

**ERZİNCAN OVASINDA YETİŞEN
ARMUT (*Pyrus spp.*) ÇEŞİTLERİ ARASINDAKİ GENETİK
İLİŞKİNİN RAPD YÖNTEMİ İLE BELİRLENMESİ**

Tevhit Geçim

**Yüksek Lisans Tezi
Tarımsal Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı
Yrd. Doç. Dr. Emine Orhan
2013
Her Hakkı Saklıdır**

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ERZİNCAN OVASINDA YETİŞEN
ARMUT (*Pyrus spp.*) ÇEŞİTLERİ ARASINDAKİ GENETİK
İLİŞKİNİN RAPD YÖNTEMİ İLE BELİRLENMESİ

Tevhit GEÇİM

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANA BİLİM DALI

ERZURUM
2013

Her Hakkı Saklıdır



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ ONAY FORMU

ERZİNCAN İLİ MERKEZ KÖYLERİNDE YETİŞEN ARMUT (*Pyrus SPP.*)
ÇEŞİTLERİ ARASINDAKİ GENETİK İLİŞKİNİN RAPD YÖNTEMİ İLE
BELİRLENMESİ

Yrd. Doç. Dr. Emine ORHAN danışmanlığında, Tevhit GEÇİM tarafından hazırlanan bu çalışma 28/06/2013 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak oybirliği/oy çokluğu (.../...) ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Sezai ERCİŞLİ

İmza : 

Üye : Doç. Dr. Mahmut Sinan TAŞPINAR

İmza : 

Üye : Yrd. Doç. Dr. Emine ORHAN

İmza : 

Yukarıdaki sonucu onaylıyorum



Prof. Dr. İhsan EFEOĞLU
Enstitü Müdürü

Bu çalışma BAP projeleri kapsamında desteklenmiştir.
Proje No: BAP 2012/238

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ERZİNCAN OVASINDA YETİŞEN ARMUT (*Pyrus spp.*) ÇEŞİTLERİ ARASINDAKİ GENETİK İLİŞKİNİN RAPD YÖNTEMİ İLE BELİRLENMESİ

Tevhit Geçim

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Emine Orhan

Armut (*Pyrus spp.*), kültür tarihi çok eskilere dayanan dünyada üretimi ve tüketimi yaygın olan bir meyve türüdür. Ülkemizin çeşit zenginliği, meyve ıslahçılarında damızlık materyal sağlayacak bir kaynak teşkil etmektedir. Elimizdeki bu gen stokunun korunması ve ıslah materyali olarak kullanılması, yeni değerlerin ortaya çıkarılması, bitki ıslahında çalışanların başlıca görevleri arasındadır. Ekonomik değere sahip ve genetik stokumuz özelliğinde olan yerel çeşitlerimizin zamanla yok olma tehlikesiyle karşı karşıya gelmelerine fırsat verilmeden, genetik materyalin koruma altına alması gerekir. Bu amaçla yapılacak seleksiyon ve moleküler karakterizasyon çalışmalarına gereksinim vardır.

Bu çalışmada, Erzincan ilinin merkez köylerinde yetişmekte olan 21 armut çeşidi arasındaki genetik ilişki, RAPD yöntemi kullanılarak karakterize edilmiştir. Çalışmada, RAPD analizi için 27 primer kullanılmıştır. Amplifikasyon durumuna göre seçilen 17 primerden toplam 102 adet bant elde edilmiştir. Bu 102 adet banttan 99'u genotipler arasında polimorfizm göstermiş olup polimorfizm oranı % 97,05 olarak belirlenmiştir. Çalışma sonuçlarına göre, "Hacı Hamza" çeşidi ile "Esmâ Hatun" çeşidi birbirine en yakın çeşitler olarak değerlendirilmiştir. "Göksulu" ve "Orak Armudu"nun ise diğer çeşitlere daha uzak akraba olduğu belirlenmiştir. Elde edilen sonuçların ileride yapılacak olan armut ıslah çalışmalarına önemli bir altyapı oluşturacağı ortaya çıkmıştır.

2013, 49 sayfa

Anahtar kelimeler: *Pyrus spp.*, Genetik İlişki, RAPD

ABSTRACT

MS Thesis

DETERMINATION OF GENETIC RELATIONSHIPS BETWEEN PEAR VARIETIES (*Pyrus* spp.) GROWING IN ERZINCAN PLAIN BY RAPD METHOD

Tevhit GEÇİM

Atatürk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Agricultural Biotechnology

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Emine ORHAN

Pear (*Pyrus* spp.) is a kind of fruit whose cultural history dates back ancient times, production and consumption is quite common in the world. Assortment richness provides breeders with a source for breeding. The protection of this gene stock and use of them as improvement material and the discovery of new values are among the main tasks of the producers in plant breeding. The genetic material should be protected before local varieties with economic value and genetic stock face with the danger of extinction. For this purpose selection and molecular characterization is required.

In this study, genetic relationships among 21 varieties of pears were characterized using RAPD method, growing in the central villages of the province of Erzincan. In the study, 27 primer were used for RAPD analysis. 102 bands were obtained from 17 primers selected depending on amplification trait. Ninety-nine of these 102 bands showed polymorphism among genotypes and polymorphism rate was found 97.05%. According to the results, the varieties of "Haci Hamza" and "Esma Hatun" were evaluated as the closest species. "Goksulu" and "Orak Armudu" were determined to be a distant relative. We reached the conclusion that the results obtained from this study will provide an important base and background for the future studies in pear improvement.

2013, 49 pages

Keywords : *Pyrus* spp., Genetic Relationship, RAPD

TEŞEKKÜR

Öncelikle bana bu konuyu veren, araştırmaya yönlendiren ve bugüne kadar yapmış olduğum çalışmalarda yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen ve çalışmalarına her zaman önder olan çok değerli danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Emine ORHAN'a yürekten teőekkürü borç bilirim.

Yüksek lisans eğitim ve öğrenimimde ilgi ve yardımlarını gördüğüm Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı Öğretim Üyelerine şükranlarımı sunarım.

Hayatım boyunca hep yanımda olan ve tez çalışmalarım esnasında desteklerini eksik etmeyen çok değerli aileme teşekkür ederim.

Tevhit Geçim

Haziran 2013

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	8
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	20
3.1. Bitki Materyali.....	20
3.2. DNA izolasyonu için kullanılan çözeltiler.....	24
3.3. PCR ve Elektroforez işlemleri için kullanılan çözeltiler.....	25
3.4. Yararlanılan alet ve cihazlar.....	26
3.5. Yöntem.....	27
3.5.1. DNA izolasyonu.....	27
3.5.2. DNA konsantrasyonu ve saflığının belirlenmesi.....	28
3.5.3. DNA amplifikasyon koşulları ve primerler.....	29
3.5.4. RAPD-PCR analizleri.....	30
3.5.5. Agaroz jel elektroforezi.....	31
3.5.6. Veri analizleri.....	32
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	33
4.1. DNA izolasyonu.....	33
4.2. RAPD-PCR analizleri.....	34
4.3. Farklılık indeksi ve dendrogram.....	40
5. SONUÇ ve TARTIŞMA.....	433
KAYNAKLAR.....	477
ÖZGEÇMİŞ.....	50

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

AE	: Elüsyon tampon çözeltisi
AFLP	: Amplified Fragment Length Polymorphism
AP-PCR	: Arbitrarily Primed PCR
BSA	: Bovine serum albumin
bç	: Baz çifti
CAPS	: Cleaved Amplified Polymorphic Sequences
cDNA	: Complementary DNA
CTAB	: Setil Trimetil amonyum bromit
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DNP	: Single Nucleotide Polymorphism
da	: Dekar
DAF	: DNA Amplification Fingerprinting
dNTP	: Deoksiribonükleotitfosfatlar
EDTA	: Etilendiamin tetraasetikasit
EST	: Expressed Sequence Tags
g	: Gram
HCl	: Hidroklorik asit
ISSR	: Inter Simple Sequence Repeat
m	: Metre
MA	: Moleküler ağırlık
mg	: Miligram
MgCl ₂	: Magnezyum klorür
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
MÖ	: Milattan Önce
mRNA	: Messenger Ribonükleik asit
NaCl	: Sodyum klorür
Na ₂ S ₂ O ₅	: Sodyum metabisülfid

ng	: Nanogram
nm	: Nanometre
PBS	: Polimorfik Bant Sayısı
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	: Ribonükleik asit
PO	: Polimorfizm oranı
PVP	: Polivinilpirolidon
RAPD	: Randomly Amplified Polymorphic DNA
RFLP	: Restriction Fragment Length Polymorphism
SCARs	: Sequence Characterized Amplified Regions
SÇKM	: Suda Çözünür Kuru Madde
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
SSR	: Simple Sequence Repeat
SRAP	: Sequence Related Amplified Polymorphism
Taq	: <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	: Tris/borik asit/EDTA tampon çözeltisi
Tris	: Tris (hidroksil metil) aminometan
Tris-HCl	: Tris hidroklorür
UPGMA	: Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average
UV	: Ultraviolet
μM	: Mikromolar
μl	: Mikrolitre

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. DNA Polimeraz Zincir Reaksiyonu	10
Şekil 2.2. Elektroforez	11
Şekil 2.3. RAPD reaksiyonunun şematik gösterimi	15
Şekil 3.1. Çoğaltılan DNA parçalarının büyüklüklerinin belirlenmesinde kullanılan DNA markörü (Ladder, 0,5-10 kb)	32
Şekil 4.1. OPW-04 primerine ait jel görüntüsü	36
Şekil 4.2. OPW-05 primerine ait jel görüntüsü	36
Şekil 4.3. OPW-06 primerine ait jel görüntüsü	36
Şekil 4.4. OPW-08 primerine ait jel görüntüsü	36
Şekil 4.5. OPW-11 primerine ait jel görüntüsü	37
Şekil 4.6. OPW-13 primerine ait jel görüntüsü	37
Şekil 4.7. OPW-18 primerine ait jel görüntüsü	37
Şekil 4.8. OPW-20 primerine ait jel görüntüsü	37
Şekil 4.9. OPA-01 primerine ait jel görüntüsü	38
Şekil 4.10. OPA-02 primerine ait jel görüntüsü	38
Şekil 4.11. OPA-04 primerine ait jel görüntüsü	38
Şekil 4.12. OPA-13 primerine ait jel görüntüsü	38
Şekil 4.13. OPH-18 primerine ait jel görüntüsü	39
Şekil 4.14. OPY-15 primerine ait jel görüntüsü	39
Şekil 4.15. OPH-19 primerine ait jel görüntüsü	39
Şekil 4.16. OPY-08 primerine ait jel görüntüsü	39
Şekil 4.17. OPB-10 primerine ait jel görüntüsü.....	40
Şekil 4.18. UPGMA metoduyla oluşturulan armut çeşitleri arasındaki genetik ilişkiyi gösteren dendogram	41

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Dünya Armut Üretimi.....	4
Çizelge 1.2. Ülkemiz armut ağaç varlığı, üretimi, verimi	5
Çizelge 3.1. Araştırmada kullanılan armut çeşitleri ve alındığı yerler	20
Çizelge 3.2. Araştırmada kullanılan armut çeşitlerinin genel özellikleri.....	201
Çizelge 3.3. Armut çeşitlerine ait DNA örneklerinin nanodrop spektrofotometrik ölçüm değerleri.....	28
Çizelge 3.4. Çalışmada kullanılan 27 adet RAPD primeri, baz dizilimleri ve amplifikasyon durumları	30
Çizelge 3.5. RAPD-PCR reaksiyon hacmi	31
Çizelge 3.6. RAPD-PCR döngüsü programı	29
Çizelge 4.1. PCR amplifikasyonları sonucunda elde edilen yaklaşık bant büyüklükleri ile bant sayıları ve polimorfizm oranları	35
Çizelge 4.2 Armut çeşitleri arasındaki farklılık (dissimilarity) indeksi	42

1. GİRİŞ

Yunanlı yazar Homer'in Milattan bin yıl önce yazdığı "Odisa" adlı eserinde Allah'ın insanlara bir armağanı olan armudun Alcineus bahçelerinde yetişmekte olduğunu bildirmiştir (Layne and Quamme 1975; Özbek 1978). Buna göre Milattan bin yıl önce armudun Yunanistan'da yetiştirildiği anlaşılmaktadır. Homer'den 600 yıl sonra ise yine Yunanlı araştırmacı Theophrastus'un (MÖ 4. yy) armut yetiştiriciliği üzerinde vermiş olduğu bilgiler bugünkü bilgilerimizden pek geri sayılmamaktadır. Bu çağlarda da Theophrastus, kültür armutlarını yabancı armutlardan ayırmakta, armudun tohum, çelik ve aşı ile yetiştirilmesinden söz etmekte ve tohumdan yetiştirilen armutların dejenere olduklarını ifade etmektedir (Özbek 1978).

Armut, *Rosales* takımının *Roseaceae* familyasının *Pomoideae* alt familyasından *Pyrus* cinsine girmektedir. Bu cins içerisinde şimdiye kadar birçok tür tespit edilmiş olmakla beraber, meyvecilik bakımından gerek kültür çeşitlerinin meydana gelişi ve gerekse anaç olarak kullanılması bakımından 13 tür önem kazanmıştır (Özbek 1978). Bu 13 türü de kökenlerinin Doğu ve Batı oluşuna göre iki büyük grup içerisinde toplamak mümkündür (Özbek 1978). Doğu armutlarının asıl köken alanını Çin, Mançurya, Kore ve Sibiryaya teşkil etmektedir. Bu bölgede yayılmış olan türlerden yapılan seleksiyonlar, tür içindeki melezlemeler veya bu türlerin kendi aralarında meydana getirdikleri hibritler hiçbir zaman meyve kalitesi bakımından batı grubuna giren armutlar kadar kaliteli çeşitler vermemişlerdir. Doğu armut türlerinin önemi, bunların türüne göre soğuklara ve ateş yanıklığı hastalığına daha fazla dayanıklı olmaları ve bir kısmının da Batı kültür çeşitleri için iyi anaç özelliklerini göstermelerindedir. Bu bakımdan dikkati çeken Doğu armutlarını *Pyrus seratina* Rehder, *P. ussuriensis* Maximovicz, *P. betulaefolia* Bunge ve *P. serrulata* Rehder türleri oluşturmaktadır. (Özbek 1978). Batı grubuna ise bugün dünyanın çeşitli yerlerinde yetiştirilen ve önemli kültür çeşitleri sayılan armutlar girmektedir. Bunlar arasında meyvecilik açısından en önemli olan türleri *P. communis* L., *P. elaeagnifolia* Pallas, *P. cordata* ve *P. salicifolia* L. teşkil etmektedir (Özbek 1978). Bu türler içerisinde *P. communis* L. Orta-Doğu Avrupa'dan Anadolu, Kafkasya ve Türkistan'a kadar uzayan geniş bir bölge içinde yayılmıştır.

Kültür armut çeşitlerimizin meydana gelişinde bu türün önemli rol oynadığı kaydedilmektedir (Layne and Quamme 1975; Özbek 1978).

Armut ağacı daha çok dikine büyüyen, doruk dalının yukarıya doğru uzaması ve yanlara doğru dallanmasıyla çoğu çeşitlerde, tacın bir piramit şeklini aldığı, bazı çeşitlerde ise tacın elmalardaki gibi yayvan şekilli olduğu bir bitkidir. Armutlarda gövde rengi genellikle koyu gri olmakla beraber kıvıla çalan taba renkli gövde rengine de rastlanmakta, dallar elmada olduğu gibi odun ve meyve dalları olarak ayrılmaktadır. Ayrıca armutlarda dalcıklar, elmalardan farklı olarak çoğunlukla tüysüz bir yapı göstermektedirler. Armut meyvesi yalancı bir meyvedir. Yani meyvenin yenilen kısmı çiçek tablasının veya hypanthium'un etlenmiş kısmından ibarettir. Meyve eti sulu ve yuvarlak hücrelerden oluşmuştur. Bazı meyvelerde ise taş hücreleri meydana geldiğinden ağızda kumlu bir his bırakmaktadır. Armutta yumurtalık çiçek tablasının içinde olup ikişer tane tohum ihtiva eden 5 karpelden oluşmaktadır (Karaçalı 1990 ve Özçağırın vd 2004).

Armut, ekolojik istekleri bakımından mutedil iklime adapte olmuş elmaya göre soğuklara daha az dayanıklı ve kuzey yarım küresinde 55. enlem derecesinden daha yukarılarda yetişmeyen bir meyve türüdür. Toprak istekleri bakımından fazla seçici değildir. Bununla beraber toprak ne kadar derin, geçirgen, sıcak ve besin maddelerince zengin olursa, armut ağaçlarının gelişmeleri o oranda iyi ve verimleri de yüksek olmaktadır (Özbek 1978).

Armut meyvesinin bileşimi çeşide, yetiştirildiği bölgeye ve meyvelerin olgunluk durumlarına göre değişmektedir. Meyvelerdeki su oranı yaklaşık %82-85'tir. Kuru maddenin %9-11'ini şekerler oluşturmakta, olgunlukla birlikte şeker oranı artmaktadır. Armutlarda organik asitlerden malik asit (elma asidi) ve sitrik asit (limon asidi) bulunmaktadır. Toplam asit miktarı %0,13-0,58 arasında değişmektedir. Meyvede büyük oranda K, Ca, Mg, S ve Fe bulunmakta ve bu elementler itibari ile armudun insan beslenmesinde önemli bir meyve olduğu görülmektedir. Vitaminler açısından elmaya

göre daha az zengin olan armut meyvesinde çok az miktarda A ve B vitaminleri bulunur (Özbek 1978).

Birçok özelliğiyle elmaya benzetilen armut, aslında elmadan daha çok çözünür lif; yani pektin içerir. Bu özelliğiyle de daha düşük kolesterol seviyelerinin sağlanmasına ve bağırsakların hareketinin düzenlenmesine yardımcı olur. C Vitamini içeriğiyle antioksidan özellik gösteren armut, serbest radikallerin vücut üzerindeki olumsuz etkisine de engel olur. Kalp-damar sağlığı, düşük kan basıncı ve fiziksel performans bakımından vücudu destekler. Früktoz ve glikoz gibi doğal şeker bakımından zengin olan armut suyu; enerji ihtiyacını çabucak karşılayabilirken bir bardak armut suyu tüketmenin, vücut ateşini de düşürdüğü biliniyor. 100 gram armutta bulunan besin öğeleri şunlardır; 15,46 g Karbonhidrat, 3,1 g Lif, 0,38 g Protein, 0,012 mg Tiamin (Vitamin B1), 0,025 mg Riboflavin (Vitamin B2), 0,157 mg Niyasin (Vitamin B3), 0,048 mg Pantotenik asit (Vitamin B5), 0,028 mg Vitamin B6, 7 mikrogram Folat (Vitamin B9), 4,2 mg Vitamin C, 9 mg Kalsiyum, 0,17 mg Demir, 7 mg Magnezyum, 11 mg Fosfor, 119 mg Potasyum, 0,10 mg Çinko (Anonim 2003).

Bunun yanında armut meyvesi, taze, sofralık, konservelik ve kurutmalık olarak kullanılmaktadır. Taze olarak tüketim süresi özellikle değişik atmosferli depolarda saklama imkânlarının sağlanmasıyla çok uzamıştır (Ünal *et al.* 1997). Dünya üzerinde armut üretimi, elmaya göre az gelişmiş olmakla beraber, diğer meyvelerle kıyaslandığında, mutedil iklim bölgelerinde yetiştirilen meyveler arasında elmadan sonra gelmektedir (Özbek 1978).

P. communis'in anavatanı olarak Anadolu, Kafkasya ve Orta Asya gösterilmekte ve bundan dolayı armut bitkisinin önemli gen kaynaklarından biri olarak kabul edilen ülkemizde yazlık, kışlık, standart ya da yerel olmak üzere her bölgeye uygun ve mahalli olarak yetiştirilen 600'ün üzerinde armut çeşidi bulunmaktadır (Özbek 1978; Şen ve Karadeniz 1995). Bu armut çeşitleri çoğunlukla yazlık çeşitler olup, özel veya kamu arazilerinde kendiliğinden yetişmiş Ahlat (*Pyrus elaeagnifolia*) veya diğer *Pyrus* türlerine aşılansarak yetiştirilmektedir. Standart yerli ve yabancı armut çeşitlerinden

oluşan kapama bahçeler oldukça azdır. Bu nedenle Türkiye’de armut yetiştiriciliği çoğunlukla mahalli gereksinimleri karşılayacak şekilde oluşmuş ve bazı çeşitler dışında çoğu ülke çapında yaygınlaşmadan mahallinde kalmıştır (Ünal vd 1997).

Dünya armut üretimi 2011 yılı verilerine göre 23 896 556 ton olup Türkiye 386 382 ton ile dünya üretiminde 6. sırada (%1,6) yer almaktadır (Çizelge 1.1). Çin 15 945 013 tonla (%66,7), İtalya 926 542 tonla (%3,87), ABD 853 407 tonla (%3,57), Arjantin 691 270 tonla (%2,89) ve İspanya 502 209 tonla (%2,10) dünya armut üretiminde söz sahibi olan başlıca ülkelerdir (Anonymous 2013).

Çizelge 1.1. Dünya Armut Üretimi (Anonymous 2013)

ÜLKELER	2011 Üretim (ton)	2011 Dünya Üretim Oranı (%)
Çin	15 945 013	66,7
İtalya	926 542	3,9
ABD	853 407	3,6
Arjantin	691 270	2,9
İspanya	502 209	2,1
Türkiye	386 382	1,6
Güney Afrika	350 527	1,5
Hollanda	336 000	1,4
Hindistan	334 774	1,4
Japonya	312 800	1,3
Kore	290 494	1,2
Belçika	284 827	1,2
Portekiz	230 447	0,9
Cezayir	180 000	0,7
Şili	176 685	0,7
TOPLAM	23 896 556	

Ülkemizde 2011 yılına ait armut ağaç sayısı, üretim ve verim değerleri Çizelge 1.2’de verilmiştir. 2011 yılı verilerine göre meyve veren yaştaki 9 784 301 adet armut ağacından 386 382 ton armut üretilmektedir. Ağaç başına verim ise 30,0 kg’dır (Anonim 2013).

Çizelge 1.2. Ülkemiz armut ağaç varlığı, üretimi, verimi (Anonim 2013)

Yıl	Meyveliklerin Alanı (da)	Üretim (ton)	Ağaç Başına Ortalama Verim (kg)	Meyve Veren Yaşta Ağaç Sayısı (adet)	Meyve Vermeyen Yaşta Ağaç Sayısı (adet)	Toplam Ağaç Sayısı (adet)
2007	210 579	356 281	36	10 007 229	1 883 543	11 890 772
2008	205 064	355 476	36	9 876 931	1 854 734	11 731 665
2009	201 420	384 244	39	9 918 803	1 995 635	11 914 438
2010	202 524	380 003	38	10 028 218	2 257 294	12 285 512
2011	209 020	386 382	39	9 784 301	2 420 950	12 205 251

Ülkemizde armut üretimi benzer yetiştirme, muhafaza ve değerlendirme özelliklerine sahip olan elma üretimi kadar hızlı bir gelişme gösterememiştir. Armut yetiştiriciliği genellikle kapama bahçeler halinde değil, değişik tarım arazilerinde dağınık populasyon halindeki ahlal veya yabani armutlara aşlanarak yetiştirilmektedir. Bu yetiştirme özelliği, armudun anavatanlarından biri olan ülkemizde çeşit zenginliğinin korunmasında yararlı olmakla beraber bakım işlemlerinin yeterli yapılamaması nedeniyle ağaçların sağlıklı gelişmemeleri de, yeterli ve kaliteli ürün vermemelerine yol açmaktadır. Son yıllarda bu olumsuzluklara *Erwinia amylovora* bakterisinin neden olduğu ateş yanıklığı hastalığı da katılmış ve birçok bölgede armut ağaçları kurumaya başlamıştır (Özrenk (2002)'ye atfen Ünal vd 1998).

Yumuşak çekirdekli meyve ağaçlarında ciddi ürün kayıplarına yol açan hastalıkların başında gelen Ateş Yanıklığı Hastalığı, özellikle armut ağaçlarının en tehlikeli ve en eski hastalıklarından birisidir. Dünyada ilk kez Amerika'da 1780 yılında New York'ta görülen ateş yanıklığı hastalığı daha sonra tüm Amerika'ya yayılmıştır. 1840 yılında Kanada'ya, 1943'te Meksika'ya yayılan hastalık, 1957 yılında binlerce kilometre uzaklıktaki İngiltere'de görülmüş, ardından Hollanda ve 1971 yılında Almanya'ya, daha sonra Danimarka, Belçika, Fransa ve İsviçre gibi ülkelere yayılmıştır. 1960 yılında Mısır'da görülen hastalık daha sonra Kıbrıs, Lübnan ve İsrail'e gelmiştir. 2000 yılı itibariyle de 40 ülkeye yayıldığı ifade edilmektedir (Özrenk (2002)'ye atfen Güleriyüz,

1985; Van der Zwet and Beer 1995; Van der Zwet and Bonn 1999; Saygılı ve Türküsay 2000).

Türkiye’de ilk kez 1985 yılında Sultandağ-Afyon’da görülen bu hastalık (Öktem ve Benlioğlu 1998), daha sonra yumuşak çekirdekli meyve yetiştiriciliği yapılan tüm bölgelere yayılmıştır (Demir ve Gündoğdu 1991; Tokgönül ve Çınar 1991; Momol *et al.* 1992). Ülkemize girdikten sonra hızla yayılan bu hastalık diğer komşu ülkelere de geçmiştir. 40’a yakın cins ve yaklaşık 200 türde etkili olan bu hastalık özellikle armut üretimini çok etkilemiş, bazı yörelerde armut neslinin tükenmesine neden olmuştur. Ateş yanıklığı (*Erwinia amylovora*) hastalığının ülkemize girmesinden sonra kültürel bakımı yapılmayan mahalli armut ağaçlarında büyük çapta kurumalar meydana gelmiş (Demir ve Gündoğdu 1991) ve yerli armutlardaki çeşitliliğin kaybolması tehlikesi doğmuştur. Genetik stok özelliğindeki bu mahalli çeşitlerimizin, zamanla yok olmasına fırsat verilmeden belirlenip genetik materyal veya kontrollü yetiştiricilik için koruma altına alınması gereklidir.

Dünyada yetiştiriciliği yapılan birçok meyve türünün gen merkezi olan Anadolu, aynı zamanda diğer birçok meyve türünün binlerce yıldır yetiştiriliyor olmasından dolayı, meyve tür ve çeşidi bakımından da oldukça zengin durumdadır. *Pyrus communis* L. türünün kültür formlarının çoğu da Anadolu da oluşmuştur. Ülkemizdeki bu çeşit zenginliği, meyve ıslahçılarına, damızlık materyal sağlayacak bir kaynak teşkil etmektedir. Elimizdeki bu gen stokunun korunması ve ıslah materyali olarak kullanılması, yeni değerlerin ortaya çıkarılması, bitki ıslahında çalışanların başlıca görevleri arasındadır. Dolayısıyla burada en büyük sorumluluğun, tarımla, özellikle bitki yetiştiriciliği ile uğraşan teknik eleman ve bilim adamlarına düştüğünü önemle belirtmek gerekir.

Armutta ıslaha yönelik seleksiyon çalışmalarında çok çeşitli karakterler üzerinde durulmaktadır. Bunlar amacına göre değişmekle beraber; meyve kalite faktörleri, soğuklara dayanım, düzenli ve yüksek verim, hastalık ve zararlılara karşı mukavemet, ateş yanıklığı (*Erwinia amylovora*) hastalığına dayanıklılık, SÇKM ve pH, ağacın

gelişme kuvveti üzerinde durulan önemli özellikler arasındadır (Özbek 1947; Güteryüz 1977; Özbek 1978; Şen 1991; Bostan ve Şen 1991; Büyükyılmaz vd 1992; Aşkın ve Oğuz 1995; Ünal vd 1997).

Bitkiler arasındaki genetik varyasyonların belirlenmesinde ve bunların sınıflandırılmasında öncelikle morfolojik, fizyolojik ve sitolojik özellikler kullanılmış, daha sonra ise biyokimyasal markörler geliştirilmiştir. Son zamanlarda ise moleküler seviyede çalışmalar yapılmaktadır (Scarano *et al.* 2002).

Moleküler markörler, kaynağını kendilerinin üretildiği bitkilerin hücrelerinde bulunan DNA'lardan alır. Canlıların yapısını belirleyen şifrede DNA zincirlerinde olduğundan moleküler markörler, bitki popülasyonundaki çeşitlilik veya o popülasyon içindeki bitki genotipleri arasındaki ilişkilerin tespitinde %100'e yakın güvenilirlikle değerlendirilirler. Bugün moleküler markörler bitki sistematğinde, ıslahında ve gen kaynaklarının değerlendirilmesinde etkin olarak kullanılmaktadır (Gülşen ve Mutlu 2005).

Moleküler markörler, bitki organizmalarında detaylı fiziksel ve genetik kromozom haritalarının hazırlanmasında, bitkilerde istenilen özelliklerde seleksiyon yolu ile seçilmesinde ve klasik ıslah çalışmalarının başarı şansını artırmada, bitkilerde gen kaynaklarının özelliklerinin belirlenmesinde, genetik incelemelerde, transgenik bitkilerin belirlenmesi gibi birçok alanda kullanılmaktadır (Gupta *et al.* 1999, Atak 2004). Son yıllara kadar bu amaçla bitki enzimlerinin farklı elektroforetik özelliklerine dayalı izoenzimler gibi biyokimyasal markör teknikleri kullanılmıştır (Bilgin 2001). Hızlı ve maliyeti düşük olmasına rağmen bu teknikler sınırlı sayıda polimorfizmi tespit edebildiğinden yerini DNA markörlerine bırakmaktadırlar.

Bu tez çalışmasında, Erzincan ovasındaki merkez köylerinde yetişmekte olan armut çeşitleri arasındaki genetik ilişkinin DNA düzeyinde markör kullanılarak RAPD-PCR yönteminden yararlanıp karakterize edilmesi ve ileride yapılacak olan armut ıslah çalışmalarına önemli bir altyapı oluşturulması hedeflenmektedir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

İlk genomik çalışmalar gözle görülebilen özelliklerin değerlendirilmesi ve yorumlanması üzerine odaklanmıştır. Son yıllara kadar genomik çalışmaların büyük kısmında, Mendel tipi kalıtım gösteren, bitki morfolojisini etkileyen, cücelik, albinizm ve yaprak morfolojisi ile ilgili genler çalışılmıştır. Morfolojik karakterler bazı özgül genlerin takibini kolaylaştırır ve çoğunlukla dominant ya da resesif özelliklerle kalıtılırlar. Ancak morfolojik markörlerin genom analizinde kullanımları sınırlıdır. Bunlar;

- Fenotip üzerinde olumsuz etkilere sahip olabilmektedirler,
- İstenilen bazı özellikleri taşıyan genleri maskeleyebilmektedirler,
- Sayıları sınırlı olabilmektedir,
- Çevresel koşullardan yüksek oranda etkilenebilmektedirler (Farooq and Azam 2002).

Sistematik problemlerin aşılmasında kullanılan ilk biyokimyasal markörler proteinlerdir. Protein markörleri, depo proteinleri ve enzim proteinleri olarak iki ana gruba ayrılırlar. Depo proteinleri jel üzerinde hareket ettirip boyandıklarında farklı genotiplerde ortaya çıkan yapı farklılıkları genetik markör olarak kullanılabilir. (Yıldırım ve Kandemir 2001).

İzoenzimler ise, farklı genler tarafından üretilen, ancak birbirine çok benzeyen enzimleri ifade etmektedir ve en fazla kullanılan protein markörleridir. İzoenzimlerin metabolizmadaki rolünün iyi bilinmesi, kullanılan yöntemin hızlı ve ucuz olması, izoenzim markörlerinin temel avantajlarıdır. Fakat izoenzim lokus sayısının az olması, bazı izoenzimlerin belirli dokularda ve belirli gelişme dönemlerinde bulunması, post-translokasyonel modifikasyonlara uğramaları bu markörlerin kullanımını kısıtlamaktadır (Yıldırım ve Kandemir 2001; Karcicio 2006).

Son yıllarda büyük ilerleme gösteren DNA temelli yöntemler, bitki ıslahı çalışmalarında moleküler biyolojinin başvurduğu önemli araçlardır. Son zamanlarda DNA bazlı

birçok moleküler teknik geliştirilmiştir. Uygulanan bu yöntemlerde ideal DNA markörlerinin istenen özellikleri;

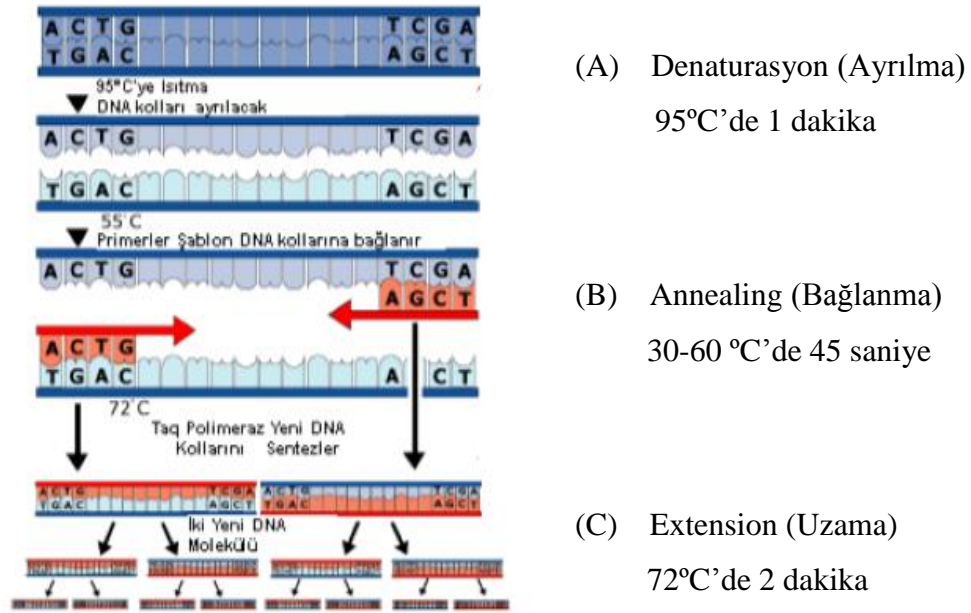
- Kolaylıkla bulunan
- Denenmesi kolay ve hızlı
- Yüksek oranda polimorfik ve üretilebilen
- Kodominant kalıtım ve genomda tekrarlanabilen
- Çevre koşullarından etkilenmeyen
- Farklı laboratuvarlar arasında veri değişimi kolay olmalarıdır (Sharma *et al.* 2008).

Genel olarak DNA'yı temel alan markör sistemleri, diğer markör sistemlerinden (özellikle morfolojik markörlerden) daha etkilidirler. Bunun nedenleri şu şekilde özetlenebilmektedir:

- Birçok morfolojik markör bitkinin bütününde fenotipik olarak gözlenirken, moleküler markörler tüm bitkide, doku ve hücresel düzeyde saptanabilmektedir.
- Morfolojik markörler ile karşılaştırıldığında moleküler lokusların allel frekansları daha yüksektir.
- Morfolojik mutantlar fenotipik olarak istenmeyen sonuçlar oluşturabilmektedir.
- Morfolojik markörlerin, heterozigot genotiplerin tanımlanmasında yetersiz olup, dominant-resesif durum sergilemesine karşın, moleküler markörler çoğunlukla kodominant kalıtım gösterirler (Karcicio 2006).

DNA markörler; melezlemeye dayalı (RLFP), PCR'a dayalı (RAPD, SSR, AFLP, STS vb.) ve dizi analizleri olmak üzere 3 grupta incelenebilmektedir (Gupta *et al.* 1999). PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) DNA polimeraz enziminin kullanılmasıyla yapay şartlarda DNA üretilmesini ifade etmektedir. Diğer bir ifade ile seçilmiş DNA parçasının çok sayıda kopyasını yapan enzimatik bir metottur. Bu teknik 1980'li yılların ortalarında geliştirilmiş ve genetik çalışmalarda devrim etkisi yapmıştır. Çünkü bu teknik hedef dizilimin birkaç saat içinde isabetli biçimde milyonlarca kopyasını üretmektedir. Ayrıca milyonlarca diğer dizilimlerle karışık bir karışım içinde, bir hedef

dizilimin başarılı bir şekilde çoğalmasını da mümkün kılmaktadır. Bu metot, hücrenin DNA kopyalama sürecinin aynısını taklit etmektedir. Reaksiyonun en önemli unsuru kısa başlatıcı dizilimlerdir. Bu yapay üretim için genelde 6-25 nükleotid uzunluğunda başlatıcı DNA'lar (primerler) kullanılmakta, DNA üretim işlemi birbirini izleyen bir seri ve çok özel işlemler sonucu sağlanmaktadır. *Thermus aquaticus* isimli bakterilerden elde edilen Taq polimeraze isimli DNA polimeraz özel enzimi ve dört DNA bazına gerek duyulmakta ve sonra 95°C civarında bir sıcaklık kullanımıyla DNA iplikçiklerinin açılması sonucu DNA tek iplikçik haline gelmekte (A), sonra 30-60°C civarında bir sıcaklıkta başlatıcı DNA kalıbın DNA'ya bağlanması (B), daha sonra da 72°C'de DNA üretimi sağlanmış olmaktadır (C) (Şekil 2.1). Bu devrelerin her biri 1-2 dakika kadar sürmekte, bu 3 devre istenildiği kadar tekrarlanarak istenilen miktarda DNA üretimi yapılabilmektedir (Maniatis *et al.*1982; Kumar 1989; Soysal 2002).



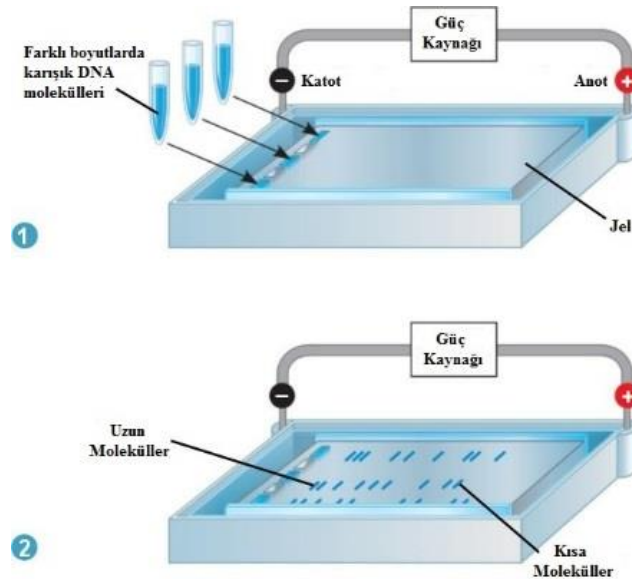
Şekil 2.1. DNA Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Aydoğan Çifci 2010)

PCR'ın kullanım alanları;

- Genetik haritalama çalışmaları
- Türler arasındaki polimorfizmin hesaplanması,

- Evrim çalışmaları,
- Bitkilerde tohum saflığının belirlenmesi,
- Adli tıp çalışmaları (Analık-babalık tayini- kimlik belirlenmesi vb.),
- Rekombinant DNA teknolojisi,
- Çeşitli kalıtsal hastalıkların doğum öncesi belirlenmesi,
- Mutant genlerin popülasyondaki devamlılığın izlenmesi,
- Genetik olarak değiştirilmiş organizmaların belirlenmesi,
- Toprak, su, gıda maddelerinde mikroorganizmaların belirlenmesi olarak sayılabilir (Eriş ve Gülen 2004).

DNA Polimeraz Zincir Reaksiyonundan sonra uygulanan elektroforez, uzunlukları değişken DNA parçalarını ayırmaya yarayan tekniklerdir. Ayırma işlemi için agaroz veya akrilamid kullanılarak oluşturulan jel kullanılmaktadır. Agaroz veya akrilamid ile hazırlanan jel özel kalıplara dökülmekte ve bir ucuna örneklerin konulacağı açıklıklar oluşturulmaktadır. Belli bir süre sonra hafifçe sertleşmiş olan jele örnekler konulmaktadır.



Şekil 2.2. Elektroforez (Anonim 2013)

DNA örneği konduktan sonra jel buffer solüsyonuna daldırılmakta, sonra bu jeller sürekli elektrik akımına maruz kalmaktadır. DNA molekölü genel olarak negatif elektrik yüklüdür. Bu nedenle pozitif kimyasal yapısı nedeniyle katot çekilmektedir. Tipik olarak birkaç saat içinde elektroforez bitirilir. İşlem bittiğinde jel içinde tutulmuş DNA Etidium Bromid ile boyandığından ultraviyole ışığı altında kolayca görölmektedir (Soysal 2002).

Moleküler DNA markörleri olarak en yaygın kullanılan yöntemlerin bazıları ile ilgili açıklamalar aşağıda verilmiştir.

RFLP markörleri ilk kullanılan hibridizasyon temelli bir markör sistemidir ve genetik analizlerde yaygın şekilde kullanılmaktadır. RFLP analizi, dokulardan izole edilen genomik DNA'nın nükleik asit dizilişlerini tanıyan DNA kesim enzimlerince spesifik olarak kesilmesi ve prob DNA'nın melezlendiği DNA etrafındaki farklı kesim yapılarının saptanması esasına dayanır. RFLP markörlerinin türler, cinsler ve hatta familyalar arasında transferleri mümkün kılması ve böylece, bir bitki türünde bir RFLP markörünün bir kez haritalanması ile akraba pek çok bitki sistemi için o haritalama bölgesinde potansiyel bir markör bulunabilmektedir. RFLP markörleri ile farklı laboratuarlarda çalışan araştırmacıların birbirleriyle tamamen aynı sonuçlar elde edilebilmesi olasıdır. RFLP markörleri eşbaskın (ko-dominat) özelliktedir. Böylece heterozigot bireylerin de karakterize edilmesi mümkün olmaktadır. RFLP markörlerinin analizlerinin pahalı olması, fazlaca zaman ve işgücü gerektirmesi en önemli dezavantajdır. Ayrıca bu yöntemde yaygın olarak radyoaktif etiketleme yapılması bir risk oluşturmaktadır. Bunların dışında RFLP analizi için fazla miktarda ve yüksek kalitede DNA gerekli olması ve genomlarda az kopya olan dizilişlerin belli noktalarda kümelenmesi nedeniyle RFLP markörlerinin genom üzerinde rasgele dağılışı göstermemeleri de diğer dezavantajlarıdır. Bu yüzden bu markörlere dayalı haritalarda yaygın olarak büyük boşluklar görölebilmektedir (Eriş ve Gülen 2004).

AFLP markörleri, genomun bütününde DNA polimorfizmini tespit için kullanılan bir markör sistemidir. RFLP ve PCR metodunun bir kombinasyonudur. Bu teknikte

genomik DNA önce birisi altı, diğeri dört taban tanıyan iki kesim enzimi tarafından kesilir. Kesilen parçaların uçlarına nükleotid dizilişi sentetik olan DNA'lar eklenir. Eklenen sentetik DNA'nın nükleotid dizilişini de taşıyan başlatıcı DNA'lar kullanımıyla nispeten spesifik DNA çoğaltımı yapılır. Üretilen parçacıklar bir baz uzunluğu farklarını dahi ayırt edebilen poliakrilamid jel üzerinde hareket ettirilerek farklı genotiplere ait farklılık gösteren parçacıklar tespit edilir (Yıldırım ve Kandemir 2001; Eriş ve Gülen 2004).

Haritalamada kullanılabilmesi, tüm genomun taranmasına olanak vermesi, parmak izi analizine izin vermesi, fazla lokus üretmesi gibi avantajlarının yanı sıra, teknik optimizasyonunun zaman alması ve pahalı oluşu, fazla miktarda DNA'ya ihtiyaç duyması, radyoaktif izotopların kullanılması ve çoğunlukla dominant kalıtım göstermesi bu yöntemin dezavantajları arasında sayılabilir (Karcicio 2006; Sharma *et al.* 2008).

Basit dizi tekrarları veya mikro satelitler ökaryotik genomlar boyunca dağılmış bulunan ve ardışık olarak tekrarlanmakta olan 2-6 nükleotid gruplarından oluşmaktadır. Bu gruplar örneğin (AT)_n (GT)_n veya (GACA)_n şeklinde gösterilmekte ve n ardışık tekrar sayısını belirtmektedir (Eriş ve Gülen 2004).

Mikro satelitleri çevreleyen DNA dizileri genellikle aynı türün bireyleri arasında korunmuş olmakla birlikte, ardışık SSR tekrar sayıdaki farklılık nedeniyle PCR sonucunda farklı uzunlukta DNA parçaları ortaya çıkar. Bu tekrarlar, çok yakın tür ve çeşitler arasında dahi tekrarlanan ünitelerin sayısında değişikliğe yol açan mutasyonlar nedeni ile oldukça polimorfiktir. SSR'leri çevreleyen DNA dizileri primer olarak kullanılarak, PCR yöntemi ile bir lokustaki farklı alleller tespit edilebilir. Amplifikasyon sonucunda elde edilen farklı uzunluktaki SSR alleller, jel elektroforezi ile ayrılabilir, gümüş boyama ve otoradyografi gibi yöntemlerle görüntülenebilir (Yeşbek 2007).

SSR tekniği genetik haritalama çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Yüksek oranda polimorfik olduklarından bitkilerde oldukça fazla bilgi verici bir özellik

gösterirler. En önemli dezavantajları poliakrilamid jel elektroforezi gerektirmesi, markör geliştirmenin oldukça fazla iş gücü ve zaman isteyen zor ve pahalı bir işlem olmasıdır (Yıldırım ve Kandemir 2001; Eriş ve Gülen 2004).

RAPD (Rasgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA); İlk defa 1990 yılında rasgele seçilmiş primerlerin kullanıldığı ve polimeraz zincir reaksiyonunu (PCR) temel alan bir teknik olarak ortaya çıkmıştır. Aynı yıllarda diğer bir çalışma grubu tarafından uygulanmış ve AP-PCR (Arbitrarily Primed PCR) olarak isimlendirilmiştir. 1991 tarihinde ise bu metotla aynı temele dayanan fakat farklı olarak 10 nükleotitten daha kısa primerlerle daha kompleks DNA parmak izi profili elde edilen DAF (DNA Amplification Fingerprinting) olarak isimlendirilen diğer benzer bir metot yayınlanmıştır (Özaydın 2004).

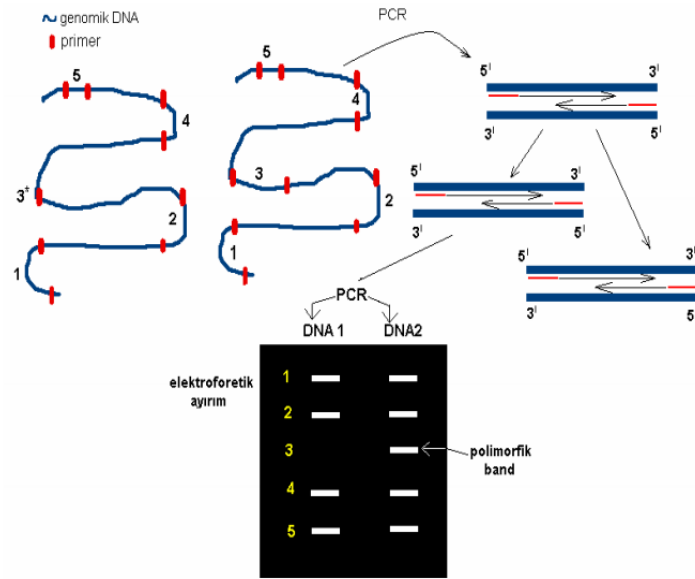
RAPD yöntemi sekans bilgisine gereksinim duymayan ve DNA'yı temel alan modifiye bir PCR tekniğidir. Tekniğin popülaritesi bulunuşundan itibaren hızlı bir şekilde artmıştır. Bakterilerden bitkilere ve insanlara kadar birçok organizmanın genomu RAPD markörlerini oluşturabilecek komplementer DNA dizisine sahiptir.

RAPD tekniğinin temel ilkesi; ilgili türe ait genomik DNA üzerinde rastgele seçilmiş, tek bir 9-10 bp oligonükleotidin, düşük bağlanma sıcaklığında tesadüfi olarak bağlanarak PCR ile çoğaltma yapmasıdır. Tekniğin devamında elde edilen çoğaltma ürünü radyoaktif olmayan standart jel elektroforezinde yürütülür ve çalışılan organizmalar oluşturdukları bant modellerine göre ayırt edilirler.

RAPD markörleri dominant özellik taşırlar. Görülen bantlar dominant alleli (A), görülmeyen bantlar ise resesif alleli (a) karakterize eder. Bu nedenle, homozigot (AA) ve heterozigot (Aa) bireyler birbirinden ayırt edilemez.

RAPD metodunun güvenilirliğini ve tekrarlanabilirliğini etkileyen pek çok farklı çoğaltma değişkeni vardır (Welsh *et al.* 1990; Williams *et al.* 1990; Rafalski *et al.* 1994). En önemli değişkenlerden birisi hedef DNA'dır. MgCl₂ konsantrasyonu, Tag

DNA polimeraz konsantrasyonu, primer konsantrasyonu, dNTP konsantrasyonu, primer bağlanması, başlangıç denaturasyonu, primer karışımları RAPD tekniğini etkileyen diğer temel değişkenlerdir. Ayrıca PCR'da oluşan çelişkili sonuçlardan, yabancı DNA tarafından oluşturulan kontaminasyona ek olarak DNA izolasyon tekniğindeki varyasyonlar, kullanılan doku kaynağı, PCR koşulları ve PCR cihazının tipi de sorumlu olabilmektedir (Özaydın 2004).



Şekil 2.3. RAPD reaksiyonunun şematik gösterimi (Yıldırım ve Kandemir 2001)

RAPD tekniğinin kullanım alanları; genetik çeşitliliğin belirlenmesi, genetik bağlantı haritalarının oluşturulması, filogenetik ilişkilerin araştırılması, popülasyon genetik yapısının analizi, bireysel parmak izi analizi, somatik hibritlerin tanımlanması, çeşitlerin tanımlanması, tür içi ve türler arası genetik değişkenliğin tespit edilmesi, hastalık ve zararlılara karşı dirençlik genlerinin işaretlenmesi, atasal türlerin saptanması, germplazm koleksiyonlarının genetik yapılarının ortaya çıkarılması ve bu konulardaki bazı ikilemlerin giderilmesi, genetik erozyonun izlenmesi ve cinsiyet tespitidir (Özaydın 2004).

RAPD yönteminin en büyük avantajları arasında, ucuz olması, çabuk sonuç vermesi, az miktarda DNA'ya ihtiyaç duyması, yüksek kalitede DNA gerektirmemesi, çok az

ekipmana gereksinim olması, radyoaktiviteye, Southern transferlere veya DNA hibridizasyonuna gerek duyulmaması sayılabilir (Williams *et al.* 1990; Özyayın 2004). Bununla beraber; belirteçlerinin dominant olması ve heterozigotları teşhis etmenin güç olması, çalışmalar sonucu elde edilen verilerin tekrarlanabilirliğinin düşük olması gibi bazı dezavantajları da vardır (Tingey *et al.* 1993; Gupta *et al.* 1999; Özyayın 2004).

Yukarıda tanımı yapılan bu metotların yanı sıra PCR'a dayalı moleküler DNA yöntemleri arasında; STS (Sequence Tagged Sites/ Dizisi Etiketlenmiş Bölge), EST (Expressed Sequence Tags/ İfade Edilen Dizi Etiketleri), ISSR (Inter Simple Sequence Repeats), SCARs (Sequence Characterized Amplified Regions/ Dizisi Karakterize Edilmiş Çoğaltılmış Bölgeler), CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence/ Çoğaltılmış Kesilmiş Polimorfik Dizi), SNP (Single Nucleotide Polymorphism/ Tek Nükleotit Polimorfizmi) gibi yöntemlerde kullanılmaktadır. Bu yöntemlerin kullanım alanları ise aşağıda verilmiştir.

STS (Sequence Tagged Sites), rasgele amplifikasyon profili ortaya çıkan yöntemlerin aksine STS markör sisteminde hedef alınan özgül bölgelerin çoğaltılması söz konusudur. STS'ler kromozomal yerleşimi ve nükleotid dizi bilinen 60-1.000 bp uzunluğunda genom bölgeleridir. Bu bölgelerin çoğaltımında kullanılan primerler (16-24 baz), genomda az sayıda bulunan, fakat genomlar arasında yüksek oranda korunmuş dizilere özgü seçilmektedir. Amplifikasyon ürünleri uzunluk olarak farklı olmasa da, uygun restriksiyon enzimleriyle yapılan kesim sonucunda farklı genotipler arasında mevcut nükleotid değişiklikleri tanımlanabilmektedir (Yıldırım ve Kandemir 2001; Karcicio 2006).

EST (Expressed Sequence Tags/ İfade Edilen Dizi Etiketleri), cDNA klonlarının rasgele dizi analizi olarak da bilinir. EST yöntemi haritalama ve dizileme çalışmaları için uygun bir yöntemdir. cDNA'lar ve mRNA'lardan elde edildikleri için belirli şartlarda ya da gelişimin farklı aşamalarında ifade edilen genlerin incelenmesine olanak sağlar (Yeşbek 2007). Bu yöntemle örneğin mısır bitkisinde LD geninin genomik klonu elde edilmiştir.

ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) hedef dizilerinin arasındaki bölgeleri çoğaltmak için SSR primerlerini kullanan, PCR tekniğine dayanan yöntemdir. Birbirine yakın bulunan SSR'ler arasındaki DNA dizileri çoğaltılır ve ortaya çıkan fragmentlerin uzunlukları karşılaştırılır. Çoğunlukla dominant markörlerdir. Yüksek polimorfizm göstermeleri, güvenilir olmaları ve otomasyona uygunlukları nedeniyle oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır (Yeşbek 2007).

SCAR, özgül oligonükleotit çiftleri ile çoğaltılabilen ve genetik açıdan tek bir lokus olarak tanımlanan genomik DNA fragmentlerini karakterize eder. SCAR markörleri kodominant olarak kalıtılırlar. 1993 yılında RAPD markörleri SCAR markörlerine dönüştürülmüş ve RAPD markör sisteminin etkinliği biraz daha artırılmıştır. Bu işlemin yapılabilmesi için amplifikasyon ürünleri kodlanır ve dizisi belirlenir. SCAR markörleri restriksiyon enzimleri ile kesilerek kodominant markörlere dönüştürülebilmektedir (Tavale 2001; Karcicio 2006).

CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence), PCR-RFLP olarak da bilinir ve PCR ürünlerinin restriksiyon enzimleriyle kesimi sonucunda oluşan DNA fragmentlerindeki polimorfizmlerini yansıtır. Primer dizaynı için gerekli olan dizi bilgisi gen bankası, genomik DNA, cDNA yâda klonlanmış PCR ürünlerinden sağlanır. Kesim ürünlerinin boyutları karşılaştırılarak polimorfizmler ortaya çıkarılabilir. Bu markör sistemi kodominant özellik gösterir (Tavale 2001; Karcicio 2006).

SNP (Single Nucleotide Polymorphism/ Tek Nükleotit Polimorfizmi) özellikle son yıllarda genom taramalarında sıkça kullanılmaktadır. SNP'ler genetik bir lokusta farklı alleller oluşturacak biçimde baz/bazlarda meydana gelen nokta mutasyonların sebep olduğu polimorfizmlerdir. Teorik olarak, bir lokustaki SNP dört bazdan birini bulunduracak şekilde, dört allel oluşturabilir. SNP'ler hem kodlayıcı hem de kodlayıcı olmayan DNA bölgelerinde meydana gelebilir (Gupta *et al.* 1999; Karcicio 2006).

Armut (*Pyrus spp.*) türünde RAPD yöntemi ile ilgili yapılmış olan çalışmalar;

Oliveria *et al.* (1999), yapmış oldukları bir çalışmada RAPD tekniği kullanılarak armut genotipleri arasındaki genetik akraba belirlemeye çalışılmışlardır. Çalışmada *Pyrus communis* (9 çeşit) ve *Pyrus pyrifolia* (2 çeşit) ile *Pyrus cordata*, *Pyrus bourgaeana*, *Pyrus pyraster* armut türleri kullanılmıştır. 60 RAPD primeri denenmiş ve 22'si çalışmada uygun bulunarak kullanılmıştır. Çalışma sonucunda, RAPD primerlerinin kullanılması ile armut genotiplerinin moleküler karakterizasyonunun yapılarak aralarındaki genetik akrabalığın belirlenebileceği saptanmıştır.

Inoue *et al.* (2006), Japonya'da yapmış oldukları bir çalışmada Japon armutlarında meyve kabuğu rengini kontrol eden önemli genlerle bağlantılı RAPD markırların geliştirilmesi amaçlanmıştır. Çalışma sonucunda, Japon armutlarının meyve fenotipi ile yakından bağlantılı RAPD DNA markırları geliştirilmiş ve kullanışlı bulunmuştur. Elde edilen bu markırların armut ıslah çalışmalarında başarılı bir şekilde kullanılabilecekleri belirlenmiştir.

Ritschel *et al.* (2007), yapmış oldukları bir çalışmada Avrupa armutları (*Pyrus communis*), Asya armutları (*Pyrus pyrifolia* ve *Pyrus ussuriensis*) ve bunların hibrit çeşitlerini kullanmışlardır. Çalışmada RAPD tekniği kullanılarak bu koleksiyondaki 46 çeşidin genetik çeşitliliğini analiz etmişlerdir. 160 primer den 87'si üretilebilir ve polimorfik bulunmuştur. Çalışma sonunda elde ettikleri dendogramda Avrupa, Asya ve hibrit armut çeşitleri farklı gruplarda toplandığı belirlenmiştir.

Palombi *et al.* (2007), Fe klorozuna toleranslı yabancı armutların *in vitro* rejenerasyonu üzerinde çalışmışlardır. Ortaya çıkan somaklonal varyasyonu ise RAPD tekniğini kullanarak analiz etmişlerdir. 7 RAPD primeri kullandıkları çalışmada ortaya çıkan genetik çeşitliliği belirleyebilmişlerdir.

Cho *et al.* (2009), yapmış oldukları bir çalışmada, türler arası melezleme ile elde edilen armutlarda (*Pyrus spp.*) çok zarar veren *Venturia nashicola* etmeninin neden olduğu

fungus bir hastalığa dayanıklılık geni olan Rvn-2 geni ile bağlantılı AFLP ve CAPS markırları geliştirilmiştir. Çalışma sonucunda CAPS markırlarının armut ışlah programlarında bu hastalığa dayanıklı olan genotipleri belirlemede etkili bir şekilde kullanılabileceği ifade edilmiştir.

Choi *et al.* (2010), Asya armutlarında (*Pyrus spp.*) genetik harita oluşturma çalışması yapmışlardır. Çalışmada *Pyrus pyrifolia* cv. Niiitaka ve *Pyrus ussuriensis* cv. Suhyangii arasında yapılan melezlemeden elde ettikleri 94 F1 bitkisi ele alınmıştır. Genetik haritaların oluşturulmasında RAPD, AFLP ve SSR markırlarının, armut genotiplerinin genetik haritalarının oluşturulmasında başarılı bir şekilde kullanılabileceği belirlenmiştir.

Lin *et al.* (2011), RAPD parmak izi kullanılarak *Pyrus spp.* eşitlerinin pratik olarak tanımlanması için yeni ve etkili bir strateji geliştirme adlı bir çalışma yapmışlardır. Çalışmada 68 armut çeşidi arasındaki genetik ilişki araştırılmıştır. Bunun için 8 RAPD (11-mer) primeri kullanmışlardır. Sonuç olarak RAPD tekniğinin armut çeşitlerini genetik olarak karakterize etmede başarılı bir şekilde kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Bitki Materyali

Bu araştırmada kullanılacak olan armut çeşitlerine ait yaprak örnekleri 2012 yılı Nisan ayında Erzincan ili merkez köylerinde yapılan arazi çalışması ile temin edilmiştir. 21 armut çeşidinden yaprak örnekleri alınarak buz kutusu içerisinde muhafaza edilmiş ve en kısa zamanda laboratuvara ulaştırılarak -80°C buzdolabına koyularak laboratuvar çalışmasına kadar muhafazası sağlanmıştır. 21 armut çeşidine ait yaprak örnekleri daha sonra RAPD analizinde kullanılmıştır. Araştırmada kullanılan armut çeşitleri ve örneklerin alındığı yer, koordinatları ve rakım bilgisi Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Araştırmada kullanılan armut çeşitleri ve alındığı yerler

Örnek No	Örnek Adı	Yer/Mevki	Koordinatlar		Rakım (m)
			x	y	
1	Bayram Yaprığı	Yeşilçay Köyü Kırılolu Mahallesi	530743	4398041	1394
2	Evliya Yatağı (Hüsrev)	Ekmekli Köyü Evliya Yatağı Mah.	530743	4398041	1394
3	Karanfil	Bahçeli Köy Çay Mahallesi	530090	4402214	1342
4	Esmâ Hatun	Yeşilçay Köyü Kırılolu Mahallesi	530756	4398011	1390
5	Mihrali	Ekmekli Köyü Köyiçi Mevkii	530154	4402201	1337
6	Hacı Hamza	Bahçeli Köy Çay Mahallesi	530131	4402215	1340
7	Bal Armudu	Bahçeli Köy Çay Mahallesi	530134	4402134	1340
8	Hacı Hamza	Yalnızbağ Köyü Köyiçi	535289	4407383	1314
9	Taş Armudu	Yalnızbağ Köyü Yavuz Selim Mah.	535267	4407491	1330
10	Adam Boğan	Ekmekli Köyü Evliya Yatağı Mah.	530084	4401862	1350
11	Mıgırık	Ekmekli Köyü Köyiçi	530150	4402170	1333
12	Göksulu	Bahçeli Köy Çay Mahallesi	530118	4402206	1332

Çizelge 3.1 (devam)

13	Taş Armudu	Cevizli Köyü Faraş Mahallesi	530253	4399774	1400
14	Orak Armudu	Ekmekli Köyü Evliya Yatağı Mah.	530098	4401899	1344
15	Kabak Armudu	Yalnızbağ Köyü Köyiçi	535286	4407380	1326
16	Kış Armudu	Yeşilçay Köyü Kırtıloğlu Mahallesi	530787	4398001	1380
17	Kırtıl Armutu (Mehrani)	Yeşilçay Köyü Kırtıloğlu Mahallesi	530790	4397980	1380
18	Limon Armudu	Ekmekli Köyü Evliya Yatağı Mah.	530141	4401888	1342
19	Hacı Osman	Bahçeli Köy Çay Mahallesi	530112	4402141	1345
20	Çermail	Yalnızbağ Köyü Köyiçi Mavkii	535286	4407383	1322
21	Hoca Mustafa	Oğlaktepe Köyü Köyiçi	533818	4399877	1198

Çalışma kapsamında kullanılan çeşitlerin genel özellikleri Çizelge 3.2 de belirtilmiştir;

Çizelge 3.2. Araştırmada kullanılan armut çeşitlerinin genel özellikleri

Örnek No	Örnek Adı	Morfolojik Özellikleri	Belirgin Özelliği
1	Bayram Yaprağı	Dikine büyümüş piramit şeklinde bir taç'a sahip, gövdesi ise koyu gri renkte ve parçalı bir yapıdadır. Meyveleri küçük bardak şekline benzemektedir, olgunlaştıklarında sarı rengi alır ve tatlı suludur.	Ateş Yanıklığına dayanıklıdır.
2	Evliya Yatağı	Yayvan şeklinde taç oluşturmuş, gövdesi ise gri renkte ve pürüzsüz bir yapıya sahip. Meyveleri büyük bardak şekline benzemektedir, olgunlaştıklarında sarı-kırmızı renk almaktadır ve tatsız ve kumludur.	Büyük ve tatsız meyvelere sahiptir.
3	Karanfil	Yayvan şeklinde taç oluşturmuş, orta boylu bir yapıya sahip, gövdesi ise gri renkte ve pürüzsüz bir yapıdadır. Meyveleri ayva büyüklüğünde ve yumurta şekline benzemektedir, olgunlaştıklarında sarı renk almaktadır ve tatlı, sulu ve kokulu yaz armududur.	Kendine has kokusu ve tadı var
4	Esmâ Hatun	Dikine büyümüş yayvan şeklinde taç oluşturmuş bir yapıya sahip, gövdesi ise koyu gri renkte ve parçalı bir yapıya sahip. Meyveleri ayva büyüklüğünde ve ayva şekline benzemektedir, olgunlaştıklarında bal rengi almaktadır ve çok tatlı, sulu ve kumsuzdur ancak muhafaza ömrü çok kısadır.	Muhafazaya dayanıksızdır, hasattan sonra hemen tüketilmelidir.

Çizelge 3.2 (devam)

5	Mihrali	Dikine büyümüş geniş bir şekilde taç oluşturmuş bir yapıya sahip, gövdesi ise koyu kahverengi renkte ve parçalı bir yapıya sahip. Meyveleri orta büyüklüktedir, olgunlaştıklarında yeşil-sarı renk almaktadır ve tatlı, sulu ve kumludur.	Sert ve dayanıklı meyveleri vardır. Haziran ayına kadar muhafaza edilebiliyor.
6-8	Hacı Hamza	Yayvan şeklinde taç oluşturmuş, orta boylu bir yapıya sahip, gövdesi ise kahverengi-gri renkte ve parçalı bir yapıya sahip. Meyveleri orta büyüklükte ve ampul şeklindedir, olgunlaştıklarında sarı renk almaktadır ve aşırı tatlı, sulu ve kumludur.	Geç meyveye yattığı ve verim yönünden azdır. Dayanıksızdır ve muhafazası yapılamıyor.
7	Bal Armudu	Dikine büyümüş geniş bir şekilde taç oluşturmuş bir yapıya sahip, gövdesi ise koyu kahverengi renkte ve parçalı bir yapıya sahip. Meyveleri ufak ve yumurta şeklindedir, olgunlaştıklarında sarı renk almaktadır. Çok tatlı, sulu ve kumsuzdur.	Kendine has kokusu vardır. Ateş yanıklığına dayanıklıdır.
9-13	Taş Armudu	Yayvan şeklinde taç oluşturmuş, orta boylu bir yapıya sahip, gövdesi ise gri renkte ve pürüzsüz bir yapıya sahip. Meyveleri orta büyüklükte ve ampul şeklindedir, olgunlaştıklarında sarı renk almaktadır ve ekşimsi, sulu ve kumludur. Uzun ömürlüdür.	Dayanıklı bir çeşittir. Aralık ayına kadar dalında kalabiliyor haziran ayına kadar muhafazası yapılabiliyor.
10	Adam Boğan	Dikine büyümüş geniş bir şekilde taç oluşturmuş bir yapıya sahip, gövdesi ise koyu kahverengi renkte ve parçalı bir yapıya sahip. Meyveleri küçük ve ampul şeklindedir, olgunlaştıklarında sarı renk almaktadır ve tatsız ve kumsuzdur.	Tatsız ve susuzdur.
11	Mıgırık	Yayvan şeklinde taç oluşturmuş, orta boylu bir yapıya sahip, gövdesi ise gri renkte ve pürüzsüz bir yapıya sahip. Meyveleri orta büyüklükte ve olgunlaştıklarında sarı renk almaktadır ve kumludur.	Bilinen iki tipi var; biri üstten biraz basık diğeri uzun kabak şeklindedir. Sert ve dayanıklıdır.
12	Göksulu	Geniş bir şekilde taç oluşturmuş orta boylu bir yapıya sahip, gövdesi ise gri renkte ve pürüzsüz bir yapıya sahiptir. Meyveleri orta büyüklükte ve yuvarlaktır, olgunlaştıklarında sarı-kırmızı renk almaktadır ve tatlı suludur.	Muhafazaya dayanıksızdır, hasattan sonra hemen tüketilmelidir.
14	Orak Armudu	Yayvan şeklinde taç oluşturmuş, orta boylu bir yapıya sahip, gövdesi ise gri renkte ve pürüzsüz bir yapıya sahip. Meyveleri orta büyüklükte ve limon şeklindedir, olgunlaştıklarında sarı renk almaktadır ve kumludur.	Meyvelerin görünüşü çok güzeldir ama tatsız kumlu ve susuzdur.
15	Kabak Armudu	Yayvan şeklinde taç oluşturmuş uzun iri bir gövdeye sahip bir yapı, gövde ise koyu gri renkte ve pürüzsüz bir yapıya sahip. Meyveleri orta büyüklükte uzun kabak şekline benzemektedir, olgunlaştıklarında sarı-yeşil renk almaktadır ve tatlı, sulu ve kumsuzdur.	Hasattan sonra durdukça olgunlaşır, dayanıklıdır.

Çizelge 3.2 (devam)

16	Kış Armudu	Dikine büyümüş yayvan şeklinde taç oluşturmuştur, gövdesi ise kahverengi-gri renkte ve parçalı bir yapıya sahip. Meyveleri orta büyüklükte ve ayva şeklindedir, olgunlaştıklarında sarı-yeşil renk almaktadır ve mayhoş tadı vardır, sulu ve kumsuzdur.	Mart ayına kadar dalında üşümeden durur.
17	Kırtıl Armutu	Yayvan şeklinde taç oluşturmuş uzun iri bir gövdeye sahip bir yapı, gövde ise koyu gri renkte ve parçalı bir yapıya sahiptir. Meyveleri orta büyüklükte ve vazo şeklindedir, olgunlaştıklarında sarı renk almaktadır ve çok tatlı kumludur. Muhafazası kısadır.	Muhafaza ömrü yok denecek kadar kısadır. Dalında olgunlaştıktan sonra kısa sürede hasat edilip tüketilmelidir
18	Limon Armudu	Dikine büyümüş piramit şeklinde bir yapıya sahip, gövdesi ise gri renkte ve pürüzsüz bir yapıya sahip. Meyveleri orta büyüklükte ve ampul şeklindedir, olgunlaştıklarında sarı-kırmızı renk almaktadır ve mayhoş tadı vardır, sulu ve kumsuzdur.	Ateş Yanıklığına dayanıklıdır.
19	Hacı Osman	Dikine büyümüş geniş bir şekilde taç oluşturmuş bir yapıya sahip, gövdesi ise koyu kahverengi renkte ve parçalı bir yapıya sahip. Meyveleri küçük ve yumurta şeklindedir, olgunlaştıklarında yeşil-sarı renk almaktadır. Tatlı, sulu ve kumludur.	Hasattan sonra durdukça olgunlaşır, dayanıklıdır.
20	Çermail Armudu	Yayvan şeklinde taç oluşturmuş, orta boylu bir yapıya sahip, gövdesi ise gri renkte ve pürüzsüz bir yapıya sahip. Meyveleri küçük ve yuvarlak şeklindedir, olgunlaştıklarında sarı renk almaktadır ve mayhoş tadı vardır ve suludur.	Ateş yanıklığına dayanıklıdır.
21	Hoca Mustafa	Dikine büyümüş yayvan şeklinde taç oluşturmuştur, gövdesi ise kahverengi-gri renkte ve parçalı bir yapıya sahip. Meyveleri orta büyüklükte, olgunlaştıklarında sarı renk almaktadır ve mayhoş tadı vardır, sulu ve kumsuzdur.	Haziran ayına kadar meyvelerin muhafazası yapılıyor. Ateş Yanıklığına dayanıklıdır.

3.2. DNA izolasyonu için kullanılan çözeltiler

- **DNA ekstraksiyon çözeltisi**

100 mM Tris-HCl (pH 8,0)

50 mM EDTA (pH 8,0)

500 mM NaCl

%2 SDS (w/v)

%2 β -mercaptoethanol (v/v)

%1 PVP (w/v)

- **CTAB/NaCl**

%10 CTAB (Setil Trimetil Amonyum Bromür)

0,7 M NaCl

- **Fenol: Kloroform: İzoamil alkol**

25: 24: 1 oranında hazır olarak bulunmakta

- **Kloroform: İzoamil alkol**

24: 1 oranında hazır olarak bulunmakta

- **TE tamponu:**

10 mM Tris-HCl (pH 8,0)

1 mM EDTA (pH 8,0)

- **%70'lik Etil Alkol:**

70 ml etil alkol distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

3.3. PCR ve Elektroforez işlemleri için kullanılan çözeltiler

- **Ethidium Bromür Çözeltisi**

500 ml 0.5xTBE tamponu içerisine 300 µl ethidium bromür ilave edilerek hazırlanmış ve karanlık ortamda oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

- **Bovine Serum Albumin**

1 ml steril distile su içerisinde 20 mg bovine serum albumin olacak şekilde hazırlanmış ve – 20°C'de muhafaza edilmiştir.

- **Bromfenol Blue Çözeltisi**

0.25 g bromfenol blue, 0.25 g xylene cyanol FF ve 30 ml gliserol'ün toplam hacminin 100 ml'ye tamamlanmasıyla hazırlanmış ve çözelti otoklavda steril edildikten sonra +4°C'de muhafaza edilmiştir.

- **0,5X TBE tamponu**

Bu araştırmada kullanılan TBE tamponu 10X TBE olarak satın alınmış ve 0,5 birim 10X TBE tampon + 9,5 birim saf su ilavesi ile 0,5X TBE tamponu hazırlanmıştır.

▪ Primerlerin Hazırlanması

Kullanılan primerler firmanın önerdiği miktarda sulandırılarak stok solüsyonu, daha sonra da uygun hesaplamalar ile 1 μ M olacak şekilde çalışma solüsyonları hazırlanmıştır.

3.4. Yararlanılan alet ve cihazlar

Moleküler Çalışmalar esnasında kullanılan alet ve cihazlar aşağıda verilmiştir.

- ✓ Buzdolabı (Arçelik)
- ✓ Derin Dondurucu (Uğur Derin Dondurucu)
- ✓ Hassas Terazı (Shimadzu, AY220)
- ✓ PCR Cihazı (Thermo Scientific)
- ✓ Otomatik Mikro Pipetler (Eppendorf)
- ✓ Otoklav (Wiswclave)
- ✓ Su Banyosu (Wirse Circu)
- ✓ Soğutmalı Santrifüj (Thermo Scientific, MR 23i Centrifuge)
- ✓ Nanodrop (Thermo Scientific)
- ✓ Manyetik Karıştırıcı (Heidolph, MR Hei-Standard)
- ✓ Mikrodalga Fırın (Blueline)
- ✓ Güç kaynağı (OWI Separation System)
- ✓ Elektroforez Sistemi (OWI) ve (Sigma-Aldrich)
- ✓ Jel Görüntüleme Sistemi (Bio-Rad, Gel-Doc 2000)
- ✓ Saf Su Makinası (Nüve, NS112)
- ✓ Buz Makinası (Scotsman AF-80)
- ✓ Etüv (Memmert)
- ✓ Vorteks (Wisemix, VM-10)
- ✓ -86 C Soğutucu (Nuair Glacier, -86 ultra low)

3.5. Yöntem

RAPD (rasgele çoğaltılmış DNA farklılığı tekniği), polimeraz zincir reaksiyonu (PCR / Polymerase Chain Reaction) yardımıyla sentetik oligonükleotidler olan 10 baz uzunluğundaki primerlerin genomik DNA'larla çoğaltılması esasına dayanmaktadır.

Isısal döngü cihazı içerisinde, uygun bir çoğaltma sıcaklığında, oligonükleotidler kalıp DNA üzerindeki bağlanma noktalarına yapışarak eğer bu noktalar birbirinden çoğaltılabilir uzaklıklarda bulunuyorlarsa kısmen kısa DNA parçacıkları üretmektedirler. Üretilen nükleotidlerin sayısı ve miktarında farklılıklar olmaktadır. Çünkü farklı örneklerin DNA'larındaki primer bağlanma bölgeleri farklılık göstermektedir (Çalışkan 2005).

3.5.1. DNA izolasyonu

DNA izolasyon protokolü olarak Lin *et al.* (2001) esas alınmıştır. Yaklaşık olarak 100-150 mg yaprak örneği sıvı azotta parçalanarak 2ml'lik eppendorf tüplere alınmıştır. Bitki materyali üzerine 1000 µl DNA ekstraksiyon çözeltisi eklenmiş ve alt üst edilerek karıştırılmış ve önceden 65°C'ye ayarlanan su banyosunda 5 dakika aralıklarla çalkalanarak 45 dakika bekletilmiştir. Yaprak örnekleri daha sonra 12 000 rpm hızda ve 4 °C'de 10 dakika soğutmalı santrifüj içerisinde santrifüjlenmiştir. Üst faz yeni bir tüpe aktarılmıştır. Eşit hacimde Fenol: Kloroform: İzamil alkol (25: 24: 1) ilave edilerek 5 dakika santrifüjlenmiştir. Üst faza 1/10 hacim %10 CTAB/ 0.7 M NaCl çözeltisinden eklenmiş ve alt üst ederek karıştırılmıştır. 5 dakika santrifüjlenmiştir. Kloroform: İzamil alkol (24: 1) eklenerek birkaç kez alt üst edilerek karıştırılmış ve 5 dakika santrifüjlenmiştir. Üst faz dikkatli bir şekilde yeni bir tüpe aktarılmıştır. DNA'yı çöktürmek için 0,6 hacim soğuk izopropanol eklenmiş ve -20°C'de 10 dakika bekletilmiştir. 10 dakika santrifüjlenerek üst fazı atılmıştır. DNA önce %100'lük sonra %70'lik soğuk ethanol ile yıkanmıştır. Bir gece bekletilerek kurutulmuş DNA, 100 µl TE tamponunda çözülerek kullanılmaya kadar -20°C'de buzdolabında muhafaza edilmiştir.

3.5.2. DNA konsantrasyonu ve saflığının belirlenmesi

İzolasyon sonrasında elde edilen DNA'ların miktarı ve kalitesi optik dansite (OD) ile kontrol edilmiştir. Bunun için, 260 (OD₂₆₀) ve 280 (OD₂₈₀) nanometre optik dansitedeki spektrofotometre nanodrop okumaları yapılmıştır. Elde edilen değerler ve bunların birbirine oranları kullanılarak, DNA miktar ve saflıkları belirlenmiştir. DNA'nın saflığını gösteren bu değer 1,2-1,7 (OD₂₆₀ / OD₂₈₀) arasında olması gerekmektedir (Ercişli vd 2008). Çizelge 3.3'de çalışmada kullanılan armut çeşitlerinin DNA miktar ve saflık değerleri verilmiştir.

Çizelge 3.3. Armut çeşitlerine ait DNA örneklerinin nanodrop spektrofotometrik ölçüm değerleri

	Örnek No	OD ₂₆₀ (nm)	Saflık Değeri (OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀)	DNA Miktarı (ng/µl)
1	Bayram Yaprağı	0,1707	1,2193	164,14
2	Evliya Yatağı	0,1661	1,2231	159,71
3	Karanfil	0,1641	1,2672	157,79
4	Esmâ Hatun	0,3112	1,3026	299,23
5	Mihrali	0,2024	1,1672	194,61
6	Hacı Hamza	0,1637	1,2592	157,40
7	Bal Armudu	0,4614	1,1898	443,65
8	Hacı Hamza	0,1875	1,2542	180,29
9	Taş Armudu	0,0831	1,1871	79,90
10	Adam Boğan	0,0848	1,6320	81,54
11	Mıgırık	0,2347	1,6250	225,67
12	Göksulu	0,2655	1,2383	255,28
13	Taş Armudu	0,1455	1,2005	159,90
14	Orak Armudu	0,3583	1,1904	344,52
15	Kabak Armudu	0,1808	1,1167	173,85
16	Kış Armudu	0,4465	1,1964	429,33
17	Kırtıl Armudu	0,1166	1,2538	112,12
18	Limon Armudu	0,3172	1,2582	305,00
19	Hacı Osman	0,1812	1,1269	174,23
20	Çermail	0,2970	1,1624	285,58
21	Hoca Mustafa	0,2577	1,1613	247,78

3.5.3. DNA amplifikasyon koşulları ve primerler

Öncelikle, hangi RAPD primerlerinin kullanılacağı belirlenmiştir. Bunun için, 6. sıradaki armut tipi kullanılmıştır. 10 baz uzunluğundaki toplam 27 primer (Operon Technologies Inc., Alameda, CA, USA) kullanılarak RAPD tekniği ile PCR'da armut çeşitlerine ait bantlar elde edilmiştir. Bunlardan 17'si amplifikasyon vermiştir. Çizelge 3.4'de, bu primerlerin isimleri ve baz sırası (5' → 3') ve amplifikasyon durumları verilmiştir.

Çizelge 3.4. Çalışmada kullanılan 27 adet RAPD primeri, baz dizilimleri ve amplifikasyon durumları

No	Primer Adı	Baz Sırası (5' → 3')	Amplifikasyon
1	OPW-01	CTCAGTGTCC	-
2	OPW-04	CAGAAGCGGA	+
3	OPW-05	GGCGGATAAG	+
4	OPW-06	AGGCCCGATG	+
5	OPW-07	CTGGACGTCA	-
6	OPW-08	GACTGCCTCT	+
7	OPW-11	CTGATGCGTG	+
8	OPW-13	CACAGCGACA	+
9	OPW-17	GTCCTGGGTT	-
10	OPW-18	TTCAGGGCAC	+
11	OPW-20	TGTGGCAGCA	+
12	OPA-01	CAGGCCCTTC	+
13	OPA-02	TGCCGAGCTG	+
14	OPA-04	AATCGGGCTG	+
15	OPA-13	CAGCACCCAC	+
16	OPH-14	ACCAGGTTGG	-
17	OPH-17	CACTCTCCTC	-
18	OPH-18	GAATCGGCCA	+
19	OPH-19	CTGACCAGCC	+
20	OPY-06	AAGGCTCACC	-
21	OPY-07	AGAGCCGTCA	-
22	OPY-08	AGGCAGAGCA	+
23	OPY-13	GGGTCTCGGT	-
24	OPY-15	AGTCGCCCTT	+
25	OPY-16	GGGCCAATGT	-
26	OPB-08	GTCCACACGC	-
27	OPB-10	CTGCTGGGAC	+

3.5.4. RAPD-PCR analizleri

PCR işlemi için aşağıdaki protokol izlenmiştir;

0,2 ml'lik PCR tüplerinin her birine, 3 µl 10X PCR tamponu, 1,3 µl BSA (10 mg/ml), 0,60 µl dNTP (10 mM), 1,20 µl MgCl₂ (25 mM), 3,00 µl DNA (100 ng/µl), 1,2 µl primer (5 µM), 0,30 µl 5 Unit/µl *Taq* DNA polimeraz ve 17,60 µl saf su ilave edilerek hacim 30 µl'ye tamamlanmıştır (Çizelge3.5). Buharlaşıma olmaması için her reaksiyon tüpüne mineral yağ damlatılmıştır (Şekil 3.16). Bu işlemlerin ardından örnekler PCR (Thermal Cycler) cihazına yerleştirilmiştir.

Çizelge 3.5. RAPD-PCR reaksiyon hacmi

dH ₂ O	: 17,60 µl
10 x PCR tamponu	: 3,00 µl
dNTP	: 0,60 µl
MgCl ₂	: 1,20 µl
BSA	: 1,30 µl
Taq DNA	: 0,30 µl
Primer	: 3,00 µl
Genomik DNA	: 3,00 µl
TOPLAM	: 30,00 µl

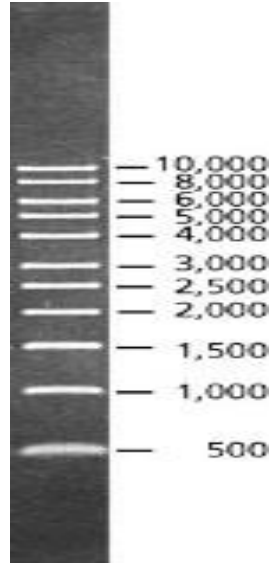
PCR cihazı, örnekleri öncelikle otomatik olarak 2 dakika 94°C tutmaktadır. Ardından, 4 döngü olacak şekilde sırasıyla 30 saniye 94°C, 1 dakika 37°C, 2 dakika 72°C'de tutarak 41 döngü olacak şekilde sırasıyla 30 saniye 93°C, 1 dakika 35°C, 2 dakika 72°C'de işlem yapmaktadır. Sonra 5 dakika 72°C'de tutarak süreç tamamlanmaktadır (Çizelge 3.6). PCR aletinden çıkarılan örnekler 4°C'de muhafaza edilmiştir (Ercişli vd 2008).

Çizelge 3.6. RAPD-PCR döngüsü programı

	Sıcaklık	Süre
1	94°C	02:00 dk
2	94°C	00:30 sn
3	37°C	01:00 dk
4	72°C	02:00 dk
5	GO TO 2, REP 2	
6	94°C	00:30 sn
7	35°C	01:00 dk
8	72°C	02:00 dk
9	GO TO 6, REP 2	
10	93°C	00:30 sn
11	35°C	01:00 dk
12	72°C	02:00 dk
13	GO TO 10, REP 41	
14	72°C	05:00 dk
15	HOLD 4°C, ENTER	
	END	

3.5.5. Agaroz jel elektroforezi

PCR işleminden sonra örnekler agaroz jel elektroforezinde yürütülmüş ve oluşan bantlara göre primerlerin hibridize olup olmadığı tespit edilmeye çalışılmıştır. Jel içerisinde agarın konsantrasyonu %1.5 konsantrasyon olacak şekilde agaroz tartılıp 0,5X Tris-Borate EDTA (TBE) tamponu içerisinde mikrodalga fırında hazırlanmıştır. İçerisine 0,5 µg/ml olacak miktarda Ethidium bromid eklenmiştir. Hazırlanan jel, örneklerin yükleneceği kuyucuklar için tarak yerleştirilerek hazırlanan elektroforez tankına dökülmüştür. Jel donduktan sonra her bir kuyucuğa ayrı bir örnek yüklenmiştir. Jelin ilk kuyucuğuna elektroforez işlemi sonucunda oluşacak bantların doğru şekilde yorumlanmasını sağlayacak olan 1 kb DNA markör (Ladder, 0,5-10 kb) (Şekil 3.7) yüklenmiştir. Elektrik akımı verilerek 75 Volt değerinde 60 dakika süre ile DNA'lar elektroforez işlemine tabi tutulmuştur. Elektroforez tankından çıkarılan jel, görüntüleme cihazında UV ışık altında incelenerek fotoğrafı çekilmiştir.



Şekil 3.1. Çoğaltılan DNA parçalarının büyüklüklerinin belirlenmesinde kullanılan DNA markörü (Ladder, 0,5-10 kb)

3.5.6. Veri analizleri

PCR ürünlerinin değerlendirilmesi her bir bireyde her primer için bantların var (1) veya yok (0) oluşuna göre ifade edilmiştir. Oluşan bantlara göre primerlerin hibridize olup olmadığı tespit edilmeye çalışılmıştır. Bantların varlığı primerlerin hibridize olduğu ve bu primerlerin ait olduğu operon bölgelerinin incelenen örneklerde bulunduğu anlamında değerlendirilmiştir. Populasyon içi değerlendirmeler Jaccard (1908)'in farklılık indeksiyle, populasyonlar arası değerlendirmeler ise SPSS V.17 ile hesaplanmış ve dendogramları UPGMA (Unweighted Pair-Group Method Analysis) analizi ile oluşturulmuştur.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. DNA izolasyonu

Çalışmada, armut çeşitlerine ait yaprak örneklerinde yapılan DNA izolasyonunda Lin *et al.* (2001) esas alınmıştır. Elde edilen DNA'ların miktarları ile saflık değerleri nanodrop spektrofotometrede (Thermo) ölçülerek belirlenmiştir.

Nükleotidlerin heterosiklik halkaları 260 nm dalga boyundaki ışığı maksimum emme özelliği taşıdığından, bu dalga boyundaki emme derecesi nükleik asitlerin miktarının bir ölçüsü olarak kabul edilmektedir. Buna göre, DNA'nın miktar ve saflığı, spektrofotometrede 260 ve 280 nm dalga boylarında elde edilecek değerlerle belirlenebilmektedir. 1 optik dansite (OD), çift sarmallı DNA için 50 µg/ml, tek sarmal DNA veya RNA için 40 µg/ml ve oligonükleotidler için ise 20 µg/ml'ye karşılık gelmektedir. 260 ve 280 nm dalga boylarında ki değerler arasındaki oran (OD_{260}/OD_{280}), nükleik asitlerin saflığı hakkında bilgi vermektedir. Bu oran iyi saflaştırılmış DNA'da yaklaşık 1,8 ve RNA'da ise yaklaşık 2'dir. Eğer ortamda fenol veya protein bulunuyorsa oran bu değerlerden düşük olabilmektedir (Olgun ve Topal 1999).

Çalışma sonunda seçilen 21 adet armut çeşidinden alınan yaprak örneklerinde yapılan izolasyon sonucu elde edilen DNA miktarları Çizelge 3.2'de verilmiştir. Çizelgeye göre, tipler arasında DNA miktarları 79,90-429,33 ng/µl arasında değişim göstermiş olup, en düşük DNA miktarı "Taş Armudu" çeşidinde belirlenirken, en yüksek DNA miktarı "Kış Armudu" çeşidinde ortaya çıkmıştır.

DNA saflığının bir ifadesi olan OD_{260}/OD_{280} oranları ise en düşük "Kabak Armudu" (1,1167) ve en yüksek "Adam Boğan" armudu (1,6320) arasında belirlenmiştir.

Nanodrop spektrofotometre verileri değerlendirilerek genotiplere ait DNA'ların araştırmadaki RAPD-PCR uygulamaları için yeterli miktarda ve saflıkta bulunduğu karar verilmiştir.

4.2. RAPD-PCR analizleri

Seçilen 21 armut çeşidinden elde edilen DNA örnekleri, 10 baz uzunluğuna sahip olan RAPD primerleri kullanılarak PCR işlemlerine tabi tutulmuştur. Yapılan PCR amplifikasyonları sonucunda elde edilen bant sayıları, polimorfizm oranları ve yaklaşık bant büyüklükleri Çizelge 4.1’de verilmiştir.

PCR işlemlerinde RAPD analizi için kullanılan 27 primerden amplifikasyon durumuna göre 17 primer seçilmiş ve seçilen 17 primer toplam 102 adet bant oluşturmuştur. Toplam 102 adet banttan 99’u çeşitler arasında polimorfizm göstermiş ve polimorfizm oranı %97,05 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.1). En fazla bant sayısı OPW-05 primerinden (13 bant) elde edilirken en az bant sayısı OPA-02 primerinden (1 bant) elde edilmiştir. Polimorfik bant sayısı bakımından OPW-05 primeri 13 bant ile en fazla sayıya sahip iken, OPW-04 primeri 2 adet bantla en az polimorfik bant oluşturan primer olmuştur. OPA-02 nolu primerden ise sadece 1 adet monomorfik bant elde edilmiştir.

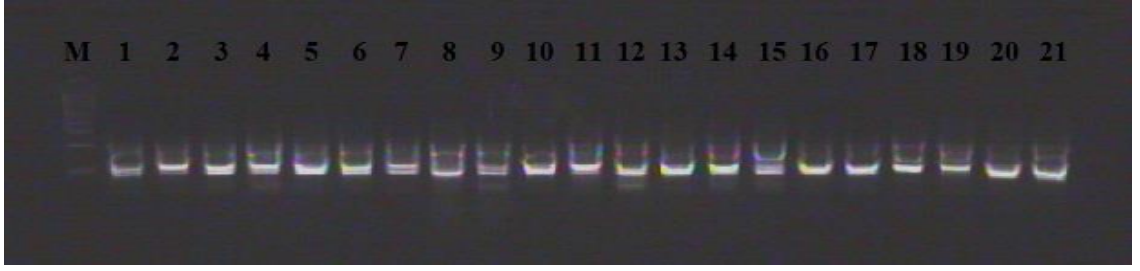
Elde edilen fragmentlerin bant büyüklüklerinde, en düşük bant büyüklüğü 100 bp olup OPW-05, OPW-18, OPY-15 primerlerinden (Şekil 4.2, 4.7 ve 4.14), en büyük bant büyüklüğü ise 4000 bp olup OPW-06 primerinden elde edilmiştir (Şekil 4.3). En yüksek polimorfizm yüzdesi %100 ile OPW-04, OPW-05, OPW-06, OPW-08, OPW-11, OPW-13, OPW-18, OPW-20, OPA-01, OPA-04, OPA-13, OPH-18 ve OPH-19 primerlerinden (Şekil 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 4.10, 4.11, 4.12, 4.13, 4.14, 4.15 ve 4.17), en düşük polimorfizm yüzdesi ise %0 ile OPA-02 primerinden elde edilmiştir (Şekil 4.10). Diğer OPY-08 primerinin polimorfizm yüzdesi ise %66.6 olduğu görülmüştür. Çalışılan primerlerden 1-13 arasında toplam bant oluşumu gerçekleşmiştir. En çok bant elde edilen primerler OPW-05 primeri olup (Şekil 4.2), bunlardan 13 adet bant elde edilmiştir. En az bant veren primer ise 1 adet bant oluşumu ile OPA-02 primeri olmuştur (Şekil 4.10). Primer başına elde edilen ortalama bant sayısı 6, primer başına elde edilen ortalama polimorfik bant sayısı ise 5,82 olarak belirlenmiştir.

Kullanılan primerlere ait bant görüntüleri Şekil 4.1 - Şekil 4.17’de gösterilmiştir. (Şekil 4.1 - Şekil 4.17 deki veriler; M:Markör, 1:Bayram Yaprağı, 2: Evliya Yatağı,

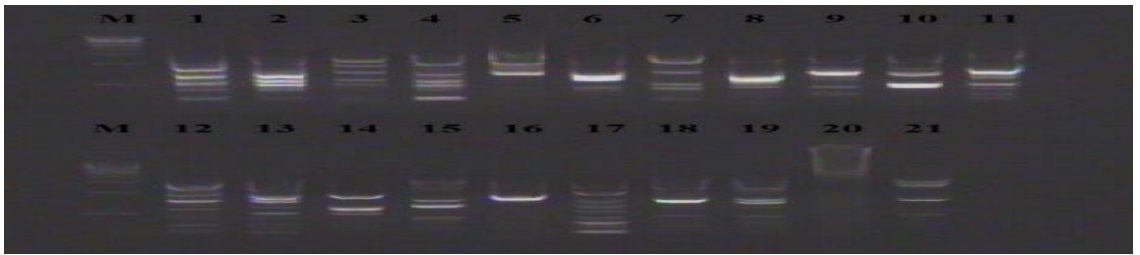
3:Karanfil, 4:Esmâ Hatun, 5:Mihrali, 6:Hacı Hamza 7:Bal Armudu, 8:Hacı Hamza, 9:Taş Armudu, 10:Adam Boğan, 11:Mıgırık 12:Göksulu, 13:Taş Armudu, 14:Orak Armudu, 15:Kabak Armudu, 16:Kış Armudu, 17:Kırtıl Armudu, 18:Limon Armudu, 19:Hacı Osman, 20:Çermail, 21:Hoca Mustafa)

Çizelge 4.1. PCR amplifikasyonları sonucunda elde edilen yaklaşık bant büyüklükleri ile bant sayıları ve polimorfizm oranları

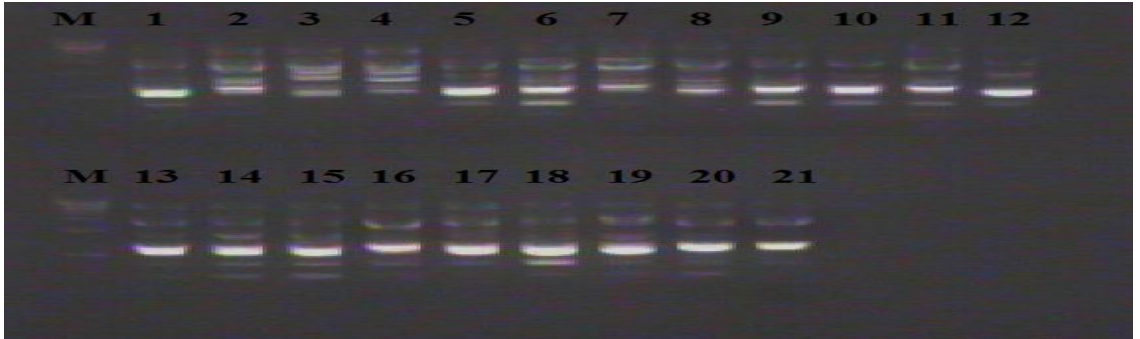
Primer Adı	Bant Büyüklüğü	Toplam Bant Sayısı	Polimorfik Bant Sayısı	Polimorfizm Oranı
OPW-04	400-750	2	2	% 100
OPW-05	100-1500	13	13	% 100
OPW-06	150-4000	7	7	% 100
OPW-08	500-3000	5	5	% 100
OPW-11	200-2500	8	8	% 100
OPW-13	150-900	9	9	% 100
OPW-18	300-1000	3	3	% 100
OPW-20	250-950	4	4	% 100
OPA-01	450-1250	4	4	% 100
OPA-02	500-1000	1	-	-
OPA-04	200-1400	5	5	% 100
OPA-13	450-700	3	3	% 100
OPH-18	250-950	7	7	% 100
OPH-19	250-2000	7	7	% 100
OPY-08	350-1750	6	4	% 66.6
OPY-15	100-1050	6	6	% 100
OPB-10	500-1400	7	7	% 100
TOPLAM		102	99	
ORTALAMA				%97,05



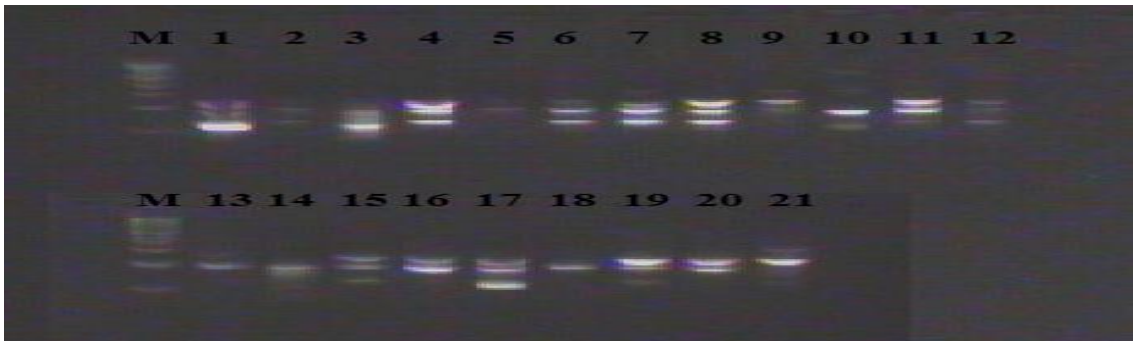
Şekil 4.1. OPW-04 primerine ait jel görüntüsü



Şekil 4.2. OPW-05 primerine ait jel görüntüsü



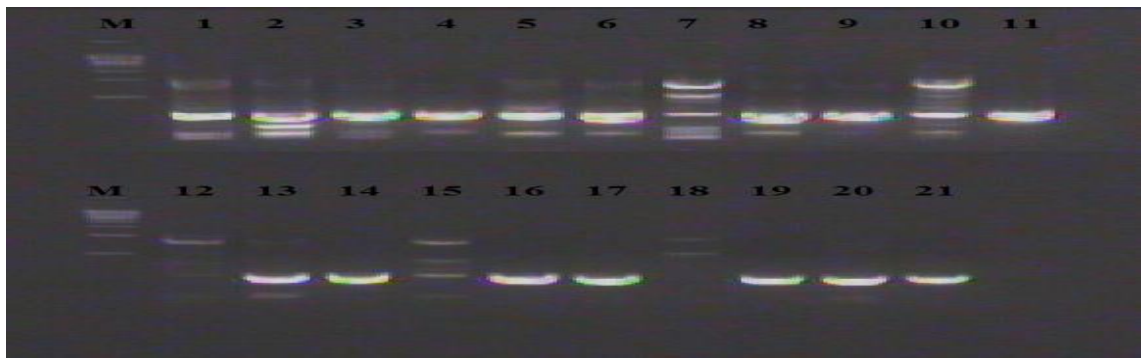
Şekil 4.3. OPW-06 primerine ait jel görüntüsü



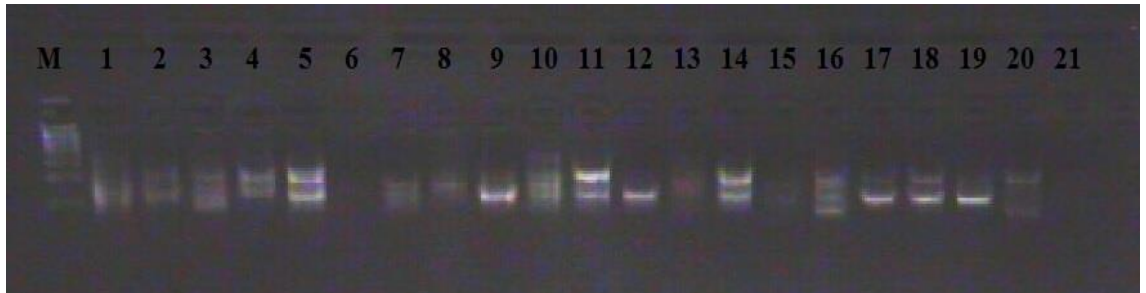
Şekil 4.4. OPW-08 primerine ait jel görüntüsü



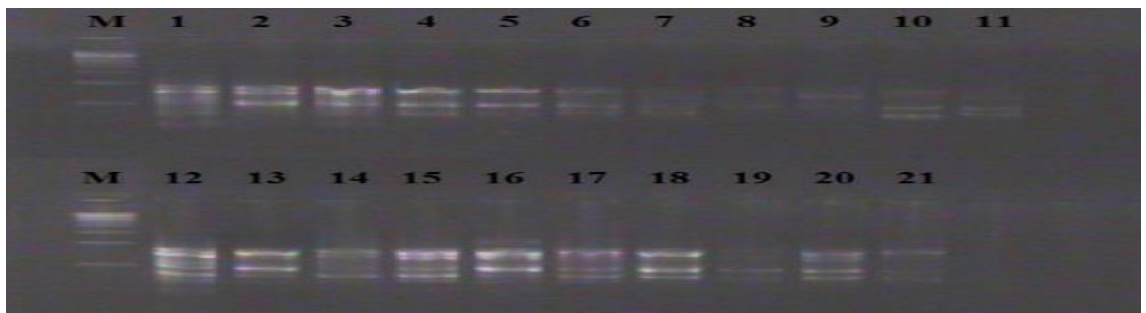
Şekil 4.5. OPW-11 primerine ait jel görüntüsü



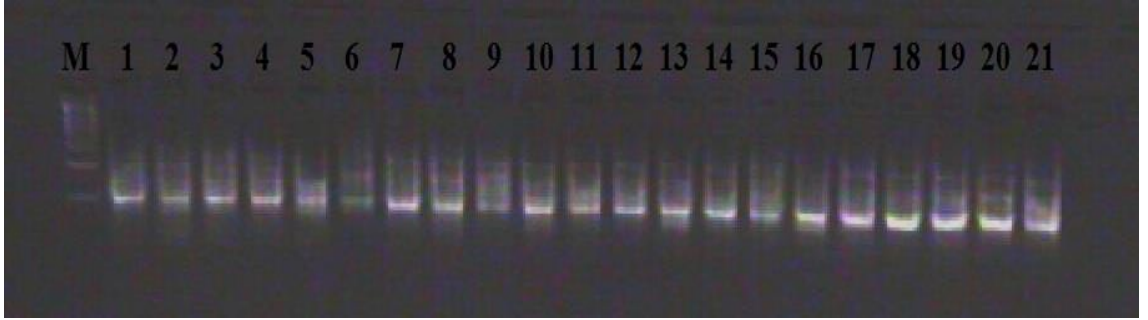
Şekil 4.6. OPW-13 primerine ait jel görüntüsü



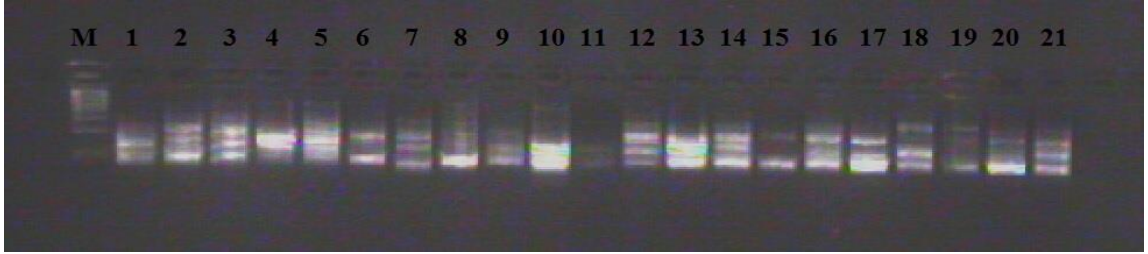
Şekil 4.7. OPW-18 primerine ait jel görüntüsü



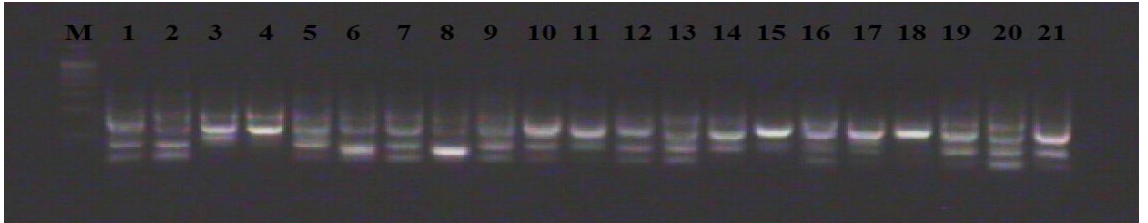
Şekil 4.8. OPW-20 primerine ait jel görüntüsü



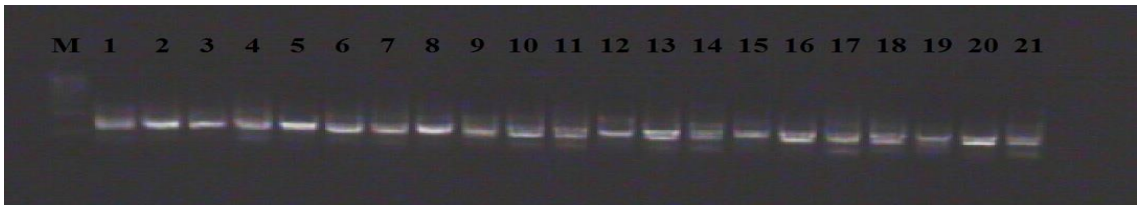
Şekil 4.9. OPA-01 primerine ait jel görüntüsü



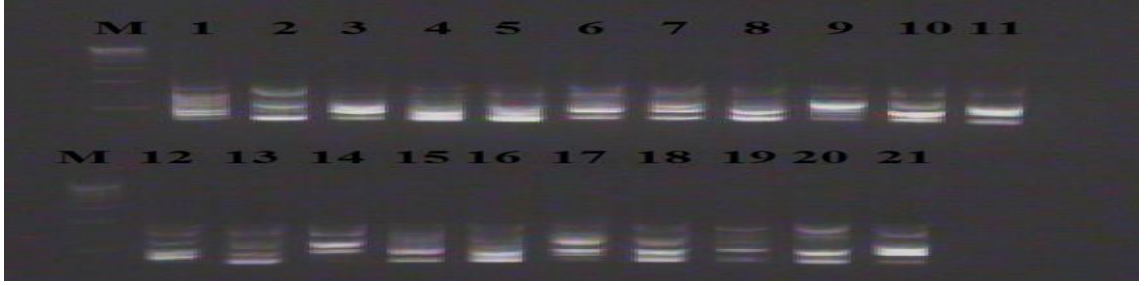
Şekil 4.10. OPA-02 primerine ait jel görüntüsü



Şekil 4.11. OPA-04 primerine ait jel görüntüsü



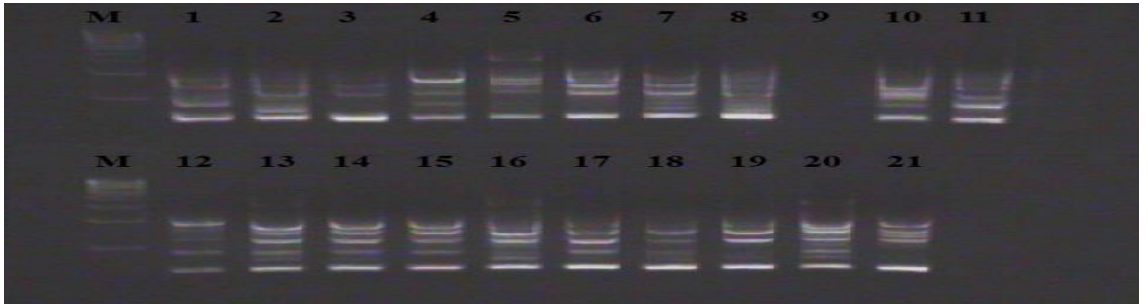
Şekil 4.12. OPA-13 primerine ait jel görüntüsü



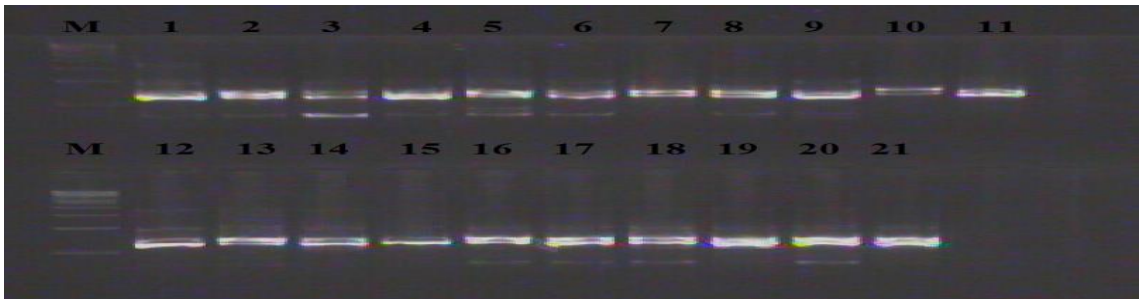
Şekil 4.13. OPH-18 primerine ait jel görüntüsü



Şekil 4.14. OPY-15 primerine ait jel görüntüsü



Şekil 4.15. OPH-19 primerine ait jel görüntüsü



Şekil 4.16. OPY-08 primerine ait jel görüntüsü

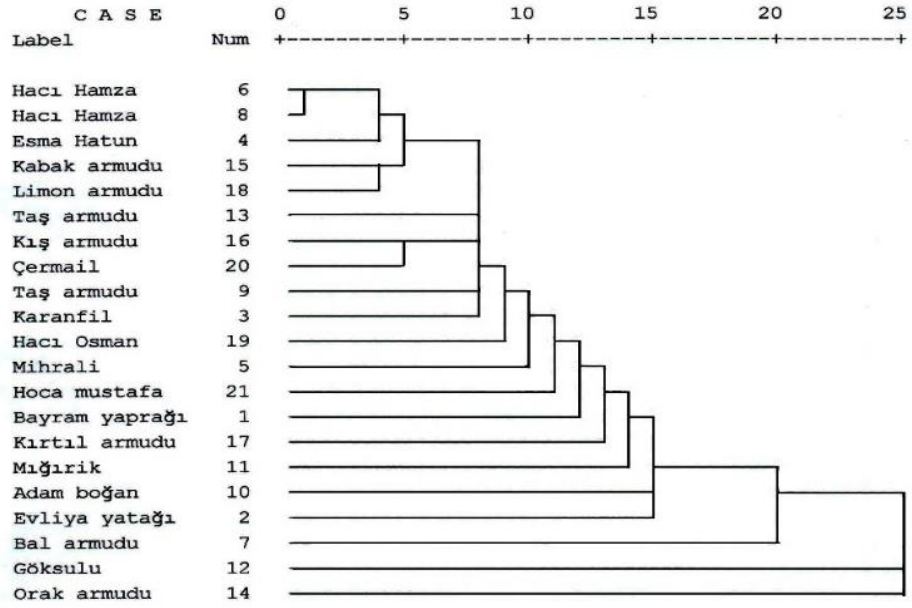


Şekil 4.17. OPB-10 primerine ait jel görüntüsü

4.3. Farklılık indeksi ve dendrogram

Çeşitler arasında genetik akrabalık düzeyinin bir ifadesi olan farklılık indeksi Çizelge 4.2’de verilmiştir. Bu çizelgedeki değerler farklılık indeksi formülü ile hesaplanarak elde edilmiştir. Çizelge incelendiğinde, en düşük farklılık indeksi (101,744) 8. sırada yer alan “Hacı Hamza” çeşidi ile 6. sırada yer alan “Hacı Hamza” çeşidi arasında tespit edilmiştir. En yüksek farklılık indeksi oranı (298,025) ise, 12. sırada yer alan “Göksulu” çeşidi ile 2. sırada yer alan “Evliya Yatağı” çeşidi arasında tespit edilmiştir.

Tipler arasında genetik ilişkiyi gösteren bir diğer ifade dendrogram (soy ağacı) olup, Şekil 4.18’de verilmiştir. Buna göre bu çalışmada incelenen 21 armut çeşidi arasındaki akrabalık durumu daha anlaşılır bir biçimde görülmektedir. Dendrogram incelendiğinde genel olarak 2 ana grup göze çarpmaktadır. Birinci grubu oluşturan “Göksulu ve Orak Armudu” çeşitleri belirgin olarak diğer çeşitlerin bulunduğu gruptan (Bayram Yaprağı, Evliya Yatağı, Karanfil, Esmâ Hatun, Mihrali, Hacı Hamza, Bal Armudu, Taş Armudu, Adam Boğan, Mığırık, Kabak Armudu, Kış Armudu, Kırtıl Armudu, Limon Armudu, Hacı Osman, Çermil ve Hoca Mustafa) farklılık göstermiştir. Çalışmada kullanılan 2 “Hacı Hamza” çeşidi arasındaki genetik ilişki birbirine en yakın bulunurken Hacı Hamza çeşidine en yakın çeşit ise Esmâ Hatun çeşidi olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.18. UPGMA metoduyla oluşturulan armut çeşitleri arasındaki genetik ilişkiyi gösteren dendrogram

Çizelge 4.2 Armut çeşitleri arasındaki farklılık (dissimilarity) indeksi

ÇeşitAdı	Bayram Yaprağı	Evliya Yatağı	Karanfil	Esmâ Hatun	Mihrali	Hacı Hamza	Bal Armudu	Hacı Hamza	Taş Armudu	Adam Boğan	Mıgırık	Göksulu	Taş Armudu	Orak Armudu	Kabak Armudu	Kış Armudu	Kırtıl	Limon Armudu	Hacı Osman	Çermail	Hoca Mustafa	
Bayram Yaprağı	,000																					
Evliya Yatağı	226,149	,000																				
Karanfil	183,705	177,619	,000																			
Esmâ Hatun	170,031	197,551	128,983	,000																		
Mihrali	187,699	213,609	158,771	135,135	,000																	
Hacı Hamza	143,671	171,069	154,621	114,139	140,678	,000																
Bal Armudu	207,363	263,165	259,631	198,215	238,207	170,020	,000															
Hacı Hamza	157,534	154,046	134,082	145,247	188,067	101,744	195,318	,000														
Taş Armudu	170,480	198,671	168,259	168,095	166,228	133,462	201,916	128,867	,000													
Adam Boğan	203,596	190,114	173,732	198,150	176,248	152,576	205,768	181,831	196,901	,000												
Mıgırık	189,362	214,376	187,813	161,345	203,580	165,939	215,396	160,267	159,393	175,846	,000											
Göksulu	194,447	298,025	233,780	211,277	248,457	192,200	246,158	218,415	209,673	247,486	197,968	,000										
Taş Armudu	145,900	189,981	156,705	153,355	167,650	126,590	213,232	142,959	194,547	167,054	195,292	203,752	,000									
Orak Armudu	236,692	281,036	252,179	237,835	271,290	207,676	283,497	203,312	261,990	262,617	227,212	281,099	208,118	,000								
Kabak Armudu	192,470	208,979	161,845	189,291	206,638	117,010	218,803	136,684	172,417	176,171	172,549	194,952	145,833	189,863	,000							
Kış Armudu	161,840	185,415	170,343	165,406	169,464	143,323	239,321	163,408	164,620	178,837	157,571	204,300	127,368	219,516	181,092	,000						
Kırtıl	204,360	216,147	174,333	170,577	231,621	154,454	281,788	174,464	207,459	208,742	189,472	189,448	147,208	201,603	172,696	156,588	,000					
Limon Armudu	215,350	196,723	170,513	184,382	185,984	156,838	241,715	186,960	187,519	168,664	152,562	188,884	153,567	228,767	112,662	149,001	172,330	,000				
Hacı Osman	209,587	165,168	180,958	187,512	211,701	169,353	255,150	136,758	163,620	208,806	150,779	235,120	171,648	199,188	149,660	168,285	167,666	132,719	,000			
Çermail	212,011	206,829	180,569	233,998	214,424	152,242	276,644	176,125	185,414	210,609	218,385	256,417	169,496	249,995	174,738	118,981	203,915	166,953	181,764	,000		
Hoca Mustafa	195,588	231,856	146,161	204,143	186,863	158,429	231,832	170,555	145,358	179,819	175,825	227,797	161,006	242,078	138,876	173,851	179,612	172,765	167,764	154,194	,000	

5. SONUÇ ve TARTIŞMA

Islah çalışmalarında, bitkilerin genetik yapılarının değiştirilmesi ve geliştirilmesiyle ortaya çıkan varyasyondan yararlanılarak yapılacak seleksiyonlarda daha kaliteli, yüksek verimli, hastalıklar ve zararlılara dayanıklı ve adaptasyon yeteneği yüksek olan yeni çeşitlerin mümkün olduğunca kısa sürede elde edilmesi amaçlanmaktadır. Bitki ıslahında melezlemeler yoluyla genetik işlemlerin ve seleksiyon etkinliği artırılmaya çalışılsa da bunlar çok uzun zaman alan, zahmetli ve yüksek maliyetli işlemlerdir. PCR'a dayalı moleküler markörler, zamanı kısalttığı, moleküler haritalamada gerekli iş gücü ve harcamayı azalttığı için günümüzde geniş ölçüde kullanılmaktadır. Rasgele dizilişi belirlemek amacıyla tek DNA primeri kullanımı içeren RAPD tekniğinin armutları da içeren birçok bitki grubunda kullanım olanağı bulunmaktadır. RAPD tekniği armutlarda, genetik haritaların hazırlanmasında, gen işaretlemede, çeşit belirlemede, popülasyonlarda ve türlerdeki varyasyonun ortaya çıkartılmasında, türler, alt türler ve çeşitler arasındaki filogenetik ilişkilerin çalışılması gibi birçok alanda kullanılmaktadır (Gupta *et al.* 1999).

RAPD-PCR tekniği kullanılarak elde edilen polimorfizm oranının değişkenliğini reaksiyon koşulları, kullanılan örnek ve primer sayısı etkileyebilmektedir. Primer sayısının fazla olması daha fazla lokusun taranmasına olanak sağladığı için RAPD tekniğinin istatistiksel değerini artırmaktadır. Yabancı döllen bitkilerde en az 10-15 primerin kullanılması yeterli iken kendine döllen bitkilerde çalışılan primer sayısının artırılması varyasyonların tespit edilmesinde kolaylık sağlayabilmektedir.

Bu çalışmada toplam 27 RAPD primeri kullanılmış ve 17'si (%62.96) armut çeşitleri arasında polimorfik olarak saptanmıştır.

RAPD-PCR yönteminin tekrarlanabilirliği hassastır. Bu tez çalışmasında güvenilirliği sağlayabilmek için PCR koşulları iyi bir şekilde optimize edilmeye çalışılmış, her bir primer en az iki kez tekrarlanmış ve sadece tekrarlanabilir nitelikteki bantlar

değerlendirmeye alınmıştır. Çalışmada kullanılan primerler ise daha önce yapılan çalışmalar ışığında seçilmiş olup, *Pyrus* türlerinde bilgi verici özellikte olduğu saptanmış olan primerlerdir.

PCR işlemlerinde RAPD analizi için kullanılan 27 primerden amplifikasyon durumuna göre 17 primer seçilmiş ve seçilen 17 primer toplam 102 adet bant oluşturmuştur. Toplam 102 adet banttın 99'u genotipler arasında polimorfizm göstermiş ve polimorfizm oranı %97,05 olarak belirlenmiştir. En fazla bant sayısı OPW 05 primerinden (13 bant) elde edilirken en az bant sayısı OPA 02 (1 bant) primerinden elde edilmiştir. Polimorfik bant sayısı bakımından OPW 05 primeri (13 bant) en fazla sayıya sahip iken, OPW 04 primeri 2 adet polimorfik bantla en az polimorfik bant oluşturan primer olmuştur. OPA 02 nolu primerden ise sadece 1 adet monomorfik bant elde edilmiştir.

Çeşitler arasında genetik akrabalık düzeyinin bir ifadesi olan farklılık indeksi Çizelge 4.2'de verilmiştir. Bu çizelgedeki değerler farklılık indeksi formülü ile hesaplanarak elde edilmiştir. Çizelge incelendiğinde, en düşük farklılık indeksi (101,744) 8. sırada yer alan "Hacı Hamza" çeşidi ile 6. sırada yer alan "Hacı Hamza" çeşidi arasında tespit edilmiştir. En yüksek farklılık indeksi oranı (298,025) ise, 12. sırada yer alan "Göksulu" çeşidi ile 2. sırada yer alan "Evliya Yatağı" çeşidi arasında tespit edilmiştir.

Dünyada armutlar üzerinde yürütülen çalışmalar incelendiğinde, RAPD tekniğinin etkin bir şekilde kullanıldığını görmekteyiz.

Oliveria *et al.* (1999), *Pyrus communis* (9 çeşit) ve *Pyrus pyrifolia* (2 çeşit) ile *Pyrus cordata*, *Pyrus bourgaeana*, *Pyrus pyraster* armut türlerini kullanarak yaptıkları bir çalışmada, 60 RAPD primeri denenmiş ve 22'si çalışmada uygun bulunarak kullanılmıştır. Çalışma sonucunda, RAPD primerlerinin kullanılması ile armut genotiplerinin moleküler karakterizasyonunun yapılarak aralarındaki genetik akrabalığın belirlenebileceği saptanmıştır.

2006 yılında Inoue *et al.*'ın, Japonya'da yapmış oldukları bir çalışmada Japon armutlarında meyve kabuğu rengini kontrol eden önemli genlerle bağlantılı RAPD markırların geliştirilmesi çalışmasında, Japon armutlarının meyve fenotipi ile yakından bağlantılı RAPD DNA markırları geliştirilmiş ve kullanışlı bulunmuştur. Elde edilen bu markırların armut ıslah çalışmalarında başarılı bir şekilde kullanılabilecekleri belirlenmiştir.

Avrupa armutları (*Pyrus communis*), Asya armutları (*Pyrus pyrifolia* ve *Pyrus ussuriensis*) ve bunların hibrit çeşitlerini kullandıkları bir çalışmada RAPD tekniği kullanılarak bu koleksiyondaki 46 çeşidin genetik çeşitliliğini analiz etmişlerdir. 160 primer den 87'si üretilebilir ve polimorfik bulunmuştur. Çalışma sonunda elde ettikleri dendogramda Avrupa, Asya ve hibrit armut çeşitleri farklı gruplarda toplandığı belirlenmiştir (Ritschel *et al.* 2007).

Lin *et al.* (2011), RAPD parmak izi kullanılarak *Pyrus* spp. çeşitlerinin pratik olarak tanımlanması için yeni ve etkili bir strateji geliştirme adlı bir çalışma yapmışlardır. Çalışmada 68 armut çeşidi arasındaki genetik ilişki araştırılmıştır. Bunun için 8 RAPD (11-mer) primeri kullanmışlardır. Sonuç olarak RAPD tekniğinin armut çeşitlerini genetik olarak karakterize etmede başarılı bir şekilde kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Bu çalışmada açıkça görüldüğü üzere RAPD tekniği armutlarda oldukça yüksek polimorfizm (%97,05) vermiştir. Bu oran Erzincan ili merkez köylerinden alınan az sayıdaki armut çeşitleri arasında yüksek bir genetik çeşitliliği ifade etmektedir.

Şekil 4.18'de ki dendrogram (soyağacı) incelendiğinde, RAPD primerleri çeşitleri birbirlerinden oldukça net bir şekilde ayırt edebilmiştir. Dendrogramda ortaya çıkan önemli nokta, "Göksulu ve Orak Armudu" çeşitlerinin belirgin olarak diğer çeşitlerin bulunduğu gruptan (Bayram Yaprığı, Evliya Yatağı, Karanfil, Esmâ Hatun, Mihrali, Hacı Hamza, Bal Armudu, Taş Armudu, Adam Boğan, Mıgırık, Kabak Armudu, Kış Armudu, Kırtıl Armudu, Limon Armudu, Hacı Osman, Çermil ve Hoca Mustafa) farklılık göstermiş olduğudur. Bu çalışmada belirlenen çeşitler arasındaki genetik ilişki

sonuçlarının armut ıslahı konusunda yapılacak olan çalışmalarda kullanılabileceği ortaya çıkmıştır.

KAYNAKLAR

- Anonim 2013. Tuik http://rapor.tuik.gov.tr/reports/rwservlet?bitkisel_uretimdb2=&report=BARAPOR82.RDF&p_yil1=2012&p_kod=1&p_mad1=113230200&p_dil=1&p_bolum=113&desformat=html&ENVID=bitkisel_uretimdb2Env (10.04.2013)
- Anonymous 2013. <http://www.nicerweb.com/bio1152/Locked/media/ch20/electrophoresis.html> (10.04.2013)
- Anonymous 2013. Faostat. <http://faostat3.fao.org/home/index.html#download> (10.04.2013)
- Aşkın, M. A ve H. Oğuz., 1995. Erciş'te Yetiştirilen Ümitvar Mellaki Armut Tiplerinde bazı Meyve ve Ağaç Özelliklerinin Tespiti Üzerinde Araştırmalar. 2.Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi, Cilt 1 (Meyve) : 84-88
- Atak, M. 2004. Farklı Triticale Hatlarının Morfolojik ve Dna Markörleriyle Genetik Karakterizasyonu. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı Doktora Tezi (Yayınlanmamış).106 s.
- Aydoğan Çıfci, E. 2010. Türkiye'de Yetiştirilen Bazı Buğday Çeşitlerinde Genetik Farklılıkların RAPD-PCR Yöntemi İle Belirlenmesi, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı Doktora Tezi 18 s.
- Bilgin, O. 2001. Bazı Ekmeklik Buğday (*Triticum aestivum* L.) Çeşit ve Hatlarında Genetik Uzaklıklar, Verim ve Kalite Özelliklerinin Belirlenmesi. Trakya Üniversitesi Tekirdağ Ziraat Fakültesi. Doktora Tezi
- Bostan, S.Z., Şen, S.M., 1991. Van ve Çevresinde Yetiştirilen Mahalli Armut Çeşitlerinin Morfolojik ve Pomolojik Özellikleri Üzerinde Araştırmalar. Yüzüncü Yıl Üniv. Ziraat. Fak. Dergisi Cilt:1, No:3 (Basılmış Yüksek Lisans Tezi), Van.
- Büyükyılmaz, M., A.N. Bulagay ve M. Burak., 1992. Doğu Marmara Bölgesinde yetişen Akça Armutlarında Klon Seleksiyonu. BAHÇE 21 (1-2): 61-68.
- Çalışkan, M.,2005. RAPD analizi ile Güllerde (*Rosa* sp.) Genetik tanımlama. Ankara Üniv., Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Ana Bilim Dalı, Doktora Tezi, Ankara
- Demir, G., Gündoğdu, M., 1991. Yumuşak çekirdekli meyve ağaçlarında görülen Ateş yanıklığı (*Erwinia amylovora* (Burr.) Winslow et al.) hastalığı üzerine araştırmalar. Türkiye Fitopatoloji Derneği Yayın No:6, s:229.
- Ercişli, S., Orhan, E., Yıldırım, N., Açar, G., 2008. Comparison of Sea Buckthorn Genotypes (*Hippophae rhamnoides* L.) Based on RAPD and FAME Data. Turk J Agric For. 32, 363-368
- Eriş, A. ve H. Gülen. 2004. Moleküler Biyoloji (Temel Bilgiler). Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ders Notları No:98.
- Faroog, S. and F. Azam. 2002. Molecular Markers in Plant Breeding-I: Concepta and Characterizations. Pakistan Journal of Biological Sciences. 5(10):1135-1140.
- Gupta, P. K., R.K. Varshney, P. C. Sharma and B. Ramesh. 1999. Review. Moleküler Markers and Their Application in Wheat Breeding. Plant Breeding, 118: 369-390.

- Güleryüz, M., 1977. Erzincan'da yetiştirilen bazı önemli elma ve armut çeşitlerinin pomolojileri ile dölllenme biyolojileri üzerine araştırmalar. Atatürk Üniv. Yayınları No:483 Erzurum.
- Güleryüz, M., 1985. Meyve ve sebze ıslahı ders notlar, A.Ü. Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü, 189s, Erzurum.
- Gülşen, O. ve N. Mutlu. 2005. Bitki Biliminde Kullanılan Genetik Markırlar ve Kullanım Alanları. Alatarım 4(2):27-37.
- Jaccard, P. 1908. Nouvelles recherches sur la distribution florale. Bul. Soc. Vaudoise Sci. Nat. 44:223-270
- Karcıo, M. 2006. Yerel Durum Buğdayı Çeşitlerinde (*Triticum durum* Desf.) RAPD-PCR Tekniği ile Genetik Çeşitlilik Analizi Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi. 80s.
- Kumar, R. 1989. The Tecnigue of Polymerase Chain Reaction. A Journal of Methods in Cell and Molecular Biology, 1: 133-152.
- Layne, R.E.C., Quamme, H.A., 1975. Advances in fruit breeding. Purdue Univ. Press. West Lafayette, Indiana.
- Maniatis, T., E. Fritsch and J. Sambrook. 1982. Molecular Cloning: A Laboratory Manual: Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Momol, T.M., Yeğen, O., Basım, H., Rudolph, K., 1992. Identification of *Erwinia amylovora* and the occurance of fire blight of pear in Western Mediterranean Region of Turkey. Journal of Turkish Phyto. 21(1):41-47.
- Özaydın, S. 2004. Rapd (Rastgele Arttırılmış Polimofik Dna) Belirleyicileri ve Bitki Sistematiği. DPÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi 6. Sayı: 113-130.
- Özbek, S., 1947. Türkiye Armut Yetiştiriciliği ve Önemli Armut Çeşitlerimiz Ankara Yüksek Ziraat Enstitüsü Basım evi Ankara
- Özbek, S., 1978. Özel Meyvecilik. Özel Meyvecilik. Çukurova Üniv. Ziraat Fak. Yayın No: 128, Adana. 486 s.
- Özrenk. K., 2002. Erzincan Ovasında Armutlarda Sorun Olan Ateş Yanıklığı Hastalığı (*Erwinia amylovora* (Burill) Winslow et al)'na Dayanıklı Belirlenmesi (doktora tezi, basılmamış). Y.Y.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Van.
- Rafalski, A., S.V. Tingey and J.G.K. Williams. 1994. (RAPD) markers. Plant Molecular Biology Manual. 114:1-8.
- Saygılı, H., Türküsay, H., 2000. Yumuşak çekirdekli meyve ağaçlarında Ateş yanıklığı hastalığı (*Erwinia amylovora* (Burr.) Winslow et al.) Ders notları.
- Sharma, A., A. G. Namdeo and K.R. Mahadik. 2008. Phcog. Rev.: Rewiev Article. Molecular Markers: New Propects in Plant Genome Analysis. Pharmacognosy Rewievs 2(3): 23-34.
- Soysal, M. İ. 2002. Genetik. T.Ü. Tekirdağ Ziraat Fakültesi Zootečni Bölümü. Biyometri ve Genetik Anabilim Dalı.
- Şen, S.M., Karadeniz, T., 1995. Genel Meyvecili, YYÜ, Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü, 87 s.
- Tavale, S. T. 2001. Molecular Analysis of Wheat Genome Using ISSR and RAPD Markers. A Thesis Submitted To The University of Pune For The Degree of Master of Science (Partly By Papers and Partly By Research) In Chemistry (Biochemistry) (Unpublished) 72s.

- Tingery. 1990. DNA Polymorphism Amplified By Arbitrary Primers Are Useful As Genetic Markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-6535.
- Tingey, S.V. and J.P. DEL Tufa. 1993. Genetic Analysis With Random Amplified Polimorphic DNA Markers. *Plant Physiol.*101: 349- 352.
- Tokgönül, S., Çınar, Ö., 1991. Doğu Akdeniz Bölgesi'nde armutlarda Ateş yanıklığı (*Erwinia amylovora* (Burr.) Winslow et al.) hastalığının tanısı ve yaygınlık durumu üzerinde araştırmalar. Türkiye Fitopatoloji Derneği Yayın No:6303.
- Ünal A., Saygılı H., Hepaksoy S., H. Z., Can ve Türküsay H.,1997 Ege Bölgesinde Armut Yetiştiriciliği ve Seçilen Bazı Armut Çeşitlerinin Pomolojik Özellikleri Yumuşak Çekirdekli Meyveler Sempozyum Bildiri Kitabı, Yalova 29-35.
- Van der Zwet T., Bonn W.G., 1999. Recent spread and current world wide distribution of fire blight. *Acta Horticulture* 489:167-168.
- Van der Zwet, T., Beer, S.V., 1995. Fire Blight – it's nature prevention and control. A practical guide to integrated diseases management. US Dept. Of Agric. nformation Bulletin, No: 631, 91
- Welsh, J.and M. McClelland. 1990. Fingerprinting Genomes Using PCR With Arbitrary Primers. *Nucleic Acids Res.*18: 7213-7218
- Williams, J.G.K., A.R. Kubelik, K.J. Lıvak, J.A. Rafalski and S.V.
- Yeşbek, A. 2007. T. *Dicoccoides* ve T. *Dicoccon* Türleri Arasındaki Genetik Çesitliliğin RAPD-PCR Tekniği İle Belirlenmesi. Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi. 75s. (Yayınlanmamış).
- Yıldırım, A. ve N. Kandemir 2001. Genetik Markörler ve Analiz Metodları. Bitki Biyoteknolojisi 2: Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları. Edt: S. Özcan, E. Gürel, M. Babaoğlu. Selçuk Üniversitesi Basımevi, s.334-363.

ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında Erzincan ilinde doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Erzincan'da tamamladım. 2005 yılı Haziran ayında Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitkisel Üretim Bölümü'nde lisansımı yapmaya hak kazandım. 2009 yılında Bahçe Bitkileri Alt Programına yerleştim ve 2010 yılında Ziraat Mühendisi olarak aynı bölümden mezun oldum. 2011 yılı Şubat ayında Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarımsal Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitimime başladım. Haziran ayında ise Alucra İlçe Gıda, Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğünde Ziraat Mühendisi olarak işe başladım ve halen devam etmekteyim.