

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ÜZÜMLERDE ÇEKİRDEKSİZLİĞİN ERKEN SELEKSİYONU AMACIYLA
DNA MARKÖRLERİNİN KULLANIMI**

ŞERİFE DEREN AMCA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

2011

**ÜZÜMLERDE ÇEKİRDEKSİZLİĞİN ERKEN SELEKSİYONU AMACIYLA
DNA MARKÖRLERİNİN KULLANIMI**

ŞERİFE DEREN AMCA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BAHÇE BİTKİLERİ ANA BİLİM DALI

**Bu tez, 2010.02.0121.040 proje numarasıyla, AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ YÖNETİM BİRİMİ tarafından
desteklenmiştir.**

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ÜZÜMLERDE ÇEKİRDEKSİZLİĞİN ERKEN SELEKSİYONU AMACIYLA
DNA MARKÖRLERİNİN KULLANIMI

Şerife Deren AMCA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

Bu tez .../.../2011 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından (....) not takdir edilerek Oybirliği / Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. H. İbrahim UZUN (Danışman).....

Prof. Dr. A. Naci ONUS

Doç. Dr. Mehmet KARACA

ÖZET

ÜZÜMLERDE ÇEKİRDEKSİZLİĞİN ERKEN SELEKSİYONU AMACIYLA DNA MARKÖRLERİNİN KULLANIMI

Şerife Deren AMCA

Yüksek Lisans Tezi, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. H. İbrahim UZUN

Ağustos 2011, 52 Sayfa

Asma ıslah programlarında çekirdeksizliğin belirlenmesi amacıyla SCC8 ve SCF27 DNA markörlerinin kullanımı incelenmiştir. Bitki materyali olarak kullanılan genotipler çekirdekli ana ve çekirdeksiz baba olarak kullanılan üzüm çeşitlerinin melezlenmesiyle elde edilmiştir.

Bireyler, Çınarlı Karası ve Tekirdağ Çekirdeksizi, Italia ve Perlette, Italia ve Barış, İri Kara ve Tekirdağ Çekirdeksizi üzüm çeşitleri arasında Tekirdağ Bağcılık Araştırma Enstitüsü'nde önceden yapılan melezlemelerle elde edilmiştir.

DNA örnekleri 50 üzüm genotipinin yapraklarından izole edilmiş ve Sequenced Characterized Amplified Regions (SCAR) analizi için Polymerase Chain Reaction'da (PCR) çoğaltılmıştır. SCC8'in, üzümlerde çekirdeksizlik ile ilgili marköre dayalı seleksiyon programları için ümit verici bir DNA markörü olduğu kararına varılmıştır. SCF27 belirgin bantlar vermesine rağmen homozigot ve heterozigot genotiplerin ayırt edilmesi için kullanışlı değildir.

SCF27 markörü tüm genotipler için kesin bantlar göstermiştir. Oysa SCC8 marköründe 50 genotipin 43 tanesi bant vermiştir.

Sonuç olarak, asma ıslah programlarında çekirdeksizliğin belirlenmesinde SCC8 ve SCF27 gibi DNA markörleri kullanılabilir. Fakat üzümlerde çekirdeksizliğin güvenilir olarak belirlenmesi için DNA markör sonuçlarının, fenotipik tanımlamalar ve duyuşal analizler ile kombine edilmesi gerekir.

ANAHTAR KELİMELELER: *Vitis vinifera* L., çekirdeksizlik, SCAR, SCC8, SCF27

JÜRİ: Prof. Dr. H. İbrahim UZUN (Danışman)

Prof. Dr. A. Naci ONUS

Doç. Dr. Mehmet KARACA

ABSTRACT

USING DNA MARKERS FOR PRE-SELECTION OF SEEDLESSNESS IN GRAPES

Şerife Deren AMCA

M.Sc. Thesis, in Department of Horticulture

Adviser: Prof.Dr. H. İbrahim UZUN

August 2011, 52 Pages

SCC8 and SCF27 DNA markers were investigated for using the determination of seedlessness in grapevine breeding programme. Genotypes which were obtained by crossing between seeded female and seedless male grape cultivars were used as plant material.

Progenies had been obtained by crossing between Çınarlı Karası and Tekirdağ Çekirdeksizi, Italia and Perlette, Italia and Barış, İri Kara and Tekirdağ Çekirdeksizi grape cultivars in Tekirdağ Viticultural Research Institute.

DNA of grape genotypes were isolated from leaf samples of 50 genotypes and amplified in Polymerase Chain Reaction (PCR) for Sequenced Characterized Amplified Regions (SCAR) analysis. It is founded that SCC8 is a promising DNA marker for Marker Assisted Selection (MAS) programmes in seedlesness of grapes. SCF27 resulted with clear bands but was not useful for differentiating homozygous and heterozygous genotypes.

All genotypes showed distinct bands for SCF27 marker whereas 43 genotypes out of 50 had clear bands for SCC8 marker.

As a conclusion, DNA markers like SCC8 and SCF27 can be used for early determination of seedlessness in grapevine breeding programmes. But combining the results of DNA markers with sensory analysis and phenotype descriptions is necessary for reliable determination of seedlessness in grapes.

KEY WORDS: *Vitis vinifera* L., seedlessness, SCAR, SCC8, SCF27

COMMITTEE: Prof. Dr. H. İbrahim UZUN (Adviser)

Prof. Dr. A. Naci ONUS

Assoc.Prof. Dr. Mehmet KARACA

ÖNSÖZ

Ülkemiz, asmanın ve bağcılık kültürünün anavatanı olarak kabul edilip oldukça uygun iklim koşullarına sahiptir. Dünya üzerinde bağcılık geniş çapta yapılmasına ve büyük ekonomik öneme sahip olmasına karşın genetik anlamda bilgiler oldukça sınırlıdır.

Asmanın birçok tüketim şekli bulunmaktadır. Tüm dünyada sofralık olarak tüketilen üzümlerde en çok aranan özellik çekirdeksiz olmasıdır. Tüketicilerden gelen böyle bir talep doğrultusunda komisyoncuların da bu özelliği taşıyan çeşitleri tercih edip daha yüksek fiyatlardan satın almasından dolayı üreticiler de bu kritere sahip çeşitleri tercih etmesine neden olmaktadır. Bu nedenlerden dolayı yeni çeşitler bulabilmek için araştırmacılar üzüm ıslahı konusunda daha fazla çalışmalar yapmaktadırlar.

Çekirdeksizlik özelliğine sahip bireyler elde edebilmek için yapılan melezlemeler daha önceleri çekirdekli anneler ile çekirdeksiz babaların melezlenmesiyle olmaktaydı. Çünkü çekirdeksiz annelerin kullanılması halinde embriyo elde edilemediğinden dolayı çimlenme sorunları çıkmaktaydı. Ne var ki in vitro, embriyo kurtarma ve doku kültürü tekniklerinin gelişmesiyle moleküler yöntemler de gelişmiş olup giderek bu konu üzerinde daha fazla kullanılmaya başlanmıştır. Böylece yapılan analizler sonunda çekirdeksizliğin kaç genle idare edildiği üzerinde birçok hipotez yer almaya başlamıştır.

Çekirdeksizlik tespiti için birçok analiz yöntemleri bulunmaktadır. Ancak moleküler markör yöntemleri dışındakilerin erken seleksiyon yapamamaları ve sonuçlarının objektif olmaması gibi bir takım dezavantajları bulunmaktadır. Bu özelliğin tespiti için ilk önce RAPD yöntemi kullanılmış ve major lokus “sdl” ve buna bağlı iki adet markör bulunmuştur. SCAR analizleri ile bulunan bu markörler geliştirilmiştir.

Bu çalışmada, geliştirilmiş olan bu markörlerin elli adet genotip üzerinde denenerek karşılaştırmaları yapılmıştır.

Yüksek lisans tez konumun belirlenmesinde ve bu çalışmamın her aşamasında yakın ilgisi, yönlendirici katkısı ve diğer yardımları için danışman hocam Sayın Prof. Dr. H. İbrahim UZUN'a en derin saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Moleküler markör ve DNA analiz yöntemleri hakkında beni bilgilendiren Sayın Doç.Dr. Mehmet KARACA ve Dr. Ayşe Gül İNCE hocalarıma teşekkür ederim.

Yüksek lisans tezimin yürütülmesi aşamasında Ankara Üniversitesi Bahçe Bitkileri Bölümü Biyoteknoloji laboratuvarının kimyasal ve alet imkanlarından faydalanmama izin veren Sayın Prof.Dr. Gökhan SÖYLEMEZOĞLU ve Yrd.Doç.Dr. Murat AKKURT hocalarıma teşekkürlerimi borç bilirim. Ayrıca yine araştırmamın laboratuvar aşamasında yardımlarını esirgemeyen Ziraat Yüksek Müh. Mina SHIDFAR'a teşekkürlerimi sunarım.

Örnekler Tekirdağ Bağcılık Enstitüsü'nden temin edildi. Bu konuda popülasyonundan faydalanmama izin verdiği için Sayın Dr. Cengiz ÖZER'e teşekkür ederim.

Ayrıca tezimin her aşamasında gösterdiği fedakarlık ve anlayışından dolayı eşime ve kızıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
ÖNSÖZ	v
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL BİLGİLER VE KAYNAK TARAMALARI	3
2.1. Asmanın Orijini ve Üretim Miktarı	3
2.2. Asmanın Ülkemizdeki Tüketim Şekli ve Çekirdeksizliğin Önemi	3
2.3. Asmalarda Çiçek Yapısı, Tohum Taslağı ve Tane Tutum Şekilleri	4
2.4. Asmada Çekirdeksizlik Analizleri	8
2.4.1. Duyusal analizler	9
2.4.2. Tartım analizleri	9
2.4.3. Moleküler markör yöntemleri	10
3. MATERYAL VE METOT	16
3.1. Materyal	16
3.2. Metot	19
3.2.1. DNA analizleri	19
3.2.1.1. Örneklerin toplanması ve saklanması	19
3.2.1.2. Genomik DNA ekstraksiyonu	20
3.2.1.3. Genomik DNA'nın kalite ve kantitesinin belirlenmesi	23
3.2.2. Genomik DNA'nın optimizasyonu	23
3.2.3. Markörlerin PCR karışımları	24
3.2.4. Markörlerin PCR amplifikasyon koşulları	25
3.2.5. Restriksiyon enzim çalışmaları ve agaroz jele yükleme	26
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	27
4.1. DNA Analizleri	27
4.2. PCR Analizleri	32

4.2.1 SCC8 markörü	32
4.2.2 SCF27 markörü	40
5. SONUÇ	48
6. KAYNAKLAR	50
ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

mg	mili gram
cM	santi Morgan
°C	santigrad derece
ml	mili litre
mM	mili Molar
µl	mikro litre
dk	dakika
rpm	devir / dakika
M	molar
pmol/µl	piko mol / mikro litre
u/µl	ünite / mikro litre
ng/µl	nano gram/mikro litre

Kısaltmalar

DNA	Deoksiribonükleik asit
PCR	“Polymerase Chain Reaction”
RFLP	“Restriction Fragment Length Polymorphism”
AFLP	“Amplified Fragment Length Polymorphism”
RAPD	“Random Amplified Polymorphic DNA”
SCAR	“Sequence Characterized Amplified Region”
CAPS	“Cleaved Amplified Polymorphic Sequence”
SSR	“Simple Sequence Repeats”
SNP	“Single Nucleotide Polymorphism”
MAS	“Marker Assisted Selection”
V	Volt
UV	Ultra Viole
RE	“Restriction Enzyme”
EDTA	“Etilendiamin tetraasetikasit”
CTAB	“Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide”
LiCl	“Lithium Chloride”
PVP	“Polyvinylpyrrolidone”
RNaz	Ribonükleaz
ME	“Beta Mercapto ethanol”
BB	“Bromophenol Blue”
TEB	“Tris EDTA-Borate”
dNTP mix	Eşit miktardaki dGTP, dTTP, dATP ve dCTP karışımı
MgCl ₂	“Magnesium Chloride”

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Olgun bir üzüm tanesinin boyuna kesiti (Elidemir 2006).....	5
Şekil 2.2. Partenokarpik üzüm çeşitlerinden olan Black Corinth salkımı.....	6
Şekil 2.3. Stenospermokarpik üzüm çeşitlerinden olan Sultani Çekirdeksiz salkımı.....	7
Şekil 2.4. Boş çekirdekli örnek olarak verilen Çavuş Çeşidi salkımı.....	7
Şekil 2.5. Normal çekirdekli çeşitlerden olan Cardinal Çeşidi salkımı.....	8
Şekil 2.6. PCR'ın şematik gösterimi (Yıldırım ve Kandemir 2001).....	11
Şekil 2.7. RAPD Tekniğinin şematik gösterimi (Yıldırım Kandemir 2001).....	12
Şekil 3.1. Genç yaprakların ve sürgün uçlarının sıvı azot ile ezilmesi.....	20
Şekil 3.2. Toz haline gelen örneklerin tüplere aktarılması.....	20
Şekil 4.1. Araştırmada kullanılan kimi örneklerin DNA görüntüleri.....	32
Şekil 4.2. Araştırmada kullanılan bazı genotiplerin SCC8 primer çifti ile oluşturulan PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü.....	33
Şekil 4.3. Araştırmada kullanılan bazı genotiplerin SCF27 primer çiftleri ile oluşturulan PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü.....	41

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Araştırmada kullanılan genotipler ve örnek numaraları	17
Çizelge 3.2. DNA Ekstraksiyon çözeltisi.....	21
Çizelge 3.3. SCC8 Primer çiftinin PCR karışım miktarı.....	24
Çizelge 3.4. SCF27 Primer çiftinin PCR karışım miktarı.....	25
Çizelge 3.5. SCC8 ve SCF27 markörleri için amplifikasyon koşulları.....	26
Çizelge 4.1. Tüm örneklerin nanodrop sonucuna göre ölçülen DNA saflık ve miktarları.....	28
Çizelge 4.2. Popülasyonun SCC8 markörüne ve <i>Bgl</i> II kesim enzimine göre sonuçlar ve açıklamaları.....	35
Çizelge 4.3. Popülasyonun SCC8 markörüne göre toplam fert sayıları ve yüzde sonuçları.....	39
Çizelge 4.4. Popülasyonun SCF27 markörüne fert sayıları ve açıklamaları.....	42
Çizelge 4.5. Popülasyonun SCF27 markörüne göre toplam fert ve yüzde sonuçları.....	45

1. GİRİŞ

Tarımda üreticilerin başlıca amacı, yetiştirdikleri ürünlerden daha çok, kaliteli ve tüketim şekline göre pazarın istediği kriterlere uygun ürün almaktır. Bu durum üzüm için de geçerlidir. Sofralık, özellikle de kurutmalık üzümün kalite faktörleri arasında çekirdeksizlik çok büyük önem taşımaktadır ve çekirdeksiz üzüm yetiştiriciliği günden güne artmaktadır. Pazarda bu özelliğe sahip çeşitler tercih edilmekte ve daha yüksek fiyatlarda alıcı bulmaktadır.

Araştırmacılar, çekirdeksiz üzüm çeşitlerinin sofralık olarak daha fazla ilgi görmesinin sonucu olarak ıslah çalışmalarını çekirdeksiz çeşit elde etme amacına yönlendirmişlerdir ve bu amaçla melezleme çalışmaları yapmışlardır. Geleneksel melezleme yöntemleriyle çekirdeksiz bireyler elde etmek için, çekirdekli çeşitler ana, çekirdeksiz çeşitler ise baba olarak kullanılmıştır. Ancak bu yöntemle çekirdeksiz bireylerin elde edilme oranları oldukça düşük bulunmuştur. Bu oranı arttırmak amacıyla, iki çekirdeksiz çeşidin melezlenmesinden sonra *in vitro*, embriyo kurtarma teknikleri ve doku kültürü tekniklerinden faydalanılmıştır. Yapılan melezlemelerde dejenerasyona uğrayan embriyonun embriyo kurtarma tekniği ile özel bir şekilde çimlendirilerek yeni bireylerin elde edilmesi çekirdeksiz birey sayısını oldukça yüksek miktarlarda arttırmıştır.

Son yıllarda moleküler biyoloji çalışmalarında meydana gelen gelişmeler, çoğu canlı türünde olduğu gibi bitkilerde de hızlı ve detaylı genetik analizlerin yapılmasına olanak sağlamıştır. Bu anlamda DNA markörlerinde elde edilen bilgiler farklı alanlarda kullanılmıştır. Bu çalışmalarda incelenen özellikler, çevre koşullarının etkisiyle farklılık göstermemesinden dolayı kesin bilgi sağlamada çeşitlerin doğrudan genotipini yansıtacak çalışmalar oldukları için daha büyük önem kazanmışlardır.

Son yıllarda elde edilen bireylerde çekirdeksizlik özelliğini tespit etmek amacıyla değişik analiz yöntemleri kullanılmıştır. Bunlardan en önemlileri duyuşal analiz, tartım analizi ve moleküler biyolojinin gelişimiyle moleküler markör analizleridir. Ancak duyuşal analizlerde hem bitkinin verime yatması beklenmekte hem de sonuçlar analizi yapan araştırmacıdan araştırmacıya değişebilmektedir, tartım analizlerinde ise bitkinin

verime yatması beklenmektedir. Dolayısıyla bu yöntemler hem zaman kaybına, hem ekonomik kayıplara hem de subjektif sonuçların alınmasına sebep olmaktadır. Oysa moleküler markör teknikleri ile hem daha erken, hem de daha objektif sonuçlar alınabilmektedir.

Polimeraz Zincir Reaksiyonunun (PCR) gelişimi ve spesifik DNA fragmentlerinin çoğaltılması yolu ile DNA polimorfizmi belirlenebilmektedir. Birçok bitkide genetik uzaklık çeşitli moleküler, kimyasal ve morfolojik özellikler kullanılarak belirlenmeye çalışılmaktadır. DNA sekansındaki polimorfizmin belirlenmesi için çok fazla sayıda teknik geliştirilmiştir. RAPD, SCAR, AFLP, SSR v.b. bunlardan bazılarıdır.

Bu araştırmanın amacı; üzümlerde Marker Assisted Selection (MAS) yöntemiyle SCC8 ve SCF27 DNA markörleri kullanılarak, farklı üzüm çeşitlerinin kombinasyonlarından elde edilen F₁ döllerindeki çekirdeksizliği önceden saptamak ve güvenilirliklerini test etmektir. Böylece seleksiyon süresi kısaltılarak çekirdeksiz üzüm ıslahı çalışmalarında, zaman ve para tasarrufu sağlanması hedeflenmiştir.

2. KURAMSAL BİLGİLER VE KAYNAK TARAMALARI

2.1. Asmanın Orijini ve Üzüm Üretimi

Dünya üzerinde çok geniş bir alana yayılmış bulunan asma türleri içerisinde en önemlisi, halen dünya üzüm üretiminin %90'ından fazlasını sağlayan *Vitis vinifera* L.'dir. Asma, kökeni çok eski yıllar öncesine uzanan önemli bitki türlerinden birisidir. Bağcılık tarihi, Avrupa ile Anadolu doğal florasında yer alan bu türün kültüre alınmasıyla başlamıştır. Arkeolojik bulgulara göre, bu türün kültüre alınmasıyla başlamıştır. Arkeolojik bulgulara göre, bu asma türünün ilk olarak, Kafkasya ve Anadolu'da kültüre alındığı ve zamanla buradan dünyanın hemen her yerine yayıldığı kabul edilmektedir (Çelik vd 1998). Dünya üzerinde 11° - 53° kuzey enlem dereceleri ile güney yarım kürede 20° - 40° güney enlem dereceleri arasında yetiştiriciliği yapılmaktadır. Ülkemizde; bağcılık 550 000 ha alan ve 4 000 000 ton üzüm üretimi ile tarım potansiyelimiz içerisinde önemli bir paya sahiptir. Bu potansiyeli ile Türkiye, alan yönünden İspanya, Fransa ve İtalya'nın arkasından 4. sırada yer alırken, üretim miktarı açısından ise İtalya, Fransa, İspanya, ABD ve Çin'in ardından 6. sırada yer almaktadır (Yıldırım 2008).

2.2. Asmanın Ülkemizdeki Tüketim Şekli ve Çekirdeksizliğin Önemi

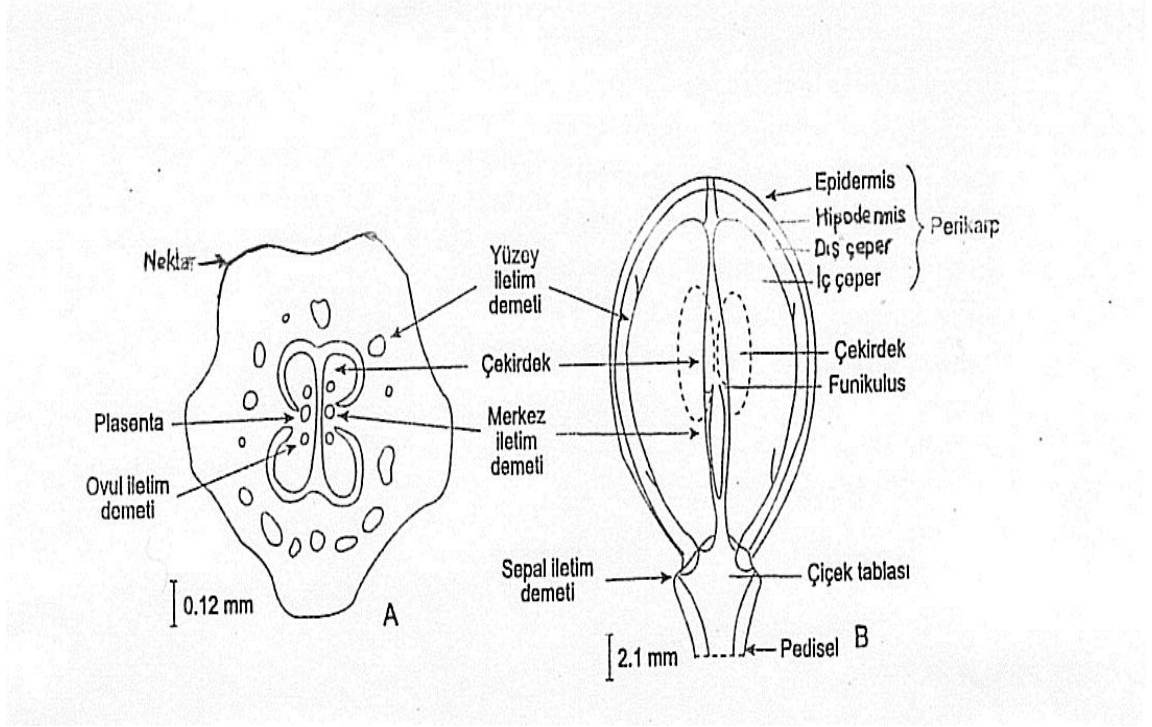
Üzüm, ülkemizde sofralık, kurutmalık, şaraplık, şıralık ve pekmez olarak tüketilmektedir. Sofralık olarak taze tüketilen üzümlerde çekirdeksizlik aranan bir vasıftır. Piyasada uygun nitelikleri taşıyan çekirdeksiz çeşit bulunması halinde çekirdekli çeşitler yerine çekirdeksiz çeşitler tercih edilmektedir. Avrupa ve Amerika'da sofralık olarak tüketilen Sultani Çekirdeksiz ve Perlette gibi çekirdeksiz çeşitlerin miktarı çekirdekli diğer üzüm çeşitlerinin toplam tüketiminden fazladır. Aynı durum Türkiye için de söz konusudur. Türkiye'de sofralık olarak ihraç edilen toplam üzüm miktarının %62'sini tek başına Sultani çekirdeksiz teşkil etmektedir. Buna karşılık önemli çekirdekli erkenci çeşit olan Cardinal ise %14'ünü oluşturmaktadır. İç pazara Sultani Çekirdeksiz girdiğinde diğer çeşitlere tercih edilmektedir. Aynı zamanda çekirdeksiz çeşitler çekirdeklilerden daha yüksek fiyata alıcı bulmaktadır. Sofralık

çekirdeksiz üzüm tüketimi ve talebi devamlı artarken dünya pazarında tüketilen kuru üzümün tamamına yakını çekirdeksizdir. Kuru üzümde aranan ilk vasıf çekirdeksiz olmasıdır.

Açıklanan durumdan dolayı çekirdeksiz çeşitler üretilebildiği takdirde gelecekte bunlar çekirdekli çeşitlerin yerini alacak piyasaya hakim olacaktır. Bu nedenle yeni çekirdeksiz çeşitler elde etmek amacıyla ıslah çalışmaları yapmak bugün bağcılıkta çalışan araştırmacıların en fazla üzerinde çalıştıkları konu olmaktadır (Barış ve Günil 1991).

2.3. Asmalarda Çiçek Yapısı, Tohum Taslağı ve Tane Tutum Şekilleri

Asmalarda çiçekler, bileşik salkım üzerinde meydana gelirler. Çiçek salkımını oluşturan çiçek organ taslaklarının farklılaşması çiçeklerin açılmasından önceki yaz gelişme periyodunda ve kışlık gözler içerisinde gerçekleşmektedir. Böylece dinlenme döneminin başlangıcında salkım taslaklarını oluşturmuş bir halde dinlenmeye girmektedirler. Genel olarak dinlenme sürecinde hiçbir değişiklik meydana gelmemektedir. Çiçek organ taslaklarının gelişmesi, çiçeklerin çeşitli kısımlarını oluşturmak üzere ilkbaharda yapraklanma ile birlikte yeniden hızlanmakta ve sırasıyla kaliks, korolla, stamen ve pistilin farklılaşması gerçekleşmektedir. Marasalı'ya göre; gelişmenin ilerlemesi ile stamenler, filament ve anterleri oluşturmak üzere farklılaşırken, karpeller de pistil ve kısımlarını oluşturmak üzere birleşmektedirler. Bu gelişmelere paralel olarak anterlerde mikrosporogenez, ovaryumda ise ovüllerin farklılaşmasıyla birlikte megasporogenez başlamaktadır (Elidemir 2006). Şekil 2.1.'de olgun bir üzüm tanesinin boyuna kesitinde organlar ve detayları gösterilmektedir.



Şekil 2.1. Olgun bir üzüm tanesinin boyuna kesiti (Elidemir 2006)

Asmalarda çekirdek oluşumu esas alınarak, üzüm çeşitlerindeki tane tutumu dört ana grupta incelenmektedir (Barış ve Günil 1991).

1) Partenokarpi: Esas itibarıyla çiçekte dişi organın gelişmemiş olmasına bağlı olarak döllenme olmadan tane teşekkül etmesi halidir. Pearson'a göre partenokarpik taneli çeşit olan Black Corinth'te tozlanmadan sonra hiç ovül gelişimi görülmemektedir. Partenokarpi ovülün kusurlu yapısından dolayı döllenememesinden meydana geldiği gibi, ovülün normal olması durumunda bile herhangi bir nedenle döllenememesinden çekirdek gelişmemesine rağmen tanenin teşekkül etmesinde de ortaya çıkmaktadır. Birinci halde partenokarpi zorunludur. Yapısal kusuru olmayan ovülün herhangi bir nedenle döllenememesinden ise partenokarpi olup döllenme olması durumunda normal çekirdekli tane teşekkül edebilmektedir. Partenokarpik taneler normal iriliğe ulaşamamakta, küçük kalmakta ve genellikle yuvarlak olmaktadır. Tanenin küçük kalması irileşmeyi sağlayan ve çekirdekli tanelerde daha fazla olan oksin azlığından kaynaklanmaktadır (Barış ve Günil 1991). Bu gruba örnek olarak Şekil 2.2.'de gösterilmiş olan Black Corinth çeşidi verilmektedir.



Şekil 2.2. Partenokarpik üzüm çeşitlerinden olan Black Corinth salkımı

2) Stenospermokarpi: Stenospermokarpi terimi ilk kez Stout tarafından 1936 yılında kullanılmıştır. Sultani Çekirdeksiz, Perlette gibi çeşitlerin tipik meyve oluşum şeklidir. Çiçeğin yapısı normaldir ve döllenme gerçekleşir. Fakat döllenmeden belli bir süre sonra (genellikle 3-4 hafta) gelişmekte olan embriyo, nusellus ve integüment dokularındaki anormalliklere bağlı olarak dejenerasyona uğramakta ve gelişmesi durmaktadır. Embriyonun dejenerasyona uğrama zamanına göre çekirdek büyüklüğü değişmekte; erken dejenerasyon halinde yumuşak yeşil çok küçük çekirdek taslağından başlayarak geç dejenerasyonda ise neredeyse normal renk ve irilikte çekirdekler oluşmaktadır. Bu tür çekirdekler parmakla ezilebilmekte ve çimlenememektedirler. Tane içinde taslak halinde de olsa çekirdek bulunduğundan partenokarpiye göre taneler daha iri olmaktadır. Üzümün yenmesi sırasında yumuşak çekirdek taslakları hissedilmediğinden bu tür çeşitler çekirdeksiz olarak nitelendirilmektedirler. Belirli oranlarda yeni döllere geçen genetik bir karakter olarak bilinmektedir (Barış ve Günil 1991). Stenospermokarpik meyvelerin en önemlilerinden olan Sultani Çekirdeksiz çeşidi Şekil 2.3.'de gösterilmektedir.



Şekil 2.3. Stenospermokarpik üzüm çeşitlerinden olan Sultani Çekirdeksiz salkımı

3) Boş Çekirdeklilik: Tane oluşumu stenospermokarpide meydana gelen mekanizmaya benzer şekilde olmaktadır. Embriyonun dejenerasyonu 5-6 hafta sonra söz konusudur. Ancak dejenerasyon taneler hemen hemen normal renk ve şeklini aldıktan sonra meydana geldiğinden görünüm itibarıyla normaldir. Çimlenme oranı çok az, boş çekirdekli taneler oluşmaktadır. Taneler çekirdekli çeşitler gibi iri, sert ama hafiftirler. Şekil 2.4.'de bulunan Çavuş çeşidi bu gruba örnektir.



Şekil 2.4. Boş çekirdeklilere örnek olarak verilen Çavuş çeşidi salkımı

4) Normal Çekirdeklilik: Bir veya birden fazla ovülün döllenmesiyle oluşan embriyosu, endospermi gelişmiş, çoğunlukla çimlenme gücü olan çekirdekli ve taneleri çeşide has iriliği gösteren meyve teşekkülü şeklindedir. Üzümlerde birçok çeşitte görülür. Şekil 2.5.'de de gösterilmiş olan Cardinal çeşidi normal çekirdeklilere örnektir.



Şekil 2.5. Normal çekirdekli çeşitlerden olan Cardinal çeşidi salkımı

Çekirdeksiz üzüm elde etmek için yapılan melezlemelerde çekirdekli çeşitler ana çekirdeksiz çeşitler baba olarak kullanılır. Elde edilen bireylerde çekirdeksiz bitkilerin oranı genellikle düşüktür. Embriyo kültürü kullanımıyla çekirdeksiz annelerle ile çekirdeksiz babaların melezlerinden canlı embriyo elde etmek artık mümkündür. Bu teknikle yüksek oranda çekirdeksiz bitkiler elde edilebilmektedir (Bouquet ve Danglot 1996).

2.4. Asmada Çekirdeksizlik Analizleri

Tüketicilerin “çekirdeksizlik” için pratik tanımı, yeme esnasında çekirdeklerin ağızda algılanabilirliğine dayanır (Ledbetter ve Ramming 1989). Üzümlerde çekirdeksizlik özelliğinin tespiti için 3 ana yöntem uygulanmaktadır (Striem vd 1994).

2.4.1. Duyusal Analizler

Üzümlerde çekirdeksizlik özelliğinin tespiti için kullanılan yöntemlerden ilki duyusal analizlerdir (Striem vd 1994, Ledbetter ve Shonnard 1991, Ledbetter ve Ramming 1989). Yani duyu organlarının algılamasına dayanan analiz yöntemidir. Ne var ki sonucu araştırmacıdan araştırmacıya değişmektedir (Ledbetter vd 1994). Algılanabilen az gelişmiş çekirdek izleri; tane sıklığı, meyvenin gevrekliği (Ledbetter ve Shonnard 1991), çekirdeğin gelişme derecesi, boyutu, integümentlerin odunlaşması, çekirdek kabuğu sertliği ve endosperm gelişim derecesi (Ledbetter ve Ramming 1989) gibi bazı faktörlerden etkilenebilmektedir. Çekirdeksiz ve çekirdekli tanelerde çekirdekler görsel olarak ebatlarda dört kategoride sınıflandırılır; normal çekirdek, geniş izler, orta izler ve küçük izler. Çekirdeksizliğin belirlenmesinde etkili olan bu faktörler kimi çevresel etmenlerden ve kimyasal uygulamalarından etkilenmektedir örneğin; giberellin uygulaması. Çiçeklenme öncesi ve tam çiçeklenme dönemindeki uygulamalara çeşitler farklı tepki vermişlerdir. Daha sonraki uygulamalara göre çiçek açım öncesindeki uygulamalarda giberellin tane tutumunu engelleyip çekirdek gelişimini durdurmaktadır. Çiçeklenmedeki uygulamalar çekirdek gelişimi büyüklüğüne az etkide bulunurken çekirdek kabuğu ve endosperm gelişim derecesini azaltarak etkilemiştir (Striem vd 1994).

2.4.2. Tartım Analizleri

Bu yöntem üzüm tanesinde bulunan normal veya rudimenter bir çekirdeğin taze ağırlığına dayanmaktadır. Şayet bu ağırlık 20-25 mg'ın altında ise çeşit çekirdeksiz kabul edilirken üzerinde ise çekirdekli kabul edilmektedir (Ledbetter ve Shonnard 1991, Striem vd 1994). Bu yöntemler asmalar verime yattıktan sonra, yani dikimden 4-5 yıl sonra yapılabildiği için, melezlemelerde çekirdeksizlik özelliğinin saptanması çok uzun zaman almaktadır.

2.4.3. Moleküler Markör Yöntemleri

Üçüncü analiz yöntemi ise moleküler belirteç yöntemleridir. Bu yöntemler sayesinde hem erken dönemde sonuç alınabilmekte hem de çeşidin DNA'sından alınan örnekler incelendiği için sonuçlar objektif olmaktadır (Streim vd 1994). Dolayısı ile yeni çekirdeksiz çeşit elde edilmesinde hem zamandan, hem de ekonomiden büyük ölçüde tasarruf sağlanmaktadır (Barış ve Gürnil 1991).

DNA markörleri tanımlama çalışmalarında daha doğru ve kesin sonuçlar veren ve bitki ıslahında ve özellikle asmada genetik çalışmaların sınırlarını genişleten bu markörler ;

A) Hibridizasyona dayalı DNA markörler,

B) Polymerase Chain Reaction'a (PCR)'a dayalı DNA markörler,
olmak üzere başlıca iki teknoloji dalında gelişim göstermiştir.

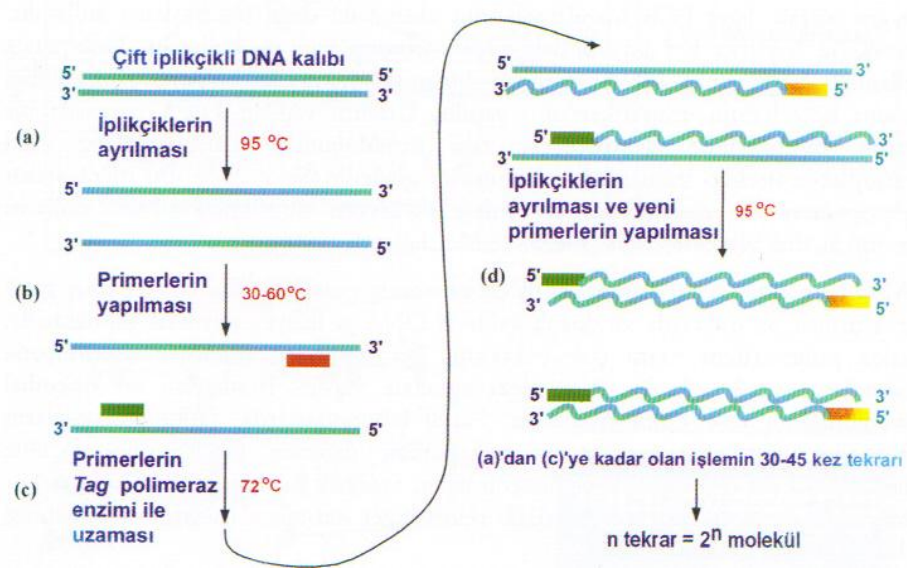
A) Hibridizasyona dayalı DNA markörler:

Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP); hibridizasyon temeline dayalı en önemli markör tekniğidir. Bu markörler çeşitli şekillerde etiketlenmiş bir DNA parçasının (prob DNA) araştırılan bir DNA örneğindeki benzer veya aynı dizilişteki DNA'ya melezlenebilmesini baz almaktadır. Dokulardan izole edilen genomik DNA, restriksiyon enzimlerince (**genellikle *EcoR I*, *Cla I*, *Hind III*, *Hinf I***) kesilir. Agaroz jelde yürütülür ve kesimi yapılmış olan DNA'nın büyüklükleri tespit edilmiş olur. Isıtılarak çift sarmalli halden tek sarmalli hale getirilen DNA naylon membrana Southern Blot tekniği ile transfer edilir. Prob (50-200 nükleotid) ile membrandaki DNA biraraya getirilerek hibridize edilir. Ayırt edilebilmesi için proba her zaman 5' ve 3' uçlarına izotop veya floresans etiketli bir baz eklenir. Elde edilen hibrit kurutulup izotop veya floresansa bağlı resmi çekilir. Avantajları; terarlanabilme kabiliyetlerinin yüksek olması, homozigotu heterozigottan ayırt edebilmeleri, uygun prob kullanılmasıyla genlerin varlığı ve sayısı hakkında kesin sonuç vermeleri ve her türlü organizmada kullanılabilmeleridir. Dezavantajları ise; yüksek miktarda ve kaliteli

DNA'ya ihtiyaç duyulması, kullanımının zor ve diğer tekniklere göre daha fazla zaman alıcı olmasıdır. Ayrıca izotop kullanıldığı için çevreye ve sağlığa zararlıdır, floresans ise pahalıdır. Proben elde edilip geliştirilmesi zordur (Karaca 2009).

B) PCR'a dayalı olan markör teknikleri ise ;

Polimeraz zincir reaksiyonu DNA polimeraz enziminin kullanılmasıyla in vitro şartlarda DNA üretilmesini ifade eder. Bu üretim için 6-25 nükleotid uzunluğunda başlatıcı DNA'lar (primerler) gerekir. Reaksiyon ortamında ayrıca pH'yı ve tuz konsantrasyonunu optimum hale getiren tampon çözelti, polimeraz enziminin ihtiyaç duyduğu MgCl ve DNA üretiminde kullanılacak A,T,G,C nükleotidlerinden her biri bulunur. Polimeraz enzimi, bu başlatıcı DNA'nın bir kalıp DNA üzerine bağlanmasından sonra, onu bir uçtan uzatmaya başlar ve kalıp DNA'nın aynısını üretir. DNA üretim işlemi birbirini izleyen bir dizi çok spesifik sıcaklık devrelerinde yapılır. Şekil 2.6.'da PCR'ın aşamalı bir şekilde çalışma prensipleri gösterilmektedir.

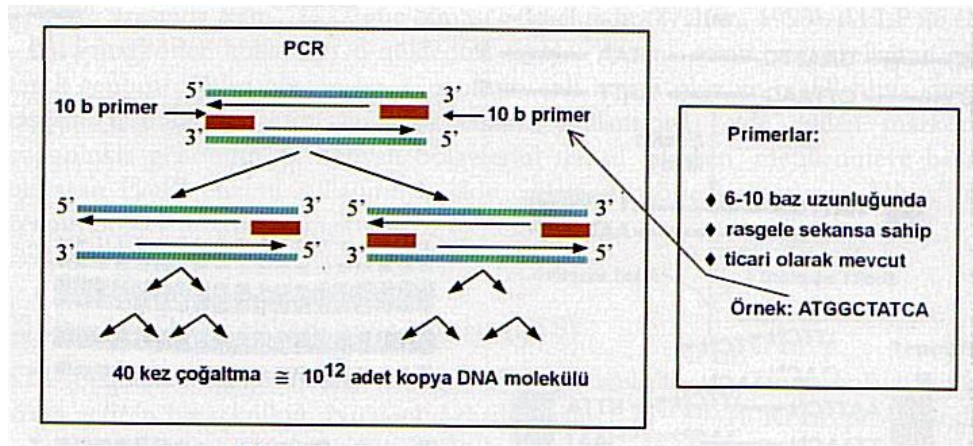


Şekil 2.6. PCR'ın şematik gösterimi (Yıldırım ve Kandemir 2001)

PCR tekniğine dayanan en önemli yöntemlerden olan RAPD, SCAR, CAPS, AFLP, SNP, SSR, CAPS-mikrosatellit aşağıda açıklanmıştır.

a) Rastgele Çoğaltılmış DNA Farklılığı (RAPD(s), Random Amplified Polymorphic DNA(s))

RAPD olarak adlandırılan bu teknik ilk geliştirilen teknik olup genellikle 10 nükleotid uzunluğunda primer ve bazı şartlarda primer seti kullanılarak genom üzerinde bu primerlerin hibrit oluşturdıkları kısımların çoğaltımı ile polimorfizmi belirler, genellikle dominant markör üretir, kullanımı yeni markör sistemlerinin gelişimi ile birlikte giderek azalmaktadır (İnce vd 2011). RAPD yönteminin çalışma prensibinin şeması Şekil 2.7.'de gösterilmektedir.



Şekil 2.7. RAPD tekniğinin şematik gösterimi (Yıldırım ve Kandemir 2001)

b) Sekansı Karakterize Edilmiş Alanlar (SCAR(s), Sequence Characterized Amplified Region(s))

Bu yöntem de genellikle AFLP, RAPD, AP-RAPD yöntemlerinden elde edilen ancak polimorfizm tam olarak saptanamayan veya çoklu ampikon oluşumundan dolayı kesim olmayan monomorfik ampikonlar önce agaroz jelden izole edilir ve sekans dizi analizleri ile yeni primer çiftleri oluşturulur. Bu primer çiftleri kullanılarak PCR analizleri ile polimorfizm araştırılır. SCAR yönteminde dominant ve kodominant markörler elde edilmektedir (İnce vd 2011).

c) oğaltılarak Kesilmiş Polimorfik Sekans Polimorfizmi (CAPS, Cleaved Amplified Polymorphic Sequence)

RAPD, AFLP gibi yöntemlerden elde edilen monomorfik ampikonların restriksiyon enzimleri kullanılarak polimorfizme dönüştürülmesinde kullanılmaktadır (İnce vd 2011).

d) oğaltılan Parça Uzunluğı Farklılığı (AFLP(s), Amplified Fragment Length Polymorphisms)

Bu teknikte genomik DNA genellikle 2 özel restriksiyon enzimleri ile kesilir, kesim noktalarına özel adaptörler bağlanır ve bu adaptör DNA sekanslamasına bağlanabilen primer çiftleri ile seçici olarak çoğaltılmış olan DNA fragmanlarının oluşturduğu polimorfizme dayanır. Genellikle poliaklamit jel elektroforezes ve gümüş nitrat etiketleme yöntemi ile analiz edilir (İnce vd 2011).

e) Tek Nükleotid Polimorfizmi (SNP, Single Nucleotid Polymorphism)

Günümüzde giderek kullanımı yaygınlaşan etkin bir yöntem olup alleller arasındaki tek nükleotid polimorfizmini belirlemede ve otomasyon floresan tekniklerinin gelişmesi ile mikro ip yönteminde etkin bir şekilde kullanılmaktadır (İnce vd 2011).

f) Basit Dizi Tekrarları veya Mikrosatellitler (SSR Simple Sequence Repeats)

Genomda bulunan ardışık tekrarlı (düzenli veya değişken) mikrosatellit alanlarını üstten ve alttan çevreleyen özel primer çiftleri ile çoğaltarak ardışık tekrar sayıdaki polimorfizmi belirler. Bu yöntem PCR tabanlı olup az miktarda DNA'ya gerek duyar ve oldukça yaygın kullanımı olan ko-dominant markör sistemidir. Bu yöntemde mikrosatellit alanlarındaki polimorfizm markör olarak kullanılmakla birlikte özellikle son dönemlerde bu yöntem kullanılarak mikrosatellitlerin genomdaki dağılımları, fonksiyonları ve gen ifadesi üzerindeki etkileri de çalışılmaktadır (İnce vd 2011).

g) CAPS-mikrosatellit (CAPS-microsatellite)

Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi araştırmacıları tarafından geliştirilen bu yöntemde özellikle EST tabanlı mikrosatellitlerde splisin, alternatif splisin olaylarından dolayı çok büyük ve monomorfik mikrosatellit lokuslarının değişik restriksiyon enzimleri kullanılarak oluşturduğu polimorfizme dayanan bir yöntemdir. Bu sistem genellikle ko-dominant markör üretmekte olup agaroz jel elektrofozes araştırma tekniğine uygundur. Ayrıca PCR sonrası ampliconların birleştirilerek analizi veya çok sayıda primer setinin aynı PCR'da amplikasyonu bu yöntemin avantajlarından (İnce vd 2011).

Asmada çekirdeksizlik özelliğinin kalıtım modeli son yapılan araştırmalara göre üç tamamlayıcı çekinik gen ve bağımsız, düzenli baskın bir gen ile kontrol edilmektedir. Bu baskın lokusa “sdl” lokusu adı verilmiştir (Bouquet ve Danglot 1996).

Bu hipotezden yola çıkılarak DNA markör yöntemlerinden olan RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) ile 81 çeşidin genetik farklılıkları incelenmiştir. Burada incelenen çeşitlerin 36 adedi çekirdekli 45 adedi çekirdeksizdir. Kullanılan bu çeşitlerden çekirdekli çeşitler kendi aralarında çekirdeksizler ise kendi aralarında melezlenmişlerdir. Böylelikle farklı kombinasyonlar elde edilmiştir. Sdl lokusuna 0.7 santi Morgan (cM) uzaklıkta opC08-1020 markörü ve 3.5 cM uzaklıkta opP18-530 markörü tespit edilmiştir (Lahogue vd 1998). RAPD yöntemiyle elde edilen bu markörler SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) yöntemiyle daha da detaylandırılmıştır. Lahogue vd 1998 tarafından opC08-1020 markörü geliştirilerek ve *Bgl*III restriksiyon enzimi ile kesilerek SCC8, Blondon vd tarafından 2001 yılında opP18-530 markörü geliştirilerek ve yine aynı enzimle kesilerek SCP18 markörü elde edilmiştir (Françoise vd 2001, Korpas vd 2009). Daha sonra Ruby Seedless ile Sultanina melezleri üzerinde yapılan çalışmalar sonunda SCAR tekniği ile başarıyla SCF27 markörü geliştirilmiştir (Mejia ve Hinrichsen 2003). SCC8 markörü ile geniş popülasyonlar üzerinde araştırmalar yapılmıştır.

Çekirdeksiz üzüm ıslahında en önemli aşamalardan birisi de kullanılan çekirdeksizlik analizidir. Kullanılan analiz yöntemlerinden MAS yöntemi özellikle son yıllarda

önemini giderek arttırmaktadır. Bu araştırmanın amacı SCC8 ve SCF27 DNA markörlerini kullanarak, farklı üzüm çeşitlerinin kombinasyonlarından elde edilen F₁ döllerindeki çekirdeksizliği önceden saptamak ve güvenilirliklerini test etmektir. Böylece seleksiyon süresi kısaltılarak çekirdeksiz üzüm ıslahı çalışmalarında, zaman ve para tasarrufu sağlanması hedeflenmiştir.

Araştırmada SCAR(s) (Sequence Characterized Amplified Region(s)) tekniği ile SCC8 ve SCF27 markörleri kullanarak çalışılmıştır. Bunun nedeni ise kullanılan markörlerin bu teknikle geliştirilmesinin yanında çekirdeksizlik özelliği ile ilgili yapılan çalışmaların birçoğunda SCAR tekniğinin uygulanmış olmasıdır. Araştırmada kullanılan markörlerden SCC8 markörü ile yapılan çalışmalar SCF27 markörü ile yapılanlara oranla daha yoğundur.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Materyal olarak, Tekirdağ Bağcılık Araştırma Enstitüsü'nde bulunan çekirdeksizlik özelliği için 7 ebeveyn ile yapılmış olan melezleme çalışmaları sonucunda meydana gelen 50 adet F₁ dölleriindeki genotiplerden yararlanılmıştır. Ayrıca, partenokarpik özellik gösteren Siyah Korent, stenospermokarpik özellik gösteren Sultani Çekirdeksiz, boş çekirdeklilik özelliği gösteren Çavuş ve yumuşak çekirdekli Trakya İlkeren üzüm çeşitleri denemede kontrol materyali olarak kullanılmıştır.

Ebeveynler ve meyve özellikleri:

Çınarlı Karası; bu çeşit siyah renkli, çekirdekli, orta-geç mevsimde olgunlaşan, verimli, ortalama salkım ağırlığı 590 g., iri (6,5 g.) ve yuvarlak tanelidir. Salkım şekli konik salkımlar homojen ve normal sıkılıktadır. Tekirdağ yöresinin yerli çeşididir. **Tekirdağ Çekirdeksizi;** siyah renkli, çekirdeksiz, orta-geç mevsimde olgunlaşan, sofralık bir çeşittir. Ortalama tane ağırlığı 3-4 gramdır. Islah çalışmaları sonucunda Tekirdağ Bağcılık Enstitüsü'nden elde edilmiştir. **Italia;** beyaz renkli, çekirdekli ve tane büyüklüğü iridir. Olgunlaşma zamanı ise orta mevsimde olur. **Barış;** beyaz renkli, çekirdeksiz ve tane büyüklüğü ortadır. Tane şekli yuvarlak olup orta büyüklüktedir. Erkenci bir çeşittir. **Perlette;** beyaz renkli, çekirdeksiz ve tanesi küçüktür. Tane şekli yuvarlak olup erkenci bir çeşittir. **İri Kara;** tane rengi siyah olup çekirdekli bir çeşittir. Tane şekli yuvarlak ve çok iridir. Oldukça geççidir. **Beauty Seedless;** tane rengi siyah olup çekirdeksizdir. Tane şekli oval ve orta iriliktedir.

Kombinasyonlar:

1. Çınarlı Karası (37) x Tekirdağ Çekirdeksizi (T); bu kombinasyondan 10 genotip,
2. Italia (7) x Barış(D); bu kombinasyondan 10 genotip,
3. Italia (7) x Perlette (B); bu kombinasyondan 10 genotip,
4. İri Kara (40) x Perlette (B); bu kombinasyondan 10 genotip,
5. Italia (7) x Beauty Seedless (C) bu kombinasyondan 10 genotip.

Böylece denemede toplam 54 genotip incelenmiştir. Ebeveynlere verilen kodlar Tekirdağ Bağcılık ve Araştırma Enstitüsü'nün kullanmış olduğu kodlardır. Araştırma bu kodlara sadık kalınarak yapılmıştır. Aşağıdaki çizelgede örneklerin genotipleri ve analizler sırasında her birine verilmiş olan örnek numaraları bulunmaktadır.

Örneğin; genotip (37xT)-173: Çınarlı Karası ve Tekirdağ Çekirdeksizi çeşitleri melezlenerek elde edilen yeni fertlerden 173. birey anlamına gelmektedir. Araştırmada bu birey 1 no.lu örnek olarak ifade edilmektedir (Çizelge 3.1.).

Çizelge 3.1. Araştırmada kullanılan genotipler ve örnek numaraları

Örnek Numarası	Genotip
K	Siyah Korent
S	Sultani Çekirdeksiz
Ç	Bozcaada Çavuşu
İ	Trakya İlkeren
1	(37 x T)-173
2	(37 x T)-174
3	(37 x T)-175
4	(37 x T)-177
5	(37 x T)-179
6	(37 x T)-193
7	(37 x T)-226
8	(37 x T)-228
9	(37 x T)-231
10	(37 x T)-238
11	(7 x D)-214
12	(7 x D)-267
13	(7 x D)-273
14	(7 x D)-279
15	(7 x D)-280

Çizelge 3.1.'in Devamı

Örnek Numarası	Genotip
16	(7 x D)-284
17	(7 x D)-299
18	(7 x D)-322
19	(7 x D)-337
20	(7 x D)-339
21	(7 x B)-48
22	(7 x B)-50
23	(7 x B)-51
24	(7 x B)-53
25	(7 x B)-96
26	(7 x B)-103
27	(7 x B)-106
28	(7 x B)-117
29	(7 x B)-160
30	(7 x B)-165
31	(40 x B)-13
32	(40 x B)-18
33	(40 x B)-19
34	(40 x B)-20
35	(40 x B)-26
36	(40 x B)-37
37	(40 x B)-39
38	(40 x B)-56
39	(40 x B)-57
40	(40 x B)-88
41	(7 x C)-1
42	(7 x C)-29
43	(7 x C)-102
44	(7 x C)-109

Çizelge 3.1.'in Devamı

Örnek Numarası	Genotip
45	(7 x C)-111
46	(7 x C)-120
47	(7 x C)-133
48	(7 x C)-142
49	(7 x C)-150
50	(7 x C)-155

3.2. Metot

Çekirdekli annelerle çekirdeksiz babaların melezlenmesiyle elde edilen bireylerin DNA markör yöntemlerinden SCAR tekniği ile çekirdeksizliğin önceden tespitinin amaçlandığı bu çalışmada, örnekler Tekirdağ Bağcılık Enstitüsü'nden temin edilmiştir. Tekirdağ yöresinde bağlarda gözler patlayıp yeni sürgünler gelişmeye başladığı zaman Haziran 2010'da alınmıştır. Tüm analiz işlemleri de Ankara Üniversitesi Bahçe Bitkileri Bölümü Biyoteknoloji laboratuvarında yapılmıştır.

3.2.1. DNA analizleri

3.2.1.1. Örneklerin toplanması ve saklanması

İncelenecek genotipler Tekirdağ Bağcılık Araştırma Enstitüsü'nden taze yaprak ve sürgün ucu olarak alınıp buz kutusu içinde muhafaza edilerek aynı gün içerisinde Ankara Üniversitesi, Bahçe Bitkileri Bölümü'ndeki moleküler laboratuvarına ulaştırılmıştır. Tüm örnekler -80°C'de DNA ekstraksiyon periyoduna kadar saklanmıştır.

3.2.1.2. Genomik DNA ekstraksiyonu

Örneklerin ezilmesi:

-80°C’de bulunan yapraklar ve sürgün uçları soğuk havan ve havaneli ile sıvı azot kullanarak ezilmiştir. Şekil 3.1’de yaprak örneklerinin taze sürgünlerden havan içerisine alınışı gösterilirken Şekil 3.2.’de ezme işlemi ve sonrasında ependorf tüpe örneğin aktarılışı gösterilmiştir. Ependorf tüplere alınan toz halindeki örnekler -80°C’de saklanmıştır.



Şekil 3.1. Genç yaprakların ve sürgün uçlarının sıvı azotla ezilmesi



Şekil 3.2. Toz haline gelen örneklerin tüplere aktarılması

Genomik DNA ekstraksiyonu için kullanılan çözeltiler ve kimyasallar:

Ekstraksiyon metodunda Lefort vd 1998 yöntemi izlenmiştir. Bunun için gereken kimyasallar ve miktarları sırasıyla aşağıda Çizelge 3.2.'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. DNA ekstraksiyon çözeltisi

Kimyasal	Miktarı
1. TRIS pH 8.0	50 mM (2ml)
2. EDTA pH 8.0	50 mM (4ml)
3. 1% CTAB	(1g)
4. 0.5% TWEEN 20	(0.5 ml)
5. LiCl	0.4 M (10ml)
6. 2% PVP	(2g)
7. RNase-A	100 mg/ml
Toplam miktar 50ml	

(Lefort vd 1998)

Bu kimyasalların çözeltide sırasıyla iyi bir şekilde dağılmaları sağlanmıştır. Kimyasalların kısaca özellikleri:

TRIS: DNA ekstraksiyonunda ve elektroforesiste yaygın olarak kullanılır. pH=7-9 arasında çözeltisinde etkisini daha yoğun gösterir.

EDTA: İstenmeyen enzimlerin kofaktörüdür. EDTA kullanıldığında pH oldukça önemlidir, pH=8 etkindir. Eğer fazla miktarda kullanılırsa PCR'ın çalışmasında sorunlar yaşanır.

CTAB: Membran proteinlerinin, polisakkaritlerin giderilmesinde etkili güçlü bir deterjandır.

TWEEN 20: Hücre agregatlarının dağılması için bir deterjandır.

Lityum Klorid: Hem DNA hem de RNA ekstraksiyonunda kullanılır. Uygun konsantrasyonda DNA elde edilirken, farklı konsantrasyonda RNA elde edilir. Polisakkaritlerin bağlanması kullanılır. PCR’da kalıntısı olursa enzimatik reaksiyonu önler.

PVP: Özellikle CTAB ile birlikte kullanılınca polisakkaritleri çok iyi uzaklaştırır. DNA’ya çok iyi bağlanır.

RNase-A: RNA’nın parçalanmasını sağlar.

Genomik DNA izolasyon yöntemi:

Çalışmada uygulanan genomik DNA izolasyonu aşağıda verilen şekliyle uygulanmış ve sırasıyla takip edilmiştir.

1. Her bir örnek için 1 ml ekstraksiyon solusyonuna 10µl Mercaptoethanol eklenmiştir.
2. 100 mg’lık yaprak dokusuna bu çözelti ilave edilmiştir.
3. Örnekler 65°C 15 dk. su banyosunda çalkalayarak bekletilip sonra da oda koşullarında soğutulmuştur.
4. Üzerine 0.5 ml kloroform/izoamilalkol (24:1) eklenerek 20-25 defa sallanıp 30 dk. buz üzerinde bekletilmiştir.
5. 3 dk. 14.000 rpm de santrifüj edilmiştir.
6. Üst faz (süpernatant) yaklaşık 0.7 ml yeni bir tüpe aktarılmıştır.
7. Üzerine yaklaşık 0.8 ml isopropanol eklenmiştir.
8. 15-20 dk. buz üzerinde bekletilmiştir.
9. 1 dk. 14.000 rpm de santrifüj edilmiştir.
10. Üst faz atılmıştır.
11. Pellet üzerine 1 ml (%70 etil alkol eklenip 2 dk. 14.000 rpm de santrifüj edilmiştir.
12. Etil alkol uzaklaştırılmıştır ve 50-100 µl TE (pH 8.0) veya steril su (nuklease free) da çözülmesi sağlanmıştır.

13. Her 100 µl solüsyon için 1µl RNase-A eklenerek 37°C'de 30 dk. bekletilmiştir (Lefort vd 1998) .

3.2.1.3. Genomik DNA'nın kalite ve kantitesinin belirlenmesi

DNA'nın saflığı nanodrop cihazı ile kontrol edilmiştir. Bunun için izolasyonu yapılan DNA'dan yaklaşık 2µl kullanılarak protein, polisakkarit ve nükleik asit oranları belirlenmiştir (Sambrook 1998).

Daha sonra elde edilen DNA'lar %1 agaroz jelde yürütülmüştür. Bunun için yapılan işlemler sırasıyla;

- 1) Balon jojeye 0,5 mg agaroz jel tartılmıştır.
- 2) Bunun içerisine 50 ml 1X TBE konulmuştur.
- 3) Mikro dalgada 2 dakika bekletildikten sonra iyice eriyen agaroz jeli çıkarıp soğumaya alınmıştır.
- 4) 28X30 cm' lik tankın içerisine jel dökülüp taraklar yerleştirildikten sonra donmaya bırakılmıştır.
- 5) Donan jel elektroforez konulup ve kuyucuklara 4 µl DNA ve 6 µl bromofenol blue karışımı pipetle yüklenmiştir.
- 6) Her bir örnek kuyucuklara konulduktan sonra 100 voltluk elektrik ile elektroforez tankı çalıştırılmıştır. 1 saat boyunca koşulmuştur. DNA UV transliminatör ile görünür hale getirilip ve dijital kamera ile görüntülenmiştir.

3.2.2. Genomik DNA'nın optimizasyonu

PCR çalışması için kullanılacak olan DNA miktarı optimize edilerek hata payı minimize edilmiştir. Bunu için DNA konsantrasyonu 100 ng/µl olarak alınmıştır (Korpas vd 2009). DNA miktarları 1µl, 1,5µl ve 2µl olarak denenmiş ve en iyi sonuç 1µl de alınmıştır.

3.2.3. Markörlerin PCR karışımları

Analiz sırasında kullanılan primerler SCF27 ve SCC8'dir. Bu markörler üzümelerde çekirdeksizliğin belirlenmesinde yüksek oranda etkili bulunmuştur (Korpas vd 2009).

SCC8 primerinin baz dizilimi;

SCC8 (ileri)= 5'-GGT-GTC-AAG-TTG-GAA-GAT-GG-3'

SCC8 (geri)= 5'-TAT-GCC-AAA-AAC-ATC-CCC-3' dir (Lahogue vd 1998).

SCF27 primerinin baz dizilimi;

SCF27 (ileri)= 5'-CAG-GTG-GGA-GTA-GAA-TG-3'

SCF27 (geri)= 5'-CAG-GTG-GGA-GTA-AGA-TTT-GT-3' dir (Cabezas vd 2006).

SCC8 markörü için PCR Karışımı:

SCC8 primeri için uygulanmış olan PCR karışımı Çizelge 3.3.'de verilmiştir.

Çizelge 3.3. SCC8 primer çiftinin PCR karışım miktarları

<u>Kimyasal</u>	<u>Miktar</u>	
DNA	1 µl	100 ng/µl
Primer ileri	1 µl	10 pmol/µl
Primer geri	1 µl	10 pmol/µl
dNTPmix	0.5 µl	25mM/µl
Taq DNA Polymerase	0.2 µl	5u/µl
MgCl ₂	1.5 µl	50 mM stok
10x buffer	2 µl	
<u>Bidistile H₂O</u>	<u>12.8 µl</u>	
Toplam Hacim	20 µl	(Lahogue vd 1998)

Bu PCR karışımında en iyi sonucu alabilmek için MgCl₂ miktarları 1µl, 1,5µl ve 2µl olarak denenmiş ve en iyi sonuç 1.5 µl'de alınmıştır.

SCF27 markörü için PCR Karışımı:

SCC27 primeri için uygulanacak olan PCR karışımı aşağıdaki Çizelge 3.4.'de verilmiştir.

Çizelge 3.4. SCF27 primer çiftinin PCR karışım miktarları

<u>Kimyasal</u>	<u>Miktar</u>	
DNA	1 µl	100 ng/µl
Primer ileri	1 µl	10 pmol/µl
Primer geri	1 µl	10 pmol/µl
dNTPmix	0.5 µl	25mM/µl
Taq DNA Polymerase	0.2 µl	5u/µl
MgCl ₂	1.5 µl	50 mM stok
10x buffer	2 µl	
<u>Bidistile H₂O</u>	<u>12.8 µl</u>	
Toplam Hacim	20 µl	(Lahogue vd 1998)

Yine tıpkı SCC8 marköründe olduğu gibi PCR optimizasyonu yapmak için karışımındaki MgCl₂ miktarlarından 1 µl, 1,5 µl ve 2 µl olacak şekilde denenmiştir. En iyi sonuç SCC8 marköründe olduğu gibi 1,5 µl ile hazırlanan karışımda alınmıştır. Daha sonra her iki markör için de ayrı ayrı PCR karışımları PCR tüplerine konulmuştur.

3.2.4. Markörlerin PCR amplifikasyon koşulları

Bir PCR reaksiyonunda çift zincirli DNA 90-95°C’de denatüre olduğu bilinmektedir. Çift sarmallı olan DNA iplikçikleri birbirinden ayrılıp tek sarmallı hale gelmektedir. 94°C’de 3 dakika bir döngü ile ilk denatürasyon yapılmıştır. Ardından 1 dakika denatürasyon yapılmıştır.

Primerlerin bağlanması (annealing) için gereken zamanın; primerin uzunluğuna, baz kompozisyonuna, primerin konsantrasyonuna ve sıcaklığa bağlı olduğu bilinmektedir. Bu nedenle 56°C’de 1 dk.’da yapılmıştır.

Primerin uzaması (extension), yani sentez aşaması uzama zamanı hedef DNA’nın konsantrasyonu ve uzunluğuna bağlı olarak gerçekleşmektedir. 72 °C’de dNTP ve Taq DNA polimeraz da reaksiyona girerek primer hedef DNA’nın karşısında senteze başlamıştır. Sentez aşaması 2 dk’da gerçekleşmiştir. Daha sonra 10 dk. daha

bekletilerek hatalı eşleşmelerin giderilmesi sağlanmıştır. Tüm bu işlemler PCR cihazı ile otomatik olarak yapılmıştır.

Çizelge 3.5. SCC8 ve SCF27 markörleri için amplifikasyon koşulları (Korpas vd 2009)

sıcaklık	süre	Döngü	işlem
94°C	3 dk.	1 döngü	denatürasyon
94°C	1 dk.	30 döngü	denatürasyon
56°C	1 dk.		annealing
72°C	2 dk.		extension
72°C	10 dk.	1 döngü	extension

3.2.5. Restriksiyon enzim çalışmaları ve agaroz jele yükleme

Bir dominant markör olan SCF27 için restriksiyon enzimi kullanılmamıştır. Örneklerin DNA'sından 2 µl pipetle alındıktan sonra bromofenol blue'dan da her bir örnek için 5 µl alınmıştır. Tüm bu örnekler %1.5'lik agaroz jele yüklenmişlerdir.

Kodominant markör olan SCC8 için ise yapılan PCR amplifikasyonundan sonra elde edilen ürüne 10 ünite (5 µl) *Bgl*II restriksiyon enzimi ilave edilip etüvde 37°C 'de 4 saat bekletilmiştir. Toplamda hacim 25µl'ye ulaşmıştır. Daha sonra DNA'lar tıpkı SCC27 marköründeki gibi 2 µl DNA ve 5 µl bromofenol blue pipetle alınıp karıştırılarak %1.5'lik agaroz jele yüklenmişlerdir (Korpas vd 2009). %1.5'lik agaroz jele yüklenen örnekler 100 V'luk elektroforez tankında 1 saat süreyle yürütülmüşlerdir. Jel içerisinde negatif kutuptan pozitif kutba doğru giden örnekler boylarına göre yol almışlar ve süre sonunda farklı yerlerde durmuşlardır. Durdukları yerlerde bandlar verirler. Etidyum bromid sayesinde UV transliminatör ile görünür hale gelen DNA'lar dijital kamera ile görüntülenmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. DNA Analizleri

Örnekler alınıp genomik DNA'nın izolasyonu ve optimizasyonu Lefort yöntemine göre yapıldıktan sonra nanodrop sonuçları alınmıştır. İki kez kontrollü bir şekilde yapılan analiz sonuçlarına göre DNA miktarları ve saflıkları belirlenmiştir.

UV ışınlarında 230, 260 ve 280 nm dalga boylarındaki ölçümlerin absorbans değerleri örneklerin DNA'larının saflıklarının değerlendirilmelerini sağlamaktadır. DNA miktarı bu tip analizlerde oldukça önem taşımaktadır. DNA miktarının gerekenden az olması yapılacak olan araştırmanın analizlerinde sorunlar yaşanmasına neden olabileceği için yeniden DNA izolasyonuna ihtiyaç duyulabilmektedir. DNA'nın saflığının en az miktarı kadar önemli olduğu bilinmektedir. Saf olmayan bir DNA, PCR cihazında çoğaltılamayabilir veya jeldeki görüntüsü yanıltıcı sonuçlar ortaya çıkartabilmektedir. UV ışığı altında 260 nm'de DNA'nın absorbe edildiği bilinmektedir. 230 nm'lik dalga boyunda ise polisakkaritlerin Emilimi daha fazladır. 280 nm'de proteinlerin Emilimi yoğun olmaktadır. Spektrofotometrede yapılan ölçümler sonucunda oranların hesaplamaları yapılarak aynı zamanda DNA'nın saflığı da tayin edilmektedir. Nanodrop ölçümlerinde ise araştırmacıların bu hesaplamaları yapmasına gerek kalmadan otomatik olarak sonuçlar alınabilmektedir.

A_{260nm}/A_{280nm} oranı 1.8-2 arasında alınan sonuç en ideal olan oran olarak bilinmektedir. Şayet ikinin çok üzerinde ise RNA kalıntısı olduğunu göstermektedir. Oranın 3'ün üzerinde olması halinde DNA parçalanmış anlamına gelmektedir. PCR çalışmaları için en ideal A_{260nm}/A_{280nm} oranı 1.6 ve üzerinde olan (1.6-2) oranlar olduğu bilinmektedir.

A_{260nm}/A_{230nm} oranı 1 civarında ise PCR cihazı çalışırken, 1.7-2 arasındaki değerler ideal oranlardır. 1'in altındaki oranlarda ise polisakkarit olduğu anlaşılmaktadır.

Araştırmada kullanılan örneklerin ölçümleri iki kez yapılmıştır. Bu iki ölçümün ortalamaları da Çizelge 4.1.'da verilmiştir.

Çizelge 4.1. Tüm örneklerin nanodrop sonucuna göre ölçülen DNA saflık ve miktarları

Melezler ve kontrol çeşitler	Örnek	DNA miktarı	DNA saflık değerleri	
		(ng/μl)	A _{260nm} /A _{280nm}	A _{260nm} /A _{230nm}
Siyah Korent	K	180,09	1,89	1,46
Sultani Çekirdeksiz	S	593,86	1,96	1,97
Bozcaada Çavuşu	Ç	135,83	1,95	1,66
Trakya İlkeren	İ	59,38	1,83	1,21
Çınarlı Karası (37) x Tekirdağ Çekirdeksizi (T)	1	64,26	1,92	1,12
	2	623,82	1,93	1,83
	3	75,94	2,01	1,53
	4	121,52	1,86	1,31
	5	132,26	1,93	1,67
	6	122,47	2,03	1,61
	7	23,77	1,77	0,94
	8	114,45	1,89	1,65
	9	86	2	1,55
	10	165,5	1,96	1,56

Çizelge 4.1.'in Devamı

Melezler ve kontrol çeşitler	Örnek	DNA miktarı	DNA saflık değerleri	
		(ng/μl)	A_{260nm}/A_{280nm}	A_{260nm}/A_{230nm}
Italia (7) x Barış (D)	11	19,86	1,80	0,7
	12	560,12	1,99	1,89
	13	80,41	1,97	1,45
	14	624,17	1,96	1,94
	15	65,02	1,92	1,35
	16	94,20	1,92	1,47
	17	869,95	2,01	2,06
	18	64,10	1,89	1,02
	19	26,34	1,92	0,92
	20	57,10	1,84	0,92
Italia (7) x Perlette (B)	21	1047,08	1,96	1,93
	22	997,40	1,94	1,78
	23	557,28	1,85	1,88
	24	186,79	1,98	1,87
	25	230,20	1,97	1,80
	26	152,14	1,91	1,58
	27	551,93	1,89	1,31
	28	42,15	1,90	1,03
	29	76,95	1,89	1,02
	30	31,23	1,87	0,91

Çizelge 4.1.'in Devamı

Melezler ve kontrol çeşitler	Örnek	DNA miktarı	DNA saflık değerleri	
		(ng/μl)	A_{260nm}/A_{280nm}	A_{260nm}/A_{230nm}
İri Kara (40) x Perlette (B)	31	66,16	1,91	1,12
	32	258,01	1,94	1,83
	33	27,94	1,89	0,92
	34	56,20	1,96	1,20
	35	60,24	1,94	1,15
	36	663,11	1,94	1,92
	37	74,16	2,05	1,72
	38	827,20	1,99	1,88
	39	547,93	1,89	1,53
	40	94,01	1,94	1,40
Italia(7) x Beauty Seedless (C)	41	114,51	1,94	1,13
	42	459,67	1,94	1,58
	43	580,43	1,94	1,04
	44	1037,89	1,97	1,96
	45	181,47	1,95	1,65
	46	54,85	1,86	1,03
	47	30,77	1,93	1,00
	48	74,51	1,98	1,01
	49	580,16	1,97	1,17
	50	120,00	1,98	1,67

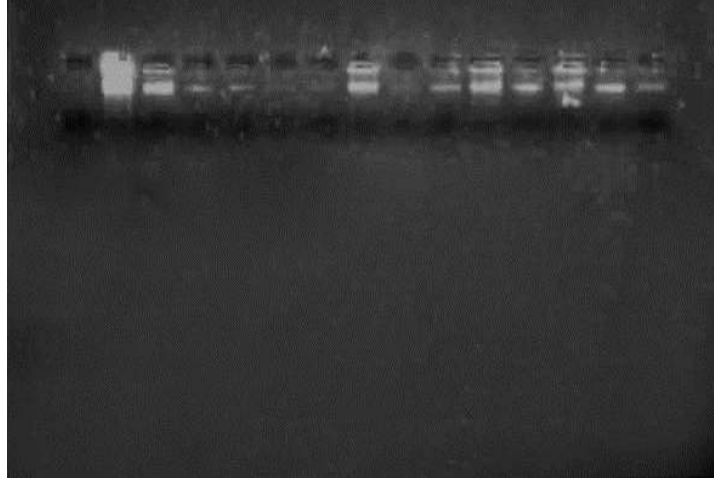
Araştırmada kontrol amaçlı bulunan Siyah Korent, Sultani Çekirdeksiz, Bozcaada Çavuşu ve Trakya İlkeren hariç, diğer örneklerin 45 adedinde A_{260nm}/A_{280nm} oranı için

en ideal değer olan 1,80-2,0 arasında sonuç elde edilmiştir. Birinci ve onuncu örnek arası ınarlı Karası (37) ve Tekirdağ Çekirdeksizi (T)’nin melezlenmesi sonunda meydana gelen bireylerdir ve bu bireylerin 7 adedinde ideal sonuç alınmıştır. On birinci ve yirminci örnekler arasındaki toplam ideal miktarı 9 adettir. Bu bireyler Italia (7) ile Barış (D)’ın melezlenmesiyle elde edilmiştir. Yirmi bir ile otuz arasındaki rnekler Italia (7) ve Perlette (B) melezidir ve hepsi ideal değerleri vermiştir. İri Kara (40) ve Perlette (B) melezinden alınan örnekler ise otuz bir ve kırk arasındadır. Toplamda 9 adedi ideal sonuçları vermiştir. Italia (7) ve Beauty Seedless (C) melezinden oluşan bireylerin ise hepsi ideal sonuçları vermiştir. Bunların dışında 3. rnek 2,01, 6. rnek 2,03, 7. rnek 1,77, 17. rnek 2,01, 37. rnek 2,05 değerleri elde edilmiştir. Ancak onlarda da PCR cihazı çalışmıştır ve sonuç alınmıştır. Hiçbir rnekte RNA kalıntısına ve parçalanmış DNA’ya rastlanmamıştır (izelge 4.1.).

A_{260nm}/A_{230nm} oranı için en ideal değer olan 1,70-2,0 arasında toplamda 13 adet bireyde sonuç alınmıştır. ınarlı Karası (37) ve Tekirdağ Çekirdeksizi (T) melezi bireylerinin (1. rnek ile 10. rnek arası) 1 tanesinde, Italia (7) ile Barış (D)’ın melezlenmesiyle elde edilen bireylerin ise (11. rnek ile 20. rnek arası) 2 tanesinde ideal sonuç alınmıştır. Italia (7) ile Perlette (B)’nin melezlenmesiyle elde edilen bireylerin ise (21. rnek ile 30. rnek arası) 5 tanesinde, İri Kara (40) ve Perlette (B) melezinden alınan örnekler ise otuz bir ve kırk arasındadır. Toplamda 4 adedi ideal sonuçları vermiştir. Italia (7) ve Beauty Seedless (C) melezinden oluşan bireylerden sadece bir tanesi ideal sonuçları vermiştir. A_{260nm}/A_{230nm} oranı birin altında olan 1. ve 10. rnek arasında 1 adet birey, 11. ve 20. rnek arasında 3 adet birey, 21. ve 30. rnek arasında ise 1 adet birey, 31. ve 40. rnek arasında 1 adet birey sonuç vermiştir. Ancak bu örneklerde da PCR alışmıştır. Diğer bireyler ise 1,7 ve 1 arasında sonuç vermiştir (izelge 4.1.).

Örnekler

S K Ç 1 İ 19 2 7 3 4 5 6 8 10



Şekil 4.1. Araştırmada kullanılan kimi örneklerin DNA görüntüleri

Agaroz jel elektroforez sonuçları ile de kullanılan DNA'nın PCR çalışmaları için uygun olduğu belirlenmiştir. Şekil 4.1.'de nanodrop ölçümleri yapılmış olan kimi örneklerin jeldeki DNA görüntüleri bulunmaktadır. Şekil 4.1'de görüldüğü üzere bazı örneklerden elde edilen DNA'nın kalite ve kantitesinde farklılıklar bulunmaktadır. Bu durum bundan sonra yapılacak çalışmalarda göz önüne alınarak daha fazla örnekten DNA izolasyonunun gerçekleştirilmesi gerektiğini ve farklı DNA izolasyon yöntemlerinin örneğin; Karaca vd (2005)'e göre DNA izolasyonlarının gerçekleştirilmesinin gerekliliğini göstermektedir.

4.2. PCR Analizleri

SCAR analizinde kullanılan SCC8 ve SCF27 primerleri 1998 yılında Lahogue tarafından geliştirilen amplifikasyon koşulları yapılmıştır.

4.2.1. SCC8 Markörü:

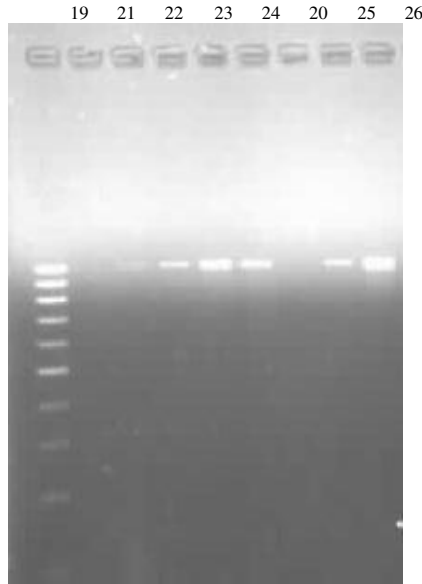
SCC8 ampikonunun *Bgl*III restriksiyon enzimi ile kesim sonucu elde edilen bulgularda "+/+ ", "+/- " ve "-/- " skorlamaları gerçekleştirilmiştir. Bu durum analiz işlemi sonucunda tek band vermesi durumunda çekirdeksizliği sembolize etmek için

"SCC8+/SCC8+" ("+/+" durumu), çekirdekliliği sembolize etmek için "scc8-/scc8-" ("-/-" durumu), çekirdekli-çekirdeksiz karışım durumunu sembolize etmek için ise "SCC8+/scc8-" ("+/-" durumu) sembolize durumları kullanılmıştır.

Restriksiyon kesim enzimleriyle elde edilen sonuçlarının band görüntülerine göre tek band verenler homozigot baskın çekirdeksiz fenotipini yansıtırken, iki band verenler homozigot çekinik “-/-” çekirdekli, üç band verenler ise heterozigot baskın “+/-” çeşitli oranlarda çekirdekli fenotipini yansıtmıştır (Françoise vd 2001).

Araştırmada kullanılan popülasyonun SCC8 primeri ile PCR amplifikasyon ürünleri oluşturulmuştur (Şekil 4.2). SCC8 lokusunda genotipin jeller üzerindeki DNA ürünlerinin %1,5’luk jelde yürütülmüştür. PCR ürün boyutu çekirdekli, çekirdeksiz veya yarı çekirdeklilik durumlarında dahi tek bir amplikon elde edilmiştir. Elde edilen amplikon büyüklüğü yaklaşık olarak 1 kb olup birden fazla (en az 2) farklı fragmandan oluşmaktadır.

Örnekler



Şekil 4.2. Araştırmada kullanılan bazı genotiplerin SCC8 primer çifti ile oluşturulan PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü

Şekil 4.2.'de SCC8 primeri ile PCR cihazında çoğaltılan kimi örneklerle ait resim sunulmuştur. Daha sonra %1,5'luk agaroz jelde yürütölüp yukarıdaki örnek görüntüdeki gibi bandlar elde edilmiştir. Band vermeyenler tekrarlanmıştır.

Buna göre, devamında *Bg/III* restriksiyon enzimi ile kesilerek elde edilen ürünlerin fenotipik sonuçları aşağıdaki çizelgede verilmiştir.

Band veren tüm örneklerin PCR ürünleri *Bg/III* enzimiyle kesildikten sonra elde edilen görüntülerdeki band sayılarına göre sonuçlar kaydedilmiştir.

Çizelge 4.2. Popülasyonun SCC8 markörüne ve *Bgl*/II kesim enzimine göre sonuçlar ve açıklamaları

Melezler	Örnek	Genotip	Markör SCC8	<i>Bgl</i> /II Kesim Enzimi ile Sonucu	Açıklama
–	K	Siyah Korent	1	+/+	çekirdeksiz
–	S	Sultani Çekirdeksiz	1	+/+	çekirdeksiz
–	Ç	Bozcaada Çavuşu	1	-/-	çekirdekli
Çınarlı Karası (37) x Tekirdağ Çekirdeksizi (T)	İ	Trakya İlkeren	1	-/-	çekirdekli
	1	(37 x T)-173	1	-/-	çekirdekli
	2	(37 x T)-174	1	-/-	çekirdekli
	3	(37 x T)-175	1	+/-	çekirdekli / çekirdeksiz karışık
	4	(37 x T)-177	1	-/-	çekirdekli
	5	(37 x T)-179	1	-/-	çekirdekli
	6	(37 x T)-193	1	-/-	çekirdekli
	7	(37 x T)-226	1	-/-	çekirdekli
	8	(37 x T)-228	1	-/-	çekirdekli
	9	(37 x T)-231	1	-/-	çekirdekli
	10	(37 x T)-238	1	+/-	çekirdekli / çekirdeksiz karışık

Çizelge 4.2.'nin Devamı

Melezler	Örnek	Genotip	Markör SCC8	Bg/II Kesim Enzimi ile Sonucu	Açıklama
Italia (7) x Barış (D)	11	(7 x D)-214	1	+/-	çekirdekli / çekirdeksiz karışık
	12	(7 x D)-267	1	+/-	çekirdekli / çekirdeksiz karışık
	13	(7 x D)-273	1	+/-	çekirdekli / çekirdeksiz karışık
	14	(7 x D)-279	1	-/-	çekirdekli
	15	(7 x D)-280	1	+/-	çekirdekli / çekirdeksiz karışık
	16	(7 x D)-284	1	+/+	çekirdeksiz
	17	(7 x D)-299	0		
	18	(7 x D)-322	1	+/+	çekirdeksiz
	19	(7 x D)-337	0		
	20	(7 x D)-339	0		

Çizelge 4.2.'nin Devamı

Melezler	Örnek	Genotip	Markör SCC8	Bg/II Kesim Enzimi ile Sonucu	Açıklama
Italia (7) X Perlette (B)	21	(7 x B)-48	1	+/-	çekirdekli / çekirdeksiz karışık
	22	(7 x B)-50	1	+/-	çekirdekli / çekirdeksiz karışık
	23	(7 x B)-51	1	+/+	çekirdeksiz
	24	(7 x B)-53	1	+/+	çekirdeksiz
	25	(7 x B)-96	1	+/+	çekirdeksiz
	26	(7 x B)-103	1	+/-	çekirdekli / çekirdeksiz karışık
	27	(7 x B)-106	1	+/+	çekirdeksiz
	28	(7 x B)-117	1	+/+	çekirdeksiz
	29	(7 x B)-160	1	+/+	çekirdeksiz
	30	(7 x B)-165	1	+/+	çekirdeksiz
İri Kara (40) x Perlette (B)	31	(40 x B)-13	0		
	32	(40 x B)-18	1	+/+	çekirdeksiz
	33	(40 x B)-19	0		
	34	(40 x B)-20	1	+/+	çekirdeksiz
	35	(40 x B)-26	1	+/+	çekirdeksiz
	36	(40 x B)-37	1	+/+	çekirdeksiz
	37	(40 x B)-39	1	+/+	çekirdeksiz
	38	(40 x B)-56	1	+/+	çekirdeksiz
	39	(40 x B)-57	1	+/+	çekirdeksiz
	40	(40 x B)-88	1	+/+	çekirdeksiz

Çizelge 4.2.'nin Devamı

Melezler	Örnek	Genotip	Markör SCC8	<i>Bg/II</i> Kesim Enzimi ile Sonucu	Açıklama
Italia (7) x Beauty Seedless (C)	41	(7 x C)-1	1	+/+	çekirdeksiz
	42	(7 x C)-29	1	+/+	çekirdeksiz
	43	(7 x C)-102	1	+/+	çekirdeksiz
	44	(7 x C)-109	1	+/+	çekirdeksiz
	45	(7 x C)-111	1	+/+	çekirdeksiz
	46	(7 x C)-120	1	+/+	çekirdeksiz
	47	(7 x C)-133	0		
	48	(7 x C)-142	0		
	49	(7 x C)-150	1	+/-	çekirdekli / çekirdeksiz karışık
	50	(7 x C)-155	1	+/+	çekirdeksiz

Elde edilen verilere göre tüm sonuçlar Çizelge 4.2.' de verilmiştir. Buna göre; band görülmeyen fert sayısına bakıldığında tüm popülasyonda toplamda 7 adet bulunmuştur. Bunların 3 adedi Italia (7) ile Barış (D) melezinde, 2 adedi İri Kara (40) ile Perlette (B) melezini, 2 adedini de Italia (7) ile Beauty Seedless (C) melezinden meydana gelen bireyler oluşturmaktadır.

Çizelge 4.3. Popülasyonun SCC8 markörüne göre toplam fert sayıları ve yüzde sonuçları

Melezler	SCC8 +/+ (çekirdeksiz fert sayısı)	SCC8 +/- (çekirdekli fert sayısı)	SCC8 +/- (çekirdekli / çekirdeksiz karışık fert sayısı)	Çekirdeksiz fert yüzdeleri (%)	Çekirdekli fert yüzdeleri (%)	çekirdekli / çekirdeksiz karışık fert yüzdeleri (%)
37 x T	0	8	2	%0	%80	%20
7 x D	2	1	4	%28,57	%14,29	%57,14
7 x B	7	0	3	%70	%0	%30
40 x B	8	0	0	%100	%0	%0
7 x C	7	0	1	%87,5	%0	%12,5
Toplam	24	9	10	%55,81	%20,93	%23,26

Elde edilen bulgular özet halinde Çizelge 4.3.'de fert sayıları ve yüzdeleri ile birlikte verilmektedir. Araştırmada kullanılan tüm örneklerin kesim sonuçlarının band görüntülerine göre (kontroller hariç) tek band verenler homozigot baskın çekirdeksiz fenotipini yansıtan toplamda 24 adet birey bulunmaktadır. Çınarlı Karası (37) ve Tekirdağ Çekirdeksizi (T) melezinin genotiplerinde hiç çekirdeksiz ferde rastlanmamıştır. Çekirdeksiz fenotipini yansıtan fertler diğer mezlere aittir. Italia (7) ve Barış (D) melezine ait 2 adet genotip, Italia (7) ve Perlette (B) melezine ait 7 adet genotip, İri Kara (40) ve Perlette (B) melezine ait 8 adet genotip, Italia(7) ve Beauty Seedless (C) melezinde ise 7 adet genotip homozigot baskın çekirdeksiz olarak bulunmuştur. Yüzdesel oranda incelendiğinde ise, çekirdeksiz fertler en yüksek Italia (7) ve Perlette (B) melezinde, İri Kara (40) ve Perlette (B) melezinde, Italia (7) ve Beauty Seedless (C) melezinde %70, %100 ve %87,5 oranlarında bulunmuştur. Italia (7) ve Barış (D) melezinde bu oran %28,57'dir. Toplam popülasyonun %55,81'i homozigot baskın çekirdeksiz olarak bulunmuştur.

İki adet band veren çekirdekli fenotipini yansıtan bireyler ise 9 adet olarak bulunmuştur ve toplam popülasyona oranı ise %20,93'tür. Çekirdeklilik fenotipini yansıtan en fazla birey sayısı Çınarlı Karası (37) ve Tekirdağ Çekirdeksizi (7) melezlerinin bireyleridir. 8 adet fert %80 oranla en fazla oranı oluşturmaktadır. Italia Barış melezinde ise bir genotip %14,29 oranı ile çekirdeklilik fenotipini yansıtan bir fert bulunurken diğer melezlerde ise homozigot çekinik çekirdekli genotipi bulunmamıştır.

Çekirdekli / çekirdeksiz karışık fenotipi yansıtan ve jel görüntülerde üç band veren bireyler ise toplamda 10 adet olarak saptanmıştır. Bunların 2 adedi Çınarlı Karası (37) ve Tekirdağ Çekirdeksizi (T) melezine, 4 adedi Italia (7) ve Barış (D) melezine, 3 adedi Italia (7) ve Perlette (B) melezine ve 1 adedi de Italia (7) ve Beauty Seedless (C) melezine aittir. Bu bireylerin yüzdesel oranlarına baktığımızda Çınarlı Karası ve Tekirdağ Çekirdeksizi melezinde %20, Italia ve Barış melezinde %57,14, Italia ve Perlette melezinde %30, Italia ve Beauty Seedless melezinde ise %12,5 bulunmuştur.

Çizelge 4.2.2'de 7 bireyde SCC8 primer çifti ile yapılan çalışmalarda toplam 7 bireyde PCR ürünü elde edilememiştir. Bu bireylere ait PCR çalışmaları tekrarlanmış ancak herhangi bir band elde edilememiştir. Bu nedenden dolayı bu bireylerde SCC8 primer çiftlerinin bağlanma bölgelerinde rekombinasyonun olduğu düşünülmektedir.

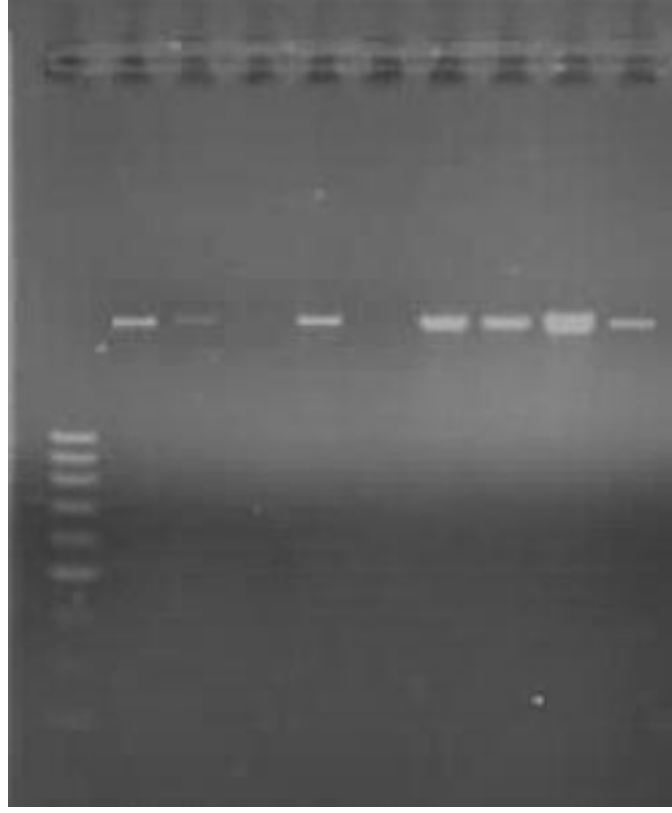
4.2.2. SCF27 Markörü:

Mejia ve Hindrichsen 2003 yılında yapmış oldukları araştırmada SCF27 markörü için elde edilen jel görüntülerinde band vermeyen genotiplerin çekirdeklilik fenotipini yansıttığını verenlerin ise çekirdeksizlik fenotipini yansıttığını belirtmiştir. Elde edilen ilk jel görüntülerinde band vermeyen bireyler üzerinde tekrar çalışılıp görüntülenerek doğru olup olmadığı yeniden kontrol edilmiştir.

Amplifikasyon ürünleri agaroz jelde yürütüldükten sonra bandların varlıkları tespit edilmiştir (Şekil 4.3.).

Örnekler

S 12 9 14 17 21 22 23 24



Şekil 4.3. Araştırmada kullanılan bazı genotiplerin SCF27 primer çiftleri ile oluşturulan PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel üzerindeki görüntüsü

Araştırmada kullanılan popülasyonun SCF27 primer çiftleri ile oluşturulan PCR ürün sonuçları ve açıklamaları Çizelge 4.4.'de bunların fert sayıları ve açıklamaları verilmektedir.

Çizelge 4.4. Popülasyonun SCF27 markörüne göre fert sayıları ve açıklamaları

Melezler	Örnek	Genotip	Markör SCF27	Açıklama
–	K	Siyah Korent	1	çekirdeksiz
–	S	Sultani Çekirdeksiz	1	çekirdeksiz
–	Ç	Bozcaada Çavuşu	0	çekirdekli
–	İ	Trakya İlkeren	0	çekirdekli
Çınarlı Karası (37) x Tekirdağ Çekirdeksizi (T)	1	(37 x T)-173	1	çekirdeksiz
	2	(37 x T)-174	0	çekirdekli
	3	(37 x T)-175	0	çekirdekli
	4	(37 x T)-177	0	çekirdekli
	5	(37 x T)-179	0	çekirdekli
	6	(37 x T)-193	0	çekirdekli
	7	(37 x T)-226	0	çekirdekli
	8	(37 x T)-228	0	çekirdekli
	9	(37 x T)-231	0	çekirdekli
	10	(37 x T)-238	0	çekirdekli
Italia (7) X Barış (D)	11	(7 x D)-214	1	çekirdeksiz
	12	(7 x D)-267	1	çekirdeksiz
	13	(7 x D)-273	1	çekirdeksiz
	14	(7 x D)-279	1	çekirdeksiz
	15	(7 x D)-280	1	çekirdeksiz
	16	(7 x D)-284	1	çekirdeksiz
	17	(7 x D)-299	0	çekirdekli
	18	(7 x D)-322	0	çekirdekli
	19	(7 x D)-337	0	çekirdekli
	20	(7 x D)-339	0	çekirdekli

Çizelge 4.4.'ün Devamı

Melezler	Örnek	Genotip	Markör SCF27	Açıklama
Italia (7) x Perlette (B)	21	(7 X B)-48	1	çekirdeksiz
	22	(7 X B)-50	1	çekirdeksiz
	23	(7 X B)-51	1	çekirdeksiz
	24	(7 X B)-53	1	çekirdeksiz
	25	(7 X B)-96	0	çekirdekli
	26	(7 X B)-103	1	çekirdeksiz
	27	(7 X B)-106	1	çekirdeksiz
	28	(7 X B)-117	0	çekirdekli
	29	(7 X B)-160	1	çekirdeksiz
	30	(7 X B)-165	0	çekirdekli
İri Kara (40) X Perlette (B)	31	(40 X B)-13	0	çekirdekli
	32	(40 X B)-18	0	çekirdekli
	33	(40 X B)-19	0	çekirdekli
	34	(40 X B)-20	0	çekirdekli
	35	(40 X B)-26	0	çekirdekli
	36	(40 X B)-37	0	çekirdekli
	37	(40 X B)-39	0	çekirdekli
	38	(40 X B)-56	1	çekirdeksiz
	39	(40 X B)-57	0	çekirdekli
	40	(40 X B)-88	1	çekirdeksiz

Çizelge 4.4.'ün Devamı

Melezler	Örnek	Genotip	Markör SCF27	Açıklama
Italia (7) x Beauty Seedless (C)	41	(7 x C)-1	1	çekirdeksiz
	42	(7 x C)-29	1	çekirdeksiz
	43	(7 x C)-102	0	çekirdekli
	44	(7 x C)-109	0	çekirdekli
	45	(7 x C)-111	0	çekirdekli
	46	(7 x C)-120	0	çekirdekli
	47	(7 x C)-133	1	çekirdeksiz
	48	(7 x C)-142	1	çekirdeksiz
	49	(7 x C)-150	0	çekirdekli
	50	(7 x C)-155	0	çekirdekli

Buna göre; araştırmada kontrol amaçlı kullanılan Siyah Korent, Sultani Çekirdeksiz, Çavuş ve Cardinal çeşitleri hariç 50 genotipte toplamda 30 adet (0) yani çekirdekli birey saptanırken, band veren (1) çekirdeksiz 20 adet birey bulunmuştur. Bu bulguların melezlerdeki fert sayıları ve bunların yüzdesel oranları aşağıdaki Çizelge 4.5.'de gösterilmektedir.

SCF27 markörü homozigot ve heterozigotluğu ayırtıramamaktadır. Bu nedenden dolayı dominant bir markör sistemidir. Bandın bulunamaması çekirdekliliği göstermektedir.

Çizelge 4.5. Popülasyonun SCF27 markörüne göre toplam fert sayıları ve yüzde sonuçları

Melezler	SCF27 markörüne göre çekirdeksiz fert sayısı	SCF27 markörüne göre çekirdekli fert sayısı	% çekirdeksizlik	% çekirdeklilik
37 x T	1	9	%10	%90
7 x D	6	4	%60	%40
7 x B	7	3	%70	%30
40 x B	2	8	%20	%80
7 x C	4	6	%40	%60
Toplam	20	30	%40	%60

Çizelge 4.5.'de de gösterildiği üzere SCF27 markörüne göre toplamda 20 adet fenotipik olarak çekirdeksizlik özelliğini yansıtan birey bulunmuştur. Bu toplam miktarı melezlere göre incelediğimizde birbirinden farklılık göstermektedirler. Buna göre en yüksek miktarda çekirdeksiz fert sayısı Italia (7) ile Perlette (B) melezinde bulunmuştur. Bu melezde 7 adet %70 oranında çekirdeksizlik fenotipini yansıtan fert saptanmıştır. Italia (7) ile Barış (D) melezinde 6 adet çekirdeksiz fert bulunmaktadır. Bu miktarın yüzdesel oranı %60'dır. Italia (7) ile Beauty Seedless (C) melezinde bu miktar 4 adettir ve yüzdesel oranı %40'tır. İri Kara (40) ve Perlette (B) melezinde bu miktar 2 adede (%20) inerken Çınarlı Karası (37) ile Tekirdağ Çekirdeksizi (T) melezinde sadece 1 adet çekirdeksizlik fenotipini yansıtan birey bulunmaktadır.

SCF27 markörüne göre çekirdeklilik fenotipini yansıtan bireyler toplamda 30 adettir. Çınarlı Karası (37) ile Tekirdağ Çekirdeksizi (T) melezinde 9 adet (%90), Italia (7) ve Barış (D) melezinde 4 adet (%40), Italia (7) ve Perlette (B) melezinde 3 adet (%30), İri

Kara (40) ile Perlette (B) melezinde 8 adet (%80), Italia (7) ve Beauty Seedless (C) melezinde ise 6 adet (%60) bulunmaktadır.

Yapılan çalışmada her iki markörle elde edilen bulguları karşılaştırdığımızda aşağıdaki örneklerde olduğu gibi birbirlerinden farklı sonuçlar da elde edilmiştir (Çizelge 4.3. ve Çizelge 4.5.). Bazı genotipler markörün birinde çekirdekli olarak görünürken diğerinde çekirdekli olarak görünmektedir veya durumu SCC8 marköründe çekirdekli / çekirdeksiz karışık olan bir genotip, SCF27 marköründe çekirdeli veya çekirdeksiz gözükebilmektedir. Ancak her iki markörde de aynı sonucu veren genotipler mevcuttur. Melezleme sonucu elde edilen bireylerin yeni olmaları ve henüz verime yatmamalarından dolayı çekirdeksizlikleri konusunda morfolojik olarak veya duyuşal olarak kesin bir karara varılmamış olması sonuçların değerlendirilmesini güçleştirmektedir. Bu nedenle moleküler düzeyde markörlerle yapılan değerlendirmelerin ileriki yıllarda melez genotiplerde yapılacak duyuşal değerlendirmelerle karşılaştırılarak kesin sonuca varılması gerekir.

Çınarlı Karası (37) ile Tekirdağ Çekirdeksizi (T) melezinde SCC8 markörüne göre 1 no.lu örnek çekirdeklilik fenotipini yansıtırken, SCF27 markörüne göre çekirdeksizlik fenotipini yansıtmaktadır.

Italia (7) ile Barış (D) melezinde SCC8 markörüne göre 14 no.lu örnek çekirdeklilik fenotipini yansıtırken, SCF27 markörüne göre çekirdeksizlik fenotipini yansıtmaktadır. Ayrıca 18 no.lu örnek SCF27 markörüne göre çekirdekli sonucunu verirken 18 no.lu örnekte ise çekirdeksiz sonucu elde edilmiştir.

Italia (7) ile Perlette (B) melezinde markörleri karşılaştırdığımızda 25 no.lu örnek, 28 no.lu örnek ve 30 no.lu örnek çekirdeklilik fenotipini yansıtan bireylerken SCC8 markörüne göre hepsi çekirdeksizlik fenotipini yansıtmaktadır.

İri Kara (40) ile Perlette (B) melezinde bu farklılıklar oldukça fazladır. SCF27 markörüne göre 32 no.lu, 34 no.lu, 35 no.lu, 36 no.lu, 37 no.lu ve 39 no.lu örneklerde

çekirdekli sonucu elde edilirken, SCC8 markörüne göre hepsi çekirdeksiz sonucu elde edilmiştir.

Italia (7) ve Beauty Seedless (C) melezinde de farklılıklar fazladır. SCF27 marköründe 43 no.lu, 44 no.lu, 45 no.lu, 46 no.lu ve 50 no.lu örnekler çekirdeklilik fenotipini yansıtırken SCC8 marköründe ise çekirdeksizlik fenotipini yansıtmaktadır.

Toplamda incelendiğinde tüm popülasyonda 16 adet bireyde farklı fenotipleri yansıtan sonuçlar elde edilmiştir. SCC8 markörü çekirdeksiz iki ebeveyninin melezlerinden oluşan fertlerde daha başarılı sonuçlar verdiği bilinmektedir (Lahoque vd 1998). Araştırmada kullanılan fertlerin ebeveynlerinin çekirdekli ve çekirdeksiz melezlerinden oluşması SCC8 ve SCF27 markörlerinin birbirinden farklı sonuçlar vermesinin sebeplerinden biri olabilir. Islah çalışmalarında SCF27 markörü kullanıldığı zaman band vermeyen bireylerin iptal edilmesiyle çalışma daha kısa sürede sonuçlanabilir. Ayrıca çekirdeksiz (stenospermokarpik özellikteki) iki ebeveynin melezlenmesi ile elde edilen bireylerin analizlerinde SCC8 markörü de kullanılabilir.

Bouquet ve Danglot'un 1996'daki hipotezine göre stenospermokarpik çekirdeksizlik birbirini tamamlayan 3 çekinik gen tarafından ve bunları düzenleyen dominant bir gen tarafından kontrol edilmektedir. Tane büyüklüğü ve çekirdeksizlik için QTL lokusu bulunmuştur. Çekirdekli çekirdeksiz melezlerine ait bireylerde yapılan araştırmalarda %74-%82 arasında doğruluk payına ait sonuçlar alınmıştır (Korpas vd 2009). Adam Blondon 2001'de null allellerin de etkili olabileceğini açıklamıştır. SCF27⁺ allelinin varlığı veya yokluğu çekirdeksizlik ilişkisini ortaya koymaktadır (Mejia ve Hindrichsen 2003).

5. SONUÇ

Asmanın birçok tüketim şekli bulunmaktadır. Bu tüketim şekillerinden en önemlisi olan sofralık tüketim şeklinde en önemli özelliklerden biri çekirdeksizliktir. Çekirdeksiz üzüm çeşitleri çekirdekliye oranla daha pahalı olmaktadır. Yeni çekirdeksiz çeşitlerin elde edilebilmesi için ıslah çalışmaları yapılmaktadır. Çekirdeksizliğin tespiti için yapılan analizlerde moleküler markör analiz yöntemleri önemli yer tutmaktadır. Çünkü hem daha objektif hem de zamandan ve ekonomiden tasarruf sağlamaktadır. Bu araştırmada şimdiye kadar asmada çekirdeksizlik özelliğinin tespiti için geliştirilmiş olan moleküler markörler yardımıyla erken seleksiyonun yapılabilirliği üzerine çalışılmıştır.

Araştırmada asmada DNA dizisi bilinen ve çekirdeksizlik fenotipi ile ilgili majör lokus “sdl” ile bağlantılı olduğu tespit edilen 2 adet markör, SCC8 ve SCF27 kullanılmıştır. Araştırmada kullanılan popülasyonun genel özelliği ebeveynlerden birinin çekirdekli diğerinin ise çekirdeksiz olmasıdır. 50 adet genotipten meydana gelen popülasyonun SCC8 markörü ile %55,81 oranında çekirdeksizlik fenotipini yansıtan birey saptanırken, %20,93 oranında çekirdekli fenotipini yansıtan birey saptanmıştır. %23,26 oranında çekirdekli / çekirdeksiz karışık fert sayısı bulunmuştur. Bunlara karşılık %14 oranında primer çiftlerinin bağlanabileceği sekansların bulunmadığı rekombinasyonlar tespit edilmiştir.

SCF 27 markörü ile %40 oranında çekirdeksiz fert elde edilirken %60 oranında çekirdekli fert elde edilmiştir. Çalışmada yararlanılan bireylerden elde edilen sonuçlara göre SCC8 primer çiftlerinin daha çok çekirdeksiz (stenospermokarpik özellikteki) ebeveynlerin melezlenmesiyle elde edilen fertlerde daha iyi sonuçlar verebileceği düşünülmektedir. SCC8 ve SCF27 markörlerinin farklı sonuçlar verdiği fertler de bu nedene dayanmaktadır. Islah çalışmalarında bu tip ebeveynler seçilirse SCC8 de daha net sonuçlar verebilir. Ayrıca yine ıslah çalışmalarının süresini kısaltabilmek için popülasyon için SCF27 markörü kullanıldığında band vermeyen bireylerin iptal edilebilir.

SCF27 primer çifti homozigotlukla heterozigotluğu ayırt edememektedir. Ancak bu primer çifti kullanılarak ıslah çalışmalarını kısaltmak mümkündür. Örneğin ıslah çalışmalarında SCF27 primer çifti kullanılarak homozigot çekirdekli bireyler elimine edilebilir ve geriye kalan heterozigot ve homozigot çekirdeksiz fertler ıslah çalışmalarına alınabilir.

Bu tez çalışmasında elde edilen veriler bir arada değerlendirildiğinde SCC8 markörünün etkin bir şekilde kullanılabilmesi için eldeki popülasyonların çekirdeksiz-çekirdeksiz melezleri olması ve bu melezlerde homozigot ve heterozigot bireylerin etkin bir şekilde bu markörle ayırt edilebileceği belirlenmiştir. SCC8 markörünün kodominant bir markör olması nedeni ile fertlerin genotipleri etkin bir şekilde belirlenebilmektedir.

Çalışmada her iki markör tekniğinden alınan sonuçlar arasında bazı durumlarda uyumsuzluklar belirlenmiştir. Bu uyumsuzlukların nedeni her ne kadar markörler ile çekirdeksizlik geni arasındaki mesafenin uzun olması ve rekombinasyonlardan kaynaklanabileceği öngörülmüş olsa da popülasyon sayısının çok düşük tutulması, PCR çalışmalarında ortaya çıkan olumsuzluklar ve araştırma olanaklarından da kaynaklanabileceği göz önüne alınmalıdır.

6. KAYNAKLAR

- BARIŞ, C. ve GÜRNİL, K. 1991. Üzüm çeşitlerinde (*V. Vinifera* L.) çekirdeksizliğin kalıtımı. *Bahçe*, 20 (1-2): 87-100.
- BOUQUET, A. and DANGLOT, Y. 1996. Inheritance of seedlessness in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Vitis*, 35(1): 35-42.
- CABEZAS, J.A., CERVERA M.T., GARCIA L., CARRENO J. and MARTINEZ-ZAPATER, J.M. 2006. A genetic analysis of seed and berry weight in grapevine. *Genome* 48:1572-1585.
- ÇELİK H., AĞAOĞLU S., FİDAN Y., MARASALI B. ve SÖYLEMEZOĞLU G. 1998. Genel Bağcılık. Fersa Matbaacılık, Sunfidan A.Ş. Mesleki Kitaplar serisi:1, Ankara, 253 ss.
- ERGÜL A. 2000. Asmalarda (*Vitis vinifera* L.cvs. Genomik DNA parmak izi analizi ile moleküler karakterizasyon. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, 86 ss.
- ELİDEMİR A. 2006. Çekirdeksiz x Çekirdeksiz üzüm melezlerinden embriyo kültürü yoluyla genotip eldesi ve RAPD yöntemiyle bu genotiplerin tanısı üzerine araştırmalar. Doktora tezi, Akdeniz Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, 181 ss.
- FRANÇOISE, A., BLONDON, A., LAHOGUE-ESNAULT, F., BOUQUET, A., BOURSQUOT, J.M. and THIS P. 2001. Usefulness of two scar markers for marker-assisted selection of seedless grapevine cultivars. *Vitis*, 40(3): 147-155.
- KARACA, M. 2009. DNA moleküler marker yöntemleri ders notları.
- KARACA, M., İNCE, A.G., ELMASULU, S.Y., ONUS, A.N., TURGUT, K. 2005. Coisolation of genomic and organelle DNAs from 15 genera and 31 species of plants. *Anal. Biochem.*, 343: 353-355.
- İNCE, A.G., AYDIN, A., KARACA, M., ONUS, A.N. 2011. Moleküler markır tekniklerinin gelişimi ve bitki ıslahı ve tohumculukta kullanım alanları. Türkiye IV. Tohumculuk Kongresi, Erol Ofset, 264-271.
- KORPAS, A., BARANEK, M., PIDRA, M. and HRADILIK, J. 2009. Behaviour of two SCAR markers for seedlessness within central European varieties of grapevine. *Vitis*, 48(1): 33-42.
- LAHOGUE, F., THIS, P. and BOUQUET, A. 1998. Identification of a codominant SCAR marker linked to the seedlessness character in grapevine. *Theor. Appl. Genet.*, 97: 950-959.

- LEDBETTER, C.A. and RAMMING, D.W. 1989. Seedlessness in grapes. *Horticultural Reviews*, 11: 150-184.
- LEDBETTER, C.A. and SHONNARD, C.B. 1991. Berry and seed characteristics associated with stenospermy in vinifera grapes. *Journal of Horticultural Science*, 66(2): 247-252.
- LEDBETTER, L., BURGOS, L. and PALMQUIST, D. 1994. Comparison of methods used for determining the stenospermic trait in *Vitis Vinifera* L. *Vitis*, 33: 11-13.
- LEFORT, F., LALLY, M., THOMPSON, D. and DOUGLAS, G.C. 1998. Morphological traits, microsatellite fingerprinting and genetic relatedness of a stand of elite oaks (*Q. robur* L.) at Tullyally, Ireland. *Silvae genetica*, 47: 5-6.
- MEJIA, N. and HINRICHSEN, P. 2003. A new, highly assertive scar marker potentially useful to assist selection for seedlessness in table grape breeding. *Acta Horticulturae*, 603:559-564.
- STRIEM J. 1994. Biological and molecular aspects of seedlessness in grapes (*Vitis vinifera*). Summary of the thesis submitted for the degree doctor of philosophy, Hebrew University of Jerusalem.
- STRIEM, J., HAYYIM, G. and SPIEGEL-ROY, P. 1994. Developing molecular genetic markers for grape breeding, using polymerase chain reaction procedures. *Vitis*, 33: 53-54.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. and MANIATIS, T. 1998. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Pres, Cold Spring Harbor, New York
- YILDIRIM, F. 2008. Ankara ve Çankırı illeri asma gen kaynaklarının SSRs (simple sequence repeats)'a dayalı genetik karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, 67 ss.
- YILDIRIM, A. ve KANDEMİR, K. 2001. Bitki Biyoteknolojisi Kitabı Cilt:2, S.Ü. Basımevi, İstanbul, 456 ss.

ÖZGEÇMİŞ

1975 yılında Antalya’da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Antalya’da tamamladı. 1994 yılında girdiği Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü’nden 1999 yılı Şubat ayında Ziraat Mühendisi olarak mezun oldu. 2008 yılına kadar özel sektörde Sebze Bitki Islahı üzerine çalıştı. 2008 yılında Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalında, “Üzümlerde Çekirdeksizliğin Erken Seleksiyonu Amacıyla DNA Markörlerinin Kullanımı” konulu Yüksek Lisans Eğitimine başladı. Halen özel sektörde Sebze Bitki Islahı alanında çalışmaktadır. Evli ve bir çocuk annesidir.