

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI**

**FARKLI KAYISI GENOMLARINI (HACİHALİLOĞLU,
STARK EARLY ORANGE, ZARD, ORDUBATBENZERİ)
KARŞILAŞTIRARAK POLİMORFİK SSR VE SNP
LOKUSLARIN TESPİT EDİLMESİ**

**Hazırlayan
Necati ÇETİNSAĞ**

**Danışman
Doç. Dr. Kahraman GÜRCAN**

Yüksek Lisans Tezi

**Haziran 2019
KAYSERİ**

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI**

**FARKLI KAYISI GENOMLARINI (HACİHALİLOĞLU,
STARK EARLY ORANGE, ZARD, ORDUBATBENZERİ)
KARŞILAŞTIRARAK POLİMORFİK SSR VE SNP
LOKUSLARIN TESPİT EDİLMESİ
(Yüksek Lisans Tezi)**

**Hazırlayan
Necati ÇETİNSAĞ**

**Danışman
Doç. Dr. Kahraman GÜRCAN**

**Bu çalışma, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu
(TUBİTAK) tarafından 214 0 400 kodlu proje ve Erciyes Üniversitesi
Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından FYL-2018-8350 kodlu
proje ile desteklenmiştir.**

**Haziran 2019
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Necati ÇETİNSAĞ



“Farklı Kayısı Genomlarını (Hacıhaliloğlu, Stark Early Orange, Zard, Ordubatbenzeri) Karşılaştırarak Polimorfik SSR ve SNP Lokusların Tespit Edilmesi” adlı Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Hazırlayan

Necati ÇETİNSAĞ

Danışman

Doç Dr. Kahraman GÜRCAN

Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü ABD Başkanı

Prof. Dr. Mehmet ARSLAN

Doç. Dr. Kahraman GÜRCAN danışmanlığında Necati ÇETİNSAĞ tarafından hazırlanan “Farklı Kayısı Genomlarını (Hacıhaliloğlu, Stark Early Orange, Zard, Ordubatbenzeri) Karşılaştırarak Polimorfik SSR ve SNP Lokusların Tespit Edilmesi” adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

20/07/2019

JÜRİ:

Danışman : Doç. Dr. Kahraman GÜRCAN

Üye : Prof. Dr. Mehmet ARSLAN

Üye : Prof. Dr. Salih KAFKAS

(Handwritten signatures of the jury members)

ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun 20.08.2019 tarih ve 2019/42-18 sayılı kararı ile onaylanmıştır.



Prof. Dr. Mehmet AKKURT

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Bana çalışmalarım süresince her türlü yardımı ve fedakârlığı sağlayan, bu süreç içerisinde her konuda desteğini veren ve ilgilerini eksik etmeyen, bilgilerinden faydalanabildiğim, değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Kahraman GÜRCAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışmasına maddi destek veren Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu'na (Proje No: 214 O 400) ve Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne (Proje No: FLY-2018-8350) teşekkür ederim.

Tüm yaşamım boyunca maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen, iyi ve kötü günlerimde her daim yanımda olan, hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan anneme, babama, ablama çok teşekkür ederim. Ayrıca her konuda destekçim olan arkadaşlarım Muhammed Ali KÖSE ve Onur CANBULATA'a çok teşekkür ederim.

Necati ÇETİNSAĞ

Haziran 2019, KAYSERİ

FARKLI KAYISI GENOMLARINI (HACIHALILOĞLU, STARK EARLY ORANGE, ZARD, ORDUBATBENZERİ) KARŞILAŞTIRARAK POLİMORFİK SSR VE SNP LOKUSLARIN TESPİT EDİLMESİ

Necati ÇETİNSAĞ

**Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü
Yüksek Lisans Tezi, Haziran 2019
Danışman: Doç. Dr. Kahraman GÜRCAN**

ÖZET

Kayısı (*Prunus armeniaca*), dünya çapında önemli bir meyve türüdür. Şarka olarak da bilinen, *Plum pox virus* (PPV) kayısında verim kaybına neden olan önemli bir viral hastalıktır. Bu tez çalışmasında PPV'ye dayanıklı ve hassas 4 kayısı çeşidinde (Hacıhaliloğlu, Ordubatbenzeri, Stark Early Orange (SEO), Zard) PPV dayanıklılık lokusu (*PPVres*) nükleotid (nt) dizisinin yüksek kapasiteli dizileme sistemleri ile belirlenmesi ve bu lokus üzerinde bulunan polimorfik bölgelerin keşfedilmesi hedeflenmiştir. DNA dizilmesi Illumina High Seq 2000 sistemi ile gerçekleştirilmiştir. Ham veriler temizlenip ve filtreledikten sonra SEO, Ordubatbenzeri, Zard çeşitleri için sırasıyla 94.975.040, 116.835.356, 113.792.588 okuma elde edilmiştir. Üç çeşidin okumaları, Şeftali ve Hacıhaliloğlu genomunda 1. kromozom üzerindeki 8400000-8700000. nükleotidler (nt) arasındaki 300 bin nt uzunluğundaki parçaya eşleştirilerek, üç çeşit için *PPVres* lokusu elde edilmiştir. Üç çeşidin 300.000 nt uzunluğundaki *PPVres* lokusu, Hacıhaliloğlu *PPVres* lokusu ile karşılaştırıldığında keşfedilen varyasyon/SNP sayısı SEO'da 26.155, Ordubatbenzeri'nde 25.891, Zard çeşidinde ise 25.516 olarak bulunmuştur. Ayrıca 103 adet (-di, -tri, -tetra) SSR lokusu tespit edilmiş ve 58 tanesinin polimorfik olduğu tespit edilmiştir. Tespit edilen bu varyasyonlar *PPVres* lokusunda yer alan PPV dayanıklılık gen veya genlerinin keşfedilmesinde, markör destekli seleksiyon (MAS) çalışmalarında kullanılacak markörler geliştirilebilecektir.

Anahtar Kelimeler: Yüksek kapasiteli dizileme (HTS), Şarka, Tek Nükleotid polimorfizmi (SNP), Basit Tekrarlı Diziler (SSR)

**DETERMINATION OF POLYMORPHIC SSR AND SNP LOCATIONS BY
COMPARING DIFFERENT APRICOT GENOMES (HACİHALİLOĞLU,
STARK EARLY ORANGE, ZARD, ORDUBATBENZERİ)**

Necati ÇETİNSAĞ

Erciyes University, Graduate School of Natural and Applied Sciences

Master Thesis, June 2019

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Kahraman GÜRCAN

ABSTRACT

Apricot (*Prunus armeniaca*) is an important fruit species worldwide. *Plum pox virus* (PPV), also known as Sharka, is an important viral disease that causes loss of yield in apricot. In this thesis, we aimed to obtain the nucleotide (nt) sequence of PPV resistance loci (*PPVres*) using high capacity sequencing systems and to explore the polymorphic areas on this loci, in four apricot accessions (Hacıhaliloğlu, Ordubatbenzeri, Stark Early Orange (SEO), Zard). DNA sequencing was conducted with Illumina High Seq 2000 system. After the raw data was cleaned and filtered, 94.975.040, 116.835.356, 113.792.588 reads were obtained for SEO, Ordubatbenzeri and Zard species, respectively. The *PPVres* loci for the three varieties were obtained by aligning the reads to the 300,000 nt long fragment between 8400000 and 8700000th nucleotides (nt) on the first chromosome in the peach and Hacıhaliloğlu genome. Comparison the 300,000 nt long *PPVres* loci to Hacıhaliloğlu *PPVres* revealed 26.155 indels/SNPs for SEO, 25.891 in Ordubatbenzeri, 25.516 in Zard. In addition, 103 SSR loci (-di, -tri, -tetra) were identified and out of the total, 58 were polymorphic. The polymorphic sites will be used in the discovery of the PPV resistance gene(s) located in the *PPVres* loci and in the development of markers that can be used in marker assisted selection (MAS) studies.

Key Words: High-Throughput Sequencing - HTS, Sharka, Single Nucleotide Polimorphism (SNP), Simple Sequence Repeats (SSR)

İÇİNDEKİLER

YÖNERGEYE UYGUNLUK.....	i
YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI.....	ii
ONAY:.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
KISALTMALAR ve SİMGELER.....	x
TABLolar LİSTESİ.....	xii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xiii
GİRİŞ.....	1

1.BÖLÜM

GENEL BİLGİLER VE LİTERATÜR ÖZETİ

1.1.Kayıısı Hakkında Genel Bilgiler.....	5
1.1.1.Kayıısı Türleri.....	6
1.1.2.Kayıısı Üretimi.....	7
1.2.Kayıısıda Hastalık Etmeni Olan <i>Plum pox virüsü</i>.....	9
1.3.Kayıısı'da Şarka Dayanıklılık Testi ve İslah Çalışmaları.....	10
1.4.Moleküler Markörler.....	14
1.4.1.Moleküler Markör Tipleri.....	14
1.5.SNP VE SSR.....	15
1.6.Mutaston Tipleri.....	15
1.7.Yüksek kapasiteli dizileme (High-Throughput Sequencing - HTS).....	16
1.7.1.Genomu Dizilenenen Bitkiler.....	16

2.BÖLÜM

YÖNTEM VE MATERTAL

2.1.Bitkisel Materyal.....	27
2.1.1.Çalışmada Kullanılan Kayısı Çeşitleri Hakkında Bilgiler	27
2.2.Örneklerden CTAB Yöntemi ile DNA İzolasyonu.....	28
2.3.DNA Konsantrasyonunun Belirlenmesi	29
2.4.Qubit Analizi	29
2.5.Yüksek kapasiteli DNA dizileme (High-Throughput Sequencing - HTS).....	29
2.5.1.HTS Verilerinin Geneious Programına Aktarılması.....	31
2.5.2.HTS Verilerinin Geneious Programında Birleştirilmesi İşlemi	31
2.5.3.HTS Verilerinin Geneious Programında Filtrelenmesi ve Temizlenmesi	31
2.5.4.Yeni SSR Ve SNP Lokuslarının Keşfedilmesi.....	32

3.BÖLÜM

BULGULAR

3.1.Bitkisel Materyal.....	34
3.2.DNA Kalitesi ve Saflığı Belirlenmesi	34
3.3.Yüksek kapasiteli dizileme (High-Throughput Sequencing - HTS) Sonuçları .	35
3.3.1.HTS Verilerinin Birleştirilmesi Sonuçları	35
3.3.2.HTS Sonrası Örneklerin Filtreleme, Temizleme İşlemi Sonuçları PPVres lokuslarının elde edilmesi.....	36
3.3.3.SSR lokusları.....	37
3.3.4.Önceki Çalışmalarda rapor edilen <i>PPVres</i> lokusu markörlerinin 4 Kayısı Çeşidinde Tespit edilmesi.....	40
3.3.5. 3 Kayısı Çeşidinin <i>PPVres</i> Lokuslarında Tespit Edilen SNP/İndel Varyasyonları	50

4.BÖLÜM

4.1.TARTIŞMA-SONUÇ ve ÖNERİLER.....	53
KAYNAKÇA.....	56
ÖZGEÇMİŞ.....	67



KISALTMALAR ve SİMGELER

ABD:	Amerika Birleşik Devletleri
bç:	Baz Çifti
nt:	Nükleotid
BG:	Bağlantı Grubu
PPV:	<i>Plum pox virüsü</i>
SSR:	Basit Tekrarlı Diziler
SNP:	Tek Nükleotid Polimorfizmi
HRM:	Yüksek Çözünürlüklü Erime
SSLP:	Tek Bir Dizi Uzunluk Polimorfizmi
HTS:	Yüksek kapasiteli dizileme (High-Throughput Sequencing - HTS)
GBS:	Genotyping-By-Sequencing
MAS:	Moleküler Destekli Seçim
QTL:	Kantitatif Karakter Lokus
RAPD:	Random Amplified Polymorphic DNA
RFLP:	Sınırlı Parça Uzunlukları Polimorfizmi
AFLP:	Çoğaltılmış Parça Uzunluğu Polimorfizmi
ISSR:	Basit Tekrarlı Diziler Arası Polimorfizm
CTAB:	Setil Trimetil Amonyum Bromit
°C:	Santigrat Derece
dNTP:	Deoksiribonükleozit Trifosfat
DNA:	Deoksiribonükleik Asit
EDTA:	Etilendiamin Tetraasetikasit
HCl:	Hidroklorik Asit
g:	Gram
KCl:	Potasyum Klorür
MgCl ₂ :	Magnezyum Klorür
ml:	Mililitre
M:	Molar
mM:	Milimolar
µl:	Mikrolitre
ng:	Nanogram
NaCl:	Sodyum Klorür

PZR:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PVP:	Polivinilpirolidon
Rpm:	Dakikadaki Dönüş Sayısı
<i>Taq</i> :	<i>Thermus aquaticus</i>
Tris-HCl:	Tris Hidroklorür
%:	Yüzde



TABLolar LİSTESİ

Tablo 1. Ekonomik olarak önemli Prunus cinsi meyve türlerinde ülkelerin üretim değerleri (FAO, 2017).....	1
Tablo 1.1. 2017 yılında en çok yaş kayısı üretimi yapan ülkeler	8
Tablo 1.2. 2016 yılında en çok kuru kayısı üretimi yapan ülkeler	9
Tablo 1.3. Ülkelerde PPV durumu	10
Tablo 3.1. SEO, Ordubatbenzeri, Zard çeşitlerinin ileri ve geri okuma Verileri	35
Tablo 3.2. Birleştirme İşlemi sonucunda Elde edilen okumaların Verileri.....	36
Tablo 3.3. Geneious programı ile filtreleme ve temizleme işlemi sayısal verileri.....	37
Tablo 3.4. Keşfedilen Yeni SSR Lokusları.	38
Tablo 3.5. Kayısı Genotiplerinde Belirlenen Varyasyonların Sayısal Değerleri	51

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Kayısı Üretiminin 2017 yılı FAO verilerine göre küresel dağılımı	3
Şekil 1.1. 2000 - 2017 Yılları Arası FOA verilerine göre Türkiye’de Kayısı Üretim / Verim Miktarı	8
Şekil 2.1. Yüksek kapasiteli DNA dizileme (High-Throughput Sequencing – HTS) İşlemi.....	30
Şekil 2.2. Verileri birleştirme, filtreleme ve temizleme işlemi basamakları.....	31
Şekil 2.3. <i>PPVres</i> Bölgesi üzerindeki PGS1.21, PGS1.24, PGS1.21_SNP, PGS1.24_SNP, ZP002_SNP, ZP002_DEL & ZP002 lokusları	32
Şekil 3.1. DNA jel görüntüsü	34
Şekil 3.2. DNA konsantrasyonu	35
Şekil 3.4. Ordubatbenzeri dizisinde bulunan PGS.1.21_SNP lokusu.....	42
Şekil 3.5. Zard dizisinde bulunan PGS.1.21_SNP lokusu.	43
Şekil 3.6. SEO dizisinde bulunan ZP002_SNP lokusu.....	44
Şekil 3.7. Ordubatbenzeri dizisinde bulunan ZP002_SNP lokusu	45
Şekil 3.8. Zard dizisinde bulunan ZP002_SNP lokusu.....	46
Şekil 3.10. Ordubatbenzeri dizisinde bulunan ZP002_DEL lokusu.....	48
Şekil 3.11. Zard dizisinde bulunan ZP002_DEL lokusu	49
Şekil 3.15. Üç Kayısının Varyasyonlarının Sayısal ve Yüzdelerik verileri.....	52

GİRİŞ

Ülkemizin jeopolitik konumu ve farklı ekolojik koşullara sahip olması bir çok meyve türünün yetiştirilmesine imkan kılmıştır. Başta kayısı olmak üzere, badem, şeftali, nektarin, fındık, incir, antepfıstığı, kiraz, vişne, erik gibi meyvelerin yetiştiriciliğinde dünyada önemli konumdadır [1]. Türkiye, bazı meyvelerdeki yüksek üretim miktarı ile ilk on içerisinde yer almaktadır (Tablo 1).

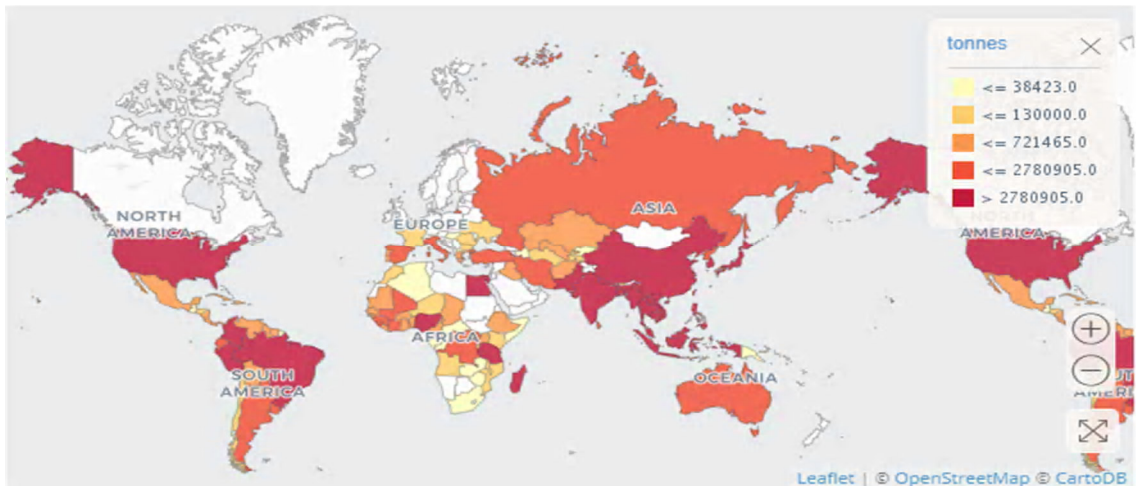
Tablo 1. Ekonomik olarak önemli Prunus cinsi meyve türlerinde ülkelerin üretim değerleri (FAO, 2017) [2]

Kayısı		Kiraz - Vişne		Badem	
Ülkeler	Üretim(ton)	Ülkeler	Üretim(ton)	Ülkeler	Üretim(ton)
Türkiye	985.000	Türkiye	672.132	ABD	1.029.655
Özbekistan	532.565	ABD	398.140	İspanya	255.503
İtalya	266.372	İran	140.081	İran	111.845
Cezayir	256.890	Özbekistan	136.609	Türkiye	90.000
İran	239.712	Şili	126.642	İtalya	79.599
Pakistan	178.957	İtalya	118.259	Avustralya	75.373
İspanya	162.872	İspanya	114.433	Tunus	67.000
Fransa	148.500	Yunanistan	89.600	Cezayir	61.943
Afganistan	131.816	Ukrayna	70.860	Çin	47.875
Yunanistan	106.600	Romanya	55.490	Libya	34.404

Şeftali - Nektarin		Erik	
Ülkeler	Üretim (ton)	Ülkeler	Üretim (ton)
Çin	14.294.973	Çin	6.804.399
İspanya	1.799.685	Romanya	434.390
İtalya	1.250.721	ABD	423.200
ABD	775.189	Sırbistan	330.582
Türkiye	771.459	İran	298.893
İran	422.365	Türkiye	297.589
Mısır	360.723	Şili	290.175
Şili	332.824	Hindistan	269.467
Kore	295.281	İtalya	206.966
Hindistan	289.866	Fransa	205.031

Ülkemizde üretimi yapılan meyve türleri arasında kayısı önemli bir türdür. Türkiye, kayısının anavatanı olmamasına rağmen Anadolu'nun çoğu bölgesinde yetiştiriciliği yapılmaktadır. Kayısının anavatanı, Vavilov (1934) çalışmasına kadar Ermenistan olarak kabul edilmiş, bu nedenle *Prunus armeniaca* olarak adlandırılmıştır. Fakat daha sonraki yapılan çalışmalar ışığında kayısının anavatanının Orta Asya, Çin ve Sibirya olduğu anlaşılmıştır [3, 4].

FAO (2017) verilerine göre, 2017 yılında toplam 4.257.241 ton taze kayısı üretilmektedir. Türkiye 985.000 tonla kayısı üretiminde 1. sırada yer almaktadır. Ülkemiz erkenci sofralık kayısı üretiminde, kuru kayısı üretiminde ve ihracatında ilk sırada yer almaktadır. Ülkemizden her yıl yaklaşık 90 ülkeye (Rusya, ABD, İngiltere, Almanya vd.) kuru kayısı ihracatı yapılmakta, kayısı yetiştiriciliğinden önemli miktarlarda gelirler elde edilmektedir.



Şekil 1. Kayısı Üretiminin 2017 yılı FAO verilerine göre küresel dağılımı [2]

Kayısıda, önemli problemlerden birisi *Plum pox virüsü* (PPV) hastalığıdır. Şarka olarak da bilinen viral hastalık başta kayısı (*Prunus armeniaca*) olmak üzere, şeftali (*Prunus persica*), erik (*Prunus domestica* ve *Prunus salicina*), vişne (*Prunus cerasus*), kiraz (*Prunus avium*) gibi sert çekirdekli meyvelerde, verim kaybına neden olmaktadır. Hastalık ile enfekte olmuş ağaçta meyve şeklinde bozukluk, yumuşama, erken olgunlaşma görülmektedir. Hastalık bir defa yayıldıktan sonra virüs kontrolü mümkün olmadığından virüse dayanıklı çeşit geliştirme ıslahçıların temel hedefi olmuştur. Yıllarca süren çabalara rağmen, Avrupa kayısılarında dayanıklılık kaynağı tespit edilememiştir [5]. Ancak Kuzey Amerika’da, Stark Early Orange (SEO), Goldrich, Harlayne ve Stella çeşitlerinin PPV’ye dayanıklı olduğu tespit edilmiştir. Bu çeşitler Avrupa ıslah programlarında Şarka ’ya dayanıklı ebeveynler olarak kullanılmaktadır. Türkiye de ise Elibüyük ve Erdiller (1995), 7 kayısı çeşidini çalışmış ve dayanıksız olduklarını belirtmiştir [6]. Çağlayan ve arkadaşları (2004) Sakit-2 ve 11/89 tipleri kayısı çeşidi ile 7 erik çeşidini çalışmış ve Şarka hastalığına dayanıksız olduklarını belirlemişlerdir [7]. Gürcan ve arkadaşları (2015, 2019) Türkiye germplasmında bulunan 200’ün üzerinde kayısı ile çalışmış, 5 adet dayanıklı kayısı çeşidi belirlemiş, geriye kalan çeşit ve tiplerin Şarka’ya dayanıksız olduğunu rapor etmiştir [8, 9]. Bir başka çalışmada Şarka ’ya dayanıklılık için Türkiye’nin önemli kurutmalık kayısı çeşitlerini, Kuzey Amerika’nın hastalığa dayanıklı çeşitleri ile çaprazlayarak 225 kombinasyonda toplam 6.750 melez kayısı bitkileri elde etmişlerdir. Yaklaşık 2.900 bitkide de fenolojik, pomolojik ve verim analizlerine devam edildiğini

bildirilmiştir [10, 11]. Ulubaş Serçe ve arkadaşları (2013) bu melez popülasyonlarının bazılarını SEO/Harlayne dayanıklılık lokusu ile bağlantılı 2 markör ile taramış ve 62 melez bitkinin SEO/Harlayne dayanıklılık lokusuyla bağlantılı markörleri taşıdığını belirlemişlerdir [12]. Adana’da SEO/Harlayne tipi dayanıklı çeşitler kullanılarak yapılan melezlemelerde dayanıklı çeşit geliştirmeye çalışılmıştır [13].

Kayıda Şarka dayanıklılığın genetik kontrolü birçok çalışmanın konusu olmuş ancak net bir şekilde çözülememiştir. Yapılan çalışmalarla dayanıklılığın, tek bir lokustan veya birkaç lokustan kaynaklanıyor olabileceği bildirilmiştir [14]. Bağlantı Grubu 1’in (BG1) üst kısmında yer alan ve *PPVres* adı verilen büyük bir lokusun Şarka dayanıklılığının %70’inden sorumlu olduğu rapor edilmiştir [15]. Zuriaga ve arkadaşları (2013) yaptıkları çalışmada *PPVres* lokusunu, 196 kb’lik bir bölgeye kadar indirmiştir [16]. Soriano ve arkadaşları (2012) çalışmalarında Moleküler Destekli Seçimde (MAS) kullanılmak üzere *PPVres* ile ilişkili üç basit dizi tekrarı (SSR) (PGS 1.21, 1.23 ve 1.24) markörünü geliştirmiştir [17]. Decroocq ve arkadaşları (2014) daraltılan 196 kb’lik bölgede, 5 bç’lik bir delesyonun dayanıklılık ile ilişkili olduğunu rapor etmiş ve bu 5 bç delesyonu belirlemek için ZP002 adlı tek dizi uzunluk polimorfizmi (SSLP) markörünü geliştirmiştir [18]. Passaro ve arkadaşları (2017) çalışmalarında, PGS 1.21, ZP002 ve PGS 1.24 markörleri için yüksek çözünürlüklü erime (HRM) analizini rapor etmiştir [19].

Bu tez çalışmasında PPV’ye dayanıklı ve hassas 4 kayısı çeşidi (Hacıhaliloğlu, Ordubatbenzeri, Stark Early Orange (SEO), Zard) ile çalışılmıştır. SEO ve Zard, Şarka’ya dayanıklı, Hacıhaliloğlu ve Ordubatbenzeri Şarka’ya hassas çeşitlerdir. Bu çeşitlerin tüm genom DNA dizileri üretilmiş ve biyoinformatik analizlere tabi tutulmuştur. Ardından üç çeşidin okumaları, Şeftali ve Hacıhaliloğlu genomunun 1. kromozom üzerindeki 8400000-8700000. nükleotidler (nt) arasındaki 300 bin nt uzunluğundaki parçaya eşleştirilerek, üç çeşit için ayrı ayrı *PPVres* lokusları elde edilmiştir. Üç çeşidin 300.000 nt uzunluğundaki *PPVres* lokusu, Hacıhaliloğlu *PPVres* lokusu ile karşılaştırılmış ve çok sayıda yeni SSR ve SNP lokusları keşfedilmiştir.

1.BÖLÜM

GENEL BİLGİLER VE LİTERATÜR ÖZETİ

1.1. Kayısı Hakkında Genel Bilgiler

Prunus ailesinde temel kromozom sayısı $x=8$ 'dir. Badem [*P. dulcis* D.A. Webb (önceki ismi: *P. amygdalus* Batsch)], şeftali [*P. persica* (L.) Batsch], kayısı ve kiraz diploittir ve $2n = 2x = 16$ 'dır. Vişne, *P. spinosa* L. ve *P. fruticosa* Pall. ise heksaploid olup $2n = 4x = 32$ 'dir. *Prunus* cinsinde 230 tür bulunur. Bu türlerin büyük bir çoğunluğu ılıman iklim kuşağına adapte olmuş ise de 35 türü eski dünya tropik kuşağına ve 25 türü ise yeni dünya tropik kuşağına endemiktir. *Prunus* cinsinde yer alan kayısı bu aile içinde ekonomik olarak önemli ağaç türlerinden biridir.

Rus botanikçi Vavilov, kayısı için 3 gen merkezi olduğunu bildirmiştir. Bu gen merkezleri: Kuzeydoğu, Orta ve Batı Çin ile Gansu ve Kuzeydoğu Tibet'i içerisine alan bölgelerdir. Ayrıca Vavilov, Türkiye'nin de içinde bulunduğu, İran, Kafkasya ve Yakın Doğu'da yabani kayısıların bulunmadığını ve mevcut kayısıların ise kültürü yapılan çeşitlerden oluştuğunu belirterek buranın ikinci derecede gen merkezi olabileceğini söylemiştir [20].

Araştırmacıların birçoğu, anavatanı Çin ve Orta Asya olan kayısıyı, Anadolu'ya Büyük İskender'in Asya Seferleriyle (M.Ö.330-323) getirdiğini düşünmektedir [21, 22]. Ancak kayısının zaten Anadolu topraklarında yetiştirildiğini kanıtlayan çalışmalar yapılmıştır. Bu kanıtlardan birisi Yozgat Boğazköy'deki kazılarda, Hititlere ait M.Ö. 1650-1200 yılları arasındaki yaşayan topluluk hakkında bilgiler veren çivi yazılı tabletlerin çözülerek okunması sayesinde Anadolu'nun geçmişi hakkında bilgiler sağlanmıştır. Tabletlerden anlaşılana göre Hititler'in sadece kayısıyı değil başka yaş ve kuru

meyveleride tükettiği anlaşılmıştır. Aynı zamanda meyveleri tüketmenin yanı sıra tanrılarına sundukları ve kutsal yerlere koydukları da tabletlerden anlaşılmıştır [23,24].

Kayısının tohum ile çoğaltılması ve uzun yıllar boyunca farklı ekolojik koşullar altında yetiştirilmesi sonucunda bitki sistematikçileri tarafından 6-8 eko-coğrafik grubunun olduğu rapor edilmiştir [25, 26]. Bu gruplar ise şu şekildedir:

Cungar-Zailiy Ekocoğrafik Grubu: İlk eko-coğrafik gruptur. Panfilov yakınlarındaki dağlık alanlar, Kazakistan'da Talty-Kurgan ve Alma-Ata Dağları ve Sincan'da Ining bölgeleridir. Kayısı ağaçlarının dikkat çeken özelliği kış soğuklarına dayanıklı olmasıdır [22, 25].

Orta Asya Ekocoğrafik Grubu: Kayısının eski genotiplerini içinde barındıran en zengin grup olduğu bildirilmiştir. Afganistan, Keşmir, Sincan, Kırgızistan, Özbekistan ve Tacikistan'daki kayısı çeşitlerini kapsamaktadır [27]. Buradaki kayısıların çoğunun kendine uyumsuz ve meyvelerdeki kuru madde oranının yüksek olduğu bildirilmiştir [20].

İran-Kafkasya Ekocoğrafik Grubu: Türkiye, Ermenistan, Azerbaycan, Gürcistan, Dağıstan, İran, Irak, Suriye, Kuzey Afrika, İspanya ve İtalya'nın bazı bölgelerinde yerel kayısı çeşitleridir. Kayısı ağaçlarının Orta Asya grubu gibi güçlü ve uzun ömürlü olmadığını ve çoğunun kendine verimsiz olduğu bildirilmiştir. [22].

Avrupa Ekocoğrafik Grubu: Doğu, Batı ve Kuzey Avrupa olarak 3 alt grubu bulunmaktadır. Ağaçları güçsüz gelişim göstermekte ve erkenci çeşitlerden oluşmaktadır. Avrupa kayısı grubu, Orta Asya ve İran-Kafkasya grubu ile kıyas edildiğinde fungal hastalıklara karşı daha toleranslı olduğu rapor edilmiştir [25].

Doğu Çin Ekocoğrafik Grubu: Bu grup, Orta Çin ve Japonya'daki birçok kayısı çeşidini ve *P. armeniaca* var. ansu türünü içermektedir [20].

1.1.1.Kayısı Türleri

Bitkilerin ilk ortaya çıktığı ve evrimlerini tamamladıkları yerlere “**Gen Merkezi**” veya “**Anavatan**” denilmektedir. Türkiye, hem Yakın Doğu hem de Akdeniz Havzası içerisinde bulunması avantajıyla, dünyada yetiştirilen çoğu meyve ve sebze türlerinin gen merkezi veya gen merkezi alanlarında bulunmaktadır [28, 29]. Ayrıca ülkemizin ekolojisinin bahçe bitkileri yetiştiriciliğine uygun olması, göç yolları üzerindeki

konumu ve Türkiye topraklarının üzerinde çoğu medeniyetin var olması sayesinde Türkiye’de çok sayıda tür ve çeşit bulunmaktadır [28, 29]. Bitki çeşitliliğinin çok olduğu bu coğrafyanın aynı zamanda da meyve genetik kaynakları bakımından da zengin olduğu görülmektedir. Bu zengin genetik kaynak kayısı bitkisinde de bulunmaktadır. Ülkemizde erkenci çeşitten geç çiçek açanına kadar değişen çeşitler bulunmaktadır. Subtropik iklimin özelliklerini taşıyan sahil kesimlerinden, ılıman iklim özelliklerini gösteren iç bölgelerde birçok alandaki kayısı üretimi ekonomik bir şekilde gerçekleştirilmektedir. Genelde, güney ve batı bölgelerinde erken çiçek açan sofralık kayısı çeşitlerinin yetiştirilmesi yaygın iken, iç bölgelerde daha çok kurutmalık çeşitlerin yetiştirildiği görülmektedir. Ülkemizdeki iklim özellikleri bakımından Doğu Karadeniz Bölgesi ile Doğu Anadolu’nun yüksek bölgeleri haricinde hemen hemen çoğu bölgesinde kayısı üretimi yapılabilmektedir [30].

Dünya üzerinde geniş bölgelere yayılan kayısının tarihsel sürecin içerisinde botanik özellikler bakımından farklı eko-coğrafik gruplar ve lokal alt grupları oluşmuştur. Şuanda dünyadaki dokuz tane kayısı tür ve alt türleri bilinmektedir. Bu tür ve alt türler;

-*Prunus armeniaca* L.,

-*Prunus armeniaca* var. *ansu* Maxim. (Ansu Kayısı),

-*Prunus mume* (Sieb.) Sieb. et Zucc. (Japon Kayısı),

-*Prunus sibirica* L. (Sibirya Kayısı),

-*Prunus mandshurica* (Maxim.) Koehne (Mançurya Kayısı),

-*Prunus davidiana* Carr.,

-*Prunus* × *dasycarpa* Ehrh. (Siyah veya Mor Kayısı),

-*Prunus armeniaca* var. *holosericea* Batal. (Tibet Kayısı),

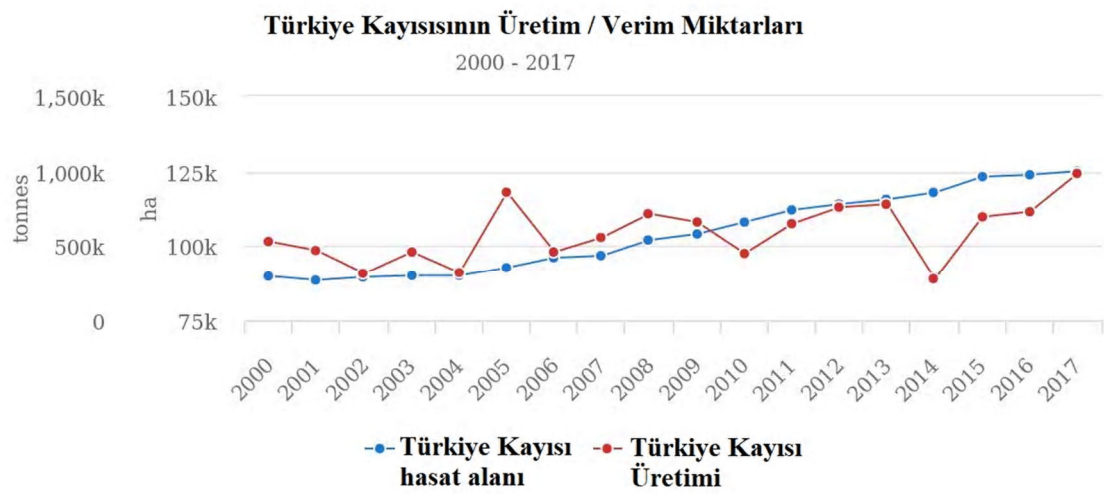
-*Prunus brigantiaca* Vill. (Briancon Kayısı-Alp Eriği) [20, 22] sıralanabilir.

Bu türler içerisinde ülkemizde de yetiştiriciliği yapılan ve dünyada en geniş coğrafik alana yayılış gösteren tür *Prunus armeniaca* L.’dir. Bunun yanında Doğu Çin, Güney Kore ve Japonya’da *Prunus armeniaca* var (Ansu Kayısı) yetiştiriciliği yapılmaktadır.

1.1.2. Kayısı Üretimi

Dünya üzerindeki kayısının üretimi ve yetiştiriciliği son zamanlarda giderek artan bir grafik göstermektedir. 2017 yılında dünyada yaş kayısı üretimi 4.257.241 ton olmuştur. Ülkemiz ise 985.000 tonluk yaş kayısının üretimi ile dünya yaş kayısı üretiminde lider

konumdadır ve toplam dünya kayısı üretiminin %18.8'ini karşılamaktadır (Tablo 1.1). Ülkemizin başlıca kayısı meyvesi üretim alanı Malatya ilidir. İlimiz adının Hititler zamanında ‘‘Meyve Bahçesi’’ anlamındaki ‘‘Melitue, Maldiya, Melita’’ kelimelerinden köken aldığı görülmektedir [31]. Malatya ilinde 2017 yılına ait yaş kayısı üretimi verileri 380.551 ton olarak kayıt edilmiştir. Bölgede, kayısı üretimi çoğunlukla kurutmalık çeşitlerden elde edilmektedir ve bu üretim dış pazara yöneliktir. İlimizde bulunan kayısı ağaçlarının çoğu ‘‘Hacıhaliloğlu’’ çeşidinden oluşmakta ve bu çeşidi ‘‘Kabaşı’’ kayısı çeşidi takip etmektedir.



Şekil 1.1. 2000 - 2017 Yılları Arası FOA verilerine göre Türkiye’de Kayısı Üretim / Verim Miktarı

Tablo 1.1. 2017 yılında en çok yaş kayısı üretimi yapan ülkeler

Ülkeler	Üretim Miktarları
Türkiye	985.000
Özbekistan	535.565
İran	239.712
Cezayir	256.890
İtalya	266.372
Pakistan	178.957
Toplam	2.459.496 (ton)

Türkiye ürettiği kayısının çok fazla miktarını kurutmalık olarak yapmaktadır. Kuru kayısı ihracatı ülke ekonomisine önemli katkı sağlamaktadır (Tablo 1.2).

Tablo 1.2. 2016 yılında en çok kuru kayısı üretimi yapan ülkeler

Ülkeler	Üretim Miktarları
Türkiye	103.250
İran	15.000
Özbekistan	9.000
Çin	6.000
Afganistan	3.500
Diğer Ülkeler	32.700
Toplam	169.450(ton)

1.2. Kayısıda Hastalık Etmeni Olan *Plum pox virüsü*

Plum pox virüsü yani Şarka Hastalığı sert çekirdekli meyvelerde verim kaybına neden olan viral bir hastalıktır. Slavca'sı *Şarka* (Sharka) olan hastalığa, İngilizcede '*Plum pox*' adı verilmiştir. Virüs ilk olarak 1915 yılında Bulgaristan'da tespit edilmiş ve hastalığın viral olduğu 1932 yılında rapor edilmiştir. Hastalık yaprak bitleriyle (afitler) veya bitki materyali ile taşınmaktadır. Şarka hastalığının belirtilerinin görülmesi 2-4 yıl sürebilmektedir. Semptomlar genellikle yaprakta açık yeşil noktalar, halkalı şekiller ve çizgiler, meyvelerde ve çekirdeklerinde halkalar, lekeler, çürümeler ve yumuşamalar olarak görülmektedir. Meyvelerde enfeksiyonun olmasıyla birlikte, şeker miktarı düşmekte, tadı bozulmakta ve erken meyve dökümü gözlemlenmektedir. Hastalığın tespiti ise biyolojik, serolojik ve moleküler yöntemlerle yapılmaktadır [32, 33, 34, 35, 36, 37].

Tablo 1.3. Ülkelerde PPV durumu

<p>Yaygın dağılım gösteren ülkeler:</p> <p>Bulgaristan, Yunanistan, Romanya, Macaristan, Slovakya, Çek Cumhuriyeti, Polonya, Almanya, Arnavutluk, Güney Kıbrıs, Mısır, Hırvatistan, Sırbistan, Karadağ [38].</p>
<p>Sınırlı dağılım gösteren ülkeler:</p> <p>Türkiye, Avusturya, Kanada, Moldova, İngiltere, Ukrayna, Fransa, İtalya, Portekiz, İspanya, Slovenya, Hindistan, Şili, Rusya, Norveç [38].</p>
<p>Giriş yapmış, ancak az oranda kayıtlı enfeksiyon gösteren ülkeler:</p> <p>İsviçre, Suriye, Hollanda, Litvanya, A.B.D, Ürdün, Tunus, Arjantin, Pakistan, Japonya, İsrail, Belçika [38].</p>
<p>Varlığı bilinen, ancak hakkında detaylı bilgi mevcut olmayan ülkeler:</p> <p>B. Hersek, Belarus, İran, Kazakistan, Çin, Lüksemburg [38].</p>

Avrupa'daki çoğu ülkede hastalıkla bulaşık olduğu tespit edilen on binlerce ağaç sökülmüş ve birçok bahçe hastalıktan arındırılmıştır. Şarka hastalığı geçtiğimiz 15 yıl içerisinde, Şili'de [39], Kanada'da [40] ve ABD'de [41] tespit edildiği raporlanmıştır ve en son Japonya'ya kadar hastalığın ulaştığı bildirilmiştir [42].

Dünya kayısı üretiminin büyük bir kısmını Türkiye karşıladığı için Şarka Hastalığı ülkemiz için çok önemlidir. PPV, ülkemizde ilk defa 1968 yılında tespit edilmiştir. Son çalışmalarda PPV ırkının (D ve M) çıkış noktasının/genetik çeşitlilik merkezinin Türkiye olduğunu işaret edilmiştir (9, 43). Ayrıca PPV'nin iki isolat grubu (PPV-T ve PPV-MIs) sadece Türkiye'de bulunmuştur (44, 45). Ayrıca kayısı yetiştiriciliğinin yoğun olduğu Malatya'da ilinde hastalığa rastlanmamıştır.

1.3. Kayısı'da Şarka Dayanıklılık Testi ve İslah Çalışmaları

Şarka hastalığının ilk çalışmaları 80'li yıllarda başlamıştır. Dayanıklı çeşit ve tiplerin belirlenmesi ve doğal enfeksiyon çalışmaları yapılmıştır. Doğal enfeksiyon çalışma yöntemi şu şekilde işlemiştir; test edilecek çeşit veya tipler PPV ile bulaşık olan

ağaçların yanına dikilerek dayanıklı olup olmadıkları test edilmiştir [46]. Ayrıca hastalığın bir başka bulaşma nedeni olan afitler veya göz aşuları kullanılarak yapay enfeksiyon çalışmaları sürdürülmüştür. PPV'yi bulaştırmada göz aşularının etkin bir yöntem olduğunu belirlemiştir. GF-305 şeftali anaçlarının hastalık belirtilerini çok hızlı bir şekilde gösterdiğini bildirilmiştir [47, 48, 49]. GF-305 anacı kullanarak, PPV dayanıklılığını belirlenmede iki yöntem geliştirilmiştir. İlk yöntemde, tohumdan gelişen veya klon olan GF-305 anacına, test edilecek kayısı çeşit veya tipleri aşılama kayısı gözlerinin sürmesi beklenmektedir. Daha sonra sürgün veren kayısıların üzerine PPV ile enfekteli gözler aşılama hastalık bulaştırılmaktadır [47, 50]. İkinci yöntemde ise önce GF-305 anacına hastalık bulaştırılmakta ve üzerine kayısı gözü aşılamaştır. Araştırmacılar her iki yöntemin kıyaslamasını yapmış ve ikinci yöntemin daha iyi sonuç verdiği bildirmiştir [49]. Virüs varlığının moleküler tespitinde ise genelde ELISA tekniği uygulanmaktadır. Analizde simptomların gözlenmemesi ve ELISA testinde de virüsün olmaması durumunda bitki dayanıklı, simptomların bulunması ancak yapılan testlerde virüsün tespit edilmemesi durumunda bitki toleran, virüsün ve hastalığa ait simptomların birlikte görülmesi durumunda ise bitki dayanıksız olarak tanımlanmaktadır.

ABD ve Avrupa'da, PPV hastalığı için ıslah çalışmaları 1950'lerden beri süre gelmektedir. Kegler ve arkadaşları (1998) 50 yıllık süre içerisinde *Prunus* familyasında Şarka'ya dayanım ile ilgili derleme makalelerinde 280 çalışmayı tartışmışlardır [51]. Martinez-Gomez ve arkadaşları (2000) kayısıda yapılan dayanıklılık çalışmalarını özetleyerek kayısıda tip ve çeşitlerin Şarka'ya dayanıklılık durumlarını listelemiştir [52]. Avrupa'da yürütülen dayanıklılık ıslahı ve moleküler çalışmalarında PPV'ye dayanıklı bazı kayısı çeşitleri "Goldrich", "Harlayne", "Stark Early Orange", "Stella" ve "Harcot" tespit edilmiştir. Bu kayısı çeşitleri ıslah çalışmalarında sıklıkla dayanıklı ebeveyn olarak kullanılmaktadır. Böylece ekonomik açıdan önemli olan kayısı çeşitlerine dayanıklılık aktarılmaya çalışılmaktadır. İspanya, Yunanistan, Fransa, İtalya ve Çek Cumhuriyeti kayısı ıslah programlarını yürüten diğer ülkelerdir. Bu çalışmalarda Yunanistan'da "Lito" ve "Pandora", Fransa'da "Avilara", Çek Cumhuriyeti'nde "Leronda" çeşitleri geliştirilmiştir. Türkiye de Elibüyük ve Erdiller (1995), 7 kayısı çeşidini çalışmış ve dayanıksız olduklarını belirtmiştir [6]. Çağlayan vd. (2004) Sakit-2 ve 11/89 tipleri kayısı çeşidi ile 7 erik çeşidini çalışmış ve Şarka hastalığına dayanıksız

olduklarını belirlemişlerdir [7]. Gürcan vd. (2015, 2019) Türkiye germplasmından bulunan 200'ün üzerinde kayısıyı çalışmış, 5 adet dayanıklı kayısı çeşidi belirlenmiş, geriye kalan çeşit ve tiplerin Şarka'ya dayanıksız olduğunu rapor etmiştir [8]. Bu dayanıklı kayısıların 2 adedi (Kaniş ve Fracasso) Kuzey Amerika kökenli dayanıklılık karakterini göstermemektedir. Dayanıklılardan 4'ü Türkiye kayısısı olup, ikisine Erciyes etek dağlarından Lifos ve Cebir ismi verilmiştir. Diğer ikisine de Anadolu'da Asuların en büyük karumu (ticaret merkezi) olan Kaniş'e istinaden "Kaniş" ve "Karum" isimleri verilmiştir [9]. Bir başka çalışmada Şarka'ya dayanıklılık sağlamak amacıyla Türkiye'nin önemli kurutmalık kayısı çeşitlerini, Kuzey Amerika'nın hastalığa dayanıklı çeşitleri ile çaprazlayarak melez bitkiler elde etmişlerdir. 225 kombinasyonda toplam 6.750 melez kayısı bitkisi arazi koşullarına aktarılmış, verim çağında bulunan yaklaşık 2.900 bitkide de fenolojik, pomolojik ve verim analizlerine devam edildiğini bildirilmiştir [10, 11]. Ulubaş Serçe vd. (2013) bu melez popülasyonlarının bazılarını SEO/Harlayne dayanıklılık lokusu ile bağlantılı 2 markör ile taramış ve 62 melez bitkinin SEO/Harlayne dayanıklılık lokusuyla bağlantılı markörleri taşıdığını belirlemişlerdir. Fakat fenotipik testlemeler yapılmadığı için bu melez bitkilerin dayanıklılık durumları netleştirilememiştir [12]. Adana'da SEO/harlayne tipi dayanıklı çeşitler kullanılarak, dayanıklı çeşit geliştirmeye yönelik çalışmalar yapılmıştır. Fenotipik testlemeler yapılmadığı için melezlerin dayanıklılık durumları net olarak belirtilmemiştir [13].

Araştırmacılar, Şarka hastalığında sürdürülen çalışmalarda, hastalığın epidemolojisinin anlaşılması, virüse ait genlerin işlevinin anlaşılması, virüse dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesi ve dayanıklılık için genetik mekanizmanın anlaşılması üzerine yoğunlaşmıştır. Şarka'ya dayanıklı kayısı kaynaklarının ve moleküler genetiklerinin araştırılmasında çeşitli segregasyon ve moleküler haritalama çalışmaları yapılmış ve bir tek genle kontrol edildiği belirtilmiştir [53, 54, 55]. Bununla beraber bazı araştırmacılar ise 2 genle [54, 56] ve bir kısım araştırmacılar ise 3 gen ile [54] kontrol edildiğini gösteren çalışmalar yayınlamışlardır. *Prunus davidiana*'dan gelen dayanıklılık çalışmaları hastalığın genetik kontrolünü daha karmaşık bir noktaya getirmiş ve birçok dayanıklılık lokusu olduğu gösterilmiştir [57, 58]. SEO'dan geliştirilen F1 ve F2 popülasyonları üzerinde [59] ve SEO çaprazı olan Lito'da [60, 61] yapılan çalışmalar sonucunda Bağlantı Grubu 1 (BG1) ve Bağlantı Grubu 5 (BG5)'de minor Kantitatif Karakter

Lokuslar (QTL) rapor edilmiştir. Minor dayanıklılık lokuslarının BG3 [57, 58, 62] ve BG5’de yer aldığı rapor edilmiştir [62,63]. Marandel ve ark. (2009a, 2009b) QTL meta-analizi çalışmasında daha önceden yayınlanan 6 çalışmayı birleştirerek BG1 ve BG3 üzerinde 4 bölge tespit etmişlerdir. [57, 58]. Dayanıklılığın genetik mekanizması ve dayanıklılığı kontrol eden lokusların sayısı tartışmalı da olsa, kayısı genomu BG1’in üst kısmında bulunan major lokusun dayanıklılıkta etkili olduğu araştırmacılar tarafından kabul edilmektedir. BG1 lokusunu belirleyebilmek için var olan Bakteriyel yapay kromozom (BAC) kütüphanesi [64] kullanılarak BG1 sekanslanmış ve oluşturulan BAC kütüphanesindeki DNA parçalarından SSR markörleri geliştirilmiştir [65]. İki SSR markörünün (“ssrPACITA5” ve “ssrPaCITA17”) markör destekli seleksiyon çalışmalarında (MAS) kullanılabileceği belirlenmiştir [61]. Daha sonraki çalışmalar ile BG1’in üst kısmında yer alan *PPVres* adı verilen büyük bir lokusun dayanıklılığın % 70’inden sorumlu olduğu rapor edilmiştir [66, 67]. MAS çalışmalarında kullanılmak üzere *PPVres* lokusunda moleküler markörler tanımlanmıştır. Soriano ve arkadaşları (2012) tarafından yapılan çalışmada *PPVres* lokusu üzerinde üç basit dizi tekrarı (SSR) (PGS 1.21, 1.23 ve 1.24) markörü geliştirmişlerdir [17]. Ardından Zuriaga ve arkadaşları (2013) yaptıkları çalışmada *PPVres* lokusunu, 196 kb’lik bir bölgeye kadar daraltmıştır [16]. Decroocq ve arkadaşları (2014) ise daraltılan 196kb’lik bölgede, 5 bç’lik bir delesyonun keşfetmişler ve bu delesyonun dayanıklılıktan sorumlu olduğunu varsayımlardır. 5 bç delesyon belirlemek için ZP002 adlı tek dizi uzunluk polimorfizmi (SSLP) markörünü geliştirmişlerdir [18]. Ardından Passaro ve arkadaşları (2017), PGS 1.21, ZP002 ve PGS 1.24 markörleri için yüksek çözünürlüklü erime (HRM) analizlerini geliştirmişlerdir [19].

Gürcan ve arkadaşları (2019) yukarıda belirtilen markörlerin tamamını kullanarak Türkiye kayısılarını taramıştır. Markörler ve dayanıklılık arasındaki bağlantı ortaya konmuştur. PPV dayanıklılığı için fenotipik ve genotipik tarama arasında uyumsuzluklar olduğu rapor edilmiştir [9]. Bu uyumsuzluk daha önceki çalışmalar ile de belirlenmiştir. Rubio vd. (2014), *PPVres* lokusu ile bağlı markörle (PGS1.21, PGS1.23 ve PGS1.24) 80 kayısı çeşit ve tipini genotiplendirmiş ve dayanıksız çeşidi 'Alba' ve (1002)8-6 genotipinin, *PPVres* ilişkili markörleri gösterdiğini de bildirmiştir [68]. Benzer şekilde, Decroocq vd. (2014), *PPVres* lokusu ile ilişkili markörlerin dayanıklı kayısı seçiminde tam olarak güvenilir olmadığını belirtmiştir. Primerler

geliştirilmesine rağmen henüz PPV dayanıklılığı için major gen keşfedilememiştir. Bu alanda daha fazla çalışmanın yapılması ve güvenilir markörlerin keşfedilmesi gerekmektedir [69].

1.4. Moleküler Markörler

Moleküler markör, genom üzerindeki bir gen bölümü veya gen bölgesi ile ilişkisi olan DNA parçaları olarak tanımlanmaktadır. Moleküler markörlere aynı zamanda DNA tabanlı olmalarıyla DNA markörleri olarakta bilinmektedir. DNA molekülünde polimorfizm gösteren bölgelerin tespit edilmesi moleküler markörlerin çalışma prensibidir. Polimorfizm, DNA dizisinde bulunan farklı amino asit varyasyonları olarak bilinmektedir. Bu belirteçler kodominant veya dominant özelliğe sahip olabilmektedir.

Moleküler markörler nükleik asit temeline dayalı genetik markörler olmasından dolayı bitki ıslahçılar tarafından genom analizlerinde kullanılmaktadır. Bu belirteçler kullanılarak birbirine morfolojik bakımdan yakın olan kültür çeşitlerini bile ayırabilmektedir. Moleküler markörlerin kullanıldığı alanlar, QTL analizleri, genetik haritalama, kültür çeşitlerinin tanımlanması, genetik akrabalıkların belirlenmesi, tohumculukta safiyet analizlerinde, gen kaynaklarının karakterizasyonunda, genetik kaynağın yapısını anlamada gibi birçok kullanım alanları mevcuttur.

Moleküler markörlerde, yüksek derecelerde polimorfizm göstermeleri ve genotipleri birbirinden ayırabilmeleri, heterozigot bireyleri, homozigot dominant bireylerden ayırabilmeleri, uygulama maliyetinin düşük ve tekrarlanabilirlik oranının yüksek olması gibi bazı özellikler istenmektedir.

1.4.1. Moleküler Markör Tipleri

Moleküler markörler Kullanılan yöntemler bakımından, Hibridizasyona Dayalı Markörler ve Polimeraz Zincir Reaksiyonuna (PZR) Dayalı Markörler olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır. Hibridizasyona dayalı markörlerde RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism/Sınırlı Parça Uzunlukları Polimorfizmi) bulunmaktadır. PZR tabanlı markörler ise 4 çeşittir. Bunlar, SSR (Simple Sequence Repeat/Basit Tekrarlı Diziler ya da Mikrosatelitler), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA/Rastgele Çoğaltılmış DNA Polimorfizmi), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism/Çoğaltılmış Parça Uzunluğu Polimorfizmi), ISSR

(Inter Simple Sequence Repeat/Basit Tekrarlı Diziler Arası Polimorfizm)'dir. Bu Markörlerin dışında ise, SRAP (Sequence Related Amplified Polymorphism), SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions), CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic) ve bu sistemlere ek olarak DNA sekanslama temeline dayanan SNP (Single Nucleotide Polymorphism) markörleri bulunmaktadır.

1.5. SNP VE SSR

Genetik çalışmalar yapan araştırmacılar tarafından Tek nükleotid polimorfizm (SNP) ve basit tekrarlanabilir diziler (SSR) markörleri fazlaca tercih edilmektedir. SSR ve SNP markörleri, genetik harita yapılmasında, harita temelli gen izolasyonunda, markör destekli seleksiyon (MAS)'da, QTL çalışmalarında yoğun olarak kullanılmaktadır.

SNP'ler bir genom üzerindeki tek nükleotid değişiklikleri olarak bilinmektedir. SNP'ler hem ökaryotik hemde prokaryotik organizmalarda en yoğun görülen polimorfizm kaynağıdır. SNP tam otomasyona uygun olması avantajıyla çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır [70].

SSR markörleri 1 ile 6 baz tekrarından oluşan DNA parçalarıdır. DNA Polimeraz enzimi replikasyon işlemi sırasında tekrar bölgesinde yüksek oranda hata yapar. Sonuç olarak bu bölgelerde 1000 kat daha fazla mutasyon gözlenmektedir. Böylece SSR lokuslarının yakın akrabalar arasında bile polimorfiktir ve bu markör sistemi kodominanttır ve geliştirildikleri laboratuvarlar dışında da güvenli olarak kullanılabilir. Yarı-otomasyona (florasana işaretleme, kapılar elektroforesiz, bilgisayar yardımı ile allel uzunluğu ölçümü) uygundur. SSR'ler sağladıkları yüksek bilgiler ile popülasyon genetiği ve parmakizi analizlerinde sıkça kullanılan markör sistemidir. Multialelik SSR'ler, SNP'ler kadar yoğun olmasa bile ökaryotik genomlar da yoğun bir şekilde bulunmaktadır.

1.6. Mutasyon Tipleri

Tek baz değişiklikleri (nokta mutasyonlar), geçişler (transisyon) veya çapraz aktarmalar (transversiyon) mutasyonları bulunmaktadır. Transisyon modelinde, Adenin (A) yerine Guanin (G) veya Sitozin (C) yerine Timin (T) gelmesi yani aynı cinsten değişme demektir; pürinden pürine veya pirimidinden pirimidine **geçiş (transition) mutasyonu** denir. Bu değişimin dört şekli vardır: Geçiş mutasyonları, A ↔

G veya C \leftrightarrow T şeklinde olabilecek değişmelerdir. Çapraz aktarmalara ise; **değişim (transversion) mutasyonu** denir. Bu durumda bir purin pirimidine veya bir pirimidin pürine dönüşür. Bunun da sekiz şekli mümkündür: A \leftrightarrow C; A \leftrightarrow T; G \leftrightarrow C veya G \leftrightarrow T. Pürinin iki pirimidinden herhangi birine veya bir pirimidinin iki pürinden herhangi birine değişmesidir. İnsersiyon veya ensersiyon genetikte bir DNA dizisine bir veya daha çok baz çiftinin eklenmesidir. Baz değişmeleri bir baz yerine başka bir bazın ikamesi (base substitution: **baz ikamesi**) şeklinde veya bir bazın eksilmesi veya eklenmesi (**indel mutations**) şeklinde olmaktadır.

1.7. Yüksek kapasiteli dizileme (High-Throughput Sequencing - HTS)

Yüksek kapasiteli dizileme (High-Throughput Sequencing - HTS) platformları, genom dizileme, RNA materyalinin paralel ve eş zamanlı olarak dizilenmesi, transkriptom dizileme, transkriptlerin 5' ve 3' uçlarının belirlenmesi, tek nükleotid değişimleri, insersiyon, delesyon ve genlerin ifadesini belirlemede sıklıkla kullanılmaktadır.

Genom dizilemesi kısmen veya tamamen yapılan canlılarda genetik düzeyde çalışmanın önu açılmıştır. Örneğin mısırdaki yapılan yaprak yanıklığı genetik olarak çalışılmasında 1.6 milyon SNP kullanılmış ve 32 QTL bölgesi bulunmuştur [71]. Domuzda vücut gelişimini kodlayan genler 51.385 SNP ile çalışılmıştır [72]. Sığırlarda süt verimini belirleyen genler 56.000 SNP ile [73], doğurganlık 10.000 SNP ile [74] çalışılmıştır [75]. Arabidopsis'te 341.602 SNP ile bağlantı dengesizliği (Linkage disequilibrium) çalışılmıştır [76].

1.7.1. Genomu Dizilenen Bitkiler

Şeftali genomu, Sanger dizileme teknolojiyle 8.5X kapsamlı DNA dizisi elde edilmiştir. 1 Kb'dan büyük 202 dizi (scaffold) üretilmiştir. Genom büyüklüğü daha önce tahmin edilen 280-300 Mb büyüklüğünden daha küçük 227 Mb olarak bulunmuştur. 27.851 adet gen anotasyonu yapılmış ve bunlardan 838 adedinin alternatif uç birleştirme (splicing) gösterdiği belirlenmiştir. Şeftali genomunda toplam 28.689 adet protein kodlayan bölge ve milyonlarca genetik markör, SSR, SNP'ler keşfedilmiştir [77].

Japon Kayısısı (*Prunus Mume*), Illumina GA sisteminde 101X kapsam ile dizilenmiş ve 280Mb genom birleştirilmiştir. Ardından Rosaceae familyasında dizilenen genomlar

ile eşleştirilmiş ve Rosaceae kromozom evrimi, birleşmeleri, parçalanmaları ve duplikasyonları belirlenmiştir. Üç önemli gen ailesi çalışılmıştır. Farklı dokulardan transkriptom profillemeye yapılmış; erken çiçeklenme, endodormansi ve bakteriyel enfeksiyonlara yanıt ekspres genleri belirlenmiştir [78].

Elma genomu, Sanger (4X kapsam) ve Roche 454 (12X kapsam) kombinasyonu ile dizilenmiştir. 603.9 Mb büyüklüğünde genom 17 kromozom olarak birleştirilmiştir. Pyreae alt ailesindeki 17 kromozomun atasal 9 kromozomdan evrildiği tespit edilmiştir. Çiçeklenme ve meyve verimi ile ilgili 15 üyeli MADS-box gen gurubu, sorbitol üretimi ve taşınımı genleri tespit edilmiştir. Genom dizileme çalışmaları sonucunda bitki genomlarında yeralan gen sayıları, gen yoğunluğu, transkripsiyon faktörleri, dayanıklılık genleri gibi bir çok genom bileşenine dair bilgi üretilmiştir [79].

Kiraz (*Prunus avium*) genomu, yeni nesil dizileme teknolojisi kullanılarak genom dizisini belirlenmiştir. Birleştirilen dizilerin toplam uzunluğu 272.4 Mb, N50 uzunluğu 219.6 kb olan 10.148 skaffold dizisinden oluşturulmuştur. 43.349 tam ve kısmi protein kodlayan genler tahmin edilmiştir. Kiraz ve şeftali genetik haritalarının karşılaştırılması, iki genom arasında yüksek sentez olduğunu ortaya çıkarmıştır. Kiraz skaffoldları harita ve sentez temelli stratejiler kullanılarak birleştirilmiştir. Altı çeşidin tüm genom analizinde 1.016,866 SNP ve 162,402 insersiyon/ delesyon bulunmuştur, bunlardan %0,7 den fazlasının yıkıcı özellikte olduğu görülmüştür [80].

Literatür Çalışmaları

HTS teknolojisi ile büyük miktarlarda veriler üretilmektedir. Bu üretilen veriler sayesinde, RNA transkriptlerinin miktarının belirlenmesi, yeni genlerin keşfi, transkriptom analizi, SSR ve SNP lokuslarının belirlenmesi ve moleküler markörlerin geliştirilmesi gibi çalışmalar yapılmaktadır.

Verde ve arkadaşları (2012), *Prunus* türlerinde, SSR'ler da dahil olmak üzere sınırlı sayıda genetik markör geliştirildiğini belirtmiştir. Bu ihtiyacı karşılamak için, şeftali genomun bütününe kapsayan çok sayıda SNP markörünün keşfi, haritalaması ve şeftalide MAS çalışmalarında kullanılabilecek moleküler markörleri geliştirmeyi hedeflemişlerdir. Bunun için Illumina ve Roche / 454 sıralama teknolojilerini kullanarak 56 adet şeftali genotipinin bütün genomunu sekanlamışlardır. Toplam 56 adet şeftali genotipinden 2.797 milyon okumadan 25,4 Gb DNA sekansı elde ettiklerini rapor

etmişler ve genom üzerinde 1.022.354 SNP tanımlamışlardır. Illumina GoldenGate testi ile SNP'lerin validasyon işlemi yapıldıktan sonra, genik olan(eksonik ve intronik) SNP'lerin %75'inin doğrulandığını bildirmişlerdir.

Verde ve arkadaşları (2017), şeftali genomunun ilk haritasındaki yanlış düzenlenen kısımları düzeltmek, yüksek doygunluğa sahip bağlantı haritalaması yapmak ve ilk şeftali genomundaki harita kalitesini arttırmak için daha kapsamlı sekanslama yöntemleriyle çalışmayı gerçekleştirmişlerdir. Şeftali bağlantı haritasını geliştirmek için 3.576 moleküler markör ile dört bağlantı haritasını kullanmışlardır. Bu çalışmada, IF7310828 x Ferganensis (PxF) şeftali popülasyonunun 242 fidesi, 'Contender' x 'Ambra'nın F2 popülasyonunun (CxA) 305 fidesini deney için kullanmışlardır. CxA F1 ebeveyninden, 265 SNP geliştirmişlerdir. SNP'lerin test edilmesi ardından 194'ünü haritalama için kullanmışlar ve geriye kalan 71 SNP'i kullanmamışlardır. PxF soyunun 242 fidesi, IPSC 9 K SNP dizisi ile genotiplendirmişler ve diziyeye yerleştirdikleri 8.144 SNP'ten toplam 3.399'unun polimorfik (% 41,7) olduğunu bildirmişlerdir [81].

Zuriaga ve arkadaşları (2013), PPV'ye dayanıklı "Goldrich" kayısı çeşidinde *PPVres* lokusunun fiziksel haritasını yapmışlardır. Bakteriyel yapay kromozom (BAC) klonları, 454 / GS-FLX Titanyum teknolojisini kullanarak sekans işlemi gerçekleştirmişlerdir. Ayrıca, 7 kayısı çeşidinin (üç PPV'ye dayanıklı ve dört PPV'ye hassas) ve 2 tane PPV'ye hassas kayısı akrabasının (*P. sibirica* ve *P. mume*) genomunu Illumina-HiSeq2000 platformunu kullanarak 14x kapsamlı sekanslarını elde etmişlerdir. 6 BAC kütüphanesinden, 454 / GS-FLX sekanslama platformunda 40 ile 641 bç uzunluğu arasında değişen ve ortalama 348 bç olan 127.802 okuma üretmişlerdir. Illumina teknolojisini kullanarak kayısı genlerinin sekanslanması sonucunda "Harlayne" için 91.443.246, "Canino" için 373.801.518 arasında değişen toplam 1.445.495.513 okuma rapor etmişlerdir. Düşük kaliteli bölgelerin ve tüm HTS verilerinde vektör ve adaptörlerin çıkarılmasından sonra, Illumina için ortalama 95.19 bç ve 454 dizileri için 344.79 bç uzunluğunda 1.391.686.236 kesilmiş okuma bildirmişlerdir. Temizlenen sekanslar PGS1.20 ve PGS1.252 markörleri aralığını kapsayan ve 7.986.205-8.281.900 aralığına karşılık gelen scaffold_1'i şeftali genomuna hizalamışlardır. Şeftali genomuna eşleme yaptıktan sonra *PPVres* lokusunu yaklaşık olarak 196 kb'lik bir bölgeye kadar daralttıklarını rapor etmişlerdir [16].

Donq ve arkadaşları (2014), RNA-Seq teknolojisi ile 454 GS-FLX Titanyum platformlarını kullanarak, Çin’de ekonomik ve ekolojik olarak önemli bir bitki olan Sibiryaya kayısısını sekanslamışlardır. Marjinal arazide yetişen bu kayısı çeşidinde tohumlarının yüksek yağ oranına sahip olması ve Çin’de bir biyoyakıt hammaddesi olarak kullanılmasına rağmen bu türün transkriptom bilgilerinin ve moleküler çalışmalarının sınırlı olduğunu belirtmişlerdir. Çalışmada, 454 GS-FLX Titanyum platformunu kullanarak uzunlukları ortalama 451 bazdan oluşan 273.068 ham okuma üretmişlerdir. Düşük kaliteli okumaları, adaptörleri, primer dizileri ve 45 bç’den az dizileri çıkardıktan sonra 1.243.067 yüksek kaliteli okumalar elde etmişlerdir. Bu okumaların GC içeriğinin ortalama % 44,5 olduğunu rapor etmişlerdir. 45 ile 5.566 bç arasındaki temiz okumaları kullanarak Newbler 2.6 programında 35.171 izotiği elde ettiklerini bildirmişlerdir. Tüm okumaları de-novo olarak 4.600 ünite halinde birleştirerek 6.509 unigenden 7.304 SSR tanımlayıp, toplam 9.930 primer çifti tasarladıklarını bildirmişlerdir. Bu primerleri doğrulamak için ise rastgele seçtikleri 50 primer çiftini seçmişler ve 24 tanesinin istenilen bantları ürettiğini gözlemlemişlerdir. Bu veriler ışığında, agronomik karakterleri ve tohumlardaki yağ asitlerinin bileşimini değiştirmek için MAS programlarında kullanılabilecek bir sekans bilgisi tabanı sağladıklarını ve dolayısıyla bitkinin gelecekte biyo-dizel hammaddesi olarak kullanımının kolaylaşacağını raporlarında belirtmişlerdir [82].

Salazar ve arkadaşları (2015), “Rojo Pasi3n” ve “Z506-7” (her ikisi de Kuzey Amerika eşidi “Orange Red” ve İspanyol eşidi “Currot” arasındaki çaprazlamadan elde edilen) kayısı genotiplerini RNA-Seq analiziyle test etmişlerdir. Ayrıca parmak izi ve genetik çeşitlilik analizlerini yapmak için farklı kökenlerden ve ülkelerden oluşan 37 kayısı genotipini test etmişlerdir. Analiz ettikleri 5 kütüphaneden toplamda 1.034 milyon ham çift uç okuma uzunluğu (100 bç) üretmişlerdir. Bu ham okumalardaki adaptör dizileri, boş okumalar ve düşük kaliteli sekansları çıkararak, sonuçta toplam 992 milyon yüksek kaliteli okuma belirlemişlerdir. Daha sonra şeftali referans genomu v1.0 eşlemişlerdir. Ancak temiz okumaların % 30’unun şeftali genomundaki 8 scaffold’un hiçbirleriyle eşleşmediğini bildirmişlerdir. Şeftali genomunu referans kullanılarak temiz RNA-Seq okumalarında SNP ve INDEL tanımlamasını yapmışlardır. Toplamda Rojo Pasion’da 282.977 ve Z506-7’de 293.574 varyasyon tanımlamışlardır. Bu varyasyonlar arasında Rojo Pasi3n’da 277.703 ve Z506-7’de 287.627 SNP tespit etmişlerdir. Rojo

Pasi3n'da 5.274 ve Z506-7'de 5.947 INDEL tespit etmişlerdir. Scaffold_1'de tespit edilen (Rojo Pasi3n'da 65.140 ve Z506-7'de 67.402) SNP ve INDEL'lerin en fazla sayıda varyant olduğunu bildirmişlerdir. Üç farklı SNplex testinde toplam 99 SNP'yi analiz ettiklerini ve analiz edilen bu SNP'ler arasında 95'inin 37 kayısı genotipinde polimorfik olduğunu tespit etmişlerdir [83].

Rubio ve arkadaşları (2015), PPV için hassas / dayanıklılık Gen İfade Analizi adlı çalışmasını gerçekleştirmiştir. Bitki materyali olarak, Kuzey Amerika çeşidi 'Orange Red' (PPV'ye dayanıklı) ve İspanyol çeşidi 'Currot' (PPV'ye hassas) arasındaki çaprazdan elde edilen 'Rojo Pasi3n' (PPV'ye dayanıklı) ve 'Z506-7' (PPV'ye Hassas) kayısı genotiplerinde çalışmışlardır. Kayısı fidelerine önce PPV aşılması gerçekleştirmiştir. Aşıladıkları çeşitlerden 'Z506-7' replikatları güçlü şarka semptomlarını göstermiş ve ELISA ve RT-PZR'de de pozitif olduğunu göstermiştir. 'Rojo Pasi3n' replikatlarının ise şarka semptomlarını göstermediğini hem ELISA hem de RT-PZR ile belirlemişlerdir. Daha sonra bu çeşitlerden RNA izole ettikten sonra cDNA kütüphanelerinin dizilerini Illumina HiSeq2000 ile elde etmişlerdir. FastQC yazılımını kullanarak ham RNA-Seq okumalarında kalite kontrolü yaptıktan sonra düşük kaliteli bölgeleri filtrelemek için fastx-toolkit aracını kullanmışlardır. Tophat 1.4.0 ve Bowtie 0.12.7 yazılımlarını kullanarak yüksek kaliteli okumaları *P. persica* genom v1.0'e eşlemişlerdir. Analiz edilen örneklerden 100 bç uzunluğunda 1.209 milyon ham pair-end okumaları üretmişlerdir. Ham okumalardan adaptör dizilerini, boş okumaları ve düşük kaliteli dizileri çıkarmışlar ve toplam 1,163 milyon yüksek kaliteli ve temiz okuma elde etmişlerdir. "Rojo Pasion" ve "Z506-7" okumalarında 283.057 ve 293.565 varyasyon tespit etmişlerdir. 'Rojo Pasion'da tespit edilen 277.792 SNP'nin 5.266'sının INDEL (delesyon) olduğu ve Z506-7'de tespit edilen 287.062 SNP'nin 5.939'unun INDEL'lerden olduğunu rapor etmişlerdir. En fazla SNP yoğunluğu ise scaffold 1'in üzerinde saptadıklarını bildirmişlerdir. (Rojo Pasion 63.140 SNP ve Z506-7'de 65.402 SNP). Ayrıca PPVres lokusunda (196 kb bölge) dayanıklı genotip Rojo Pasi3n'a özgü 124 SNP tanımlamışlardır. Bu SNP'lerin PPV dayanıklılığından sorumlu aday genlerin tanımlanmasında kullanılabileceğini bildirmişlerdir [84].

Bielenberg ve arkadaşları (2015), Genotyping-By-Sequencing (GBS) yöntemini kullanarak şeftalinin F2 popülasyonunda SNP keşfi yapmışlardır. Bitki materyali olarak yüksek soğutma gereksinimine ihtiyaç duyan 'Hakuho' çeşidini ve düşük soğutma

gereksinimi isteyen 'UFGold'un F1 hibritini kendileyerek, 57 adet şeftali F2 popülasyonunu geliştirmişlerdir. Illumina HiSeq 2000 platformu kullanarak sekanslama işlemini gerçekleştirmişlerdir. 63 havuzlanmış ve barkodlanmış örneklerden, her örnek için yaklaşık 100 bç'lik 1,5 milyon tek uçlu okuma ürettiklerini rapor etmişlerdir. TASSEL programını kullanarak şeftali genomunun tüm ana scaffoldları boyunca dağılmış 9.998 SNP lokusu tanımlamışlardır. Prunus türlerinden 370 SSR markörünü F2 haritalama popülasyonunda polimorfizm için taramışlardır. Taradıkları 370 SSR marköründen 37'sinin, F2 popülasyonunda polimorfik olduğunu tespit etmişlerdir. Daha sonra bu SSR'leri, TASSEL ile tanımladıkları SNP markörleri ile birleştirip genetik bağlantı haritası oluşturmuşlardır. Bu haritalamada aralık ortalaması 2.85 cM olan 201 SNP ve 33 SSR markörünü bağlantı haritası üzerinde konumlandırmışlardır. Sonuç olarak ortaya koydukları bu bağlantı haritası 666.1 cM harita mesafesini içeren sekiz bağlantı grubunu bildirmişlerdir [85].

Gürcan ve arkadaşları (2017), transkriptom analizi için yurt dışı kökenli, yerel, ve bölgesel kayıslardan oluşan 7 kayısı çeşidini (SEO, Hacıhaliloğlu (HH), Perfection, İğdir, Roxana, Esen1 ve Esen2) çalışmalarında kullanmışlardır. Bu çeşitlerden SEO, PPV'ye dayanıklılığı ile Avrupa ıslah programlarında çok yaygın olarak kullanılmaktadır. Hacıhaliloğlu çeşidi ise PPV'ye çok hassas olmasına karşın kuru kayısı üretiminin yaklaşık %70 bu çeşitten sağlanmaktadır. Kayıslardan, RNA izolasyonu yapıp RNA kalitesini kontrol ettikten sonra cDNA kütüphanelerini Illumina HiSeq 2000 teknolojisini kullanarak oluşturmuşlar ve sekanslama işlemini gerçekleştirmişlerdir. Transkriptlerin fonksiyonel düzenlenmesini (Gen Ontolojisi - GO ve Kyoto Genler ve Genom Ansiklopedisi - KEGG) başarı ile gerçekleştirmişlerdir. De-novo düzeneği ile ortalama N50 değeri 1.762 nt olan ortalama 43.023 sekans ürettiklerini rapor etmişlerdir. Yedi çeşit arasında ise en yüksek transkript sayısını (59.751) 'İğdir' çeşidinin ürettiğini bildirmişler. Transkript havuzunda SSR'ler ve tüm motifler için minimum 5 tekrar ile 14,722 di-, tri-, tetra-, penta- ve heksanükleotit motif lokuslarını tanımlamışlardır. Toplamda 206 lokus için primer tasarlamışlardır. Bu primerleri 24 kayısı çeşidinde (PPV'ye dayanıklı 7 çeşit ve PPV'ye hassas 17 çeşit) taramışlar ve 72'sinin, polimorfik olduğu belirlemişlerdir. Yeni geliştirilen EST-SSR primerlerinin kayısı karakterizasyonunda ve haritalama çalışmalarında güvenilir bir kaynak olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir [86].

Mariette ve arkadaşları (2016), HTS teknolojisini ve kayısı germplazmasının geniş genetik çeşitliliğini kullanarak SNP'ler keşfetmişlerdir. Bunun için referans olarak yüksek kaliteli şeftali (*Prunus persica*) genomundan faydalanmışlardır. 72 adet ıslah edilmiş bitki materyalini çalışmalarında kullanmışlardır. Illumina HiSeq 2000/2500 platformunu kullanarak sekanslama işlemini gerçekleştirmişlerdir. Sekanslama işlemi tüm çeşitler için 15x derinlikte iken, bazı çeşitlerde 'Harlayne', 'Stark Early Orange', 'Goldrich', 'Real d'imola' ve 'Shalakh' da 25x derinlikte sekanslamanın olduğu bildirilmiştir. Sekanslama sonrasında kaliteli filtreleme yöntemi ile eşleştirilmiş okumalardan QC Toolkit v.2 programını kullanarak düşük kalitede olan okumaları çıkarmışlardır. Kaliteli filtrelemenin ardından, şeftali genomunun %99'unu temsil eden sekiz adet en uzun scaffold'u kullanarak okumaları Şeftali genomu v.1 üzerine eşleştirmişler ve 349.995 SNP seti elde etmişlerdir. Analiz çalışmalarında çok sayıda SNP elde ettikleri için popülasyon yapısını daha iyi anlamak adına FASTSTRUCTURE yazılımını kullanmışlardır. Kayısı çeşitlerinden dört dayanıklı (Harlayne, SEO, Goldrich ve Stella) ve dört hassas sekansı (Bergeron, Moniqui, Canino, Vestar) hizalayarak SNP'leri rapor etmişlerdir. SNP doğrulamasını yapmak için 30 adet SNP'ten GWAS analizi ile BG1'deki en önemli 15 adet SNP lokusunu seçip bu SNP'leri 11 kayısı çeşidinde test etmişler ve 14 tanesinin 11 kayısı çeşidinde polimorfik olduğunu belirlemişlerdir. Ancak 1 SNP'nin (SNP_LG1_10867606) PZR ürünü üretmediğini rapor etmişlerdir [87].

Gürcan ve arkadaşları (2016), GBS yöntemini kullanarak, toplam 90 kayısı çeşidinde SNP ve SSR genotiplendirmesini araştırmışlardır. Türkiye'den; Alyanak, Aprikoz, Hacihaliloğlu, Hasanbey, Iribitirgen, Kabaası, Karacabey, Mahmudun Erigi, Şekerpare ve Tokaloğlu çeşitlerinin Illumina HiSeq 2000 platformunda sekans işlemini yapmışlardır. Yaklaşık 34.69 Gb ham veri ürettiklerini rapor etmişlerdir. Sekansları filtrelendikten sonra, düşük kaliteli okumalar, ApeKI kesim bölgesi ve barkodlar olmadan yaklaşık 28 Gb temiz veri üretmişlerdir. Düşük veri içeren örneklerin çıkarılmasıyla ortalama okuma sayısı 3.571.945 ve ortalama baz sayısı 310.919.767 olarak rapor edilmiştir. Toplam SNP sayısının 17.842 olduğunu, kayısı çeşitlerinde ise ortalama 13.961 ile 17.401 arasında değiştiğini ve GC baz oranında % 44 olduğunu bildirmişlerdir. Ortalama SNP sayısı 13.962, homozigot SNP lokusları sayısı 12.074 ve heterozigot SNP sayısını ise 1.888 olarak bildirmişlerdir [88].

Salazar ve arkadaşları (2017), GBS yönetimini kullanarak kayısıda genetik haritalama ve SNP keşfi yapmışlardır. Bitki materyali olarak “Angeleno”, “September King” ve “September Queen” ile “98-99” çaprazlaması ile türetilen 3 F1 Japon erikten (*Prunus salicina* Lindl) 272 fideyi kullanmışlardır. Ayrıca, her bir ebeveyn için genetik bir harita geliştirmek amacıyla “98-99” × “Angeleno” çaprazından 153 fide kullanılmıştır. Üç fastq. dosyası üretmişler ve her plate veya şerit için 16 milyondan fazla etiketi olan ve plate başına 220 milyondan fazla okuma olduğunu bildirmişlerdir. Ham sekanslar, Şeftali genom v1 ile eşleştirmiş ve 2.244.856’sının şeftali genomundan farklı pozisyonlarda olduğunu, 190.411’ini çoklu pozisyonlarda olduğunu ve 2.795.107’sini şeftali genomu v.1’e eşleştiğini bildirmişlerdir. HapMap dosyalarında filtre uygulamadıklarında 102.992 SNP, filtre uygulandığında ise 42.909 SNP keşfetmişlerdir. TASSEL v5 programını kullanarak SNP’ler ile agronomik özellikler arasındaki markör-özellik ilişkisini göstermişlerdir. “98-99” × “Angeleno” çaprazından toplam 981 SNP haritalamasıyla “98-99” için 479 SNP içeren 688.8 cM’lik ve “Angeleno” için 502 SNP içeren 647.03 cM’lik genomik bölgeyi kapsayan harita bildirmişlerdir. En uzun kromozomların ise BG1’de olduğunu ve uzunluklarında “98-99” da 156.3 cM ve “Angeleno” da 153.1 cM olduğunu göstermişlerdir. BG5’in ise “98-99” da 61.5 cM ve “Angeleno” nun 79.8 cM uzunluğunda olduğunu ve bunların en kısa kromozomlar olduğunu bildirmişlerdir [89].

Passaro ve arkadaşları (2017), *PPVres* lokusundaki dayanıklı / hassas alellerin genotiplemesini belirlemek için HRM çalışmasını gerçekleştirmişlerdir. Çalışmalarında 51 kayısı çeşidini, PPV dayanıklılığı için fenotiplendirip test etmişlerdir. HRM analizi, DNA’nın termal denatürasyonu sırasında flüoresans değişimini izlemek için birleştirici boyaların kullanılması temeline dayanmaktadır. SSR markörlerinin yeterince basit ve güvenilir olmadığı önceki çalışmalarda gösterilmiştir. Bu nedenle, iki yeni (PGS1.21_SNP ve PGS1.24_SNP), dayanıklılıkla ilişkili markör tasarlamışlardır. Ek olarak, ZP002_DEL (ZP002_SNP) markörüne alternatif bir deneme için, ppb22225m geninin ilk intronunda bulunan A / T polimorfizminin varlığına dayanan ve delesyon ile bağlantılı olan bir markör tasarlamışlardır. Bu markörleri “Lito” çeşitlerinin BAC kütüphanelerinin derlemesinden almışlardır. Geliştirdikleri bu 3 HRM markörünü, ‘Lito’ (dayanıklı) x ‘BO81604311’ (hassas)’deki F1 popülasyonunda ve ayrıca daha önce SSR markörleri ile genotiplenen PPV dayanıklılığı için fenotiplendirilmiş 73

örnekte test etmişlerdir. Test ettikleri örneklerden dayanıklılık alellini taşıyan 42 birey arasından sadece altı tanesinin dayanıklı olduğunu bildirmişlerdir. Bu sebeple dayanıklılık çalışmalarının daha çok derinleşmesi gerekliliğini vurgulamışlardır. Bu araştırmada, *PPVres* lokusundaki önceden belirlenen markörlerde HRM analizlerini geliştirerek kayısındaki PPV dayanıklılığı genotiplenmesinin hızlı ve uygun maliyetli bir protokolünü geliştirmişlerdir [19].

Goonetilleke ve arkadaşları (2018), badem çeşitlerinin Nonpareil X Lauranne çaprazlaması sonucu elde edilen 231 F1 bitkisinden DNA izole etmişlerdir. GBS yönteminde daha önce diğer bitkiler için kullanılmış olan ApeKI enzimini, badem genomunda kesim enzimi olarak kullanmışlardır. Daha sonra sekanslama işlemi için DNA havuz kütüphanesi oluşturup, Illumina HiSeq 2000 cihazı ile tek uçlu sekanslama (100-bç okuma) gerçekleştirmiştir. Sekanslama sonucunda GBS ile 21.6 Gb veri üretmiş, toplam 186 milyon diziyi okumuşlardır. GBS sekans verilerinde, SNP keşfi için TASSEL 3.0 yazılımını kullanmışlardır. Doğrusal regresyon analizi, dizi okuma sayısı ile her birey için etiket sayısı arasında güçlü bir pozitif ilişki olduğu göstermişlerdir. Bir dizi filtre işlemi sonrasında Nonpareil ve Lauranne'un her biri için haritalamaya uygun olduğunu düşündükleri 300 den fazla etiket çifti seçmişlerdir. Tüm örnekler arasında toplam 453.648 önemli etiketler elde ettiklerini bildirmişlerdir. Bu etiketlerden 308.971'i, şeftali genomuna eşlenmiştir. Sekiz ana scaffold'dan 1. scaffold üzerine 6.088'i diğer scaffoldlara ise 30,594 ile 59,923'ünü eşleştirmişlerdir. Etiketler, her ana scaffold'un tüm uzunluğu boyunca eşleştirilmiştir [90].

Carrasco ve arkadaşları (2018) çalışmasında, "Angelino" ve "Aurora" çeşitlerinin melezlerinden oluşan 137 fideyi kullanarak kayısı genomunda SNP tespiti ve genetik haritalamasını yapmışlardır. Angelo çeşidi Şili için taze meyve ihracatı endüstrisinde kullanılan önemli bir çeşittir. Bu çeşit aynı zaman da geç hasat edilen, yüksek bir verimlilik seviyesine ve uzun bir raf ömrüne sahip olan önemli bir çeşittir. Bu çalışmada, GBS yöntemi ile elde edilen SNP'leri kullanarak Japon eriklerinin (*Prunus salicina Lindl.*) yüksek yoğunluklu bağlantı haritalarını rapor etmişlerdir. GBS yöntemiyle 454.912.276 okuma elde etmişlerdir. Referans olarak şeftali genomu V2.1 kullanarak 49.826 SNP tanımlamışlardır. Filtrelerin uygulanması sonrası (MAF>% 0.05 ve maksimum eksik veri olarak % 10), JoinMap 4.1 yazılımını kullanarak analiz edecekleri 12.720 SNP elde ettiklerini ve ayrıca harita yapımı için yüksek kaliteli

SNP'ler olduğunu raporlamışlardır. Sekiz bağlantı grubuna eşleşen 137 Angelo x Aurora yavrularında 1.441 tane yüksek kaliteli SNP tespit etmişlerdir. Angelo'da 588 cM ve Aurora'da 490 cM olan bağlantı haritaları yapmışlardır. Her iki ana haritadaki SNP'leri ve heterozigot konfigürasyondaki SNP'leri kullanarak 732 SNP içeren konsensüs bağlantı haritası oluşturmuşlardır. Daha sonra bütün bağlantı gruplarını bir araya getirerek, SNP'lerin %85,6'sının intragenik bölgelerde ve %14,4'ünde intergenik olmayan bölgelerde yer aldığını göstermişlerdir. Bununla birlikte, bazı SNP'lerin v2.1 şeftali genomunun scaffoldlarına göre farklı sırayı takip ettiği ve ayrıca 732 SNP'ten 69 tanesinin şeftali genetik haritasında farklı bağlantı gruplarıyla eşleştiğini rapor etmişlerdir [91].

Zhang ve arkadaşları (2018) yaptıkları çalışmada, bademde transkriptom verilerini elde etmek ve yeni SSR markörleri geliştirmek için çalışmışlardır. Illumina HiSeq 2000 teknolojisini kullanarak transkriptom verilerini üretmiş ve 66.668.192 ham okuma verisi elde etmişlerdir. Adaptörler çıkarıldıktan sonra Trinity programı kullanarak ortalama 988 bç uzunluğuna sahip 64.924.070 yüksek kaliteli ve 1.702.600 düşük kaliteli okumaları elde etmişlerdir. Ayrıca 201 bç ile 15.555 bç arasında değişen ve N50 değeri 1.714 bç uzunluğunda olan toplam 42.135 unigen bulmuşlardır. 48.012 unigen dizilerinden MISA yazılımını kullanarak 8.641 yeni SSR markörü geliştirmişlerdir. Yeni keşfedilen di-nükleotitler 5.141 adet, tri-nükleotitler 2.416 adet, tetra-nükleotitler 606 adet, hekza-nükleotitler 277 adet ve son olarak penta-nükleotitler 201 adet olarak tespit edilmiştir. SSR primerlerini doğrulamak amacıyla 100 adet SSR bölgesini rastgele bir şekilde seçmişler ve sonra bu 100 primer çiftini test etmişler ve 82 primer çiftinden sonuç alırken geriye kalan 18 primerden PZR ürünlerini üretmediğini rapor etmişlerdir. SSR markörlerinin transfer edilebilirliğini doğrulamak için ise beş farklı türü seçerek (*A. ledebouriana*, *A. mongolica*, *A. pedunculata*, *A. tangutica* ve *A. triloba*) çalışmalarında ürettikleri 82 SSR markörünü değerlendirmişlerdir. Sonuç olarak 70 SSR markörünün bu beş türe transfer edilebileceğini bildirmişlerdir [92].

Gürcan ve arkadaşları (2019), 227 kayısı çeşidini ve Kayseri'deki koleksiyon parselinde bulunan 48 fidanı çalışmalarında kullanmışlardır. CTAB metodunu kullanarak kayısıların genç yaprak dokularından DNA ekstrakt etmişlerdir. Moleküler araştırmalarını ise 10 markör kullanarak yapmışlardır. Bu markörler; PGS1.21, PGS1.23 ve PGS1.24 (Soriano ve diğerleri, 2012), ZP002 (Decroocq ve diğerleri, 2014), iki

CAPS markörü (SNP 8.156.254 ve SNP 8.157.485) (Decroocq ve diğeri, 2014) ve Passaro ve arkadaşları (2017) tarafından geliştirilen dört HRM markörleridir. Tüm DNA örneklerini PGS1.21, PGS1.23 ve PGS1.24 markörleri ile taramışlar ve alel boyutlarını floresan etiketli bir kılcal sistem aracılığıyla elde edilmiştir. HRM analizlerini de LightCycler® Nano Instrument - Real-time PZR sistemini (Roche, İsviçre) kullanarak yapmışlardır. Çalışmada kullanılan 10 markörden 8'inin önceki raporlarla tutarlı sonuçlar verdiğini ancak iki CAPS markörünün PZR bantlarını üretmediğini rapor etmişlerdir. HRM analizi ile 4 genotipin (Cebir, Lifos, Karum, Zard) PPV-T'ye dayanıklı olduğunu bildirmişlerdir. İki genotipin ise ("Kaniş" ve İtalyan Çeşidi "Fracasso") hastalığa dayanıklı olmasına rağmen dayanıklılık ile ilişkili markörlerin hiçbirini taşımadığını bildirmişlerdir. Ayrıca çalışmada kullanılan 48 fidenin 22'sinin 8 markör için dayanıklılık lokuslarını taşıdığını rapor etmişlerdir. Çalışma sonucunda ZP002 markörünün *PPVres* lokusundaki dayanıklılık alelini seçmede daha güvenilir ve kolay olduğunu bildirmişlerdir [9].

2.BÖLÜM

YÖNTEM VE MATERTAL

2.1. Bitkisel Materyal

Tez çalışması 2016-2019 yılları arasında Erciyes Üniversitesi Genom ve Kök Hücre Merkezi Bitki Biyoteknolojisi laboratuvarında yürütülmüştür. Bitkisel materyaller, Erciyes Üniversitesi Kayısı Koleksiyon Bahçesinde bulunan PPV'ye dayanıklı / hassas olan 4 farklı (Hacıhaliloğlu, SEO, Ordubatbenzeri, Zard) kayısı çeşidinden seçilmiştir. Bitkilerden alınan taze yaprak örnekleri azot tanklarına konularak Erciyes Üniversitesi Genom ve Kök Hücre Merkezi Bitki Biyoteknolojisi Laboratuvarı'na getirilmiştir.

2.1.1. Çalışmada Kullanılan Kayısı Çeşitleri Hakkında Bilgiler

Hacıhaliloğlu, kayısı iyi bir kurutmalık çeşit olmasına rağmen PPV'ye hassastır. Kuru madde oranı diğer kayısılarda %18-20 iken Hacıhaliloğlu çeşidinde %24-30 arasındadır. Hacıhaliloğlu kayısı orta irilikte, oval, sarı renkli ve genellikle kırmızı yanaklı meyve oluşturmaktadır. Çekirdek içi bileşim olarak Glikozit, Amigdalin, Nişasta, Yağ ve benzeri maddelerden meydana gelmektedir. Acı çekirdek ilaç ve kozmetik sanayisinde, tatlı çekirdek ise gıda sanayisinde kullanılmaktadır.

Ordubatbenzeri önemli bir sofralık kayısı çeşidi olarak bilinmektedir. PPV'ye hassas olan bir çeşittir.

SEO (Stark Early Orange) çeşidinin en önemli özelliği *Plom pox virüsüne* (PPV) dayanıklı olmasıdır. Bu çeşit, Avrupa ıslah programlarında dayanıklılık için genetik kaynak olarak kullanılmaktadır. Yaprakları küçük, geniş olan bir çeşittir. Mart-Nisan ayları arasında çiçeklenen çeşidin, meyveleri ise yuvarlak şekilde ve orta büyüklüktedir.

Zard, kayısısı PPV'ye dayanıklı bir çeşittir. Bu çeşidin çiçeklenme zamanı geç olduğundan dolayı donlara karşı daha toleranslıdır. Aynı zamanda bu kayısının meyvelerindeki kuru madde oranının % 22-24 arasındadır. Bu çeşidin meyveleri küçük ve yumuşak olgunlaştığında ise yeşil-sarı renkte olmaktadır.

Çalışmada seçilen kayısı çeşitlerinde;

- i. Tüm genomun dizilenmesini sağlamak için kayısı çeşitlerinde CTAP yöntemi kullanılarak DNA izolasyon işlemi gerçekleştirilmiştir [93].
- ii. 214 O 400'nolu proje kapsamında elde edilmiş olan Hacıhaliloğlu kayısı verileri çalışmada kullanılmıştır.
- iii. Belirtilen çeşitlerin ham genom dizileri ile Hacıhaliloğlu'nun *PPVres* lokusu kıyaslanmış ve bütün çeşitlerin 300 bin nt uzunluğunda *PPVres* lokusları belirlenmiştir.
- iv. Daha önceki çalışmalarda rapor edilen, PPV dayanıklılığı ile ilişkili markörler belirlenmiştir.
- v. 4 kayısı çeşidinde 300 bin nt uzunluğunda *PPVres* lokuslarında yeni SSR ve SNP lokusları keşfedilmiştir.

2.2. Örneklerden CTAB Yöntemi ile DNA İzolasyonu

- a) 0.5 g genç yaprak örneği ve sıvı azot ile toz haline getirilmiş, 2 ml'lik tüplerin içerisine konulmuştur.
- b) Tüplerin üzerine 0.7 ml CTAB tampon çözeltisi (100 mM Tris-HCl, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, %2 CTAB, %2 PVP, β -mercaptoethanol, %0.1 Na₂S₂O₅) eklenerek karıştırılmıştır.
- c) 60 dakika boyunca su banyosunda tutulan örnekler her 15 dk da bir ters düz edilerek karıştırılmıştır. Su banyosu işlemi sonrasında örnekler oda sıcaklığında 5-10 dk bekletilerek sıcaklığının düşmesi sağlanmıştır.
- d) 0.7 ml kloroform:isoamyl alkol (24 : 1) ilave edilmiştir. Her 3 dakikada bir karıştırılarak oda koşullarında 15 dk tutulmuştur.
- e) 13.000 rpm'de 15 dk süre ile santrifüj edilerek yaprak kalıntılarının dibe çökmesi sağlanmıştır.
- f) Santrifüj sonrası üstteki oluşan faz pipet yardımı ile epandorf tüplere alınıp üzerine -20 °C'de bekletilen isopropanol ilave edilmiştir. Bu aşamada tüpler

hafif sallanarak DNA'nın çökmesi sağlanmıştır.

- g) Örnekler 1 gece boyunca -20°C 'de bekletildikten sonra tüpler 10.000 rpm'de 10 dk süre ile santrifüj edilerek DNA çöktürülmüş ve tüp içerisindeki isopropanol boşaltılmıştır.
- h) Tüplere içerisinde 10 mM amonyum asetat bulunan, 0.5 ml %76'lık etanol yıkama tampon çözeltisi ilave edilmiş ve 1-2 saat boyunca $+4^{\circ}\text{C}$ 'de bekletilmiştir.
- i) Yıkanan DNA kurutularak saf suda çözdürülmüştür. İzole edilen DNA kalitesini kontrol etmek için önce %1'lik agaroz jelde DNA koşturularak konsantrasyonuna bakılmasının ardından DNA saflığı Qubit analizi yapılmıştır.

2.3. DNA Konsantrasyonunun Belirlenmesi

DNA izolasyonundan sonra DNA konsantrasyonu jel-elektroforez yöntemiyle UV altında bakılmıştır. Jele yüklenecek örneklerin karışımı; 2 μl stok DNA, 4 μl jel yükleme boyası (loading dye) ve 14 μl saf su ile toplam 20 μl hacim olacak şekilde hazırlanmıştır. DNA örnekleri % 0.8 konsantrasyona sahip agaroz jeldeki kuyucuklara konulmuştur. 1 xTBE tampon çözeltisi (89 mM Tris-Cl, 89 mM borik asit, 20 mM EDTA) içerisinde elektroforeze tabi tutulmuştur. Elektroforez cihazı 90 volta ayarlanıp 60 dakika koşturma işlemi gerçekleştirilmiş ve jel görüntüsü alınmıştır.

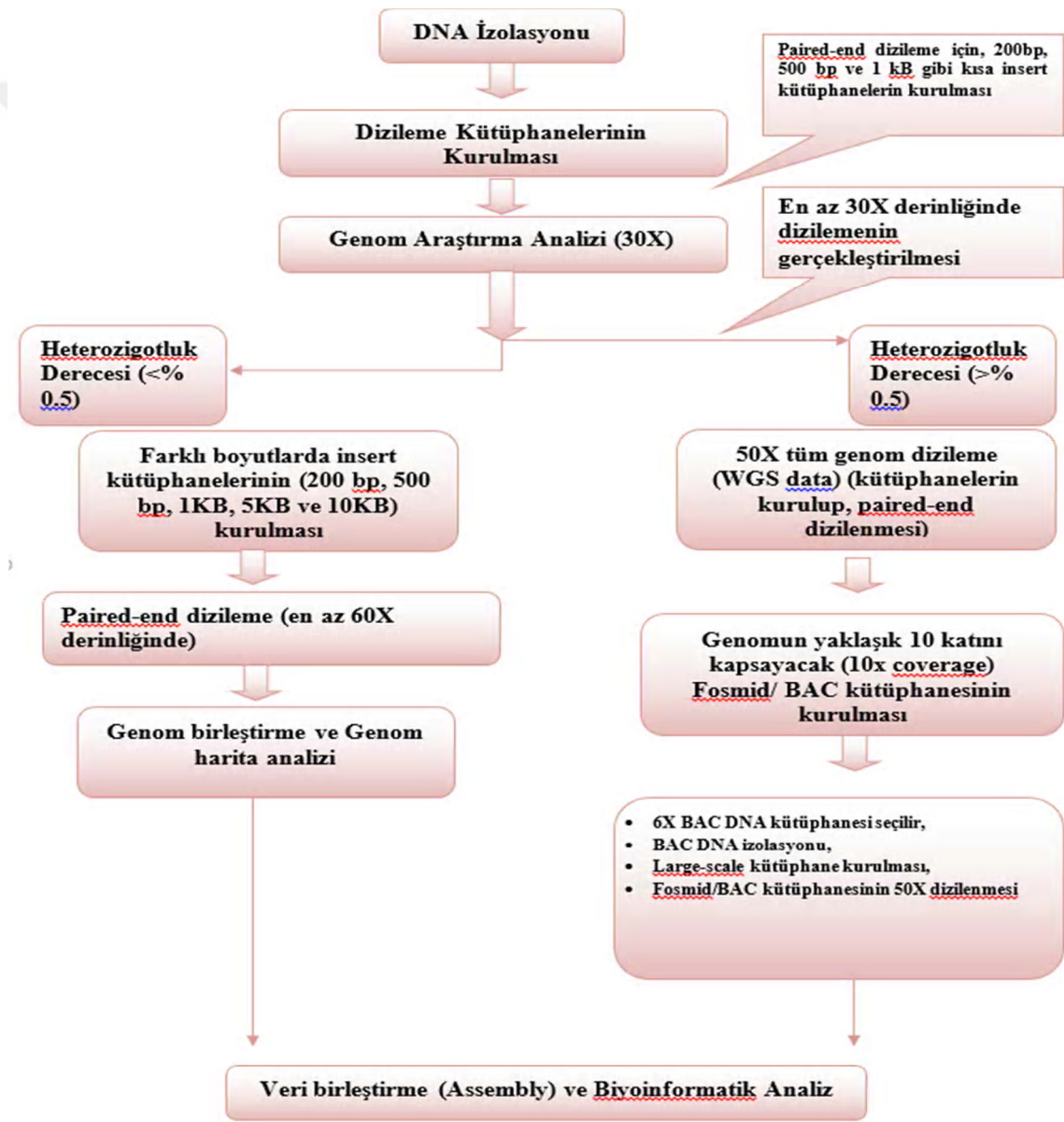
2.4. Qubit Analizi

DNA'lar izole edildikten sonra miktarının ölçümü için nanodrop (Thermo, Multiscan Go) kullanılmış ve DNA kalitesi A260/A280 oranlarına göre belirlenmiştir. Sonra DNA saflığı ölçümü Qubit cihazında Qubit protokolü uygulamayı belirlenmiştir. Protokol şu şekildedir; ilk olarak 199 μl Qubit buffer ve 1 μl Qubit reagent eklenerek mix hazırlanıp, Qubit ölçüm tüplerine 198 μl paylaştırılarak ve 2 μl DNA eklenerek 2 dk oda sıcaklığında ve karanlıkta bekletilmiştir. Daha sonra örnekler cihazda okutulup değerler ng/ μl cinsinden cihaz tarafından hesaplanarak DNA saflık sonuçları elde edilmiştir.

2.5. Yüksek kapasiteli DNA dizileme (High-Throughput Sequencing - HTS)

HTS teknolojisi kullanılarak Ordubatbenzeri, SEO ve Zard çeşitlerinin ham genom dizileri elde edilmiştir (Şekil 2.1). Ek olarak Doç. Dr. Kahraman GÜRÇAN'ın yürütücülüğüyle 214 O 400 nolu projeden elde edilen Hacıhaliloğlu çeşidinin tüm

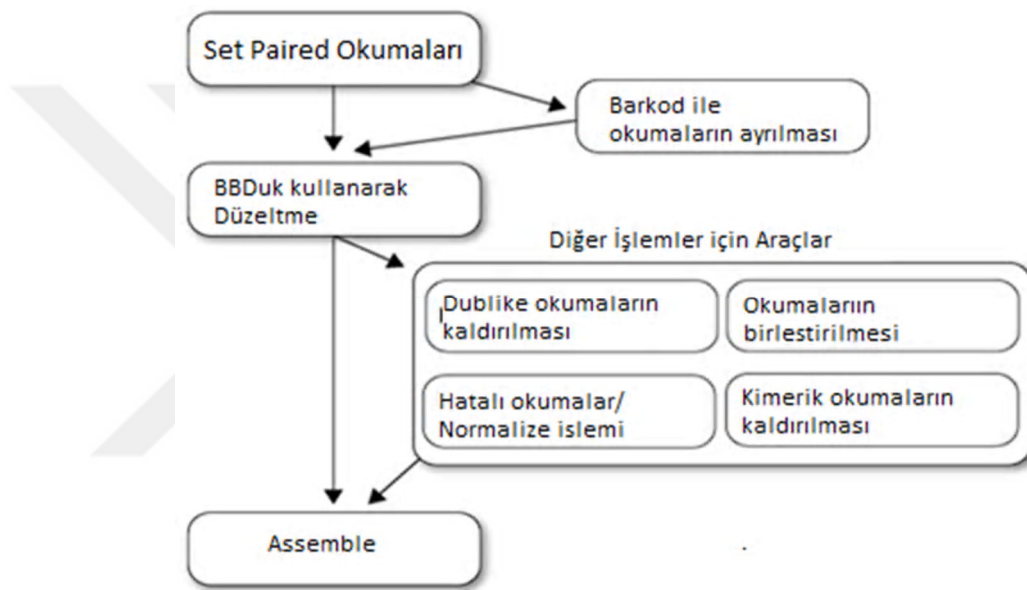
genom sekansı kullanılmıştır. Hacihaliloğlu çeşidinin genomu ile Şeftali 1. Kromozomunun karşılaştırmasıyla referans genom dizisi elde edilmiştir. Daha sonra Hacihaliloğlu kromozomu üzerinde Passaro ve arkadaşlarının (2017) tarif ettiği gibi *PPVres* bölgesi seçilmiş ve tez çalışmasında bu bölge üzerinde yoğunlaşmıştır. Çalışmada Ordubatbenzeri, SEO ve Zard çeşitlerinin ham genom dizileri elde edilmiştir. Ardından referans olarak alınan Hacihaliloğlu *PPVres* lokusu ile herbir çeşidin genomu kıyaslanmıştır.



Şekil 2.1. Yüksek kapasiteli DNA dizileme (High-Throughput Sequencing – HTS) İşlemi

2.5.1. HTS Verilerinin Geneious Programına Aktarılması

Illumina sistemi, okumalarını ileri (forward) ve geri (reverse) olarak üzere iki ayrı dosyada ve fastq. formatında oluşturmaktadır. Genellikle standart Illumina adaptörleri, işlemi gerçekleştirenler tarafında kesilmiş olmaktadır. Çalışmada ham verilerin birleştirilmesi, temizlemesi ve filtrelemesi işlemler Şekil 2.2’de gösterilen basamaklar takip edilerek gerçekleştirilmiştir.



Şekil 2.2. Verileri birleştirme, filtreleme ve temizleme işlemi basamakları

2.5.2. HTS Verilerinin Geneious Programında Birleştirilmesi İşlemi

Geneious programına verilerin aktarılması işleminden sonra bu verilerin birleştirilmesi basamağına geçilmiştir. Verileri birleştirilme işlemi ‘Sequence → Set paired reads’ parametreleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

2.5.3. HTS Verilerinin Geneious Programında Filtrenmesi ve Temizlenmesi

Genom sıralamasından sonra dizi uçlarındaki hatalı, düşük kaliteli okumalar düzgün bir genom dizilemesini önlemektedir. Bunun için okumaların düzeltilmesi önemli olmaktadır. Geneious programında BBDuk düzeltme aracı bulunmaktadır. BBDuk aracında bir “Q” değeri bulunmakta ve bu Phred puanı olarak bilinmektedir (değiştirilmiş Mott algoritması). Illumina okumalar için minimum Q değerinin 20’ye

ayarlanmasını önermektedir. Geneious programında Annotate & Predict → Trim menüsü kullanılarak çalışmadaki ham veriler analiz edilmiştir.

2.5.4. Yeni SSR Ve SNP Lokuslarının Keşfedilmesi

Illumina ile dizilenmiş olan kayısı genomları, Geneious programı kullanılarak filtrelenip temizlendikten sonra Geneious programı kullanılarak, Şeftali 1. kromozomu ile Hacihaliloğlu çeşidinin genomu kıyaslanmıştır ve buradan referans genom dizisi elde edilmiştir. Daha sonra Hacihaliloğlu'nun kromozomu üzerinde *PPVres* bölgesi belirlenmiştir. Bunun için Passaro ve ark. (2017) gösterdikleri gibi 1. Kromozom üzerindeki (8.400.000 ile 8.700.000) yaklaşık 300.000 nt. içeren (*PPVres*) kısmı belirlenerek çalışmada kullanılmıştır (Şekil 2.3). Hacihaliloğlu'nun *PPVres* lokusuna eşleştirilmiştir. Tüm çeşitlerden elde edilen *PPVres* lokuslarının doğruluğunun ispatı için *PPVres* lokusu üzerinde daha önceden geliştirilmiş ve PPV dayanıklılığı ile ilişkili olduğu bilinen primerlerin dizileri tüm çeşitlerin genomlarında tespit edilmiştir.

İsim	Tip	Boyut	Pozisyon (bp)	İleri Primer	Geri Primer	Varyasyon
PGS1.21 ¹	SSR	172-220	8527745	CCCTGGTGTCTGCTCTCTC	CATCCACAAATGGGAAGCAT	
PGS1.24 ¹	SSR	101-141	8668808	GTAAATGAGTGCCTGCGTGT	TGCGAGAGTTGTGATTGATG	
ZP002 ²	SSLP	107-112	8607078	TGTATCCTCCAGCTTCAAAGTC	AACATTTTCTGATTC AATGCCA	
PGS1.21_SNP	SNP	118	8491690	ACCCGGTGAAGAAAAGTGA	TGGATCGCTTCTACATGTCAAG	A/G
PGS1.24_SNP	SNP	70	8774594	ACTAATAAACAGGACCTGCAATAT	CTATTCAATTCGGTTTATGC	A/G
ZP002_SNP	SNP	64	8606821	GCCAGTTTCCTGTAGCAAAACCAC	ATTCITATTCCAAGCTGCAITA	A/T
ZP002_DEL	SSLP	86-91	8606972	CAGCTTCAAAGTCTTCCGATTCA	ATGCCAACTCATTACACGTTCAA	GTTTG

B)

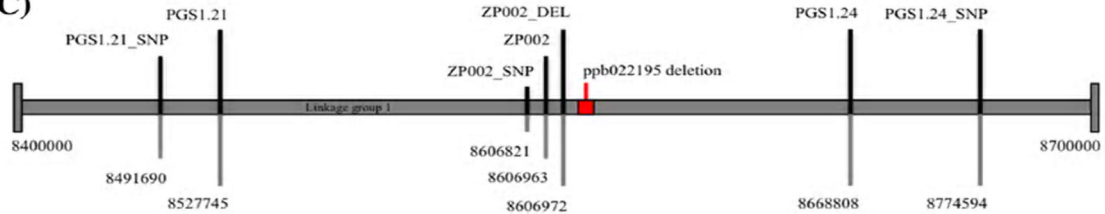
PGS1.21 SNP
 ACCCGGTGAAGAAAAGTGA AATATCTAGCAAAACCAGCCA AACTAAAATATCACAGTAAGAAGGCAATCTGACCGAT **G/A** AGCATGCGA
 ATTCCAATTCTTGACATGTAGAAAGCGATCCA

PGS1.24 SNP
 ACTAATAAACAGGACCTGCAATAT **G/A** CTTAAGTGTACCTCTTAGGAAGTGCATAAACCGAAAATGAATAG

ZP002 SNP
 GCCAGTTTCCTGTAGCAAAACCAC **A/T** AATTGAGAGTACTGTAATGCAGCTTGGAAATAAGAAAT

ZP002 DEL
 CAGCTTCAAAGTCTTCCGATTCA TATCTCTCCAGTGAAT **GTTTG** GACATCAATGAAAACGACTGTATT **TGAACGTGTAATGAGTTGGCAT**

C)



Şekil 2.3. *PPVres* Bölgesi üzerindeki PGS1.21, PGS1.24, PGS1.21_SNP, PGS1.24_SNP, ZP002_SNP, ZP002_DEL & ZP002 [92] lokusları

i. Yeni SSR lokuslarının keşfedilmesi

Geneious programının BBDuk-Trim aracını kullanarak adaptörlerin çıkarılması ve kaliteli düzeltme işlemleri gerçekleştirilmiştir. Düzenlenen örnekler (214 O 400 nolu) proje ile elde edilmiş olan Hacihaliloğlu genomu kullanılmıştır. Hacihaliloğlu çeşidinin genomu ile Şeftali 1. kromozomunun kıyaslamasıyla referans genom dizisi elde edilmiştir. Daha sonra Hacihaliloğlu kromozomu üzerinde Passaro ve arkadaşlarının (2017) tarif ettiği gibi *PPVres* bölgesi belirlenmiş ve diğer çeşitlerin genomları ile kıyaslanmıştır. Burada elde edilen *PPVres* lokuslarının kontiglerinden oluşan referans genom dizisinde, SSRIT-Gramene (<https://archive.gramene.org/db/markers/ssrtool>) yazılımı kullanılarak minimum tekrar değeri 5 olan ve en az 2 nükleotid tekrarına sahip SSR lokusları tespit edilmiştir.

ii. Yeni SNP lokusların keşfedilmesi

Geneious BBDuk-Trim aracı kullanılarak temizleme ve filtreleme işlemi başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Her bir çeşit için elde edilen genom dizilerini Hacihaliloğlu referans genomuna eşlemek için Geneious programı kullanılmıştır. Hacihaliloğlu kromozomu üzerinde Passaro ve arkadaşlarının (2017) tarif ettiği gibi *PPVres* bölgesi seçilmiştir. Çalışmada Ordubatbenzeri, SEO ve Zard çeşitlerinin ham genom dizileri ile referans olarak alınan Hacihaliloğlu *PPVres* lokusu kıyaslanmıştır. Eşleme ile oluşan referans genomların üzerinde Geneious programının Annotate & Predict → Find Variations / SNP menüsü kullanılarak *PPVres* bölgesinde SNP lokusları keşfedilmiştir.

3. BÖLÜM

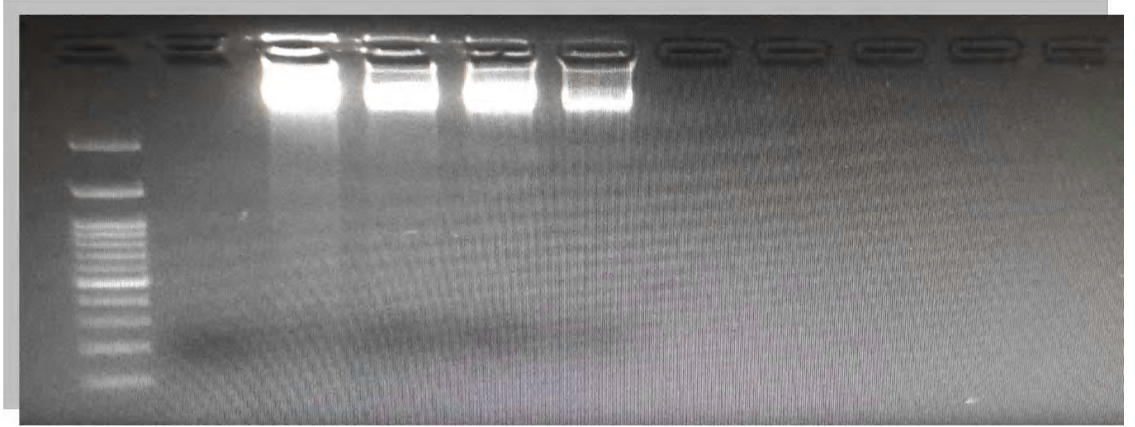
BULGULAR

3.1. Bitkisel Materyal

Tez çalışmasındaki örnekler (Ordubatbenzeri, SEO, Zard) Erciyes Üniversitesi Kayısı Koleksiyon Bahçesinden alınarak azot tankı içerisinde (-198 °C) Erciyes Üniversitesi Genom ve Kök Hücre Merkezi Bitki Biyoteknolojisi laboratuvarına getirilmiştir.

3.2. DNA Kalitesi ve Saflığı Belirlenmesi

Çalışmada kullanılan örneklerden daha önce bahsedildiği gibi CTAB yöntemi ile DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen DNA'nın konsantrasyonu, kalitesi ve saflığı belirlenmiştir. DNA'ların jel ve konsantrasyon sonuçları gösterilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. DNA jel görüntüsü

Kayıslı çeşitlerinden OD260/280 değeri 1.8/2.0 ve OD260/230 değeri 1.3/1.6 olan kaliteli DNA elde edilmiştir.

Ready				Wiping: On(Total 90)			Pathlength: 0.2mm		
Sample Name	Date Time	Check	Judge	Nucleic Acid Conc(ng/μL)	OD260/280	OD260/230	OD260	OD280	OD230
Ordubatbenzer	17.03.12 15:16:05	<input type="checkbox"/>		3160,10	2,02	1,64	64,263	32,331	39,660
S.E.O	17.03.12 15:15:12	<input type="checkbox"/>		1672,11	1,97	1,52	34,210	17,737	22,791
HacıHaliloglu	17.03.12 15:14:25	<input type="checkbox"/>		3230,70	1,96	1,34	73,050	41,423	56,675
zard	17.03.12 15:13:37	<input type="checkbox"/>		2019,63	1,96	1,43	43,250	23,515	31,057

Şekil 3.2. DNA konsantrasyonu

3.3. Yüksek kapasiteli dizileme (High-Throughput Sequencing - HTS) Sonuçları

Tez çalışmasında HTS ile elde edilen ham veriler birleştirilmeden önce Geneious programına iki dosya halinde yüklenmiştir. SEO için 51.925.278, Ordubatbenzeri için 62.931.347, Zard için 62.649.448 çift yönlü okumalar elde edilmiştir.

Tablo 3.1. SEO, Ordubatbenzeri, Zard çeşitlerinin ileri ve geri okuma Verileri

Örnek İsimleri	Okuma Sayısı	% GC	Nükleotid Sayısı
SEO_ileri okuma sayısı	51.925.278	% 39.1	13.033.244.778
SEO_geri okuma sayısı	51.925.278	% 39.3	13.033.244.778
Ordubatbenzeri_ileri okuma sayısı	62.931.347	% 38.7	15.795.768.097
Ordubatbenzeri_geri okuma sayısı	62.931.347	% 39.0	15.795.768.097
Zard_ileri okuma sayısı	62.649.448	% 39.0	15.725.011.448
Zard_geri okuma sayısı	62.649.448	% 39.3	15.725.011.448

3.3.1. HTS Verilerinin Birleştirilmesi Sonuçları

Geneious programında verilerin birleştirilmesi için 'Sequence → Set paired reads' parametreleri seçilerek birleştirilmiştir. SEO çeşidi için 251 nükleotidden oluşan 103.850.556 kaliteli okuma elde edilmiştir. Okumanın GC oranı 39.2 ve nükleotid sayısı

26.066.489.556'dır. Ordubatbenzeri'nde 251 nükleotidden oluşan 125.862.694 kaliteli okuma elde edilmiştir. GC oranı 38.9 ve toplam nükleotid sayısı 31.591.536.194'dür. Zard çeşidi için ise 251 nükleotidden oluşan 125.298.896 okuma sayısı elde edilmiştir. GC oranı 39.2 ve nükleotid sayısı 31.450.022.896'dır (Tablo 3.2).

Tablo 3.2. Birleştirme İşlemi sonucunda Elde edilen okumaların Verileri

Örnek Adı	Okuma sayısı	GC Oranı(%)	Nükleotid Sayısı
SEO	103.850.556	39.2 %	26.066.489.556
Ordubatbenzeri	125.862.694	38.9 %	31.591.536.194
Zard	125.298.896	39.2 %	31.450.022.896

3.3.2. HTS Sonrası Örneklerin Filtreleme, Temizleme İşlemi Sonuçları PPVres lokuslarının elde edilmesi

Genom sıralamasından sonra dizi uçlarındaki hatalı, düşük kaliteli okumalar düzgün bir genom dizilemesini önlemektedir. Bunun için okumaların düzeltilmesi önemli olmaktadır. Geneious programında BBDuk düzeltme aracı bulunmaktadır. BBDuk aracında bir "Q" değeri bulunmakta ve bu Phred puanı olarak bilinmektedir (değiştirilmiş Mott algoritması). Illumina okumalar için minimum Q değerinin 20'ye ayarlanmasını önermektedir. Bu nedenle çalışmada Q değeri 20 olarak ayarlanmış ve filtreleme, temizleme işlemleri gerçekleştirilmiştir.

Temizleme işlemlerinden sonra, SEO örneği için 94.975.040 temiz okuma sayısı elde edilmiştir ve GC oranı 38.6'dır. Toplam nükleotid sayısı ise 19.806.141.708'dir. Ordubatbenzeri için 116.835.356 ile GC oranı 38.3 olan temiz okuma elde edilmiştir. Toplam nükleotid sayısı ise 24.656.268.363'tür. Zard çeşidinden ise toplam 113.792.588 temiz okuma sayısı ile GC oranı 38.5 olarak tespit edilmiş ve toplam nükleotid sayısı ise 23.863.224.916 elde edilmiştir (Tablo 3.3).

Tablo 3.3. Geneious programı ile filtreleme ve temizleme işlemi sayısal verileri

Örnek Adı	Okuma sayısı	GC Oranı(%)	Nükleotid Sayısı
SEO	94.975.040	38.6 %	19.806.141.708
Ordubatbenzeri	116.835.356	38.3 %	24.656.268.363
Zard	113.792.588	38.5 %	23.863.224.916

Şeftali birinci kromozomu ile Hacıhaliloğlu kromozomu karşılaştırılması sonucunda, Hacıhaliloğlu'nda 357.380 nükleotid uzunluğunda *PPVres* lokusu elde edilmiştir. Bu lokusun GC oranı 32.3 olarak belirlenmiştir.

SEO okumalarının, Hacıhaliloğlu *PPVres* lokusu ile kıyaslaması sonucunda, SEO'da 355.785 nükleotid uzunluğunda *PPVres* lokusu elde edilmiştir. Bu lokusun GC oranı 32.5 olarak bulunmuştur.

Ordubatbenzeri okumalarının, Hacıhaliloğlu *PPVres* lokusu ile eşleştirilmesi sonucunda Ordubatbenzeri'nde 356.621 nükleotid uzunluğunda *PPVres* fragmanı elde edilmiştir. Bu fragmanın GC oranı 32.7 olarak bulunmuştur.

Zard okumalarının, Hacıhaliloğlu *PPVres* lokusu ile eşleştirilmesi sonucunda Zard'da 357.213 nükleotid uzunluğunda *PPVres* fragmanı elde edilmiştir. Bu fragmanın GC oranı 32.7 olarak bulunmuştur.

3.3.3. SSR lokusları

Tez çalışmasındaki 3 çeşidin HTS verilerinin düzenlenmesi ve Hacıhaliloğlu *PPVres* lokusuna eşleştirilmesiyle her çeşit için *PPVres* lokusları elde edilmiştir. Elde edilen *PPVres* lokuslarında SSR'ler SSRIT-Gramene (<https://archive.gramene.org/db/markers/ssrtool>) yazılımı kullanılarak keşfedilmiştir. Toplamda 103 SSR lokusu keşfedilmiştir. Bu lokusların 88 tanesi di- tekrar, 12 tanesi tri- tekrar, 3 tanesi ise tetra- tekrar olarak belirlenmiştir. Bu yeni SSR lokuslarının 58 tanesinde polimorfik olduğu tespit edilmiştir (Tablo 3.4).

Tablo 3.4. Keşfedilen Yeni SSR Lokusları. Polimorfik lokuslar mavi renkte işaretlenmiştir.

	Hacıhaliloğlu		Ordubatbenzeri		SEO		Zard	
	Motif	Tekrar Sayısı	Motif	Tekrar Sayısı	Motif	Tekrar Sayısı	Motif	Tekrar Sayısı
1	at	5	at	5	at	5	at	5
2	ga	8	ga	8	ga	8	ga	7
3	gt	7	gt	7	?	?	?	?
4	gt	6	?	?	tg	8	tg	8
5	ag	26	ag	26	ag	26	ag	26
6	ct	7	ct	7	ct	7	ct	7
7	?	?	tc	7	tc	7	tc	7
8	tc	5	tc	5	tc	5	tc	5
9	ag	18	ag	18	ag	18	ag	18
10	at	10	at	12	at	12	at	13
11	ga	5	?	?	ga	5	?	?
12	at	10	at	10	?	?	at	14
13	at	10	at	17	at	10	at	17
14	ac	5	ac	5	ac	5	ac	5
15	at	16	at	16	at	17	at	16
16	at	17	at	10	at	16	at	11
17	ta	9	ta	9	ta	9	ta	9
18	ta	5	ta	5	ta	5	ta	5
19	?	?	?	?	ac	7	ac	5
20	at	9	?	?	at	9	?	?
21	at	9	at	8	at	6	at	6
22	ag	19	ag	19	ag	19	ag	19
23	?	?	ag	6	ag	6	ag	6
24	ta	5	ta	5	ta	9	ta	5
25	ta	5	ta	7	ta	5	ta	5
26	ca	6	ca	6	ca	6	ca	6
27	ga	9	ga	9	ga	9	ga	8
28	ga	5	ga	5	ga	5	ga	5
29	?	?	ag	5	ag	9	ag	9
30	ga	9	ga	6	?	?	?	?
31	at	9	at	9	at	9	at	9
32	ta	13	ta	13	ta	13	ta	13
33	tc	26	tc	27	tc	26	tc	27
34	ga	7	ga	7	ga	7	ga	7
35	ta	12	ta	14	ta	14	ta	14

36	?	?	tg	6	?	?	?	?
37	ta	7	ta	5	at	7	at	7
38	at	6	at	6	at	9	at	10
39	ta	22	ta	22	ta	22	ta	22
40	ta	5	ta	5	?	?	?	?
41	ct	9	ct	10	ct	10	ct	10
42	?	?	ct	12	ct	15	ct	15
43	?	?	ct	12	ct	10	ct	10
44	at	5	at	5	at	5	at	5
45	ta	9	?	?	?	?	ta	9
46	ag	29	ag	28	ag	26	ag	28
47	ga	18	ga	18	ga	18	ga	18
48	ta	9	ta	9	ta	13	?	?
49	ct	5	ct	5	ct	5	ct	5
50	tc	5	tc	5	tc	5	tc	5
51	ta	5	ta	5	ta	5	ta	5
52	ta	8	ta	9	ta	10	ta	9
53	ag	7	ag	7	ag	7	ag	7
54	ga	5	ga	5	ga	5	ga	5
55	ag	33	ag	33	ag	33	ag	33
56	ga	19	ga	19	?	?	ga	19
57	?	?	?	?	ag	22	?	?
58	gt	13	gt	13	gt	13	gt	13
59	ag	10	ag	11	ag	10	ga	11
60	ga	5	ga	6	ga	6	ag	7
61	?	?	?	?	?	?	ag	12
62	ga	5	ga	5	ga	5	ga	5
63	ag	5	ag	5	ag	5	?	?
64	ga	5	ga	5	ga	5	ga	5
65	at	7	at	7	at	7	at	7
66	at	5	at	5	at	5	at	5
67	?	?	?	?	?	?	at	5
68	ga	5	ga	5	ga	5	?	?
69	tc	8	tc	8	tc	8	tc	8
70	ct	27	ct	27	ct	27	ct	27
71	tc	25	tc	25	tc	25	tc	25
72	ta	11	ta	13	ta	14	ta	13
73	ta	6	ta	6	ta	6	ta	6
74	at	11	at	15	?	?	at	9
75	ta	16	ta	16	ta	16	ta	16
76	ta	5	ta	5	ta	5	ta	5
77	ag	11	ag	11	ag	11	ag	11

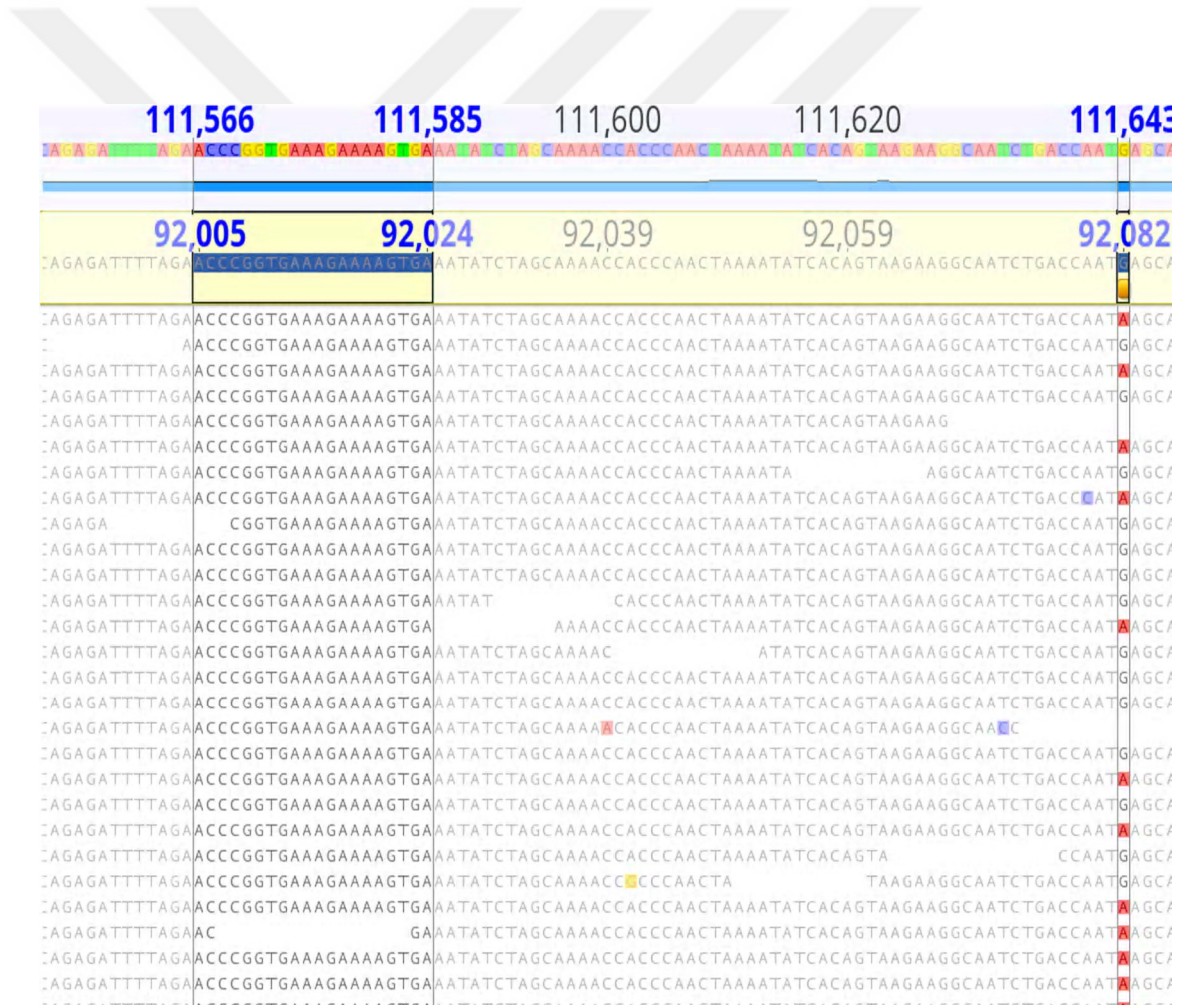
78	ag	5	ag	5	ag	5	ag	5
79	?	?	?	?	tg	10	tg	10
80	?	?	?	?	tg	22	tg	22
81	gt	21	gt	44	?	?	?	?
82	ga	24	ga	24	ga	24	ga	24
83	tc	5	tc	5	tc	5	tc	5
84	tg	5	tg	5	tg	5	?	?
85	?	?	?	?	?	?	ca	5
86	tc	9	tc	9	tc	9	tc	9
87	?	?	?	?	ca	5	ca	5
88	at	6	at	6	at	6	at	6
89	ctg	5	ctg	5	ctg	5	ctg	5
90	tga	5	tga	5	tga	5	tga	5
91	gtg	5	gtg	5	gtg	5	gtg	5
92	?	?	ggt	12	ggt	12	ggt	12
93	?	?	tgg	6	tgg	6	tgg	23
94	ggt	16	ggt	16	ggt	16	?	?
95	?	?	aat	9	aat	8	aat	7
96	?	?	?	?	?	?	aat	5
97	ggt	9	ggt	9	ggt	9	ggt	9
98	aga	5	aga	5	aga	5	aga	5
99	?	?	taa	5	?	?	taa	5
100	aat	9	?	?	aat	5	?	?
101	?	?	taaa	5	taaa	5	?	?
102	?	?	?	?	?	?	tatg	5
103	?	?	?	?	?	?	tttc	6

3.3.4. Önceki Çalışmalarda rapor edilen *PPVres* lokusu markörlerinin 4 Kayısı Çeşidinde Tespit edilmesi

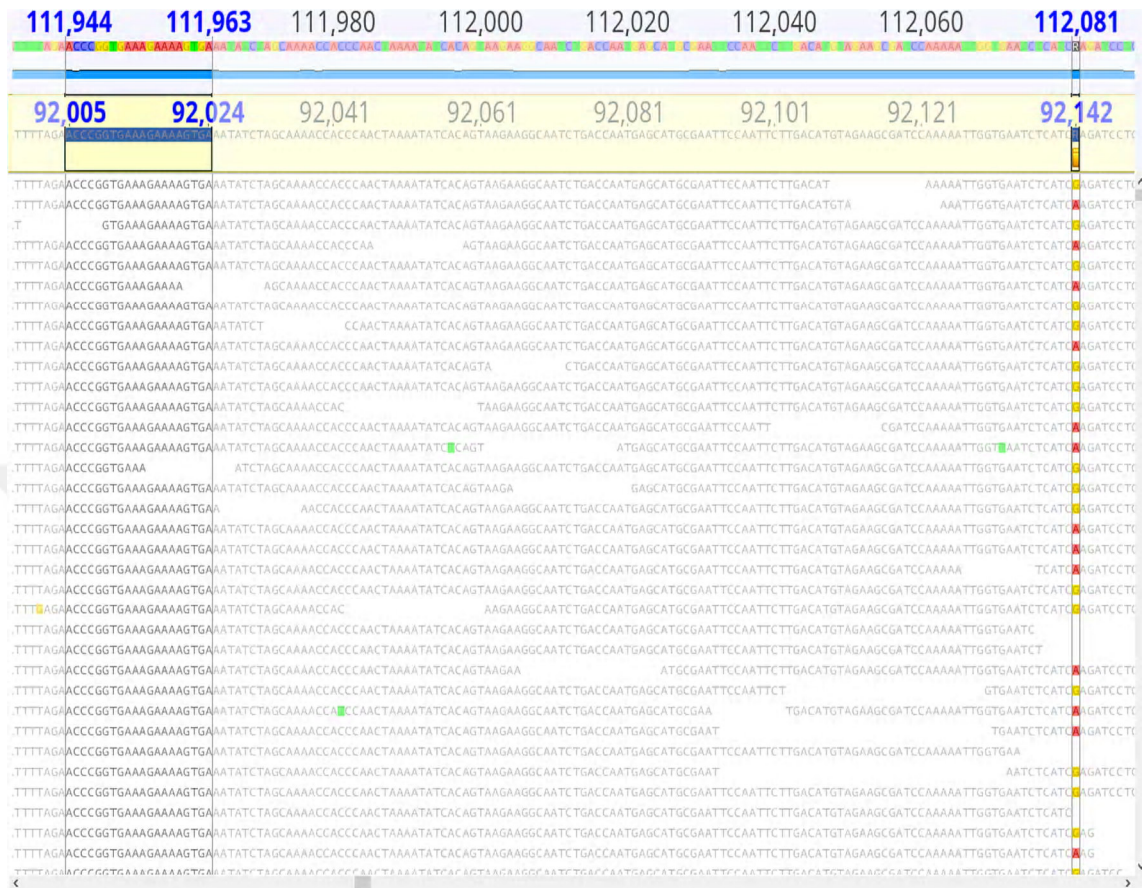
PPV dayanıklılık lokusu ile ilişkili moleküler markörler Passaro ve arkadaşları (2017)'nin çalışmasında özetlenmiştir. Passaro ve arkadaşları (2017)'nin çalışmasında bahsedilen 3 SNP lokusu (PGS1.21_SNP, ZP002_SNP ve ZP002_DEL) iki SSR lokusu (PGS1.21, PGS1.24) bu tez çalışmasında kontrol edilmiş, 4 kayısı çeşidinin rapor edilen markörleri taşıyıp taşımadıkları, böylece bu markörlerin güvenilir olup olmadıkları belirlenmiştir.

a) PGS1.21_SNP primerinin 4 kayısı çeşidindeki sonuçları

Passaro ve arkadaşları (2017) PGS1.21_SNP markörü için PPV'ye dayanlı çeşitlerin Adenin nükleotidini taşıdığını bildirmiştir. PPV'ye hassas olan Hacihaliloğlu genotipinin Guanin nükleotidini homozigot taşıdığı tespit edilmiştir. Diğer hassas çeşit Ordubatbenzeri genotipinin ise Adenin/Guanin nükleotidlerini heterozigot olarak taşıdığı belirlenmiştir (Şekil 3.4). Dayanıklı SEO çeşidinin Adenin/Guanin lokusu için heterozigot olduğu (Şekil 3.3), diğer dayanıklı Zard çeşidinin, dayanıklılıkla ilişki Adenin nükleotidini taşımadığı, hassaslıkla ilişkili Guanin nükleotidini homozigot olarak taşıdığı belirlenmiştir (Şekil 3.5).



Şekil 3.3. SEO dizisinde bulunan PGS.1.21_SNP lokusu. PGS.1.21_SNP markörünün 5' primer dizisi 111566-111585. nükleotidleri arasında görülmektedir. Dayanıklılıkla ilişkili A/G SNP lokusu 111643. nükleotidde görülmektedir.



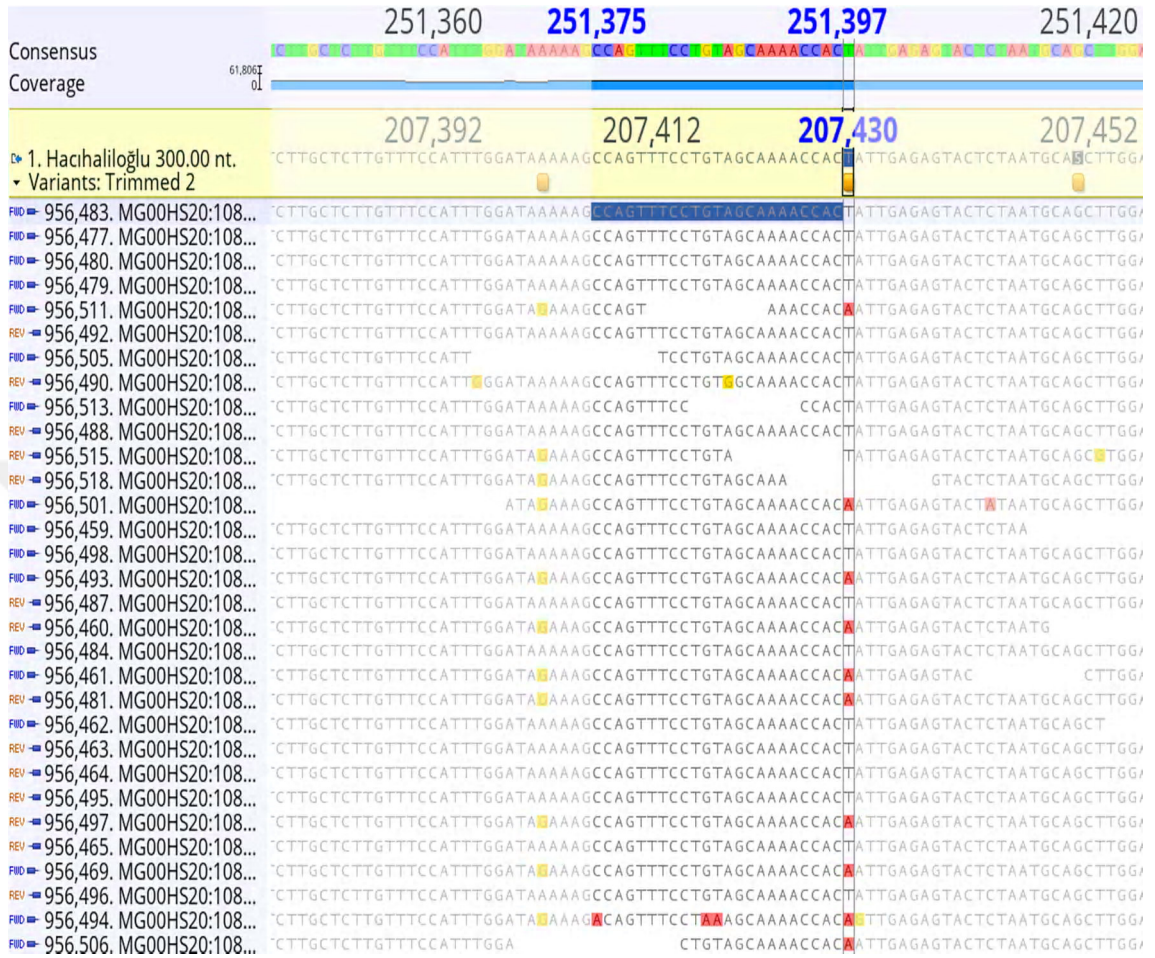
Şekil 3.4. Ordubatbenzeri dizisinde bulunan PGS.1.21_SNP lokusu. PGS.1.21_SNP markörünün 5' primer dizisi 111944-111963. nükleotidleri arasında görülmektedir. Dayanıklılıkla ilişkili A/G SNP lokusu 112081. nükleotide görülmektedir.



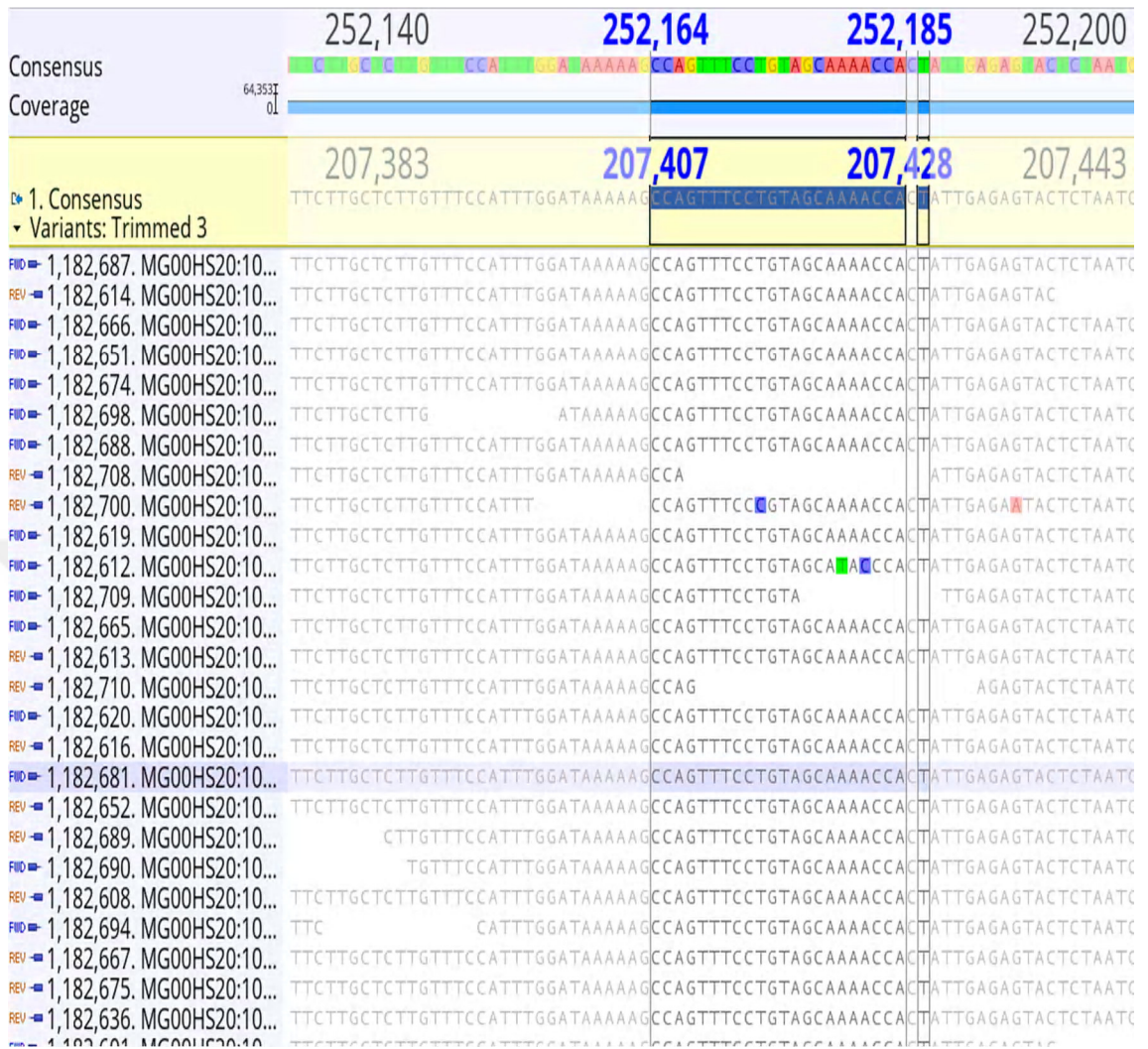
Şekil 3.5. Zard dizisinde bulunan PGS.1.21_SNP lokusu. PGS.1.21_SNP markörünün 5' primer dizisi 112105-112124. nükleotidleri arasında görülmektedir. Dayanıklılıkla ilişkili Guanin SNP lokusu 112242. nükleotide görülmektedir.

b) ZP002_SNP primerinin 4 kayısı çeşidindeki sonuçları

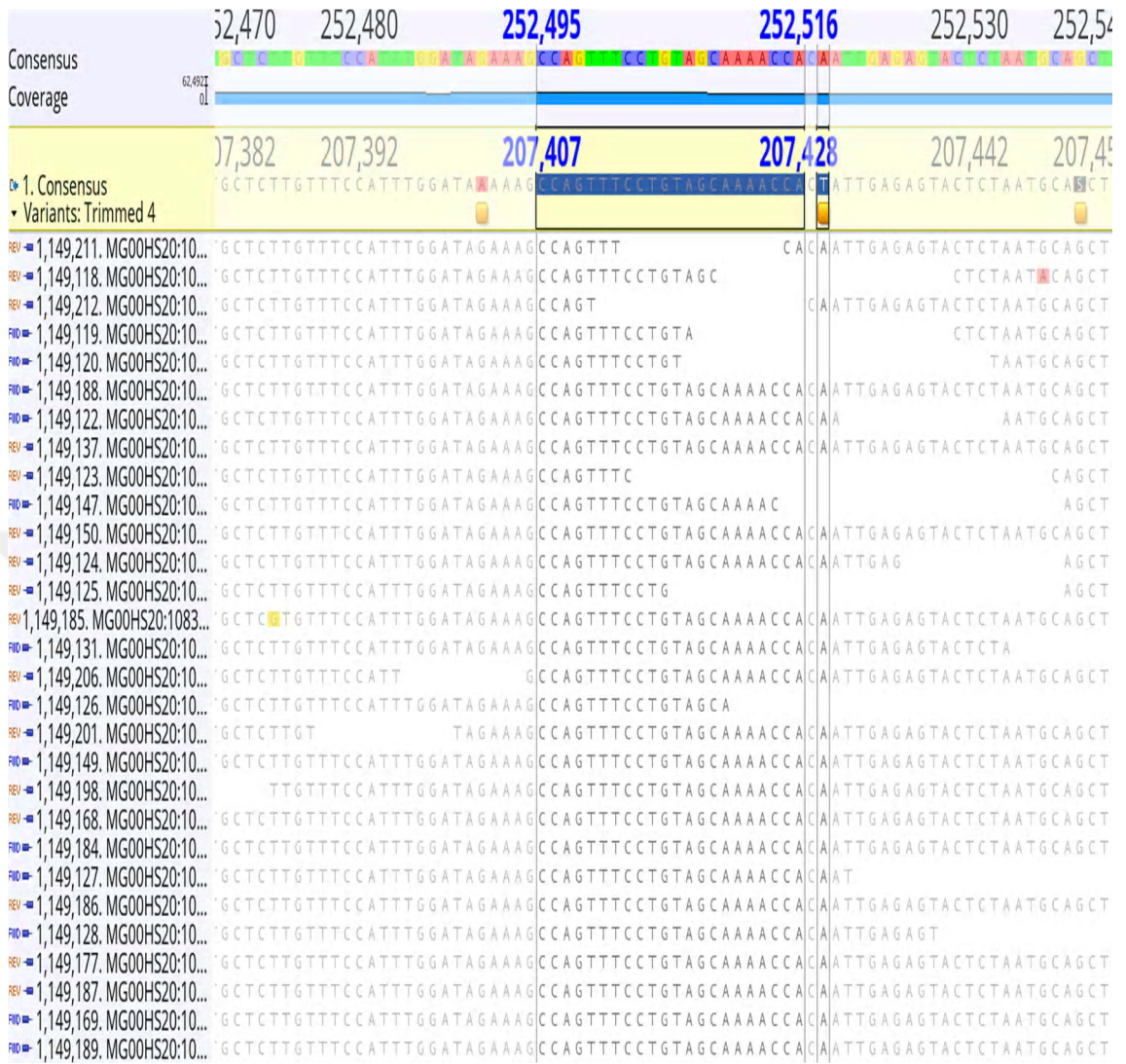
Passaro ve arkadaşları (2017), PPV'ye dayanıklı genotiplerin ZP002_SNP lokusunda Adenin nükleotidini, hassas genotiplerinde Timin nükleotidinin bulunduğunu bildirmiştir. SEO genotipinin Adenin/Timin nükleotidlerini taşıdığı ve genotipin bu lokus için heterozigot olduğu keşfedilmiştir (Şekil 3.6). PPV'ye hassas olan Ordubatbenzeri çeşidinin beklendiği gibi Timin nükleotidini taşıdığı ve genotipin bu lokus için homozigot olduğu görülmüştür (Şekil 3.7). Zard genotipinin Adenin nükleotidini taşıdığı ve genotipin bu lokus için homozigot olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.8).



Şekil 3.6. SEO dizisinde bulunan ZP002_SNP lokusu. ZP002_SNP markörünün 5' primer dizisi 251375-251396. nükleotidleri arasında görülmektedir. Dayanıklılıkla ilişkili A/T SNP lokusu 251397. nükleotidde görülmektedir.



Şekil 3.7. Ordubatbenzeri dizisinde bulunan ZP002_SNP lokusu. ZP002_SNP markörünün 5' primer dizisi 252164-252183. nükleotidleri arasında görülmektedir. Dayanıklılıkla ilişkili Timin SNP lokusu 252185. nükleotidde görülmektedir.

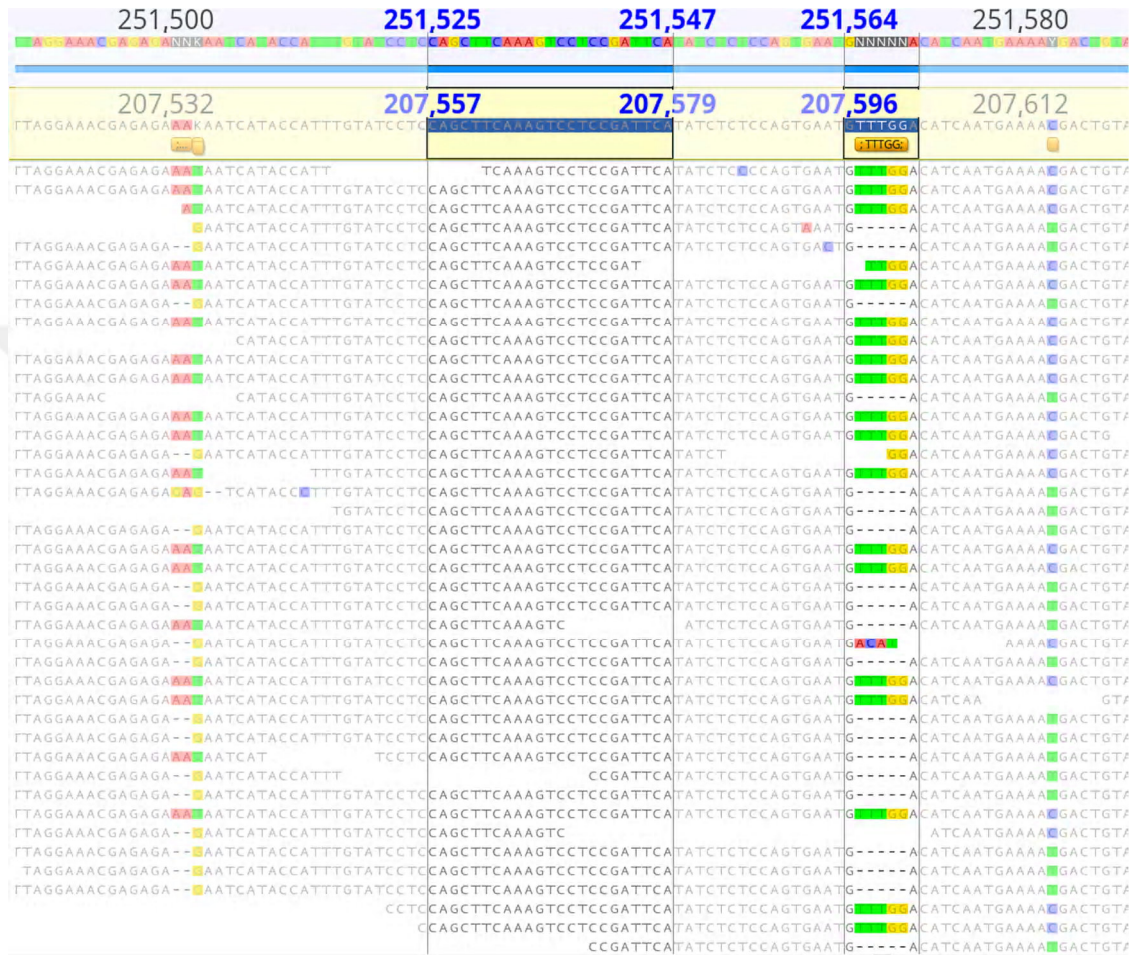


Şekil 3.8. Zard dizisinde bulunan ZP002_SNP lokusu. ZP002_SNP markörünün 5' primer dizisi 252495-252514. nükleotidleri arasında görülmektedir. Dayanıklılıkla ilişkili Adenin SNP lokusu 252516. nükleotide görülmektedir.

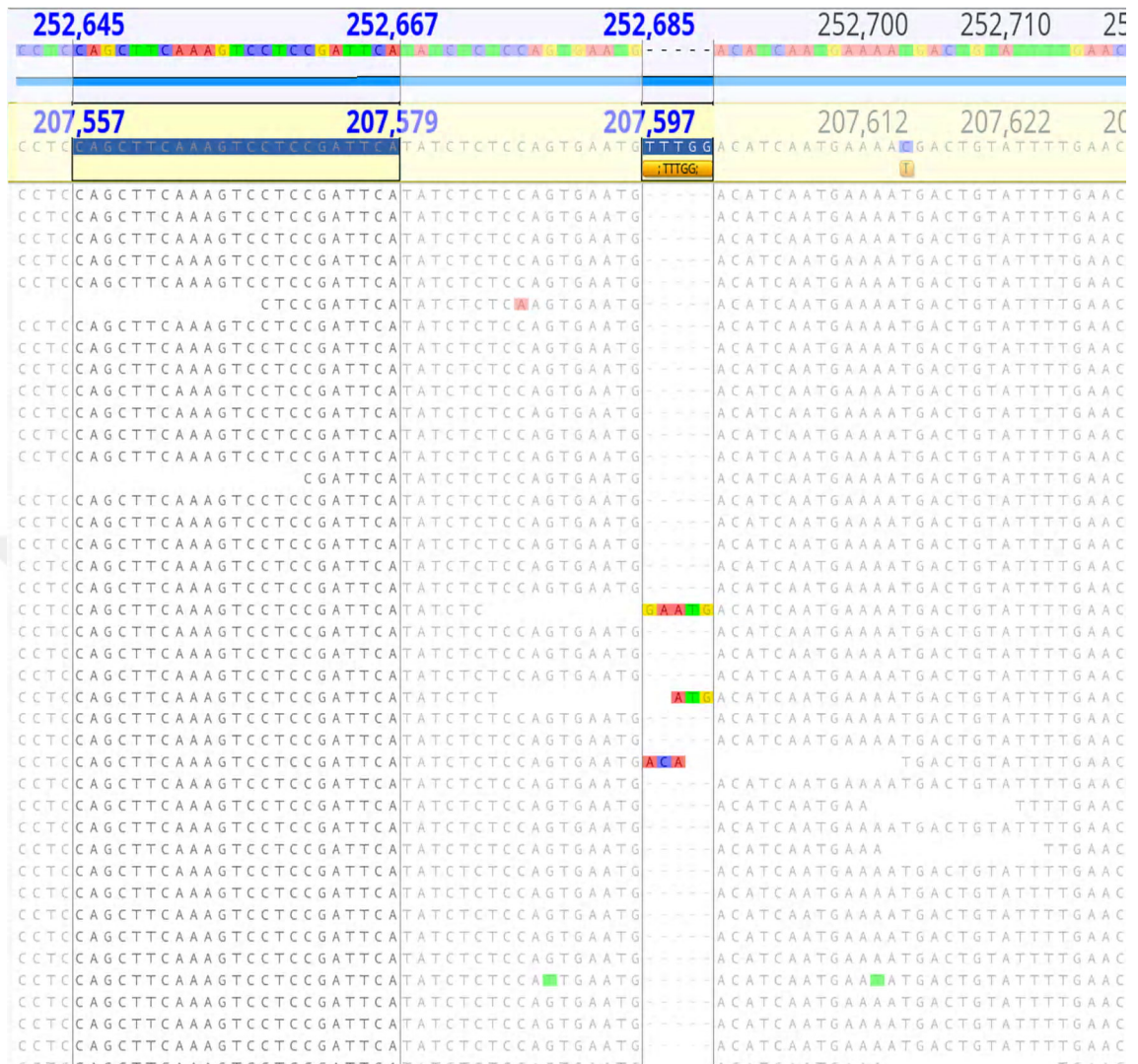
c) ZP002_DEL primerinin 4 kayısı çeşidindeki sonuçları

Passaro ve arkadaşları (2017), PPV'ye dayanıklı genotiplerde *PPVres* lokusunda 5 bç'lik bir GTTTG delesyonunun olduğunu, hassas genotiplerde ise bu delesyonun bulunmadığını bildirmiştir. Hacıhalioğlu ve Ordubatbenzeri çeşitlerinde delesyon tespit edilmemiş olup, PPV'ye dayanıksız olan bu iki çeşidin bu lokusta beklendiği gibi homozigot dayanıksız oldukları anlaşılmıştır (Şekil 3.10). SEO çeşidinde *PPVres* lokusunda 5 bç'lik delesyonun olduğu ve genotipin bu lokus için heterozigot olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.9). Diğer dayanıklı çeşit Zard'da ise 5 bç'lik delesyonun anneden

be babadan gelen her iki lokusda da bulunduğu ve yani Zard'ın bu lokus için homozigot dayanıklı olduğu belirlenmiştir (Şekil 3.11).



Şekil 3.9. SEO dizisinde bulunan ZP002_DEL lokusu. ZP002_DEL markörünün 5' primer dizisi 251525-251547. nükleotidleri arasında, dayanıklılıkla ilişkili delesyon 252564-252569. nükleotidleri arasında görülmektedir.



Şekil 3.11. Zard dizisinde bulunan ZP002_DEL lokusu. ZP002_DEL markörünün 5' primer dizisi 251645-251667. nükleotidleri arasında görülmektedir. Dayanıklılıkla ilişkili Delesyon 252685-252690. nükleotidler arasında görülmektedir.

d) PGS1.21 ve PGS1.24 SSR primerlerinin 4 kayısı çeşidinde elde edilen sonuçları

PPV dayanıklılığı ile bağlantılı olduğu belirtilen ve moleküler olarak PPV dayanıklılığının taranmasında kullanılan iki adet SSR (PGS1.21, PGS1.24) lokusu 4 adet kayısı çeşidi *PPVres* lokusunda incelenmiştir. Hacıhaliloğlu çeşidinde kapılar elektorforez ile 214/220 alleleri belirlenmiş, HTS okumalarında ise Hacıhaliloğlu çeşidinin 210, 216 ve 220 lokuslarını taşıdığı belirlenmiştir. Ordubatbenzeri için ise kapılar elektorforez ile 214/216 alleleri belirlenmiş, HTS okumalarında ise 210, 212 ve

220 lokusları belirlenmiştir. Zard ve SEO genotiplerinde ise kapılar elektorforez ile belirlenen alleler, HTS sekanslama verilerinde tespit edilmemiştir. HTS kısa okumalar tekrar dizilerindeki farklılıkların tespit edilmesine imkân vermemiştir. PGS24 (SSR) lokusunda, HTS dizileme verilerinde dört kayısı çeşidi için de tekrar dizi farklılıkları tespit edilememiştir.

3.3.5. 3 Kayısı Çeşidinin *PPVres* Lokuslarında Tespit Edilen SNP/İndel Varyasyonları

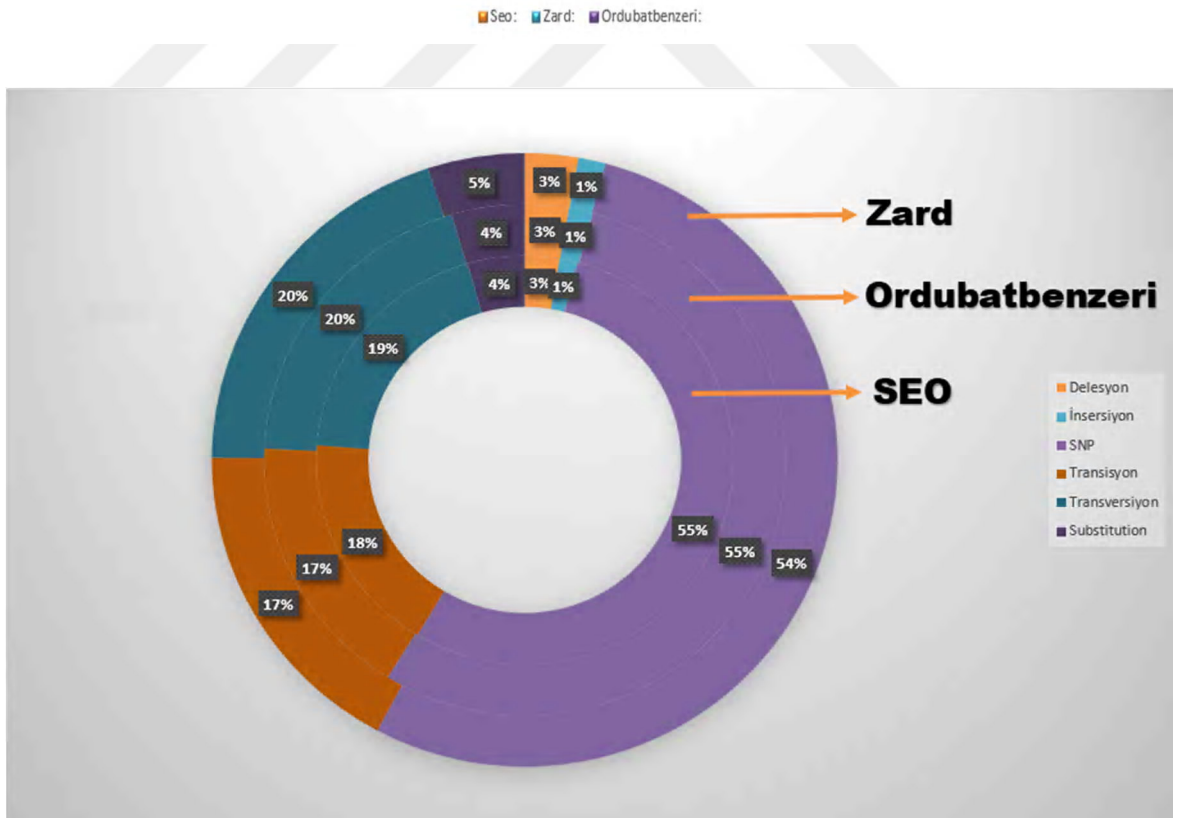
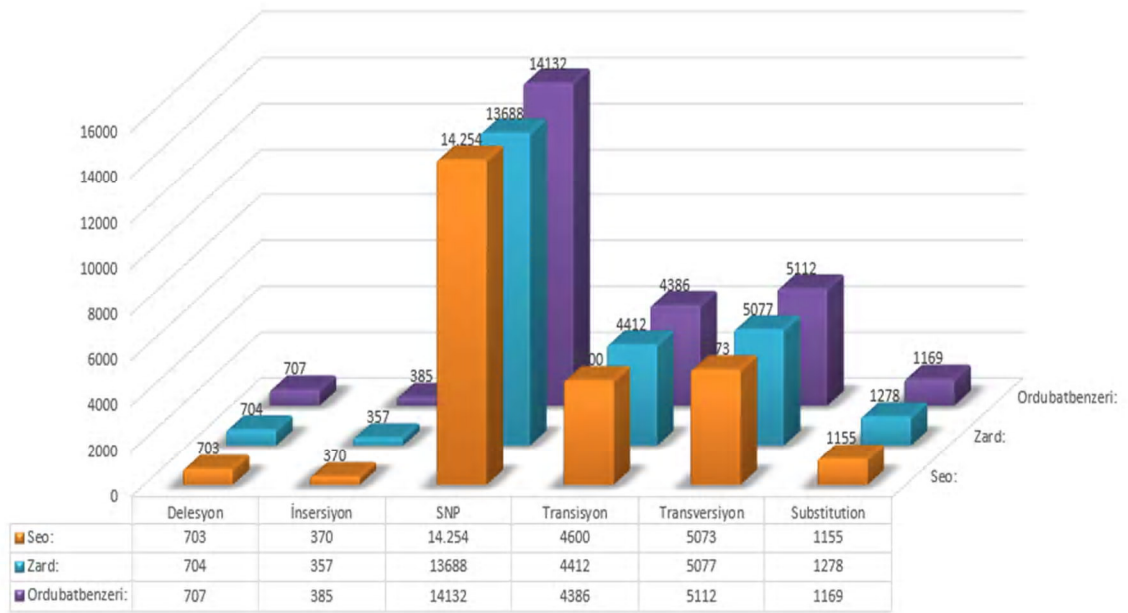
Ordubatbenzeri çeşidinde; Delesyon (silinme): 707 adet, İnsersiyon: 385 adet, Tek nükleotid baz değişimi (SNP): 14.132 adet, Transisyon: 4.386 adet, Transversiyon: 5.112 adet; Substitution: 1.169 adet olmak üzere toplam 25.891 varyasyon belirlenmiştir (Tablo 3.5).

SEO çeşidinde; Delesyon (silinme): 703, İnsersiyon: 370, Tek nükleotid baz değişimi (SNP): 14.254, Transisyon: 4.600, Transversiyon: 5073, Substitution: 1.155 olmak üzere toplam 26.155 varyasyon tespit edilmiştir (Tablo 3.5).

Zard çeşidinde; Delesyon (silinme): 704, İnsersiyon: 357, Tek nükleotid baz değişimi (SNP): 13.688, Transisyon: 4.412, Transversiyon: 5.077, Substitution: 1.278 tane olmak üzere toplamda 25.516 varyasyon tespit edilmiştir (Tablo 3.5).

Tablo 3.5. Kayısı Genotiplerinde Belirlenen Varyasyonların Sayısal Değerleri

<i>Kayıtı genotipleri</i>	<i>SEO</i>	<i>Ordubatbenzeri</i>	<i>Zard</i>
<i>Delesyon</i>	703	707	704
<i>İnsersiyon</i>	370	385	357
<i>SNP</i>	14.254	14.132	13.688
<i>SNP Transisyon</i>	4.600	4.386	4.412
<i>SNP Transversiyon</i>	5.073	5.112	5.077
<i>Substitution</i>	1.155	1.169	1.278
<i>Toplam Varyasyon</i>	26.155	25.891	25.516



Şekil 3.15. Üç Kayısının Varyasyonlarının Sayısal ve Yüzdelerik verileri

4.BÖLÜM

4.1. TARTIŞMA-SONUÇ ve ÖNERİLER

Kayısı dünya çapında ılıman bölgelerde yetişebilmektedir. Şarka olarak da bilinen *Plum pox virüsü* (PPV), kayısı, şeftali, erik, vişne olmak üzere *Prunus* türlerine ciddi zararlar vermekte ve bu hastalık sert çekirdekli meyvelerde verim ve kaliteyi düşürmektedir. Yıllardır süren çalışmalara rağmen hastalık ile etkin bir mücadele yöntemi geliştirilememiştir.

PPV'ye dayanıklı kayısıların moleküler genetikleri araştırılarak çeşitli segregasyon ve moleküler haritalama çalışmaları bildirilmiştir. Bu çalışmalar ile PPV dayanıklılığının tek genle, 2 genle veya 3 gen ile kontrol edildiğini gösteren çalışmalar yayınlamıştır. Aynı zamanda minor dayanıklılık lokuslarının BG3 ve BG5'te yer aldığı rapor edilmiştir [62, 63]. Daha sonra BG1'in üst kısmında yer alan *PPVres* adı verilen büyük bir lokusun dayanıklılığın % 70'inden sorumlu olduğu rapor edilmiştir [66, 67]. İlerleyen çalışmalar ile PPV'ye dayanıklı olan "Goldrich" kayısı çeşidinde *PPVres* lokusunun fiziksel haritası oluşturularak *PPVres* lokusu 196 kb'lik bölgeye kadar daraltılmıştır [16].

Prunus türlerine özgü SSR ve SNP markörleri geliştirilmiştir. Bunların birçoğu dayanıklılık genini bulmak için yapılan kayısı genetik haritalarında kullanılmıştır. Dirlewanger ve arkadaşları (2002, 2006) dayanıklılık için şeftalide 55 SSR markörü [94, 95], Aranzana ve arkadaşları (2002) şeftali genomik kaynağından 27 SSR markörü yayınlamışlardır [96]. Hagen ve arkadaşları (2004) kayısıda 21 SSR markörü [97], Howad ve arkadaşları (2005) şeftalide 6 SSR markörü [98], Yamamoto ve arkadaşları (2002, 2005) şeftalide 58 SSR markörü [99,100], Decroocq ve arkadaşları (2003) kayısıda 10 SSR markörü [101], Lopes ve arkadaşları (2002) 21 SSR markörünü rapor etmişlerdir [102]. Testolin ve arkadaşları (2004) *P. dilcus*'ta 29 SSR markörünü [103], Vilanova ve arkadaşları (2006) kayısıda 10 SSR markörü [104], Messina ve arkadaşları

(2004) kayısında PPV dayanıklılığını belirleyebilmek için 20 SSR markörünü rapor etmiştir [105].

Soriano ve arkadaşları (2008) BG1 üzerinde tespit ettikleri 2 SSR markörünün (“ssrPACITA5” ve “ssrPaCITA17”) MAS kullanılabileceğini bildirmiştir [61]. Soriano ve arkadaşları (2012) tarafından yapılan çalışmada *PPVres* lokusu üzerinde üç basit dizi tekrarı (SSR) (PGS 1.21, 1.23 ve 1.24) markörü geliştirmişlerdir [17]. Ardından Zuriaga ve arkadaşları (2013) yaptıkları çalışmada *PPVres* lokusunu, 196 kb'lik bir bölgeye kadar daraltmış [16] ve Decroocq ve arkadaşları (2014) daraltılan 196kb'lik bölgede, 5 bç'lik bir delesyonun keşfetmişlerdir. 5 bç delesyon belirlemek için ZP002 adlı tek dizi uzunluk polimorfizmi (SSLP) markörünü geliştirmiştir [18]. Salazar ve arkadaşları (2015) iki kayısı genotipinde SNP ve INDEL çalışması yapmış ve BG1 üzerinde Rojo Pasi3n'da 65.140 ve Z506-7'de 67.402 SNP keşfetmişlerdir. Bu SNP'lerden 99 tanesini analiz etmiş ve 37 tanesinin polimorfik olduğunu göstermişlerdir. G3rcan ve arkadaşları (2017) kayısı transkriptom çalışmalarında 206 SSR lokusu belirlemiştir. Bunların 72 tanesinin polimorfik olduğunu rapor etmiştir. Passaro ve arkadaşları (2017), PGS 1.21, ZP002 ve PGS 1.24 mark3rleri için y3ksek 3z3n3rl3kl3 erime (HRM) analizlerini geliştirmiştir [19]. Bu tez çalışmasında da Şeftali birinci kromozomu ile Hacihaliloğlu genomu karşılaştırılmış ve *PPVres* lokusu belirlenmiştir. Ardından 3 çeşidin genomları Hacihaliloğlu *PPVres* lokusu ile 3 çeşidin genomu kıyaslanmış ve *PPVres* fragmanları elde edilmiştir. Bu *PPVres* lokuslarında ise Ordubatbenzerinde için 25.891, SEO için 26.155, Zard için 25.516 SNP lokusu keşfedilmiştir. Ayrıca fragmanlar 3zerinde 103 SSR lokusu belirlenmiş ve 34 tanesinin polimorfik olduğu tespit edilmiştir.

Bu tez çalışmasında, 3nceki çalışmalar ile *PPVres* lokusunda dayanıklılıkla birlikte aktarıldığı belirlenen lokuslar t3m çeşitlerde tespit edilmiştir. 3 SNP/indel lokusunun 4 kayısı çeŐitlerindeki allelleri de g3venilir olarak belirlenmiştir. Hacihaliloğlu genotipinde PGS1.21_SNP mark3r3 için beklendiği gibi homozigot Guanin n3kleotidini taşıdığı, SEO ve Ordubatbenzeri genotipinin Adenin/Guanin n3kleotidlerini heterozigot taşıdığı, Zard eşidi dayanıklı olmasına rağmen dayanıklılıkla bağlı olduğu rapor edilen Adenin n3kleotidi yerine Guanin n3kleotidini homozigot taşıdığı g3sterilmiŐtir. PGS1.21_SNP primerinin g3venilir olmadığı belirlenmiştir. Diğer iki lokusda (PGS1.24_SNP ve ZP002_Del) ise beklenen alleller g3zlenmiŐ olup, en azından 4 çeŐitte g3venilirlikleri teyit edilmiştir.

PPV dayanıklılığı ile ilişkili olduğu belirtilen ve moleküler olarak PPV dayanıklılığının taranmasında kullanılan iki adet SSR (PGS1.21, PGS1.24) lokusu 4 adet kayısı çeşidi *PPVres* lokusunda incelendiğinde ise yine lokusların pozisyonu doğru olarak belirlenmiş fakat anne ve babadan gelen alleller sağlıklı tespit edilememiştir. Okumaların tekrar bölgelerinde beklenen uzunlukta üretilmediği, birçok kısa uzunlukta tekrar bölgesinin olduğu görülmüştür. Birçok farklı uzunluktaki tekrar okuması nedeniyle PCR'da üretilen alleler okumalarda tespit edilememiştir. HTS okumalarının SSR lokuslarının incelenmesinde güvenilir bir yöntem olmadığı sonucuna varılmıştır.

PPV dayanıklılığı ile ilişkili markörlerin güvenilir olmadığı daha önceki çalışmalarda da belirtilmiştir. Rubio ve arkadaşları (2014), *PPVres* lokusu ile ilişkili markörlerle (PGS1.21, PGS1.23 ve PGS1.24) 80 kayısı çeşit ve tipini genotiplendirmiş ve dayanıksız çeşidi 'Alba' ve (1002)8-6 genotipinin, *PPVres* ilişkili markörleri gösterdiğini de bildirmiştir [68]. Decroocq vd. (2014), *PPVres* lokusu ile ilişkili markörlerin dayanıklı kayısı seçiminde tam olarak güvenilir olmadığını belirtmiştir. Gürcan ve arkadaşları (2019) *PPVres* ile ilişkili markörlerin tamamını kullanarak Türkiye kayısılarını taramış ve PPV dayanıklılığı için fenotipik ve genotipik tarama arasında uyumsuzluklar olduğu rapor etmiştir [9]. Çalışmada Yılbata çeşidi biyolojik testlemede hassas bulunurken, moleküler markörler ile dayanıklı bulunmuştur. Bu tez çalışmasında, yukarıda belirtildiği gibi daha önceki çalışmalarda rapor edilen SNP ve İndel lokusları HTS okumalarında başarılı bir şekilde tespit edilebilmiştir. Dayanıklılıkla ilişkili güvenilir markörlerin keşfedilmesi gerekmektedir.

Sonuç olarak, bu tez çalışmasında 3 kayısı genotipinde *PPVres* lokusları elde edilmiş, bu lokus üzerinde bulunan ve dayanıklılıkla ilişkili olduğu rapor edilen 5 markörün pozisyonu ve polimorfizmi incelenmiştir. 1 adet SNP primerinin beklenen allelere sahip olmadığı, dayanıklılıkla ilişkili markör olarak kullanılmayacağı belirlenmiştir. SSR allelerin HTS dizilerinde teyit edilmesinin kolay olmadığı anlaşılmıştır. Çalışmada ayrıca *PPVres* lokusu taranarak polimorfik SSR lokusları ve SNP varyasyonları belirlenmiştir. Tez çalışmasında tespit edilen bu varyasyonlar, *PPVres* bölgesinde yer alan PPV dayanıklılık gen veya genlerinin keşfedilmesi ve MAS çalışmaları için markörlerin geliştirilmesinde kullanılacaktır.

KAYNAKÇA

1. Özçagıran, R., Ünal, A., Özeke, E., İsfendiyaroglu, M., 2004. Ilıman İklim Meyve Türleri Sert Çekirdekli Meyveler, Cilt 1. **Ege Üniversitesi Basımevi**, **67**: 92, Bornova, İzmir.
2. FAO, 2017. <http://www.fao.org> (Erişim Tarihi: 1 Haziran 2019)
3. Asma, B. M., 2000. Kayısı Yetiştiriciliği, **Evin Ofset**. Malatya.
4. Abacı, Z.T., 2011. Bazı Kayısı Genotiplerinde Eşeyssel Uyuşmazlık Durumlarının Arazi Koşullarında ve Moleküler Tekniklerle Araştırılması, İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi. Malatya.
5. Martinez-Gomez, P., Dicenta, F., 2000. Evaluation Of Resistance Of Apricot Cultivars To A Spanish İsolate Of Plum Pox Potyvirus (PPV). **Plant Breeding**, **119**: 179–181.
6. Elibüyük, S.O., Erdiller, G., 1995. The susceptibility of some apricot and plum varieties to Plum pox (Sharka) virus, **Acta Horticulturae**, **384**: 549–552.
7. Çağlayan., K., Ulubaş Serçe., Ç, Gazel, M., Polat, A., Voight, E., 2004. Reaction of Some Turkish Plum and Apricot Cultivars to Plum Pox Virus. **Journal of Turkish Phytopathology**, **33 (1-3)**: 19-24.
8. Gürçan, K., Öcal, N., Uğurtan Y.K., Ullah, S., Erdogan F.A., Zengin, Y., 2015. Evaluation of Turkish apricot germplasm using SSR markers: Genetic diversity assessment and search for Plum pox virus resistance alleles. **Scientia Horticulturae**, **193**: 155–164.
9. Gürçan, K., Çetinsığ, N., Pınar, H., Macit, T., 2019. Molecular and biological assessment reveals sources of resistance to Plum pox virus-Turkey strain in Turkish apricot (*Prunus armeniaca*) germplasm. **Scientia Horticulturae**, **252**: 348-353.
10. Asma, B.M., 2010. “Melez Kayısıların Şarka Hastalığı’na (Plum Pox Virus, PPV) Dayanıklılık Durumlarının Saptanması, Sofralık ve Kurutmalık Yeni Kayısıların İslah Edilmesi Üzerine Araştırmalar (II. Dilim)”. İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Proje No: İ.Ü. BABP 2010/34, Malatya.
11. Asma, B.M., 2011. Breeding Program For Plum Pox Virus Resistance In Turkey: Preliminary Results. *XV International Symposium on Apricot Breeding and Culture*, 20-24 June 2011, Erivan-Armenia.

12. Ulubaş Serçe, Ç., Gazel, M., Çağlayan, K., Asma, B.M., Badenes, M.L., 2013. Screening for resistance to plum pox virus in some local Turkish apricot cultivars and their crosses by molecular markers. **Acta Horticulturae**, **1063**: 123-128.
13. Ünek, C., 2015. Şeftali, Nektarin ve Kayıslarda Şarka Hastalığına Dayanıklılık İslahı Üzerine Araştırmalar. Çukurova Üniversitesi, Adana, Doktora Tezi.
14. Decroocq, S., Chague, A., Lambert, P., Roch, G., Audergon, J.M., Geuna, F., Chiozzotto, R., Bassi, D., Dondini, L., Tartarini, S., 2014. Selecting With Markers Linked To The Ppvres Major QTL Is Not Sufficient To Predict Resistance To Plum Pox Virus (PPV) In Apricot. **Tree Genet Genomes**, **10**: 1161-1170.
15. Dondini, L., Lain, O., Vendramin, V., Rizzo, M., Vivoli, D., Adami, M., Guidarelli, M., Gaiotti, F., Palmisano, F., Bazzoni, A., Boscia, D., Geuna, F., Tartarini, S., Negri, P., Castellano, M., Savino, V., Bassi, D., Testolin, R., 2011. Identification of QTL for resistance to plum pox virus strains M and D in Lito and Harcot apricot cultivars, **Molecular Breeding** DOI: 10.1007/s11032-010-9431-3.
16. Zuriaga, E., Soriano, J.M., Zhebentyayeva, T., Romero, C., Dardick, C., Canizares, J., Badenes, M.L., 2013. Genomic analysis reveals MATH gene(s) as candidate for Plum pox virus (PPV) resistance in apricot (*Prunus armeniaca* L.). **Molecular Plant Pathology**, **13**: 663–677.
17. Soriano, J.M., Domingo, M.L., Zuriaga, E., Romero, C., Zhebentyayeva, T., Abbott, A.G., Badenes, M.L., 2012. Identification Of Simple Sequence Repeat Markers Tightly Linked To Plum Pox Virus Resistance In Apricot. **Molecular Breeding**, **30**: 1017-1026.
18. Decroocq, S., Chague, A., Lambert, P., Roch, G., Audergon, J.M., Geuna, F., Chiozzotto, R., Bassi, D., Dondini, L., Tartarini, S., 2014. Selecting With Markers Linked To The Ppvres Major QTL Is Not Sufficient To Predict Resistance To Plum Pox Virus (PPV) In Apricot. **Tree Genet Genomes**, **10**: 1161-1170.
19. Passaro, M., Geuna, F., Bassi, D., Cirilli, M., 2017. Development Of A High-Resolution Melting Approach For Reliable And Cost-Effective Genotyping Of Ppvres Locus In

20. Bailey, C.H., Hough, L.F., 1979. Apricots, Advances in Fruit Breeding. **P: Pruduce University Press**. West Lafayette, Indiana, U.S.A.
21. Dokuzoğuz, M., 1966. Ege Bölgesi Kayısı Çeşitleri Üzerine Pomolojik Çalışmalar. **Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi**. 3 (2) : 60-77.
22. Mehlenbecher, S.A., Cociu, V., Hough, L.F., 1991. Apricots, Genetic Resources of Temperate Fruit and Nut Crops. **Acta Horticultural**, **290**: 66-107.
23. Memiş, E., 1989. Eskiçağ Türkiye Selçuklu Tarihi. **Selçuk Üniversitesi Yayınları** 87: 228 Konya.
24. Ertem, H., 1974. Boğazköy Metinlerine göre Hitiler devri Anadolu'sunun florası. **TTK Basımevi**. ANKARA.
25. Layne, R.E.C., Bailey, C.H., Hough, L.F., 1996. Apricots. **In: Fruit Breeding**. Vol:1: Tree and Tropical Fruits, pp. 79-111. Eds. By J.Janick and J.M. Moore, John Willey and Sons, New York.
26. Ledbetter, C.A., 2008. Apricots. J.F. Hancock (ed.). **Temperate Fruit Crop Breeding**, **39**: 82.
27. Asma, B.M., 2011. Her Yönüyle Kayısı, **Uyum Ajans**. İstanbul.
28. 14. Ağaoğlu, Y.S., Çelik, H., Çelik, M., Fidan, Y., Gülşen, Y., Günay, A., Halloran, N., Köksal, İ., Yanmaz, R., 1995. Genel Bahçe Bitkileri. **A. Ü. Ziraat Fakültesi Eğitim, Araştırma ve Geliştirme Vakfı Yayınları**. No 4: 369 s.
29. Demir, I., 1990. Genel Bitki Islahı. **E. Ü. Ziraat Fakültesi Yayınları**. No 496: 366 s. E.Ü.Z. F.Ofset Atölyesi İZMİR.
30. Özbek, S., 1978. Özel Meyvecilik. **Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları**. No:128, 386 s.
31. Joshi, S., Srivastava, R.K., Dhar, D.N., 1986. The chemistry of Prunus armeniaca. **Br. Food Journal**, **88**: 74-78.
32. Varveri, C., Ravelonandro, M., Dunez, J., 1987. Construction And Use Of A Cloned cDNA Probe For The Detection Of Plum Pox Virus. **Plants Phytopathology**, **77**: 1221–1224.
33. Wetzel, T., Candresse, T., Ravelonandro, M., Dunez, J., 1991. A Polymerase Chain Reaction Adapted To Plum Pox Potyvirus Detection. **Journal of Virological Methods**, **33**: 355-365.

34. Asensio, M., Gorris, M., Sanz, A., Corbonell, E., Cambra, M., 1994. Characterization and detection of Plum pox virus using monoclonal antibodies. **Acta Horticultural**, **386**: 354–356.
35. Cambra, M., Asensio, M., Gorris, M.T., Perez, E., Camarasa, E., Garcia, J.A., Moya, J.J., Lopez-Aballa, D., Vela, C., Sanz, A., 1994. Detection Of Plum Pox Potyvirus Using Monoclonal Antibodies To Structural And Non-Structural Proteins. **EPPO Bulletin**, **24**: 569-577.
36. Candresse, T., Cambra, M., Dallot, S., Lanneau, M., Asensio, M., Gorris, M.T., Revers, F., Macquaire, G., Olmos, A., Boscia, D., Quiot, J.B., Dunez, J., 1998. Comparison Of Monoclonal Antibodies And Polymerase Chain Reaction Assays For The Typing Of Isolates Belonging To The D And M Serotypes Of Plum Pox Potyvirus. **Phytopathology**, **88**: 198-204.
37. Schneider, W.L., Sherman, D.J., Stone, A.L., Damsteegt, V.D., Frederick, R.D., 2004. Specific Detection And Quantification Of Plum Pox Virus By Real-Time Fluorescent Reverse Transcription-PCR. **Journal Virology Methods**, **120**: 97–105
38. Anonymous 2016. EPPO. 2016. <https://gd.eppo.int/taxon/PPV000/distribution>.
39. Rosales, M., Hinrichsen, P., Herrera, G., 1998. Molecular characterization of plum pox virus isolated from apricots, plums and peaches in Chile. **Acta Horticulturae**, **472**: 401–405.
40. Thompson, D., McCann, M., MacLeod, M., Lye, D., Green, M., James, D., 2001. First report of plum pox potyvirus in Canada. **Plant Dis**, **85**: 97.
41. Levy, L., Damsteegt, V., Welliver R., 2000. First report of plum pox virus (sharka disease) in *Prunus persica* in the United States. **Plant Dis**, **84**: 202.
42. Maejima, K., Hoshi, H., Hashimoto, M., Himeno, M., Kawanishi, T., Komatsu, K., Yamaji, Y., Hamamoto, H., Namba, S., 2010. First report of plum pox virus infecting Japanese apricot (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.) in Japan. **Japan Genetic Plant Pathology**, **76**: 229–231.
43. Gürcan, K., Ceylan, A., 2016b. Full-genome analysis of Plum pox virus D isolates from Turkey. **Acta Horticulturae**, **1163**: 75–84.
44. Teber, S., Gürcan, K., 2016. Recombination analysis of 51 PPV isolates including 10 genomes of PPV-M Istanbul. **Acta Horticulturae**, **1163**: 85-92.

45. Ulubaş Serce, C., Candresse, T., Svanella-Dumas, L., Krizbai, L., Gazel, M., Caglayan, K., 2009. Further Characterization Of A New Recombinant Group Of Plum Pox Virus Isolates, PPV-T, Found In Orchards In The Ankara Province Of Turkey. **Virus Resistant**, **142**: 121–126.
46. Rankovic, M., Sutic, D., 1980. Investigation Of Peach As A Host Of Sharka (Plum Pox) Virus. **Acta Phytopathology Academic Scientia Hung**, **15**: 201-205.
47. Audergon, J.M., Morvan, G., 1990. A Rapid Method For Assessing The Sensivity Of Apricot To Plum Pox Virus. In: **Proceedings of the XXIII International Horticultural Congress**, Florence, Italy. p.46.
48. Martinez-Gomez, P., Dicenta, F., 1999. Evaluation Of Resistance To Sharka In The Breeding Apricot Program In CEBAS-CSIC In Murcia (Spain). **Acta Horticulturae**, **488**: 731-736.
49. Moustafa, T.A., Badenes, M.L., Martinez-Calvo, J., Llacer, G., 2001. Determination Of Resistance To Sharka (Plum Pox) Virus In Apricot. **Scientia Horticulture**. **91**: 57–70.
50. Audergon, J.M, Dosba, F., Karayiannis, I., Dicenta, F., 1994. Amélioration De L'abricotier Pour La Résistance Á La Sharka. **EPPO Bulletin**, **24**: 741–748.
51. Kegler, H., Fuchs, E., Gruntzig, M., Schwarz, S., 1998. Some results of 50 years of research on the resistance to plum pox virus. **Acta Virologica**, **42**: 200–215.
52. Martinez-Gomez, P., Dicenta, F., Audergon, J.M., 2000. Behaviour of apricot (*Prunus armeniaca* L.) cultivars in the presence of sharka (plum pox potyvirus): a review. **Agronomie**, **20** (4): 407-422.
53. Karayiannis, I., Thomidis, T., Tsaftaris, A., 2008. Inheritance of resistance to Plum Pox Virus in apricot (*Prunus armeniaca* L.), **Tree Genetics and Genomes**, **4**: 143–148.
54. Llácer, G., Badenes, M.L., Romero, C., 2008. Problems in the determination of inheritance of Plum Pox Virus resistance in apricot. **Acta Horticulturae**, **781**: 263-267.
55. Rubio, M., Audergon, J.M., Martínez-Gómez, P., Dicenta, F., 2007. Testing genetic control hypothesis for Plum pox virus (Sharka) resistance in apricot, **Scientia Horticulturae**, **112**: 361-365.
56. Krska, B., Salava, J., Polák, J., Komínek, P., 2002. Genetics of resistance to Plum pox virus in apricot, **Plant Protection Science**, **38**: 180-182.

57. Marandel, G., Salava, J., Abbott, A. G., Candresse, T., Decroocq, V., 2009a. Quantitative trait loci meta-analysis of Plum pox virus in apricot (*Prunus armeniaca* L.): new insights on the organization and the identification of genomic resistance factors. **Molecular Plant Pathology**, **10**: 347-360.
58. Marandel, G., Pascal, T., Candresse, T., Decroocq, V., 2009b. Quantitative resistance to Plum pox virus in *Prunus davidiana* P1908 linked to components of the eucariotic translation initiation complex. **Plant Pathology**, **58**: 425-435.
59. Lambert, P., Hagen L.S., Arús, P., Audergon, J.M., 2004. Genetic Linkage Maps of Two Apricot Cultivars (*Prunus armeniaca* L.) Compared with the Almond Texas X Peach Earlygold Reference Map for *Prunus*. **Theoretical and Applied Genetics**, **108**: 1120–1130.
60. Vilanova, S., Romero, C., Abbott, A.G., Llácer, G., Badenes, M. L., 2003. An apricot F2 progeny linkage map based on SSR and AFLP markers, mapping PPV resistance and self-incompatibility traits. **Theoretical and Applied Genetics**, **107**: 239-247.
61. Soriano, J.M., Vera, E.M., Vilanova, S., Martínez-Calvo, J., Llácer, G., Badenes, M.L., Romero, C., 2008. Identification and mapping of a locus conferring Plum Pox Virus resistance in two apricot improved linkage maps. *Tree Genet. Genomes*. 4: 391–402.
62. Lambert, P., Dicenta, F., Rubio, M., Audergon, J.M., 2007. QTL analysis of resistance to sharka disease in the apricot (*Prunus armeniaca* L.) ‘Polonais’, ‘Stark Early Orange’ F1 progeny. **Tree Genetics and Genomes**, **3**: 299–309.
63. Pilarova, P., Marandel, G., Decroocq, V., Salava, J., Krška, B., Abbott, AG., 2010. Quantitative trait analysis of resistance to Plum pox virus in the apricot F1 progeny ‘Harlayne’ × ‘Vestar’. **Tree Genetics and Genomes**, **6**: 467–475.
64. Vilanova, S., Romero, C., Abbott, A.G., Llácer, G., Badenes, M.L., 2003. An apricot F2 progeny linkage map based on SSR and AFLP markers, mapping PPV resistance and self-incompatibility traits. **Theoretical and Applied Genetics**, **107**: 239-247.
65. 108. Vilanova, S., Soriano, J.M., Lalli, D.A., Romero, C., Abbott, A.G., Llácer, G., Badenes, M.L., 2006. Development of SSR markers located in the G1 linkage group of apricot (*Prunus armeniaca*) using a bacterial artificial chromosome library. **Molecular Ecology Notes**, **6**: 789–791.

66. Dondini, L., Lain, O., Vendramin, V., Rizzo, M., Vivoli, D., Adami, M., Guidarelli, M., Gaiotti, F., Palmisano, F., Bazzoni, A., Boscia, D., Geuna, F., Tartarini, S., Negri, P., Castellano, M., Savino, V., Bassi, D., Testolin, R., 2011. Identification of QTL for resistance to plum pox virus strains M and D in Lito and Harcot apricot cultivars. **Molecular Breeding**, **27**: 289–299.
67. Vera Ruiz, E.M., Soriano, J.M., Romero, C., Zhebentyayeva, T., Terol, J., Zuriaga, E., Llácer, G., Abbott, A.G., Badenes, M.L., 2011. Narrowing down the apricot Plum pox virus resistance locus and comparative analysis with the peach genome syntenic region. **Molecular Plant Pathology**, **12**: 535–547.
68. Rubio, M., Ruiz, D., Egea, J., Martínez-Gómez, P., Dicenta, F., 2014. “Opportunities of marker-assisted selection for Plum pox virus resistance in apricot breeding program. **Tree Genetics and Genomes**, **10**: 513–525.
69. Decroocq, S., Chague, A., Lambert, P., Roch, G., Audergon, J.M., Geuna, F., Chiozzotto, R., Bassi, D., Dondini, L., Tartarini, S., 2014. Selecting With Markers Linked To The Ppvres Major QTL Is Not Sufficient To Predict Resistance To Plum Pox Virus (PPV) In Apricot. **Tree Genetics and Genomes**, **10**: 1161-1170.
70. 75. Buschiazzo, E., Gemmell, N.J., 2006. The Rise, Fall and Renaissance of Microsatellites in Eukaryotic Genomes. **Bioessays**, **28**: 1040-1050.
71. Kump, K.L., vd. 2011. Genome-wide association study of quantitative resistance to southern leaf blight in the maize nested association mapping population. **Nature Genetics**, **43**: 163–168.
72. Fan, B., Onteru, S.K., Du, Z.Q., Garrick, D.J., Stalder, K.J., Rothschild, M.F., 2011. Genome-wide association study identifies loci for body composition and structural soundness traits in pigs. **PLoS ONE** **6**: e14726.
73. Hayes, B.J., Bowman, P.J., Chamberlain, A.J., Savin, K., Van Tassell, C.P., Sonstegard, T.S., Goddard, M.E., 2009. A validated genome wide association study to breed cattle adapted to an environment altered by climate change. **PLoS ONE** **4**: e6676.
74. Feugang, J.M., Kaya, A., Page, G.P., Chen, L., Mehta, T., vd. 2009. Two-stage genome-wide association study identifies integrin beta 5 as having potential role in bull fertility. **BMC Genomics**, **10**: 176.

75. Huang, X., Wei, X., Sang, T., Zhao, Q., Feng, Q., vd, 2010. Genome-wide association studies of 14 agronomic traits in rice landraces. **Nature Genetics**, **42**: 961–967.
76. Kim, S., vd. 2007. Recombination and linkage disequilibrium in *Arabidopsis thaliana*. **Nature Genetics**, **39**: 1151–1155.
77. Verde, I., Abbott, A., Scalabrin, vd. 2013. The high-quality draft genome of peach (*Prunus persica*) identifies unique patterns of genetic diversity, domestication and genome evolution. **Nature Genetics**, **45**: 487-496.
78. Zhang, Q., Chen, W., Sun, L., vd. 2012. The genome of *Prunus mume*. **Nature Communications**, **3**: 1318
79. Velasco, R., Zharkikh, A., Affourtit, J., vd. 2010. The genome of the domesticated apple (*Malus x domestica* Borkh.). **Nature Genetics**, **42**: 833-839.
80. Shirasawa, K., Isuzugawa, K., Ikenaga, M., vd. 2017. The genome sequence of sweet cherry (*Prunus avium*) for use in genomics-assisted breeding. **Oxford**. **24**: 499–508.
81. Verde, I., Jenkins, J., Dondini, L., Micali, S., Pagliarani, G., Vendramin, E., Paris, R., Aramini, V., Gazza, L., Rossini, L., Bassi, D., Troglio, M., Shu, S., Grimwood, J., Tartarini, S., Dettori T.M., Schmutz, J., 2017. The Peach V2.0 Release: High-Resolution Linkage Mapping And Deep Resequencing Improve Chromosome-Scale Assembly And Contiguity. **BMC Genomics**, **18**: 225.
82. Dong, S., Liu, Y., Niu, J., Ning, Y., Lin, S., Zhang, Z., 2014. De Novo Transcriptome Analysis Of The Siberian Apricot (*Prunus Sibirica* L.) And Search For Potential SSR Markers By 454 Pyrosequencing. **Gene**, **544**: 220-227.
83. Salazar, J.A., Rubio, M., Ruiz, D., Tartarini, S., Martinez-Gomez, P., Dondini, L., 2015. SNP Development For Genetic Diversity Analysis In Apricot. **Tree Genet Genome**, **11**: 15.
84. 80. Rubio, M., Ballester, A.R., Olivares, P.M., Castro de Moura, M., Dicenta, F., Martinez-Gomez, P., 2015. Gene Expression Analysis Of Plum Pox Virus (Sharka) Susceptibility/Resistance In Apricot (*Prunus armeniaca* L.). **PLoS One**. **10**: e0144670.
85. Bielenberg, D.G., Rauh, B., Fan, S., Gasic, K., Abbott, A.G., Reighard, G.L., Okie, W.R., Wells, C.E., 2015. Genotyping By Sequencing For SNP-Based Linkage

- Map Construction And QTL Analysis Of Chilling Requirement And Bloom Date In Peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]. **PLoS ONE**. **10(10)**: e0139406.
86. Gürcan, K., Ocal, N., Yılmaz, K.U., Ullah, S., Erdogan, A., Zengin, Y., 2015. Evaluation Of Turkish Apricot Germplasm Using SSR Markers: Genetic Diversity Assessment And Search For Plum Pox Virus Resistance Alleles. **Sci Horticulture**, **193**: 155–164.
87. Mariette, S., Wong Jun Tai, F., Roch, G., Barre, A., Chaque, A., Decroocq, S., Groppi, A., Laizet, Y., Lambert, P., Tricon, D., Nikolski, M., Audergon, J.M., Abbott, A.G., Decrock, V., 2016. Genome-Wide Association Links Candidate Genes To Resistance To Plum Pox Virus In Apricot (*Prunus Armeniaca*). **New Phytology**, **209**: 773–784.
88. Gurcan, K., Teber, S., Ercisli, S., Yilmaz, K.U., 2016. Genotyping By Sequencing (GBS) In Apricots And Genetic Diversity Assessment With GBS-Derived Single-Nucleotide Polymorphisms (SNPs). **Biochem Genetics**, **54**: 854-885.
89. Salazar, J., Pacheco, I., Shinya, P., Zapata, P., Silva, C., Aradhya, M., Velasco, D., Ruiz, D., Martínez-Gómez, P., Infante, R., 2017. Genotyping By Sequencing For SNP-Based Linkage Analysis And Identification Of Qtls Linked To Fruit Quality Traits In Japanese Plum (*Prunus Salicina* Lindl.). **Front. Plant Sci.** **8**: 476. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00476>.
90. Goonetilleke, S.N., March, T.J., Michelle, G., Amanda R. Walker, A.R., Mather, D.E., 2018. Genotyping By Sequencing In Almond: SNP Discovery, Linkage Mapping, And Marker Design. **Genes Genomes Genetics**, **8**: 161-172.
91. Carrasco, B., González, M., Gebauer, M., García-González, R., Maldonado, J., Silva, H., 2018. Construction Of A Highly Saturated Linkage Map In Japanese Plum (*Prunus Salicina* L.) Using GBS For SNP Marker Calling. **PLoS ONE**. **13(12)**: e0208032. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208032>.
92. Zhang, L., Yang, X., Qi, X., Guo, C., and Jing, Z., 2018. Characterizing The Transcriptome And Microsatellite Markers For Almond (*Amygdalus Communis* L.) Using The Illumina Sequencing Platform. **Hereditas**, **155**: 14.
93. Doyle, J.J., Doyle, J.L., 1987. A Rapid Isolation Procedure For Small Quantities Of Fresh Leaf Tissue. **Phytochemical Bulletin**, **19**: 11-15.
94. Dirlwanger, E., Cosson, P., Tavaud, M., Aranzana, M.J., Poizat, C., Zanetto, A., Arus, P., Laigret, F., 2002. Development of microsatellite markers in Peach

- [*Prunus persica* (L.) Batsch] and their use in genetic diversity analysis in peach and sweet cherry (*Prunus avium* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, **105**: 127–138.
95. Dirlewanger, E., Cosson, P., Boudjerhi, K., Renaud, C., Capdeville, G., Tauzin, Y., Laigret, F., Moing, A., 2006. Development of a second-generation genetic linkage map for peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] and characterization of morphological traits affecting flower and fruit. **Tree Genetic Genomes**, **3**: 1-13,
 96. Aranzana, M.J., Garcia-Mas, J., Carbó, J., Arús, P., 2002. Development and variability analysis of microsatellite markers in peach, **Plant Breeding**, **121**: 87–92.
 97. Hagen, L.S., Chaib, J., Fady, B., Decroocq, V., Bouchet, J.P., Lambert, P., Audergon, J.M., 2004. Genomic and cDNA microsatellites from apricot (*Prunus armeniaca* L.), **Molecular Ecology Notes**, **4**: 742–745.
 98. Howad, W., Yamamoto, T., Dirlewanger, E., Testolin, R., Cosson, P., Cipriani, G., Monforte, A.J., Georgi, L., Abbott, A.G., Arus, P., 2005. Mapping with a few plants, using selective mapping for microsatellite saturation of the *Prunus* reference map. **Genetics**, **171**: 1305–1309.
 99. Yamamoto, T., Mochida, K., Imai, T., Shi, Y.Z., Ogiwara, I., Hayashi, T., 2002. Microsatellite markers in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] derived from an enriched genomic and cDNA libraries. **Molecular Ecology Notes**, **2**: 298–301.
 100. Yamamoto, T., Yamaguchi, M., Hayashi, T., 2005. An integrated genetic linkage map of peach by SSR, STS, AFLP and RAPD. **Journal Japan Soc. Horticulture Scienta**, **74**: 204–213.
 101. Decroocq, V., Fav, M.G., Hagen, L., Bordenave, L., Decroocq, S., 2003. Development and transferability of apricot and grape EST microsatellite markers across taxa. **Theoretical and Applied Genetics**, **106**: 912–922.
 102. Lopes, M.S., Sefc, K.M., Laimer, M., Da Câmara, M.A., 2002. Identification of microsatellite loci in apricot. **Molecular Ecology Notes**, **2**: 24–26.
 103. Testolin, R., Messina, R., Lain, O., Marrazzo, M.T., Huang, W.G., Cipriani, G., 2004. Microsatellites isolated in almond from an AC-repeat enriched library. **Molecular Ecology Notes**, **4**: 459–461.
 104. Vilanova, S., Soriano, J.M., Lalli, D.A., Romero, C., Abbott, A.G., Llácer, G., Badenes, M.L., 2006. Development of SSR markers located in the G1 linkage

group of apricot (*Prunus armeniaca*) using a bacterial artificial chromosome library. **Molecular Ecology Notes**, **6**: 789–791.

105. Messina, R., Lain, O., Marrazzo, M.T., Cipriani, G., Testolin, R., 2004. New set of microsatellite loci isolated in apricot. **Molecular Ecology Notes**, **4**: 432–434.



ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: Necati ÇETİNSAĞ
Uyruğu: Türkiye (T.C)
Doğum Tarihi ve Yeri: 01.04.1993 - Kayseri
Medeni Durum: Bekar
e-mail: necaticetinsag@gmail.com
Yazışma Adresi: Erciyes Üniversitesi Betül Ziya EREN Genom Ve Kök Hücre Merkezi

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	Erciyes Üniversitesi, Tarımsal Biyoteknoloji	2019
Lisans	Erciyes Üniversitesi, Tarımsal Biyoteknoloji	2016
Lise	Anadolu İstikbal Lisesi, Kayseri	2011

YABANCI DİL

İngilize

PROJELER

1.Necati ÇETİNSAĞ 2209/A Üniversite Öğrencileri Araştırma Projeleri Destek programı (Kayısı'da polimorfik SSR/mikrosallit primerlerin geliştirilmesi) 2015.

2.Necati Çetinsag (Bursiyer). 214O400. Shotgun DNA Dizileme ile Kayısı Tüm Genom Fiziksel Harita (Genom) Analizi ve RNaseq Transkriptom Profilleme Yoluyla Kayısı Tüm Gen Setinin Anotasyonu -TUBİTAK-ANAS-İkili işbilliği projesi. Başlama:01/04/2016 ve Bitiş:01/10/2018.

YAYINLAR

1. Kose, M.A., **Cetinsag, N.**, Gurcan, K., 2017. De Novo Transcriptome Assembly And SSR Marker Development In Apricot (*Prunus Armeniaca*). **Turkish Journal Of Agriculture And Forestry**. 41: 305-315.
2. Gurcan, K., **Cetinsag, N.**, Pınar, H., Macit, T., 2019. Molecular And Biological Assessment Reveals Sources Of Resistance To Plum Pox Virus - Turkey Strain In Turkish Apricot (*Prunus Armeniaca*) Germplasm. **Scientia Horticulturae**. 252: 348-353.

SEMPOZYUM VE KONGRELER

1. Canbulat, O., **Çetinsag, N.**, Köse, M.A., Teber, S., Caymaz, F., Gürcan, K. (2018). Goji berry 'de in vitro Bitki Rejenerasyon Protokolünün Oluşturulması. Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi 1. Bitki Islahı ve Genetiği Öğrenci Kongresi Niğde (Tukey), Özet Kitapçığı ss 25
2. **Çetinsag, N.**, Canbulat, O., Köse, M.A., Teber, S., Caymaz, F., Gürcan, K. (2018). Yerel Kayısı (*Prunus armeniaca*) Popülasyonlarında Plum Pox Virüsü Dayanıklılığı ve Kendine Uyuşmazlığın Moleküler Markörler ile Belirlenmesi. Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi 1. Bitki Islahı ve Genetiği Öğrenci Kongresi Niğde (Tukey), Özet Kitapçığı ss 20
3. **Çetinsag, N.**, Canbulat, O., Köse, M.A., Teber, S., Caymaz, F., Gürcan, K. (2018). Türkiye Kayısı (*Prunus armeniaca*) Germplasm'ında Plum pox virüs'üne Dayanıklı Yeni Kayısı Çeşitleri. *Türkiye VII. Bitki Koruma Kongresi (Uluslararası Katılımlı), 14-17 Kasım 2018, Muğla, Türkiye, Özet Kitapçığı ss 109*
4. Köse, M.A., **Çetinsag, N.**, Gürcan K. (2016). Polymorphic Expressed Sequence Tag Simple Sequence Repeat EST SSR Markers in Apricot. *III International Symposium on Horticulture in Europe - SHE2016. 17-21 October, 2016, Chania, Crete (Greece)*.