalışmaları, polen ve tohum yoluyla gen akış oranlarının tespiti ve türler arası hibridizasyon çalışmalarında, genetik çeşitlilik çalışmalarında, filocoğrafik çalışmalarda etkili olarak kullanılmaktadırlar (Agarwal vd. 2008).

Bitkilerdeki mtDNA hayvan hücrelerindeki mtDNA'ya göre daha karmaşık ve büyüktür. Bunun yanında, dairesel kromozom şeklindeki mtDNA moleküler bir heterojenlik göstermekte ve yüksek orandaki reorganizasyon yeteneğinden dolayı bitki filogenetik çalışmalarında çok tercih edilmemektedir. Özellikle açık tohumlu bitkilerde populasyon farklılaşmalarının araştırılmasında heterojen özelliklerinden dolayı sıkça kullanılmaktadır (Sperisen vd. 2001).

#### **2.7.3.2.5 ISSR (Inter- Simple Sequence Repeats) tekniği,**

RAPD ile maliyeti yaklaşık olarak aynı olan ISSR tekniği RAPD'e göre oldukça güvenilir, tekrarlanabilirlik oranı yüksek ve PCR koşullarından çok etkilenmeyen bir tekniktir. ISSR tekniği, çoğunlukla dinükleotid veya trinükleotid tekrarlarından oluşan primerler kullanılır. Kullanılan primerlerin mikrosatellit bölgelerinden çoğaltılmış olmaları ve "annealing" sıcaklıklarının yüksek olması ile RAPD tekniğinden ayrılır.

ISSR tekniği ile ilgili çalışmalar 1994 yılında başlamış Gupta vd. (1994) ve sonraki çalışmalarda bu tekniğin bitki türlerindeki varyasyonu belirlemede yüksek etkiye sahip olduğu saptanmıştır (Nookaraju vd. 2012, Zhaobin vd. 2013).

Tekrarlanabilirliğinin yüksek, maliyetinin nispeten düşük olması ve genotipik varyabilitiyi belirlemede etkin olmasına rağmen günümüzde bağcılık araştırmalarında ISSR tekniğinin kullanıldığı çalışma sayısının az olduğu görülmektedir. 15 ISSR primeri kullanarak 15 üzüm çeşidinin genom polimorfizmini belirleyen Wu vd. (2006)'da %86.7'lik oranla yüksek polimorfizm elde ettiklerini bildirmişlerdir. Araştırmacılar *Vitis amurensis* ve bu tür ile *Vitis vinifera* melezlerinden oluşan çeşitler arasında genetik benzerlik oranı 0.27-0.75 arasında değişirken çeşitlerin ait oldukları türlere göre iki ana grupta toplandığını bildirmişlerdir. Bu teknik genetik çeşitlilik, sınıflandırma, moleküler markör bulma çalışmaları, evrim ve genom haritası oluşturma çalışmalarında son yıllarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Fang ve Roose 1997).

#### **2.7.3.2.6 SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) tekniği**

Bir gen veya özellikle ilişkili genomun belirli bir bölgesinden geliştirilen dominant ya da kodominant markörlerdir. Bu markör çoğunlukla genomda tek bir bölgeden kaynaklanmaktadır. SCAR markörler genetik haritada belirli bir gen ya da özellikle bağlantılı olarak tespit edilen RAPD- AFLP gibi bantlardan yola çıkılarak geliştirilir. Sözü edilen RAPD ya da AFLP bandı klonlanır ve sekans analizi yapılır. RAPD ya da AFLP primeri sekansta belirlendikten sonra 3'ucundan 24-26 bp uzunluğa kadar uzatılarak yeni bir primer geliştirilir. Yeni geliştirilen primer sekansa özgü markör oluşturmak üzere kullanılır.

1. Bu teknik spesifik bir gen bölgesinin çoğaltılmasını mümkün kılar,
2. Tekrarlanabilir ve farklı genetik materyalde kullanılabilir özelliktedir,
3. Marköre dayalı seleksiyon amaçlı kullanıma uygundur,

Diğer bir ifade ile istenilen bir RAPD markörünün kullanımı, u kısımlarının dizilerinin belirlenmesi ve daha uzun primerler (24 nükleotid gibi) oluşturmakla arttırılabilir (McDermott vd. 1994).

Bu tür dizileri belirlemiş çoğaltılmış bölgelerde (SCAR) DNA dizi farklılıkları tek eşsiz bir bandın varlığı/yokluğu ile belirlenir. SCAR, RAPD'e göre daha fazla tekrarlanabilir ve elektroforezde var/yok dağılımlarına dönüştürülebilirler. SCAR'lar genelde dominant markörler olmalarına rağmen 4 baz çifti restriksiyon enzimleri ile parçalanmaları ve DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) veya SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) teknikleri ile tanımlanmaları suretiyle kodominant markörlere dönüştürülebilirler (Rafalski ve Tingey 1993).

SCAR markörler asmada genetik haritalama çalışmalarında kullanıldığı gibi, direk parmak izi çalışmalarında da kullanılmaktadır. Asma anaçlarının parmakizi çalışmalarında kullanılmak üzere RAPD orjinli değişik SCAR markörler geliştirilmiştir (Xu ve Bakalinsky 1996, Söylemezoğlu 2002, Zyprian 2003).

Lahogue vd. (1998), tarafından bulunan *sdI* genine bağlı RAPD markörleri, Sultana kökenli kısmen çekirdeksiz iki genotipin melezlenmesi ile elde edilen populasyonda BSA (Bulked Segregant Analysis) yöntemi ile araştırılmıştır, OPC-08 RAPD markörü SCAR markörüne (SCC8) dönüştürülmüştür.

#### **2.7.3.2.7 CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence) tekniği**

CAPS, PCR ve RFLP'nin kombinasyonu ile ortaya çıkmıştır ve aslında PCR-RFLP Maeda vd. (1990) metodu olarak tanımlanmaktadır. Bu teknik, PCR reaksiyonu ile çoğaltılan ürünlerin restriksiyon enzimleriyle kesilmesi ve elektroforezle büyüklüklerine göre ayrılan bu kesilmiş fragmentlerin tespitini içerir (Konieczny ve Ausubel 1993, Michaels ve Amasino 1998).

Primerler cDNA veya genomik DNA klonlarından, klonlanan ve DNA zincirleri tespit edilen RAPD veya ISSR bantlarından elde edilir. CAPS markörde kritik adım, DNA izolasyonu, PCR'in durumu ve polimorfik bölgelerin dağılımı veya sayısıdır. CAPS markörünün birçok avantajı var, birincisi; bu markörün analizi sadece PCR'a bağlı olduğundan oldukça kolaydır ve fazla zaman kaybı diğerlerine göre bulunmamaktadır.

İkincisi; EST'den gelişen CAPS primerleri, diğer genomik SSR markörlerinden gelişenlere göre genetik haritalama çalışmalarında daha yararlı sonuçlar vermektedir. Üçüncüsü; CAPS markörleri ko-dominant davranış içerisindedir. Ama CAPS markörlerin, SSR ve AFLP'ye göre polimorfizm oranı daha düşüktür. Bundan başka mutasyonlarda CAPS markörlerin gelişimi, belli mutasyonların bölgenin oluşturulması veya bozması sebebi ile bir restriksiyon enziminin oluşturulmasıdır. Bunu engellemek için bazı araştırmacılar CAPS'ten bir alternatif markör (dCAPS) oluşturarak CAPS ile ilgili oluşan mutasyon bölgede problemleri yok ediyor (Michaels ve Amasino 1998).

#### **2.7.3.2.8 SNP (Single/simple Nukleotid Polymorphism) tekniği**

Bitkilerdeki fenotipik varyasyonların birçoğunun kaynağını genlerdeki nükleotid sekans polimorfizmi oluşturmaktadır. Bu şekilde varyasyonlar, DNA analizine yönelik çeşitli markör tekniklerle (RFLP, CAPS, SSR, AFLP) ortaya konulabilmektedir. Ancak fenotipik varyasyonun ana kaynağını oluşturan, genlerdeki birçok mutasyon şekilleri bu yöntemlerle etkin bir şekilde tanımlanamamaktadır. Bu nedenle genlerdeki özel mutasyonların belirlenmesine yönelik SNP analizi gerekmektedir. Genomda birçok SNP bulunmakta ve genlerde bulunan bazı SNP markörler önemli özellikleri karakterize etmektedir. Bu nedenle, genlerdeki SNP'ler çeşitlerin genetik tanımlanmasında oldukça etkin markörlerdir. Genlerdeki SNP'lerin tanımlanmasında PCR-SSCP analizi ile çok yüksek oranda başarının eldesi mümkün olabilmektedir (Shirasawa vd. 2004).

*Vitis vinifera*'da SNP'lerin tanımlanmasında SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) tekniğinin oldukça etkin olduğunu vurgulayan çok yeni bir çalışmada 78 bp'da 1 SNP olduğu belirtilmektedir (Salmaso vd. 2005).

SNP'ler genetik çeşitlilik, populasyon yapısı, kantitatif özellik lokusları (QTL), markör destekli seleksiyon (MAS) çalışmalarında ve ailesel ilişkilerin araştırılmasında yaygın kullanılmaktadır. Bu yöntemin avantajları; PCR'a dayalı, kodominant, sonuçları net, tekrarlanabilir. Dezavantajlar; Sekans bilgisi şart, her lokusta yoktur, düşük polimorfizm, poliploidlerde kullanımı zordur (Özcan vd. 2001).

### 2.7.3.2.9 SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) tekniği

SSCP tekniği genelde, orijinal olarak mutasyonların hızlı analizi için ilk olarak Orita vd. (1989) tarafından bildirilmiştir. Bir DNA dizilim bölgesindeki (1000 baz çiftinden daha kısa) dizi varyantları ve mutasyonları (özellikle nokta mutasyonları) belirlemede kullanılan bir markör sistemidir. PCR ile çoğaltılan bir genom bölgesi, uygun ısıda denatürasyona tabi tutularak mutasyon bölgesinde II. ve III. DNA konformasyonlarının oluşturulması esasına dayanmaktadır. Varyasyona bağlı olarak oluşan II. ve III. konformasyondaki DNA molekülleri jel elektroforezinde farklı bant profilleri oluşturularak varyantların tespitine olanak sağlamaktadır. Teknoloji olarak basit olmasına rağmen, her bir mutasyon için farklı ortamların oluşturulması gerekliliği, bu tekniğin uygulamasını kısıtlayan en önemli etkidir. Mutasyon içeren DNA molekülü tek baz bile farklı olsa normal dizide değişik bir yapı oluşturacağından farklı yerlerde bandlaşma gözlenmektedir. Normal ve incelenen örnek arasında fark olması mutasyonun varlığını göstermektedir. Nokta mutasyonlarının DNA dizi analizi ile kesin olarak teşhis edilebilmesine rağmen taranacak DNA fragmenti büyüdükçe teşhis süresi ve analiz maliyeti artmaktadır. Bunu önlemek amacıyla mutasyon içeren gen, kısa DNA parçacıkları (200 bp) halinde amplifiye edilip SSCP yöntemiyle taranarak mutasyonun bulunduğu fragment belirlenir. Böylece, büyük bir genin tümünü analiz etmek yerine sadece mutasyon içeren parçanın incelenme sürecini kısalttığı gibi maliyeti de azaltmaktadır. Burada asıl amaç mutasyonun bulunduğu bölgeyi belirlemektir. SSCP markörler özellikle, insan genetiği çalışmalarında, genlerde oluşan mutasyonları belirlemeye yönelik, tıpta hastalıkların tanı ve teşhisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Seifert vd 1997).

Genetik varyasyonun belirlenmesinde, laboratuvar koşullarında uygulama kolaylığı sağlaması, ekonomik olması ve hassas bir yöntem olması SSCP markörlerin önemli avantajlarını oluşurmaktadır (Sunnucks vd. 2000).

### 2.7.3.2.10 EST (İfade Edilmiş Dizi Etiketleri) kullanımı

Kodlama yapan genom bölgeleri mesajcı RNA'ya transkripte olarak protein sentezi için kalıplık görevi görmektedir ve günümüzde ters transkriptaz enzimi kullanarak RNA'dan komplementer DNA (cDNA) elde edilmektedir. cDNA RNA'dan üretilen kararlı bir yapı olup, yapısındaki intronlar kırılarak (splicing) ekzonlardan oluşmuş, anlatımı yapılan bir genin dizilenmesi ile 5' EST veya 3' EST (Expressed Sequence Tag) olarak ifade edilirler. 5' EST genelde kodlama yapan bölgelerden (ekzon) elde edilir ve bu bölgeler genelde türler arası korunmuştur ve gen aileleri içinde çok fazla değişmezler. 3' genelde kodlama yapmayan bölgelerde (intron) veya translasyona uğramayan bölgelerden (UTR) elde edilir ve kodlama yapan bölgelere oranla türler arasında daha az korunaklıdır. Günümüzde EST belirlenmesi çok hızlı ve kolay şekilde yapılabilmekte, dijital veri bankalarında yaklaşık 6.5 milyon EST dizisi bulunmaktadır. EST dizileri, gen transkriptlerinin belirlenmesi, gen keşifleri, gen anlatımı ve düzenlenmesiyle ilgili bilgi edinilmesinde, dizi belirlenmesinde ve EST temelli RFLP, SSR, SNP, CAPS gibi önemli moleküler markör sistemlerinin geliştirilmesinde bir araç olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, EST dizileri DNA mikroarray çalışmalarında gen anlatımlarının belirlenmesinde prob olarak, genetik bağlantı haritaları ve fiziksel haritaların oluşturulmasında da kullanılabilir (Kurata vd. 1997).

EST dizileri SSR dizileri için yararlı bir kaynaktır ve çeşitli bitki türlerindeki EST dizilerinin yaklaşık %1-5 arası 20 baz çifti veya daha fazla uzunlukta SSR bölgeleri barındırmaktadır. EST-SSR bölgeleri, transkripte olmayan bölgelere oranla daha korunaklı olan transkripsiyon bölgelerinde bulunmakta ve yakın türlere transferleri mantıklı görünmektedir. EST dizilerinden elde edilen primerler kullanılarak ilgili bölgenin çoğaltılması ve dizilerek kıyaslanması pek çok SNP'yi ortaya çıkarabilir. Temel olarak, EST markörleri ilgi alanındaki spesifik genlerin klonlanmasında, komple genom dizilenmesinde, çeşitli akraba organizmalardaki fonksiyonel genlerin haritalanmasında çok popülerdir (Kesawat ve Das 2009).



## 2.8 MAS (Marköre Dayalı Seleksiyon) ve Bitki Islahındaki Uygulama Alanları

Marköre dayalı seleksiyon (MAS) kavramı yaklaşık 30 yıl önce Smith ve Simpson (1986) ile Soller ve Beckmann (1983) tarafından ifade edilmiştir. MAS uygulamalarının gelişimi ilk mısır ile başlamış ve bunu buğday takip etmiştir. Bu yöntemle; özellikle hastalık ve zararlılara dayanıklılık, üzümelerde çekirdeklilik/ çekirdeksizlik veya herhangi bir maddenin sentezi ile ilişkili markörler kullanarak seleksiyon gerçekleştirilmektedir. Böylece zamandan ve enerjiden tasarruf ederek kısa zamanda istenilen özelliğe sahip bitkileri belirleme, gerektiğinde ıslah çalışmaları başlangıcında ebeveyn olarak kullanma gibi avantajlara sahip olunabilir (Ben- Ari vd. 2012).

Bu teknik klasik ıslahı tamamlayıcı, oldukça hızlı, etkin, doğru ve ekonomik bir seleksiyon yöntemidir. Ancak tek başına klasik ıslah metotlarının yerine kullanılabilen bir yöntem değil, aksine klasik ıslahın başarısını arttıran tamamlayıcı ve yardımcı bir tekniktir. Gelişen markör teknolojisi ve markör destekli seleksiyon tekniği sayesinde yapılacak olan asma ıslahı çalışmaları daha etkili bir şekilde yürütülebilmekte ve klasik ıslaha oranla çok daha kısa bir sürede başarılı ve güvenilir sonuçların elde edilmesi mümkün olmaktadır. Markör destekli seleksiyon, asmada geri melez ıslahında, gen piramitlerinin oluşturulmasında, resesif genlerin seleksiyonunda, çevre faktörlerinin ekstrem olduğu, zaman ve ekonomik avantajlar sağlayarak ıslah etkinliğini artıran ve yeni çeşitlerin geliştirilmesini hızlandıran bir tekniktir. Bitki ıslahında kantitatif karakterleri etkileyen genlerin klasik ıslah metotlarıyla aktarılmasında özellikle bağlantı sürüklenmesi (linkage drag) gibi birçok problemle karşılaşmaktadır. Markör destekli seleksiyon önem arz eden ve birden fazla gen veya lokus tarafından kontrol edilen karakterlerin hızlı bir şekilde aktarılmasını sağlamaktadır (Sönmezoğlu vd. 2010).

Asma, çok yıllık bir bitki türü olduğundan kombinasyon ıslahı çalışmalarında daha uzun süre ve işgücü gerektirmektedir. Moleküler markör tekniklerinde kaydedilen hızlı ilerlemeler, araştırmacılara markörler yardımıyla erken seleksiyon imkanı sunmuştur. “Marker Assisted Selection” (MAS) denen bu yöntemde üzerinde çalışılan özelliğe ait markörler önceden belirlenip işaretlenmekte ve çok erken dönemde genç bitkilerin DNA

örneklerinde bu markörler araştırılarak erken seleksiyon imkânı sağlanabilmektedir. Doğru markör seçimi MAS için başarılı sonuçlar elde etmek çok kolay olacaktır, örneğin RFLP gibi kodominant markörler MAS ve evrim çalışmaları için yararlıdır, ancak çok zaman alıcı, nispeten pahalı olabilir ve yüksek oranda teknik uzmanlık gerektirir. Yeni bir tür için RFLP markör sistemi geliştirmenin çok pahalı olması veya yüksek miktarda DNA'ya ihtiyaç göstermesi ve yavaş taraması nedeniyle MAS'da etkinliğinin olmaması ve çoğunlukla PCR-tabanlı sistemlerden birinin kullanma zorunluluğunu ortaya çıkarır.

MAS çalışmalarının avantajları aşağıda özetlenmiştir,

1. Fenotipik taramaya göre daha kolay bir metottur, Özellikle tanımlanması zahmetli özelliklerde zaman ve kaynak israfını engeller.
2. Çevresel faktörlerden etkilenmediği için güvenilirliği yüksektir, Homozigot ve heterozigot ırkları ayırarak tek bitkinin seçimini sağlar.
3. Ülkemizde var olan genetik kaynakların tam bir kimlik tespitlerinin yapılmasını bu yolla genetik rezervin korunmasını sağlar.
4. Herhangi bir çeşit karışıklığı durumunda ayırımı ve bu yolla çeşitlerin satış işlemi gibi ticari haklarının korunmasına yardımcı olur.
5. Spesifik özellikteki genotiplerin daha titiz, doğru şekilde ayırımı sağlar (Vardar-Kanlıtepe vd. 2010).

MAS çalışmalarında yaklaşımlar aşağıdaki şekilde özetlenebilir,

1. Geri melezleme: İstenilen bölgenin etkili bir şekilde seçimini sağlar, bağlantı taramalarını minimize eder, tekrar eden ebeveynlerin tespitini kolaylaştırır.
2. Piramitleme: Patojenlerin spesifik dozları için çoklu hastalık direnç genlerinin tespitinde hız sağlar.
3. Erken Safhada Döl Seçimi: Daha sonraki F2 ve F3 ıslah programları ile ilgili MAS'ın kaynağı tespit olduğundan dolayı avantaj sağlar.
4. Birleştirilmiş yaklaşımlar: Bazı durumlarda fenotipik çalışmalar ile MAS'ı birleştirmek faydalı olabilir (Hafez vd. 2006).

Sonuç olarak, son yıllarda moleküler biyolojide görülen hızlı ilerleme, bitki genetiği çalışmalarında, üretimi, genetik çeşitliliğin korunması, ıslah gibi hedefler doğrultusunda kullanımına çok büyük ve önemli katkı sağlamıştır. Fakat bu markör yardımcı moleküler biyolojik uygulamalar, moleküler markörlerin tamamlayıcısı olmaktadır. Zaman içerisinde, Markör destekli seleksiyon (MAS) uygulanan bitki ıslahı çalışmaları, dayanıklı bireyler hızlı şekilde belirlendiği için ıslah çalışmalarına büyük bir ivme kazandırmakta ve yalnızca istenilen bireylerle yola devam etmeyi sağlamaktadır. Bütün bu uygulamaların devamında spesifik bir özelliği kontrol eden çoklu genlerin dizi haritalarında bulunduğu bölge adlandırılan, Quantitative Trait Loci (QTL) Populasyonların ayırımında kullanılan etkili bir yöntem olarak, böylece genom dizi haritaları geliştirilir (Staub ve Serquen 1996).

Çizelge 2.14'de Mildiyö, külemeye dayanıklılık ıslahında, Marköre Dayalı Seleksiyon yardımı ile yapılan çalışmalar yer almaktadır (Anonymus 2013).

Çizelge 2.14 Mildiyö, küleme ve çekirdeksizlik asma ıslahında, Marköre Dayalı Seleksiyon yardımı ile yapılan çalışmalar

Markör	Yakın primer	Kromozom	Orijin genotip	Referans
<i>Ren1</i>	UDV-020,VMC9h4-2, VMCNg4e10.1(260bp), UDV124(216 bp)	13	Nimrang x Kishmish vatkana	Hoffmann vd. 2008, Riaz vd. 2013
<i>Ren 2</i>	Cs25 (CAPS) 997 bp <i>Rsa I</i> ve <i>Taq I</i> kesim enzimi	14	Horizon' x Ill. 547-1 ( <i>V. rupestris</i> x <i>V.</i> <i>cinerea</i> )	Dalbo vd. 2001
<i>Ren 3</i>	UDV-015b, VVIv67	15	Regent x Lemberger	Welter vd. 2007
<i>Ren 4</i>	VMC7f2, VMC3e5f, Vvim93, Vvin16, VVMD17, VMC2a3, GR0520, IN0954 ve SNP'ler	18	<i>V. romanetii</i>	Riaz vd. 2013, Mahani vd. 2012
<i>Ren 5</i>	VMC9c1 R: 132/132 S: 146:146	14	<i>V. vinifera</i> * <i>M.</i> <i>rotundifolia</i>	Blanc vd. 2012
<i>Rpv1</i>	VVIb32,VMC3B8,VMC2 H4,VCHR12B, UDV-024, VMC1G3.2, GF12-05, MCNG2H7, VMC8G9,	12	28-8-78 ve <i>M.</i> <i>rotundifolia</i> (Syrah)	Merdinoglu vd. 2003, Schwander vd. 2012
<i>Rpv3</i>	UDV-112, VMC7F2, UDV737, GF18-11, UDV 305, , VrZAG14, UDV 108	18	Regent x Lemberger Chardonnay x Bianca	Welter vd. 2007 Bellin vd. 2009
<i>Rpv4</i>	VMC7h3 4, VMCNg2e1	4	Regent x Lemberger	Welter vd. 2007

Çizelge 2.14 mildiyö, külleme ve çekirdeksizlik asma ıslahında, Marköre Dayalı Seleksiyon yardımı ile yapılan çalışmalar (devam)

<i>Rpv5</i>	VVIo52b	9	Gloire de Montpellier ve <i>V. riparia</i>	Marguerit vd. 2009
<i>Rpv 6</i>	VMC8G9	12	Gloire de Montpellier ve <i>V. riparia</i>	Marguerit vd. 2009
<i>Rpv7</i>	UDV-097	7	Chardonnay x Bianca	Bellin vd. 2009
<i>Rpv8</i>	VVIp05, Chr14V015, VVIp22	14	<i>V. vinifera</i> * <i>V. amurensis</i> (Ruprecht)	Blasi vd. 2011
<i>Rpv9</i>	CCoAOMT,	7	Moscato Bianco x <i>V. riparia</i>	Moreira vd. 2011
<i>Rpv10</i>	GF09-46, GF09-65	9	Solaris ve <i>V. amurensis</i>	Schwander vd. 2012
<i>Rpv11</i>	VR ZAG 79, VCHR05C, VMC3B9, VVMD27, VVMD5	5	Regent x Lemberger 153 Chardonnay x (2009)	Fischer vd. 2004, Bellin vd. 2009, Schwander vd. 2012
<i>Rpv12</i>	UDV-014, UDV-304, rgvvin180, UDV 370	14	99-1-48 ve <i>V. amurensis</i>	Venuti vd. 2013
<i>Rpv13</i>	VMC1G3.2	12	Moscato Bianco x <i>V. riparia</i>	Moreira vd. 2011
<i>Run1</i>	VMC4f3.1 (184 bp), VMC8g9	12	VRH3082-1-42 x Cabernet S. (rotundifolia)	Barker vd. 2005
<i>Run2.1</i>	VMC7f2, VMCNg1e3, VVin16	18	Magnolia ve <i>M. rotundifolia</i>	Riaz vd. 2011
<i>Run2.2</i>	VMC7f2,	18	Trayshed ve <i>M. rotundifolia</i>	Riaz vd. 2011

## 2.9 Genetik Linkage (bağlantı) Kavramı

Genetik markörlerin en önemli kullanım alanı genetik haritaların hazırlanmasıdır. Gen haritalaması genlerin ve markörlerin kromozomlar üzerinde bulunduğu yerlerin ve birbirlerine olan uzaklıkların tespit edilmesidir. Thomas Hunt Morgan (1866–1945) sirke sineklerinde yaptığı araştırmada göz rengi ve kanat özellikleri kalıtımının Mendel Kanunlarına uymadığını belirlemiştir. Bu çalışmalar sonucunda genlerin kromozomlar üzerinde bileşik konumda olabileceği belirtilmiş ve genetik linkage (bağlantı) kavramı ilk kez ortaya konulmuştur (Morgan 1911).

Kromozomlar üzerinde bulunan genler bağımsız olarak gamet hücrelerine geçmektedir. Fakat aynı kromozom üzerinde ve fiziksel olarak bir birine yakın olan genler bazen Mendel kurallarına uymayarak birlikte yeni nesile aktarılacaktır. Aynı kromozom üzerinde bulunan bu genlere bağlı gen (linked gen); bu genlerin oluşturmuş olduğu

gruba bağlantı grubu (linkage group) ve bu olaya da bağlantı (linkage) denilmektedir. Kromozomlar arasında bir crossing-over olayı gerçekleşmiş ise ebeveyne benzeyen ve benzemeyen yeni gametler oluşacaktır. Oluşan yeni gametlerden ebeveyne benzeyenlerine parantel (ebeveynsel) kombinasyon, ebeveyn jenerasyonunda görülmeyen ve yeni oluşan gametlere ise rekombinant, oluşan bu olaya rekombinasyon denilmektedir. Rekombinasyon olayı, homolog kromozomların her birinde ayrı ayrı olabileceği gibi iki homolog kromozom arasında da şekillenebilmektedir. Rekombinasyon sonucunda meydana gelen yeni jenerasyonda ebeveyn jenerasyonuna benzeyen birey sayısı genellikle rekombinantların sayısına göre daha fazla olmaktadır. Rekombinant bireylerin ilgili jenerasyonda oluşan toplam fert sayısına oranı crossing-over oranını (Rekombinasyon frekansı, RF) vermektedir ve  $\theta$  ile tanımlanmaktadır. Rekombinasyon frekansı %0–50 arasında ise iki gen birbirine bağlı olup (linked) ve aynı linkage grubunda yer almaktadır. Eğer  $\theta > %50$  ise iki gen arasında bir bağlılık yoktur ve bu genler farklı linkage grupları oluşturmakta veya kromozomlar üzerinde yer almaktadırlar (Erensayın 2000).

### **2.9.1 Genetik bağlantı haritalama ve harita birimi**

Genetik haritalama, genlerin ve markörlerin kromozomlar üzerinde bulunduğu yerler ve birbirlerine olan uzaklıkların tespit edilmesidir. Crossing-over olayından yararlanarak, bağlı genlerin dizilişi ve aralarındaki uzaklıkların bulunması sonucu genetik bağlantı haritaları oluşturulmaktadır. Bir kromozom üzerinde bulunan genler birbirlerine ne kadar yakın ise aralarında crossing-over olma olasılığı o kadar azalmaktadır. İki gen arasındaki mesafe arttıkça iki gen arasında crossing-over olma olasılığı da artmaktadır. Yani iki gen arasındaki crossingover oranı kullanılarak bu iki genin arasındaki mesafe tahmin edilebilmektedir. Crossing-over sonucu iki gen arasında bulunan mesafe harita birimi olarak ifade edilir ve bir harita birimi %1  $\theta$ 'ye eşittir. Harita birimi olarak Thomas Hunt Morgan'a ithafen Morgan (M) kullanılmaktadır ve %1 (0.01)  $\theta$ , 1 centimorgan (1 cM) olarak ifade edilmektedir. Fiziksel olarak 1 cM yaklaşık 1 milyon baz çiftini ifade etmektedir ve her 100 mayoz bölünmede 1 rekombinasyon olayının olduğunu göstermektedir (Liu 1998).

### 2.9.2 Kantitatif özellik lokuslar (QTL)

İlk bağlantı gen haritası 1913 yılında Alfred Henry Sturtevant tarafından oluşturulmasına rağmen tüm canlı türlerinde genetik haritalama çalışmaları 20. Yüzyılın sonlarına yoğunlaşmıştır. İyi bir bağlantı gen haritasında; yeterli sayıda ve bilgilendirici markörlerin bulunması ve bu markörlerin kromozomlar üzerinde eşit dağılım göstermesi gerekmektedir. Bu amaca ulaşılabilmesi için yeterince büyüklükte referans populasyonlarına ihtiyaç bulunmaktadır. Küçük populasyonların varlığı ve markör sayısının kısıtlı olduğu durumlarda, markörler arası rekombinasyon oranları ile harita mesafeleri kolaylıkla hesaplanabilmektedir. Fakat haritalama verilerinin büyük olduğu durumlarda sağlıklı istatistiksel analizlerin yapılabilmesi amacıyla bilgisayar programlarına ihtiyaç bulunmaktadır (Özşensoy ve kurar 2013).

Genetik harita elde edebilmek için hangi genetik element veya genlerin melez bitkilerde bir arada ortaya çıktığının belirlenmesi gereklidir. Çünkü bunlar genetik olarak birbirine bağlıdır ve kromozom üzerinde birlikte yer alırlar. Aslında bir araştırmacının genetik haritalama yapabilmesi için araştırmacının en uygun populasyonları seçmesi, bu populasyonları kullanarak ikili rekombinasyon frekanslarını hesaplaması, bağlantı gruplarını belirlemesi, harita uzaklıklarını saptaması ve harita sırasını belirlemesi gerekir. Genetik elementlerin kromozom üzerindeki sıralanışları rekombinasyon frekansına göre gerçekleşmektedir, iki genetik element arasındaki mesafe fazlaysa rekombinasyon frekansı yüksek demektir. Birbirine yakın olan elementler arasında rekombinasyon olasılığı daha düşük demektir. İki genetik element arasındaki gözlenen rekombinasyon frekansına göre elementler kromozom üzerinde sıralanarak genetik harita oluşturulur. Rekombinasyon sıklığı ve genetik mesafe her zaman birebir olmaz. İki gen arasındaki mesafe 10 cM'dan düşük ise bir bağlantıdan söz edilebilir. Genom haritalarının hazırlanmasında DNA markörlerin temel alınması; kalıtım bilgisinin elde edilmesinde markörler açısından sınırsız bir potansiyel kaynak olması ve haritalar üzerindeki spesifik bazı markörlerin doğrudan belirli genlere ulaşmayı temin etmesi gibi iki önemli avantaj sağlamaktadır. Bitki boyu, çiçeklenme zamanı, verim ve verim unsurları, kalite, bazı hastalık zararlılara karşı dayanıklılık gibi birçok karakter kantitatif olarak kontrol edilmektedir. Kantitatif özelliklerin gen bölgeleri QTL (Quantitative

Trait Loci) olarak adlandırılmaktadırlar. DNA ya da moleküler markörler kullanılarak QTL'lerin yerlerini belirlemek ve genom içinde dağılımını ortaya çıkarmak ve haritalamak mümkündür. Bu genlerin genom içerisinde nerede olduklarını bilmek bitki ıslahı çalışmaları açısından oldukça önemlidir. Tarımsal önemi olan kalıtsal özellikler için QTL'lerin yerlerinin tayini, gelecekteki genetik manipulasyonlara (yönlü değişikliklere) ve organizmalar arasında gen transferlerine kapı açar. Moleküler markörlerin bulunması ve onlardan türetilen kromozom haritaları, kantitatif özelliklerin genetik kontrolüne ve onun parçalara ayrılmasına olanak sağlamıştır. Kantitatif özellikler çok sayıdaki genden etkilendiği için, bu genlerin genom içerisinde nerede oldukları bilinmelidir. Uygun bir populasyonda QTL analizi olarak bilinen yöntemin uygulanmasıyla, belirli kromozom bölgesindeki ilgili genlerin yerleri saptanabilir, etkilerinin büyüklüğü tahmin edilebilir, gen etkisinin eklemeli veya baskın olup olmadığı belirlenebilir. Üstün çeşitleri elde etmek için ıslah programlarındaki genlerin düzenlenmesinde bunlar başlangıç adımlarıdır (Asins 2002).

QTL analizinin en belirgin uygulamaları ıslah ve ıslah öncesi çalışmalar ile QTL klonlamada markörler aracılığıyla seleksiyondur. QTL analizinin temel amacı, QTL'i dar kromozomal bölgelere yerleştirmektir. Bu amaçla deneme şeklinin, açılan populasyonunun tipinin, büyüklüğünün, sayısının, DNA markörlerinin bilgi sağlama düzeyi ile polimorfikliği, bağlantı haritasının kurulması ve QTL analizinin yapılması için istatistiksel metodolojilerin hepsinin birlikte değerlendirilmesi gerekir. Genetik harita oluşturulurken izlenecek yollar sırasıyla şöyledir:

Haritalamada kullanılacak en uygun populasyonun seçimi, DNA izolasyonu, izole edilen DNA'ların polimorfik markörler yardımı ile DNA'nın belirli bir bölgesinin PCR'da çoğaltılması, jel elektroforezi yapılarak bantların görüntülenmesi, skorlama ve son olarak da sonuçların analiz edilmesidir. Bu haritalama bitkinin fonksiyonlarının bilinmesi için gereklidir.

## 2.10 Külleme ve Mildiyö Hastalığına Karşı Dayanıklılık İslahında Yapılan Çalışmalar

Dayanıklılık, hastalık ve zararlı etmeninin çoğalma ve gelişmesinin bitki tarafından engellenmesidir. Bitkinin hastalık ve zararlı etmenine karşı dayanıklılığı; düşük, orta ve yüksek düzeyde gerçekleşmektedir. Bitki yüksek düzeyde dayanıklı ise patojen hiç çoğalamamakta veya çok az düzeyde çoğalabilmekte, orta ve düşük dayanıklılıkta ise hastalık ve zararlı etmeni belli düzeyde çoğalabilmektedir. Dayanıklılık kalıtsal olarak; tek gen (monogenic), birkaç gen (oligogenic) ve çok gen (polygenic) tarafından idare edilmektedir (Roberts 2002).

Dayanıklılığın kaç gen tarafından idare edilmesinin bilinmesi ıslah çalışmaları için büyük önem taşımaktadır. Tek gen tarafından idare edilen dayanıklılık ıslahı çalışmaları, diğerlerine göre oldukça basit ve sonuç elde edilmesi daha kolaydır. Çok gen tarafından yönetilen dayanıklılıkta genomda birçok bölge etkili olduğundan genel olarak Mendel'in genetik açılım oranlarına uygun olmaya bilmektedir. Bu durum kantitatif olarak ölçülebilmekte ve bunlar QTL (Quantitative Trait Loci) olarak adlandırılmaktadır. QTL üzerine çevre ve genler arası interaksiyonlar büyük rol oynamaktadır (Young 1996).

Moleküler markörlerin uygulamaya aktarılabilmesi için ilk önce üzerinde çalışılan hastalık ve zararlı etmenine karşı dayanıklılıktan sorumlu gen kaynağının klasik yöntemlerle belirlenmesi gerekmektedir. Hastalık ve zararlılara karşı dayanıklılık genleri çoğunlukla bitkilerin yabani formlarında bulunmakta ve bu genler melezleme çalışmaları ile yabani bitkilerin kültür formlarına aktarılmaktadır. Kimi durumlarda dayanıklılık geni veya genlerini taşıyan yabani türler ile bunların kültür formları arasındaki melezlemeler başarılı olmamakta ve istenilen dayanıklılık geni aktarılamamaktadır. Bu durum dayanıklılık ıslahı çalışmalarına sınırlama getirmektedir. Bu sınırlamalar, doku kültürü ve gen aktarım yöntemleri kullanılarak aşılmaya çalışılmaktadır. Dayanıklılık ıslahı çalışmalarında moleküler markörler 2 şekilde devreye giriyorlar:



- a) Dayanıklılık geni ile ilgili markör oluşturulmuş veya gen klonlanmış
- b) Dayanıklılık geni ile ilgili markör oluşturulmamış veya gen klonlanmamış olma durumuna göre uygulamada farklılıklar göstermektedir. Dayanıklılık geni ile ilgili moleküler markör daha önceden oluşturulması veya genin klonlanması dayanıklılık ıslahı çalışmalarına kolaylıklar getirmektedir (Boerma ve Hussey 1992, Vrain 1999).

Sonuç olarak; biyoteknolojik yöntemlerden moleküler markörlerin sağladığı avantajlardan faydalanarak dayanıklılığın genetik mekanizmasını tanımlamak ve üzümlerde dayanıklılık özelliği ile sıkı ilişkili moleküler markörlerin belirlenmesi ve bunların geleneksel melezleme ıslahında (Marköre Dayalı Seleksiyon) amaçlı kullanımı amacıyla çok sayıda çalışma yapılmaktadır. Dünyada bağcılığı sınırlandıran en önemli hastalık etmenleri; külleme (*Uncinula- erysiphe necator*) ve mildiyö (*Plasmopara viticola*)'dır. Mantar kökenli bu hastalık etmenleri asma gelişimini sınırlandırarak önemli ürün kayıplarına neden olmaktadır. Kaydedilen hızlı ilerlemeler, moleküler markör tekniklerinde, araştırmacılara markörler yardımıyla erken seleksiyon imkânı sunmuştur. "Marköre Dayalı Seleksiyon" (MAS) denen bu yöntemde üzerinde çalışılan araştırmacılar ve araştırma sonuçları aşağıda kısaca özetlenmektedir.

**Costacurta vd. (1987)**, 6 *Vitis vinifera* L. çeşidi ile mildiyö'ya dayanıklılık sağlamak amacıyla türler arası melezlemelerden elde edilen 4 hibrit mezlenerek, sonuçlarını incelemeye almışlardır. Kullanılan ebeveynlere göre değişmekle birlikte, %20 oranında bir dayanıklılık sağlanmıştır. Dayanıklılık kontrolünün poligenik olduğu saptanmıştır. Elde edilen F1'lerin dayanıklılığı arasındaki farklılık kullanılan hibritlerden daha çok kullanılan ebeveynlerden kaynaklanmıştır. En dayanıklı hibrit, Seyve-Villard 5276 olarak belirlenmiştir.

**Naidenova vd. (1987)**, Seibel ve Seyve-Villard (SV) hibritlerini, bir yıldan fazla bir süre ile doğal ve yapay koşullar altında test etmişlerdir. Sonuçta SV12-375 hibritinin mildiyö (*Plasmopara viticola*)'ye ve diğer fungal hastalıklara yüksek oranda dayanıklılık gösterdiğini tespit etmişlerdir.

**Mahfud ve Sarwon (1987)**, Endonezya’da yaptığı inokülasyon çalışmalarında mildiyö’ye en dayanıklı çeşitlerin Malaga ve Isabella olduğunu belirlemişlerdir.

**Ye vd. (1995)**, Horizon ve Illinois 547-1, iki interspesifik hibritinde RAPD primerlerinden yararlanarak, asmalarda külleme hastalığına karşı dayanım haritasını oluşturmuşlardır. Elde edilen F1 populasyonunda, incelenen 327 RAPD primerinden 90 adedi ile 504 adet skorlanabilen ve açılım gösteren DNA parçası haritalamada kullanılmıştır. Bunlardan 42 adedi Horizon çeşidinde 19 bağlantı grubunda 1099 cM’lık ve 48 adedi de Illinois 547-1 çeşidinde 20 bağlantı grubunda 1059 cM’lık alana yayıldığı bildirilmektedir. Çalışmada incelenen bireylerde 3 yıllık arazi gözlemlerinin değerlendirilmesi ile dayanıklı 547-1 çeşidinde 10 numaralı bağlantı grubunda bir bölgenin, küllemeye dayanımı etkileyen bir QTL taşıdığı sonucuna varmışlardır.

**Buck ve Zyprian (2000)**, 150 bireylik populasyondan elde edilen “Regent” çeşidi fungal hastalıklara dayanıklı ve “Lemberger” duyarlı çeşidi arasındaki melezleme sonucunda seçtikleri 47 birey üzerinde genom haritası çıkarmak için RAPD markörlerini test etmişlerdir. Araştırmacılar 11 bağlantı grubu ortaya çıkarmışlardır.

**Kozma (2000)**, fungal hastalıklara dayanımı araştırmak için, *Vitis amurensis* hibritleri, *Vitis vinifera* çeşitleri ve Franko-Amerikan hibritlerini kullanarak, doğal ve yapay enfeksiyonun yapıldığı çalışmalarında, dayanım düzeyleri 5 aşamada belirlemişler ve külleme ve mildiyöye dayanımın dominant karakterde olduğu iddea etmişlerdir. Dayanım derecesi ebeveynin genetik kaynağına göre değişiklikler göstermiştir. Franko-Amerikan hibritleri ile Doğu Asya *V. amurensis* hibritlerinin dayanım ıslahı çalışmaları için iyi bir kaynak olabileceği araştırmacı tarafından belirtilmiştir.

**Luo vd. (2001)**, [Xun-3 (*V. quinquangularis*, mildiyö’ye dayanıklı) x Ugni Blanc (*V. vinifera*, mildiyö’ye dayanıksız)] melezinden F1’ler analiz edilmiştir. Önce mildiyö’ye dayanıklı genleri bulmak için bir BSA (Bulk segregasyon analizi) yapmışlar. Daha sonra yaklaşık 280 RAPD (Operon) primeri kullanmışlardır ve bunlardan sadece 160 adet belirgin bantlar oluşturmuştur. OPO06-1500 primerini bir major *Rpv1* lokusu ile çok sıkı bağlı olduğunu ortaya çıkarmışlardır. Bu lokus mildiyö hastalığı ile

bağlantılıdır. Mapmaker software analizine göre bu primer *Rpv1* lokusu ile sadece 1.7 cM uzakta olduğunu tespit etmişlerdir. Daha sonra bu RAPD markörünü sekansladıktan sonra SCAR markörüne dönüştürmüşlerdir. Bu çalışma (Çin ülkesine ait bir yabani çeşit) *V. quinquangularis* ile *V. vinifera*'dan melezlenen 5 diğer genotiplerini çok daha hızlı analiz etmişlerdir ve SCAR markörleri sadece dayanıklı çeşitlerde bant verdikleri için ıslah programlarına uygun ve hızlı bir markör olarak kullanmışlardır.

**Reisch (2001)**, küllemeye karşı Horizon (hassas) ve Illinois 547- 1 (*Vitis rupestris* x *V. cineria*) (dayanıklı) bireylerin melezlerinden oluşturduğu populasyonun içinden seçtiği 272 bireylerle kurduğu yeni plantasyonda, AFLP markör kullanarak gerçekleştirdiği BSA (Balk Segregation Analizi) sonuçlarına göre, küllemeye dayanıklı lokus tespit etmiştir. Çalışmada kullanıldığı 2 DNA markörün küllemeye dayanıklılık mesafesi 12 cM'dan daha yakın olarak belirlemişlerdir.

**Dalbo vd. (2001)**, külleme ve siyah çürüklük hastalıklarına dayanımın kalıtımını çalışmak için Ye vd. (1995)'ın oluşturduğu Horizon x Illinois 547-1 populasyonunu kullanmıştır. Her iki ebeveyne ait genetik haritalar çıkarılmış ve 20 adet bağlantı grubu belirlenmiştir. Çalışmada RAPD primerleri temel oluştururken, ek olarak 30 mikrosatelit ve 4 STS (Sequence Tagged Sites) markörü sonuçlarına göre 10 adet homolog bağlantı grubu tespit edilmiştir. Birbirlerinden ortalama uzaklığı 7.5 cM olan 451 markör haritalar üzerine yerleştirilmiştir. Islah programında kullanılma amacıyla, küllemeye dayanımda görev alan en güçlü QTL (547-1 çeşidinde 10 bağlantı grubu) seçilmiştir. Bu QTL'e yakından bağlı bir RAPD markörü (CS25b) ve bir AFLP markörü (AfAA6), CAPS markörlerine dönüştürülerek aynı dayanım kaynağının kullanıldığı farklı melezlerde QTL açılımı takip edilmiştir. Bütün melezlerde, küllemeye duyarlı bireylerin yüzdesinin, bu markörler esas alınarak yapıldığında önemli ölçüde azaltılabileceği sonucuna varılmıştır.

**Pauquet vd. (2001)**, *Vitis vinifera* x *M. rotundifolia* melez kombinasyonunda külleme (*Uncinula necator*) hastalığına dayanıklılıkla ilişkili dominant bir gen bölgesi tespit etmişler ve (Bouquet 1986) bunu Resistant Uncinula Necator (*Run1*) geni olarak göstermiştir. 157 bireyden oluşan BC5 populasyonu üzerinde AFLP markörlerini

kullanarak yaptıkları çalışmada. Cabernet Sauvignon çeşidini duyarlı kontrol çeşit olarak kullanmışlardır. 13 AFLP markörü 22 adet *Run1* taşıyan genotip ile 16 duyarlı genotip üzerinde ileri düzeyde araştırılmıştır. 13 AFLP markörü içerisinde, bu gen ile genetik haritada sıkı bağlantılı olan 3 AFLP markörü tespit etmişler ve bu markörlerin (MDS= Marköre Dayalı Seleksiyon) yöntemi ile külleme hastalıklarına dayanıklı bireylerin erken tespiti için elverişli bir araç olarak bildirerek, bu amaçla daha geniş populasyonlarda denenmesi gerektiğini bildirmişlerdir. Ancak *Run1* geni *Vitis vinifera* L. türünden farklı olarak 2n=40 kromozom sayısına sahip bir *Muscadinia* türünden kaynaklandığı için, 2n=38 olan *Euvitis* alt cinsine ait türlerin kullanıldığı melezleme çalışmalarında dayanıklılık özelliği ile ilişkisi sınırlı olacaktır.

**Donald vd. (2002)**, daha önceden klonlanmış patojen dayanıklılık genlerini asmada deneyerek RGA (Dayanıklılık Gen Analoglarını) çoğaltmaya çalışmışlardır. 28 adet asma RGA dizileri tanımlanmış ve %70 veya daha fazla nükleik asit, dizi özelliğine dayanarak, 22 alt gruba bölünmüştür. Her grubun temsilcilerine ait RFLP ve AFLP markörleri *Run1* lokusuna bağlantı açısından taranmıştır. Özellikle 2 adet RGA (GLP1-12 ve MHD145) markörün *Run1* geni ile sıkı bağlantılı olduğunu belirlemişlerdir. 3 RGA ve 13 AFLP markörü bu lokusa sıkı şekilde bağlantılı bulunmuştur. Bu markörlerden 2 RGA (GLP1-12 ve MDH145) ve 10 AFLP markörü dayanıklı genotipte aynı anda açılım göstermiştir. 3 markör (MHD98) sadece 2.4 cM'lık bir pozisyonda *Run1* lokusunda bulunmaktadır. 22 *Run1* taşıyan dayanıklı genotip ile 16 duyarlı genotip, 13 AFLP markörü kullanılarak analiz edilmiştir. 3 markörün sadece dayanıklı genotiplerde bulunmuş olması, külemeye dayanıklı asma çeşitlerinin markör aracılığıyla seleksiyonu için bir olanak sağlayabilir. Araştırmacılar, gen ile birlikte açılım gösterdiği tespit edilen markörler arasında rekombinasyonun görülmesini bu bölgede rekombinasyonun mümkün olabileceği ve daha büyük populasyonlarda araştırılmasının gerekeceği şeklinde ifade etmişlerdir. Çalışmanın devamında bu RGA primerleri daha sonra çoğaltılan DNA örnekleri *EcoR* I enzimi ile kesilerek, analizi daha kolay olan CAPS marköre çevrilmiştir. 870 bp büyüklüğündeki PCR ürünleri, *EcoRI* enzimi ile kesildiğinde 670 bp ve 200 bp büyüklüğündeki kesim ürünü bantlar yalnızca dayanıklı genotiplerde görülürken, hassas bireylerde görülmemiştir.

**Kozma (2002)**, Macaristan’da fungal hastalıklara dayanıklı üzüm çeşitlerinin melezleme çalışmaları 1949 yılında başlamıştır. En erken sonuç 1970 yılında Zalagyongye çeşidinde elde edilmiş, bunu değerli çeşitler takip etmiştir. Zalagyongye bu çeşitler içinde en yaygın olanıdır. Bu çeşidin popülaritesinin sebebi, dayanıklı olması, erken olgunlaşma ve iyi bir tada sahip olmasıdır. Bu çeşitler sadece Macaristan’da kalmamış, diğer üzüm üretici ülkelere de yayılmıştır.

**Kozma ve Dula (2003)**, külemeye dayanımını inceledikleri çalışma sonucunda, iki hibrit ailesinde (*Muscadinia* x *V.vinifera* BC4 x Franco American hibrit x *V.vinifera* x *V.amurensis*) ve *Muscadinia* x *V.vinifera* BC4 x (*V. amurensis* x *V.vinifera*) BC2), *Run1* geninin *Muscadinia*’dan gelen külemeye dayanımından sorumlu mildiyö dayanımı ile bağlantılı olduğunu belirlemişlerdir. Araştırmacılar ebeveynlerinden daha fazla mildiyöye dayanıklı hibritler elde etmişlerdir.

**Marino vd. (2003)**, *Vitis* Muscato bianco (*Vitis vinifera*) x *V. riparia* melezlemesinden elde edilen popülasyonunda SSR ve AFLP markörleri kullanarak yapraklarda mildiyöye dayanım ve tanede aroma bileşikleri için QTL analizi yapmışlardır. Ana ebeveyn haritası 403 SSR ve AFLP markörleri ile 21 bağlantı grubundan (1.128 cM) ve baba ebeveyn haritası 502 SSR ve AFLP markörleri ile 20 bağlantı grubundan (1.143 cM) oluşmuştur. Mildiyöye dayanımın belirlenmesi için doğal enfeksiyon ve yapay inokülasyon sonrası değerlendirme yapılmıştır. Yapay inokülasyon sonrası mildiyö semptomları ve serbest aroma bileşikleri ile ilgili QTL rapor edilmiştir.

**Merdinoglu vd. (2003)**, 151 RAPD, 13 ISSR ve 208 SSR primeri kullanarak *Muscadinia* üzümlerine mildiyö dayanımı kazandıran gene bağlı moleküler markörleri tanımlamak amacıyla BSA metodunu kullanmışlardır. Varyans analizi sonucunda 1 RAPD, 4 ISSR ve 8 SSR’ın dayanım üzerine önemli etkide bulunduğunu belirlemişlerdir. Bunlardan 12 adedi aynı bağlantı grubunda 45 cM’lık bir bölge içine yerleşmiştir. Dayanım QTL’in varlığı aralık (interval) haritalama ile doğrulanmıştır. Bu sonuçlar; *Rpv1* (*Plasmopara viticola* dayanım geni) olarak isimlendirilen bu QTL’in *Muscadinia* üzümlerinde dayanım sağlayan gen olduğunu düşündürmektedir. *Rpv1*, ayrıca küleme dayanım geni *Run1*’e yakından bağlantılı bulunmuştur.

**Regner vd. (2003)**, 70 bireylik bir Welschriesling x Sirius (KI.K1977) populasyonunu külleme ve mildiyöye tolerans açısından açılım gösteren, 160 SSR ve 190 RAPD markörü ile araştırmışlardır. 7 RAPD markörünün külleme dayanımıyla önemli derecede bağlantılı olduğunu bulmuşlar. Tek bir markörün etkisinin yüksek olmaması, dayanımın birden fazla allele dayalı olduğunu doğrulamıştır. Araştırmacılar başka bir populasyonda, (Gr. Veltliner x Seyval= KI.K1979) elde edilen bu markörleri incelemiştir; ancak RAPD markörleri arasında herhangi bir ortaklık sağlanamadığını tespit etmişlerdir. Araştırmacılar populasyondaki birey sayısı ile markör sayısının arttırılmasının gerekli olduğu sonucuna ulaşmışlardır.

**Zyprian vd. (2003)**, fungusa dayanıklı iki hattın (Gf.Ga-47-42 x Villard blanc) melezlenmesi ile elde ettikleri populasyonu külleme ve mildiyö hastalıklarına karşı moleküler markörleri kullanarak analiz etmişlerdir. Bu çalışma sonucunda elde edilen haritanın daha önceki çalışmalarında kullandıkları Regent x Lemberger populasyonuna ait harita kadar doygun olmamakla birlikte bu haritanın, fenotipik karakterlere ait QTL'lerin genetik bölgelerinin korelasyonu çalışmasında kullanılabileceği görüşünü bildirmişlerdir. Araştırmacılar her iki haritayı kullanarak fungal patojenlere dayanım ile ilgili genetik faktörlerin karşılaştırmasını yapabileceklerini dile getirmektedirler.

**Fischer vd. (2004)**. 'Regent x Lemberger' populasyonunda fungal hastalıklara dayanıma yönelik yaptıkları araştırmada, 153 bireyde, 185 AFLP, 137 RAPD, 85 SSR ve 22 SCAR veya CAPS markörünü kullanarak, fungal hastalıklara dayanıma yönelik genetik harita oluşturmuşlardır. Ana ebeveynde külleme dayanım için 1 adet QTL, 16'ncı bağlantı grubunda ve mildiyö'ye dayanım için birden fazla QTL, 9 ve 10'uncu bağlantı guruplarında saptanmıştır. Olgunlaşma zamanı, tane büyüklüğü ve koltuk sürgünü büyümesine yönelik başka QTL'ler bulunmuştur.

**Zyprian vd. (2005)**, fungal hastalıklara dayanım ve tat bileşiklerine yönelik Gf.Ga.47-42 x Villard blanc genetik haritasında çalışmalar yapmışlardır. Melezleme populasyonundan elde edilen sonuçları Regent çeşidine ait genetik haritanın QTL ilişkisi ile karşılaştırmışlardır. Regent'te saptanan külleme hastalığına dayanım markörleri yeni bir melezlemede test edilmiştir. Dayanımın yanında tat bileşiklerinin

Gf.Ga 47-42 ıslah hattından elde edildiğini ve Villard blanc'ın daha naturel beyaz şarap verdiğini ifade etmişlerdir.

**Barker vd. (2005)**, Asmalarda yapay bakteri kromozom kütüphanesi (BAC) kullanarak, küllemeye dayanıklı *Run1* geninin genetik ve fiziksel haritasını oluşturmuşlardır. Küllemeye dayanıklı gen *Run 1* tarafından kontrol edilmektedir. Bu gen tek dominant gen olarak *Muscadinia rotundifolia*'da bulunmaktadır. *Run1*, *V. vinifera*'ya bir psödo geriye melezleme stratejisi ile geçerek, genetik markörler ile bellirlenmiştir. Bu çalışmada dayanıklı genin kapsamlı şekilde yapısı ve fiziksel haritasının ileri pozisyonel klonlama dayanıklılık üzerinde çalışmaların sağladığını açıklamışlardır. Fiziksel haritalama yapay bir bakteri kromozomu kütüphanesi (BAC) tarafından kurularak ve *Run1* genini taşıyan dayanıklı bir *V. vinifera*'dan genomik DNA izolasyonu yöntemi kullanarak yapmışlardır. 20 yeni genetik markörler ile BAC'ın örtüşüm sağladığını ortaya çıkarmışlar ve bunun *Run1* lokusuna bağlı olarak yakından incelenmeye almışlardır. Dayanıklılık geninin yerini SSR markörü (VMC4f3.1) ile BAC sonu türetilmiş markör CB292.294 arası olarak belirlemişlerdir. Bu bölge 2 dayanıklı multi genin benzer soylarını (RGA) içermektedir.

**Yaşa (2005)**, 300 adet RAPD primeriyle Italia x Mercan'dan meydana getirilen F1 populasyonunu küllemeye dayanıklılığını incelemiş, test edilen RAPD primerleri ile bu populasyon içinde çok düşük oranda (%37) polimorfizm tespit etmiştir. LOD 3.0'da Mercan ve Italia çeşidine ait elde edilen haritalarda sırasıyla 8 ve 6 adet bağlantı gurupları üzerinde sayıları 2-3 arasında değişen markör bulmuştur. Italian çeşidinde sadece OPI4c ve OPI4d arasında (5.0 cM) ve OPD3a ve OPD4a arasında (9.2 cM) gerçek bir bağlantı tespit edilmiştir. Mercan çeşidinde ise sc10826b ile OPM2a arasında (6.8 cM) bir bağlantı gözlenmiştir.

**İşçi (2006)**, Italia ve Mercan üzüm çeşitlerinin melezlenmesi sonucu elde edilen F1'lerde genom haritasını ve Fungal Kökenli Hastalıklara Yönelik kodominant markörlerden SSR ve dominant markörlerden AFLP kullanarak gerçekleştirmiştir. Genom haritalaması için çift yönlü yalancı melez tekniği kullanılmıştır. Haritalamanın yapılmasında Mapmaker/Exp 3.0 paket programında 3.0 LOD değeri kullanılmış, ana

ve babaya ait 2 ayrı genetik bağlantı haritası bulunmuştur. Haritanın anaya ait 6, babaya ait 1 bağlantı grubu içerdiği bildirilmektedir.

**Akkurt vd. (2007)**, mantar hastalıklarına dayanıklı Regent ile hassas Lemberger çeşitlerinin melezlemesinden oluşturulan genetik haritayı (Fischer vd. 2004) kullanarak, külleme (*Uncinula necator*) hastalığına dayanıklılık ile ilişkili QTL bölgesinden 7 adet RAPD markörü daha stabil ve tekrarlanabilir moleküler markör tekniği olan SCAR marköre çevirmişlerdir. Araştırmacılar külleme'ye dayanıklılıkla ilişkili SCAR markörlerden ScORA7-760 ve ScORN3'ün yalnızca dayanıklı genotiplerde bant verdiğini, hassas genotiplerde bant vermediğini tespit etmişlerdir. Geliştirilen bu markörlerin farklı melezleme kombinasyonunda (Gf.Ga-47 42 x Villard Blanc) aynı sonucu verdiği, ilave olarak Amerikan kökenli dayanıklı *Vitis* türlerinde de benzer sonuçlar verdiğini tespit ederek, bu iki markörün külleme'ye dayanıklılık ıslahında MDS için kullanılabilir olduğunu bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar ScoRA14 markörün mildiyö'ye karşı dayanıklılık ıslahında kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

**Eibach vd. (2007)**, VHR 3082-1-42 x Regent melezinde 119 bireyden fungal hastalıklara dayanıma yönelik yaptıkları melezlemede moleküler markörleri (UDV 108, UDV 130, UDV 15, VMCNC2f12, GLP1-12, ScoRA7, VVIV67, VMC\_4d9.2a) kullanarak, dayanıklılık geninin piramitlenmesi üzerinde çalışmışlardır. VRH3082-1-42, *Muscadinia rotundifolia* G52 x Malaga seedling No. 1 melezlemesinden elde edilen hibritlerin 4 kez *Vitis vinifera* ile geriye melezlenmesi sonucu elde edilmiştir. VRH3082-1-42; CAPS-markör GLP1-12 markörü ile bağlantılı olan, küllemeye dayanıklı, *Run1*-geni taşımaktadır. Aynı zamanda, mildiyöye karşı dayanıklılık sağlayan, *Rpv1* genini de taşımaktadır. 'Regent' ise hem küllemeye hem de mildiyöye dayanıklı yeni bir çeşit olup, 1996'da Almanya'da ticari kullanım için tescil edilmiştir. Fenotipik değerlendirme mildiyö için yapay, külleme için doğal inokulasyonlar sonrası gerçekleştirilmiştir. Fenotip değerlendirmeleri sonrası 20 genotip hem külleme hemde mildiyöden ari gözükmiştir. VRH3082-1-42 x 'Regent' in popülasyonu üzerinde yürütülen araştırmalar sonucu; GLP1-12 markörünün *Run1* geni dolayısıyla küllemeye dayanıklılık ile sıkı sıkıya bağlı olduğunu gösterirken; *Rpv1*-geni ile ilgili markörlerin de mildiyöye karşı Regent'ten kaynaklanan dayanıklılıkla bağlantılı olduğunu



göstermiştir. Araştırmada genotiplerin değerlendirilmesinde ise; VMC-4d9.2a, UDV-015b, VVIv67 ve ScORA7-760 markörlerinin küllemeye dayanımla ilişkili olduğu (19 % enfeksiyonsuz, 37 % hafif enfeksiyonlu), UDV-130, VMCNG2-f12 ve UDV-108 markörlerinin ise; mildiyöye dayanımla ilgili olduğu (71 % enfeksiyonsuz, 25 % hafif enfeksiyonlu sınıf 3) belirlenmiştir. Mildiyöye dayanımla markörler arasındaki ilişki; küllemeyle ilişkili olan markörlerinden daha kuvvetlidir. Külleme ve mildiyö dayanımla ilgili markörler ile marköre dayalı seleksiyon (MAS) uygulaması; dayanıklılıkla ilişkili genlerin piramitlemesi mümkün olmuştur. Sonuç olarak; ıslah programlarından piramitleme yöntemi için, fenotipik değerlendirme ve marköre dayalı seleksiyonun (MAS) kombinasyonu önerilmektedir.

**Molnar vd. (2007)**, çalışmalarında *Run1* lokusunu belirtmek için ıslah programında moleküler markörlere dayalı MAS yöntemi kullanılarak uygulamalar yapmışlardır. BC5 hibritlerinde patojen (külleme) bulaştırılmasından 3 hafta sonra incelemeye alınan bitkiler; hassas ve dayanıklı şeklinde ayrılmıştır. GLP1-12 primeri ile PCR koşullarında çoğaltılan bantlar *EcoR1* enzimi ile kesim yapılarak PCR-RFLP analizleri gerçekleştirilmiştir. *EcoR1* enzim uygulaması yapılan dayanıklı çeşitlerde, DNA amplifikasyonu ürünlerin 2 parça (670 ve 200 bp) uzunluğuna bölündüğü, dayanıksız çeşitlerde kesim gerçekleşmediği belirlenmiştir. SSR analizleri için VMC4f3.1 ve VMC8g9 primerleri kullanılmıştır. Bitkilerin %90-99'unda; VMC8g9 primeri kullanılarak yapılan analizlerde *Run1* locusunun belirlenebilirlik oranının diğer 2 primere göre daha fazla olmasından ötürü diğer primerlerden başarılı bulunmuştur. Agaroz jelde dayanıklı ve duyarlı çeşitlerin baz uzunluğu sırayla 160-167 bp olarak ayrımı ortaya çıkmıştır. Moleküler markörler ile taranarak yapılan analiz sonucunda; GLP1-12 ve VMC8g9 primerlerinde, dayanıklı çeşit 66 adet, duyarlı çeşit 63 adet olarak ve VMC4f3.1 primerinde, dayanıklı çeşit 61 adet, dayanıksız çeşit 68 adet olarak belirlenmiştir. Fenotip sonuçlarına baktıklarında, dayanıklı çeşit 67 adet, duyarlı çeşit ise 62 adet olarak belirlenmiştir. Bu yüzden GLP1-12, VMC8g9 ve VMC4f3.1 primer sonuçlarının fenotip sonuçlarıyla kıyaslandığında; GLP1-12, VMC8g9 primerlerinin küllemeye dayanıklı oranının diğer primere göre daha yüksek olduğu görülmektedir.

**Welter vd. (2007)**, *V. vinifera* türüne ait dayanıklı Regent ve hassas olan Lamberger çeşidine ait melezleme yapmışlar; külleme ve mildiyö hastalıkları ile ilgili genetik harita oluşturarak QTL analizleri üzerinde bir çalışma ortaya koymuşlardır. 144 F1 genotip için farklı moleküler markörler kullanmışlardır. 430 markör, Kosambi fonksiyonu ile LOD 7.0 seviyesinde haritalanmıştır. Markörler, 19 bağlantı grubunda genel ortalama, 1.585 cM yayılım göstermiş ve bunların arasındaki mesafe 3.67 cM olarak tespit edilmiştir. Dayanıklılık faktörü iki hastalığı tespit etmiştir: *U. necator* için bir büyük QTL 15 nolu LG üzerinde saptanmış ve *P. Viticola* karşı bir büyük ve 3 küçük QTL (Büyük olanı 18 nolu bağlantı üzerinde ve küçükleri sıra ile 4, 5 ve 12 bağlantı üzerinde) tespit edilmiştir. Bütünü ile 21 fonksiyonel gen markörleri, 16 dayanıklı gen adaylarından tahmin edilmiştir. 13 RGA (Dayanıklı Gen Analöğü) markörleri, 5 RGA primer test çiftleri, türetilen 13 RGA markörleri ile eşleştirilmiş olabilir. En önemlisi sonuçta bu çalışma sadece külleme ve mildiyö'ya ait genom bölgelerinin tanımlanması için değil; her iki hastalığa ait olan dayanıklı gen adaylarının, gen bölgeleri tarafından yerleşerek iki büyük dayanıklı QTL kapsamında genetik bölgeleri ile birlikte yer alan dayanıklı aday genlerinin tanımlanması için yapılmıştır.

**Hoffman vd. (2008)**, çalışmalarında 'Kışmış Vatkana' çeşidinde *Erysiphe necator* mantarının sınırlaması sonucunda, külleme dayanıklılığın tek bir lokus tarafından kontrol edildiğini göstermişlerdir. *Vitis vinifera* türüne ait bu çeşit, Asya'nın merkezinde yetiştirilmektedir. Külleme oluşturur bu mantar çeşidi (*Erysiphe necator*), doğal ve yapay inokulasyonlarda görülür belirtiler üretmemektedir. 'Kışmış vatkana' patojenin epiderm hücrelere girmesine izin vermektedir, aynı hassasiyete sahip olan Nimrang çeşidi gibidir; ama mantarın yaygınlaşmasında sınırlar oluşturmaktadır. Kışmış vatkana'da conidiforların yoğunluğu ( $33.6 \pm 8.7$  conidiophores mm<sup>-2</sup>) Nimrang çeşidinde ise ( $310.5 \pm 24.0$  conidiophores mm<sup>-2</sup>), 120 saat inokulasyondan sonra çok az görünmüştür. 'Nimrang' x 'Kışmış vatkana' melezinden oluşan 310 popülasyonunda mantarın olup olmadığı 2 mevsim boyunca denetlenmiştir. Kışmış vatkana'da heterozigot olan külleme dayanıklı tek bir baskın (*REN1*) alleli fenotipik ayrımlar ile ortaya çıkarmışlardır. Tüm genom içinde Bulk ayırım analizleri, 195 SSR markörü ile yapılmış ve sonuçları ortaya çıkmıştır. Bulk analizleri içerisinde Kışmış vatkana'dan gelen 2 allelin dayanıklılık pik yoğunluk oranlarını her markör için ölçerek

sonuçlandırmışlardır. En önemlisi, daha önceki çalışmalarda 13 bağlantı grubu üzerinde hiç rastlanmayan (*REN1*) külleme hastalığına dayanıklılık ile ilgili lokusu, bu çalışmada fenotipik sonuçlara dayanarak *REN1* küllemeye dayanıklı lokusu olarak 13. bağlantı grubu üzerinde bulmuşlardır. Ayrıca bu lokus, *M. rotundifolia*'da bulunan 12 nolu bağlantı grubu üzerinde (*RUN1*) lokusuna ait dayanıklılık geninden tamamen farklı bir lokus olarak ortaya çıkarmışlardır. 310 bireylik populasyonun analiz sonuçlarında marköre dayalı seleksiyon (MAS) yardımı ile dayanıklılık (*REN1*) lokusun 7.4 cM aralıklarla hedef bölgeye sarılması söylenmiştir. Sonuçta *REN1* lokusuna ait en yakın markörlerin VMC9H4-2, VMCNG4E10-1 ve UDV-020 olduğu ve lokusa 0.9 cM uzaklıkta olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca bu primerler için sıra ile dayanıklı alleller, 283, 259 ve 128 bp olarak tespit etmişlerdir. Sonuç olarak Kışmış vatkana'nın Asya Bölgesi sınırları içerisinde *REN1* lokusunu taşıyarak küllemeye dayanıklı çeşit olduğunu ortaya koymuşlardır.

**Bellin vd. (2009)**, çalışmalarında *Vitis vinifera*'ya ait mildiyöye hassas Chardonnay ve [Bouvier x 'Villard Blanc (dayanıklı hibrit)] melezinden ortaya çıkan 'Bianca' çeşidini, mildiyö hastalığına dayanıklı olarak kullanmışlardır. Bunların melezinden oluşan 116 bireyin mildiyöye dayanıklılığın ayrımını QTL ile belirlemek için bu çalışmayı yapmışlardır. Bireyleri, hem sera koşullarında hem de bağda mildiyö mantarına maruz bırakmış; bitkinin tepkisini 2-6 gün inokulasyondan sonra siyah renkte nekrozların olup olmadığını incelemişlerdir. 18 nolu kromozom üzerinde *Rpv2* lokusunun hemen aşağısında, QTL piklerin değerlendirmesi ile *Rpv3* lokusunun olduğunu belirlemişlerdir. Bu lokus ilk olarak Regent çeşidinde 4 sene boyunca yürütülen denemeler ile %56'nın üzerinde genetik dağılımı gösterdiği ispat edilmiştir (Fischer vd. 2004, Welter vd. 2007). Ancak araştırmacılar QTL piklerinin fazla aşağı yukarı çıktığından, birden fazla dayanıklı genom fonksiyonunun olduğunu düşünerek bu çalışmayı sürdürmüşlerdir. Bianca ve Chardonnay'nin genetik haritasını bir psödo test melezi kullanarak ortaya çıkarmışlardır. *Rpv3* lokusunun yerini 2.9 cM mesafe ile UDV-305 ve VMC7F2 markörlerin arasında olduğunu belirlemişlerdir. UDV-305 markörü BAC klon VVCS1H060E17, Cabernet Sauvignon çeşidinin 2067 genleri tarafından ortaya çıkmıştır. UDV-305 yüksek duyarlılık lokusunun üst sınırında yer almaktadır. 18 nolu kromozom üzerinde bulunan QTL, bu çalışmada sınırdaki bir QTL halinde dayanıklı

(Bianca) çeşide ait serada yaprak disk üzerinde bulunan 7 nolu kromozom üzerinde olduğunu tespit etmişlerdir. Bu minör, QTL serada inokulasyon ile ilgili %3.8 fenotipik dağılımın yoğun olduğunu, bağda ise %12.1'e kadar çıktığını ortaya çıkarmışlardır. Dayanısız Chardonney çeşidinde bu minör QTL'in, 5 nolu kromozom üzerinde ve yoğunluğun %24.5 olduğunu tespit etmişlerdir. Son olarak Bianca'da bulunan *Rpv3* lokusu ve *M. rotundifolia*'da bulunan *Rpv2* lokusunun yeri PN40024 üzüm sekans aralıkları ile belirlenen ve bu iki bölgenin aynı 18 nolu kromozom üzerinde yaklaşık 1.5Mbp uzaklıkta yer aldığını ortaya çıkarmışlardır. Tam anlamıyla Bianca çeşidinde mildiyöye dayanıklılık fenotipik ayırım, 18 nolu kromozom üzerinde, *Rpv3* lokusuna ait tek bir dominant allel olarak sonuçlanmıştır.

**Kozma vd. (2009)**, bu çalışmada *Muscadinia rotundifolia* ve *Vitis vinifera*'ya ait 'Kışmış vatkana' melezinden BC3 ve BC4 hibritleri ile *V. amurensis* x *V. vinifera* hibritleri külemeye dayanıklı yeni çeşit geliştirmişlerdir. *Vitis vinifera*'nın birçok çeşidi külemeye hassas olarak tanınmaktadır. Ancak Kışmış vatkana çeşidi tam tersine hem doğal hem de yapay ortam koşullarında kendinden dayanıklı belirtiler göstermektedir. Külemeye dayanıklı *Run1* lokusu; *Muscadinia rotundifolia* çeşidinde tanımlanmıştır. 2000 yıllarında başladıkları ıslah projesi ile ilgili sofralık ve şaraplık çeşitlerde en iyi kaliteye ulaşmanın amaçlanmasına, ayrıca külemeye de dayanıklı olmasına önem vermişlerdir. F1'lere hem serada yapay şartlarda inokulasyon yapıldı, hem de bağda F1'ler bu hastalığa tabii tutulduktan sonra dayanıklı ve hassas çeşitler 1:1 oranla *Run1* geninde dominant kalıtımı ortaya çıktı. *Muscadinia rotundifolia* türünde ise; patojenlere karşı dayanıklılık özelliği kısmen değil baskın olarak görülmektedir. Hassas olarak *V. vinifera* türünden 'Nimrang' çeşidi ile *Vitis vinifera*'ya ait 'Kışmış vatkana' melezinden oluşan F1'lerde bir kalıtsal dominantlık şeklini bulmuştur. Kışmış vatkana'dan gelen dayanıklı genin (*Ren1*), ıslah için yüksek kalitede dayanıklılık sağladığı anlaşılmıştır. (*M.rotundifolia* x *V.vinifera*) BC4x Cardinal çeşidiyle melezleme sonucunda BC5 ürünü ortaya çıkmıştır. PCR-RFLP (GLP1-12) ve SSR (VMC8g9 ve VMC4f3) teknikleriyle, ortaya çıkan BC5 ürününde külemeye dayanıklılık işaretleri bulunmuştur. Birçok *Vitis* türlerinde (*V.Rupestris*, *V.Berlandieri*, *V.Labrusca*, *V.Rubra*); patojenlere karşı dayanıklılık özelliği kısmen görülmektedir. Abiyotik stresler ile meydana gelen dayanıklılığın bulunduğu halde, tam olarak fungal hastalıklara dayanıklılığı

bilinmemektedir. Bu çalışmada ilk önce, SSR primerleri ile saf *vinifera* türüne ait Kışmış vatkana çeşidinde moleküler yöntemlerin dayanıklı geninin tam yerini saptamaya çalışmışlardır.

**Coleman vd. (2009)**, küllemeye dayanıklılık geni, *REN1* Orta Asya kökenli iki asmadaki bir NBS-LRR gen grubundan ayrılmaktadır. “Kışmış vatkana” ve “Dzhandzhal kara”, *V. vinifera* türleri arasında küllemeye karşı dayanıklılık konusunda tektir. Bu çalışmada; “Kışmış vatkana’ya” göre, bağcılık için önemli olan ve bazı ayırt edici özelliklere sahip “Dzhandzhal kara”, *REN 1* geninin varlığını (örneğin; çekirdekli ve çekirdeksiz sofralık üzüm), duyarlı asmalar ile melezlenmiş dayanıklı türden birini, iki ayrı döl grubu içerisindeki 461 yavru dölden alınan rekombinantlar kullanılarak *Ren1* lokusunun tam yerini, gen içeriğini, yapısal organizasyonunu ve PN40024 dizili asmada benzer olan 1.4-Mb *Ren1* bölgesinin gelişim dinamiğini, “Kışmış vatkana” ve “Dzhandzhal kara”nın genetik alt yapısını ortaya çıkarmak için yapılan akrabalık ve populasyon analizlerini göstermektedir.

**Marguerit vd. (2009)**, çalışmalarında *Vitis vinifera* Cabernet Sauvignon ile *Vitis riparia* Gloire de Montpellier ile bir psödo test cross yapmış ve ortaya çıkan 138 bireyde 212 DNA markör (199 SSR, 11 SSCP) ve 2 adet morfolojik markör kullanmış, 1,249 cM bir bağlantı grubunu ve markörler arasında ortalama 6.7 cM bir mesafe olduğunu ispat etmişlerdir. Mildiyö hastalığına dayanıklı QTL 9 ve 12 bağlantı grupları arasında olduğunu söylemektedirler. Ayrıca cinsiyeti ile ilgili bu lokusun LG2 üzerinde (VVACS primeri) olduğu ile ilgili LG 1, 14, 17 ve 18 bağlantı grubu üzerinde bulunduğunu saptamışlar, ayrıca çalışmalarında hem mildiyöye dayanıklılık ile ilgili hem de cinsiyet ile ilgili birbirine yakın bağlantı gruplarının izlerinin olduğunu tespit etmişlerdir.

**Katula-Debrececi vd. (2010)**, BC5 (BC4 × Kışmış vatkana) melezlerinden, MDS markör yardımı ile seleksiyon yöntemi kullanarak küllemeye dayanıklı 2 baskın genin geçmesini 441 F1’de araştırmışlardır. Markör yardımı ile seleksiyon iki dominant küllemeye dayanıklı genin, *Run1* ve *Ren1* lokusların izlerinin incelemesini yapmışlardır. *Run1* lokusu *Muscadinia rotundifolia* × *Vitis vinifera* BC4 hibritlerinin, bir psödo

geriye melezleme ile geçmekte, oysaki küllemeye dayanıklı *Ren1* lokusu, *Vitis vinifera* türünden Kışmış vatkana çeşidinin çaprazlanması ile ortaya çıkmıştır. Bu çalışmada, VRH3082-1-42 × Kışmış vatkana melezlenmesi ile 1185 F1 bitkisi elde etmişlerdir. İnokulasyondan sonra 286 bitkinin tamamen dayanıksız ve 899 bitkinin dayanıklı olduğunu görmüşlerdir. Dayanıklı olanların arasından 411 ve dayanıksızlardan 30 adet rastgele seçmişler, sonunda fenotipik ve moleküler markörlerin yardımı ile dayanıklılık oranını 3:1 (*Run1+* *Ren1+* ve her iki lokus *Run1+/Ren1+*) şeklinde göstermişlerdir. Çalışmalarında küllemeye dayanıklı SSR primerleri (*Run1*'a yakın olan primer VMC8g9, VMC4f3.1) ve *Rpv1* geninden açıklanan (VMC1g3.2) ve (Barker 2005) tarafından geliştirilen BAC kütüphanesinden elde edilmiş CB (CB 69,70, CB 137,138) markörleri kullanmışlardır. Bu çalışmada, *M. rotundifolia*'da kendini gösteren *Rpv1* ve *Run1* lokusları ve her ikisinin de 12'nci bağlantı grubuna bağlı oldukları ve elde ettikleri bilgilere göre ispat etmişlerdir. *Ren1* için bazı SSR markörleri, UDV020a, VMC9h4.2 ve VMCNg4e10.1 kullandılar. Bu çalışmada, VMC1g3.2 primeri 122-140 bp ve VMC8g9 primeri 160-167 ve 174 bp uzunluklarında sonuçlar elde etmişlerdir. VMC4f3.1 primerinde sadece 2 baz (184-186) birbirinden farklı olduğu için ve sekans analiz cihazında yanlış sonuç verme ihtimali dolayısıyla iptal etmek zorunda kalmışlardır. Ama *Run1* ve *Ren1* için sadece (VMC1g3.2) primeri 122 bp ve (VMC8g9) primeri için 160 bp ve (VMC9h4.2) primerinde 286 bp uzunluğunda olanların dayanıklılık ile ilgili olduğunu söylemişlerdir. Ayrıca bu çalışmada F1, bitkilerde sadece (%28) *Run1+* ve (%37) *Ren1+* geninin bulunduğunu ve sadece 9 tane bitkide (%35), (*Run1+/Ren1+*) lokusunun çıktığını ispat etmişlerdir. Bu bitkiler 2 adet PM (küllemeye dayanıklı) genine sahip ve ayrıca bu genler farklı kromozomda olduğu (*Run1*, 12 kromozom üzerinde ve *Ren1*, 13 kromozom üzerinde) ve daha fazla avantaj sağladığı için ilerideki ıslah çalışmalarında çok önemli bir materyal olduğunu ispat etmişlerdir. Çalışmalarında çok net olarak (Marköre dayalı sistem) hibrit genotipleri ayırmada ve asmada birden fazla lokusu belirlemede MAS tekniğinin hızlı ve doğru sonuçlar ortaya çıkardığını söylemişlerdir.

**Riaz vd. (2011)**, asmada değişik (meyve, yaprak, dal, salkım iskeleti) kısımlarını değerlendirerek külleme (*E. necator*) hastalığına dayanıklı lokusların geliştirilmesine yönelik; Sınırlı bir genetik haritalama izlemi içinde farklı SSR markörlerine dayalı, 5

üzüm popülasyonundan dayanıklı lokuslar ile ilgili piramit oluşturmaya yönelik bu çalışmayı yapmışlardır. Popülasyonlarının bir kısmına, Asya türleri yerleştirdikleri için oradaki külleme mantarını incelediklerinde (*Plasmopora amurensis*) cinsinden olduğunu söylemişlerdir. Çalışmalarında *V. romanetti* Çin türleri içinde, küllemeye dayanıklı *Ren 4* lokusunun bulunduğunu, ayrıca *M. rotundifolia* (Trayshed ve Magnolia) kultivarlarından 18 nolu kromozom üzerinde külleme hastalığına dayanıklı iki lokusun (*Run 2.1* ve *Run 2.2*) olduğunu tespit etmişlerdir. En önemlisi olan 18 nolu kromozom üzerinde, önceden küllemeye dayanıklılık gösterdiğini; aynı yerde mildiyö'ye de dayanıklılık lokuslarının içerdiğini tespit etmişlerdir. Eski çalışmaların sonucundan yararlanarak mildiyö'ye dayanıklılık lokusunu taşıyan (*Rpv1*) ve aynı anda küllemeye de dayanıklı olan (*Run1*) lokusunun, 12 kromozom üzerinde olduğunu tekrar beyan etmektedirler. Asmaların her iki hastalığa dayanıklı (külleme ve mildiyö) ve QTL'deki aralıkları 4, 7, 9, 12, 13 ve 18 nolu kromozom üzerinde olduğunu; genetik yönden haritalandığını ifade etmişlerdir. Önceden küllemeye dayanıklılık ile ilgili (*Run1*) lokusunun bulunmasında kullanılan (VMC4f3.1 ve VMC8g9 ) primerlerini Trayshed için de bağlantılı olduğunu belirtmişler ve bu sebepten onu kullanmışlardır. VMC4 f3.1 için 182, 192 ve 208 bp uzunluğunda ve VMC8g9 için 137, 138, 140 ve 159 bp uzunluğunda dayanıklılık göstermişlerdir. Kullandıkları diğer markörler VMC7f2 (193, 195 ve 197 bp) ve UDV108 (202, 220 ve 198 bp) ve daha önce (Bellin 2009) kullanılan UDV305 kullanıldı ve 5 popülasyonda olduğu gibi, temiz ve açık bantlar göstermedi. Bir diğer önemli sonuç da asmanın yukarıda bahsettiğimiz farklı yerlerinden yapılan çalışmada, her bir populasyon için farklı bölgelerin küllemeye dayanıklılık gösterdiğini ifade etmişlerdir. 06708 populasyonu için salkım iskeleti ve dal; 04327 için meyve ve salkım iskeleti; 06712 için yapraklar, dal, salkım iskeleti ve meyve; 08391 için yapraklar ve 08306 için yapraklar, dayanıklı bölgeler olarak tespit etmişlerdir.

**Thines (2011)**, son zamanlarda araştırmacılar Almanya'nın güneyinde bulunan Stuttgart şehrinde çok farklı bir mildiyö patojenine rastlamışlar ki bunun, patojeni *Plasmopora viticola*'dan farklı olduğunu bulmuşlardır. Şimdiye kadar hiç gözükmemiş bu tür patojen, *Plasmopara muralis* diye adlandırılmıştır. Son 2 yıl içinde tüm Stuttgart şehrindeki bağlara bulaşan bu hastalık ve değişik patojeni, sarmaşık üzümlerde (genelde

süs amaçlı, duvar kaplaması için yetiştirilen bir çeşit olarak) daha fazla görülmüştür. Bu hastalıklı yapraktan, mikroskop yardımıyla bir damla su üzerine aktararak fotoğraflarını dijital kamera ile çekmişler. DNA izolasyonu ve PCR çalışmaları ve daha sonra sekans analizleri yapılmıştır. Filogenetik analizleri MEGA 4.0 yöntemi ile yapmışlardır. Gruplandırma analizleri mafft, 6.717 version ve Q-INS-i algoritma kullanarak belirlenmiştir. Hem gruplandırma hem de Filogenetik analizleri TreeBASE ile doğrulanmıştır. Sonuçta Parthenocissus ile bulaşık olan olgun yaprakların üst kısmında kızarıklıklar gözükmemektedir. Ama küçük yaprakları olgun yapraklar ile kıyasladıklarında daha az izler görünmektedir. Ayrıca *plasmopora*'nın *vitis* cinslerinde gözükmemesi mumsu tabakası, *Parthenocissus tricuspidata*'da görülmemektedir. Bu patojenin diğerine göre farkı; mantarın dallanma uzunluğunda belirgin bir değişiklikte gözükmesidir. Oysaki *Plasmopora viticola*'da dallanmalar gözükmemektedir. Detaylı baktığımızda, *vitis* cinsine ait *plasmopora* sporangları orta kısımdan daha uzak noktada çıkmış, ancak *Parthenocissus tricuspidata* sporanjlar daha orta kısmında gözüküştür. Genel olarak mildiyö'den bahsettiğimizde, bu türe ait özel ve geniş varyeteler söz konusu olmaktadır. Örneğin *Plasmopara muralis*, *plasmopora viticola*'dan menşe alınarak tek bir gende değişiklik olduğu görülmüştür. "Acaba *Plasmopora amurensis* Asya çeşitlerine dayalı *plasmopora viticola* ile aynı mı yoksa farklı mıdır?" sorusunu yayının sonunda sormuşlardır.

**Ramming vd. (2011)**, bu çalışmada *Vitis vinifera* × *V. romanetii* melezinden 1030 populasyon arasında küllemeye dayanıklı olanları ayırarak tek bir dominant *Ren4* lokusunun "*Erysiphe necator*"a dayanıklı olduğunu ispat etmişlerdir. Bu geriye melezlemede 2 (pBC2) ve (pBC3) populasyonda (1.030 dölden) 1:1 ayırım oranı şeklinde 543 dayanıklı ve 487 dayanıksız olarak ortaya çıkmıştır. Sadece *V. romanetii* çeşidinden gelen dokuz adet melezde *Ren4* lokusunun şiddetli küllemeye dayanıklı olduğunu sera, laboratuvar ve bağ denemelerinde ortaya çıkarmışlar ve haritalama çalışmalarında bu lokusun 18 nolu kromozom üzerinde olduğunu tespit etmişlerdir. 2006-2010 arasında *Ren4* ile ilgili pBC2 ve pBC3 asmalarını, Kaliforniya ve New York'un Külleme teşhis bölümünde yapraklar, taneler, sürgünler ve salkım iskeletini detaylı bir şekilde devamlı incelemeye almışlar ve hiç sporlama klonileri görülmemiştir. Böylece büyük ihtimal ile *Ren4* lokusunun küllemede dayanıklı olarak rol oynadığını



belirtmişlerdir. Buna ilave olarak *V. romanetii* ve onun soyundan gelen çeşitler küllemeye dayanıklı olup bu çeşitler, *Mlg* dominant genini taşıdıkları için ıslah çalışmalarında uygun bir materyal olarak değerlendirilebilmektedir.

**Blasi vd. (2011)**, çalışmalarında mildiyöye dayanıklı olan *V. Amurensis*'in genetik haritasını (232 SSR) ve (7 RGA) markörleri kullanarak çıkarmışlardır. Bu hastalığa bağlantılı olan 14 nolu kromozom üzerinde bir major QTL (*Rpv8*) lokusunu ortaya çıkarmışlardır. *V. amurensis* 'Ruprecht' (hermafrodit) çeşidinde 232 (S1) döl kullanmışlardır. Çalışmalarında kullandıkları bu 232 SSR primerinden 23 adedi amplifikasyon oluşmamış ve temiz bantlar elde edilememiştir. Ayrıca 87 adet polimorfizm olmadığı için çıkarılmıştır. Toplam 129 SSR ve RGA primerlerinden 134 adet yararlı lokusu döllere üzerinde bulmuşlardır. Oluşturdukları haritanın uzunluğu 975 cM ve markörler arası mesafe ortalama 7.3 cM dir. En uzun bağlantı grubu LG 19 yaklaşık 9 markör ve en kısası ise LG17'de 3 markör bulmuşlardır. Bu çalışma hem marköre dayalı ıslah programlarında, asma genom sekansı hem de mildiyöye dayanıklı lokusların ortaya çıkması ile en iyi şaraplık ve sofralık çeşitlerin elde edilmesine yardımcı olmaktadır.

**Moreira vd. (2011)**, iki popülasyon *Vitis spp.* (asma türleri arasında) Mildiyö hastalığına karşı, genetik harita analizleri yaparak bir QTL oluşturmuşlar ve dayanıklı lokusları bulmuşlardır. Birinci popülasyon, *Vitis vinifera*'dan hassas olan 'Moscato Bianco' çeşidi ile dayanıklı olan *V. riparia* bireylerinden melezlenerek Pop1 oluşturulmuşlardır. İkinci popülasyona ait 'VRH 3082 1-42' x 'SK77 5/3' *Vitis rotundifolia* ve *Vitis amurensis* çeşitlerinin melezi ile Pop2 oluşturmuşlardır. Dayanıklı çeşitleri bulmak için F1'ler hem bağ hem de serada inokulasyon yaparak izlerini yapraklarda incelemişlerdir. Çalışmalarında SSR, SNP ve SSCP markörleri kullanarak pop1 popülasyonuna ait LG 7, 8, 12 ve 17'de bir bağlantı grubu olduğunu bulmuşlardır. Pop 2 için çok altta bir bağlantı grubu LG1, 6 ve 7 ait olduğunu bulmuşlardır. Sonuç olarak pop1 ile pop2 arasında hiçbir bağlantı bulunmamıştır. Yani tamamen farklı gruplar olarak ortaya çıkmışlardır. Bu bilgiler ile fenotiplerin incelemesinde kromozom bölgesine ait yeni bilgiler ortaya çıkarmışlardır.

**Mahanil vd. (2012)**, külemeye dayanıklı Asya türlerinden *V. amurensis*, *V. romanetii*, *V. piasekii*, *V. davidii*, *V. davidii var. cyanocarpa*, *V. liubanensis* and *V. bashanica* olarak tanımlanmaktadır. Geniş çaplı çalışmalarında *V. romanetti*'ye ait bir aksesiyonda külemeye dayanıklı *Ren 4* lokusu 18 nolu kromozom üzerinde 15 SNP ve 1 SSR markör ile tanımlanmasını haritalayarak ortaya çıkarmışlardır. Böylece *V. romanetti*'ye ait külemeye dayanıklı, tek dominant *Ren 4* lokusu, bu hastalığın hiflerin üremesinin engellemesini göstermişlerdir. Önceki çalışmalarda *Ren 4* lokusu SSR markörü 18 nolu kromozom üzerinde VMC7F2 primeri ile bağlantılı olduğu belirlenmiştir. Ayrıca bu markör birçok hastalığa dayanıklı olduğu halde, çekirdeksizlik ile bağlantılı olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada, 05-3010 ve 07-3553 markörler ıslah popülasyonuna bağlı bir monomorf primer olarak ortaya çıkmıştır. Çekirdeksizlik önceden majör bir QTL ile 18 nolu kromozom üzerinde sadece bir popülasyonda *Ren 4* lokusuna bağlı olduğu belirlenmiştir ve diğerlerinde bu bağlantı gözükmemektedir. Kuzey Amerika ve doğu Avrupa üzüm çeşitlerine ait külemeye dayanıklı *Run1* lokuslar Chr 12 üzerinde, *Ren1* Chr 13, *Ren2* Chr 14, *Ren3* Chr 15 ve *Run2* Chr 18 üzerinde olduğunu ortaya çıktığını söylemektedirler. Çalışmada en ilginç olan *Run 2* ile *Ren 4* lokusunun SSR markörlerinde VMC7F2 ile çok sıkı bağlantılı olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmada kullanılan bu iki çekirdekli dayanıklı ve çekirdekli dayanıksız popülasyon (03-3004 ve 05-3010) ile ilgili çekirdeksizlik ve *Ren 4* lokusu 03-3004 bir biri ile çok sıkı bağlı olduğu ortaya çıkmıştır.

**Schwander vd. (2012)**, kendi yaptıkları çalışmada Asya vitis çeşitlerin gen havuzundan, mildiyö için dayanıklı yeni bir lokusu *Rpv10*'nun tanınmasını gerçekleştirmişlerdir. *Rpv10* genelde *Vitis amurensis* Asya türlerinden bilinen bir yabancı çeşit olarak ortaya çıkmıştır. Gf. Ga-52-42 çeşidi (Bacchus x Villard Blanc) melezinden ve Solaris çeşidi (Merzling x Geisenheim 6493) melezlerinden oluşmuştur. Gf. Ga-52-42. Almanya'nın Geilweilerhof ıslah enstitüsünden ortaya çıkan bir genotiptir. Bu çeşit mildiyö için yüksek oranda dayanıklılık göstermektedir. 'Solaris' ayrıca Almanya ticari çeşitlerinden ıslah edilen bir çeşit olarak tanınmış ve mildiyö için yüksek dayanıklılık oluşturmaktadır. Gf. Ga-52-42 ve Solaris melezinden 265 F1 birey oluşmuştur. Bu F1'leri fenotipik açıdan değerlendirmişler. Ayrıca genotip açıdan da SSR markörleri kullanarak mildiyö için dayanıklılığı bildirmişlerdir. Çalışmalarında QTL analizi

sonucunda, 2 adet güçlü bağlantı gurubunu (LGs) 18 ve 09 belirlemiştir. LG 18 üzerindeki lokus önceden *Rpv3* lokusu olarak belirlenmiş ve bu lokusta Gf. Ga-52-42 çeşidinden geçmiştir. Solaris'e ait dayanıklı lokusu LG09 üzerinde geçmiş ve fenotipte %50 dayanıklılık göstermiştir. Bu mildiyö dayanıklılık lokusunun ismi *Rpv10* olarak adlandırılmıştır. Mildiyöye dayanıklı *Rpv10* lokusu *V. amurensis* yabani Asya çeşitlerinden geçtiğini belirlemiştir. 314 bp uzunluğunda bir PN40024 (12X) referans genom içerisinde QTL'in sekansını bir LOD 2.1 cM mesafe ile örtüşmektedir. *Rpv10* lokusunun dayanıklılık üzerindeki olasılıklar asma ıslah programlarında tartışılmıştır. Ayrıca çalışmalarında soy ağacı analiz sonucundan yola çıkarak, Sevemyi x Muscat Ottonel' melezinden ortaya çıkan Solaris, ebeveyn için gerçek bir soy olarak bildirilmişlerdir. Bu çalışmada ayrıca bahis edilen 05 LG nolu bağlantı gurubu üzerinde *Rpv11* lokusun olduğunu ve mildiyö ile ilgili çok küçük grupta bağlı olarak ıslah çalışmalarında kullanılması tavsiye edilmemektedir. Bu yüzden marköre dayalı seleksiyon (MAS) yöntemi farklı lokuslarda yeni dayanıklı çeşitlerin belirlenmesinde güçlü bir araç olarak kullanılmaktadır.

**Blanc vd. (2012)**, çalışmalarında hem külleme ve hemde mildiyö hastalığına dayanıklı olan *M. rotundifolia* ait, SSR markörlerinden yararlanarak bir referans bağlantı gurubunun geliştirmesini amaçlamışlardır. Bu haritayı oluşturmak için S1 *M. rotundifolia* ile Regal melezinden oluşan bitkileri kullanmışlardır ve yaklaşık 948 cM uzaklığındaki 20 bağlantı gurubu üzerinde *M. rotundifolia* kromozomuna ait benzer yerde örtüştüğünü ve her markör yaklaşık 5.3 cM birbirinden uzaklıkta olduğunu bulmuşlardır. *V. vinifera* ve *M. rotundifolia*'ya ait genetik haritalarını kıyasladığında gen lokusunun yüksek oranda eş doğrusal bölgede olduğunu tahmin etmişlerdir. QTL analizlerin sonunda küllemeye dayanıklı *Ren 5* ait bir majör QTL'in 14'üncü bağlantı gurubu üzerinde olduğunu ve ayrıca fenotipik varyans %58 oranında dayanıklılık göstererek küllemeye dayanıklı lokusu bu şekilde bulmuşlardır. Sonuç olarak küllemeye dayanıklı farklı yeni bir lokusunu (*Ren 5*) 20. bağlantı gurubundan 14 (LG) üzerinde olduğunu ortaya çıkarmışlardır. Genetik bağlantı için kullandıkları 451 SSR marköründen sadece VMC9c1 markörü *Ren 5* için en yakın markör olarak tespit etmişlerdir. Ayrıca Mildiyö dayanıklı genini çok daha uzak noktada olduğunu ifade

etmişlerdir ve böylece amaçları doğrultusunda tekrar *M. rotundifolia* çeşidini külleme hastalığı için en iyi dayanıklı çeşit olarak ispat etmişlerdir.

**Di Gaspero vd. (2012)**, asmalarda (*vitis*) cinsine ait *Rpv3* lokusu mildiyö hastalığına dayanıklılık amaçlı çok etkin bir lokus olarak belirlemişlerdir. Bu çalışmada asma ıslahında farklı bölgelere ait en iyi mildiyöye dayanıklı 580 çeşidin allelerin belirlenmesi ile ilgili *Rpv3* lokusu üzerinde çalışma yapılmıştır. Bu çalışma dayanıklılığı taşıyan 5 guruptan oluşan çeşitler; 1) 1880 yılında Missouri eyaletinde *V. rupestris* ve *V. linsecumii* melezinden Munson çeşidi, 2) ilk 1879 yılında Victor Ganzin tarafından, *V. rupestris*, ıslah edilen Ganzin çeşidi, 3) 1869 yılında Illinois eyaletinde, Otto Wasserzieher tarafından *V. riparia* ve *V. labrusca* 'melezinden ortaya çıkan Noah çeşidi, 4) 1882 yılında Fransa'da, George Couderc tarafından, *V. rupestris* × *V. labrusca* melezinden ortaya çıkan Bayard çeşidi, 5) 1880 yılında Albert Seibel tarafından Fransa'da *V. rupestris* ait olan Seibel 4614 guruplar olarak seçmişlerdir. Diğer önemli konu mildiyöye ait dayanıklı *Rpv3* lokusu Kuzey Amerika'nın yabani çeşitlerinden *V. vinifera*'nın Villard Blanc çeşidine aktarılmıştır ve böylece dayanıklılık lokusunu taşımaktadır. Çalışmada yaprak örneklerini, Amerika asma gen bankası, Fransa INRA Enstitüsü ve Almanya'nın Geilweilerhof Asma Islah Enstitüsü, Macaristan ve İtalya Asma Araştırma Enstitüsü ve Rusya üniversitesinden alınmıştır. *Rpv3* lokusuna ait genotipler bu koleksiyon içinde bulunmaktadır. Haplotiplerin analizinde yaklaşık 580 çeşidin genotiplerini kullanarak, *Rpv3* lokusuna ait bir major gurup şeklinde UDV305, UDV737, UDV730, UDV732, UDV734 ve UDV736 markörleri kullanmışlardır. Çalışmada gözükken null allelerin ortaya çıkması ile homozigot allelerin olduğuna işaret etmektedir. Seibel 4614 çeşidinde, *Rpv3* 299-279 bp alleleri en çok ortaya çıkan haplotip frekansıdır ve en çok yaygın olan haplotiplerin arasında yer aldığını belirlemişlerdir. Yaklaşık 265 varyetenin içinden 106'sında bu frekans gözükmiştir. Bunun 92'si *V. vinifera* haplotipleri ile kombinasyon içindedir ve 14'ü diğer Kuzey Amerikan haplotipleri içinde kombinasyon halindedir. Ayrıca Regent çeşidinde Chambourcin'den gelen mildiyöye dayanıklı *Rpv3* 299-279 lokusu bulunmaktadır. Bu çalışmada 50 genotipte oluşan ikinci büyük haplotip frekansı *Rpv3* null-297 olarak belirlenmiştir. Daha az gözükken haplotiplerin frekansları, *Rpv3* 321-312, *Rpv3* null-271, *Rpv3* 361-299, *Rpv3* 299-314 ve *Rpv3* null-287 olarak ortaya çıkmıştır. SSR

markörlerinin kullanımı ile *Rpv3* haplotiplerin soyundan gelen mildiyöye dayanıklı olanlar bu markörlerle ortaya çıkmıştır. Bu çalışma açıkça keşif edilmemiş genetik kaynakları, dayanıklı genlerin farklılaştırılması, farklı ıslah soy hatlarının göstermesini tanımlandırmaktadır ve bu tip çalışmaların devamını da bir ihtiyaç olarak her zaman açıklamaktadır.

**Barba vd. (2013)**, bağ küllemesine direncin etkinliği ve dayanıklılığın, yüksek çözünürlü haritaların gelişmesi ile ilişkili hassas ve dayanıklı genlerin bilinmesi yoluyla artırılabilir. Yabani *V. rupestris* B38 ve kültürel *V. vinifera* ‘Chardonnay’de külleme 'ye karşı dayanıklılık ve hassaslık üzerinde çalışılmıştır. Moleküler markörler *V. vinifera* ‘PN40024’ genom dizisinde 16.833 tek nükleotid polimorfizm (SNPs) ile sonuçlanan, genetik sekans kullanılarak tanımlanmıştır. Ortalama 36 SNP/Mbp’in genom üzerinde yoğunluğundan toplam 17K setinden 11 SNP *Vitis rupestris*den dayanıklılık lokusunu 7. nolu kromozom üzerinde bulunduğunu ve ‘Chardonnay’ için 10 SNP kullanarak, hassaslık lokusunun 9. nolu kromozomda bulunmalarınıdır. Chardonnay (1.215 SNP) ve rupestris B38 (1.146SNP)’in bağlantı gurubunu incelediğinde Chardonnay çeşidine ait *Sen1* lokusunun dayanıksızlık ile ilgili olduğunu ilk olarak *V. vinifera* çeşidine ait küllemeye hassas olduğunu ortaya çıkarmışlardır. Dayanıksızlık ile ilişkili markörlerin tanımlanması ve kullanması, asma ıslah programlarında olumsuz seleksiyonlarının önlenmesinde kullanılmaktadır.

**Venuti vd. (2013)**, araştırmalarına göre *V. amurensis*’e ait Amur çeşidi ve birçok Asya’nın çeşitleri mildiyöye dayanıklı genlerini taşımaktadırlar. QTL analiz sonucu bir dominant *Rpv12* geni mildiyöye dayanıklı olduğunu bulmuşlardır. Bu lokus mildiyöye bağlı fenotip varyasyonlarında %79 olarak dayanıklılık göstermiştir. Dayanıklılık geni “Zarja severa” ve “Michurinets” çeşitlerinden melezlemeler sonucu aktarılmıştır. Ayrıca 2 SNP kombinasyona ait NB-LRR gen bölgesinde mildiyöye dayanıklı *V. vinifera*, *V. amurensis* ve *V. amurensis* × *V. vinifera* melezinde 200 dayanıklı haplotip bitki ortaya çıkmıştır. Bu çalışmada 48 *amurensis*’e ait ve *V. amurensis* × *V. viniferam* melezinden oluşan 28 varyete ve hibrit hatlara baktığımızda hepsinde *Rpv12* geni bulunmuştur. Ama 12 tanesinde sadece *RPV10* geni bulunmuştur. Mendel’e bağlı olarak gözükten dayanıklılık geni (*Rpv12*) 0.2 cM uzaklıkta 14 nolu kromozom üzerinde ortaya

çıkmiştir. Ayrıca *Rpv12* ile *Rpv3* mildiyöye dayanıklılık konusunda beraberce ek etkide bulunmaktadır. *Rpv12* haplotipinden 10 kb gen bölgesini sekanslamışlardır ve *V. vinifera*'ya ait bir sonraki jenerasyon da 12 adet polimorfizmi ortaya çıkarmışlardır.

**Zah-Bi vd. (2014)**, çalışmalarında, *V. vinifera*'nın genom haritası ile *M. rotundifolia* için genom haritası bibiri ile karşılaştırmak amacı ile yürüttükleri araştırmalarında külleme ve mildiyö hastalıklarına ait lokusları incelemişlerdir. *M. rotundifolia* ve Regale çeşitlerinde (BAC) kütüphanesi oluşturmuşlardır. Run1/Rpv1 ile ilgili SSR primerlerinden VMC4F3-1, VMC8G9 ve UDV-05 primerlerini kullanmışlar ve bu primerler ile ilgili BAC klonlamasında pozitif sonuçlara ulaşmışlardır. VMC8g9 primeri için 172 bp büyüklüğündeki alleli dayanıklılık ile ilgili bulmuşlardır. Sonuç olarak *M. rotundifolia* çeşidinin genomunu *V. vinifera* genomuna yakın bulmuşlardır.

Dünyada gerçekleştirilen bu araştırmaların asmada genetik ilerlemeye büyük fayda sağladığı ve hız kazandırdığı gözlemlenmektedir. Ülkemizde de bu alanda öncü ve ileri çalışmaların gerekliliği ortaya çıkmaktadır. Sonuçlandırdığımız bu çalışma bu gerçeğin gerekliliği sonucunda ortaya çıkmıştır.

### **3. MATERYAL ve YÖNTEM**

Bu çalışma "Moleküler Markörlerin Bağcılıkta Külleme ve Mildiyö Hastalıklarına Dayanıklı Çeşit Islahında, Marköre Dayalı Seleksiyon (Marker Assisted Selection-MAS) Amaçlı Kullanılması" konulu, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümünde yürütülen bir BAP projesi (Proje Kod No: BAP/09B4347002) kapsamında 2010-2012 yılları arasında, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü laboratuvarı, üretim ve araştırma seraları ve bağında, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Toprak Bilimi ve Bitki Besleme Bölümü üretim ve araştırma serası, Ankara Üniversitesi Merkez Biyoteknoloji Laboratuvarı, Kalecik Bağcılık Araştırma ve Uygulama İstasyonu, Kalecik'te BAK Şarapçılığa ait üretim bağında yürütülmüştür.

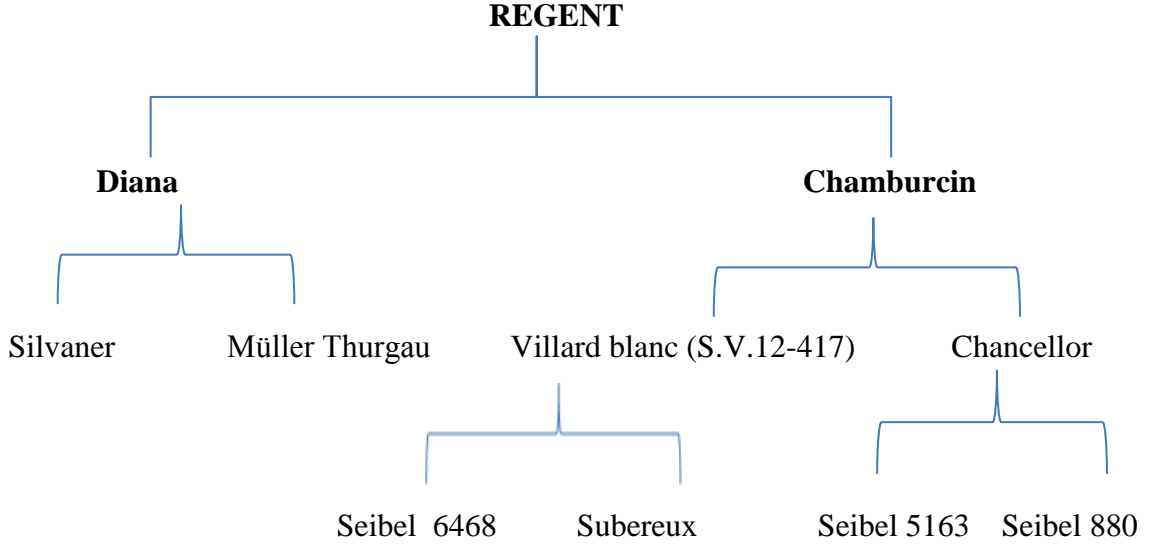
Üzerinde çalışılan genotiplere ait materyaller Kalecik BAK şarap üretim firması ve Kalecik Araştırma ve Uygulama bağından ebeveyn olarak seçilen Kalecik Karası, Regent ve Boğazkere üzüm çeşitlerinin melezleme çalışmaları sonucu (Kalecik Karası x Regent, Boğazkere x Regent) F1'ler elde edilmiştir. Projenin vejetasyon dönemlerinde yapılan kastrasyon ve melezleme çalışmaları sonucu geliştirilen F1 populasyonlarına ait genotiplerde külleme ve mildiyö hastalıklarına dayanıklı olanların, Marköre Dayalı Seleksiyon yolu ile erken seleksiyonu amaçlanmıştır.

#### **3.1 Materyal**

Bu çalışmada ana ebeveyn olarak Kalecik Karası ve Boğazkere çeşitleri, baba ebeveyn olarak Regent (dayanıklı ebeveyn) kullanılmıştır. Boğazkere × Regent melezlemesinden 168 adet F1 bitkisi ile Kalecik Karası × Regent melezlemesinden 25 adet bitki bitkisel materyal olarak kullanılmıştır.

### 3.1.1 Regent, şaraplık üzüm çeşidi

Çizelge 3.1 Şekil 3.1 ve 3.2’de Regent üzüm çeşidine ait özellikler verilmiştir.



Şekil 3.1 Regent üzüm çeşidinin soy ağacı (Akkurt vd. 2007)

Çizelge 3.1 Regent, şaraplık üzüm çeşidine ait özellikler

<b>Orijin</b>	Avrupa ve Amerikan türlerinin ortak melezi, Almanya
Sinonimler	GEILWEILERHOF 67-198- 3
<b>Tane Özellikleri</b>	
Renk	Siyah mavi renkte
Şekil	Yuvarlak
Büyüklik	Küçük-Orta
Çekirdek	1-2
Tad	Kiraz ve black corrent tadında
<b>Salkım Özellikleri</b>	
Şekil	Kanatlı konik
Büyüklik	Orta
Sıklık	Orta
<b>Kültürel Özellikler</b>	
Olgunlaşma	Almanya’da Orta mevsim
Yöre	1996’da ilk olarak Almanya’da kültüre alınmış ve diğer Avrupa bağlarına yayılmıştır
İslahçı	Gerhard Alleweldt, melezleme yılı 1967
Budama	8-10 göz bırakılarak budanır
<b>Diğer Özellikler</b>	Regent hibrit üzüm çeşitleri arasında en önemli şaraplık çeşitlerden birisidir, Şarapta bulunan alkol miktarı fazladır, <u>Diana x Chambourcin</u> melezi ile ortaya çıkmıştır, Sıra aralığı 1.9-2 m olarak dikilir, Asit miktarı 3 g/l’dir.





Şekil 3.2 Regent çeşidine ait salkımın görüntüsü

### 3.1.2 Boğazkere, şaraplık çeşidinin özellikleri

Çizelge 3.2 ve şekil 3.3’de Boğazkere üzüm çeşidine ait özellikler verilmiştir.



Şekil 3.3 Boğazkere üzüm çeşidine ait omcanın görüntüsü

Çizelge 3.2 Boğazkere, şaraplık üzüm çeşidinin özellikleri

<b>Orijin</b>	Türkiye
Sinonimler	Yok
<b>Tane Özellikleri</b>	
Renk	Mor-siyah
Şekil	Yuvarlak
Büyükük	Orta büyüklükte, 3-4 gr
Çekirdek	2-3
Tad	Yüksek tanenli bir tada sahip
<b>Salkım Özellikleri</b>	
Şekil	Kanatlı konik
Büyükük	İri
Sıklık	Sık, dolgun yapılı
<b>Kültürel Özellikler</b>	
Olgunlaşma	Orta mevsim (Eylül ortası)
Yöre	Diyarbakır
Budama	Yarı-uzun/Kısa
<b>Diğer Özellikler</b>	Üzümün kabuklarında bulunan ve şaraba burukluk katan tanen oranı çok yüksektir, Burukluğun yanı sıra, baharatlı tadı, şarap üretiminde Boğazkere üzümünü çok değerli kılmaktadır, Tarihi çok eskiye dayanan bir Anadolu üzümüdür.

### 3.1.3 Kalecik Karası, şaraplık çeşidinin özellikleri

Çizelge 3.3 ve şekil 3.4’de Kalecik Karası üzüm çeşidine ait özellikler verilmiştir.



Şekil 3.4 Kalecik Karası üzüm çeşidine ait salkım görüntüsü

Çizelge 3.3 Kalecik Karası, şaraplık üzüm çeşidinin özellikleri

<b>Orijin</b>	Türkiye, Orta Anadolu'da Ankara-Kalecik
Sinonimler	Yok
<b>Tane Özellikleri</b>	
Renk	Siyah mavi renkte
Şekil	Yuvarlak
Büyüklik	Küçük-Orta, 2g
Çekirdek	1-3
Tad	Çilek ahududu ve kiraz
<b>Salkım Özellikleri</b>	
Şekil	Kanatlı konik
Büyüklik	Küçük-Orta, 125-200 g
Sıklık	Sık
<b>Kültürel Özellikler</b>	
Olgunlaşma	Orta mevsim (Kalecik koşullarında Eylül ortası)
Yöre	Orta Anadolu, Ankara'nın Kalecik ilçesi
Budama	Yarı-uzun/Kısa
<b>Diğer Özellikler</b>	Şarabının özellikleri: Menekşe-yakut renkli, çeşide özgü aromalı, kırmızı meyve aromalarınca zengin, canlı, dolgun ve dengelidir. Alkol oranı %12-14 ve sırasındaki asit miktarı tartarik asit cinsinden 4-7 g/l'dir.

### 3.2 Yöntem

2010-2012 yılları arasında yapılan melezleme çalışmasında ana bitki olarak seçilen Kalecik Karası (kırmızı şaraplık) üzüm çeşidine ait Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Araştırma ve Uygulama Bağı ile Boğazkere (kırmızı şaraplık) üzüm çeşidine ait, Kalecik adresindeki BAK Şarapçılığa ait bağdan, kuvvetli gelişme gösteren, sağlıklı 20'şer adet omca seçilerek işaretlenmiştir.

#### 3.2.1 Babalık çeşitten çiçek tozlarının izole edilerek alınması

'Regent' çeşidine ait salkımlar çiçeklenmeden önce 25x30 cm ebatlarında parşomen kâğıdından oluşturulan keseler içerisine alınarak izole edilmişlerdir (Şekil 3.5). Tozlanma zamanında keselerin ağızları açılarak, çiçek tozları melezlemede kullanılmak üzere alınmışlardır.



Şekil 3.5 ‘Regent’ üzüm çeşidine ait salkımın kese içerisinde izole edilmesine ait görüntü

### 3.2.1.1 Ana çeşitlerde salkımların izole edilmesi

Üzerinde çalışılan ana çeşitlere (Kalecik Karası ve Boğazkere) ait deneme salkımları çiçekler açılmadan önce, yabancı tozlanmadan korumak amacıyla parşomen kese kâğıtları içerisinde alınarak izole edilmişlerdir (Şekil 3.6).



Şekil 3.6 Üzerinde çalışılan ana çeşitlere çiçekler açılmadan önce parşomen kese kâğıtları içerisinde alınarak izole edilmesi

### 3.2.1.2 Analık çeşitlere ait salkımların kastrasyonu ve kastre edilmiş salkımların izolasyonu

Ana çeşitlere ait salkımlarda, kendi çiçek tozlarıyla döllemenin önlenmesi amacıyla çiçeklenme başlangıcından önce kastrasyon işlemi yapılmıştır. Bu işlem, taç halkası (korolla)'nın yaklaşık 2 mm'lik kısmının erkek organ (stamenler) başçıkları ile birlikte kesilip atılması suretiyle gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.7). Kastrasyon işlemi salkımlar üzerinde 150–200 adet dişi organ kalacak şekilde tamamlanmış, ardından geriye kalan çiçekler kesilip salkımdan uzaklaştırılmıştır (Şekil 3.8). Kastre edilen salkımlar 25 x 30 cm ebatlarında parşomen keseler içine alınarak, yabancı tozlanmaya karşı izole edilmişlerdir. Her bir salkımın üzerine kastrasyon tarihi ve çeşidin adı yazılı etiketler asılmıştır (Şekil 3.9).



Şekil 3.7 Ana çeşite ait salkımda taç halkası ve (stamen)'lerin kesilip atılması işleminden bir görüntü



Şekil 3.8 Boğazkere üzüm çeşidinde kastrasyon işlemi tamamlanmış bir salkımın görünümü



Şekil 3.9 Kastrasyon sonrası parşomen kese kâğıdı ile izole edilmiş salkımların deneme omcası üzerindeki görünüşü

### 3.2.1.3 Salkımların tozlanması ve tozlanan salkımların izolasyonu

Kastrasyon işleminden sonra izole edilen salkımların çiçek tozu kabul etme durumları, kastrasyonu takip eden iki üç gün içerisinde kese kâğıtları açılıp, çiçeklerin dişicik tepeleri kontrol edilerek belirlenmiştir. Dişicik tepesinde şekerli beyaz damlacık görüldüğü anda babalık çeşide ait çiçek tozlarının bir suluboya fırçası yardımıyla ana çeşidin dişi organı üzerine serpilmesi suretiyle tozlama gerçekleştirilmiştir. Bu şekilde melezlenen salkımlar yabancı tozlanmaya karşı parşomen kese kâğıtları içerisinde



alınarak korunmuşlardır. Birinci tozlamayı takip eden iki günde, yukarıda açıklanan işlemler tekrarlanarak salkımlarda ikinci ve üçüncü tozlama işlemi yapılmıştır.

#### **3.2.1.4 Melez salkımlarda tane tutumunun takibi ve ardından salkımların etiketlenmesi**

Mezleme yapılan “Kalecik Karası x Regent” kombinasyonuna ait salkımlar ve “Boğazkere x Regent” kombinasyonuna ait salkımlar tozlanma ve dölleme olaylarının tamamlanıp, tane tutumunun gerçekleşmesinin görülmesinin ardından, melez salkımlarda keselerin ağızları açılarak etiketleri asılmış ve mezleme yapılan salkımlarda olgunluk takip edilmiştir (Şekil 3.10- 3.11).



Şekil 3.10 Tane tutumundan sonra keseden çıkarılmış Boğazkere çeşidine ait salkım görünümü



Şekil 3.11 Melez salkımın, kese kağıdından çıkartıldıktan sonra etiketlenmiş görünümü

### 3.2.1.5 Melez salkımlarda olgunluğun takibi

Mezleme yapılan salkımlarda hasat zamanına kadar olgunluk düzenli olarak takip edilmiştir (Şekil 3.12).



Şekil 3.12 Olgunluk takibi yapılan “Boğazkere x Regent” melezlemesine ait bir hibrit salkımın omca üzerindeki görünüşü

### 3.2.1.6 Melezlenen salkımların hasadı ve çekirdeklerin çıkartılması

Melez salkımlar, tam olgunluğa eriştikten sonra etiketleriyle birlikte hasat edilmişlerdir. Hasat edilen üzüm tanelerinden, hibrit çekirdekler çıkartılarak meyve etinden iyice arındırılmış, yıkanıp temizlenmişlerdir. Çekirdekler mantari enfeksiyonlara karşı fungusit ile muamele edilerek, gölgede kurumaya bırakılmışlardır. “Kalecik Karası x Regent” kombinasyonunda 50 adet, “Boğazkere x Regent” kombinasyonundan 900 melez tohum (çekirdek) elde edilmiştir. Kurutulan hibrit genotiplere ait tohumlar, petri kaplarına alınarak etiketlenmiş ve katlama tarihine kadar +4 °C de muhafazaya alınmışlardır (Şekil 3.13-3.14).





Şekil 3.13 Hasat edilen melezleme ürünü salkım görüntüsü



Şekil 3.14 Hasat edilen salkımlardan hibrit çekirdeklerin çıkartılmasına ait görüntü

### 3.2.1.7 Hibrit tohumların katlanması

Her iki melezleme kombinasyonundan elde edilen hibrit tohumlar çimlendirme öncesi, gerçek dinlenmenin kırılması amacıyla katlamaya alınmışlardır. Katlamada kullanılacak dere kumu elekten geçirildikten sonra otoklavlanarak sterilize edilmiş, nemlendirildikten sonra 18x10x7 cm ebatlarındaki şeffaf plastik kaplara doldurulmuştur. Hibrit tohumlar, mantari enfeksiyonlara karşı fungusitle ilaçlanmış ve ardından katlama ortamına serilmişlerdir. Üzerleri nemli dere kumu ile örtüldükten sonra sıcaklığı +4 °C'ye ayarlanmış, inkübatörlere konulmuşlardır (Şekil 3.15-3.16).



Şekil 3.15 Nemli dere kumu içerisinde katlamaya alınan hibrit tohumların görüntüsü



Şekil 3.16 Tohumların katlama işleminin gerçekleştirildiği inkübatörler içerisindeki görüntüsü

### 3.2.1.8 Hibrit tohumların katlamadan çıkarılması

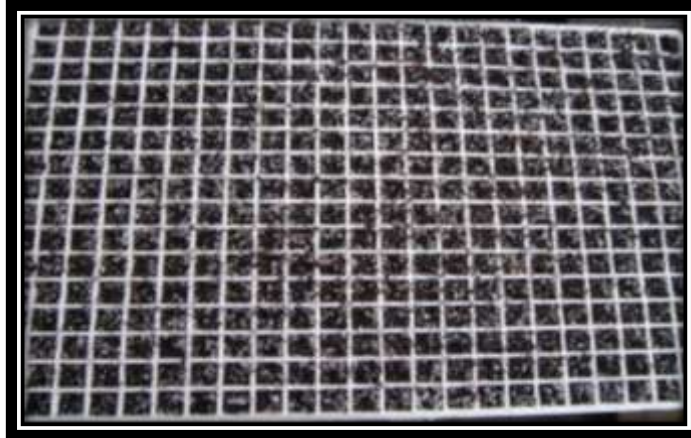
Katlama uygulaması  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 90 gün süreyle gerçekleştirilmiş ve 90 günün sonunda, katlamaya son verilerek tohumlar inkübatörden çıkarılmışlardır. Tohumlar, 2.00 mm çaplı elekler içerisinde su ile yıkanarak kumdan arındırılmıştır (Şekil 3.17).



Şekil 3.17 Boğazkere x Regent melezleme kombinasyonuna ait hibrit tohumların katlamadan sonra kumdan arındırılmaları

### 3.2.1.9 Hibrit tohumların çimlendirilmesi

Her iki kombinasyona ait hibrit tohumlar katlama sonrası çimlendirilmeye alınmıştır. Bu amaçla elde edilen hibrit tohumlar, Perlit (1/2) + Torf (1) + Vermikulit (1/3) karışımından oluşan çimlendirme ortamı serili 216'lık viyol kaplarına 1.5 cm derinlikte ekilmişlerdir. Tohum ekimi elle gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.18). Tohum ekimi yapılan viyoller, sıcaklık, nem ve havalandırması kontrol altında tutulan, çimlendirme odalarına alınmıştır. Çimlendirme odası sıcaklığı 24°C nisbi nem %75 olacak şekilde ayarlanmıştır. Ekim yapılan tohumlar ilk kökcüklerin görülmesinin ardından, köklendirme serasına alınmışlardır (Şekil 3.19).



Şekil 3.18 F1 hibrit tohumlarının viyollere ekim işlemine ait görüntü



Şekil 3.19 Regent x Boğazkere kombinasyonuna ait bitkilerin köklendirme serasındaki görünümleri

#### **3.2.1.10 F1 bitkilerinin şaşırtılması**

Çimlenen bitkiciklerin 3-5 adet gerçek yapraklarının çıktığında bitkiler, Ankara Üniversitesi, Bahçe Bitkileri Bölümü üretim seralarına şaşırtma yapılmak üzere nakledilmişlerdir (Şekil 3.20). Üretim serasında viyollerde bulunan F1 bitkileri, içerisinde Perlit (1) + Torf (1) + Kokopit (1) karışımı bulunan siyah plastik saksılar içerisine şaşırtılmışlardır (Şekil 3.21). Saksılara şaşırtılan her iki kombinasyona ait F1 bitkilerinin her birine numara verilmek suretiyle etiketlenmiştir (Şekil 3.22). F1 bitkilerinin şaşırtma işleminden itibaren sera içerisinde sulama, gübreleme ve ilaçlama gibi bakım işlemleri gerçekleştirilmiştir.





Şekil 3.20 Hibrit bitkilerin plastik saksılara şaşırtma işleminin görüntüsü



Şekil 3.21 Şaşırtılan bitkilerin köklendirme serasındaki görüntüsü



Şekil 3.22 Köklendirme serasında hibrit F1 bitkilerinin etiketlenmesine ait görüntü

### 3.2.1.11 F1 Hibrit bitkilerinden yaprak örneklerinin toplanması ve muhafazası

Kalecik Karası x Regent ve Boğazkere x Regent melezleme kombinasyonlarında köklendirme serasında gelişimlerini sürdüren F1 bitkilerinden DNA izolasyonlarında kullanılmak üzere yaprak örnekleri 2010-2011 Ağustos dönemi boyunca toplanmıştır. Bu amaçla, her bir F1 bitkisinin sürgün ucundan itibaren ilk üç genç yaprağı alınarak, etiketi ile birlikte alüminyum folyo ile sarıldıktan sonra şeffaf polietilen torbalara konulmuştur (Şekil 3.23). Buz üzerinde biriktirilen torbalar vakit geçirmeden laboratuvara götürülerek, burada izolasyon zamanına kadar muhafaza edilmek üzere, sıvı azota daldırılarak şok bir dondurmanın ardından, -80 °C deki derin dondurucuda muhafaza altına alınmıştır.



Şekil 3.23 F1 bitkilerinin sürgün ucundan ilk üç genç yaprağın analiz için alınması

### 3.3 DNA İzolasyonu

F1 bitkilerinden DNA izolasyonları sağlıklı genç yaprak örnekleri kullanılarak, Lefort vd. (1998) protokolüne göre gerçekleştirilmiştir.

İzolasyon aşamaları aşağıdaki gibi uygulanmıştır;

1. Havan içerisine konan yaprak örnekleri sıvı azot ile dondurularak, havan eli yardımıyla kül (un) kıvamına gelene kadar ezilmiştir (Şekil 3.24). Ezilen yaprak örneklerinden 100 mg alınarak 2 ml'lik mikro santrifüj tüplere konulmuştur,

2. Tüplerin üzerine 1 ml DNA ekstraksiyon solüsyonu (örnek başına 10 µl Merkuptoethanol içerir) ilave edildi ve homojen hale gelinceye kadar karışması sağlanmıştır,
3. Sıcaklığı 65°C'ye ayarlanmış su banyosunda arasıra çalkalanarak 15 dakika bekletilmiştir,
4. Su banyosunun ardından örneklerin üzerine 0.5 ml kloroform/isoamil alkol (24:1) karışımı eklenmiş, iyice çalkalanmış ve 30 dakika buz üzerinde bekletilmiştir,
5. Oda sıcaklığında, 5 dakika 14.000 rpm hızında santrifüj edilmiştir,
6. Ependorf tüpün üst kısmındaki sıvı diğer bir steril mikro santrifüj tüpe aktarılmıştır,
7. Üzerine 0.8 ml isopropanol eklenmiş ve bir gece -20°C bekletilmiştir,
8. Örnekler 1 dakika 14.000 rpm hızında santrifüj edilmiş ve ardından üstteki sıvı dökülerek uzaklaştırılmıştır,
9. Tüplerde kalan pellet (çökelti) üzerine 1 ml % 70'lik ethanol eklendi ve 2 dakika 14.000 rpm hızında santrifüj edilmiştir,
10. Tüplerde bulunan ethanol uzaklaştırıldı ve tüplerin ağzı açık bırakılarak içerisinde bulunan alkolün tamamen uçması sağlanmıştır,
11. DNA, 100 µl H<sub>2</sub>O (nuclease free)'da çözülmüş, gece boyu +4°C'de tutularak DNA'nın çözülmesi sağlanmıştır,
12. Her 100 µl için 1 µl RNase-A (RNase-A; Sigma R9009; 10 mg/ml) eklenerek, 37°C'de 30 dakika etüvde bekletilmiştir,

#### **DNA ekstraksiyon solüsyonu hazırlığı (50 ml çözelti için)**

- 2 ml TRIS (50 mM. pH 8.0)
- 4 ml EDTA (50 mM. pH 8.0)
- 10 ml LiCl (4M)
- 1 g CTAP (% 1)
- 2 g PVP (% 2)
- 0.5 ml TWEEN 20 ( % 0.5)



Şekil 3.24 Havanda sıvı azot ile yaprak örneklerinin DNA ekstraksiyonu amacıyla öğütülmesine ait görüntü

### 3.3.1 İzole edilen DNA'ların agaroz jel'de görüntülenmesi

F1 hibrit bitkilerin genç yapraklarından izole edilen DNA'lar Agaroz Jel Elektroforez yöntemi ile görüntülenmiştir. Bu amaçla %1'lik Agaroz jel kullanılmıştır.

100 ml %1'lik agaroz jel hazırlığı için aşağıdaki adımlar takip edilmiştir.

- 1 gr agaroz tartılarak, 100 ml'lik erlene konulmuş, üzerine 100 ml 1xTBE solüsyonu eklenmiştir,
- Hafifçe çalkalanıp, agarozun erimesi amacıyla mikrodalga fırında kaynatılmıştır,
- Kaynama başlangıcında mikrodalgadan çıkarılan çözelti, musluk suyu altında tutularak bir miktar soğutulmuş ardından 5 µl Ethidium Bromid eklenmiştir,
- Ethidium Bromidin çözelti içerisinde dağılması amacıyla erlen hafif şiddette çalkalanmış, ardından hava kabarcığı oluşturmadan yavaş ve dikkatli bir şekilde jel taşıyıcı tepsiye dökülmüştür.
- Jelin polimerize olması için 30 dakika çeker ocak altında bekletilmiştir (Şekil 3.25).

### 1xTBA buffer hazırlığı (1 litre için)

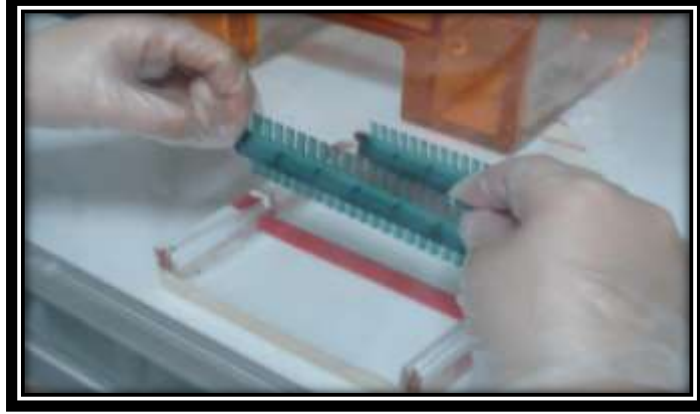
108 gr Tris

54 gr Borik asit

40 ml (0.5M) EDTA Toplam PH: 8.26-8.28



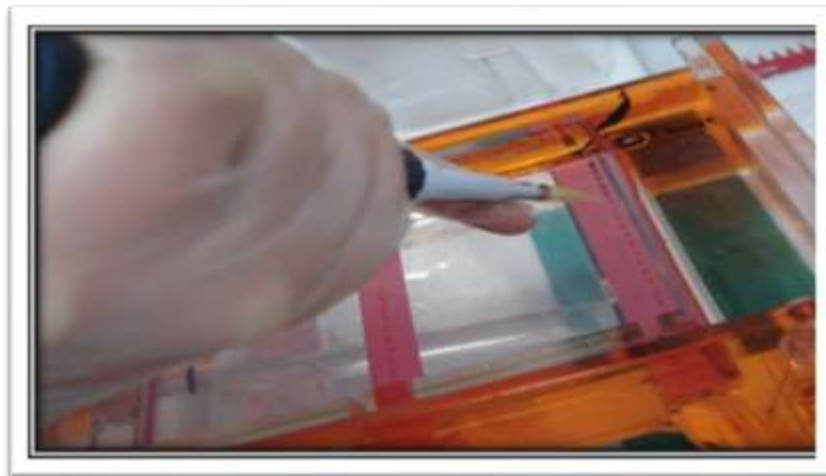
Bu şekilde 10x TBE bufferi hazırlamış oluyoruz. Bu çözülden 10 ml alarak 90 ml su ile karıştırdığımızda 1x TBE bufferi elde ediyoruz.



Şekil 3.25 Polimerize olması için çeker ocak altında bekletilen agaroz jelin görüntüsü

### 3.3.2 Örneklerin jele yüklenmesi

Taşıyıcı tepside dikkatlice alınan jel, elektroforez tankı içerisine yerleştirildikten sonra tankın içine jelin üstünü kapatacak kadar 1XTBE çözeltisi doldurulmuştur, 4  $\mu$ l yükleme tamponu, 2  $\mu$ l örnek bir parafilm üzerinde karıştırılıp, jele yüklenmiştir (Şekil 3.26). Örnekler 100 V'da 60 dakika yürütüldükten sonra UV ışık altında "SynGene Jel Görüntüleme Sistemi" ile görüntülenmiştir.



Şekil 3.26 Örneklerin agaroz jele yüklenmesine ait görüntü

### 3.3.3 DNA Miktar ve saflık ölçümleri

İzole edilen DNA örneklerinin miktar ve saflığına, agaroz jel görüntüleri ile birlikte spektrofotometrik (NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer) ölçümler sonucu karar verilmiştir. Nanodrop Spektrofotometre ile ölçümler gerçekleştirilmiştir. Ölçüm sonuçlarına göre saflık değeri 1.8-2.0 arasında olan örnekler saf DNA olarak değerlendirilmiştir. Ölçümler her bir örnek için iki tekrarlı olarak yapılmıştır.

### 3.3.4 PCR analizleri

F1 bitkilerinden izole edilen DNA'ların PCR tekniği ile çoğaltımları Biometra Uno Thermocycler'da gerçekleştirilmiştir. PCR çoğaltımları SSR, SCAR ve CAPS markör tekniklerine göre gerçekleştirilmiştir. Çizelge 3.4'de, araştırmada kullanılan primerler ve primerlerin bağlantılı olduğu külleme veya mildiyöye dayanım özelliği ayrıntılı olarak verilmiştir.

Çizelge 3.4 Çalışmada kullanılan markör teknikleri ve primer sekansları

Markör	İleri Primer	Geri Primer	Bağlantılı Lokus
1) VMC8g9	AAC ATT ATC AAC ATG GTT TTA	ATA TTC ATC CTT CCC ATC ACT A-	SSR, <i>Run1</i>
2) VMC1g3.2	-GAT AGT TAC CAT ACT TAG TCG GA-	-ACT TAG CTT CAG AAG AAA ATA GA-	SSR, <i>Rpv1</i>
3)VMC7F2	AAGAAAGTTTGCA GTTTATGGTG	AAGATGACAATAG CGAGAGAGAA	SSR, <i>Ren3</i> , <i>Ren4</i> , <i>Rpv3</i>
4) UDV-015	TGC ACA TTT CCC TCC TTA G	CGG GTT ACT GGG AAG GGT AT	SSR, <i>Ren3</i>
5) UDV-305	TGGTGCAATGGTC ATAATTT	GAGGAAAAGAGA AAGCAAAGA	SSR, <i>Rpv3</i>
6) VMCNG2-f12	TCG CTG GAG AGA TAG ATG CCT T-	AGG CCA CCG GAT CAA AAC T-	SSR, <i>Rpv1</i>
7) ScORA7-760	-GAA ACG GGT GTG AGG CAA AGG TGG-	-GGC CAT TAG GAA ATC AAC ATT AC-	SCAR, <i>Ren3</i>
8) ScORN3-32	-GGT ACT CCC CAT TAA CGA CAG C-	-GTA CTC CCC CCA ACA TAG CCA T-	SCAR, <i>Ren3</i>
9) ScORA14	TCT GTG CTG GAG AAG AGA TGA G	TCT GTG CTG GCA GTC ATT ATT A-	SCAR, <i>Rpv3</i>
10) GLP1-12	-GGA ATA TTT ACT TGG ACA TCG-	-CAT TTG AAT TGG AGC ATA CTC-	CAPS, <i>Run1</i>

### **PCR karışımları**

PCR Karışımı, 0.5 ml ependorf tüpte;

20–100 ng DNA,

20–50 pmol ileri (forward) primer

20–50 pmol ters (revers) primer

200–500 mM toplam dNTP

0.5–1.5 ünite Taq DNA Polymeraz

1.5–3.5 mM Mgcl<sub>2</sub>

2.5 µl 10x Buffer

Olacak şekilde toplam 25 µl hacminde tamamlandıktan sonra üzerine 1 damla mineral yağ eklenerek gerçekleştirilmiştir.

### **PCR Döngüsü (PCR Programı)**

1. 94 °C' de 4 dak ön denaturasyon
  2. 94 °C' de 1 dak DNA çift iplikçığının ayrılması (denatürasyon),
  3. Primer annealing sıcaklığı 1 dak (annealing),
  4. 72 °C' de 1 dak yeni iplikçığın yazımı (extension),
  5. 72 °C' de 10 dak son yazılım,
- (2- 4 basamaklar 35 döngü olarak uygulanmıştır)

### **3.3.5 PCR ürünlerinin görüntülenmesi**

SCAR, SSR ve CAPS tekniğine göre elde edilen PCR çoğaltım ürünleri agaroz jel elektroforez tekniği ile ayrılarak UV ışık altında görüntülenmiştir.

100 ml %1.5' luk agaroz jel hazırlığı için aşağıdaki adımlar takip edilmiştir;

- 1.5 gr agaroz tartılarak. 100 ml'lik erlene konulmuş, üzerine 100 ml 1x TBE çözeltisi eklenmiştir,
- Hafifçe çalkalanıp, agarozun erimesi amacıyla mikrodalga fırında kaynatılmıştır,
- Kaynama başlangıcında mikrodalgadan çıkarılan çözelti, musluk suyu altında tutularak bir miktar soğutulmuş ardından 7 µl Ethidium Bromid eklenmiştir,
- Ethidium'un çözelti içerisinde dağılması amacıyla erlen hafif şiddette çalkalanmış, ardından hava kabarcığı oluşturmadan yavaş ve dikkatli bir şekilde jel taşıyıcı tepsiye dökülmüştür,
- Jelin polimerize olması için 30 dakika çeker ocak altında bekletilmiştir,

### 3.3.6 PCR Ürünlerinin jele yüklenmesi

Taşıyıcı tepside dikkatlice alınan jel, elektroforez tankı içerisine yerleştirildikten sonra tankın içine jelin üstünü kapatacak kadar 1x TBE (Tris, Borik asit, EDTA) çözeltisi doldurulmuştur. PCR amplifikasyon ürünleri uygun ölçüde pipet kullanarak jel kuyularına yüklenmiştir. Örnekler 100 V'da 60 dakika yürütüldükten sonra UV ışık altında "SynGene Jel Görüntüleme Sistemi" ile görüntülenmiştir.

### 3.3.7 PCR çoğaltım ürünlerinin görüntülenmesi ve kapiller elektroforezde allel verilerinin görüntülenmesi

PCR amplifikasyon ürünleri, SCAR primerlerinde (ScORA7-760, ScORN3-32, ScORA14) %1.5-2'lik agaroz jelde yürütülmüştür. CAPS markörüne ait GLP1-12 primerinin amplifikasyon ürünleri *EcoRI* restriksiyon enzimi ile kesilmesinin ardından agaroz jele yüklenmiştir. SSR primerlerinde PCR ürünleri (VMC1g3.2, VMC8g9, VMC7F2, UDV-015, UDV-305, VMCNG2-f12) %2'lik agaroz jelde yürütülmüş ve çoğaltım ürünü bantlar görüntülenmiştir. Daha sonra SSR allellerin görüntülenmesi için ayırımında kapiller elektroforez yöntemi kullanılmıştır. Jellere göre daha iyi ayırım gücüne sahip olan, zaman ve iş gücünden tasarruf amacıyla, az miktar PCR ürünü kullanma, çok sayıda örnekle çalışılabilmeye olanak sağlaması, DNA polimeraz'dan kaynaklanan ve starter pikler (bant) olarak adlandırılan PCR amplifikasyonu sırasında yanlış bağlanımların kolaylıkla belirlenmesi, otomatik olarak allel büyüklüklerinin

tespit edilmesi ve yanlış okumaların ortadan kaldırılması gibi önemli avantajlara sahiptir. Söz konusu avantajlara sahip sistemlerin kullanıldığı metot kısmında kapilleri elektroforez amacıyla Beckman CEQ™ 8800 Genetik Analiz Sistemi kullanılmıştır. CEQ™ 8800 cihazında aynı anda 2 adet 96'lık plate ile çalışılma olanğı mevcuttur. Lokuslara ait PCR ürünleri % 2'lik agaroz jelde koşturulduktan sonra, işaretlemede kullanılan flüoresan (Proligo, wellred işaretli primerler, Fransa) boyalara göre (örneğin; D4, D3, D2) örnekler değişik oranlarda (1:5, 1:10 gibi) 20 µl SLS (Sample Loading Solution) ile seyreltilmiştir. Örnek ve SLS karışımları üzerine 0.4 µl size standart-400 eklendikten sonra karşım vortekslenerek ve santrifüj edilerek üzerine bir damla mineral yağ damlatılmıştır. Daha sonra plate CEQ™ 8800 Genetik Analiz Sistemi'nde elektroforez edilmiştir.

## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

### 4.1 Melezleme ıslah çalışmaları

Bu araştırmada ülkemizin külleme ve mildiyöye hassas ancak çok kaliteli kırmızı şaraplık üzüm çeşitleri arasından ana ebeveynler olarak seçilen Boğazkere ve Kalecik Karası üzüm çeşitleri 2010 ve 2011 yılları vejetasyon dönemlerinde Regent çeşidi ile melezlenmiştir. Sonuçta “Kalecik Karası x Regent” ve “Boğazkere x Regent” olmak üzere iki adet melezleme kombinasyonu oluşturulmuştur. İki yıl üst üste yürütülen melezlemeler ve elde edilen hibrit tohumların (çekirdeklerin) bitkiye dönüştürülmesi sonucu elde edilen araştırma bulguları Çizelge 4.1’de verilmiştir. Toplam bitkiye dönüştürmeleri içerisinde en kuvvetli, sağlıklı ve iyi gelişmiş olan “Boğazkere x Regent” kombinasyonundan yaklaşık 168 adet ve “Kalecik Karası x Regent” kombinasyonundan 25 adet F1 bitkisi seçilmiş ve külleme ve mildiyö hastalıklarına dayanıklılıkla ilişkili markörler ile PCR analizlerinde kullanılmıştır. Çalışmada Kalecik Karası üzüm çeşidinde kastrasyon, melezleme sonuçlarındaki nedeniyle istediğimiz miktarda F1 bitkisine ulaşamamıştır.

Çizelge 4.1 Mezlenen çiçek sayısı ve elde edilen F1 bitki sayısı

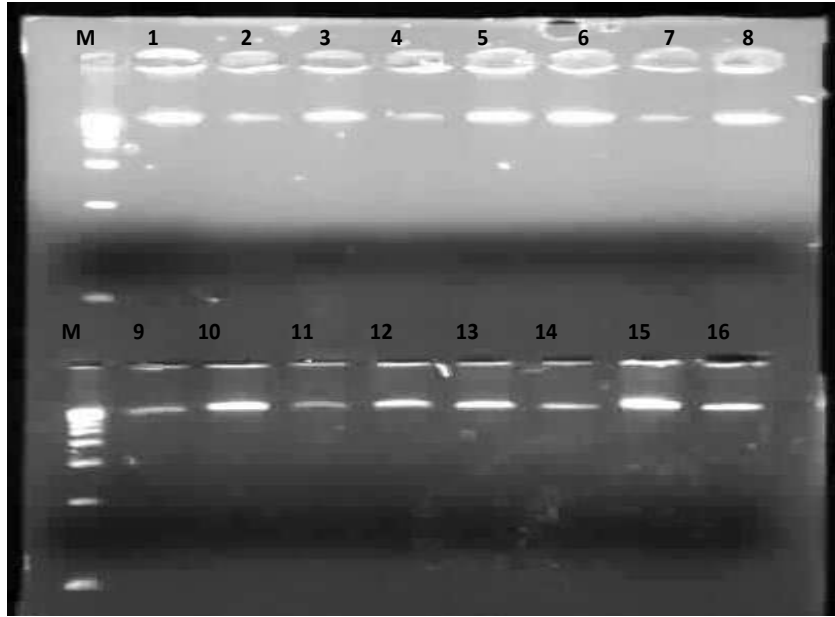
<b>Islah çalışmaları</b>	<b>Boğazkere×Regent</b>	<b>Kalecik Karası×Regent</b>
Mezlenen çiçek sayısı	3000	3000
Hibrit tohum sayısı	900	50
*Katlamaya alınan tohum sayısı	750	50
Çimlenen tohum sayısı	380	25
Bitkiye dönüşen F1 sayı	200	25

\*Elde edilen hibrit tohumlarda suda yüzdürme testi ile dibe çöken ve canlı olarak değerlendirilen tohumlar katlamaya alınmıştır.

## 4.2 Marköre Dayalı Seleksiyon

### 4.2.1 DNA izolasyonu ve Nanodrop sonuçları

Lefort vd. (1998)'te belirtilen yönteme göre elde edilen Boğazkere×Regent ve Kalecik Karası×Regent populasyonlarındaki F1 bitkilerine ait DNA'ların saflık ve miktar değerleri NanoDrop ND1000 ile belirlenmiştir. Moleküler düzeyde yapılan çalışmalarda DNA'nın saflığının 1.8-2.0 arasında olması istenen bir durumdur. Çizelge 4.2'de Nanodrop Spektrofotometre ile ölçümler sonucu elde edilen DNA'ların saflıklarının 1.10 – 1.99 arasında değiştiği görülmektedir. Ekstrakte edilmiş olan DNA'ların görsel olarak agaroz jel (%1) üzerinde görüntüleri saptanmıştır (Şekil 4.1).



Şekil 4.1 “Boğazkere x Regent” hibrit bitkilerden izole edilen DNA'ların agaroz jel üzerindeki görünüşleri (M: 100 bp DNA ladder. 1-16 F1 bitkilerine ait DNA'lar)

Çizelge 4.2 “Boğazkere x Regent” ve “Kalecik Karası x Regent melezleme kombinasyonundan elde edilen örneklere ait DNA miktar ve saflık ölçümleri

Örnek No	Miktar	Saflık	Örnek	Miktar	Saflık
No	0.00	NaN	No	0.00	NaN
Regent	598.11	1.89	BR25	119.64	1.48
Regent	590.25	1.90	BR25	90.20	1.50
BR2	140.01	1.48	BR26	115.97	1.70
BR2	136.70	1.50	BR26	118.62	1.68
BR3	220.60	1.64	BR27	79.30	1.48
BR3	221.27	1.65	BR27	85.93	1.44
BR4	155.71	1.55	BR29	101.60	1.64
BR4	154.21	1.56	BR29	111.85	1.55
BR6	98.68	1.38	BR30	163.88	1.51
BR6	101.44	1.37	BR30	227.80	1.39
BR7	101.02	1.43	BR32	79.17	1.47
BR7	98.21	1.44	BR32	75.79	1.48
BR8	33.46	1.20	BR33	144.12	1.49
BR8	31.41	1.14	BR33	176.74	1.43
BR9	222.13	1.70	BR35	78.31	1.51
BR9	223.51	1.70	BR35	79.77	1.50
BR10	138.56	1.54	BR36	110.84	1.53
BR10	138.55	1.56	BR36	113.40	1.51
BR11	93.90	1.68	BR37	77.33	1.47
BR11	97.75	1.66	BR37	78.36	1.41
BR12	178.17	1.61	BR38	81.43	1.36
BR12	179.83	1.61	BR38	85.60	1.38
BR13	106.61	1.47	BR39	91.21	1.54
BR13	105.19	1.46	BR39	92.35	1.52
BR14	143.56	1.49	BR40	171.28	1.52
BR14	144.54	1.49	BR40	160.99	1.56
BR15	94.22	1.46	BR41	105.74	1.42
BR15	56.97	1.41	BR41	106.38	1.43
BR16	183.69	1.58	BR42	87.19	1.37
BR16	180.65	1.58	BR42	84.30	1.45
BR17	149.67	1.57	BR43	166.79	1.41
BR17	150.95	1.55	BR43	137.75	1.51
BR18	87.29	1.49	BR45	132.45	1.54
BR18	76.60	1.51	BR45	132.30	1.56
BR19	49.47	1.43	BR46	98.73	1.52
BR19	106.68	1.44	BR46	97.43	1.54
BR20	291.00	1.72	BR47	34.54	1.31
BR20	270.84	1.72	BR47	34.62	1.31
BR21	279.92	1.50	BR48	77.56	1.54
BR21	286.24	1.44	BR48	78.86	1.55
BR22	136.50	1.70	BR49	28.05	1.35
BR22	142.83	1.69	BR49	27.36	1.37
BR23	120.07	1.56	BR50	52.80	1.34
BR23	148.07	1.49	BR50	33.23	1.32
BR24	93.17	1.38	BR51	163.78	1.60
BR24	83.00	1.42	BR51	157.91	1.63



Çizelge 4.2 “Boğazkere x Regent” ve “Kalecik Karası x Regent” hibrit kombinasyonundan örneklere ait DNA miktar ve saflık ölçümleri (devam)

Örnek No	Miktar (ng/ul)	Saflık (260/280)	Örnek No	Miktar (ng/ul)	Saflık (260/280)
BR52	144.63	1.69	BR78	66.29	1.52
BR52	150.76	1.66	BR78	65.79	1.54
BR53	80.15	1.43	BR79	105.73	1.60
BR53	79.29	1.46	BR79	107.86	1.60
BR54	20.41	1.42	BR80	76.01	1.42
BR54	68.71	1.45	BR80	71.91	1.47
BR55	63.54	1.49	BR81	38.44	1.36
BR55	63.48	1.51	BR81	25.95	1.32
BR56	60.97	1.42	BR82	59.33	1.33
BR56	61.78	1.43	BR82	58.97	1.30
BR57	74.77	1.58	BR83	90.73	1.52
BR57	74.81	1.59	BR83	88.90	1.52
BR58	54.78	1.49	BR85	65.85	1.44
BR58	68.64	1.54	BR85	65.02	1.43
BR59	80.10	1.40	BR86	61.13	1.40
BR59	78.56	1.41	BR86	60.26	1.39
BR60	76.37	1.42	BR87	131.30	1.65
BR60	76.68	1.43	BR87	133.03	1.64
BR61	170.45	1.63	BR88	89.94	1.43
BR61	176.35	1.60	BR88	91.94	1.40
BR62	151.96	1.46	BR89	119.30	1.62
BR62	145.36	1.51	BR89	117.68	1.64
BR63	255.28	1.78	BR90	241.01	1.88
BR63	215.47	1.82	BR90	237.16	1.89
BR64	56.17	1.38	BR91	171.06	1.62
BR64	53.37	1.40	BR91	172.38	1.62
BR65	123.34	1.63	BR92	42.55	1.34
BR65	123.85	1.63	BR92	42.38	1.34
BR66	137.72	1.41	BR93	62.82	1.40
BR66	109.96	1.53	BR93	61.36	1.41
BR67	89.30	1.43	BR94	59.43	1.24
BR67	87.57	1.42	BR94	59.88	1.22
BR68	53.79	1.45	BR95	43.23	1.14
BR68	57.77	1.37	BR95	43.64	1.14
BR69	325.26	1.34	BR96	75.93	1.30
BR69	173.49	1.49	BR96	76.28	1.31
BR71	43.65	1.22	BR97	59.28	1.30
BR71	43.52	1.27	BR97	59.08	1.33
BR72	146.75	1.51	BR98	133.67	1.48
BR72	128.90	1.59	BR98	134.89	1.47
BR73	57.33	1.50	BR99	233.54	1.76
BR73	56.30	1.54	BR99	235.23	1.76
BR74	67.02	1.15	BR101	556.61	1.83
BR74	53.49	1.31	BR101	564.73	1.83
BR75	64.91	1.37	BR102	211.35	1.58
BR75	66.16	1.40	BR102	205.30	1.64
BR76	74.21	1.53	BR103	82.31	1.39
BR76	73.63	1.51	BR103	81.77	1.40
BR77	41.61	1.36	BR104	191.21	1.69
BR77	41.85	1.37	BR104	187.74	1.67

Çizelge 4.2 “Boğazkere x Regent” ve “Kalecik Karası x Regent” hibrit kombinasyonundan örneklere ait DNA miktar ve saflık ölçümleri (devam)

Örnek No	Miktar (ng/ul)	Saflık (260/280)	Örnek No	Miktar (ng/ul)	Saflık (260/280)
BR107	135.77	1.55	BR136	114.87	1.72
BR107	131.61	1.51	BR137	86.18	1.32
BR108	76.12	1.43	BR137	84.42	1.33
BR 108	71.13	1.37	BR138	134.60	1.46
BR109	631.47	1.93	BR138	134.92	1.45
BR109	636.55	1.93	BR139	287.09	1.49
BR110	94.44	1.52	BR139	225.21	1.66
BR110	90.76	1.48	BR140	148.18	1.74
BR111	86.57	1.44	BR140	139.72	1.74
BR111	84.42	1.41	BR141	244.51	1.75
BR112	81.57	1.50	BR141	242.90	1.74
BR112	85.95	1.46	BR142	178.56	1.70
BR113	80.89	1.49	BR142	173.17	1.71
BR113	78.66	1.48	BR144	201.90	1.69
BR114	78.90	1.43	BR144	196.72	1.68
BR114	78.78	1.41	BR145	141.42	1.68
BR117	228.95	1.71	BR145	135.48	1.69
BR117	227.81	1.70	BR146	108.35	1.53
BR119	64.73	1.44	BR146	104.59	1.50
BR119	67.10	1.42	BR148	161.04	1.82
BR122	104.73	1.20	BR148	162.08	1.81
BR122	104.63	1.20	BR151	279.99	1.79
BR123	234.23	1.77	BR151	276.47	1.79
BR123	236.60	1.75	BR152	135.73	1.78
BR124	120.51	1.74	BR152	133.90	1.77
BR124	122.79	1.72	BR154	426.70	1.70
BR125	100.42	1.64	BR154	430.19	1.71
BR125	93.97	1.68	BR156	304.39	1.77
BR126	135.50	1.36	BR156	295.65	1.77
BR126	130.99	1.36	BR157	253.33	1.75
BR127	153.80	1.20	BR157	253.04	1.75
BR127	122.65	1.41	BR158	243.57	1.82
BR129	117.00	1.48	BR158	243.79	1.85
BR129	113.09	1.45	BR159	38.60	1.56
BR131	115.99	1.55	BR159	41.02	1.53
BR131	114.37	1.55	BR160	137.92	1.77
BR132	161.21	1.72	BR160	125.05	1.80
BR132	160.57	1.76	BR162	248.70	1.74
BR133	129.77	1.47	BR162	247.63	1.75
BR133	129.37	1.48	BR165	175.11	1.85
BR134	113.67	1.47	BR165	172.97	1.85
BR134	116.25	1.46	BR166	426.70	1.70
BR135	319.19	1.80	BR166	430.19	1.71
BR135	319.55	1.81	BR168	52.73	1.64
BR136	111.33	1.72	BR168	59.72	1.59

Çizelge 4.2 “Boğazkere x Regent” ve “Kalecik Karası x Regent” melezleme kombinasyonundan örneklere ait DNA miktar ve saflık ölçümleri (devam)

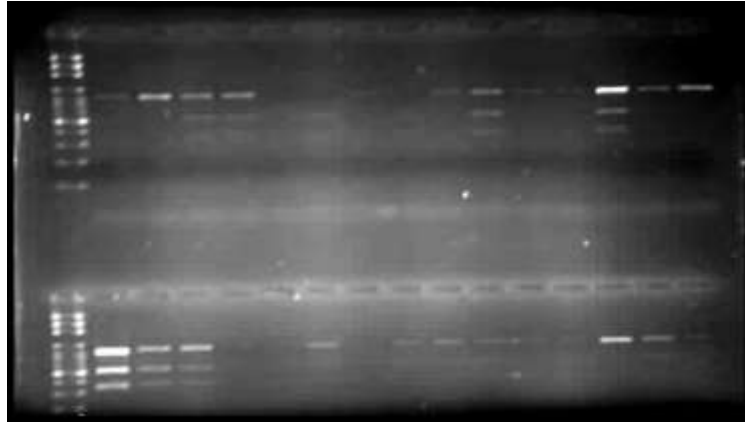
Örnek No	Miktar (ng/ul)	Saflık (260/280)	Örnek No	Miktar (ng/ul)	Saflık (260/280)
BR200	221.53	1.64	Kalecik Karası	206.73	1.99
BR200	227.20	1.63	Kalecik Karası	209.39	1.89
BR202	526.83	1.35	KR1	53.11	1.29
BR202	522.15	1.35	KR1	52.83	1.31
BR205	106.56	1.56	KR2	89.77	1.45
BR207	110.18	1.86	KR2	88.91	1.45
BR207	107.82	1.85	KR5	71.42	1.44
BR218	82.08	1.86	KR5	71.78	1.40
BR218	80.54	1.88	KR6	87.05	1.58
BR235	52.10	1.87	KR6	88.96	1.53
BR243	59.17	1.94	KR7	127.27	1.56
BR243	60.42	1.90	KR7	122.44	1.66
BR245	65.06	1.51	KR8	210.82	1.70
BR260	61.91	1.85	KR9	494.38	1.86
BR260	63.61	1.87	KR9	492.70	1.89
BR261	77.43	1.86	KR10	119.66	1.58
BR261	77.50	1.87	KR10	94.77	1.74
BR265	204.59	1.90	KR11	134.51	1.76
BR265	221.90	1.91	KR11	104.14	1.91
BR269	127.66	1.58	KR12	155.92	1.99
BR277	53.26	1.52	KR13	213.86	1.65
BR277	54.37	1.47	KR13	194.08	1.73
BR285	84.31	1.83	KR14	226.12	1.61
BR285	83.41	1.89	KR14	184.37	1.72
BR292	150.91	1.37	KR15	131.78	1.81
BR292	101.71	1.47	KR15	136.33	1.75
BR296	496.14	1.84	KR16	270.69	1.98
BR296	505.39	1.84	KR16	259.73	1.97
BR299	75.31	1.92	KR17	155.66	1.35
BR299	78.03	1.86	KR17	120.36	1.45
BR311	182.68	1.70	KR18	169.61	1.54
BR312	81.44	1.45	KR18	145.59	1.59
BR312	121.41	1.39	KR19	227.05	1.78
BR318	131.84	1.52	KR19	223.64	1.79
BR322	85.65	1.74	KR20	385.05	1.62
BR322	76.67	1.86	KR20	343.37	1.75
BR325	134.13	1.46	KR21	432.99	1.96
BR325	125.75	1.51	KR21	437.14	1.88
BR326	73.37	1.70	KR22	137.69	1.30
BR326	71.51	1.73	KR22	121.34	1.35
BR327	102.04	1.69	KR23	74.88	1.55
BR327	87.90	1.80	KR23	72.57	1.63
BR330	106.46	1.15	KR24	204.05	1.63
BR334	61.36	1.90	KR24	192.84	1.70
BR334	63.87	1.89	KR25	231.38	1.67
BR339	71.16	1.83	KR25	162.00	1.93
BR339	68.71	1.89	KR26	278.64	1.85
BR348	112.23	1.95	KR26	249.61	1.94
BR348	109.33	1.93	KR27	573.67	1.77
			KR27	609.22	1.72

#### 4.2.2 PCR Uygulamaları

Araştırmada MDS (Marköre Dayalı Seleksiyon) için toplam 10 adet primer (6 adet SSR), (3 adet SCAR ) ve (1 adet CAPS) kullanılmıştır. CAPS markörü GLP1-12 primerinin amplifikasyon ürünleri *EcoRI* restriksiyon enzimi ile kesilmesinin ardından agaroz jele yüklenmiştir. Kesimin ardından, DNA amplifikasyon ürünleri literatürde belirtilenin aksine ikiden fazla (4-5 adet) kesim ürünü bant deseni oluşturmuştur.

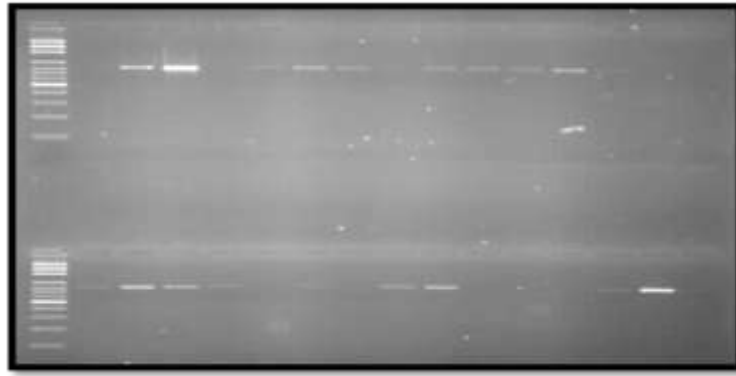


şekil 4.2 BR popülasyonuna ait bitkilerde GLP1-12 primerinin PCR ürünlerinin görünümü



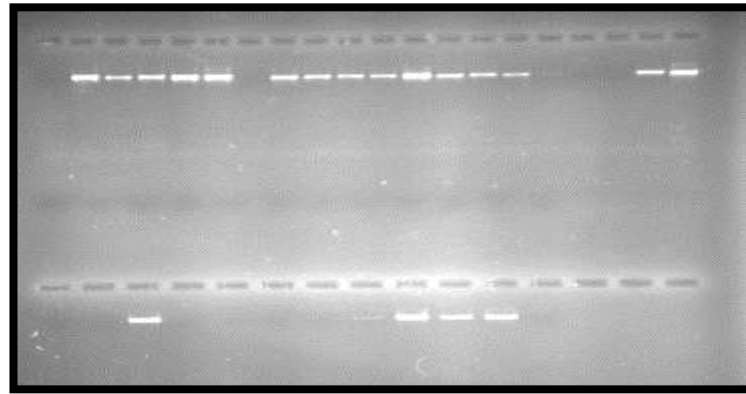
şekil 4.3 BR popülasyonuna ait F1 bitkilerinin GLP1-12 PCR ürünlerin *EcoRI* enzimi ile kesilm sonrası bant görünümleri

SCAR primerlerine ait PCR ürünleri (ScORA7-760, ScORN3-32, ScORA14) %1.5-2'lik agaroz jelde yürütülerek görüntülenmiştir. Bu yöntem ile SCAR primerlerinden (ScORA7-760, ScORN3-32) primerleri bant veren bireyler külemeye dayanıklı olarak, bant vermeyenler dayanıksız olarak değerlendirmeye alınmıştır. ScORA7-760 primeri ile 760 bp büyüklüğünde BR popülasyonuna ait 168 F1 bitkisinden 53 adeti 760 bp büyüklüğünde bant oluşturmuştur ve 115 adeti bant oluşturmamıştır (Çizelge 4.5, Şekil 4. 4). KR popülasyonuna ait 25 adet F1 bitkisinden 2 adet 760 bp büyüklüğünde bant verirken, 23 adeti bant oluşturmamıştır (Çizelge 4.6).



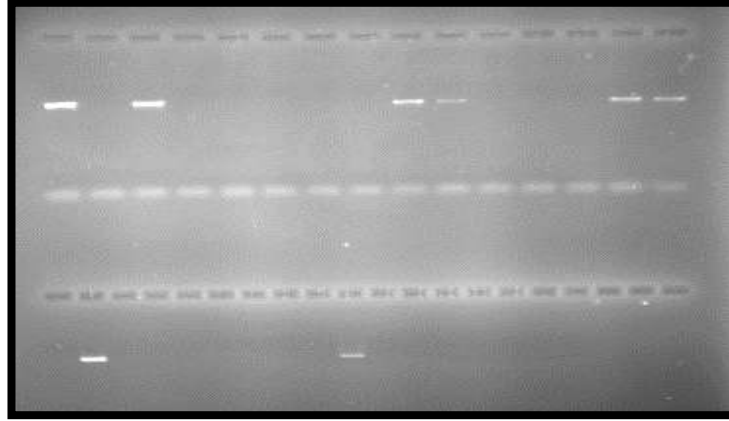
Şekil 4.4 BR popülasyonuna ait F1 bitkilerde ScORA7-760 primerinin PCR ürünlerin görünümü

ScORN3-32 primeri ile BR popülasyonunda 135 adet genotip belirlenen 900 bp büyüklüğünde bant oluştururken, 33 adeti bant oluşturmamıştır (çizelge 4.5). KR popülasyonunda ise 25 adet genotipierin tamamı 900 bp büyüklüğünde bant oluşturmuşlar (Çizelge 4.6, Şekil 4. 5).



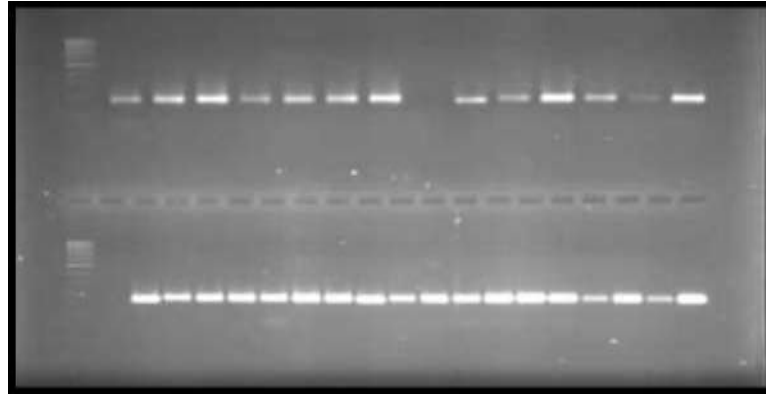
Şekil 4.5 BR popülasyonuna ait F1 bitkilerde ScORN3-32 primerinin PCR ürünlerinin görünümü

ScORA14 primerinde, SCAR primerleri gibi bant veren genotiplerin sayısı 168 adet F1 BR bitkisinde 68 adet ve 100 adet genotip amplifikasyon ürünü oluşturmamıştır (Çizelge 4.5). Bu primer ile 25 adet KR bitkisinde, 3 adet bu primer ile amplifikasyon ürünü bant verirken 22'si bant oluşturmamıştır (Çizelge 4.6, Şekil 4. 6).

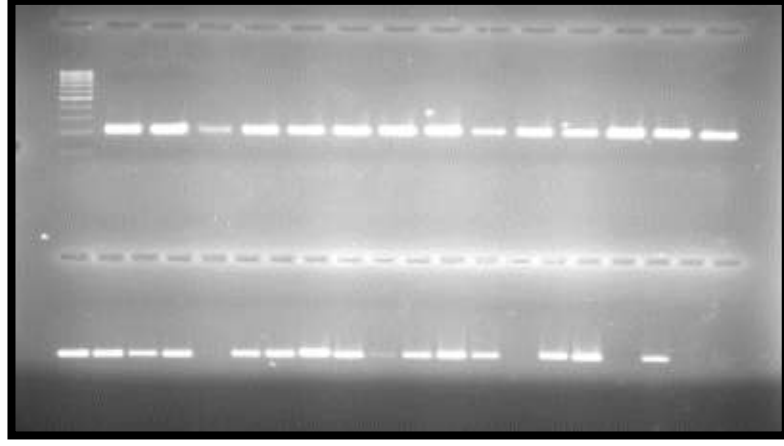


Şekil 4.6 BR populasyonuna ait F1 bitkilerde ScORA14 primerinin PCR ürünlerinin görünümü

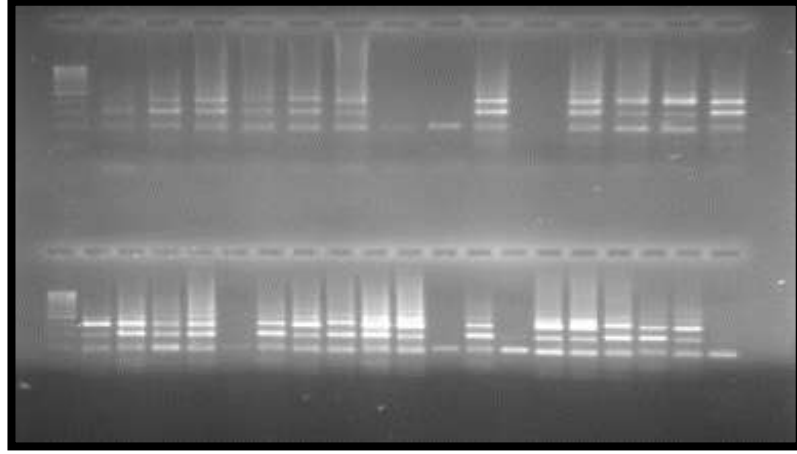
Araştırmada kullanılan 6 adet SSR primeri ile elde edilen PCR ürünlerine ait bant görüntüleri Şekil 4.7 – şekil 4.12’de verilmiştir, Kapiler elektroforez tekniği ile belirlenen allel büyüklükleri ise çizelge 4.4’de verilmiştir.



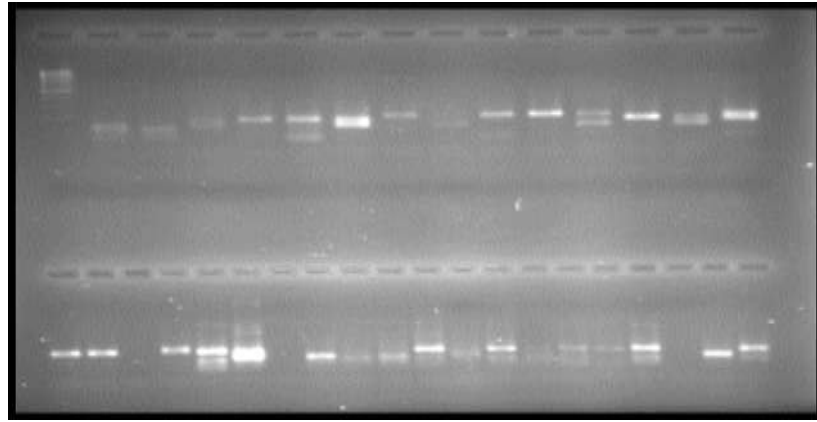
Şekil 4.7 BR populasyonuna ait F1 bitkilerde VMC8g9 Primerinin PCR ürünlerinin görünümü



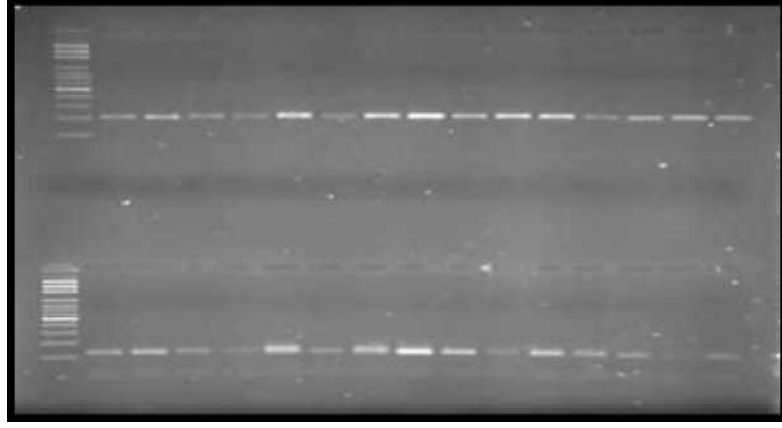
Şekil 4.8 BR populasyonuna ait F1 bitkilerde VMC7f2 Primerinin PCR ürünlerinin görünümü



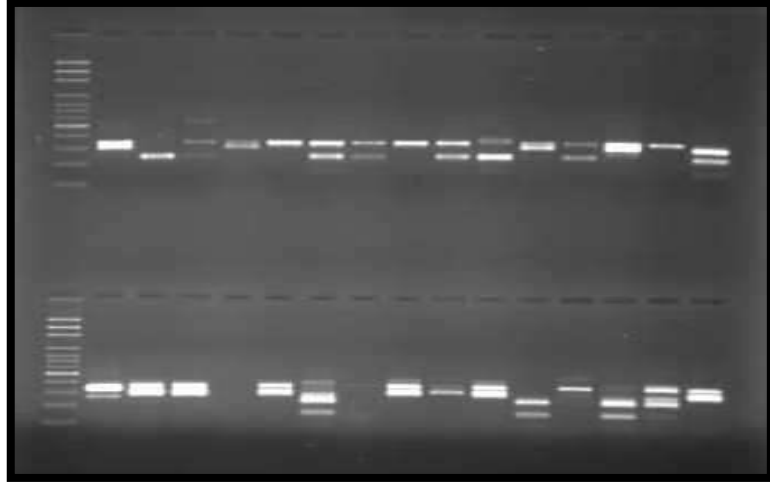
Şekil 4.9 BR populasyonuna ait F1 bitkilerde UDV-15 Primerinin PCR ürünlerinin görünümü



Şekil 4.10 BR populasyonuna ait F1 bitkilerde UDV-305 Primerinin PCR ürünlerinin görünümü



Şekil 4.11 BR populasyonuna ait F1 bitkilerde VMC1g3.2 Primerin PCR ürünlerinin görünümü



Şekil 4.12 BR populasyonuna ait F1 bitkilerde VMCNG2f12 Primerinin PCR ürünlerinin görünümü

#### 4.2.3 Genetik Analizler

Uygun PCR koşulları ve iyi amplifiye olmuş lokusların elektroforezi ile örnek jel ve piklerden de görüldüğü üzere sağlıklı okumaları sağlayacak, pik büyüklüklerine ulaşılırken dayanıklı allelerini taşıyan veya taşımayan kolaylıkla tespit edilmiştir. Çizelge 4.3’de BR ve KR genetik analiz sonuçları verilmektedir.



Çizelge 4.3 BR popülasyonuna ait genetik analiz sonuçları

Markör	İlişkili olduğu dayanıklı lokus	Dayanıklılıkla ilişkili beklenen allel büyüklüğü	BR popülasyonda allel büyüklükleri	Dayanıklılık ile ilişkili seçilen F1 sayısı	Referans yayın
UDV-305	Rpv3	299	229/299	33	Bellin vd. 2009
VMCNG2F12	Rpv3	198	161/189	-	Eibach vd. 2007
ScoRA14	Rpv3	460	460	68	Akkurt vd. 2007
UDV-15	Ren3	189	175/189	105	Welter vd. 2007
ScoRA7	Ren3	760	760	53	Akkurt vd. 2007
ScoRN3	Ren3	900	900	-	Akkurt vd. 2007
VMC1g3.2	Rpv13	122/122	122/139	-	Moreira vd. 2011
VMC7F2	Ren4	199	206/212	-	Bellin vd. 2009, Riaz vd. 2011
VMC8G9	Run1/Rpv1	172	173/176	-	Barker vd. 2005, Marguerit vd. 2009
Markör	İlişkili olduğu dayanıklı lokus	Dayanıklılıkla ilişkili beklenen allel büyüklüğü	KR popülasyonda allel büyüklükleri	Dayanıklılık ile ilişkili seçilen F1 sayısı	Referans yayın
UDV-305	Rpv3	299	229/299	14	Bellin vd. 2009
VMCNG2F12	Rpv3	198	161/189	-	Eibach vd. 2007
ScoRA14	Rpv3	460	460	4	Akkurt vd. 2007
UDV-15	Ren3	189	175/189	6	Welter vd. 2007
ScoRA7	Ren3	760	760	3	Akkurt vd. 2007
ScoRN3	Ren3	900	900	-	Akkurt vd. 2007
VMC1g3.2	Rpv13	122/122	122/139	-	Moreira vd. 2011
VMC7F2	Ren4	199	206/212	-	Bellin vd. 2009, Riaz vd. 2011
VMC8G9	Run1/Rpv1	172	173/176	-	Barker vd. 2005, Marguerit vd. 2009

SCAR Markörlerde dayanıklılık ile bant veren F1'ler seçilmiştir.

SSR markörlerde dayanıklılık ile ilişkili allele sahip F1'ler seçilmiştir.

GLP1-12 kesim sonucunda 4-6 bant oluşturduğu ve literatürdeki bildirtilenlere aykırı kesim gösterdiği için değerlendirmeye alınmamıştır.

Çizelge 4.4-4.7'de araştırmada kullanılan primerler ve genotiplerde tespit edilen allel büyüklükleri sunulmuştur.

Çizelge 4.4 “Regent x Boğazkere” melezleme kombinasyonunda (SSR) markörleri ile elde edilen PCR ürünlerinin allelik dağılımı

Genotip	UDV-305		VMC1g3.2		VMCNG2F12		VMC8G9		UDV-15		VMC7F2	
	allel büyü.	allel büyü.	allel büyü.	allel büyü.	allel büyü.	allel büyü.	allel büyü.	allel büyü.	allel büyü.	allel büyü.	allel büyü.	allel büyü.
<b>Regent</b>	<b>229</b>	<b>299</b>	<b>122</b>	<b>140</b>	<b>159</b>	<b>161</b>	<b>173</b>	<b>176</b>	<b>175</b>	<b>189</b>	<b>206</b>	<b>212</b>
<b>Boğazkere</b>	<b>301</b>	<b>304</b>	<b>127</b>	<b>155</b>	<b>151</b>	<b>181</b>	<b>163</b>	<b>163</b>	<b>177</b>	<b>193</b>	<b>201</b>	<b>205</b>
2	299	301	122	127	181	181	163	173	177	193	201	212
3	299	301	122	127	151	151	163	176	-	-	205	212
4	301	229	127	140	159	159	163	173	189	193	205	212
6	304	229	122	127	151	151	163	173	175	189	201	212
7	-	-	-	-	181	181	163	173	175	189	201	212
8	301	229	-	-	159	159	163	176	-	-	201	212
9	301	229	122	127	151	151	163	173	189	193	201	212
10	301	229	122	127	159	159	163	173	175	177	205	212
11	301	229	-	-	159	159	163	163	-	-	-	-
12	301	229	122	140	159	159	163	176	175	177	205	212
13	301	229	122	127	-	-	163	176	189	193	201	212
14	301	229	122	127	-	-	163	173	177	189	205	212
15	301	229	122	127	-	-	163	173	175	177	205	212
16	-	-	122	127	-	-	163	176	175	177	205	202
17	229	301	122	140	159	159	163	176	177	193	201	212
18	229	201	122	127	151	151	163	173	177	189	205	212
19	229	301	122	127	151	151	163	173	175	177	205	212
20	229	301	122	127	159	181	163	173	175	177	205	205
21	229	301	127	122	-	-	163	176	175	177	205	205
22	229	301	122	140	-	-	163	176	177	189	205	205
23	229	301	122	127	151	161	163	176	175	177	205	205
24	229	301	122	127	151	151	163	173	177	189	205	205
25	229	301	122	127	151	181	163	163	175	177	201	206
26	301	229	122	127	159	181	163	173	177	189	201	206
27	-	-	122	127	-	-	163	163	189	193	201	206
29	229	301	122	127	181	181	163	173	189	193	201	206
30	229	301	127	140	151	181	163	176	189	193	201	212
32	229	301	122	127	-	-	163	173	177	189	201	212
33	229	301	127	122	151	159	163	173	175	177	205	205
35	301	229	122	140	-	-	163	176	189	193	201	212
36	301	229	127	140	-	-	163	176	189	193	205	205
37	301	229	127	140	151	151	163	176	177	189	205	212
38	301	229	122	127	161	181	163	173	177	193	201	206
39	301	229	127	140	159	181	163	176	177	193	201	206
40	229	301	122	127	151	159	163	173	175	177	205	212
41	301	229	122	127	159	159	163	176	177	193	201	206
42	229	301	122	127	151	151	163	173	189	193	201	206
43	301	229	127	140	151	159	163	173	189	193	201	212
45	301	229	122	140	151	151	163	163	175	193	201	206
46	229	301	122	127	181	181	163	176	175	177	201	212
47	301	229	127	140	159	159	163	176	175	177	205	212
48	301	229	122	127	-	-	163	176	189	193	201	206
49	301	229	127	140	159	181	163	176	177	189	201	206
50	301	229	127	140	159	181	163	176	177	189	201	206
51	301	229	122	127	181	181	163	173	177	189	201	212
52	229	229	122	127	181	181	163	163	177	193	201	206
53	301	229	127	140	161	181	163	176	177	189	201	212

Çizelge 4.4 “Regent x Boğazkere” melezleme kombinasyonunda (SSR) markörleri ile elde edilen PCR ürünlerinin allelik dağılımı (devam)

Genotip	UDV 305		VMC1g3.2		VMCNG2F12		VMC8G9		UDV-15		VMC7F2	
	allel büy.	allel büy.	allel büy.	allel büy.	allel büy.	allel büy.	allel büy.	allel büy.	allel büy.	allel büy.	allel büy.	allel büy.
54	301	299	122	140	161	181	163	176	189	193	201	206
55	301	229	122	127	159	151	163	173	177	189	205	205
56	304	229	122	140	159	151	163	163	177	193	205	205
57	229	301	127	140	159	181	163	173	189	193	201	206
58	301	229	127	140	159	181	163	173	177	189	201	212
59	301	229	122	140	181	181	163	176	189	193	201	212
60	301	229	122	127	159	181	163	176	189	193	201	206
61	229	301	127	140	159	181	163	176	177	189	201	206
62	301	229	127	140	181	181	163	176	175	177	201	212
63	301	229	122	127	151	151	163	176	175	177	205	212
64	301	229	122	127	159	181	163	173	189	193	201	206
65	301	229	127	140	159	151	163	176	193	189	205	205
66	301	229	127	140	161	181	163	173	193	189	201	206
67	301	229	127	122	151	159	163	176	177	193	205	205
68	301	229	127	140	181	181	163	163	189	193	201	201
69	229	301	127	122	151	151	163	173	-	-	201	206
71	301	229	127	140	151	159	163	176	177	193	201	206
72	301	301	122	127	151	159	163	176	189	193	201	206
73	301	229	127	140	151	151	163	176	177	193	205	212
74	229	301	127	140	181	181	163	163	177	193	201	201
75	301	229	122	127	181	181	163	176	177	193	201	212
76	229	301	127	140	181	181	163	163	175	177	201	201
77	301	229	122	127	181	181	163	163	175	177	201	206
78	299	304	127	140	181	181	163	173	-	-	201	212
79	301	301	122	127	151	151	163	163	177	193	201	206
80	301	301	122	127	151	151	163	173	177	189	205	212
81	301	301	122	127	151	181	163	163	175	177	201	206
82	301	229	127	140	151	161	163	176	175	177	201	206
83	301	229	127	122	151	159	163	173	189	193	205	205
85	304	304	122	127	159	181	163	173	177	189	201	212
86	304	229	127	140	151	151	163	176	175	177	201	206
87	301	301	122	127	151	151	163	173	177	193	205	212
88	301	229	-	-	151	159	163	173	177	189	201	206
89	301	299	122	140	159	181	163	173	189	193	201	212
90	301	229	122	127	151	159	163	176	177	193	205	205
91	301	229	122	127	-	-	163	176	177	193	201	206
92	301	301	127	140	-	-	163	163	175	177	201	206
93	301	229	122	127	159	159	163	173	189	193	206	206
94	301	299	-	-	151	181	163	173	189	193	201	212
95	301	301	122	127	159	159	163	173	189	193	-	-
96	301	229	140	155	151	151	163	176	177	189	201	206
97	301	229	122	140	161	181	163	176	177	189	201	206
98	301	229	127	140	151	151	163	176	177	189	205	212
99	301	229	-	-	151	151	163	176	177	189	205	205
101	229	229	122	140	151	151	163	176	177	189	205	212
102	301	229	122	127	181	181	163	173	177	189	201	206
103	301	229	122	140	151	151	163	176	177	189	201	206
104	301	229	-	-	151	151	163	176	177	189	201	206
107	301	229	122	140	151	151	163	176	177	189	201	206

Çizelge 4.4 “Regent x Boğazkere” melezleme kombinasyonunda (SSR) markörleri ile elde edilen PCR ürünlerinin allelik dağılımı (devam)

Genotip	UDV 305		VMC1g3.2		VMCNG2F12		VMC8G9		UDV-15		VMC7F2	
	allel büy.	allel büy.	allel büy.	allel büy.	allel büy.	allel büy.	allel büy.	allel büy.	allel büy.	allel büy.	allel büy.	allel büy.
108	301	229	122	127	151	159	-	-	177	189	201	206
109	301	229	122	127	159	181	163	173	189	193	205	205
110	301	299	122	127	151	151	163	173	189	193	201	212
111	229	304	122	127	181	181	163	173	189	193	201	212
112	229	304	122	127	181	181	163	173	177	189	205	212
113	301	229	-	-	151	151	163	173	175	177	201	206
114	299	304	122	127	151	151	163	173	177	189	201	206
117	301	229	122	140	159	159	163	173	175	177	201	206
119	301	229	127	140	159	159	163	173	189	193	201	206
122	301	229	122	127	151	151	163	176	177	189	201	206
123	299	301	-	-	151	151	163	173	193	189	201	212
124	-	-	122	127	151	151	163	176	177	189	206	206
125	299	301	122	127	181	181	163	163	177	193	205	205
126	301	299	122	140	151	151	163	176	177	189	201	206
127	299	301	122	127	151	151	163	163	177	189	-	-
129	299	301	122	140	151	151	163	176	189	193	206	206
131	301	299	122	140	151	151	163	173	177	189	201	206
132	301	229	127	140	181	181	163	173	177	189	201	212
133	301	299	122	127	181	181	163	173	177	193	201	206
134	-	-	140	155	151	151	163	176	177	189	201	206
135	229	301	122	127	151	151	163	173	177	189	205	205
136	301	229	122	140	159	159	163	173	177	189	201	206
137	299	304	140	155	151	151	163	173	177	189	212	212
138	299	304	122	127	-	-	163	173	189	193	201	212
139	299	304	-	-	151	151	163	173	177	189	201	206
140	301	229	122	127	151	151	163	176	177	189	201	206
141	229	301	122	140	159	159	163	163	177	193	205	212
142	299	304	122	127	181	181	163	173	177	193	201	212
144	299	304	122	127	-	-	163	173	177	189	212	212
145	299	304	122	127	181	181	163	176	189	193	212	212
146	299	304	127	140	-	-	163	176	-	-	201	206
148	301	229	127	140	151	151	163	176	177	193	201	212
151	301	299	-	-	151	151	163	173	189	193	206	206
152	301	229	127	140	159	159	163	173	177	189	201	206
154	229	301	122	127	-	-	163	176	177	189	201	206
156	299	304	122	140	151	151	163	176	175	177	205	212
157	-	-	122	127	181	181	163	176	177	189	201	212
158	299	304	122	140	151	151	163	176	175	177	201	212
159	-	-	122	127	151	151	163	173	-	-	201	212
160	301	229	127	140	181	181	163	176	189	193	201	212
162	299	304	122	127	151	151	163	163	177	189	212	212
165	229	304	122	140	181	181	163	173	177	189	201	212
166	299	304	122	127	181	181	163	173	177	193	201	212
168	299	304	122	140	181	181	163	173	177	189	212	212
200	299	304	122	127	151	151	163	163	175	177	205	212
202	229	301	122	127	161	161	163	173	177	189	205	205
205	301	229	122	127	151	151	163	176	189	193	212	212
207	299	304	122	140	151	151	163	176	175	177	205	212
218	299	304	122	127	151	151	163	176	175	177	205	212

Çizelge 4.4 “Regent x Boğazkere” melezleme kombinasyonunda (SSR) markörleri ile elde edilen PCR ürünlerinin allelik dağılımı (devam)

Genotip	UDV 305		VMC1g3.2		VMCNG2F12		VMC8G9		UDV-15		VMC7F2	
	allel büy.	allel büy.	allel büy.	allel büy.	allel büy.	allel büy.	allel büy.	allel büy.	allel büy.	allel büy.	allel büy.	allel büy.
235	301	299	122	127	151	151	163	163	177	189	201	206
243	229	301	140	155	151	151	163	176	177	189	201	201
245	301	229	122	127	151	151	163	176	177	189	201	206
260	229	301	122	127	151	151	163	176	175	177	201	206
261	301	229	122	140	151	151	163	173	177	189	201	206
262	301	229	122	127	151	159	163	173	177	189	201	206
265	-	-	122	127	181	181	163	173	177	189	201	212
269	301	299	127	140	151	159	163	176	177	189	201	206
277	229	301	127	140	159	181	163	176	175	177	201	206
285	-	-	122	127	151	151	163	173	177	193	201	206
292	-	-	122	127	151	161	173	173	177	189	201	206
296	301	229	122	127	161	181	163	176	177	189	201	206
299	304	299	122	140	151	181	163	176	175	177	201	212
311	301	229	140	155	159	159	163	163	177	189	201	206
312	301	229	122	127	151	159	163	176	177	189	201	206
318	301	229	122	127	159	181	163	176	189	193	201	206
322	229	301	127	122	151	181	163	176	177	193	201	206
325	-	-	122	127	-	-	163	173	177	189	201	212
326	301	229	122	127	151	151	163	173	177	193	212	-
327	301	229	140	155	151	161	163	173	177	189	201	206
330	301	299	122	140	151	159	163	176	177	189	205	-
334	229	301	122	140	151	159	163	176	177	189	201	206
339	301	229	122	127	159	181	163	176	177	189	201	206
348	301	229	122	127	151	151	163	176	177	189	201	206

Allel büy: allel büyüklüğü

Çizelge 4.5 “Regent x Boğazkere” melezleme kombinasyonunda (SCAR) markörleri ile elde edilen PCR ürünlerinin allelik dağılımı

	ScoRA 7	ScorA 14	ScoRN3-32		ScoRA 7	ScorA14	ScoRN3-32
Genotip	A. ürünü	A. ürünü	A. ürünü	Genotip	A. ürünü	A. ürünü	A. ürünü
Regent	+	+	+	53	-	-	-
Boğazkere	-	-	+	54	+	-	+
2	-	+	+	55	+	-	+
3	-	+	+	56	-	-	+
4	+	+	+	57	+	-	+
6	+	+	+	58	+	-	+
7	+	+	+	59	-	-	-
8	+	+	+	60	+	-	+
9	+	+	+	61	-	-	-
10	-	-	+	62	-	+	+
11	-	-	+	63	-	+	+
12	-	+	+	64	-	-	+
13	+	+	+	65	+	-	+
14	+	+	+	66	+	-	+
15	-	+	+	67	-	-	-
16	-	-	+	68	+	-	+
17	-	+	+	69	-	-	-
18	-	+	+	71	-	-	+
19	-	+	+	72	+	-	+
20	-	-	-	73	-	+	+
21	+	-	+	74	-	+	+
22	+	-	+	75	-	-	-
23	-	-	-	76	-	-	+
24	+	+	+	77	-	-	+
25	-	+	+	78	-	+	+
26	+	-	+	79	-	-	+
27	-	-	+	80	-	+	+
29	+	-	+	81	-	+	+
30	+	+	+	82	-	-	+
32	+	+	+	83	-	-	+
33	-	-	+	85	-	+	+
35	+	+	+	86	-	-	-
36	+	-	+	87	-	+	+
37	+	+	+	88	-	-	-
38	+	-	+	89	-	+	+
39	-	-	+	90	-	-	+
40	+	+	+	91	-	+	+
41	-	-	-	92	-	-	+
42	-	-	-	93	+	+	-
43	+	+	+	94	-	+	+
45	+	-	+	95	+	-	-
46	-	+	+	96	-	-	+
47	-	+	+	97	-	+	-
48	+	-	+	98	-	-	+
49	+	+	+	99	+	-	+
50	+	-	+	101	+	+	+
51	+	+	+	102	+	+	+
52	-	-	+	103	+	-	+

Çizelge 4.5 “Regent x Boğazkere” melezleme kombinasyonunda (SCAR) markörleri ile elde edilen PCR ürünlerinin allelik dağılımı (devam)

	ScoRA 7	ScorA 14	ScoRN3-32		ScoRA7	ScorA14	ScoRN3- 32
Genotip	A. ürünü	A. ürünü	A. ürünü	Genotip	A. ürünü	A. ürünü	A. ürünü
104	+	-	+	205	-	+	+
107	-	-	+	207	-	-	+
108	+	-	+	218	-	+	+
109	+	-	+	235	-	+	+
110	+	+	+	243	-	-	+
111	-	-	+	245	-	-	+
112	-	+	+	260	-	-	+
113	-	-	-	261	-	-	+
114	-	+	+	262	-	-	+
117	-	+	+	265	-	+	-
119	+	-	+	269	-	-	+
122	-	-	+	277	-	-	+
123	-	-	+	285	-	+	+
124	-	-	+	292	-	-	+
125	-	-	-	296	-	-	+
126	-	-	+	299	-	-	+
127	-	-	+	311	-	-	+
129	-	+	-	312	-	-	+
131	-	-	-	318	-	+	+
132	-	+	+	322	-	-	+
133	-	+	+	325	-	-	+
134	+	+	+	326	-	-	-
135	-	-	+	327	-	-	+
136	-	-	+	330	-	+	+
137	-	-	-	334	-	+	+
138	+	-	+	339	-	-	+
139	-	-	-	348	-	+	+
140	-	-	+				
141	-	-	-				
142	-	+	+				
144	-	+	-				
145	-	-	+				
146	-	+	+				
148	-	+	-				
151	-	-	+				
152	-	-	+				
154	+	-	+				
156	-	+	-				
157	+	+	+				
158	-	+	+				
159	-	-	-				
160	+	-	-				
162	-	-	-				
165	+	-	-				
166	-	-	-				
168	+	+	+				
200	-	+	+				
202	+	-	-				

Çizelge 4.6 “Regent x Kalecikkarası” melezleme kombinasyonunda (SSR) markörleri ile elde edilen PCR ürünlerinin allelik dağılımı

Genotip	UDV 305		VMC1g3.2		VMCNG2F12		VMC8G9		UDV-15		VMC7F2	
	allel büyü.	allel büyü.	allel büyü.	allel büyü.	allel büyü.	allel büyü.	allel büyü.	allel büyü.	allel büyü.	allel büyü.	allel büyü.	allel büyü.
Regent	229	299	122	140	159	161	173	176	175	189	206	212
Kalecik Karası	231	333	120	122	151	190	165	165	173	178	203	201
1	299	231	122	122	151	190	165	173	173	175	-	-
2	231	299	122	122	151	190	165	173	175	178	201	212
5	229	333	120	140	151	190	165	173	175	178	201	206
6	231	299	122	140	151	151	165	173	178	189	201	212
7	231	299	122	122	151	190	165	173	173	175	203	212
8	299	333	122	120	151	190	165	173	175	178	201	201
9	231	299	122	122	151	190	165	173	-	-	-	-
10	231	299	120	140	151	151	165	176	175	189	203	206
11	299	333	122	122	151	151	165	173	175	178	201	201
12	229	231	122	120	151	151	165	173	173	175	201	212
13	299	231	122	120	151	159	165	173	178	189	201	206
14	231	299	122	120	151	151	165	165	175	178	-	-
15	231	229	122	140	151	151	165	176	-	-	206	206
16	231	299	120	122	151	151	165	173	175	178	201	201
17	231	229	120	122	151	190	165	173	175	178	-	-
18	231	229	122	122	151	151	165	165	178	189	-	-
19	231	299	122	120	151	151	165	173	175	178	203	203
20	231	229	122	122	151	151	165	165	173	175	201	212
21	231	229	120	122	151	190	173	173	175	178	201	201
22	333	229	140	140	151	161	165	173	178	189	-	-
23	333	299	122	120	151	151	165	173	-	-	201	212
24	231	229	140	140	151	151	173	173	178	189	203	212
25	231	229	122	122	151	151	165	165	173	175	203	212
26	231	229	122	140	190	190	-	-	175	178	203	206
27	231	299	120	120	151	151	165	173	173	175	-	-

Allel büyü: Allel büyüklükleri



Çizelge 4.7 “Regent x Kalecikkarası” melezleme kombinasyonunda (SCAR) markörleri ile elde edilen PCR ürünlerinin allelik dağılımı

	<b>ScoRA7</b>	<b>ScoRA14</b>	<b>SCORN3-32</b>
Genotip	A. ürünü	A. ürünü	A. ürünü
<b>Regent</b>	+	+	+
<b>Kalecik Karası</b>	-	-	+
<b>1</b>	-	-	+
<b>2</b>	-	-	+
<b>5</b>	-	-	+
<b>6</b>	-	-	+
<b>7</b>	-	-	+
<b>8</b>	-	-	+
<b>9</b>	-	-	+
<b>10</b>	-	-	+
<b>11</b>	-	-	+
<b>12</b>	-	-	+
<b>13</b>	-	-	+
<b>14</b>	-	-	+
<b>15</b>	-	-	+
<b>16</b>	-	-	+
<b>17</b>	-	-	+
<b>18</b>	-	-	+
<b>19</b>	-	-	+
<b>20</b>	-	-	+
<b>21</b>	-	-	+
<b>22</b>	+	+	+
<b>23</b>	-	-	+
<b>24</b>	+	+	+
<b>25</b>	-	-	+
<b>26</b>	-	+	+
<b>27</b>	-	-	+

A. ürünü: Amplifikasyon ürünü

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Modern bitki ıslahı uygulamaları bilim içerisinde dinamik bir alandır. Islahçı, genetik varyasyonları kullanarak yetiştirici ve tüketicilerin önemseydiği karakterleri içeren yeni çeşitlerin geliştirilmesi için çalışır. Bizim yaptığımız bu araştırma, Türkiye'nin en değerli ve kaliteli şaraplık üzüm çeşitleri arasında yer alan Boğazkere ve Kalecik Karası çeşitleri ile Almanya'da ıslah edilmiş Regent çeşidinin melezlenmesi ile yeni ve hastalıklara dayanıklı çeşit ıslahının ilk aşamasını oluşturmaktadır. Regent çeşidi; külleme ve mildiyöye dayanıklılık sağlayan genleri taşımaktadır. Bu çeşit sadece Almanya değil, bütün dünyada tanınmış ve çok değerli gen kaynakları arasında yer almaktadır.

Dünya bağcılığının en önemli sorunlarından olan külleme ve mildiyö hastalığı, dünyanın önemli bağcı ülkeleri arasında yer alan Türkiye bağcılığı açısından da ciddi sorunlara yol açmaktadır. Bu nedenle bağcılıkta ciddi maliyeti olan kimyasal ilaçlamayı azaltmak amacıyla bu tez çalışması külleme ve mildiyöye karşı dayanıklı çeşit ıslahı hedeflenerek yürütülmüştür. Çalışmamızda Türkiye'de ilk olarak dayanıklılık ıslah çalışmalarında MDS (Marköre Dayalı Seleksiyon) yöntemi kullanılmıştır.

Söz konusu araştırma altı aşamada gerçekleştirilmiştir. Bu aşamalar;

1. Melezleme çalışmaları,
2. F1 bitkilerinin elde edilmesi
3. F1 bitkilerinden DNA izolasyonu,
4. Elde edilen DNA'lar kullanılarak PCR analizleri,
5. PCR analiz sonuçlarının dayanıklılıkla ilişkili allel büyüklükleri yönüyle incelenmesi ve Marköre Dayalı Seleksiyon amaçlı değerlendirilmesi,
6. Hastalıklara dayanıklı çeşit adaylarının seçilmesi,

2010-2012 yıllarında, yürütülen melezleme çalışmaları sonucunda BR popülasyonundan, 870 adet F1 bitkisi elde edilmiştir. MDS analizleri için, F1 bitkilerden en kuvvetli ve iyi gelişmiş olan yaklaşık 192 adet bitki seçilmiştir. Ön PCR

çalışmaları sonucu 24 F1 bitkisi seçilen hiçbir primer ile amplifikasyon göstermediği için deneme dışı bırakılmıştır. Kalan toplam 168 F1 BR bitkisi üzerinde analizler yürütülmüştür. Bu bitkiler halen Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Toprak Bilimi ve Bitki Besleme Bölümü üretim ve araştırma serasında yer almaktadır. Araştırmada MDS yöntemi ile ön seleksiyon için seçilmeyen bitkiler Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Kalecik Araştırma ve Uygulama Bağına tesis edilerek muhafaza altına alınmışlardır.

Kalecik Karası çeşidinde 2010-2012 yılında tekrarlanan toplam 3 melezleme sonrası hibrit salkım oluşumu yeterli seviyede gerçekleşmemesinden dolayı hedeflenen 150 bitki sayısına ulaşılammış, toplam 25 adet F1 bitkisi üzerinde analizlerimiz gerçekleştirilmiştir.

Laboratuvar analizleri DNA izolasyonu ile başlamıştır. Çalışmada kullanılan DNA izolasyon yöntemi asma gibi fenolik maddece son derece zengin olan ve bu nedenle ekstraksiyonda problem yaşanan türler için geliştirilmiş Lefort vd. (1998)'e göre gerçekleştirilmiştir.

Araştırmada kullanılan melezleme populasyonlarındaki F1 bitkilerine ait DNA'lar materyal ve yöntem bölümünde ayrıntılı olarak verilen hastalıklara dayanıklılık özelliği ile ilişkili seçilen moleküler markörler ile PCR ortamında çoğaltılarak, ilgili allel büyüklükleri değerlendirilmiştir.

Araştırmada kullanılan dayanıklılıkla ilişkili moleküler markörler ve elde edilen sonuçlara göre değerlendirmeler aşağıda ayrıntılı olarak verilmiştir.

### **5.1 Dayanıklılıkla İlişkili SCAR ve CAPS Markörlerin MDS (Markör Destekli Seleksiyon) Analizlerin Değerlendirilmesi**

Araştırmamızda hastalıklara dayanıklılıkla ilişkili 3 adet SCAR ve 1 adet CAPS markörü kullanılmıştır. Bu markörlerden 2 adet SCAR (ScoRA7-760 ve ScoRN3) Regent × Lemberger melez polulasyonunda Ren3 dayanıklılık lokusu ile ilişkilidir ve 15 nolu kromozom üzerinde yer almaktadır (Fischer vd. 2004, Akkurt vd. 2007, Welter vd.

2007). Seçilen ScoRA14 primeri yine aynı populasyonda mildiyöye dayanıklılıkla ilişkili Rpv3 lokusu ile bağlantılıdır ve 18 nolu kromozom üzerinde yer almaktadır (Akkurt vd. 2007, Welter vd. 2007).

Akkurt vd. (2007), küllemeye (*Erisiphe necator*) dayanıklılıkla ilişkili SCAR markörlerden ScoRA7-760 ve ScoRN3-32'ün yalnızca dayanıklı genotiplerde bant verdiğini, dayanıksız genotiplerde bant vermediğini bildirmektedirler. Buna göre araştırma populasyonlarımızdan BR populasyonunda, ScoRA7-760 marköründe 53 adet (%31) birey ilgili yayında belirtilen 760 bp büyüklüğünde amplifikasyon ürünü bant vermiştir. Buna karşılık 115 adet (%68.45) birey bant oluşturmamıştır. KR populasyonunda 2 adet F1 bitkisi (%8.00) bant verirken, 23 adedi (%92.00) bant vermemiştir.

Eibach vd. (2007), tarafından yapılan çalışmada ScoRA7-760 primerini küllemeye dayanıklılıkla ilişkili markör olarak kullanmışlardır. Bu markörün %19 oranında hastaliksız ve %37 oranında çok az miktarda bulaşık (enfeksiyonlu) bitkilerde bant verdiğini, dayanıksız bireylerde bant vermediğini belirlemişlerdir. Zah-Bi vd.(2014) çalışmalarında ScoRN3 ve ScoRA7 primerlerini kullanmışlar ve ePCR ürünü bant elde edemediklerini bildirmişlerdir.

Araştırmamızda ScoRA7 markörü ile BR populasyonunda bant veren 53 adet F1 dayanıklı çeşit adayı olarak seçilmiştir. KR populasyonunda ise 2 adet bitki dayanıklı genotip adayı olarak seçilmiştir.

ScoRN3-32 markörü ile BR F1 bitkilerinden 135 adeti (%80.35) bant verirken 33 adeti (%19.64) oranında bant vermediği belirlenmiştir. KR populasyonunda ise F1 bitkilerinin tamamı bu markör ile amplifikasyon ürünü bant vermiştir. Bu markör Akkurt vd. (2007) tarafından küllemeye dayanıklılıkla ilişkili olarak seçilirken, bizim çalışmamızda dayanıksız ebeveynler dahil, populasyondaki F1 bitkilerinin %80'inde bant vermesi, bizim populasyonumuzda MDS amaçlı kullanımının uygun olmadığı şeklinde değerlendirilmiştir. Nitekim Luo vd. (2001) dayanıklılıkla ilişkili RAPD markörlerden geliştirdikleri SCAR markörleri Çin kökenli *Vitis* türlerinde dayanıklılıkla

ilişkili olarak belirlenirken, Akkurt vd. (2004) tarafından yürütülen çalışmada Regent × Lemberger popülasyonunda hem dayanıklı hem de dayanıksız bireyler bu markör ile bant vermiştir. Bu çalışmada genetik kaynakların farklılığının markörlerin MDS amaçlı kullanımını sınırlayan en önemli faktör olduğu ve daha fazla genetik kaynaktan test edilmesi gerekliliği öne sürülmüştür (Akkurt 2004). Benzer bir değerlendirme ScoRN3 markörü için bizim çalışmamızda da geçerlidir.

Araştırmamızda mildiyöye dayanıklılıkla ilişkili olarak seçilen ScoRA14 markörü 'Regent x Lemberger' genetik haritasında 18 nolu kromozom üzerinde yer almakta Fisher vd. (2004) ve Akkurt vd. (2007) tarafından mildiyöye (*Plasmopara viticola*) dayanıklılık ıslahında erken seleksiyon amaçlı kullanılabilir olarak öne sürülmüş bir markördür. Bu nedenle çalışmamızda da mildiyöye dayanıklılık ile ilişkili olarak seçilmiştir. Kullanılan ScoRA14 primeri ile üzerinde çalıştığımız Boğazkere x Regent popülasyonuna ait 168 adet F1 bitkisinden 68 adedi (%40.47) bu markör ile bant verirken, 100 adedi (%59.52) amplifikasyon ürünü bant vermemiştir. Kalecik Karası × Regent melez popülasyonunda ise toplam 3 adet bitki bant oluştururken (%12.00), 22 adedi (%88.00) bant vermemiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda BR popülasyonlarda amplifikasyon oluşturan 68 adet F1 bitkisi ile KR popülasyonunda 3 adet F1 dayanıklı genotip adayları olarak seçilmişlerdir.

Her 3 SCAR markörün birlikte değerlendirildiğinde; BR melez popülasyonunda 24 adet (%14.28) F1 bitkisi her üç markör ile amplifikasyon oluşturdıkları için külleme ve mildiyöye yüksek oranda dayanıklı genotip adayı olarak seçilebilmişlerdir. Yine her üç markörle de bant oluşturmayan 28 adet (%16.66) F1 bitkisi araştırmanın 2. yılı sonrasında erken seleksiyon sonucu dayanıksız aday genotipler olarak, dayanıklılık ıslahı çalışmalarından elemine edilebilmişlerdir.

KR popülasyonunda ise, her üç markör ile de amplifikasyon veren F1 bitkisi sayısı 2 adet (%8.00) olarak ortaya çıkmıştır. Bant vermeyen bitki sayısı ise 23 adet (%92.00) olarak belirlenmiştir.

Araştırmada kullanılan diğer bir markör olan CAPS markörü GLP1-12, Donald vd. 2002, tarafından *Run1* lokusu (Resistant *uncinula necator* 1) ile sıkı bağlı olan üç

markörden biri olarak belirlenmiş ve daha sonra dayanıklılık ıslahı çalışmalarında *Vitis rotundifolia*'dan gelen *Run1* geni için işaretleyici markör olarak kullanılmıştır (Eibach vd. 2007 ve Molnar vd. 2007). Donald vd. (2002)'ye göre bu primer ile çoğaltılan DNA örnekleri 870 bp büyüklüğünde bant vermekte ve amplifikasyon ürünleri *EcoR1* enzimi ile kesildiğinde 670 bp ve 200 bp büyüklüğünde kesim ürünü bantlar yalnızca dayanıklı genotiplerde gerçekleştiği, hassas bireylerde ise kesimin gerçekleşmediği ifade edilmektedir. Eibach vd. 2007, hem genotipik değerlendirme hem de fenotipik değerlendirmeler sonrası, GLP1- 12 markörünü küllemeye dayanıklılıkla ilişkili olarak sıkı bağlantılı olduğunu, dayanıklı *Run1* geninin *M. rotundifolia* BC2'den aktarıldığını bildirmişlerdir.

Araştırmamızda BR melezleme popülasyonunda 85 adet (%50.59) F1 bitkisi GLP1-12 primeri ile amplifikasyon ürünü bant oluşturmuştur. Amplifikasyon ürünleri *EcoRI* enzimi ile kesiminin ardından dayanıklı ebeveyn Regent'te kesim gerçekleşmemiş, dayanıksız ebeveyn Boğazkere ile birlikte 85 adet bireyde literatürdeki bildirilenlere aykırı kesim göstermiştir. Araştırmada kullanılan ikinci melezleme popülasyonunda benzer sonuçlar elde edilmiştir.

Sonuç olarak araştırmamızda bu markör MDS amaçlı olarak değerlendirmeye alınmamıştır. Küllemeye dayanıklılık genlerinden *M. rotundifolia* kanı taşıyan genler *Run1*, diğer *vitis* türlerinden aktarılan dayanıklılık genleri *Ren* (Resistant *erysiphe necator*) olarak isimlendirilmektedir. GLP1-12 markörü *rotundifolia* kaynaklı *Run1* geni için bir işaretleyici olduğundan, bizim araştırmamızda farklı bir allelik pozisyon gösterdiği düşünülmektedir. Keza araştırmamızda her 2 popülasyonda *rotundifolia* kanı bulunmamaktadır.

Monlar vd. (2007), çalışmalarında {(*M. rotundifolia* x *V. vinifera*) BC4} x Cardinal melezinden GLP1-12 primerinin literatürdeki allelik dağılıma göre melezleme popülasyonunda 66 adet külleme dayanıklı ve 63 adet dayanıksız çeşit tesbit etmişlerdir.

Cadle-Davidson vd. (2011) çalışmalarında *Run1* lokusunu araştırmak için "Eger 99-11 (VRH 3082-1-42 (BC4) X SK 90-2-19) (*V. rotundifolia* ile *V. vinifera*'nın geri melezi)"

melezlemede kullandıkları GLP1-12 primerinin sadece dayanıklı bireylerde 700 bp büyüklüğünde alleler verdiğini bildirilmektedir.

## **5.2 Dayanıklılıkla İlişkili Olarak Seçilen SSR Markörlerin MDS (Markör Destekli Seleksiyon) Amaçlı Analizlerin Değerlendirilmesi**

Araştırmada farklı araştırmacılar tarafından külleme veya mildiyöye dayanıklılıkla ilişkili olarak belirlenen 6 adet SSR lokusu (UDV-15, UDV 305, VMC8g9, VMCNG2F12, VMC1G3.2 ve VMC7f2) Boğazkere x Regent ve Kalecik Karası x Regent populasyonlarında MDS ile dayanıklı genotipleri erken seleksiyon amacıyla kullanılmıştır. Bu markörler ile elde edilen sonuçlar arasında ayrıntılı olarak açıklanmaktadır.

### **5.2.1 UDV-15**

Welter vd (2007), Regent × Lemberger populasyonundan oluşturdukları genetik haritada, 15 nolu kromozom üzerinde belirledikleri dayanıklılık lokusu (Ren 3) ile bağlantılı olarak UDV-15 SSR markörünü belirlemişlerdir.

Eibach vd. (2007), UDV-15 markörünü VHR 3082-1-42 x Regent melezinden oluşan populasyonda külleme hastalığı ile bağlantılı bireylerin seleksiyonu amacıyla kullanmıştır. Regent (dayanıklı) çeşidi bu markör ile 178:189 (bp) büyüklüğünde allelik dağılım göstermiş ve 189 bp allele sahip bireyler dayanıklılıkla ilişkili olarak tespit edilmiştir (Anonymous 2011a). Bu primer ile dayanıklı allele sahip bireylerden, fenotipik değerlendirmeler sonucu, bireylerin yaklaşık %19'u enfeksiyonsuz, %37'si çok az enfeksiyonlu olarak belirlenmiştir.

Araştırmamızda UDV-15 markörü ile Regent çeşidinde 175:189 bp büyüklüklerinde allelik dağılım belirlenmiştir. Boğazkere çeşidi için ise 177:193 bp büyüklüğünde alleller elde edilmiştir. 168 F1 BR bitkisinde, 101 adeti Regent çeşidinden gelen dayanıklılıkla ilişkili 189 bp alleli taşımaktadır. Diğer populasyonda Kalecik Karası çeşidinde 178:178 bp büyüklüğünde alleler elde edilmiştir. KR populasyonundan 25

F1'den 5 adeti (%20) oranında dayanıklılıkla ilişkili alleleri taşımaktadır. Araştırma sonuçlarımızda Regent'ten kaynaklanan küllemeye dayanıklı lokus *Ren3* ile ilişkili olarak UDV-15 SSR markörü, başarılı bir şekilde değerlendirilmektedir.

### 5.2.2 VMC8G9

*Muscadinia rotundifolia*'da belirlenen mildiyöye dayanıklılıkla ilişkili dominant gen *Run1* olarak isimlendirilmiş ve değişik araştırmacılar tarafından genetik kaynağı *Muscadinia rotundifolia* olan bu gen ile ilişkili moleküler markörler belirlenmiştir (Pauquet vd. 2001, Donald vd. 2002). Barker vd. (2005), Mtp 3294 (BC4: VRH3082-1-42 x Cabernet Sauvignon), Mtp 3322 ve Mtp 3328 populasyonlarında *Run1* lokusuna sıkı ilişkili markörleri VMC8g9 ve VMC4f3.1 olarak belirlemişlerdir.

Molnar vd. (2007) yürüttükleri bir çalışmada, (*M. rotundifolia* x *V. vinifera*) BC4 x Cardinal melez populasyonunda *Run1* lokusu ile ilişkili olarak kullanılan VMC8g9 primerinin dayanıklı bireylerde 160:167 bp, Kishmish moldavskij çeşidinde 160:174 bp ve bu lokusu taşımayan hassas *Vitis vinifera* çeşidi Cardinal'de 179:179 bp büyüklüğünde bantlara ulaşmışlardır. Çalışmalarında 160 bp büyüklüğündeki alleli VMC8g9 primeri için küllemeye dayanıklılıkla ilişkili olarak belirlemişlerdir.

Marguerit vd. (2009) çalışmalarında, Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera*) x *Vitis riparia* Gloire de Montpellier melezinde VMC8g9 primerini *V. riparia*'dan kaynaklanan mildiyöye dayanıklılıkla ilişkili bir lokus (*Rpv5*) ile bağlantılı olduğunu bildirmektedir.

Katula vd. (2010), çalışmalarında, VRH3082-1-42 x Kışmış vatkana melezinden küllemeye dayanıklılıkla ilişkili *Run1* lokusunun izini bulmak için, VMC8g9 primerini kullanmışlar, *Run1* lokusunun 12 nolu kromozom üzerinde olduğunu bildirmişlerdir. Bu primer Kışmış vatkana çeşidinde 167:174 bp büyüklüğünde, VRH3082-1-42 çeşidinde ise 160-167 bp büyüklüğünde alleller vermiştir. Bu çalışmada da Molnar vd (2007)'deki gibi sadece 160 bp allele sahip olan F1'ler küllemeye dayanıklı olarak bulunmuştur.



Araştırmamızda kullandığımız VMC8g9 primeri Regent çeşidinde 173:176 bp, Boğazkere çeşidinde ise 163:163 bp büyüklüğünde allelik dağılım göstermiştir. 168 F1 BR bitkisinde görülen allelik dağılım şu şekilde gerçekleşmiştir: 163:173 bp allelleri (70 adet), 163:176 bp allelleri (77 adet) ve 163:163 bp allelleri (20 adet).

KR populasyonunda Kalecik Karası çeşidinde 165:165 bp büyüklüğünde alleler elde edilmiştir. 25 F1 bitkisinden 165:165 bp allelerinden 3 adet F1, 165:173 bp allelerinden, 19 adet ve 165:176 bp allellerinden 2 adet F1 bitkisi ortaya çıkmıştır.

Dolayısıyla her iki populasyonda *Run1* lokusuna bağlı külemeye dayanıklılıkla ilişkili 160 bp allel ortaya çıkmamıştır. Araştırmamızda *Muscadinia rotundifolia* kaynağı taşıyan ebeveynimiz bulunmadığından *Run1* lokusunun da melez bitkilerde görülmemesi beklenen bir sonuçtur. Araştırmamızda bu primer ile *vinifera*'da görülen ve dayanıklı bireylerin ayırımında kullanılamayan alleler ortaya çıkmıştır.

Riaz vd. (2011), çalışmalarında 5 farklı populasyonda, asmanın farklı yerlerinden aldıkları örneklerde, *Run1*, *Run2.1*, *Run2.2* ve *Ren4* külemeye dayanıklı lokusları belirlemek için VMC8g9 primerini farklı genetik kaynaklarda (*V. Vinifera*, *Muscadinia rotundifolia*) denemişlerdir. Araştırmada VMC8g9 markörü için 159, 176, 172, 137, 138, 140, 164, 170, 173 ve 192 bp büyüklüğünde alleler ortaya çıkmıştır. 159, 137 ve 138 bp büyüklüğündeki allelerin dayanıklılık ile ilişkili oldukları belirlenmiştir.

### 5.2.3 VMCNG2F12

Welter vd. (2007) Regent (dayanıklı) x Lemberger (dayanıksız) çeşitlerin melezlemelerinden oluşturdukları genetik haritada 18 nolu kromozomda mildiyöye dayanıklılıkla ilişkili bir lokus (*Rpv3*) belirlemişlerdir. VMCNG2F12 primeri genetik haritada *Rpv3* lokusuna ilişkili olarak belirlenmiştir.

Eibach vd. (2007) VHR 3082-1-42 x 'Regent' melezinden oluşan F1 bitkilerinde *Rpv3* lokusu ile ilişkili VMCNG2F12 primerini, dayanıklı bireylerin erken seleksiyonu için

denemişlerdir. Dayanıklı çeşitlerde 186 bp büyüklüğünde allel ortaya çıktığı belirlenmiştir (Anonymous 2011a).

Bizim yaptığımız çalışmada BR populasyonunda, Regent çeşidi, 159:161 bp ve Boğazkere çeşidi ise 151:181 bp büyüklüğünde bantlar vermişlerdir. KR populasyonunda ise Kalecik Karası çeşidi 151:190 bp büyüklüğünde bant vermiştir. Üzerinde çalıştığımız melezleme populasyonlarında literatürde dayanıklılıkla ilişkili 186 bp allele rastlanmamıştır. Bu nedenle bu markör araştırmamızda mildiyöye dayanıklılığa yönelik Marköre Dayalı Seleksiyonda kullanılabilir olarak değerlendirilmemiştir.

Zah-Bi vd. (2014) Rpv2/Rpv3 lokusu ile ilişkili VMCNG2f12 primerini kullanmışlardır. *Vitis* türlerinde 198 bp, *M. rotundifolia*'da 200 bp ve Regale çeşidinde 180 bp büyüklüğündeki allelere ulaşmışlardır.

#### **5.2.4 VMC1g3.2**

Donald vd. (2002) *Muscadinia rotundifolia*'da mildiyö dayanımına ilişkin bir lokus belirlemişler ve bu lokus Resistant Plasmopora viticola'nın kısaltılmasından oluşan (*Rpv1*) olarak isimlendirilmiştir. Barker vd. (2005), Mtp 3294 (BC4: VRH3082-1-42 x Cabernet Sauvignon), Mtp 3322 ve Mtp 3328 populasyonlarından geliştirdikleri genetik haritalarda *Rpv1* lokusunu, *Run1* lokusunda olduğu gibi 12 nolu kromozom üzerinde belirlemişler ve bu lokus ile bağlantılı SSR markör QTL analizleri sonucu VMC1G3.2 olarak belirlenmiştir. Bundan sonraki pek çok araştırmada VMC1G3.2 primeri *Rpv1* lokusu için işaretleyici olarak kullanılmıştır (Eibach vd. 2007, Katula vd. 2010).

Yaptığımız çalışmada VMC1g3.2 primeri ile dayanıklı ebeveyn Regent 122:140 bp, hassas Boğazkere ise 127:155 bp büyüklüğünde alleller ortaya çıkarmıştır. BR populasyonunda 168 adet F1 bitkisinden toplam 85 adeti (%50.59) 122 bp allele sahip olmuştur. KR populasyonunda Kalecik Karası 120:122 bp allelik dağılım göstermiş 25 F1 bitkisinden 22 adeti 122 bp allele sahip olduğu belirlenmiştir.

Katula-Debreceni vd. (2010), çalışmalarında Kışmış vatkana (küllelemeye dayanıklı *vinifera*) x Nimrang (küllelemeye hassas *vinifera*) ve VRH3082-1-42 (BC4) x Kışmış vatkana populasyonunda külleme ve mildiyöye dayanıklı bireylerin MAS ile erken seleksiyonu ve MAS'ın *Run1* ve *Ren1* lokusunu taşıyan bitkilerin erken seleksiyonunda kullanılabilirliğini göstermek amacıyla *Rpv1* lokusuna bağlı VMC1g3.2 primerini kullanmışlardır. Bu primer ile külleme dayanıklı mildiyö hassas Kışmış vatkana'da 122:140 bp allellerini elde etmişlerdir. BC5 populasyonunda (VRH3082-1-42 x Kışmış vatkana) 122:122 bp homozigot olan bitkilerin dayanıklı, heterozigot bitkilerin ise farklı seviyede dayanıklı ve hassas olduğunu belirterek, 122:122 bp allelik dağılımın *Rpv1* için MAS amaçlı kullanılabilir olduğunu bildirmişlerdir.

Araştırmamızda 168 F1 bitkisinden oluşan BR populasyonunda 122:122 bp homozigot allele sahip F1 tespit edilmemiştir. Ancak ilginç bir şekilde KR populasyonunda 8 adet F1 (KR1, KR2, KR7, KR9, KR11, KR18, KR20, KR25) Katula vd. (2010) mildiyöye dayanıklı bitkilerde olması beklenen 122:122 bp allelik dağılıma sahip olduğu görülmüştür. Bu bitkiler mildiyöye dayanıklı aday genotipler olarak seçilirken; fenotipik değerlendirmeler özellikle bu bitkilerde büyük önem arz etmektedir.

### 5.2.5 UDV 305

Bellin vd. (2009), 'Chardonnay' × 'Bianca' çeşitlerinin melezinden ortaya çıkardığı genetik haritada, mildiyöye dayanıklı *Rpv3* lokusunun 18 nolu kromozom üzerinde UDV305 ve VMC7f2 markörleri arasında yer aldığını ve birbirinden 2.9 cM uzakta olduğunu tespit etmişlerdir. UDV305 primeri, Regent ile Bianca'dan kaynaklanan ve aynı dayanıklılık lokusu olduğu tahmin edilen *Rpv3* lokusu ile sıkı ilişkili olarak bildirilmektedir (Eibach vd. 2007).

Di Gaspero vd. (2012), *Rpv3* lokusunu major bir grup şeklinde UDV305, UDV737 ve diğer UDV markörleri ile belirlemeye çalışmışlardır. Araştırmada hastalıklara dayanıklılık asma ıslahı çalışmalarında kullanılan 580 adet genotip bu primerler ile taranmış ve dayanıklılık ile ilişkili alleler belirlenmeye çalışılmıştır. Araştırma

sonuçlarına göre ıslah hatlarında en fazla rastlanan alleler 279-299 bp alleleri olmuştur. Bu nedenle 279 ve 299 bp alleler mildiyöye dayanıklılıkla ilişkili olduğu belirlenmiştir.

Riaz vd. (2011), ‘Magnolia (*M. rotundifolia*)’ × ‘Trayshed’ melezlemesinden elde ettikleri genetik haritada UDV-305 primeri ile temiz bantlar elde edememişler ve sonuç alamamışlardır. Bu çalışmada *vitis* türlerinden kaynaklı bir dayanıklı lokusu olan *Rpv3* ile ilişkili temiz allelerin elde edilememesi, çalışmada genetik kaynak olarak *Muscadinia rotundifolia*’nın kullanılmasından kaynaklandığı söylenebilir.

Zah-Bi vd. (2014), UDV 305 primerini *Rpv3* lokusunu belirlemek için kullanmışlar, *vitis* genomunda 361 bp alleli *rotundifolia*’da ve Regale çeşitlerinde ise multi (pek çok) allele rastlamışlardır. Zah-Bi vd. (2014) ve Riaz vd. (2011) çalışmalarında UDV-305 primeri ile *rotundifolia*’da birbirini destekleyen sonuçlar ortaya çıkmıştır.

Araştırmamızda Regent çeşidinde büyüklükleri 229-299-231-290 bp olmak üzere multi alleler elde edilmiştir. Boğazkere çeşidi için 301:304 bp alleler elde edilmiştir. Kalecik Karasında ise, 233:333 bp büyüklüğünde alleler belirlenmiştir. Rodolf Eibach ile yapılan kişisel görüşme (Anonymous 2011a) ve Di Gaspero vd. (2012) yayınında ortak olan görüş UDV-305 primeri ile Regent çeşidine ait allel büyüklükleri 229-299 bp dir. Bu nedenle araştırmamızda 229-299 bp allelleri değerlendirmeye alınmış ve diğer allelleri değerlendirme dışı bırakılmıştır.

Regent’ten gelen olan 299 bp dayanıklılık allelerini taşıyan F1 bitkileri mildiyöye dayanıklı genotip adayları olarak değerlendirilmiştir. Bu sonuçlara göre araştırmamızda BR popülasyonundan 33 adet genotip mildiyöye dayanıklı aday olarak seçilmiştir. KR popülasyonlarında bu 14 adet F1 dayanıklı genotip adayları olarak seçilmiştir.

### **5.2.6 VMC7F2**

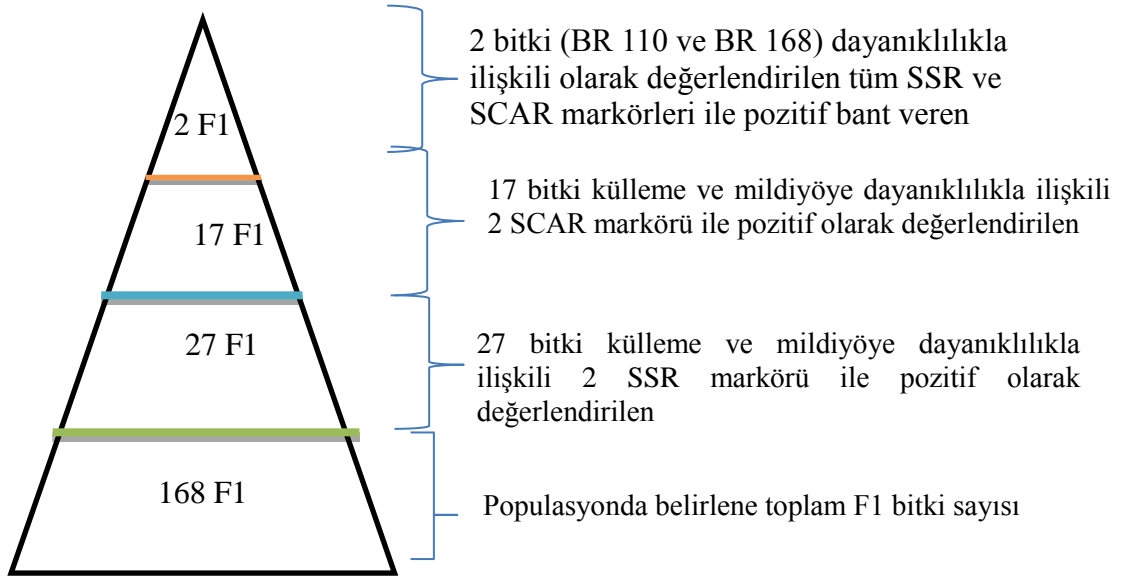
Mahanil vd. (2012) 18 nolu kromozom üzerinde yer alan VMC7F2 SSR markörünün çekirdeksizlik lokusu (*sdl*) ile birlikte, mildiyöye dayanıklılık ile ilişkili *Rpv3* lokusu ve

küllemeye dayanıklılıkla ilişkili *Run2* ve *Ren4* lokusu ile ilişkili (Riaz vd. 2011) olduğunu bildirilmektedir.

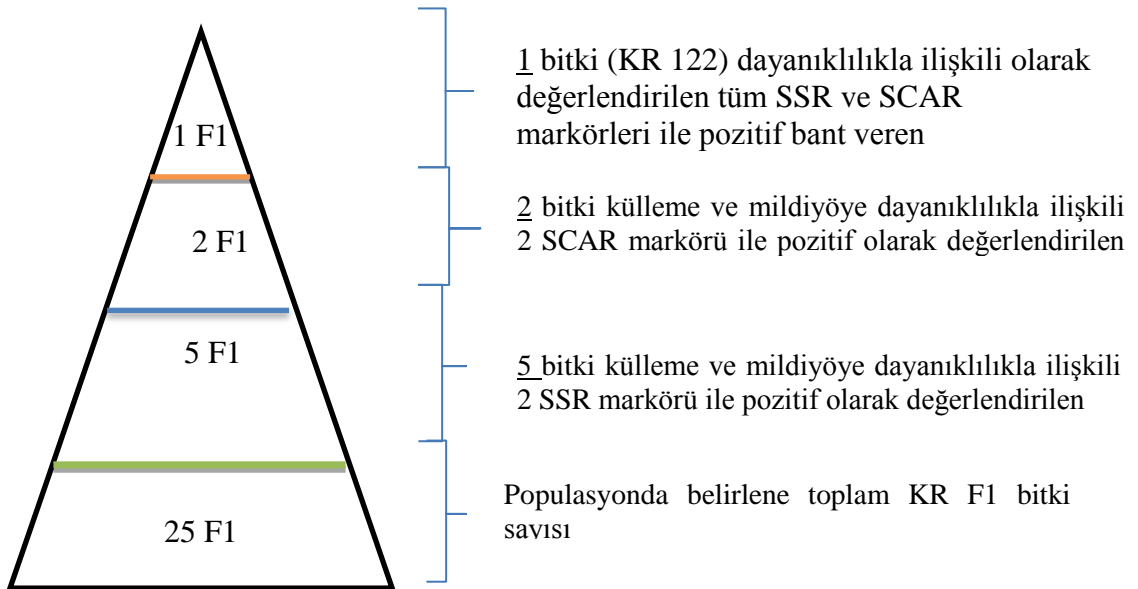
Riaz vd. (2011) araştırmalarında asmanın 4 farklı bölgesinden; (yaprak, salkım iskeleti, dal ve meyve) örnekleri 5 farklı araştırma popülasyonda değerlendirmeye almışlardır. Araştırmada *Run1*, *Run2.1*, *Run2.2* ve *Ren4* lokuslarında, VMC7f2 primeri'nin allel profilini bazı *V. vinifera*, *M. rotundifolia* ve *V. romanetii* çeşitlerinde sonuçlandırmışlardır. VMC7f2 primerinde 193, 195, 199, 197 ve 203 bp büyüklüğündeki allelere ulaşmışlardır. 193, 197 ve 195 bp büyüklüğündeki allelerin dayanıklılıkla ilişkili oldukları belirlenmiştir.

Bellin vd. (2009), çalışmalarında mildiyöye dayanıklılıkla ilişkili *Rpv3* lokusunun UDV305 ve VMC7f2 markörleri arasında yer aldığını ve birbirinden 2.9 cM uzaklıkta olduğunu tespit etmişlerdir. Her iki markör 18 nolu kromozom üzerinde yer almaktadır. Böylece VMC7F2 primerin hem mildiyöye dayanıklılıkla (*Rpv3* lokusu) hem küllemenin (*Ren4*, *Run2.1* lokuslar) ve hemde çekirdeksizlik (*sdl* lokusu) ile ilişkili olduğunu bildirilmektedir.

Araştırmamızda kullandığımız VMC7F2 primeri ile Regent çeşidinde 206:212 bp, Boğazkere çeşidinde 201:205 bp büyüklüğünde alleller elde edilmiştir. Kalecik Karasında ise, 203:201 bp büyüklüğünde alleler belirlenmiştir. Üzerinde çalıştığımız melezleme popülasyonlarında literatürde dayanıklılıkla ilişkili olarak belirtilen 199, 200, 193, 195 ve 197 bp allellere rastlanmamıştır. Bu nedenle bu markör araştırmamızda külleme ve mildiyöye dayanıklılığa yönelik Marköre Dayalı Seleksiyonda kullanılabilir olarak değerlendirilmemiştir.



Şekil 5.1 Boğazkere × Regent populasyonunda MDS yöntemi ile külleme ve mildiyöye F1 BR bitkilerinde dayanıklı genotiplerin piramitlenmesi



Şekil 5.2 Kalecik Karası × Regent populasyonunda MDS yöntemi ile külleme ve mildiyöye F1 BR bitkilerinde dayanıklı genotiplerin piramitlenmesi

Bitkilerin sađlıklı yetiřtirilmesini sađlamak ve patojen yođunluđunu dűřürerek ilaç uygulama sayısını azaltmak için gerekli kűltűrel ۆnlemlerin alınması bűyűk ۆnem tařımaktadır. Bu amaçla, alınan kűltűrel ۆnlemler ile yođun fungusit kullanımının ۆnűne geçilmesi gerekmektedir. Ancak hastalıklara dayanıklı veya tolerant, yeni çeřitlerin elde edilerek bađcılıđa kazandırılması, kimyasal műcadeleyi dolayısıyla çevreyi kirletici maddelerin uygulanmasını azaltan en ۆnemli geliřmedir. Bu dođrultuda arařtırmamız ۆlkemizde hastalıklara dayanıklılık ıslahında Markűre Dayalı Seleksiyon tekniđinin kullandıđı ilk çalıřma olması yűnűnden son derece ۆnemlidir. Bu arařtırma ve devamı niteliđindeki diđer arařtırma projeleri ile ۆlkemize yeni ve sađlıklı ۆzűm çeřitlerin kazandırılması ۆncelikle hedeflerimiz arasındadır. Yapılan bu ve benzeri arařtırmalar asmada genetik ilerlemeye bűyűk fayda sađlayacađı ve hız kazandırdıđı gűz ۆnűne alındıđında, ۆlkemizde de bu alanda ۆncű ve ileri çalıřmaların gerekliliđi ortaya çıkmaktadır.

## KAYNAKLAR

- Agarwal, S., Holton, K. L. Lanza, R. 2008. Efficient Differentiation of Functional Hepatocytes from Human Embryonic Stem Cells. *Stem cell*. 26:1117–1127.
- Ağaoğlu, Y.S., Söylemezoğlu, G., Çalışkan, M. ve Ergül, A. 1999. Türkiye’de yetiştirilen Razakı üzüm çeşidi ekotiplerinin elektroforetik tanımlamaları üzerinde araştırmalar. Türkiye III. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi. 14–17 Eylül, s; 398–394. Ankara.
- Akkurt, M. 2004. Entwicklung molekularer marker für Oidium (*Uncinula necator*)-resistenz bei der Weinrebe. PhD Diss. Karlsruhe T.H. Deutschland. 117 p.
- Akkurt, M., Welter, L., Töpfer, R. and Zyprian, E. 2007. Development of SCAR markers linked to downy mildew (*Palsmopora viticola*) resistance in grapevine (*Vitis vinifera* L.), *Mol Breeding*, 19:103–111.
- Alleweldt, G., Spiegel-Roy, P., Reisch, B.I. 1990. Grapes (*Vitis*). In: Moore JN (ed) Genetic resources of temperate fruit and nut crops, *Acta Hortic*. 290:289–327.
- Alleweldt, G. 1997. Genetics of grapevine breeding. *Progress in botany*. 58: 442-454.
- Anonim. 2009. [www.dpt.gov.tr](http://www.dpt.gov.tr). 20.05.2009
- Anonymus. 2011. Fao. 2011. [www.fao.org](http://www.fao.org). 10.09.2011.
- Anonymus. 2011a. Kişisel görüşme. Prof. Dr. Rudolf Eibach. Institute For Grapevine Breeding, Geilweilerhof. Germany.
- Anonymus. 2013. Anonymus 2013. [www.genoscope.cns.fr/vitis](http://www.genoscope.cns.fr/vitis).
- Antcliff, A.J, 1980. Inheritance of sex in *Vitis*. *Ann Amelior Plant*. 30:113–122.
- Anwar, S.A., McKenry, M.V., Ramming, D.W. 2002. A search for more durable grape rootstock resistance to root-knot nematode. *Am J Enol Vitic* 53:19–23.



- Arroyo-Garcia, R., Ruiz-Garcia, L., Boulling, L., Ocete, R., López, M. A., Arnold, C., Ergul, A., Söylemezoğlu, G., Uzun, H. İ., Cabello, F., Ibáñez, J., Aradhya, M. K., Atanassov, A., Atanassov, I., Balint, S. J., Cenis, L., Costantini, L., Gorislavets, S., Grando, M. S., Klein, B. Y., McGovern, P., Merdinoglu, D., Pejic, I., Pelsy, F., Primikirios, N., Risovannaya, V., Roubelakis-Angelakis, K. A., Snouss, H., Sotiri, P., Tamhankar, S., This, P., Troshin, L., Malpica, J. M., Lefort, F and Martinez- Zapater, J. M. 2006. Genetic evidence for the existence of independent domestication events in grapevine. *Molecular Ecology*. 15(12). 3707-3714.
- Asins, M.J. 2002. Present and Future of Quantitative Trait Locus Analysis in Plant Breeding. *Plant Breeding*. 121; 281-291.
- Barba, P., Cadle-Davidson, L., Harriman, J., C. Glaubitz, J, Brooks, S., Hyma, K and Reisch, B. 2013. Grapevine powdery mildew resistance and susceptibility loci identified on a high-resolution SNP map.
- Barış C. 1988. Pratik Bağcılık. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Mesleki yayınlar, no 316.
- Barker, C. L., Donald, T., Pauquet, J., Ratnaparkhe, M.B., Bouquet, A., Adam-Blondon, A.F., Thomas, M.R and Dry, I. 2005. Genetic and physical mapping of the grapevine powdery mildew resistance gene. *Run1*. using a bacterial artificial chromosome library. *Theor Appl Genet* 111: 370–377. *Theor Appl Genet*.
- Becker, H., Sopp, E. 1990. Rootstocks with immunity to phylloxera and nematode resistance. In: Proceedings of the 5th International Symposium on Grape Breeding. *Vitis special issue, St. Martin/Pfalz* p. 294.
- Bellin, D., Peressotti, E., Merdinoglu, D., Wiedemann-Merdinoglu, S., Adam-Blondon, A-F., Cipriani, G., Morgante, M., Testolin, R and Di Gaspero, G. 2009. Resistance to *Plasmopara viticola* in grapevine ‘Bianca’ is controlled by a major dominant gene causing localised necrosis at the infection site. *Theor Appl Genet*. 120; 163–176.

- Ben-Ari, G and Lavi, U. 2012, Marker-assisted selection in plant breeding. Elsevier Inc. DOI: 10.1016/B978-0-12-381468-100011-0.
- Bilanger, R. R., Busnell, W. R., Bille, A. J and Carver, OT. 2002. The Powdery Mildews A Comprehensive Treatise. APS Press. St. Poul. MN.
- Blanc, S., Wiedemann-Merdinoglu, S., Dumas, V., Mestre, Pere and Merdinoglu, D. 2012. A reference genetic map of *Muscadinia rotundifolia* and identification of Ren5, a new major locus for resistance to grapevine powdery mildew. *Theor Appl Genet* 125:1663–1675. DOI 10.1007/s00122-012-1942-3.
- Blasi, P., Blanc, S., Wiedemann-Merdinoglu, S., Prado, E., Rühl, E.H and Mestre, P. 2011. Construction of a reference linkage map of *Vitis amurensis* and genetic mapping of *Rpv8*, a locus conferring resistance to grapevine downy mildew. *Theor. Appl. Genet.* 123. 43e53.
- Bloodworth, P.J., Nesbitt, W.B., Barker, K.R. 1980. Resistance to root knot nematodes in *Euvitis* × *Muscadinia* hybrids. In: Proceedings of the 3rd International Symposium on Grape Breeding, Davis, CA, pp 275–292.
- Boerma, H.R. and Hussey, R.S. 1992. Breeding plants for resistance to nematodes. *Journal of Nematology.* 24; 242-252.
- Botstein, D., White, K. L., Skolnick. M. and Davis. R. W. 1980. Construction of a genetic linkage map in map using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 32; 3 14–33 l.
- Botta, R., Vellania, R. and Me. G. 1987. Grapevine breeding by gamma radiations: results and prospects. *Acta Horticulturae* 224. 30–36.
- Bouquet, A. 1980. *Vitis* x *Muscadinia* hybridisation: a new way in grape breeding for disease resistance in France. Proc. 3th Int. Symp. In Grape Breeding. 42-61 p.
- Bouquet, A. 1986. Introduction dans l'espèce *Vitis vinifera* L. d'un caractère de résistance à l'oidium (*uncinula necator* Schw. Burr.) issu de l'espèce *Muscadinia rotundifolia* (Michx.) Small. *Vignevini.* 12 (suppl):141–146.

- Boyden, L.E. 2005. Allelism of root-knot nematode resistance and genetics of leaf traits in grape rootstocks. Cornell University, Ithaca.
- Boz, Y., Bakır, M., Çelikkol, B.P., Kazan, K., Yılmaz, F., Çakır, B., Aslantas, S., Söylemezoğlu, G., Yaşasin, A.S., Özer, C, Çelik, H ve Ergül, A. 2011. Genetic characterization of grape (*Vitis vinifera* L.) germplasm from Southeast Anatolia by SSR markers *Vitis - Journal of Grapevine Research* Volume 50. Issue 3. Pages 99-106.
- Bray, E., Bailey-Serres, J. and Weretilnyk, E. 2000. Responses to abiyotik stresses chapter 22. In *biochemistry and molecular biology of plants*. American Society Plant Physiology Rockrille MD.
- Buck, S. and Zyprian, E. 2000. First Approaches of Molecular Mapping in a Model Population Derived from The Crossing of The Grapevine Varieties ‘Regent’ x ‘Lemberger’. VII. International Symp on Grapevine Genetics and Breeding. Montpellier. France. *Acta Horticulture*. No:528: 203-207.
- Büyükünäl-Bal, E. B. 2003. Arpa Mikrosatelitlerinin Ekmeklik Buğdaydaki Genetik Çalışmalar İçin Kullanım Olanaklarının Araştırılması. *KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi* 6(2).
- Cadle-Davidson, L., Mahanil, S., Gadoury, D. M., Kozma, P., and Reisch, B. I. 2011. Natural infection of Run1-positive vines by naïve genotypes of *Erysiphe necator*. *Vitis* 50 (4), 173–175.
- Carbonneau, A. 1985. The early selection of grapevine rootstocks for resistance to drought conditions. *Am. J. Enol. Vitic.* 36, 195–198.
- Charbaji, T. and Nabulsi, I. 1999. Effect of low doses of gamma irradiation on in vitro growth of grapevine. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 57. 129–132.
- Cheikh, N., Jones, R.J., 1994. Disruption of maize kernel growth and development by heat stress (role of cytokinin/abscisic acid balance). *Plant Physiol.* 106:45–51.

- Coleman, C., Copetti, D., Cipriani, G., Hoffmann, S., Kozma, P., Kovács, L., Morgante, M., Testolin, R., and Di Gaspero, G. 2009. The powdery mildew resistance gene REN1 co-segregates with an NBS-LRR gene cluster in two Central Asian grapevines. BMC Genetics.
- Costacurta, A., Cancellier, S., Corino, L. and Borgu, M. 1987. Resistance to *Plasmopora viticola* in crosses of *Vitis vinifera* L. with hybrids. Plant Breeding Abst. 57 (5).
- Cousins, P., Walker, M.A. 2002 Genetics of resistance to *Meloidogyne incognita* in crosses of grape rootstocks. Theor Appl Genet 105:802–807.
- Çakır, A. 2011. Bağcılıkta Abiyotik Stres Koşullarına Yönelik Melezlemelerden Kuraklık ve Tuz Stresine Toleranslı Ümitvar Tiplerin Elde Edilmesi. Ankara Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri ABD. 220 s.
- Çalışkan, M. 2005. RAPD analizi ile güllerde (*rosa* sp.) genetik tanımlama. Ankara Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri ABD. 92 s.
- Çelen, H.İ. 2001. Tarımsal İlaç Uygulamalarında Karşılaşılan İlaç Sürüklenmesi. Tarımsal Mekanizasyon 20. Ulusal Kongresi Kitabı. Şanlıurfa. s.274-284.
- Çelik, H., Ağaoğlu, Y.S., Fidan, Y., Marasalı, B. ve Söylemezoğlu, G. 1998. Genel Bağcılık. Sunfidan A.Ş. Mesleki Kitaplar Serisi: 1. Ankara. 253s.
- Çelik, H. 2009. Özel bağcılık ders notları. Ankara Ünive. Zir. Fak. Bahçe Bitkileri Bölümü. Ankara.
- Dalbó, M.A., Ye, G.N., Weeden, N.F., Wilcox, W.F. and Reisch, B.I. 2001. Marker-assisted Selection for Powdery Mildew Resistance in Grapes J. Amer. Soc. Hort. SCI. 126(1); 83–89.
- Delen, N., Durmusoglu, E., Güncan, A., Güngör, N., Turgut, C. ve Burçak, A. 2005. Türkiye’de pestisit kullanımı, kalıntı ve organizmalarda duyarlılık azalısı sorunları. 6. Türkiye Ziraat Mühendisliği Teknik Kongresi. 3-7 Ocak 2005. Ankara. Cilt II. 629-648.

- Di Gaspero, G., Cipriani, G., Adam-Blondon, A.F., Testolin, R. 2007. Linkage maps of grapevine displaying the chromosomal locations of 420 microsatellite markers and 82 markers for R-gene candidates Theor. Appl. Genet. 114. pp. 1249–1263.
- Di Gaspero, G., Copetti, D., Coleman, C., Castellarin, S.D., Eibach, R., Kozma, P., Lacombe, T., Gambetta, G., Zvyagin, A., Cindric, P., Kovács, L., Morgante, M and Testolin, R. 2012. Selective sweep at the *Rpv3* locus during grapevine breeding for downy mildew resistance. Theor Appl Genet. 124:277–286.
- Donald, T. M., Pellerone, F., Adam-Blondon, A. F., Bouquet, A., Thomas, M. R. and Dry, I. B. 2002. Identification of resistance gene analogs linked to a powdery mildew resistance locus in grapevine. Theor. Appl. Genet. 104; 610-618 p.
- Doulati-Baneha, H., Mohammadi, S.A., Labrad, M. 2013. Genetic structure and diversity analysis in *Vitis vinifera* L. cultivars from Iran using SSR markers Scientia Horticulturae 160; 29–36.
- During, H. 1986. Testing for drought tolerance in grapevine scions. Angewandte Botanik. 60:103–111.
- Eibach, R., Diehl, H., Alleweldt, G. 1989. Untersuchungen zur Vererbung von Resistenzeigenschaften bei Reben gegen *Oidium tuckeri*, *Plasmopara viticola* und *Botrytis cinerea*. Vitis 28:209–228
- Eibach, R., Zyprian, E., Welter, L. and Töpfer, R. 2007. The use of molecular markers for pyramiding resistance genes in grapevine breeding. Vitis 46 (2). 120–124.
- Emanuelli, F., Lorenzi, S., Grzeskowiak, L., Catalano, V., Stefanini, M., Troglio, M., Myles, S., Martinez-Zapater, J.M., Zyprian, E., Moreira, F.M and Grando, M.S. 2013. Genetic diversity and population structure assessed by SSR and SNP markers in a large germplasm collection of grape. BMC Plant Biol.

- Emmett, R. W., Harris, A. R., Taylor, R. H. And McGechan, J. K. 1992. Grapevine disease and vineyard protection (Ed. B. G. Coombe and P. R. Dry. Viticulture Vol 2 practices: 232-278). Winetitles. Adelaide.
- Erensayın, C. 2000. Genetik. 2. Baskı. Ankara: Nobel Yayın Dağıtım, pp. 119-134.
- Ergül, A. 1992. Bağcılıkta melezleme ıslahı. Yüksek Lisans semineri, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri ABD, Ankara. 92 s.
- Ergül, A. 1997. Asmanın sitolojik yapısı ve özel amaçlar açısından asma ıslahının esasları. Doktora Semineri. Ankara Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü. Bahçe Bitkileri ABD. Ankara. 25 s.
- Ergül, A. 2000. Asmalarda (*Vitis vinifera* L. cv.) genomik DNA parmak izi analizi ile moleküler karakterizasyon Ankara Üniv. Fen Bil. Ens. Doktora Tezi. Ankara.
- Ergül, A., Aras, S., Söylemezoğlu, G. ve Ağaoğlu, Y.S. 2002. Kalecik Karası Üzüm Çeşidi Klonlarında AFLP Tekniği ile Polimorfizmin Belirlenmesi. Türkiye V. Bağ ve Şarap. Semp. Nevşehir. 31-37.
- Ergül, A., Marasalı, B and Ağaoğlu, Y.S. 2002a. Molecular discrimination and identification of some Turkish grape cultivars (*vitis vinifera* l.) by RAPD markers, *Vitis* 41, 159-160.
- Ergül, A., Kazan, K., Aras, S., Çevik, V., Çelik, H., Söylemezoğlu, G. 2006. AFLP analysis of genetic variation within the two economically important Anatolian grapevine (*Vitis vinifera* L.) varietal groups. *Genome*. 49; 467-475.
- Ergül, A., Perez Rivera, G., Söylemezoğlu, G., Kazan, K. and Arroyo Garcia, R. 2011. Genetic diversity in Anatolian wild grapes ( *Vitis vinifera* subsp. *sylvestris*) estimated by SSR markers, *Plant Genetic Resources, Characterization and Utilization* 9(3); 375–383.
- Eriş, A. 1992. Özel bağcılık. Uludağ Üniv. Zir. Fak. Ders Notları No; 52. 212 p.
- Eriş, A., Gülen., H., 2004. Moleküler Biyoloji. Temel Bilgiler Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi. 138s.

- Fang, D.Q. and Roose, M.L. 1997. Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers. *Theor. Appl. Genet.* 95: 408–417.
- Fanizza, G., Chaabane, R., Lamaj, F., Ricciardi, L., Resta, P. 2003. AFLP Analysis of Genetic Relationships Among Aromatic Grapevines ( *Vitis vinifera*). *Theor. Appl. Genet.* 107 (6): 1043-1047.
- Fennell, J.L. 1948. Inheritance studies with the tropical grape. *J Hered.* 39:54–64.
- Fidan, Y. 1985. Özel bağcılık. Ankara Üniv. Zir. Fak. Yayınları 930. Ders Kitabı No: 265. 401 s.
- Fidan, Y., Çelik, H., Çelik, S ve Şeniz, V. 1986. Kalecik Karası Üzüm Çeşidinde Teksel Seleksiyon. TÜBİTAK-TOAG Proje No: 507. Sonuç Raporu. Ankara. s:28.
- Fidan, Y., Yavaş, İ ve Özışık, S. 1991. Kalecik Karası Üzüm Çeşidinde Teksel Seleksiyon. TÜBİTAK-TOAG. Proje No: 634. Sonuç Raporu. Ankara. s:127.
- Firoozabady, E., Olmo, H.P. 1987. Heritability and correlation studies of certain quantitative traits in table grapes, *Vitis* spp. *Vitis* 26:132–146.
- Fischer, B. M., Slakhutdinov, I., Akkurt, M., Eibach, R., Edwards, K. J., Töpher, R. and Zyprian, E. M. 2004. Quantitative trait locus analysis of fungal disease resistance factors on a molecular map of grapevine. *Theor. Appl. Genet.* 108; 501-515 p.
- Francia, E., Rizza, F., Cattivelli, L., Stanca, A.M., Galiba, G., Toth, B., Hayes, P.M., Skinner, J.S and Pecchioni, N. 2004. Two loci on chromosome 5H determine low-temperature tolerance in a ‘Nure’ (winter) x ‘Tremois’ (spring) barley map. *Theor. Appl. Genet.* 108: 670-680.
- Galet, P. 1988. *Cepages et vignobles de France. Vol. 1 Les Vignes Americaines*, 2nd edn. Charles Dehan, Montpellier
- Grando, M.S., Frisinghelli, C and Stefanini, M. 2000. Genotyping of Local Grapevine Germplasm. *Acta Hort.* 528: 183-187.

- Gupta, S.K., Chyi, Y.S., Romero-Severson, J and Owen, J.L. 1994. Amplification of DNA Markers from Evolutionarily Diverse Genomes Using Single Primers of Simple-Sequence Repeats. *Theor. Appl. Genet.*, 89: 998-1006.
- Gupta, S.K. and Pandey, M.K. 2013. Breeding for Disease and Insect-Pest Resistance. *Integrated Pest Management Current Concepts and Ecological Perspective*.
- Gülcan, R. ve İlter, E. 1975. Bağcılıkta Islah Metodları. E.Ü.Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü.
- Hafez, E.E., Ghany, AGAA and Zakil, EA,. 2006. LTR-retrotransposons based molecular markers in cultivated Egyptian cottons *G. barbadense*. *Afr J Biotechnol.* 5:1200-4.
- He, P.H., Wang, G. 1986. Studies on the resistance of wild *Vitis* species native to china to downy mildew, *Plasmopora viticola* (Berk. et Curtis) Berl. et de Toni. *Acta Horti Sinica*, 13:17–24.
- He, P., Lixin, N. 1989. Study of cold hardiness in the wild *Vitis* native to China. *Acta Horti Sinica.* 16:81–88.
- Hocquigny, S., Pelsy, F., Dumas, V., Kindt, S., Heloir, MC and Merdinoglu, D. 2004. Diversification within grapevine cultivars goes through chimeric states *Genome* 47 579–589.
- Hoffmann, S., Di Gaspero, G., Kovács, L., Howard, S., Kiss, E., Galbács, Z., Testolin, R and Kozma, P. 2008. Resistance to *Erysiphe necator* in the grapevine ‘Kishmish vatkana’ is controlled by a single locus through restriction of hyphal growth. *Theor Appl Genet* 116; 427–438.
- Hwang, C.F., Xu, K., Hu., R., Zhou, R., Riaz, S and Walker, M. A. 2010. Cloning and characterization of XiR1. a locus responsible for dagger nematode resistance in grape. *Theor Appl Genet.* 121:789–799.
- İşçi, B. 2006. *Asma (Vitis vinifera L.)’da Genom Haritalaması: Önemli Morfolojik Karakterlere ve Fungal Kökenli Hastalıklara Yönelik AFLP Ve SSR Linkage Gruplarının Oluşturulması*. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Doktora Tezi. 211 s.



- Jabco, J.P., Nesbitt, W.B., Werner, D.J. 1985 Resistance of various classes of grapes to the bunch and muscadine grape forms of black rot. *J Am Soc Hortic Sci.* 110:762–765.
- Katula-Debreceeni, D., Lencsés, A.K., Szokea, A., Veresa, A., Hoffmann, S., Kozma, P., Kovács, L.G., Heszky, L and Kiss, E. 2010. Marker-assisted selection for two dominant powdery mildew resistance genes introgressed into a hybrid grape population. *Scientia Horticulturae*.
- Kesawat, M.S. ve B.K Das, 2009. Molecular Markers: It's Application in Crop Improvement. *J. Crop Sci. Biotech.*, 12 (4),169 -181.
- Khawale, R.A., Yerramilli, V. and Singh, S.K. 2007. Molecular marker-assisted selection of in vitro chemical mutagen-induced grapevine mutants. *Current Science* 92. 1056–1060.
- Kiss, L. 1998. Natural Occurrence of *Ampelomyces* Intracellular Mycoparasites in Mycelia of Powdery Mildew Fungi.. 140. 709-714.
- Kochert, G. 1994. RFLP Technology. In; Phillips. R.L. and Vasil. I. K. (eds). *Kluwer Academic Publishers. USA. DNA-Based Markers in Plants.* p. 8-38.
- Konieczny, A and Ausubel, F.M. 1993. A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers. *Plant J.* 4: 403–410.
- Korbuly, J. 1999. Evaluation of different sources for breeding powdery mildew resistant grapevine varieties. *Horticult. Sci.* 5: 35-40.
- Kozma, Jr. P. 2000. Winegrape Breeding for Fungus Disease Resistance, Proc, of VII. International Symp. on Grapevine Genetics and Breeding. Montpellier. France. *Acta Horticulturae.* Vol 2. No. 528.
- Kozma, Jr. P. 2002. Resistant grape varieties originating from Franco-American hybrids in Hungary. *INT. J. Hort. SCI.* 8; 1 47-50 P.

- Kozma, Jr. P. and Dula, T. 2003. Inheritance of resistance to downy mildew and powdery mildew of hybrid family *Muscadinia* x *V. vinifera* x *V. amurensis* x Franco-American hybrid. Proc. VIIIth Int'l. Congress on Grape. Acta Hort. 603. 457-463.
- Kozma, P., Kiss, E., Hoffmann, S., Galbács, Zs. and Dula, T. 2009. Using the Powdery Mildew Resistant *Muscadinia rotundifolia* and *Vitis vinifera* 'Kishmish vatkana' for Breeding New Cultivars. Acta Hort. 827. Conf on Grape Genetics and Breeding.
- Krivanek, A.F., Famula, T.R., Tenschler, A., Walker, A.R. 2005. Inheritance of resistance to *Xylella fastidiosa* within a *Vitis rupestris* × *Vitis arizonica* population. Theor Appl Genet 111:110–119.
- Kunter, B., 2011. Asma ıslahı ders notları. Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü. Ankara.
- Kunter, B., Değirmenci ve Karataş D. 2011. Asmalarda Mutasyonlar ve Mutant *Vitis Vinifera* L. Çeşitleri. 21(2): 146-151. YYÜ TAR BİL DERG.
- Kurata, N., Umehara, Y., Tanoue, H., Sasaki, T. 1997. Physical mapping of the rice genome with YAC clones. Plant Mol. Biol., 35, 101–113.
- Lahogue, F., This, P and Bouquet, A. 1998. Identification of a Codominant SCAR Marker Linked to The Seedlessness Character in Grapevine. Theor. Appl. Genet. 97; 950-959.
- Larsen, H., and Caspari, H. 2001. Soft control strategies for grape Powdery Mildew (*Uncinula necator*). Colorado State University. Western Colorado Research Center. Grand Junction. CO 81503.
- Lefort, F., Lally, M., Thompson, D. ve 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.

- Lider, L.A. 1954. Inheritance of resistance to a root-knot nematode (*Meloidogyne incognita* var. *acrita* Chitwood) in *Vitis* spp. *Proc Helminthol Soc Wash.* 21:53–60.
- Liu, B.H. 1998. *Statistical genomics: Linkage, mapping, and QTL analysis.* CRC Press LLC. Boca Raton New York.
- Loubser, J. T. 1983. Nematodes as parasites in vineyards and provisional results regarding the susceptibility of rootstocks. *Vitis.* 22 (3); 278 p.
- Luo, S.L., He, P.C., Zhou, P and Zheng, X.Q. 2001. Identification of molecular genetic markers tightly linked to downy mildew resistant genes in grape. Europe PubMed central.
- Maeda, M., Uryu, N., Murayama, N., Ishii, H., Ota, M., Tsuji, K and Inoko, H. 1990. A simple and rapid method for HLA-DP genotyping by digestion of PCR-amplified DNA with allele specific restriction endonucleases. *Hum. Immunol.* 27: 111–121.
- Mahanil, S., Ramming, D., Cadle-Davidson, M., Owens, C., Garris, A., Myles, S and Cadle-Davidson, L. 2012. Development of marker sets useful in the early selection of Ren4 powdery mildew resistance and seedlessness for table and raisin grape breeding. *Theor Appl Genet.* 124: 23–33.
- Mahfud, M. and Sarwono, C. 1987. Tolerance of some grape varieties to Downy Mildew. *Plant Breeding Abstarct.* 59 (7).
- Marguerit, E., Boury, Christophe., Manicki, A, Donnart, Martine., Butterlin, G., Némorin, A., Wiedemann-Merdinoglu, S., Merdinoglu, D., Ollat, N and Decroocq, S. 2009. Genetic dissection of sex determinism, inflorescence morphology and downy mildew resistance in grapevine. *Theor Appl Genet.* 118:1261–1278.

- Marino, R., Sevini, F., Madini, A., Vecchione, A., Perlot, I., Della Serra, A., Versini, G., Velasco, R. and Grando, M.S. 2003. QTL mapping for disease resistance and fruit quality in grape. ISHS VIII International Conference on Grape Genetics and Breeding. *Acta Horticulturae*. 603; 528-533.
- Mauro, M. C., Strefeler, M., Weeden, N.F. and Reisch, B.I. 1992. Genetic analysis of Restriction Fragment Length Polymorphism. *J. of Heredity* 83; 18-21.
- Mayak, S., Tirosh, T and Glick, B.R. 2004b. Plant growth-promoting bacteria that confer resistance to water stress in tomato and pepper. *Plant Sci*. 166: 525–530.
- McDermott, J.M., Brandle, U., Dutly, F., Haemmerli, U.A., Keller, S., Muller, K.E and Wolf, M.S. 1994. Genetic variation in powdery mildew of barley: Development of RAPD, SCAR and VNTR markers. *Phytopathology* 84; 1316-1321.
- McGrew, J.R. 1976. Screening grape seedlings for black rot resistance. *Fruit Varieties J*, 30:31–32.
- McGovern, P.E. 2003. *Ancient Wine: The Search for the Origins of Viniculture*. Princeton. NJ. Princeton University Press.
- Merdinoğlu, D., Wiedeman-Merdinoğlu, S., Coste, P., Dumas, V., Haetty, S., Butterlin, G. and Greif, C. 2003. Genetic Analysis of Downy Mildew Resistance Derived from *Muscadinia rotundifolia*. ISHS Acta: VIII International Conference on Grape Genetics and Breeding. *Horticulturae*. 603; 451-456.
- Meredith, C.P., Lider, L.A., Raski, D.J., Ferrari, N.L. 1982. Inheritance of Tolerance to Xiphinema-Index in *Vitis* Species. *Am J Enol Vitic* 33:154–158.
- Michaels, S.D., Amasino, R.M. 1998. A robust method for detecting single-nucleotide changes as polymorphic markers by PCR. *Plant J*. 14: 381–385.
- Molnar, S., Galbacs, Z., Halasz, G., Hoffman, S., Kiss, E., Kozma, P., Veres, A., Galli, Z., Szöke, A. and Heszky, L. 2007. Marker assisted selection for powdery mildew resistance in a grapevine hybrid family. *Vitis* 46 (4). 212–213.

- Moreira, F.M., Madini, A., Marino, R., Zulini, L., Stefanini, M., Velasco, R., Kozma, P and Grando, M. S. 2011. Genetic linkage maps of two interspecific grape crosses (*Vitis* spp.) used to localize quantitative trait loci for downy mildew resistance. *Tree Genetics & Genomes*. 7: 153–167.
- Morgan, TH. 1911. The application of the conception of pure lines to sex-limited inheritance and to sexual dimorphism. *Am Nat*; 45(530): 65–78.
- Mortenson, J. A. 1968. The inheritance of resistance to Pierce's disease in *Vitis*. *Proc. Am. Soc. Hortic. Sci.* 92: 331-337.
- Mortenson, J.A. 1977. Segregation for resistance to black rot in selfed grape seedlings. *Fruit Varieties. Journal* 31:59–60.
- Mortenson, J.A. 1981. Sources and inheritance of resistance to anthracnose in *Vitis*. *J Hered*, 72:423–426.
- Mullins, M.G., Bouquet, A., Williams, L.E. 1992 *Biology of the grapevine*. Cambridge Univ. Press. New York.
- Naidenova, I. N., Kyaburu, E. A., Sypostat, L. F. and Arabadzhi, V. S. 1987. Immunity characteristics of complex interspecific hybrids of grape. *Plant Breeding Abst.* 57 (11).
- Najafi, J., Alipanah, L., Ghareyazie, B., Mohammadi, S.A., Hagh nazari, A. and This, P. 2006. Genetic diversity of Iranian and some of European grapes revealed by microsatellite markers. *Iranian Journal of Biotechnology*. 4(1). 423-429.
- Nookaraju, A and Agrawal, D.C. 2012. Genetic homogeneity of in vitro raised plants of grapevine cv. Crimson Seedless revealed by ISSR and microsatellite markers. *South African Journal of Botany* 78; 302–306.
- Olmo, H.P. 1951. Investigation in polyploidy of fruits. *Symposium of American Society of Horticultural Science*.

- Olmo, H.P. 1986. The potential role of (*vinifera* × *rotundifolia*) hybrids in grape variety improvement. *Experientia* 42:921–926.
- Oraman, M.N ve Agaoğlu, Y.S. 1970. Ankara’da yetistirilen bazı saraplık üzüm çeşitlerinde morfolojik ayırım ve floral gelişme devreleri ile çiçeklerin açılması ve üzümlerin olgunlaşması arasındaki ilişkiler üzerinde bir araştırma. *Ankara Üniv. Zir. Fak. Yıllığı* 19: 503-519.
- Orita, M., Iwahana, H., Kanazawa, H., Hayashi, K. and Sekiya, T. 1989. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc. Natd. Acad. Sci. USA*.
- Owens, C.L. 2008. Grapes. In: J.F. Hancock (Ed.), *Temperate Fruit Crop Breeding* . Springer, pp. 197–233.
- Önder, M. 1989. *Yurt Dışı Müzelerinde Türk Eserleri*. Gaye Matbaacılık. Ankara.
- Özcan, S., Gurel, E. ve Babaoğlu, M. 2001. *Bitki Biyoteknolojisi (Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları)*. S. Ü. Vakfı Yayınları. 456s.
- Özşensoy, Y., ve Kurar, E. 2013. Markör sistemleri ve genetik karakterizasyon çalışmalarında kullanımları. *Journal of Cell and Molecular Biology* 10(2):11-19.
- Pauquet, L., Bouquet, A., This, P. and Adam-Blondon, A. F. 2001. Establishment of a Local Map of AFLP Markers Around the Powdery Mildew Resistance Gene *Rm1* in Grapevine and Assessment of Their Usefulness for Marker Assisted Selection. *Theor. Appl. Genet.* 103; 1201-1210.
- Pearson, R.C. and Goheen, A.C. 1988. *Compendium of grape diseases*. APS Press. The Amer. Phytopathol. Soc. 3340.93 p.
- Pouget, R. 1980. Breeding grapevine rootstocks for resistance to iron chlorosis, pp. 191–197. In: *Proc. 3rd Intern. Symp. Grape Breeding*, UC Davis.

- Pouget, R. and Ottenwaelter, M. 1986. Recherche de porte-greffes adaptées aux sols acides: une nouvelle variété, le Gravesac. In: Proc. 4th Intern. Symp. Grape Genetics, April 1985, Verona (Italy), Vignevini, 13 (suppl. 12), 134–137.
- Provan, J., Powell, W and Hollingsworth, P.M. 2001. Chloroplast microsatellites: new tools for studies in plant ecology and systematics. *Trends Ecol*, 16, 142–147.
- Rafalski, J. A. and Tingey, S. V. 1993. Genetic Diagnostic in plant breeding: RAPDS. microsatellites and machines. *TIG*. 9. 275-279.
- Ramming, D.W., Gabler, F., Smilanick, J., Cadle-Davidson, M., Barba, P., Mahanil, S., and Cadle-Davidson, L. 2011. A Single Dominant Locus, Ren4, Rapid Non-Race-Specific Resistance to Grapevine Powdery Mildew. PHYTO-09-10-0237.
- Randles, J.W. 2003. Economic impact of viroid diseases. Hadidi, A., Flores, R., Randles, J.W and Semancik, J.S., Eds. Csiro Publishing: Australia Pages 3-15.
- Raski, D.J., Meredith, C.P., Goheen, A.C and Lider, L.A. 1983. Strategies against grapevine fanleaf virus and its nematode vector. University of California Davis. *Plant Disease Journal*.
- Regner, F. und Messner, R. 1993. Molekulare Differenzierung von Rebsorten Mittels RAPD-Analyse. *Mitteilungen Klosterneuburg Rebe und Wein. Obstbau und Fruechte*. 43; 160-164.
- Regner, F., Fradossi, A., Eisenheld, C., Stierschneider, I. and Haas, M. 2003. Genetic analysis of a segregating population derived by a cross of Welschriesling x Sirius. *Proc. VIIIth Int'l. Congress on Grape. Acta Hort*. 603; 141-148.
- Regner, F. 2007. Genetische Analyse der Rebsorte Welschriesling und die Weinbaulichen Konsequenzen. *Deutsches Weinbau Jahrbuch*. 58: 139-145.
- Reisch, B. L., Einset, J. and Pratt, C. Janick. J.. Moore. J. N. 1996. *Grapes. Advances in fruit breeding. Vol II. Vine and small fruites*. Wiley & Sons. Inc. USA.
- Reisch, B. 2001. Map-based Cloning of a Powdery Mildew resistance Locus in Vitis. Report to the American Vineyard Foundation.

- Riaz, S., Dangl, G.S., Edwards, K.J. and Meredith, C.P. 2004. A Microsatellite Marker Based Framework Linkage Map of *Vitis vinifera* L. *Theor. Appl. Genet.* 108: 864-87.
- Riaz, S., Tenschler, A.C., Ramming, D.W., Walker, M.A. 2011. Using a limited mapping strategy to identify major QTLs for resistance to grapevine powdery mildew (*Erysiphe necator*) and their use in marker-assisted breeding. *Theor Appl Genet* 122; 1059–1073.
- Riaz, S., Boursiquot, J. M., Dangl, G. S., Lacombe, T., Laucou, V., Tenschler, A. C and Walker, M. A. 2013. Identification of mildew resistance in wild and cultivated Central Asian grape germplasm. *Plant Biology*, 13:149.
- Roberts, P.A. 2002. Concept and consequences of resistance in plant resistance to parasitic nematodes (e.ds J.L. Starr, R. Cook and J. Bridge). CAB International Pub. UK.
- Rothwell, N.V. 1988. *Understanding Genetics*. Fourth Edition. Oxford University Press. 70p. UK.
- Ruana, J. and Sonnio, A. 2003. Marker-assisted selection – Current status and future perspectives in crops, livestock, forestry and fish. Chapter 1: 4-13.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mulli, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. and Arnheim, N. 1985. Enzymatic Amplification of Beta-globin Genomic Sequences and Restriction site Analysis for Diagnosis of Sickle cell Anemia. *Science*. 230 (4732); 1350–1354.
- Salmaso, M., Faes, G., Segala, C., Stefanini, M., Salakhutdinov, I., Zyprian, E., Toepfer, R., Grando, M.S. and Velasco, R. 2005. Genome diversity and gene haplotypes in the grapevine (*Vitis vinifera* L.). as revealed by single nucleotide polymorphisms. *Molecular Breeding*. 14; 385-395.
- Schwander, F., Eibach, R., Fechter, I., Hausmann, L., Zyprian, E and Topfer, R. 2012. *Rpv10*: a new locus from the Asian *Vitis* gene pool for pyramiding downy mildew resistance loci in grapevine. *Theor Appl Genet* 124:163–176.



- Scott, K.D., Lee, L.S., Dow, T. and Hery, R.J. 2000b. Isolation and Characteristics of new Grape Microsatellites. *Acta Hort.* 528; 199-200.
- Sefc, K.M., Steinkellner, H., Wagner, HW., Glössl, J. and Regner, F. 1997. Application of microsatellite markers to parentage studies in grapevine. *Vitis* 36 (4); 179-183.
- Seifert, K. A., Louis-Seize, G. and Savard, M. E. 1997. The phylogenetic relationships of two trichothecene-producing hyphomycetes. *Spicellum roseum* and *Trichothecium roseum*. *Mycologia*. 88; 250-257.
- Shirasawa, K., Monna, L., Kishitani, S. and Nishio, T. 2004. Single Nucleotide Polymorphisms in randomly selected genes among japonica rice (*Oryza sativa* L.) varieties identified by PCR-RF-SSCP. *DNA Research* 11; 275-283.
- Sivritepe, N. ve Eriş, A. 1998. Bazı asma anaçlarında NaCl uygulamalarının iyon metabolizması üzerine etkileri. *Bahçe* 27 (1-2); 23-33 s.
- Smith, C. and Simpson, S. P. 1986. The use of genetic Polymorphisms in livestock improvement. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 103: 205-217.
- Soller, M. and Beckmann, J. S. 1983. Genetic polymorphism in varietal identification and genetic improvement. *Theoretical and Applied Genetics* 67: 25-33.
- Sönmezoğlu, Ö. A., Yıldırım, A., Eserkaya-Güleç, T., Kandemir, N. 2010. Markör Destekli Seleksiyonun Bugday Islahında Kullanımı. *GOÜ. Ziraat Fakültesi Dergisi*, 27(1), 105-112.
- Söylemezoğlu, G., Ağaoğlu, Y.S., Marasalı, B., Ergül, A., Çalışkan, M. ve Türkben, C. 1998. Üzüm Çeşitlerinin Yaprak Kökenli Katesol Oksidaz (CO). Peroksidaz (PER) ve Esteraz (EST) İzoenzimlerinden Yararlanılarak Tanımlanmaları. IV. Bağ. Semp.. Yalova. 138-144.
- Söylemezoğlu, G. 2002. Development of SCAR's (Sequence Characterized Amplified Regions) to Anchor Genetic Linkage Maps in *Vitis*. *Gıda Dergisi*. 129–136.

- Söylemezoğlu, G., Boz, Y., Özer, C., Çelik, H., Türkoğlu, M. ve Ergül, A. 2005a. İskenderiye Misketi Çeşidinin Ülkemiz Misket Grubu Çeşitleri ile AFLP'ye Dayalı Genetik Benzerlikleri. Türkiye 6. Bağ. Semp., Cilt: 1. Tekirdağ. 252-257.
- Söylemezoğlu, G, Çelik, H., Boz, Y., Özer, C., Çelik, H., Türkoğlu, M. ve Ergül, A. 2005b. Asma Anacı Genetik Benzerliklerinin AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) Tekniği ile Moleküler Düzeyde Belirlenmesi. Türkiye 6. Bağ. Semp.. Cilt: 1. Tekirdağ. 258-265.
- Söylemezoğlu, G., Güneş, A., Çelik, H., İnal, A., Yaşa, Z., Bağcı, E. G. ve Çakır, A. 2010. Amerikan asma anaçlarında bor ve tuz stresine tolerans mekanizmalarının stres ile ilgili fizyolojik parametreler ve antioksidan enzimler ile belirlenmesi. TUBİTAK Proje No: 106 O 061. Ankara 211 s.
- Sperisen, C., Büchler, U., Gugerli, F., Mátyás, G., Geburek, T and Vendramins G. G. 2001. Tandem repeats in plant mitochondrial genomes: application to the analysis of population differentiation in the conifer Norway spruce. *Molecular Ecology*. 10, 257–263.
- Staub, J.E. and Serquen, F.C. 1996. Genetic Markers. Map Construction. and Their Application in Plant Breeding. *Hortscience*. Vol: 31(5): 729-741.
- Stover, L.H. 1960. Progress in the development of grape varieties for Florida. *Proc Fla State HortSoc* 73:320–323.
- Sunnucks, P., Wilson, A.C.C., Beheregaray, L.B., Zenger, K., French, J. and Taylor, A. C. 2000. SSCP is not so difficult: the application and utility of single-stranded conformation polymorphism in evolutionary biology and molecular ecology. *Molecular Ecology*. 9; 1699-1710.
- Szegedi, E., Korbuly, J., Koleda, I. 1984. Crown gall resistance in East-Asian *Vitis* species and in their *V. vinifera* hybrids. *Vitis* 23:21–26.

- 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.
- Thines, M. 2011. Recent outbreaks of downy mildew on grape ivy (*Parthenocissus tricuspidata*. *Vitaceae*) in Germany are caused by a new species of Plasmopara. *Mycol Progress* 10; 415–422.
- Thomas, M.R. and Scott, N.S. 1993. Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analysed as sequence-tagged sites (STSs). *Theor. Appl.*
- Uslu, İ., Samancı, H., Demiray, T. ve Gökçay, E. 1995. Melezleme yoluyla sofralık yeni üzüm çeşitlerinin elde edilmesi. *Bilimsel Araştırma ve İncelemeler Yayın No 56*. Atatürk Bahçe Kültürleri Merkez Araştırma Enstitüsü. Yalova.
- Uzun, H.İ ve Sarıkaya, İ. 1996. Bazı Melez Üzüm Çeşitlerinde ve Ebeveynlerinde İzoenzim Bant Deseni Varyasyonları Üzerinde Çalışmalar. *Ankara Üniv. Zir. Fak. Derg.* 9: 1-9.
- Uzun, İ. 2003. Bağcılık. Akdeniz Üniversitesi, Bahçe Bitkileri Bölümü. Ders notları.
- Vardar-Kanlıtepe, Ç., Aras, S., Cansaran-Duman, D. 2010. Bitki ıslahında moleküler belirteçlerin kullanımı ve gen aktarımı. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 67 (1): 33-43.
- Venuti, Silvia., Copetti, D., Foria, S., Falginella, L., Hoffmann, S., Bellin, D., Cindric, P., Kozma, P., Scalabrin, S., Morgante, M., Testolin, R and Di Gaspero, G. 2013. Historical Introgression of the Downy Mildew Resistance Gene *Rpv12* from the Asian Species *Vitis amurensis* into Grapevine Varieties. [www.plosone.org](http://www.plosone.org). Volume 8. Issue 4. e61228.
- Vouillamoz, J.F., McGovern, P.E., Ergül, 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* 4(2); 144–158.

- Vrain, T.C. 1999. Engineering natural and synthetic resistance for nematode management. *Journal of Nematology*. 31; 424-436.
- Wakana, A., Fukudome, I., Hanada, N., Hiramatsu, M., Sakai, K and Kajiwara, K. 2008, 'Bea-Kei', a new triploid seedless grape cultivar derived from a 'Muscat Bailey A' x 'Kyoho' cross. *Journal of the Faculty of Agriculture*.
- Walker, M.A., Meredith, C.P., Goheen, A.C. 1985. Sources of resistance to grapevine fanleaf *virüs* (GFV) in *Vitis* species. *Vitis* 24:218–228.
- Walker, M.A, Meredith, C.P, 1990. The genetics of resistance to grapevine fanleaf virus in *Vitis vinifera*. In: Alleweldt G (ed) *Proceeding of the 5th International Symposium on Grape Breeding*. St. Martin, Pfalz, Germany, *Vitis* special Issue, pp 228–238.
- Weeden, N.F., Reisch, B.L and Martens, M.E. 1988. Genetic analysis of isozyme polymorphism in grape. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*. 113(5); 765-769.
- Weising, K., Nybom, H., Wolff, K. and Meyer, W. 1995. *DNA fingerprinting in plants and fungi*. CRC Pres. Inc. 322 p.
- Weising, K., Nybom, H., Wolf, K. and Kahl, G. 2005. *DNA Fingerprinting in Plants; Principles. Methods. and Applications*. Second Edition. CRC Press. 444p.
- Welter, L.J., Göktürk- Baydar, N., Akkurt, M., Maul, E., Eibach, R., Töpfer, R and Zyprian, M. E. 2007. Genetic mapping and localization of quantitative trait loci affecting fungal disease resistance and leaf morphology in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Mol Breeding*. 20:359–374.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey. S.V. 1990. DNA Polymorphisms Amplified by Arbitrary Primers are Useful as Genetic Markers. *Nuc. Acids Res.*. 18; 6531-6535.
- Wolfe, W.H. 1976. Identification of grape varieties by isozyme banding patterns. *Amer. J. Enol. Vitic.* 43; 261-265.

- Wu, Z.L., Fang, L.Y., Wang, J. and Shen, Y.J. 2006. Analysis Genetic Diversity of *Vitis* by Using ISSR Markers. *J. Fruit Sci.* 23(4); 605-608.
- Xu, K., Riaz, S., Roncoroni, N. C., Jin, Y and Hu, R. 2008. Genetic and QTL analysis of resistance to *Xiphinema index* in a grapevine cross. *Theor. Appl. Genet.* 116. 305–311.
- Xu, H. and Bakalinsky, A.T. 1996. Identification of grape (*Vitis*) rootstocks using sequence characterized amplified region DNA markers. *HortScience* 31 (2); 267-268.
- Yamada, M. and Higashihiroshima, H., Yamane, H., Sato, A., Hirakawa, N., Iwanami, H., Yoshinaga, K., Ozawa, T., Mitani, N., Shiraishi, M., Yoshioka, M., Nakajima, I., Nakano, M. and Nakaune, R. 2008. New grape cultivar Shine Muscat. *Bulletin of the National Institute of Fruit Tree Science.* 7. 21-38 p.
- Yaşar, Z. 2005. *Asma (Vitis vinifera L.)’da Önemli Vegetatif ve Generatif Karakterler ile Hastalıklara Dayanım Özelliklerine Yönelik Genom Haritalaması.* Ankara üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı. Doktora Tezi. 123 s.
- Ye, G.N., Lodhi, M.A., Weeden, N.F. and Reisch, B.I. 1995. A RAPD Linkage Map for Grape and Identification of Major QTL for Powdery Mildew Resistance. BARD Project. Final BARD Report. US 1888-90. pp 54-67.
- Yıldırım, A. and Kandemir, N., Özcan, S., Gürel, E. ve Babaoğlu, M. 2001. Genetik Markörler ve Analiz Metodları Bitki Biyoteknolojisi Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları. Selçuk Üniversitesi Basım evi. Konya. s;334–336.
- Young, N.D. 1996. QTL Mapping and quantitative disease resistance in plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43: 479-501.
- Zah-Bi, C.I., Canaguier, A., Choisne, N., Le Clainche, I., Bras, M., Couturat, L., Dry, I., Gouyvenoux, M., Poulain, J and Adam-Blondon, A-F. 2014. Development of genomic resources for *Muscadinia rotundifolia* in order to assist comparative mapping with *Vitis vinifera*. (unpublish article).

- Zhaobin Jinga, B and Xiping Wanga, B. 2013. Genetic relationship between Chinese wild *Vitis* species and American and European Cultivars based on ISSR markers *Biochemical Systematics and Ecology* 46: 120–126.
- Zohary, D. and Hopf, M. 2000, *Domestication of Plants in the Old World*. New York: Oxford University Press.
- Zyprian, E., 1997. IV. Function of genetic material molecular biology of environmentally stressed plants. *Progress in Botany*. 58: 369–385.
- Zyprian, E., Eibach, R. and Töpfer, R. 2003. Comparative Molecular Mapping of Fungal Disease Resistance and Agronomic Traits in Segregating Populations of Grapevine. *Plant and Animal Genome XI Conference Abst.* San Diego. CA. ABD.
- Zyprian, E., Eibach, R., Akkurt, M. and Töpfer, R. 2005. Genetic mapping of SSR Markers in grapevine for the analysis of disease resistance and flavor compounds. *Plant and Animal Genome XIII Conference Abst.* San Diego. CA. ABD.

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Mina Shidfar

Doğum Yeri : Urmia, İran

Doğum Yılı : 1981

Medeni Hali : Bekâr

Yabancı Dil : İngilizce, Farsça, Türkçe, Azerice

### Eğitim ve Akademik Durumu:

Lise : Urmia. İran (1999)

Lisans : Orumiyeh Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri bölümü, İran (2003).

Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi. Bahçe Bitkileri bölümü Türkiye (02/2006-08/2008).

### Çalıştığı Kurum ve Yıl :-

#### Yayımları (SCI)

1. M., Akkurt. A., Çakır. **M.**, **Shidfar**, F., Mutaf. G., Söylemezoğlu. (2013). Using Seedlessness-related Molecular Markers in Grapevine Breeding for Seedlessness via Marker- Assisted Selection (MAS) into ‘Muscat of Hamburg’ × ‘Sultani’ Progeny. Turk J Biol 37: TÜBİTAK doi:10. 3906/biy-1206-31 (**Turkish Journal of Biology**). The Turkish Journal of Biology is included in the Science Citation Index Expanded (SCI-E) (2012 Impact Factor: 0.914).
2. M., Akkurt. A., Çakır. **M.**, **Shidfar**, B.P., Çelikkol and G., Söylemezoğlu. (2012). Using SCC8. SCF27 and VMC7f2 markers in grapevine breeding for seedlessness via marker assisted selection. GMR ISSN: 1676-5680 DOI: (**Journal of Genetics and Molecular Research**. Impact factor1.18).

3. K., Afshar Pour Rezaeieh, **M., Shidfar**, B., Gürbüz and K. M., Khavar. (2012)  
Genomic DNA extraction from seed induced callus and explants in *Salvia L.*  
species for utilization in secondary metabolite production pp. 636 – 640 DOI:  
10.5897/JMPR11.1382 (**Journal of medicinal plants**).

### **Hakemli Dergiler**

1. M., Akkurt, N., Keskin, **M., Shidfar**, A., Çakır. (2013). Effects of Some Treatments  
Prior to Stratification on Germination in Kalecik Karası (*Vitis vinifera L.*)  
Seeds. Iğdır University Journal of the Institute of Science and Technology.  
ISSN 2146-0574.
2. A., Çakır, N., Karaca, **M., Shidfar**, Ç., Baral, G., Söylemezoğlu. (2013). Sultani  
Çekirdeksiz Üzüm Çeşidinin Farklı Amerikan Asma Anaçları ile Aşı Tutma  
Oranının Belirlenmesi. YYÜ TAR BİL DERG (YYU J AGR SCI), 23(3): 229-  
235.

### **Uluslararası Kongre Sunum**

1. **M., Shidfar**, G., Söylemezoğlu, A., Ergül (2009). Determination of Genetic Diversity  
of Some Turkish Grapevines by SSRs Markers. (6th International Congress of  
Horticulture Science (Rasht- Iran).
2. H., Doulati Baneh, Gh., Hassani and **M. Shidfar** (2009). 6th International Congress  
of Horticulture Science, Iran. Study of synonym and parent-progeny relations  
among Iranian grape cultivars using SSR markers (Gilan- Iran).
3. A.M., Daneshian, B., Gürbüz, A., Ahmadzadeh and **M. Shidfar** (2007). The situation  
and Application of Plant Color in Natural Dyeing Factories in Tabriz City of  
Iran. I. International Medicinal and Aromatic Plants Conference on Culinary  
Herbs (Antalya- Turkey).



4. **M., Shidfar, K.**, Afshar Pour Rezaeieh (2012). Imperceptible Death of Urmia Lake: Ecological, Biological and Urban Consequences. VIII. International Soil Science Congress.( Izmir- Turkey). Poster.
5. **M., Shidfar, K.**, Afshar Pour Rezaeieh (2012). Combating Desertification Of Great Loot Desert, Central Iran. VIII. International Soil Science Congress ( Izmir-Turkey), Poster.
6. K., Afshar Pour Rezaeieh, **M., Shidfar, A.**, Eivazi, H., Ranji (2012). Evaluation of the Purification Capacity of Some Main Iranian Rivers Based on BOD: A Brief Review. VIII. International Soil Science Congress ( Izmir- Turkey). Poster.
7. K., Afshar Pour Rezaeieh, **M., Shidfar, A.M.**, Daneshian (2012). Persian Gulf Mangrove Ecosystem: Opportunities and Threats. VIII. International Soil Science Congress ( Izmir- Turkey). Poster.
8. M., Akkurt, **M., Shidfar, A.**, Çakır, A., Ergül, G., Söylemezoğlu (2010). Use of Molecular Markers for Seedlessness in Grapevine Breeding. 10<sup>th</sup> International Conference on Grapevine Breeding and Genetics (Geneva- New York. USA). Poster.
9. M., Akkurt, A., Çakır, **M., Shidfar, A.**, Ergül, G., Söylemezoğlu (2010). Effects of Gibberellic Acid (GA3), Benzilaminopurin (BAP) and Stratification Time on Germination of KalecikKarasi (*Vitis Vinifera* L.) Seeds. 28<sup>th</sup> International Horticultural Congress IHC (Lisboa- Portugal). Poster.
10. F., Sheedfar, **M., Shidfar, H.**, Farajpoor, M., Maham (2006). Experimental Consolidia Orientalis Poisoning in Mice. 6th IC-TST International Congress of Turkish Society of Toxicology (Antalya- TURKEY).

## Ulusal Kongre Sunum

1. Z, Kara, G., Söylemezoğlu, A., Çakir, A., Sabir, **M. Shidfar**. (2011). Effects of Mycorrhizal (Biovam) Treatments on Production of Grafted Grapevines. VI. National Horticulture Congress (Sanliurfa- Turkey).
2. **M., Shidfar**, K., Afshar Pour Rezaeieh, B., Gürbüz. Kh. M., Khavar (2010). Genomic DNA Extraction From Seed Induced Callus and Explants in *Salvia* L. Species for Utilization in Secondary Metabolite Production.1. National Molecular Biology and Biotechnology Congress. (Antalya-Turkey).
3. K., Afshar Pour Rezaeieh, **M., Shidfar**, B., Gürbüz, Kh. M., Khavar (2010). A Preliminary Investigation of *In-Vitro* Based DNA Extraction of *Salvia* L. (Labiatae) Species 1. National Molecular Biology and Biotechnology Congress. (Antalya-Turkey).
4. **M., Shidfar**, K., Afshar Pour Rezaeieh, H., Dolatiye Baneh. (2012). Morpho-Phenological Characteristics of *Syzygium Cumini* L. (a berry fruit) tree that Grow in the Southern Region of Iran. IV. National Berry fruits Symposium (Antalya- Turkey). Poster.
5. K., Afshar Pour Rezaeieh, **M., Shidfar**, E., Khadem Arabbaghi. (2012). Introducing a Common Types of *Berberis vulgaris* L. of Iran and it's Economic Importance IV. National Berry fruits Symposium (Antalya- Turkey). Poster.
6. K., Afshar Pour Rezaeieh, E., Khadem Arabbaghi, E., Derelli, **M., Shidfar** (2012). Seed Priming Techniques for Medicinal Plants. Medicinal and Aromatic Plants Symposium (Tokat- Turkey). Poster.
7. A., Çakir, **M., Shidfar**, Ç., Baral, N., Karaca, G. Söylemezoğlu (2011). Determination of Grafting Compatibility Ratio Between Sultana seedless grape varieties with different American Rootstocks. VI. National Horticulture Congress (Sanliurfa- Turkey). Poster.

8. K., Afshar Pour Rezaeieh, B., Gurbuz, **M.**, **Shidfar**, A. M., Daneshian, (2011). Medicinal and aromatic plants biodiversity of Turkey: Overview and background. 1St. Iranian Congress of Herbal Drugs, (Shahrekord-Iran) Poster.