

**T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI
2021-YL-015**

**NAR (*PUNICA GRANATUM* L. VE *P. NANA* L.)’DA
BİTKİ BOYU İLE İLİŞKİLİ RAPD
BELİRTEÇLERİNİN BELİRLENMESİ VE BAZI
MORFOLOJİK GÖZLEMLER**

Meryem ŞİMŞEK UÇKUN

**Tez Danışmanı:
Prof. Dr. Zeynel DALKILIÇ**

AYDIN

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Meryem ŞİMŞEK UÇKUN tarafından hazırlanan **Nar (*Punica granatum L.* ve *P. nana L.*)’da bitki boyu ile ilişkili RAPD belirteçlerinin belirlenmesi ve bazı morfolojik gözlemler** başlıklı tez, 21.01.2021 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

	Unvanı, Adı Soyadı	Kurumu	İmzası
Başkan :	Prof. Dr. Zeynel DALKILIÇ	Aydın Adnan Menderes Üniv.	
Üye :	Prof. Dr. Sadiye GÖZLEKÇİ	Akdeniz Üniv.	
Üye :	Doç. Dr. Emre SEVİNDİK	Aydın Adnan Menderes Üniv.	

Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu yüksek lisans tezi, Enstitü Yönetim KurulununSayılı kararıyla tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Gönül AYDIN
Enstitü Müdürü

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Bu tezde sunulan tüm bilgi ve sonuçların, bilimsel yöntemlerle yürütülen gerçek deney ve gözlemler çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce, sonuç ve bilgilere bilimsel etik kuralların gereği olarak eksiksiz şekilde uygun atıf yaptığımı ve kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

21.01.2021

Meryem ŞİMŞEK UÇKUN

ÖZET

NAR (*PUNICA GRANATUM* L. VE *P. NANA* L.)'DA BİTKİ BOYU İLE İLİŞKİLİ RAPD BELİRTEÇLERİNİN BELİRLENMESİ VE BAZI MORFOLOJİK GÖZLEMLER

Meryem ŞİMŞEK UÇKUN

Yüksek Lisans Tezi, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Zeynel DALKILIÇ

2021, 56 sayfa

Bu çalışmanın amacı, PCR-RAPD yöntemi kullanılarak bitki boyuyla ilişkili moleküler belirteçlerin belirlenmesidir. Bitki materyali olarak Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü bahçesinde bulunan bodur ve normal boylu nar bitkileri melezleme ıslahı ve kendileme ıslahı yöntemiyle elde edilen kendilenmiş melez bitkiler kullanılmıştır. 2020 yılında yapılan ölçümlerde *P. nana* × *P. granatum* melezlemesinde 52 bitkiden en kısa bitki 129 cm, en uzun bitki 250 cm; *P. nana* kendilemesinde 44 bitkiden en kısa bitki 59 cm, en uzun bitki 154 cm; *P. granatum* kendilemesinde 2 bitkiden en kısa bitki 172 cm, en uzun bitki 174 cm ve ana 110 cm, baba ebeveyn ise 396 cm olarak ölçülmüştür. Ana ve baba ebeveynle birlikte toplam 16 bitkinin yaprağından DNA çıkartılmıştır. RAPD primerlerini BSA ile test etmek amacıyla 7'şer melez bitkinin DNA'ları eşit miktarda karıştırılarak iki ayrı küme oluşturulmuştur. Test edilen 120 RAPD primerinden kalıcı polimorfizm gösterenler, iki kümeyi oluşturan bireyler ve ebeveyni ile birlikte analiz edilmiştir. OPM07 primerinden elde edilen 650 bp büyüklüğündeki bant ana ebeveyn, bodur nar kümesi ve bodur kendilemesindeki bitkilerde gözlenmezken; baba ebeveyn, normal boylu nar kümesi ve 4 normal boylu nar melezinde görülmüştür. Çalışma sonucunda OPM07-650 RAPD belirtecinin narda bitki boyu özelliği ile %57 ilişkili olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Punica granatum*, *P. nana*, RAPD, PCR, BSA

ABSTRACT

DETERMINATION OF RAPD MARKERS RELATED TO PLANT HEIGHT IN POMEGRANATE (*PUNICA GRANATUM* L. AND *P. NANA* L.) AND SOME MORPHOLOGICAL OBSERVATIONS

Meryem ŞİMŞEK UÇKUN

M. Sc. Thesis, Department of Horticulture

Supervisor: Prof. Dr. Zeynel DALKILIÇ

2021, 56 pages

The objective this study was to determine the markers related to plant height using PCR-RAPD method. As a plant material, dwarf and normal pomegranate parents and their hybrids were used in hybridization breeding and self-breeding methods located in ADU Faculty of Agriculture, Department of Horticulture. In the plant height measurements made in 2020; the height of the shortest and longest plant, respectively, was in the hybridization of *P. nana* × *P. granatum*, out of 52 plants, 129 cm and 250 cm; in *P. nana* selfing, out of 44 plants, 59 cm and 154 cm; in *P. granatum* selfing, out of 2 plants 172 cm and 174 cm; and female parent was 110 cm and male parent was 396 cm. DNA was extracted from the leaves of a total of 16 samples together with the parents. In order to test the RAPD primers, BSA was created using equal amounts of DNA of two different groups corresponding to the height of the hybrid plants. Among the 120 RAPD primers tested, the persistent bands gave polymorphisms in the bulks assessed in the further study which each individual and both parents tested for polymorphisms. The 650 bp band obtained from the OPM07 primer was not observed in the female parent, dwarf pomegranate bulk and self-pollinated dwarf plants, but that was observed in the male parent, normal height pomegranate bulk and the four normal height pomegranate hybrids. As a result of this study, OPM07-650 RAPD marker was able to determine 57% of the polymorphism in plant height characteristic in pomegranate.

Key Words: *Punica granatum*, *P. nana*, RAPD, PCR, BSA

ÖNSÖZ

Lisans ve Yüksek Lisans öğrenimim boyunca arazi ve laboratuvar çalışmalarım sırasında maddi ve manevi yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Zeynel DALKILIÇ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

DNA izolasyonu aşamasındaki yardımlarından dolayı İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Doğanlar-Frary Lab.'dan Tülin TAŞCIOĞLU'na ve Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Bölümü'nden değerli hocamız Prof. Dr. Bülent BOZDOĞAN'a, tezimin gerek arazi gerek laboratuvar çalışmaları sırasında yardımlarını esirgemeyen değerli arkadaşlarım Zir. Yük. Müh. Pelin ÇAMOĞLU KONAK'a, Zir. Yük. Müh. Dilek KAYA'ya, DNA izolasyonu-PCR konularında tecrübelerinden yararlandığım Arş. Gör. Nezih ATA'ya, kimyasal solüsyonların hazırlanması aşamasındaki yardımlarından dolayı Öğr. Gör. Dr. Adem YAVAŞ'a teşekkür ederim. Laboratuvar çalışmalarına imkân tanıyan ADÜ Tarımsal Biyoteknoloji ve Gıda Güvenliği Uygulama ve Araştırma Merkezi (TARBİYOMER)'ne teşekkür ederim.

ZRF-17022 numaralı proje ile çalışmama maddi destek sağlayan ADÜ Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) birimine teşekkür ederim.

Yüksek lisans öğrenimim boyunca desteğinden dolayı eşim Muammer UÇKUN'a, yaşamım ve öğrenim hayatım boyunca gösterdikleri maddi-manevi fedakârlıklardan dolayı aileme en derin sevgilerimle teşekkür ederim.

Meryem ŞİMŞEK UÇKUN

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	vii
ABSTRACT.....	ix
ÖNSÖZ	xi
KISALTMALAR DİZİNİ	xv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xxi
1 . GİRİŞ	1
1.1. Narın Anavatanı ve Üretimi	1
1.2. Narın Genel Kullanım Alanları	2
1.3. Moleküler Belirteçler ve Kullanım Alanları	3
1.4. PCR, RAPD ve Kullanım Alanları.....	4
1.5. BSA ve Kullanım Alanları	8
2. KAYNAK ÖZETLERİ	9
2.1. Narın Döllenme Biyolojisi	9
2.2. Narda Yapılan Islah Çalışmaları	12
2.3. Narda Yapılan Moleküler Belirteç Çalışmaları	15
3. MATERYAL VE YÖNTEM	20
3.1. Materyal	20
3.2. Yöntem.....	20
3.2.1. Çiçek Tozu Elde Edilmesi.....	20
3.2.2. Emaskulasyon.....	20
3.2.3. Melezleme, Kendileme.....	21

3.2.4. Meyve Eldesi, Tohum Çıkarma, Tohum Ekimi, Aktarma.....	22
3.2.5. Çöğürlerde Boy Ölçümü.....	22
3.2.6. Yaprak Örneklerinin Alınması, DNA Çıkartılması.....	23
3.2.7. BSA analizi.....	26
3.2.8. RAPD ve PCR analizlerinin yapılması.....	26
3.2.9. Jel elektroforezi	27
3.2.10. Verilerin değerlendirilmesi.....	27
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	28
4.1. Arazi Çalışmalarından Elde Edilen Bulgular	28
4.1.1. 2014 Yılı Bulguları.....	28
4.1.2. 2015 Yılı Bulguları.....	29
4.1.3. 2016 Yılı Bulguları.....	29
4.1.4. 2020 Yılı Bulguları.....	29
4.2. Laboratuvar Çalışmalarından Elde Edilen Bulgular.....	29
4.2.1. DNA Kalitesinin ve Miktarının Belirlenmesi.....	29
4.2.2. RAPD analizi.....	33
4.2.3. Bodur ve Normal Boylu Kümede Polimorfik Bantların Analizi	35
4.2.4. Bitki Boyuna Bağlı Olan Polimorfik RAPD Primerinin Analizi.....	38
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	43
KAYNAKLAR.....	45
ÖZGEÇMİŞ.....	56

KISALTMALAR DİZİNİ

AFLP Çoğaltılmış Parça Uzunluğu Polimorfizmi (Amplified Fragment Length Polymorphism)

APG IV sistemi Angiosperm Filogeni Grubu (The Angiosperm Phylogeny Group) tarafından geliştirilen çiçekli bitkiler için modern, çoğunlukla moleküler tabanlı bitki taksonomisinin dördüncü sürümü

bp Baz çifti (base pair)

BSA Küme Açılım Analizi (Bulked Segregant Analysis)

CAPS Bölünerek Çoğaltılmış Polimorfik Diziler (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences)

CCC Chlormaquat

CID Çeşit Tanımlama Diyagramı (Cultivar Identification Diagram)

CTAB Cetyl-N,N,N-Trimethylammonium Bromide

DAMD Minisatellit DNA'nın Doğrudan Çoğaltılması (Directed Amplification of Minisatellite DNA)

dATP Deoksi adenzin trifosfat

dCTP Deoksi sitidin trifosfat

dGTP Deoksi guanozin trifosfat

dTTP Deoksi timidin trifosfat

DNA Deoksiribonükleik asit

EtOH Etil alkol (ethanol)

EUROSTAT Avrupa Birliği İstatistik Ofisi (Statistical Office of the European

Communities)

FDA Fluorescein diacetate

ISSR Basit Dizi Tekrarı Arası (Inter Simple Sequence Repeat)

İzolasyon Özütleme, çıkartma (extraction)

M Molar

MAS Belirteç Yardımıyla Seleksiyon (Marker-Assisted Selection)

MgSO₄ Magnezyum sülfat

mM Milimolar

nm Nanometre

PCR Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)

PIC Polimorfik Bilgi Miktarı (Polymorphic Information Content)

Primer Başlatıcı

PVP Polivinilpirrolidon

QTL Kantitatif Özellik Lokusları (Quantitative Trait Loci)

RAMP Rastgele Çoğaltılmış Mikrosatellit Polimorfizmi (Random Amplified Microsatellite Polymorphisms)

RAPD Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (Random Amplified Polymorphic DNA)

rpm Dakikadaki devir sayısı (revolutions per minute)

SCAR Naz Dizilimi Karakterize Edilmiş Çoğaltılmış Bölgeler (Sequence Characterized Amplified Region)

SRAP Baz Dizilimine Bağlı Çoğaltılmış Polimorfizm (Sequence-Related

Amplified Polymorphism)

SSR	Basit Dizi Tekrarları (Simple Sequence Repeats)
SSCP	Tek İplik Konformasyon Polimorfizmi (Single Strand Conformation Polymorphism)
STS	Gümüş tiyosülfat
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TE	Tris-EDTA
TRAP	Hedef Bölge Çoğaltma Polimorfizmi (Telomerase Repeated Amplification Protocol)
TTC	2,3,5 Triphenyl Tetrazolium Chloride
vorteks	Hızlı çalkalama (vortex)
β -Me	β -mercaptoethanol
μ l	Mikrolitre

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 RAPD reaksiyonunun şematik gösterimi.....	7
Şekil 3.1. Denemede kullanılan nar bitkileri.....	21
Şekil 3.2. Nar çiçeklerinin görünümü	22
Şekil 3.3. Melez bitkilerin görünümü.....	23
Şekil 4.1. Nar yapraklarından elde edilen DNA bant görüntüsü.....	34
Şekil 4.2. OPM07 RAPD primerinin nar bitkilerindeki bant görüntüsü	39
Şekil 4.3. OPC 01-18 primerinin nar bitkilerindeki bant görüntüsü	40
Şekil 4.4. OPA 08 primerinin nar bitkilerindeki bant görüntüsü	40
Şekil 4.5. OPB 09 primerinin nar bitkilerindeki bant görüntüsü.....	41

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Yıllar itibariyle Türkiye'nin nar üretimi	2
Çizelge 4.1. 2014 yılında yapılan melezleme çalışması.....	28
Çizelge 4.2. Nar melezlerinin 2016 yılındaki boy ölçümü.....	30
Çizelge 4.3. Nar melezlerinin 2020 yılındaki boy ölçümü.....	32
Çizelge 4.4. Nar yapraklarından elde edilen DNA miktarı	34
Çizelge 4.5. Narda kullanılan RAPD primerleri ve elde edilen bantlar	35
Çizelge 4.6. OPM07 RAPD primerinin nar bitkilerindeki bant deseni.....	39

1. GİRİŞ

1.1. Narın Anavatanı ve Üretimi

Nar (*Punica granatum* L., $2n=2x=16$) Lythraceae (sinonim: Punicaceae) familyasına dahil, çok yıllık, ılıman, subtropik ve tropik bölgelerde yetiştirilen bir meyve türüdür. Son zamanda yapılan morfolojik (Graham ve Graham, 2014), moleküler (Berger vd., 2016) ve APG IV sistemi (Byng vd., 2016) çalışmalarında tek cinse sahip olan Punicaceae familyası artık Lythraceae familyası içerisinde incelenmektedir. *Cuphea* (275 spp.), *Lagerstroemia* (56 spp.), *Nesaea* (50 spp.), *Rotala* (454 spp.), and *Lythrum* (35 spp.) Lythraceae (Kınagiller) familyasının diğer üyeleridir. *Punica* cinsi içerisinde, *P. granatum* (kültür narları) ve *P. nana* (bodur narlar) olmak üzere iki tür bulunmaktadır. Bazı araştırmacılar *Punica* cinsini *P. granatum* L., *P. protopunica* Balf., ve *P. nana* L. olarak üç tür olarak değerlendirirler (Rana vd., 2010). Narın anavatanının Güney Kafkasya, İran, Afganistan, Güney Asya, Batı Asya, Anadolu ve Akdeniz arasındaki bölgeleri kapsadığı düşünülmektedir. Anavatanlarının yanında Avrupa ve Afrika'nın Akdeniz sahil bölgelerinde, Çin, Hindistan, Afganistan, İran, Arabistan, Şili, Arjantin, Kaliforniya, Arizona ve Kuzey Meksika'da da yetiştiriciliği yapılmaktadır (Özbek, 1977; Dokuzoğuz ve Mendilcioğlu, 1978; Ozguven ve Yilmaz, 2000; Holland, vd. 2009; Gözlekçi, 2014; Kahramanoglu vd., 2020). Türkiye'de narın meyvecilik sektöründeki gelişimi 2000'li yıllardan itibaren önem kazanmıştır. Günümüzde henüz FAO ve EUROSTAT tarafından düzenli tutulan resmi nar istatistikleri mevcut değildir. Nar üretiminde öne çıkan ülkeler Hindistan, İran ve Çin'dir. Türkiye Ortadoğu'da İran'ın ardından, en önemli nar üreticisi ve ihracatçısı konumundadır (Kurt ve Şahin, 2013; Gözlekçi, 2014). 2004-2018 yılları itibari ile Türkiye'deki nar üretimi TÜİK verilerine göre Çizelge 1.1'de verilmiştir (Anonim, 2019).

Çizelge 1.1. Yıllar itibariyle Türkiye'nin nar üretimi (Anonim, 2019)

Yıl	Toplu meyveliklerin alanı (dekar)	Üretim (ton)	Ağaç başına ortalama verim (kg)	Meyve veren yaşıta ağaç sayısı	Meyve vermeyen yaşıta ağaç sayısı	Toplam ağaç sayısı
2004	65,000	73,000	23	3,200,000	1,220,000	4,420,000
2005	67,000	80,000	25	3,222,000	1,409,000	4,629,200
2006	75,675	90,737	29	3,136,166	1,502,233	4,638,399
2007	111,230	106,560	30	3,610,788	3,367,316	6,978,104
2008	176,197	127,760	32	4,017,480	5,928,736	9,946,216
2009	197,345	170,963	34	5,092,148	5,794,324	10,886,472
2010	206,073	208,502	32	6,431,358	5,678,792	12,110,150
2011	244,454	217,572	28	7,881,144	6,432,893	14,314,037
2012	269,024	315,150	31	10,011,871	5,789,933	15,801,804
2013	283,991	383,085	35	11,086,789	5,089,180	16,175,969
2014	304,548	397,335	34	11,755,997	6,033,851	17,789,848
2015	307,511	445,750	33	13,310,323	4,072,289	17,382,612
2016	305,302	465,200	34	13,858,784	3,481,808	17,340,592
2017	297,669	502,606	37	13,661,560	3,122,595	16,784,155
2018	291,490	537,847	40	13,574,229	2,645,256	16,219,485

1.2. Narın Genel Kullanım Alanları

Narın meyvesinden sofralık tüketimde, ekşi narlardan sitrik asit fabrikasyonunda ve sirke yapımında, nar suyu üretiminin bir yan ürünü olan nar çekirdeklerinden ise bitkisel yağ ve hayvan yemleri için besin unu eldesinde yararlanılır. Kabukları içerdiği tanen (%28-30) özellikle deri işleme endüstrisinde kumaş ve deri boyamacılığında, meyve sularının durultulmasında kullanılmaktadır. Narın kabukları ve çiçekleri, boya ve mürekkep yapımında kullanılan bir hammaddedir (Onur, 1982).

Tıbbî alanda yapılan çalışmalarda narın antioksidan içeriğinin yüksekliğinin yanında, bazı hastalıkların tedavisine yardımcı olduğu belirlenmiştir (Oğuz vd., 2011; Akçiçek vd., 2018).

Nar suyunda bol miktarda antioksidan polifenoller bulunmektedir. Nar çekirdeği yağı %80 oranında punisik asid, fitoöstrojen ve östron içermektedir. Nar çekirdeğinin yağında yüksek oranda bulunan punisik ve trienoik asid çok düşük dozlarda bile antikarsinojen özelliğe sahiptir ve akciğer kanseriyle ilgili yapılan bir çalışmada, farelere ağızdan verilen nar ekstresinin akciğerde bulunan tümörün büyümesinde önemli ölçüde azalmaya neden olduğu belirlenmiştir (Xu vd., 2005; Yılmaz ve Usta, 2010).

Nar tohumlarında bulunan punisik asidin terapötik etkilerinden dolayı insanlardaki değişik kronik hastalıklara karşı etkili olduğu bilinmektedir (Shabbir vd., 2017).

Değişik *in vivo* deneylerle kanıtlandığına göre, nar tohumları yangı (enflamasyon) ve metabolik sendroma karşı mücadele eden başlıca bileşik olarak konjuge linolenik asit (CLnA) (punisik asit) içermektedir. Nar tohumun toplam yağ oranı %7.9-16.0 arasında değişim gösterir. Nar tohumunun yağı içerisindeki punisik asit oranı %74-85 arasında değişir (Verardo vd., 2014).

Nar tohumlarının yağ kapsamı %13.95-24.13 arasında değişmektedir. Palmitik, stearik, arakidik ve behenik asit kapsamı sırasıyla %2.10-2.77, 1.35-2.01, 0.33-0.48 ve 0.16-0.22 arasında değişmektedir. Başlıca doymamış yağ asidi punisik asittir (%70.42–76.17) (Kıralan vd., 2009).

Son zamanlarda nar meyvesinin tip-2 diyabetten korunmada ve tedavisinde kullanımı ile ilgili çalışmalar yapılmaktadır. Narın kullanılan meyve dış kabukları, çiçekleri ve tohumları oksidatif stresi ve lipid peroksidasyonunu azaltarak tip-2 diyabette etkili olmaktadır (Banihani vd., 2013).

1.3. Moleküler Belirteçler ve Kullanım Alanları

Meyve ağaçlarının birçoğunun kalıtım mekanizması bilinmemektedir. Pazar isteklerinin sürekli değişmesi sonucunda mevcut çeşitler zamanla ticari değerlerini yitirebilmektedir. Yaygın olarak kullanılmakta olan geleneksel ıslah yöntemleri çok ciddi problemlerle karşılaşmaktadır. Eşeyssel kısırlık, gençlik kısırlığı döneminin uzun olması, düşük varyasyon oranı, ağaç hacimlerinin büyüklüğü ve

bunlardan dolayı oluşan araştırmalarda yüksek bütçe ihtiyaı bu problemlerin bazılarındandır (Soost ve Roose, 1996).

Islah çalışmalarında yetiştiricilik için önem teşkil eden özelliklerin fenotipik olarak seleksiyonu uzun zaman gerektirirken, morfolojik belirteçler yardımıyla seleksiyonda da bir takım sorunlar bulunmaktadır. Bunlar pleiotropik ve epistatik etkilerin bulunması ve evre koşullarının değişken olması olarak karşımıza çıkabilir. Moleküler belirteçlerin yardımıyla yapılan seleksiyonda bu tür sorunlar daha azdır ve sonuçlar daha güvenilirdir (Melchinger, 1990).

Moleküler genetik yöntemler, çok hızlı bir şekilde bitki özelliklerini teşhis etmemize yardımcı olabilir. Bu yöntemler şimdiye kadar en fazla ekonomik değere sahip ürünlerden eltik, mısır, buğday, asma, amgiller ve pamukta yaygın olarak kullanılmıştır. Her türün gelişim tarihinin bilinmesi, genetik çeşitliliğin seviyesinin ve dağılımının tespitinde önemli rol oynar (Hamrick vd., 1992).

DNA belirteçlerinin bitki ıslahındaki rolü kimlik tanısı ve akrabalık düzeylerinin belirlenmesi, melez bitki tanısı, belirteç yardımıyla seleksiyon (Marker-Assisted Selection, MAS), küme açılım analizi (Bulked Segregant Analysis, BSA), tohum ıslahı, vb.'dir DNA belirteçleri; sekansa spesifik olanlar (SSR, ISSR, SCAR, CAPS, RAMP, SRAP, TRAP, SSCP) ve sekansa spesifik olmayanlar (RAPD, AFLP) şeklinde 2 gruba ayrılmıştır (Vardar-Kanlítepe vd., 2010).

Canlıların yapısını belirleyen şifre DNA zincirlerinde olduğundan moleküler belirteçler, bitki populasyonundaki çeşitlilik veya o populasyon içindeki bitki genotipleri arasındaki ilişkilerin tespit edilmesinde %100'e yakın güvenirlikle değerlendirilirler. Moleküler belirteçler bitki sistematigiinde, bitki ıslahında ve gen kaynaklarının değerlendirilmesinde etkin olarak kullanılmaktadır (Gülşen ve Mutlu, 2005).

1.4. PCR, RAPD ve Kullanım Alanları

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)'a (Saiki vd., 1985) dayalı RAPD (Rastgele oğaltılmış Polimorfik DNA) yöntemi, bazı türlerdeki polimorfizmi belirlemek için kullanılmıştır. RAPD ilk defa 1990'da rastgele seçilmiş primerlerin kullanıldığı ve PCR'nunu temel alan bir yöntem olarak ortaya çıkmıştır (z Aydın, 2004). Bu yöntemin ana prensibi ilgili türe ait genomik DNA üzerinde rastgele seçilmiş, tek bir 10 bp oligonükleotidin (10-mer) kullanılarak düşük

bağlanma sıcaklığında rastgele olarak bağlanarak PCR ile çoğaltmasının yapılmasıdır. Yöntemin devamında elde edilen çoğaltma ürünü radyoaktif olmayan agaroz jel elektroforezinde yürütülür ve çoğaltma ürünleri bantlar halinde gözlemlenerek incelenir. Bantların varlığı veya yokluğuyla sonuçlar değerlendirilmektedir (Williams vd., 1990; Welsh ve McClelland, 1990). RAPD yöntemi ilgili genotipler arasındaki polimorfizmi gösterebilir. 90'lı yıllardan bu yana, RAPD belirteçleri farklı bitki türlerinin çeşitleri veya klonlarını tanımlamak için başarıyla kullanılmıştır (Williams vd., 1990; Welsh ve McClelland, 1990; Belaj vd., 2001; Besnard vd., 2001; Claros vd., 2001; Ozden-Tokatli vd., 2010; Talebi Bedaf vd., 2011).

PCR, ilk kez 1985 yılında Kary Mullis tarafından keşfedilmiş, yüksek ölçüde hassas ve özgün bir teknik olarak tanımlanmıştır. Tanı ve araştırma olanaklarında evrime yol açan bu keşfinden dolayı 1993 yılında Nobel ödülünü almaya hak kazanmıştır. PCR'ın keşfi, özel amaçlarla genlerin belirlenmesi, DNA parçalarının klonlanması, bakteri kontaminasyonu, enfeksiyonların teşhisi, genetiği değiştirilmiş DNA'nın varlığı ve gıda içeriklerinin özgünlüğünün kontrolü gibi alanlarda da incelemelere olanak sağlamıştır (Kahya vd., 2013; Mullis vd., 1986; Arı, 2004).

Biyoteknoloji alanında önemli keşiflerden biri olan PCR, bir çeşit "*in vitro* klonlama"dır. PCR, DNA'nın kopyalanmasını taklit eden bir tekniktir ve üç adımdan oluşur. Temel olarak, çoğaltılmak istenen bölgenin iki ucuna özgü, baz dizilerini tamamlayıcı sentetik oligonükleotid primer ile sınırlandırılan genin enzimler yardımıyla sentezlenmesine dayanır. Bu teknik bilinen bir DNA bölgesini çoğaltmak veya bilinmeyen bir bölgeyi çoğaltıp farklılığı bulmak için kullanılır. Bu yöntem çok az miktarda DNA ile çalışmaya imkân vermektedir. PCR yönteminde periferik kan, deri, saç, tükürük ve mikroorganizma olmak üzere farklı tip bitkisel ve hayvansal kökenli materyal DNA kaynağı olarak kullanılmaktadır. Gerekli olan DNA miktarının elde edilmesi ve yalnızca yeterli miktarda kopyanın analiz edilmesi geleneksel laboratuvar yöntemleri ile sağlanır. Bundan dolayı PCR hassas ve güvenilir bir yöntemdir (Garibyan vd., 2013; Çarhan vd., 2016). PCR; genetik haritalama, türler arası polimorfizm tespiti, evrim çalışmaları, tohum saflığının belirlenmesi, analık-babalık tayini, adli tıpta kimlik belirleme, kalıtsal hastalıkların belirlenmesi, kanser araştırmaları, mutant genlerin popülasyondaki devamlılığının izlenmesi, GMO (Genetiği Değiştirilmiş Organizmalar-transgenik organizmalar)'nın belirlenmesi, toprak, su ve gıda

maddelerindeki mikroorganizmaların belirlenmesinde kullanılmaktadır (Altun, 2006).

PCR döngüleri üç adımdan oluşur bunlar; çift iplikçik DNA zincirinin açılması (denaturasyon), primer bağlanması (annealing) ve uzama (extension)'dır.

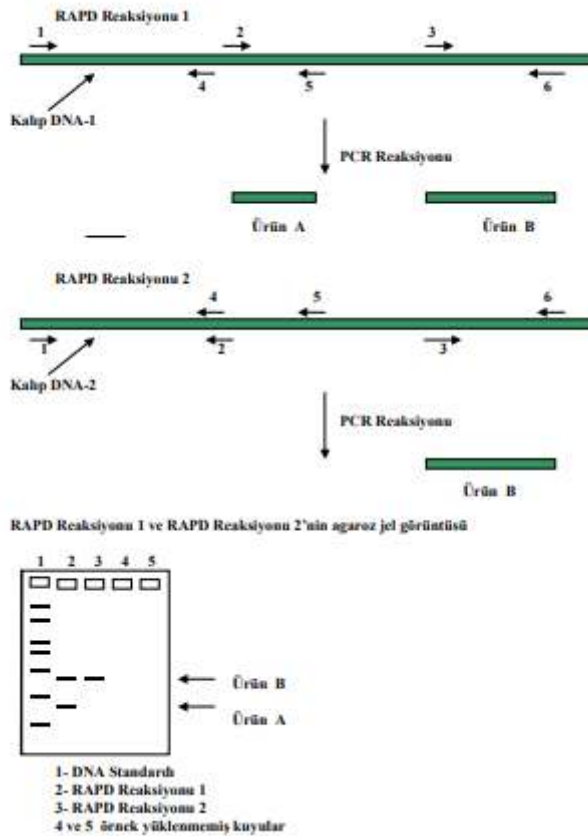
DNA Zincirinin Açılması (Denatürasyon): Çift iplikçik halindeki kalıp DNA molekülü 91-95°C arası bir sıcaklık kullanımıyla tek iplikçik haline dönüşür.

Primerin Bağlanması (Annealing): Denatürasyon aşamasından sonra tek iplikçik haline gelen DNA molekülüne oligonükleotitlerin 37-65°C sıcaklığında 3' ucundan yapışması işlemidir.

Uzama (Extension): DNA zinciri üzerine yapışan primerler 70- 72°C sıcaklıkta DNA polimeraz enzimi (*Thermus aquaticus*) yardımıyla istenilen DNA bölgesini çoğaltır. 3 aşamadan oluşan bu işlem bir PCR devrini temsil eder. Bu işlem genel olarak defalarca tekrar edilerek ilk DNA dizisinden milyonlarca yeni DNA çoğaltılmasını sağlar. (Sevindik, 2014; Bişkin vd., 2011; Yorgancılar, vd., 2015)

RAPD yönteminin temel prensibi, ilgili türe ait olan genomik DNA üzerinde rastgele seçilmiş, 10-mer oligonükleotidin, düşük bağlanma sıcaklığında tesadüfi olarak DNA'daki ilişkili bölgelere bağlanarak DNA'yı PCR aracılığı ile çoğaltmasıdır (Öz Aydın, 2004; Filiz ve Koç, 2011) (Şekil 1.1).

RAPD yöntemi; çabuk sonuç vermesi, diğer yöntemlere kıyasla daha ucuz olması, az iş gücü gerektirmesi, az miktarda ve daha düşük kalitede DNA'ya ihtiyaç duyulması, polimorfizm oranının yüksek olması gibi avantajlara sahiptir. En önemli dezavantajı ise güvenilirliğinin sınırlı olmasıdır. Farklı araştırmacılar tarafından, farklı laboratuarlarda hatta farklı cihazlarda farklı sonuçlar bulunduğu literatürde mevcuttur. PCR şartlarının optimize edilmesi zaman alıcı ve zor olsa da optimum değerler belirlenmeli ve tüm çalışma süresince sabit tutulmalıdır (Şekil 1.1) (Öz Aydın, 2004). Çoğaltılan DNA parçaları jel elektroforezi yapıldıktan sonra Etidyum bromür (EtBr) ile boyanarak ultraviyole (UV) ışık altında görüntülenir. Metodun hızı, hassasiyeti ve çok yönlü olması birçok bitki türünün gen haritalaması ve populasyon çalışmalarına olanak sağlamaktadır (Altun, 2006; Kaya ve Neale, 1995).



Şekil 1.1 RAPD reaksiyonunun şematik gösterimi (Öz Aydın, 2004)

RAPD-1, RAPD-2 reaksiyonlarında bir tane primer ve iki tane farklı kalıp DNA kullanılmıştır.

a) Oklar reaksiyona katılmış olan aynı diziye sahip primerin kopyalarıdır

b) Okların yönü DNA sentez yönünü belirlemektedir.

c) Sayılar kalıp DNA'da primerlerin bağlanma bölgelerini göstermektedir.
1.RAPD reaksiyonunda 2 ve 5 pozisyonlarına bağlanan primerler arasındaki DNA dizisinin çoğaltılmasıyla ürün A, 3 ve 6 pozisyonlarına bağlanan primerler arasındaki DNA dizisinin çoğaltılmasıyla ürün B oluşmaktadır.

2.RAPD reaksiyonunda sadece 3 ve 6 pozisyonları arasındaki bölgedeki DNA dizisinin çoğaltılmasıyla ürün B oluşmaktadır.

Reaksiyon 1 ve reaksiyon 2'ye eklenen primerlerin tümünden PCR sonucu bant elde edilemez. Elde edilebilen bantlar agaroz jelde görüntülenmektedir (Öz Aydın, 2004).

1.5. BSA ve Kullanım Alanları

Bulk Segregant Analysis (BSA) yöntemi havuzlanmış DNA örneklerinin karşılaştırılması esasına dayanır. Aynı küme içerisindeki bireyler, ilgilenilen gen ya da özellik bakımından aynıdır, ancak diğer genler için aynı değildirler. Bir karakter için karşılaştırılan iki küme, onları birbirinden ayıran belirteçleri belirlemek için analiz edilir. Küme açılım analizi (BSA), Michelmore vd. (1991) tarafından genomun özel bölgeleriyle ilişkili belirteçleri tanımlamak için keşfedilen bir yöntemdir. Orijini tek bir melezleme olan, izole bir popülasyondan gelen iki tane kümede DNA örneklerinin karşılaştırılmasına dayanır. Bir özellik için karşılaştırılan iki küme, kümeyi oluşturan 14-20 adet bireyleri birbirinden ayıran belirteçleri saptamak için analiz edilirler (Michelmore vd., 1991, Vardar-Kanlıtepe vd., 2010).

Bu çalışmanın amacı, bodur ve normal boylu nar bitkileri arasında yapılan melezlemeden elde edilen F_1 bireyleri kullanılarak BSA ve RAPD yöntemi yardımıyla narda bitki boyu ile ilişkili moleküler belirteçlerin saptanmasıdır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Narın Döllenme Biyolojisi

Nar çiçekleri o yılın sürgünlerinin ucunda veya 2-3 yaşlı dallarda oluşur. Çiçeklerin kendine özgü kırmızı rengi vardır, nadiren beyaz ve sarı renkte olabilirler. Çanak yaprakları (calyx) 5-8 adet, etli, keskin kenarlı ve tüysüzdür. Taç yaprakların (corolla) sayısı çanak yapraklarla aynıdır. Bazen çift sıralı da olabilirler. Yaklaşık olarak 200-300 adet erkek organ bulunur. Erkek organlar (stamen) çanak yaprak tüpü içerisinde dairesel şekilde dizilmişlerdir. Başçıklar (anther) eliptik şekilde ve altın sarısı renktedirler. İplikçikler (filament) açık kırmızı renklidir. Yumurtalık (ovarium) küre şeklinde, çanak yapraklar tüpünün içine gömülmüş halde bulunur ve çok hücrelidir. Dişicik borusu konik, kalın bir kısım ile yumurtalığa bağlıdır (Dokuzoğuz ve Mendilcioğlu, 1978; Onur, 1988; Gözlekçi, 1997).

Nar çiçekleri andromonoik yapıdadır. Kültür çeşitlerindeki çiçekler verimli çiçek (B tipi) olmakla beraber verimsiz çiçek (A tipi) olmak üzere iki tipte incelenmektedir (Onur, 1988; Yılmaz, 2007; Holland vd., 2009; Wetzstein vd., 2011).

A tipi (erkek) çiçek: Morfolojik olarak verimli, fizyolojik olarak erkek yapıdadır. Bunlar meyve vermeyen erkek çiçeklerdir. Bu çiçeklerde diş organ tam gelişmemiş ve kısa kalmıştır. Yumurtalık tam olarak gelişmemiş olup küçüktür. Bu durumdaki çiçeklerin dala bağlanan kısımları şişkin değildir ve V şeklinde görülür. Bu tip çiçekler, sadece tozlanma açısından faydalıdır ve açıldıktan kısa süre sonra dökülürler (Onur, 1988).

B tipi (hermafrodit) çiçek: Morfolojik ve fizyolojik olarak verimli yapıdadır. Bu çiçeklerde diş organ uzundur ve hafif kıvrık bir boyuncuğa sahip olup U şeklindedir. Yumurtalık tam olarak gelişmiştir. Bu tip çiçeklerin dala bağlanan bölümünün gelişmiş ovaryumdan dolayı şişkin olduğu görülmektedir. Döllendikten sonra ovaryum içeren ortadaki boğumlu bölüm daha da şişkinleşir ve meyveyi oluşturur (Onur, 1988).

Narda çiçekteki erkek organın başçıkları olgunlaşmadan önce, dişi tepesi aktif hale gelir. Bundan dolayı, B tipi (verimli) çiçekler açıldıklarında, aynı çiçeğin erkek organları henüz olgunlaşıp çiçek tozu yaymadığı için, tozlanma aynı ağacın diğer çiçeklerinden ya da farklı ağacın çiçeklerinden, böceklerle taşınan çiçek tozları ile gerçekleşir. Bu çiçek tozları da genellikle A tipi (verimsiz) çiçeklerden gelmektedir. Çünkü nar ağaçlarında A tipi çiçekler, B tipi çiçeklerden daha fazla bulunmaktadır. A tipi çiçek sayısının B tipi çiçeklerden 1,5-4,5 kat daha fazla olduğu ve çeşit, yıl, iklim gibi etmenlere bağlı olarak değiştiği belirtilmiştir (Shulman ve ark., 1984).

B tipi çiçeklerin çiçek tozu canlılıkları A tipi çiçeklerinkinden daha düşüktür (Gozlekci ve Kaynak, 2000). Ancak 'Dr. Ercan 35', 'Efenar 25', 'Kamilbey 35' ve 'Tezeren 35' nar çeşitlerinde A ve B tipi çiçek tozlarının canlılığı arasında istatistikî farklılık bulunmamıştır (Aksoy, 2017).

Farklı nar çeşitleri farklı çiçeklenme sezonuna sahiptirler. Genellikle kültür çeşidi olarak yetiştirilenler yılda bir kez, süs bitkisi olarak kullanılanlar iki veya üç kez çiçek açarlar. Yılda bir kez çiçek açan çeşitlerde çiçeklenmenin bitiminden sonra açan ve meyve bağlamayan çiçekler görülebilir. Bunlara yalancı çiçekler denilmektedir (Tibet ve Baktır, 1991).

Bodur narlarda yapılan bir çalışmada, bitkilerin kısa güne olumsuz tepki gösterdikleri ve ışık yoğunluğunun da çiçeklenmeyi olumlu yönde etkileyen başlıca faktörlerden biri olduğu tespit edilmiştir. 40 klux'un üzerinde ışık yoğunluğu sağlandığında sıcaklığın çok önemli olmadığını ayrıca budama ve budama ile birlikte chlormaquat (CCC) uygulamasının çiçeklenmeyi teşvik ettiğini ve açan çiçeklerin veya çiçek taç yapraklarının dökülmesini önlemek için ise gümüş thiosülfat (STS) uygulamasının olumlu sonuç verdiği belirtilmiştir (Tibet, 1993).

Tibet (1993), 'Hicaznar' üzerinde yaptığı biyolojik bir araştırmada, hangi tomurcuklardan çiçek tomurcuğu oluşacağı ve sürgün üzerindeki tomurcukların çiçek tomurcuğu oluşturma düzenlerinin belli olmadığını ifade etmiştir ayrıca, ilk morfolojik tomurcuk ayrımını da 20 Şubat olarak tespit etmiştir.

'Hicaznar' çeşidinde dölleme biyolojisi üzerine yapılan çalışmada, bir ağaçta açan çiçeklerin %77.68-%86.42'sinin verimsiz (A tipi) çiçek, %13.80-

%22.32'sinin ise verimli (B tipi) çiçek olduğu belirlenmiştir ayrıca, toplam çiçeklerin meyve bağlama oranı %7.59-%16.07 iken, verimli (B tipi) çiçeklerin meyve bağlama oranının ise %44.0-%71.99 olduğu ifade edilmiştir. (Gözlekçi, 1997).

'Hicaznar' çeşidi ve 33 N 26 nar genotipi üzerinde yapılan bir çalışmada, en yüksek çiçek tozu canlılığı 'Hicaznar' çeşidinin A tipi çiçeklerinde TTC testinde %75.2 oranında, FDA testinde %82.5 oranında, çimlenme oranı ise % 1 agar + % 10 sakkaroz ortamında %61.5 olarak tespit edilmiştir. Çiçek tozu üretim miktarında ise A tipi çiçeklerde 'Hicaznar' çeşidinde 3055 adet/başçık ve 33 N 26 genotipinde 2701 adet/başçık bildirilmiştir (Derin ve Eti, 2001).

Üstüntaş (2015), Hicaznar çeşidinde yapmış olduğu çiçek tozu çimlendirme testinde farklı borik asit ve sakkaroz konsantrasyonlarında en yüksek çimlenme oranının %7.2, %1 agar+%20 sakkaroz+%25 borik asit ortamında gerçekleştiğini bildirmiştir. Bu ortam çiçeklenme döneminin başlangıcında A tipi ve B tipi çiçeklerde ayrı ayrı test edilmiş ve A tipi çiçekte %19.5 oranında, B tipi çiçekte %29.1 oranında çimlenme gözlenmiştir. Aynı yıl çiçeklerde canlılık (TTC) testleri yapılmış ve en yüksek canlılık oranı %92.4 ile çiçeklenme döneminin başlangıcında A tipi çiçekte gözlemlenirken, çiçeklenme dönemi sonunda %95.0 ile B tipi çiçekte gözlemlenmiştir. Yapılan başçık sayımlarında A tipi çiçekteki başçık sayısı 329.8, B tipi çiçekteki başçık sayısı 300.4 olarak tespit edilmiş, bir çiçekteki toplam çiçek tozunun miktarı yapılan hemasitometrik lam sayımında A tipi çiçekte 2,143,700 olduğu, B tipi çiçekte ise 1,036,380 adet olduğu bildirilmiştir.

'Tezeren 35', 'Dr. Ercan 35', 'Efenar 35' ve 'Kamilbey 35' çeşitlerinde çiçek tozu canlılık testi yapmış, en yüksek canlılık oranını çiçeklenme döneminin başlangıcında %84.7 ile 'Efenar 35' çeşidinin B tipi çiçeğinde, en düşük canlılık oranını çiçeklenme döneminin sonunda %39.4 ile 'Tezeren 35' çeşidinin A tipi çiçeğinde tespit edilmiştir. Çeşitlerin A tipi ve B tipi çiçeklerinin çiçek tozu canlılık oranları karşılaştırıldığında, A tipi çiçeklerin %40.5 ile %80.2 arasında, B tipi çiçeklerin ise %39.4 ile %84.7 arasında değiştiği belirlenmiştir (Aksoy, 2017).

2008-2009 yılları arası Hindistan için önemli bir çeşit olan 'Ganesh' nar çeşidinin çiçek biyolojisi üzerine çalışma yürütülmüştür. 'Ganesh' çeşidinin bir yıl içinde (Ocak-Şubat), (Haziran-Temmuz) ve (Eylül-Ekim) ayları olmak üzere üç kez

çiçek açtığı belirlenmiştir. Ganesh çeşidinin çiçekleri; verimli çiçek, orta düzey çiçek, verimsiz çiçek olmak üzere 3 tipte ele alınmış ve pistil uzunlukları sırasıyla 2.0, 1.6, 0.65 cm olarak ölçmüşler, çiçeklerin ortalama ağırlıklarını sırasıyla 4.8, 2.6 ve 1.7 g olarak belirlenmiştir. Ayrıca, bu çeşidin çiçek tozu canlılığı, ortalama %93.2 olarak belirlenmiştir (Babu vd., 2011).

2.2. Narda Yapılan İslah Çalışmaları

İslah çalışmalarına hizmet eden iki önemli araç genetik kaynakların moleküler yöntemlerle tanımlanması ve moleküler işaretleyicilerdir. İslah çalışmalarında gen kaynaklarının zenginliği ve bu kaynakların tanımlanması elde edilecek yeni çeşitlere kazandırılacak özelliklerin belirlenmesi açısından çok önemlidir. İslah materyalleri arasındaki genetik akrabalık bilgileri yeni çeşit geliştirme çalışmalarında sonuca daha kısa sürede ulaşılmasını sağlayabilir (Mohammadi ve Prasanna, 2003; Jalikop, 2010).

Bitkiler âleminde hermafrodit (erselik, er-dişi), ginodioik, androdioik, ginomonoik ve andromonoik çiçek yapısına sahip bireylere rastlanmaktadır. Andromonik bir bitki olan narda aynı bitki üzerinde hem verimli hermafrodit hem de verimsiz erkek çiçekler bulunmaktadır. *P. nana* × *P. granatum* melezlemesi sonucu elde edilen F₁ bitkilerinin, boylarının gençlik kısırlığı döneminde belirlenmesi, yapılan ıslah çalışmalarına mali ve iş gücü açısından yarar sağlayacak ve ıslah çalışmalarına hız kazandırabilecektir.

Son yıllarda ülkemiz nar üretiminin ve ihracatının artırılması için yeni çeşitlerin geliştirilmesinin önemi anlaşılmış ve buna yönelik ıslah çalışmaları yapılmaya başlanmıştır. Biyoteknoloji çalışmalarının da yürütülen klasik ıslah çalışmalarına adapte edildiği gözlenmektedir. Özellikle moleküler tekniklerin kullanılması ıslah çalışmaları sırasında, erken dönemde istenen ve istenmeyen özellikler açısından seleksiyona katkı sağlayabilmektedir (Simsek vd., 2017).

Hindistan'da 'Ganesh' × 'Nana' kombinasyonundan elde edilen F₁ nar melezi 'Amlidana' ismi ile tescil edilmiştir. Tropik iklim şartlarına uyum sağlayan bu çeşit, ekşi olan 'Daru' çeşidinden daha üstün özelliklere sahiptir. Normale göre daha kısa boylu olması nedeniyle sık dikimli bahçelerde birim alandan elde edilecek meyve verimin artırmak amacıyla kullanılabilir (Jalikop, 2000).

Küçük (2003), 'İzmir 1', 'İzmir 10', 'İzmir16', 'İzmir 23', 'İzmir 26', 'İzmir 1445', 'İzmir 1513' çeşitleriyle yaptığı kendine tozlanma ve açık tozlanma çalışmasında, en düşük meyve tutma oranını kendine tozlanmada %10, açık tozlanmada %4.1 oranında 'İzmir 1445' çeşidinde belirlemiş, en yüksek meyve tutma oranını ise kendine tozlanmada %82.8, açık tozlanmada %94.2 oranında 'İzmir 1513' çeşidinde tespit etmiştir.

Shao vd. (2003) yaptıkları çalışmada *in vitro* olarak çoğalttıkları *P. nana* L. ($2n=2x=16$) bitkisinin kolhisin ile muamelesinden tetraploid ($2n=4x=32$) bitki elde etmişler ve bazı morfolojik özellikler bakımından diploid ve tetraploid bitkileri karşılaştırmışlardır. Tetraploid bitkilerde kök uzunluğu, yaprak uzunluğu, çiçek tomurcuğu uzunluğu diploid bitkilerden daha kısa, yaprak genişliği, çiçek tomurcuğu genişliği tetraploid bitkilerde daha uzun olarak ölçülmüştür. Ayrıca çiçek tozu miktarı tetraploid bitkilerde artarken çiçek tozu canlılığı önemli ölçüde azalmıştır.

Hindistan'daki melezleme çalışmasında 'Ganesh', 'Kabul Yellow' doğal tip ve 'Kabul Yellow' rozet yapraklı mutant olmak üzere 3 nar ebeveyni kullanılmıştır. 'Ganesh' çeşidinin F_2 bireylerinde 0.12 frekansta rozet genotipinde bireylere rastlanmıştır. 'Kabul Yellow' çeşidinde ise bir adet resesif mutant klon tespit edilmiştir (Jalikop, 2003).

Hindistan'da 2001-2006 yılları arasında meyve asitliği bakımından tatlı ve ekşi çeşitler arasında melezleme çalışmaları yapılmış ve meyve asitliğinin kalıtımını incelenmiştir. Çalışmada toplam 3 tatlı nar çeşidi ('Ganesh', 'Ruby', 'Kabil Sarı') ve 3 ekşi nar çeşidi ('Nana', 'Daru', 'Double Flower') kullanılmıştır F_1 ve F_2 populasyonlarını incelediklerinde nardaki meyve asitliğini kontrol etmede majör genlerin ve çoklu genlerin etkili olabileceği bildirilmiştir (Jalikop, 2007).

Holland vd. (2007) İsrail'de 40 çöğür arasından keşfedilen bir tesadüf çöğürünü Shani-Yonay ismi ile tescil ettirmişlerdir. 'Shani-Yonay' meyvesi, İsrail'de ağustosun üçüncü haftasında olgunlaşır. Popüler olarak yetiştirilen 'Wonderful' çeşidinden yaklaşık bir ay önce olgunlaşır. Ağacı dalları aşağıya sarkık şekilde çalimsı büyüme ve gelişme sergiler. Meyvesi kırmızı kabuk ile koyu kırmızı, yumuşak ve tatlı tohumlara (dane) sahiptir.

Hindistan'da istenmeyen bir özellik olan dane kararmasının diğer meyve özellikleriyle olan ilişkisini belirlemek amacıyla 158 adet nar genotipinde çalışmalar yapılmış, yüksek SÇKM'ye sahip ve açık renk daneleri olan genotiplerin, dane kararmasına daha yatkın olduğu bildirilmiştir. (Jalilop vd., 2010).

İran'da MTS $\times$ ND melezlemesinden elde ettikleri 37 adet F_1 melezini ve MTS, ND bireylerini meyve özellikleri bakımından 66 RAPD primeri ile test edilmiştir. Çalışma sonucunda %21.2 oranında polimorfizm tespit etmişlerdir. Meyve özelliklerinin genetik benzerlik ve farklılıkları tespit etmek için yeterli olmayacağı bildirilmiştir (Zamani vd., 2010).

Irganlı genotipi ve 'Hicaznar' çeşidi arasında 28'er çiçekte karşılıklı melezleme yapmış ve Irganlı genotip $\times$ 'Hicaznar' kombinasyonunda hiçbir tutum gözlenmezken, 'Hicaznar' $\times$ Irganlı genotipi kombinasyonunda 9 adet meyve tutumu olduğu bildirilmiştir (Üstütaş, 2015).

2006-2009 yılları arasında Antalya'da narda melezleme çalışmaları yapılmıştır. 'Hicaznar' açık tozlanma (OPH), 'Hicaznar' $\times$ 'Fellahyemez' (H $\times$ F), 'Hicaznar' $\times$ 'Ernar' (H $\times$ E) ve Hicaznar kendileme (H $\times$ H) melezleme kombinasyonları yapılmıştır. 2006'da bu kombinasyonlardan sırasıyla 26, 18, 13 ve 10 olmak üzere toplam 67 melez birey, ağaç ve meyve özellikleri bakımından ebeveynleri ile karşılaştırmışlar, tozlayıcı genotipin elde edilen melezler üzerinde doğrudan ve önemli etkilere sahip olduğu belirtilmiştir (Yazıcı ve Şahin, 2016).

Aksoy (2017), 'Tezeren 35', 'Dr. Ercan 35', 'Efenar 35' ve 'Kamilbey 35' nar çeşitlerinde açık tozlanma, kendine tozlanma ve karşılıklı tozlanma çalışmaları yapmış, en düşük meyve tutma oranı kendine tozlanmada %25.2 ve açık tozlanmada %60.1 ile 'Tezeren 35' çeşidinde gözlemlenirken, en yüksek meyve tutma oranlarını kendine tozlanmada %62.4 ile 'Efenar 35' çeşidinde, açık tozlanmada %85.0 ile 'Dr. Ercan 35' çeşidinde gözlemlenmiştir. Melezleme çalışmalarında en yüksek meyve tutma oranını %49.7 ile 'Kamilbey 35' $\times$ 'Dr. Ercan 35' kombinasyonunda, en düşük meyve tutma oranını ise 'Efenar 35' $\times$ 'Dr. Ercan 35' kombinasyonunda olduğunu bildirmiştir.

2.3. Narda Yapılan Moleküler Belirteç Çalışmaları

İran’da yapılan bir çalışmada, 24 adet nar genotipinde çeşitlilik düzeyini belirlemek için yaptıkları çalışmada RAPD yöntemi kullanılmıştır. Nar genotipleri toplam 100 adet RAPD primeriyle test edilmiştir. Kullanılan 16 primerden polimorfik desen elde etmişler ve toplam 178 bandın 102 tanesinin polimorfik olduğu belirtilmiştir. Genotipler arasındaki genetik çeşitlilik düzeyini ortalama %57.3 oranındaki polimorfizmle ifade edilmiş, RAPD yönteminin narın genetik çeşitliliğini belirlemede etkili bir yöntem olduğu bildirilmiştir (Sarkhosh vd., 2006).

Ercisli vd. (2007) yaptıkları çalışmada ‘Çekirdeksiz’, ‘Kırmızı kabuk’, ‘Siyah nar’, ‘Nuz ekşi’, ‘Yeşil kabuk’, ‘Kırlı hanım’ çeşitleri arasındaki biyokimyasal ve genetik ilişkileri incelemek amacıyla RAPD yöntemini kullanmışlardır. Nar yapraklarının yağ asidi bileşimi gaz kromatografisi kullanılarak belirlenmiş, özellikle, ‘Kırlı hanım’ çeşidinin diğer çeşitlerden farklı bir yağ asidi profiline sahip olduğu; ‘Kırlı hanım’ çeşidinde linoleik asit tespit edilemezken, diğer çeşitlerin ise çeşitli linoleik asit seviyelerine sahip olduğunu belirlemiştir. Çeşitler arasında yağ asidi kompozisyonundaki farklılıklar 76 RAPD primeriyle test edilmiştir. Toplamda, 76 primerin 15’i polimorfik bantlar üretmiştir. RAPD yönteminin, nar çeşitlerinde yağ asitlerinin bileşimindeki farklılıkları ayırt etmek için kullanılabileceğini belirtmişler ve kullandıkları çeşitler arasındaki yağ asidi kompozisyonundaki farklılıkları ortalama %85.2 oranında polimorfizm ile ifade etmişlerdir.

Zamani vd. (2007) İran’da 24 nar genotipinin meyve özelliklerini 24 RAPD primeri kullanarak çalışmışlardır. RAPD analizinden elde edilen sonuçlarla meyve özelliklerinin anlamlı bir korelasyon üretmediğini, meyve özelliklerine dayanan bilgilerin, nardaki genetik ayırım için yeterli olmadığı, SSR, AFLP, SNP gibi yöntemlerin daha kesin sonuçlar sağlayabileceğini bildirmişlerdir.

Yuan vd. (2007) Çin’de 6 farklı yöreden toplanan 85 nar genotipinin genetik akrabalığını 8 floresan-AFLP primeri kullanarak araştırmışlardır. Bu primerlerden 135-185 ortalama 158 polimorfik lokus elde edilmiştir. PIC değeri %62.5-86.1 arasında değişmiş ve ortalama %73.3 bulunmuştur.

Durgac vd. (2008) Hatay yöresinde bazı meyve özelliklerine göre seçtikleri 6 farklı nar çeşidinde ('İncekabuk', 'Ekşi nar', 'Kan narı', 'Katırbaşı', 'Şerife', 'Tatlı') yaptıkları pomolojik ve genetik çeşitlilik çalışmasında toplam 100 RAPD primerini test etmişlerdir. Nar çeşitleri arasında %22 oranında polimorfizm tespit etmişlerdir. Farklı meyve özelliklerine göre seçtikleri bu 6 çeşidin morfolojik ve moleküler verileri arasında tutarsızlıklar olduğunu belirtmişler, meyve özellikleri arasındaki çeşitliliğin, genetik ilişkinin iyi bir göstergesi olmadığını, nar genetik çeşitliliğini ortaya çıkarmayı amaçlarken çalışmalarda SSR veya AFLP yöntemlerinin kullanılmasını önermişlerdir.

Zhang vd. (2008) Çin'de 23 nar genotipi ile yaptığı bir çalışmada genetik çeşitliliği belirlemek amacıyla SRAP yöntemi kullanılarak 7 çift primer test etmiştir. Toplamda 1380 bandın 662 adedi polimorfik olarak gözlenmiştir. Genotipler arasındaki genetik çeşitlilik %48 oranında polimorfizm ile ifade edilmiştir.

Jbir vd. (2008) Tunus'un 14 farklı bölgesinde belirledikleri 34 nar çeşidinde genetik çeşitliliği belirlemek amacıyla AFLP yöntemini kullanarak 6 primer kombinasyonu, çeşitler arasındaki genetik varyasyonu %94.7 polimorfizm oranıyla ifade etmişlerdir.

Sarkhosh vd. (2009) İran'da yumuşak çekirdekliğin RAPD yöntemiyle değerlendirilmesi çalışmasında 21 yumuşak çekirdekli nar çeşidi kullanmışlardır. Toplam 29 adet RAPD primerinden 14 tanesi polimorfik bant oluşturmuştur. 14 primerden toplam 146 bant elde edilmiş, 43 adet polimorfik bant elde edilmiştir. Polimorfizm oranı ortalama %29.5 olarak belirlemişlerdir. Polimorfizm oranının düşük olmasını, meyve özelliklerinin nardaki genetik ayrım için yeterli olmadığını belirtmişlerdir.

Pirseyedi vd. (2010) İran'da zenginleştirilmiş *P. granatum* genom kütüphanesinden 12 polimorfik SSR belirteci geliştirmişlerdir. Bu belirteçler 60 nar genotipi ile test edilmiştir. Lokus başına polimorfik allel sayısı 2-5 arasında değişmiş ve ortalama 2.9 olmuştur. Belirteçlerin PIC'i 0.26-0.61 arasında değişmiş ve ortalama 0.43 bulunmuştur.

Curro vd. (2010) yaptıkları çalışmada, narda mikrosatellit-AFLP tekniğini kullanmış ve 9 SSR belirteci geliştirmişlerdir. SSR belirteçlerinin kullanışlılığını tespit etmek amacıyla toplam 33 nar genotipinde DNA çalışmaları yürütmüşler ve geliştirilen belirteçlerin, düşük polimorfizm oranı gösterdiği bildirilmiştir.

Araştırmacılar tespit ettikleri düşük polimorfizm oranının, nar genotipleri arasındaki dar genetik çeşitlilik ile ilgili olabileceğini belirtmişlerdir.

Narzary vd. (2010), Hindistan'da 28 farklı çeşidi temsil eden 87 adet narda genetik çeşitliliği belirlemek amacıyla RAPD, DAMD ve ISSR yöntemlerini kullanmış ve 21 adet RAPD primeri kullanarak %92.4 oranında, 5 adet DAMD primeri kullanarak %98.5 oranında, 17 adet ISSR primeri kullanarak %76.5 oranında polimorfizm belirlemişlerdir. Çalışma sonucunda narlarda genetik çeşitliliğin değerlendirilmesinde DAMD yönteminin RAPD ve ISSR'den daha güçlü olduğunu belirtmişlerdir.

Ebrahimi vd. (2010), İran'da 20 nar genotipleri arasındaki genetik akrabalığı belirlemek amacıyla 25 SSR primeri kullanmışlardır. Polimorfik bant veren 13 SSR primerinden toplam 44 ve ortalama 3.4 allel elde edilmiştir. Ortalama PIC değeri 0.4 bulunmuştur.

Basaki vd. (2011) İran'da 202 nar genotipinde yaptığı bir çalışmada meyve boyu, çapı, meyve boyu/çapı oranı, çanak yaprak yüksekliği, çapı, çanak yaprak yüksekliği/çap oranı, çanak yaprak şekli, meyve tadı, meyve şekli, meyve boyutu, meyve rengi, güneş yanığı hassasiyeti, gövde çatlaması, çiçek uzunluğu, genişliği ve dişicik borusu uzunluğu olmak üzere birçok morfolojik özelliği incelemiş, genotiplerde 30 SSR primerini test etmiş ve 7 primerden polimorfik bant elde etmişlerdir. SSR yöntemiyle inceledikleri özelliklerin çoğuyla bağlantılı olan bir SSR primeri belirlemişlerdir. MP12 primerinin dişicik borusu yüksekliğiyle ilişkili olabileceğini ve MP26 primerinin meyve boyu, meyve çapı, çanak yaprak boyu meyve boyu/çap oranı, meyve boyu, çanak yaprak şekli ve güneş yanığı hassasiyeti gibi özellikleri birbirine bağladığını, bu özellikler arasında anlamlı ve pozitif bir korelasyon olduğunu bildirmişlerdir.

Talebi Bedaf vd. (2011) yaptığı bir çalışmada 24 nar çeşidi arasındaki genetik varyasyonun karşılaştırılmasında RAPD ve ISSR yöntemlerini kullanmıştır. Çalışılan 160 RAPD primerinden 13'ü ve 15 ISSR primerinden 6'sı tekrarlanabilir bantlar vermiştir. RAPD primerlerinden elde edilen toplam 131 banttan 29'u (%22.1) ve ISSR primerlerinden elde edilen toplam 173 banttan 64'ü (%37.0) polimorfiktir. Ortalama PIC değeri RAPD'de 0.128 ve ISSR'de 0.163 bulunmuştur. Araştırmacılar ISSR yönteminin çeşitlerin gruplamasında ve tekrarlanabilir bant elde edilmesinde daha iyi olduğunu belirtmişlerdir.

Soriano vd. (2011), narda 117 SSR belirteci geliştirmişler ve bunları 11 nar genotipinde test etmişlerdir. Toplamda primerlerin 66'sının polimorfik bant oluşturduğu, 38'inin monomorfik bant oluşturduğu ve 13 primerin hiç bant oluşturmadığını tespit etmişlerdir.

Ercisli vd. (2011) AFLP yöntemini kullanarak, meyve ağırlığı, dane rengi, tat, tohum sertliği özelliklerine göre Çoruh vadisinin çeşitli bölgelerinden seçtikleri 19 farklı nar genotipinde yaptıkları genetik karakterizasyon çalışmasında 4 farklı AFLP primer kombinasyonundan toplam 297 bant elde etmişlerdir. Bu bantların arasında 213 bantın polimorfik özellik gösterdiğini ve %73.0 oranında polimorfizm elde ettiklerini belirtmişlerdir.

Sarkhosh vd. (2011) İran'da 21 yumuşak çekirdekli nar genotipindeki genetik çeşitliliği belirlemek amacıyla 72 floresan-AFLP primer kombinasyonu kullanmışlar, 31 adet primer kombinasyonundan % 39.0 oranında polimorfizm elde etmişlerdir. Buldukları düşük polimorfizm oranıyla ilgili, morfolojik olarak birbirlerinden farklı görünen çeşitlerin her birinin benzer bir genetik kökene sahip olduğunu ve bir orijinal klondan çoğaltılan ve farklı bölgelere transfer edilen genotiplere farklı isimler verildiği hipotezinden bahsetmişlerdir.

Sarkhosh vd. (2012) İran'da ticari olarak yetiştirilen Malas Danesiyah Esfahani (MDE) çeşidi ile yumuşak çekirdekli Bihaste Danesefid Ravar (BDR) çeşidi arasındaki melezlemeden 62 melez birey elde etmişlerdir. Oluşturulan F₁ popülasyonunda 26 AFLP primer çifti kullanılmıştır. Toplamda elde edilen 216 belirteçten 144'ü MDE ebeveyninde, 130'u BDR ebeveyninde kullanışlı olmuştur. MDE ebeveyninin bağlantı haritasında yer alan 67 AFLP belirteci 435.3 cM kapsamış ve belirteçler arası ortalama uzaklık 6.5 cM olarak hesaplanmıştır. BDR ebeveyninin bağlantı haritasında yer alan 66 AFLP belirteci 344.2 cM kapsamış ve belirteçler arası ortalama uzaklık 5.2 cM olarak hesaplanmıştır. Her iki ebeveyninden 67 AFLP belirteci kullanılarak oluşturulan ortak bağlantı haritası ise 335.5 cM uzunluğu kapsamış ve 8 bağlantı grubu oluşturmuştur.

Zhang vd. (2012) Çin'de 47 nar çeşidinde genetik çeşitliliği 11 RAPD primeri ile test etmişlerdir. Yaptıkları çalışmada her primerden üretilen polimorfik bantları manuel olarak bir çeşit tanımlama diyagramı (CID) oluşturmada kullanmışlar ve kullandıkları bu şemanın pratik, etkili, kaydedilebilir ve yenilenebilir olduğunu, genetik çalışmalarında bitki numunelerinin hızlı bir şekilde tanımlanması için temel referans bilgisi olarak kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Jbir vd. (2012) Tunus'ta 32 çeşidin karakterize edilmesinde 13 SSR primeri kullanmışlardır. Bu primerlerden toplam 40 allel elde edilmiş ve 46 genotip birbirinden ayırt edilebilmiştir. Genetik DAS (Paylaşılan Allel Uzaklığı) parametresi kullanılarak oluşturulan soyağacında (dendrogram) çeşit örneklerinin alındıkları yöreden bağımsız olarak gruplandıkları bulunmuştur.

Yuan vd. (2018) tarafından Çin'de *P.granatum*'un ilk taslak genom haritası çıkartılmıştır. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar nar için tahmin edilen 336 Mb uzunluğundaki genomun %81.5'i olan yüksek kaliteli 274 Mb'a karşılık gelmiştir. Bu taslak nar genom haritası N50 büyüklüğü 1.7 Mb olan 2177 adet genom omurgası (scaffold) ile 30903 gen içermektedir. Bu çalışmada Black 127, Nana, Taishanhong ve Wonderful nar çeşitleri kullanılmıştır. Paylaşılan genler bakımından *Punica* cinsi ile *Arabidopsis*, *Eucalyptus*, *Malus* ve *Vitis* cinsleri karşılaştırması yapılmıştır. Son zamanlarda elde edilen diğer araştırma sonuçlarını destekleyecek şekilde narın küfeya (*Cuphea* spp.), oya ağacı (*Lagerstroemia* spp.), *Nesaea* spp., *Rotala* spp. ve kırmızı kan çiçeği (*Lythrum* spp.) gibi Lythraceae familyasının bir üyesi olduğu teyit edilmiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Bu çalışmada kullanılan ana (*P. nana*), baba (*P. granatum*) ve melez bireyler (Şekil 3.1) Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Ziraat Fakültesi bahçesinde bulunmaktadır. *P. nana* 30 ila 50 cm boylanabilen, çiçekleri kırmızı-turuncu renkli, küçük nar meyveleri oluşturan çalı formunda bir bitkidir (Bonyanpour ve Khosh-Khui, 2013). *P. granatum* 1-5 m boylanabilen çalı ya da ağaçlık formunda, çok dallı taca sahip bir bitkidir.

3.2. Yöntem

3.2.1. Çiçek Tozu Elde Edilmesi

Melezleme çalışmaları için seçilen ana ve baba ebeveynlerin çiçekleri maksimum iriliğe ulaştıklarında ancak çanak yapraklarının uçları henüz açılmadığı balon aşamasında yapılmaya başlanmıştır (26.05.2014). Melezleme çalışmalarında kullanılmak üzere, baba ebeveyn balon safhasındaki çiçekler sabah erken saatlerde toplanmış ve aynı gün başcıkları beyaz bir kâğıt üzerine dökülmüştür. Güneş ışığında bekletildikten sonra patlayan başcıkların çiçek tozları (pollen) filakon şişelere yerleştirilmiştir. Melezlemede kullanılmak üzere buzdolabında (4°C) muhafaza edilmiştir.

3.2.2. Emaskulasyon

Balon safhasındaki ana ebeveynin (*P. nana*), çiçeklerinde bulunan taç yaprakları ve erkek organları steril bir jilet yardımıyla dişi organa zarar vermeden uzaklaştırılmıştır (27.05.2014).



Şekil 3.1. Denemede kullanılan melez nar bitkileri

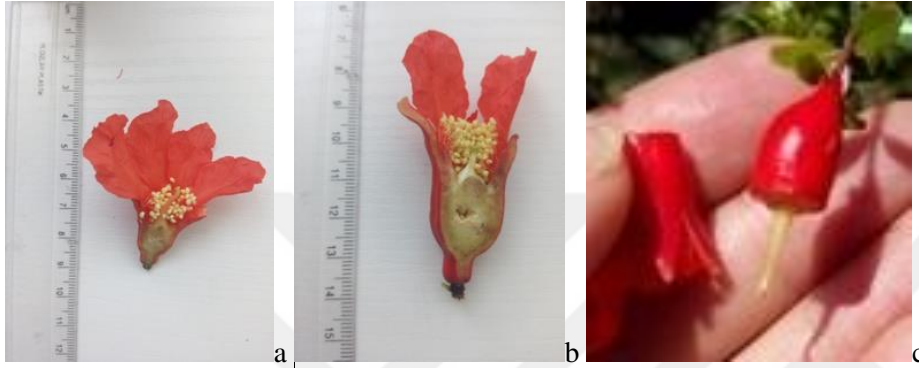
3.2.3. Melezleme, Kendileme

Melezleme; seçilen erkek ebeveyne ait çiçek tozlarının, emaskule edilmiş dişi çiçeğin stıgması üzerine bırakılmasından sonra döllenmeyle meyve oluşması işlemidir. Buzdolabında muhafaza edilmiş baba ebeveyne (*P. granatum*) ait çiçek tozları, emaskulasyon işlemi yapıldıktan hemen sonra ana ebeveynin dışıcık tepesine boya fırçası yardımıyla sürülmüştür. Tozlama işlemi çiçeklenme dönemi boyunca belirli aralıklarda toplam 176 çiçekte yapılmıştır. Tozlama işlemi gerçekleştirilen çiçeklere rafya ip bağlanmış ve bu şekilde takibi kolaylaşmıştır.

Melezleme dışında ana ebeveyn üzerinde balon evresindeki çiçekler kendileme amacıyla kese kâğıdı ile kapatılmış toplam 10 çiçekte keseleme işlemi yapılmıştır. Kese kâğıdı ile dışarıdan çiçek tozu girişi engellenecek ve çiçeğin kendi çiçek tozuyla tozlanması amaçlanmıştır.

Ana ve baba ebeveynler belirlenirken çiçeklenme döneminde oluşturdukları A tipi ve B tipi çiçekler dikkate alınmıştır. Normal boylu nar (*P. granatum*) bitkisinin baba ebeveyn olarak seçilme sebebi daha çok A tipi çiçek oluşturmasıdır. Ana ebeveyn olarak seçilen bodur nar (*P. nana*) bitkisinde ise genellikle B tipi çiçek

görülmüştür. Çalışmada kullanılan ana ve baba ebeveyn bitkilerinin çiçeklenme dönemleri birbirleriyle büyük oranda örtüşmektedir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Nar çiçeklerinin görünümü (a) A tipi erkek çiçek, (b) B tipi hermafrodit çiçek, (c) emasküle edilmiş hermafrodit çiçek

3.2.4. Meyve Eldesi, Tohum Çıkarma, Tohum Ekimi, Aktarma

Melezlenmiş ve kendilenmiş çiçeklerden tutan meyveler 20.10.2014'te hasat edilmiş, elde edilen meyvelerin tohumları çıkartılmış, temizlenip kurutulduktan sonra ekilinceye kadar buzdolabında (4°C) muhafaza edilmiştir. Tohumlar viyollerdeki perlit ortamına ekilmiştir. Çimlenen tohumlardan elde edilen çöğürler 3 litrelik naylon torbalara dikilmiştir. Melez çöğürler ve kendilenmiş çöğür bitkiler sera içerisinde ayrı masalara yerleştirilmiştir. Sera koşullarında sulama ve diğer bakım işlemleri yapılarak bitkiler büyütülmüştür.

Çöğür bitkiler 29.07.2016'da 12 litrelik saksılara aktarılmış ve sera dışına beton zemin üzerinde bakım işlemleri devam ettirilmiştir. Bu işlemlerin hepsi melezleme ve kendileme çöğürleri içinde yapılmıştır. Saksılardaki bitkilere numara verilmiş ve etiketlemeleri yapılmıştır (Şekil 3.3).

3.2.5. Çöğürlerde Boy Ölçümü

Boy ölçümü 11.11.2016 ve 16.02.2020 tarihlerinde *P. nana* × *P. granatum*, *P. nana* kendileme ve *P. granatum* kendileme bitkilerinde gövde uzunluğu toprak yüzeyi ile en uçtaki yaprak arasındaki mesafe çelik şerit metreyle ölçülerek yapılmıştır.



Şekil 3.3. Melez bitkilerin görünümü (a) Naylon torbalara aktarılmış bitkiler, (b) saksılara aktarılmış bitkiler

3.2.6. Yaprak Örneklerinin Alınması, DNA Çıkartılması

Seçilen bitkilerin genç yaprakları etiket numaralarına göre toplanmıştır. Yapraklar bekletilmeden DNA izolasyonu için ADÜ-TARBIYOMER'e getirilmiştir.

Öncelikle Norgen Bioteck (Genomic DNA Isolation Kit 100 preps Cat.# 24750, Thorold, Ontario, Kanada) ticari kiti ile DNA çıkartılmaya çalışılmıştır. DNA çıkartma basamakları aşağıdaki gibidir:

- Kullanılacak tüplerin üzerine bitki numaraları yazılmıştır.
- Yaklaşık 100 mg yaprak örneği havan içerisinde sıvı azot ile un haline gelene kadar ezilmiştir.
- 20 mg ezilmiş örnek spatula yardımıyla 1.5 ml Eppendorf tüplere eklenmiştir.
- Tüplerin her birine 300 µl Digestion Buffer A eklenmiştir.
- Tüplerin her birine 12 µl Proteinase K eklenmiş ve nazikçe vortekslenmiştir.
- Örnekler 55°C'de yaklaşık 1 saat inkubasyonda bekletilmiştir.
- Örneklerin her birine 300 µl Buffer SK eklenmiş ve nazikçe vortekslenmiştir.
- Örneklerle 300 µl %96'lık EtOH eklenmiş ve nazikçe vortekslenmiştir.
- Örneklerden yaklaşık 600 µl sıvı alınıp Kit içerisindeki Collection Tube'ün üzerine yerleştirilen Spin Column'un üzerine bırakılmıştır.

- Örnekler 8000 rpm’de 3 dak santrifüj edilmiştir.
- Spin column çıkartılıp, Collection Tube’ün tabanında biriken kahverengi-siyah sıvı lavaboya dökülmüş ve Spin column tekrar collection tube’ün üzerine yerleştirilmiştir.
- Örneklerle 500 µl Wash Solution A eklenmiştir.
- Örnekler 14000 rpm’de 1 dak santrifüj edilmiştir.
- Collection tube’ün tabanında biriken kahverengi sıvı dökülmüş ve Spin column tekrar collection tube’ün üzerine yerleştirilmiştir.
- Örneklerin her birine 500 µl Wash Solution A eklenmiştir.
- Örnekler 14000 rpm’de 2 dak santrifüj edilmiştir.
- Spin column, 1.7 ml’lik Elution Tube içerisine yerleştirilmiştir.
- Örneklerin her birine 200 µl Elution Buffer B eklenmiştir.
- Örnekler önce 6000 rpm’de 1 dak santrifüj edilmiştir.
- Sonra 14000 rpm’de 2 dak santrifüj edilmiştir.
- Elution tube’ün tabanında kalan pellet 50 µl ddH₂O ile çözdürülmüştür.

Norgen Biotek yöntemiyle DNA izole edilmeye çalışılmış, ancak yeterli miktarda ve kalitede DNA elde edilememiştir.

Daha sonra DNA izolasyonu Doyle ve Doyle (1987, 1990) ile Costa ve Roberts (2014)’ten değiştirilerek CTAB (%2) yöntemiyle yapılmıştır. DNA çıkartma basamakları aşağıdaki gibidir:

- 1.5 ml Eppendorf tüplerin üzerine bitki numaraları yazılmıştır.
- Aynı tüplerin içerisine yaklaşık 100 mg yaprak örneği küçük parçalara ayrılarak tüplere yerleştirilmiştir.

- Tüplerin içerisine sıvı azot koyulup yapraklar un haline gelinceye kadar ezilmiştir.
- Önceden 65°C'de ısıtılmış olan %2'lik CTAB'tan her tüpe 600 µl eklenip vortexlenmiştir.
- Tüpler birkaç saniye santrifüj edilmiştir.
- Tüplerin üzerlerine 100 µl %2'lik CTAB eklenip karıştırılmıştır.
- Tüpler 65°C'lik etüvde 1.5 saat bekletilmiş ve bu süre içerisinde 3 kez çalkalanmıştır.
- Tüplere 800 µl C:I (24:1) eklenip karıştırılmıştır.
- Tüpler 13000 rpm'de 20 dak santrifüj edilmiştir.
- Tüpler santrifüj edilirken, yeni Eppendorf tüplere etiketler yazılmıştır.
- Yaklaşık 600-800 µl süpernatant yeni tüplere aktarılmıştır.
- Tüplere -20°C'de bekletilen 2-propanol ilave edilip, tüpler nazikçe çalkalanmadan karıştırılmıştır.
- Tüpler -20°C'de 1 saat bekletilmiştir.
- Tüpler -20°C'den çıkartıldıktan sonra hiç karıştırılmadan 13000 rpm'de 4 dak santrifüj edilmiştir.
- Pellet tüpün dibinde kalacak şekilde üzerlerindeki sıvı yavaşça dökülmüştür.
- Tüplerin içerisinde kalan alkolü uzaklaştırmak için tüpler 32°C'lik etüvde 20-25 dak bekletilmiştir.
- Örneklerin içerisindeki alkol uzaklaştırıldıktan sonra tüplerin her birine 80 µl ddH₂O eklenerek hafifçe hafifçe vurularak alt üst edilmiş ve içerisindeki pellet çözündürülmüştür.
- Tüplerin her birine 8 µl 7.5 M Amonyum Asetat eklenmiştir.

- Tüplerin her birine 180 µl (-20°C'de muhafaza edilmiş) %100 EtOH eklenmiş ve hafifçe vurularak alt üst edilmiştir.
- Oda sıcaklığında yarım saat bekletilmiştir.
- Tüpler 13000 rpm'de 4 dak santrifüj edilmiştir.
- Tüplerin üzerindeki sıvı dikkatlice dökülmüştür.
- 30 dakika kurumaya bırakılmıştır.
- Kurutulduktan sonra 50 µl ddH₂O ile çözdürülmüştür.
- Örnekler kullanılıncaya kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.7. BSA analizi

Çalışmada kullanılan küme açılım analizi Micheltmore vd. (1991)'ne göre yapılmıştır. Öncelikle *P. nana* × *P. granatum* melezlerine ait en kısa boylu 10 adet melez birey, en uzun boylu 10 adet melez birey, ana ve baba ebeveyn olmak üzere toplam 22 bireyen DNA'sı ayrı ayrı çıkartılmıştır. Sonra bodur nar (*P. nana*) kendilemesinden elde edilen 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 numaralı bireyler (7 adet) ve ana ebeveyni ile *P. nana* × *P. granatum* melezlerine ait 29, 35, 40, 42, 48, 50, 54 numaralı melez bireyler (7 adet) ve baba ebeveyn olmak üzere toplam 16 bireyin DNA'sı ayrı ayrı çıkartılmıştır. *P. nana* × *P. granatum* melez bitkilerinin DNA'larından eşit miktarda alınıp küme oluşturulmuştur. Aynı işlem kısa boylu kendileme yapılmış bitkilerde de yapılmıştır.

3.2.8. RAPD ve PCR analizlerinin yapılması

PCR solüsyonu: Her bir örnek için 1.5 µl 10× Buffer Taq tampon, 0.6 µl MgSO₄, 1 µl 3 mM dNTP, 1 µl primer, 0.2 µl Taq DNA polymerase, 6 µl genomik DNA kullanılmıştır ve üzerine karışımı 15 µl'ye tamamlamak için 4.7 µl steril ddH₂O eklenmiştir. Hazırlanan tüpler bekletilmeden PCR cihazına yerleştirilmiştir. PCR cihazında: 4 dak 94°C, 25 s 94°C, 45 s 35°C, 1 dak 72°C, 34 döngü 5 dak 72°C programı ile çoğaltılmıştır. Çalışmada OPA1-20, OPB1-20, OPC1-20, OPD1-20, OPH1-20, OPM1-20 olmak üzere 120 adet 10-mer uzunluğunda RAPD primeri kullanılmıştır. RAPD-PCR analizi polimorfizm gösteren primerler ile üç kez tekrarlanmıştır.

3.2.9. Jel elektroforezi

Agaroz jel elektroforezi çoğaltılmış DNA parçalarının ayrılması, tanımlanması ve saflaştırılması amacıyla kullanılan bir yöntemdir (Griffin ve Griffin, 1993). PCR ürünlerini yürütmek için % 1.8'lik agaroz jel hazırlanmıştır. Cam bir şişe içerisine, 0.9 mg agaroz ve 50 ml 0.5× TBE eklenerek mikrodalga fırında hafif kaynatılmış ve içerisine 2.4 µl ABM SafeView eklenmiştir. Bir süre oda sıcaklığında bekletip 15'lik tarak yerleştirilen tabakaya hızlı bir şekilde ve içerisinde baloncuk kalmayacak şekilde dökülmüştür. Jel donduktan sonra tabaka elektroforez cihazına yerleştirilmiş ve taraklar dikkatli bir şekilde çıkartılmıştır. 2 µl ABM Loading Dye, ve 10 µl PCR ürünü karıştırılmış toplamda 12 µl'lik PCR ürünü jel üzerindeki kuyucuklara pipetlenmiştir. 90 V, 35-50 dak süresince yürütülmüştür. Jel UV ışık altında gözlemlenmiştir.

3.2.10. Verilerin değerlendirilmesi

PCR analizleri sonrasında DNA bantlarında DNA'nın var olması durumunda "1", olmaması durumunda ise "0" değerleri verilerek DNA bantları skorlanmış ve monomorfik bantlar atılarak RAPD analizleri polimorfik bantlarda yapıldı.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Elde edilen bulgular arazi ve laboratuvar çalışmaları olmak üzere iki başlık altında incelenmiştir.

4.1. Arazi Çalışmalarından Elde Edilen Bulgular

Melezleme ve kendileme çalışması yapılırken şu kombinasyonlar kullanılmıştır: *P. nana* kendileme, *P. granatum* kendileme, *P. nana* × *P. granatum*.

4.1.1. 2014 Yılı Bulguları

2014 Mayıs-Haziran ayları arasında melezleme yapılmıştır. *P. nana* × *P. granatum* melezlemesinden çiçeklenme dönemi boyunca toplam 176 adet melezleme yapılmış, 66 adet meyve elde edilmiştir. *P. nana* kendilemeden 10 adet keseleme yapılmış, 2 adet meyve elde edilmiştir. *P. granatum* kendilemeden 9 adet keseleme yapılmış, 6 adet meyve elde edilmiştir (Çizelge 4.1). Elde edilen meyveler 2015 yılı ekim işlemi yapılana kadar buzdolabında +4° C de muhafaza edilmiştir. Ekilen tohumlardan elde edilen bitkilerden 2016 yılında *P. nana* × *P. granatum* melezlemesinden 54 bitki, *P. nana* kendilenmesinde 50 bitki ve *P. granatum*, kendilenmesinden 6 bitki kullanılırken; 2020 yılında ise *P. nana* × *P. granatum* melezlenemsinden 52 bitki, *P. nana* kendilenmesinden 44 ve *P. granatum* kendilenmesinden 2 bitki boy ölçümünde kullanılmıştır.

Çizelge 4.1. 2014 yılında yapılan melezleme ve kendileme çalışması

Melezleme kombinasyonu	Mezlenen / kendilenen çiçek sayısı (adet)	Tutan meyve sayısı (adet)	% Tutan	Hasat edilen meyve sayısı (adet)	% Hasat edilen
<i>P. nana</i> × <i>P. granatum</i>	176	71	%40.3	66	%37.5
<i>P. granatum</i>	9	8	%88.9	6	%66.7
<i>P. nana</i>	10	8	%8.0	2	%2.0

4.1.2. 2015 Yılı Bulguları

2015 yılında +4°C’de muhafaza edilen tohumların perlit ortamında viyollere ekilmiş ve sera koşullarında bakım işleri yapılmıştır.

4.1.3. 2016 Yılı Bulguları

2016 yılında yapılan ölçümlerde *P. nana* × *P. granatum* melezlemesinde 54 bitkinin boy ortalaması 55 cm iken ,en kısa boylu bitki 26 cm, en uzun boylu bitki 79 cm boyundadır (Çizelge 4.2). *P. nana* kendilemesinde 50 bitkinin boy ortalaması 41 cm iken en kısa bitki 26 cm ve en uzun bitki 57 cm olarak ölçülmüştür. *P. granatum* kendilemesinde 6 bitkinin boy ortalaması 37 cm iken en kısa boylu bitki 30 cm, en uzun boylu bitki 42 cm boyundadır. Ana ebeveyn 85 cm, baba ebeveyn ise 339 cm olarak ölçülmüştür.

4.1.4. 2020 Yılı Bulguları

2020 yılında yapılan ölçümlerde *P. nana* × *P. granatum* melezlemesinde 52 bitkinin boy ortalaması 184 cm iken yapılan ölçümlere göre en kısa boylu bitki 129 cm, en uzun boylu bitki 250 cm boyundadır (Çizelge 4.3). *P. nana* kendilemesinde 44 bitkinin boy ortalaması 113 cm iken en kısa bitki 59 cm ve en uzun bitki 154 cm olarak ölçülmüştür. *P. granatum* kendilemesinde 2 bitkinin boy ortalaması 173 cm iken yapılan ölçümlere göre en kısa boylu bitki 172 cm, en uzun boylu bitki 174 cm boyundadır. Ana ebeveyn 110 cm, baba ebeveyn ise 396 cm olarak ölçülmüştür (Çizelge 4.3).

4.2. Laboratuvar Çalışmalarından Elde Edilen Bulgular

4.2.1. DNA Kalitesinin ve Miktarının Belirlenmesi

Hazır DNA çıkarma kiti kullanılarak %1 CTAB yöntemiyle farklı tarihlerde DNA izole edilmeye çalışılmış, ancak yeterli miktarda ve kalitede DNA elde edilememiştir. Kullanılan bireylerin yapraklarından 02.03.2018 tarihinde DNA izolasyonu yapılmış ve PCR için yeterli miktar ve kalitedeki DNA’lar elde edilmiştir. İzole edilen DNA’ların kalitesi ve miktarları, Nanodrop Spektrofotometre kullanılarak ölçülmüştür. Cihazda 260/280 nm’deki absorbans

Çizelge 4.2. Nar melezlerinin 2016 yılındaki boy ölçümü

2016	<i>P. nana</i> × <i>P. granatum</i> bitki boyu (cm)	<i>P. nana</i> kendileme bitki boyu (cm)	<i>P. granatum</i> kendileme bitki boyu (cm)	Ebeveynin bitki boyu (cm)
1	79	26	30	Ana: 85
2	76	27	35	Baba: 339
3	74	30	38	
4	67	31	38	
5	69	32	39	
6	67	32	42	
7	67	33		
8	67	34		
9	65	34		
10	64	35		
11	61	35		
12	60	36		
13	60	36		
14	60	36		
15	59	37		
16	59	37		
17	59	37		
18	59	37		
19	59	37		
20	59	38		
21	58	38		
22	58	38		
23	57	39		
24	57	39		
25	56	39		
26	56	40		
27	55	40		
28	54	40		
29	54	40		
30	54	40		
31	53	41		
32	53	43		
33	53	43		

Çizelge 4.2. devam

34	52	44	
35	52	45	
36	52	46	
37	51	47	
38	51	47	
39	50	47	
40	50	48	
41	49	48	
42	49	50	
43	49	51	
44	49	53	
45	48	53	
46	48	53	
47	48	54	
48	47	54	
49	47	55	
50	45	57	
51	44		
52	44		
53	40		
54	38		
Boy Ort.	55	41	37

değerleri DNA saflık derecesini belirtmektedir. Elde edilen miktar ve kalite ölçümleri Şekil 4.1 ve Çizelge 4.4'te verilmiştir. İzole edilen ana ebeveynin DNA miktarı 32.0 ng/μl DNA kalitesi 1.41, baba ebeveynin DNA miktarı 34.0 ng/μl DNA kalitesi ise 1.86 olarak ölçülmüştür. Bodur nar kümesini oluşturan bireylerin DNA miktarları 20.8 ng/μl ile 46.0 ng/μl arasında, DNA kalitesi ise 1.39 ile 1.67 arasında ölçülmüştür. Normal boylu nar kümesini oluşturan bireylerin DNA miktarları 22.0 ng/μl ile 34.0 ng/μl arasında, DNA kalitesi ise 1.66 ile 1.80 arasında ölçülmüştür.

Çizelge 4.3. Nar melezlerinin 2020 yılındaki boy ölçümü

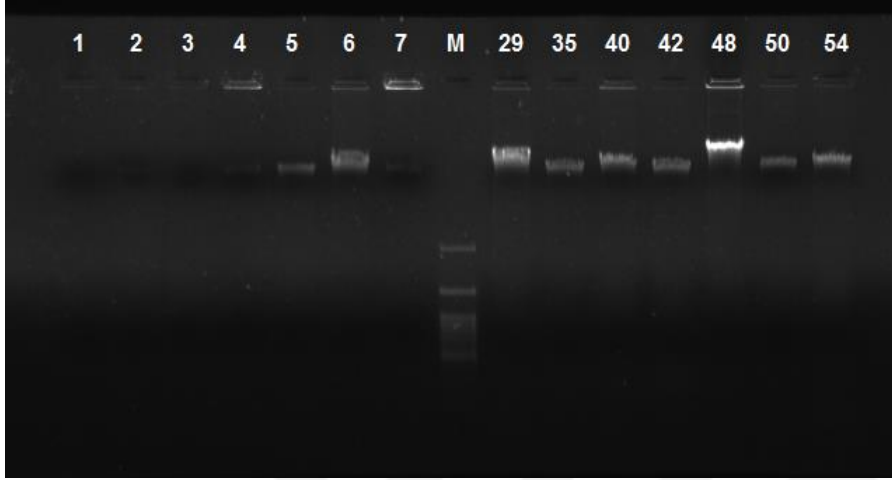
2020	<i>P. nana</i> × <i>P. granatum</i> bitki boyu (cm)	<i>P. nana</i> kendileme bitki boyu (cm)	<i>P. granatum</i> kendileme bitki boyu (cm)	Ebeveynin bitki boyu (cm)
1	250	59	172	Ana: 110
2	228	60	174	Baba: 396
3	226	73		
4	224	78		
5	223	82		
6	223	84		
7	222	87		
8	222	87		
9	222	89		
10	221	93		
11	216	99		
12	212	101		
13	211	103		
14	208	103		
15	208	106		
16	206	109		
17	204	109		
18	202	110		
19	197	111		
20	196	111		
21	193	112		
22	188	113		
23	186	114		
24	186	116		
25	185	117		
26	183	118		
27	183	120		
28	182	122		
29	178	122		

Çizelge 4.3. devam

30	177	122	
31	177	126	
32	177	126	
33	176	129	
34	175	132	
35	173	134	
36	169	138	
37	164	140	
38	164	144	
39	163	146	
40	163	147	
41	160	150	
42	155	153	
43	150	153	
44	148	154	
45	147		
46	142		
47	139		
48	137		
49	133		
50	133		
51	132		
52	129		
Boy Ort.	184	113	173

4.2.2. RAPD analizi

120 adet 10-mer uzunluğunda RAPD primerinin 16 bireyde test edilmesiyle toplam 491 adet bant elde edilmiştir. Bu bantların 27 adedi polimorfik (%5.5), 464 adedi ise monomorfik (%94.5) olarak belirlenmiştir. Test edilen primerlerden OPA-10, OPB-2, OPB-3, OPD-1, OPD-17, OPH-10, OPH-20, OPM-1, OPM-20 PCR ürünü oluşturmamış ve kalan 111 primer farklı büyüklüklerde bant oluşturmuştur (Çizelge 4.5).



Şekil 4.1. Nar yapraklarından elde edilen DNA bant görüntüsü

Çizelge 4.4. Nar yapraklarından elde edilen DNA miktarı

Örnek No.	Nükleik asit konsantrasyonu (260 nm'de ng/µl)	260 nm / 280 nm
Bodur (<i>P. nana</i> kendileme)		
1	31.3	1.67
2	22.4	1.65
3	24.0	1.39
4	23.0	1.46
5	29.0	1.58
6	20.8	1.56
7	46.0	1.43
Ana	32.0	1.41
Normal boylu (<i>P. nana</i> × <i>P. granatum</i>)		
29	23.5	1.67
35	30.0	1.69
40	22.0	1.66
42	28.3	1.78
48	28.0	1.77
50	34.0	1.70
54	23.9	1.80
Baba	34.0	1.86

4.2.3. Bodur ve Normal Boylu Kümede Polimorfik Bantların Analizi

Bodur ve boylu kümelerde polimorfizm gösteren RAPD primerleri, bodur kümeyi oluşturan 7 birey, bodur küme, ana ebeveyn, normal boylu kümeyi oluşturan 7 birey, normal boylu küme, baba ebeveynde ayrı ayrı test edilmiş ve sadece OPM7 primeri kalıcı polimorfizm göstermiştir.

Çizelge 4.5. Narda kullanılan RAPD primerleri ve elde edilen bantlar

Primer adı	Baz dizilimi 5'-3'	Toplam bant sayısı (adet)	Polimorfik bant sayısı (adet)	Bant büyüklüğü (bp)	Polimorfizm oranı (%)
OPA-1	CAGGCCCTTC	2	0	1100-600	0
OPA-2	TGCCGAGCTG	5	0	1200-600	0
OPA-3	AGTCAGCCAC	2	0	700-500	0
OPA-4	AACTGGGCTG	2	0	1000-700	0
OPA-5	AGGGGTCTTG	3	0	1100-600	0
OPA-6	GGTCCCTGAC	1	0	1300	0
OPA-7	GAAACGGGTG	5	1	900-500	20
OPA-8	GTGACGTAGG	3	1	800-450	33
OPA-9	GGGTAACGCC	2	0	1000-600	0
OPA-10	GTGATCGCAG	-	-	-	-
OPA-11	CAATCGCCGT	6	0	1000-400	0
OPA-12	TCGGCGATAG	3	0	1000-900	0
OPA-13	CAGCACCCAC	2	0	700-450	0
OPA-14	TCTGTGCTGG	2	1	1200-700	50
OPA-15	TTCCGAACCC	2	0	1000-900	0
OPA-16	AGCCAGCGAA	2	0	1300-1000	0
OPA-17	GACCGCTTGT	2	0	1100-700	0
OPA-18	AGGTGACCGT	2	0	1400-1000	0
OPA-19	CAAACGTCGG	2	1	1100-900	50
OPA-20	GTTGCGATCC	3	0	1300-600	0
OPB-1	GTTTCGCTCC	2	1	1500-1000	50
OPB-2	TGATCCCTGG	-	-	-	-
OPB-3	CATCCCCCTG	-	-	-	-
OPB-4	GGACTGGAGT	4	1	1500-900	25
OPB-5	TGCGCCCTTC	3	1	1200-800	33

Çizelge 4.5. devam

OPB-6	TGCTCTGCCC	5	0	1300-1000	0
OPB-7	GGTGACGCAG	7	0	1300-500	0
OPB-8	GTCCACACGG	4	0	1500-800	0
OPB-9	TGGGGGACTC	3	1	1600-650	33
OPB-10	CTGCTGGGAC	8	0	1100-500	0
OPB-11	GTAGACCCGT	3	0	1300-450	0
OPB-12	CCTTGACGCA	4	0	1300-700	0
OPB-13	TTCCCCCGCT	2	0	1300-800	0
OPB-14	TCCGCTCTGG	5	0	1400-700	0
OPB-15	GGAGGGTGTT	3	0	700-450	0
OPB-16	TTTGCCCGGA	5	0	1300-450	0
OPB-17	AGGGAACGAG	7	0	1300-475	0
OPB-18	CCACAGCAGT	7	0	1400-650	0
OPB-19	ACCCCCGAAG	3	0	1200-700	0
OPB-20	GGACCCTTAC	4	0	1100-700	0
OPC-1	TTCGAGCCAG	5	0	1300-550	0
OPC-2	GTGAGGCGTC	3	0	1200-1000	0
OPC-3	GGGGGTCTTT	2	1	1000-800	50
OPC-4	CCGCATCTAC	5	0	1300-475	0
OPC-5	GATGACCGCC	7	0	1500-700	0
OPC-6	GAACGGACTC	8	1	1400-600	13
OPC-7	GTCCCGACGA	8	0	1400-700	0
OPC-8	TGGACCGGTG	6	0	1300-650	0
OPC-9	CTCACCGTCC	7	3	1400-600	43
OPC-10	TGTCTGGGTG	5	0	1300-550	0
OPC-11	AAAGCTGCGG	6	0	1300-450	0
OPC-12	TGTCATCCCC	3	0	1100-600	0
OPC-13	AAGCCTCGTC	3	0	1100-700	0
OPC-14	TGCGTGCTTG	2	0	1100-800	0
OPC-15	GACGGATCAG	8	0	1400-400	0
OPC-16	CACACTCCAG	6	0	1300-450	0
OPC-17	TTCCCCCAG	1	0	900	0
OPC-18	TGAGTGGGTG	3	0	1200-850	0
OPC-19	GTTGCCAGCC	3	0	1300-800	0
OPC-20	ACTTCGCCAC	6	0	1300-900	0
OPD-1	ACCGCGAAGG	-	-	-	-

Çizelge 4.5. devam

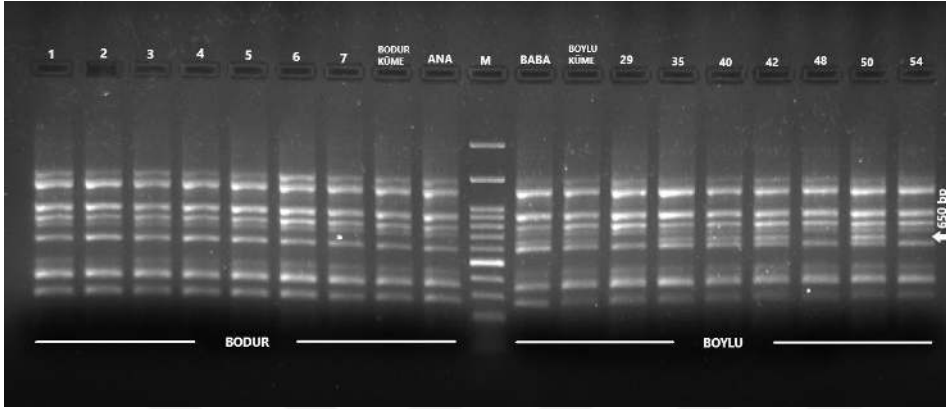
OPD-2	GGACCCAACC	5	0	1400-1000	0
OPD-3	GTCGCCGTCA	10	0	1500-600	0
OPD-4	TCTGGTGAGG	6	0	1400-600	0
OPD-5	TGAGCGGACA	10	0	1300-500	0
OPD-6	ACCTGAACGG	3	1	1300-1000	33
OPD-7	TTGGCACGGG	4	1	1300-900	25
OPD-8	GTGTGCCCCA	6	0	1300-475	0
OPD-9	CTCTGGAGAC	2	0	1100-1000	0
OPD-10	GGTCTACACC	3	0	1200-400	0
OPD-11	AGCGCCATTG	8	0	1300-450	0
OPD-12	CACCGTATCC	8	4	1300-450	50
OPD-13	GGGGTGACGA	6	0	1500-500	0
OPD-14	CTTCCCCAAG	2	1	1300-1000	50
OPD-15	CATCCGTGCT	3	0	1200-900	0
OPD-16	AGGGCGTAAG	4	1	1300-700	25
OPD-17	TTTCCCACGG	-	-	-	-
OPD-18	GAGAGCCAAC	7	1	1100-600	14
OPD-19	CTGGGGACTT	4	1	1100-400	25
OPD-20	ACCCGGTCAC	2	0	1200-1000	0
OPH-1	GGTCGGAGAA	3	0	1100-550	0
OPH-2	TCGGACGTGA	3	0	1100-550	0
OPH-3	AGACGTCCAC	7	0	1100-400	0
OPH-4	GGAAGTCGCC	6	0	900-400	0
OPH-5	AGTCGTCCCC	5	0	1000-400	0
OPH-6	ACGCATCGCA	8	0	1300-350	0
OPH-7	CTGCATCGTG	6	1	1100-350	17
OPH-8	GAAACACCCC	4	1	1000-350	25
OPH-9	TGTAGCTGGG	1	0	1400	0
OPH-10	CCTACGTCAG	-	-	-	-
OPH-11	CTTCCGCAGT	6	0	1200-450	0
OPH-12	ACGCGCATGT	6	0	1400-450	0
OPH-13	GACGCCACAC	4	0	1100-475	0
OPH-14	ACCAGGTTGG	5	0	1200-350	0
OPH-15	AATGGCGCAG	2	0	1000-800	0
OPH-16	TCTCAGCTGG	4	0	1300-500	0
OPH-17	CACTCTCCTC	7	0	1300-350	0

Çizelge 4.5. devam

OPH-18	GAATCGGCCA	6	0	1200-450	0
OPH-19	CTGACCAGCC	7	0	1100-400	0
OPH-20	GGGAGACATC	-	-	-	-
OPM-1	GTTGGTGGCT	-	-	-	-
OPM-2	ACAACGCCTC	5	0	1100-650	0
OPM-3	GGGGGATGAG	5	0	1100-475	0
OPM-4	GGCGGTTGTC	4	0	900-450	0
OPM-5	GGGAACGTGT	3	0	600-400	0
OPM-6	CTGGGCAACT	3	0	1100-450	0
OPM-7	CCGTGACTCA	10	1	1200-375	10
OPM-8	TCTGTTCCCC	4	0	1100-400	0
OPM-9	GTCTTGCGGA	5	0	1000-400	0
OPM-10	TCTGGCGCAC	7	0	1400-500	0
OPM-11	GTCCACTGTG	4	0	1300-500	0
OPM-12	GGGACGTTGG	4	0	900-375	0
OPM-13	GGTGGTCAAG	5	0	800-350	0
OPM-14	AGGGTCGTTC	5	0	800-375	0
OPM-15	GACCTACCAC	5	0	1000-450	0
OPM-16	GTAACCAGCC	2	0	800-400	0
OPM-17	TCAGTCCGGG	3	0	1100-400	0
OPM-18	CACCATCCGT	5	0	900-450	0
OPM-19	CCTTCAGGCA	5	0	1100-375	0
OPM-20	AGGTCTTGGG	-	-	-	-

4.2.4. Bitki Boyuna Bağlı Olan Polimorfik RAPD Primerinin Analizi

Çalışmada kullanılan bodur ve boylu bireyler arasındaki boy farklılığı Şekil 4.2’de bant seviyelerine göre değerlendirilmiştir (Çizelge 4.6). OPM07 primerinde yaklaşık 650 bp büyüklüğündeki bant 7 bodur birey, bodur küme, ana ebeveynde ve normal boylu bitkilerden 29, 48, 54 numaralı bireylerde gözlenmezken, baba ebeveyn, normal boylu küme, 35, 40, 42, 50 numaralı bireylerde gözlenmiştir. OPM07 primeri 1200-375 bp büyüklüğü arasında 9 monomorfik ve 1 polimorfik toplam 10 bant oluşturmuştur. Fenotipik olarak boy özelliklerine göre bodur ve normal boylu olarak sınıflandırılmış olan bu bireylerde gözlenen bandın boyla ilgili olduğu ve boy ile %57 oranında ilişkili olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.2. OPM07 RAPD primerinin nar bitkilerindeki bant görüntüsü. Sütun 1-7: No. 1-7 arası bodur kümeyi oluşturan bireyler, 8: bodur küme, 9: ana (*P. nana*), 10: M: 100 bp DNA standardı, 11: baba (*P. granatum*), 12: normal boylu küme, 13: No. 29-54 arası normal boylu kümeyi oluşturan melez bireyler

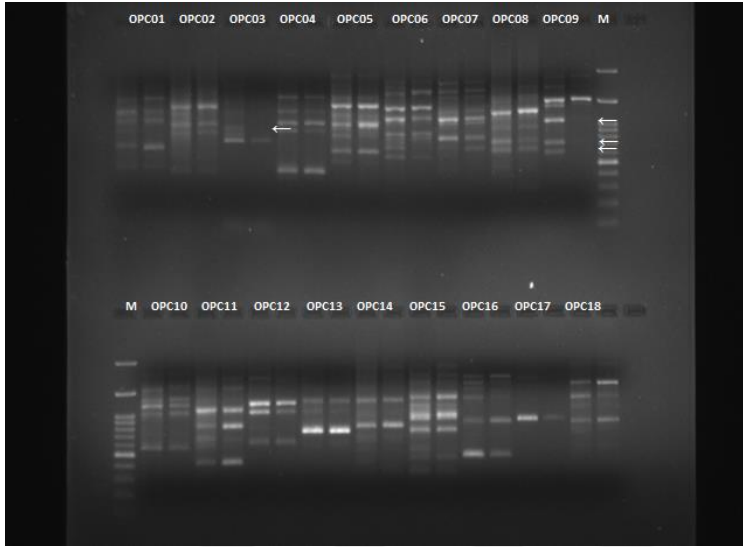
Çizelge 4.6. OPM07 RAPD primerinin nar bitkilerindeki bant deseni

Bireyler																		
1	2	3	4	5	6	7	Bodur Küme	Ana	M	Baba	Normak Boylu Küme	29	35	40	42	48	50	54
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1200	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1100	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	900	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	800	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	700	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	0	0	0	0	0	0	0	0	650	1	1	0	1	1	1	0	1	0
1	1	1	1	1	1	1	1	1	600	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	475	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	425	1	1	1	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	1	1	1	375	1	1	1	1	1	1	1	1	1

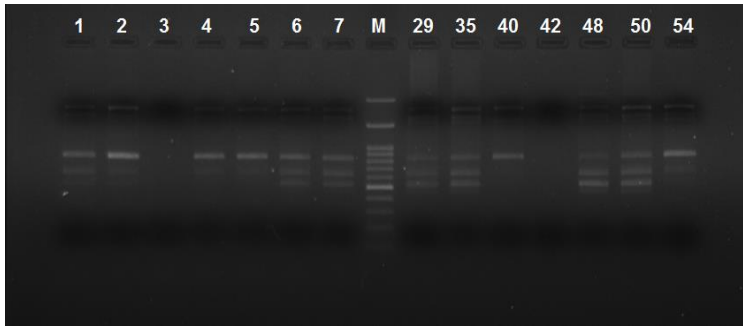
No. 1-7 arası bodur kümeyi oluşturan bireyler, bodur küme, ana (*P. nana*), M: 100 bp DNA standardı, baba (*P. granatum*), normak boylu küme, No. 29-54 arası normal boylu kümeyi oluşturan bireyler

Şekil 4.3'te OPC01-18 primerleri kullanılarak jelin üst bölümündeki son sütun 100 bp M DNA, diğer sütunlar ikili gruplar halinde sırasıyla bodur ve normal boylu nar kümeleri görülmektedir. Şekil 4.4'te OPA08 ve Şekil 4.5'te OPC09 primerleri kullanılarak yapılan analizde bodur kümeyi oluşturan bireyler, Bodur Küme, Ana

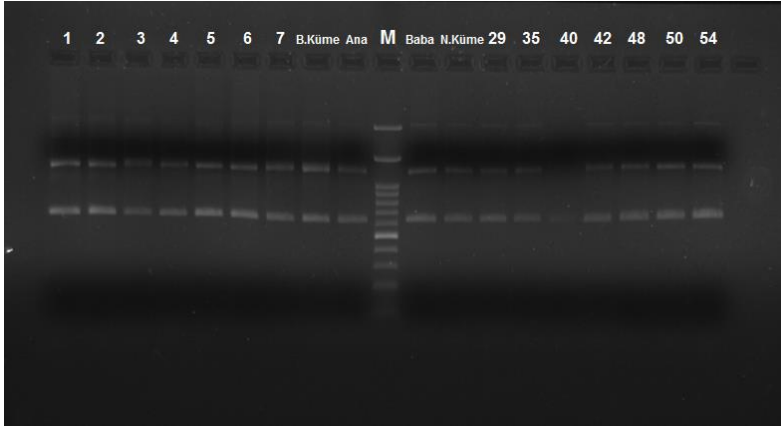
(*P. nana*), Baba (*P. granatum*), normal boylu küme ve normal boylu kümeyi oluşturan bireyler görülmektedir.



Şekil 4.3. OPC01-18 primerlerinin nar bitkilerindeki jel görüntüsü. Jelin üst bölümündeki son sütun 100 bp M DNA, diğer sütunlar ikili gruplar halinde sırasıyla bodur ve normal boylu nar BSA kümeleri



Şekil 4.4. OPA08 primerinin nar bitkilerindeki jel görüntüsü. 1-7: bodur kümeyi oluşturan bireyler, M: 100 bp DNA standardı, 29-54: normal boylu kümeyi oluşturan bireyler



Şekil 4.5. OPB09 primerinin nar bitkilerindeki jel görüntüsü. Soldan itibaren sütun 1-7: No. 1-7 bodur kümeyi oluşturan bireyler, 8: bodur küme, 9: ana (*P. nana*), 10: M: 100 bp DNA standardı, 11: baba (*P. granatum*), 12: normal boylu küme, 13-19 arası No. 29-54 normal boylu kümeyi oluşturan bireyler

Moleküler biyoloji tekniklerindeki ilerlemeler sayesinde, genetik polimorfizmi saptamak amacıyla oldukça yararlı çok sayıda DNA belirteçleri geliştirilmiştir. Son yıllarda, DNA işaretleyicileri geliştirmek için en sık kullanılan moleküler yöntem, PCR'na dayalı olan RAPD'dir (Bardakci, 2001). Yapılan kaynak taraması sonucunda narda farklı çeşitlerde yapılan melezleme çalışmalarından farklı sonuçlar elde edilmiştir. Jalikop (2003), 'Ganesh', 'Kabul Yellow' doğal tip ve 'Kabul Yellow' rozet yapraklı mutant olmak üzere 3 nar çeşidinde melezleme çalışmaları yapmış, 'Ganesh' çeşidinin F₂ bireylerinde rozet genotipinde bireylere rastladıklarını, 'Kabul Yellow' çeşidinde ise bir adet resesif mutant klon tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Ayrıca aynı araştırmacı 2000 yılında yaptığı çalışmada, 'Ganesh' × 'Nana' çeşitlerinde melezleme çalışmalarından normale göre daha kısa boylu, iklim şartlarına uyum sağlayan Amlidana çeşidi elde etmiştir. Üstüntaş (2015), Denizli'de yaptığı çalışmada Irganlı genotipi ve 'Hicaznar' çeşidi arasında 28'er çiçekte yaptığı karşılıklı melezleme çalışmalarından, Irlıganlı genotip × 'Hicaznar' kombinasyonunda meyve tutumu gözlemezken, 'Hicaznar' × Irlıganlı genotipi kombinasyonunda 9 adet meyve elde etmiştir. Zamani vd. (2010) İran'da (Malase-Tourshe-Saveh) MTS × (Narm-Daneh) ND melezlemesinden 37 adet bitki elde etmişler. Aksoy (2017) yaptığı melezleme çalışmalarında en yüksek meyve tutma oranını %49.7 ile 'Kamilbey 35' × 'Dr. Ercan 35' kombinasyonunda, en düşük meyve tutma oranını ise 'Efenar 35' × 'Dr. Ercan 35' kombinasyonunda olduğunu bildirmiştir. Bu çalışmada bodur (*P. nana*) ile normal boylu (*P.*

granatum) arasında yapılan melezleme ve kendileme çalışmalarından *P. nana* × *P. granatum* melezlemelerinden 71 adet meyve, *P. nana* kendilemeden 8 adet meyve, *P. granatum* kendileme çalışmalarından ise 8 adet meyve elde edilmiştir.

Yapılan kaynak taraması sonucunda narda bitki boyuyla ilgili pek az çalışmaya ulaşılmıştır. Farklı bitki türlerinde boy ile ilgili yapılan çalışmalarda farklı belirteçler tespit edilmiştir. Harel-Beja vd. (2015) narda yaptıkları meyve özellikleriyle ilgili QTL haritalama çalışmasında bitki boyu, meyve ağırlığı, meyve çapı, dane ağırlığı ve SÇKM ile ilişkili buldukları QTL'lerin LG2 kromozomunda birbirlerine yakın olarak yerleşmiş olduklarını belirlemişlerdir. Çeltikte yapılan bir çalışmada bitki boyunun meyve özellikleri üzerinde pleiotropik bir etkiye sahip olduğunu belirtilmiştir. (Zhang vd., 2006; Yan vd., 2011). Muzda yapılan bir çalışmada 57 normal - 59 bodur bireyde 66 RAPD primeri test edilmiş, bunlardan OPJ-04 primerinden 1.5 kb bant uzunluğunda % 28.8 oranında boya bağlı polimorfizm tespit edilmiştir (Damasco vd., 1996; Ramage vd., 2004). Yan vd. (2003) mısırdaki bitki boyuyla ilgili yaptıkları çalışmada ise 266 F₂ bireyde SSR ve RFLP yöntemleriyle, mısırdaki beş farklı gelişim aşamasında bitki boyunu etkileyen 8 adet QTL tespit etmişlerdir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

2014 yılında *P. nana* ve *P. granatum* arasında kendileme ve melezleme çalışmaları yapılmıştır. Çiçeklenme dönemi boyunca *P. nana* × *P. granatum* kombinezyonunda toplam 176 adet melezleme yapılmış, 66 adet meyve elde edilmiştir. *P. nana* kendilemesinden 2 adet ve *P. granatum* kendilemesinden 6 adet meyve elde edilmiştir. Elde edilen meyveler tohum çıkarılması ve ekimi işlemi yapılana kadar buzdolabında +4°C’de muhafaza edilmiştir.

2016 yılında yapılan bitki boyu ölçümlerinde *P. nana* × *P. granatum* melezlemesinde 54 bitkinin boy ortalaması 55 cm, en kısa boylu bitki 26 cm, en uzun boylu bitki 79 cm olarak ölçülmüştür. *P. nana* kendilemesinde 50 bitkinin boy ortalaması 41 cm, en kısa boylu bitki 26 cm, en uzun boylu bitki 57 cm olarak ölçülmüştür. *P. granatum* kendilemesinde 6 bitkinin boy ortalaması 37 cm, en kısa boylu bitki 30 cm, en uzun boylu bitki 42 cm olarak ölçülmüştür. Ana ebeveyn 85 cm, baba ebeveyn ise 339 cm olarak ölçülmüştür.

2020 yılında yapılan ölçümlerde ise; *P. nana* × *P. granatum* melezlemesinde 52 bitkinin boy ortalaması 184 cm, en kısa boylu bitki 129 cm, en uzun boylu bitki 250 cm boyundadır. *P. nana* kendilemesinde 44 bitkinin boy ortalaması 113 cm, en kısa bitki 59 cm, en uzun bitki 154 cm olarak ölçülmüştür. *P. granatum* kendilemesinde 2 bitkinin boy ortalaması 173 cm, en kısa boylu bitki 172 cm, en uzun boylu bitki 174 cm olarak ölçülmüştür. Ana ebeveyn 110 cm, baba ebeveyn ise 396 cm olarak ölçülmüştür.

Çalışmada kullanılan nar bitkilerinin yapraklarından DNA izolasyonu için CTAB (%2) yöntemi kullanılmıştır. İzole edilen ana ebeveynin DNA miktarı 32.0 ng/μl DNA kalitesi 1.41, baba ebeveynin DNA miktarı 34.0 ng/μl DNA kalitesi ise 1.86 olarak ölçülmüştür. Bodur kümeyi oluşturan bireylerin DNA miktarları 20.8 ng/μl ile 46.0 ng/μl arasında, DNA kalitesi ise 1.39 ile 1.67 arasında ölçülmüştür. Boylu kümeyi oluşturan bireylerin DNA miktarları 22.0 ng/μl ile 34.0 ng/μl arasında, DNA kalitesi ise 1.66 ile 1.80 arasında ölçülmüştür. 120 adet 10-mer uzunluğunda RAPD primerinin 16 bireyde test edilmesiyle toplam 491 adet bant elde edilmiştir. Bu bantların 27 adedi polimorfik (%5.5), 464 adedi ise monomorfik (%94.5) olarak belirlenmiştir.

Bu çalışmada *P. nana* $\times$ *P. granatum* bitkilerinde yapılan melezleme çalışmaları sonucu elde edilen bireyler arasından seçilen 14 adet F₁ bitkisinde BSA kullanılarak, RAPD yönteminden yararlanılarak OPM07 primerinden 650 bp büyüklüğünde boyla %57 ilişkili belirteç (OPM07-650) tespit edilmiştir. RAPD ve diğer moleküler belirteç yöntemlerinden yararlanılıp daha fazla belirteç bulunarak nar genomu üzerinde bitki boyu ile ilişkili yerlerin haritalanması çalışmaları yapılabilecektir.

Moleküler belirteçlerin kullanımı, uzun süren bitki ıslah çalışmalarından daha çabuk, etkili ve güvenilir sonuçlar alınabilmesi açısından önem kazanmaktadır. Bu çalışma, ileride yapılacak çalışmalarda RAPD veya diğer moleküler belirteç sistemleri kullanılarak boy ve diğer morfolojik özellikler ile ilişkili daha yüksek sayıda moleküler belirtecin belirlenmesinde ve genom üzerinde haritalandırılmasında yararlı olabilecektir.

KAYNAKLAR

- Akçiçek, E., Kayalar, H., Ötleş, S. 2018. Nar Sağlıkta Yıldız. Gece Kitaplığı, Ankara, 392 s.
- Aksoy, D. 2017. Bazı nar çeşitlerinde çiçeklenme, çiçek tozu ve meyve tutum özelliklerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi (basılmamış). Aydın Adnan Menderes Üniv. Fen Bil. Ens. Bahçe Bitkileri ABD, Aydın, 58s.
- Anonim, 2019. TÜİK, Türkiye İstatistik Kurumu, [<http://www.tuik.gov.tr>], Erişim tarihi: 10.10.2019.
- Altun, Z. G. 2006. DNA işaretleyiciler (markör) ve Türkiye’de orman ağaçları ıslahında kullanımı. **Ege Ormancılık Araştırma Müdürlüğü Yayınları**, 2:20-36.
- Arı Ş. 2004. DNA’nın polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılması. Editörler: Temizkan, G., Arda, N. Moleküler biyolojide kullanılan yöntemler. Biyogem yayınları, Nobel Tıp Kitabevleri, 1(5):101-120. İstanbul.
- Babu, K. D., Chandra, R., Sharma, J., Jadhav, V.T. 2011. Flower biology of pomegranate cultivar ‘Ganesh’ under Solapur conditions of Maharashtra - a preliminary study. **Acta Horticulturae**, 890:221-226.
- Bardakci, F. 2001. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. **Turkish Journal of Biology**, 25(2): 185-196.
- Basaki, T., Choukan, R., Nekouei, S. M. K., Mardi, M., Majidi, E., Faraji, S., Zeinolabedini, M. 2011. Association analysis for morphological traits in pomegranate (*Punica granatum* L.) using microsatellite markers. **Middle-East Journal Scientific Research**, 9(3):410-417.
- Belaj, A., Trujillo, I., Rosa, R. D. L., Rallo, L. 2001. Polymorphism and discrimination capacity of randomly amplified polymorphic markers in an olive germplasm bank. **Journal of American Society of Horticultural Science**, 126:64-71.

- Berger, B.A., Kriebel, R., Spalink, D., Sytsma, K.J. 2016. Divergence times, historical biogeography, and shifts in speciation rates of Myrtales. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 95:116-136.
- Besnard, G., Baradat, P., Berville, A. 2001. Genetic relationships in the olive (*Olea europaea* L.) reflect multilocal selection of cultivars. **Theoretical and Applied Genetics**, 102:251-258.
- Bişkin, Z., Yıldırım, A., İnci, A., Düzlü, Ö. 2011. Parazitolojide Teşhis Amaçlı Kullanılan Moleküler Biyolojik Teknikler. **J. Fac. Vet. Med. Univ. Erciyes**, 8(1):43-51.
- Bonyanpour, A., Khosh-Khui, M. 2013. Callus induction and plant regeneration in *Punica granatum* L. 'Nana' from leaf explants. **Journal of Central European Agriculture**, 14(3):928-936.
- Byng, J.W., Chase, M.W., Christenhusz, M.J.M., Fay, M.F., Judd, W.S., Mabberley, D.J., Sennikov, A.N. 2016. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. **Botanical Journal of the Linnaeus Society**, 181: 1-20.
- Claros, M. G., Crespillo, R., Aguilar, M. L., Canovas, F. M. 2001. DNA fingerprinting and classification of geographical related genotypes of olive tree (*Olea europaea* L.). **Euphytica**, 116:131-142.
- Costa, C. M., Roberts, R. P. 2014. Techniques for improving the quality and quantity of DNA extracted from herbarium specimens. **Phytoneuron**, 48:18.
- Curro, S., Caruso, M., Distefano, G., Gentile, A., La Malfa, S. 2010. New microsatellite loci for pomegranate, *Punica granatum* (Lythraceae). **American Journal of Botany**, 97:58-60.
- Çarhan, A., Ercan, E., Yalçinkaya, T. 2016. Dijital PZR ve kullanım alanları. **Türk Hij. Den. Biyol. Dergisi**, 73(2):183-198.
- Damasco, O. P., Graham, G. C., Henry, R. J., Adkins, S. W., Smith, M. K., Godwin, I. D. 1996. Random amplified polymorphic DNA (RAPD)

- detection of dwarf off-types in micropropagated Cavendish (*Musa* spp. AAA) bananas. **Plant Cell Reports**, 16:118-123.
- Derin, K., Eti. S. 2001. Determination of pollen quality, quantity and effect of cross pollination on the fruit set and quality in the pomegranate. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, 25(2001):169-173.
- Dokuzoğuz, M., Mendilcioğlu, K. 1978. Ege bölgesi nar çeşitleri üzerinde pomolojik çalışmalar. **Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi**, 15(2):133-157.
- Doyle, J. J., Doyle, J. L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, 19(1):11-15.
- Doyle, J. J., Doyle, J. L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, 12(1):13-15.
- Durgac, C., Ozgen M., Simsek, O., Aka Kacar, Y., Kiyga, Y., Celebi, S., Gunduz, K., Serce, S. 2008. Molecular and pomological diversity among pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars in Eastern Mediterranean region of Turkey. **African Journal of Biotechnology**, 7:1294-1301.
- Ebrahimi, S., Sayed-Tabatabaei, B.E., Sharifnabi, B. 2010. Microsatellite isolation and characterization in pomegranate (*Punica granatum* L.). **Iranian Journal of Biotechnology**, 8(3):156-163.
- Ercisli, S., Agar, G., Orhan, E., Yildirim, N., Hizarci, Y. 2007. Interspecific variability of RAPD and fatty acid composition of some pomegranate cultivar (*Punica granatum* L.) growing Southern Anatolia Region in Turkey. **Biochemical Systematics and Ecology**, 35:764-769.
- Ercisli, S., Kafkas, E., Orhan, E., Kafkas, S., Dogan, Y. and Esitken, A. 2011. Genetic characterization of pomegranate (*Punica granatum* L.) genotypes by AFLP markers. **Biological Research**, 44:345-350.
- Filiz, E., Koç, İ. 2011. Bitki biyoteknolojisinde moleküler markörler. **Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi**, 28(2):207-214.

- Gariyban, L., Avashia, N. 2013. Polymerase Chain Reaction. **Journal of Investigative Dermatology**, 133(3):1-4.
- Graham, S.A., Graham, A. 2014. Ovary, fruit, and seed morphology of the Lythraceae. **International Journal of Plant Sciences**, 175(2):202-240.
- Gozlekci, S., Kaynak, L. 2000. Investigations on pollen production and quality in some standard pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars. **Options Mediterraneenes**, 42:71-77.
- Gözlekçi, S. 1997. Hicaznar (*Punica granatum* cv. Hicaznar) çeşidinin dölleme meyve gelişimi ve olgunlaşması üzerine araştırmalar. Doktora Tezi (basılmamış). Akdeniz Üniv. Fen Bil. Ens. Bahçe Bitkileri ABD, Antalya, 154 S.
- Gözlekçi, S. 2014. Dünyada ve Türkiye’de nar yetiştiriciliği. Nar Çalıştayı, T. C. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, 24-25 Kasım, Antalya, s: 11-21.
- Griffin, H. G., Griffin, A. M. 1993. DNA sequencing: recent innovations and future trends. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 38:147-159.
- Gülşen, O., Mutlu, N. 2005. Bitki biliminde kullanılan genetik markırlar ve kullanım alanları. **Alatarım**, 4(2):27-37.
- Hamrick, J.L., Godt, M.J.W., Sherman-Broyles, S.L. 1992. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. **New Forests**, 6:95-124.
- Harel-Beja, R., Sherman, A., Rubinstein, M., Eshed, R., Bar-Ya'akov, I., Trainin, T., Ophir, R., Holland, D. 2015. A novel genetic map of pomegranate based on transcript markers enriched with QTLs for fruit quality traits. **Tree Genetics and Genomes**, 11:109.
- Holland, D., Hatib, K., Bar-Ya'akov, I. 2009. Pomegranate: Botany, Horticulture, Breeding. **Horticultural Reviews**, 35:127-191.
- Holland, D., Hatib, K., Bar-Ya'akov, I., Yonay, E., Abd El Hadi, F. 2007. ‘Shani-Yonay’ pomegranate. **Horticultural Science**, 42(3):710-711.

- Jalikop, S.H. 2000. Amlidana: a new pomegranate hybrid. **Indian Horticulture**, 47:22-23.
- Jalikop, S.H. 2003. Rosetted siblings in F₂ of a cross in pomegranate (*Punica granatum* L.) can be useful model for rosetting investigations. **Euphytica**, 131:333-342.
- Jalikop, S.H. 2007. Linked dominant alleles of inter-locus interaction results in a major shift in pomegranate fruit acidity of ‘Ganesh’ × ‘Kabul Yellow’. **Euphytica**, 158:201-207.
- Jalikop, S.H. 2010. Pomegranate Breeding. **Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology**, 4(Special Issue 2):26-34.
- Jalikop, S.H., Venugopalan, R., Kumar, R. 2010. Association of fruit traits and aril browning in pomegranate (*Punica granatum* L.). **Euphytica**, 174:137-141.
- Jbir, R., Hasnaoui, N., Mars, M., Marrakchi, M., Trifi, M. 2008. Characterization of Tunisian pomegranate (*Punica granatum*) cultivars using amplified fragment length polymorphism analysis. **Scientia Horticulturae**, 115:231-237.
- Jbir, R., Zehdi, S., Hasnaoui, N., Ben Dhiaf, A., Mars, M., Salhi Hannachi, A. 2012. Microsatellite polymorphism in Tunisian pomegranates (*Punica granatum* L.): cultivar genotyping and identification. **Biochemical Systematics and Ecology**, 44:27-35.
- Kahramanoglu, I., Usanmaz, S., Alas, T. 2020. Advances in breeding and cultivation of pomegranate. In: Achieving Sustainable Cultivation of Tropical Fruits (Yahia E.M., Ed.), **Burleigh Dodds Science Publishing Limited**, pp. 569-496, Cambridge, UK.
- Kahya, S., Büyükcangaz, E., Carlı, K. T. 2013. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Optimizasyonu. **Uludağ Univ. J. Fac. Vet. Med.** 32(1):31-38.
- Kaya, Z., Neale, D.B. 1995. Utility of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for linkage mapping in Turkish red pine (*Pinus brutia* Ten.). **Silvae Genetica**, 44(2-3):110-116.

- Kıralan, M., Gölükcü, M., Tokgöz, H. 2009. Oil and conjugated linolenic acid contents of seeds from important pomegranate cultivars (*Punica granatum* L.) grown in Turkey. **Journal American Oil Chemists' Society**, 86:985-990.
- Kurt, H., Şahin, G. 2013. Bir ziraat coğrafyası çalışması: Türkiye'de nar (*Punica granatum* L.) tarımı. **Marmara Coğrafya Dergisi**, 27:551-574.
- Küçük, E. 2003. Bazı nar (*Punica granatum* L.) çeşitlerinin kendine verimlilik durumlarının saptanması. Yüksek Lisans Tezi (basılmamış). Ege Üniv. Fen Bil. Ens. Bahçe Bitkileri ABD, İzmir, 38s.
- Melchinger, A. E. 1990. Use of molecular markers in breeding for oligogenic disease resistance. **Plant Breeding**, 104:1-19.
- Michelmore, R. W., Paran, I., Kesseli, R. V. 1991. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, 88:9828-9832.
- Mohammadi, S.A., Prasanna, B.M. 2003. Analysis of genetic diversity in crop plants-salient statistical tools and considerations. **Crop Science**, 43(4): 1235-1248.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: polymerase chain reaction. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, 51:263-273.
- Narzary, D., Rana, T. S., Ranade, S. A. 2010. Molecular analyses of genetic diversity in Indian pomegranates using RAPD, DAMD and ISSR. **Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology**, 4(Special issue 2), 126-143.
- Oğuz, H. İ., Ukav, İ., Eroğlu, D. 2011. Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde nar (*Punica granatum* L.) üretimi ve pazarlanması. GAP VI. Tarım Kongresi, 09-12 Mayıs, Şanlıurfa, s:108-112.

- Onur, C. 1982. Akdeniz bölgesi narlarının seleksiyonu. Doktora Tezi (basılmamış). Çukurova Üniv. FBE. Bah. Bit. ABD, Adana.
- Onur, C. 1988. Nar. **Derim**, 5(Özel Sayı:4): 147-191.
- Ozden-Tokatli, Y., Akdemir, H., Tilkat, E., Onay, A. 2010. Current status and conservation of *Pistacia* germplasm. **Biotechnology Advances**, 28:130-141.
- Ozguven, A. I., Yilmaz, C. 2000. Pomegranate growing in Turkey. **Options Mediterraneennes**, 42:41-48.
- Öz Aydın, S. 2004. RAPD (Rastgele arttırılmış polimorfik DNA) belirleyicileri ve bitki sistematigi. **Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi**, 6:113-130.
- Özbek, S. 1977. Genel Meyvecilik. Çukurova Üniv. Zir. Fak. Yay., No: 2, Adana. 386 S.
- Pirseyedi, S. M., Valizadehghan, S., Mardi, M., Ghaffari, M. R., Mahmoodi, P., Zahraavi, M., Zeinalabedini, M., Nekoui, S. M. K. 2010. Isolation and characterization of novel microsatellite markers in pomegranate (*Punica granatum* L.). **International Journal of Molecular Science**, 11:2010-2016.
- Ramage, C. M., Borda, S. D., Hamil, S. D., Smith, M. K. 2004. A simplified PCR test for early detection of dwarf off-types in micropropagated Cavendish bananas (*Musa* spp. AAA). **Scientia Horticulturae**, 103:145-151.
- Rana, T.S., Narzary, D., Ranade, S. A. 2010. Systematics and taxonomic disposition of the genus *Punica* L. **Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology**, 4(Special Issue 2):19-25.
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., Arnheim, N. 1985. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, 230:1350-1354.

- Sarkhosh, A., Zamani, Z., Fatahi, R., Ebadi, A. 2006. RAPD markers reveal polymorphism among some Iranian pomegranate (*Punica granatum* L.) genotypes. **Scientia Horticulturae**, 111:24-29.
- Sarkhosh, A., Zamani, Z., Fatahi, R., Hassani, M.E., Wiedow, C., Buck, E., Gardiner, S.E. 2011. Genetic diversity of Iranian soft-seed pomegranate genotypes as revealed by fluorescent-AFLP markers. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, 17(3):305-311.
- Sarkhosh, A., Zamani, Z., Fatahi, R., Ranjbar, H. 2009. Evaluation of genetic diversity among Iranian soft-seed pomegranate accessions by fruit characteristics and RAPD markers. **Scientia Horticulturae**, 121:313-319.
- Sarkhosh, A., Zamani, Z., Fatahi, R., Wiedow, C., Chagné, D., Gardiner, S.E. 2012. A pomegranate (*Punica granatum* L.) linkage map based on AFLP markers. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, 87(1):1-6.
- Sevindik, E. 2014. Türkiye’de yetişen *Inula* L. (Asteraceae) türlerinin moleküler sistematik analizi ve ekolojisi. Doktora Tezi. Balıkesir Üniv. FBE. Biyoloji ABD, Balıkesir.
- Shabbir, M.A., Khan, M.R., Saeed, M., Pasha, I., Khalil, A.A., Siraj, N. 2017. Punicic acid: A striking health substance to combat metabolic syndromes in humans. **Lipids in Health and Disease**, 16:99.
- Shao, J., Chen, C., Deng, X. 2003. *In vitro* induction of tetraploid in pomegranate (*Punica granatum*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 75:241-246.
- Shulman, Y., Fainberstein, L., Lavee, S. 1984. Pomegranate fruit development and maturation. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, 59(2):265-274.
- Simsek O., Donmez, D., Aka-Kacar, Y. 2017. RNA-Seq analysis in fruit science: A review. **American Journal of Plant Biology**, 2:1-7.
- Soost, R. K., Roose, M. L. 1996. Citrus. **In Fruit Breeding, Vol. I: Tree and Tropical Fruits**, edited by Jules Janick and James N. Moore. John Wiley and Sons. 257-323.

- Soriano, J. M., Zuriaga, E., Rubio, P., Ll  cer, G., Infante, R., Badenes, M.L. 2011. Development and characterization of microsatellite markers in pomegranate (*Punica granatum* L.). **Molecular Breeding**, 27(1):119-128.
- Talebi Bedaf, M., Bahar, M., Sharifnabi, B., Yamchi, A. 2011. Evaluation of genetic diversity among Iranian pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars, using ISSR and RAPD markers. **Taxonomy and Biosystematics**, 3(8):35-44.
- Tibet, H. 1993. Narın (*Punica granatum* L.)        biyolojisi üzerinde bir araştırma. Yüksek Lisans Tezi (basılmamış). Akdeniz Üniv. Fen Bil. Ens. Bahçe Bitkileri ABD, Antalya, 51 S.
- Tibet, H., Baktır,   . 1991. Narlarda       lenme. **Derim**, 8(4): 166-173.
-   st  nta  , T. 2015. Narda di  cik tepesi sıvısının        tozu çimlenmesine etkisi ve melezleme   alı  maları. Yüksek Lisans Tezi (basılmamış). Aydın Adnan Menderes Üniv. Fen Bil. Ens. Bah. Bit. ABD, Aydın, 35 s.
- Vardar-Kanl  tepe,   ., Aras, S., Cansaran-Duman, D. 2010. Bitki ıslahında moleküler belirteçlerin kullanımı ve gen aktarımı. **Türk Hijyen ve DeneySEL Biyoloji Dergisi**, 67(1):33-43.
- Verardo, V., Garcia-Salas, P., Baldi, E., Segura-Carretero, A., Fernandez-Gutierrez, A., Caboni, A.F. 2014. Pomegranate seeds as a source of nutraceutical oil naturally rich in bioactive lipids. **Food Research International**, 65:445-452.
- Welsh, J., McClalland, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, 18(24): 7213-7218.
- Wetzstein, H. Y., Ravid, N., Wilkins, E., Martinelli, A. P. 2011. A Morphological and histological characterization of bisexual and male flower types in pomegranate. **Journal of American Society for Horticultural Science**, 136(2):83-92.

- Williams, J. G. K., Kubelik, A. E., Livak, K. J., Rafalski, J. A., Tingey, S. C. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, 18:6531-6535.
- Xu, J., Guo, C.J., Yang, J. J., Wei, J. Y., Li, Y. F., Pang, W., Jiang, Y. G., Cheng, S. 2005. Intervention of antioxidant system function of aged rats by giving fruit juices with different antioxidant capacities. **Chinese Journal of Preventive Medicine**, 39:80-3.
- Yan, J., Tang, H., Huang, Y., Shi, Y., Li, J., Zheng, Y. 2003. Dynamic analysis of QTL for plant height at different developmental stages in maize (*Zea mays* L.). **Chinese Science Bulletin**, 48(23):2601-2607.
- Yan, W-H., Wang, P., Chen, H-X., Zhou, H-J., Li, Q-P., Wang, C-R., Ding, Z-H., Zhang, Y-S., Yu, S-B., Xing, Y-Z., Zhang, Q-F. 2011. A major QTL, Ghd8, plays pleiotropic roles in regulating grain productivity, plant height, and heading date in rice. **Molecular Plant**, 4:319-330.
- Yazıcı, K., Şahin, A. 2016. Characterization of pomegranate (*Punica granatum* L.) hybrids and their potential use in further breeding. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, 40:813-824.
- Yılmaz, B., Usta, C. 2010. Narın (*Punica granatum*) terapötik etkileri. **Türk Aile Hekimleri Dergisi**, 14(3):146-153.
- Yılmaz, C. 2007. Nar. Hasad Yayıncılık Ltd. Şti., İstanbul, 176 S.
- Yorgancılar, M., Yakışır, E., Tanur Erkoyuncu, M. 2015. Moleküler Markörlerin Bitki Islahında Kullanımı. Bahri Dağdaş Bitkisel Araştırma Dergisi, 4(2):1-12.
- Yuan, Z., Fang, Y., Zhang, T., Fei, Z., Han, F., Liu, C., Liu, M., Xiao, W., Zhang, W., Wu, S., Zhang, M., Ju, Y., Xu, H., Dai, H., Liu, Y., Chen, Y., Wang, L., Zhou, J., Guan, D., Yan, M., Xia, Y., Huang, X., Liu, D., Wei, H., Zheng, H. 2018. The pomegranate (*Punica granatum* L.) genome provides insights into fruit quality and ovule developmental biology. **Plant Biotechnology Journal**, 16(7):1363-1374.

- Yuan, Z., Yin, Y., Qu, J, Zhu, L., Li, Y. 2007. Population genetic diversity in Chinese pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars revealed by fluorescent-AFLP markers. **Journal of Genetics and Genomics**, 34(12):1061-1071.
- Zamani, Z., Sarkhosh, A., Fatahi, R., Ebadi, A. 2007. Genetic relationships among pomegranate genotypes studied by fruit characteristics and RAPD markers. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, 82(1):11-18.
- Zamani, Z., Zarei, A., Fatahi, R. 2010. Characterization of progenies derived from pollination of pomegranate cv. Malase-Tourshe-Saveh using fruit traits and RAPD molecular marker. **Scientia Horticulturae**, 124:67-73.
- Zhang, S., Wang, L., Cao, S., Liu, T. 2008. Analysis of genetic diversity of 23 pomegranate genotypes by SRAP. **Journal of Fruit Science**, 25(5):655-660.
- Zhang, Y., Luo, L., Xu, C., Zhang, Q., Xing, Y. 2006. Quantitative trait loci for panicle size, heading date and plant height co-segregating in trait performance derived near-isogenic lines of rice (*Oryza sativa*). **Theoretical and Applied Genetics**, 113:361-368.
- Zhang, Y.P., Tan, H.H., Cao, S.Y., Wang, X.C., Yang, G., Fang, J.G. 2012. A novel strategy for identification of 47 pomegranate (*Punica granatum*) cultivars using RAPD markers. **Genetics and Molecular Research**, 11(3):3032-3041.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Meryem ŞİMŞEK UÇKUN

Doğum Yeri Ve Tarihi :

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : Adnan Menderes Üniversitesi - Bahçe Bitkileri
Bölümü

Yüksek Lisans Öğrenimi : Aydın Adnan Menderes Üniversitesi - Fen
Bilimleri Enstitüsü

Yabancı Diller : İngilizce

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

A) Bildiriler

-
-
-

İLETİŞİM

E-Posta Adresi :

Tarih : 21.01.2021