

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI**

**FARKLI AHLAT GENOTİPLERİNİN MİKROÇOĞALTIM
ETKİNLİĞİNİN BELİRLENMESİ VE MOLEKÜLER
KARAKTERİZASYONU**

**Hazırlayan
Merve A. YİĞİT**

**Danışman
Doç. Dr. Aydın UZUN**

Yüksek Lisans Tezi

**Temmuz 2017
KAYSERİ**

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI**

**FARKLI AHLAT GENOTİPLERİNİN MİKROÇOĞALTIM
ETKİNLİĞİNİN BELİRLENMESİ VE MOLEKÜLER
KARAKTERİZASYONU**

(Yüksek Lisans Tezi)

**Hazırlayan
Merve A. YİĞİT**

**Danışman
Doç. Dr. Aydın UZUN**

**Temmuz 2017
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

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

Merve A. YİĞİT



YÖNERGEYE UYGUNLUK

“Farklı Ahlat Genotiplerinin Mikroçoğaltım Etkinliğinin Belirlenmesi ve Moleküler Karakterizasyonu” adlı Yüksek Lisans tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Hazırlayan

Merve A. YİĞİT



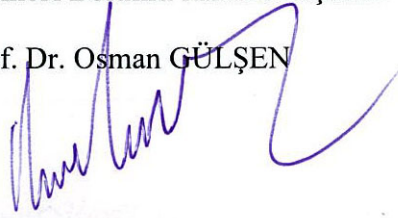
Danışman

Doç. Dr. Aydın UZUN



Bahçe Bitkileri Bölümü A.B.D. Başkanı

Prof. Dr. Osman GÜLŞEN



KABUL-ONAY

Doç. Dr. Aydın UZUN danışmanlığında **Merve Arefe YİĞİT** tarafından hazırlanan “**Farklı Ahlat Genotiplerinin Mikroçoğaltım Etkinliğinin Belirlenmesi ve Moleküler Karakterizasyonu**” adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Bahçe Bitkileri** Anabilim Dalında **Yüksek Lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

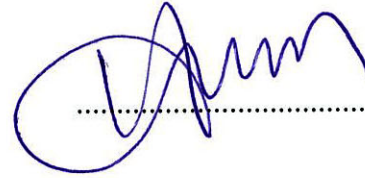
17.07/2017

JÜRİ:

Danışman : Doç. Dr. Aydın UZUN



Üye : Yrd. Doç. Dr. Hasan PINAR



Üye : Yrd. Doç. Dr. Murat GÜNEY

**ONAY:**

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun 01/08/2017 tarih ve 2017/12 2/sayılı kararı ile onaylanmıştır.


Prof. Dr. Mehmet AKKURT

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca farklı bakış açıları ve bilimsel katkılarıyla beni aydınlatan, yönlendiren, bilgi ve yardımlarını esirgemeyen, Erciyes Üniversitesi Seyrani Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü laboratuvarlarında bana çalışma imkânı sağlayan danışman hocam Sayın Doç. Dr. Aydın UZUN' a ve Erciyes Üniversitesi Seyrani Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri öğretim üyelerinden Sayın Yrd. Doç. Dr. Hasan PINAR' a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Erciyes Üniversitesi Seyrani Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı hocalarıma teşekkür ederim.

Tez çalışmamın en yoğun zamanlarında katkı ve desteklerini esirgemeyen Bahçe Bitkileri Doku Kültürü ve Moleküler Laboratuvarı ekip arkadaşlarım Emrah Uysal, Selin Çabuk ve Tuba DİLFIRUZ' a teşekkür ederim.

Çalışmamda kullanılmak üzere bitkisel ve diğer çalışma materyallerimi temin eden, projemi destekleyen T.C. Orman ve Su İşleri Bakanlığı Çölleşme ve Erozyonla Mücadele Genel Müdürlüğü' ne, projeye destek veren Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine (FDA-2016-6724) ve Doç. Dr. Aydın UZUN yürütücülüğündeki proje ekibine de teşekkür ederim.

Hayatımın her aşamasında ve kararında olduğunda gibi master eğitimim süresince de benden maddi-manevi güvenini ve desteğini esirgemeyen aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Merve A. YİĞİT

Temmuz 2017, KAYSERİ

FARKLI AHLAT GENOTİPLERİNİN MİKROÇOĞALTIM ETKİNLİĞİNİN BELİRLENMESİ VE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

Merve A. YİĞİT

Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü
Yüksek Lisans Tezi, Temmuz 2017
Danışman: Doç. Dr. Aydın UZUN

ÖZET

Ahlat; *Pyrus elaeagrifolia*, Anadolu’ da doğal olarak yetişen kloroza ve kuraklığa dayanıklı, anaç geliştirmede kullanılabilecek önemli gen kaynaklarından biridir. Bu çalışmada ülkemizin farklı noktalarından belirli morfolojik kriterlere göre toplanmış 40 farklı ahlat genotipinin mikroçoğaltım etkinliğinin belirlenmesi, kolay çoğaltılan ümitvar tiplerin tespit edilmesi, moleküler karakterizasyonunun yapılması amaçlanmıştır. 2016 yılında Erciyes Üniversitesi laboratuvarlarında genotipler 9.0 µM BA (benzyladenine), 0.5 µM IAA (indole-3-aceticacid), 0.3 µM giberillic acit (GA3) ile desteklenmiş, MS besin ortamında kültüre alınmış, *in vitro* tepkileri belirlenmiş, 13 adet ISSR primeri moleküler analizleri yapılmıştır. Bu çalışmalar ayrı ayrı değerlendirilmiş ve bulgulara göre 40 genotipten 20 tanesi %3.3 ile %16.6 arasında değişen oranlarda *in vitro* sürgün oluşumu göstermiş, maximum sürgün oluşumu %16.6 oranla Nevşehir’ den alınan N37 numaralı genotip ile Kahramanmaraş’ tan alınan KM53 numaralı genotipte elde edilmiştir. Moleküler analizler sonucu elde edilen dendograma göre genotipler arasındaki genetik benzerlik 0.75-0.98 arasında değişmiştir. En uzak genotip 0.75 benzerlik oranıyla AN64 nolu genotip olurken, birbirine en yakın genotipler N40 ve N41 nolu genotipler olmuştur. Farklı bölgelerden seçilen 40 adet ahlat genotipinin genetik benzerlikleri ile mikroçoğaltım etkinliği arasındaki ilişki dendogram üzerindeki dağılıma göre incelendiğinde KY19 ve AD33 aynı grupta yer almış; N40, N45, N42, N44, N38 nolu genotipler hem mikroçoğaltım etkinliği yüksek genotipler hem de genetik olarak birbirine yakın genotipler olarak belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Pyrus elaeagrifolia*, doku kültürü, mikroçoğaltım, PCR, ISSR

**DETERMINATION OF *IN VITRO* MULTIPLICATION EFFICIENCY AND
MOLECULAR CHARACTERIZATION OF SOME SELECTED *PYRUS
ELAEAGRIFOLIA* GENOTYPES**

Merve A. YİĞİT

Erciyes University, Institute of Natural and Applied Science

Master's Thesis, July 2017

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Aydın UZUN

ABSTRACT

Pyrus elaeagrifolia which grown extensively in Anatolia as wild pear species is one of the most important genetic resources for developing rootstock which is tolerant to chlorosis and drought. In this study, it was aimed to determine the microbial activity of 40 different *Pyrus elaeagrifolia* species which selected from different part of Turkey according to certain morphological criteria, to determine easily reproduced promising types, to make molecular characterization. To determine multiplication efficiency genotypes were cultured using MS media (9.0 µM BA (benzyladenine), 0.5 µM IAA (indole-3-acetic acid), 0.3 µM gibberillic acid (GA3), *in vitro* reaction were determined, 13 ISSR primers molecular analyzes were performed. These studies were evaluated separately and 20 genotypes out of 40 genotypes showed *in vitro* shoot formation at rates ranging from 3.3% to 16.6% and genotype N37 numbered from Nevşehir with maximum shoot formation of 16.6% and genotype KM53 from Kahramanmaraş were obtained. Molecular analyzes showed that the genetic similarities between the genotypes according to the resulting dendrogram ranged from 0.75 to 0.98, with the most distant genotype being AN64 polynucleotides with a similarity ratio of 0.75, while the closest genotypes were N40 and N41 genotypes. Obtained results showed that there were important variation among genotypes. When the relationship between the genetic similarities of the 40 wild pear genotypes selected from different regions and the microbial activity was analyzed according to the distribution on the dendograms, KY19 and AD33 belonged to the same group and the N40, N45, N42, N44 and N38 genotypes were both genetically close to each other genotypes.

Keywords: *Pyrus elaeagrifolia*, tissue culture, micropropagation, PCR, ISSR

İÇİNDEKİLER

FARKLI AHLAT GENOTİPLERİNİN MİKROÇOĞALTIM ETKİNLİĞİNİN BELİRLENMESİ VE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	i
YÖNERGEYE UYGUNLUK.....	ii
KABUL-ONAY	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ÖZET	v
ABSTRACT.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	ix
ÇİZELGELER LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLER LİSTESİ	xi

1. BÖLÜM

GİRİŞ	1
-------------	---

2. BÖLÜM

ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Ahlat ve Diğer Yumuşak Çekirdeklielerde <i>In Vitro</i> Çoğaltım Üzerine Yapılmış Çalışmalar.....	9
2.2. Ahlat ve Diğer Yumuşak Çekirdeklielerde Yapılmış Moleküler Çalışmalar ..	13

3. BÖLÜM

MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal.....	19
3.2. Metot.....	21
3.2.1. Doku Kültürü Çalışması	21

3.2.1.1.Besin ortamının hazırlanması.....	21
3.2.1.2.Eksplantların yüzey sterilizasyonu	21
3.2.1.3.Kültür ortamının şartları.....	23
3.2.2. Moleküler Çalışmalar	23
3.2.2.1. DNA izolasyonu.....	23
3.2.2.2.PCR optimizasyonu	25
3.2.2.3. ISSR lokuslarına ait primerler	27
3.2.2.4.Verilerin değerlendirilmesi	27
3.2.2.5.Primerlerin polimorfizm oranlarının saptanması	28

4. BÖLÜM

ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1.Doku Kültürü Çalışmaları	29
4.2. Moleküler Çalışmalar	32
4.2.1. ISSR Markır Analizi	32
4.2.2. ISSR Soyağacı ve Matrix Plot (3D Plot) Analizleri	35

5. BÖLÜM

SONUÇLAR VE ÖNERİLER	38
KAYNAKLAR	40
ÖZGEÇMİŞ.....	49

SİMGELER ve KISALTMALAR

µl	: Mikrolitre
AFLP	: Amplified Fragment Length Polymorphism
AgNO ₃	: Gümüşnitrat
BA	: Benzyl-adenine
GA ₃	: Giberellic acid
IAA	: Indole-3-acetic acid
IBA	: Indole-3-butyric acid
ISSR	: Inter Simple Sequence Repeat
M	: Molar
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
MS	: Murashige&Skoog Medium
NAA	: Naphthalene acetic acid
NaOH	: Sodyum Hidroksit
ng	: Nanogram
NH ₄ NO ₃	: Amonyumnitrat
PCR	: Polymerase Chain Reaction
QTL	: Quantative Trait Loci
RAPD	: Random Amplified Polymorphic DNA
RIL	: Recombinant Inbreed Line
SRAP	: Sequence Related Amplified Polymorfism
SSR	: Simple Sequence Repeat
TDZ	: Thidiazuron

ÇİZELGELER LİSTESİ

Çizelge 3.1. Araştırmada kullanılan ahlat genotipleri.....	20
Çizelge 3.2. DNA Ekstraksiyon Çözeltileri.....	25
Çizelge 3.3. PCR Mix Konsantrasyonları.....	26
Çizelge 3.4. PCR Döngü Programı	26
Çizelge 3.5. ISSR Primerleri.....	27
Çizelge 4.1. Farklı bölgelerden seçilen 40 adet ahlat genotipinin mikroçoğaltım etkinliği(%)	30
Çizelge 4.2. ISSR primerlerinin amplifikasyonu sonucu elde edilen bant uzunlukları (BU), toplam bant sayısı (TBS), polimorfik bant sayısı (PBS) ve polimorfizm oranları (PO).....	34

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1.	Codominant ve dominant markörlerin karşılaştırılması.....	6
Şekil 2.1.	Genetik benzerlik matris dendogramı	15
Şekil 3.1.	Türkiye' nin farklı bölgelerinden toplanan ahlat genotipleri	19
Şekil 3.2.	Besi ortamlarının hazırlanması.....	21
Şekil 3.3.	Eksplantların yüzey sterilizasyonu.....	22
Şekil 3.4.	Eksplantların kültür kaplarına dikilmesi	22
Şekil 3.5.	İklimlendirme dolabında gözlemlenen kültüre alınmış doku parçaları.....	23
Şekil 3.6.	DNA izolasyonu	25
Şekil 3.7.	PCR, Görüntüleme cihazı.....	26
Şekil 4.1.	Farklı bölgelerden seçilen 40 adet ahlat genotipinin mikroçoğaltım etkinliği(%).	31
Şekil 4.2.	Sürgün gelişimi gösteren genotipler.....	31
Şekil 4.3.	(VHVG TG) ₇ ISSR primerinin söz konusu genotiplerdeki jel görüntüsü	32
Şekil 4.4.	(AGC) ₆ G ISSR primerinin söz konusu genotiplerdeki jel görüntüsü	32
Şekil 4.5.	(AG) ₈ T ISSR primerinin söz konusu genotiplerdeki jel görüntüsü	33
Şekil 4.6.	Farklı bölgelerden seçilen 40 adet ahlat genotipinde 13 adet ISSR markırı elde edilen dendogram (+: <i>In vitro</i> sürgün gelişimi gösteren genotipler)	35
Şekil 4.7.	Farklı bölgelerden seçilen 40 adet ahlat genotipinde akrabalık ilişkilerini gösteren temel bileşenler analizi.....	35
Şekil 4.8.	Farklı bölgelerden seçilen 40 adet ahlat genotipinde akrabalık ilişkilerini gösteren temel bileşenler analizi (matrix plot (3D plot) görünümü)	36

1. BÖLÜM

GİRİŞ

Genelde ‘ahlat’ yaygın adıyla bilinen fakat bazı yörelerde ‘çakal armudu’, ‘çördük’ gibi yöresel isimleri de olan *Pyrus elaeagrifolia* Pall. [1], Güneydoğu Avrupa’dan başlayarak, Anadolu, Kafkasya ve Kırım’ a kadar olan bölgede geniş yayılım alanı bulmuş, kurak ve elverişsiz koşullara çok iyi uyum sağlamış yabani bir armut türüdür. Yirmi iki *Pyrus* türünden biri olup; ahlat, yabani armut ve badem yapraklı ahlat taksonları sistematik olarak Gülgiller (*Rosaceae*) familyası, Pomoideae alt familyası içerisinde incelenmektedir [2, 3].

Ülkemizde özellikle Kütahya, Eskişehir, Bolu, İstanbul, Kastamonu, Sivas, Ankara, Antalya ve Kayseri bölgelerinde yaygın olarak bulunmakta, bunun dışındaki birçok bölgede de değişik düzeylerde ahlat popülasyonlarına rastlanmaktadır. Ahlat ağaçları yuvarlak taçlı, orta boylu, sık dallı ve dikenlidir. Meyveleri küçük, topaç şeklinde ve çok kumludur. Ahlat kurak iklim şartlarına iyi uyum sağlamış, derin köklü, tamamen kserofit özellikte olup armut yetiştiriciliğinde kullanılabilecek bir anaç olarak belirtilmiştir [4, 5]. Mevcut ahlat popülasyonlarından Anadolu’ nun değişik bölgelerinde farklı amaçlarla pratikte faydalanılmaktadır. Çeşit değiştirme aşırı ile üzerine değişik armut çeşitleri aşılanmakta, kurak koşullarda kırsal alanlarda ağaçlandırma amaçlı kullanılabilmekte, meyveleri taze olarak, turşu yapılarak ya da kurutularak tüketilmektedir.

Doğada serbest tozlanma sonucu oluşmuş tohumlarla çoğalan bir tür olan ahlatta uzun yıllar boyunca tür içi ve türler arası doğal melezlemeler ile çok geniş bir çeşitliliğin oluştuğu kabul edilmekle birlikte bu türde genetik çeşitlilik ve popülasyon yapısına ilişkin daha önce yapılmış herhangi bir araştırma bulgusu bulunmamaktadır. Genel olarak kireçli ve kurak alanlara uyum sağladığı gözlemlenen ahlatta bu zengin

çeşitliliğin özellikle anaç ıslahı çalışmaları için biyotik ve abiyotik stres (kuraklık, kireç, tuz vb.) koşullarına dayanıklılık karakterlerini içerisinde barındırdığı öngörülmektedir. Son yıllarda özellikle odunsu bitkilerin, beklenen küresel iklim değişikliğine nasıl uyum sağlayacakları konusu önemli araştırma alanlarından. Sıcak ve kurak çevre koşullarında yetiştirme yeteneğine sahip olan yabani armut türlerinin bu noktada önemli bitkilerden olduğu bildirilmektedir ve bunların çok değerli olduğu ancak arazilere ve orman alanlarına dağılmış halde bulundukları vurgulanmaktadır [6]. Küresel iklim değişikliği özellikle kurak koşullara adapte olmuş türlerin önemini bir kat daha artırmaktadır. Bu noktada ülkemizde özellikle kurak koşullara çok iyi adapte olmuş olan ahlat çok önemli bir materyal haline gelmektedir. Bu materyallerin genetik varyasyon düzeyinin ve bunların populasyon yapısının belirlenmesi ile muhtemel orijin gruplarının ortaya konulması ve bunlar arasında vejetatif olarak daha kolay çoğaltılabilen tiplerin belirlenmesi, bu genetik kaynakların yönetimi, kullanımı ve muhafazası açısından çok önemli ve ilk aşamadır. Ahlat populasyonlarının yoğun olarak bulunduğu yörelerden özellikle meyve iriliği başta olmak üzere belirli kriterlere göre seçilecek genotiplerin tekerrürlü olarak çoğaltılması, vejetatif çoğaltılma imkanlarının ortaya konulması, erozyon kontrolü ve kurak-yarı kurak sahaların ağaçlandırılma, rehabilitasyon ve kapama bahçeleri (özel ağaçlandırma) tesislerinde kullanım imkanlarının belirlenmesi, orman köylüleri ile kırsal alanlarda yaşayan yöre halkının ekonomik gelir elde etmesi, ülkemizde ilk olarak “ahlat genetik kaynakları koleksiyonu” oluşturulması, bu koleksiyonun muhafaza edilmesi ve yapılacak sonraki çalışmalara kaynak teşkil edecek bir veri tabanı oluşturulması çok önemlidir.

Ahlat kış soğuklarına (-30°C) ve yetiştiği ortamdan yüksek düzeyde Fe ve Zn alma yeteneği ile kloroza, diğer bir ifadeyle yüksek pH'ya çok dayanıklıdır ve bu nedenle toprak ve iklim özellikleri diğer birçok *Pyrus* türünün yetiştirilmesi için uygun olmayan kireçli ve kurak koşullara çok iyi uyum sağlamıştır. Armut kalem çeşidi *Pyrus elaeagrifolia* anacı ile kuraklığa tolerans kazanır ve topraktan yüksek seviyelerde azot, fosfor, demir, bor ve çinko alır [7]. Demir-Kloroz özellikle kireçli topraklara sahip bölgelerde armut için yaygın bir sorundur [8]. *Pyrus elaeagrifolia* kuraklık ve kloroza toleranslı anaç geliştirmek için kullanılan çok önemli gen kaynaklarından bir tanesidir [7].

Ahlat tipleri arasında meyve ağırlığı, abiyotik stres koşullarına dayanım ve vejetatif çoğalma potansiyelleri konusunda farklılıklar olduğundan, bu özellikler yönünden öne çıkan ve daha kolay çoğaltılabilen tiplerin ortaya konulması, yapılacak olan kurak- yarı kurak bölge ağaçlandırma ve rehabilitasyon çalışmaları için çok önemli bir alternatif ortaya koyacaktır.

Armut anaçlarında modern ıslah yaklaşımları olarak anacın ağaç tacını azaltması, hastalıklara dayanıklılık, kış soğuklarına ve kurağa dayanıklılık gibi özellikler gösterilmektedir [9]. Buradan hareketle, üzerine aşılı çeşitte orta büyüklükte taç oluşturan, kış soğuklarına ve kuraklığa oldukça dayanıklı olan ahlat; anaç ıslah çalışmaları için çok önemli bir materyal olarak kabul edilebilir. Yapılan bir diğer çalışmada, ahlatın demir klorozuna dayanıklı ve ağaç tacını azaltıcı özellikte [10] ve tuza dayanıklı anaç ıslahı çalışmaları [11] için uygun bir tür olduğu belirlenmiştir. Öte yandan ahlatın hastalıklara dayanımı konusunda yeterli çalışma yapılmamıştır. Bu önemli özellikleri ile uygun ahlat genotipleri doğrudan anaç olarak kullanılabileceği gibi ıslah yoluyla özellikleri daha da iyileştirilerek ve klonal olarak üretilerek standart bir ahlat anacı geliştirilmesi mümkündür.

Uzun yıllar boyunca doğada kendiliğinden ve açık tozlanarak yetişmekte olan ahlatlar tohumla çoğalmaktadır. Bu nedenle yıllar boyunca farklı genetik yapıda birçok genotipin karışımı ile doğadaki ahlatlar içerisinde çok geniş bir genetik varyasyonun meydana gelmiş olması kuvvetle muhtemeldir. Bu konuda herhangi bir bilimsel çalışmanın şimdiye kadar yapılmamış olması nedeniyle, bu çeşitliliğin boyutları konusunda net bilgiler mevcut değildir. Doğada bulunan ahlatlar içerisinde gözlemlere dayanarak belirlenen farklı morfolojik özellikler (yaprak büyüklüğü ve rengindeki farklılıklar, ağaç tacı genişliğindeki farklılıklar, meyve iriliği ve olgunlaşma dönemlerindeki farklılıklar vb.) içerisinde genetik olarak da bir çeşitliliğin olduğunu göstermektedir. Ahlat, özellikle ülkemizin orta kesimlerinde doğada yoğun olarak bulunmakta olup ağaç sayısı konusunda net bilgiler mevcut değildir. Genel olarak bu ağaçların açık tozlanma sonucunda oluşmuş tohumlardan meydana gelmelerinden dolayı genetik olarak birbirinden farklı yapıda oldukları kabul edilebilir. Ancak özellikle kırsal kesimde arazi açmak için yapılan tahribatlar, odun ve kereste amaçlı kesimler nedeniyle ahlat popülasyonu tehlike altındadır. Bunun yanında bazı yörelerde

ahlatın, kültür armut çeşitleri ile aşıl原因arak değerdendirilmesi ile bir kısım ahlat populasyonu çalışılmaz duruma gelmekte, doğal genetik yapıımız daralmaktadır.

Türkiye toplam olarak 12000 civarında takson barındırmakta olup bunların dört binden fazlası endemiktir [12]. Ancak yine bu türlerin 1944 tanesi tehlike altındaki türler olup bunların sayısı her geçen gün artmaktadır. Bitki genetik kaynaklarının korunmasına yönelik olarak geliştirilen eylem planında özellikle doğal olarak yetişen bitkiler için; 1) bunların toplanarak *ex-situ* muhafazası, 2) karakterizasyon çalışmaları ve değerdendirme aşamaları çok önemli iki aşama olarak gösterilmektedir [13]. Ahlatla ilgili olarak ülkemizin önemli bir bitkisi olan ve korunması gereken bu türün *ex-situ* muhafazaya alınması ve moleküler karakterizasyonlarının yapılarak çeşitliliğinin belirlenmesi yapılan bu çalışma ile kısmen de olsa sağlanmış olacaktır.

Bitki biyoteknolojisinde görülen yeni ve hızlı gelişmeler, bitki gen kaynaklarına ait yapılan çalışmalarda, özellikle genetik çeşitliliğın korunması, üretimi, karakterizasyonu, ıslah gibi amaçlara katkılar sağlamıştır. Bu gelişmeler sayesinde meyve türlerinin karakterizasyonu genom analizleri ile yapılabilmekte, homozigotinin çok kısa sürede sağlanması, melezlerin embriyo kültürü ile yaşatılması, kalıtsal yapıları gen aktarımı, somaklonal varyasyon ve somatik hibridizasyon gibi *in vitro* teknikler ile taksonomik bir sınırlama olmaksızın hızlı ve etkili bir şekilde değıştirilebilmekte, hızlı, yoğun ve virüslerden ari çoğaltım, gen kaynaklarının korunması ve birçok etkene karşı genotiplerin reaksiyonlarının kısa sürede test edilmesi sağlanabilmektedir [14-19].

Bu biyoteknolojik yöntemlerin birçoğının farklı bitki tiplerinde uygulanabilmesinin ilk şartı *in vitro* koşullarda organogenesis için uygun protokollerin oluşturulmasıdır. Bitki parçalarından doğrudan ya da kallus gelişiminden sonra dolaylı olarak meydana gelebilen *in vitro* organogenesis; kültür tipi, besin ortamlarının bileşimi ve inkübasyon koşullarının değıştirilmesi ile hücre ve dokuların sürgün ve kök taslağı meydana getirmesi yönünde uyarılması olarak tanımlanabilmektedir. 1980'li yıllardan sonra meyve genotiplerinde başlayan, hem tohum [20-23] ve hem de somatik doku [24-33] orjinli *in vitro* organogenesis çalışmaları, genellikle gen transferi öncesinde rejenerasyon koşullarının belirlenmesi amacıyla planlanmıştır [19].

Biyoteknolojik yöntemlerle ve virüsten ari bitki üretiminde çeşitli organ ve dokulardan hızlı ve güvenilir adventif sürgünlerin eldesi önemlidir [34]. Birçok meyve türünde

olduğu gibi *P. elaeagrifolia* bitkisinin ebeveyn ile aynı özelliklere sahip klonal çoğaltımı çelikle, daldırma ile ve mikro çoğaltım ile mümkündür. Özellikle tohumdan çimlendirilmesi aşamasında karşılaşılan zorluklar ve çelikle çoğaltılmasındaki sorunlar nedeniyle *in vitro* çoğaltım yöntemleri ahlatın klonal çoğaltımında önem kazanmıştır. Bu yöntem ile kısa sürede kitlesel üretim sağlanabilmektedir.

Meyve ağaçlarının çoğaltımında ve gelişiminde virüssüz çoğaltımın birçok kullanışlı uygulaması mevcuttur. *In vitro* çoğaltım armut anaçlarının fidanlık kullanımı için yıl boyunca kullanılabilirliğine olanak sağlamaktadır ve patojensiz armut gen kaynakları, ülkeler arasında karantina bariyerleri boyunca kolaylıkla değiş tokuş edilebilir [35].

Bitki genetik kaynaklarının karakterizasyonu için ise biyokimyasal markörler, morfolojik markörler ve moleküler markörler kullanılmaktadır.

Bitkilerdeki genetik kaynakların karakterizasyonu için başlangıçta morfolojik, fizyolojik ve sitolojik özellikler kullanılmış olup daha sonra bu aşamayı daha da kısaltmak ve güçlendirmek amacı ile biyokimyasal markörler geliştirilmiştir. Son zamanlarda ise moleküler çalışmalar ivme kazanmıştır [36].

Moleküler markörler, kendilerinin üretildiği bitkilerin hücrelerinde bulunan DNA'lardaki nükleik asit diziliş farklılığını çeşitli şekillerde gösterirler ve bitki popülasyonundaki çeşitlilik veya o popülasyon içindeki bitki genotipleri arasındaki ilişkilerin tespitinde %100'e yakın güvenilirlikle değerlendirilirler.

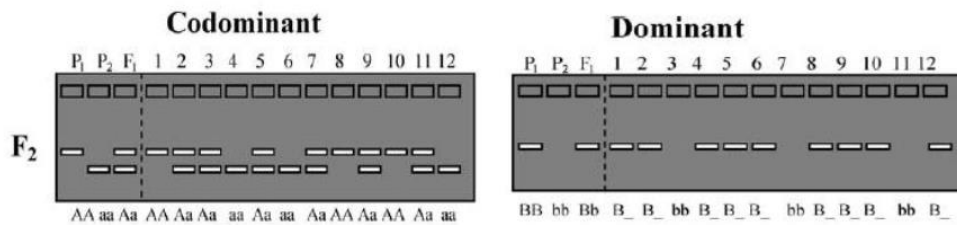
DNA markörlerinde amaç, bireyler (çeşit, hat, tür vb.) arasındaki DNA seviyesindeki farklılığın ortaya çıkarılmasıdır. Eğer bu farklılık genomda tek bir bölgeyi gösteriyorsa bu bir allel olarak adlandırılır. DNA seviyesinde bunu yapmanın başlıca avantajı, herhangi bir DNA zincirinin, iki birey arasındaki allelik farklılığı gösterebilmesidir. Bunun için o DNA dizininin herhangi bir proteini kodlayıp kodlamadığını bilmeye gerek yoktur. Kullanılacak markör sistemini etkileyen bazı faktörler vardır. Polimorfizmin seviyesi veya popülasyonun tipi, farklı çevrelerdeki stabilitesi, lokus sayısı, kolaylık, analiz maliyeti, altyapı bu kriterlerden bazılarıdır [37].

Genotipler arasında farklılık göstermeyen markörler monomorfik markörler; aynı veya farklı türlerin bireyleri arasında farklılık gösteren markörler ise polimorfik markörler

olarak isimlendirilirler. Polimorfik markörler farklı genotipleri ayırt edebildiği için monomorfik olanlardan daha yararlıdır.

Markörlerin haritalamada kullanılabilmeleri için polimorfik olmaları zorunludur. Yani; bir melezleme çalışması sonucu ortaya çıkan yavrularda inceleme yapılabilmesi için alternatif formlarının bulunması gerekir. Polimorfizm DNA dizisinde yaklaşık her 300 veya 500 nükleotidde bir oluşan varyasyonlardır. Bir özelliği kodlayan diziler içinde oluşan varyasyonlar gözle görülebilir fiziksel değişikliklere (hastalığa karşı dayanıklılık, tohum rengi, bitki boyu, vb.) sebebiyet verirler. Oysa varyasyonların çoğu herhangi bir özelliği kodlamayan diziler (intronlar) içerisinde gerçekleşir ve bir organizmanın fiziksel görünüşü veya fonksiyonu üzerinde hiçbir etkisi yoktur. Fakat bunlar DNA düzeyinde belirlenebilir ve markör olarak kullanılırlar. Bitki türüne ve markör tipine bağlı olarak markörlerin farklılık gösterme oranları değişiklik göstermektedir [38].

Homozigot ve heterozigotlar arasında ayrımlanabilmelerine göre polimorfik markörler dominant ve kodominant özellik gösterirler. Dominant markörler var veya yok olarak belirlenirken, kodominant markörler boyut olarak farklılık gösterirler. Bütün bu kurallara göre bakılırsa, bir DNA markörünün farklı formları (örneğin jel üzerindeki farklı boyuttaki bantlar) markör allelleri olarak adlandırılır. Böylece dominant bir markör sadece 2 allele sahipken, kodominant markörler farklı birçok allele sahip olabilmektedir. Kodominant markörlerle homozigot ve heterozigotlar arasındaki bu farklılık net bir şekilde görülebilmektedir (Şekil 1.1). Ancak dominant markörler bu ayrımı yapamamaktadır [39].



Şekil 1.1. Codominant ve dominant markörlerin karşılaştırılması

Temelde, farklı iki DNA markörü tekniği mevcuttur. DNA markörlerin bitkilerde kullanımı PCR temelli olmayan RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) markörlerle başlamış olup, PCR (PZR) (Polymerase Chain Reaction = Polimeraz Zincir Reaksiyonu) tekniğinin ortaya çıkması ile birlikte PCR'a dayalı DNA markörler; SSR

(Simple Sequence Repeats), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA, AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) ve SRAP (Sequence Related Amplified Polymorphism) genetik tanımlamalarda kullanılmaya başlanmıştır (Çelikkol, 2011). PCR, DNA'nın *in vitro* koşullarda enzimatik olarak sentezletilmesidir. *Thermus aquaticus*'dan elde edilen sıcaklığa dayanıklı polimeraz enziminin (*Taq* DNA polymerase) keşfi PCR tekniğinin geliştirilmesinde anahtar rolü oynamıştır. Bu enzim sayesinde hücrede normal şartlar altında gerçekleşebilen doğal DNA replikasyonu laboratuvar şartlarında 'termocycler' adı verilen özel cihazlar yardımı ile gerçekleştirilmiştir. Yöntem, küçük miktardaki özellikli bir DNA parçasının, bir dizi enzimatik reaksiyon sonucu milyonlarca kez çoğaltılması orjinlidir. Çoğaltılabilen unsurlar DNA'nın istenilen veya rastgele sentezlenen bazı bölgeleridir, tamamı değildir [39]. Yeni yaygınlaşmaya başlayan SNP (Single Nucleotide Polymorphism), DNA zincirindeki tek nukleotit farklılığını kullanmaktadır. Bu teknik bitki genomuna ait DNA zincir bilgisini gerektirdiğinden, bitki bilimlerine girmesi gecikmiştir [37].

Genetik çeşitliliğin belirlenmesinde, filogenetik çalışmalarda, genom haritalarının oluşturulmasında ve evrim biyolojisinde birçok bitkide uygulanabilen etkili bir teknik olan ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat) [40], hassas ve tekrarlanabilirliği yüksek olan, ökaryotik genomlarda tekrar eden 2, 3, 4, 5 gibi nükleotid birimlerinin lokustan bağımsız bir şekilde genomda rastgele dağılımlarını esas alan bir yöntem olduğu için diğer yöntemler içinde öne çıkmaktadır [41, 42].

ISSR markörlerinin uygulanması kolay ve primerleri daha uzun olduklarından güvenilirlikleri fazla, kullanımı hızlıdır [43]. Yeterli bilgi sunan ISSR primerlerini kullanmak zamandan tasarruf, düşük bir maliyet ve genetik analizlerde pratiklik sağlamaktadır.

ISSR markörleri Mendel kalıtımına uygun olarak dominant markörler vermektedir [44]. Bununla beraber kimi durumlarda homozigot ve heterozigotluğun tanımlanmasında kodominant markör de vermektedirler. Primer sentezlenebilmesi için sekans bilgisinin gerektiği SSR markörleri, AFLP markörlerinin yüksek maliyeti, RAPD markörlerinin düşük üretkenliği birçok çalışmada önemli kısıtlamalar oluşturmaktadır. Bu kısıtlamaların birçoğunun ortadan kalkmasında ISSR markörleri önemli bir tekniktir [41].

Ahlatın *in vitro* çoğaltımı mevcut araştırmalarda uygulanmıştır. Ahlat tipleri arasında *in vitro* çoğalma potansiyelleri konusunda farklılıklar olabileceğinden, daha kolay çoğaltılabilen tiplerin ortaya konulması, yapılacak olan kurak- yarı kurak bölge ağaçlandırma ve rehabilitasyon çalışmalarını için çok önemli bir alternatif ortaya koyacaktır.

Bu çalışmada farklı 40 ahlat genotipinin mikroçoğaltım etkinlikleri; sürgün oluşturma potansiyelleri incelenerek farklılıklar tespit edilmiş, kolay çoğaltılabilen ümitvar tipler belirlenmiştir. Genotipler arası *in vitro* çoğaltım potansiyellerinde ciddi bir varyasyon saptanmış, bu varyasyonun kalıtsal özelliklerle bağlantısı ISSR moleküler markör yöntemi kullanılarak açığa çıkarılmıştır.

2. BÖLÜM

ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Ahlatta ve Diğer Yumuşak Çekirdeklielerde *In Vitro* Çoğaltım Üzerine Yapılmış Çalışmalar

Uzun yıllar boyunca doğada kendiliğinden ve açık tozlanarak yetişmekte olan ahlatlar tohumla çoğalmaktadır. Bu nedenle yıllar boyunca farklı genetik yapıda birçok genotipin karışımı ile doğadaki ahlatlar içerisinde çok geniş bir genetik varyasyonun meydana gelmiş olması kuvvetle muhtemeldir. Tohumla çoğaltma üzerine az sayıda çalışmanın yapıldığı bildirilmekte [45], vejetatif çoğaltma üzerine yapılan çalışmaların ise çok daha sınırlı olduğu görülmektedir [6].

Dolcet-Sanjuan *et al.* (1990), 4 *Pyrus* türünde (*P. amygdaliformis* Vill, *P. betulaefolia* Bunge, *P. calleryana* Dene, ve *P. communis* L.) ve *Cydonia oblonga* L.' da uygun mikroçoğaltım protokolünü belirlemek için yaptıkları çalışmalarında sürgün çoğalması için 10-20µM Benzyladenine' i ve 135µE m⁻² s⁻¹ yüksek ışık şiddetini optimal bulmuşlardır. *Pyrus* türlerinin köklendirilmesi için sürgünler 7 gün boyunca yüksek seviyelerde (10-32µM) IBA' ya maruz bırakılmış veya sürgünlere 10 µM IBA' ya 15 sn boyunca daldırma işlemi uygulanmış, ardından oksinsiz ortama geçiş yapılmıştır. Naphthaleneacetic acid *C. Oblonga* için IBA' dan daha etkili olmuştur [46].

Dolcet-Sanjuan *et al.* (1992), *Pyrus* türleri ve *C. oblonga* 'nın *in vitro* manipülasyonları adlı çalışmalarında sonuç olarak; 1: mikroçoğaltım prosedürünün optimizasyonunu, 2: adventif sürgün oluşumu başlangıcını, 3: düşük Fe oranına anaçların karakterizasyon ve seçiminin diferansiyel tepkilerini belirtmişlerdir. Yüksek ışık şiddetinin (135 µmolm⁻²s⁻¹) *Pyrus* ' ta yaprak yüzeyini genişlettiği ve çarpma oranını arttırdığı için önemli bir şart olduğunu kaydetmişlerdir. Adventif sürgünler yaprak disklerinden *P. amygdaliformis* Vill. ve *Cydonia oblonga* L' da TDZ ve NAA içeren MS besi

ortamında rejene olmuştur. Optimal kombinasyon *P. amygdaliformis* için 3 μM TDZ ve 1 μM NAA içerirken, *C. oblonga* için 32 μM TDZ ve 0.3 μM NAA içermektedir. Mikrosürgünler, kökler Fe miktarının azaltılmasına önemli farklılıklar göstermiştir. Düşük Fe varlığına yüksek toleransa sahip *P. amygdaliformis*' in kökleri Fe eksikliğine hassas *C. oblonga* ' ya göre 12 kat daha fazla tepki göstermiştir. *C. oblonga* ' nın yaprak disklerinden elde edilen adventif sürgünler, düşük Fe varlığına toleransa sahip somaklonal varyantların taranması için kullanılmıştır [47].

Yeo ve Reed (1995), *Pyrus* anacında mikroçoğaltımı incelediğinde eksplantlarını açık alanda yetişen *Pyrus calleryana* Dcne 'Oregon Pear Rootstock (OPR) 157', *P. betulifolia* Bunge 'OPR 260', and *P. communis* L. 'Old Home' x 'Farmingdale 230' ('OH x F 230') ın güçlü dallarından seçmiştir. 'OPR 260' and 'OH x F 230' sürgünleri IBA ile desteklenmiş Cheng ortamında, NAA'dan daha iyi çoğalma göstermiştir. 0.5 μM ' dan büyük NAA ve IBA konsantrasyonları sürgün çoğaltımını engellemiştir. 'OPR 260' ve 'OH x F 230' için en başarılı mikroçoğaltım ortamı 8 μM BA ve 0.5 μM IBA ile desteklenmiş Cheng ortamı olarak belirlenmiştir. 'OPR 157' in en iyi sürgün çoğaltımı 8 μM BA ile sağlanmıştır ve 0.5 μM dan düşük NAA' dan ve oksin içermeyen ortamdan IBA' ya göre daha iyi sonuç alınmıştır. 'OH x F 230' IBA ve NAA etkisiyle kolayca köklenmiştir (>80%). 'OPR 260' için en iyi köklenme oranı (42.9%), 10 μM IBA içeren besi ortamının karanlıkta 1 hafta bekletilmesiyle, 'OPR 157' için en iyi köklenme oranı (23.9%) 10 μM NAA ya 15 sn daldırma ile sağlanmıştır. İklimlendirme için köklenen bitkiler serada 4 hafta süre ile tutulmuştur [48].

Shibli *et al.* (1997), 'Yabani Armutun (*Pyrus syrica*) Mikroçoğaltımı' isimli çalışmasında başarılı sürgün oluşumunun 1.5-2.0 mg l- ' benzyl adenine ile desteklenmiş MS besi ortamında sağlandığını, benzyl adenine (2.0 mg l-1) ve zeatin (1.5-2.0 mg l-1 in kallus oluşumunu artırdığını bildirmiştir. Indole butyric acid, indole acetic acid ve naphthalene acetic acid in vitro köklenmeyi uyarmış ve maximum %72 köklenme 3.0 mg l-1 indole acetic acid ile sağlanmıştır. Ne aktif kömürün ne de polyvinylpyrrolidoneun *in vitro* köklenmeyi etkilemediğini gözlemlemiştir. Cam veya plastik kapaklı serada aralıklı sis kullanılarak köklenen sürgünler aklimatize edildiğinde %95 hayatta kalma başarısı sağlanmıştır [49].

Dumanoğlu vd. (1999), iki ahlat tipine ait yeşil çeliklerde IBA ve Putrescine' nin köklenme ve sürme üzerine etkilerini araştırmışlardır. Köklenme oranları ortalama olarak Ahlat 1 tipinde % 11.4, Ahlat 2 tipinde ise % 43.8 olarak belirlenmiştir [50].

Gültekin vd. (2006), yaptıkları çalışmada, ahlat (*Pyrus elaeagrifolia* Pall.), yabani armut (*P. communis* L.) ve badem yapraklı ahlat (*P. amygdaliformis* Vill.)'ta bazı tohum özellikleri ve farklı soğuk ıslak katlama işlem kombinasyonları ile değişik ekim zamanlarının bu türlerin tohumlarının çimlenme yüzdelere olan etkilerini incelemiştir. Her 3 türde de 9 (2 Kasım 2004 tarihinde doğrudan ekim), 11 (2 Ocak 2005 tarihinde doğrudan ekim) ve 2 (6-7°C sıcaklıkta 2 ay soğuk-katlama 2 Mart tarihinde ekim) nolu ön işlemler çimlenme yüzdesini olumlu yönde en fazla etkileyen ön işlemler olmuştur. Buna karşılık, her 3 türde de tohumun çimlenme yüzdesini en az etkileyen ön işlemler 15 (2 Mayıs 2005 tarihinde doğrudan ekim) ve 14 (2 Nisan 2005 tarihinde doğrudan ekim) nolu ön işlemler olmuştur [45].

Dumanoğlu ve Aygün (2006), 'Bazı Ayva (*Cydonia oblonga* Mill.) Genotiplerinde Yaprak Disklerinden Sürgün Organogenesi' adlı çalışmalarında bitkisel materyal olarak, Quince A (bodur), S.Ö. (Sabahattin Özbek) 39-200 (bodur), S.Ö. 18-82 (orta kuvvetli) ve S.Ö. 58-315 (kuvvetli) klon anaçları ile Eşme, Limon ve Çukurgöbek çeşitlerini kullanılmıştır. TDZ + NAA kombinasyonları ya da BA + NAA, AgNO₃ ve putrasin uygulamalarının iki denemede Organogenesis için etkilerini araştırmıştır. Sürgün organogenesi sadece 0.33 mg/l TDZ + 0.5 mg/l NAA + 2.0 mg/l AgNO₃ içeren MS (Murashige ve Skoog) temel besin ortamında önemli düzeyde uyarılmıştır. Uygulamaları sonucunda sürgün oluşturma oranı Quince A'da %80.0, S.Ö. 39-200'de %56.7, S.Ö. 18-82'de %17.5, S.Ö. 58-315'de %37.5, Eşme'de %36.7, Limon'da %40.0 ve Çukurgöbek'de %43.3 olarak belirlenmiştir. Ortalama sürgün sayısı ise genotiplere göre 0.4-2.7 adet/disk arasında değişmiştir [19].

Diğer bir çalışmada ise *in vitro* koşullarda çimlendirilmiş ahlat çöğürü üzerine *in vitro* mikro aşılama yöntemi ile yarı bodur 'OHF-333' klon anacı aşılansmış ve farklı uygulamaların aşı başarısına ve materyallerin dış ortama alıştırılması üzerine etkileri incelenmiştir. Söz konusu aşı kombinasyonu *in vitro* mikro aşılama tekniği ile başarılı bir şekilde elde edilmiş ve aşıli bitkilerin dış koşullara alıştırılması konusunda daha

ayrıntılı çalışmalara ihtiyaç olduğu belirtilmiştir. Bu çalışma ahlat ile ‘OHF-333’ anacının aşı uyuşması hakkında olumlu bilgiler vermektedir [51].

Bir *Pyrus* türü olan *Pyrus pyrifolia*’ da Thakur *et al.* (2008), mikroçoğaltımda eksplant kuruluşunu ve sürgün oluşumunu incelemiş, çalışma sonucunda en yüksek eksplant oluşumu kış mevsimi boyunca gözlemlenmiş (77.88%), bu oran bahar mevsimi boyunca da yaklaşık olarak aynı kalmıştır (76.21%). En düşük eksplant oluşumu yağmurlu sezon boyunca gözlemlenmiştir (61.94%). Sürgün uçlarının oluşumu (69.07%), boğum segmentlerinin oluşumundan (71.95%) önemli ölçüde düşüktür [52].

Bhatt *et al.* (2012), elma için düşük maliyetli mikroçoğaltım ortamını belirlemek amaçlı çalışmalarında M9 elma anacının taze sürgünlerini 3 mg/l BA, 2 mg/l Kinetin, % 3 sukroz ve % 0.8 agar içeren MS besi ortamına aktarmışlardır. % 85.7 oranında multiple sürgün elde etmişlerdir. Daha sonra maliyeti düşürmek amacı ile sukrozu sofr şeker ile değiştirmiş, sıvı MS ortamına 2 mg/l BA, 3 mg/l Kinetin, % 3 sofr şeker ilave edip 22 eksplantta sürgün gelişimi gözlemlenmişlerdir. Sofr şeker ile sukroz arasında sürgün gelişimi, büyüme, sürgün sayısı, köklenmede önemli farklılıklar gözlemlenmemiştir [53].

Reed *et al.* (2012), yaptıkları çalışmada *Pyrus sp.* sürgünlerinin mikroçoğaltımı ve büyümesinde kalsiyum klorit, potasyum fosfat ve magnezyum sülfatın yüksek konsantrasyonda kullanımının 4.4 μ M BA (benzyladenine) ile desteklenmiş MS ortamına göre daha iyi sonuç verdiğini belirtmiştir [54].

Boudabous *et al.* (2013), *Malus domestica* L. kültür çeşidi Douce de Djerba’ da mikroçoğaltım çalışmalarında nodal eksplantlarda BAP (1.0 mg.L^{-1}) ve IBA (0.1 mg.L^{-1}) ile desteklenmiş temel MS besi ortamında yüksek oranda sürgün oluşumu (85%) ve farklılaşma gözlemlenmiştir. *In vitro* çoğaltılmış mikro sürgünler en yüksek çoğalma oranını gösteren BAP (1.0 mg.L^{-1}) ve IBA (0.1 mg.L^{-1}) ile desteklenen ortama aktarılmış, kardeşlenme hızlıca gerçekleşmiştir. BAP sürgün oluşumunu ve büyümeyi + yönde etkilemiştir fakat 4.0 mg.L^{-1} ’ yi aşan konsantrasyonun büyümeyi azalttığı kaydedilmiştir. IBA (3.0 mg.L^{-1}) ve toz aktif kömür 2.0 g.L^{-1} ile zenginleştirilmiş yarı mukavemetli MS ortamında kültürlen sürgünlerde sağlıklı kök gelişimi ile yüksek oranda köklenme (% 66.7) görülmüştür. Kökleri iyi gelişen bitkiler % 60 hayatta kalma oranı ile dış ortama aktarılmıştır [55].

Aygün ve Dumanoglu (2015), ahlat (*P. elaeagnifolia*) bitkisinde *in vitro* sürgün çoğalmasını ve *in vitro* ve *ex vitro* köklenme oluşumunu incelemiştir. Temel MS ortamını yalnızca benzyladenine (BA) nın farklı konsantrasyonları veya oksinlerle birlikte kombinasyonu ile desteklemişlerdir. İlk kültürde sürgün çoğalması yüzdesi 9.0 μ M BA ve 0.5 μ M indole-3-acetic acid ile desteklenmiş MS ortamında %80' in üzerinde elde edilmiştir. Alt kültürlerde en yüksek oranda sürgün çoğalması 4.5 ve 9.0 μ M BA içeren MS ortamında görülmüştür. *In vitro* köklenme denemelerinde yüksek performans 5 μ M indole-3-butyric acid (IBA) içeren besi ortamında elde edilmiştir. *Ex vitro* köklenme denemelerinde ise 10 μ M IBA nın çabuk daldırma yöntemi ile uygulanmasından önemli ölçüde etkilenmiştir [6].

Dumanoglu vd. (2016), yaptıkları çalışmada, “Golden Delicious” ve “Mondial Gala” elma çeşitlerinin (*Malus x domestica* Borkh.) sürgün ucu kültürü ile çoğaltımında sürgün ve kök oluşumu üzerine Murashige ve Skoog (MS) temel besin ortamına amonyum nitratın 1/4, 1/3, 1/2 ve 1/1 düzeylerinde katılmasının etkilerini araştırmıştır. Ortamlara sürgün çoğaltma aşamasında 1.0 mg/l BA ve 0.5 mg/l GA₃, köklendirme aşamasında 0.2 mg/l IBA+0.2 mg/l NAA ilave etmiş, ek olarak *in vitro* köklenmenin iyileştirilmesi amacıyla zor köklenen “Golden Delicious” ve kolay köklenen “MM106” (kontrol) genotiplerine ait mikro çeliklere farklı dozlarda IBA (0.25, 0.50, 1.0, 1.5, 2.0 ve 3.0 mg/l) veya IBA+NAA (0.5+0.5 mg/l) ilave edilmiş makro element düzeyi 1/2 olan MS besin ortamına doğrudan ya da IBA solusyonlarına (1000 ve 4000 ppm) hızlı daldırmanın ardından dikmiştir. Köklendirme denemelerinde kültürler ilk 1 hafta karanlıkta tutulmuştur. En yüksek sürgün oluşumu 8.7 adet/eksplant ile “Mondial Gala” çeşidinde 1/4 NH₄NO₃ düzeyinde elde edilmiştir. “Golden Delicious” çeşidinde 4.0-5.2 adet/eksplant arasında değişen sürgün sayısı üzerine NH₄NO₃ düzeylerinin etkisi istatistiksel anlamda benzer olmuştur. Zor ve kolay köklenen elma genotiplerinde köklenme oranı 1000 ppm IBA uygulaması ile %50 (Golden Delicious) ve %100 (MM106) düzeylerine çıkarılmıştır [56].

2.2. Ahlatta ve Diğer Yumuşak Çekirdeklielerde Yapılmış Moleküler Çalışmalar

Pyrus spp. dünyada en geniş yayılım alanı gösteren türlerden bir tanesidir. *Pyrus* cinsi taksonomik olarak Rosaceae familyasının Pomoideae alt familyasında incelenmektedir.

Challice ve Westwood, (1973) *Pyrus* spp. $x=17$ kromozom sayısında olduğunu ve 20 temel tür bulundurduğunu belirtmişlerdir [57].

Pyrus türleri arasında kültüre alınmış, ticari olarak üretimi yapılan çok az tür bulunmaktadır.

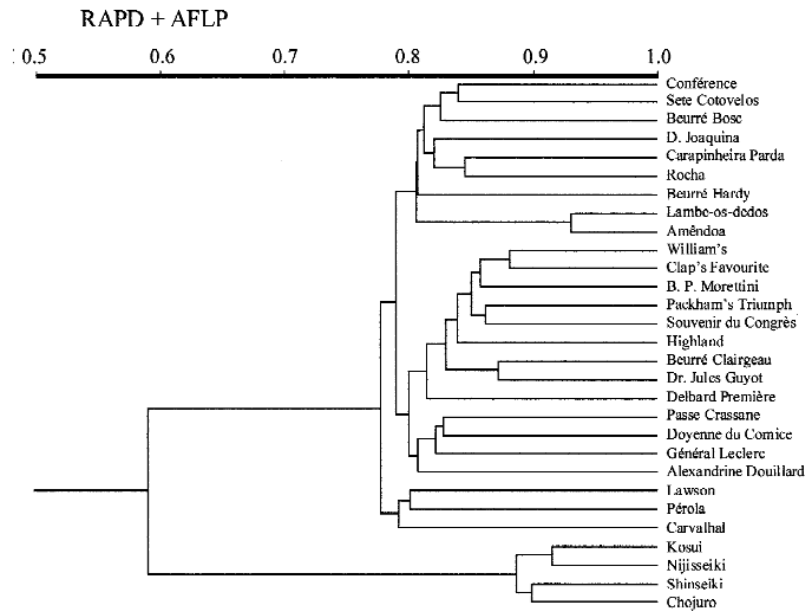
Ülkemiz bitki çeşitliliği ve genetik kaynaklar bakımından dünyadaki önemli merkezlerden birisidir. *Pyrus* cinsi yumuşak çekirdekli meyveler içerisinde ikinci önemli türdür ve hemen hemen tüm bölgelerde de yetiştirilmektedir.

Çeşitler arasındaki genetik varyasyonu ortaya çıkarmakta hangi moleküler DNA tekniğinin en uygun olduğunu belirlemek amacıyla RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphisms), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), SSR (Simple Sequence Repeat) ve ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) DNA işaretleyici teknikleri karşılaştırılmış ve polimorfizm bakımından SSR ve AFLP teknikleri; maliyet bakımından RAPD ve ISSR teknikleri; tekrarlanabilirlik bakımından RFLP, SSR, ISSR ve AFLP DNA tekniklerinin avantajlı oldukları belirtilmiştir [58].

DNA temelli moleküler markörler *Pyrus* cinsinde genetik akrabalığın analizleri ve çeşitlerin farklılıklarının ortaya konulmasında etkili bir şekilde kullanılmaktadır [59].

Moleküler çalışmalar çeşitler arasında genetik akrabalığın tanımlanması, genetik çeşitliliğin hesaplanması ve genetik kimliklerin ortaya konulmasında güçlü bir araç olarak ortaya çıkmıştır [60].

Monte – Corvo *et al.* (2000), tarafından Portekizin 8 yerel armut çeşidinin de bulunduğu toplam 25 armut çeşidinde AFLP ve RAPD markörleriyle yaptıkları çalışmada çeşitlerin genetik akrabalıklarını değerlendirmiştir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Genetik benzerlik matriks dendogramı [61]

Forte *et al.* (2002), yaptıkları çalışmalarda, kloroplastta bulunan *matK* geni markırlarına göre Orta Asya yabani elması olan *Malus sieversii*'nin kültürü yapılan elmalara en yakın tür olduğunu belirlemişlerdir. Bunun yanında diğer bir yabani elma türü olan *Malus sylvestris*'in *Malus sieversii* ile yakın ilişkili olduğunu ve *Malus sylvestris*'in kültürü yapılan elmaların ortaya çıkışında ikincil önemli grup olduğunu bildirmişlerdir [62].

Ashok *et al.* (2006), Kuzey Amerika'ın 28 ticari armut çeşidinin SSR markörleri ile akrabalıklarını araştırdıkları çalışmasında 7 armut çeşidinin diğerlerinden farklı olduğunu tespit etmişlerdir [63].

Coart *et al.* (2006), elma içerisindeki kloroplast varyasyonu ve kültürü yapılan elma (*Malus domestica*) ile Avrupa yabani elması (*Malus sylvestris*) arasındaki ilişkileri cpDNA markırları ile araştırmışlardır. *Malus domestica* ile *Malus sylvestris* arasında bilinenden daha yakın bir ilişki olduğu ve 8 kloroplast haplotipinin iki türde de var olduğu belirlenmiştir. Öte yandan Asya yabani elması olarak bilinen *Malus sieversii* ve *Malus domestica*'da yalnızca bir kloroplast haplotipi ortak olarak bulunmuştur. *Malus* cinsi içerisinde yüksek düzeyde cpDNA polimorfizmi bulunmuş ve bu durum *M. domestica*'nın orijininin karmaşık olduğu şeklinde yorumlanmıştır. Öte yandan *M.*

sylvestris olarak bilinen bazı genotiplerin aslında *M. sieversii* ve *M. domestica* melezi olduğu ortaya konulmuştur [64].

Erdoğan vd. (2007), yaptıkları çalışmada Ankara ve çevresinde daha önceden seçilmiş 39 ‘Ankara’ armudu klonu arasındaki genetik farklılıkları RAPD tekniği ile araştırmıştır. DNA miktarı 18.4 ng/μl ile 103.9 ng/μl arasında değişmiştir. 25 adet primerden (Operon) 2 tanesinde amplifikasyon zayıf olmuş diğerleri ise açıkça okunabilen ve tekrarlanabilen bantlar vermiştir. Fakat bu bantlar polimorfizim göstermediğinden ‘Ankara’ armudu klonlarının genetik ayrımı yapılamamıştır [65].

Bir yabani elma türü olan *Malus sieversii*’ nin farklı bölgelerden toplanmış genotiplerinde genetik ilişki çalışmaları yapılmış ve çeşit veya genotiplerin coğrafik orijinleri ile genetik yapıları arasında bir ilişki olduğu bildirilmiştir. Buna göre, aynı coğrafik bölgede ortaya çıkan genotipler diğer bölgelere has genotiplere göre birbirlerine genetik olarak daha yakın bulunmaktadır [66].

Brini *et al.* (2008), Tunus’ un 25 yerel armut çeşidi ve 6 Avrupa armut çeşidi arasında genetik çeşitlikleri araştırmışlardır. 25 yerel armut çeşitleri arasında 12 farklı parmak izi deseni tespit etmişlerdir [67].

Richards *et al.* (2009), Kazakistan’ ın sekiz farklı bölgesinden toplanmış olan toplam 949 adet *Malus sieversii* genotipinde genetik çeşitliliği incelemişlerdir. Genetik çeşitlilik bakımından bölgeler arasında önemli farklılıklar belirlenmiş ve güneybatı bölgelerden alınan örneklerin kuzey bölgelerden alınanlara göre daha fazla varyasyon gösterdiği tespit edilmiştir. Bunun yanında her bölge içerisinde de önemli düzeyde varyasyon saptanmıştır. Araştırmacılar aynı popülasyonda yapılan diğer çalışmalarda elma hastalıklarına karşı tepkilerin de belirlendiğini ve toplama yapılan bölgeler arasında bu bakımdan da varyasyon olduğunu belirtmişlerdir [68].

Volk *et al.* (2009), Kırgızistan orijinli ve *Malus kirghisorum* olarak bilinen türe ait 49 elma genotipi ile Kazakistan orijinli *M. sieversii* elmalarını genetik yapı olarak karşılaştırmışlardır. Çalışmada Kırgızistan’ daki *M. kirghisorum* türünün bazı farklı alleri taşıdığı ancak *M. sieversii* ile ilişkili bir tür olabileceği üzerinde durulmuştur [69].

Forsline *et al.* (2010), Kazakistan’ da 1989, 1993, 1995 ve 1996 yıllarında elma genetik kaynakları toplama çalışmaları yapmışlardır. Çalışmada çoğunlukla tohum örnekleri alınmış olmakla birlikte aynı miktarda aşı gözü şeklinde de toplama yapılmıştır. Toplam 894 ağaçtan 12 bin civarında tohum alınmış ve ABD’ ye götürülmüştür. Kazakistan’ dan toplanan elma genetik kaynakları üzerinde ABD’ de farklı araştırma kuruluşlarında, soğuğa dayanıklılık ve başta ateş yanıklığı (*Erwinia amylovora* Burrill) ve karaleke (*Venturia inaequalis* (Cooke) Wint.) olmak üzere birçok hastalığa karşı olan tepkileri belirlenmiş ve bu konularda dayanıklı çeşit eldesi için olumlu sonuçlar alınmıştır [70].

Gasi *et al.* (2010), Bosna Hersek ve yabancı orijinli elma çeşitlerinde morfolojik ve moleküler markırlarla akrabalık düzeylerini araştırmışlar ve sonuçta yerli ve yabancı materyallerin belirgin olarak birbirinden farklı olduklarını bulmuşlardır [71].

Pereira-Lorenzo *et al.* (2008), Kanarya adalarına özgü yerel elma çeşitleri ile yabancı orijinli çeşitleri karşılaştırmışlar ve sadece yerel çeşitlere özgü beş adet allel olduğunu saptamışlardır. Bu durum gen merkezi olmasa bile uzun yıllar (Kanarya adaları için yaklaşık 500 yıl) yetiştiricilik yapılan bölgelerde de o bölgeye özgü değişimlerin meydana geldiğini ve oraya has genetik havuzun oluştuğunu göstermektedir [72].

Ülkemizde bulunan elma genetik kaynaklarında varyasyon düzeyini belirlemek için peroksidaz markırları ile çalışmalar yapılmıştır [73]. Bu çalışmada genetik kaynaklar içerisinde kullanılan markırlar yönünden yüksek düzeyde bir varyasyonun olduğu tespit edilmiştir. Orijin bölgeleri ülkemizin birbirine yakın coğrafik alanları olan ve morfolojik özellikler yönünden benzerlik gösteren genotipler genel olarak birbirine yakın olarak konumlanmışlardır. Bu durum bu genotiplerin muhtemelen aynı genetik ataya sahip olabileceğini göstermektedir.

Bayazıt vd. (2011), yaptıkları çalışmada Türkiye’ nin farklı bölgelerinden seçilen 13 ayva çeşidinde RAPD tekniğini kullanarak genetik haritalama yapmıştır. Kullandıkları 30 primerden 14 tanesi hiç polimorfizm göstermediği için polimorfizm gösteren 16 primer ile çalışmalarını sürdürmüştür. Genotipler arasında 0.483 ile 0.925 arasında benzerlik gözlemlenmiştir [74].

Uzun vd. (2016), Türkiye’ deki elma gen kaynakları arasındaki ilişkiyi belirlemek için yaptıkları ISSR taramasında 14 primerle çalışmış, toplamda 111 band elde etmiş ve bunlardan 76 tanesini polimorfik olarak belirlemiştir. Çalışmada primer başına düşen polimorfizm oranı 5.4, ortalama polimorfizm bilgi içeriği ise 0.37 olarak kaydedilmiştir. Yapılan UPGMA analizi sonucunda tipler 0.79 ile 0.98 arasında genetik benzerlik göstermiştir ve UPGMA analizine dayanan dendrogramda ise birçok alt grup belirlenmiştir. Yerel çeşitler arasında yüksek seviyelerde genetik varyasyon gözlemlenmiştir. Yabancı çeşitlerden *M.baccata*, *M. prunifolia* ve *M. sylvestris* yerel çeşitler arasında karışık olarak kümelendirilmiş şekilde incelenmiştir. Çalışmada Türkiye’ nin elma genetik çeşitliliği açısından zengin olduğu ve bu türlerin elma ıslah programları için fırsatlar sağlayabileceği sonucuna varılmıştır [75].

Bir başka çalışmada Pınar vd. (2016), Türkiye’ nin farklı bölgelerinden seçtikleri 17 ayva çeşidinde meyve karakterizasyonu ve SRAP tekniğini kullanarak genetik haritalama yapmıştır. Meyve karakterizasyonunda ‘Bardacık’ en yüksek meyve ağırlığına sahipken, titre edilebilir asit miktarı oranı ‘Osmancık’ ta gözlemlenmiştir. Meyve özelliklerinde çeşitler arası ciddi bir varyasyon tespit edilmiştir. Moleküler analizlerde ise 23 SRAP primeri ile çalışılmış, toplamda 133 bant elde edilmiş olup bunlardan 67 tanesi polimorfiktir. Genetik benzerlik 0.78 ile 1.00 arasındadır. 2 çeşit (‘Sekergevrek’ ve ‘32S04’) diğer çeşitlere oranla genetik olarak daha farklı bulunmuştur [76].

3. BÖLÜM

MATERYAL VE METOT

Bu araştırma, 2016 – 2017 yıllarında Erciyes Üniversitesi, Seyrani Ziraat Fakültesi Araştırma Birimi Bahçe Bitkileri Bölümü Doku Kültürü ve Moleküler Genetik Laboratuvarlarında yürütülmüştür.

3.1. Materyal

Bu çalışmanın bitkisel materyalini ‘Doğal Ahlat (*Pyrus elaeagnifolia* Pall.) Populasyonlarındaki İri Meyveli Tiplerin Belirlenmesi, Moleküler Karakterizasyonu, Vejetatif Çoğaltma Kapasiteleri ile Kurak-Yarıkurak Alanlarda Kullanım İmkânlarının Belirlenmesi ve Muhafazası’ araştırma projesi kapsamında toplanan ahlat genotipleri oluşturmaktadır.

Toplamda 40 adet ahlat genotipi ile çalışma yürütülmüştür (Şekil 3.1). Bu genotiplerin illere göre dağılımı aşağıda yazılmış olup Çizelge 3.1’ de verilmiştir.



Şekil 3.1. Türkiye’ nin farklı bölgelerinden toplanan ahlat genotipleri

Çizelge 3.1. Araştırmada kullanılan ahlat genotipleri

SIRA NO	GENOTİP	ALINDIĞI İL	ALINDIĞI MEVKİ
1	KY2	Kayseri	Talas-Başakpınar
2	KY8	Kayseri	Talas-Başakpınar
3	KY14	Kayseri	Talas-Başakpınar
4	KY15	Kayseri	Tomarza-Giriş
5	KY21	Kayseri	Tomarza-İncili Köyü
6	AD32	Adana	Tufanbeyli-Uçevler
7	AD33	Adana	Tufanbeyli-Uçevler
8	AD35	Adana	Tufanbeyli-Fatma Kuyu
9	N37	Nevşehir	Ürgüp-Yeşilöz
10	N38	Nevşehir	Ürgüp-Yeşilöz
11	N40	Nevşehir	Ürgüp-Yeşilöz
12	N41	Nevşehir	Ürgüp-Yeşilöz
13	N42	Nevşehir	Ürgüp-Yeşilöz
14	N44	Nevşehir	Ürgüp-Yeşilöz
15	N45	Nevşehir	Ürgüp-Yeşilöz
16	KY48	Kayseri	Hacılar-Sesli
17	KM52	Kahramanmaraş	Göksun
18	KM53	Kahramanmaraş	Göksun
19	KM54	Kahramanmaraş	Göksun
20	KM55	Kahramanmaraş	Göksun
21	KM57	Kahramanmaraş	Göksun
22	AN59	Ankara	Ayaş
23	AN64	Ankara	Beypazarı-Ahlatlık Geçidi
24	AN67	Ankara	Beypazarı-Ahlatlık Geçidi
25	E70	Eskişehir	Eskişehir-Sarıcakaya arası
26	AK73	Afyonkarahisar	Bayat-Yüreğil arası
27	AK76	Afyonkarahisar	Bayat-Yüreğil arası
28	AK79	Afyonkarahisar	Afyon-Şuhut arası
29	D83	Denizli	Çardak-Denizli arası
30	D84	Denizli	Merkez
31	U87	Uşak	Ulubey
32	I89	Isparta	Şarkikaraağaç
33	KN92	Konya	Hüyük-Buduk mah.
34	KN95	Konya	Konya-Beyşehir arası
35	KN97	Konya	Konya-Beyşehir arası
36	KN100	Konya	Merkez
37	IE2	Isparta	Eğirdir
38	IE4	Isparta	Eğirdir
39	IE5	Isparta	Eğirdir
40	IE13	Isparta	Eğirdir

3.2.Metot

3.2.1.Doku Kültürü Çalışması

3.2.1.1.Besin ortamının hazırlanması

Çalışmada Aygün ve Dumanoglu (2015)' in geliştirdikleri protokol uygulanmıştır. 0.3 μM giberellik asit (GA_3) ile desteklenmiş MS (Murashige&Skoog Medium - Murashige, 1962) besi ortamı kullanılmış olup; bu besi ortamı 30 g/l sukroz, 7.0 g/l agar ve benzyladenine (BA; 9.0 μM), indole-3-aceticacid (IAA; 0.5 μM) ile desteklenmiştir [6]. Besin ortamında kültüre alınan eksplantların bu işlemde kısa süre sonra ortama salgıladıkları fenolik maddelerin absorpsiyonu amacıyla 2 g/l toz aktif karbon ilavesi yapılmıştır. Besin ortamlarının pH'sı agar eklenmeden ve otoklavlanmadan önce 5.7' ye ayarlanmış ve sonrasında otoklavda 121 °C' de 20 dakika süreyle sterilize edilmiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Besi ortamlarının hazırlanması

3.2.1.2.Eksplantların yüzey sterilizasyonu

Kültüre alınan genotiplerde sürgünler o yılı sürmüş ve belli bir pişkinliğe ulaşmış olanlardan alınmıştır. Laboratuvar ortamına getirilen sürgünler yapraklarından ayrıldıktan sonra yaklaşık 3' er göz içerecek şekilde kesilmiş, öncelikle akan çeşme suyu altında 5 dk yıkanmıştır, ardından %0.1 fungusit içeren sulu çözeltide 10 dk süre ile bekletildikten sonra steril kabine alınmış, %70 etil alkole 1 dk muamele edilip steril saf sudan geçirilmiş, ardından %10 ticari sodyum hipoklorit çözeltisine % 0.1 Tween 20

ilave edilmiş, eksplantlar bu çözelti ile 18 dk çalkalanmış ve steril distile su ile 3 kez durulanmıştır (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Eksplantların yüzey sterilizasyonu

Yüzey sterilizasyonunun ardından ≈ 1 cm uzunluğunda 1' er göz içerecek şekilde yeniden kesilen eksplantlar BA, GA₃ ve IAA ile desteklenmiş 10 ml MS besin ortamı içeren kültür kaplarına dikine kültürlenmiştir (Şekil 3.4).

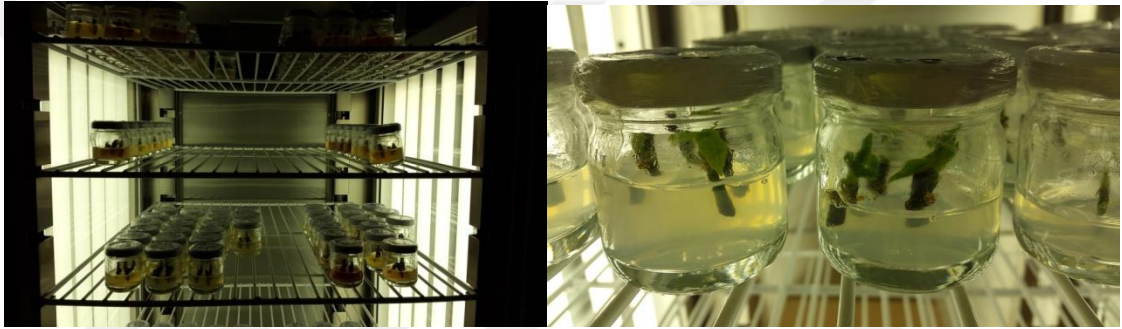


Şekil 3.4. Eksplantların kültür kaplarına dikilmesi

Her bir genotipte 1 kültür kabında 3' er eksplant olacak şekilde 30 eksplant tekerrürlü olarak kültüre alınmıştır. İlk kültürden 4 hafta sonra gözlerden süren sürgün uzunluğu 1 cm' yi geçtiğinde eksplantlar 9.0 μM BA ve 0.3 μM GA₃ ile desteklenen alt kültür MS ortamına aktarılmıştır [6]. Eksplantların sürgün geliştirme oranları kaydedilmiştir.

3.2.1.3. Kültür ortamının şartları

İklim kabininin ışığı 35 $\mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ (yaklaşık 3200 lüks) ışık yoğunluğunda, ortam sıcaklığı 24 ± 1 °C olacak şekilde ayarlanmış ve fotoperyot (zamanlayıcı yardımıyla 16/8 saat ışık/karanlık) uygulanmıştır (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. İklimlendirme dolabında gözlemlenen kültüre alınmış doku parçaları

3.2.2. Moleküler Çalışmalar

3.2.2.1. DNA izolasyonu

Araştırmada çalışılan 40 ahlut genotipinin DNA izolasyonu için bitkilerin hastalık ve zararlılardan arı, yeni açmakta olan genç sürgün yaprakları kullanılmıştır. Bitkiden alınan yapraklar laboratuvara getirildikten sonra izolasyon işlemi modifiye edilmiş CTAB protokolüne [77] göre yapılırken, DNA kalite ve miktar ölçümleri %1' lik agaroz jelde yürütülerek yapılmıştır. DNA örnekleri analizler yapılncaya kadar -20 °C' de muhafaza edilmiştir.

DNA izolasyonunda kullanılan tampon çözeltinin içeriği gösterilmiştir.

DNA izolasyon protokolü;

- 62°C' de su banyosunu önceden hazırlanır.

- Taze yapraklar (0.2 gr) 0.6 ml ekstraksiyon çözeltisi (Çizelge 3.2) içerisinde ezilmiştir.
- 62 °C' de 30 - 60 dakika boyunca inkubasyon yapılır, örnekler arasına ters-düz edilir.
- 300 ul chloroform: octanol (24 : 1) çözeltisi ilave edilir ve yavaşça ters-düz yapılarak karıştırılır (100 defa).
- 14000 rpm.' de 5 dk santrifüj edilir.
- Sulu kısmı pipetle çekilerek başka steril 1,5 ml' lik bir tüpe aktarılır.
- 500 ul chloroform: octanol (24:1) çözeltisi ilave edilir ve yavaşça ters-düz yapılarak karıştırılır (100 defa).
- 14000 rpm.' de 5 dk santrifüj edilir.
- 2. kez 500 ul chloroform: octanol (24:1) çözeltisi ilave edilir ve yavaşça ters-düz yapılarak karıştırılır (100 defa).
- 14000 rpm.' de 5 dk santrifüj edilir.
- Üst faz pipetle çekilerek başka steril 1,5 ml' lik bir tüpe aktarılır.
- Üzerine toplam hacmin 2/3 ü kadar (550 ul) soğuk isopropanol ilave edilir (beyaz çökelek halinde DNA + diğer organik bileşikler gözle görülebilir). 30 dk veya daha fazla süre ile -20 °C'de bekletilir.
- 14000 devirde 2 dk santrifüj edilir ve sıvı kısmı uzaklaştırılır.
- Elde edilen pelletin üzerine 500 ul yıkama çözeltisi (% 76 etanol ve 10 mM NH₄Ac (amonyum asetat)) ilave edilir ve oda sıcaklığında 10 dk bekletilir.
- 14000 rpm' de 3 dk santrifüj yapılır ve sıvı kısım uzaklaştırılır.
- Beyaz çökelek tamamen kuruyuncaya kadar çeker ocakta bekletilir.
- Beyaz çökelti üzerine 300 ul TE (10 mM Tris, 0,1 mM EDTA, pH 7,4) ilave edilir.
- Çökelti tamamen çözünene kadar oda sıcaklığında gece boyunca veya 65 °C' de 60 dk boyunca bekletilir.
- 10 ug/ml son konsantrasyon olacak şekilde RNase ilave edilir ve 37 °C' de 30 dk inkube edilir.
- 200 ul TE ve 15 ul amonyum asetat (10 mM, pH 7,7) ilave edilir. Son olarak çözelti üzerine 2 hacim kadar soğuk etanol ilave edildikten sonra 20 dk süre ile veya gece boyunca -20 °C' de bekletilir.

- 14000 rpm.' de 3 dk santrifüj yapılır ve sulu kısmı dikkatlice döktükten sonra oda koşullarında çökelti iyice kurutulur.
- Uygun miktarda TE (10 mM Tris, 0.1 mM EDTA, pH 7.4) ilave edilir (100-200ul) [77].



Şekil 3.6. DNA izolasyonu

Çizelge 3.2. DNA Ekstraksiyon Çözeltileri

Kimyasal	Oran
CTAB	% 2
EDTA	20Mm
Tris-Cl	100Mm
NaCl	1.4M
Mercaptoethanol	%0.2

3.2.2.2.PCR optimizasyonu

ISSR primerleri için Uzun vd. (2009)' nin kullandığı PCR yöntemi optimize edilerek kullanılmıştır [78]. Çizelge 3.3' te her primer için optimize edilmiş dd.H₂O, Buffer, MgCl₂, dNTP, primer, DNA Taq Polimeraz ve DNA miktarları ve Çizelge 3.4' te döngü programları verilmiştir.

Çizelge 3.3. PCR Mix Konsantrasyonları

	DNA	Buffer	MgCl ₂	dNTP	Primer	Taq	Su	Tp.Hacim
	20ng/ µl	10x µl	50mM	100m M		0,5 U	µL	µL
ISSR	2 µl	1,5 µl	1,5 µl	0,33	1,5 µl	0,2	7,97	15

Çizelge 3.4. PCR Döngü Programı

Sıcaklık	Süre	Açıklama
94 °C	3 dk-1 döngü	Ön denatürasyon
94 °C	1 dk-35 döngü	Denatürasyon
53 °C	50 dk-35 döngü	Bağlanma
72 °C	2 dk-35 döngü-2 tekrar	Uzama
72 °C	7 dk-1 döngü	Son uzama
4 °C	-	Bekleme

PCR çalışmalarından elde edilen PCR ürünlerine 3 µl yükleme bufferı (20 ml gliserol (% 40), 30 ml steril su, 0.05 g bromofenolblue) eklenerek elde edilen karışım % 2' lik agaroz jele yüklenerek 110 V elektrik akımı altında 3 saat süreyle koşturulmuştur. Agaroz jelin hazırlanmasında 1X TAE bufferı kullanılmış ve içerisine 25 µl (0.5 mg/ml) ethidiumbromide çözeltisi eklenmiştir. Her elektroforez işleminde 100 bp DNA Ladder standart olarak yüklenmiştir. Elektroforez işleminden sonra jeller bilgisayara bağlı olan jel görüntüleme cihazına alınarak UV altında jel görüntüleri bilgisayara kaydedilmiş, polimorfik bantlar olup olmadığına bakılmıştır (Şekil 3.7).

**Şekil 3.7. PCR, Görüntüleme cihazı**

3.2.2.3. ISSR lokuslarına ait primerler

Çalışmada izolasyonu yapılan DNA' lar genetik benzerlik ve farklılıklarının tespit edilmesi amacıyla Çizelge 3.5' te verilen ISSR markörleriyle taranmıştır. Araştırmada 20 adet ISSR primeri test edilmiş ve bu primerlerden polimorfik ve skorlaması kolay olan 13 ISSR primeri bu çalışma için seçilmiştir.

Çizelge 3.5. ISSR Primerleri

	Primer adı	Primer açılımı 5' -3'
1	(AG) ₈ T	AGAGAGAGAGAGAGAGT
2	(VHVGTTG) ₇	HVVGTTGTTGTTGTTGTTG
3	(AG) ₇ YC	AGAGAGAGAGAGAGAYC
4	(CT) ₈ TG	CTCTCTCTCTCTCTCTTG
5	(HVHCA) ₇ T	HVHCACACACACACACAT
6	BDB(CA) ₇ C	BDBCACACACACACACAC
7	(AGC) ₆ G	AGCAGCAGCAGCAGCAGCG
8	(TCC) ₅ RY	TCCTCCTCCTCCTCCRY
9	(GA) ₈ YG	GAGAGAGAGAGAGAGAYG
10	(DBDACA) ₇	DBDACACACACACACACA
11	(CAC) ₆	CACCACCACCACCAC
12	(GAA) ₆	GAAGAAGAAGAAGAAGAA
13	(CA) ₆ AC	CACACACACACAAC

3.2.2.4. Verilerin değerlendirilmesi

Yapılan moleküler analizler sonucunda elde edilen jel görüntüleri değerlendirilmiş ve tüm primerlerin bantlarını içeren bir tabloya skorlamalar sonucu elde edilen baz çifti birimindeki bant büyüklükleri yazılmıştır. DNA bant varlığı durumunda (1), yokluğu durumunda (0) değerleri verilerek ikili (binary) matriks dendrogram tablosu veri dosyası hazırlanmıştır. Elde edilen verilerin analizi için NTSYS (Numerical Taxonomy Multivariate Analysis System) 2.1 bilgisayar paket programı kullanılmış, Rohlf [79] metoduna göre elde edilen benzerlik matrisinin UPGMA (Unweighted Pair Group Method Arithmetic Average) gruplandırması ile genetik ilişkinin seviyesi belirlenmiştir. Benzerlik indeksleri Dice [80]' e göre hesaplanmıştır.

3.2.2.5.Primerlerin polimorfizm oranlarının saptanması

Primerlerin polimorfizm oranları belirlenirken aşağıda yer alan formül uygulanmıştır.

$$\text{Polimorfizm oranı} = \frac{\text{Polimorfik bant sayısı}}{\text{Toplam bant sayısı}} \times 100$$



4. BÖLÜM

ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

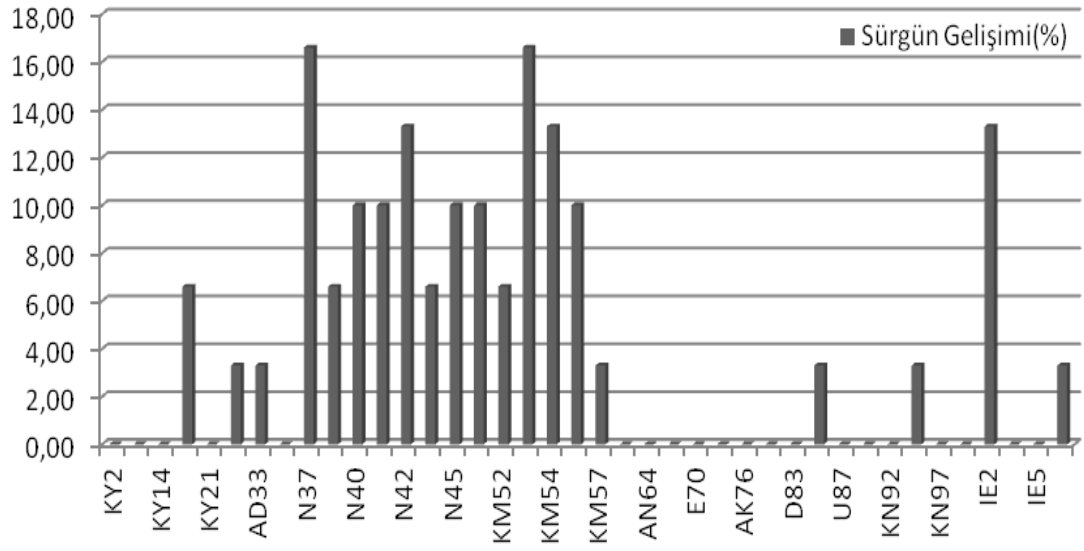
4.1.Doku Kültürü Çalışmaları

Belli ağaç ve meyve özellikleri dikkate alınarak Türkiye' nin farklı birçok bölgesinden seçilip toplanan 40 farklı *Pyrus elaeagrifolia* L. bitkisinin ilkbahar sürgünleri *in vitro* çoğaltım için en başarılı metot olan Aygün ve Dumanoglu (2015)' e göre MS ortamına transfer edilmiştir [6]. Araştırma sonucunda incelenen tüm özelliklerle genotipler arasında önemli farklılıklar belirlenmiştir. Kültüre alma işlemini takiben 4 hafta sonunda sürgün gelişimi gösteren ve göstermeyen genotipler belirlenmiş, mikroçoğaltım etkinliği Çizelge 4.1' de verilmiştir. Bulgulara göre 40 ahlal genotipinden 20 tanesinde sürgün gelişimi gözlemlenmiştir (Çizelge 4.1). Genotiplerin sürgün oluşturma potansiyelleri %3.3 ile %16.6 arasında değişmektedir ve en yüksek sürgün gelişim oranı %16.6 oranla Nevşehir' den alınan N37 numaralı genotip ile Kahramanmaraş' tan alınan KM53 numaralı genotiptedir. Oysa Aygün ve Dumanoglu (2015), yaptıkları çalışmada *P. elaeagrifolia* Pall.' da başlangıç kültüründe sürgün çoğalması oranını yüksek seviyelerde (>80%) 9.0 μ M BA ve 0.5 μ M IAA ile desteklenmiş MS besi ortamında gözlemlemiştir. Alt kültürlerde ise en yüksek başarıyı 4.5 μ M ve 9.0 μ M BA ile desteklenmiş besi ortamlarında sağlamıştır [6]. Boudabous *et al.* (2013) ise *Malus domestica* L. kültür çeşidi Douce de Djerba' da mikroçoğaltım çalışmalarında nodal eksplantlarda BAP (1.0 mg.L⁻¹) ve IBA (0.1 mg.L⁻¹) ile desteklenmiş temel MS besi ortamında yüksek oranda sürgün oluşumu (85%) ve farklılaşma gözlemlemiş, *in vitro* çoğaltılmış mikro sürgünleri en yüksek çoğalma oranını gösteren BAP (1.0 mg.L⁻¹) ve IBA (0.1 mg.L⁻¹) ile desteklenen ortama aktarmış, kardeşlenme hızlıca gerçekleştirilmiştir [55]. Yine aynı şekilde bir başka *Pyrus* türü olan *Pyrus pyrifolia*' da Thakur *et al.* (2008), mikroçoğaltımda eksplant kuruluşunu ve sürgün oluşumunu incelemiş, çalışma sonucunda kış mevsimi boyunca dahi yüksek oranda sürgün oluşumu gözlemlenmiş (77.88%), bu oran bahar mevsimi boyunca da yaklaşık olarak aynı

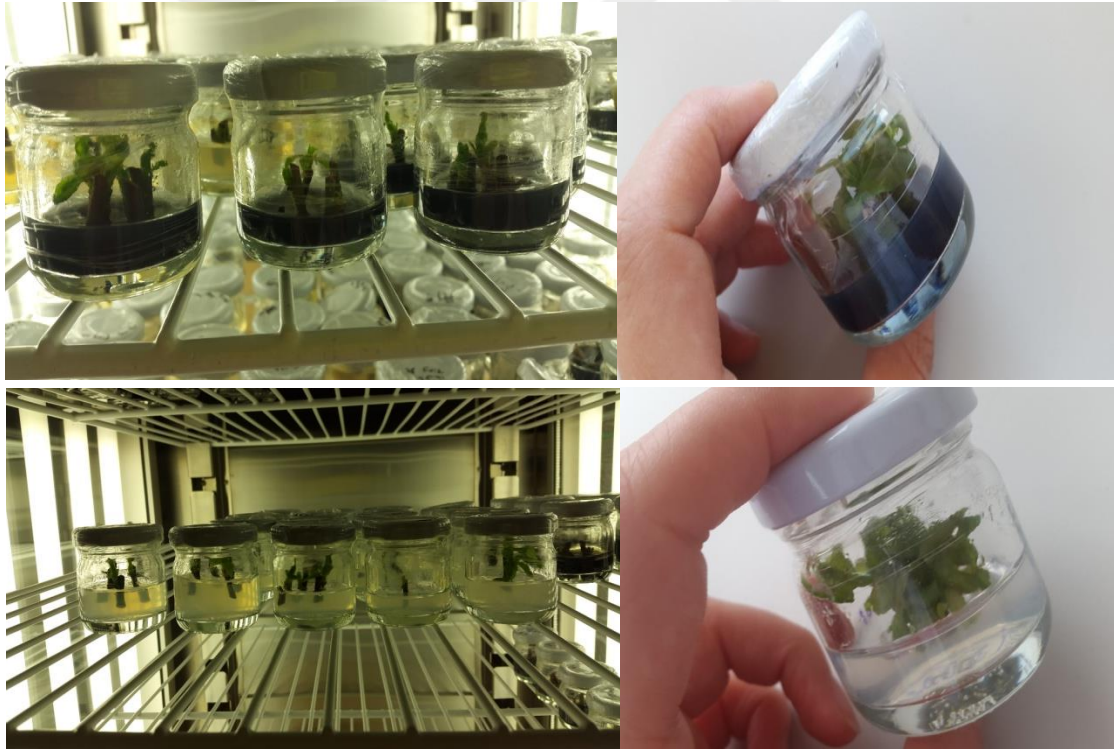
kalmıştır [52]. *Pyrus elaeagrifolia* Pall.'ın (ahlat) "Ahlat 1" (boz ahlat) ve "Ahlat 2" (ak ahlat) tipleri ile *Pyrus communis* L.'nin "Ankara" armudu çeşidinden yeşil çeliklerin köklenmesi ve sürmesi üzerine IBA ve Putrescine' in etkileri araştırılırken sürme oranı, köklenen ve süren çelik oranı, köklenme oranı Ahlat 1' de sırasıyla %0.0, %0.0 ve %11.4; Ahlat 2' de %32.4, %32.4 ve %43.8 olarak belirlenmiştir, sürme-köklenme oranlarının düşük olduğu görülmektedir [50]. Bir başka çalışmada ise Aygün ve Dumanoglu (2006), 'Bazı Ayva (*Cydonia oblonga* Mill.) Genotiplerinde Yaprak Disklerinden Sürgün Organogenesi' uyarmaya çalışırken bitkisel materyal olarak, 8 farklı ayva genotipi kullanmış ve uygulamaları sonucunda sürgün oluşturma oranı Quince A' da %80.0, S.Ö. 39-200' de %56.7, S.Ö. 18-82' de %17.5, S.Ö. 58-315' de %37.5, Eşme' de %36.7, Limon' da %40.0 ve Çukurgöbek' te %43.3 olarak belirlemiştir. Ortalama sürgün sayısı genotiplere göre oldukça farklılık göstermektedir [19]. Farklı ahlat genotiplerinde mikroçoğaltım etkinliğini belirlemek amaçlı yapılan bu çalışmada da genotiplerin sürgün oluşturma oranları düşük ve *in vitro* tepkileri birbirinden farklıdır. Bu farklılığın genetik farklılıktan ve ağacın kendiliğinden oluşup gelişme gösterdiği alanın şartlarından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Çizelge 4.1. Farklı bölgelerden seçilen 40 adet ahlat genotipinin mikroçoğaltım etkinliği(%)

GN	Sürgün Gelişimi (%)	GN	Sürgün Gelişimi (%)	GN	Sürgün Gelişimi (%)	GN	Sürgün Gelişimi (%)
KY2	0,00	N40	10,00	KM57	3,30	U87	0,00
KY8	0,00	N41	10,00	AN59	0,00	I89	0,00
KY14	0,00	N42	13,30	AN64	0,00	KN92	0,00
KY19	6,60	N44	6,60	AN67	0,00	KN95	3,30
KY21	0,00	N45	10,00	E70	0,00	KN97	0,00
AD32	3,30	KY48	10,00	AK73	0,00	KN100	0,00
AD33	3,30	KM52	6,60	AK76	0,00	IE2	13,30
AD35	0,00	KM53	16,60	AK79	0,00	IE4	0,00
N37	16,60	KM54	13,30	D83	0,00	IE5	0,00
N38	6,60	KM55	10,00	D84	3,30	IE13	3,30



Şekil 4.1. Farklı bölgelerden seçilen 40 adet ahlat genotipinin mikroçoğaltım etkinliği(%)

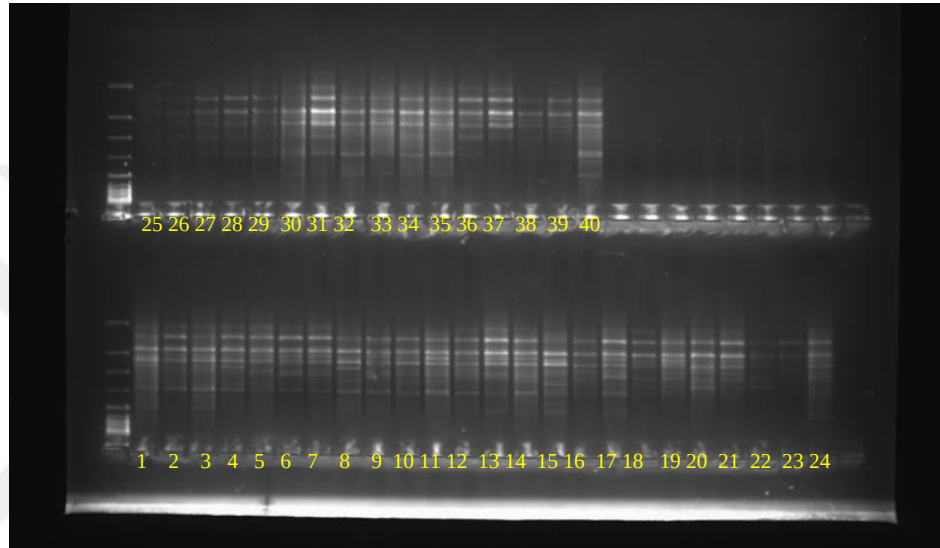


Şekil 4.2. Sürgün gelişimi gösteren genotipler

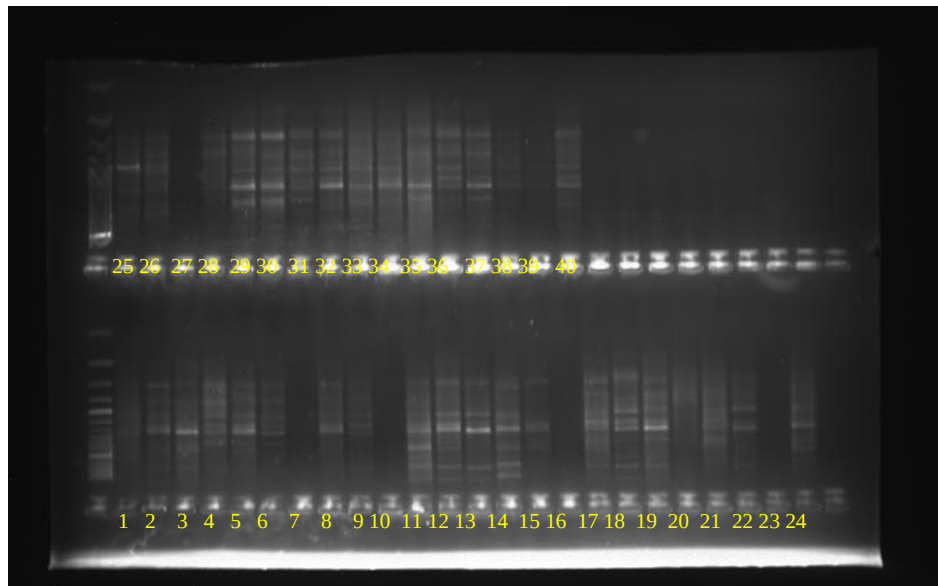
4.2. Moleküler Çalışmalar

4.2.1. ISSR Markır Analizi

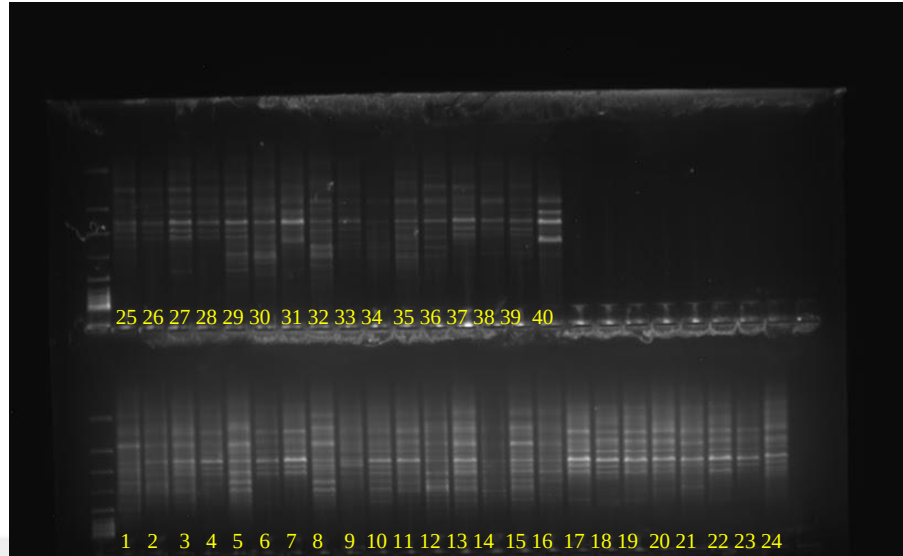
ISSR primerleri kullanılarak genotiplerin akrabalık ilişkilerini belirlemek amacıyla yapılan moleküler çalışmadan elde edilen görüntülerden bazıları genotiplerin Çizelge 3.1’ de verilen sıra numaraları ile birlikte Şekil 4.3, Şekil 4.4 ve Şekil 4.5’ te verilmiştir.



Şekil 4.3. (VHVG TG)₇ ISSR primerinin söz konusu genotiplerdeki jel görüntüsü



Şekil 4.4. (AGC)₆G ISSR primerinin söz konusu genotiplerdeki jel görüntüsü



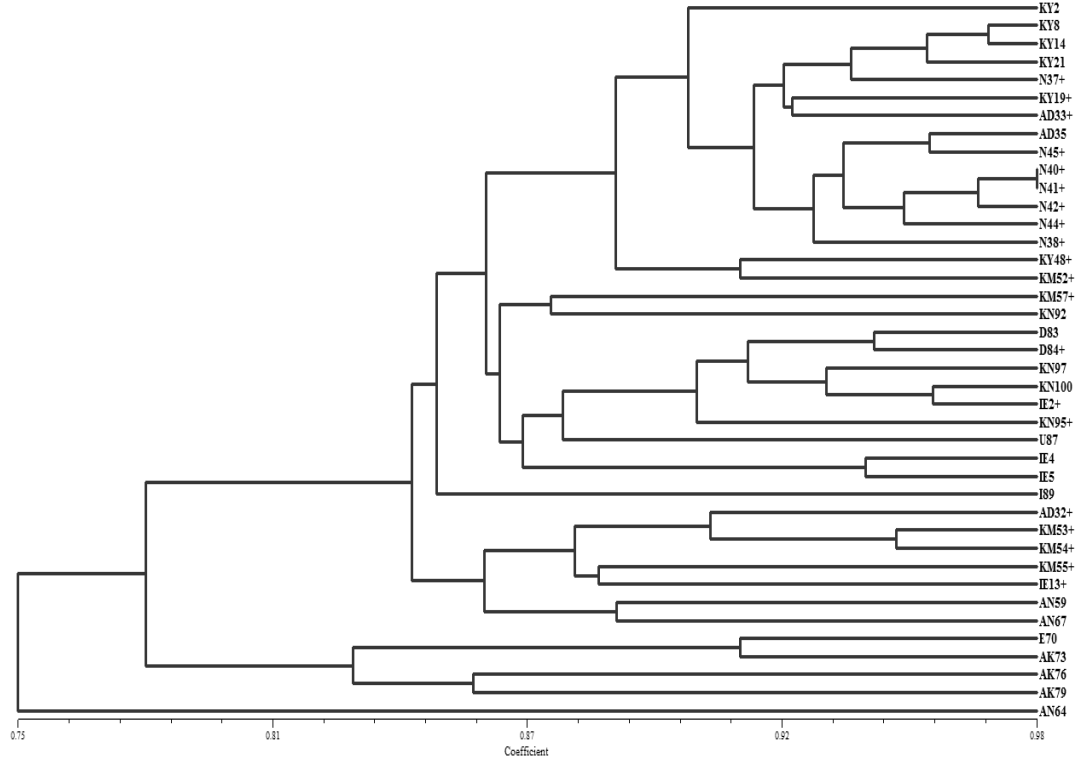
Şekil 4.5. (AG)₈T ISSR primerinin söz konusu genotiplerdeki jel görüntüsü

Çalışmada ele alınan genotiplerin birbirleriyle olan akrabalık ilişkilerini belirlemek amacıyla yapılan ISSR çalışmalarında toplam 13 primer kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan primerlerden elde edilen polimorfik bant uzunluğu aralıkları 100 bp (AG)₈T ile 1300 bp (TCC)₅RY arasında değişiklik göstermiştir. Primerlerden toplam 76 bant elde edilirken, primer başına düşen ortalama bant sayısı 5.8 olmuştur. Elde edilen bantların 62 adedi polimorfik olarak saptanmış, polimorfik bantların primer başına düşen ortalaması 4.7 olarak hesaplanmıştır. Çalışmada kullanılan ISSR primerlerinden 7 tanesinde (CT₈TG, AGC₆G, CAC₆, GAA₆, CA₆AC, GA₈YG ve TCC₅RY) polimorfizm oranı %100' e ulaşırken, en düşük polimorfizm oranı %25 değeri ile BDBCA₇C primerinde görülmüştür. Diğer primerlerden elde edilen oranlar bu değerler arasında değişmiştir (Çizelge 4.2). Erdoğan ve ark., (2007) yaptıkları çalışmada Ankara ve çevresinde daha önceden seçilmiş 39 'Ankara Armudu' klonu arasındaki genetik farklılıkları RAPD tekniği ile araştırmıştır. 25 adet primerden (Operon) 2 tanesinde amplifikasyon zayıf olmuş diğerleri ise açıkça okunabilen ve tekrarlanabilen bantlar vermiştir. Fakat bu bantlar polimorfizm göstermediğinden 'Ankara' armudu klonlarının genetik ayrımı yapılamamıştır.

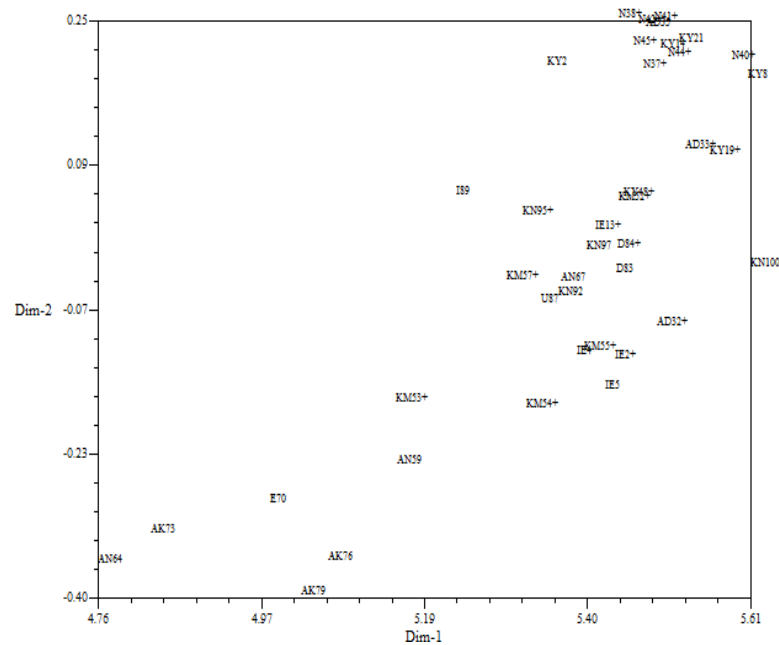
Çizelge 4.2. ISSR primerlerinin amplifikasyonu sonucu elde edilen bant uzunlukları (BU), toplam bant sayısı (TBS), polimorfik bant sayısı (PBS) ve polimorfizm oranları (PO)

Primer Adı	BU	TBS	PBS	PO (%)
(AG) ₈ T	100-400	9	5	55.5
(VHVG TG) ₇	110-500	10	8	80.0
(AG) ₇ YC	300-850	7	5	71.4
(CT) ₈ TG	400-900	4	4	100.0
(HVVHCA) ₇ T	650-1100	5	3	60.0
BDBCA ₇ C	700-1250	4	1	25.0
(AGC) ₆ G	300-1100	5	5	100.0
(TCC) ₅ RY	350-1300	7	7	100.0
(GA) ₈ YG	300-1100	6	6	100.0
(DBDACA) ₇	300-1100	7	6	85.7
(CAC) ₆	350-1000	4	4	100.0
(GAA) ₆	400-1250	5	5	100.0
CA ₆ AC	550-1100	3	3	100.0
Ortalama	-	5.8	4.7	82.8
Toplam	-	76	62	

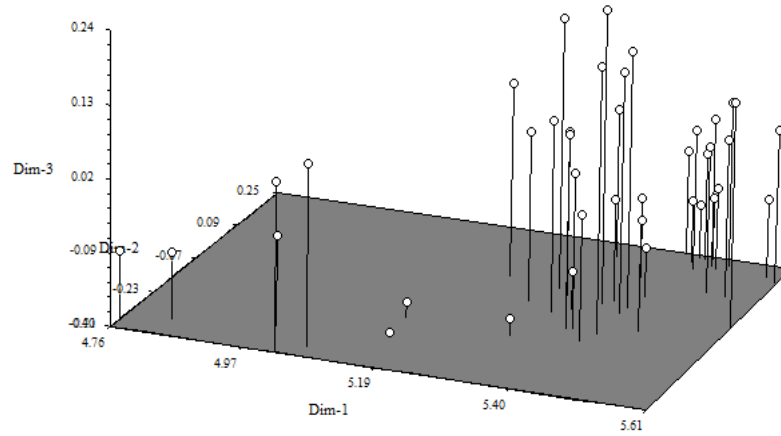
4.2.2. ISSR Soyağacı ve Matrix Plot (3D Plot) Analizleri



Şekil 4.6. Farklı bölgelerden seçilen 40 adet ahlat genotipinde 13 adet ISSR markırı elde edilen dendrogram (+: *In vitro* sürgün gelişimi gösteren genotipler)



Şekil 4.7. Farklı bölgelerden seçilen 40 adet ahlat genotipinde akrabalık ilişkilerini gösteren temel bileşenler analizi



Şekil 4.8. Farklı bölgelerden seçilen 40 adet ahlut genotipinde akrabalık ilişkilerini gösteren temel bileşenler analizi (matrix plot (3D plot) görünümü)

Çalışmada kullanılan 40 adet ahlut genotipi ile 13 adet ISSR primer ile elde edilen dendrogram Şekil 15’ te verilmiştir. Elde edilen dendrograma göre genotipler arasındaki genetik benzerlik 0.75-0.98 arasında değişmiştir. Yapılan UPGMA analizine göre 2 ana grup elde edilmiş ve grup 1’ de AN64 nolu genotip yer alırken grup 2’ de diğer 39 genotip yer almıştır. Genotipler arasında en uzak genotip 0.75 benzerlik oranıyla AN64 nolu genotip olurken, birbirine en yakın genotipler N40 ve N41 nolu genotipler olmuştur. Söz konusu genotipler Nevşehir ilinden aynı bölgeden seçilen genotipler iken, AN46 nolu genotip ise Ankara ili Beypazarı-Ahlutluk Geçidi’ nden seçilmiştir. Dendrogram genel olarak incelendiğinde ahlut genotipleri bölgelere göre ayrılmış görünmektedir. Diğer taraftan aynı bölgeden seçilen bazı genotipler ayrı gruplarda yer almış olup bunun nedeni genetik farklılık olabileceği gibi kullanılan markır sistemi ile elde edilen band sayısı olabilir.

Farklı bölgelerden seçilen 40 adet ahlut genotipinin genetik benzerlikleri ile mikroçoğaltım etkinliği arasındaki ilişki dendrogram üzerindeki dağılıma göre incelendiğinde; KY19 ve AD33 aynı grupta yer almış, N40, N45, N42, N44, N38 nolu genotipler hem mikroçoğaltım etkinliği yüksek genotipler hem de genetik olarak birbirine yakın genotipler olarak belirlenmiştir. Diğer taraftan KM52, KM57 nolu genotipler mikro çoğaltım etkinliği yüksek genotipler olup aynı zamanda genetik

benzerlik oranları birbirine yakın çıkmıştır. D83 ve D84 nolu genotipler ile KM53, KM54, KM55, IE13 nolu genotipler aynı grupta yer alırken, yine söz konusu genotiplerin mikro çoğaltım etkinlikleri yüksek bulunmuştur (Şekil 4.6, 4.7, 4.8). Brini *et al.* (2008), Tunus' un 25 yerel armut çeşidi ve 6 avrupa armut çeşidi arasında genetik çeşitlikleri araştırmışlardır. 25 yerel armut çeşitleri arasında 12 farklı parmak izi deseni tespit etmişlerdir [67]. Richards *et al.* (2009), Kazakistan' ın sekiz farklı bölgesinden toplanmış olan toplam 949 adet *Malus sieversii* genotipinde genetik çeşitliliği incelemişlerdir. Genetik çeşitlilik bakımından bölgeler arasında önemli farklılıklar belirlenmiş ve güneybatı bölgelerden alınan örneklerin kuzey bölgelerden alınanlara göre daha fazla varyasyon gösterdiği tespit edilmiştir. Bunun yanında her bölge içerisinde de önemli düzeyde varyasyon saptanmıştır [68]. Ülkemizde bulunan elma genetik kaynaklarında varyasyon düzeyini belirlemek için peroksidaz markırları ile çalışmalar yapılmıştır [73]. Bu çalışmada genetik kaynaklar içerisinde kullanılan markırlar yönünden yüksek düzeyde bir varyasyonun olduğu tespit edilmiştir. Orijin bölgeleri ülkemizin birbirine yakın coğrafik alanları olan ve morfolojik özellikler yönünden benzerlik gösteren genotipler genel olarak birbirine yakın olarak konumlanmışlardır ve bu durum bu genotiplerin muhtemelen aynı genetik ataya sahip olabileceğini göstermektedir. ISSR primer sistemiyle elde edilen dendogram ile mikro çoğaltım etkinliği karşılaştırıldığında bir ilişkinin olduğu görülmekte ve elde edilen bulgular mikro çoğaltım etkinliğine genotipin etkisinin olduğu tezini desteklemektedir.

5. BÖLÜM

SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışma Türkiye' nin farklı bölgelerinden toplanan kloroz, kuraklık gibi stres koşullarına, aşırı kış soğuklarına dayanıklı, elverişsiz koşullara çok iyi uyum sağlamış bir tür olan ahlat genotiplerinin çeşit değiştirme aşılarında anaç olarak veya kurak koşullarda kırsal alanlarda ağaçlandırma amaçlı kullanılabilmesi için klonal çoğaltıma uygun tiplerin belirlenmesi amacıyla fidanlık koşullarında gereksinim duyulan uzun üretim sürecini kısaltacak *in vitro* çoğaltım etkinlikleri ve söz konusu genotiplerin akrabalık ilişkileri incelenmiştir.

Araştırmada 40 adet ahlat genotipinin, 2016 yılında alınan taze sürgünleri aseptik şartlarda kültüre alınmıştır. Sonuç olarak bu 40 genotipin 20 tanesinde %3.3 ile %16.6 arasında değişen oranlarda sürgün gelişimi gözlemlenmiştir ve en yüksek sürgün gelişim oranı %16.6 oranla Nevşehir' den alınan N37 numaralı genotip ile Kahramanmaraş' tan alınan KM53 numaralı genotip olarak belirlenmiştir. Elde edilen düşük sürgün gelişimi oranları ahlatın zor çoğaltılan bir tür olduğunu göstermiştir. Ahlat mikrosürgünlerinde daha iyi bir sonuç alınması için ortam şartlarının optimize edilmesi ve buna bağlı olarak çalışmaların devam ettirilmesi önerilmektedir.

Çalışma kapsamında moleküler tanımlama yöntemlerinden ISSR markör teknikleri kullanılarak ahlat genotiplerinin genetik olarak parmak izleri çıkarılmış ve genetik benzerlik oranları belirlenmiş, elde edilen rakamsal ve grafiksel veriler yardımı ile genotipler arasındaki ilişki değerlendirilmiştir. Çalışmada, ele alınan ahlat genotiplerinin ISSR teknikleri ile tanımlanmalarında kullanılacak polimorfizm oranı yüksek primerler belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan 20 adet ISSR primeri ile ön tarama işlemi gerçekleştirilmiş ve tarama çalışması sonucunda bu primerler içerisinde 13 tanesinin polimorfizm seviyeleri bakımından uygun sonuçlar verdiği bulunmuştur.

Yapılan çalışmada kullanılan ISSR tekniğinin başarılı bir şekilde yürütüldüğü, sonraki çalışmalarda bu tekniğin kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

ISSR tekniğinde en yüksek polimorfizm oranı % 100 elde edilirken; toplam 76 adet bandın, 62 tanesinin polimorfik olduğu belirlenmiştir.

ISSR analizlerine göre benzerlik indeksi bakımından en yüksek genetik benzerlik N40 ve N41 genotipleri arasında bulunurken, bunu sırasıyla KY8, KY14 ve N42 genotipleri izlemiştir. En uzak genetik benzerliğe sahip genotip AN64 nolu genotip olarak saptanmıştır.

Oluşturulan dendrogram sonucunda belirli gruplarda yer alan bireylerin kendi içlerinde, doku kültürü çalışmasında incelenen özellikler açısından daha yüksek benzerlik oranına sahip olduğu ve bu nedenle akrabalık ilişkilerinin daha yüksek olduğu söylenebilir.

Meyve ve çiçeklerinin insan sağlığı için sağladığı yarar, bahçe kültürleri açısından değerlendirildiğinde bazı yumuşak çekirdekli meyve türleri için anaç olarak kullanılma potansiyeli ayrıca ağaç şekli, rengi ve diğer morfolojik özelliklerinden dolayı süs bitkisi olarak peyzajda geniş bir kullanım alanına sahip olması, küresel iklim değişikliği ile özellikle kurak koşullara adapte olmuş türlerin öneminin bir kat daha artması ve ahlatın da bu noktada ülkemizde özellikle kurak koşullara çok iyi adapte olmuş bir genetik materyal olması, bu materyallerin genetik varyasyon düzeyinin ve bunların populasyon yapısının belirlenmesi ile muhtemel orijin gruplarının ortaya konulması ve bunlar arasında vejetatif olarak daha kolay çoğaltılabilen tiplerin belirlenmesi, bu genetik kaynakların yönetimi, kullanımı ve muhafazası açısından çok önemlidir ve yapılacak sonraki çalışmalara kaynak teşkil edecek bir veri tabanı oluşturmaktadır.

Bu çalışmanın materyallerini içeren ahlat gen havuzunun ciddi bir genetik çeşitlilik barındırdığı yapılan bu çalışmayla ortaya konmuş ve vejetatif çoğaltımda başarılı sonuç gösterebilecek genotipler ve bu genotiplerin lokasyonları belirlenmiştir.

KAYNAKLAR

1. Anonim, [https://tr.wikipedia.org/wiki/Ahlat_\(bitki\)](https://tr.wikipedia.org/wiki/Ahlat_(bitki)), 2016.
2. Davis, P.H., 1972, Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Edinburg at the Universty Press., 4.
3. Anşin, R., Özkan, Z. C., 1993. Tohumlu Bitkiler (SPERMATOPHYTA) Odunsu Taksonlar. KTÜ Orman Fak. Yayın No: 19, Trabzon.
4. Özbek, S., 1978. Özel Meyvecilik. Çukurova Üiv. Ziraat Fak. Yayın No:128, Adana. 486 s.
5. Özçağırın, R., Ünal, A., Özeker, E., İsfendiyoğlu, M. 2005. Ilıman İklim Meyve Türleri (Yumuşak Çekirdekli Meyveler Cilt II), Ege Üniversitesi Basımevi, Yayın No: 556, İzmir, 200 s.
6. Aygün, A., Dumanoglu, H., 2015. *In vitro* shoot proliferation and *in vitro* and *ex vitro* root formation of *Pyrus elaeagrifolia* Pallas. Front. Plant Sci. 6:225. doi: 10.3389/fpls.2015.00225.
7. Lombard, P.B. and Westwood, M.N., 1987. Pear rootstocks, In: Rootstocks for Fruit Crops. Rom, R.C. and Carlson, R.F. (eds), A Wiley-Interscience Publication, John Wiley and Sons, Inc., pp. 145–183, New York.
8. Dolcet-Sanjuan, R., Claveria, E., Bonany, J., et al. 2004. Selection for new pear rootstocks: in vitro screening and field evaluation for tolerance to iron chlorosis. **Acta Horticulture**, 658:463-468.
9. Bell, R.L., Quamme, H.A., Layne, R.E.C., Skirvin, R.M. 1996. Pears, In: Fruit Breeding Volume I Tree and Tropical Fruits, Editor: Janick, J. and Moore, J.N. New York, John Wiley and Sons. Inc., 441-513.
10. Bonany, J., Dolcet-Sanjuan, R., Claveria, E., Iglesias, I., Asin, L., Simard, M.H. 2005. “Breeding of pear rootstocks. First evaluation of new interspecific rootstocks for tolerance to lime-induced chlorosis and induced vigour under field conditions”. **Acta Hort.** 671, 239-242.
11. Matsumoto, K., Tamura, F., Chun, J.P., Tanabe, K. 2006. “Native Mediterranean *Pyrus* rootstock, *P.amygdaliformis* and *P.elaeagrifolia*, present higher tolerance to salinity stress compared with Asian natives”. J. Japanese Soc.

- Hort. Sci. 75, 450-457. Özbek, S. 1978. Özel Meyvecilik (Kışın Yapraklı Döken Meyve Türleri), Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara.
12. Karagöz, A., Zencirci, N., Tan, A., Taşkın, T., Köksel, H., Sürek, M., Toker, C., Özbek, K. 2010. "Bitki genetik kaynaklarının korunması ve kullanımı". *Türkiye Ziraat Mühendisliği VII. Teknik Kongresi Bildirileri*, Ankara: 155-177.
 13. Cooper, H.D., Spilane, C., Anishetty, N.M., Griffie, P. 1996. "Promoting the identification, conservation and use of wild plants for food and agriculture in the Mediterranean: The FAO global plan of action". *CIHEAM - Options Mediterraneennes*, 17-31.
 14. Litz, R. E. and D. J. Gray. 1992. Organogenesis and Somatic Embryogenesis. P. 3-34. In: F. A. Hammerschlag and R. E. Litz (eds). *Biotechnology of Perennial Fruit Crops*. CABI, University Press, Cambridge.
 15. Schuerman, P. L. and A. M. Dandekar. 1993. Transformation of temperate woody crops: Progress and potentials. **Scientia Hort.** 55: 101-124.
 16. Hatipoğlu, R. 1999. Bitki Biyoteknolojisi. Çukurova Üniv. Ziraat Fakültesi Yayınları: 190, Ders Kitabı: A-58, Adana.
 17. Jain, S. M. 2001. Tissue culture-derived variation in crop improvement. *Euphytica* 118: 153-166.
 18. Heslop-Harrison, J. 2005. Introduction. P. XIX-XXIV. In: R. E. Litz (ed.). *Biotechnology of Fruit and Nut Crops*. CABI Publishing, Trowbridge.
 19. Aygün, A., Dumanoglu, H., 2006. Bazı Ayva (*Cydonia oblonga* Mill.) Genotiplerinde Yaprak Disklerinden Sürgün Organogenesisi. **Tarım Bilimleri Dergisi**, 13 (1) 54-61.
 20. Korban, S. and Skirvin, R. M., 1985. *In vitro* shoot regeneration from an intact and a sectioned embryo-axis of apple seeds. **Plant Science**, 39 (1): 61-66.
 21. Hiratsuka, S. and Katagiri, M., 1988. Shoot and callus formation in explants from immature seeds of Japanese pear. **Scientia Horticulturae**, 34 (3-4): 193-199.
 22. Pieterse, R. E. 1989. Regeneration of plants from callus and embryos of 'Royal' apricot. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, 19: 175-179.

23. Mante, S., R. Scorza and J. M. Cordts. 1989. Plant regeneration from cotyledons of *Prunus persica*, *Prunus domestica*, and *Prunus cerasus*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, **19**: 1-11.
24. Swartz, H. J., R. Bors, F. Mohamed and K. Naess. 1990. The effect of *in vitro* pretreatments on subsequent shoot organogenesis from excised *Rubus* and *Malus* leaves. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, **21**: 179-184.
25. Dolcet-Sanjuan, R., Mok, D.W.S., and Mok, M.C., 1991. In vitro manipulations of *Pyrus* species and *Cydonia oblonga*. **Acta Hort.** **300**,45–50.
26. Welander, M. and G. Maheswaran. 1992. Shoot regeneration from leaf explants of dwarfing apple rootstocks. **J. Plant Physiol.** **140**: 223-228.
27. Chevreau, E. and C. Leblay. 1993. The effect of mother plant pretreatment and explant choice on regeneration from *in vitro* pear leaves. **Acta Horticulturae** **336**: 263-268.
28. Baker, B. S. and S. K. Bhatia. 1993. Factors effecting adventitious shoot regeneration from leaf explants of quince (*Cydonia oblonga*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, **35**: 273-277.
29. Sarwar, M. and R. M. Skirvin. 1997. Effect of thidiazuron and 6-benzylaminopurine on adventitious shoot regeneration from leaves of three strains of ‘McIntosh’ apple (*Malus x domestica* Borkh.) *in vitro*. **Scientia Hort.** **68**: 95-100.
30. Tornero, O. P., J. Egea, A. Vanoostende and L. Burgos. 2000. Assessment of factors affecting adventitious shoot regeneration from *in vitro* cultured leaves of apricot. **Plant Science**, **158**: 61-70.
31. Gamage, N. and T. Nakanishi. 2000. *In vitro* shoot regeneration from leaf tissue of apple (cultivar “Orine”): High shoot proliferation using carry over effect of TDZ. **Acta Hort.** **520**: 291-298.
32. Sun, Q. R., Q. Z. Liu and R. H. Zhao. 2003. Somatic embryogenesis from *in vitro* leaves of pear. **Acta Hort. Sinica** **30** (1): 85-86.

33. Chevreau, E. and R. Bell. 2005. *Pyrus* spp. Pear and *Cydonia* spp. Quince. P. 543-565. In: R. E. Litz (ed.). *Biotechnology of Fruit and Nut Crops*. CABI Publishing, Trowbridge.
34. Kadota, M., Imizu, K., Hirano, T., 2001. Double-phase in vitro culture using sorbitol increases shoot proliferation and reduces hyperhydricity in Japanese pear. **Scientia Horticulture**, **89**, 207-215.
35. Shibli, R.A., Ajlouni, M.M., Jaradat, A., Aljanabi, S., Shatnawi, M., 1997. Short Communication Micropropagation in wild pear (*Pyrus syrica*). **Scientia Horticulturae**, **68**, 237-242.
36. Scarano, M. T. Abbate, L., Ferrante, S., Lucretti, S., Tusa, N. 2002. ISSR-PCR Technique: a Useful Method for Characterizing New Allotetraploid Somatic Hybrids of Mandarin. **Plant Cell Rep**, **20**:1162-1166.
37. Gulsen, O., Kaymak, S., Ozongun, S., Uzun, A., 2010. Genetic analysis of Turkish apple germplasm using peroxidase gene-based markers. **Sci. Hort.**, **125**: 368–373.
38. Özcan, S., Gürel, E. ve Babaoğlu, M., 2001. Genetik Markörler ve Analiz Metodları. *Bitki Biyoteknolojisi II. Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları*. Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları, Konya, 456, 334-363.
39. Yorgancılar, M., Yakışır, E., Tanur Erkoyuncu, M., 2015. Moleküler Markörlerin Bitki Islahında Kullanımı. **Bahri Dağdaş Bitkisel Araştırma Dergisi. Journal of Bahri Dagdas Crop Research** **4** (2):1-12, 2015. ISSN: 2148-3205.
40. Reddy, M.P., Sarla, N. & Siddiq, A., (2002). Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. **Euphytica** **128**: 9–17.
41. Zietkiewicz, E., Rafalski, J.A. & Labuda, D., (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**, **20**: 176–183.

42. Gupta, M., Chyi, Y.-S., Romero-Severson, J., Owen, J.L., 1994. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. **Theoretical and Applied Genetics**. **89**, (7–8), 998–1006.
43. Bornet, B. & Branchard, M., (2001). Nonanchored inter-simple sequence repeat (ISSR) markers: Reproducible and specific tools for genome fingerprinting. **Plant Mol Biol Reporter** **19**: 209–215.
44. Wang, D.G., Fan, J.B., Siao, C.J., Berno, A., and et al. 1998. Large-Scale Identification, Mapping, and Genotyping of Single-Nucleotide Polymorphisms in the Human Genome. **Science**, **280**, (5366), 1077-1082 DOI: 10.1126/science.280.5366.1077.
45. Gültekin, H.C., Gezer, A., Yücedağ, C., 2006. Bazı Ahlat (*Pyrus* L.) Türlerinin Tohum Özellikleri ve Çimlendirme Olanakları Üzerine Araştırmalar. **Süleyman Demirel Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi**, **2**, 80-88.
46. Dolcet-Sanjuan, R., Mok, D.W.S. & Mok, M.C., 1990. Micropropagation of *Pyrus* and *Cydonia* and their responses to Fe-limiting conditions. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, **21**: 191.
47. Dolcet-Sanjuan, D.W.S. Mok, M.C. Mok., 1992. *In vitro* manipulations of *Pyrus* species and *Cydonia oblonga*. ISHS Acta Horticulturae 300: *In Vitro* Culture, XXIII IHC.
48. Yeo, Y.D., Reed, M.B., 1995. Micropropagation of Three *Pyrus* Rootstocks. **Hortscience** **30**(3):620–623.
49. Shibli, R.A., Ajlouni, M.M., Jaradat, A., Aljanabi, S., Shatnawi, M., 1997. Short Communication Micropropagation in wild pear (*Pyrus syrica*). **Scientia Horticulturae** **68**, 237-242.
50. Dumanoglu, H., Aygün, A., Alay, A., Güneş, N.T., Özkaya, M.T., 1999. Ahlatın (*Pyrus elaeagrifolia* pall.) yeşil çeliklerinde köklenme ve sürme üzerine çelik alma zamanı IBA ve Putrescine'in etkileri. **Tr. J. of Agriculture and Forestry**, **23**, 559-565.

51. Koltarla, A., 2007. Ahlatın (*Pyrus elaeagrifolia* Pallas) bodurlaştırıcı ara anaç “OH x F-333” ile birlikte *in vitro* çoğaltımında mikro aşılama tekniğinin kullanımı. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
52. Thakur A., Kanwar J.S., 2008. Micropropagation of ‘Wild Pear’ *Pyrus pyrifolia* (Burm F.) Nakai.I. Explant Establishment and Shoot Multiplication. **Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj** 36 (1), 103-108.
53. Bhatt, A., Kansal, S., Chauhan, R.S., Sood, H., 2012. Low-cost Tissue Culture Procedures for Micropropagation of Apple Root Stocks. **International Journal of Plant Developmental Biology**, 6 (1), 67-72.
54. Reed, B.M., DeNoma, J., Wada, S., Postman, J., 2012. In Press Micropropagation of pear (*Pyrus* sp). In: Lambardi M., Ozudogru E., Jain S. (eds) Protocols for Micropropagation of Selected Economically-Important Horticultural Plants. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols), vol 994. Humana Press, Totowa, NJ.
55. Boudabous, M., Mars, M., Marzougui, N., Ferchichi, A., 2013. Micropropagation of apple (*Malus domestica* L. cultivar Douce de Djerba) through *in vitro* culture of axillary buds. **Acta Botanica Gallica, Botany Letters**, 157, (3), 513-524.
56. Dumanoglu, H., Erdogan, V., Aygun, A., 2016. Elma Genotiplerinin Mikro Çoğaltımında Farklı Amonyum Nitrat Düzeylerinin Sürgün ve Kök Oluşumu Üzerine Etkileri. **Tarım Bilimleri Araştırma Dergisi** 2 (1):177-182.
57. Challice, J.S., Westwood, M.N., 1973. Numerical taxonomic studies of the genus *Pyrus* using both chemical and botanical characters. **Bot J Linn Soc** 67 (2): 121-148. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.1973.tb01734.x>.
58. Staub, J.E., Serquen, F.C., Gupta, M., 1996. Genetic Markers, Map Construction, and Their Application in Plant Breeding, **Hortsciense**. 31(5) p.729-741.
59. Bao L., Chen K., Zhang D., Li X. and Yuanwen Teng. 2008. An assessment of genetic variability and relationships within Asian pears based on AFLP (amplified fragment length polymorphism) markers.

60. Katayama H., Adachi S., Yamamoto T., and Uematsu C., 2007. A wide range of genetic diversity in pear (*Pyrus ussuriensis* var. *Aromatica*) genetic resources from Iwate, Japan revealed by SSR and chloroplast DNA markers. **Genet Resour Crop Evol.** **54**:1573–1585.
61. Monte-Corvo L., Cabrita L., Oliveira C. and Leitão J., 2000. Assessment of genetic relationships among *Pyrus* species and cultivars using AFLP and RAPD markers. **Genetic Resources and Crop Evolution** **47**: 257–265.
62. Forte, A. V., Ignatov, A.N., Ponomarenko, V.V., Dorokhov, D.B., Savelyev, N.I. 2002. Phylogeny of the *Malus* (Apple Tree) species, inferred from the morphological traits and molecular DNA analysis. **Rus. J. of Genet.** **3**:1150–1160.
63. Ashok K. G., Lukens, L.N., Hunter, D.M., Strommer, J.N., 2006. European and Asian Pears: Simple Sequence Repeat–Polyacrylamide Gel Electrophoresis-based Analysis of Commercially Important North American Cultivars. **Hort Science**. Print ISSN: 0018-5345 Online ISSN: 2327-9834.
64. Coart, E., Van Glabeke, S., De Loose, M., Larsen A.S., Roldan-Ruiz, I., 2006. Chloroplast diversity in the genus *Malus* : new insights into the relationship between the European wild apple (*Malus sylvestris* (L.) Mill.) and the domesticated apple (*Malus domestica* Borkh.). **Mol. Ecol.** **15**: 2171–2182.
65. Erdoğan, V., Aygün, A., Şan, B., Koltarla, A., Güneş, N., Dumanoglu, H. 2007. ‘Ankara’ armudu (*Pyrus communis* L.) klonlarının RAPD tekniği ile moleküler analizi. *Türkiye V. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi*, Bildiriler kitabı, Cilt 1: 56-59.
66. Zhang, Z., Chen, X., He, T., Liu, X., Feng, T., Yuan, Z. 2007. Genetic structure of *Malus sieversii* population from Xinjiang, China, revealed by SSR Markers. **J. of Genet. and Genomics**, **34**: 947-955.
67. Brini W., Mars M. and Hormaza J.I., 2008. Genetic diversity in local Tunisian pears (*Pyrus communis* L.) studied with SSR markers. **Scientia Horticulturae** **115**, 337–341.

68. Richards, C.M., Volk, G.M., reilley, A.a., Henk, A.D., et al. 2009. Genetic diversity and population structure in *Malus sieversii*, a wild progenitor species of domesticated apple. **Tree Genetics & Genomes**, 5:339–347.
69. Volk, G.M., Richards, C.M., Henk, A.D., Reilley, A., Miller, D.D., Forsline, P.L. 2009. Novel Diversity Identified in a Wild Apple Population from the Kyrgyz Republic. **Hortscience**, **44**: 516-518.
70. Forsline, P. L., Aldwinckle, H. S., Dickson, E. E., Luby, J. J. Hokanson, S. C. 2010. Collection, Maintenance, Characterization, and Utilization of Wild Apples of Central Asia, in Horticultural Reviews: Wild Apple and Fruit Trees of Central Asia, 29 (ed J. Janick), John Wiley & Sons, Inc., Oxford, UK. doi: 10.1002/9780470650868.ch1.
71. Gasi, F., Simon, S., Pojskic, M., Kurtovic, N, Pejic, I., 2010. Genetic assessment of apple germplasm in Bosnia and Herzegovina using microsatellite and morphologic markers. Sci. Hort., doi:10.1016/j.scienta.2010.07.002.
72. Pereira-Lorenzo, S., Ramos-Cabrera, A.M., Gonzalez-Díaz, A.J., Diaz-Hernandez, A.B. 2008. Genetic assessment of local apple cultivars from La Palma, Spain, using simple sequence repeats (SSRs). **Sci. Hort.** **117**:160–166.
73. Gülşen, O., Mutlu, N., 2005. Bitki Biliminde Kullanılan Genetik Markırlar ve Kullanım Alanları, **Alatarım**, **4** (2): 27-37.
74. Bayazit, S., Imrak, B., Küden, A., & Kemal, G. M., 2011. “RAPD analysis of genetic relatedness among selected quince (*Cydonia oblonga* Mill.) accessions from different parts of Turkey” **Hort Sci**, **38**, 134-141.
75. Uzun, A., Ozongun, S., Gulsen, O., Yılmaz, K.U., Kaymak, S., Ercisli, S., 2016. Determination of genetic relatedness among Turkish apple germplasm based on ISSR markers. **Journal of Applied Botany and Food Quality** **89**, 82-88 (2016), DOI:10.5073/JABFQ.2016.089.010.
76. Pınar, H., Kaymak, S., Ozongun, Ş., Uzun A., Unlü, M., Bircan, M., Ercisli, S., Orhan, E., 2016. Morphological and Molecular Characterization of Major Quince Cultivars from Turkey. **Not Bot Horti Agrobi**, **44**(1):72-76.

77. Doyle J.J. & Doyle J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus. 12:** 13–15.
78. Uzun A., Gülşen O., Kafa G., Seday U., Tuzcu Ö., Yeşiloğlu T., 2009. Characterization For Yield, Fruit Quality, And Molecular Profiles Of Lemon Genotypes Tolerant To 'Mal Secco' Disease, **Scientia Horticulturae, 122**, 556-561.
79. Rohlf, F.J., 1998. NTSYS-pc. Numerical taxonomy and multivariate analysis: version 2.02. Exeter Software. Setauket, New York.
80. Dice L.R. 1945. “Measures of the amount of ecologic association between species”. **Ecology. 26**, 297–302.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı : MERVE AREFE
Soyadı : YİĞİT
Doğum Yeri : Melikgazi/KAYSERİ
Doğum Tarihi : 02.07.1990
Yabancı Dili : İngilizce
e-mail : merveyigit@gmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Lise :Behice Yazgan Anadolu Lisesi 2004-2008
Lisans :Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi
Peyzaj Mimarlığı Bölümü 2009-2013

ÇALIŞILAN PROJELER

T.C. Orman Ve Su İşleri Bakanlığı Çölleşme Ve Erozyonla Mücadele Genel Müdürlüğü; Doğal Ahlat (*Pyrus elaeagrifolia* Pall.) Populasyonlarındaki İri Meyveli Tiplerin Belirlenmesi, Moleküler Karakterizasyonu, Vejetatif Çoğaltma Kapasiteleri İle Kurak-Yarıkurak Alanlarda Kullanım İmkânlarının Belirlenmesi Ve Muhafazası Araştırma Projesi

Yamula Patlıcanı (*Solanum molongena* L.) ve Cırgalan Biberinin (*Capsicum annuum* L.) Seleksiyonu, Saflaştırılması ve Karakterizasyonu Bilimsel Araştırma Projesi