

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**KARADENİZ VE MARMARA BÖLGELERİNDE YETİŞTİRİCİLİĞİ
YAPILAN FARKLI ASMA GENOTİPLERİNİN KÜLLEME VE MİLDİYÖ
HASTALIKLARINA DAYANIKLILIK ÖZELLİKLERİNİN MARKÖRE
DAYALI SELEKSİYON YÖNTEMİ İLE BELİRLENMESİ**

Zeynep YILDIRIM

BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

**ANKARA
2016**

Her hakkı saklıdır

ETİK

Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tezdeki bütün bilgilerin tam ve doğru olduğunu, bilgilerin elde edilme aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi bildiririm.

15.07.2016

Zeynep YILDIRIM

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

KARADENİZ VE MARMARA BÖLGELERİNDE YETİŞTİRİCİLİĞİ YAPILAN FARKLI ASMA GENOTİPLERİNİN KÜLLEME VE MİLDİYÖ HASTALIKLARINA DAYANIKLILIK ÖZELLİKLERİNİN MARKÖRE DAYALI SELEKSİYON YÖNTEMİ İLE BELİRLENMESİ

Zeynep YILDIRIM

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Murat AKKURT

Karadeniz ve Marmara bölgelerinde yetiştirilen farklı asma genotiplerinin külleme ve mildiyö hastalıklarına dayanıklılığının Marköre Dayalı Seleksiyon (MDS) ile belirlendiği bu çalışma, 2014-2016 yılları arasında Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü Moleküler Biyoteknoloji Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. Çalışmada 128 birey genetik olarak analiz edilmiştir. Kodominant markör olan SSR markörler; UDV020a, VMC9H4.2, VMC7F2, VMC8G9, VMC1G3.2, VMC4F3.1; CAPS markör GLP1-12 ve SCAR markör SCORA7 kullanılmıştır. Çalışmada SSR primerlerine ait amplifikasyon ürünleri AATI Fragment Analyzer cihazı ile analiz edilmiştir. Araştırmamızın sonucunda 128 örnek arasından küllemeye olası dayanıklı olarak 22, mildiyöye olası dayanıklı olarak 10 adet birey seçilmiştir. Fenotipik gözlemlerle birlikte ortak olarak mildiyöye dayanıklı bulunan «Köfteci Üzümlü», küllemeye dayanıklı bulunan «53 Güneysu 03» çeşitleri projenin devamında değerlendirilip gelecekte ıslah çalışmalarında erken seleksiyonda rol oynayacaktır.

Haziran 2016, 62 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Vitis vinifera* L., MDS, külleme, mildiyö, SSR, CAPS, SCAR

ABSTRACT

Master Thesis

DETERMINATION OF POWDERY MILDEW AND DOWNY MILDEW RESISTANCE IN DIFFERENT GRAPEVINE GENOTYPES VIA MARKER ASSISTED SELECTION CULTIVATED IN BLACK SEA AND MARMARA REGION

Zeynep YILDIRIM

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

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Murat AKKURT

The research about determination of different grapevine genotypes from Black Sea and Marmara Region via Molecular assisted selection was carried out in Ankara University Molecular Biotechnology laboratory between 2014 and 2016. One hundred and twenty eight genotypes were analysed genetically. SSR markers; UDV020a, VMC9H4.2, VMC7F2, VMC8G9, VMC1G3.2, VMC4F3.1, CAPS marker GLP1-12 and SCAR marker SCORA7 were used. In this study amplification products were analysed by ABI Fragment Analyser. Following the searches 22 resistant genotypes to powdery mildew and 10 resistant genotypes resistant to downy mildew were identified markers. Phenotypical observations and molecular researches identifies that resistant to mildew “Köfteci Üzümlü” and resistant to powdery mildew “53 Güneş 03” varieties are going to evaluate for future studies.

June 2016, 62 pages

Key Words: Downy mildew, powdery mildew, MAS, SSR, CAPS, SCAR, *Vitis vinifera* L.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın her anında bana yol gösteren, denetleyen, bilgileriyle destekleyen tez danışmanın, hocam Sayın Doç. Dr. Murat AKKURT'a (Ankara Üniversitesi Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı) tezimi titizlikle değerlendiren jürideki hocalarım Sayın Doç. Dr. Gölge SARIKAMIŞ (Ankara Üniversitesi Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı) ve Sayın Doç. Dr. Zeliha GÖKBAYRAK'a, (Canakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı) derslerinden yararlandığım hocalarıma; çalışmamın süresince ilgisini esirgemeyen hocam Sayın Dr. Hande TAHMAZ'a; tez çalışmalarımın her aşamasında sonuçların bilimsel önemini değerlendiren Max Planck Enstitüsü'nden Sayın Dr. Ozan BOZDAĞ'a teşekkür ediyorum.

Zeynep YILDIRIM

Ankara, Temmuz 2016

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY SAYFASI	
ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	3
2.1 Asmanın Tarihçesi ve Taksonomisi.....	3
2.2 Dünya ve Türkiye Bağcılığı.....	3
2.3 Külleme ve Mildiyö Hastalıkları.....	5
2.3.1 Külleme hastalığı.....	5
2.3.2 Mildiyö hastalığı.....	5
2.4 Bitki Islahında Moleküler Markörlerin Önemi ve Avantajları.....	6
2.5 Moleküler Markörlerin Uygulama Alanları.....	7
2.6 Moleküler Markör Teknikleri.....	7
2.6.1 RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) markörler.....	8
2.6.2 AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) markörler.....	8
2.6.3 SSR (Simple SequenceRepeats)=Mikrosatelit.....	8
2.6.4 CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences)	9
2.6.5 SCAR (Sequence Characterized Amplified Region)	9
2.7 MDS (Marköre Dayalı Seleksiyon) ve Uygulama Alanları.....	9
2.8 Bağcılıkta Külleme ve Mildiyö Hastalığına Karşı Dayanıklılık Islahında Yapılan Çalışmalar.	10
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	19
3.1. Materyal.....	19
3.2 Yöntem.....	23
3.2.1 Yapraklardan DNA izolasyonu.....	23
3.2.2 İzole edilen DNA'ların agaroz jelde görüntülenmesi.....	25
3.2.3 Örneklerin jele yüklenmesi.....	26
3.2.4 DNA miktar ve saflık ölçümü.....	26
3.2.5 PCR analizleri.....	26
3.2.6 PCR ürünlerinin görüntülenmesi.....	28
3.2.6.1 Agaroz jel elektroforez yöntemiyle görüntülenme.....	28
3.2.6.2 Fragman analizi yöntemiyle görüntüleme.....	28
3.2.7 PCR ürünlerinin allel büyüklüklerinin hesaplanması.....	29
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	31
4.1 DNA izolasyonu -DNA miktar ve saflık tayini.....	31

4.2.Genetik Analizler.....	31
4.2.1 SCAR ve CAPS analiz sonuçları.....	31
4.2.2 SSR analiz sonuçları.....	33
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	36
KAYNAKLAR.....	47
EKLER.....	50
EK 1 DNA miktarı ve saflık değerleri ortalamaları	51
EK 2 Araştırmada kullanılan genotiplerin SSR markörleri ile elde edilen PCR ürünlerinin allelik dağılımı.....	54
EK 3 CAPS Primerinde PCR Ürün Varlığı.....	60
EK 4 SCAR Primerinde 760 bp Amplifikasyon Ürünü Varlığı.....	61
ÖZGEÇMİŞ.....	62



SİMGELER DİZİNİ

AFLP	Çoğaltılan Parça Uzunluğu Polimorfizmi Markörleri
CAPS	Bölünerek Çoğaltılmış Polimorfik Dizi
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EST	İfade Edilmiş Dizi Etiketleri
ISSR	Basit Sekans Tekrarlamaları Arası Polimorfizm
LG	Linkage Group (Bağlantı Grubu)
MDS	Marker Assisted Selection (Markör Destekli Seleksiyon)
RAPD	Rastgele Çoğaltılan Polimorfik DNA
RFLP	Kesilen Parça Uzunluğu Polimorfizmi
REN	<i>Erysiphe necator</i> 'e Dayanıklı
RPV	<i>Plasmopara viticola</i> 'ya Dayanıklı
RUN	<i>Uncinula necator</i> 'e Dayanıklı
SNP	Tek Nükleotid Polimorfizmi
SSCP	Tek İplik Konformasyon Polimorfizmi
SSR	Basit Dizi Tekrarları (Mikrosatelit)
STS	Dizisi Etiketlenmiş Sekanslar

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Asma tanelerinde ve yaprakta külleme belirtileri.....	5
Şekil 2.2 Yaprak alt ve üst yüzeyinde mildiyö belirtileri.....	6
Şekil 3.1 Örnek alınan lokasyonlar.....	19
Şekil 3.2 Sıvı azot ile ezilen yapraklar.....	24
Şekil 3.3 Genç yapraklardan DNA izolasyonlarının yapılışına ait görüntüler.....	24
Şekil 3.4 AATI Fragman analiz cihazı.....	29
Şekil 4.1 12 adet örneğe ait DNA'ların agaroz jeldeki görüntüsü.....	31
Şekil 4.2 GLP1-12 Primerinin PCR görüntüsü.....	32
Şekil 4.3 35 örnek numaralı Sunbelt çeşidinde GLP 1-12 primeri amplifikasyon ürününün EcoRI sonrası kesilme görüntüsü.....	32
Şekil 4.4 SCORA7 Primeri ile elde edilen amplifikasyon ürünlerinin görüntüsü.....	32
Şekil 4.5 VMC8g9 Primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin görüntüsü.....	33
Şekil 4.6 VMC1g3.2 Primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin görüntüsü.....	33
Şekil 4.7 VMC7f2 Primerinin PCR görüntüsü.....	34
Şekil 4.8 UDV020 Primerinin PCR görüntüsü.....	34
Şekil 4.9 VMC4F3.1 Primerinin PCR görüntüsü	34
Şekil 4.10 VMC9H4.2 Primerinin PCR görüntüsü.....	35

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Dünyada ilk 10 ülkenin 2013 üzüm üretim miktarları ve bağ alanları.....	4
Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan asma çeşitleri, orijinleri ve alındığı lokasyonlar.....	20
Çizelge 3.2 Uluslararası ıslah kuruluşlarından toplanan çeşitler.....	22
Çizelge 3.3 Kullanılan primerler.....	27
Çizelge 5.1 SSR markörler ile tespit edilen olası dayanıklı çeşitler.....	40
Çizelge 5.2 SCAR markörleri ile belirlenen aday dayanıklı genotipler.....	42
Çizelge 5.3 Proje gelişme raporunda yapay ve doğal inokülasyon sonucunda dayanıklı ve hassas çeşitler.....	44
Çizelge 5.4 Mildiyöye dayanıklı çeşit adayları.....	45
Çizelge 5.5 Küllemeye dayanıklı çeşit adayları.....	46

1. GİRİŞ

Anadolu çok eski ve köklü bağcılık kültürüne sahip olmasının yanı sıra asmanın gen merkezlerinden biridir. Bu nedenlerle Anadolu'da çok zengin bir asma çeşitliliği ve gen potansiyeli vardır.

Tarihte birçok medeniyete ev sahipliği yapmış Anadolu'da asma meyvesi üzüm halkın beslenmesinde büyük rol oynamıştır. Üzüm yaş, kurutmalık ve şaraplık olarak değerlendirilerek farklı şekillerde değerlendirmenin de toplumsal açıdan önemini göstermiştir. Asma yüksek adaptasyon yeteneğine sahip bir bitkidir ve bu avantaj ile birçok bitkinin yetişemediği iklimlerde yetiştirilmekte, toprakların değerlendirilmesine faydalı olmaktadır (Kısmalı 1995).

Asmanın yabancı döllmesi ve heterozigotik yapısından kaynaklı olarak çok fazla genetik çeşitlilik ortaya çıkmıştır. Bu yüzden günümüzde asmanın çoğaltılmasında vejetatif çoğaltma kullanılmaktadır ve bu sayede çok eski türler günümüze kadar ulaşmış, korunmuştur. Kültür asması olan *Vitis vinifera*'nın ülkemizde gen merkezinin olmasından kaynaklı olarak ülkemizde çok fazla çeşit bulunmaktadır.

Kültüre alınan bitkilerde hastalıklara dayanıklılık yeteneği her zaman düşük olmuştur ancak genetik açımdan kaynaklı ve eski türleri koruyabilmenin sağladığı fayda ve aynı zamanda yeni çeşit geliştirme ile bunun değişebileceği gösterilmiştir. Özellikle yağış alan, nemli bölgelerde asmada fungal hastalıklar çok görülmektedir. En önemli iki hastalık olan külleme ve mildiyö bağcılığın ekonomik olarak zarar görmesine neden olmaktadır. Hastalıklardan korunmak için gereken ilaçlama ekonomik olmamasının yanı sıra insan ve çevre sağlığını da olumsuz etkilemektedir.

Uncinula necator fungusunun neden olduğu külleme hastalığı ile *Plasmopara viticola* fungusunun neden olduğu mildiyö hastalığı ülkemiz bağ alanlarında ve dünya bağ alanlarında en fazla zarar yapan iki önemli fungal hastalıktır. Hastalık yaprak, meyve ve sürgünleri etkileyerek önemli ürün kayıplarına neden olur. Hastalığı engellemek için

kültürel uygulamaların yanı sıra pestisit kullanılmaktadır. Ancak son yıllardaki göre araştırmalara pestisit kalıntılarının hem insan sağlığı hem de çevre üzerinde olumsuz etkileri vardır. Hastalığın kontrolünde etkili yöntemlerden birisi de hastalığa dirençli dayanıklı yeni çeşit geliştirmektir. Bu amaçla 20. yüzyılın başlarından beri ıslah çalışmaları dünyanın pekçok bağcı ülkesinde devam etmektedir. Dayanıklılıkla ilişkili genlerin klasik bitki ıslahıyla hassas bireylere aktarılması amacıyla en yaygın kullanılan yöntem, dayanıklı bireylerle dayanıksız bireylerin melezlenmesidir. Ancak bu klasik bitki ıslahı sırasında çok fazla sorunla karşılaşilmektedir. Markör destekli seleksiyonun amacı karşılaşılan bu sorunlara çözüm bulmaktır. Bu yöntemde, avantajları dolayısıyla moleküler markörler tercih edilmektedir.

Farklı Vitis türlerinin hastalıklara dayanımı aynı değildir. Biyoteknolojik yöntemlerin ıslahta kullanılmaya başlanmasıyla birlikte fungal hastalık etmenlerine dayanıklılığın genetik olarak tanımlaması yapılmaktadır. (Dalbo vd. 2001; Luo vd. 2001, Paquet vd. 2001, Fischer vd. 2004, Akkurt vd. 2007). Marköre Dayalı Seleksiyon hastalıklara dayanıklı bireylerin belirlenmesi ve erken seleksiyonda kullanılması ile ekonomik ve daha az zaman alarak asma ıslahında öncelikli olmaya başlamıştır. Klasik ıslah ile birlikte kullanılan MDS yaygın ve etkili bir yöntem olarak ıslah çalışmalarında yerini almıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Asmanın Tarihçesi ve Taksonomisi

Vitis vinifera M.Ö 6000-5000 yıllarında Kafkasya ve Anadolu'da kültüre alınmıştır. Buradan güneyde Nil deltasına, batıda Avrupa'ya ve doğuda Çin'e yayılmıştır. Amerika'ya yayılması kıtanın keşfinden sonra olmuştur. 1600'lü yıllardan sonra Avustralya, Yeni Zelanda ve Güney Afrika'ya yayılmıştır (Kunter vd. 2011).

Asmalar *Rhamnales* takımına bağlıdır. Bu takımın üç familyasından yalnızca *Vitaceae* familyasına ait bitkiler, bilinen anlamda asmaları tanımlamaktadır. Kültür asmalarının tümü *Vitis* cinsine aittir. *Vitis* cinsi iki alt cinsten oluşmaktadır. Bunlar kromozom sayısı $2n=38$ olan *Euvtis* ve $2n=40$ olan *Muscadinia*'dır. *Euvtis* cinsine dahil olan türler arasından *Vitis vinifera* L. en önemli türdür. Eski dünya üzümü veya Avrupa üzümü olarak bilinir. Bu türün gen merkezi Karadeniz ve Hazar Denizi arasındaki alandır. Bu alan Türkiye'nin Kuzeydoğu bölgesini de kapsar. *Vitis vinifera*'nın iki yabani alt türü (ssp. *sylvestris* ve ssp. *caucasia*) ve bir kültür türü (*V. vinifera* ssp. *Sativa*) vardır.

2.2 Dünya ve Türkiye Bağcılığı

Tarih öncesi çağlarda kültüre alınan asma ve bağcılık kültürü, doğu ve batı medeniyetlerinin sosyal ve ekonomik yapısı içinde her dönemde önemli bir yer tutmuştur. Asma sıcak-ılıman iklim kuşağı bitkisiidir. Dünya üzerinde asmanın en başarılı olarak yetiştirildiği kuşak, 34°- 49° kuzey ve güney enlemleri arasındır.

Dünya bağ alanları 2007-2012 yılları arasındaki 6 yıllık dönem içerisinde toplamda %4.17'lik bir azalma göstermiştir. Bu kayıp daha çok Avrupa bağ alanlarındaki azalmadan kaynaklanmaktadır. Avrupa kıtasında alan olarak ilk üç sırada yer alan İspanya (%18.56 azalma) Fransa (%8.07 azalma) ve İtalya'nın (%9.51 azalma) bağ alanlarında önemli bir azalma gözlenmektedir. Dünyanın önemli bağcı ülkeleri olan ilk 10 ülke sıralamasında önemli bir değişiklik olmazken, Romanya ilk 10 ülke

sıralamasından çıkmış ve Şili bağ alanlarındaki artış ile ilk 10 içerisine dahil olmuştur. Dünya bağ alanlarındaki azalmaya karşılık, yaş üzüm üretiminde 2007-2012 yılları arasında önemli bir değişim olmamıştır . Çizelge 2.1’de 2013 yılına ait üretim değerleri verilmiştir.

Çizelge 2.1 Dünyada ilk 10 ülkenin 2013 üzüm üretim miktarları ve bağ alanları (FAO)

	Ülkeler	Üretim (ton) 2013	Alan (ha)
1	Çin	11650024	733000
2	İtalya	8010364	702100
3	A.B.D	7744997	394848
4	İspanya	7480000	944200
5	Fransa	5518371	760615
6	Türkiye	4011409	468792
7	Şili	3297981	219651
8	Arjantin	2881346	233721
9	Hindistan	2483000	118000
10	İran	2046420	207537

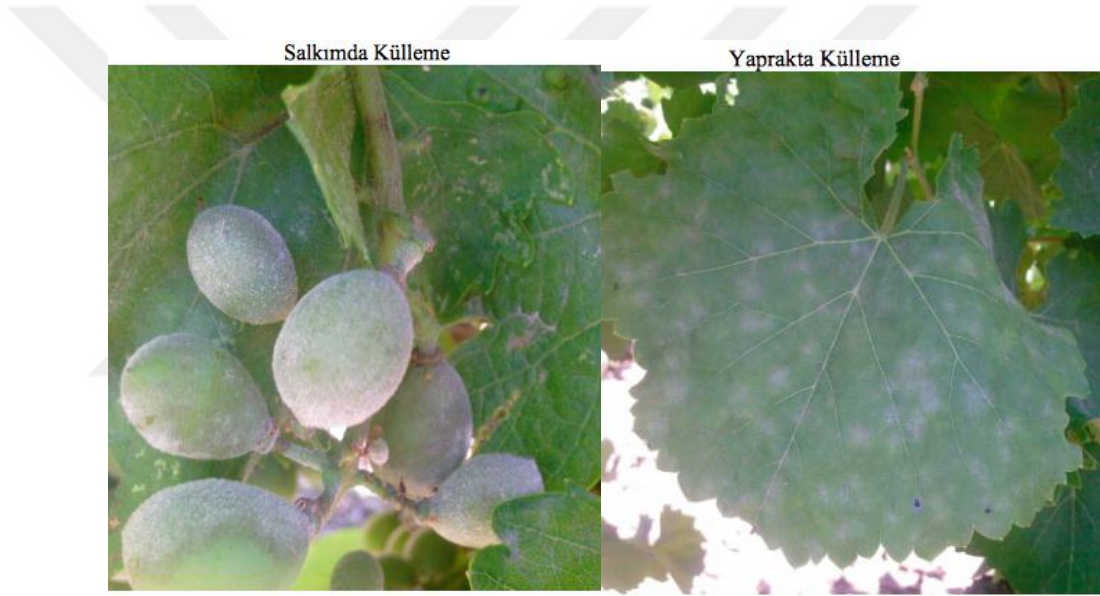
Anadolu asmanın gen merkezlerinden biri olmasının yanı sıra çok eski ve köklü bir bağcılık kültürüne sahiptir. Bu nedenle Anadolu’da çok zengin bir asma çeşitliliği ve gen potansiyeli bulunmaktadır. Anadolu’nun Kuzey Doğu bölümünü içine alan Karadeniz ve Hazar denizi arasındaki Kafkasya geçiş bölgesi (Transcaucasia), kültür (*Vitis vinifera* ssp. *sativa*) ve yabani (*Vitis vinifera* ssp. *sylvestris*) asmanın gen merkezi ve kültüre alındığı yer olarak kabul edilmektedir (MacGovern 2003).

Ülkemiz coğrafi konumu dolayısıyla son derece elverişli iklim kuşağında yer almaktadır. Bağcılık açısından değerlendirildiğinde de iklim şartları fazlasıyla uygundur. İç ve Doğu Anadolu’da yüksekliğin 1.500 m’yi aşan yöreleri ile yıllık yağışın 1.200 mm’nin üzerinde olduğu Doğu Karadeniz bölgesi dışında kalan bütün bölgelerde ekonomik olarak bağcılık yapılabilir (Arroyo-Garcia vd. 2006, Ergül vd. 2006, Kunter vd. 2011).

2.3 Külleme ve Mildiyö Hastalıkları

2.3.1 Külleme hastalığı

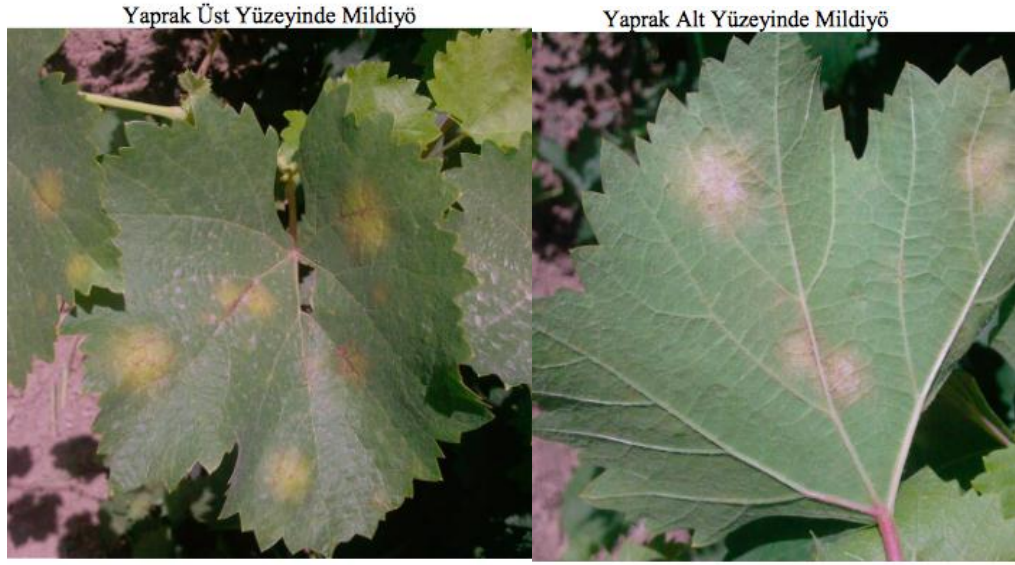
Uncinula necator fungusunun neden olduğu bir hastalıktır. Sürgünlerin uzamaya başladığı ilk andan itibaren faaliyete başlar ve tüm yeşil aksam üzerinde belirtiler gösterir. Yaprak, sürgün, çiçek ve taneler ilk olarak gri renkli kül serpilmiş gibi tozlu bir hal alır. Bunlar zamanla şiddetini arttırarak siyahlaşır ve yapraklarda kıvrılmalara, tanelerde ise çatlayıp çürümelere ve tüm salkımın deforme olmasına yol açar. Bu hastalık önemli ölçüde ürün kayıplarına neden olur (Şekil 2.1).



Şekil 2.1 Asma tanelerinde ve yaprakta külleme belirtileri

2.3.2 Mildiyö hastalığı

Plasmopara viticola'nın neden olduğu fungal bir hastalıktır. Tüm yeşil aksamda hasar oluşturur. Yapraklardaki belirtiler daha belirgindir. Yaprak üst kısmında sarımtırak yağ lekeleri görülür. Bu lekelerin alt kısımlarında beyaz misel örtüsü oluşur. Zamanla bu lekeler büyür, ortası kızarır ve kuruyarak dökülür. Hastalıklı sürgünlerde kurumalara, salkımlarda ise tanelerin buruşmasına neden olur. Önemli ölçüde ekonomik zarara yol açar (Şekil 2.2).



Şekil 2.2 Yaprak alt ve üst yüzeyinde mildiyö belirtileri

2.4 Bitki Islahında Moleküler Markörlerin Önemi ve Avantajları

Moleküler markörler genomdaki bir gen bölgesi ya da bu bölgeyle ilişkili sentetik DNA parçasıdır. Moleküler markörler, bitkilerde ıslah ve marköre dayalı seleksiyon çalışmalarında, filogenetik çalışmalarda, evrimsel ilişkilerin araştırılmasında etkili bir şekilde kullanılmaktadır (Filiz ve Koç 2011).

Moleküler markörlerin en büyük avantajlarından biri biotik ve abiotik stres koşullarına bağlı olmadan ıslah çalışmasının sürdürülebilmesidir (Vardar vd. 2010). Bunun getirisi olarak da ıslah çalışmalarını hızlandırmaktadır.

Moleküler markörler Dominant ve kodominant olmaları, genoma bağlı yapılarından dolayı güvenilirliği, tekrarlanabilirlik, genomda birden fazla bölge belirleyebilmeleri, çevre koşullarından etkilenmemeleri, poliformik davranışları ve standardize olabilmelerinden dolayı bitki ıslahında çok büyük öneme sahiptirler.

2.5 Moleküler Markörlerin Uygulama Alanları

1. Genotip tanımlama
2. Sistematiik ve karakterizasyon tanımlama
3. Genetik haritalama
4. QTL, Nicel Özellik Lokus Haritalaması (Quantitative trait loci)
5. Marköre dayalı seleksiyon
6. Genetik kaynakları belirleme ve koruma
7. Hastalık ve zararlılara karşı dayanıklılık ıslahı
8. Çeşit tescili
9. Islah hatlarının tanımlanması
10. Tohum saflık testleri
11. Hibrit çeşit saflık testleri
12. Cinsiyet belirleme
13. Genetik çeşitliliğin belirlenmesi
14. Gen kaynaklarının genetik kökeni
15. Adaptasyon yeteneğinin tahmini
16. Popölasyon ve evrim genetiğı

2.6 Moleküler Markör Teknikleri

Moleküler markörler; kesilen parça uzunluğı polimorfizmi (RFLP), rastgele çoğaltılan polimorfik DNA markörleri (RAPD), çoğaltılan parça uzunluğı polimorfizmi (AFLP), dizisi etiketlenmiş sekanslar (STS), basit dizi tekrarı=mikrosatelitler (SSR), kesilerek çoğaltılmış polimorfik dizi (CAPS), tek iplik konformasyon polimorfizmi (SSCP), amplikon uzunluk polimorfizmi (ALP), basit dizi tekrarları arası polimorfizm (ISSR), ifade edilen dizi etiketleri (EST) ve tek nükleotid polimorfizmi (SNP) gibi farklı isimlerle anılan tekniklerdir.

Ülkemizde bağıcılık araştırmalarında moleküler markör çalışmaları çoğunlukla genotip karakterizasyonuna yönelik olarak yürütölmüştür (Sabır vd. 2008).

2.6.1 RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) markörler

Williams ve ark. (1990) tarafından geliştirilen ve genellikle 10 bazlık rastgele seçilmiş primerlerin kullanıldığı teknik, çeşit tanımlanma çalışmalarında sıkça tercih edilmektedir. RAPD yöntemi, 9-10 baz uzunluğundaki rastgele primerlerin, kalıp (template) DNA'nın iki iplikçiği üzerinde, birbirine karşıt iki farklı noktada tamamlayıcılarını (komplementerlerini) bularak, bu ara bölgenin çoğaltılmasını (amplifikasyonunu) esas alan polimorfizmden oluşmaktadır. Tekrarlanabilirliğinin düşük olması nedeniyle son yıllarda daha az tercih edilmeye başlamıştır.

2.6.2 AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) markörler

Yeni bir markör sistemi olarak geliştirilmiştir (Vos vd. 1995). Ebeveynler ve ıslah sonucu elde edilen bireylerin DNA 'ları iki restriksiyon enzimiyle (4 baz ve 6 baz) kesilmekte ve DNA'nın kesilmesiyle oluşan DNA parçacıkları adaptörlerle birleştirilmektedir. Ligasyon ürünleri birer baz eklenen primerlerle PCR tekniği ile çoğaltılmakta ve elde edilen PCR ürünleri 3 baz ilave edilmiş primerlerle (primerlerin birisi radyoaktif veya fluorescent ile işaretlenebilir) seçici PCR'a tabi tutulmaktadır.

PCR ürünleri poliakrilamid jelde yürütülerek oluşan polimorfizme göre sonuçlar değerlendirilmektedir. Tek bir reaksiyonda 30-150 bölge tanımlanabilmesi, sonuçların tekrarlanabilir olması en önemli avantajını oluşturmaktadır. Dezavantajı ise pahalı olması, laboratuvar ekipmanına gereksinim duyulması ve dominat markör olmasıdır (Vos vd. Ridout ve Donini, 1999).

2.6.3 SSR (Simple Sequence Repeats)=Mikrosatelit

1-10 (genellikle 3-6) baz çifti arasında, kısa diziler halinde genomda rastgele dağılmış tekrar dizileridir. Genomda bol olması, yüksek polimorfizm göstermesi, Mendel kalıtımına uygunluğu, kodominantlık, farklı laboratuvarlarda tekrar üretilebilir olması gibi özellikleri sayesinde SSR, son yıllarda en fazla kullanılan markör tekniği olmuştur.

2.6.4 CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences)

Teknik, sekansa özgü primerlerle PCR ortamında çoğaltım esasına dayanır. Primer çiftleri farklı sekans data banklarından geliştirilen belli karakterlere özgü primerlerdir (Jiang vd. 1997). Gen spesifik primerlerle PCR ortamında çoğaltılan amplifikasyon ürünleri restriksiyon enzimleri ile kesilir. Farklı bireylerde kesim noktasındaki nükleotid farkı olduğu durumda polimorfizm ortaya çıkar.

2.6.5 SCAR (Sequence Characterized Amplified Region)

Bir gen veya özellikle ilişkili genomun belirli bir bölgesinden geliştirilen dominant ya da ko-dominant markörlerdir. Bu markör çoğunlukla genomda tek bir bölgeden kaynaklanmaktadır. SCAR markörler genetik haritada belirli bir gen ya da özellikle bağlantılı olarak tespit edilen RAPD- AFLP gibi bantlardan yola çıkılarak geliştirilir. Sözü edilen RAPD ya da AFLP bandı klonlanır ve sekans analizi yapılır. RAPD ya da AFLP primeri sekansa belirlendikten sonra 3' ucundan 24-26 bp uzunluğa kadar uzatılarak yeni bir primer geliştirilir. Yeni geliştirilen primer sekansa özgü markör oluşturmak üzere kullanılır (Akkurt 2004).

2.7 MDS (Marköre Dayalı Seleksiyon) ve Uygulama Alanları

Marköre Dayalı seleksiyon her ne kadar etkili, hızlı ve ekonomik bir seleksiyon tekniği olsa da klasik ıslah tekniklerinin yerine kullanılması olası değildir. MDS klasik ıslah ile birlikte uygulandığında ıslah çalışmasının hızını ve başarısını artıran ve ekonomik olarak katkı sağlayan bir yöntemdir. Klasik ıslahta istenilen genotiplerin seçimi zor ve uzun süre almaktadır. Ancak MDS ile arzu edilen özellikteki genotiplerin seçimi çok daha erken yapılabilir ve istenilen karakterler pratikte kullanımı çok daha kısa sürede olur.

MDS özet olarak aşağıda belirtilen çalışmalarda kullanılır:

1. İstenilen özelliklerin melezlemeyle aktarımı
2. Birçok genin aynı anda seçilimi

3. Kantitatif karakter lokusları (QTL) aktarımı
4. Anaç seçimi
5. Erken aşamada birey (döl) seçimi

2.8 Bağcılıkta Külleme ve Mildiyö Hastalığına Karşı Dayanıklılık İslahında Yapılan Çalışmalar

Külleme ve mildiyö hastalıklarının Avrupa bağlarına bulaşması ve bağcılığı önemli ölçüde tehdit etmesinden sonar; bağcılıkta 19. Yüzyılın başlarından itibaren bu hastalıklara karşı dayanıklı çeşit geliştirme çalışmaları başlatılmıştır. Ağırlıklı olarak Avrupa kıtasında bağ konusunda uzman ıslahçılar tarafından başlatılan bu ıslah çalışmalarında ağırlıklı olarak klasik melezleme ıslahı tekniği ile dayanıklı Amerikan türleri ile dayanıksız *V.vinifera* çeşitlerinin melezlenmesi yoluyla, dayanıklılık özelliğinin *V.vinifera* çeşitlerine aktarılmasına yönelik ıslah programları ağırlık kazanmıştır.

Moleküler Marker tekniklerinin gelişmesi ve bağcılık alanında da kullanılması 1990' lı yılların sonu ile 2000'li yılların başına rastlamaktadır.

Dalbó vd. (2001), tarafından yayınlanan çalışmada markör destekli seleksiyonun üzümlerde (*Vitis L. Sp.*) küllemeye dayanıklılık ıslahında kullanılması amaçlanmış ve bu karakteri taşıyan lokuslarla ilgili moleküler markörler geliştirilmiştir. Araştırmada ayrıca küllemeye dayanıklılıkla ilişkili genetik haritalar geliştirilmiştir. Genetik haritalar Horizon x Illinois 547-1 (*V. rupestris* Scheele ve *V. cinerea* Engelm hibridi)'melezlemesinden oluşturulmuştur. Illinois 547-1 (dayanıklı ebeveyn) haritası asıl QTL varyasyonun %41'ini oluşturmaktadır. 1 RAPD ve 1 AFLP markör haritalanan popülasyonda küllemeye dayanıklılıkta yüksek oranda ilişki göstermiştir. Küllemeye dayanıklılık 1/5 oranında 4 farklı popülasyonda görsel olarak görülmüştür. 2 popülasyon 'III. 547-1' dayanıklı ebeveynin melezlerinden; [Horizon x Ill. 547-1 ve NY88.0514.03 ('Horizon' x Ill. 547-1) x 'Traminette' (Joannes-Seyve 23-416 x 'Gewürztraminer')], diğer iki popülasyon ise 'NY88.0514.03' (Horizon' x Ill. 547-1)

melezlerinden; [NY88.0514.03 ('Horizon' x Ill. 547-1) x NY73.0136.17 (NY33277 x 'Chancellor') ve J.S. 23-416 x Ill. 547-1] gelmektedir.

Pauget vd. (2001), AFLP markörlerin Run1 geni taşıyan (daha sonra VRH olarak isimlendirilecektir) bireylerin seçiminde kullanılabilirliğini araştırmışlardır. Küllemeye karşı dayanıklılıkta monogenik determinizm *Muscadinia rotundifolia*'dan *Vitis vinifera* 'ya BC4 (4. Geriye melez) ve BC5 (5. Geriye melez) populasyonlarında tanımlanmıştır. BC5 popülasyonundan 157 birey Run1 genine bağlı markörleri seçmek için kullanılmıştır. 13 AFLP markörü seçilmiş ve dayanıklılıkla ilişkili olarak test edilmiştir. Mtp3294 popülasyonunun; 157 (74 dayanıklı, 84 duyarlı) bireyin alt kümesi *in vitro* testlerde tekrar test edilmiştir. 13 markörden 10 tanesi dayanıklılık geniyle kosegregasyon bulunmuştur. Analizler sonucunda 22 Run1 geni taşıyan ve 16 duyarlı genotip ayrılmıştır. 3 markör dışındaki bütün markörler duyarlı çeşitlerde görülmemiş, dayanıklı çeşitlerde görülmüştür. Çalışma sonucu yabani çeşitlerin patojenlere dayanıklılıkta değerli bir kaynak olduğunu göstermektedir. *M. rotundifolia* birçok patojene karşı yüksek oranda dayanıklılık göstermektedir. Kültür çeşitleri ve *rotundifolia*ların çaprazlamasına dayalı geri melezleme programları yabani çeşitlerin kültür çeşitlerinden filogenetik olarak çok uzak olduğunu ve dayanıklılığı sağlamanın moleküler biyoloji tekniklerine ihtiyacı olacağını göstermektedir. EMaa10 ve Run1 geni arasında rekombinasyon gösteren bütün genotipler BC1 bireyinden (VRH8695) elde edilmiştir. BC5 bireyi VRH3161-6-4 da aynı zamanda VRH8695'dan elde edilmiştir. Bu durumda F1 bireylerinin kısırlığından dolayı BC2 'den ziyade BC1 jenerasyonu tercih edilebilir olarak ifade edilmiştir.

Donald vd. (2002), Run-1 lokusuna bağlı olup olmadığının anlaşılması için AFLP ve RFLP markörleriyle çalışılmıştır. 3 markör dayanıklı genotiplerde tespit edilmiştir. Bu da marköre dayalı seleksiyon ile küllemeye dayanıklı asma çeşidi tespitinde kullanılabileceğini göstermiştir. Araştırmanın daha büyük popülasyonlarda devam etmesi gerektiği belirtilmiştir.

Kozma ve Dula (2003) tarafından, Küllemeye dayanıklılığın incelendiği bir çalışmada kullanılan iki hibrid ; *Muscadinia* X *Vitis vinifera* BC4 x (*V. amurensis* X *V. vinifera*)

BC2) ve (*Muscadinia* x *V. vinifera* BC4 x Franco-American hibrit x *V. vinifera* X *V. amurensis* 'in *Muscadinia*'dan gelen küllemeye dayanıklılıkla ilişkili Run1 geninin mildiyöye dayanıklılıkla da bağlantılı olduğu bulunmuştur.

Merdinoğlu vd. (2003) tarafından, *Muscadinia* çeşitlerinde mildiyöye dayanıklılıkla ilişkili geni tanımlayan markörler bulmak amacıyla yapılan çalışmada 208 SSR, 13 ISSR ve 151 RAPD primer kullanılmıştır. Araştırmanın sonucunda 8 SSR, 4 ISSR ve 1 RAPD primer dayanıklılıkla ilişkili bulunmuştur.

Gökbayrak vd. (2006) tarafından yayınlanan çalışmada Italia x Mercan asma popülasyonunda genom haritalaması yapılmıştır. 60 F1 bitkisi ve 2 ebeveynden oluşan popülasyon hastalıklara dayanıklılık ve morfolojik özellikleri incelenmiştir. 300 primer kullanılmış ve 2 genetik bağlantı haritası çıkarılmıştır. Araştırma sonucunda küllemeye dayanıklılık ve çiçeklenme zamanı 1 ve 2 markör lokusuyla bağlantı olduğu tespit edilmiştir.

Eibach vd. (2007), tarafından yayınlanan çalışmada moleküler markörlerin dayanıklılık genlerinin piramitlemesinde kullanımı araştırılmıştır. Gen piramitleme farklı ebeveynlerden istenilen farklı genlerin birleştirilip tek bir genotip oluşturulması çalışmalarıdır. Gen piramitleme programı sonucunda oluşan ürün bütün hedef karakterleri içeren genlerin oluşturduğu genotiptir. Moleküler markör ile dayanıklı genleri piramitlemenin pratikte kullanımında VHR 3082-1-42 x 'Regent' melezlerinin geliştirilen markörlerle taranması gerçekleştirilmiştir. VHR 3082-1-42 *Muscadinia rotundifolia* x *Vitis vinifera* melezidir ve *V. vinifera* ile 4 kez geri melezleme ile elde edilmiştir. Küllemeye dayanıklı Run1 (Resistance uncinula necator) ve mildiyöye dayanıklı Rpv1 (Resistance plasmopora viticola) genlerini taşımaktadır. Regent ise mildiyö ve küllemeye dayanıklı ticari kullanım için 1996 yılında Almanya'da geliştirilen yeni bir çeşittir.

Araştırmada Run1 geninin varlığını saptamak için CAPS markör GLP1-12 kullanılmış, RPV1 geni için ise VMC_8g9 ve VMC_1g3.2 SSR markörleri kullanılmıştır. Mildiyö için asıl QTL, 18. Bağlantı grubunda, külleme için ise 15. Bağlantı grubunda haritalama

sonrası bulunmuştur. Ek olarak küllemeye ilişkili SCAR markör SCORA7 çalışmaya daha sonra dahil edilmiştir. F1 soyundan gelen %48 bireyde küllemeye rastlanmamıştır. Run1 ve Rpv1 geni taşımayan genotiplerde VMC_4d9.2a, UDV_ 015b,VViv67 ve SCORA7markörleri küllemeye dayanıklılıkla ilişkili bulunmuş ve UDV_130, VMCNG2_f12 ve UDV_108 mildiyöye dayanıklılıkla ilişkili bulunmuştur.

Monlar vd. (2007), araştırmalarında,Donald ve ark. (2002) ve Barker ve ark. (2005) tarafından Run1 genine bağlı olarak belirlenen lokusların BC5 popülasyonuna ait bireylerde PCR-RFLP (GLP1- 12P1-P3) ve SSR markörlerle (VMC4f3.1, VMC8g9) doğrulamayı amaçlamışlardır. Bitki materyali olarak {(*M. rotundifolia* x *V. vinifera*) BC4} x Cardinal (Sofralık) melezinden elde edilen BC5 hibrid bitkileri (02-2 olarak isimlendirilmiştir) kullanılmıştır.

Fidanlara serada patojenin sporları bulaştırılmış ve 3 hafta sonra semptomsuz veya duyarlı olarak gruplandırılmışlardır. PCR-RFLP için GLP1-12P1-P3 primeri ile çoğaltılan bireyler daha sonra *EcoRI* Restriksiyon enzimi ile kesilmişlerdir. SSR analizlerinde VMC4f3.1 ve VMC8g9 primerleri kullanılmıştır.20 duyarlı ve 20 dayanıklı birey fenolojik gözlemlere göre seçilmiş ve PCR- RFLP markörlerle test edilmiştir. 870 bp DNA fragmanı hem sağlıklı hem de duyarlı bireylerde amplifike olmuştur. *EcoRI* ile kesimden sonra dayanıklı bireyler iki ayrı parçaya ayrılırken (670 bp ve 200 bp), duyarlı bireylerde bölünme olmamıştır.Dayanıklı dayanıksız genotipleri ayırmada VMC8g9 markörü en uygun olan markör olarak bulunmuştur. Çünkü 160-167 bp fragmanı agoroz jelde yüksek oranda çözülmüştür. 160 bp parça dayanıklı bireylerde görülürken, 167 bp parça dayanıksız bireylerde gözlemlenmiştir. VMC4f3.1 SSR markör sonuçlarına göre 186 bp büyüklüğündeki bant küllemeye dayanıklılıkla ilişkili bulunmuştur. Bu durum markörlerin bağlantısının %100'den az olduğunu ve %90-99 oranda bitkilerde Run1 geni tespiti için kullanılabileceğini göstermektedir.

Akkurt vd. (2007), çalışmasında Regent x Lemberger melezlerinden küllemeye (*Uncinula necator*) dayanıklı QTL bölgelerinden SCAR markörler geliştirilmiştir. RAPD ürünleri klonlanıp, sekanslanmıştır. En az 21 nükleotid uzunluğunda primerler tasarlanmıştır. Regent x Lemberger F1 popülasyonunun tamamı yeni geliştirilen bu

primerler ile test edilmiştir. Araştırmada SCORA7 ve ScORN3-R SCAR markörleri küllemeye dayanıklılıkla ilişkili olarak bulunmuştur. SCORA7markörü küllemeye dayanıklılıkta marköre dayalı seleksiyonda ve farklı kaynakların daha sonra Ren3 olarak isimlendirilecek külleme dayanıklılık geni ile ilişkili olarak kullanılabilir olduğu belirlenmiştir.

Hoffman vd. (2008), çalışmalarında 'Kishmis vatkana' çeşidinin külleme dayanıklılık özelliklerini moleküler olarak incelemişlerdir. 'Kishmish vatkana' Merkez Asya'da kültüre alınan ve külleme ajanı olan fungus *Erysiphe necator* doğal inokülasyonunda semptom göstermeyen bir *Vitis vinifera* asma çeşididir. 'Kishmish vatkana' çeşidi, duyarlı olan *Vitis vinifera* 'Nimrang' çeşidi ile kıyaslandığında, patojenin epidermal hücrelere geçişine izin verdiği ancak üremesinin sınırlı olduğu belirlenmiştir. İnokülasyondan 120 saat sonra Konidiyum yoğunluğu daha düşüktür.

Bu çalışmada 'Nimrang' x 'Kishmish vatkana' melezi olan 310 döl 2 sezon boyunca görsel olarak konidiyumların varlığına göre değerlendirilmiştir. Fenotipik segregasyon *Erysiphe necator*'e dayanıklı REN1 varlığını heterozigot olan Kishmish vatkana'da göstermiştir. Populasyona ait DNA'lardan havuz (BULK) oluşturulmuş ve oluşturulan havuzda dağılım analizleri (BSA=Bulked Segregant Analys) 195 microsatelit marker kullanılarak yürütülmüştür. Her bir marker dayanıklı gen ile ilişki piklere göre ölçülmüştür. 195 SSR marker 19 kromozomda dağılmıştır. Fenotipik lokus LG 13'de saptanmıştır ve bu bölge daha önceki çalışmalarda da dayanıklılıkla ilişkili olarak görülmüştür. 310 dölün segregasyon analizi sonucunda REN1 pozisyonu 7.4 cM aralıkta sınırlandırılmıştır. En yakın markörler VMC9H4-2, VMCNG4E10-1 ve UDV-020, *REN1* lokusundan 0.9 cM uzaklıkta tespit edilmiştir. Bu çalışma sonucunda Kishmish vatkana'nın küllemeye olan dayanıklılığının bağcılık ve markör destekli seleksiyon için çok önemli olduğunu göstermiştir.

Bellin vd. (2009)'nin çalışmalarında dayanıklı çeşit olarak Bianca, hassas çeşit olarak Chardonnay kullanılmıştır. İki çeşidin melezi 116 birey sera ve arazi koşullarında mildiyö inokülasyonuna uğratılmıştır. UDV305 ve VMC7f2 markörleri ile Rpv3

lokusunun yerini saptamışlardır. Rpv2 lokusunun ve Rpv3 lokusunun 18 nolu kromozom üstünde olduğu bulunmuştur.

Kozma vd. (2009), çalışmalarında küllemeye dayanıklı yeni çeşit geliştirilmiştir. Bu çeşit Kishmish vatkana'nın BC3 ve BC4 hibritleri ve *V. amurensis* x *V. vinifera* hibridlerinden geliştirilmiştir. F1'lere Yapay ve doğal inokülasyon sonucu hassas ve dayanıklı bireyler ayrılmıştır. VMC4f3, VMC8g9 ve GLP1-12 markörleriyle yürütülen çalışmada BC5 popülasyonunda küllemeye dayanıklılık bulunmuştur.

İşçi vd. (2010), araştırmasında İtalya x Mercan melezlerinde fungal hastalıklara karşı dayanıklılık karakterleri çalışılmıştır. Populasyon 60 bireyden oluşmaktadır ve referans olarak Cabernet Sauvignon ve Merlot üzüm çeşitleri kullanılmıştır. SSR ve AFLP primerlerle ulaşılan sonuçta küllemeye dayanıklılıkta bağlantı grubu uzaklıkları 3/3.7 cM bulunmuştur.

Katula- Debreceni vd. (2010), küllemeye dayanıklılıkla ilişkili genler olan Run1 ve Ren1'in moleküler markör destekli seleksiyon amaçlı kullanımını araştırmışlardır. Run1 ve Ren1 farklı kaynaklardan gelmektedir. Run1 lokusu *Muscadinia rotundifolia* x *Vitis vinifera* BC4 , Ren1 ise *V. vinifera* orijinli Kishmish vatkana kaynaklıdır. Ren1 ve Run1'i içeren genotipler Kishmish vatkana ve VRH 3082- 1-42 melezleridir. Küllemeye dayanıklı 411 bitki içinden %35'inin Ren1 ve Run1 'i taşıdığı belirlenmiştir. 441 bitkiyi içeren BC5 (BC4 x Kishmish vatkana) dölleri , SSR ve BAC'dan elde edilen CB markörleri ile analiz edilmiştir. Bu markörlerle küllemeye dayanıklılık BC5 hibridlerinde kanıtlanmış ve piramitleme yapılmıştır. Bunun sonucunda dayanıklı fenotiplerin en az bir lokus-bağlı markör varlığı ile co-segregate olduğunu göstermiştir. Bulunan sonuçlar aynı zamanda *M. rotundifolia* ile yapılan çalışmalarla yakından ilişkilidir. Sonuçlar Markör destekli seleksiyonun farklı lokuslardan hibrit genotip seçiminde en hızlı ve an doğru yöntem olduğunu göstermiştir.

Moreira vd. (2011), çalışmasında iki popülasyon (Pop) mildiyöye dayanıklılıkla ilişkili genetik harita oluşturmak ve QTL bölgelerinin belirlenmesi amacıyla kullanılmıştır. Popülasyon1 duyarlı *Vitis vinifera* çeşidi 'Moscato Bianco' ve dayanıklı *Vitis riparia*

melezlerinden oluşmaktadır ve 174 bireyi içerir. Popülasyon2 iki VRH3082 1-42 ve SK77 5/3 melezlerinin interspesifik hibridi olup 94 bireyi içerir. Bu hibridlerin dayanıklılık karakterleri *Vitis rotundifolia* ve *Vitis amurensis* 'den gelmektedir. Dayanıklılık görsel olarak sera koşullarında ölçülmüştür. 80 SSR, 5 EST (IN0006, IN0010, IN0040, IN0302 and IN0327) ve 3 RGA (rgVamu035, stkVa011 and stkVr0001) marker hem Pop1 hem de Pop2'de ortak bulunmuştur. 1037.2 cM ve 651 cM büyüklüğünde bağlantı haritaları SSR markörlerle oluşturulmuştur. Stabil QTL'in dahil olduğu bağlantı grubu 7, Pop1 haritalanmasında görülmüştür. Diğer QTL'ler ise bağlantı grubu 8, 12 ve 17'de tespit edilmiştir. Pop2 haritasındaki 1, 6 ve 7. Bağlantı grupları *P.viticola*'ya dayanıklılıkta önemli bulunmuştur. Bu aday genler, kromozom bölgeleri barındıran fenotipik lokuslar hakkında yeni bilgiler sağlayabileceği saptanmıştır.

Riaz vd. (2011), çalışmasında SSR markör verilerine dayalı sınırlı genetik haritalama stratejisini beş asma popülasyonunda birden fazla kaynaktan gelen genetik markörleri geliştirmek ve külleme (*Erysiphe necator*)'ye dayanıklılıkla ilişkili lokusların piramitlemesini sağlamak için kullanılmıştır. 3 popülasyon *Muscadinia rotundifolia* 'Magnolia''dan elde edilmiştir. İlk popülasyon (06708) 97 döle sahiptir ve 137 SSR markörle 7 kromozomda (4, 7, 9, 12, 13, 15, and 18) küllemeye dayanıklılıkla ilişkili bulunmuştur. QTL analizleri yürütülmüş ve genetik harita pseudo-testcross tekniğiyle oluşturulmuştur. Kromozom 13 ve 18'deki markörler yalnızca ikinci (04327) ve üçüncü (06712) popülasyonlarda haritalanmış ve sırasıyla 47 ve 80 döle sahiptir. Küllemeye dayanıklılıkla ilişkili önemli QTL'ler farklı dokularda (yaprak, salkım sapı, kök ve tane) kromozom 18 üzerinde tespit edilmiştir. Magnolia'da külleme için farklı bir QTL bölgesi tespit edilmiştir. Küllemeye dayanıklılık *M. rotundifolia* 'da kromozom 12'deki Run1 geni tarafından kontrol edilmektedir. Bu nedenle Magnolia dayanıklılık lokusu Run2.1 olarak adlandırılmıştır. Küllemeye dayanıklılık aynı zamanda dördüncü popülasyonda (08391) haritalanmış ve 255 dölü olan *M. rotundifolia* 'Trayshed' kaynaklıdır. %50 fenotipik varyasyon görülen ve haritalanan lokus, kromozom 18 üzerindedir ve Run2.2 olarak adlandırılmıştır. Bu lokus Magnolia popülasyonlarında da bulunmuştur ancak markör büyüklükleri farklıdır. Trayshed ve Magnolia'da en azından 1 allelde denenen markörlerin %68 'i ortaktır. Ancak diğer %32 markör bu iki *M.*

rotundifolia seleksiyonunda farklıdır. 42 dölü olan son popülasyon 08306 *Vitis romanetii* C166-043 'den elde edilmiştir. Genetik haritada Ren4 olarak adlandırılan major külleme dayanıklılık geni kromozom 18 üzerinde bulunmuştur ki bu *M.rotundifolia*'nın dayanıklı bireylerinin kromozomlarının aynı bölgesindeki %70 fenotipik varyasyonu açıklamaktadır. Haritalama sonuçları farklı kaynaklardan alınan dayanıklı genlerin kromozom 18 üzerinde olduğunu ve genetik markörlerin lokusları piramitlemede ve diğer külleme dayanıklı lokusların tek bir hatta toplanmasında kullanılabileceğini göstermiştir.

Söylemezoğlu vd. (2012), Külleme ve mildiyö hastalıklarına dayanıklı yeni ve kaliteli üzüm çeşitlerinin ıslahı amacıyla başlatılan projede, ülkemizin mantar kökenli hastalıklara karşı hassas ancak çok kaliteli kırmızı şaraplık üzüm çeşitlerinden olan “Kalecik Karası” ve “Boğazkere” çeşitleri ile Almanya Geilweilerhof Asma Islahı Enstitüsünde külleme ve mildiyö hastalıklarına dayanıklı olarak ıslah edilen, kaliteli, kırmızı şaraplık üzüm çeşidi “Regent” çeşitlerinin melezlenmesinden oluşan, “Kalecik Karası x Regent” ve “Boğazkere x Regent” olmak üzere iki adet melezleme kombinasyonu kullanılmıştır. Projede MDS sonrası 36 adet F1 bitkisi ise 3 ve daha fazla markör ile pozitif sonuç verdikleri için hastalıklara dayanıklı olma olasılıkları yüksek olduğu gerekçesiyle erken seleksiyon ile dayanıklı çeşit adayları olarak seçilmişlerdir.

i Gaspero vd. (2012) tarafından, UDV305, UDV737, UDV730, UDV732, UDV734 ve UDV736 markörleri ile 580 çeşit üzerinde Rpv3 lokusu üzerinde çalışma yapılmıştır. Seibel çeşidinde Rpv3 299-279, Regent ve Chambourcin'de Rpv3 299-279 lokusu bulunmaktadır. Bunların dışında Rpv3 null-297, Rpv3 321-312, Rpv3 null-271, Rpv3 361-299, Rpv3 299-314 ve Rpv3 null-287 frekansları ortaya çıkmıştır.

Riaz vd. (2013), özel 380 genotipin 34 SSR marker ile verilerini çıkarılmışlardır. Bu 380 örneğin 306'sı *V. vinifera* çeşitlerinden, 40'ı *V.vinifera* subsp. *Slyvestris* alt türünden , 34'ü Kuzey Pakistan, Afganistan ve Çin'den gelen *Vitis* türlerinden oluşmaktadır. 4 SSR alleli külleme dayanıklılıkla ilişkili lokus Ren1'de, 10 mildiyöye dayanıklılık genotipi, 8'i *V.vinifera* kültür çeşitlerinde, 2'si *V.vinifera* subsp.

slyvestris'te tespit edilmiştir. Ren-1 bağı allelini (143 bp) içeren 620 bp bölge sekans karşılaştırmalarında SSR marker SC8-0071-014 ile 10 yeni genotip mildiyöye dayanıklılıkta daha önce tespit edilen *V.vinifera* çeşidi Kismish vatkana ve Karadzhandal ile tespit edilen sekans ile aynı bulunmuştur.



3. MATERİYAL VE YÖNTEM

Bu çalışma ,“ Külleme ve Mildiyö Hastalıklarına Dayanıklı Üzüm Çeşit ve Tiplerinin Toplanması, Hastalıklara Dayanıklılığının Farklı Yöntemlerle Belirlenmesi ve Dayanıklılık Islahı Çalışmalarında Ebeveyn Olarak Kullanılabilecek Genotiplerin Belirlenmesi konulu, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü ve Atatürk Bahçe Kültürleri Merkez Araştırma Enstitüsü tarafından ortaklaşa yürütülen TÜBİTAK projesi (Proje Kod No:TÜBİTAK/113O641) kapsamında 2014-2016 yılları arasında, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Moleküler Biyoteknoloji laboratuvarında tamamlanmıştır.

3.1 Materyal

Materyal olarak proje partneri Yalova Atatürk Bahçe Kültürleri Merkez Araştırma Enstitüsü tarafından Türkiye'nin Karadeniz sahil kuşağı ağırlıklı olmak üzere farklı bölgelerden toplanmış olan 128 genotip seçilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1 Örnek alınan lokasyonlar (Atak vd. 2016)

Popülasyon külleme (*E. necator*) ve mildiyöye (*P.viticola*) dayanıklı asma çeşit ve tipleri (farklı ülkelerin dayanıklılık ıslahı çalışmalarından elde edilen genetik materyaller) ile mildiyö ve külleme hastalıkları yönünden dayanıklı veya tolerant olabileceği düşünülen üzüm çeşit ve tiplerine ait yurtiçi (Çizelge 3.1) ve yurtdışından (Çizelge 3.2) temin edilen çeliklerden elde edilmiştir.

Çizelge 3.1 Çalışmada Kullanılan Asma Çeşitleri, Orijinleri ve alındığı lokasyonlar

ÖRNEK NO	ÇEŞİT	LOKASYON
1	57 Ayancık 01	Samsun 19 Mayıs Üniv.
2	Batum 4 (Batum siyah)	Samsun 19 Mayıs Üniv.
3	57 Erfelek 03	Samsun 19 Mayıs Üniv.
4	57 Gerze 04	Samsun 19 Mayıs Üniv.
5	61 Of 04	Samsun 19 Mayıs Üniv.
6	61 Sürmene 01	Samsun 19 Mayıs Üniv.
7	61 Sürmene 02	Samsun 19 Mayıs Üniv.
8	57 Merkez 02	Samsun 19 Mayıs Üniv.
10	53 Merkez 02	Samsun 19 Mayıs Üniv.
11	53 Ardeşen 02 (TESCİL)	Samsun 19 Mayıs Üniv.
12	53 Pazar 03 (TESCİL)	Samsun 19 Mayıs Üniv.
13	53 Güneysu 05 (TESCİL)	Samsun 19 Mayıs Üniv.
14	53 Güneysu 03 (TESCİL)	Samsun 19 Mayıs Üniv.
15	55 Merkez 06	Samsun 19 Mayıs Üniv.
16	55 Merkez 12	Samsun 19 Mayıs Üniv.
17	55 Merkez 11 (Beyaz)	Samsun 19 Mayıs Üniv.
18	53 Güneysu 01	Samsun 19 Mayıs Üniv.
19	08 Arhavi 01	Samsun 19 Mayıs Üniv.
21	53 Pazar 02	Samsun 19 Mayıs Üniv.
22	55 Çarşamba 01	Samsun 19 Mayıs Üniv.
23	28 Tirebolu 02	Samsun 19 Mayıs Üniv.
24	28 Görele 01	Samsun 19 Mayıs Üniv.
25	28 Merkez 01	Samsun 19 Mayıs Üniv.
49	Isabella (YALOVA)	Yalova BKMAE
50	Rize Geççi	Yalova BKMAE
51	Köfteci üzümü	Yalova BKMAE
62	FX1-1	Yalova BKMAE
63	BX1-166	Yalova BKMAE
64	KXP-10	Yalova BKMAE
65	Özer Karası	Yalova BKMAE
67	86/1	Yalova BKMAE
68	85/1	Yalova BKMAE

Çizelge 3.1 Çalışmada Kullanılan Asma Çeşitleri, Orijinleri ve alındığı lokasyonlar (devam)

69	Atak 77	Yalova BKMAE
70	Pembe 77	Yalova BKMAE
71	Arifbey	Yalova BKMAE
72	FX1-10	Yalova BKMAE
73	Gülgönül	Yalova BKMAE
74	Güzgülü	Yalova BKMAE
76	Siyah Geççi (YALOVA)	Yalova BKMAE
81	Yusufeli 03 (İri beyaz)	Artvin
82	Yusufeli 04 (Çikilop-siyah)	Artvin
85	Giresun T-1 (G-1)	Giresun
88	Giresun T-4 (B-2)	Giresun
89	Giresun T-5 (B-3)	Giresun
94	Isabella-V.labrusca (kokusuz)-Sinop1	Sinop
95	Isabella-V.labrusca (çok kokulu) Sinop2	Sinop
96	Kozcuğaz (Pembe-geççi)	Sinop
97	Isabella-V.labrusca (kokusuz) Sinop3	Sinop
98	Beyaz üzüm (Geççi)Sinop 4	Sinop
99	Karaağaç üzümü (Siyah İnce kabuklu, geççi)	Kastamonu/İnebolu
100	Kara Üzüm (siyah geççi)	Bartın
101	Safranbolu Çavuşu	Bartın
108	Bektaş üzümü	Bursa
109	Çılapa	Tekirdağ BAE
110	Saparev	Tekirdağ BAE
111	Leblebicioğlu	Tekirdağ BAE
112	Çınar Üzümü	Tekirdağ BAE
113	Tek çekirdekli	Tekirdağ BAE
114	Deli kara	Tekirdağ BAE
117	Kuş Yürek	Tekirdağ BAE
118	Koruk	Tekirdağ BAE
119	Al Üzüm	Tekirdağ BAE
120	Faslaka	Tekirdağ BAE
122	Elhamra	Tekirdağ BAE
123	Bulgar Karası	Tekirdağ BAE
124	Deli Emin Razakısı	Tekirdağ BAE
125	Gelin Öldüren	Tekirdağ BAE
127	Beyaz Kokulu	Tekirdağ BAE
128	Gürcü	Tekirdağ BAE
131	Favli	Tekirdağ BAE
132	Mercan	Tekirdağ BAE
133	Yerli Isabella	Tekirdağ BAE
134	Çınarlı karası	Tekirdağ BAE
135	Tilki Kuyruk	Zonguldak/Karadeniz Ereğli

Çizelge 3.1 Çalışmada Kullanılan Asma Çeşitleri, Orijinleri ve alındığı lokasyonlar (devam)

136	Alüzüm	Zonguldak/Karadeniz Ereğli
137	Sobe Ak Üzüm	Zonguldak/Karadeniz Ereğli
173	Yusufeli isimsiz 1 - 24	Artvin
174	Yusufeli isimsiz 2- 32	Artvin
175	Yusufeli isimsiz 3- 14	Artvin
176	Yusufeli isimsiz - 19	Artvin
177	Yusufeli isimsiz - 29	Artvin
178	Yusufeli isimsiz - 33	Artvin
179	(Yusufeli) Koruk (beyaz) üzümü- 42	Artvin
180	(Yusufeli) Peterek turfandası(beyaz) - 47	Artvin
181	(Yusufeli) İstanbul üzümü (kırmızı) - 28	Artvin
182	(Yusufeli) Zelebur siyah- 23	Artvin
183	(Yusufeli) kokulu siyah üzüm - 44	Artvin
184	Rize Çayeli isimsiz 4 (Roucaneuf)	Rize
192	Katıkara 1 (Gürcü Üzümü)	Ordu
193	Katıkara 2 (Gürcü üzümü)	Ordu

Çizelge 3.2 Uluslararası ıslah kuruluşlarından toplanan çeşitler

26	Concord	Samsun 19 Mayıs Üniv.
27	Mars (Çekirdeksiz)	Samsun 19 Mayıs Üniv.
28	Niagara	Samsun 19 Mayıs Üniv.
29	Ontario	Samsun 19 Mayıs Üniv.
30	Steuben	Samsun 19 Mayıs Üniv.
31	Valiant	Samsun 19 Mayıs Üniv.
32	Kyoho	Yalova BKMAE
33	Marechall Foch	Samsun 19 Mayıs Üniv.
34	Arcadia	Samsun 19 Mayıs Üniv.
35	Sunbelt	Samsun 19 Mayıs Üniv.
37	Boscoop Glory (Holland)	Samsun 19 Mayıs Üniv.
38	Orion	Ankara Ü. Ziraat Fakültesi
40	Staufer	Ankara Ü. Ziraat Fakültesi
41	Regent	Ankara Ü. Ziraat Fakültesi
42	Sirius	Ankara Ü. Ziraat Fakültesi
43	Phoenix	Ankara Ü. Ziraat Fakültesi
44	Mortensen	USDA ARS Geneva/NY
45	Alden	USDA ARS Geneva/NY
46	Kay Grey	USDA ARS Geneva/NY
47	Sugargate	USDA ARS Geneva/NY
48	Muscat Bailey A	Japonya
153	Steuben	USDA ARS Geneva/NY

Çizelge 3.2 Uluslararası ıslah kuruluşlarından toplanan çeşitler (devam)

154	Price	USDA ARS Geneva/NY
155	Concord Seedless	USDA ARS Geneva/NY
156	Edelweiss	USDA ARS Geneva/NY
157	Canadice	USDA ARS Geneva/NY
158	Himrod	USDA ARS Geneva/NY
159	Lakemont	USDA ARS Geneva/NY
160	Newyork Muscat	USDA ARS Geneva/NY
161	Seneca	USDA ARS Geneva/NY
162	Sheridan	USDA ARS Geneva/NY
164	Van Buren	USDA ARS Geneva/NY
165	Venus	USDA ARS Geneva/NY
166	Yates	USDA ARS Geneva/NY
168	Glenore-	USDA ARS Geneva/NY
169	Hendrickson Seedless	USDA ARS Geneva/NY
172	Munson	Samsun 19 Mayıs Üniv.

Köklendirme için Çelik ve Köse. (2006) kullandığı yöntem kullanılmıştır ve köklendirme işlemleri Yalova Atatürk Bahçe Kültürleri Merkez Araştırma Enstitüsü tarafından seralarda yapılmıştır. Yalova Atatürk Bahçe Kültürleri Merkez Araştırma Enstitüsü tarafından gönderilen materyal her bir örnek için 0,5-1 gr arası genç yapraklardır. DNA izolasyonu aşamasına kadar yaprak örnekleri -80°C’de muhafaza edilmiştir.

3.2 Yöntem

3.2.1 Yapraklardan DNA izolasyonu

Bitkilerden DNA izolasyonları sağlıklı genç yaprak örnekleri kullanılarak Norgen Biotek Plant/Fungi İsolation Kit ® protokolüne göre yapılmıştır.

İzolasyon aşamaları aşağıdaki gibi uygulanmıştır:

1. Yaprak örnekleri havan içerisinde sıvı azot kullanılarak dondurulmuş ve havan eli ile ezilip toz haline getirilmiştir (Şekil 3.2). Ezilen örnekler 1 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır (Şekil 3.3).
2. 500 µl Lysis Solüsyon eklenerek vortex ile karıştırılmıştır.
3. 100 µl Lysis Additive eklenerek vortex ile karıştırılmıştır.
4. 65°C 'de 10 dakika inkübasyona bırakılır. Bu arada tüpler 2-3 kez elde karıştırılmıştır.
5. 100 µl Binding Solution eklenerek 10 dakika buz üstünde inkübasyona bırakılmıştır.
6. 2 dakika 14000 RPM'de santrifüj edilmiştir.
7. Lizat mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır.
8. Lizatla eşit miktarda %70'lik ethanol eklenir ve vortex ile karıştırılmıştır.
9. Ayırma kolonu(spin column) takılmış toplama tüpüne(collection tube) aktarılan ethanolü lizat 1 dakika 14000 RPM'de santrifüj edilmiştir.
10. 500 µl Yıkama Solüsyonu eklenir ve 1 dakika 14000 RPM'de santrifüj edilmiştir.
11. Yıkama sonrası artıklar atılarak tekrar 500 µl Yıkama Solüsyonu eklenir ve 1 dakika 14000 RPM'de santrifüj edilmiştir.
12. Yıkama sonrası artıklar atılarak 1 dakika 14000 RPM'de santrifüj edilmiştir.
13. Ayırma Kolonu(spin column) mikrosantrifüj tüpüne takılır ve 100 µl Elution Buffer eklenerek 2 dakika 2000 RPM'de santrifüj edilmiştir.
14. 1 dakika 14000 RPM'de son santrifüjün ardından 1 µl RNAz enzimi eklenerek elde edilen DNA'lar -20 °C'de depolanmıştır.



Şekil 3.2 Sıvı azot ile ezilen yapraklar



Şekil 3.3 Genç yapraklardan DNA izolasyonlarının yapılışı

3.2.2 İzole edilen DNA'ların agaroz jelde görüntülenmesi

Bitkilerden izole edilen DNA'lar Agaroz Jel Elektroforez yöntemiyle görüntülenmiştir.

150 ml %1,5'luk agaroz jel aşağıdaki gibi hazırlanmıştır:

1. 1,2 gr agaroz tartılıp 200 ml'lik erlene konmuştur.
2. 1xTBE solüsyonu erlene eklenmiştir.
3. Mikrodalga fırında kaynatılmıştır.
4. Kaynama başladığı anda alınıp soğuk su altında bir süre tutulup soğutulmuştur.
5. Çözeltinin içine 7,5 µl Ethidium Bromid eklenmiştir.
6. Jel çeker ocak altında polimerize olması için bekletilmiştir.

10x TBE solüsyonu Hazırlanması

108 gr Tris

54 gr Borik asit

40 ml 0.5M EDTA

PH: 8.26-8.28

10x TBE bufferi hazırlandıktan sonra 1xTBE eldesi için bu solüsyondan 200 ml alınıp 1800 ml saf su ile karıştırılmıştır.

3.2.3 Örneklerin jele yüklenmesi

Tepsiden alınan agoroz jel elektroforez tankına yerleştirilmiş ve üzeri 1x TBE ile doldurulmuştur. 4 µl yükleme tamponu (loading dye) parafin üzerine konmuş, içerisine 2 µl örnekleme karıştırılmış ve jele yüklenmiştir. Örnekler 1 saat 100 V'da yürütülmüş ve SynGene görüntüleme sistemi ile görüntülenmiştir.

3.2.4 DNA miktar ve saflık ölçümü

İzole edilen DNA'ların miktar ve saflığı NanoDrop ND-1000 Spektrofotometre ile iki tekrarlı olarak ölçülmüştür.

NanoDrop Ölçüm Tekniği:

Örnekten alınan 1 µl DNA ölçüm muhafazasına konur ve üzeri aparat koluyla kapatılmıştır. Spektrofotometrik ölçüm sonrası ölçüm muhafazası temizlenir ve yeni örneğe geçilmiştir. NanoDrop yazılımında DNA saflığı 260/280 bölümünde, miktarı (ng/µl) bölümünde belirtilmiştir..

Nanodrop spektrofotometre ile miktar tayini yapılan DNA örneklerinde, son volüm 100 ng/µl olacak şekilde seyreltme işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.2.5 PCR analizleri

İzole edilen DNA'lar Biometra Uno Thermocycler'da PCR tekniği ile çoğaltılmıştır. Moleküler marker tekniklerinden SSR, CAPS ve SCAR teknikleri uygulanmıştır. Araştırmada kullanılan primerler; mildiyöye ve küllemeye dayanıklılıkla ilişkili olarak referans alınan araştırma bilgileri ile bu araştırmalarda dayanıklılıkla ilişkili olarak belirtilen allel büyüklükleri Çizelge 3.3'de verilmiştir.

Çizelge 3.3 Kullanılan Primerler

Primer	Gen	Allel Büyüklüğü (bp)	Genotip Orijini	İlgili Yayın	Hastalık
VMC7F2	Rpv1	212/222	<i>M.rotundifolia</i>	Riaz vd. 2011	Mildiyö
VMC7F2	Rpv3	210/216	Regent	Bellin vd. 2009	Mildiyö
VMC8G9	Rpv1	160	<i>M.rotundifolia</i>	Molnar vd. 2007	Mildiyö
VMC4F3.1	Run1	186	<i>M.rotundifolia</i>	Molnar vd. 2007	Külleme
VMC1G3.2	Run1	153	<i>M.rotundifolia</i>	Barker vd. 2005	Külleme
UDV020a	Ren1	161	Kismish vatkana	Hoffmann vd. 2008	Külleme
VMC9H4.2	Ren1	283	Kismish vatkana	Hoffmann vd. 2008	Külleme
GLP1-12	Run1	870(670-200)	<i>M.rotundifolia</i>	Molnar vd. 2007	Külleme
SCORA7	Ren3	760	Regent	Akkurt vd 2007	Külleme

PCR için hazırlanan Karışım (PCR Master mix)

0,5 ml ependorf tüp içinde;
5,05 µl ddH₂O (moleküler saf su)
2 µl 5x Buffer
0,25 µl dNTP karışımı
0,6 µl MgCl₂
0,5 µl ileri (forward) primer
0,5 µl geri (revers) primer
0,1 µl Taq DNA Polimeraz Enzimi
1 µl DNA olacak şekilde 10 µl' ye tamamlanmıştır.

PCR Programı

1. 94°C' de 4 dakika ön denatürasyon,
 2. 94°C' de 1 dakika denatürasyon
 3. Primer'in annealing sıcaklığında 1 dakika
 4. 72°C' de 1 dakika
 5. 72°C' de 10 dakika
- (2- 4 basamaklar 35 döngü olarak uygulanmıştır)

3.2.6 PCR ürünlerinin görüntülenmesi

PCR amplifikasyon ürünleri agaroz jel elektroforez ve fragman analizi yöntemiyle görüntülenmiştir.

3.2.6.1 Agaroz jel elektroforez yöntemiyle görüntülenme

CAPS ve SCAR moleküler markör tekniğiyle elde edilen PCR ürünleri agaroz jel elektroforez yöntemiyle UV ışık altında görüntülenmiştir.

150 ml %1,5'luk agaroz jel aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır;

1. 1,2 gr agaroz tartılıp 200 ml'lik erlene konmuştur.
2. 1xTBE solüsyonu erlenin üzerine eklenmiştir.
3. Mikrodalga fırında kaynatılmıştır.
4. Kaynama başladığı anda alınıp soğuk su altında bir süre tutulup soğutulmuştur.
5. Çözeltinin içine 7,5 µl Ethidium Bromid eklenmiştir.
6. Jel çeker ocak altında polimerize olması için bekletilmiştir.

Tepsiden alınan agaroz jel elektroforez tankına yerleştirilmiş ve üzeri 1x TBE ile doldurulmuştur. 5 µl PCR ürünü jele yüklenmiştir. Örnekler 1 saat 100 V'da yürütülmüş ve SynGene sistemi ile görüntülenmiştir.

3.2.6.2 Fragman analizi yöntemiyle görüntüleme

SSR tekniğiyle elde edilen PCR ürünleri AATI Fragment Analyzer cihazıyla (Şekil 3.4) fragmanlarına ayrılmıştır. Ürünlerin yüklenmesinde AATI Fragment Analyzer protokolü uygulanmıştır.

Fragman ayrımı öncesi PCR ürünlerinin yüklenmesi:

1. 96'lık bir plate'in her bir kuyucuğuna 22 µl Dilution Buffer konulmuştur.
2. Her bir kuyucuğa 2 µl örnek konulup Dilution Buffer'la karışması için santrifüj edilmiştir.

3. 45 µl Seperation Jel 4,5 µl boya ile karıştırılıp cihazın jel kısmına yüklenmiştir.
4. 80 ml ultra saf su 20 ml Capillary Contioning Solüsyon ile karıştırılıp cihaza yerleştirilmiştir.
5. 20 ml Inlet Buffer 80 ml ultra saf su ile karıştırılıp 96'lık plate içerisineher bir kuyucuk 1 ml olacak şekilde dağıtılmış ve plate Inlet Buffer tepsisine yerleştirilmiştir.
6. Marker solüsyonu özel 96 kuyucuklu marker plate içerisine 30 µl olarak dağıtılmış ve 1'er damla mineral yağ üzerlerine eklenmiştir.



Şekil 3.4 AATI Fragman Analiz Cihazı

3.2.7 PCR ürünlerinin allel büyüklüklerinin hesaplanması

SCAR(SCORA7) primeri ile elde edilip agoroz jel elektrofozinde görüntülenen ürünler külleme ve mildiyöye dayanıklılık tespiti için SynGel görüntüleme sisteminde bant büyüklükleri belirlenmiştir. Bu amaçla her bir jelin ilk kuyucuğuna DNA Ladder (100-1000 bp) konmuş ve bant büyüklükleri bu ladder yardımı ile tespit edilmiştir.

CAPS primeri (GLP1-12) kullanılarak elde edilen PCR ürünleri; Donald vd. (2001) e göre *EcoR1* restriksiyon enzimi ile kesildikten sonra, SynGel görüntüleme sisteminde yukarıda anlatıldığı şekilde kesim gerçekleşip gerçekleşmediği ve oluşan bant büyüklükleri tespit edilmiştir.

SSR primerleri (VMC7F2, VMC4f3.1, VMC1g3.2, VMC9h4.2, UDV020a, VMC8g9) ile elde edilen PCR ürünleri Fragment Analyzer ile pik görüntüleri olarak ayrılmış ve ProSize yazılımıyla piklerdeki allel büyüklükleri belirlenmiştir.

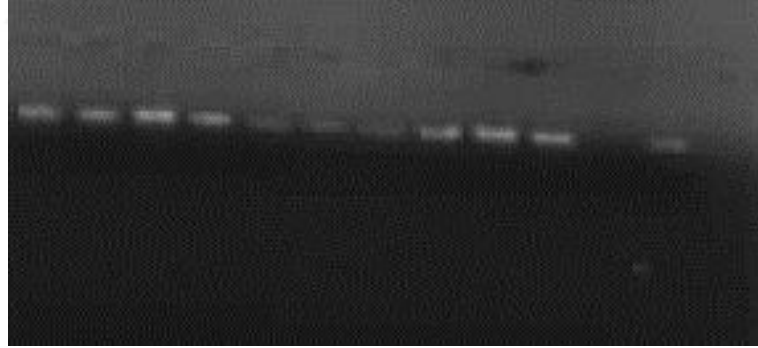


4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1 DNA izolasyonu -DNA miktar ve saflık tayini

Araştırmada kullanılan genotiplerin DNA izolasyonlarından sonra elde edilen DNA miktar ve saflık düzeyleri NanoDrop ND1000 spektrofotometre ile ölçülmüştür. DNA miktarları son volüm 100 ng/ul olacak şekilde seyreltilmiştir. Saflık değerleri 1,8 ve 2,0 arasında yer alanlar DNA'lar saf/bulaşıksız olarak değerlendirilmiştir. Saflık değeri 1,8'in altında olan DNA'lar tekrar izole edilmiş ve jel elektroforozine görüntülenmiştir. Araştırmada kullanılan genotiplere ait DNA miktarı ve saflık değerleri ortalamaları EK 4.1'de verilmiştir.

Örnek DNA'ları NanoDrop ölçüm sonuçlarından sonra Agaroz Jel Elektroforez yöntemiyle görüntülenmiştir (Şekil 4.1). Bu şekilde DNA saflık derecesi ve miktarları jel görüntüleri ile de konfirme edilebilmiştir.



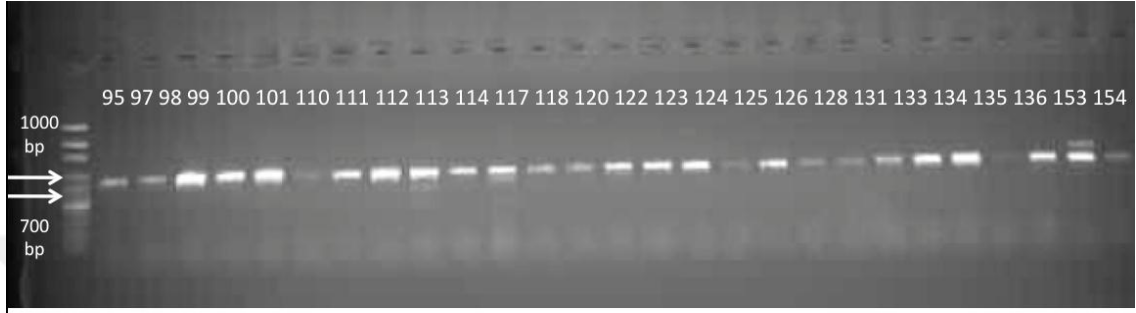
Şekil 4.1 12 örneğe ait DNA'ların agaroz jeldeki görüntüsü

4.2.Genetik Analizler

4.2.1 SCAR ve CAPS analiz sonuçları

CAPS markörü olan GLP1-12 primerinin PCR amplifikasyon ürünleri agaroz jel üzerinde görüntülenerek, örnekler bant var bant yok şeklinde değerlendirilmiştir (Şekil

4.2). Doanld vd. (2001) e göre dayanıklı genotiplerin belirlenmesi amacıyla amplifikasyon ürünleri *EcoRI* enzimi ile kesilmiştir. Kesim ürünleri agaroz jel elektroforez yöntemiyle görüntülenmiştir (Şekil 4.3). GLP1-12 PCR analiz sonuçları amplifikasyon ürünü var (+) amplifikasyon ürünü yok (-) olacak şekilde çizelge EK 3’de verilmiştir.

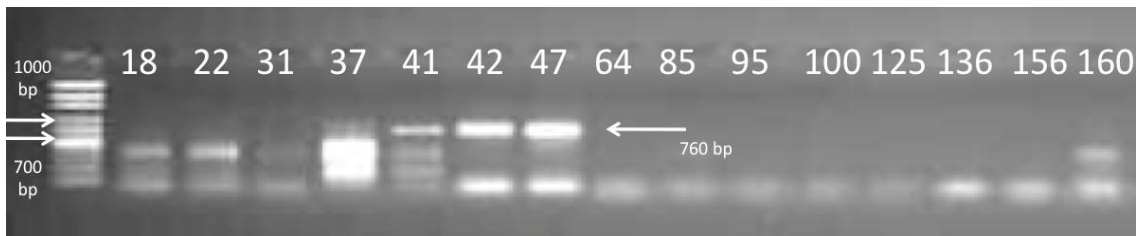


Şekil 4.2 GLP1-12 Primerinin PCR görüntüsü



Şekil 4.3 35 örnek numaralı Sunbelt çeşidinde GLP 1-12 primeri amplifikasyon ürününün *EcoRI* sonrası kesilme görüntüsü

SCAR markörü olan SCORA7 primerinin amplifikasyon ürünleri agaroz jelde görüntülenmiştir (Şekil 4.4). EK 4’te SCORA7 primeri ile amplifikasyon ürünü 760 bp verenler ve vermeyenler olarak verilmiştir.

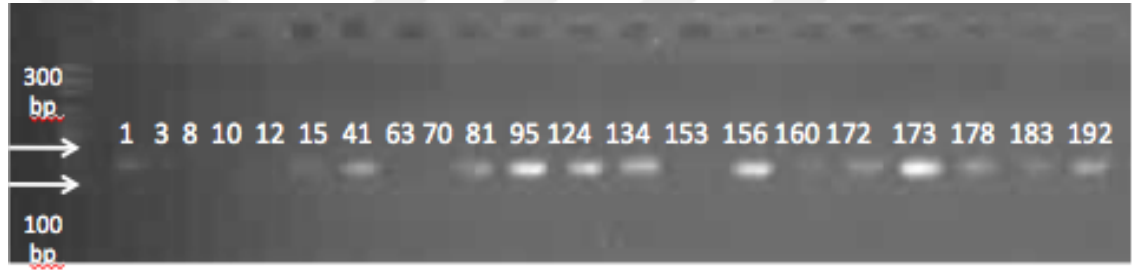


Şekil 4.4 SCORA7 Primeri ile elde edilen amplifikasyon ürünlerinin görüntüsü

4.2.2 SSR analiz sonuçları

SSR primerleriyle gerçekleştirilen PCR analiz sonuçları, fragman analiziyle bant büyüklüklerinin belirlenmesi öncesinde, amplifikasyon ürünü oluşup oluşmadığını denetlemek amacıyla agaroz jel elektroforezi tekniğiyle bant görüntüleri elde edilmiştir.

Her bir SSR primeriyle elde edilen bant görüntülerden seçilen fotoğraflar şekil 4.5- 4.10 arasında verilmiştir. SSR primerleriyle elde edilen allelik dağılımlar araştırmada kullanılan tüm genotipler için EK 2’de ayrıntılarıyla verilmiştir. SSR analizlerinde ‘Regent’ çeşidi referans seçilmiştir.



Şekil 4.5 VMC8g9 Primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin görüntüsü

Şekil 4.6’de VMC1g3.2, primere ait jel görüntüsü yer alırken EK 2’de allel büyüklükleri belirtilmiştir.



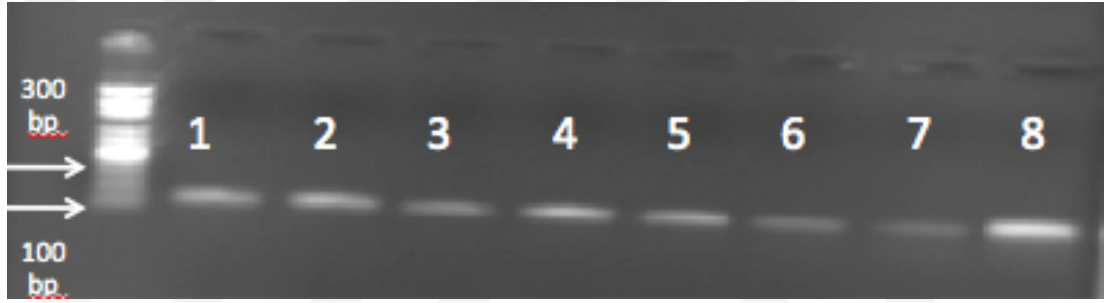
Şekil 4.6 VMC1g3.2 Primeri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin görüntüsü

VMC7f2 primerine ait jel görüntüsü şekil 4.7’de verilmiştir. Allelik dağılım sonuçları da EK 2’de verilmiştir.



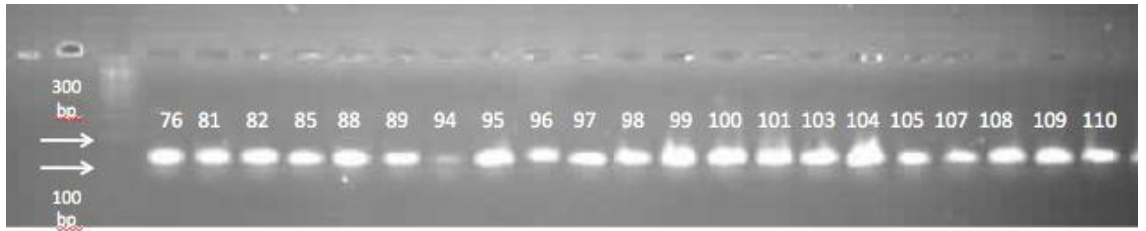
Şekil 4.7 VMC7F2 Primerinin PCR görüntüsü

UDV020a primeri Şekil 4.8de örnek bir agaroz jel görüntüsü verilmiştir. Allelik dağılım sonuçları EK 2’de verilmiştir.



Şekil 4.8 UDV020 Primerinin PCR görüntüsü

Şekil 4.9’da VMC4F3.1 primeri örnek bir agaroz jel görüntüsü verilmiştir. Allelik dağılım sonuçları EK 2’de verilmiştir.



Şekil 4.9 VMC4F3.1 Primerinin PCR görüntüsü

Şekil 4.10’da VMC9H4.2 primeri örnek bir agaroz jel görüntüsü verilmiştir. Allelik dağılım sonuçları EK 2’de verilmiştir.



Şekil 4.10 VMC9H4.2 Primerinin PCR görüntüsü

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Külleme ve mildiyö tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de bağcılığı tehdit eden en önemli iki fungal hastalık etmenidir. Ülkemizde bağ bölgelerimize göre değişmekle birlikte hastalık simptomlarının ortaya çıkmasının ve hastalığın kontrolü için bir vejetasyon dönemi içerisinde 5-12 kez ilaçlama yapılması gerekli olmaktadır. Bu nedenle özellikle bu iki hastalık etmenine dayanıklı çeşit geliştirme ıslahına yönelik çalışmalar ülkemiz için büyük önem arz etmektedir.

Bu araştırmada ülkemizin yıllık ortalama yağışı 900 mm'nin üzerinde olduğu için ekonomik anlamda bağcılığın sınırlı olduğu Karadeniz sahil kesiminde yetiştiriciliği yapılabilen asma genotipleri ile Marmara bölgelerinden toplanan farklı üzüm çeşitlerinin hastalıklara karşı dayanıklılık durumlarının, Marköre Dayalı Seleksiyon (MAS: Marker Assisted Selection) yöntemi ile genotipik olarak belirlenmesi amaçlanmıştır.

Araştırmada dünyanın farklı ıslah enstitülerinde (Almanya/Geilweilerhof; ABD/USDA, Japonya) külleme ve mildiyöye dayanıklı ve/veya tolerant olarak ıslah edilmiş çeşit ve çeşit adayları da Marköre Dayalı Seleksiyonda referans olarak alınmıştır. Bu çeşitlerden geliştirilen QTL haritaları sonrasında (Fisher vd. 2004, Welter vd. 2007, Hoffman vd. 2008, Bellin vd. 2009, Riaz vd. 2011) genomlarında dayanıklılıkla ilişkili kromozom bölgelerinden geliştirilen moleküler markörler, dayanıklı çeşit adaylarının erken seleksiyonuna yönelik olarak kullanılmışlardır.

Araştırmada kullanılan 128 örneğin genetik analizlerinin sonuçlarına göre; dayanıklı çeşit adayı olarak seçilen genotipler çizelge 5.1'de verilmiştir.

Araştırmada Marköre Dayalı Seleksiyonda kullanılan markörler ve bu markörlerin genetik analizine ilişkin detaylar aşağıda verilmiştir.

SSR Markörler:

Araştırmada külleme ve mildiyöye dayanıklılıkla ilişkili 6 adet SSR markör kullanılmıştır (VMC7f2, UDV020a, VMC4f3.1, VMC8g9, VMC9h4, VMC1g3.2).

VMC7F2;

VMC7F2 primeri Riaz vd. (2011) tarafından mildiyöye dayanıklılıkla ilişkili *Rpv1* geniyle bağlantılı olduğu öne sürülmüştür. Araştırmacıların kullanmış oldukları melezleme popülasyonu *M. rotundifolia* (Muscadinia alt cinsi/2n=40) çeşidi olan ‘Magnolia’ melezinden oluşmaktadır. Araştırmamızda Riaz vd. (2011)’ nin bulgularına göre allelik dağılımı referans olarak kullandığımız tek çeşit ABD/USDA orjinli *M. rotundifolia* melezi olan Sugargate çeşidi VMC7F2 ile 212/222 bp büyüklüğünde allellere sahiptir. Araştırmamızda kullandığımız çeşitlerden hiçbirisi 212/222 allelik dağılım göstermemiştir (Çizelge 5.1). Bu araştırmamızda beklenen bir sonuç olup diğer markörlerden (VMC8g9, VMC4f3.1) elde edilen sonuçlar ile de desteklenmiştir.

Bellin vd. (2009) araştırmalarında VMC7F2 primerinin mildiyöye dayanıklılıkla bağlantılı *Rpv3* geni ile yakın ilişkili olduğunu tespit edilmişlerdir. Araştırmada “Bianca x Chardonnay” melezi olan 116 örnekle çalışılmış ve dayanıklılıkla ilişkili QTL bölgesinin 18 nolu kromozom üzerinde UDV305-VMC7F2 arasında olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmada ‘Regent’ ve Bianca’ nın ortak bir pedigraye sahip olması nedeniyle (Her ikisinde de Villard Blanc ortak ebeveyn) mildiyöye dayanıklılık geninin ‘Bianca’ çeşidi için de *Rpv3* geni olduğu görüşü dile getirilmiştir. Buna göre araştırmamızda Regent çeşidinin allel büyüklükleri olan 210/216 bp *Rpv3* geni ile ilişkili olarak değerlendirilmiş ve 210/216 bp allel büyüklüğüne sahip 10 çeşit mildiyöye dayanıklı çeşit adayı olarak seçilmişlerdir (Çizelge 5.1).

Araştırmamızda VMC7F2 ile dayanıklılıkla ilişkili allel olan 210 bp alleli Regent ile birlikte 10 çeşitte gözlemlenirken, bunlardan 3 adetinin Yusufeli/Artvin’den toplanan çeşitler olması ilgi çekicidir.

Shidfar (2015) doktora çalışmasında VMC7F2 primerini Rpv3 geni ile ilişkili olarak MDS amaçlı kullanmış ve ‘Regent’ çeşidinin allellerinden 206 bp alleli dayanıklılıkla ilişkili olarak bildirmiştir. Araştırma sonucunda bulduğumuz allel büyüklükleri (210:216/206:210) her iki allelde de 4 bp fark olmakla birlikte bu durumun farklı Fragman Analiz cihazlarının kullanımından kaynaklandığı düşünülebilir.

VMC8g9 Primeri

VMC8g9 pekçok araştırmacı tarafından *Muscadinia rotundifolia* kökenli Run1 geni ile ilişkili olarak kullanılmıştır (Eibach vd. 2007, Molnar vd. 2007, Hoffman vd. 2008, Riaz vd. 2011). Run1 geni ilk olarak Donald vd (2002) tarafından *M. rotundifolia*’da küllemeye dayanıklılıkla ilişkili gen olarak tespit edilmiş ve bu isimle anılmıştır. Daha sonra *Muscadinia* kökenli dayanıklılık genleri Run, Euvitis kökenli dayanıklılık genleri Ren olarak isimlendirilmiştir.

Molnar vd. (2007) araştırmasında *M. rotundifolia* x *V. vinifera* melez popülasyonunda Run1 geni ile bağlantılı markör olarak VMC8g9 kullanmışlar ve küllemeye dayanıklı bireylerin 160 bp allel büyüklüğüne sahip olduğu tespit edilmişlerdir. Çalışmamızda kullanılan 128 çeşit içinde 160 bp allel büyüklüğüne sahip birey bulunmamıştır.

VMC4f3.1 Primeri

VMC4f3.1 primeri pekçok araştırmacı tarafından külleme dayanıklılık geni Run1 ile ilişkili olarak kullanılmıştır (Wiedemann-Merdinoglu vd. 2006, Molnar vd. 2007, Marguerit vd. 2009, Katula-Debreceni vd. 2010). Araştırmacılar bu markörün *M. rotundifolia* QTL haritasında Run1 ile ilişkili olarak VMC1g3.2 ile VMC8g9 arasında yer aldığını bildirmektedir (Hoffman 2008). Molnar vd. (2007) ‘nin çalışmasında MDS amaçlı kullanılan bu primer *M. rotundifolia* x *V. vinifera* melez popülasyonunda Run1 geni ile bağlantılı olarak denenmiş ve araştırmada dayanıklı bireylerde 186 bp allel büyüklüğü tespit edilmiştir. Bizim çalışmamızda 1 adet birey (Vailant) 186 bp alleli taşıdığı görülmüştür (Çizelge 5.1).

VMC1g3.2 Primeri

Barker vd. (2005) yaptıkları çalışmada *Run1* geni ve *M.rotundifolia* arasındaki ilişki araştırılmıştır. Araştırma sonucunda dayanıklılıkla ilişkili beklenen allel büyüklüğünün 153 bp olduğu bulunmuştur. Çalışmamızda 153 bp allel büyüklüğüne sahip bireyler Çizelge 5.1’de verilmiştir. Yine orijinin *M.rotundifolia* olması ve Sugargate çeşidinin bu allel büyüklüğünü vermesi beklenen bir sonuçtur.

UDV020a Primeri

Hoffmann vd. (2008) yaptıkları araştırmada bir *V.vinifera* çeşidi olan Kismish vatkanada külleme ile ilişkili olduğu bilinen *Ren1* geni araştırılmıştır. Araştırma sonucunda 161 bp allel büyüklüğüne sahip bireylerin dayanıklı olduğu tespit edilmiştir. Bizim çalışmamızda ise 5 çeşit 161bp allel büyüklüğüne sahiptir ve olası dayanıklı çeşit olarak bulunmuştur. (Çizelge 5.1)

VMC9h4 Primeri

Hoffmann vd. (2008) yaptıkları araştırmada VMC9h4.2 markörü kullanılmış ve külemeye dayanıklılıkla ilişkili *Ren1* geninin Kismish vatkana çeşidindeki varlığı araştırılmıştır. Sonuçlara göre 283 bp allel büyüklüğüne sahip bireyler külemeye dayanıklılıkla ilişkilendirilmiştir. Çalışmamızda 6 bireyin 283 bp allel büyüklüğüne sahip olduğu belirlenmiştir (Çizelge 5.1)

Çizelge 5.1 SSR markörler ile tespit edilen olası dayanıklı çeşitler

Marker	İlgili Olduğu Gen	Dayanıklılık orijini	Dayanıklılıkla ilişkili allel büyüklüğü	Dayanıklı Genotip Aday No.	Allel büyü. (bp)	Çeşit Adı
VMC7F2	Rpv1	<i>Muscadinia rotundifolia</i>	212/222	47	212/222	Sugargate (<i>M.rotundifolia</i>)
VMC7F2	Rpv3	Regent	210/216	4	210/216	57 Gerze 04
				38	210/216	Orion
				40	210/216	Staufer
				41	210/216	Regent
				44	210/216	Mortensen
				51	210/216	Köfteci üzümü
				176	210/216	(Yusufeli) yağ üzümü - 19
				180	210/216	(Yusufeli) Peterek turfandası(beyaz)
				181	210/216	(Yusufeli) İstanbul üzümü
VMC8g9	Rpv1	<i>Muscadinia rotundifolia</i>	160/160	-	-	-
VMC4f3.1	Run1	<i>Muscadinia rotundifolia</i>	188/186	31	186/186	Valiant

Çizelge 5.1 SSR markörler ile tespit edilen olası dayanıklı çeşitler (devam)

Marker	İlgili Olduğu Gen	Dayanıklılık orijini	Dayanıklılıkla ilişkilendirilen allel büyüklüğü	Dayanıklı Genotip Aday No.	Allel büyü. (bp)	Çeşit Adı
VMC1g3.2	Run1	<i>Muscadinia rotundifolia</i>	153/153	27	153/153	Mars (Ç.siz)
				47	153/153	Sugargate
				62	153/153	FX1-1
				117	153/153	Kuş Yürek
UDV020a	Ren1	Kismish vatkana	161/161	76	160/162	Siyah Geççi-YALOVA
				98	158/161	Beyaz üzüm (Geççi)Sinop 4
				108	159/162	Bektaş üzümü
				173	156/162	(Yusufeli) isimsiz 1 - 24
				184	148/160	Rize Çayeli isimsiz 4 (Roucaneuf ?)
VMC9h4	Ren1	Kismish Vatkana	283	12	283/292	53 Pazar 03 (TESCİL)
				14	283/292	53 Güneysu 03 (TESCİL)
				26	283/292	Concord
				27	272/283	Mars (Ç.siz)
				31	283/283	Valiant
				32	283/290	Kyoho

SCAR Markörleri

Akkurt vd. (2007) çalışmalarında “Regent x Lemberger” melezleme popülasyonunda “Regent” genetik haritasında küllemeye dayanıklılık ile ilişkili olarak tespit edilen QTL bölgesinden SCORA7 markörünü geliştirmiştir. Regent haritasında küllemeye dayanıklılıkla ilişkili olarak tespit edilen ve Ren3 olarak isimlendirilen SCORA7 markörü, Eibach vd. (2007) araştırmalarında Run1 ve Rpv1 geni taşımayan popülasyonlarda küllemeye dayanıklılıkla ilişkili olarak başarıyla kullanılabildiğini bildirmişlerdir. Akkurt vd. (2007) SCORA7 markeri ile 760 bp büyüklüğünde amplifikasyon ürünü veren genotiplerin küllemeye dayanıklı olarak değerlendirmişlerdir.

Araştırmamızda 10 tane genotip 760 bp büyüklüğünde amplifikasyon ürünü bant vermiştir. Bu genotipler külleme dayanıklı aday genotipler olarak seçilmişlerdir çizelge 5.2’de SCORA7 primeri ile 760 bp büyüklüğünde amplifikasyon ürünü bant veren dayanıklı genotip adayları verilmiştir.

Çizelge 5.2 SCAR markörleri ile belirlenen aday dayanıklı genotipler

Primer	Gen	Allel Büyüklüğü	Genotip No	Çeşit
SCORA7	Ren3	760	2	Batum 4 (Batum siyah)
		760	17	55 Merkez 11 (Beyaz)
		760	37	Boscoop Glory (Holland)
		760	38	Orion
		760	40	Staufer
		760	41	Regent
		760	42	Sirius
		760	43	Phoenix
		760	47	Sugargate
		760	184	Rize Çayeli isimsiz 4 (Roucaneuf ?)

CAPS Markörleri

CAPS markörü GLP1-12 primeri Run1 ile ilişkili olarak Donald vd. (2001) tarafından geliştirilmiş ve Muscadinia genotipi taşıyan populasyonlarda Run1 ile ilişkili bireylerin belirlenmesi amacıyla başarıyla kullanılmıştır. Araştırmamızda PCR amplifikasyon ürünleri agaroz jel üzerinde görüntülenerek, örnekler bant var bant yok şeklinde değerlendirilmiştir. GLP1-12 PCR analiz sonuçları amplifikasyon ürünü var (+) amplifikasyon ürünü yok (-) olacak şekilde Çizelge 4,3'de verilmiştir. Donald vd. (2002)'e göre dayanıklı genotiplerin belirlenmesi amacıyla amplifikasyon ürünleri *EcoRI* enzimi ile kesilmiştir. 870 bp DNA fragmanı hem sağlıklı hem de duyarlı bireylerde amplifike olmuştur. *EcoRI* ile kesimden sonra dayanıklı bireyler iki ayrı parçaya ayrılırken (670 bp ve 200 bp), duyarlı bireylerde bölünme olmamıştır. Araştırmamızda kesim ürünleri agaroz jel elektroforez yöntemiyle görüntülenmiştir (Şekil 4.12). Dayanıklı çeşitler 670 bp ve 200 bp kesim ürünü oluşturmalarına göre değerlendirilmiştir. Analiz sonrasında yalnızca 35 No'lu örnekte (Sunbelt) kesilme gerçekleşmiştir (Şekil 4.12.2). Diğer örneklerde herhangi bir kesilme gerçekleşmemiştir.

Araştırmamızın sonucunda 128 örnek Marköre Dayalı Seleksiyon yöntemiyle külleme ve mildiyöye dayanıklılıkla ilişkili markörler ile taranmış, küllemeye olası dayanıklı olarak 22, mildiyöye olası dayanıklı olarak 10 genotip seçilmiştir.

Araştırma bir TÜBİTAK projesinin parçası olarak yürütülmüş, diğer taraftan proje kapsamında fenotipik gözlemlere dayalı olarak dayanıklı bireyler belirlenmiştir. Atak vd. (2016) proje kapsamında (Proje Kod No:TÜBİTAK/113O641) yayınladıkları proje gelişme raporunda fenotipik olarak takibi yapılan genotiplerin sonuçları Çizelge 5.3'de verilmiştir.

Çizelge 5.3 Proje gelişme raporunda yapay ve doğal inokülasyon sonucunda dayanıklı ve hassas çeşitler (Atak vd. 2016)

MİLDİYÖ DOĞAL			MİLDİYÖ YAPAY		
Genotip No	Çeşit	Hastalık Şiddeti	Genotip No	Çeşit	Hastalık Şiddeti
43	Phoenix	Aşırı Dayanıklı	19	08 Arhavi 01	Aşırı Dayanıklı
51	Köfteci üzümü	Yüksek Dayanıklı	49	Isabella-YALOVA	Yüksek Dayanıklı
38	Orion	Dayanıklı	59	Lival	Dayanıklı
28	Niagara	Hassas	27	Mars (Ç.siz)	Hassas
1	57 Ayancık 01	Oldukça Hassas	2	Batum 4 (Batum siyah)	Oldukça Hassas
KÜLLEME DOĞAL			KÜLLEME YAPAY		
Genotip No	Çeşit	Hastalık Şiddeti	Genotip No	Çeşit	Hastalık Şiddeti
14	53 Güneysu 03 (TESCİL)	Aşırı Dayanıklı	15	55 Merkez 06	Aşırı Dayanıklı
18	53 Güneysu 01	Yüksek Dayanıklı	11	53 Ardeşen 02 (TESCİL)	Yüksek Dayanıklı
35	Sunbelt	Dayanıklı	47	Sugargate	Dayanıklı
30	Steuben	Hassas	39		Hassas
65	Özer Karası	Oldukça Hassas	48	Muscat Bailey A	Oldukça Hassas

Fenotipik gözlem sonuçları ve bizim araştırmamız sonuçları kıyaslandığında VMC7F2 markörleri ile mildiyöye olası dayanıklı tespit ettiğimiz 38 nolu genotip (Orion) Atak vd. (2016)'nin çalışmasında doğal inokülasyon sonucunda mildiyöye dayanıklı bulunmuştur. 43 no'lu genotip (Phoenix) ve 38 no'lu genotip (Orion) çalışmamızda SCORA7 markörü ile küllemeye olası dayanıklı bulunurken Atak vd. (2016)'nin çalışmasında mildiyöye aşırı dayanıklı bulunmuştur. VMC7F2 markörü ile mildiyöye olası dayanıklı olarak tespit edilen 51 genotip no'lu 'Köfteci Üzüümü' fenotipik gözlem sonucu mildiyöye yüksek dayanıklı olarak tespit edilmiştir (Çizelge 5.5) Araştırmamızda VMC9H4.2 markörü ile küllemeye olası dayanıklı olarak tespit ettiğimiz 14 no'lu '53 Güneysu 03' çeşidi doğal inokülasyon sonucu küllemeye aşırı dayanıklı bulunmuştur (Çizelge 5.6) VMC7F2 ile mildiyöye, VMC4F3.1, VMC1g3.2 ve SCORA7 ile küllemeye dayanıklı bulunan 47 no'lu *M. rotundifolia* çeşidi olan 'Sugargate' Atak vd. (2016) tarafından yapay külleme inokülasyonu sonucu dayanıklı tespit edilmiştir.

Çizelge 5.4 Mildiyöye Dayanıklı Çeşit adayları

Mildiyöye Dayanıklı	Fenotipik olarak Mildiyöye Dayanıklı	Ortak Dayanıklı
Sugargate (<i>M.rotundifolia</i>)	Phoenix	Orion
57 Gerze 04	Köfteci üzümü	Köfteci üzümü
Orion	Orion	
Staufer	08 Arhavi 01	
Regent	Isabella-YALOVA	
Mortensen	Lival	
Köfteci üzümü		
(Yusufeli) yağ üzümü		
(Yusufeli) Peterek turfandası(beyaz)		
(Yusufeli) İstanbul üzümü (kırmızı)		

Çizelge 5.5 Küllemeye Dayanıklı Çeşit adayları

Küllemeye Dayanıklı	Fenotipik Gözlemde Küllemeye Dayanıklı	Ortak Dayanıklı
Valiant	53 Güneysu 03 (TESCİL)	Sugargate
Mars (Ç.siz)	53 Güneysu 01	53 Güneysu 03 (TESCİL)
Sugargate	Sunbelt	
FX1-1	55 Merkez 06	
Kuş Yürek	53 Ardeşen 02 (TESCİL)	
Siyah Geççi-YALOVA	Sugargate	
Beyaz üzüm (Geççi)Sinop 4		
Bektaş üzümü		
(Yusufeli) isimsiz 1 - 24 çelik		
Rize Çayeli isimsiz 4 (Roucaneuf ?)		
53 Pazar 03 (TESCİL)		
53 Güneysu 03 (TESCİL)		
Concord		
Kyoho		
Batum 4 (Batum siyah)		
55 Merkez 11 (Beyaz)		
Boscoop Glory (Holland)		
Orion		
Stauffer		
Regent		
Sirius		
Phoenix		

Araştırmamızın sonucunda 128 örnek arasından küllemeye olası dayanıklı olarak 22, mildiyöye olası dayanıklı olarak 10 adet birey seçilmiştir. Fenotipik gözlemlerle birlikte ortak olarak mildiyöye dayanıklı bulunan «Köfteci Üzümlü», küllemeye dayanıklı bulunan «53 Güneysu 03» çeşitleri projenin devamında değerlendirilip gelecekte ıslah çalışmalarında erken seleksiyonda rol oynayacaktır.

KAYNAKLAR

- Akkurt , M. Welter, L., Maul, E., Töpfer, R. and Zyprian, E. 2007. Development of SCAR markers linked to powdery mildew (*Uncinula necator*) resistance in grapevine (*Vitis vinifera* L. and *Vitis* sp.). *Mol Breeding*. 19:103–111.
- Arroyo- Garcia, R., Ruiz-Garcia, L., Bolling, L., Ocete, R., Lopez, M.A., Arnold, C., Ergul, A., Sözyilemezoglu, G., uzun, H.I, Cabello, F., Cenis, J.L., Constantini, L., Gorislavets, S., Grando, M.S., Klein,B.Y., McGovern, P.E., Merdioglu, D., Pejic, I., Pelsy, F., Primikirios, V., Risovannaya, V., Roubelakis, K.A., Snoussş, H., Sotiri, P., Tamhankar, S., This, P., Troshin, L., Malpica, Ji.M., Lefort, F. and Martinez-Zapater, J.M. 2006. Multiple origins of cultivated grapevine (*Vitis vinifera* L. ssp. *sativa*) based on chloroplast DNA polymorphisms. *Molecular Ecology*. 15: 3707-3714
- Atak, A. ve Akkurt, M. 2016. Karadeniz ve Marmara Bölgelerinde Yetiştiriciliği Yapılan Farklı Asma Genotiplerinin Külleme Ve Mildiyö Hastalıklarına Dayanıklılık Özelliklerinin Marköre Dayalı Seleksiyon Yöntemi İle Belirlenmesi. TÜBİTAK projesi (Proje Kod No:TÜBİTAK/113O641). Yalova/Ankara.
- Barker, C. L., Donald, T., Pauquet, J., Ratnaparkhe, M. B., Bouquet, A., Adam-Blondon A.F., Thomas, M.R. and Dry I. 2005 Genetic and physical mapping of the grapevine powdery mildew resistance gene, *Run1*, using a bacterial artificial chromosome library. *Theor Appl Genet*. 111: 370–377
- Bellin, D., Peresotti, E., Merdinoglu, D., Wiedemann-Merdionglu, S., Adam-Blondon, A.F., Cipriani, G., Morgante, M., Testolin, R. and Di Gaspero, G. 2009. Resistance to *Plasmopara viticola* in grapevine ‘Bianca’ is controlled by a major dominant gene causing localised necrosis at the infection site. *Theor Appl Genet*. 120; 163–176.
- Bouquet, A. 1986. Introduction dans l’espèce *Vitis vinifera* L. d’un caractère de résistance à l’o (*Uncinula necator* Schw. Burr.) issu de l’espèce *Muscadinia rotundifolia* (Michx.) Small. *Vig- nevini* 12 (suppl):141–146
- Çelik, H. ve Köse, B. 2006. Rize’de yetişebilecek bazı Amerikan üzüm çeşitlerinin fidan kaliteleri üzerine araştırmalar. I. Rize Sempozyumu, 16-18 Kasım 502-506.
- Çelik, H., Ağaoğlu,Y.S., Fidan,Y., Marasalı,B. ve Söylemezoğlu,G. 1998. Genel Bağcılık. Ankara: Sunfidan A.Ş
- Dalbó, M.A. Ye, G. N., Weeden, N. F., Wilcox, W. F. and Reisch, B.I. 2001. Marker-assisted Selection for Powdery Mildew Resistance in Grapes.J. Amer. Soc. Hort. Sci. 126(1):83–89.
- Di Gaspero , G., Copetti, D., Coleman, C., Castellarin, S.D, Eibach, R., Kozma, P., Lacombe, T., Gambetta, G., Zvyagin, A., Cindri, P., Kovács, L., Morgante, M. and Testolin, R. 2012. Selective sweep at the *Rpv3* locus during grapevine breeding for downy mildew resistance. *Theor. Appl. Genet*. 124 (2): 277-86.

- Donald , T. M., Pellerone, F., Adam-Blondon, A. F., Bouquet, A., Thomas, M. R. and Dry, I. B 2002. Identification of resistance gene analogs linked to a powdery mildew resistance locus in grapevine Theor Appl Genet .104:610–618
- Eibach, R., E. Zyprian, and Töpfer. R. 2007. The use of molecular markers for pyramiding resistance genes in grapevine breeding . Vitis.46 (2), 120–124.
- Fischer, M. B., Salakhutnov, I., Akkurt, M., Eibach, R., Edwards, K. J., Töpfer, R. and Zyprian, E. 2004. Quantitative trait locus analysis of fungal disease resistance factors on a molecular map of grapevine. Theor Appl Genet. 108:501–515.
- Gökbayrak, Z., Özer, C. and Söylemezoğlu, G. 2006 Preliminary Results on Genome Mapping of an Italia x Mercan Grapevine Population. Turk J Agric For. 30 273-280
- Hoffmann , S., Di Gaspero , G., Kovács, L , Howard, S., Kiss, E., Galbács , Z., Testolin, R. and Kozma, P. 2008. Resistance to *Erysiphe necator* in the grapevine ‘Kishmish vatkana’ is controlled by a single locus through restriction of hyphal growth. Theor Appl Genet. 116:427–438.
- İşçi B., Altındışli A., Söylemezoğlu, G. and Özer C. 2010 Genome mapping in F₁ population of crossbred Italia and Mercan grape varieties: Establishment of AFLP and SSR linkage groups towards significant morphological characters and fungal diseases. African Journal of Biotechnology Vol. 9(36), pp. 5879-5886.
- Katula-Debreceni, D., Lencsés , A.K., Szo’ke , A., Veres, A., Hoffmann, S., Kozma, P., Kovács , L.G., Heszky , L. and Kiss, E. 2010. Marker-assisted selection for two dominant powdery mildew resistance genes introgressed into a hybrid grape population. Scientia Horticulturae 126 (2010) 448–453.
- Kısmalı, İ. 1995. Ders Notları. E.Ü. Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü, Bornova-İZMİR.
- Kozma Jr, P. and Dula, T. 2003. Inheritance of Resistance to Downy Mildew and Powdery Mildew of Hybrid Familiy *Muscadinia* x *V. vinifera* x *V. amurensis* x Franco-American Hybrid. Proc. VIIIth Int’l. Congress on Grape. Acta Hort., 603 457-463.
- Luo, S, L., He, P. C., Zhou, P. and Zheng, X. Q. 2001. Of Molecular Genetic Markers Tightly Linked To Downy Mildew Resistant Genes İn Grape. Acta Genet. Sinica China 28, 76-82.
- Marguerit, E., Boury, C., Manicki, A., Donnart, M., Butterlin, G., Némorin , A., Wiedemann- Merdinoglu, S., Merdinoglu, D., Ollat, N. and Decroocq, S. 2009. Genetic dissection of sex determinism, inflorescence morphology and downy mildew resistance in grapevine. Theor Appl Genet. 2009;118:1261–1278.
- Merdinoğlu, D., Wiedeman-Merdinoğlu, S., Coste, P., Dumas, V., Haetty, S., Butterlin, G. and Greif, C., 2003. Genetic Analysis of Downy Mildew Resistance Derived from *Muscadinia rotundifolia*. ISHS Acta: VIII International Conference on Grape Genetics and Breeding. Horticulturae, 603: 451-456 .

- Molnár , S. , Galbács, Z., Halász, G., Hoffmann, S., Kiss, E., Kozma, P., Veres, A., Galli, Z., Szöke, A. and Heszky, L. 2007. Marker assisted selection (MAS) for powdery mildew resistance in a grape- vine hybrid family. *Vitis*.46 (4), 212–213.
- Moreira , F. M., Madini, A., Marino, R., Zulini, L., Stefanini, M., Velasco, R., Kozma, P. and Grando, M.S. 2011. Genetic linkage maps of two interspecific grape crosses (*Vitis* spp.) used to localize quantitative trait loci for downy mildew resistance. *Tree Genetics & Genomes*. 7:153–167.
- Pauquet, J.,Bouquet, A., This, P. and Adam-Blondon, A. F. 2001. Establishment of a local map of AFLP markers around the powdery mildew resistance gene Run1 in grapevine and assessment of their usefulness for marker assisted selection. *Theor Appl Genet*.103:1201–1210.
- Riaz, S. , Boursiquot , J.M., Dangl, G.S., Lacombe, T., Laucou, V.,Tenscher, A.C. and Walker, M.A. 2013. Identification of mildew resistance in wild and cultivated Central Asian grape germplasm. *BMC Plant Biology* 2013, 13:149
- Riaz, S. 2000. A microsatellite marker-based linkage map of *Vitis vinifera*. In: *Proc Plant and Animal Genome VIII*, San Diego, California, USA, January 9–12,
- Riaz, S., Tenscher, A.C., Ramming, D.W. and Walker, M.A. 2011. Using a limited mapping strategy to identify major QTLs for resistance to grapevine powdery mildew (*Erysiphe necator*) and their use in marker-assisted breeding. *Theor Appl Genet*. 122:1059–1073.
- Ridout, C. and Donini, P.1999 "Use of AFLP in cereals research." *Trends in Plant Science* 4.2 : 76-79.
- Shidfar, M. 2014. Moleküler Markörlerin Bağcılıkta Külleme ve Mildiyö Hastalıklarına Dayanıklı Çeşit İslahında, Marköre Dayalı Seleksiyon (Marker Assisted Selection- MAS) Amaçlı Kullanılması. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Ankara.
- Söylemezoğlu, G., Ergül, A., Akkurt, M. ve Çakır, A. 2012. Asmada külleme ve mildiyö hastalıklarına dayanıklı çeşit ıslahında marköre dayalı seleksiyon (marker assisted selection) yöntemi ile hızlandırılmış seleksiyon. Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi.Ankara.
- Vos, P. Hegers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van de Lee, T., Hornes, M. and Zabeau, M 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleid Acid Research*. 23 (21): 4407-4414.
- Welter, L. . J., Baydar, N.G., Akkurt, M., Maul, E., Eibach, R., Töpfer, R., and Zyprian, E. 2007. Genetic mapping and localization of Quantitative trait loci affecting fungal disease resistance and leaf morphology in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Mol. Breeding* 20, 359-374
- Wiedemann, S., Prado, E., Coste, P., Dumas, V., Butterlin, G., Bouquet, A. and Merdinoglu, D 2006. Genetic Analysis Of Resistance To Downy Mildew From *Muscadinia rotundifolia*. 9th Int.Conf. Grape Genet. Breed., (2006), Udine, Italy.

EKLER

EK 1 DNA miktarı ve saflık değerleri ortalamaları

EK 2 Araştırmada kullanılan genotiplerin SSR markörleri ile elde edilen PCR ürünlerinin allelik dağılımı

EK 3 CAPS Primerinde PCR ürünü varlığı

EK 4SCAR Primerinde 760 bp amplifikasyon ürünü varlığı

EK 1 DNA miktarı ve saflık değerleri ortalamaları

Örnek No	Miktar (ng/ul)	Saflık (260/280)		Örnek No	Miktar (ng/ul)	Saflık (260/280)
No	0	NaN		No	0	NaN
1	285	1,86		21	37,245	1,575
2	270,18	1,65		22	80,32	1,815
3	251,19	1,705		23	60,475	1,76
4	238,61	1,73		24	79,83	1,91
5	153,025	1,44		25	13,865	1,25
6	114,58	1,99		26	127,91	1,745
7	41,01	2,005		27	105,31	1,54
8	49,825	1,765		28	103,13	1,6
10	48,715	1,71		29	198,34	1,58
11	77,645	1,29		30	107,905	1,5
12	40,605	1,58		31	139,3	1,49
13	55,1	1,41		32	81,735	1,62
14	45,85	1,97		33	121	1,55
15	42,975	1,985		34	96,65	1,325
16	54,15	1,5		35	138,9	1,43
17	49,45	1,75		37	127,05	1,4
18	87,205	1,535		38	156,77	1,57
19	38,25	1,965		40	140,005	1,435

EK 1 DNA miktarı ve saflık değerleri ortalamaları (devam)

Örnek No	Miktar (ng/ul)	Saflık (260/280)	Örnek No	Miktar (ng/ul)	Saflık (260/280)
No	0	NaN	No	0	NaN
41	110,1	1,5	76	122,19	1,585
42	153,05	1,775	81	137,59	1,205
43	147,225	1,53	82	84,82	0,75
44	102,6	1,68	85	62,96	0,895
45	183,165	1,77	88	86,435	0,835
46	63,385	1,78	89	244,64	1,565
47	35,855	1,745	94	95,445	0,975
48	149,205	1,92	95	27,18	0,75
49	101,71	1,62	96	114,26	1,41
50	96,27	1,76	97	228,44	1,59
51	103,925	1,895	98	180,78	1,5
62	96,8	1,89	99	89,52	1,395
63	62,18	1,895	100	147,335	1,18
64	37,505	1,785	101	63,26	0,645
65	97,93	1,76	108	98,925	1,73
67	72,5	1,995	109	229,06	1,855
68	28,53	1,92	110	105,675	1,685
69	70,495	2,11	111	153,915	1,785
70	29,86	1,73	112	204,97	1,85
71	122,675	1,98	113	82,25	1,53
72	52,135	1,75	114	135,725	1,775
73	81,18	2,05	117	62,62	1,76
74	67,525	1,85	118	74,8	1,84

EK 1 DNA miktarı ve saflık değerleri ortalamaları (devam)

Örnek No	Miktar (ng/ul)	Saflık (260/280)	Örnek No	Miktar (ng/ul)	Saflık (260/280)
No	0	NaN	No	0	NaN
119	110,42	1,835	160	144,975	1,4
120	138,885	1,8	161	466,85	1,935
122	119,06	1,655	162	388,62	1,945
123	207,44	1,865	164	401,94	1,925
124	54,465	1,605	165	326,275	1,94
125	106,9	1,795	166	605,14	1,93
126	111,68	1,8	168	238,375	1,9
127	113,78	1,705	169	219,965	1,905
128	158,05	1,885	172	518,715	1,935
131	378,23	1,87	173	421,035	1,965
132	1374,095	1,965	174	337,985	1,89
133	459,97	1,91	175	611,675	1,98
134	546,215	1,945	176	352,7	1,9
135	579,25	1,9	177	468,565	1,95
136	373,575	1,86	178	443,44	1,925
137	1647,9	1,975	179	448,295	1,915
153	316,45	1,92	180	455,85	1,97
154	285,975	1,88	181	943,855	1,01
155	175,17	1,85	182	453,705	1,315
156	232,39	1,895	183	751,845	1,41
157	255,99	1,885	184	251,05	1,36
158	281,185	1,875	192	291,055	1,575
159	409,005	1,94	193	180,25	1,43

EK 2 Araştırmada kullanılan genotiplerin SSR markörleri ile elde edilen PCR ürünlerinin allelik dağılımı

VMC1g3.2			UDV020a			VMC9h4.2			VMC8g9			VMC7f2			VMC4f3.1		
Genotip	allel büy.	allel büy.	Genotip	allel büy.	allel büy.	Genotip	allel büy.	allel büy.	Genotip	allel büy.	allel büy.	Genotip	allel büy.	allel büy.	Genotip	allel büy.	allel büy.
Regent	140	153	Regent	143	149	Regent	280	292	Regent	182	185	Regent	210	216	Regent	195	197
1	140	140	1	144	144	1	273	292	1	178	202	1	203	207	1	174	197
2	-	-	2	147	151	2	272	287	2	173	177	2	213	224	2	179	181
3	-	-	3	144	144	3	274	292	3	-	-	3	211	211	3	179	181
4	140	140	4	144	144	4	273	292	4	178	202	4	210	216	4	179	179
5	140	140	5	145	145	5	273	292	5	-	-	5	208	212	5	179	181
6	137	137	6	144	144	6	273	292	6	178	202	6	202	207	6	179	181
7	141	183	7	144	144	7	269	289	7	-	-	7	208	212	7	181	181
8	132	132	8	144	150	8	290	298	8	174	180	8	211	211	8	179	181
10	141	141	10	-	-	10	287	291	10	180	186	10	205	205	10	176	176
11	141	141	11	144	151	11	274	293	11	-	-	11	208	212	11	179	180
12	148	207	12	116	149	12	283	292	12	186	196	12	205	209	12	-	-
13	142	142	13	144	144	13	274	293	13	151	190	13	205	210	13	176	212
14	149	149	14	118	118	14	283	292	14	182	185	14	208	212	14	176	180
15	274	274	15	-	-	15	-	-	15	-	-	15	-	-	15	175	212
16	140	140	16	143	143	16	274	293	16	-	-	16	203	207	16	181	182
17	142	154	17	150	166	17	290	290	17	-	-	17	208	212	17	182	210
18	142	142	18	144	144	18	273	292	18	175	198	18	203	208	18	179	181
19	148	148	19	117	150	19	284	292	19	186	195	19	208	212	19	180	192
21	141	141	21	151	166	21	274	291	21	178	178	21	210	220	21	-	-
22	141	141	22	-	-	22	274	293	22	178	202	22	208	212	22	180	181
23	140	140	23	141	141	23	274	293	23	178	202	23	208	212	23	178	179

EK 2 Araştırmada kullanılan genotiplerin SSR markörleri ile elde edilen PCR ürünlerinin allelik dağılımı (devam)

24	140	182	24	143	143	24	274	293	24	178	202	24	208	212	24	179	181
25	142	184	25	143	143	25	274	293	25	-	-	25	208	212	25	177	179
26	140	140	26	142	142	26	283	292	26	-	-	26	208	212	26	175	211
27	153	153	27	151	151	27	272	283	27	180	186	27	211	211	27	177	179
28	136	136	28	144	144	28	290	293	28	178	188	28	207	207	28	176	176
29	141	184	29	144	144	29	272	292	29	174	178	29	211	211	29	181	190
30	140	140	30	142	142	30	272	292	30	-	-	30	182	208	30	182	214
31	182	181	31	144	144	31	283	283	31	163	176	31	203	203	31	186	186
32	141	141	32	143	143	32	283	290	32	176	180	32	208	212	32	179	227
33	182	184	33	143	143	33	285	312	33	-	-	33	208	208	33	174	182
34	147	147	34	144	144	34	273	298	34	186	186	34	250	250	34	188	211
35	137	137	35	142	142	35	269	289	35	175	175	35	211	211	35	176	192
37	141	141	37	149	149	37	313	321	37	169	208	37	208	212	37	183	212
38	140	140	38	142	148	38	271	291	38	-	-	38	210	216	38	182	187
40	140	140	40	143	147	40	272	291	40	184	229	40	210	216	40	181	183
42	140	140	42	143	147	42	273	273	42	183	202	42	214	219	42	182	190
43	154	154	43	148	151	43	272	291	43	183	202	43	215	221	43	191	197
44	143	143	44	149	149	44	271	290	44	182	185	44	210	216	44	184	184
45	183	140	45	144	144	45	271	290	45	178	202	45	208	212	45	181	181
46	140	182	46	117	117	46	284	284	46	178	178	46	208	212	46	182	182
47	153	153	47	147	149	47	271	318	47	-	-	47	212	222	47	176	184
48	141	141	48	118	144	48	277	320	48	178	202	48	208	212	48	181	214
49	140	182	49	144	144	49	274	293	49	178	202	49	208	212	49	180	182
50	146	153	50	152	152	50	288	288	50	-	-	50	208	212	50	174	232
51	154	154	51	143	143	51	276	292	51	170	170	51	210	216	51	173	194

EK 2 Araştırmada kullanılan genotiplerin SSR markörleri ile elde edilen PCR ürünlerinin allelik dağılımı (devam)

62	153	153	62	143	143	62	277	293	62	170	170	62	208	212	62	174	195
63	137	142	63	150	150	63	292	321	63	175	208	63	206	211	63	181	187
64	141	153	64	158	158	64	272	279	64	186	186	64	213	216	64	176	181
65	141	141	65	138	149	65	298	320	65	170	177	65	211	211	65	17	17
67	141	141	67	148	158	67	298	302	67	175	186	67	211	211	67	176	192
68	141	141	68	147	157	68	299	303	68	174	186	68	211	211	68	176	198
69	141	141	69	150	159	69	288	298	69	182	185	69	211	211	69	176	192
70	141	141	70	150	157	70	290	320	70	186	186	70	208	212	70	176	182
71	136	146	71	148	158	71	280	285	71	183	183	71	208	212	71	191	219
72	136	136	72	147	157	72	292	311	72	173	180	72	213	216	72	204	219
73	149	156	73	148	151	73	277	298	73	174	186	73	-	-	73	169	188
74	142	142	74	158	158	74	291	311	74	181	185	74	208	212	74	176	176
76	137	143	76	160	162	76	279	287	76	173	185	76	211	211	76	185	201
81	141	153	81	148	158	81	289	296	81	169	181	81	208	212	81	183	216
82	154	154	82	157	157	82	301	310	82	174	186	82	208	208	82	192	198
85	140	140	85	147	147	85	275	294	85	178	202	85	208	212	85	176	198
88	141	141	88	150	150	88	275	294	88	178	202	88	208	212	88	182	189
89	140	140	89	150	150	89	-	-	89	178	202	89	204	208	89	182	182
94	138	138	94	149	149	94	274	293	94	178	202	94	209	213	94	181	181
95	-	-	95	148	148	95	-	-	95	178	202	95	208	212	95	182	189
96	143	143	96	158	173	96	277	290	96	174	174	96	214	214	96	196	233
97	140	140	97	151	151	97	273	292	97	178	202	97	207	211	97	182	182
98	140	140	98	158	161	98	288	312	98	174	174	98	213	217	98	178	209
99	201	201	99	159	159	99	291	312	99	185	185	99	208	212	99	176	233

EK 2 Araştırmada kullanılan genotiplerin SSR markörleri ile elde edilen PCR ürünlerinin allelik dağılımı (devam)

100	142	142	100	148	158	100	280	288	100	175	184	100	209	227	100	192	212
101	-	-	101	148	159	101	289	296	101	174	186	101	212	216	101	176	212
108	136	141	108	159	162	108	303	312	108	175	186	108	212	216	108	183	198
109	135	135	109	158	158	109	278	311	109	170	175	109	208	212	109	177	183
110	144	144	110	147	157	110	298	311	110	175	175	110	208	212	110	188	197
111	136	141	111	148	158	111	-	-	111	181	186	111	208	212	111	175	198
112	140	152	112	154	168	112	290	352	112	180	186	112	212	216	112	199	218
113	142	142	113	146	158	113	276	287	113	170	170	113	208	212	113	179	197
114	144	153	114	159	172	114	287	290	114	175	186	114	211	211	114	177	189
117	153	153	117	148	158	117	302	312	117	175	175	117	217	217	117	196	196
118	136	141	118	147	157	118	291	304	118	181	187	118	208	223	118	177	183
119	143	155	119	154	169	119	286	308	119	-	-	119	206	221	119	180	194
120	143	145	120	158	164	120	312	402	120	-	-	120	208	223	120	177	189
122	137	142	122	148	159	122	278	292	122	181	186	122	208	212	122	175	212
123	141	141	123	149	149	123	323	337	123	174	196	123	205	205	123	182	182
124	138	143	124	158	158	124	294	314	124	181	186	124	208	212	124	175	212
125	139	142	125	158	158	125	291	291	125	175	180	125	207	207	125	183	192
126	132	132	126	157	157	126	293	313	126	177	185	126	208	212	126	177	218
127	135	141	127	148	156	127	293	323	127	169	174	127	206	214	127	191	216
128	139	139	128	151	151	128	244	274	128	178	202	128	204	208	128	181	181
131	137	142	131	158	158	131	296	304	131	175	175	131	207	224	131	183	189
132	132	136	132	158	173	132	291	404	132	203	203	132	207	222	132	189	192
133	139	139	133	149	149	133	274	294	133	-	-	133	203	208	133	182	182
134	-	-	134	147	159	134	292	303	134	174	174	134	-	-	134	197	197
135	141	145	135	148	158	135	303	303	135	179	179	135	205	211	135	192	198

EK 2 Araştırmada kullanılan genotiplerin SSR markörleri ile elde edilen PCR ürünlerinin allelik dağılımı (devam)

136	143	143	136	137	155	136	291	313	136	-	-	136	208	225	136	193	211
137	144	144	137	158	158	137	291	305	137	-	-	137	208	212	137	177	198
153	145	145	153	426	426	153	272	303	153	175	187	153	204	208	153	184	184
154	143	143	154	152	152	154	270	321	154	183	183	154	203	208	154	182	182
155	482	482	155	147	147	155	272	277	155	179	183	155	203	205	155	178	178
156	140	140	156	157	157	156	272	275	156	179	208	156	203	206	156	182	200
157	143	143	157	123	123	157	284	291	157	191	191	157	207	225	157	180	180
158	141	141	158	-	-	158	275	314	158	186	208	158	203	209	158	183	213
159	143	143	159	148	155	159	272	293	159	187	187	159	163	203	159	184	214
160	144	165	160	120	120	160	273	285	160	187	191	160	202	212	160	177	183
161	147	147	161	120	148	161	272	284	161	192	199	161	208	223	161	195	195
162	140	140	162	120	156	162	284	293	162	184	184	162	203	208	162	182	182
164	-	-	164	121	121	164	284	322	164	182	185	164	205	222	164	183	183
165	154	154	165	155	233	165	293	313	165	184	188	165	203	209	165	183	198
166	203	205	166	-	-	166	291	291	166	190	192	166	-	-	166	213	222
168	140	140	168	155	155	168	274	312	168	187	208	168	203	205	168	183	212
169	139	139	169	148	148	169	270	320	169	191	200	169	206	208	169	185	185
172	208	208	172	147	147	172	274	293	172	191	207	172	203	203	172	193	214
173	135	135	173	156	162	173	289	301	173	184	190	173	212	216	173	-	-
174	140	140	174	155	170	174	292	303	174	-	-	174	208	212	174	197	197
175	138	155	175	155	155	175	279	312	175	174	174	175	208	212	175	178	183
176	-	-	176	155	170	176	291	303	176	190	190	176	210	216	176	196	212
177	149	156	177	155	170	177	292	302	177	187	187	177	212	214	177	184	195
178	156	156	178	155	170	178	285	303	178	-	-	178	208	212	178	195	195

EK 2 Araştırmada kullanılan genotiplerin SSR markörleri ile elde edilen PCR ürünlerinin allelik dağılımı (devam)

179	156	156	179	155	163	179	277	313	179	180	189	179	212	216	179	184	198
180	138	141	180	145	155	180	307	307	180	178	178	180	210	216	180	192	192
181	136	136	181	155	168	181	280	314	181	173	178	181	210	216	181	173	179
182	-	-	182	-	-	182	-	-	182	-	-	182	211	211	182	-	-
183	141	141	183	147	147	183	274	293	183	202	202	183	208	212	183	182	182
184	-	-	184	148	160	184	273	273	184	190	190	184	212	222	184	174	174
192	140	140	192	137	155	192	287	291	192	177	183	192	213	229	192	185	213
193	142	142	193	137	155	193	289	293	193	184	191	193	212	214	193	-	-

EK 3 CAPS Primerinde PCR ürünü varlığı

GLP1-12		GLP1-12		GLP1-12		GLP1-12	
Genotip	PCR ürünü	Genotip	PCR ürünü	Genotip	PCR ürünü	Genotip	PCR ürünü
1	+	40	-	99	+	160	+
2	+	41	-	100	+	161	+
3	+	42	-	101	+	162	+
4	+	43	-	108	+	164	+
5	+	44	-	109	+	165	+
6	+	45	-	110	+	166	+
7	-	46	-	111	+	168	+
8	+	47	-	112	+	169	+
10	-	48	-	113	+	172	+
11	+	49	-	114	+	173	+
12	+	50	-	117	+	174	-
13	+	51	+	118	+	175	+
14	-	62	+	119	+	176	+
15	-	63	+	120	+	177	+
16	+	64	+	122	+	178	+
17	+	65	+	123	+	179	+
18	+	67	-	124	+	180	+
19	+	68	+	125	+	181	+
21	-	69	+	126	+	182	-
22	+	70	+	127	+	183	+
23	-	71	+	128	+	184	+
24	-	72	+	131	+	192	+
25	+	73	-	132	+	193	+
26	+	74	+	133	+		
27	+	76	+	134	+		
28	+	81	+	135	+		
29	-	82	+	136	+		
30	-	85	-	137	+		
31	+	88	+	153	+		
32	-	89	+	154	+		
33	-	94	+	155	+		
34	+	95	+	156	+		
35	+	96	+	157	+		
37	-	97	+	158	+		
38	-	98	+	159	+		

EK 4SCAR Primerinde 760 bp amplifikasyon ürünü varlığı

SCORA7		SCORA7		SCORA7		SCORA7	
Genotip	760 bp allel büyüklüğü	Genotip	760 bp allel büyüklüğü	Genotip	760 bp allel büyüklüğü	Genotip	760 bp allel büyüklüğü
1	-	40	+	99	-	160	-
2	+	41	+	100	-	161	-
3	-	42	+	101	-	162	-
4	-	43	+	108	-	164	-
5	-	44	-	109	-	165	-
6	-	45	-	110	-	166	-
7	-	46	-	111	-	168	-
8	-	47	+	112	-	169	-
10	-	48	-	113	-	172	-
11	-	49	-	114	-	173	-
12	-	50	-	117	-	174	-
13	-	51	-	118	-	175	-
14	-	62	-	119	-	176	-
15	-	63	-	120	-	177	-
16	-	64	-	122	-	178	-
17	+	65	-	123	-	179	-
18	-	67	-	124	-	180	-
19	-	68	-	125	-	181	-
21	-	69	-	126	-	182	-
22	-	70	-	127	-	183	-
23	-	71	-	128	-	184	+
24	-	72	-	131	-	192	-
25	-	73	-	132	-	193	-
26	-	74	-	133	-		
27	-	76	-	134	-		
28	-	81	-	135	-		
29	-	82	-	136	-		
30	-	85	-	137	-		
31	-	88	-	153	-		
32	-	89	-	154	-		
33	-	94	-	155	-		
34	-	95	-	156	-		
35	-	96	-	157	-		
37	+	97	-	158	-		
38	+	98	-	159	-		

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Zeynep YILDIRIM

Doğum Yeri : Ankara

Doğum Tarihi : 25.12.1989

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce, Almanca

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Kırkkonaklar Anadolu Lisesi (2008)

Lisans : Ankara Üniversitesi Ziraat Mühendisliği (2012)

Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahç Bitkileri Anabilim
Dalı (09.2013 – 07.2016)

Çalıştığı Kurum / Kurumlar ve Yıl

Vinolus Şarapçılık (2013-2014)