

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

SULTANİ ÇEKİRDEKSİZ VE KALECİK KARASI
ÜZÜM ÇEŞİTLERİNDE UYARILMIŞ MUTASYON ETKİLERİNİN
SİTOLOJİK VE MOLEKÜLER TANIMLANMASI

Dilek DEĞİRMENCİ

BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

ANKARA

2006

Her Hakkı Saklıdır

ÖZET

Doktora Tezi

SULTANİ ÇEKİRDEKSİZ VE KALECİK KARASI ÜZÜM ÇEŞİTLERİNDE UYARILMIŞ MUTASYON ETKİLERİNİN SİTOLOJİK VE MOLEKÜLER TANIMLANMASI

Dilek DEĞİRMENCİ

Ankara Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü
Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Birhan KUNTER

Bu araştırmada, Sultanî Çekirdeksiz (SÇ) ve Kalecik karası (KK) üzüm çeşitlerinde 5 farklı dozda (20, 25, 30, 40 ve 45 Gy) gama radyasyonu uygulamaları ile uyarılmış mutasyon etkileri sitolojik ve moleküler olarak incelenmiştir.

Bu amaçla her iki çeşide ait populasyon içerisinde, mutasyon etkilerinin oluşturduğu fenotipik değişimler M1V1, M1V2 ve M1V3 vejetasyonlarında morfolojik gözlemlerle belirlenerek, mutant adayı bireyler seçilmiştir. Mutant adayı olarak seçilen bireylerde, sitolojik tanımlama ve SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) markörler aracılığıyla genetik polimorfizmin tanımlanmasına yönelik çalışmalar yürütülmüştür.

Sitolojik tanımlama çalışmalarında, her iki çeşitte ($2n=38$) diploid yapılı hücreler gözlenmiştir. Sadece SÇ 30 Gy 34 nolu bireyde $2n$ diploid kromozom sayısından fazla ve ploid olduğu düşünülen hücre yapısı gözlenmiştir. Genetik tanımlama çalışmaları sonucunda ise, vejetatif karakterlerden sorumlu 50 adet SSCP primeri kullanılarak yapılan ön deneme analizlerinde polimorfik olduğu belirlenen 15 adet SSCP primeri ile tamamlanan çalışmalar sonucunda, mutant adayı bireylerle kontrol bitkileri arasında, monomorfik bant desenleri elde edilmiştir. Üzerinde çalışılan primerler ile polimorfizm sağlanamamıştır.

2006, 116 Sayfa

Anahtar Kelimeler: *Vitis vinifera* L., mutasyon , gama radyasyonu, sitoloji, kromozom, SSCP

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

CYTOLOGIC AND MOLECULAR IDENTIFICATION OF INDUCED MUTATION EFFECTS IN SULTANI ÇEKİRDEKSİZ and KALECİK KARASI cvs. (*Vitis vinifera* L.)

Dilek DEĞİRMENCİ

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

Supervisor: Prof. Dr. Birhan KUNTER

The effects of induced mutation applied by 5 different doses of gamma irradiation (20, 25, 30, 40 and 50 Gy) were cytologic and molecular determined on *Vitis vinifera* L. cultivars, Sultani Çekirdeksiz (SÇ) and Kalecik karası (KK).

Mutant candidates were selected through the morphological observations of the mutation-induced phenotypic changes in the M1V1, M1V2 and M1V3 vegetations. Genetic polymorphism of the selected individuals were cytologically identified and characterized with SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) markers.

In cytological studies, diploid cells ($2n=38$) were observed for both cultivars. Cells showing ploidy level other than diploidy were found only in the individual SÇ 30 Gy 34. Genetic identification studies performed with 50 SSCP primers on 15 polymorphic individuals resulted in monomorphic bands among the mutant candidates and the control plants. No polymorphism was obtained with the markers studied.

2006, 116 pages

Key Words: *Vitis vinifera* L., mutation, gamma radiation, cytology, chromosome, SSCP

TEŞEKKÜR

Doktora tez konumun belirlenmesinde ve yönlendirici katkılarından dolayı başta danışman hocam sayın Prof. Dr. Birhan KUNTER'e en içten teşekkürlerimi sunarım. Tez konumun oluşturulmasında ve her aşamasında danışman hocam kadar değerli katkılarından dolayı sayın Dr. Burak KUNTER'e özel teşekkürlerimi sunarım. Tez konumla ilgili olarak tüm katkıları ve destekleri için hocam sayın Prof. Dr. Hasan ÇELİK'e teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Her zaman manevi desteğini yanımda hissettiğim çok değerli hocam sayın Prof. Dr. Y. Sabit AĞAOĞLU'na sonsuz teşekkür ediyorum.

Bizlere modern laboratuvar ve rahat çalışma ortamı sağlayan Bölüm Başkanımız, sayın hocam Prof. Dr. Gökhan SÖYLEMEZOĞLU'na ve tüm bölüm hocalarıma teşekkür ederim.

Sitolojik incelemeler aşamasında çok değerli fikirleri ve tecrübelerini paylaştıkları için sayın hocam Prof. Dr. Fatma ÜNAL (Gazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi- Biyoloji Bölümü) ve Yrd. Doç. Dr. Deniz YÜZBAŞIOĞLU'na (Gazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi- Biyoloji Bölümü) çok teşekkür ediyorum.

Tez çalışmamın moleküler aşamasını İtalya'da tamamladığım “San Michele Tarım Enstitüsü'nde (Istituto Agrario di San Michele all Adige (IASMA-Trento-İtalya)) sağlamış olduğu laboratuvar imkânları ve çok değerli tecrübelerini büyük samimiyetle paylaşan Dr. Riccardo VELASCO'ya çok teşekkür ediyorum. Laboratuvardaki yardımlarından dolayı Dr. Michela TROGGIO'ya ve tüm arkadaşlarıma sonsuz teşekkür ediyorum.

Tezimin her aşamasında manevi desteklerini ve yardımlarını esirgemeyen değerli arkadaşlarım, Dr. Hüseyin KARATAŞ, Araş. Gör. Nurhan KESKİN ve Dr. Zeliha YAŞA'ya çok özel teşekkürlerimi sunarım. Yine doktora eğitimim boyunca manevi destekleri ile sürekli yanımda olan ve desteklerini esirgemeyen çok değerli tüm arkadaşlarıma ve tüm bölüm çalışanlarına sonsuz teşekkürler ediyorum.

Tez materyallerine ışın uygulamalarındaki katkılarından dolayı Türkiye Atom Enerjisi Kurumu'na teşekkür ederim. Doktora tezimin gerçekleşmesindeki mali katkılarından dolayı TÜBİTAK (TOGTAG 3091)'a teşekkür ederim. Yurt dışında kaldığım sürede NATO A2 burs olanağı kazandığım TÜBİTAK'a ve İtalya Hükümeti'ne teşekkür ederim.

Bugüne kadar eğitim hayatım süresince maddi ve manevi desteğini esirgemeyen ve daima her konuda destek olan ve başarılarımın kaynağını oluşturan çok değerli aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Dilek DEĞİRMENCİ
Ankara, Ekim 2006

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
1.GİRİŞ	1
2.KURAMSAL TEMELLER.....	4
2.1 Bitki İslahında Mutasyon ve Uygulama Alanları	4
2.1.1 Kimerik yapılar	5
2.1.2 Radyasyonun mutasyon ıslahında kullanımı	7
2.2 Asmalarda Mutasyon Islahı Çalışmaları	10
2.2.1 Somatik mutasyonlar	12
2.2.2 Yapay mutasyon ıslahı çalışmaları	14
2.3 Mutant Bireylerde Karakterizasyon Çalışmaları	17
2.3.1 Sitolojik karakterizasyon çalışmaları.....	17
2.3.2 Mutasyonların moleküler karakterizasyonu ve bu amaçla kullanılan yöntemler	19
2.3.2.1 SSCP markörler aracılığıyla mutasyonların tanımlanması.....	27
2.3.2.2 SSCP markörlerin kullanım alanları	33
3. MATERYAL VE YÖNTEM	36
3.1 Işın Uygulamaları.....	36
3.2 Mutant Koleksiyon Parselinin Kurulması	37
3.3 Fenotipik Değişimlerin Belirlenmesi	38
3.4 Sitolojik Tanımlama Çalışmaları	38
3.4.1 Kök uçlarının elde edilmesi.....	40
3.4.2 Kromozom sayımında kullanılan sitolojik yöntemler.....	41
3.4.3 Mikroskop incelemeleri ve sürekli preparatların hazırlanması.....	44
3.5 SSCP Markörler ile Moleküler Tanımlama Çalışmaları	44
3.5.1 DNA izolasyonu	47

3.5.2 SSCP primerlerinin seçilmesi	48
3.5.2.1 SSCP analizlerinde kullanılacak primerlerin belirlenmesine yönelik ön tarama çalışmaları.....	51
3.5.3 PCR yardımıyla DNA amplifikasyonu	52
3.5.4 Poliakrilamid jel elektroforez yöntemi ile SSCP polimorfizminin görüntülenmesi.....	53
3.5.4.1 Poliakrilamid jellerin hazırlanması	53
3.5.4.2 SSCP-PCR ürünlerinde DNA'nın tek iplikçikli duruma getirilmesi	53
3.5.4.3 Elektroforez ve polimorfizmin gözlenmesi.....	53
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	55
4.1 Mutant Adaylarının Seçiminde Morfolojik Tanımlama Çalışmaları	55
4.2 Mutant Adaylarının Sitolojik Tanımlanması.....	59
4.3 SSCP Analiz Çalışmaları	73
4.3.1 SSCP analizlerinde kullanılacak primerlerin seçilmesi.....	73
4.3.2 Mutant adaylarının SSCP markörler ile genetik tanımlanması.....	75
5. TARTIŞMA	93
KAYNAKLAR.....	99
ÖZGEÇMİŞ.....	115

SİMGELER DİZİNİ

AFLP	Amplified Fragment Length Polimorphism
AgNO ₃	Gümüş nitrat
APS	Amonyum persülfat
bp	Base pair (Baz çifti)
BACCA	Tane
CAPs	Cleaved Amplified Polimorphism
Co ⁶⁰	Kobalt 60
CTAB	Hekzadesil Trimetil Amonyum Bromür
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP	Deoksi-Nükleozid Trifosfat
EDTA	Etilen Diamine Tetra Asetik Asit
EST	Expressed Sequence Tag
FOGLIO	Yaprak
GAA	Glasiyal asetik asit
GEMMA	Tomurcuk
GERMO	Sürgün
Gy	Gama radyasyonu uygulama doz birimi (Gray)
HCL	Hidroklorik asit
IASMA	Istituto Agrario San Michele all Adige
INFIO	Çiçek
LDLR	Low Density Lipoprotein Receptor
MDE TM	Mutation Detection Enhancement
MgCl ₂	Magnezyum klorür
ml	Mililitre
MVD	Mutant Varieties Database
NaCL	Sodyum klorür
NaOH	Sodyum Hidroksit
NCBI	The National Center for Biotechnology Information
ng	Nanogram
PCR	Polymerase Chain Reaction
PVPP	Polivinylypyroprolidone

RADIC	Kök
RAPD	Random Amplified Polimorphic DNA
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RNA	Ribonükleik asit
RNAase	Ribonükleaze
rpm	Dakikada dönüş sayısı
RuBisCO/LS	Ribulose Bisphosphate Carboxylaseoxygenase Large Subunit
SNP	Single/simple Nükleotit Polimorfizm
SSCP	Single Strand Conformation Polymorphism
SSR	Simple Sequence Repeat
TAE	Tris- Asetik Asit- EDTA
TAEK	Türkiye Atom Enerjisi Kurumu
TBE	Tris- Borik asit- EDTA çözeltisi
TE	Tris-EDTA çözeltisi
TEMED	Tetra Etil Metilen Diamin
TILLING	Targetting Induced Local Lesions in Genomes
UV	Ultraviyole
μ	Mikron

Kısaltmalar

M1V1	1. mutasyon, 1. vejetasyon
M1V2	1. mutasyon, 2. vejetasyon
M1V3	1. mutasyon,3. vejetasyon
SÇ	Sultani Çekirdeksiz
KK	Kalecik karası

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1	Meriklinal, periklinal ve sektörel kimerik yapıların anatomik oluşumları	7
Şekil 3.1	Sitolojik çalışmalarda kullanılan köklerin <i>in vitro</i> (a-b) ve <i>in vivo</i> (c-d) koşullarda elde edilmesi	41
Şekil 4.1	Mutant adaylarda gözlenen fenotipik değişimler	57
Şekil 4.2	Yapraklarda gözlenen fenotipik değişimler	58
Şekil 4.3	Sultani Çekirdeksiz üzüm çeşidi kontrol örneğine ait diploid yapılı (2x) kromozom görüntüsü	62
Şekil 4.4	SÇ 20 Gy 29 nolu mutant adayı bireye ait diploid yapılı (2x) kromozom görüntüsü	62
Şekil 4.5	SÇ 25 Gy 17 nolu mutant adayı bireye ait diploid yapılı (2x) kromozom görüntüsü	63
Şekil 4.6	SÇ 25 Gy 38 nolu mutant adayı bireye ait diploid yapılı (2x) kromozom görüntüsü	63
Şekil 4.7	SÇ 30 Gy 3 nolu mutant adayı bireye ait diploid yapılı (2x) kromozom görüntüsü	64
Şekil 4.8	SÇ 30 Gy 9 nolu mutant adayı bireye ait diploid yapılı (2x) kromozom görüntüsü	64
Şekil 4.9	SÇ 30 Gy 12 nolu mutant adayı bireye ait diploid yapılı (2x) kromozom görüntüsü	65
Şekil 4.10	SÇ 30 Gy 14 nolu mutant adayı bireye ait diploid yapılı (2x) kromozom görüntüsü	65
Şekil 4.11	SÇ 30 Gy 19 nolu mutant adayı bireye ait diploid yapılı (2x) kromozom görüntüsü	66
Şekil 4.12	SÇ 30 Gy 33 nolu mutant adayı bireye ait diploid yapılı (2x) kromozom görüntüsü	66
Şekil 4.13	SÇ 30 Gy 34 nolu mutant adayı bireye ait ploidy yapılı (>2x) kromozom görüntüsü	67

Şekil 4.14 SÇ 30 Gy 40 nolu mutant adayı bireye ait diploid yapılı (2x) kromozom görüntüsü.....	67
Şekil 4.15 SÇ 30 Gy 45 nolu mutant adayı bireye ait diploid yapılı (2x) kromozom görüntüsü.....	68
Şekil 4.16 Kalecik karası üzüm çeşidi kontrol örneğine ait diploid (2x) yapılı kromozom görüntüsü.....	68
Şekil 4.17 KK 20 Gy 61 nolu mutant adayı bireye ait diploid yapılı (2x) kromozom görüntüsü.....	69
Şekil 4.18 KK 20 Gy 70 nolu mutant adayı bireye ait diploid yapılı (2x) kromozom görüntüsü.....	69
Şekil 4.19 KK 25 Gy 58 nolu mutant adayı bireye ait diploid yapılı (2x) kromozom görüntüsü.....	70
Şekil 4.20 KK 25 Gy 60 nolu mutant adayı bireye ait diploid yapılı (2x) kromozom görüntüsü.....	70
Şekil 4.21 KK 30 Gy 7 nolu mutant adayı bireye ait diploid yapılı (2x) kromozom görüntüsü.....	71
Şekil 4.22 KK 30 Gy 9 nolu mutant adayı bireye ait diploid yapılı (2x) kromozom görüntüsü.....	71
Şekil 4.23 KK 30 Gy 18 nolu mutant adayı bireye ait diploid yapılı (2x) kromozom görüntüsü.....	72
Şekil 4.24 KK 30 Gy 19 nolu mutant adayı bireye ait diploid yapılı (2x) kromozom görüntüsü.....	72
Şekil 4.25 KK 40 Gy 36 nolu mutant adayı bireye ait diploid yapılı (2x) kromozom görüntüsü.....	73
Şekil 4.26 GEMMA 1639, GEMMA 1026 ve GEMMA 1525 primerleri ile SSCP analiz sonuçlarına ait jel görüntüsü.....	74
Şekil 4.27 Sultani Çekirdeksiz üzüm çeşidine ait RADIC 294 nolu primer ile amplifikasyon görüntüsü.....	75
Şekil 4.28 SÇ 25 Gy 43 nolu aday mutant bireye ait sekans analiz sonucunun kromotogram görüntüsü.....	77
Şekil 4.29 Sultani Çekirdeksiz üzüm çeşidine ait kontrol ve mutant adayı bireylerde RADIC 294 primeri ile SSCP jel görüntüsü.....	77

Şekil 4.30 Sultani Çekirdeksiz üzüm çeşidine ait kontrol ve mutant adayı bireylerde RADIC 118 primeri ile SSCP jel görüntüsü	78
Şekil 4.31 Sultani Çekirdeksiz üzüm çeşidine ait kontrol ve mutant adayı bireylerde RADIC 561 primeri ile SSCP jel görüntüsü	78
Şekil 4.32 Sultani Çekirdeksiz üzüm çeşidine ait kontrol ve mutant adayı bireylerde RADIC 1104 primeri ile SSCP jel görüntüsü.....	79
Şekil 4.33 Sultani Çekirdeksiz üzüm çeşidine ait kontrol ve mutant adayı bireylerde RADIC 1188 primeri ile SSCP jel görüntüsü.....	79
Şekil 4.34 Sultani Çekirdeksiz üzüm çeşidine ait kontrol ve mutant adayı bireylerde RADIC 1517 primeri ile SSCP jel görüntüsü.....	80
Şekil 4.35 Sultani Çekirdeksiz üzüm çeşidine ait kontrol ve mutant adayı bireylerde GEMMA 243 primeri ile SSCP jel görüntüsü.....	80
Şekil 4.36 Sultani Çekirdeksiz üzüm çeşidine ait kontrol ve mutant adayı bireylerde GEMMA 334 primeri ile SSCP jel görüntüsü.....	81
Şekil 4.37 Sultani Çekirdeksiz üzüm çeşidine ait kontrol ve mutant adayı bireylerde GEMMA 1026 primeri ile SSCP jel görüntüsü.....	81
Şekil 4.38 Sultani Çekirdeksiz üzüm çeşidine ait kontrol ve mutant adayı bireylerde GEMMA 1097 primeri ile SSCP jel görüntüsü.....	82
Şekil 4.39 Sultani Çekirdeksiz üzüm çeşidine ait kontrol ve mutant adayı bireylerde GERMO 220 primeri ile SSCP jel görüntüsü	82
Şekil 4.40 Sultani Çekirdeksiz üzüm çeşidine ait kontrol ve mutant adayı bireylerde GERMO 890 primeri ile SSCP jel görüntüsü	83
Şekil 4.41 Sultani Çekirdeksiz üzüm çeşidine ait kontrol ve mutant adayı bireylerde INFIO 432 primeri ile SSCP jel görüntüsü	83
Şekil 4.42 Sultani Çekirdeksiz üzüm çeşidine ait kontrol ve mutant adayı bireylerde INFIO 622 primeri ile SSCP jel görüntüsü	84
Şekil 4.43 Sultani Çekirdeksiz üzüm çeşidine ait kontrol ve mutant adayı bireylerde FOGLIO 236 primeri ile SSCP jel görüntüsü	84
Şekil 4.44 Kalecik karası üzüm çeşidine ait kontrol ve mutant adayı bireylerde, RADIC 118 primeri ile SSCP jel görüntüsü	85
Şekil 4.45 Kalecik karası üzüm çeşidine ait kontrol ve mutant adayı bireylerde, RADIC 294 primeri ile SSCP jel görüntüsü	85

Şekil 4.46	Kalecik karası üzüm çeşidine ait kontrol ve mutant adayı bireylerde RADIC 561 primeri ile SSCP jel görüntüsü	86
Şekil 4.47	Kalecik karası üzüm çeşidine ait kontrol ve mutant adayı bireylerde RADIC 1104 primeri ile SSCP jel görüntüsü	86
Şekil 4.48	Kalecik karası üzüm çeşidine ait kontrol ve mutant adayı bireylerde RADIC 1188 primeri ile SSCP jel görüntüsü	87
Şekil 4.49	Kalecik karası üzüm çeşidine ait kontrol ve mutant adayı bireylerde RA1517 primeri ile SSCP jel görüntüsü	87
Şekil 4.50	Kalecik karası üzüm çeşidine ait kontrol ve mutant adayı bireylerde GEMMA 243 primeri ile SSCP jel görüntüsü	88
Şekil 4.51	Kalecik karası üzüm çeşidine ait kontrol ve mutant adayı bireylerde GEMMA 334 primeri ile SSCP jel görüntüsü	88
Şekil 4.52	Kalecik karası üzüm çeşidine ait kontrol ve mutant adayı bireylerde GEMMA 1026 primeri ile SSCP jel görüntüsü	89
Şekil 4.53	Kalecik karası üzüm çeşidine ait kontrol ve mutant adayı bireylerde GEMMA 1097 primeri ile SSCP jel görüntüsü	89
Şekil 4.54	Kalecik karası üzüm çeşidine ait kontrol ve mutant adayı bireylerde GERMO 220 primeri ile SSCP jel görüntüsü	90
Şekil 4.55	Kalecik karası üzüm çeşidine ait kontrol ve mutant adayı bireylerde GERMO 890 primeri ile SSCP jel görüntüsü	90
Şekil 4.56	Kalecik karası üzüm çeşidine ait kontrol ve mutant adayı bireylerde INFIO 432 primeri ile SSCP jel görüntüsü.....	91
Şekil 4.57	Kalecik karası üzüm çeşidine ait kontrol ve mutant adayı bireylerde INFIO 622 primeri ile SSCP jel görüntüsü.....	91
Şekil 4.58	Kalecik karası üzüm çeşidine ait kontrol ve mutant adayı bireylerde FOGLIO 236 primeri ile SSCP jel görüntüsü.....	92
Şekil 5.1	SÇ 30 Gy 34 nolu bireyin; a) fenotipik görüntüsü, b) ploid (>2x) kromozomlu hücre görüntüsü	95

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1	İyonize radyasyon uygulamaları ile elde edilen mutant türlerin ülkelere göre dağılımı	2
Çizelge 2.1	Fiziksel mutagen kaynakları ve özellikleri	8
Çizelge 2.2	Mutagen olarak kullanılan bazı kimyasal maddeler	8
Çizelge 2.3	Gama radyasyon uygulamaları ile elde edilmiş üzüm çeşitleri.....	15
Çizelge 2.4	Moleküler karakterizasyon çalışmalarında kullanılan markör teknikleri	22
Çizelge 3.1	Mutant koleksiyon parseline dikilen aday bireylerin çeşitlere ve dozlara göre sayısı.....	37
Çizelge 3.2	Sultani Çekirdeksiz populasyonundan sitolojik incelemeler için seçilen mutant adayı bireyler ve bazı özellikleri	39
Çizelge 3.3	Kalecik karası populasyonundan sitolojik incelemeler için seçilen mutant adayı bireyler ve bazı özellikleri.....	40
Çizelge 3.4	Sultani Çekirdeksiz üzüm çeşidine ait SSCP analizlerinde kullanılan mutant adayı bireyler	45
Çizelge 3.5	Kalecik karası üzüm çeşidine ait SSCP analizlerinde kullanılan mutant adayı bireyler	46
Çizelge 3.6	SSCP analizlerinde kullanılan primerlerin geliştirildiği EST isimleri	49
Çizelge 3.7	Sekans dizilişi bilinen primerlere ait baz dizileri	50
Çizelge 3.8	SSCP primerlerinin seleksiyon aşamasında kullanılan mutant adayı bitkiler.....	51
Çizelge 4.1	Sultani Çekirdeksiz ve Kalecik karası bireylerinde morfolojik gözlem yapılan bitki sayısının vejetasyon yılları ve ışın dozlarına göre sayısı	55
Çizelge 4.2	Yenice dönemindeki mutant adaylarının seçiminde kullanılan morfolojik farklılıklar	56
Çizelge 4.3	Sultani Çekirdeksiz ve Kalecik karası üzüm çeşitlerinde sitolojik gözlem sonuçları.....	61

1. GİRİŞ

Mutasyonlar, kalıtım materyalinin (DNA ve RNA) fiziksel ve kimyasal yapısının değişmesi sonucu DNA dizininde, genetik açılım veya rekombinasyon kökenli olmayan, kalıtsal değişimler olarak tanımlanmaktadır (Van Harten 1998). Mutasyon terimi, kromozomlardaki sayı ve yapı değişiklikleri ile genlerdeki değişimleri içermektedir.

Mutasyon oluşturma ve bu mutant tiplerden yararlanma düşüncesi ilk kez; 1901 yılında Hugo de Vries isimli araştırmacının “Mutasyon Teorisi” adlı eserinde ortaya atılmıştır. Araştırmacı, bu eserde mutasyon yoluyla bitki ve hayvanlarda yeni tiplerin ortaya çıkabileceği savunmuş ve 1904 yılında ABD’de verdiği bir konferansda röntgen ışınlarının mutasyon yaratmak amacıyla kullanılmasını önermiştir (Fisher 1997).

X ışınlarının mutasyon yaratma yönünde etkili olduğu ise ilk kez 1927 yılında *Drosophila*’da (sirke sineği), Müller tarafından açıklanmıştır. Müller, entomolog olmakla birlikte, bitkilerde genetik değişim için uyarılmış mutasyonların gelecekte önemli rol oynayacağını belirtmiştir (Micke *et al.* 1987).

1928 yılında Stadler, röntgen ışınlarının arpa ve mısırdaki mutasyonları ortaya çıkarmada etkili olduğunu açıklamıştır. Sonraki yıllarda bitki ıslahçıları, bitki özelliklerini değiştirmek amacıyla uyarılmış mutasyonları kullanmaya başlamışlardır (Ahloowalia *et al.* 2004).

1956 yılında barış için Atom sloganı ile Uluslararası Atom Enerjisi Ajansı kurulmuştur. 1959 yılında ise IAEA ile FAO’nun işbirliği sonucunda Yaşam Bilimleri Bölümü içerisinde Tarımda Nükleer Teknikler Bölümü kurularak, gıda ve tarım alanında nükleer tekniklerin kullanılmasını sağlayacak çalışmalar için zemin hazırlanmıştır. 1961 yılında Seibeldorf’da tarım alanındaki çalışmalara hizmet vermek üzere laboratuvarlar kurulmuştur. Günümüzde de bu birimin amaçlarından birisi, tarımsal değeri olan bitkilerde uyarılmış mutasyonlar ile yeni çeşitlerin geliştirilmesidir (Fisher 1997).

1969 yılında, FAO/IAEA bitki ıslahçıları için; hastalık ve zararlılara dayanıklı daha yüksek özelliklere sahip, kaliteli yeni çeşitlerin geliştirilmesine yönelik uyarılmış mutasyon ıslahı yöntemleri konusunda uygulamalı teknik eğitim kursları başlatılmıştır. Aynı yıl “Manual on Mutation Breeding” (Mutasyon İslahında İzlenilen Yol) adlı eserin ilk basımı gerçekleştirilmiştir (Micke *et al.* 1987).

FAO/IAEA-Tarımda Nükleer Teknikler Bölümü'nün (Division of the Nuclear Techniques in Agriculture) kurulmasından bu yana dünyada 50 ülkede, iyonize radyasyonların kullanılması ile doğrudan mutant veya mutantların melezleme ıslahında kullanılması ile toplam 2540 çeşit kayıt altına alınmış ve elektronik bilgi ağına aktarılmıştır (Anonymous 2006). Mutant Çeşit Veri Tabanı (Mutant Varieties Database-MVD) içerisinde yer alan bitki çeşitlerinin, ıslah edildikleri ülkelere göre dağılımı Çizelge 1.1’de sunulmuştur (Ahloowalia *et al.* 2004).

Çizelge 1.1 İyonize radyasyon uygulamaları ile elde edilen mutant bitki türlerinin ülkelere göre dağılımı

Ülkeler	Oran (%)
Çin	26.8
Hindistan	11.5
Rusya	9.3
Hollanda	7.8
ABD	5.7
Japonya	5.3
Diğer ülkeler	33.6

Mutant çeşit veri tabanı incelendiğinde, 2540 çeşidin % 70’inin doğrudan mutant yeni çeşit; kalan % 30’unun ise mutant bireylerin melezlemelerde kullanılması sonucu geliştirilmiş olduğu bilgisine ulaşılmaktadır. Mutasyon ıslahının en yoğun uygulama alanı bulunduğu türlerden olan pirinçde geliştirilen yeni çeşitlerin çoğunluğunun doğrudan mutantlar olarak mutasyon parselinden seçilmiş olması, bu tür için ilgi çekicidir (Ahloowalia *et al.* 2004).

Mutasyon ıslahı çalışmaları, bitki veya bitkilerin çoğaltma organlarının fiziksel veya kimyasal mutagenler ile muamele edilmesine dayanmaktadır. Mutasyona dayalı bitki ıslahı çalışmalarının ilk amacı uygun mutagen dozu ile zengin bir fenotipik varyasyon

yaratmak ve pozitif seleksiyon ile, birkaç önemli özelliğın değiştirildiği daha iyi özelliklere sahip yeni çeşitlerin geliştirilmesidir. Bu yolla geliştirilen ve yukarıda bazı detayları verilen 2000'den fazla yeni bitki çeşidi, herhangi bir yasal sınırlamaya tabi tutulmadan yetiştirilmek üzere serbest bırakılmıştır (Ahloowalia and Maluszynski 2001, Ahloowalia *et al.* 2004).

Mutant bitkilerde mutasyona uğrayan bölgelerin moleküler olarak belirlenmesi de bitkisel araştırmalarda önemli yer tutan çalışmalarını oluşturmuştur. Böylece özellikle model bitkilerde mutasyonların mekanizması anlaşılmaya çalışılmıştır. Son beş yılda genetik çalışmalarda mutasyon farklı bir yönde ele alınmaya başlanmıştır. Bu yeni yaklaşımda, genetik haritalama çalışmaları yürütölmekte olan model ve yüksek bitkilerde, mutasyonlar yardımıyla bitkilerde genlerin çalışma prensiplerinin açıklanmasına çalışılmaktadır (Waugh *et al.* 2006).

Bitki ıslahında yaşanmakta olan bu yeni gelişmeler kapsamında planlanan Doktora tez çalışmasında, gama radyasyonu kullanılarak Sultani Çekirdeksiz ve Kalecik karası üzüm çeşitlerinde elde edilen fenotipik değişimlerin sitolojik ve moleküler tanımlanması amaçlanmıştır. Fenotipik farklılıkların sitolojik tanımı için kromozom sayısı düzeyindeki etkiler saptanmış ve mutant adaylar SSCP tekniği ile moleküler olarak incelenmiştir.

2. KURAMSAL TEMELLER

2. 1 Bitki Islahında Mutasyon ve Uygulama Alanları

Günümüz modern ıslah çalışmalarında temel izlenen yol; istenilen genotiplerde varyasyon oluşturmak, seleksiyon yoluyla seçim yapmak, gözlemlemek ve çoğaltmak şeklindedir. Islah çalışmalarında etkinliği arttırmak ve gerekli olan uzun süreyi kısaltmak amacıyla bitki ıslahçıları birkaç tekniği kombine etmektedirler.

Mutasyona dayalı ıslah çalışmalarında öncelikli strateji; birkaç önemli özelliğin değiştirilerek daha iyi özelliklere sahip yeni çeşitlerin geliştirilmesidir. Adaptasyon kabiliyeti iyi olan bir çeşidin, bir ya da birkaç özelliğinin iyileştirilmesi amaçlı mutasyonların bitki ıslahında kullanılması önem kazanmaktadır. Mutasyon ıslahı ile melezleme ıslahı karşılaştırıldığında, mutasyon ıslahı sonucunda çeşidin genotipinde oldukça az değişiklik meydana gelmektedir. Mutasyon ıslahı ile klasik melezleme ıslahı çalışmalarındaki uzun zaman gereksinimi de ortadan kalkmaktadır (Parpstein 1988, Ahloowalia and Maluszynski 2001, Lapade *et al.* 2002).

Bir gen içerisinde DNA sekansında meydana gelen herhangi bir değişim mutasyon olarak adlandırılmaktadır. Mutant terimi ise, mutasyona uğramış bir ya da birkaç özelliği değişmiş birey; mutagen ise, mutasyona neden olan fiziksel veya kimyasal maddeyi ifade etmektedir.

Mutasyonlar, fenotipte meydana getirdiği değişimler nedeniyle morfolojik olarak tanımlanabilir niteliktedir. Mutasyonların anlaşılması aynı zamanda bir genin anlaşılmasına yardımcı olacağından önem taşımaktadır.

Birçok mutasyon, doğal olarak oluşmaktadır. Bu şekilde oluşan mutasyonlar, spontan mutasyonlar olarak bilinmektedir. Doğal mutasyonlar oldukça düşük oranlarda oluşmaktadır. Doğal mutasyonlara, organizmaya içsel (genetik yapı ve fizyolojik durumlar) veya dışsal etki eden faktörler (beslenme, sıcaklık, doğal radyasyon, kimyasal maddeler ve yüksek oksijen basıncı gibi) neden olmaktadır.

Mutagen uygulamaları ile elde edilen mutasyonlar, uyarılmış mutasyonlar olarak tanımlanmaktadır. Ökaryotik hücreler, generatif ve somatik olmak üzere iki tip hücre yapısına sahiptir. Mutasyonlar her iki hücre tipinde de oluşmaktadır. Eğer generatif hücrede oluşuyorsa generatif mutasyon olarak tanımlanırken, somatik hücrelerde oluşan mutasyonlar ise somatik mutasyon olarak tanımlanmaktadır. Somatik mutasyonlar nesilden nesile vejetatif çoğaltım ile aktarılabilmektedir. Mutasyon, bir ana hücrede olduğu durumda diğer kardeş hücrelerde de mutasyon oluşmaktadır. Bu nedenle somatik mutasyonlar, genellikle mutasyona uğrayan bölgede sektörel olarak oluşmaktadır (Philip 1999).

2.1.1 Kimerik yapılar

Bir bitki ya da bir bitkinin genetik olarak farklı tabakalara sahip bölümü “**kimera**” olarak adlandırılmaktadır. Bitki biliminde kimerik yapı, apikal meristemde oluşan mutasyon sonucu genetik olarak en az iki farklı hücre tabakasına sahip olması durumunu ifade etmektedir (Burge *et al.* 2002).

Mutasyon sürgün apikal meristeminin bir tabakasını etkilediği zaman mutant hücre, bitki gelişimi boyunca, mitoz bölünme ile çoğalarak mutant sektörü oluşturmaktadır. Periklinal kimeralar genetik mozaığın bir spesifik özelliğidir. Asmalarda ploidy düzeyinin değişimine neden olan kimerizm, ilk olarak sürgün apikal meristeminde tanımlanmıştır. Bu yapı “**sitokimerik yapı**” olarak adlandırılmaktadır. Asma apikal meristemi L1 ve L2 olmak üzere iki genetik tabakadan oluşmuştur (Thompson and Olmo 1963).

Mutasyon ıslahı çalışmalarında, seleksiyon aşamasında en önemli zorluk oluşturan faktör; kimyasal ya da fiziksel mutagen uygulamasını takiben kimerik yapıların oluşmasıdır. Bu kimerik yapıların izole edilip geliştirilmesi mümkün olmasına karşın, kalıcı mutasyonların izole edilmesi oldukça güçtür (Mandal *et al.* 2000). Bitkide oluşan mutasyonlar meristemin bir bölümünde etkide bulunarak mutant doku sektörlerinin oluşmasına neden olurlar. Böyle bir meristemden gelişen bitki, mutant ve mutant olmayan kısımları bir arada taşımaktadır.

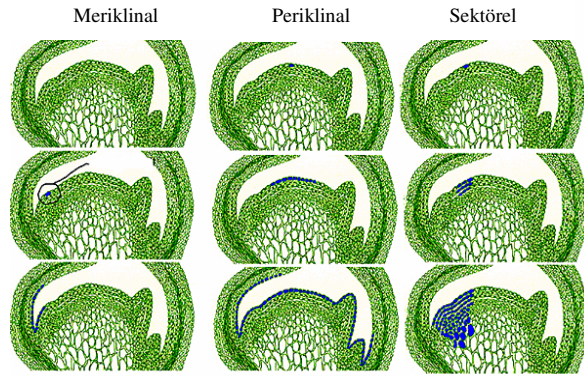
Mutasyonlar her bitki türünde herhangi bir hücrede gerçekleşebilmektedir. Kimerik yapılı bitkinin oluşmasında önemli olan mutant hücrenin bulunma yeridir. Buna bağlı olarak morfolojik ve kimyasal olarak incelenebilir özellikte olabilir ya da tanımlanmaz nitelik taşıyabilir. Mutasyonlar sonucu fenotipik karakterlerdeki değişim (yaprak şekli, meyve rengi ve büyüklüğü, verim) oldukça kolay selekte edilebilirken, hastalıklara dayanıklılık ya da çevre koşullarına tolerans gibi bazı özelliklerin stres koşulları oluşturulmadan izlenmesi mümkün olamamaktadır (Marcotrigiano 1990).

Kimerik yapıların oluştuğu apikal meristemin anatomik yapısı, mutasyonun *in vivo* nasıl eksprese olacağını belirlediğinden önem taşımaktadır. Kimerik yapının anatomik incelenmesinde anahtar faktör, bir meristemde iki ayrı genotipin gelişimine neden olan meristemlerin nasıl organize edildiğini anlamaktır. Promeristem hücrelerinin histolojik olarak farklılaşma şekline göre, 1) periklinal kimeralar, 2) meriklinal kimeralar, 3) sektörel kimeralar olarak üç farklı gruba ayrılmaktadırlar.

Mutant olmayan dokunun çevresini en az bir veya iki mutant doku sarmış durumdaki yapı “periklinal kimera” olarak adlandırılmaktadır. Periklinal kimeranın apikal meristemi en az bir mutant hücre tabakası içermektedir. Mutasyon meristemin en uç tabakasında oluşmakta ve pozisyonundan dolayı mutant tabakada hücre bölünmesinin gerçekleşmesi sonucu apeksin tüm tabakasını sarmaktadır (Şekil 2.1). Bir başka deyişle, tüm tabaka mutanttır. Periklinal kimera'nın geleneksel ismi mutant iç bölgeyi tamamen maske şeklinde, sarması nedeniyle “hand-in-glove” olarak adlandırılmaktadır (Dermen 1960).

Meriklinal kimeralar periklinal kimeraların benzeridir. Mutant doku sürgünün tamamı boyunca uzanmak yerine sadece küçük bir bölümünü teşkil etmektedir (Şekil 2.1). Mutasyon, meristemin bir noktasında oluşur ve meristemin bir bölümü boyunca gelişir. Apikal meristemin tüm bölgesini kaplamak yerine küçük bir kısmını kapsar. Oluşum şekline göre dolayısıyla sadece tabakanın bir bölümünde gerçekleşmesi ve gelişmesi sonucu bitkinin sadece fenotipik olarak bir bölümüne yansır. Meriklinal kimeralar stabil değildir.

Sektörel kimeralarda mutasyon, meristemin en ucunda çeşitli tabakalarda oluşur. Oluşum pozisyonundan dolayı mutant hücre topluluklarının bölünmesi ile mutant hücrelerin oluşturduğu bölgeler meydana gelmektedir (Şekil 2.1). Bu şekilde kimerik yapı oluşumu genellikle bitkilerin belirli kısımlarında görülür. Genetik olarak farklı olan dokunun her ikisinde birden ve kısım kısım sürgünün belirli yerlerinde oluşum gösterir. Sadece bu mutant bölgeden gelişen sürgünler mutasyonun etkisini taşır. Sektörel kimeralarda, periklinal kimeralar gibi oldukça stabil yapıda olup bahçe bitkilerinde en çok bilinen kimeraları oluşturur.



Şekil 2.1 Meriklinal, periklinal ve sektörel kimerik yapıların anatomik oluşumları (Marcotrigiano 1997)

2.1.2 Radyasyonun mutasyon ıslahında kullanımı

Mutasyon ıslahı çalışmalarında, mutasyon oluşturma amaçlı olarak; UV ışınları ile birlikte, iyonize radyasyon olarak da adlandırılan X ve gama ışınları, alfa ve beta partikülleri, proton ve nötronları da kullanılır. Bunların her birinin özelliği enerjilerini vermeleri olup, bu olaya da 'iyonizasyon' denir. Mutagen uygulamalarında yaygın olarak kullanılan radyasyon kaynakları ve özellikleri Çizelge 2.1-2.2'de sunulmuştur (Ahloowalia and Maluszynski 2001).

Birçok mutasyon ıslahı çalışmalarında gama radyasyonu ve X ışınları mutasyonun uyarılması amacıyla kullanılmaktadır. Bitki materyaline radyasyonun uygulanmasında anahtar faktör; materyal tarafından absorbe edilen radyasyon enerjisi miktarıdır. Radyasyon dozunun ölçü birimi gray "Gy" dir. 1 Gy, radyasyona tabi tutulan 1kg'lık ürünün 1J lük enerji absorpsiyonuna eşittir (Sağel vd. 2002).

Çizelge 2.1 Fiziksel mutagen kaynakları ve özellikleri

1. Fiziksel mutagenler		
Radyasyon Tipi	Kaynağı	Dokuya giriş kabiliyeti
X ışınları	X ışını mak.	Birkaç mm-cm
Gama Işınları (Co ⁶⁰ ve Se ¹³⁷)	Radyoizotop Nükleer Reaksiyonu	cm düzeyi
Nötronlar	Nükleer Reaksiyon Hızlandırıcı	cm düzeyi
Beta Katod Işını	Radyoizotop	Birkaç mm üzerinde
Alfa Taneciği	Radyoizotop	mm nin küçük katları
Protonlar	Nükleer Reaksiyon Hızlandırıcı	cm düzeyi

Fiziksel mutagen uygulamalarında gama radyasyon uygulaması; kullanımının kolay olması, geçirgenliğinin yüksek olması sonucu hedef hücrelere ulaşabilmesi ve toksik herhangi bir etki ve zararının olmaması nedeniyle yoğun olarak tercih edilmektedir (Schum 2003).

Doğrudan mutant çeşitlerin geliştirilmesinde, radyasyonla mutasyonun uyarılması en yaygın (% 89) kullanılan metottür. Mutagen uygulamalarında en çok radyasyon kaynağı olarak gama ışınları kullanılmakta olup (% 64), bunu X ışınları (% 22) takip etmektedir. Kimyasal mutagenlerin ıslah çalışmalarında kullanımı ise oldukça sınırlıdır (Ahloowalia *et al.* 2004). Mutasyon ıslahı çalışmalarında kullanılan bazı kimyasal mutagenler Çizelge 2.2’de sunulmuştur.

Çizelge 2.2 Mutagen olarak kullanılan bazı kimyasal maddeler

2. Kimyasal mutagenler		
Sulfat sulfonatlar	Di metil sulfonat	DMS
	Di etil sulfat	DES
	Metil metan sulfat	MMS
	Etil metan sulfonat	EMS
Etilen aminler	Etilen amin	EI
Nitroz bileşikler	N-metil-N-nitroz üretan	MNU
	N-etil-N-nitroz üre	ENH

Kimyasal mutagenler, mikro mutasyonlara uygun olduklarından genellikle tercih edilirler. Ancak bu mutagenler *in vivo* sistemde meristematik dokulara giriş gücü zayıf olduğundan vejetatif olarak üretilen bitkilerde etkinliği düşüktür. Örneğin dormant gözler, hem normal hava basıncında hem de vakum şartlarında kimyasal çözeltiliye batırıldığında, mutagenin tomurcuk meristemine ulaşamadığı birçok araştırmacı tarafından saptanmıştır. Kimyasal mutagenlerin geniş çeşitliliğe sahip olması, güvenli kullanımını güçleştirmektedir (Çoban 2003).

Vejetatif çoğaltılan bitkilerde radyasyonun tomurcuklara uygulanması tercih edilir. Bu organlar için kimyasal mutagen uygulamaları, hedef hücrelerdeki dozun belirlenmesindeki zorluklar nedeniyle uygulamada pratik değildir (Micke *et al.* 1987).

Fiziksel ve kimyasal mutagenler genom içerisinde, herhangi bir gende varyasyona sebep olabilir ve bu nedenle bitkinin herhangi bir özelliğini etkileyebilir. Bir diğer önemli olay, elbette her mutasyonun belirlenme ve kullanma yönünün mümkün olup olmayacağıdır. Genetik değişimin gerçekleşmesi yönünde herhangi bir ipucu bulunmamaktadır. Melezleme ıslahı ile elde edilen populasyondaki varyasyondan farklı olarak mutasyonlar, tesadüfe bağlı varyasyon oluşturmaktadır. Sadece mutasyon frekansına yönelik, en etkili doz uygulandığı koşulda mutasyona uğratılmış 10.000 hücrede ortalama bir kez özel bir gende mutasyon oluşması beklenmektedir. Spontan mutasyonlarda olduğu gibi, mutagenlerin uygulandığı koşulda da, mutagen tipi ve diğer faktörlerden etkilenme durumuna bağlı olarak, ortaya çıkan varyasyonun kaynağı olan genlerin mutasyona uğrama durumunda farklılıklar oluşmaktadır. Genlerin mutasyona uğraması birçok faktör tarafından etkilenmektedir. Bazı genler sürekli olarak mutasyona uğrayabilirken, diğer bazı genlerde mutasyon aynı sıklıkta gerçekleşmemektedir (Micke *et al.* 1987).

Mutasyon oluşturmak amacıyla radyasyon uygulandığında, bitkisel materyalde ışınlanmanın dozuna bağlı olarak, yüksek fizyolojik zarar (%90 ölümcül) ve düşük mutasyon frekansı meydana geldiği gibi, yüksek mutasyon frekansı ve düşük fizyolojik zarar da meydana gelebilir. Bitki ıslahçısının isteği, yüksek mutasyon frekansı ve düşük

fizyolojik zarardır. Bu sonucun elde edilebilmesi şansı, ışınlamanın etkili dozda yapılması ile sağlanabilir. Mutasyon ıslahı çalışmalarında kullanılacak doz sınırlarının iyi belirlenmesi gerekmektedir. Bunun için “etkili doz (ED₅₀)” veya “büyüme % 50 azaltan doz” kavramı ortaya atılmıştır. Bu değer, her bitki türü için farklı olup mutasyon ıslah çalışmalarına başlamadan önce, etkili doz oranı belirlenmelidir (Sağel vd. 2002).

Işınlamayı takiben bitki ıslahçıları ve genetikçileri ilgilendiren üç sonuç ortaya çıkmaktadır. Bunlar; fizyolojik zarar, gen mutasyonları ve kromozom mutasyonlarıdır. Birincisi ön etki (fizyolojik zarar), diğerleri ise, kalıtsal değişiklik yani mutasyondur. Fizyolojik zarar, mutasyon uygulamasını takip eden birinci generasyonda (M1V1) ortaya çıkar. Fizyolojik zarar etkisi, hücre bölünmesinin engellenmesi, büyüme hızı ve davranışının değişimi ve dokuların yeniden düzenlenmesi şeklinde ortaya çıkmaktadır. Fizyolojik zarar oranının belirlenmesinde, vejetatif gelişim, köklenme durumu ve bitkilerin hayatta kalma oranı dikkate alınır. Kromozom mutasyonları, M1V1 veya sonraki generasyonlarda belirlenebilirken, gen mutasyonları çoğunlukla resesif olduğundan, değişik fenotiplerin ve gen mutasyonlarının ortaya çıkması, M1V2 generasyonunda gerçekleşmekte ve kalıcı mutasyonların gelecek generasyonlara aktarılması mümkün olmaktadır (Donini 1982).

2.2 Asmalarda Mutasyon Islahı Çalışmaları

Çok yıllık bahçe bitkilerinin ıslahında, yaşanan teknik zorlukların yanı sıra, tüketici ve pazar taleplerinin geleneksel yaklaşımı nedeniyle uzun yıllar oldukça sınırlı ilerlemeler sağlanabilmiştir. Bunun sonucu olarak, geleneksel çeşitlerin büyük ölçüde korunarak günümüze ulaştığı görülmektedir. Bununla birlikte, son yıllarda özellikle sofralık tüketimin artması yeni çeşitlere olan talebi artırmıştır. Asma ıslah programlarında yeni çeşitlerin kaynağını daha çok somatik mutantların seleksiyonu ve melezleme ıslahı oluşturmaktadır.

Doğal mutasyonların frekansları oldukça düşüktür. Bu nedenle son yıllarda özellikle vejetatif olarak üretilen bitkilerde uygun mutagenlerden yararlanılarak mutasyon frekansını yükseltme ve yapay mutasyonlar meydana getirme yöntemi bir ıslah metodu

olarak benimsenmiştir. Bir çok meyve türünde olduğu gibi vejetatif üretime uygun karakterde ve heterozigotik yapıda olmaları nedeniyle asmalar da mutasyon ıslahı yöntemine cevap veren türlerdir (Donini 1992).

Ülkemizde özellikle sofralık üzüm çeşitlerine yönelik asma ıslah programları, klon seleksiyonu ve melezleme ıslahı teknikleri ile yürütülmektedir. Yeni çeşit geliştirilmesinin hedeflendiği melezleme ıslahı çalışmaları, ıslah sürecinin çok uzun olmasına karşılık, değişen tüketici talepleri ve pazar ihtiyaçlarını beklenildiği ölçüde karşılayamamıştır. Yerli melez çeşitlerin birçoğu yetiştiricilik ve pazarlamada sorun yaratan, istenmeyen özelliklere sahiptir. Diğer taraftan, ülkemiz gen kaynaklarının yüzyıllar içerisinde kazandığı zenginlik, durulmuşluk ve yeknesaklıktan yararlanmayı hedefleyen, ayrıca etkili bir seleksiyon ile kombine edilecek mutasyon ıslahı tekniği ile, mevcut çeşitlere yeni özellikler kazandırılması mümkün olacaktır.

Asma tür ve çeşitlerinin uzun yıllar vejetatif çoğaltılan populasyonlar olduğu dikkate alındığında, populasyon içerisinde yüksek mutasyon birikiminin bulunduğu açıktır. Bununla birlikte, klon düzeyinde yüksek oranda varyasyon gösteren bir tür olup çeşit içerisinde gözlenen bu varyasyonlar, çevre koşullarından kaynaklandığı gibi, kalıcı nitelikteki varyasyonlar ise somatik mutasyonlardan kaynaklanmaktadır. Günümüzde ekonomik öneme sahip bir çok üzüm çeşidi, somatik mutasyonların belirlenmesiyle geliştirilmişlerdir. Bu nedenle, gerek somatik mutasyonların gözlenmesi gerekse somatik mutasyonları uyaracak ıslah çalışmaları değer taşımaktadır.

Uyarılmış mutasyonların ıslah amaçlı kullanılması çalışmalarında, 20-30 yıl önce hızlı ilerlemeler kaydedilmiş, ancak daha sonraki yıllarda söz konusu çalışmalar giderek azalmıştır (Predieri 2001). Günümüzde ise, ıslahın etkinliğini arttıran teknolojik ilerlemeler, mutasyonun etkili olarak kullanılabilen önemli bir ıslah tekniği olduğu görüşünü yeniden gündeme getirmiştir.

Predieri (2001), indüklenmiş mutasyonların, spontan mutasyonlardan farklı olmayan genetik değişimler olduğunu ve gen teknolojisiyle oluşturulan yeni genetik bilgiyi taşıyan bitkiler (GMO) karşısında mutasyon ıslahının çok önemli bir alternatif olarak yer aldığını belirtmiştir.

2.2.1 Somatik mutasyonlar

Asmaların sürekli eşeysiz çoğaltılması sonucunda oluşan klonal populasyonlar içinde gerçekleştirilen başarılı seleksiyonlar sonucunda birçok çeşide ait somatik mutantlar elde edilmiştir.

Populasyonlar içerisinde gerçekleşen somatik mutasyonlar çoğunlukla tane şekli ve rengi bakımından meydana gelen değişimleri kapsamaktadır. Asmalarda tane rengi değişimleri tipik olarak somatik mutasyon sonucudur. Asmalarda tane kabuğu rengi, antosiyaninler olarak isimlendirilen kırmızı renk pigmentlerinin birikmesi ile oluşmaktadır. Beyaz çeşitlerin kırmızı çeşitlerden bağımsız mutasyonlar sonucu oluştuğu bilinmektedir. Ancak renk mutasyonlarının moleküler düzeyde oluşum mekanizması bilinmemektedir. Son yıllarda asmada antosiyanin pigmentleri ile ilişkili olarak renk değişiminin genetik kontrolü konusunda çalışmalar sürdürülmektedir (Kobayashi *et al.* 2004, 2005, Castellari *et al.* 2006).

Siyah bir üzüm çeşidi olan Kyoho'da (*Vitis labrusca*), Myb ilişkili genlerin (VMyb A1-1, VMybA1-2 ve VMyb A2 gibi) antosiyanin biyosentezini düzenlediği araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Kobayashi *et al.* 2004, 2005). Kobayashi *et al.* 2004, beyaz çeşitler olan Italia ve Muscat of Alexandria'dan tomurcuk mutasyonları ile oluşan iki kırmızı renkli üzüm çeşidi, Ruby Okuyama ve Flame Muscat üzerinde çalışmışlardır. VmybA1 transkripsiyon faktörü, sadece üzerinde çalışılan kırmızı çeşitlerde belirlenmiştir. Dolayısı ile mutasyonlar sonucu oluşmuş ve VMyb A1-1 geninin homologu olup beyaz çeşitlerde pigmentasyonun azalması ile ilişkili olduğunu belirtmişlerdir.

Tane rengi konusundaki değişimler daha çok şaraplık çeşitlerde görülmekle birlikte, en tipik örneği, çok büyük oranda çeşit ve klon zenginliğine sahip “Pinot noir” üzüm çeşidi oluşturmaktadır. Günümüzde Pinot grubu çok büyük çeşit ve klon zenginliğine sahiptir. Bu gruba giren çeşitlerde yüksek oranda agronomik ve ampelografik varyasyon (tane rengi, ürün yükü, yaprak morfolojisi, ve bitki habitusu bakımından) gözlenmektedir. Pinot noir’dan somatik mutasyonla oluşmuş ve oldukça yaygın yetiştiriciliği yapılmakta olan “Pinot blanc” ve “Pinot gris” ile Pinot gris’den somatik mutasyonla oluşmuş “Pinot meunier” örnek olarak verilebilir (Hocquigny *et al.* 2004).

Tane rengindeki değişimden yararlanılarak gerçekleştirilen seleksiyonlarda, bir diğer önemli grubu oluşturan çeşit “Cabernet Sauvignon” olup somatik mutantlarını; “Sauvignon noir”, “Sauvignon jaune”, “Sauvignon rose”, “Sauvignon gris”, “Cygne blanc” (Mann and Mann 1998 “Malian” ve Malian’dan beyaz renkli “Shalistin” (Cleggett 2002) oluşturmaktadır.

“Merlot rose” şaraplık üzüm çeşidinin Merlot’tan somatik mutasyonla oluştuğu (Moretti 1983), “Malvasia rosa” çeşidinin ise Malvasia popülasyonu içerisinde belirlenen (Fregoni 2000) tomurcuk mutasyonlarından seçildikleri bildirilmektedir.

İtalyan şaraplık üzüm çeşitleri olan “Dolcetto”, “Primitivo” ve “Trebiano” üzüm çeşitlerinin bir çok somatik mutantları belirlenmiş olup, İtalya’da yetiştiricilikte yaygın olarak kullanılmaktadır. Yine sofralık üzüm çeşitlerinden “Italia” çeşidine ait, “Italia rubi”, “Benitaka”, “Brasil” (Albuquerque and Souza 2001) ve “Redimeire” (Pires *et al.* 2003) ile “Bicchieri” (RedItalia), “La notte (Elongate Italia)”, “Dipinto (Early Italia)” adlı (Fanizza *et al.* 2003) birçok somatik mutanı bulunmaktadır.

Asmalarda doğal mutasyonlar sonucunda tetraploid yapıların oluştuğu araştırmacılar tarafından belirtilmiştir. Bu çeşitlere; Alphonse Lavallée’nin “Leopold III”, Muscat of Alexandria’nın “Muscat Canon Hall” (Yamada *et al.* 2003), Razakı’nın “Centennial” (Kim *et al.* 2002), Chasselas’nın “Chasselas Gros Coulard”, Gros Colman’ın “Süper Gros Colman” ve “Barbera” isimli İtalyan üzüm çeşidinin ise iri taneli tetraploid formları (Botta *et al.* 1989) örnek olarak verilebilir.

Asmalara özgü önemli bir diğer değişim, çekirdekli genotiplerden çekirdeksiz tiplerin elde edilmesidir. Çekirdeksiz *vinifera* çeşitlerinin progenitörü konumundaki Sultani Çekirdeksiz'in tomurcuk mutasyonu sonucu ortaya çıktığı kabul edilmektedir. Ülkemizde yaygın olarak yetiştiriciliği yapılan "Yuvarlak Çekirdeksiz" çeşidinin Sultani Çekirdeksiz'den somatik mutasyonla oluştuğu düşünülmektedir. Diğer taraftan, günümüz bağcılığının önde gelen çeşidi olan Sultani Çekirdeksiz çeşidinin somatik mutantları; "Bruce's Sport", "Sultana H5" ve "Moss Sultana" tescil edilerek dünya bağcılığına kazandırılmıştır (Rathjen and Robinson 1992).

Vitis vinifera ve diğer türler içerisinde yer alan birçok çeşitten; Emperor'dan "Emperor Seedless" (Einset and Pratt 1975) , Avustralya'da, "Menindee Seedless" çeşidinden erkenci ve kırmızı renkli "Ralli Seedless" (Ralli and Ralli 1996), İsrail'de "King Husainy" çeşidinden "Jade Seedless" (Karniel 1996), İtalya'da, "Queen of vineyard" üzüm çeşidinin çekirdeksiz tipleri (Botta *et al.* 1989) belirlenmiştir.

Vitis vinifera x *Vitis labrusca* melezlerinden; Catawba'dan "Catawba Seedless", Concord'dan "Concord Seedless", Niagara'dan "Niagara Rosato (Red)" ve Niagara Red çeşidinden tomurcuk mutasyonu ile "Rosinha" isimli çekirdeksiz mutantı oluşmuştur (Pires *et al.* 1988) .

2.2.2 Yapay mutasyon ıslahı çalışmaları

Bağcılık açısından, uyarılmış mutasyonların üstünlüğü, elit bir çeşitte yalnızca bir veya birkaç karakterin değiştirilebilmesidir. Somatik mutasyonlardan da izlenebileceği gibi, asmalarda mutagenlerin daha çok meyve rengi, aroması, çekirdek özellikleri, olgunlaşma zamanı, salkım sıklığı ve stres koşullarına dayanıklılık ile ilgili karakterler üzerinde etkili olduğu bildirilmektedir (Donini 1982).

FAO ile IAEA'nın vejetatif çoğaltılan çok yıllık bitkilerde mutasyon ıslahına yönelik projeleri kapsamında başta Rusya ve İtalya olmak üzere asmalarda mutagen uygulamaları ıslah çalışmalarında yeniden kullanılmaya başlamıştır. Bu çalışmalar sonucunda değişik ülkelerde birçok yeni çeşit elde edilmiş, bunların bir kısmı

kazandıkları özellikleri nedeniyle ıslah ebeveyni olarak kullanılırken, meyve kalitesi iyi olanlar çeşit olarak tescil edilmiştir. Uluslararası Atom Enerjisi Ajansı Mutant Bitkiler bilgi sistemine kayıt ettirilen bazı mutant asma çeşitleri aşağıda (Çizelge 2.3) verilmiştir (Spiegel-Roy 1990, Maluzsynski *et al.* 2000).

Çizelge 2.3 Gama radyasyon uygulamaları ile elde edilmiş üzüm çeşitleri

Ana Çeşit	Elde edilen mutant sayısı veya adı	Özellikleri	Islah Edildiği Ülke	Kaynak
Marandi	Fikreti	Erkenci	Rusya (1986) Gama ışınları	Anonymous 2006
Bonarda	2	Kısa boğum aralarına sahip, seyrek salkımlı	İtalya	Maluzsynski <i>et al.</i> 2000
Dolcetto	2	Erkenci, tane dökümüne dayanıklı	İtalya	Maluzsynski <i>et al.</i> 2000
Regina Vigneti	1	Çekirdeksiz ve küçük taneli	İtalya	Maluzsynski <i>et al.</i> 2000

Asmalarda dinlenme halindeki kışlık gözlerin gama radyasyonundan etkilenme düzeyi üzerine yapılan çalışmalarda, elde edilen başarının çeşitlere göre değiştiği belirlenmiştir. Bu konuda çeşitli araştırmacılar tarafından yapılan çalışmaların sonuçlarına göre en etkili gama radyasyonu uygulama dozunun çeşide bağlı olarak değişmekle birlikte 20-45 Gy arasında olduğu belirtilmiştir (Rosati *et al.* 1990, Lima da Silva *et al.* 2000, Çoban vd. 2002, Marasalı vd. 2003).

Einset and Pratt (1975)'a göre, radyasyon uygulamasının ardından vejetatif gelişimde çarpıcı özelliklerin gözleendiği, sürgün gelişiminin engellenmesi, yaprakta klorofil noksanlığı, şekil değişikliği, yaprak büyüklüğü ve tüylülüğünde değişim, meyvenin erken olgunlaşması, meyve aromasında değişimler meydana geldiği ifade edilmiştir.

Sofralık çeşitlerden “Muscat Hamburg” ve “Chasselas Dore” üzüm çeşitlerinde, tane biçimi ve renginde, yaprak ve sürgün pigmentasyonunda ve antosiyanin içeriğinde mutasyonlar gözlenmiştir. Genel olarak, salkımda tane sayısı azalmış ve ortalama tane ağırlığı artmıştır (Baditescu 1986).

Fideghelli (1990) tarafından yapılan çalışmada; “Dolceto”, “Barbera”, “Bornardo”, “Fresia”, “Delight”, “Regina dei Vigneti” ve “Muscat Hamburg” üzüm çeşitlerinin dinlenme halindeki gözlerine gama ışını (Co⁶⁰) uygulanmıştır. Birinci yıl, araştırma sonucunda vejetatif gelişim parametrelerinde meydana gelen değişim belirlenirken, ikinci yıl çalışmalarında meydana gelen değişimlerin kalıcı olup olmadığı belirlenmiştir. Yaprak şekli ve büyüklüğünde farklılık, boğum arası uzunluğunun kısalması gibi morfolojik değişimler belirlenmiştir. Mutasyon etkilerinin incelenmesi amacıyla fenotipik değişimlerle birlikte kök hücrelerindeki kromozom sayılarını incelemişlerdir.

Botta *et al.* (1988) tarafından yapılan bir ıslah çalışması programında, *Vitis vinifera* üzüm çeşitlerinde (Dolcetto, Barbera, Queen of vineyards, Delight, Perlette) iyonize radyasyon uygulamaları ile, ürün kalitesinin artırılması, hastalık ve zararlılara dayanıklı yeni çeşitlerinin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Boncuklanma eğilimi gösteren Dolcetto üzüm çeşidinde gama radyasyon uygulamaları ile boncuklanma sorunu olmayan erkenci özellikte mutant bireyler selekte edilmiştir. Barbera üzüm çeşidinde ise iri taneli poliploid yapı gözlenmiş olup, bu bireylerde tane kabuğunun diploidlere göre daha kalın yapıya sahip olmasından dolayı “*Botrytis cinerea*” ya dayanımının da beraberinde gelen olumlu bir özellik olduğu belirtilmiştir.

Mutagen uygulamaları ile doku kültürü tekniklerinin kombine kullanılması mutasyonun etkinliğini önemli düzeyde arttırmaktadır. *In vitro* çalışmalarda büyümeyi düzenleyici maddelerin kullanılması bitkide genetik kararlılığın bozulması gibi sorunlara sebep olduğundan, düşük dozlarda gama radyasyonu *in vitro* gelişimi uyarmak amacıyla kullanılmaktadır. Çeşitli türlerde yapılan çalışmalarda gelişmeyi arttırma ile beraber kallus oluşumunun da artmasına neden olduğu belirtilmiştir (Kim *et al.* 1986, Rosati *et al.* 1990, Charbaji and Nabulsi 1999).

2.3 Mutant Bireylerde Karakterizasyon Çalışmaları

2.3.1 Sitolojik karakterizasyon çalışmaları

Mutagen uygulamalarının etkileri sitolojik olarak incelenebilir. En iyi belirlenebilen değişiklikler de kromozom mutasyonları olup bunlar, mitoz ve mayoz bölünme sırasında gözlemlenebilmektedir. Radyasyonun bitkilerdeki öldürücü etkisi genellikle hücre bölünmesinin inhibe edilmesi sonucu ortaya çıkmaktadır.

Asmalarda mutasyonların uyarılması ile elde edilen başarılı sonuçların mutant bitkilerin seçimi aşamasında da sürdürülmesi gerekmektedir. Bu aşamada, *Vitis* türlerinin yüksek kromozom sayısı ($2n=38$) ile birlikte son derece küçük kromozomlara sahip olması, aşılması gereken teknik bir dezavantaj olarak karşımıza çıkmaktadır.

Asmalarda kromozomların son derece küçük olduğu çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilmiştir. Ghimpu (1929), 0.5 mikron olarak bildirirken; Shetty (1958), 0.855-1.014 mikron arasında değiştiğini; Raj ve Seethaiah (1968) ise, kromozomların karyotip analizleri üzerine yapmış oldukları çalışmalar sonucunda üzerinde çalıştıkları çeşitlere bağlı olarak ortalama kromozom uzunluğunu 0.786-2.163 mikron arasında değiştiğini belirtmişlerdir. *Vitis vinifera* çeşitleri üzerinde sonraki yıllarda yapılan bir diğer karyolojik çalışmada da kromozom uzunluklarını 0.975-2.450 mikron arasında değiştiği ifade edilmiştir (Patil and Jadhav 1985). Patil ve Patil (1992) yapmış oldukları karyolojik çalışmada ise, ortalama kromozom büyüklüklerinin 0.94-1.80 mikron arasında değiştiğini bildirmişlerdir.

Asma kromozomlarının oldukça küçük olması ve sayısının fazla olmasının yanı sıra, ezme preparat hazırlığı sırasında yoğun sitoplazma yapısına sahip olması nedeniyle düzgün bir kromozom dağılımının elde edilmesindeki sorunlar sitolojik çalışmalarda büyük güçlük oluşturmaktadır (Skene *et al.* 1988). Kromozomların net bir şekilde sayılabilmesi ve görüntülenebilmesi açısından değişik yöntemler geliştirilmektedir.

Asma kromozomlarının son derece küçük yapıya sahip olması nedeniyle oldukça az sayıda kromozom morfolojisine yönelik çalışma bulunmaktadır. Asmaların sitogenetiği üzerindeki çalışmalarda, çeşitlere göre karyolojik farklılıklar belirlenmiştir. Mutagen etkilerinin araştırıldığı sitolojik çalışmalarda ise, kimerik, diploid ve ploid hücre yapıları gözlenmiştir (Thompson and Olmo 1963, Patil and Jadhav 1985, Skene *et al.* 1988, Patil and Patil 1992, Yadav and Grumet 1994, Viljoen and Spies 1995).

Araştırmacılar, sitolojik çalışmaların etkinliğini arttırabilmek için, farklı enzimler kullanarak hücredeki yoğun sitoplazmik yapının uzaklaştırılması ile kromozomların net olarak gözlenebildiğini belirlemişlerdir (Viljoen and Spies 1995, Park *et al.* 1999, Park *et al.* 2002b).

Son yıllarda sitogenetik çalışmalardan karyolojik alanda oldukça yeni bir çalışma Haas and Alleweldt (2000) tarafından yürütülmüştür. *Vitis vinifera* L. Baccus çeşidinde, karyotip analizi amacıyla sitogenetik çalışmalar kök uçlarında yapılmıştır. 19 kromozomda kısa kol ve uzun kol boyları ile beraber tüm kromozom boy uzunluğu hesaplanmıştır. Özellikle karyolojik çalışmalarda, ezme preparasyondan daha çok, kromozomların şeklinin korunduğu enzim içerikli preparat hazırlığının daha uygun olduğunu belirtmişlerdir. Çalışmada kullanılan enzim yöntemi ile beraber kromozom boylarında ve şekillerinde bozulmalar olmadığından uzunluk olarak geçmiş bulgulara göre daha yüksek kromozom boyları (1.09-2.37 μ) tespit edilmiştir. Böylece ezme preparat hazırlığında oluşan mekanik zararlanmanın kromozom şekli üzerindeki olumsuz etkisinin de ortadan kalktığını bildirmişlerdir.

Bir mutantın polipliod yapısı; stoma büyüklüğü, tane büyüklüğü, tohum büyüklüğü ve kromozom sayısı ile doğrudan ilişkilidir (Fanizza *et al.* 2003). Sacerdote *et al.* (1981) tarafından yapılan bir çalışmada, Barbera üzüm çeşidine değişik dozlarda gama ışını uygulamaları yapılmıştır. Sitolojik ve histolojik gözlemler sırasında, kök ucu hücrelerindeki kromozom sayıları ile polen, stoma ve tanelerdeki epidermal hücrelerin büyüklüklerini incelemişlerdir. Çalışma sonucunda, iki bitki izole eden araştırmacılar, birinin tetraploid, diğzerinin ise 2n-4n periklinal kimera olduğunu bildirmişlerdir.

Radyasyon uygulamaları ile elde edilen populasyonda, sitolojik karakterizasyon çalışmaları önem kazanmaktadır. Bu kapsamda yapılan bir çalışmada; *Vitis vinifera* cv. Podarok ve Magaracha çeşitlerinde, *in vitro* koşullarda varyasyon oluşturmak amacıyla gama radyasyonu ve kolkisin uygulamaları yapılmış ve sitolojik çalışmalar sonucunda üzerinde çalışılan populasyonda % 2.5 oranında tetraploid bitkiler elde edilmiştir (Kuksova *et al.* 1997).

Diploid özellikte olan *Vitis vinifera*'da doğal ya da uyarılmış mutasyonlarla ploidy seviyesi farklı; triploid, tetraploid ve aneuploid yeni tiplerin ortaya çıkması ekonomik öneme sahip yeni tiplerin ortaya çıkması açısından önem taşımaktadır. Bu bakımdan doğal melezlemeler (2x X 4x, 4x X 2x, 3x X 2x ya da 3x X 4x) yoluyla, *in vitro* kültür aracılığıyla ya da uyarılmış mutasyonlarla yeni tipler hızla kazandırılmaktadır. Bu bakımdan yoğun çalışmalar Japon araştırmacılar tarafından yürütülmekte olup, tetraploid kökenli çeşitlerle diploidlerin melezlenmesi sonucu, çekirdeksiz özellikte ve triploid yeni tipler ve ekonomik öneme sahip iri taneli tetraploid çeşitler geliştirmektedir (Yamashita *et al.* 1998, Park *et al.* 1999, Notsuka *et al.* 2000, Park *et al.* 2002a, Park *et al.* 2002b)

2.3.2 Mutasyonların moleküler karakterizasyonu ve bu amaçla kullanılan yöntemler

Mutagenlerin genetik yapı üzerine etkisinin moleküler düzeyde belirlenmesine yönelik günümüzde oldukça sınırlı bilgi mevcuttur. Genom düzeyinde bu etkiler; baz çifti değişimleri (SNPs “single/simple nükleotit polimorfizm”), küçük eklenmeler veya kayıplar ile kromozomal değişimleri kapsayan DNA hasarlarını ifade etmektedir (Lagoda 2005).

Son on yıl boyunca, genlerin yapısı ve fonksiyonlarının incelendiği “genom çalışmaları (genomics)” olarak adlandırılan çalışmalarla klasik Mendel genetiği yeni bir boyuta geçmiştir. Bitki ıslahında, istenen bir özellik yönünde mutasyonun sağlanması ile, sorumlu gende olan mutasyonların belirlenebilmesi aşamasında uyarılmış mutantlarla, moleküler markör teknolojisinin kombine kullanılması önem kazanmaktadır.

Bu aşamada, moleküler ve genetik yaklaşım sonucu, mutant karakter, daha önce fonksiyonu bilinmeyen DNA sekansı ile ilişkilendirilebilmesi bakımından önem taşımaktadır (Anonymous 2002).

Günümüzde mutasyon teknikleri, bitki ıslahında genetikçiler tarafından bitkilerde bazı karakterlerden sorumlu genlerin keşfinde kullanılmaktadır (Lagoda 2005). Mutasyonun mekanizmasını anlayabilmek için, spesifik mutasyonların nasıl oluştuğu ve genom üzerinde nasıl dağıldığını anlamak gerekmektedir. Geçmişte bu durum, bitki genomunun yapısı ve DNA'da hasarın anlaşılmasına yönelik bilginin yetersizliğinden dolayı mümkün olamazken ve oldukça sınırlı sayıda bitki geninde sekans analizi yapılmışken; bugün, biyoinformatik ve fonksiyonel genomik yaklaşımları ile yüksek DNA sekans analizi yöntemleri, genom yapısı üzerine geniş bilgi olanağı sunmaktadır. Dikotiledonlar için model bitki olan *Arabidopsis thaliana*'da ve monokotiledonlar için model bitki olan pirinçde, genomik DNA sekansı tamamlanmış durumdadır ancak genlerle ilişkili fonksiyonların birçoğu henüz bilinmemektedir. Aynı zamanda insan genomu üzerinde yapılan çalışmalar ile mutagenlerin DNA üzerindeki etkisi insan genetiğinden bitki genetiğine aktarılmaktadır (Lagoda 2005).

Birçok türde moleküler markörler aracılığıyla genetik karakterizasyon önem kazanmıştır. Moleküler markör sistemleri, genomik DNA sekansındaki varyasyonu belirleme esasına dayanmaktadır. Moleküler markörler; genellikle segregasyon analizlerinde, detaylı genetik haritaların oluşturulmasında, tarımsal özelliklerle ilişkili genlerde doğal veya uyarılmış mutant allellerin belirlenmesinde ve karakterizasyonunda etkin olarak kullanımı sağlamaktadır. Markörler, aynı zamanda kantitatif varyasyonlarla (bitki boyu, hastalıklara dayanım ve olgunluk gibi faktörler) ilişkili genlerin tanımlanmasında farklı türlerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Islah çalışmalarında seleksiyon aşamasında moleküler markörlerin kullanımı oldukça önem kazanmıştır. Moleküler markörler, önemli tarımsal özelliklerin genetik düzeyde açılımını belirlemek ve ıslah döngüsü boyunca istenilen özelliklerin biriktirilerek yeni nesillere aktarılmasında aracı teknik olarak kullanılmaktadır (Anonymous 2002).

Mutant bireylerin genetik tanımlanmasında son yıllarda farklı moleküler markör sistemlerinin kullanımı gelişmeye başlamıştır. Tarım biyoteknolojisinde, ilk olarak geliştirilen moleküler markörlerden en geleneksel olan ilk grup; RFLP “Restriction Fragment Length Polymorphism” ve RAPD “Random Amplified Polimorphic DNA” markörler, ikinci grup ise SSR “Simple Sequence Repeat” ve AFLP “Amplified Fragment Length Polimorphism” markörlerdir. 21.yüzyıl bitki ıslahçılarının geliştirmekte olduğu yeni markörlerle birlikte son yıllarda, karakterizasyon çalışmalarına hızla yeni moleküler markör grupları eklenmektedir. Bu kapsamda üçüncü grup markörler ise EST “Expressed Sequence Tag” ve SNP markörleri oluşturmaktadır. Çizelge 2.4’de yaygın olarak kullanılmakta olan moleküler markörlerin karşılaştırmalı olarak özellikleri sunulmuştur (Anonymous 2002, Jain and Swennen 2004).

Ayrıca son yıllarda geliştirilmiş bir teknik olan “TILLING (Targetting Induced Local Lesions in Genomes)” yöntemi, bitki türlerinde doğal ve uyarılmış varyasyonlarda, DNA polimorfizmlerini belirlemeye yönelik bir teknik olduğu belirtilmektedir. Hedef gende çok yüksek etkinlik düzeyi ile tek baz değişimli allel varyasyonlarını çok hızlı tespit edebildiği araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Gilchrist and Haughn 2005).

Mutant genlerin genetik karakterizasyonu yönünde FAO/IAEA-(Plant Breeding and Genetics) Bitki Islahı ve Genetiği bölümünün halen devam etmekte olan projeleri bulunmaktadır (Lagoda 2005).

Çizelge 2.4 Moleküler karakterizasyon çalışmalarında kullanılan markör teknikleri

Markör/teknik	PCR' a dayalı	Polimorfizm	Dominansi durumu
RFLP	X	düşük-orta	kodominant
RAPD	√	orta-yüksek	dominant
SSR	√	yüksek	kodominant
ISSR	√	yüksek	dominant
AFLP	√	yüksek	dominant
IRAP/REMAP	√	yüksek	kodominant
Protein-izoenzim	X	düşük	kodominant
STS-EST	√	yüksek	kodominant/dominant
SNP	√	oldukça yüksek	kodominant
SSCP	√	oldukça yüksek	kodominant
SCARS/CAPS	√	yüksek	kodominant

(Anonymous 2002, Jain and Swennen 2004)

Asmalarda klonal varyasyonların moleküler karakterizasyonu;

İyi özelliklere sahip mutant karakterlerin tanımlanmasında etkili hızlı seleksiyon yöntemlerinin kullanılması önem kazanmaktadır. Etkin bir seleksiyonun yapılabilmesi için, uygun ve hızlı seleksiyon yöntemlerine gereksinim duyulmasından dolayı moleküler markörler aracılığıyla polimorfizmin tanımlanması son yıllarda önem kazanmıştır (Maluszynski 2001).

Schneider *et al.* (1996) tarafından yapılan bir çalışmada, asmalarda protoplast kültürü ile geliştirilen somaklonal varyasyonların genetik tanımlanması yönünde “Seyval blanc” çeşidinde, RAPD tekniği ile başarılı olarak, oldukça küçük bir genetik değişimin olduğu ilk olarak bu araştırmada bildirilmiştir.

Vitis vinifera'da farklı araştırmacılar tarafından yürütülen birçok çalışmada, klonal düzeyde moleküler markörler yardımıyla genetik tanımlama çalışmaları sonucunda, bir grup araştırmacı klonal düzeyde RAPD ve SSR markörler ile tanımlama yönünde başarısız sonuçlar elde ederken (Gogorcena *et al.* 1993; Vignani *et al.* 1996, Cervera *et al.* 1998, Ye *et al.* 1998, Dangl *et al.* 2001) diğer bir grup araştırmacı ise RAPD ve SSR markörler

ile başarılı sonuçlar elde edildiğini belirtmişlerdir (Schneider *et al.* 1996, Regner *et al.* 2000 b, Scott *et al.* 2001)

Klonal varyasyonların tanımlanması yönünde son yıllarda çeşitli araştırmacılar tarafından yapılan araştırmalar sonucunda, SSR markörlerle genetik analizi oldukça güç olmakla beraber genomda daha büyük alanların analizi ile mutasyona uğrayan klonların tanımlanma şansının arttığı belirtilmektedir. Bu kapsamda, son yıllarda araştırmacılar, değişken ve yoğun bant oluşumundan dolayı daha az güven vermesine rağmen, yüksek oranda tekrar edilir olma özelliğinin yanı sıra genotipler arası akrabalık ilişkisinin belirlenmesinde oldukça uygun bir teknik olan AFLP markörlerle analiz yaklaşımının klonal varyasyonun tanımlanabilmesine yardımcı bir teknik olduğunu belirtmişlerdir (Cervera *et al.* 1998, Scott *et al.* 2001, Fanizza *et al.* 2003).

Vitis vinifera'da somatik mutantların ebeveynlerinden farklılıklarının tanımlanması yönünde yapılan ilk çalışmada, Flame Seedless üzüm çeşidinin erkenci özellikte somatik mutantının genetik karakterizasyonunda AFLP markörlerin etkinliğinin araştırıldığı çalışmada; 64 primer kombinasyonundan iki tanesinde polimorfizm elde edilmiş ve Flame Seedless klonlarında erkencilik yönünde tanımlama çalışmalarında başarı ile kullanılabileceği belirtilmiştir (Scott *et al.* 2001).

Scott *et al.* (2001) tarafından yapılan çalışmadan farklı olarak zıt bulguların elde edildiği Fanizza *et al.* (2003) tarafından yürütülen araştırmada ise, klon seleksiyonu çalışmaları sonucu seçilen tipik morfolojik farklılıklara sahip İtalya üzüm çeşidinin somatik mutantları olan üç çeşit, Bicchieri (Red Italia), La notte (Elongate Italia) ve Dipinto (Early Italia) arasında farklılıkların belirlenmesinde AFLP markörlerin etkinliği araştırılmıştır. 49 primer kombinasyonundan 3880 AFLP bandı elde edilmiş ancak hiç birisinde polimorfizm gözlenememiştir. Çok nadiren polimorfik bantlar gözlenmiş ancak tekrar edilir olmadığını belirtmişlerdir. Mutasyonun genom içerisinde oldukça küçük bir alanda meydana gelmiş olabileceğini ve dolayısı ile AFLP ve diğer tekniklerle tanımlamanın mümkün olamayacağını belirtmişlerdir.

Bellin *et al.* (2001), Pinot klonlarında AFLP markörler ile genetik polimorfizmin belirlenmesinin amaçlandığı çalışmada; klonların ayırımında AFLP'nin daha az etkili yöntem olduğunu bildirmişler ve burada etkili olan faktörün gözlenen fenotipik farklılığın genomda küçük bir bölgeyi etkilemesinden kaynaklanabileceğini belirtmişlerdir. Ayrıca klonların karakterizasyonu ve genetik olarak tanımlanmasında daha hızlı ve etkili bir yöntem olan SCAR markörlerin geliştirilmesinin etkili bir yaklaşım olacağını belirtmişlerdir.

Imazio *et al.* (2002) tarafından yapılan bir araştırmada; Traminer üzüm çeşidine ait 24 klonda 3 farklı yaklaşım (SSR, AFLP ve MSAP (methyl sensitive amplified polymorphism)) ile genetik karakterizasyon çalışmaları yürütülmüştür. Sonuçta SSR markörlerin asma klonları arasında genetik farklılıkların belirlenmesinde güçlü bir ayırım vermediğini buna karşın AFLP ile karakterizasyonda başarılı sonuçlara ulaşıldığını bildirmişlerdir. Çalışma sonuçları değerlendirildiğinde, klonlar arası morfolojik farklılıkların oluşmasında genetik ve epigenetik değişimlerin birlikte etkisinin söz konusu olduğunu ve klonal tanımlamada AFLP ve MSAP moleküler tekniklerin en iyi yaklaşım olabileceğini vurgulamışlardır.

Birçok stabil SSR markörler kodlanmayan bölgede bulunmakta ve fenotiple ilişkilendirilmesi oldukça güçtür. Bu nedenle SSR markörler öncelikli olarak çeşit tanımlamada etkin olmasına karşın mutantların tanımlanmasında başarılı değildir. Ancak sadece EST ya da cDNA verilerinden geliştirilen SSR markerlar fenotiple ilişkilendirilebilmektedir. Çünkü bu primerler, gen ekspresyonunun gerçekleştiği bölgeden geliştirilmiştir (Borrego *et al.* 2002).

Yapılan çok yeni bir çalışmada yüksek düzeyde polimorfik özellik gösteren EST kökenli, VRG mikrosatelitler ile Pinot noir klonlarında polimorfizm başarılı olarak ortaya koyulmuştur. Pinot noir klonları arasındaki farklılık 13 tane VRG SSR primeri ile tanımlanmıştır. Kimerik mutantlar 3 allel oluşumu göstermişlerdir (Regner *et al.* 2006)

Araştırıcılar tarafından klonal değişimlerin karakterizasyonu konusunda elde edilen bu farklı bulgular değişik sebeplere dayanmaktadır. Başlıca sebeplerden birisi klonların oluşum orjinin bilinmeyişi, budama ve çoğaltma ile mutantların izolasyonu ile korunarak çoğaltımı yapılmadığından klonal farklılıklar oluşmaktadır. Bu farklı bulgular ayrıca; farklı primer kombinasyonlarına, farklı markörlere ve üzerinde çalışılan farklı çeşitlerden kaynaklı olmaktadır (Fanizza *et al.* 2003).

Asmalarda kimerik varyasyonların moleküler karakterizasyonu;

Uzun yıllar vejetatif çoğaltılan *Vitis vinifera* L. türünde; yüksek heterozigotik yapıya ve genomunun yüksek kromozom sayısına sahip olması ($2n=2x=38$) nedeniyle, uzun yıllar içerisinde kimeralar oluşabilmektedir (Riaz *et al.* 2002, Zulini *et al.* 2005). Daha önce araştırıcılar tarafından kimerismin önemi gösterilmiş olmasına rağmen asmada bu olayın önemi henüz bilinmemektedir.

Asmalarda görülen bu kimerik durum; yüksek oranda kimerik yapıların oluşumu nedeniyle daha çok Pinot grubu çeşitlerde olmak üzere diğer çeşitler üzerinde de, moleküler markörler aracılığıyla araştırıcılar tarafından incelenmiştir (Verdisson *et al.* 1999, Regner *et al.* 2000 a, Franks *et al.* 2002, Riaz *et al.* 2002, Hocquigny *et al.* 2004, Zulini *et al.* 2005).

Asmalarda kimerismin belirlenebilmesi yönünde, RAPD tekniğinin kullanılabilirliğini gösteren ilk çalışmada; adventif tomurcuklar kimerik yapının ortaya çıkışında aday konumunda olduğu belirtilmiş ve adventif tomurcukların kimerik karakter taşıması yönündeki bu hipotezi doğrulamak amacıyla RAPD analizi ile moleküler düzeyde iki üzüm çeşidi, Chardonnay ve Pinot noir üzüm çeşitlerinde çalışılmıştır. A12 ve C06 isimli iki RAPD primerinin, adventif sürgünlerde kimerismi belirleme yönünde etkili olduğunu bildirmişlerdir (Verdisson *et al.* 1999).

Son yıllarda Franks *et al.* (2002) ve Riaz *et al.* (2002), çeşit içerisinde bazı kimerik klonları SSR markörler ile tanımlayabilmişler, ancak tüm klonlarda başarılı olamamışlardır. Bu alanda Riaz *et al.* (2002) tarafından yapılan bir araştırmada Pinot

noir ve Chardonnay klonları içerisinde 100 SSR lokusunun taranması ile farklılıklar tespit etmişlerdir.

Franks *et al.* (2002), iki SSR lokusunda üç allel oluşumu gösteren “Pinot Meunier” ve “Primitivo di Gioia” çeşitlerinde L1 ve L2 hücre tabakalarını izole edilip ayrı ayrı genetik analizi yapıldığında her iki tabaka için iki allel oluşumu gözlenmiş dolayısı ile üçüncü allel oluşumu her iki tabakadaki ortak kimerik yapıya neden olan allel olduğu belirlenmiştir.

Pinot grubuna giren çeşitlerde yüksek oranda agronomik ve ampelografik varyasyon gözlenmektedir. Bu nedenle çok büyük oranda çeşit ve klon zenginliğine sahiptir. Oluşan bu varyasyonların kaynağını kimerik yapılar oluşturmakta ve bu nedenlerle Pinot grubu, üzerinde çeşit içi karakterizasyon çalışmak için oldukça iyi bir aday olmaktadır (Hocquingny *et al.* 2004).

Hocquingny *et al.* (2004), yapmış oldukları çalışmada INRA (Colmar/Fransa) Enstitüsünde bulunan Pinot çeşidine ait 145 klon üzerinde çalışılarak, 50 mikrosatelit lokus taranmış ve Pinot gris’e ait PG52 klonunda renkli tane sektörüne sahip bölgelerde iki mikrosatelit lokusu (VVS2 ve VVMD32) tarandığında, üç allel oluşumu gözlenmiştir. Araştırmacılar, üç allelli genotiplerin, genetik olarak farklı iki hücre tabakasından oluşan periklinal kimeraları tanımlayabildiğini vurgulamışlardır. Ayrıca araştırmada, melezlerdeki Mendel segregasyonu incelendiğinde, L2 hücre tabakası tarafından beyaz tane rengi fenotipik özelliği eksprese olurken, L1 hücre tabakası renkli özelliğe sahip fenotipten sorumlu olduğu ve eşeysel çoğaltım ile transforme olmadığını göstermiştir.

Kuzeydoğu İtalya çeşitlerinden “Picolit” klonlarında, genetik varyasyonun belirlenmesinin amaçlandığı bir araştırmada, uzun yıllar vejetatif çoğaltılmış klonlarda SSR ve AFLP markörlerle genetik analiz çalışmaları sonucunda belirgin bir somatik stabilitenin oluştuğunu ancak az oranda da olsa kalıcı mutasyonların ve kimeraların oluşabileceğini vurgulamışlardır. Üzerinde çalıştıkları Picolit çeşidine ait iki klonda, kimerik yapının SSR markörlerle genetik analizi sonucunda, üç allel oluşumu ile tanımlanmıştır (Zulini *et al.* 2005).

2.3.2.1 SSCP markörler aracılığıyla mutasyonların tanımlanması

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

Farklı türlerde, baz sekansında varyasyonlarını incelemek ve iki türün aynı gen bakımından farklı versiyonlara sahip olup olmadığını belirlemek amacıyla; ilgili genin sekans analizi, ya da SSCP tekniği kullanılabilir. Tek iplikçikli DNA fragmentlerinin elektroforetik ortamda hareketliliğine dayanan SSCP, SNP'lerin belirlenmesinde en kolay yöntemdir (Orita *et al.* 1989, Dean *et al.* 1990, Jaeckel *et al.* 1998, Sunnucks *et al.* 2000, Kuhn *et al.* 2005).

SNP'ler, yeni generasyon markörleri olup, genom içerisinde oldukça zengin olması nedeniyle diğer markör grubu içerisinde en ilgi çeken grubu oluşturmaktadır (Kuhn *et al.* 2005). En yeni tahminlere göre, insan genomunda bir SNP ortalama 1000 bp'de oluştuğundan, şimdiye kadar bilinen en zengin markörlerdir. Özellikle insan SNP haritalarının çıkarılmasına yönelik oldukça yoğun çalışmalar bulunmaktadır. Son yıllarda SNP'ler, aynı zamanda bitki moleküler biyolojisi çalışanlarının da dikkatini çekmektedir. Bitki genomunda kodlanan bölgede oluşma oranı, dağılımı ve frekansı bakımından özellikle tür içi sekans varyasyonunu belirlemede ilgi çekici markör grubunu oluşturmaktadır. SNP'ye dayalı markörler, genom içerisinde oluşum oranının yüksek olması nedeniyle doymuş genetik haritaların oluşturulmasında, EST haritalarının oluşturulmasında, populasyonda allel frekansının belirlenmesinde, birden fazla lokus

tarafından kontrol edilen fenotipik özelliklerin genetik ilişkilerinin ortaya koyulmasında, genetik karakterizasyon ve hastalıklara dayanım taramalarında son yıllarda kullanılmaktadır (Kuhn *et al.* 2005).

Gelecekte birçok bitki türünde SNP haritalarının hazırlanabileceği ve yoğun olarak kullanılabileceği ümit edilmektedir. Bitkilerde, SNP'lerin insan genomundan daha zengin olduğu görülmektedir. Bu nedenle, başlangıç çalışmaları, buğday (1 SNP her 20 bp'da) ve mısır (1 SNP her 70 bp'da) genomunda yapılmıştır (Lörz and Wenzel 2004). *Vitis vinifera*'da SNP'lerin tanımlanmasında SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) tekniğinin oldukça etkin olduğunu vurgulayan çok yeni bir çalışmada 78 bp'da 1 SNP oluştuğu belirtilmektedir (Salmaso *et al.* 2005).

SNP'lerin tanımlanmasında kullanılan metotlardan birisi, genomik sekansdan sentezlenmiş lokus spesifik primerler aracılığıyla, farklı bireylerden DNA örnekleri kullanılarak PCR amplifikasyonu ve SNP'lerin keşfi amacıyla, PCR ürününün sekans analizi yapılmaktadır.

SSCP tekniği orijinal olarak mutasyonların hızlı analizi için geliştirilmiştir (Orita *et al.* 1989, Hayashi 1991, Hayashi 1992). Mutasyonların tanımlanmasında; "SSCP (single strand conformation polymorphism)" markörler oldukça hassas ve doğru sonuçlar vermesi nedeniyle avantaj sağlamaktadır. DNA sekans verilerinin belirlenmesinden önce, sekans varyasyonlarının tespit edilmesine yönelik teknikler daha ucuz ve daha hızlı yöntemlerdir. Mutasyon tarama tekniği olarak, SSCP analizi daha çok tek lokus polimorfizminin analizinde daha yaygın olarak kullanılmaktadır.

SSCP markörler; DNA polimorfizmi, DNA fragmentinde değişik yerlerdeki mutasyonları ve sekans varyasyonlarının tanımlanmasına yönelik, ilk olarak Orita *et al.* (1989) tarafından bildirilmiştir. Genetik varyasyonun belirlenmesinde, laboratuvar koşullarında uygulama kolaylığı sağlaması, ekonomik olması ve hassas bir yöntem olması SSCP markörlerin önemli avantajlarını oluşturmaktadır (Sunnucks *et al.* 2000).

Prensip olarak bu metot, nükleik asitlerin sahip olduğu büyüklük ve şekle bağlı olarak poliakrilamid jelde elektroforetik hareketliliğine dayanmaktadır. Temel protokol olarak; hedef genomik DNA'nın PCR aracılığıyla amplifikasyonu gerçekleştirilmektedir. PCR ürünü, denaturasyon sonucu tek iplikçikli yapıya dönüştürülür ve poliakrilamid jel elektroforeze tabi tutulur. Jel üzerinde, ana tipten farklı bant deseni veren örnek, mutasyonun bulunduğu belirtmektedir. Bant desenlerinde, eğer birey homozigot ise iki bant oluşumu, heterozigot ise dört bant oluşumu gerçekleşmektedir. Belirli bir uzunlukta verilen çift iplikçikli DNA'nın jel elektroforezde hareketliliği, nükleotit sekansından bağımsızdır. Buna karşın tek iplikçikli DNA'nın hareketliliği; nükleotit sekansındaki küçük değişimler sonucu değişim gösterebilir.

DNA fragmenti, sekans değişimi sonucu poliakrilamid jelde ya da otomatik dizi analiz cihazında incelenirse sahip olduğu sekans düzenine göre hareket eder. Eğer örnekler farklı yer alır ise sahip oldukları DNA'nın farklılığından kaynaklı olduğu kesinlikle söylenebilir. Bu durum "polimorfizm" olarak adlandırılmakta ve bize incelemiş olduğumuz grubun genetik yapısı hakkında bilgi vermektedir. Büyük bir popülasyonu, sahip olduğu gen sekansı bakımından incelemek istediğimizde, öncelikle SSCP tekniğini kullanarak aynı versiyondaki grupları inceleyebiliriz. Eğer birbirine benzer ve farklı yapıya sahip grupları bilirsek her kopyadan bir tanesini sekans analizinde kullanabiliriz. Bu da aynı forma sahip bir çok genin sekans analizine gerek kalmaksızın ayırt edilmesine olanak sağlamaktadır. Bir çok SSCP protokolü, tek lokusda polimorfizm analizine yöneliktir. Spesifik DNA primerleri ile, bireylere ait hedef DNA'larda analiz yapılır. SSCP markörler, SSR ve RFLP gibi kodominant markörlerdir.

SNP analizleri için birkaç teknik geliştirilmiş olmasına rağmen, en önemlisi bir çoğunun, mutasyonun pozisyonu ile ilgili bilgiye gereksinim duyulmasıdır (Neff *et al.* 1998, Drenkard *et al.* 2000).

SNP pozisyonunun belirlenebilmesi için, büyük genlerde zor olan nükleotit sekans analizinin yapılması gerekmektedir. SNP'nin tanımlanmasında, SSCP markör tekniğinin başarısı üzerine etkili en önemli iki faktör; SNP'nin pozisyonu ve DNA fragmentinin

büyüklüğüdür (Sato and Nishio 2003). SSCP ile varyant fragmentler belirlendikten sonra, mutasyonun şekli ve pozisyonunun belirlenmesi için spesifik DNA sekansında, SNP profili belirlenmektedir (Martin Lopes *et al.* 2001).

SSCP analizleri bugün mutasyonları tanımlama üzerine birçok laboratuvarında, yöntemde modifikasyonlarla birlikte yaygın olarak kullanılmaktadır. Farklı laboratuvarların kendi çalışmaları doğrultusunda geliştirdikleri değişik SSCP metotları bulunmaktadır. Farklı SSCP koşullarının özeti ilk olarak Hayashi (1991) tarafından yayınlanmıştır.

SSCP orijinal olarak, radyoaktif nükleotit kullanılarak geliştirilmiş bir yöntem olup, oldukça kompleks ve her zaman tekrar edilebilir sonuçlar vermediğinden, radyoaktif gereksinimi olmayan, sıcaklık kontrollü elektroforetik üniteler ve standart mini jel sistemi ile tekniğin modifikasyonu sonucu uygulama kolaylığı ve tekrar edilir nitelikte sonuçlara ulaşmada başarı artmıştır (Orita *et al.* 1989, Hayashi and Yandell 1993, Markoff *et al.* 1997, Hennesy *et al.* 1998).

Mutasyon tanımlama yönünde SSCP markör tekniği, oldukça uygun bir yöntem olup, başarı % 70-95'e kadar ulaşabilmektedir. SSCP analizinde, başarı ve hassasiyeti etkileyen faktörler bulunmaktadır. Bunlar; a) jel bileşimi, b) DNA fragment büyüklüğü, c) tampon bileşimi ve pH d) elektroforez boyunca sıcaklık e) DNA konsantrasyonu f) DNA fragmentinin G+C konsantrasyonudur (Hongyo *et al.* 1993, Jaekel *et al.* 1998, Nataraj *et al.* 1999, Sunnucks *et al.* 2000). Bu faktörlerden herhangi birindeki değişim, DNA fragmentinde nükleotit düzeyinde değişimin tanımlanmasında etkinliği azaltıcı ya da artırıcı rol oynamaktadır. Belirtilen faktörlere ilişkin detaylı açıklamalar aşağıda verilmiştir.

a) Jel bileşimi

SSCP analizinde hassasiyet ve başarı, kullanılan jel tipine bağlıdır. Optimum jel tipi, küçük gözeneklere sahip olması nedeniyle DNA iplikçiklerinde, varyasyonların ideal olarak belirlenmesinde etkin olan, poliakrilamid türevi olanlardır. Ravnik *et al.* (1994) tarafından yapılan bir çalışmada, "Mutation Detection Enhancement (MDE TM)"

jel (FMC Bioproducts, Rockland, ME) ile mutasyon belirleme oranı, % 95 düzeyinde başarılı olmuştur. Son yıllarda yapılan birçok SSCP analizinde standart akrilamid formülasyonuna göre MDE jel kullanılmaktadır (Nataraj *et al.* 1999).

Orita *et al.* (1989), tarafından yapılan çalışmada, standart poliakrilamide göre ayırında daha etkili olan MDE jelin kullanımı ile, daha büyük DNA fragmentlerinde de başarılı sonuçlara ulaşılabildiğini belirtmişlerdir. Ayrıca MDE-SSCP profillerinin belirlenmesinde SSCP yöntemi, SNP tanımlama yönünde en etkili ve basit aracı bir yöntem olduğunu da vurgulamışlardır (Martin Lopes *et al.* 2001).

Aynı zamanda araştırmacılar DNA iplikçisindeki varyasyonu belirlemede, nötral bileşimlerin ilave edilmesiyle jelin etkinliğinin artacağını belirtmişlerdir. Buna göre; nötral bileşiklerden, %10-15 konsantrasyonlarında sakkaroz ve gliserin ile düşük konsantrasyonlarda ilavesi ana bireyden farklı mutasyonların belirlenmesinde etkinliği arttırmaktadır (Nataraj *et al.* 1999). Daha büyük DNA fragmentinin analizinde; elektroforez koşulları ve SSCP jeline gliserin ilavesi, genellikle analizin hassasiyetini geliştirmektedir. Ayrıca gliserin ilave edilmesi, ortamın pH'nı düşüren etkiye sahip olacağından yani asidik bir yapı kazandıracağından, yoğun elektrostatik gücü azaltarak mutant fragmentlerin hareketliliğini arttırmaktadır (Orita *et al.* 1989, Hayashi 1991, Nataraj *et al.* 1999).

b) DNA fragment büyüklüğü

PCR-SSCP analizinde hassasiyet, fragment büyüklüğünün azalması ile ilişkilidir. Fragment büyüklüğü için optimal sonuçların 150-200 bp aralığında sağlandığı belirtilmiştir (Nataraj *et al.* 1999, Wagner 2002). Yaklaşık 200 bp uzunluğundaki fragmentler için başarı, % 90'ın üzerinde olabilmekte ve tek baz değişimleri bile belirlenebilmektedir (Hayashi 1991, Jaeckel *et al.* 1998, Sunnucks *et al.* 2000). 800 bp uzunluğuna kadar mutasyonlar belirlenebilmesine rağmen, hassasiyet o kadar yüksek olamamaktadır. PCR ürünü, SSCP analizinden önce mutlaka kontrol edilmelidir (Orita *et al.* 1989, Hayashi and Yandell 1993, Markoff *et al.* 1997, Hennesy *et al.* 1998, Nataraj *et al.* 1999).

c) Tampon bileşimi ve pH

Araştırmacılar, düşük pH oranına sahip jel ve bufferı, SSCP analizi yapılacak DNA fragment uzunluğunda yaklaşık 800bp'e kadar etkinliği belirgin bir şekilde arttırdığını belirtmişlerdir. Bununla birlikte, düşük pH ile beraber yüksek tuz konsantrasyonları nükleik asit fosfatbağları arasındaki elektrostatik gücün kırılmasında oldukça etkin bir ortam oluşturmaktadır. Böylelikle tek iplikçikli DNA fragmentinin belirgin konformasyonları gerçekleşmektedir (Nataraj *et al.* 1999).

d) Elektroforez boyunca sıcaklık

Elektroforez için en uygun koşul, % 5-10 gliserin içeren ortamda, oda sıcaklığında 20-25 °C'de, ya da gliserin içermeyen elektroforetik koşulda 4 °C olduğu belirtilmiştir (Hayashi 1991, Hongyo 1993).

e) DNA konsantrasyonu

Jel üzerinde DNA örneğinin hareketliliği konusunda en önemli faktörü, moleküler ağırlığından çok DNA yapısı oluşturmaktadır. SSCP analizinde, 10-100 ng amplifiye edilmiş DNA örneği kullanılmaktadır. Bir nükleotit değişimi, DNA'nın elektroforetik hareketliliğini etkilemekte ve farklı bant deseni oluşturmaktadır (Hongyo *et al.* 1993, Sunnucks *et al.* 2000).

f) DNA fragmentinin G+C konsantrasyonu

Çalışmalarda, ilgili DNA fragmentindeki G+C konsantrasyonunun da DNA iplikçiliğinin hareketliliğini etkilediği belirtilmektedir. Pürin konsantrasyonunun yüksek olması, DNA fragmentinin hareketliliği üzerine oldukça önemli etkide bulunmaktadır.

2.3.2.2 SSCP markörlerin kullanım alanları

SSCP markörler özellikle, insan genetiği çalışmalarında, genlerde oluşan mutasyonları belirlemeye yönelik, tıpta hastalıkların tanı ve teşhisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Hayashi 1991, Sunnucks *et al.* 2000, Makino *et al.* 2000, Lacerda *et al.* 2005).

Bu teknik aynı zamanda; yüksek düzeyde ilişkili olan iki gen arasındaki ekspresyon ürününün karakterizasyonunda (Hedley *et al.* 1994), gen familyası içerisinde yer alan genler arasındaki farklılığın analizinde (Hagiwara *et al.* 1998, Slabough *et al.* 1997) ve gen haritalama çalışmalarında (Slabough *et al.* 1997, Phillips and Vasil 2001, Xie *et al.* 2002) kullanılmaktadır.

İnsan genetiği konusunda kullanım alanları

Tıpta hastalıkların teşhisinde özellikle kanser türlerinde, mutasyonun tespitinde SSCP, son yıllarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Son yıllarda özellikle göğüs kanseri, beyin kanseri gibi pek çok kanser türleri ile ilişkili olan birçok gen üzerinde yoğun olarak çalışmalar sürdürülmektedir. Önemli hastalıklardan anemi, yüksek kolesterol, diabet ve kalp rahatsızlıkları ile ilgili genlerde mutasyonların tanımlanması üzerine çalışmalar bulunmaktadır (Bunn *et al.* 2002, Sözen *et al.* 2005).

Kanserle ilgili genetik mutasyonların tanımlanmasında PCR'a dayalı teknolojiler hassas belirleme yöntemleridir. İnsanda tümör oluşumu ile ilişkili olan p53 geni üzerinde yapılmış birçok çalışma bulunmaktadır. Kanser hastalarında, p53 geni mutasyonlarının SSCP tekniği ile tanımlanması mümkündür. Normal ve öldürücü hücrelerin bir arada bulunduğu örneklerde moleküler yöntemlerle hastalıkların teşhisi yapılabilmektedir. Özellikle Çin ve Japon araştırmacılar bu konuda yoğun olarak çalışmaktadır. Kanserle ilişkili olarak, sadece bu gen üzerine 1000'den fazla çalışma bulunmaktadır (Philips *et al.* 2000, Bunn *et al.* 2002, Sozen *et al.* 2005, Lacerda *et al.* 2005).

Tıpta hastalıkların teşhisine yönelik yapılan çalışmalardan; Türk hastalarında, kalıtsal hiperkolesterolün moleküler tanımlanması yönünde yapılan çok yeni bir araştırma örnek

olarak verilebilir. LDLR “Low Density Lipoprotein Receptor”, isimli gende mutasyon sonucu kalıtsal hiperkolestrol hastalığının oluştuğu bilinmektedir. 36 tane hastada LDLR geninde mutasyonu izlemek amaçlı test analizleri yapılmıştır. Exon-intron mutasyonları, fluorescent SSCP (F-SSCP) ile analiz edilmiştir. Mutasyon tanımlamada F-SSCP tekniğinin etkinliği araştırılmış ve mutant bölgelerin tanımlanmasında başarılı sonuçlar elde edildiği belirtilmiştir (Bunn *et al.* 2002, Sozen *et al.* 2005).

Bitki genetiğinde kullanım alanları

SSCP markörlerin bitki genetiğinde kullanımı ile ilgili olarak son yıllarda oldukça sınırlı bitki türlerinde çalışmalar bulunmaktadır (Plomioni *et al.* 1999, Wang *et al.* 2001, Xie *et al.* 2002, Sato and Nishio 2003, Kajiwara *et al.* 2005).

Genom haritalama çalışmalarının ardından, bitki genom çalışmalarında gelecek en önemli adım; bir türe ait bir çok gen familyasında nükleotit sekans varyasyonunun analizinin yapılabilmesi ve buna bağlı olarak fenotipik varyasyon ve nükleotit sekans dizilişindeki farklılıklar arasındaki ilişkinin ortaya çıkarılabilmesidir. Bu nedenle SNP analizi, genlerin fonksiyonunun belirlenmesi üzerine oldukça önem kazanacaktır (Sato and Nishio 2003). Tarımsal öneme sahip genlerle ilgili olarak, bilgilerin edinilmesi hızla artan öneme sahip olacak ve SNP analizi ile bu genler, bitki ıslah programında ilişkilendirilebilecektir.

SSCP yönteminin kullanımı konusunda bitkilerde yapılan çalışmalar oldukça sınırlı olmakla birlikte, *Vitis vinifera*'da virüslerin moleküler tanımlanmasında (Goszcynski and Jooste 2002, Jooste and Goszcynski 2005) ve genom haritalama çalışmalarında (Salmaso *et al.* 2004, Troggio *et al.* 2006) kullanılmaktadır.

Bitkilerde yapılmış çalışmalara bir örnek olarak buğdayda yapılmış bir çalışmada, gf-2.8 geni mutasyonları SSCP analizleri ile tanımlanmıştır. Buğdayda, gf 2.8 geni, tuza toleransla ilişkili olan gen olarak bilinmektedir. Primerler, tuza tolerant mutantda, gf-2.8 geni kodlanan bölgesinden dizayn edilmiştir. Tüm materyallerde yaklaşık 685 bp DNA fragmenti, agaroz jel elektroforezde amplifikasyona tabi tutulmuştur. SSCP ve sekans analizi kombinasyonlu yürütülen çalışmada, mutasyon taramaları SSCP analizi ile

yürütülmüştür. Mutasyonun pozisyonu ve şekli de sekans analizleri ile ortaya koyulmuştur (Wang *et al.* 2001).

Bitkilerde yapılan çalışmalara bir diğer örnek, henüz genom haritalaması tamamlanmış olan pirinçde yapılmış bir çalışmada; Waxy geni mutasyonlarının tanımlanması, CAPs “Cleaved Amplified Polimorphism” ve SSCP markörler ile kombine analizlerle gerçekleştirilmiştir. DNA polimorfizminin analizinde oldukça başarılı sonuçlara ulaşılmıştır. Mutasyon taramalarında, aminoasit değişimleri ile sonuçlanan mutasyonlar, eksonlarda nükleotit değişimleri olarak gerçekleştiği belirtilmiştir. Araştırma sonuçlarında, SSCP'nin geniş bitki genlerinde nokta mutasyonlarının tanımlanmasında oldukça yararlı bir teknik olduğunu ortaya koymuşlardır (Sato and Nishio 2003).

Pirinçde yapılan bir diğer çalışmada, RuBisCO/LS “Ribuloz Bisfofat Carboxylaseoxygenase Large Subunit” gen mutasyonları SSCP analizi ile tanımlanmıştır RuBisCO/LS, fotosentezden sorumlu anahtar enzimdir. Bu çalışmada, mutant çeşitler arasındaki farklılıklar, mutant gen analizleri, SSCP ve nükleotit sekans analizi ile tanımlanmıştır. DNA sekans analizi ile bu gende mutasyonlar; eklenme ve kayıplar şeklinde nükleotit değişimleri olarak tanımlanmıştır. Kodlanmayan bölgede gözlenen bu mutasyonlar, RuBisCO/LS gen ürününün azalması sonucu mutant pirinç hattında gözlenmiştir. Bunun sonucu olarak da, mutant hatlarda renk açılmaları gerçekleşerek sarı renk yaprak oluşumu görülmüştür (Kajiwara *et al.* 2005).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

“Sultani Çekirdeksiz ve Kalecik Karası Üzüm Çeşitlerinde Uyarılmış Mutasyon Etkilerinin Sitolojik ve Moleküler Tanımlanması” isimli bu çalışma, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü’nde 2002-2006 yılları arasında yürütülmüştür. Tez çalışması ‘Yerli Üzüm Çeşitlerinin Mutasyon Islahı İle Geliştirilmesi’ konulu projenin bir alt bölümünü oluşturmaktadır.

Çalışma, TÜBİTAK (TOGTAG-3091) tarafından desteklenmiş, ayrıca konu ile ilgili olarak TÜBİTAK ve İtalya Hükümeti burslarının kazanılması sonucunda, moleküler tanımlama çalışmaları, 2004-2005 yılları arasında, San Michele Tarım Enstitüsü’nde (Istituto Agrario San Michele All Adige, IASMA (Trento-Italia)) yürütülmüştür.

Tez çalışmasının aşamalarına göre kullanılan materyaller ve izlenen yöntemlere ilişkin bilgiler aşağıda sunulmuştur.

3.1 Işın Uygulamaları

Sultani Çekirdeksiz ve Kalecik karası üzüm çeşitlerinde populasyon içerisinde varyasyonu arttırmak amacıyla gama radyasyonu uygulanmıştır. Bu amaçla araştırma materyalleri, Türkiye Atom Enerjisi Kurumu (TAEK), Sarayköy Nükleer Araştırma ve Eğitim Merkezi’nde bulunan Co⁶⁰ gama kaynağında ışınlanmıştır.

Gama radyasyonu uygulamalarında beş farklı doz (20, 25, 30, 40 ve 45 Gray) kullanılmıştır. Her radyasyon dozu için 100 adet olmak üzere, iki çeşitte toplam 1000 adet tek gözlü çelik ışınlanmıştır.

3.2 Mutant Koleksiyon Parselinin Kurulması

Işınlanmış tek gözlü çelikler 99R anacı üzerine aşıl原因 olarak tüplü fidanlar elde edilmiştir. Sera koşullarında gelişmesini tamamlayan fidanlar, 0.5 m x 1.0 m dikim aralığı ile bağa aktarılmıştır. Mutant koleksiyon parseli 2002 yılında, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Araştırma ve Uygulama Bağı'nda kurulmuştur.

Gama radyasyonu uygulamalarının ardından çevresel ve radyasyon etkisinin oluşturduğu fizyolojik zararlanma nedeni ile ortaya çıkan kayıplar sonucu araştırma parseline dikilen ve başlangıç popülasyonunu oluşturan toplam birey sayısı Sultani Çekirdeksiz için 207 adet, Kalecik karası için 315 adet olup, ışınlama dozlarına göre birey sayısının dağılımı Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Tez çalışması kapsamında, her iki çeşide ait 10'ar adet kontrol bitkisi araştırma parselinde yer almıştır. Kontrol bitkileri, karşılaştırmalı olarak incelenmek üzere mutagen uygulanmamış bireyleri ifade etmektedir.

Sultani Çekirdeksiz çeşidine ait proje parselinde yer alan SÇ 50 Gy 3 numaralı aday birey, çekirdeklilik özelliği göstermesi nedeniyle sitolojik ve genetik tanımlama çalışmalarında kullanılmak üzere tez çalışmasında yer almıştır.

Çizelge 3.1 Mutant koleksiyon parseline dikilen aday bireylerin çeşitlere ve dozlara göre sayısı

Doz	Sultani Çekirdeksiz (adet)	Kalecik karası (adet)
20 Gy	63	83
25 Gy	66	79
30 Gy	46	54
40 Gy	20	49
45 Gy	2	40
Kontrol	10	10
Toplam	207	315
Genel Toplam	522	

3.3 Fenotipik Değişimlerin Belirlenmesi

Mutant koleksiyon parseline aktarılan bitkilerde, ışınlamayı izleyen birinci (M1V1-2002 yılı), ikinci (M1V2-2003 yılı) ve üçüncü vejetasyon (M1V3-2004 yılı) dönemlerinde, toprak üstü organlarında çıplak gözle görülebilen bazı vejetatif özellikler dikkate alınmış ve kontrol bitkileri ile karşılaştırmalı olarak morfolojik değişimler incelenmişlerdir.

Buna göre Sultani Çekirdeksiz ve Kalecik karası aday bitkilerinde, vejetatif özellikler dikkate alınarak, genel gelişme durumu, sürgün ve göz yapısı, sülük yapısı ve yaprak yapısı bakımından bütün bireyler gözlenerek bitkilere ait kimlik bilgileri çıkarılarak fenotipik değişimler incelenmiştir.

3.4 Sitolojik Tanımlama Çalışmaları

Fenotipik gözlem sonuçlarına göre, kontrol bitkilerinden farklı bulunan ve iki yıl (M1V1-2002 ve M1V2-2003) tekrar eden özellikleri gösteren bireyler sitolojik tanımlama çalışmaları için seçilmişlerdir. Sultani Çekirdeksiz’de 26 adet, Kalecik karası’nda 18 adet birey seçilerek, gama radyasyonunun kromozom sayısı bakımından oluşturabileceği etkiler sitolojik olarak incelenmiştir. Çizelge 3.2-3.3’de her iki çeşitte üzerinde çalışılan bireyler ve fenotipik farklılıklarına ait kısa bilgiler sunulmuştur.

Sitolojik incelemelerde kromozom sayısı incelenmiştir. *Vitis vinifera* kromozomları oldukça küçük yapılı olmalarının yanı sıra, hücre içerisindeki diploid sayının yüksek olması ($2n=38$) nedeniyle mikroskopik incelenmeleri oldukça sorunludur. Bu çalışmada kromozomlar, meristematik kök ucu hücrelerinde metafaz safhasında incelenmiştir. Uygun kök örneklerinin elde edilmesi ve örneklerle uygun sitolojik metotların belirlenebilmesi için ön denemeler yapılmıştır.

Çizelge 3.2 Sultani Çekirdeksiz populasyonundan sitolojik incelemeler için seçilen mutant adayı bireyler ve bazı özellikleri

No	Birey adı	Fenotipik değişim	Gelişme durumu
1	SÇ 20 Gy 29	Genel olarak klorofil mutasyonları ve iri yaprak oluşumu	Kuvvetli gelişme
2	SÇ 20 Gy 41	Genel olarak iri yaprak oluşumu	Kuvvetli gelişme
3	SÇ 25 Gy 14	Bazı boğumlarda boğum arasının kısılması ve kış gözünden yaprak oluşumu	Kuvvetli gelişme
4	SÇ 25 Gy 17	Genel olarak iri yaprak oluşumu	Kuvvetli gelişme
5	SÇ 25 Gy 38	Genel olarak koyu yeşil renkli ve iri yaprak oluşumu	Kuvvetli gelişme
6	SÇ 25 Gy 48	İri ve kalın yaprak oluşumu Bazı yapraklarda klorofil mutasyonları	Normal gelişme
7	SÇ 30 Gy 2	Tüm bitkide sülüklerden yaprak oluşumu ve kış gözünden yaprak oluşumu	Kuvvetli gelişme
8	SÇ 30 Gy 3	Genel olarak koyu renkli ve iri yaprak oluşumu	Kuvvetli gelişme
9	SÇ 30 Gy 5	Bazı boğumlarda sülüklerden yaprak oluşumu	Kuvvetli gelişme
10	SÇ 30 Gy 7	Bazal boğumlarda iri yaprak oluşumu	Normal gelişme
11	SÇ 30 Gy 9	Yapraklarda şekil anormallikleri ve klorofil mutasyonları Bazı boğumlarda boğum aralarının kısılması	Normal gelişme
12	SÇ 30 Gy 11	Genel olarak iri yaprak oluşumu ve tüm boğumlarda kış gözünden yaprak oluşumu	Kuvvetli gelişme
13	SÇ 30 Gy 12	Bazal boğumlarda iri yaprak oluşumu	Kuvvetli gelişme
14	SÇ 30 Gy 13	Bazal boğumlarda iri yaprak oluşumu	Kuvvetli gelişme
15	SÇ 30Gy 14	Sülüklerden yaprak oluşumu ve bazı yapraklarda klorofil mutasyonları oluşumu	Kuvvetli gelişme
16	SÇ 30 Gy 17	Bazı boğumlarda iri yaprak oluşumu	Kuvvetli gelişme
17	SÇ 30 Gy 19	Bazı boğumlarda iri yaprak oluşumu	Kuvvetli gelişme
18	SÇ 30 Gy 20	Genel olarak iri ve kalın yaprak oluşumu	Kuvvetli gelişme
19	SÇ 30 Gy 31	Kalın ve kaba dokulu yaprak oluşumu	Kuvvetli gelişme
20	SÇ 30 Gy 33	İri yaprak oluşumu	Kuvvetli gelişme
21	SÇ 30 Gy 34	Genel olarak iri yaprak oluşumu ve bazı boğumlarda boğum aralarının kısılması	Kuvvetli gelişme
22	SÇ 30 Gy 35	Genel olarak kalın ve kaba dokulu yaprak oluşumu	Kuvvetli gelişme
23	SÇ 30 Gy 37	Genel olarak iri yaprak oluşumu	Normal gelişme
24	SÇ 30 Gy 40	Yapraklar genel olarak koyu renkli ve kalın yaprak yapısı	Normal gelişme
25	SÇ 30 Gy 45	İri yaprak oluşumu	Normal gelişme
26	SÇ 50 Gy 3*	Çekirdekli meyve oluşumu	Kuvvetli gelişme

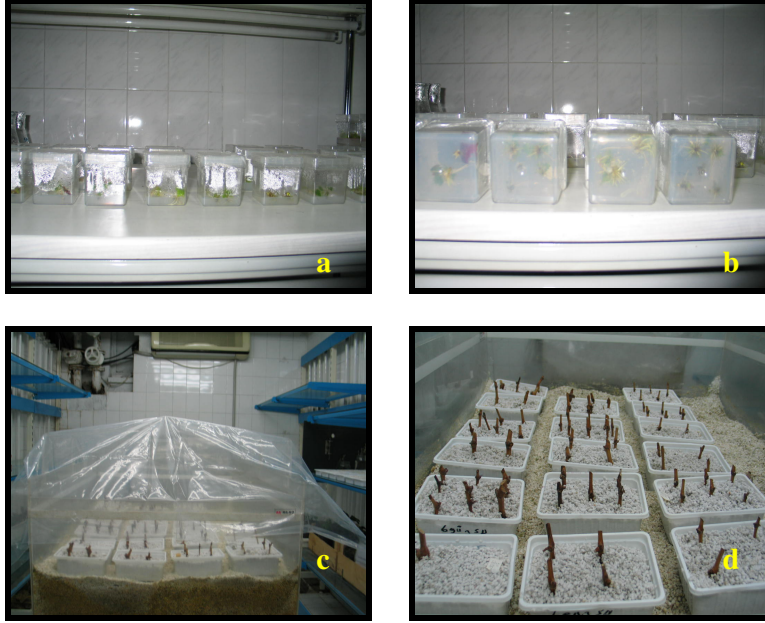
* Proje parselinden sitolojik incelemeler için alınmıştır.

Çizelge 3.3 Kalecik karası populasyonundan sitolojik incelemeler için seçilen mutant adayı bireyler ve bazı özellikleri

No	Birey adı	Fenotipik değişim	Gelişme durumu
1	KK 20 Gy 61	İri yaprak oluşumu ve klorofil mutasyonları	Kuvvetli gelişme
2	KK 20 Gy 70	Bazal kısımlarda iri yaprak oluşumu ve yapraklarda şekil anormallikleri	Kuvvetli gelişme
3	KK 25 Gy 24	Genel olarak iri yaprak oluşumu	Kuvvetli gelişme
4	KK 25 Gy 35	Bazal kısımlarda iri yaprak oluşumu	Normal gelişme
5	KK 25 Gy 42	İri ve kalın yapılı yaprak oluşumu	Kuvvetli gelişme
6	KK 25 Gy 58	Bazal kısımlarda iri ve kalın yapılı yaprak oluşumu	Kuvvetli gelişme
7	KK 25 Gy 60	İri ve kalın yaprak oluşumu	Kuvvetli gelişme
8	KK 30 Gy 1	Kaba ve kalın yaprak oluşumu Hemen hemen tüm boğumlarda ikiz göz oluşumu	Kuvvetli gelişme
9	KK 30 Gy 2	Bazı boğumlarda boğum arasının kısalması ve boğumlarda ikiz göz oluşumu	Normal gelişme
10	KK 30 Gy 6	Genel olarak iri yaprak oluşumu	Kuvvetli gelişme
11	KK 30 Gy 7	Bazı yapraklarda iri ve kalın yaprak oluşumu	Normal gelişme
12	KK 30 Gy 8	Tüm bitkide normalden iri yapılı yapraklar ve kış gözünün üzerinde yaprak oluşumu	Kuvvetli gelişme
13	KK 30 Gy 9	Bazı yapraklarda klorofil mutasyonları ve baza kısımlarda iri yaprak oluşumu	Zayıf gelişme
14	KK 30 Gy 18	Genel olarak iri yaprak oluşumu	Kuvvetli gelişme
15	KK 30 Gy 19	Genel olarak iri yaprak oluşumu	Kuvvetli gelişme
16	KK 40 Gy 18	Genel olarak İri yaprak oluşumu	Kuvvetli gelişme
17	KK 40 Gy 36	Genel olarak iri yaprak oluşumu ve yapraklarda şekil anormallikleri	Kuvvetli gelişme
18	KK 45 Gy 11	Bazal kısımda iri yaprak oluşumu	Kuvvetli gelişme

3.4.1 Kök uçlarının elde edilmesi

Kök uçlarında kromozom sayımı için, mitoz bölünmenin metafaz safhasında sayılabilir nitelikte kromozomların gözlenebileceği bir yöntemin belirlenmesi gerekmektedir. Bu amaçla ilk aşamada uygun köklerin elde edilmesi için *in vitro* ve kontrollü koşullarda *in vivo* çoğaltma tekniklerinden yararlanılmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1 Sitolojik çalışmalarda kullanılan köklerin *in vitro* (a-b) ve *in vivo* (c-d) koşullarda elde edilmesi

Kromozomların metafaz safhasında görüntülenebilmesi için kök uçlarının alınma zamanı önemlidir. Bu nedenle ön çalışmalar için yukarıda belirtilen her iki koşulda köklendirilmiş çeliklerden günün sabah bölümünde olmak koşuluyla 6 farklı saatinde (09:00, 09:30, 10:00, 10:30, 11:00, 11:30) kök örnekleri alınmıştır. Mikroskopik olarak hücrelerde metafaz safhasının en yoğun olarak gözlenebildiği saatler 10:30-11:00 arası olduğu saptanmıştır.

3.4.2 Kromozom sayımında kullanılan sitolojik yöntemler

İkinci aşamada kromozom sayımı için en uygun sitolojik yöntemlerin belirlenmesi için ön çalışmalar yapılmıştır.

Kromozom incelemelerinde yöntem seçimi amacıyla kullanılan sitolojik yöntemlerden birincisi Kuksova *et al.* (1997) tarafından kullanılan yöntemdir. Bu yöntemde kök örnekleri ön işlem uygulaması olarak, 2 saat süreli % 0.03'lük kolkisin'de oda koşullarında bekletildikten sonra, +4 °C' de 4-5 saat Carnoy tespit çözeltisinde

(3 kısım etil alkol : 1 kısım glasiyal asetik asit) tespit edilmiştir. Boyama aşamasında; + 4 °C'de % 1'lik asetoorsein içerisinde 5-6 gün süre ile bekletilerek kök dokularının boyanması sağlandıktan sonra, kök ucunun 0.5-1 mm'lik uç kısmı temiz lam üzerine alınarak, % 45'lik asetik asit ile ezme preparat hazırlığı yapılmıştır.

İkinci olarak Yamashita *et al.* (1998) tarafından belirtilen yöntem izlenmiştir. Ön işlem uygulamasında kökler 2 °C'de 24 saat süre ile su içerisinde bekletildikten sonra Carnoy çözeltisinde 24 saat tutulmuştur. Daha sonra, 1 N HCL ile 60 °C'de 1 dakika hidroliz işlemi gerçekleştirilmiştir. Hidroliz işleminin ardından, kökler feulgen boyasında 8-9 saat bekletilerek boyanmıştır. Daha sonra 1-2 damla asetokarmin ile ezme preparat hazırlığı yapılmıştır.

Ön çalışmalarda kullanılan üçüncü yöntem enzimler yardımıyla hücre içerisinde kromozomların daha iyi görüntülenebilmesi amacıyla uygun olarak, Park *et al.* (1999) tarafından belirtilen yöntem denenmiştir. Bu yönteme göre kökler 2 saat süre ile oda sıcaklığında, 2 mM 8-hydroxyquinoline içerisinde ön işleme tabi tutulmuştur. Tespit için diğer yöntemlerdeki gibi Carnoy çözeltisi kullanılmış ve +4 °C'de 2 saat tespit yapılmıştır. Tespit çözeltisinden alınan örnekler, saf su ile yıkanmıştır. Daha sonra hazırlanan enzim karışımında 38 °C'de, 30-60 dakika tutulmuştur. Enzim karışımı; % 4 cellulase RS (Yakult) ve % 1 pectolyase Y23 (Seishin Pharmaceutical) enzimleri ile. 0.07 M KCL ve 0.075 M Na₂EDTA ile hazırlanan çözeltisi 0.1 M HCL ile pH:4 olacak şekilde hazırlanmıştır. Preparat hazırlığı aşamasında, enzim uygulamasının ardından kök uçları yıkanarak lam üzerine alınmış ve birkaç damla asetik asit ile ezme işleminin ardından % 4 Giemsa (1/15 fosfat buffer çözeltisinde hazırlanmış, pH:6.8) ile 3-5 dakika süre ile boyamanın ardından oda koşullarında kısa süre tutularak devamlı preparat yapılmış ve mikroskopta incelenmiştir (Park *et al.* 1999)

Feulgen ile boyamanın yapıldığı 2. yöntemde hücrelerde kromozomlar yeterli olarak boyanmadığı ve kromozomlar ile sitoplazma arasında istenilen düzeyde kontrast elde edilemediğinden; 3. yöntemde ise Giemsa boyasının hücrelerde sitoplazmanın çok yoğun boyanmaya neden olması sonucunda yine kromozomlarda net bir görüntü sağlanamadığından mikroskobik gözlemler başarısız olmuştur.

Kullanılan yöntemler içerisinde daha başarılı sonuçların elde edildiği Kuksova *et al.* (1997)'nin yöntemi hidroliz aşamasının eklenmesi ve boyamanın farklı uygulanması ile modifiye edilerek geliştirilmiştir. Hidroliz işlemi kök dokularının yumuşamasını ve hücrelerin kolay dağılmasını sağladığı gibi, hücrelerde temiz bir sitoplazma görüntüsünün elde edilmesine de yardımcı olmaktadır. Bu nedenle, yöntem hidroliz uygulaması eklenmiştir. İkinci farklılık boyamada kullanılan asetoorsein'in derişimi ve boyama süresinde yapılmıştır. Kuksova *et al.* (1997)'na göre kökler % 1 asetoorsein boyası içerisinde 5-6 gün süre ile tutulduğunda, kök hücrelerinin bozulduğu, sitoplazmanın oldukça yoğun boyandığı gözlenmiştir. Bu nedenle daha yüksek derişimli olarak % 2'lik asetoorsein ile daha kısa süreli olacak şekilde, kök yapısına bağlı olarak 1 ya da 2 gün bekletilerek köklerin boyanması sağlanmıştır. İnce yapılı köklerde 1 günlük boyama sonucunda iyi bir sitoplazmik boyama sağlanırken, kalın dokulu köklerde 2 gün boyama ile daha iyi hücre görüntüleri elde edilmiştir. Belirtilen açıklamalara göre, sitolojik çalışmalarda izlenen yöntem aşamaları ile aşağıda verilmiştir.

1. Kök örnekleri 10:30-11:00 arasında alınmıştır.
2. Ön işlem uygulaması olarak 2 saat süreyle kök örnekleri % 0.03 kolkisin'de bekletilmiştir.
3. Tespit için Carnoy çözeltisi kullanılmıştır. Kökler +4 °C'de 4-5 saat bekletilerek tespit edilmiştir.
4. Hidroliz 1 N HCl içerisinde 60 °C'de 15 dakika süre ile yapılmıştır.
5. Boyama % 2'lik asetoorsein ile kökün yapısına bağlı olarak 1 veya 2 gün süreyle bekletilme şeklinde uygulanmıştır.
6. 1-2 mm'lik boyanmış kök uçlarında 1 damla asetik asit (% 45) yardımıyla ezme yöntemiyle preparat yapılmıştır.

3.4.3 Mikroskop incelemeleri ve devamlı preparatların hazırlanması

Ezme preparatlar Zeiss Axiolab mikroskop ile incelenmiş ve mikrofotografları çekilmiştir. Mikroskopta fotoğraflanacak olan preparatlar devamlı hale getirilmiştir.

Devamlı preparatlar sıvı azot tekniği kullanılarak hazırlanmıştır (Yüzbaşıoğlu vd. 1997). Bu amaçla ezme preparat, 3-5 saniye süre ile sıvı azot içerisinde tutulmaktadır. Sıvı azottan alındıktan sonra lamel bir ucundan dikkatli bir şekilde kaldırılarak oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Daha sonra Depex ile kapatılarak devamlı preparat haline getirilmiştir.

3.5 SSCP Markörler ile Moleküler Tanımlama Çalışmaları

Morfolojik ve sitolojik tanımlama sonuçlarına göre farklı özelliklere sahip olduğu bilinen mutant bireylerin moleküler olarak tanımlanması amacıyla, bitkilerde mutasyon bölgelerinin moleküler tanımlanmasında önerilen yöntemlerden biri olarak son yıllarda önem kazanan SSCP tekniği (Single Strand Conformation Polimorfizm-Tek İplikçikli DNA Konformasyon Polimorfizmi) kullanılmıştır. Çalışmaların önemli bir bölümü San Michele Tarım Enstitüsü'nde (Istituto Agrario San Michele All Adige, IASMA- Italia) Dr. Riccardo Velasco'nun teknik danışmanlığı ile gerçekleştirilmiştir.

SSCP markörler, 20-25 bp uzunluğunda özel primerlerin kullanıldığı, DNA fragmentlerinin (200-800 bp) PCR amplifikasyonu sonucu, denature edilmiş tek iplikçikli DNA'da nükleotit sekans varyasyonunu, jel elektroforez yardımıyla tanımlanmaktadır. Yöntem, tek iplikçikli DNA'nın bağımsız hareketliliğine dayanmaktadır. DNA dizisinde, sekans analizine gerek kalmaksızın nükleotit varyasyonlarını belirlemede büyük avantaj sağlamakta olup ayrıca gen spesifik olması nedeniyle, primer dizaynı için gen sekans bilgisi kullanılarak, mutasyonları belirlemede kullanılmaktadır (Hayashi 1992).

Sultani Çekirdeksiz ve Kalecik karası üzüm çeşitlerinde elde edilmiş olan uyarılmış varyasyon içerisinde morfolojik ve sitolojik tanımlamalara göre seçilen 22 aday ve bir adet kontrol örneği olmak üzere toplam 23 adet bireyde mutasyonların SSCP markörleri ile moleküler düzeyde tanımlaması yapılmıştır. Üzerinde çalışılan mutant adayı bireylere ait kısa fenotipik özellikler Çizelge 3.4 - 3.5’de verilmiştir.

Çizelge 3.4 Sultani Çekirdeksiz üzüm çeşidine ait, SSCP analizlerinde kullanılan mutant adayı bireyler

No	Birey adı	Fenotipik değişim	Gelişme durumu
1	SÇ 20 Gy 29	Genel olarak klorofil mutasyonları ve iri yaprak oluşumu	Kuvvetli gelişme
2	SÇ 20 Gy 46	Bazı yapraklarda şekil anormallikleri	Normal gelişme
3	SÇ 20 Gy 69	Bazı yapraklarda klorofil mutasyonları	Kuvvetli gelişme
4	SÇ 25 Gy 2	Genel olarak yapraklar normalden kalın yapılı ve koyu yeşil renkte	Kuvvetli gelişme
5	SÇ 25 Gy 12	Yapraklarda şekil anormallikleri	Normal gelişme
6	SÇ 25Gy 14	Bazı boğumlarda boğum arasının kısalması ve kış gözünün üzerinde yaprak oluşumu	Kuvvetli gelişme
7	SÇ 25 Gy 40	Küçük yapılı yapraklar ile yapraklarda şekil bozuklukları	Zayıf gelişme
8	SÇ 25 Gy 43	Klorofil mutasyonlarının oluşumu	Kuvvetli gelişme
9	SÇ 25 Gy 44	Klorofil mutasyonları ve iri yaprak oluşumu	Kuvvetli gelişme
10	SÇ 25 Gy 48	İri ve kalın yaprak oluşumu Bazı yapraklarda klorofil mutasyonları	Normal gelişme
11	SÇ 25 Gy 60	Kalın dokulu ve koyu yeşil renkli yapraklar ve bazı boğumlarda ikiz göz oluşumu	Kuvvetli gelişme
12	SÇ 25 Gy 61	Bazı yapraklarda klorofil mutasyonları	Normal gelişme
13	SÇ 30 Gy 2	Tüm bitkide sütlüklerden yaprak oluşumu ve kış gözünün üzerinde yaprak oluşumu	Kuvvetli gelişme
14	SÇ 30 Gy 5	Bazı yapraklarda klorofil mutasyonları ve yapraklarda şekil anormallikleri	Kuvvetli gelişme
15	SÇ 30 Gy 9	Yapraklarda şekil anormallikleri ve klorofil mutasyonları Bazı boğumlarda boğum aralarının kısalması	Normal gelişme
16	SÇ 30 Gy 11	Genel olarak iri yaprak oluşumu ve tüm boğumlarda kış gözünden yaprak oluşumu	Kuvvetli gelişme
17	SÇ 30 Gy 14	Sütlüklerden yaprak oluşumu, ve bazı yapraklarda klorofil mutasyonları oluşumu	Kuvvetli gelişme
18	SÇ 30 Gy 34	İri yaprak oluşumu ve bazı boğum aralarının kısalması	Kuvvetli gelişme
19	SÇ 30 Gy 41	Yapraklarda şekil anormallikleri	Normal gelişme
20	SÇ 30 Gy 44	Yapraklarda klorofil mutasyonları oluşumu	Kuvvetli gelişme
21	SÇ 40 Gy 21	Küçük yaprak oluşumu, zayıf sürgün gelişimi ve bağum araları kısa yapıda	Zayıf gelişme
22	SÇ 50 Gy 3*	Çekirdekli meyve oluşumu	Kuvvetli gelişme

* Proje parselinden genetik tanımlama çalışmalarında kullanılmak üzere alınmıştır.

Çizelge 3.5 Kalecik karası üzüm çeşidine ait SSCP analizlerinde kullanılan mutant aday bireyler

No	Birey adı	Fenotipik değişim	Gelişme durumu
1	KK 20 Gy 13	Bazı yapraklarda klorofil mutasyonları oluşumu	Kuvvetli gelişme
2	KK 20 Gy 15	Yaprak anormallikleri ve genel olarak klorofil mutasyonları	Normal gelişme
3	KK 20 Gy 61	Bazal boğumlarda iri yaprak oluşumu ve klorofil mutasyonları	Kuvvetli gelişme
4	KK 20 Gy 70	Bazal kısımlarda iri yaprak oluşumu ve yapraklarda şekil anormallikleri	Kuvvetli gelişme
5	KK 20 Gy 79	Yaprak anormallikleri ve klorofil mutasyonları	Normal gelişme
6	KK 25 Gy 8	Bazı yapraklarda klorofil mutasyonları	Normal gelişme
7	KK 25 Gy 52	Bazı yapraklarda şekil anormallikleri	Kuvvetli gelişme
8	KK 30 Gy 1	Kaba ve kalın yaprak oluşumu Hemen hemen tüm boğumlarda ikiz göz oluşumu	Kuvvetli gelişme
9	KK 30 Gy 2	Kısa boğum oluşumu ve ikiz göz oluşumu	Normal gelişme
10	KK 30 Gy 3	İkiz göz oluşumu, sülükten yaprak oluşumu	Normal gelişme
11	KK 30 Gy 8	Tüm bitkide normalden iri yapılı yapraklar ve kış gözünün üzerinde yaprak oluşumu	Kuvvetli gelişme
12	KK 30 Gy 9	Bazı yapraklarda klorofil mutasyonları	Zayıf gelişme
13	KK 30 Gy 13	Kalın ve kaba yaprak oluşumu ve bazı yapraklarda klorofil mutasyonları	Kuvvetli gelişme
14	KK 30 Gy 53	Bazı boğumlarda sülüklerden yaprak oluşumu	Normal gelişme
15	KK 40 Gy 32	Bazı yapraklarda klorofil mutasyonları	Kuvvetli gelişme
16	KK 40 Gy 36	İri yaprak oluşumu ve yapraklarda şekil anormallikleri	Kuvvetli gelişme
17	KK 40 Gy 38	Bazı yapraklarda klorofil mutasyonları	Kuvvetli gelişme
18	KK 45 Gy 4	Bazı yapraklarda klorofil mutasyonları	Kuvvetli gelişme
19	KK 45 Gy 6	Bazı yapraklarda klorofil mutasyonları	Normal gelişme
20	KK 45 Gy 9	Bazı yapraklarda klorofil mutasyonları	Normal gelişme
21	KK 45 Gy 17	Bazı yapraklarda klorofil mutasyonları	Kuvvetli gelişme
22	KK 45 Gy 21	Klorofil mutasyonları ve koyu yeşil renkli yaprak oluşumu	Kuvvetli gelişme

SSCP markörler ile moleküler tanımlama çalışmalarında aşağıda belirtilen aşamalar uygulanmıştır.

1. DNA izolasyonu
2. DNA fragmentinin PCR ile çoğaltılması (amplifikasyon)
3. PCR ürünlerinin tek iplikçikli duruma getirilmesi (denaturasyon)
4. Poliakrilamid jel elektroforez ile polimorfizm elde edilmesi
5. Gümüş nitrat boyama yöntemi ile polimorfizmin görüntülenmesi

3.5.1 DNA izolasyonu

DNA izolasyonu çalışmaları, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Birimi Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. DNA izolasyonu, bölümümüzde yürütülmüş olan bir çok çalışmada asma örneklerinde başarı ile kullanılmış olan Lodhi *et al.* (1994)'a göre yapılmıştır. Buna göre izlenen yöntem aşağıda ayrıntılı verilmiştir.

- 0.5 g genç yaprak sıvı azot ile ezilir ve 6 ml ekstraksiyon çözeltisi ilave edilir.
- Homojen hale getirilen çözeltiliye 50 mg PVPP (polivinylpyrrolidone) (sigma P6755) ilave edildikten sonra 60 °C'deki su banyosunda 25 dakika bekletildikten sonra oda sıcaklığında soğuması sağlanır.
- 6 ml kloroform:oktanol (24:1) ilave edilerek hafifçe 20-25 kez sallanır.
- 6000 rpm'de 15 dakika oda sıcaklığında santrifüj edildikten sonra üstteki sıvı kısım alınarak hacminin yarısı kadar 5 M NaCl çözeltisi eklenerek iyice çalkalanır.
- Toplam hacminin iki katı kadar % 95' lik soğuk etanol (-20 °C) ilave edilir ve tüpler buzdolabında 30-60 dakika bekletildikten sonra DNA sarmalleri gözlendiğinde bir plastik çubuk (lup) yardımıyla alınarak, %76' lık soğuk etil alkol bulunan ependorf tüplere aktarılır.
- 3000-5000 rpm de 3 dakika santrifüj yapılarak DNA'nın çöktürülmesi sağlanır. Daha sonra tüpler ters çevrilerek etanolun uzaklaşması sağlanır.
- DNA, 200-300 µl TE tampon çözeltisi içerisinde çözüldükten sonra her 100 µl için 1 µl RNAase ilave edilerek 37 °C' de 15 dakika bekletilerek RNA uzaklaştırılır.

Çözeltiler:

Ekstraksiyon çözeltisi 20 mM sodyum EDTA (Etilen Diamine Tetra Asetik Asit) ve 100 mM Tris-HCL (pH:8), 1.4 M NaCl ve % 2'lik CTAB (Hekzadesil Trimetil Amonyum Bromür) şeklinde hazırlanan çözeltiliye % 0.2 β-mercaptoethanol kullanım öncesi ilave edilir.

TE çözeltisi: 10 mM Tris-HCL ve 1 mM EDTA karışımı (pH: 8)

RNAse A (sigma R6513): 10 mg/ml

3.5.2 SSCP primerlerinin seçilmesi

SSCP primerlerinin seçimi yöntemin uygulanmasındaki en önemli konudur. Tez çalışmasının yürütüldüğü dönemde ulaşılan kaynaklara göre ve günümüzde, asmalara özel primerlerden söz etmek henüz mümkün değildir. Bu nedenle çalışmada NCBI (The National Center for Biotechnology Information) ve IASMA (Istituto Agrario San Michele all Adige) gen bankası verileri kapsamında 50 adet primer seçilmiştir. Primer seçiminde vejetatif gelişmeden sorumlu transkripsiyon faktörleri dikkate alınmıştır. Çizelge 3.6'da IASMA tarafından geliştirilen primerlerin sentezlendiği ESTs listesi sunulmuştur. Buna göre, INFIO: çiçek, GEMMA: tomurcuk, RADIC: kök, BACCA: tane, GERMO: sürgün ve FOGLIO ise yaprak kökenli EST lerdir. Üzerinde çalışılan primerlerden sadece 7 tanesinin sekans dizilişi (Çizelge 3.7) ile ilgili bilgilere ulaşılabilirken (Salmaso *et al.* 2004, Moser *et al.* 2005, Salmaso *et al.* 2006), diğerlerinin ise henüz yayın basım aşamasında olması nedeniyle (Troggio *et al.* 2006) sekans dizilişi verilememiştir.

Çizelge 3.6 SSCP analizlerinde kullanılan primerlerin geliştirildiği EST isimleri

No	EST ismi	NCBI numarası	Tür adı	Primer adı	Kullanılan organ
1	ISMAAEST000037	15236109	<i>Arabidopsis thaliana</i>	INFIO 160	Çiçek
2	ISMAAEST000066	22023157	<i>Oryza sativa</i>	GERMO 322	Sürgün
3	ISMAAEST000221	30694805	<i>Arabidopsis thaliana</i>	RADIC 1892	Kök
4	ISMAAEST000369	15223290	<i>Arabidopsis thaliana</i>	GEMMA 967	Tomurcuk
5	ISMAAEST000562	15240297	<i>Arabidopsis thaliana</i>	RADIC 114	Kök
6	ISMAAEST000679	24850307	<i>Oryza sativa</i>	RADIC 1637	Kök
7	ISMAAEST000695	15227754	<i>Arabidopsis thaliana</i>	RADIC 1517	Kök
8	ISMAAEST000771	30024598	<i>Lotus corniculatus</i>	INFIO 727	Çiçek
9	ISMAAEST001401	21593586	<i>Arabidopsis thaliana</i>	BACCA 672	Tane
10	ISMAAEST001581	15242784	<i>Arabidopsis thaliana</i>	BACCA 1409	Tane
11	ISMAAEST001618	15223618	<i>Arabidopsis thaliana</i>	GERMO 220	Sürgün
12	ISMAAEST001692	18407554	<i>Arabidopsis thaliana</i>	RADIC 1104	Kök
13	ISMAAEST001697	30696297	<i>Arabidopsis thaliana</i>	GEMMA 1097	Tomurcuk
14	ISMAAEST001706	30696193	<i>Arabidopsis thaliana</i>	BACCA 023	Tane
15	ISMAAEST001728	30908921	<i>Oryza sativa</i>	RADIC 1188	Kök
16	ISMAAEST001748	15222161	<i>Arabidopsis thaliana</i>	BACCA 048	Tane
17	ISMAAEST001954	4760692	<i>Nicotiana tabacum</i>	BACCA 1500	Tane
18	ISMAAEST001968	22331031	<i>Arabidopsis thaliana</i>	BACCA 1016	Tane
19	ISMAAEST002050	6552389	<i>Nicotiana tabacum</i>	RADIC 1187	Kök
20	ISMAAEST002110	15228188	<i>Arabidopsis thaliana</i>	INFIO 0620	Çiçek
21	ISMAAEST002140	30677923	<i>Arabidopsis thaliana</i>	RADIC 0493	Kök
22	ISMAAEST002216	5917653	<i>Petroselinum crispum</i>	RADIC 1731	Kök
23	ISMAAEST002241	15237721	<i>Arabidopsis thaliana</i>	RADIC 294	Kök
24	ISMAAEST002248	15242272	<i>Arabidopsis thaliana</i>	GERMO 209	Sürgün
25	ISMAAEST002275	18396143	<i>Arabidopsis thaliana</i>	GERMO 379	Sürgün
26	ISMAAEST002276	15239413	<i>Arabidopsis thaliana</i>	GEMMA 243	Tomurcuk
27	ISMAAEST002380	15222223	<i>Arabidopsis thaliana</i>	BACCA 135	Tane
28	ISMAAEST002738	15239113	<i>Arabidopsis thaliana</i>	GEMMA 334	Tomurcuk

Çizelge 3.6 SSCP analizlerinde kullanılan primerlerin geliştirildiği EST isimleri (devam)

29	ISMAAEST002745	26451690	<i>Arabidopsis thaliana</i>	INFIO 410	Çiçek
30	ISMAAEST002781	15222433	<i>Arabidopsis thaliana</i>	RADIC 930	Kök
31	ISMAAEST002840	15240297	<i>Arabidopsis thaliana</i>	RADIC 046	Kök
32	ISMAAEST002850	18423250	<i>Arabidopsis thaliana</i>	GERMO 28699	Sürgün
33	ISMAAEST002862	30680980	<i>Arabidopsis thaliana</i>	INFIO 192	Çiçek
34	ISMAAEST002892	20127075	<i>Arabidopsis thaliana</i>	GERMO 307	Sürgün
35	ISMAAEST003027	15240604	<i>Arabidopsis thaliana</i>	INFIO 432	Çiçek
36	ISMAAEST003084	15240754	<i>Arabidopsis thaliana</i>	INFIO 340	Çiçek
37	ISMAAEST003172	30695456	<i>Arabidopsis thaliana</i>	RADIC 811	Kök
38	ISMAAEST003203	28629811	<i>Arabidopsis thaliana</i>	FOGLIO 236	Yaprak
39	ISMAAEST003268	15233516	<i>Arabidopsis thaliana</i>	RADIC 138	Kök
40	ISMAAEST003358	30024600	<i>Lotus corniculatus</i>	RADIC 1845	Kök
41	ISMAAEST003447	15240708	<i>Arabidopsis thaliana</i>	INFIO 622	Çiçek
42	ISMAAEST003450	15248520	<i>Arabidopsis thaliana</i>	RADIC 305	Kök
43	ISMAAEST003566	20466590	<i>Arabidopsis thaliana</i>	GEMMA 1639	Tomurcuk
44	ISMAAEST003637	15236725	<i>Arabidopsis thaliana</i>	GEMMA 1026	Tomurcuk
45	ISMAAEST003691	7528276	<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>	BACCA 1688	Tane
46	ISMAAEST003734	15228188	<i>Arabidopsis thaliana</i>	GERMO 890	Sürgün
47	ISMAAEST003740	25354704	<i>Arabidopsis thaliana</i>	RADIC 561	Kök
48	ISMAAEST004035	11282608	<i>Arabidopsis thaliana</i>	RADIC 1075	Kök
49	ISMAAEST004118	11273985	<i>Arabidopsis thaliana</i>	INFIO 135	Çiçek
50	ISMAAEST003915	2573367	<i>Arabidopsis thaliana</i>	RADIC 118	Kök

Çizelge 3.7 Sekans dizilişi bilinen primerlere ait baz dizileri

No	Primer adı	Forward	Reverse
1	INFIO 135	AGCCGCAGTTAAGGAAGAGG	CCAATACTGCAACTGCACTCC
2	GEMMA 1026	AGGTTCTTGCTTCAACCTGG	AATGCTGCTCTTCAGCACCT
3	INFIO 160	GACTATGGCATCCTCAAGGC	GAAGCAGTTGATCGAGGAGG
4	INFIO 620	AAGATCAGGCTGCAGCAACT	ACCATGTCCTCCTGCACTTC
5	INFIO 432	GGCGAGTCTGCTTCGAGTT	GGCGTGGATAACACACCTCT
6	RADIC 493	GCATTAAGGTCGATTCACCG	AACCGGTATGACAGCTCCTG
7	RADIC 561	CGCTCTCCTGGAGTCTGTTC	CACTCCAATAACCTCCGCC

3.5.2.1 SSCP analizlerinde kullanılacak primerlerin belirlenmesine yönelik ön tarama çalışmaları

Seçilen 50 adet primer içerisinde mutant adayı bireylerde yüksek polimorfizm gösterenlerin belirlenmesi amacıyla ön deneme analizleri yapılmıştır. Her iki çeşitte primer seleksiyonu aşamasında test amaçlı kullanılmak üzere her iki çeşide ait örnek popülasyonundan seçilmiş 6 adet bireyde (Çizelge 3.8) kontrol örnekleri ile birlikte, toplam 50 adet SSCP primeri ile ön deneme analizleri yapılmıştır.

Çizelge 3.8 SSCP primerlerinin seleksiyonu aşamasında kullanılan mutant adayı bitkiler

Çeşit	No	Birey adı
Sultani Çekirdeksiz	1	Kontrol
	2	SÇ 25 Gy 40
	3	SÇ 30 Gy 2
	4	SÇ 40 Gy 21
Kalecik karası	5	Kontrol
	6	KK 30 Gy 1
	7	KK 30 Gy 9
	8	KK 30 Gy 53

Primer seleksiyonu sırasında yapılan analizlerdeki ilk aşamayı amplifikasyon testleri oluşturmaktadır. Morfolojik özellikler esas alınarak seçilen 50 adet primerden 10 tanesinde (RADIC 1075, RADIC 1637, RADIC 1892, GEMMA 967, GERMO 209, GERMO 322, INFIO 340, INFIO 410, INFIO 727, GERMO 28699) PCR amplifikasyonu oluşmadığından ilerleyen çalışmalarda kullanılamamıştır.

40 primer ile Sultani Çekirdeksiz ve Kalecik karası üzüm çeşitlerine ait birer kontrol ve seçilmiş 6 adet mutant olmak üzere toplam sekiz adet bireyde polimorfik primerleri belirlemek üzere SSCP jel görüntüleri elde edilerek değerlendirilmiştir. Ön deneme SSCP analizleri sonucunda polimorfik bant elde edilen 15 adet primer (RADIC 118, RADIC 294, RADIC 561, RADIC 1104, RADIC 1188, RADIC 1517, GEMMA 243,

GEMMA 334, GEMMA 1026, GEMMA 1097, GERMO 220, GERMO 890, INFIO 432, INFIO 622, FOGLIO 236) her iki çeşide ait mutant aday bireylerde polimorfizmin taranmasına yönelik daha sonraki analizlerde kullanılmak üzere seçilmiştir.

3.5.3 PCR yardımıyla DNA amplifikasyonu

PCR reaksiyonu için MJ PTC 100 Research, INC. Thermocycler cihazı kullanılmıştır. Toplam reaksiyon karışımı 25 µl olacak şekilde, 2 µl genomik DNA (10 ng/µl), 0.2 µl Tag-polimeraz (Qiagen) (5 U/µl), 2.5 µl buffer 10 X (Qiagen), 2 µl dNTP (10 mM) ve 1 µl primer (10 µM) (forward ve reverse) kullanılmıştır. PCR ürünü % 1.5 lik agarose jelde görüntülenmiştir. Buna göre çalışmada kullanılan PCR koşulları aşağıda verilmiştir.

PCR koşulları:

Ön denaturasyon	95 °C	5 dk
Denaturasyon	94 °C	30 sn
Primer bağlanması	57 °C	1 dk
Yeni iplikçik yazılımı	72 °C	1.5 dk
Son yazılım	72 °C	5 dk
Toplam döngü sayısı		30

SSCP-PCR ürünlerinin durumu % 1.5 agaroz jelde gözlenmiştir. Bunun için, PCR ürününden alınan 5 µl'lik DNA örneği, 1.5 µl Silver gold ve 2 µl bromofenol blue karışımı ile boyanarak agaroz jele yüklenmiştir. DNA büyüklük markörü olarak, Mass Ruler™ DNA ladder (Fermantas (80-10.000 bp)) kullanılmıştır. Elektroforez, 1 X TAE (Tris, Asetik asit, EDTA (0.5 M-pH: 8) tampon çözeltisi içerisinde, 160 V'da yaklaşık 35 dakika koşutulduktan sonra UV altında PCR ürünlerinin durumu izlenmiştir.

PCR amplifikasyonu sonucunda elde edilen PCR ürünleri SSCP analizinde kullanılmıştır. PCR amplifikasyonu sonucunda genel olarak ortalama 200-500 bp aralığındaki DNA fragmentleri SSCP analizinde kullanılmıştır.

3.5.4 Poliakrilamid jel elektroforez yöntemi ile SSCP polimorfizminin görüntülenmesi

3.5.4.1 Poliakrilamid jellerin hazırlanması

Poliakrilamid jeller, 20 cm x 20 cm büyüklüğünde camların kullanıldığı, dikey elektroforez sisteminde hazırlanmıştır. Jel tankının camları özel kimyasal maddeler kullanılarak jel dökümüne hazır hale getirilmiştir. Camlardan birinde, jelin sabitleştirilmesi için yapıştırıcı solüsyon (5 ml %100 etil alkol, 7µl γ methacryloxypropyl-trimethoxysilane ve 4.5 µl asetik asit) diğeri ise, özel çözücü solüsyon (Repel-silane ES) kullanılmıştır.

Poliakrilamid jel solüsyonunun hazırlanmasında 6 ml akrilamid [MDETM (Mutation Detection Enhancement) gel], 7 ml gliserin, 2 ml TBE (10X), 75 µl APS (%10), 25 µl TEMED 14 ml H₂O içerisinde çözdürülmüştür.

3.5.4.2 SSCP-PCR ürünlerinde DNA'nın tek iplikçikli duruma getirilmesi

SSCP analizinde DNA'nın tek iplikçikli duruma getirilmesi için formamidin kullanılmıştır (Nataraj *et al.* 1999). 5 µl DNA (PCR ürünü), 9 µl formamidin ile birlikte 94 °C'de 3 dakika süreyle iplikçik açılımı sağlanmış ve hızla buz üzerine alınarak yapı korunmuştur.

3.5.4.3 Elektroforez ve polimorfizmin gözlenmesi

Tek iplikçikli duruma getirilmiş olan PCR ürünü, 0.6 X TBE buffer içerisinde poliakrilamid jele yüklenmiştir. Yükleme miktarı 6 µl olarak uygulanmıştır. Elektroforez 135 V'da 16 saat olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

Poliakrilamid jellerin boyanmasında AgNO_3 (Gümüş nitrat) ile boyama tekniği kullanılmıştır. Boyamada kullanılan üç farklı çözeltili, kullanım sırasına göre; tespit çözeltilisi (10 ml etil alkol, 0.5 ml asetik asit ve 100 ml H_2O) içerisinde 5 dakika süreyle, boya çözeltilisi (10 ml etil alkol, 0.5 ml asetik asit, 0.2 g AgNO_3 ve 100 ml H_2O) içerisinde 5 dakika süreyle, ve son olarak bant desenleri görünür hale gelene kadar geliştirme çözeltilisi (6 g NaOH, 540 g formaldehit ve 200 ml H_2O) içerisinde tutulmuştur.

Boyama işlerinin tamamlanmasının ardından poliakrilamid jeller, Image master VDS CL (Amersham Pharmacia Biotech)” görüntüleme cihazında görüntülenmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1 Mutant Adaylarının Seçiminde Morfolojik Tanımlama Çalışmaları

Mutasyon ıslahı ile yeni genotiplere ulaşma olasılığı yüksek olmakla birlikte, özellikle çok yıllık bitkilerde mutasyon etkilerinin birbirini izleyen yıllarda ve dikkatli gözlenememesi, bu olasılığın azalmasına neden olmaktadır.

Bu çalışma ile mutasyon etkilerinin sitolojik ve moleküler tanımlanması amaçlanmış olmakla birlikte, çalışmanın amacına uygun, kararlılık gösteren bireylerin erken aşamalarda seçilmesi önemli olmuştur. Bu nedenle, birey sayısının kararlı bir aşamaya gelme süreci içerisinde bitkilerdeki morfolojik değişimler incelenerek, farklılık gösteren bireylerin seçilmesine çalışılmıştır. Sitolojik ve moleküler çalışmaların materyalini oluşturan aday bireyler morfolojik incelemelerle seçilmiştir.

Sultani Çekirdeksiz ve Kalecik karası üzüm çeşitlerinden elde edilen ışımlanmış bireylerin oluşturduğu mutant koleksiyon parselinde başlangıç popülasyonu (M1V1-2002) ve ışınlamayı izleyen ikinci yıl (M1V2-2003 yılı) ve üçüncü yılda (M1V3-2004 yılı) gelişmesini sürdürebilen bitki sayıları Çizelge 4.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.1 Sultani Çekirdeksiz ve Kalecik karası bireylerinde morfolojik gözlem yapılan bitki sayısının vejetasyon yılları ve ışın dozlarına göre sayısı

Doz	Sultani Çekirdeksiz			Kalecik karası		
	M1V1	M1V2	M1V3	M1V1	M1V2	M1V3
20 Gy	63	53	37	83	55	49
25 Gy	66	49	48	79	58	54
30 Gy	46	23	15	54	27	20
40 Gy	20	7	-	49	26	22
45 Gy	2	-	-	40	16	15
Kontrol	10	7	7	10	8	6
Toplam	207	139	107	315	190	166

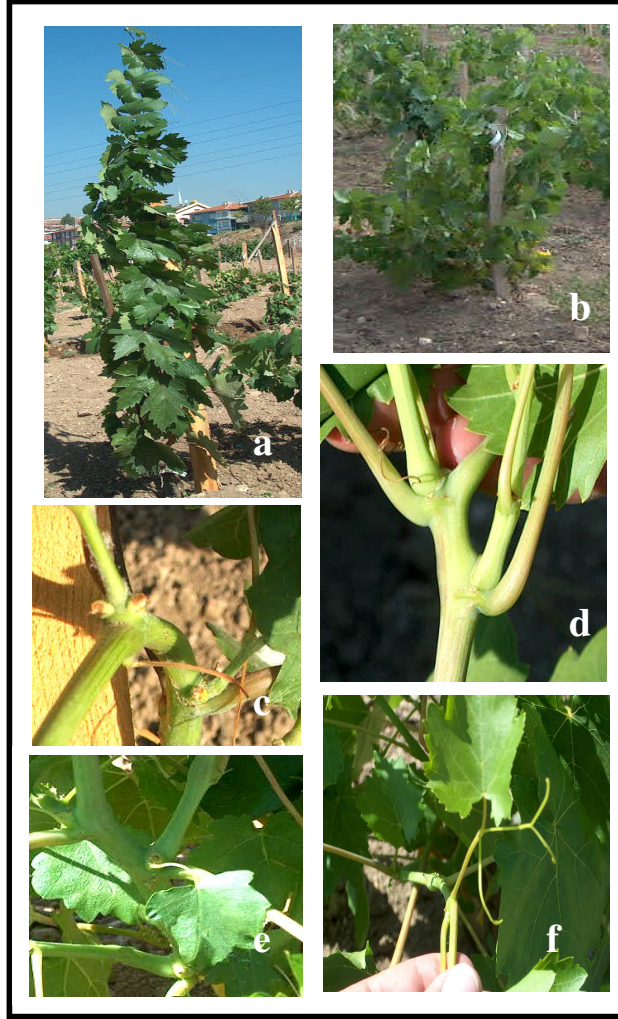
Çizelge 4.1'den izlenebileceği gibi, bağ koşullarında başlangıç populasyonunu oluşturan birey sayısı, ışınlama sonrasında beklenen kayıplar ve bağ koşullarında fidanların tutması sırasında yaşanan kayıplar nedeniyle ikinci yıla geçerken önemli bir azalma yaşanmıştır. Sultani Çekirdeksiz için 207 adet olan başlangıç populasyonu sayısı ikinci yılda (M1V2-2003) 139'a gerilerken, Kalecik karası'nda 315 bitkiden 190 bitkiye inmiştir. Üçüncü vejetasyonda ise kaybedilen bitki sayısı daha az olup mutant koleksiyon parseli bu yılda, Sultani Çekirdeksiz'de 107 adet, Kalecik karası'nda 166 adet olacak şekilde kararlı hale gelmiştir.

İkinci ve üçüncü vejetasyon yıllarında (M1V2-2003 ve M1V3-2004) belirtilen bitki sayılarına bağlı olarak, henüz yenice döneminde olan Sultani Çekirdeksiz ve Kalecik karası populasyonlarında kontrol bitkilerinden farklı olarak değerlendirilen morfolojik değişimler izlenmiştir. Morfolojik farklılıklar dört ana grup altında toplanmıştır (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2 Yenice dönemindeki mutant adaylarının seçiminde kullanılan morfolojik farklılıklar

Özellik grubu	Alt grupları
1. Gelişme şekli	a) Kuvvetli gelişme b) Zayıf gelişme
2. Sürgün ve göz yapısı	a) Boğum arasında kısılma b) Boğumlarda ikiz göz oluşumu c) Kış gözü üzerinde yaprak oluşumu
3. Sülük yapısı	a) Şekil bozuklukları
4. Yaprak yapısı	a) Klorofil mutasyonları b) Şekil bozuklukları

Çalışmalarda elde edilen ve yukarıda çizelge halinde sunulan morfolojik bulgulara ilişkin görüntüler Şekil 4.1- 4.2'de toplu olarak verilmiş; ayrıca sınıflandırmada dikkate alınan bu farklılıklar aşağıda açıklanmıştır.



Şekil 4.1 Mutant adaylarda gözlenen fenotipik değişimler

- a) Kuvvetli ve dik gelişme; KK 25 Gy 52
- b) Zayıf gelişme; SÇ 25 Gy 40
- c) Boğumda ikiz göz oluşumu; KK 30 Gy 1
- d) Boğum arasının kısalması; SÇ 30 Gy 34
- e) Kış gözünden yaprak oluşumu, SÇ 25 Gy 14
- f) Sülükden yaprak oluşumu; SÇ 30 Gy 14



Şekil 4.2 Yapraklarda gözlenen fenotipik değişimler

Yaprakda klorofil mutasyonları; a) SÇ 25 Gy 43 b) KK 25 Gy 8

Yapraklarda şekil anormallikleri; c) SÇ 30 Gy 9 d) KK 20 Gy 70
f) KK 40 Gy 36 g) KK 20 Gy 79

İri yaprak oluşumu; e) KK 20 Gy 61

Gelişme şekli bakımından yaz sürgünleri dik uzama eğiliminde olan, kolay gövde oluşturan kuvvetli gelişme özelliğindeki asmalara karşılık, yaz sürgünleri kısa olan ve koltuk sürgünü oluşturma eğilimindeki asmalar genel olarak zayıf, çalimsı görünümde bitkiler oluşturmuşlardır. Bu özelliklere göre asmalar kuvvetli gelişenler ile zayıf gelişenler olmak üzere iki alt grupta toplanmıştır. Henüz yenice döneminde olan asmalarda sürgün ve göz yapısı bakımından mutasyon etkilerini yansıtan farklılıklar üç alt sınıfta değerlendirilmiştir. Sürgünlerde boğum aralarının kısalması, boğumlarda ikiz göz oluşumu ve az sayıda olmakla birlikte kış gözü üzerinde yaprak oluşumudur. Yine çok az sayıda olmakla beraber sülüklerde şekilsel anormallikler gözlenmiştir.

Her iki çeşitte gama ışını uygulamalarının en önemli etkisi yapraklarda belirlenmiştir. Özellikle klorofil mutasyonları olarak tanımlanan (Sangsivi *et al.* 2005) yaprak yüzeyinde bölgesel renksiz alanlar veya şeritler ya da nokta lekeler halindeki renksiz alanlar gözlenmiştir. Işın uygulamaları sonucunda yaygın olarak görülmesi beklenen bir diğer oluşum, yapraklarda şekil bozukluklarıdır. Araştırmada, normal yaprak yapılarından farklı olarak çok iri yapraklar görülmüş, ayrıca yaprak ayasının dalgalı ve sert bir yapı kazanması, dilim sayısı ve şeklinin değişmesi gibi şekil bozuklukları da belirlenmiştir.

4.2 Mutant Adaylarının Sitolojik Tanımlanması

Sultani Çekirdeksiz ve Kalecik karası mutant adaylarının diploid ve ploid mutant olma özellikleri kromozom sayımları yapılarak incelenmiştir. Ploid bireylere ulaşma oranını arttırmak amacıyla her iki çeşitte genel ortalamanın üzerinde çok kuvvetli gelişme eğiliminde olan ve çok iri yaprak oluşturmaları ile farklı bulunan bireyler seçilerek kromozom sayımları yapılmıştır.

Sultani Çekirdeksiz üzüm çeşidinde ışın dozlarına göre 20 Gy'den 2 adet, 25 Gy'den 4, 30 Gy'den 19 bireyde kromozom sayımı yapılmıştır. 30 Gy uygulaması ile elde edilen bireylerin kuvvetli gelişme ve iri yaprak oluşturma eğilimleri diğer dozlardan daha fazla olduğundan bu uygulamadan 19 birey seçmek mümkün olmuştur. Dozlara göre bitki sayısı, aday numaraları ve kromozom sayımı sonuçlarının birlikte sunulduğu

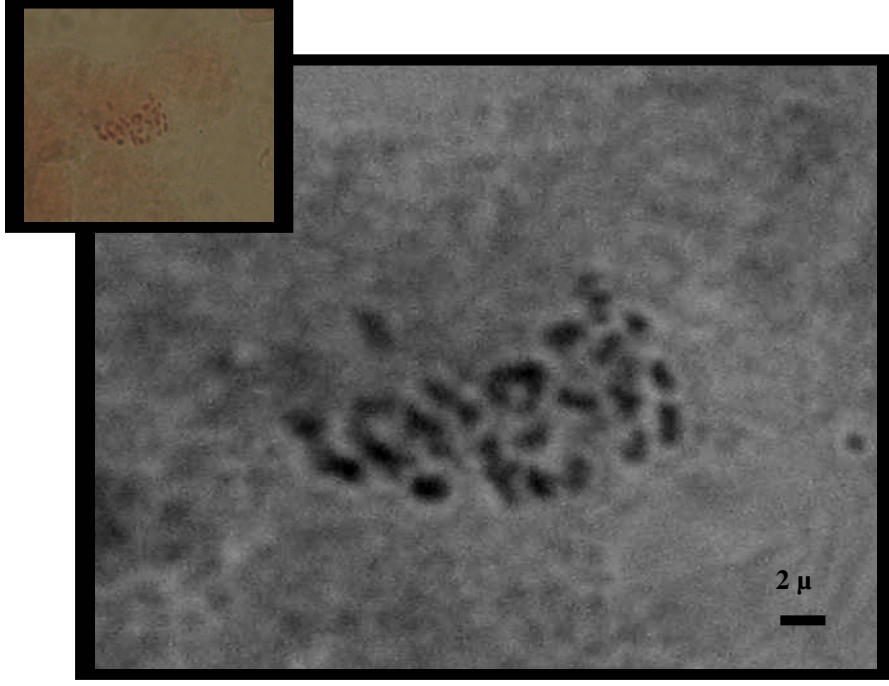
Çizelge 4.3'den görülebileceği gibi; Sultani Çekirdeksiz mutant adayları daha çok diploid kromozom sayısı ile tanımlanmıştır. Ancak 30 Gy uygulaması sonucunda elde edilen SÇ 30 Gy 34 no'lu birey, $2n=2x=38$ kromozom sayısından daha fazla ancak sayılamayan nitelikte ploid kromozom sayısı bulunan tek genotip olarak önem kazanmıştır. Sultani Çekirdeksiz kontrol ve mutant adayı bireylerinden elde edilen diploid ve bir adet ploid kromozom sayısını gösteren mikrofotograflar şekillerde (Şekil 4.3- 4.15) sunulmuştur.

Kalecik karası populasyonundan seçilen mutant adaylarının 2 adedi 20 Gy, 5 adedi 25 Gy, 8 adedi 30 Gy, 2 adedi 40 Gy ve 1 adedi 45 Gy uygulamasından elde edilmiştir. Populasyonda gerçekleştirilen sitolojik inceleme sonuçları incelenen bireyler düzeyinde kromozom sayısının diploid düzeyde olduğunu açığa çıkarmış, ploid birey tespit edilememiştir (Çizelge 4.3). Şekil 4.16-4.25'de Kalecik karası kontrol ve mutant adayı bireylerinden elde edilen kromozom sayısını gösteren mikrofotograflar sunulmuştur.

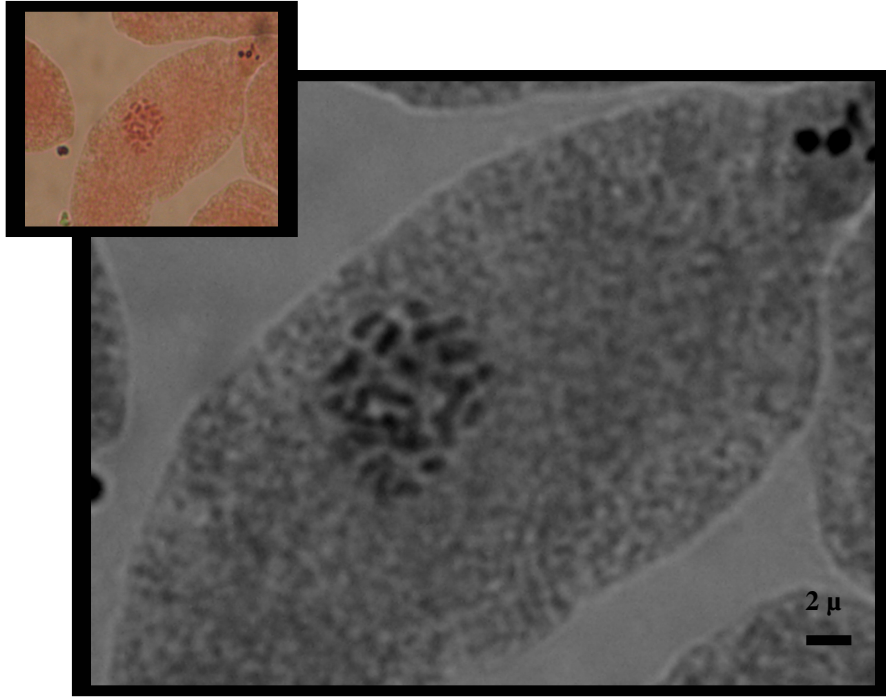
Çizelge 4.3 Sultani Çekirdeksiz ve Kalecik karası üzüm çeşitlerinde sitolojik gözlem sonuçları

Sultani Çekirdeksiz			Kalecik karası		
No	Birey adı		No	Birey adı	
1	SÇ 20 Gy 29	2x	1	KK 20 Gy 61	2x
2	SÇ 20 Gy 41	2x	2	KK 20 Gy 70	2x
3	SÇ 25 Gy 14	2x	3	KK 25 Gy 24	2x
4	SÇ 25 Gy 17	2x	4	KK 25 Gy 35	2x
5	SÇ 25 Gy 38	2x	5	KK 25 Gy 42	2x
6	SÇ 25 Gy 48	2x	6	KK 25 Gy 58	2x
7	SÇ 30 Gy 2	2x	7	KK 25 Gy 60	2x
8	SÇ 30 Gy 3	2x	8	KK 30 Gy 1	2x
9	SÇ 30 Gy 5	2x	9	KK 30 Gy 2	2x
10	SÇ 30 Gy 7	2x	10	KK 30 Gy 6	2x
11	SÇ 30 Gy 9	2x	11	KK 30 Gy 7	2x
12	SÇ 30 Gy 11	2x	12	KK 30 Gy 8	2x
13	SÇ 30 Gy 12	2x	13	KK 30 Gy 9	2x
14	SÇ 30 Gy 13	2x	14	KK 30 Gy 18	2x
15	SÇ 30 Gy 14	2x	15	KK 30 Gy 19	2x
16	SÇ 30 Gy 17	2x	16	KK 40 Gy 18	2x
17	SÇ 30 Gy 19	2x	17	KK 40 Gy 36	2x
18	SÇ 30 Gy 20	2x	18	KK 45 Gy 11	2x
19	SÇ 30 Gy 31	2x			
20	SÇ 30 Gy 33	2x			
21	SÇ 30 Gy 34	>2x			
22	SÇ 30 Gy 35	2x			
23	SÇ 30 Gy 37	2x			
24	SÇ 30 Gy 40	2x			
25	SÇ 30 Gy 45	2x			
26	SÇ 50 Gy 3*	2x			

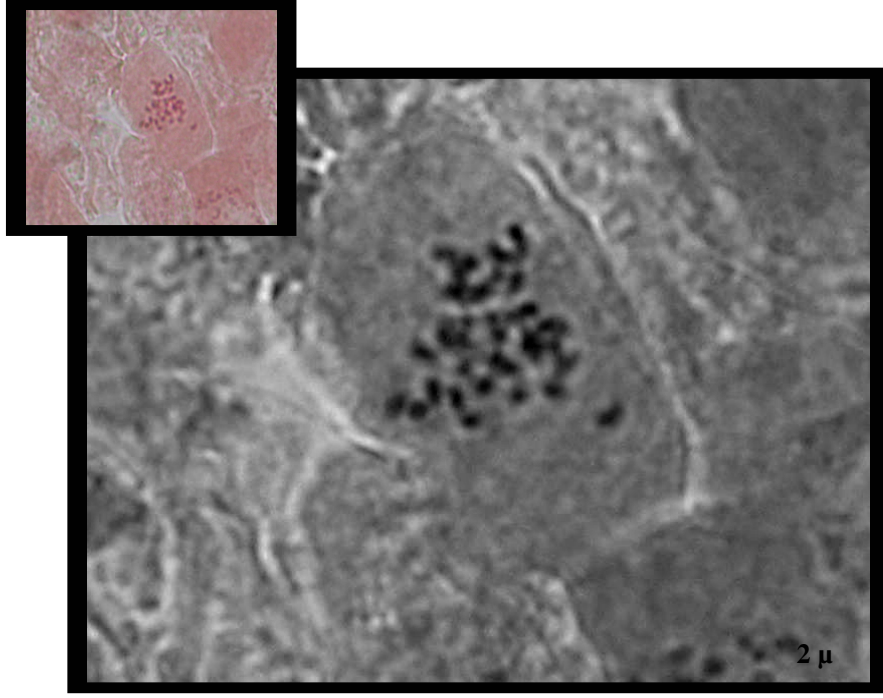
* Proje parseline sitolojik incelemelerde kullanılmak üzere tez çalışmasında yer almıştır.



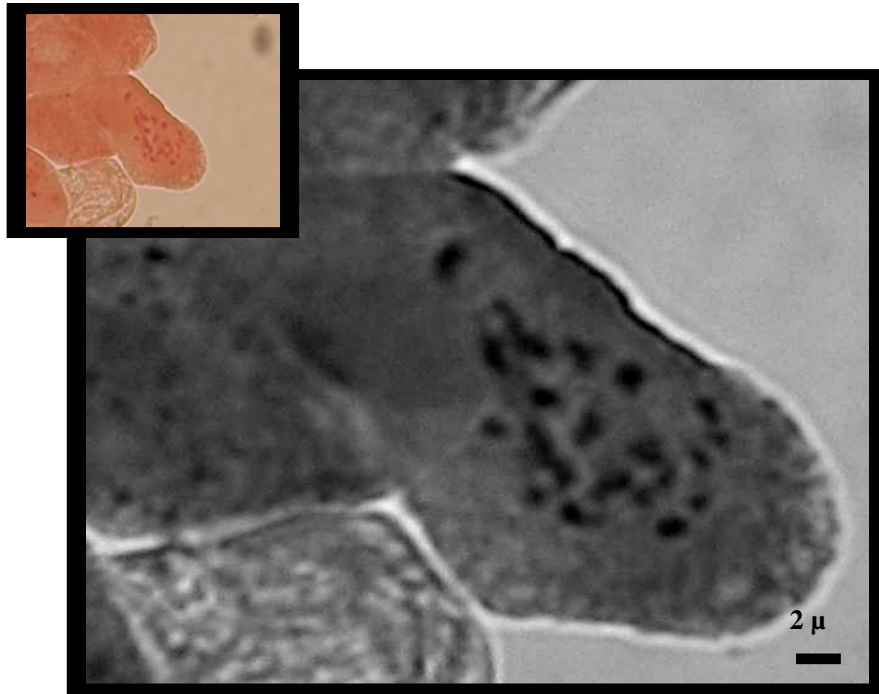
Şekil 4.3 Sultani Çekirdeksiz üzüm çeşidi kontrol örneğine ait diploid yapı (2x) kromozom görüntüsü



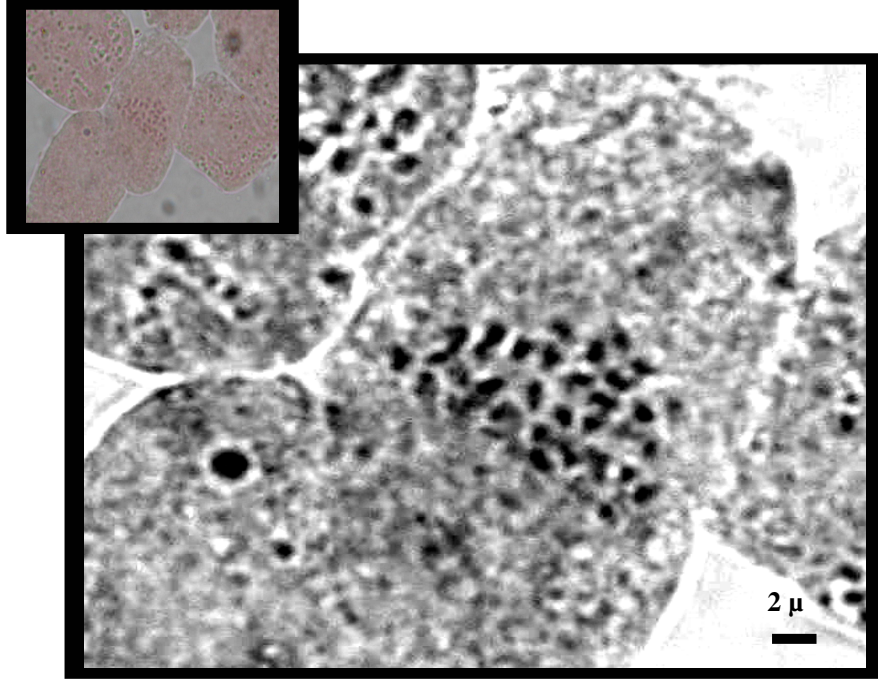
Şekil 4.4 SÇ 20 Gy 29 nolu mutant adayı bireye ait diploid yapı (2x) kromozom görüntüsü



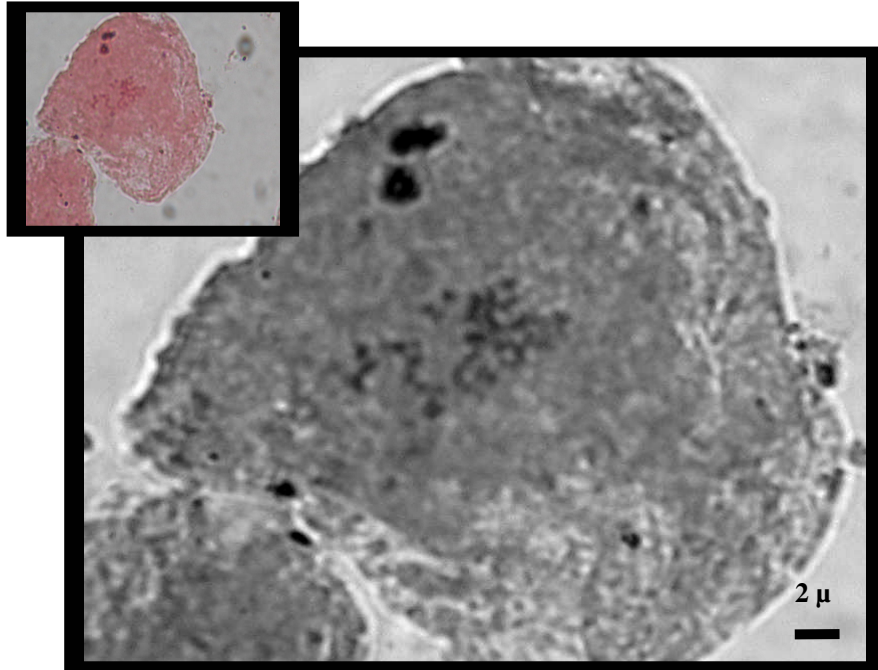
Şekil 4.5 SÇ 25 Gy 17 nolu mutant adayı bireye ait diploid yapı (2x) kromozom görüntüsü



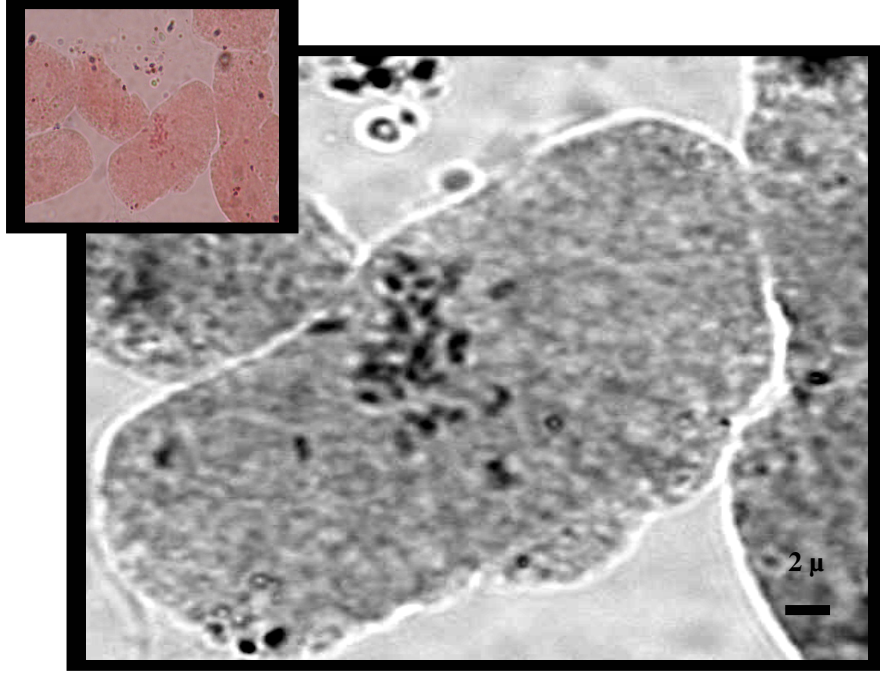
Şekil 4.6 SÇ 25 Gy 38 nolu mutant adayı bireye ait diploid yapı (2x) kromozom görüntüsü



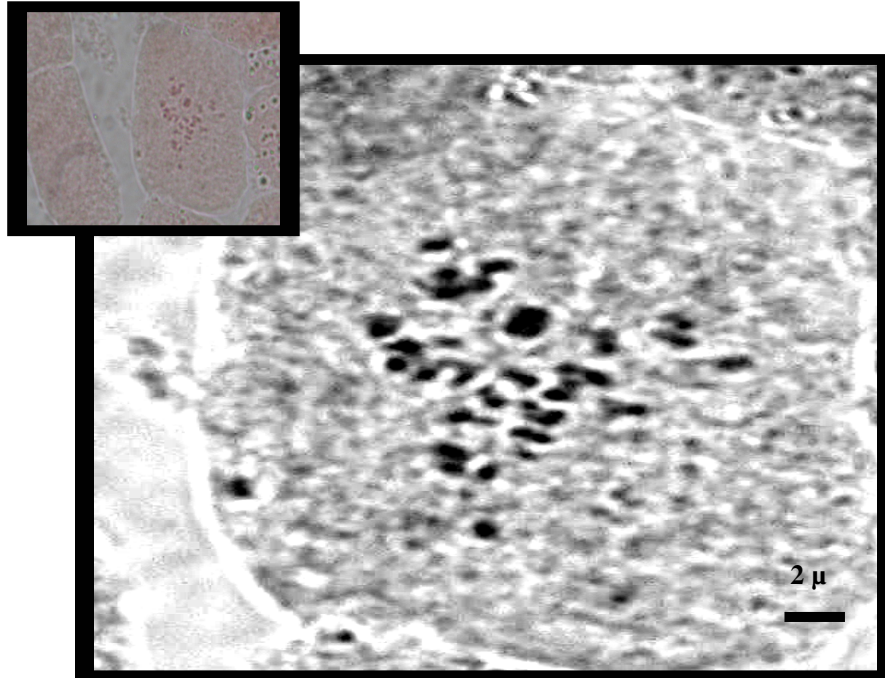
Şekil 4.7 SÇ 30 Gy 3 nolu mutant adayı bireye ait diploid yapı (2x) kromozom görüntüsü



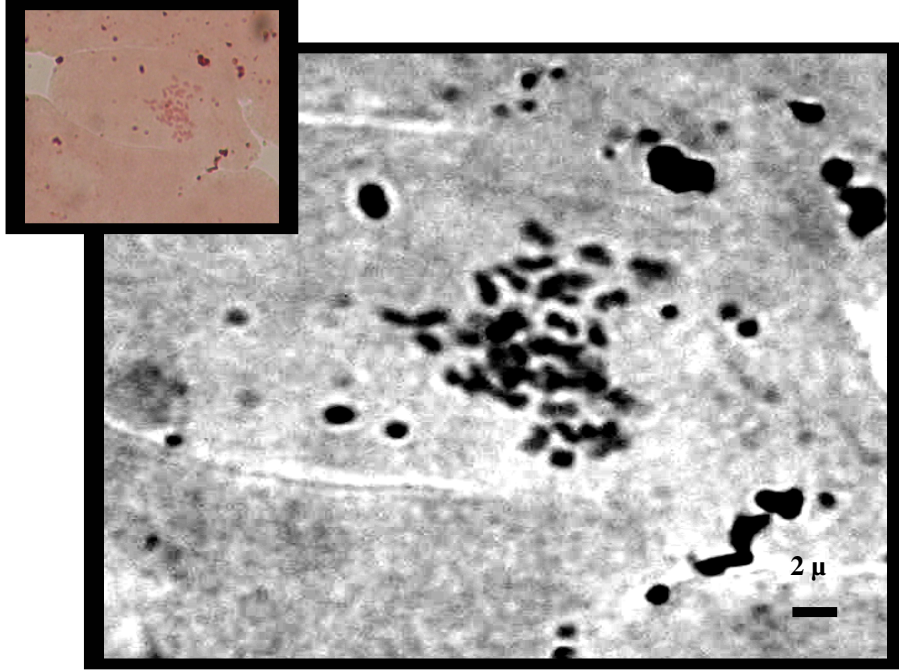
Şekil 4.8 SÇ 30 Gy 9 nolu mutant adayı bireye ait diploid yapı (2x) kromozom görüntüsü



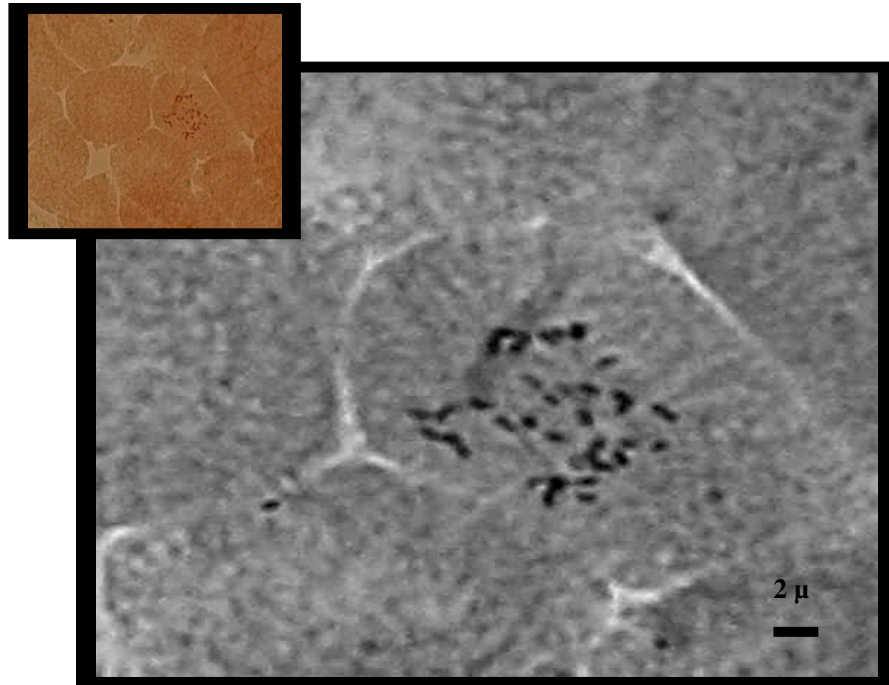
Şekil 4.9 SÇ 30 Gy 12 nolu mutant adayı bireye ait diploid yapı (2x) kromozom görüntüsü



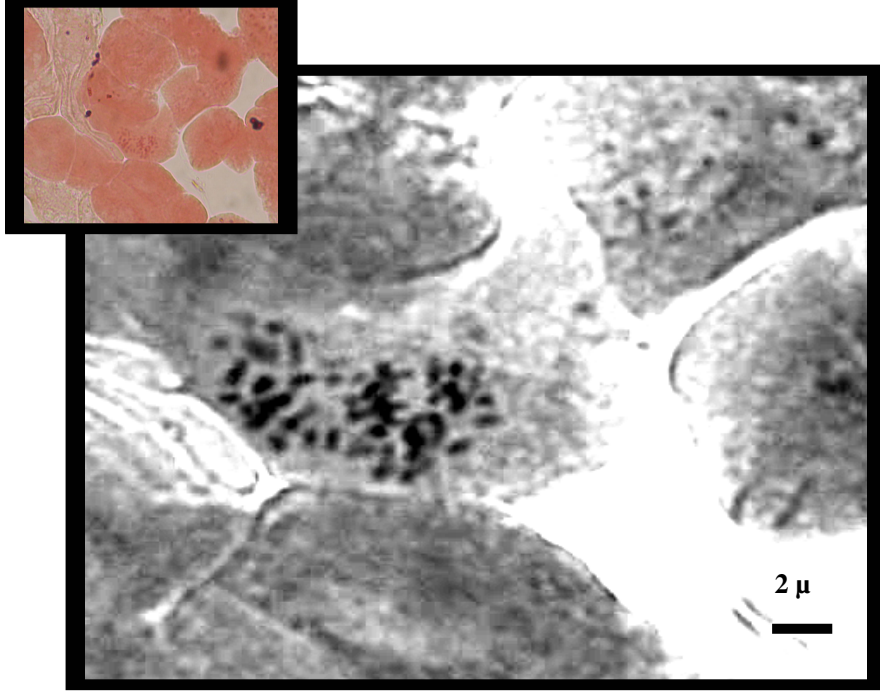
Şekil 4.10 SÇ 30 Gy 14 nolu mutant adayı bireye ait diploid yapı (2x) kromozom görüntüsü



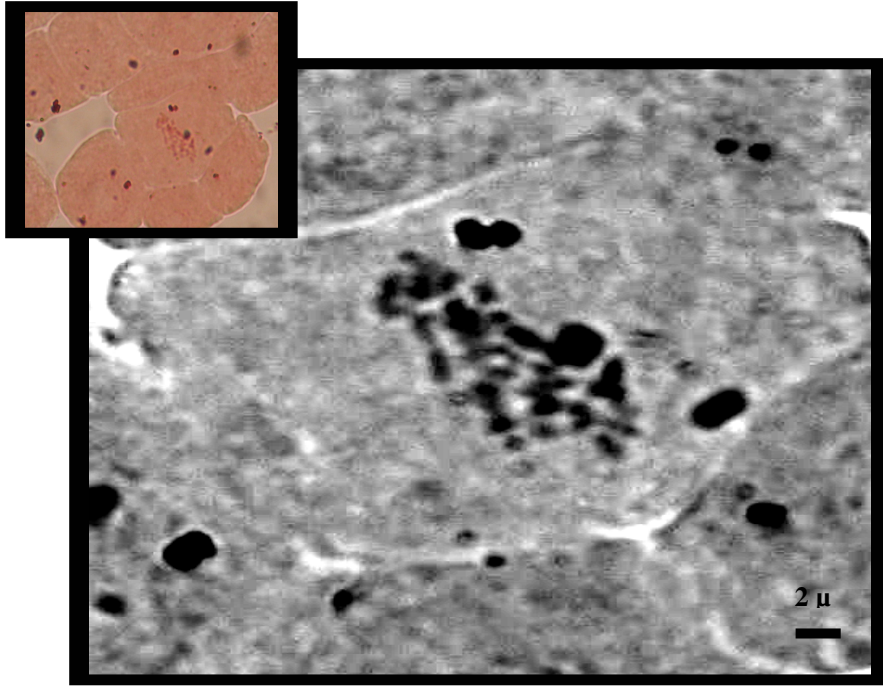
Şekil 4.11 SÇ 30 Gy 19 nolu mutant adayı bireye ait diploid yapılı (2x) kromozom görüntüsü



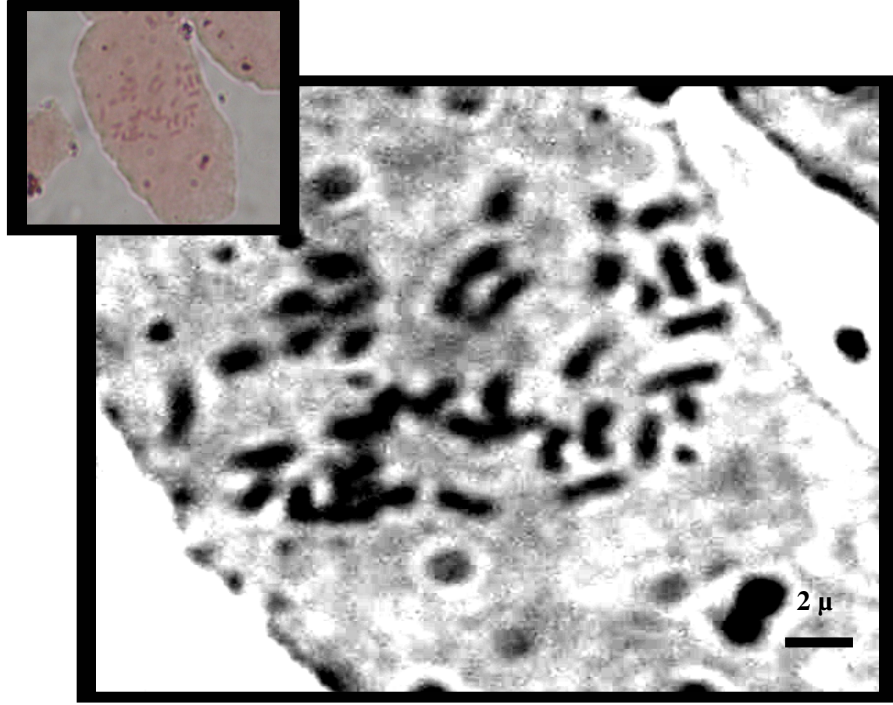
Şekil 4.12 SÇ 30 Gy 33 nolu mutant adayı bireye ait diploid yapılı (2x) kromozom görüntüsü



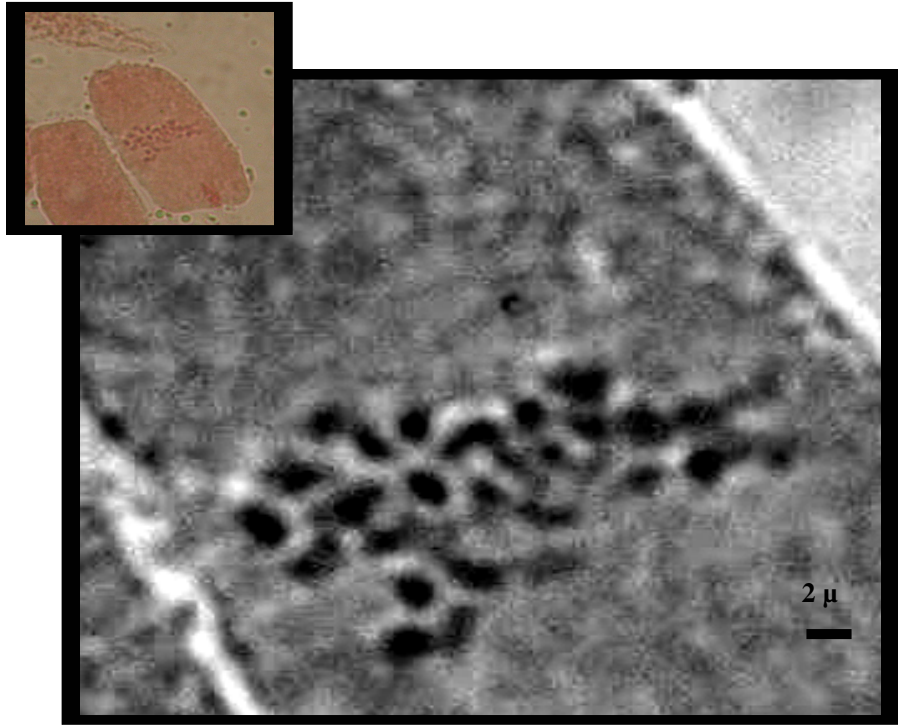
Şekil 4.13 SÇ 30 Gy 34 nolu mutant adayı bireye ait ploid yapılı (>2x) kromozom görüntüsü



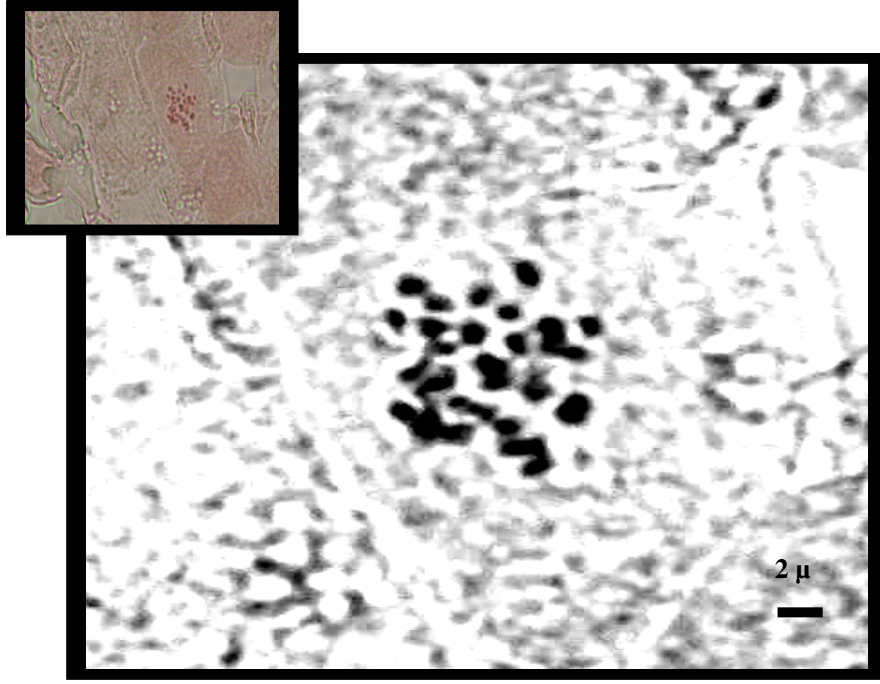
Şekil 4.14 SÇ 30 Gy 40 nolu mutant adayı bireye ait diploid yapılı (2x) kromozom görüntüsü



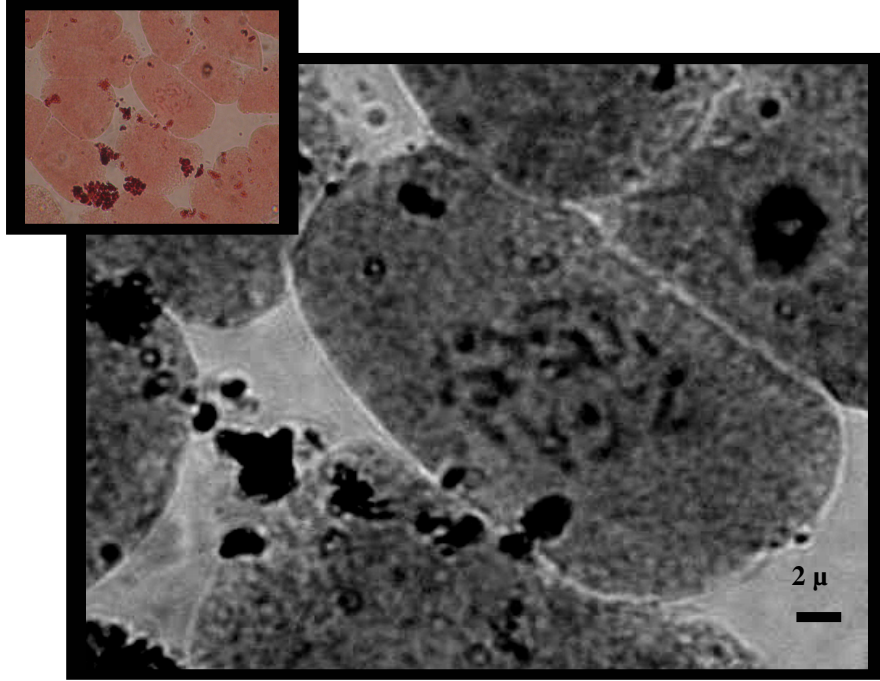
Şekil 4.15 SÇ 30 Gy 45 nolu mutant adayı bireye ait diploid yapılı (2x) kromozom görüntüsü



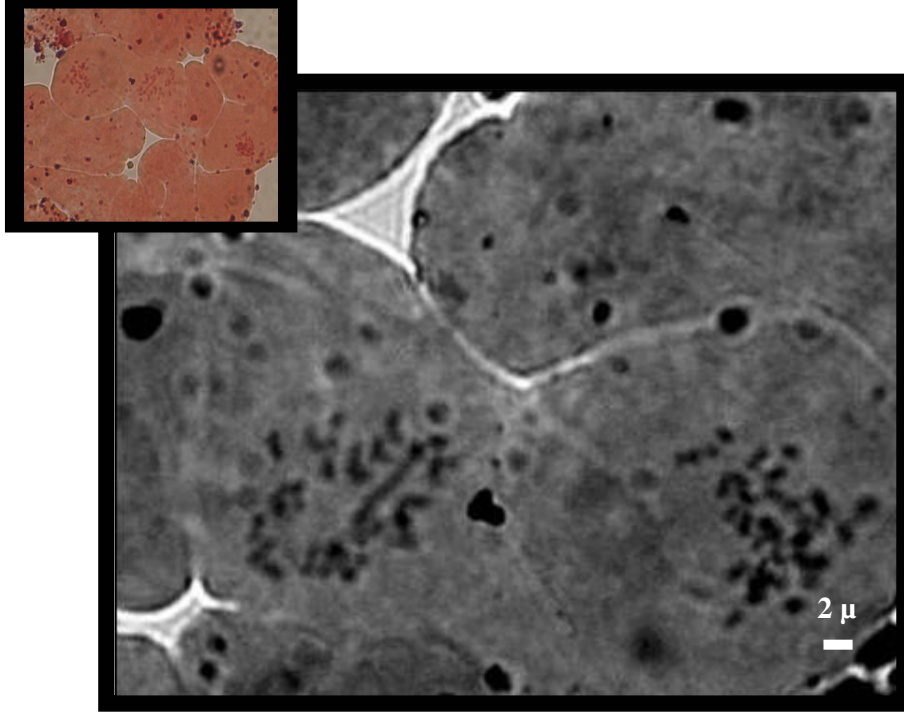
Şekil 4.16 Kalecik karası üzüm çeşidi kontrol örneğine ait diploid (2x) yapılı kromozom görüntüsü



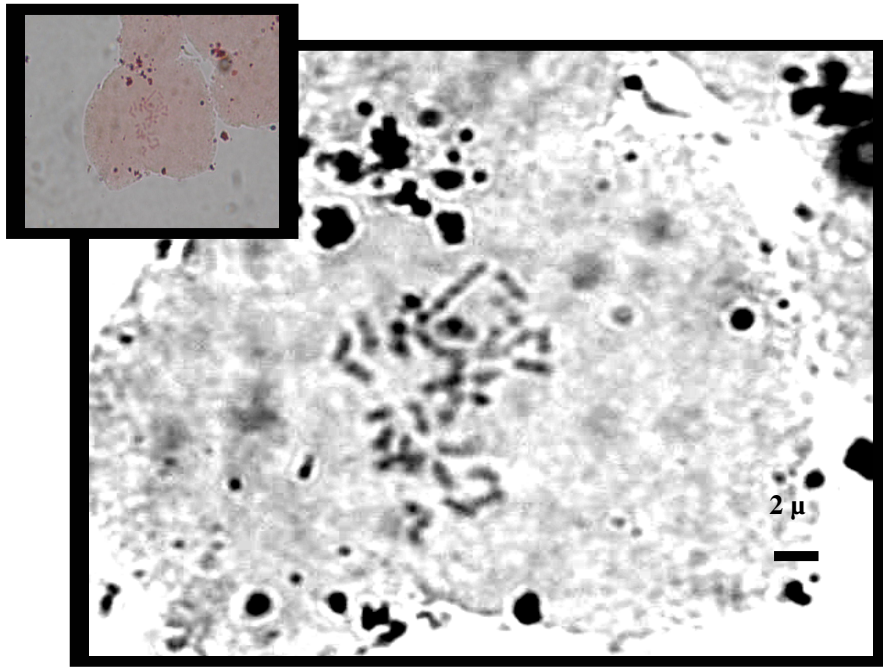
Şekil 4.17 KK 20 Gy 61 nolu mutant adayı bireye ait diploid yapılı (2x) kromozom görüntüsü



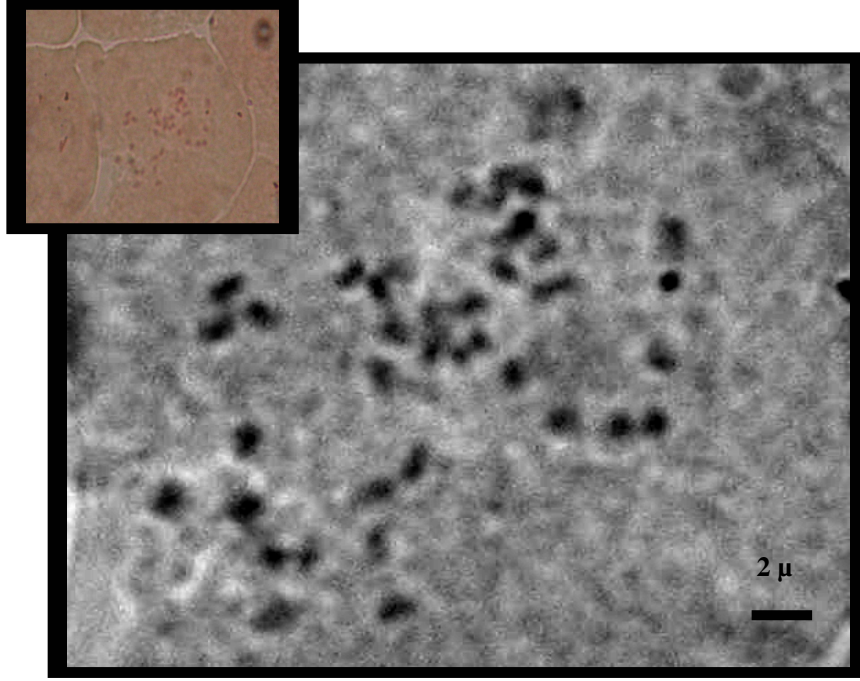
Şekil 4.18 KK 20 Gy 70 nolu mutant adayı bireye ait diploid yapılı (2x) kromozom görüntüsü



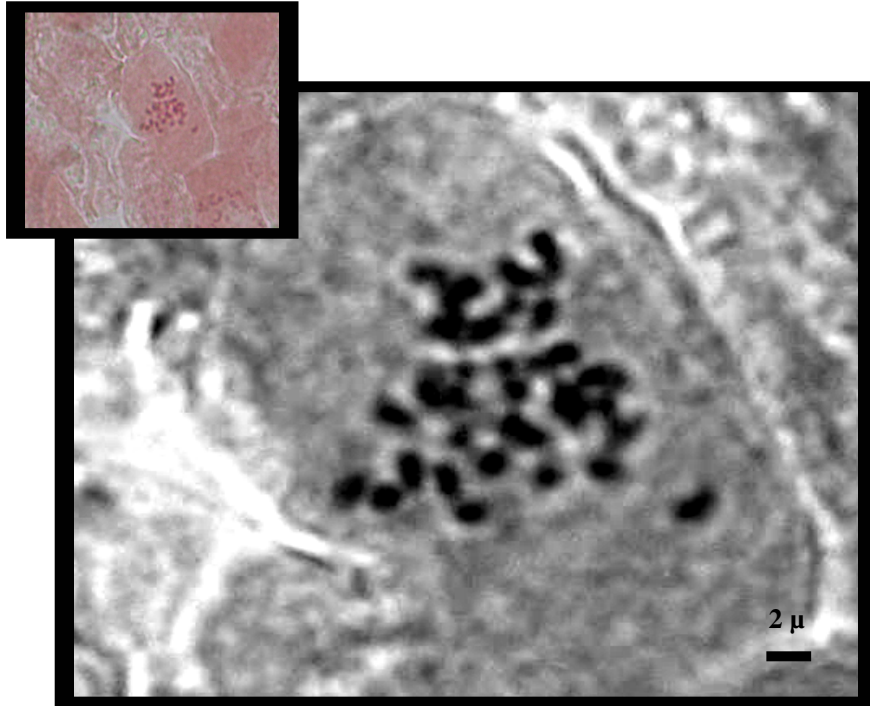
Şekil 4.19 KK 25 Gy 58 nolu mutant adayı bireye ait diploid yapı (2x) kromozom görüntüsü



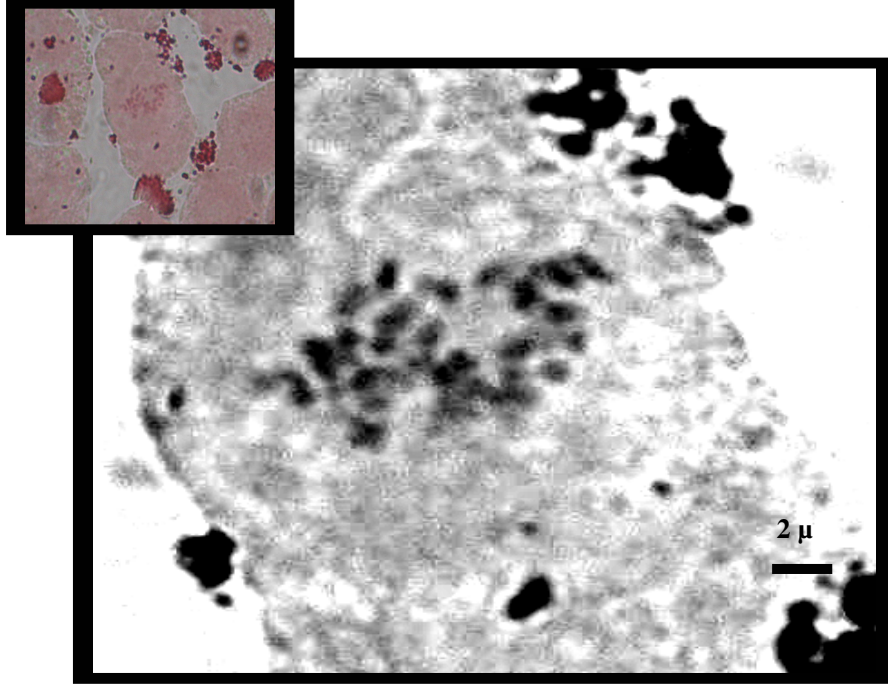
Şekil 4.20 KK 25 Gy 60 nolu mutant adayı bireye ait diploid yapı (2x) kromozom görüntüsü



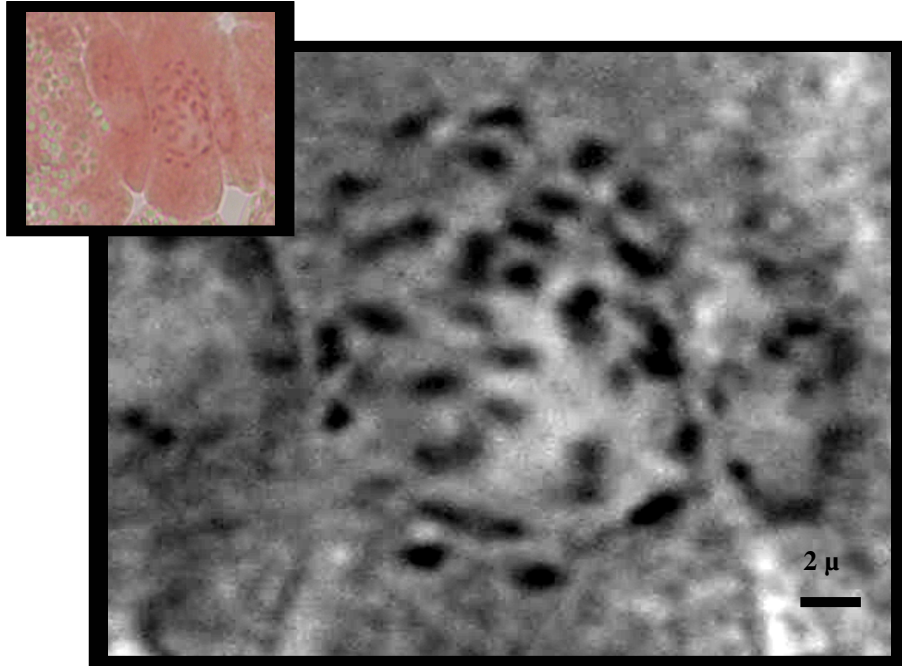
Şekil 4.21 KK 30 Gy 7 nolu mutant adayı bireye ait diploid yapı (2x) kromozom görüntüsü



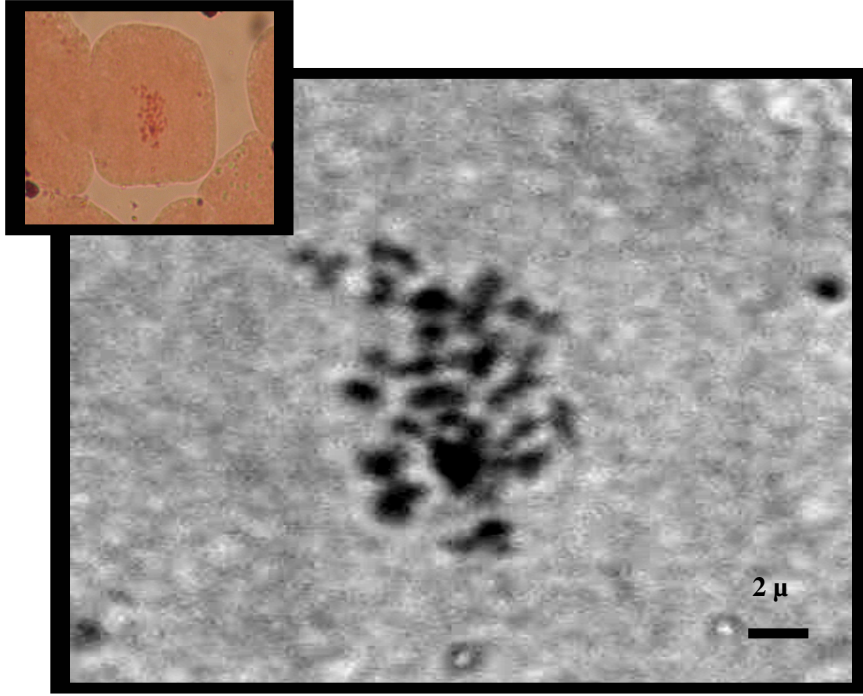
Şekil 4.22 KK 30 Gy 9 nolu mutant adayı bireye ait diploid yapı (2x) kromozom görüntüsü



Şekil 4.23 KK 30 Gy 18 nolu mutant adayı bireye ait diploid yapılı (2x) kromozom görüntüsü



Şekil 4.24 KK 30 Gy 19 nolu mutant adayı bireye ait diploid yapılı (2x) kromozom görüntüsü



Şekil 4.25 KK 40 Gy 36 nolu mutant adayı bireye ait diploid yapılı (2x) kromozom görüntüsü

4.3 SSCP Analiz Çalışmaları

Morfolojik gözlemler ve sitolojik incelemeler sonrasında her iki çeşide ait populasyon içerisinde seçilen mutant adayı bireylerde DNA üzerinde mutasyon bölgelerinin belirlenebilmesi amacıyla uygulanan SSCP tekniğinden elde edilen bulgular, yöntem aşamalarına göre aşağıda sunulmuştur.

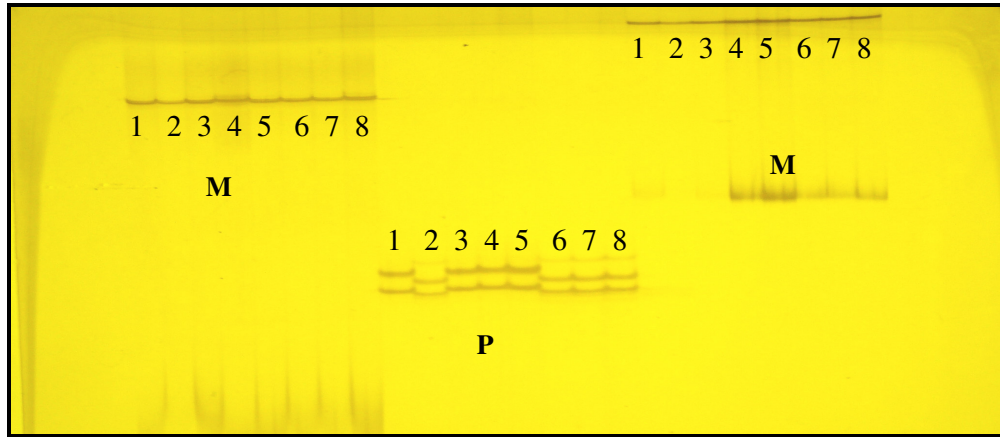
4.3.1 SSCP analizlerinde kullanılacak primerlerin seçilmesi

Asmalarda SSCP markörlerin kullanılması ve asma genotiplerine özel markörlerin geliştirilmesi önemli bir araştırma alanı olup, henüz yayın eksikliği bulunmaktadır. Bu nedenle, ilk aşamada bitkilerde genel olarak vejetatif gelişmeden sorumlu olduğu bilinen genler (NCBI: www.ncbi.nlm.nih.gov) arasından seçilen 50 adet primerin mutant adayı bireylerdeki çalışma durumu incelenmiştir. Böylece, kontrol ve mutant

adayı bireylerin moleküler düzeyde tanımlanmasında en etkili amplifikasyon ve polimorfizmi verebilecek primerlerin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Sultani Çekirdeksiz ve Kalecik karası üzüm çeşitlerine ait mutant adayları içerisinde tesadüfen 6 birey seçilmiştir. Bu bireyler, SÇ 25 Gy 40, SÇ 30 Gy 2, SÇ 40 Gy 21 ile KK 30 Gy 9, KK 30 Gy 19 ve KK 30 Gy 53. Her iki çeşide ait kontrol bireyleri ile birlikte toplam 8 adet bireyde 50 SSCP primeri ile analiz yapılmıştır.

Taranan primerlerden 10 tanesinde PCR amplifikasyonu elde edilemezken, 40 primerden PCR ürünü elde edilmiş ve bu primerler SSCP analizinde kullanılmak üzere seçilmiştir. İkinci aşamada 40 adet primer ile SSCP analizi yapılmış ve Şekil 4.26'dan izlenenebileceği gibi PCR ürünü elde edilen bu primerlerden monomorfik ve polimorfik bantlar elde edilmiştir. Buna göre primerlerin 25 adedinde monomorfik bantlar elde edildiğinden bunlar elenmiş ve polimorfik bant veren 15 adet primer (RADIC 118, RADIC 294, RADIC 561, RADIC 1104, RADIC 1188, RADIC 1517, GEMMA 243, GEMMA 334, GEMMA 1026, GEMMA 1097, GERMO 220, GERMO 890, INFIO 432, INFIO 622, FOGLIO 236,) seçilmiş mutant adayı bireylerin tanımlanmasında kullanılmak üzere belirlenmiştir.



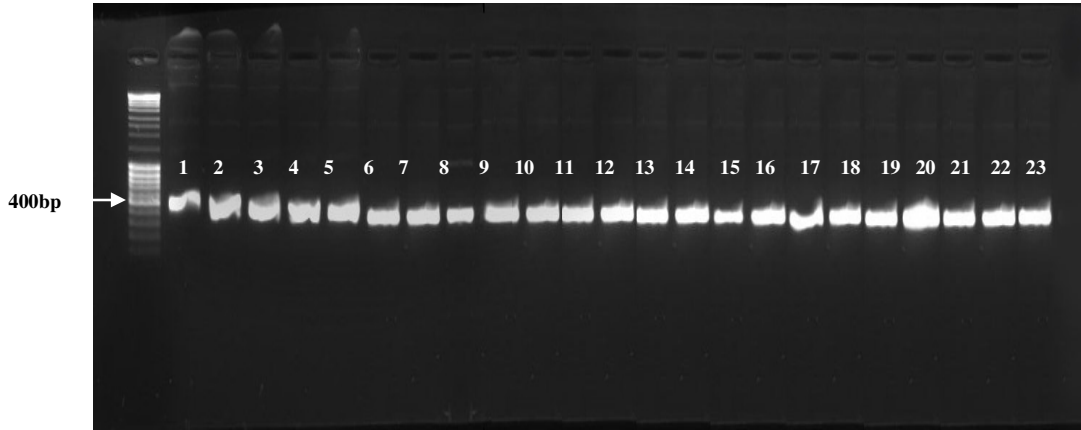
Şekil 4.26 GEMMA 1639, GEMMA 1026 ve GEMMA 1525 primerleri ile SSCP analiz sonuçlarına ait jel görüntüsü

[P: polimorfik, M: monomorfik (1: Kalecik karası-kontrol, 2: Sultani Çekirdeksiz-kontrol, 3: KK 30 Gy 19, 4: KK 30Gy 9, 5: KK 30 Gy 53, 6: SÇ 25 Gy 40, 7: SÇ 30 Gy 2, 8: SÇ 40 Gy 21)]

4.3.2 Mutant adaylarının SSCP markörler ile genetik tanımlanması

Belirlenen 15 adet polimorfik primer ile, Sultani Çekirdeksiz ve Kalecik karası üzüm çeşitlerinden elde edilen 22'şer adet mutant adayı, kontrol bireyler ile karşılaştırılacak şekilde SSCP analizleri yürülmüştür.

SSCP analiz çalışmalarında ilk aşamayı amplifikasyon çalışmaları oluşturmaktadır. Her SSCP primeri ile öncelikli olarak PCR amplifikasyon işlemi yapılmıştır. Buna göre üzerinde çalışılan 46 örnekte seçilmiş 15 primer ile amplifikasyon yapılmıştır. PCR amplifikasyonu sonucunda üzerinde çalışılan primerlerle yaklaşık 200-500bp aralığında bantlar elde edilmiştir. Üzerinde çalışılan 15 primer ile her iki çeşitte agaroz jel üzerinde amplifikasyon görüntüleri elde edilmiştir. Örnek olması bakımından, Sultani Çekirdeksiz üzüm çeşidine ait yaklaşık 400 bp uzunluğunda bant deseni veren RADIC 294 nolu primer ile PCR ürününün agaroz jel üzerindeki görüntüsü Şekil 4.27'de verilmiştir.



Şekil 4.27 Sultani Çekirdeksiz üzüm çeşidine ait RADIC 294 nolu primer ile amplifikasyon görüntüsü

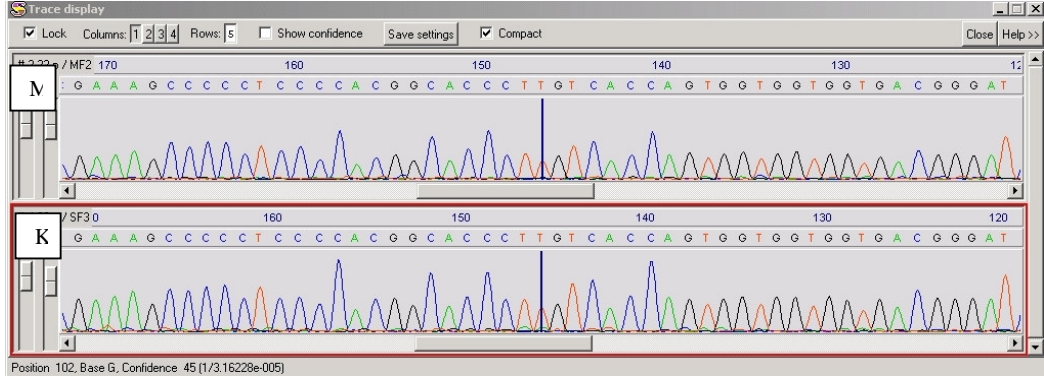
1: Kontrol, 2: SÇ 20 Gy 29, 3: SÇ 20 Gy 46, 4: SÇ 20 Gy 69, 5: SÇ 25 Gy 2, 6: SÇ 25 Gy 12, 7: SÇ 25 Gy 14, 8: SÇ 25 Gy 40, 9: SÇ 25 Gy 43, 10: SÇ 25 Gy 44, 11: SÇ 25 Gy 48, 12: SÇ 25 Gy 60, 13: SÇ 25 Gy 61, 14: SÇ 30 Gy 2, 15: SÇ 30 Gy 5, 16: SÇ 30 Gy 9, 17: SÇ 30 Gy 11, 18: SÇ 30 Gy 14, 19: SÇ 30 Gy 34, 20: SÇ 30 Gy 41, 21: SÇ 30 Gy 44, 22: SÇ 40 Gy 21, 23: SÇ 50 Gy 3

Amplifikasyonu takip eden ikinci aşamada, PCR ürünleri kullanılarak SSCP analizleri yapılmıştır. Buna göre, SSCP analizleri sonucunda tekrar edilir nitelikte polimorfik bant desenlerine rastlanmamıştır. SSCP jel görüntülerinde genel olarak, çalışılan 15 primer ile monomorfik bantlar elde edilmiştir.

Sultani Çekirdeksiz'e ait 22 aday ve bir adet kontrol örneği olmak üzere toplam 23 adet bireyde, 15 primer ile gerçekleştirilen SSCP analizine göre, kontrol bitkisi ve tüm mutant adayları RADIC 294 primeri dışında 14 adet primer ile monomorfik bant desenleri elde edilmiş yani bireyler arasında primerlerin taradığı bölgeler bakımından farklılık bulunmamıştır. Söz konusu primerler ile Sultani Çekirdeksiz üzüm çeşidinde gerçekleştirilen çalışmalara ait jel sonuçları Şekil 4.29- 4.43'da verilmiştir.

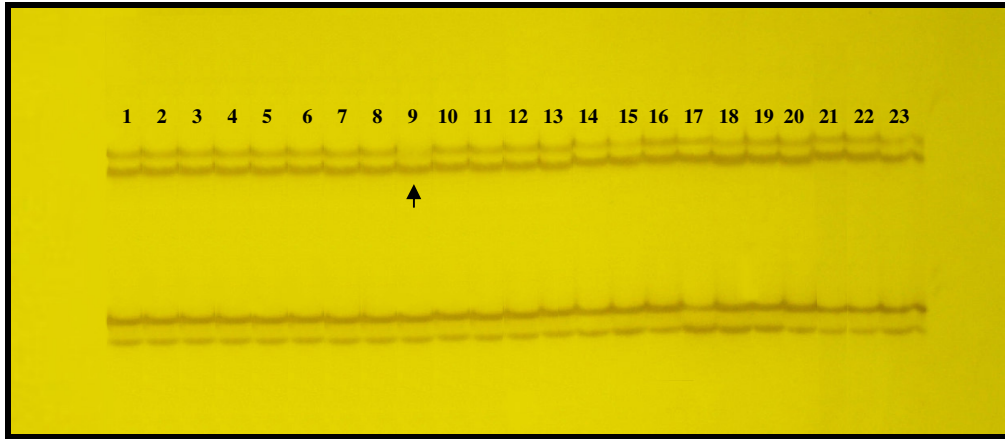
Sitolojik çalışmalar sonucu ploid olduğu belirlenmiş olan SÇ 30 Gy 34 bireyi ile, proje kapsamında incelenen bir aday olmasına karşın, çekirdekli olması ile belirgin morfolojik farklılık gösteren ve bu nedenle tez çalışması kapsamında SSCP analizlerine dahil edilen SÇ 50 Gy 3 bireyi de izlenen yöntemde monomorfik bant desenleri göstermişlerdir.

Diğer taraftan, RADIC 294 primeri ile SÇ 25 Gy 43 no'lu bireyde iki kez tekrar edilen polimorfik bant deseni elde dilmistir (Şekil 4.29). Bunun üzerine ilgili primer ile dizi analizi yapılarak değişimin nükleotit bazında gerçekleşme durumu araştırılmıştır. Sekans analizi sonucunda, RADIC 294 primeri ile SÇ 25 Gy 43 numaralı polimorfik bant deseni veren aday mutant birey kontrol örneği ile birlikte incelenmiş ancak nükleotid düzeyinde bir farklılık olmadığı tesbit edilmiştir (Şekil 4.28).



Şekil 4.28 SÇ 25Gy 43 nolu aday mutant bireye ait sekans analiz sonucunun kromotogram görüntüsü
M: mutant adayı birey (SÇ 25 Gy 43), K: SÇ-kontrol

Kalecik karası üzüm çeşidinde ise yine aynı şekilde, 22 mutant adayı ve 1 adet kontrol bireyi olmak üzere toplam 23 adet birey, 15 primer kullanılarak SSCP analizi ile tanımlanmıştır. Elde edilen jel görüntülerinde mutant adayları kontrolden farklı bulunmadığı gibi, birbirleri arasında da polimorfizm göstermemişlerdir. Çalışmanın bu bölümüne ait bant desenlerini gösteren jel görüntülerinden elde edilen sonuçlar Şekil 4.44- 4.58’de sunulmuştur.



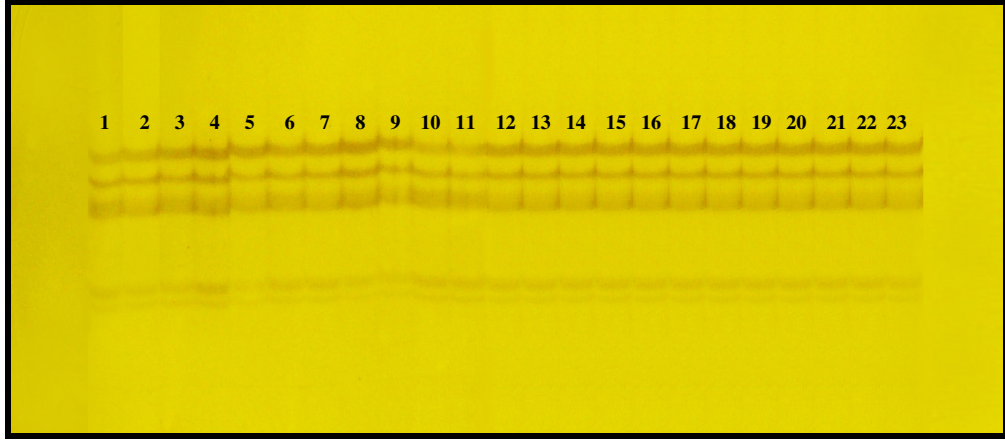
Şekil 4.29 Sultani Çekirdeksiz üzüm çeşidinde ait kontrol ve mutant adayı bireylerde RADIC 294 primeri ile SSCP jel görüntüsü

1: Kontrol, 2: SÇ 20 Gy 29, 3: SÇ 20 Gy 46, 4: SÇ 20 Gy 69, 5: SÇ 25 Gy 2, 6: SÇ 25Gy 12, 7: SÇ 25 Gy 14, 8: SÇ 25 Gy 40, 9: SÇ 25 Gy 43, 10: SÇ 25 Gy 44, 11: SÇ 25 Gy 48, 12:SÇ 25 Gy 60, 13: SÇ 25 Gy 61, 14: SÇ 30 Gy 2, 15: SÇ 30 Gy 5, 16: SÇ 30 Gy 9, 17: SÇ 30 Gy 11, 18: SÇ 30 Gy 14, 19: SÇ 30 Gy 34, 20: SÇ 30 Gy 41, 21: SÇ 30 Gy 44, 22: SÇ 40 Gy 21, 23: SÇ 50 Gy 3
Not: Ok işareti SÇ 25 Gy 43 numaralı mutant adayı bireye ait polimorfik bant desenini göstermektedir.



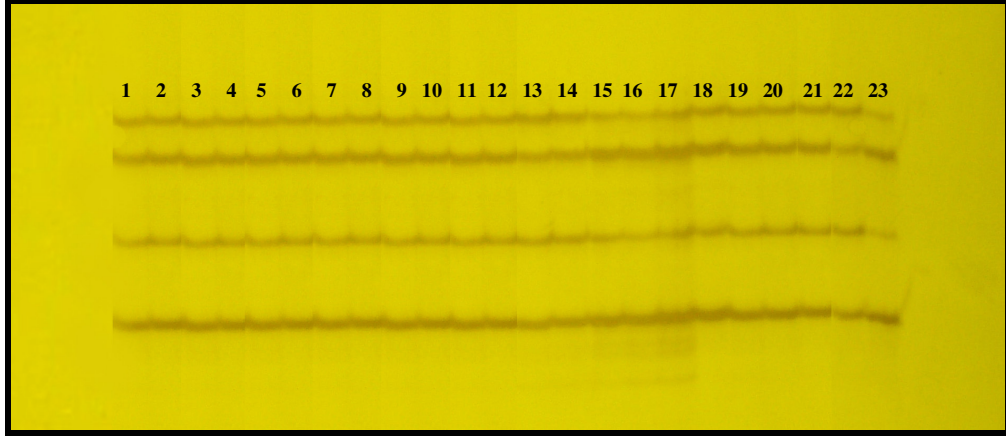
Şekil 4.30 Sultani Çekirdeksiz üzüm çeşidine ait kontrol ve mutant aday bireylerde RADIC 118 primeri ile SSCP jel görüntüsü

1: Kontrol, 2: SÇ 20 Gy 29, 3: SÇ 20 Gy 46, 4: SÇ 20 Gy 69, 5: SÇ 25 Gy 2, 6: SÇ 25Gy 12, 7: SÇ 25 Gy 14, 8: SÇ 25 Gy 40, 9: SÇ 25 Gy 43, 10: SÇ 25 Gy 44, 11: SÇ 25 Gy 48, 12: SÇ 25 Gy 60, 13: SÇ 25 Gy 61, 14: SÇ 30 Gy 2, 15: SÇ 30 Gy 5, 16: SÇ 30 Gy 9, 17: SÇ 30 Gy 11, 18: SÇ 30 Gy 14, 19: SÇ 30 Gy 34, 20: SÇ 30 Gy 41, 21: SÇ 30 Gy 44, 22: SÇ 40 Gy 21, 23: SÇ 50 Gy 3



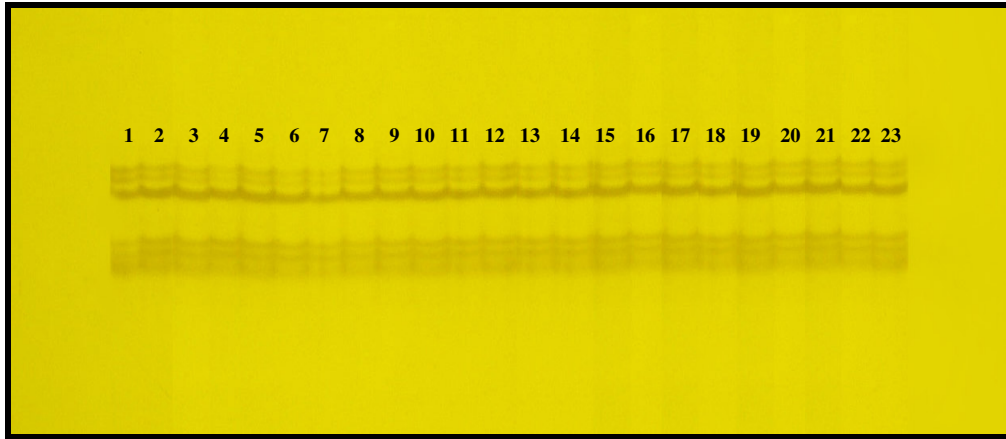
Şekil 4.31 Sultani Çekirdeksiz üzüm çeşidine ait kontrol ve mutant aday bireylerde RADIC 561 primeri ile SSCP jel görüntüsü

1: Kontrol, 2: SÇ 20 Gy 29, 3: SÇ 20 Gy 46, 4: SÇ 20 Gy 69, 5: SÇ 25 Gy 2, 6: SÇ 25Gy 12, 7: SÇ 25 Gy 14, 8: SÇ 25 Gy 40, 9: SÇ 25 Gy 43, 10: SÇ 25 Gy 44, 11: SÇ 25 Gy 48, 12: SÇ 25 Gy 60, 13: SÇ 25 Gy 61, 14: SÇ 30 Gy 2, 15: SÇ 30 Gy 5, 16: SÇ 30 Gy 9, 17: SÇ 30 Gy 11, 18: SÇ 30 Gy 14, 19: SÇ 30 Gy 34, 20: SÇ 30 Gy 41, 21: SÇ 30 Gy 44, 22: SÇ 40 Gy 21, 23: SÇ 50 Gy 3



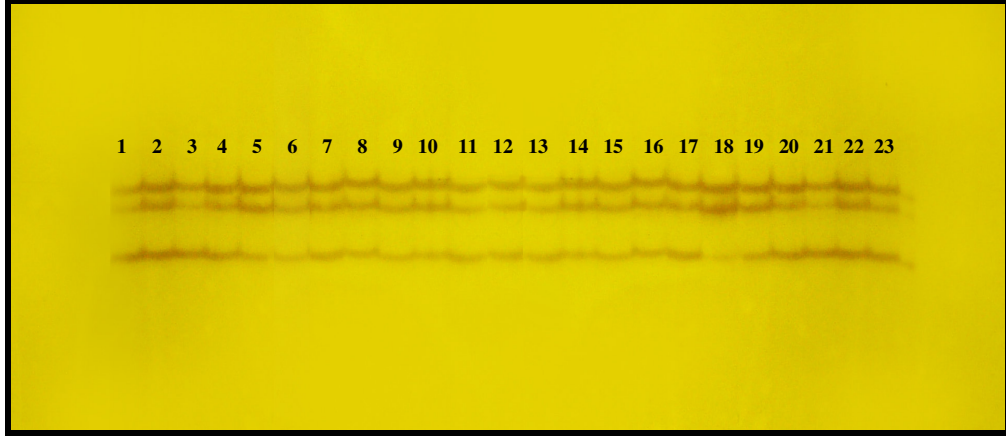
Şekil 4.32 Sultani Çekirdeksiz üzüm çeşidine ait kontrol ve mutant aday bireylerde RADIC 1104 primeri ile SSCP jel görüntüsü

1: Kontrol, 2: SÇ 20 Gy 29, 3: SÇ 20 Gy 46, 4: SÇ 20 Gy 69, 5: SÇ 25 Gy 2, 6: SÇ 25Gy 12, 7: SÇ 25 Gy 14, 8: SÇ 25 Gy 40, 9: SÇ 25 Gy 43, 10: SÇ 25 Gy 44, 11: SÇ 25 Gy 48, 12: SÇ 25 Gy 60, 13: SÇ 25 Gy 61, 14: SÇ 30 Gy 2, 15: SÇ 30 Gy 5, 16: SÇ 30 Gy 9, 17: SÇ 30 Gy 11, 18: SÇ 30 Gy 14, 19: SÇ 30 Gy 34, 20: SÇ 30 Gy 41, 21: SÇ 30 Gy 44, 22: SÇ 40 Gy 21, 23: SÇ 50 Gy 3



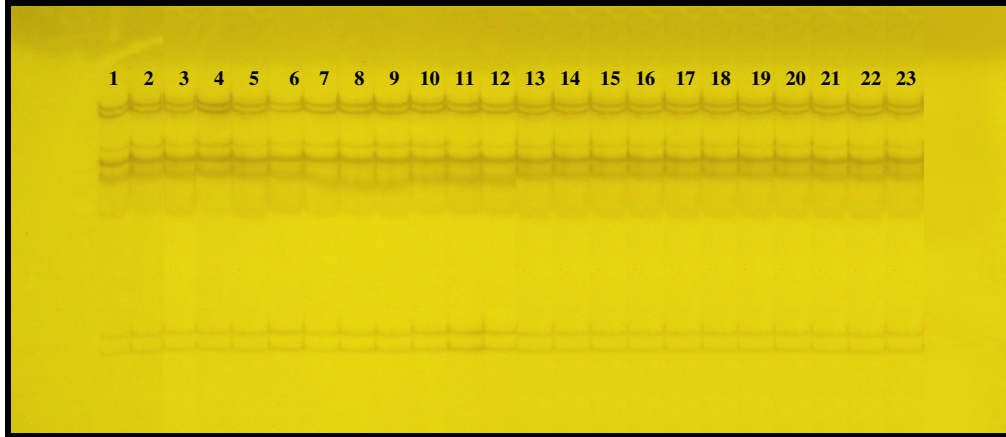
Şekil 4.33 Sultani Çekirdeksiz üzüm çeşidine ait kontrol ve mutant aday bireylerde RADIC 1188 primeri ile SSCP jel görüntüsü

1: Kontrol, 2: SÇ 20 Gy 29, 3: SÇ 20 Gy 46, 4: SÇ 20 Gy 69, 5: SÇ 25 Gy 2, 6: SÇ 25Gy 12, 7: SÇ 25 Gy 14, 8: SÇ 25 Gy 40, 9: SÇ 25 Gy 43, 10: SÇ 25 Gy 44, 11: SÇ 25 Gy 48, 12: SÇ 25 Gy 60, 13: SÇ 25 Gy 61, 14: SÇ 30 Gy 2, 15: SÇ 30 Gy 5, 16: SÇ 30 Gy 9, 17: SÇ 30 Gy 11, 18: SÇ 30 Gy 14, 19: SÇ 30 Gy 34, 20: SÇ 30 Gy 41, 21: SÇ 30 Gy 44, 22: SÇ 40 Gy 21, 23: SÇ 50 Gy 3



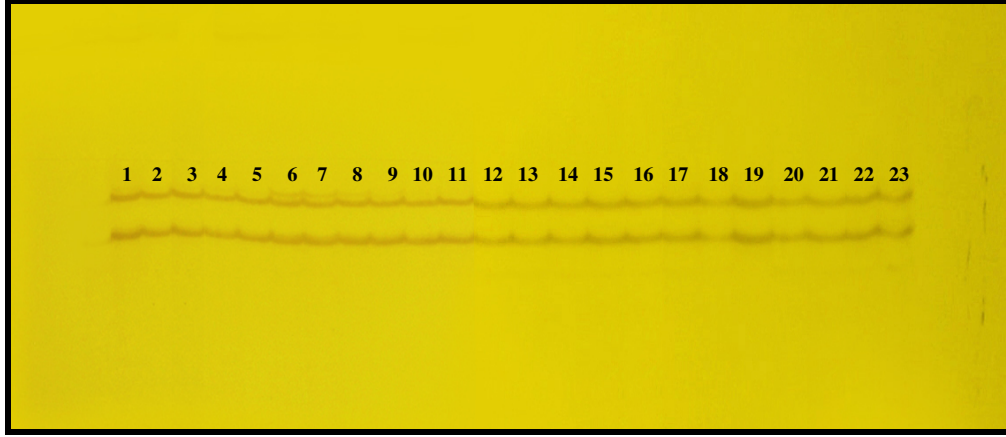
Şekil 4.34 Sultani Çekirdeksiz üzüm çeşidine ait kontrol ve mutant aday bireylerde RADIC 1517 primeri ile SSCP jel görüntüsü

1: Kontrol, 2: SÇ 20 Gy 29, 3: SÇ 20 Gy 46, 4: SÇ 20 Gy 69, 5: SÇ 25 Gy 2, 6: SÇ 25Gy 12, 7: SÇ 25 Gy 14, 8: SÇ 25 Gy 40, 9: SÇ 25 Gy 43, 10: SÇ 25 Gy 44, 11: SÇ 25 Gy 48, 12: SÇ 25 Gy 60, 13: SÇ 25 Gy 61, 14: SÇ 30 Gy 2, 15: SÇ 30 Gy 5, 16: SÇ 30 Gy 9, 17: SÇ 30 Gy 11, 18: SÇ 30 Gy 14, 19: SÇ 30 Gy 34, 20: SÇ 30 Gy 41, 21: SÇ 30 Gy 44, 22: SÇ 40 Gy 21, 23: SÇ 50 Gy 3



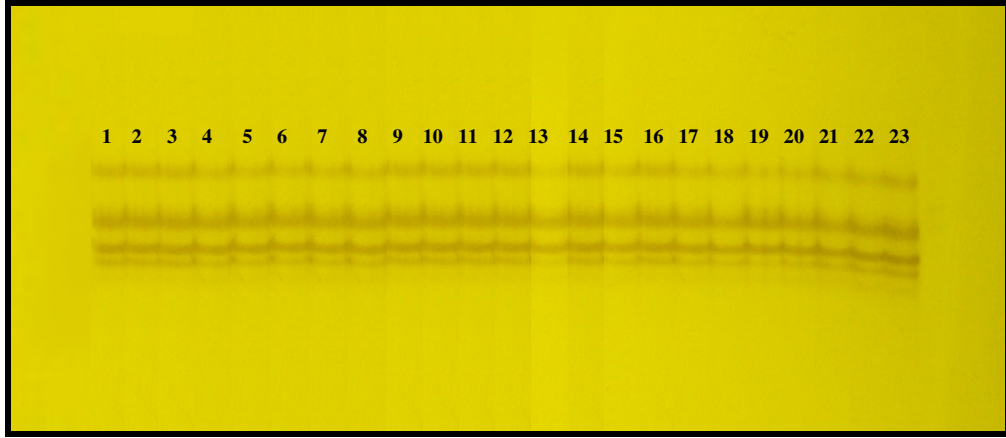
Şekil 4.35 Sultani Çekirdeksiz üzüm çeşidine ait kontrol ve mutant aday bireylerde GEMMA 243 primeri ile SSCP jel görüntüsü

1: Kontrol, 2: SÇ 20 Gy 29, 3: SÇ 20 Gy 46, 4: SÇ 20 Gy 69, 5: SÇ 25 Gy 2, 6: SÇ 25Gy 12, 7: SÇ 25 Gy 14, 8: SÇ 25 Gy 40, 9: SÇ 25 Gy 43, 10: SÇ 25 Gy 44, 11: SÇ 25 Gy 48, 12: SÇ 25 Gy 60, 13: SÇ 25 Gy 61, 14: SÇ 30 Gy 2, 15: SÇ 30 Gy 5, 16: SÇ 30 Gy 9, 17: SÇ 30 Gy 11, 18: SÇ 30 Gy 14, 19: SÇ 30 Gy 34, 20: SÇ 30 Gy 41, 21: SÇ 30 Gy 44, 22: SÇ 40 Gy 21, 23: SÇ 50 Gy 3



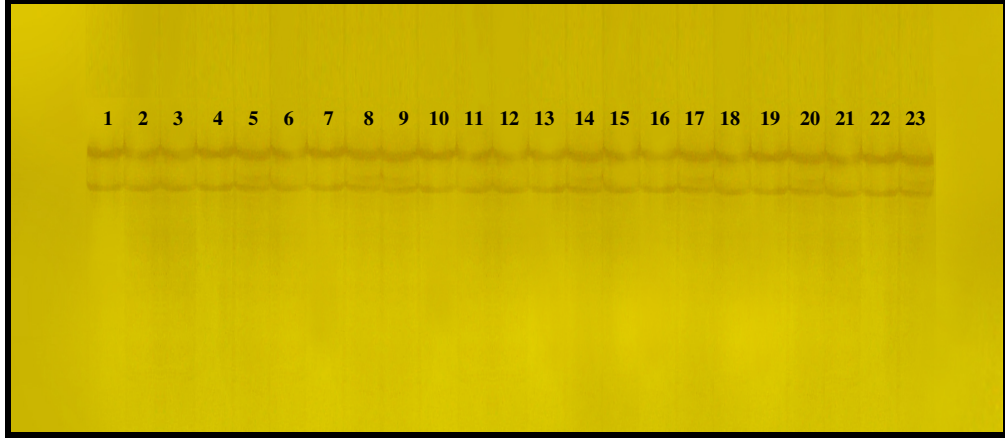
Şekil 4.36 Sultani Çekirdeksiz üzüm çeşidine ait kontrol ve mutant adayı bireylerde GEMMA 334 primeri ile SSCP jel görüntüsü

1: Kontrol, 2: SÇ 20 Gy 29, 3: SÇ 20 Gy 46, 4: SÇ 20 Gy 69, 5: SÇ 25 Gy 2, 6: SÇ 25Gy 12, 7: SÇ 25 Gy 14, 8: SÇ 25 Gy 40, 9: SÇ 25 Gy 43, 10: SÇ 25 Gy 44, 11: SÇ 25 Gy 48, 12: SÇ 25 Gy 60, 13: SÇ 25 Gy 61, 14: SÇ 30 Gy 2, 15: SÇ 30 Gy 5, 16: SÇ 30 Gy 9, 17: SÇ 30 Gy 11, 18: SÇ 30 Gy 14, 19: SÇ 30 Gy 34, 20: SÇ 30 Gy 41, 21: SÇ 30 Gy 44, 22: SÇ 40 Gy 21, 23: SÇ 50 Gy 3



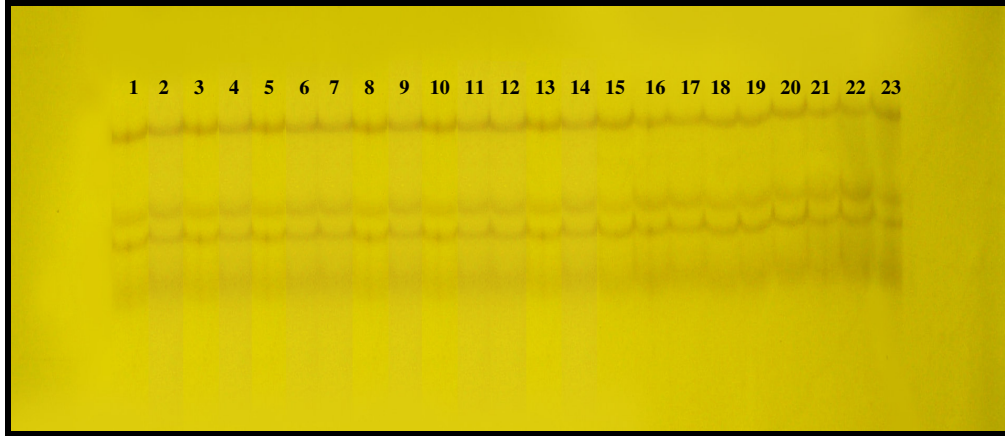
Şekil 4.37 Sultani Çekirdeksiz üzüm çeşidine ait kontrol ve mutant adayı bireylerde GEMMA 1026 primeri ile SSCP jel görüntüsü

1: Kontrol, 2: SÇ 20 Gy 29, 3: SÇ 20 Gy 46, 4: SÇ 20 Gy 69, 5: SÇ 25 Gy 2, 6: SÇ 25Gy 12, 7: SÇ 25 Gy 14, 8: SÇ 25 Gy 40, 9: SÇ 25 Gy 43, 10: SÇ 25 Gy 44, 11: SÇ 25 Gy 48, 12: SÇ 25 Gy 60, 13: SÇ 25 Gy 61, 14: SÇ 30 Gy 2, 15: SÇ 30 Gy 5, 16: SÇ 30 Gy 9, 17: SÇ 30 Gy 11, 18: SÇ 30 Gy 14, 19: SÇ 30 Gy 34, 20: SÇ 30 Gy 41, 21: SÇ 30 Gy 44, 22: SÇ 40 Gy 21, 23: SÇ 50 Gy 3



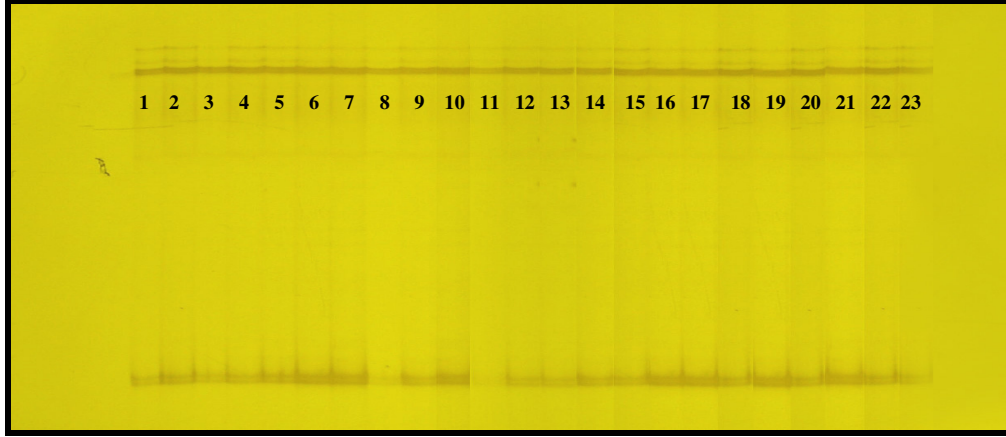
Şekil 4.38 Sultani Çekirdeksiz üzüm çeşidine ait kontrol ve mutant adayı bireylerde GEMMA 1097 primeri ile SSCP jel görüntüsü

1: Kontrol, 2: SÇ 20 Gy 29, 3: SÇ 20 Gy 46, 4: SÇ 20 Gy 69, 5: SÇ 25 Gy 2, 6: SÇ 25Gy 12, 7: SÇ 25 Gy 14, 8: SÇ 25 Gy 40, 9: SÇ 25 Gy 43, 10: SÇ 25 Gy 44, 11: SÇ 25 Gy 48, 12: SÇ 25 Gy 60, 13: SÇ 25 Gy 61, 14: SÇ 30 Gy 2, 15: SÇ 30 Gy 5, 16: SÇ 30 Gy 9, 17: SÇ 30 Gy 11, 18: SÇ 30 Gy 14, 19: SÇ 30 Gy 34, 20: SÇ 30 Gy 41, 21: SÇ 30 Gy 44, 22: SÇ 40 Gy 21, 23: SÇ 50 Gy 3



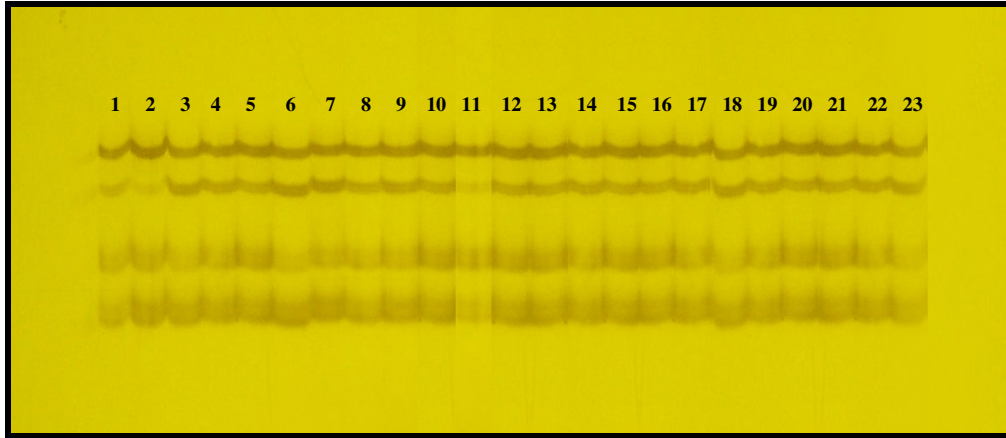
Şekil 4.39 Sultani Çekirdeksiz üzüm çeşidine ait kontrol ve mutant adayı bireylerde GERMO 220 primeri ile SSCP jel görüntüsü

1: Kontrol, 2: SÇ 20 Gy 29, 3: SÇ 20 Gy 46, 4: SÇ 20 Gy 69, 5: SÇ 25 Gy 2, 6: SÇ 25Gy 12, 7: SÇ 25 Gy 14, 8: SÇ 25 Gy 40, 9: SÇ 25 Gy 43, 10: SÇ 25 Gy 44, 11: SÇ 25 Gy 48, 12: SÇ 25 Gy 60, 13: SÇ 25 Gy 61, 14: SÇ 30 Gy 2, 15: SÇ 30 Gy 5, 16: SÇ 30 Gy 9, 17: SÇ 30 Gy 11, 18: SÇ 30 Gy 14, 19: SÇ 30 Gy 34, 20: SÇ 30 Gy 41, 21: SÇ 30 Gy 44, 22: SÇ 40 Gy 21, 23: SÇ 50 Gy 3



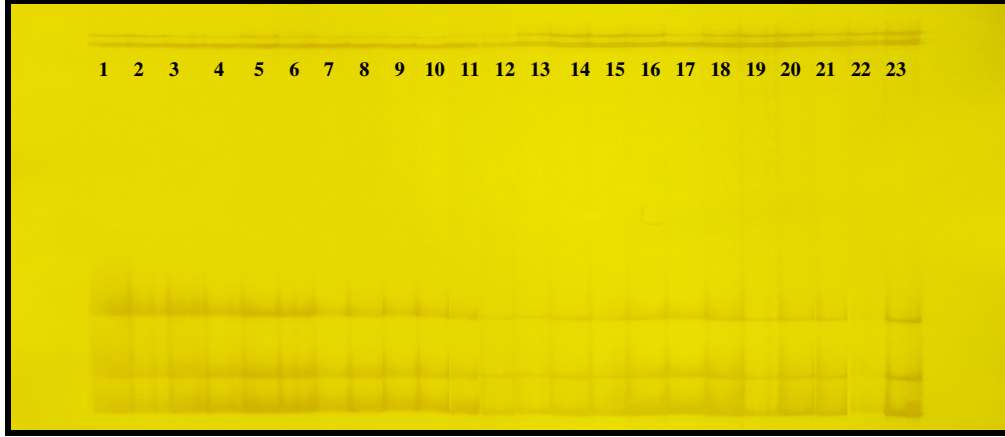
Şekil 4.40 Sultani Çekirdeksiz üzüm çeşidine ait kontrol ve mutant aday bireylerde GERMO 890 primeri ile SSCP jel görüntüsü

1: Kontrol, 2: SÇ 20 Gy 29, 3: SÇ 20 Gy 46, 4: SÇ 20 Gy 69, 5: SÇ 25 Gy 2, 6: SÇ 25Gy 12, 7: SÇ 25 Gy 14, 8: SÇ 25 Gy 40, 9: SÇ 25 Gy 43, 10: SÇ 25 Gy 44, 11: SÇ 25 Gy 48, 12: SÇ 25 Gy 60, 13: SÇ 25 Gy 61, 14: SÇ 30 Gy 2, 15: SÇ 30 Gy 5, 16: SÇ 30 Gy 9, 17: SÇ 30 Gy 11, 18: SÇ 30 Gy 14, 19: SÇ 30 Gy 34, 20: SÇ 30 Gy 41, 21: SÇ 30 Gy 44, 22: SÇ 40 Gy 21, 23: SÇ 50 Gy 3



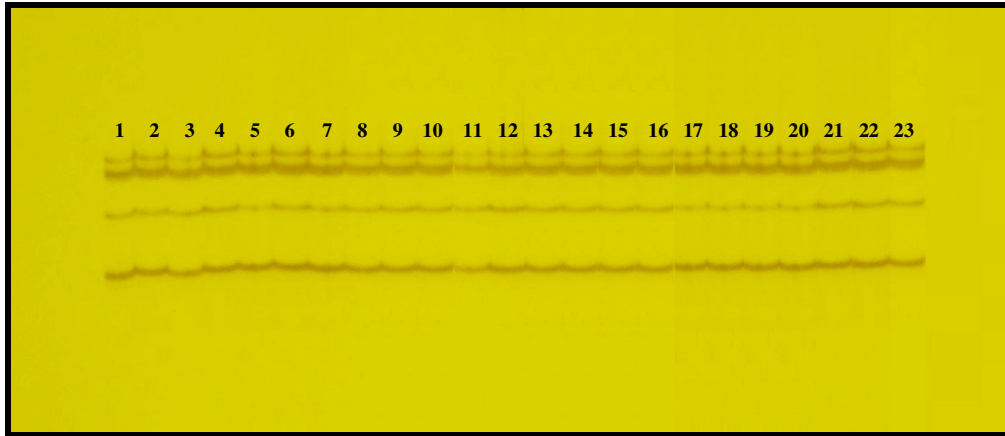
Şekil 4.41 Sultani Çekirdeksiz üzüm çeşidine ait kontrol ve mutant aday bireylerde INFIO 432 primeri ile SSCP jel görüntüsü

1: Kontrol, 2: SÇ 20 Gy 29, 3: SÇ 20 Gy 46, 4: SÇ 20 Gy 69, 5: SÇ 25 Gy 2, 6: SÇ 25Gy 12, 7: SÇ 25 Gy 14, 8: SÇ 25 Gy 40, 9: SÇ 25 Gy 43, 10: SÇ 25 Gy 44, 11: SÇ 25 Gy 48, 12: SÇ 25 Gy 60, 13: SÇ 25 Gy 61, 14: SÇ 30 Gy 2, 15: SÇ 30 Gy 5, 16: SÇ 30 Gy 9, 17: SÇ 30 Gy 11, 18: SÇ 30 Gy 14, 19: SÇ 30 Gy 34, 20: SÇ 30 Gy 41, 21: SÇ 30 Gy 44, 22: SÇ 40 Gy 21, 23: SÇ 50 Gy 3



Şekil 4.42 Sultani Çekirdeksiz üzüm çeşidine ait kontrol ve mutant aday bireylerde INFIO 622 primeri ile SSCP jel görüntüsü

1: Kontrol, 2: SÇ 20 Gy 29, 3: SÇ 20 Gy 46, 4: SÇ 20 Gy 69, 5: SÇ 25 Gy 2, 6: SÇ 25Gy 12, 7: SÇ 25 Gy 14, 8: SÇ 25 Gy 40, 9: SÇ 25 Gy 43, 10: SÇ 25 Gy 44, 11: SÇ 25 Gy 48, 12: SÇ 25 Gy 60, 13: SÇ 25 Gy 61, 14: SÇ 30 Gy 2, 15: SÇ 30 Gy 5, 16: SÇ 30 Gy 9, 17: SÇ 30 Gy 11, 18: SÇ 30 Gy 14, 19: SÇ 30 Gy 34, 20: SÇ 30 Gy 41, 21: SÇ 30 Gy 44, 22: SÇ 40 Gy 21, 23: SÇ 50 Gy 3



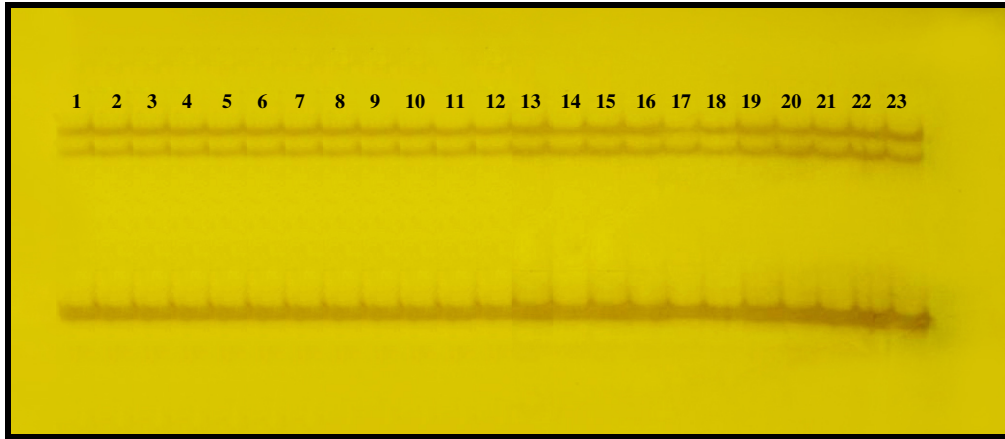
Şekil 4.43 Sultani Çekirdeksiz üzüm çeşidine ait kontrol ve mutant aday bireylerde FOGLIO 236 primeri ile SSCP jel görüntüsü

1: Kontrol, 2: SÇ 20 Gy 29, 3: SÇ 20 Gy 46, 4: SÇ 20 Gy 69, 5: SÇ 25 Gy 2, 6: SÇ 25Gy 12, 7: SÇ 25 Gy 14, 8: SÇ 25 Gy 40, 9: SÇ 25 Gy 43, 10: SÇ 25 Gy 44, 11: SÇ 25 Gy 48, 12: SÇ 25 Gy 60, 13: SÇ 25 Gy 61, 14: SÇ 30 Gy 2, 15: SÇ 30 Gy 5, 16: SÇ 30 Gy 9, 17: SÇ 30 Gy 11, 18: SÇ 30 Gy 14, 19: SÇ 30 Gy 34, 20: SÇ 30 Gy 41, 21: SÇ 30 Gy 44, 22: SÇ 40 Gy 21, 23: SÇ 50 Gy 3



Şekil 4.44 Kalecik karası üzüm çeşidine ait kontrol ve mutant aday bireylerde, RADIC 118 primeri ile SSCP jel görüntüsü

1: Kontrol, 2: KK 20 Gy 13, 3: KK 20 Gy 15, 4: KK 20 Gy 61, 5: KK 20 Gy 70, 6: KK 20 Gy 79, 7: KK 25 Gy 8, 8: KK 25 Gy 52, 9: KK 30 Gy 1, 10: KK 30 Gy 2, 11: KK 30 Gy 3, 12: KK 30 Gy 8, 13: KK 30 Gy 9, 14: KK 30 Gy 13, 15: KK 30 Gy 53, 16: KK 40 Gy 32, 17: KK 40 Gy 36, 18: KK 40 Gy 38, 19: KK 45 Gy 4, 20: KK 45 Gy 6, 21: KK 45 Gy 9, 22: KK 45 Gy 17, 23: KK 45 Gy 21



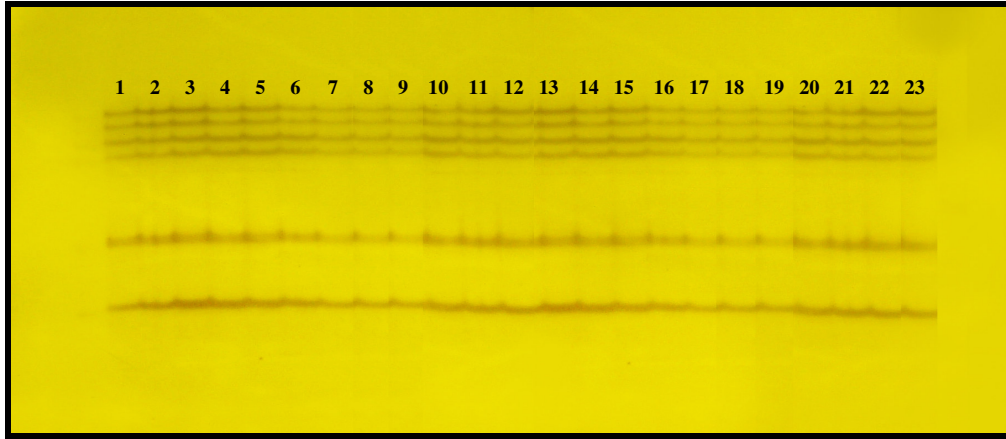
Şekil 4.45 Kalecik karası üzüm çeşidine ait kontrol ve mutant aday bireylerde, RADIC 294 primeri ile SSCP jel görüntüsü

1: Kontrol, 2: KK 20 Gy 13, 3: KK 20 Gy 15, 4: KK 20 Gy 61, 5: KK 20 Gy 70, 6: KK 20 Gy 79, 7: KK 25 Gy 8, 8: KK 25 Gy 52, 9: KK 30 Gy 1, 10: KK 30 Gy 2, 11: KK 30 Gy 3, 12: KK 30 Gy 8, 13: KK 30 Gy 9, 14: KK 30 Gy 13, 15: KK 30 Gy 53, 16: KK 40 Gy 32, 17: KK 40 Gy 36, 18: KK 40 Gy 38, 19: KK 45 Gy 4, 20: KK 45 Gy 6, 21: KK 45 Gy 9, 22: KK 45 Gy 17, 23: KK 45 Gy 21



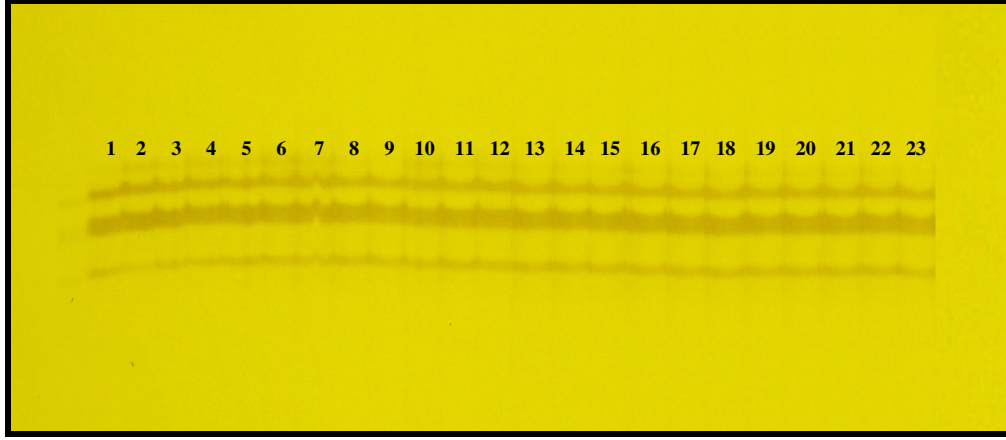
Şekil 4.46 Kalecik karası üzüm çeşidine ait kontrol ve mutant adayı bireylerde RADIC 561 primeri ile SSCP jel görüntüsü

1: Kontrol, 2: KK 20 Gy 13, 3: KK 20 Gy 15, 4: KK 20 Gy 61, 5: KK 20 Gy 70, 6: KK 20 Gy 79, 7: KK 25 Gy 8, 8: KK 25 Gy 52, 9: KK 30 Gy 1, 10: KK 30 Gy 2, 11: KK 30 Gy 3, 12: KK 30 Gy 8, 13: KK 30 Gy 9, 14: KK 30 Gy 13, 15: KK 30 Gy 53, 16: KK 40 Gy 32, 17: KK 40 Gy 36, 18: KK 40 Gy 38, 19: KK 45 Gy 4, 20: KK 45 Gy 6, 21: KK 45 Gy 9, 22: KK 45 Gy 17, 23: KK 45 Gy 21



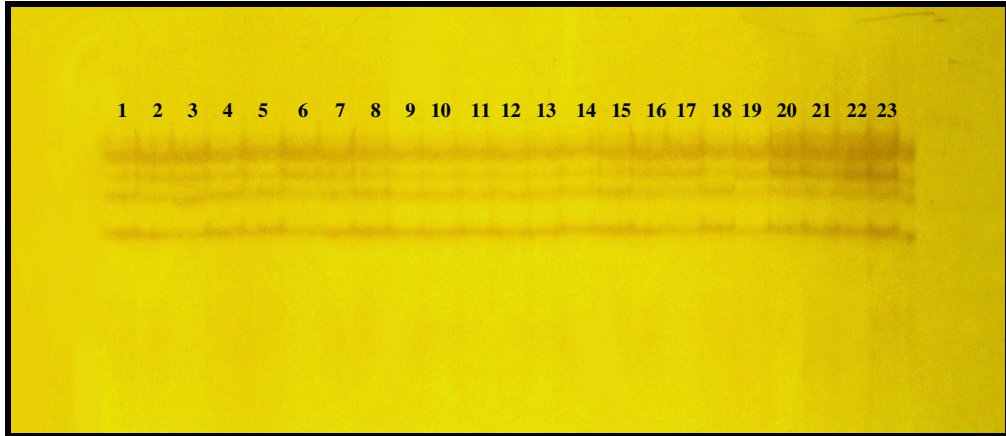
Şekil 4.47 Kalecik karası üzüm çeşidine ait kontrol ve mutant adayı bireylerde RADIC 1104 primeri ile SSCP jel görüntüsü

1: Kontrol, 2: KK 20 Gy 13, 3: KK 20 Gy 15, 4: KK 20 Gy 61, 5: KK 20 Gy 70, 6: KK 20 Gy 79, 7: KK 25 Gy 8, 8: KK 25 Gy 52, 9: KK 30 Gy 1, 10: KK 30 Gy 2, 11: KK 30 Gy 3, 12: KK 30 Gy 8, 13: KK 30 Gy 9, 14: KK 30 Gy 13, 15: KK 30 Gy 53, 16: KK 40 Gy 32, 17: KK 40 Gy 36, 18: KK 40 Gy 38, 19: KK 45 Gy 4, 20: KK 45 Gy 6, 21: KK 45 Gy 9, 22: KK 45 Gy 17, 23: KK 45 Gy 21



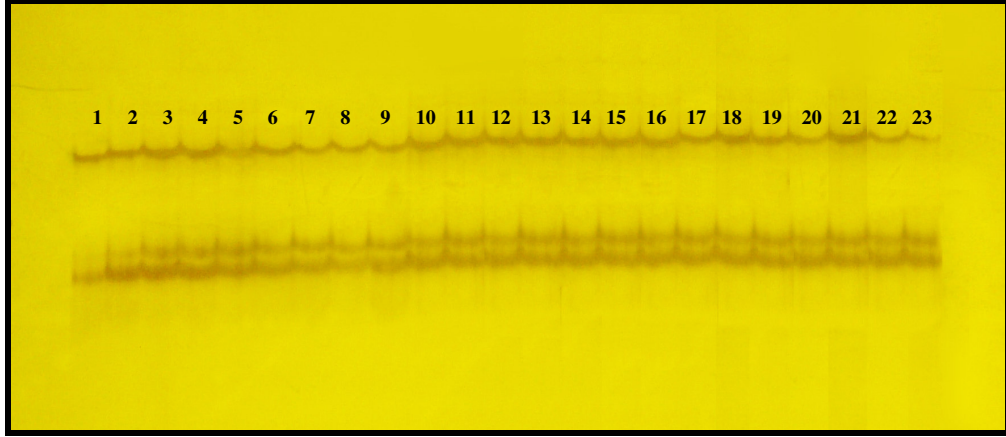
Şekil 4.48 Kalecik karası üzüm çeşidine ait kontrol ve mutant adayı bireylerde RADIC 1188 primeri ile SSCP jel görüntüsü

1: Kontrol, 2: KK 20 Gy 13, 3: KK 20 Gy 15, 4: KK 20 Gy 61, 5: KK 20 Gy 70, 6: KK 20 Gy 79, 7: KK 25 Gy 8, 8: KK 25 Gy 52, 9: KK 30 Gy 1, 10: KK 30 Gy 2, 11: KK 30 Gy 3, 12: KK 30 Gy 8, 13: KK 30 Gy 9, 14: KK 30 Gy 13, 15: KK 30 Gy 53, 16: KK 40 Gy 32, 17: KK 40 Gy 36, 18: KK 40 Gy 38, 19: KK 45 Gy 4, 20: KK 45 Gy 6, 21: KK 45 Gy 9, 22: KK 45 Gy 17, 23: KK 45 Gy 21



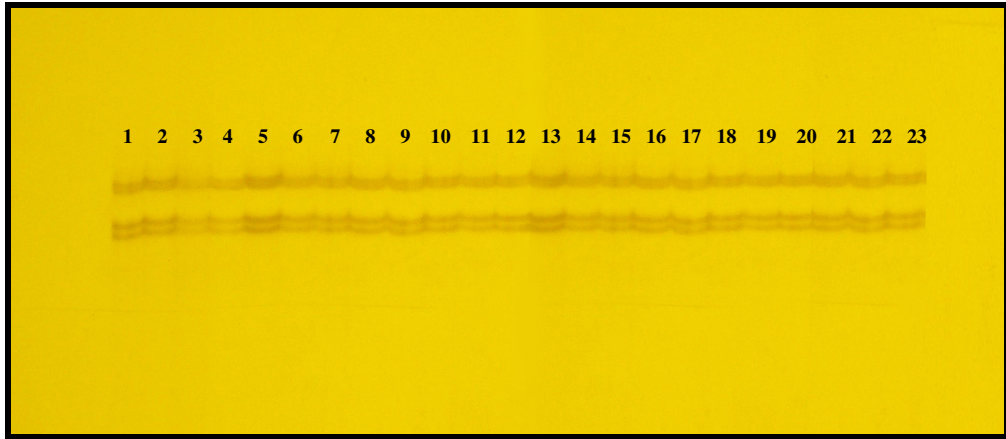
Şekil 4.49 Kalecik karası üzüm çeşidine ait kontrol ve mutant adayı bireylerde RADIC 1517 primeri ile SSCP jel görüntüsü

1: Kontrol, 2: KK 20 Gy 13, 3: KK 20 Gy 15, 4: KK 20 Gy 61, 5: KK 20 Gy 70, 6: KK 20 Gy 79, 7: KK 25 Gy 8, 8: KK 25 Gy 52, 9: KK 30 Gy 1, 10: KK 30 Gy 2, 11: KK 30 Gy 3, 12: KK 30 Gy 8, 13: KK 30 Gy 9, 14: KK 30 Gy 13, 15: KK 30 Gy 53, 16: KK 40 Gy 32, 17: KK 40 Gy 36, 18: KK 40 Gy 38, 19: KK 45 Gy 4, 20: KK 45 Gy 6, 21: KK 45 Gy 9, 22: KK 45 Gy 17, 23: KK 45 Gy 21



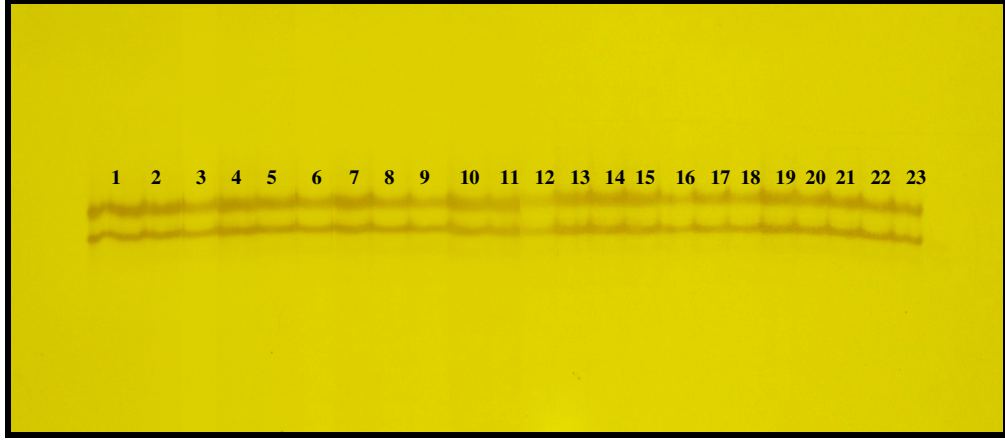
Şekil 4.50 Kalecik karası üzüm çeşidine ait kontrol ve mutant adayı bireylerde GEMMA 243 primeri ile SSCP jel görüntüsü

1: Kontrol, 2: KK 20 Gy 13, 3: KK 20 Gy 15, 4: KK 20 Gy 61, 5: KK 20 Gy 70, 6: KK 20 Gy 79, 7: KK 25 Gy 8, 8: KK 25 Gy 52, 9: KK 30 Gy 1, 10: KK 30 Gy 2, 11: KK 30 Gy 3, 12: KK 30 Gy 8, 13: KK 30 Gy 9, 14: KK 30 Gy 13, 15: KK 30 Gy 53, 16: KK 40 Gy 32, 17: KK 40 Gy 36, 18: KK 40 Gy 38, 19: KK 45 Gy 4, 20: KK 45 Gy 6, 21: KK 45 Gy 9, 22: KK 45 Gy 17, 23: KK 45 Gy 21



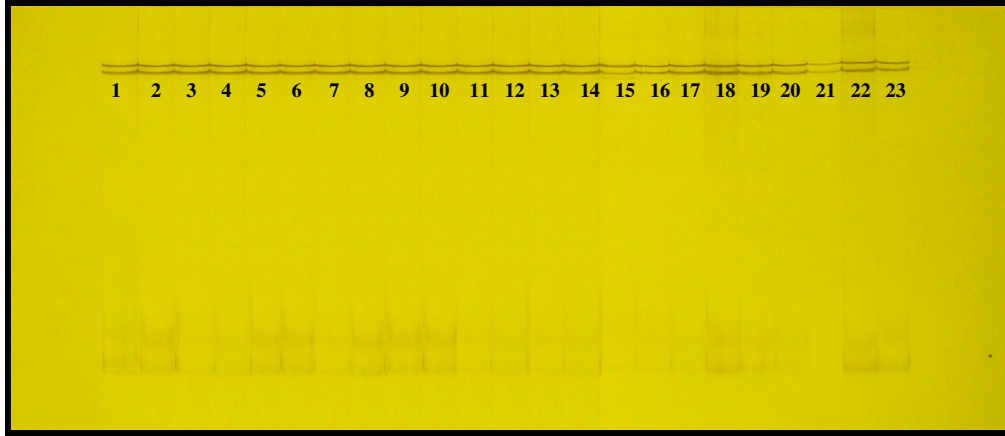
Şekil 4.51 Kalecik karası üzüm çeşidine ait kontrol ve mutant adayı bireylerde GEMMA 334 primeri ile SSCP jel görüntüsü

1: Kontrol, 2: KK 20 Gy 13, 3: KK 20 Gy 15, 4: KK 20 Gy 61, 5: KK 20 Gy 70, 6: KK 20 Gy 79, 7: KK 25 Gy 8, 8: KK 25 Gy 52, 9: KK 30 Gy 1, 10: KK 30 Gy 2, 11: KK 30 Gy 3, 12: KK 30 Gy 8, 13: KK 30 Gy 9, 14: KK 30 Gy 13, 15: KK 30 Gy 53, 16: KK 40 Gy 32, 17: KK 40 Gy 36, 18: KK 40 Gy 38, 19: KK 45 Gy 4, 20: KK 45 Gy 6, 21: KK 45 Gy 9, 22: KK 45 Gy 17, 23: KK 45 Gy 21



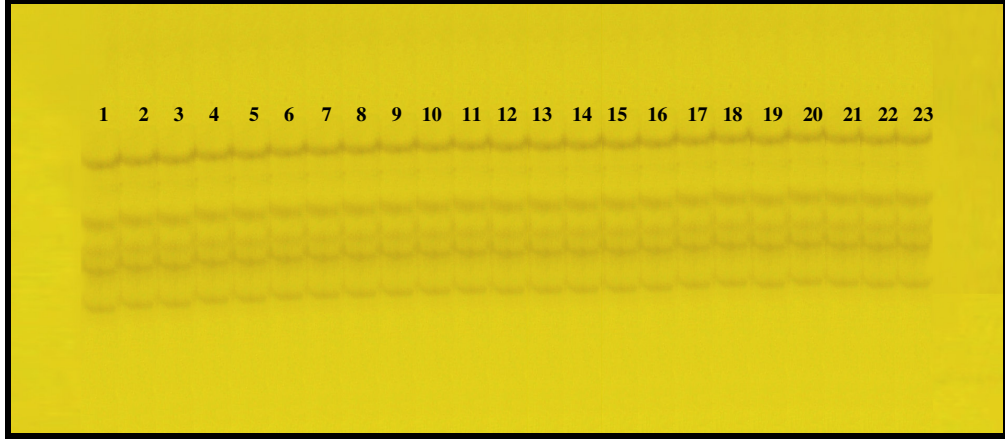
Şekil 4.52 Kalecik karası üzüm çeşidine ait kontrol ve mutant adayı bireylerde GEMMA 1026 primeri ile SSCP jel görüntüsü

1: Kontrol, 2: KK 20 Gy 13, 3: KK 20 Gy 15, 4: KK 20 Gy 61, 5: KK 20 Gy 70, 6: KK 20 Gy 79, 7: KK 25 Gy 8, 8: KK 25 Gy 52, 9: KK 30 Gy 1, 10: KK 30 Gy 2, 11: KK 30 Gy 3, 12: KK 30 Gy 8, 13: KK 30 Gy 9, 14: KK 30 Gy 13, 15: KK 30 Gy 53, 16: KK 40 Gy 32, 17: KK 40 Gy 36, 18: KK 40 Gy 38, 19: KK 45 Gy 4, 20: KK 45 Gy 6, 21: KK 45 Gy 9, 22: KK 45 Gy 17, 23: KK 45 Gy 21



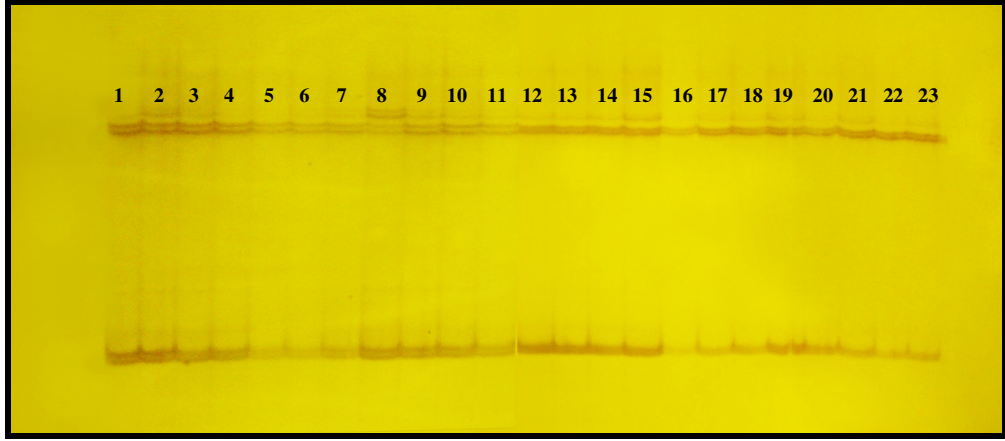
Şekil 4.53 Kalecik karası üzüm çeşidine ait kontrol ve mutant adayı bireylerde GEMMA 1097 primeri ile SSCP jel görüntüsü

1: Kontrol, 2: KK 20 Gy 13, 3: KK 20 Gy 15, 4: KK 20 Gy 61, 5: KK 20 Gy 70, 6: KK 20 Gy 79, 7: KK 25 Gy 8, 8: KK 25 Gy 52, 9: KK 30 Gy 1, 10: KK 30 Gy 2, 11: KK 30 Gy 3, 12: KK 30 Gy 8, 13: KK 30 Gy 9, 14: KK 30 Gy 13, 15: KK 30 Gy 53, 16: KK 40 Gy 32, 17: KK 40 Gy 36, 18: KK 40 Gy 38, 19: KK 45 Gy 4, 20: KK 45 Gy 6, 21: KK 45 Gy 9, 22: KK 45 Gy 17, 23: KK 45 Gy 21



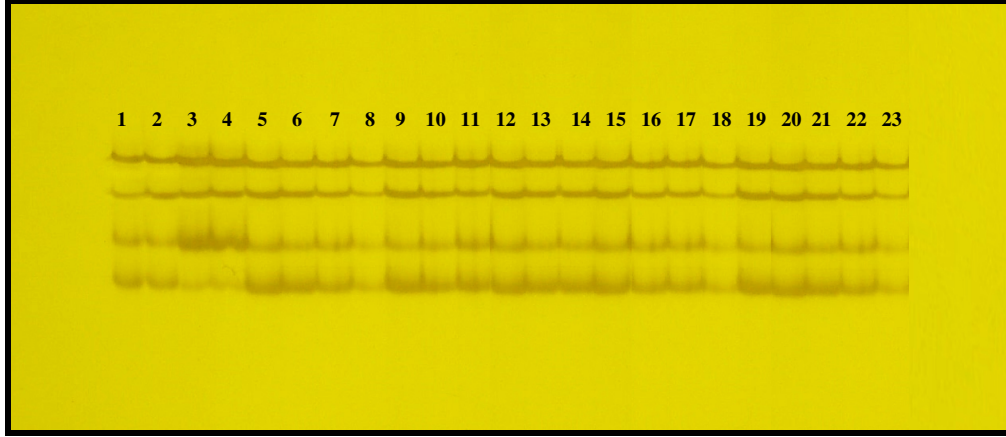
Şekil 4.54 Kalecik karası üzüm çeşidine ait kontrol ve mutant adayı bireylerde GERMO 220 primeri ile SSCP jel görüntüsü

1: Kontrol, 2: KK 20 Gy 13, 3: KK 20 Gy 15, 4: KK 20 Gy 61, 5: KK 20 Gy 70, 6: KK 20 Gy 79, 7: KK 25 Gy 8, 8: KK 25 Gy 52, 9: KK 30 Gy 1, 10: KK 30 Gy 2, 11: KK 30 Gy 3, 12: KK 30 Gy 8, 13: KK 30 Gy 9, 14: KK 30 Gy 13, 15: KK 30 Gy 53, 16: KK 40 Gy 32, 17: KK 40 Gy 36, 18: KK 40 Gy 38, 19: KK 45 Gy 4, 20: KK 45 Gy 6, 21: KK 45 Gy 9, 22: KK 45 Gy 17, 23: KK 45 Gy 21



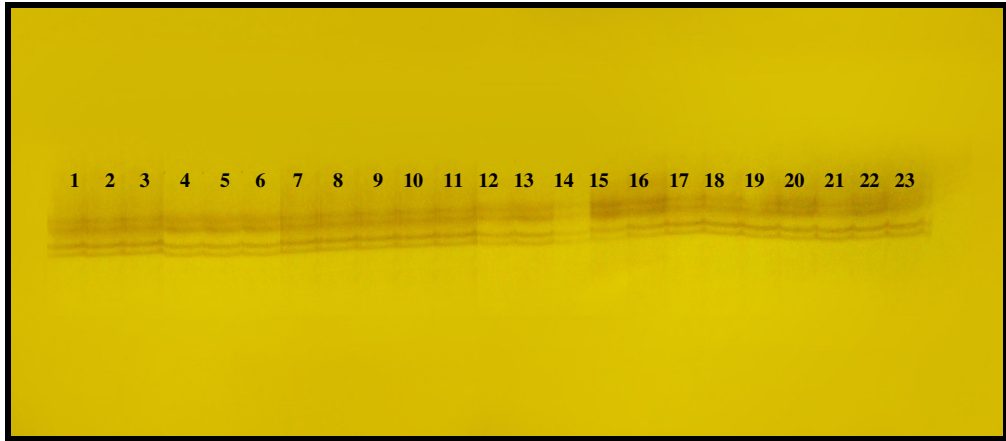
Şekil 4.55 Kalecik karası üzüm çeşidine ait kontrol ve mutant adayı bireylerde GERMO 890 primeri ile SSCP jel görüntüsü

1: Kontrol, 2: KK 20 Gy 13, 3: KK 20 Gy 15, 4: KK 20 Gy 61, 5: KK 20 Gy 70, 6: KK 20 Gy 79, 7: KK 25 Gy 8, 8: KK 25 Gy 52, 9: KK 30 Gy 1, 10: KK 30 Gy 2, 11: KK 30 Gy 3, 12: KK 30 Gy 8, 13: KK 30 Gy 9, 14: KK 30 Gy 13, 15: KK 30 Gy 53, 16: KK 40 Gy 32, 17: KK 40 Gy 36, 18: KK 40 Gy 38, 19: KK 45 Gy 4, 20: KK 45 Gy 6, 21: KK 45 Gy 9, 22: KK 45 Gy 17, 23: KK 45 Gy 21



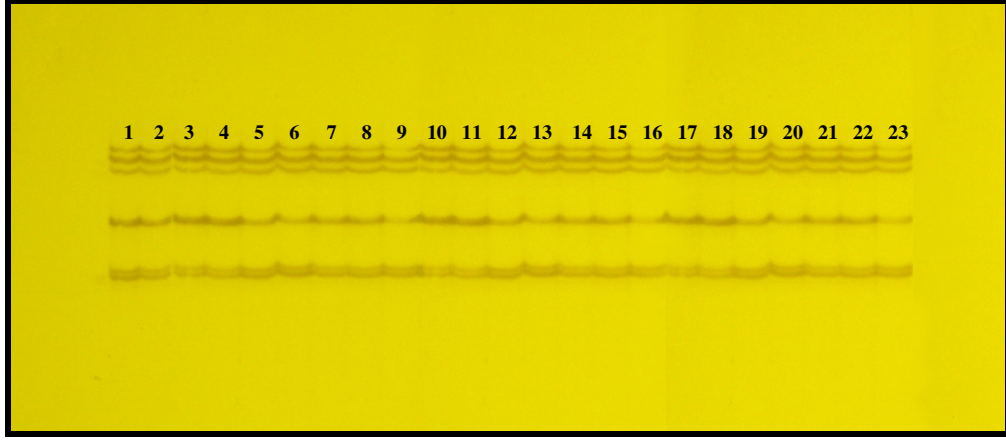
Şekil 4.56 Kalecik karası üzüm çeşidine ait kontrol ve mutant adayı bireylerde INFIO 432 primeri ile SSCP jel görüntüsü

1: Kontrol, 2: KK 20 Gy 13, 3: KK 20 Gy 15, 4: KK 20 Gy 61, 5: KK 20 Gy 70, 6: KK 20 Gy 79, 7: KK 25 Gy 8, 8: KK 25 Gy 52, 9: KK 30 Gy 1, 10: KK 30 Gy 2, 11: KK 30 Gy 3, 12: KK 30 Gy 8, 13: KK 30 Gy 9, 14: KK 30 Gy 13, 15: KK 30 Gy 53, 16: KK 40 Gy 32, 17: KK 40 Gy 36, 18: KK 40 Gy 38, 19: KK 45 Gy 4, 20: KK 45 Gy 6, 21: KK 45 Gy 9, 22: KK 45 Gy 17, 23: KK 45 Gy 21



Şekil 4.57 Kalecik karası üzüm çeşidine ait kontrol ve mutant adayı bireylerde INFIO 622 primeri ile SSCP jel görüntüsü

1: Kontrol, 2: KK 20 Gy 13, 3: KK 20 Gy 15, 4: KK 20 Gy 61, 5: KK 20 Gy 70, 6: KK 20 Gy 79, 7: KK 25 Gy 8, 8: KK 25 Gy 52, 9: KK 30 Gy 1, 10: KK 30 Gy 2, 11: KK 30 Gy 3, 12: KK 30 Gy 8, 13: KK 30 Gy 9, 14: KK 30 Gy 13, 15: KK 30 Gy 53, 16: KK 40 Gy 32, 17: KK 40 Gy 36, 18: KK 40 Gy 38, 19: KK 45 Gy 4, 20: KK 45 Gy 6, 21: KK 45 Gy 9, 22: KK 45 Gy 17, 23: KK 45 Gy 21



Şekil 4.58 Kalecik karası üzüm çeşidine ait kontrol ve mutant aday bireylerde FOGLIO 236 primeri ile SSCP jel görüntüsü

1: Kontrol, 2: KK 20 Gy 13, 3: KK 20 Gy 15, 4: KK 20 Gy 61, 5: KK 20 Gy 70, 6: KK 20 Gy 79, 7: KK 25 Gy 8, 8: KK 25 Gy 52, 9: KK 30 Gy 1, 10: KK 30 Gy 2, 11: KK 30 Gy 3, 12: KK 30 Gy 8, 13: KK 30 Gy 9, 14: KK 30 Gy 13, 15: KK 30 Gy 53, 16: KK 40 Gy 32, 17: KK 40 Gy 36, 18: KK 40 Gy 38, 19: KK 45 Gy 4, 20: KK 45 Gy 6, 21: KK 45 Gy 9, 22: KK 45 Gy 17, 23: KK 45 Gy 21

5. TARTIŞMA

Sultani Çekirdeksiz ve Kalecik karası üzüm çeşitlerinde uyarılmış mutasyon etkilerinin sitolojik ve moleküler olarak incelenmiş olduğu tez çalışmasında; kontrol bitkileri ile karşılaştırmalı olarak M1V1, M1V2 ve M1V3 vejetasyonlarında vejetatif karakterler bakımından değişimler üzerinde gözlemler yapılarak mutant aday bireyler belirlenmiş, seçilen bireylerde sitolojik tanımlama ve genetik polimorfizmin belirlenmesine yönelik çalışmalar yürütülmüştür.

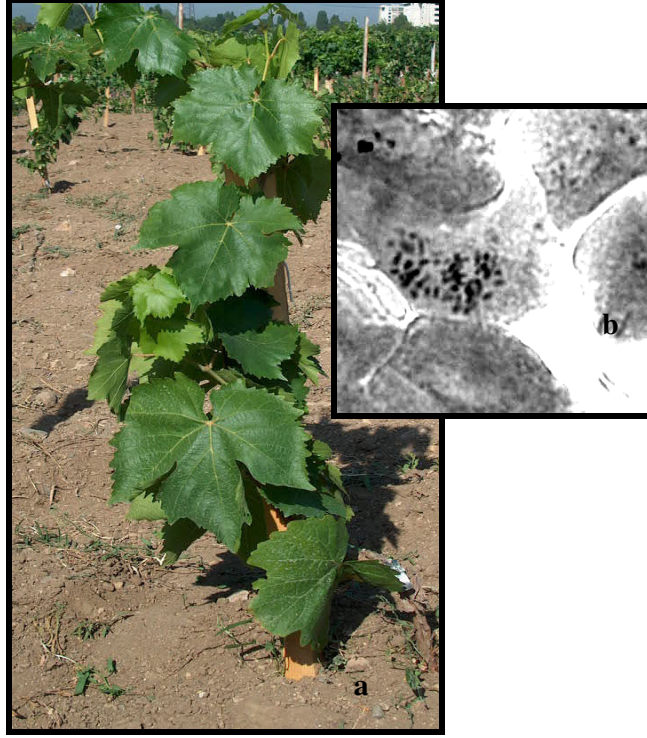
Genel olarak değerlendirildiğinde mutasyonların seleksiyonu, mutasyon ıslahının en zor aşamasıdır. Mutagen uygulamasını takiben Sultani Çekirdeksiz ve Kalecik karası üzüm çeşitlerinde M1V1 vejetasyonunda mutagen etkisi çoğunlukla yapraklarda klorofil mutasyonlarının oluşması şeklinde gözlenmiştir. Araştırmacılar mutagen uygulamalarının, ilk yılda vejetatif gelişme özellikleri bakımından farklı etkilere neden olduğunu, daha sonraki yıllarda ise bazı etkilerin ortadan kalktığını belirtmişlerdir (Donini 1975, 1982, Hajdu *et al.* 1995, Körösi *et al.* 1995). Gen ve kromozom mutasyonları kalıcı genetik değişiklikler olup M1V1 generasyonundan diğer generasyonlara aktarılabilmektedir. Bu nedenle ikinci vejetasyondan (M1V2) itibaren gözlemler önem kazanmaktadır. Mutasyonla morfolojik değişimleri büyük ölçüde etkileyen; büyüme gücü, büyüme tipi, yaprak şekli, yaprak rengi gibi özellikleri tanımlamak güç olmamakla beraber, kalıcı nitelik taşıyanların seleksiyonu önemli aşamayı oluşturmuştur. M1V2 ve M1V3 vejetasyonlarında yapılan morfolojik gözlemlerde Sultani Çekirdeksiz ve Kalecik karası çeşitlerine ait mutant aday bireylerde, sürgünlerde oluşan değişimler bakımından; en tipik mutasyon etkisi literatürde de bildirildiği gibi, boğum aralarının kısalması olarak gözlenmiştir. Radyasyonun etkisi sonucu asmalarda boğum arasının kısalması şeklindeki morfolojik değişimler Donini *et al.* 1982, 1992, Parpstein 1988, Fideghelli 1990, Çoban 1998, Körösi *et al.* 1995 tarafından da yaygın olarak gözlenmiştir. Bu çalışmada sürgünlerde gözlenen bir diğer değişim, boğumlarda ikiz göz oluşumu, kış gözü üzerinde yaprak oluşumu, sülükten yaprağa dönüşüm şeklinde ortaya çıkmıştır. Mutagen etkisi sonucunda her iki çeşide ait populasyon içerisinde oluşan bir diğer önemli değişim yapraklarda klorofil sentezinin etkilenmesi ile yaprak yüzeyinde belirli bir alanda ya da nokta lekeler şeklinde tüm yaprak yüzeyinde ortaya çıkan albino

bölgeler olmuştur. Bu oluşumların önceki çalışmalarda da gözlemlendiği, radyasyon etkisi sonucunda klorofil sentezinin engellendiği ve buna bağlı olarak farklı tiplerde klorofil mutasyonlarının olduğu bildirilmiştir (Donini *et al.* 1982, 1992, Fideghelli 1990, Körösi *et al.* 1995, Çoban 1998, Sangsiri *et al.* 2005). Bitkilerin vejetatif organlarında meydana gelen bir diğer önemli değişim, yapraklarda şekil anormalliklerinin oluşmasıdır. Şekil anormallikleri bakımından, yapraklarda dilim yapısı ve şeklinin değişmesi, yaprak ayasının dalgalı ve sert bir yapı kazanması ve iri yaprak oluşumunun gerçekleşmesi gibi özellikler gözlenmiştir. Körösi *et al.* (1995), Çoban (1998) ve Sangsiri *et al.* (2005)' da mutagen uygulamaları sonucunda iri yaprak oluşumu ve yaprak ayasında sert yapılanmanın meydana geldiğini bildirilmektedirler.

Tez çalışması kapsamında Sultani Çekirdeksiz ve Kalecik karası üzüm çeşidine ait mutant adayı bireylerde yapılan morfolojik gözlemler sonucu iki yıl (M1V1-M1V2) boyunca tekrar eden özellikleri taşıyan bireyler sitolojik incelemelerde kullanılmıştır.

Vitis vinifera L.'nin kromozom yapısının oldukça küçük olması, sayıca fazla olması ($2n=38$) ve sitoplazmanın yoğun yapısı kromozom çalışmalarını güçleştiren en önemli faktörlerdir (Thompson and Olmo 1963, Patil and Patil 1992, Viljoen and Spies 1995, Haas and Alleweldt 2000). Sitolojik incelemelerde özellikle sitoplazmanın içerdiği yoğun alkaloidler kromozom görüntülerinin elde edilmesinde büyük sorun oluşturmaktadır. Ezme preparasyon sırasında, metafaz safhasında bir düzlem üzerinde, sayılabilir nitelikte net bir kromozom dağılımının gözlenmesi tüm bu nedenlerden dolayı oldukça güç olmuştur. Sultani Çekirdeksiz'e ait 26, Kalecik karası üzüm çeşidinde ise 18 adet mutant adayı birey üzerinde sitolojik incelemeler yapılmıştır. Sitolojik çalışmalar sonucunda, Sultani Çekirdeksiz üzüm çeşidinde sadece SÇ 30 Gy 34 numaralı bireyde diploid ($2x$) 38 kromozom sayısından daha fazla sayıda kromozoma sahip ploid yapı belirlenmiştir. Ancak, kromozom sayımı tam yapılamadığından bu bireyin ploidy düzeyi hakkında kesin bir ifade kullanılmaktan kaçınılmıştır (Şekil 5.1). Bunun dışındaki tüm bireylerde diploid ($2x$) yapılu hücreler gözlenmiştir. Kalecik karası üzüm çeşidinde ise seçilen bireylerin tümünde yapılan sitolojik incelemeler sonucunda diploid ($2x$) yapılu hücreler gözlenmiştir. Çalışmada incelenen bireylerden yalnız birinde ploid özellik belirlenmiş olması yalnızca bu bireyin mutant özellik taşıdığını ifade

etmez. Mutasyonların en değerli olanları diploid mutasyonlardır (Griffiths *et al.* 2005). Bu nedenle, diploid bireylerde ileri düzeydeki morfolojik değerlendirmelerin sürdürülmesi önemlidir.



Şekil 5.1 SÇ 30 Gy 34 nolu bireyin; a) fenotipik görüntüsü b) ploid kromozomlu (>2x) hücre görüntüsü

Bitkilerdeki fenotipik varyasyonların birçoğunun kaynağını genlerdeki nükleotit dizilerinin belirli bir bölgedeki polimorfizmi oluşturmaktadır. Bu şekildeki varyasyonlar, çeşitli markör teknikleriyle (RFLP, CAPs, SSR, AFLP) belirlenebilmektedir. Buna karşılık, fenotipik varyasyonun ana kaynağını oluşturan genlerde nükleotitlerde eksilme ya da eklenme veya tek nükleotit bazında değişimler gibi mutasyonlar, söz konusu yöntemlerle etkin bir şekilde tanımlanamamaktadır (Shirasawa *et al.* 2004). Bu nedenle genlerdeki özel mutasyonların belirlenmesine yönelik SNP (Single Nucleotide Polymorphism) tekniğinin geliştirilmesine çalışılmaktadır. Genomda bir çok SNP bulunmakta ve genlerde önemli özellikleri karakterize etmektedirler. Genlerdeki SNP'lerin tanımlanmasında PCR-SSCP analizi ile çok yüksek oranda başarı elde edilebileceği bildirilmektedir (Shirasawa *et al.* 2004).

Mutasyon tanımlama konusunda SSCP markörler, SNP tanımlamalarında, özellikle tıpta hastalıkların teşhis ve tanılarında yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Bitkiler üzerindeki çalışmalar henüz çok sınırlı olup, bu konuda son yıllarda *Vitis vinifera*'da özellikle haritalama amaçlı çalışmalarda kullanılmaya başlandığı görülmektedir (Salmaso *et al.* 2004, Moser *et al.* 2005, Salmaso *et al.* 2006, Troggio *et al.* 2006). SSCP tekniği, DNA dizisinde sekans analizine gerek kalmaksızın nükleotit varyasyonlarını belirlemede büyük avantaj sağlamaktadır (Orita *et al.* 1989). İlgili primerle çoğaltılan DNA dizisindeki nükleotit değişimi, DNA'nın elektroforetik hareketliliğini etkilemekte ve farklı bant deseni oluşturmaktadır (Melcher 2003). SSCP markörler gen spesifik olması nedeniyle, primer dizaynı için gen sekans bilgisi kullanılarak, mutasyonları belirlemede kullanılmaktadır (Hayashi 1992). Mutasyon tarama konusunda SSCP markörler daha sıklıkla, özellikle tıp tanılarında, tek lokusda farklılıkların analizinde kullanılmaktadır (Sunnucks *et al.* 2000). SSCP analizinde başarıyı etkileyen en önemli faktör ilgili genin sahip olduğu büyüklüktür (Nataraj *et al.* 1999).

Bu bilgilere dayanarak yapılan bu çalışmada morfolojik gözlemler ve sitolojik incelemeler sonucunda seçilen 22 adet Sultani Çekirdeksiz ve 22 adet Kalecik karası üzüm çeşitlerine ait mutant adayı birey ile her iki çeşidin kontrol bitkileri olmak üzere toplam 46 adet bireyde SSCP tekniği ile moleküler tanımlama yapılmıştır. Ancak tüm bireyler, kullanılan 15 SSCP primeri ile monomorfik bantlar oluşturmuştur. Buna göre, bireyler arasında, taranan DNA dizisi bakımından bir farklılık belirlenememiştir. Özellikle Sultani Çekirdeksiz'de ploid yapının gözlendiği SÇ 30 Gy 34 ve tez çalışması dışında bir birey olduğu halde, çekirdek oluşturması nedeniyle tez çalışmasının moleküler tanımlama bölümüne dahil edilen SÇ 50 Gy 3 no'lu bireylerin de diğer tüm Sultani Çekirdeksiz genotipleri gibi monomorfik bantlar vermiş olması, bu teknik ile polimorfizmin ortaya çıkarılmasındaki zorluğu kanıtlayan destekleyici bulgu olmuştur.

Primer seçiminde, henüz asmalara özgü önemli özellikleri kontrol eden genlerin DNA düzeyindeki bilgisi yetersiz olduğundan, tez çalışması kapsamında en optimum yaklaşım hedeflenerek, özellikle vejetatif karakterlerden sorumlu homolog genlerden

yararlanılarak SSCP primerleri seçilmiş ve mutant adayı bireylerde genetik polimorfizmin belirlenmesine çalışılmıştır.

SSCP analizlerinde elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, mutant adayı bireylerde, SSCP polimorfizminin monomorfik düzeyde ortaya çıkmasının aşağıdaki nedenlerden kaynaklandığı düşünülmektedir.

- Mutasyonun genom içerisinde oldukça küçük bir alanda meydana gelmiştir.
- Belirli morfolojik özelliği kodlayan gen bölgesinde amplifiye edilen alan oldukça küçüktür.
- Fenotipik olarak gözlenen özellikleri kontrol eden genler hakkında henüz asmalarda yeterli bilginin olmayışı nedeniyle gen spesifik bir yöntem olan SSCP yönteminde kullanılan primer sayısının oldukça sınırlı olmasıdır.

Sonuç olarak tez çalışması ile, Sultani Çekirdeksiz ve Kalecik karası üzüm çeşitlerinde gama radyasyonu uygulamalarından yaşama gücünde bireylerin elde edildiği varyasyonlara ulaşılması başarılmıştır. Elde edilen yeni populasyonların, çok yıllık bitkiler için çok sınırlı kabul edilecek üç yıllık bir süre için de olsa, morfolojik değerlendirmelerinde tekrar edilebilir farklılıklar belirlenmiş ve mutasyonun varlığı fiziksel anlamda ortaya konulmuştur. Ayrıca kromozom çalışmaları ile, seçilmiş bireylerde sitolojik yönlü değişimlerin elde edildiği belirlenmiştir. Morfolojik ve sitolojik çalışmalardan elde edilen sonuçlar, bireylerde mutasyonun moleküler düzeyde tanımlanmasının hedeflendiği SSCP çalışmaları ile desteklenmek istenmiş ancak, SSCP çalışmalarından elde edilen sonuçların monomorfik olması nedeniyle ilişkilendirme yapılamamıştır. Ancak tez çalışması iki açıdan önem taşımaktadır. Birincisi, ülkemizde asma ıslahında yapay mutasyon tekniklerinden yararlanılarak elde edilen bireylerin bağ koşullarına aktarılmasıyla önemli bir kaynak oluşturulmuştur. İkinci olarak, az veya çok varyasyonların elde edildiği bu populasyonlar üzerinde gerçekleştirilmiş olan sitolojik ve moleküler düzeyde yürütülmüş tanımlamalar, gerek kromozom çalışmaları gerekse SSCP tekniğinin uygulanması bakımından, ülkemizde asmalar üzerinde gerçekleştirilen ilk çalışmalar olarak orijinal niteliktedir.

Elde edilen bireyler ve bulgular bundan sonraki aşamada mutasyon ıslahı ile yeni bireylerin geliştirilmesinde kullanılabileceği gibi, son yıllarda giderek önem kazanan gen fonksiyonları ve genom haritalama çalışmaları için gerekli olan mutasyonla değiştirilmiş özellikler ve DNA dizilerinin sağlanabileceği bir kaynak olarak hizmet edecektir.

KAYNAKLAR

- Ahloowalia, B.S. and Maluszynski, M. 2001. Induced mutations- A new paradigm in plant breeding. *Euphytica*, 118; 167-173.
- Ahloowalia, B.S. Maluszynski, M. and Nichterlein, K. 2004. Global impact of mutation derived varieties. *Euphytica*, 135; 187-204.
- Albuquerque, R.M. and Souza, C.M. 2001. Italia rubi, Benitaka and Brasil-three Brazilian spontaneous mutations of cv. Italia. *Progrès Agricole et Viticole*, Montpellier, 118 (23); 503-505.
- Anonymous 2002. Mutant germplasm characterization using molecular markers. A manual, IAEA, Vienna 2002. Training course series no:19.
- Anonymous 2006. Web sitesi: <http://www-mvd.iaea.org/MVD>, Erişim tarihi: 27.10.2006
- Baditescu, D. 1986. Transformation of vine by induced genetic mutagenesis. *Vignevine*, Bologna, 13 (1); 271-277.
- Bellin, D., Velasco, R. and Grando, M.S. 2001. Intravarietal DNA polymorphisms in grapevine (*V. vinifera* L.). Proc. Int. Sym. on Molecular Markers. *Acta Horticulture*, 546; 343-349.
- Borrego, J., De Andres, M. T., Gamez, J.L. and Ibanez, J. 2002. Genetic study of Malvasia and Torrontes groups through molecular markers. *American Journal Enology and Viticulture*, 53; 125-130.
- Botta, R., Vallania, R. and Me, G. 1988. Grapevine breeding by gamma radiation: Results and Prospects. *Acta Horticulture*, 224; 421-423.
- Botta, R., Vallania, R. and Me, G. 1989. Induced seedlessness in *Vitis vinifera* L. cv. Queen of the Vineyard. *Rivista-di-Viticultura e di Enologia*, 42 (4); 9-15.

- Bunn, F.C., Lintott, C.J., Scott, R.S. and George, P.M. 2002. Comparison of SSCP and DHPLC for the Detection of LDLR Mutations in a New Zealand Cohort. *Human Mutation, Mutation in Brief.*, 492.
- Burge, G. K., Morgan, E. R. and Seelye, J. E. 2002. Opportunities for synthetic plant chimeral breeding: past and future. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 70; 13-21.
- Castellarin, S., Di Gaspero, G., Marconi, R., Nonis, A., Peterlunger, E., Paillard, S., Adam-Blondon, F. and Testolin, R. 2006. Colour variation in red grapevines (*Vitis vinifera* L.): genomic organisation, expression of flavonoid 3'-hydroxylase, flavonoid 3', 5'- hydroxylase genes and related metabolite profiling of red cyanidin-/blue delphinidin-based anthocyanins in berry skin. *BMC Genomics*, 7:12; 2-17.
- Cervera, M.T., Cabezas, J.A., Sancha, J.C., Martinez de Toda, F. and Martinez-Zapater, J.M. 1998. Application of AFLPs to the characterization of grapevine *Vitis vinifera* L. Genetic resources: A case study with accesions from Rioja (Spain). *Theor. Appl. Genet.*, 97; 51-59.
- Charbaji, T. and Nabulsi, I. 1999. Effect of low doses of gamma irradiation on *in vitro* growth of grapevine. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 57; 129-132.
- Cleggett, M. D. 2002. Variety 'Malian'. *Plant Varieties Journal*, 15 (2); 85-86.
- Çoban, H. 1998. Investigations on the variations caused by gamma-rays originating from Co⁶⁰ treated to Round Seedless grape variety in different doses. Ege Üniv. Fen Bilimleri Ens. Doktora tezi. Bornova, İzmir.
- Çoban, H. 2003. Vejetatif olarak üretilen bitkilerde mutasyon ıslahı. S. Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi, 17 (31); 62-67.

- Çoban, H., Kara, S. ve İlter, E. 2002. Investigations on radiosensitivity of some grape varieties. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 5(5); 601-603.
- Dangl, G.S., Mendum, M.L., Prins, B.P., Walker, M.A., Meredith, C.P. and Simon, C.J. 2001. Simple sequence repeat analysis of a clonally propagated species: A case study with accessions from Rioja (Spain). *Theor. Appl. Genet.*, 97; 51-59.
- Dean, M., White, M.B., Amos, J., Gerrard, B., Steward, C., Khaw, K.T. and Leppert, M. 1990. Multiple mutations in highly conserved residues are found in mildly affected cystic fibrosis patients. *Cell*, 61; 863-870.
- Dermen, H. 1960. The nature of plant sports. *American Horticultural Magazine*, 39; 123-173.
- Donini, B. 1975. Induction and isolation of somatic mutations in vegetatively propagated plants. II. Research Coordination Meeting on The Improvement of Vegetatively Propagated Plants Through Induced Mutations. Tokai (Japan), IAEA Vienna, 35-51.
- Donini, B. 1982. Mutagenesis applied to improve fruit trees. Induced mutations in vegetatively propagated plants II. Panel Proceedings Series., 29-35.
- Donini, B. 1992. FAO/IAEA International training course on the induction and use of mutations in plant breeding. Seibersdorf, 1-10.
- Drenkard, E., Richter, B.G., Rozen, S., Stutius, L.M., Angell, N.A, Mindrinos, M., Cho, R.J., Oefner, P.J., Davis, R.W. and Ausubel, F.M. 2000. A simple procedure for the analysis of single nucleotide polymorphism facilitates map-based cloning in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 124; 483-1492.
- Einset, J. and Pratt, C. 1975. Grapes. (In: *Advances in Fruit Breeding*. Ed.: J. Janick and J.N. Moore). Purdue University Press. West Lafayette; Indiana., 130-153.

- Fanizza, G., Chaabane, R., Ricciardi and Resta, P. 2003. Analysis of a spontaneous mutant and selected clones of cv. Italia (*Vitis vinifera*) by AFLP markers. *Vitis*, 42 (1); 27-30.
- Fideghelli, C. 1990. Plant mutation breeding for crop improvement, Held in Vienna, 247.
- Fisher, D. 1997. History of The International Atomic Energy Agency-The First Forty Years, ISBN 92-0-102397-9. 550 p. Division of Publications IAEA, Vienna, Austria.
- Franks, T., Botta, R. and Thomas, M.R. 2002. Chimerism in grapevines: implications for cultivar identity, ancestry and genetic improvement. *Theor. Appl. Genet.*, 104; 192-199.
- Fregoni, M. 2000. 'Malvasia Rosa' a new aromatic grapevine variety. *Acta Horticulturae.*, 528; 685-687.
- Ghimpu, M.V. 1929. Sur les chromosomes de *Vitis*, *Medicago* et *Hordeum*. *Comp. R. de l'Assoc. des Anat.*, 111-114.
- Gilchrist, E.J. and Haughn, G. W. 2005. TILLING without a plough: a new method with applications for reverse genetics. *Current opinion in plant biology.* 8; 211-215.
- Gogorcena, Y., Arulsekhar, S., Dandekar, A.M. and Parfitt, D.E. 1993. Molecular markers for grape characterization. *Vitis*, 32; 183-185.
- Goszczyński, D.E. and Jooste, A.E.C. 2002. The application of single-strand conformation polymorphism (SSCP) technique for the analysis of molecular heterogeneity of grapevine virus A. *Vitis*, 41(2); 77-82.

- Griffiths A.J.F., Wessler S.R., Lewontin R.C., Gelbart W.M., Suzuki D.T. and Miller J.H. 2005. Introduction to Genetic Analysis. Eight Edition (ISBN 0-7167-4939-4). W.H.Freeman and Company, New York, 782p.
- Haas, H.U. and Alleweldt, G. 2000. The karyotype of grapevine (*Vitis vinifera* L.). VII. Int. Sym. on Grapevine Genetics and Breeding. Acta Horticulturae, 528; 247-250.
- Hagiwara, K., Freeman, A.A.H., Mc Menamin, M.G. and Haris, C.C. 1998. Screening cloned PCR fragments by restriction endonuclease fingerprinting to obtain wild-type sequences. BioTechniques, 25; 554-558.
- Hajdu, E., Körösi, F. And Jezierska, S.E. 1995. Studies on varietal vine selection. Int. Symp. On Clonal Selection, Yalta (Ukraine), 1-10.
- Hayashi, K. 1991. PCR-SSCP: A simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA. PCR Methods Applications, 1; 34-38.
- Hayashi, K. 1992. PCR-SSCP: A method for detection of mutations. Review. GATA, 9(3); 73-79.
- Hayashi, K. and Yandell, D.W. 1993. How sensitive is PCR-SSCP? Human Mutation, 2; 338-346.
- Hedley, P.E., Machray, G.C., Davies, H.V., Burch, L. and Waugh, R. 1994. Potato (*Solanum tuberosum*) invertase-encoding cDNAs and their differential expression. Gene 145; 111-214.
- Hennesy, L., Teare, J. and Ko, C. 1998. PCR conditions and DNA denaturants affect reproducibility of single-strand conformation polymorphism patterns for BRCA1 mutations. Clin. Chem. 44; 879-882.

- Hocquingny, S., Pelsy, F., Dumas, V., Kindt, S., Heloir, M-C., and Merdinoğlu, D. 2004. Diversification within grapevine cultivars goes through chimeric states. *Genome*, 47; 579-589.
- Hongyo, T., Buzard, G.S., Calvert, R.J. and Weghorst, M. 1993. 'Cold SSCP': A simple, rapid and non-radioactive method for optimized single strand conformation polymorphism analyses. *Nucleic Acids Research*, Vol. 21; No. 16; 3637-3642p.
- Imazio, S., Labra, M., Grassi, F., Winfield, M., Bardini, M. and Scienza, A. 2002. Molecular tools for clone identification: the case of the grapevine cultivar 'Traminer'. *Plant Breeding*, 121; 531-535.
- Jaeckel, S., Epplen, J.T., Kauth, M., Mitterski, B., Tschentscher, F. and Epplen, C. 1998. Polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism or how to detect reliably and efficiently each sequence variation in many samples and many genes. *Electrophoresis*, 19; 3055-3061.
- Jain, S. M. and Swennen 2004. Banana improvement. Cellular, molecular biology and induced mutations (Proje FAO/IAEA) (book). Hautea, D. M., Molina, G. C., Balareto, C. H., Coronado, N. B., Perez, M. T. H., Alvarez, Cahama, A. O., Akuba, R. H., Qilloy, R. B., Frankie, R. B., Capillo, C. S. 2004. Analysis of induced mutants of Philippine bananas with molecular markers. *Plant Breeding and Genetic section 2004* (Stephon Nielen).
- Jooste, A.E.C. and Goszczynski, D.E. 2005. Single strand conformation polymorphism (SSCP), cloning and sequencing reveals two major groups of divergent molecular variants of grapevine leafroll-associated virus 3 (GLRaV-3). *Vitis*, 44(1); 39-43.
- Kajiwara, H., Kaneko, T., Nishimura, M. and Ishizaka, M. 2005. Proteomic identification of RuBisCO/LS gene mutations in radiation mutant of rice by two-dimensional gel electrophoresis, mass spectrometry, single strand

conformation polymorphism and nucleotide sequencing. Rice Genetics Newsletter, Vol 20; 1-3p.

Karniel, S. 1996. Variety “King Husainy” syn “Jade Seedless”. Plant Varieties Journal. 9 (1); 17.

Kim, S.K., Reisch, B.I. and Aldwinckle, H.S. 1986. *In vitro* grape shoot tip mutagenesis. Vignevini, Bologna, 13; 26-27.

Kim, S.H., Jeong, J.H., Kim, S.K. and Paek, K.Y. 2002. Parantage identification of “Daebong” grape (*Vitis* spp) using RAPD analysis. Journal Plant Biotechnology, 4(2); 67-70.

Kobayashi, S., Yamamoto, N. and Hirochika, H. 2004. Retrotransposon-induced mutations in grape skin color. Science, Washington, 304; 982.

Kobayashi, S., Yamamoto, N. and Hirochika, H. 2005. Association of VvmybA1 gene expression with anthocyanin production in grape (*Vitis vinifera*) skin color mutants. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, 74 (3); 196-203.

Körösi, F., Hajdu, E. and Jezeierska, S.E. 1995. Emperical modelling of radiosensitivity of some grape clone to X-ray irradiation. I. Int. Sym. On Agric. And Bio-Industries, Brussels (Belgium), 1-8.

Kuhn, D., Borrone, J., Meerow, A., Motamayor, J., Brown, J.S. and Schnell, R.J. 2005. Single strand conformation polymorphism analysis of candidate genes for reliable identification of alleles by capillary array electrophoresis. Electrophoresis. 26; 112-125.

Kuksova, V.B., Nikolai, M.P. and Gleba, Y. 1997. Somaclonal variation and *in vitro* induced mutagenesis in grapevine. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 49; 17-27.

- Lacerda, L.L., Serrano, S.V., Mathes, A., Rey, J.A., Bello, M.J. and Casartelli, C. 2005. An intronic variant in the TP53 gene in a Brazilian woman with breast cancer. *Cancer Genet Cytogenet.* 2005 Jul 15;160(2):160-3
- Lagoda, P.J.L. 2005. Second Research Coordination Meeting on “Effects of mutagenic agents on the DNA sequence in plants”, Republic of Korea, 14-18 November 2005 (Plant Breeding and Genetics Newsletter, July 2005)
- Lapade, A.G., Veluz, A.M.S, Marbella, A.C., Barrida and Rama, M.G. 2002. Status of Mutation Breeding in Vegetatively Propagated Crops in the Philipines. FNCA Workshop on Mutation Breeding 20-23 August, Beijing, China.
- Lima da Silva, A., Hariscain, P., Ollat, N. and Doazan, J.P. 2000. Comparative *in vitro* development of five grapevine rootstock varieties and mutants from the cultivar ‘Grevesac’. *Acta Horticulture*, 528; 351-357.
- Lodhi, M.A., Daly, M.J., Ye, G.N., Weeden, N.F. and Reisch, B.I. 1994. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars. *Vitis* species. *Plant Molecular Biology Reporter* 12 (1):6-13.
- Lörz, H and Wenzel, G. 2004. Molecular marker systems in plant breeding and crop improvement (Biotechnology in Agriculture and Forestry 55). Mohler, V. and Schwarz, G. 2004. Genotyping Tools in Plant Breeding: From Restriction Fragment Length Polymorphism to Single Nucleotide Polymorphism (23-34p).
- Makino, R., Kaneko, K., Kurahashi, T., Matsumura, T. and Mitamura, K. 2000. Detection of mutation of the p53 gene with high sensitivity by fluorescence-based PCR-SSCP analysis using low-pH buffer and an automated DNA sequencer in a large number of DNA samples. *Mutation Research*, 452 (1); 83-90.
- Maluszynski, M. 2001. Officially released mutant varieties-The FAO/IAEA Database. *Plant Tissue and Organ Culture*, 65; 175-177.

- Maluszynski, M., Nichterlein, K., Van Zanten, L. and Ahloowalia, S. 2000. Officially released mutant varieties-The FAO/IAEA Database. Mutation Breeding Review No:12; 1-84.
- Mandal, A.K.A., Chakrabarty, D. and Data, S.K. 2000. Application of *in vitro* techniques in mutation breeding of chrysanthemum. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 60; 33-38.
- Mann, D. and Mann, D.E. 1998. Variety "Cygne Blanc". Plant Varieties Journal, 11 (2); 51-52.
- Marasalı, B., Kunter, B., Değirmenci, D., Keskin, N., Taner, Y., Çelik, H., Tutluer, İ., Uslu, N., Sağel, Z. ve Peşkirçioğlu, H. 2003. Yerli Üzüm Çeşitlerinde Mutasyon İslahına Yönelik Olarak Etkili Mutasyon Dozunun Belirlenmesi ve M₁V₁ Generasyonunda Görülen İlk Etkiler. Türkiye IV. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi, Bildirileri: 467-469, 8-12 Eylül 2003. Antalya.
- Marcotrigiano, M. 1997. Chimeras and variegation: patterns of deceit. HortScience, 32; 773-784.
- Marcotrigiano, M. 1990. Genetic mosaic and chimeras, Implications in biotechnology. Biotechnology in agriculture and forestry. Vol. 11. Springer-Verlag, Berlin, 85-111.
- Markoff, A., Savov, A., Vladimirov, V., Bogdanova, N., Kremensky, I. and Ganev, V. 1997. Optimization of single-stranded conformation polymorphism analysis in the presence of polyethylene glycol. Clin. Chem. 43; 30-3.
- Martin Lopes, P., Zhang, H. and Koebner, R. 2001. Detection of Single Nucleotide Mutations in Wheat Using Single Strand Conformation Polimorphism Gels. Plant Molecular Biology Reporter, 19; 159-162.

- Melcher, U. 2003. <http://opbs.okstate.edu/melcher/MG11129.html> Erişim tarihi:01.10.2006
- Micke, A., Donini, B. and Maluszynski, M. 1987. Induced mutations for crop improvement -a review. Trop. Agric. (Trinidad), No:4, 259-275.
- Moretti, G. 1983. A spontaneous mutation of Merlot: Merlot Rose. Rivista di Viticoltura e di Enologia, Conegliano, 36; 541-554.
- Moser, C., Segala, C., Fontana, P., Salakhudtinov, I., Gatto, P., Pindo, M., Zyprian, E., Toepfer, R., Grando, M.S. and Velasco, R. 2005. Comparative analysis expressed sequence tags from different organs of *Vitis vinifera* L. Funct. Integr. Genomics, 5; 208:217.
- Nataraj, A.J., Olivos-Glander, I., Kusukawa, N. and Edward, H.W. 1999. Single-strand conformation polymorphism and heteroduplex analysis for gel-based mutation detection. Electrophoresis, 20; 1177-1185.
- Neff, M. M., Neff, J.D., Chory, J. and Pepper, A.E. 1998. dCAPs, a simple technique for the genetic analysis of single nucleotide polymorphisms: experimental applications in *Arabidopsis thaliana* genetics. Plant J. 14; 387-392.
- Notsuka, K., Tsuru, T. and Shiraishi, M. 2000. Induced polyploid grapes via “*in vitro*” chromosome doubling. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, 69 (5); 543-551.
- Orita, M., Suzuki, Y., Sekiya, T. and Hayashi, K. 1989. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. Genomics, 5; 874-879.
- Park, S.M., Hiramatsu, M. and Wakana, A. 1999. Aneuploid plants derived from crosses triploid grapes through immature seed culture and subsequent embryo culture. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 59; 125-133.

- Park, S.M., Wakana, A., Hiramatsu, M. and Uresino, K. 2002a. A tetraploid hybrid plant from 4x X 2x crosses in *Vitis* and its origin. *Euphytica*, 126; 345-353.
- Park, S.M., Wakana, A., Kim, J.H. and Jeong, C.S. 2002b. Male and female fertility in triploid grapes (*Vitis* complex) with special reference to the production of aneuploid plants. *Vitis* 41(1); 11-19
- Parpstein, F. 1988. Improvement of selection methods for the compact growth character in the mutation breeding apple cultivars. *Acta Horticulture*, 224; 395-412p.
- Patil, S.G. and Patil, V.P. 1992. Karyomorphology of *Vitis vinifera*, *V.rotundifolia* and their hybrid. *Cytologia*, 57; 91-95.
- Patil, V.P. and Jadhav, A.S. 1985. Karyomorphology of three varieties of *Vitis vinifera*. *Cytologia*, 50; 83-88.
- Phillip, M.C. 1999. Genes and Mutations. www.ndsu.nodak.edu/mutation
- Phillips, H.A., Howard, G.C.W and Miller, W.R. 2000. p53 mutations as a marker of malignancy in bladder washing samples from patients with bladder cancer. *British Journal of Cancer*, 82; 136-141.
- Phillips, R.L. and Vasil, I.K. 2001. DNA-based markers in plants, 2nd edn. Kuwer, Dordrecht.
- Pires, E.J.P., Pommer, C.V., Passos, S. and Terra, M. 1988. Seedless somatic mutant in the Niagara Red grape cultivar. *Bragantia-Revista Cientifica do Instituto Agronomico*, 47; 171-176.
- Pires, E.J.P., Swazaki, H.E., Terra, M.M., Botelho, R.V., Conagim, A. and Nogueira, A.M. 2003. Redimeire: A natural mutation of cv. Italia in Brazil. *Vitis*, 42(1); 55-56.

- Plomioni, C., Hurme, P., Frigerio, J.-M., Ridolfi, M., Pot, D., Pionneau, C., Avila, C., Gallardo, F., David, H., Neutelings, G., Campbell, M., Canovas, F.M. and Savolainen, O. 1999. Developing SSCP markers in two *Pinus* species. *Molecular Breeding*, 5; 21–31.
- Predieri, S. 2001. Mutation induction and tissue culture in improving fruits. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 64; 185-210.
- Raj, A.S. and Seethaiah, L. 1968. Karyotype analysis and meiotic studies in three varieties of grape (*Vitis vinifera* L.). *Cytologia*, 34; 475-483.
- Ralli, G. and Ralli, I. 1996. Variety “Ralli Seedless”. *Plant Varieties Journal*, 9(1);17-18.
- Rathjen, A.H. and Robinson, S.P. 1992. Characterization of a variegated grapevine mutant showing reduced polyphenol oxidase activity. *Australian Journal of Plant Physiology*, Melbourne, 19; 43-54.
- Ravnik-Glavac, M., Glavac, D. and Dean, M. 1994. *Hum. Mol. Genet.*, 3; 801-807.
- Regner, F., Stadlbauer, A., Eisenheld, C. and Kaserer, H. 2000a. Genetic relationships among pinots and related cultivars. *American Journal of Enology and Viticulture*, 51 (1); 7-14.
- Regner, F., Wiedeck, E. and Stadlbauer, A. 2000b. Differentiation and identification of White Riesling clones by genetic markers. *Vitis*, 39(3); 103-107.
- Regner, F., Hock, R. and Santiago, J.L. 2006. Highly variable *Vitis* microsatellite loci for the identification of Pinot noir clones. *Vitis*, 45 (2); 85-91.
- Riaz, S., Garrison, K.E., Dangl, G.S., Bouriquot, J.M. and Meredith, C.P. 2002. Genetic divergence and chimerism within ancient asexually propagated wine grape cultivars. *J. Am. Hort. Sci.*, 127; 508-514.

- Rosati, P., Silvestroni O., Intrieri, C. and Murri, G. 1990. Effects of *in vitro* gamma irradiation on two grapevine cultivars, *Vitis vinifera* L. *Vitis*. Special Issue, 471-477.
- Sacerdote, J., Radicati, L., Me, G. and Donini, B. 1981. Investigations on two cases of induced poliploidy in *Vitis vinifera* L. (cv. Barbera), *Vitis*, 20; 335-340.
- Sağel, Z., Peşkircioğlu, H., Tutluer, İ., Uslu, N., Şenay, A., Taner, K. Y., Kunter, B., Şekerci, S. ve Yalçın, S. 2002. Bitki Islahında Mutasyon ve Doku Kültürü Teknikleri. TAEK, ANTHAM, Nükleer Tarım Radyobioloji Bölümü.
- Salmaso, M., Faes, G., Segala, C., Stefanini, M., Salakhutdinov, I., Zyprian, E., Toepfer, R., Grando, M.S. and Velasco, R. 2004. Genome diversity and gene haplotypes in the grapevine (*Vitis vinifera* L.), as revealed by single nucleotide polymorphisms. *Molecular Breeding*, 14; 385-395.
- Salmaso, M., Malacarne, G., Troggio, M., Stefanini, M., Grando, M.S. and Velasco, R. 2006. An SNP EST-related genetic map of the grapevine (*Vitis vinifera* L.). (Submitted)
- Sangsiri, C., Sorajjapinun, W. And Srinives, P. 2005. Gamma radiation induced mutations in Mungbean. *Science Asia*, 31; 251-255.
- Sato, Y. and Nishio, T. 2003. Mutation detection in rice waxy mutants by PCR-RF-SSCP. *Theor. Apply. Genet.*, 107 (3); 560-567
- Schneider, S., Reustle, G. and Zyprian, E. 1996. Detection of somaclonal variation in grapevine regenerants from protoplasts by RAPD-PCR. *Vitis*, 35; 99-100.
- Schum, A. 2003. Mutation Breeding in Ornamentals: An Efficient Breeding Method. Proj. 21st IS on Classical Molecular Breeding (Ed. G. Forkmann *et al.*) *Acta. Hort.*, 612; 47-53.

- Scott, K.D., Ablett, E.M., Lee, L.S. and Henry, R. J. 2001. AFLP markers distinguishing an early mutant of Flame Seedless grape. *Euphytica*, 113; 245-249.
- Shetty, B. V. 1958. Cytotaxonomical studies in *Vitaceae*. *Bibliogr. Genet.*, 28; 167-172.
- Shirasawa, K., Monna, L., Kishitani, S. and Nishio, T. 2004. Single Nucleotide Polymorphisms in randomly selected genes among *japonica* rice (*Oryza sativa* L.) varieties identified by PCR-RF-SSCP. *DNA Research* 11; 275-283.
- Skene, K.G.M., Goodwins, D.R. and Barlas, M. 1988. Ploidy stability in grapevines following longterm storage *in vitro*. *Vitis*, 27; 41-46.
- Slabaugh, M.B, Huestis, G.M., Leonard, J., Hooloway, J.L. Rosato, C., Hongtracul, V., Martini, N., Toepfer, R., Voets, M., Schell, J. and Knapp, S.J. 1997. Sequence-based genetic markers for genes and gene families: single-strand conformation polymorphisms for the fatty acid synthesis genes in *Cuphea*. *Theor. Appl. Genet.* 94; 400-408.
- Sözen, M.M., Whittall, R., Oner, C., Tokatlı, A., Kalkanoğlu, H.S., Dursun, A., Coşkun, T., Oner, R. and Humphires, S.E. 2005. The molecular basis of familial hypercholesterolaemia in Turkish patients. *Atherosclerosis*, 180(1); 63-71.
- Spiegel-Roy, P. 1990. Economic and agricultural impact of mutation breeding in fruit trees. *Mutation Breeding Review*, No: 5; 1-27.
- Sunnucks, P., Wilson, A.C.C., Beheregaray, L.B., Zenger, K., French, J. and Taylor, A. C. 2000. SSCP is not so difficult: the application and utility of single-stranded conformation polymorphism in evolutionary biology and molecular ecology. *Molecular Ecology*, 9; 1699-1710.
- Thompson, M. and Olmo, H.P. 1963. Cytohistological studies of cytochimeric and tetraploid grapes. *American Journal of Botany*, 50; 901-950.

- Troggio, M., Malacarne, G., Coppola, G., Segala, C., Cartwright, D.A., Pindo, M., Stefanini, M., Mank, R., Moroldo, M., Morgante, M., Grando, M.S. and Velasco, R. 2006. A physically anchored SNP-based genetic linkage map of grapevine (*Vitis vinifera* L.). (submitted to Genetics)
- Van Harten, A. M. 1998. Mutation Breeding: Theory and Practical Applications. Cambridge Univ. Press. Cambridge.
- Verdisson, S., Baillieul, F. and Audran, J. C. 1999. Use of RAPD markers to detect chimerism in synthetic grape chimeras (*Vitis vinifera* L.). *Vitis*, 38 (3); 93-95.
- Vignani, R., Bowers, J. E. and Meredith, C. P. 1996. Microsatellite DNA polymorphism analysis of clones of *Vitis vinifera* 'Sangiovese' *Sci. Hort.*, 65; 163-169.
- Viljoen, T.A. and Spies, J.J. 1995. Cytogenetical studies of three *Vitis* species. *Vitis*, 34(4); 221-224.
- Wagner, J. 2002. Screening methods for detection of unknown point mutations.(http://www.users.med.cornell.edu/screening_for_mutations.), 2003 February 17.
- Wang, C.T., Huang, Z.J., He, C.F., Bi, C.L. and Shen, Y.Z. 2001. Detection of the wheat salt-tolerant-mutant using PCR-SSCP combining with direct sequencing. *Yi Chuan Xue Bao*, 28 (9); 852-855.
- Waugh, R, Leader, D.J., Mc Callum, N. and Caldwell, D. 2006. Harvesting the potential of induced biological diversity. *Trends in Plant Science*, 11(2);71-79.
- Xie, J., Todd, C., Wehner, C. and Conkling, M.A. 2002. PCR- based Single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis to clone nine aquaporin genes in *Cucumber*. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 127 (6); 925-930.

- Yadav, R.C. and Grumet, R. 1994. Tendrils as an alternate tissue source for chromosome visualization. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 119 (4); 850-852.
- Yamada, M., Yamare, H., Kurihara, A., Nagata, K., Yoshinaga, K., Hirakawa, N., Sato, A., Iwanami, H., Ozawa, T., Sumi, T., Hirabayashi, T., Matsumoto, R., Kakutani, M. and Nakajima, I. 2003. New grape cultivar "Sunny Rouge". *Bull. Nat. Inst. Fruit Tree Sci.*, 2; 33-42.
- Yamashita, H., Shigehara, I. and Haniuda, T. 1998. Production of triploid grapes by *in ovulo* embryo culture. *Vitis*, 37(3); 113-117.
- Ye, G., Söylemezoğlu, G., Weeden, N.F., Lamboy, W.F., Pool, R.M. and Reisch, B.I. 1998. Analysis of the relationship between grapevine cultivars, sports and clones via DNA fingerprinting. *Vitis*, 37(1); 33-38.
- Yüzbaşıoğlu, D., Ünal, F. and Duman, H. 1997. Giemsa c-banding analysis of *Sternbergia lutea* (L.) Ker-Gawl. Ex Sprengel and *S. sicuta* Tiro ex Guss from Turkey. The Japan Mendel Society. *Cytologia*, 62; 1-6.
- Zulini, L., Fabro, E. and Peterlunger, E. 2005. Characterisation of grapevine cultivar Picolit by means of morphological descriptors and molecular markers. *Vitis*, 44(1); 35-38.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Dilek DEĞİRMENCİ
Doğum Yeri : Ankara
Doğum Tarihi : 1976
Medeni Hali : Bekar
Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu

Lise : Ankara Ayrancı Lisesi
Lisans : Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi
Bahçe Bitkileri Bölümü, 1993-1997
Yüksek Lisans: Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri
Anabilim Dalı 1997-2000

Çalıştığı Kurum ve Yılları

Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, 1999-2006.

Yayımları

Değirmenci, D., Karataş, H., Velasco, R., Vezzulli, S., Marasalı Kunter, B. Bodur, Ç. Ağaoğlu, Y. S. 2006. Mikrosatellite fingerprinting of homonymous grapevine (*Vitis vinifera* L.) varieties in neighboring regions of South-East Turkey. (Submitted).

Değirmenci, D., Marasalı Kunter, B. 2006. Asmalarda Çekirdeksizliğin Biyolojik Özellikleri ve Islah Amaçlı Kullanımı. Alatarım. (değerlendirilme aşamasında)

Ağaoğlu, Y. S., Karataş, H., Değirmenci, D. 2006. Molecular characterization of some local (İskilip-Çorum) Anatolian grape cultivars (*Vitis vinifera* L.). 9th International Conference on Grapevine Genetics and Breeding. Udine.

- Marasalı, B., Değirmenci, D., Karabacak N. 2005. Uslu Üzüm Çeşidinde Tohum Taslaklarının Gelişimi ile Tane Tutumu Arasındaki İlişkiler. Türkiye VI. Bağcılık Sempozyumu, Tekirdağ, 19-23 Ekim 2005 (Basım aşamasında)
- Marasalı, B., Kunter, B., Değirmenci, D., Keskin, N., Taner, Y., Çelik, H., Tutluer, İ., Uslu, N., Sağel, Z., Peşkircioğlu, H. 2003. Yerli Üzüm Çeşitlerinde Mutasyon İslahına Yönelik Olarak Etkili Mutasyon Dozunun Belirlenmesi ve M₁V₁ Generasyonunda Görülen İlk Etkiler. Türkiye IV. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi 8-12 Eylül 2003, Antalya, 467-469.
- Marasalı, B., Keskin, N., Değirmenci, D. 2003. Yeniden Yapılanma Sürecinde Türkiye Bağcılığı. Ekin Dergisi. Yıl:7, Sayı: 24, Sayfa: 67.
- Çelik, H., Marasalı, B., Söylemezoğlu, G., Değirmenci, D., Karaağaç, E., Göktürk Baydar, N., Karlı İlbay, A. 2002. Razakı ve Hamburg Misketi Üzüm Çeşitleri İçin Ankara Koşullarında Uygun Anaç Seçimi . Türkiye V. Bağcılık ve Şarapçılık Sempozyumu, Nevşehir, 122-129.
- Değirmenci, D., Marasalı, B. 2002. Stenospermokarpik Üzüm Çeşitlerinde Çekirdeklerin *In vivo* Çimlenme Gücünün Geliştirilmesinde Büyüme Düzenleyici Madde Etkilerinin Morfolojik ve Anatomik İncelenmesi. Türkiye V. Bağcılık ve Şarapçılık Sempozyumu, Nevşehir, 46-52.
- Değirmenci, D., Marasalı, B. 2001. Sultani Çekirdeksiz ve Perlette Üzüm Çeşitlerinde Büyüme Düzenleyici Madde Uygulamalarının Çekirdek İzi Gelişimine Etkisi. Tarım Bilimleri Dergisi, Cilt: 7, Sayı: 4, 148-152s.
- Değirmenci, D. 2000. Stenospermokarpik Üzüm Çeşitlerinde Büyüme Düzenleyici Maddelerin Çekirdek İzi Gelişimi ve Çimlenmesini Uyarıcı Etkileri. Yüksek Lisans Tezi. 61 S. Ankara.