

Zeytin (*Olea europaea* L.) Genotiplerinin DNA Markörleri Yardımı ile Karakterizasyonu

Characterization of Olive Genotypes (*Olea europaea* L.) by Means of DNA Markers

Öznur ÇETİN¹, Adalet MISIRLİ², M. Bahattin TANYOLAÇ³

¹Bornova Zeytincilik Araştırma Enstitüsü

²Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü

³Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü

Geliş tarihi: 01.03.2017

Kabul tarihi: 20.05.2017

Özet

Bu çalışmada ulusal zeytin arazi gen bankasındaki 96 genotip DNA'ya dayalı yöntemler olan RAPD, AFLP ve SSR markör teknikleri uygulanarak moleküller düzeyde tanımlanmıştır. RAPD markör analizinde 52 primerden 215 polimorfik bant, AFLP markör analizinde 26 primerden 919 polimorfik bant ve SSR markör analizinde ise 14 primerden 62 polimorfik bant elde edilmiştir. Her teknikten elde edilen veriler ile genetik uzaklık matrisi ve dendrogram oluşturulmuştur. Ayrıca üç tekniğin verilerinin birleştirilmesi sonucunda toplam 1196 adet polimorfik bant değerlendirilerek dendrogram ve genetik uzaklık matrisi elde edilmiştir. İncelenen 96 genotipte RAPD markör analizinde en düşük genetik uzaklık değeri 0.05, en yüksek genetik uzaklık değeri 0.84 olarak tespit edilmiştir. AFLP markör analizinde popülasyonda genetik uzaklık bakımından en düşük değer 0.15, en yüksek değer 0.71'dir. SSR markör analizinde ise en düşük ve en yüksek genetik uzaklık değerleri ise 0.00 ile 0.87 olarak saptanmıştır. RAPD, AFLP ve SSR markör analizi verileri birlikte değerlendirilerek elde edilen genetik uzaklık matrisinde, en düşük değer 0.14, en yüksek değer ise 0.70 olarak belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Zeytin, RAPD, AFLP, SSR.

Abstract

In this study, 96 genotypes in the National Ex-situ Olive Germplasm Bank have been characterized by DNA-based marker techniques such as RAPD, AFLP and SSR. In the marker analyses, 215 polymorphic bands from 52 primers in RAPD, 919 polymorphic bands from 26 primers in AFLP and 62 polymorphic bands from 14 primers in SSR have been obtained. A dendrogram and a genetic distance matrix have been established with the data of each technique separately. Besides, the dendrogram and the genetic distance matrix have also been constructed by evaluating totally 1196 polymorphic bands as a result of combining the data of these techniques. In the studied 96 genotypes, it has been determined that the lowest genetic distance value was 0.05 and the highest genetic distance value was 0.84 in RAPD marker analysis. In AFLP marker analysis, the lowest value was 0.15 and the highest value was 0.71 within the population in the context of genetic distance. As for SSR, the lowest and highest genetic distance values have been determined as 0.00 and 0.87 respectively. Evaluating the data of RAPD, AFLP and SSR marker analyses together, it has been determined that the lowest genetic matrix value was 0.14 and the highest genetic matrix value was 0.70.

Keywords: Olive, RAPD, AFLP, SSR.

Giriş

Zeytin, dünyanın belirli bölgelerinde ekolojik açıdan kendine uygun yaşam alanları bulmuştur. Genel olarak Kuzey ve Güney yarımkürenin 30°-45° enlemleri arasındaki bölge zeytinin üretim kuşağı olarak nitelendirilmektedir (Rallo ve ark., 1997). Ekonomik anlamda 38 ülkede zeytin üretimi yapılmakta olup bu ülkelerin 30'u kuzey yarımkürede, 8'i ise güney yarımkürede yer almaktadır (Öztürk, 2006). Kuzey yarımkürede bulunan üretim alanları Akdeniz Havzası'nda yoğunlaşmakta ve dünya zeytin üretiminin % 99'unu karşılamaktadır. Bu nedenle, zeytin, Akdeniz ülkelerinin ekonomisinde, beslenmesinde ve kültüründe önemli bir yere sahiptir (Zamora ve ark., 2001). Dünyada geniş bir alanda yetiştiriciliği yapılmakta olan zeytin türünün, 2000'den çok çeşide sahip olduğu bildirilmiştir (Bartolini ve ark., 1998). Ancak, yerel çeşitler hakkındaki bilgi eksikliği sebebiyle bu rakamın düşük olduğu ifade edilmektedir (Cantini ve ark., 1999).

Zeytin, M.Ö. 3000 yıllarında Akdeniz'in doğu kıyılarında kültüre alınmaya başlamış olup, bu bölgede kültüre alınan ilk meyve türlerindendir (Zohary ve Spiegel-Roy, 1975). Günümüze kadar yapılan arkeolojik çalışmalarдан elde edilen bulgular, zeytin yetiştiriciliğinin kökeninin Suriye-İsrail-Filistin bölgesi olduğunu göstermektedir (Zohary ve Hopf, 1993; Remesal- Rodríguez, 1996). Zeytinin orijin merkezlerinden birisi olarak kabul edilen Türkiye zeytin çeşitliliği bakımından son derece zengindir. Zeytincilik Araştırma Enstitüsü'nün 1968 yılından beri yapmış olduğu surveylerde 89 genotip belirlenmiş ve tescil ettirilmiştir.

Günümüzde sürekli gelişen moleküler markör teknikleri bitki sistemi içinde, genetik kaynaklarının tanımlanmasında, ıslahında, genetik haritaların oluşturulmasında ve hastalıklara dayanımın belirlenmesinde kullanılmaktadır (Gülşen ve Mutlu, 2005). Ülkelerin en büyük zenginliği olan gen kaynaklarının korunması, değerlendirilmesi ve adına doğru olarak kayıt altına alınması son derece önemlidir. Diğer bitki türlerinde olduğu gibi zeytinde de genetik kaynaklarının tanımlanmasında morfolojik karakterlerden yararlanılmaktadır. Ancak son yıllarda morfolojik özelliklere göre yapılan

tanımlamaların yanında daha güvenilir bulgulara ulaşılabilmesi bakımından moleküler teknikler ile yapılan tanımlamalar yoğun olarak kullanılmaya başlanmıştır.

Morfolojik özelliklerine göre yapılan çeşitli tanımlamada; bazı çeşitlerin birbirine benzemesi, bazlarında ise aynı çesidin farklı çevresel koşullarda yetişirilmesine bağlı olarak doğru adlandırıldığını ve bunun da çeşitli tanımlamada karışıklıklara yol açtığı belirtilmiştir (Vergari ve ark., 1996). Geleneksel ıslah uygulamalarına alternatif olarak sürekli gelişen moleküler markör teknikleri, çevre faktörlerinden etkilenmemeleri, genetik değişiklikleri daha fazla yansıtması, her bir ebeveyinden gelen farklı karakterleri ortaya çıkarmaları, bitkilerin genetik orijinin belirlenmesine yardımcı olması ve çok sayıda markörün elde edilebilir olması nedeniyle önemli avantajlar sağlamaktadır (Yıldırım ve Kandemir, 2001). Birçok ülkede zeytin genotiplerinin DNA'ya dayalı moleküler markör teknikleri ile tanımlanması konusunda araştırmalar yapılmaktadır (Belaj ve ark., 2003a; Cordeiro ve ark., 2008; Shahriari ve ark., 2008).

Bu çalışmada, zeytin arazi gen bankasındaki 96 genotipin DNA'ya dayalı yöntemler olan RAPD, AFLP ve SSR markör teknikleri ile tanımlanması amaçlanmıştır. Her teknikten elde edilen verilerin ayrı ayrı ve birlikte değerlendirilmesi herhangi bir teknikle belirlenemeyecek bir polimorfizmin diğer bir teknikle ortaya çıkarılmasına olanak sağlama açısından önem taşımaktadır. Çeşit zenginliği ve üç farklı moleküler markör tekniğinin birlikte uygulandığı bu çalışma Türkiye'de ilk olarak zeytinde gerçekleştirilmiş diğer moleküler karakterizasyon çalışmalarından farklı bir yapıya sahiptir.

Materyal ve Metot

Materyal

Bu çalışma 2010-2012 yıllarında Zeytincilik Araştırma Enstitüsü moleküler genetik laboratuvarında yürütülmüştür. Zeytincilik Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Ulusal Zeytin Koleksiyon bahçesinde yer alan tescilli 89 çeşit ve bu çeşitlerin bazlarında belirlenmiş tipleri de içeren toplam 96 zeytin genotipi çalışmanın materyalini oluşturmaktadır.

Metot

Sürgün ucundaki genç yapraklardan alınan örnekler ependorf tüplere alınıp sıvı azot içerisinde laboratuvara getirilmiştir. DNA izolasyonu Doyle ve Doyle (1990) DNA izolasyon protokolü modifiye edilerek gerçekleştirılmıştır.

RAPD markör analizi

RAPD markör analizinde çalışan ve polimorfizm gösteren primerleri belirleyebilmek amacıyla 4 adet örnek üzerinde 10 bazlık 300 adet primer (Operon Technologies, USA) kullanılmıştır. Polimorfik ve skorlanabilir bant veren primerler belirlendikten sonra tüm polimorfizm gösteren primerler ile 1/400 DNA seyreltmesi ve 10 pM

primer konsantrasyonunda PCR yapılmış, %2'lik agaroz jel elektroforezinden sonra EtBr ile boyanmış ve jel görüntüleme sisteminde (G-box, SYNGENE) görüntülenmiştir.

AFLP markör analizi

AFLP analizi için 96 genotipe ait tüm DNA'lar 40 ng/ μ l olacak şekilde seyreltilmiştir. AFLP analizi için Li-Cor IRDye Fluorescent AFLP Kit (Katalog Numarası: 830-06197 AFLP 2-DYE Selective Amplification Kit) kullanılmıştır. Li-Cor IRDye Fluorescent AFLP Kit protokolü referans alınarak reaksiyona tabi tutulan DNA'lardan elde edilen amplikonlar, Li-Cor 4300s DNA Analyzer cihazı kullanılarak ayrımlanmıştır.

Çizelge 1. Zeytin genotipleri

No	Genotip adı	No	Genotip adı	No	Genotip adı
1	Trabzon yağlık	33	Büyük topak ulak	65	Hursuki
2	Samsun yağlık	34	Sarı ulak	66	Belluti
3	Görvele	35	Küçük topak ulak	67	Melkabaşı
4	Marantelli 1	36	Celebi	68	Mavi
5	Marantelli 2	37	Halhalı	69	Samsun tuzlamalık
6	Patos	38	Sarı habesi	70	Ayvalık
7	Samsun kırmızı tuzlamalık	39	Saurani	71	Hurma karaca
8	Butko	40	Sayfi	72	Hurma kara
9	Otur	41	Karamanı	73	Erkence
10	Sinop no 5	42	Elmacık	74	Çilli
11	Sinop no 2	43	Yağlık sarı zeytin	75	İzmir sofralık
12	Sati	44	Kilis yağlık	76	Çakır
13	Samsun ufak tuzlamalık	45	Maraş no 7	77	Memeli
14	Sinop no 4	46	Nizip yağlık	78	Dilmit
15	Siyah salamuralık	47	Kan celebi	79	Girit zeytini
16	Sinop no 6	48	Halhalı celebi	80	Tavşan yüreği
17	Sinop no 7	49	Hazma celebi	81	Ak zeytin
18	Sinop no 1	50	Yuvarlak halhalı	82	Çekişte
19	Samsun salamuralık	51	Kalembezi	83	Kara yaprak
20	Beyaz yağlık 1	52	Yağlık celebi	84	Yağ zeytini
21	Beyaz yağlık 2	53	Yün celebi	85	Yerli yağlık
22	Çizmelik	54	Eğriburun	86	Aşıyeli
23	Eşek zeytini	55	Tespih celebi	87	Taşarası
24	Erdek yağlık	56	Eğriburun	88	Taşarası
25	Edincik	57	Yuvarlak celebi	89	Memecik
26	Eşek zeytini	58	Hırhalı celebi	90	Domat
27	Gemlik	59	İri yuvarlak	91	Kiraz
28	Karamürsel su	60	Yağ celebi	92	Uslu
29	Şam	61	Zoncuk	93	0
30	Samanlı	62	Halhalı 1	94	A
31	Çelebi	63	Halhalı 2	95	B
32	Ağaç no 31	64	Halhalı 3	96	L

SSR markör analizi

SSR markör analizi için 96 genotipe ait DNA'lar, 20 ng/ μ l olacak şekilde seyreltimiştir. SSR analizi için Carriero ve ark., (2002), Muzzalupo ve ark., (2006), Sefc ve ark., (2000), Rekik ve ark., (2008), makaleleri referans alınarak çalışmada kullanılacak SSR primerleri belirlenmiştir. Belirlenen 27 adet SSR primerinden forward primerlere universal M13 primer baz dizisi (5'-CACGACGTGTAAAACGAC-3') 5'-3' yönünde ligaz enzimi kullanılarak eklenmiş ve böylelikle IRdye 700 ve 800 işaretli M13 kullanılarak, poliakrilamid jel elektrofezinde 700 nm ve 800 nm dalga boyunda görüntüleme yapılmıştır.

İstatistiksel analizler ve verilerin toplanması

Değerlendirme; RAPD, AFLP ve SSR markör teknikleri için ayrı ayrı elde edilen veriler ve üç tekniğin verilerinin birleştirilmesine dayanmaktadır. Buna göre, elde edilen polimorfik DNA bantları "1" (DNA bantı var) ve "0" (DNA bantı yok) olacak şekilde Microsoft Excel çizelgesine yazılmış ve veri matrisi oluşturulmuştur. JMP Paket programı (SAS, 1995) kullanılarak cluster (kümeleme) analizi sonucunda dendrogram elde edilmiştir. PHYLIP 3.67 (Felsenstein, 2007) paket programı kullanılarak gen frekansları ile çeşitli arasındaki genetik uzaklık hesaplanmıştır. Elde edilen matris Nei'nin (Nei, 1978) D_A genetik uzaklıguna göre popülasyonların birbirlerine olan genetik uzaklık değerlerini içermektedir. Çalışmada her bir primer için PIC (polymorphic information content) değerlerini hesaplamak amacıyla; $PIC = 1 - \sum (P_{ij})^2$ (Botstein ve ark., 1980) denklemi kullanılmıştır. Bu denklemde P_{ij} , her bir lokus için j 'inci populasyondaki i 'inci allelin frekansıdır. Hesaplama Microsoft Excel programı kullanılmıştır.

Bulgular

RAPD markör analizi sonuçları

RAPD markör analizi sonucunda polimorfizm gösteren 52 RAPD primerinden toplam 215 adet polimorfik bant elde edilmiştir. Her bir primerle

yapılan PCR sonucunda elde edilen polimorfik bant sayısı 1 ile 10 arasında değişmektedir. En fazla polimorfik bant (10 polimorfik bant) OPA12 ve OPC15 primerlerinde tesbit edilmiştir. En az polimorfik bant (1 polimorfik bant) veren primerler ise OPA03, OPA16, OPA20, OPB16, OPE01 ve OPE16 olarak belirlenmiştir. Primer başına düşen ortalama polimorfik bant sayısı 4'tür. RAPD markör analizinde en düşük genetik uzaklık değeri 0.05 olarak Sinop no:2 (11 nolu genotip) ve Samsun ufak tuzlamlık (13 nolu genotip) arasında belirlenmiştir. En yüksek genetik uzaklık değeri 0.84 ise Otur (9 nolu genotip) ve Yün çelebi (53 nolu genotip) arasında tesbit edilmiştir. Otur genotipi Artvin ili orijinli, Yün çelebi genotipi ise Gaziantep ili Nizip ilçesi orijinlidir.

AFLP markör analizi sonuçları

AFLP markör analizi 96 zeytin genotipinde 26 primer kombinasyonu uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonucunda 26 primer kombinasyonundan toplam 919 adet polimorfik bant elde edilmiştir. Primer kombinasyonu başına düşen polimorfik bant sayısı 9 ile 62 arasında değişmekte ve ortalama polimorfik bant sayısı 35 olarak hesaplanmıştır. En fazla polimorfik bant (62 polimorfik bant) MCTA-EACT primer kombinasyonundan elde edilirken, en az polimorfik bant (9 polimorfik bant) MCAA-EAGC primer kombinasyonundan elde edilmiştir. Verilerinin değerlendirilmesi sonucunda en düşük genetik uzaklık değeri 0.15 olarak 72 ve 84 nolu genotipler arasında görülmektedir. Bu genotipler; 72 nolu İzmir ili orijinli 'Hurma kara' ve 84 nolu Aydın ili Kuşadası orijinli 'Yağ zeytini' olarak belirlenmiştir. En yüksek genetik uzaklık 0.71 değeri ile 53 ve 68 nolu genotipler arasında tesbit edilmiş olup 53 numara Gaziantep-Nizip ilçesi orijinli 'Yün çelebi' ve 68 numara ise Mardin ili Derik ilçesi orijinli Mavi genotipini temsil etmektedir.

SSR markör analizi sonuçları

SSR markör analizinde 96 zeytin genotipine 27 SSR primeri uygulanmış, 14 tanesinde amplifikasyon gerçekleşmiştir. 14 adet SSR primerinden

toplamda 62 polimorfik bant tespit edilmiştir. Her bir primerle yapılan PCR sonucunda elde edilen polimorfik bant sayısı 2 ile 8 arasında değişim göstermiştir. En fazla polimorfik bant (8 polimorfik bant) GAPU89 ve GAPU103A primerlerinde, en az polimorfik bant (2 polimorfik bant) ise primer ise GAPU82 primerinden elde edilmiştir. Primer başına düşen ortalama polimorfik bant sayısı 4.4 olarak hesaplanmıştır.

Genotipler arasında en düşük genetik uzaklık değeri Samsun orijinli Samsun ufak tuzlamalık (13 nolu genotip) ile Tekirdağ orijinli Siyah salamuralık (15 nolu genotip); Hatay orijinli Karamanı (41 nolu genotip) ile Aydın orijinli Taşarası (87 nolu genotip) ve İzmir orijinli Hurma kara (72 nolu genotip) ile Bodrum/Muğla orijinli Dilmit (78 nolu genotip) genotipleri arasında 0.00 olarak belirlenmiştir. En yüksek genetik uzaklık değeri olan 0.87 ise Tekirdağ orijinli Beyaz yağlık 2 (21 nolu genotip) ile Sinop orijinli Sinop no 4 (14 nolu genotip); Tatayn/Şanlıurfa orijinli Eğriburun (56 nolu genotip) ile Sinop orijinli Sinop no 4 (14 nolu genotip) arasında belirlenmiştir.

RAPD, AFLP ve SSR markör teknikleri verilerinin birlikte değerlendirilmesi

Çalışmada yer alan RAPD, AFLP ve SSR markör tekniklerinden elde edilen sırasıyla 215, 919 ve 62 polimorfik bant aynı Excel matris dosyasında birlikte değerlendirilerek analiz yapılmıştır. Buna göre, toplam olarak 1196 polimorfik bantın yer aldığı veriler ile genetik uzaklık matrisi (Çizelge 2) ve kümeleme analizi ile dendrogram (Şekil 1) oluşturulmuştur.

Tartışma ve Sonuç

Bu çalışma ile ulusal zeytin arazi gen bankasındaki 96 genotipin moleküler düzeyde tanımlanması gerçekleştirılmıştır. Karakterizasyonda üç farklı moleküler markör teknigi birlikte uygulanarak, herhangi bir teknikte belirlenemeyen polimorfizmin diğer bir teknikte belirlenebilmesi sağlanmıştır. RAPD, AFLP ve SSR markör analizi

verileri kombine edilerek elde edilen genetik uzaklık matrisinde, en düşük genetik uzaklık değeri 0.14 Kuşadası orijinli genotipler olan Yağ zeytini (84 nolu genotip) ve Yerli yağlık (85 nolu genotip) genotipleri arasında, en yüksek genetik uzaklık değeri 0.70 ise Artvin orijinli Satı (12 nolu genotip) genotipi ile Nizip orijinli Yun çelebi (53 nolu genotip) genotipleri arasında belirlenmiştir.

Çalışmada yer alan RAPD, AFLP ve SSR markör sistemlerinden elde edilen genetik uzaklık matrisleri ve dendrogramlar incelendiğinde, grup oluşturan genotipler arasında bazı istisnalar ortaya çıkmakla beraber paralel durumun varlığı dikkat çekmektedir. RAPD analizinde Yağ zeytini ve Yerli yağlık genotipleri arasındaki genetik ilişki 0.10, AFLP analizinde 0.15 ve SSR analizinde ise 0.10 olarak belirlenmiştir. Uygulanan bütün tekniklerde, Memecik ve Taşarası-Kuşadası genotipleri arasında yakın bir benzerlik değerine ulaşılmış olup RAPD analizinde 0.05, AFLP analizinde 0.21 ve SSR analizinde 0.10 değerleri saptanmıştır. RAPD, AFLP ve SSR teknikleri birlikle değerlendirildiğinde de benzer şekilde bu genotipler arasında 0.18 genetik uzaklık değeri elde edilmiştir.

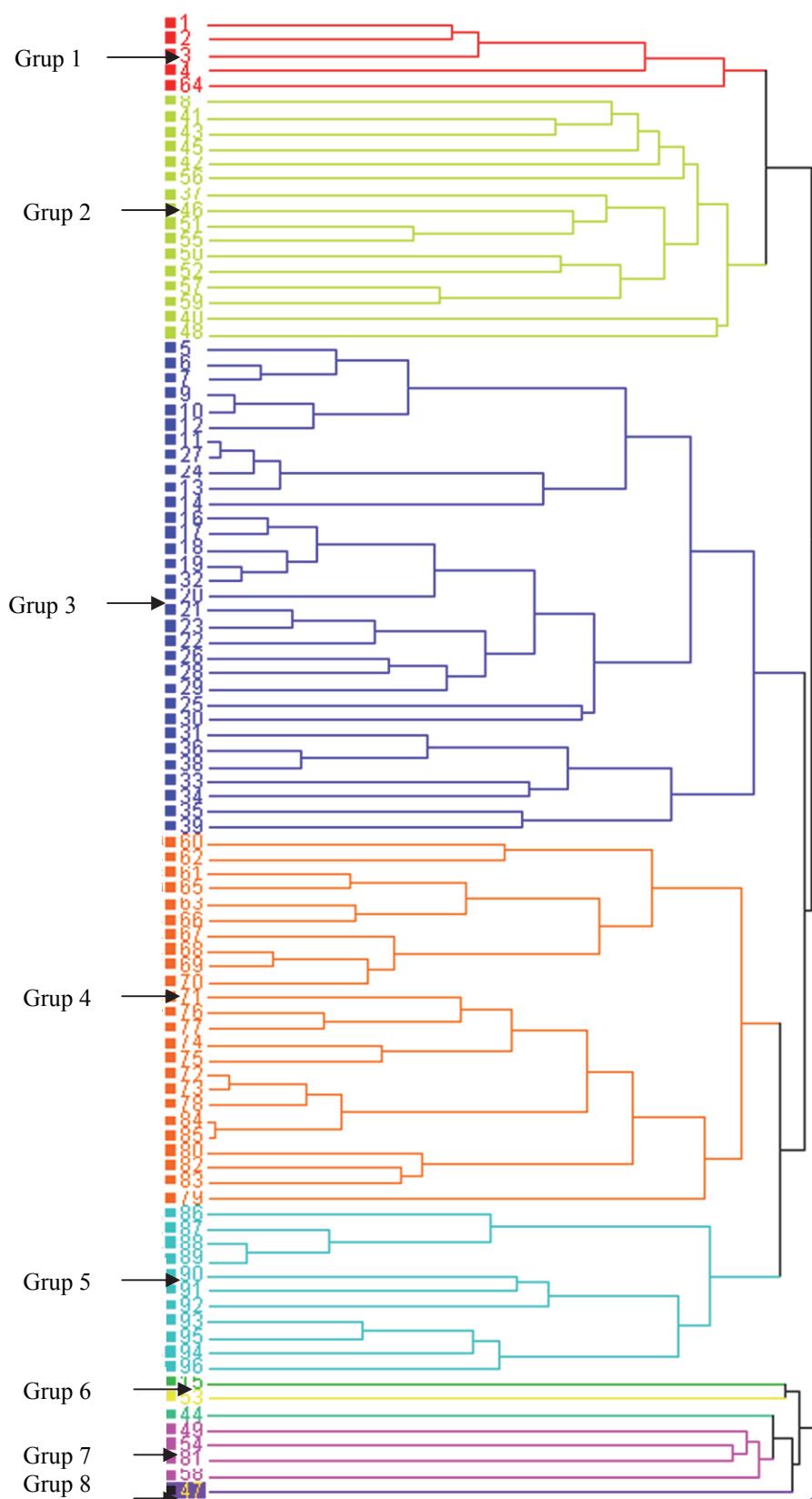
RAPD, AFLP ve SSR markör tekniğini karşılaştırmak amacıyla 32 zeytin çeşidine yapılan benzer bir çalışmada, ortalama genetik benzerlik değeri SSR markör teknigi için 0.36, RAPD markör teknigi için 0.56, AFLP teknigi için ise 0.68 olarak hesaplanmıştır. Yapılan değerlendirmeler doğrultusunda her 3 teknik zeytin çeşitlerinin karakterizasyonunu sağlamakla beraber SSR tekniginin diğerlerinden farklı olarak Frantoio ve Cellina çeşitlerinin de ayrimini gerçekleştirebildiğinden daha etkin olduğu vurgulanmaktadır (Belaj ve ark., 2003b) Bu durum SSR tekniginin ayrim gücünün daha yüksek olduğunu göstermektedir. Ulusal zeytin gen bankasında yer alan 96 zeytin genotipinde yürütülen bu çalışmadan elde edilen bulgular Belaj ve ark. (2003b) tarafından gerçekleştirilen çalışma ile benzerlik göstermeye olup, SSR tekniginin AFLP ve RAPD teknigine göre genotipleri ayırmama özelliği daha fazla bulunmuştur.

Çizelge 2. RAPD, AFLP ve SSS verileri ile oluşturulan veri matrisi.

	1	0.00	2	0.28	0.00	3	0.28	0.26	0.00	4	0.29	0.33	0.27	0.00	5	0.28	0.31	0.26	0.27	0.00	6	0.30	0.33	0.29	0.19	0.00	7	0.29	0.35	0.32	0.28	0.18	0.00	8	0.36	0.36	0.36	0.32	0.30	0.31	0.29	0.00	9	0.28	0.34	0.29	0.21	0.21	0.21	0.32	0.00	10	0.29	0.33	0.28	0.28	0.24	0.22	0.23	0.31	0.18	0.00	11	0.29	0.35	0.29	0.30	0.21	0.23	0.23	0.32	0.18	0.21	0.00	12	0.32	0.35	0.33	0.32	0.25	0.21	0.23	0.34	0.17	0.24	0.19	0.00	13	0.32	0.35	0.30	0.28	0.26	0.26	0.26	0.31	0.25	0.24	0.24	0.24	0.24	0.24	0.24	0.25	0.25	0.25	0.00	14	0.35	0.34	0.31	0.34	0.30	0.28	0.29	0.33	0.28	0.28	0.26	0.24	0.24	0.24	0.24	0.25	0.25	0.25	0.00	15	0.48	0.41	0.46	0.51	0.49	0.52	0.52	0.46	0.48	0.48	0.47	0.49	0.44	0.41	0.00	16	0.31	0.33	0.28	0.31	0.26	0.26	0.27	0.34	0.22	0.25	0.23	0.23	0.23	0.23	0.28	0.44	0.00	17	0.30	0.34	0.29	0.30	0.25	0.24	0.26	0.30	0.23	0.24	0.24	0.25	0.42	0.19	0.00	18	0.32	0.35	0.30	0.28	0.28	0.26	0.26	0.31	0.25	0.27	0.25	0.24	0.24	0.24	0.29	0.47	0.23	0.22	0.00	19	0.30	0.33	0.28	0.30	0.27	0.23	0.24	0.35	0.22	0.25	0.22	0.21	0.21	0.29	0.49	0.21	0.19	0.20	0.00	20	0.33	0.38	0.32	0.30	0.29	0.29	0.29	0.37	0.31	0.36	0.36	0.36	0.36	0.36	0.30	0.49	0.24	0.24	0.21	0.00	21	0.33	0.35	0.33	0.34	0.29	0.30	0.28	0.38	0.24	0.29	0.27	0.26	0.26	0.26	0.33	0.48	0.28	0.26	0.23	0.00	22	0.33	0.35	0.31	0.31	0.28	0.28	0.27	0.33	0.26	0.28	0.27	0.26	0.26	0.26	0.30	0.44	0.20	0.20	0.00	23	0.31	0.35	0.33	0.31	0.38	0.25	0.26	0.33	0.25	0.28	0.26	0.25	0.25	0.25	0.30	0.49	0.25	0.24	0.23	0.00	24	0.30	0.34	0.30	0.30	0.27	0.27	0.27	0.34	0.25	0.27	0.25	0.25	0.25	0.26	0.30	0.49	0.28	0.27	0.00	25	0.32	0.36	0.36	0.32	0.29	0.30	0.33	0.37	0.31	0.31	0.29	0.29	0.29	0.29	0.30	0.30	0.29	0.29	0.29	0.00	26	0.35	0.36	0.35	0.35	0.28	0.28	0.28	0.35	0.29	0.30	0.29	0.29	0.29	0.29	0.30	0.30	0.29	0.29	0.29	0.00	27	0.29	0.35	0.29	0.32	0.24	0.25	0.26	0.33	0.22	0.26	0.23	0.23	0.23	0.23	0.28	0.46	0.22	0.22	0.22	0.00	28	0.32	0.34	0.31	0.31	0.27	0.27	0.27	0.34	0.25	0.27	0.27	0.27	0.27	0.27	0.31	0.29	0.29	0.29	0.00	29	0.35	0.36	0.33	0.35	0.34	0.31	0.31	0.35	0.29	0.31	0.28	0.28	0.28	0.28	0.32	0.30	0.28	0.28	0.28	0.00	30	0.37	0.38	0.35	0.37	0.33	0.31	0.31	0.37	0.28	0.31	0.28	0.31	0.28	0.31	0.34	0.30	0.28	0.28	0.28	0.00	31	0.33	0.36	0.36	0.36	0.33	0.32	0.32	0.36	0.33	0.33	0.32	0.32	0.32	0.32	0.36	0.33	0.31	0.31	0.32	0.00	32	0.30	0.34	0.32	0.32	0.30	0.32	0.32	0.36	0.30	0.32	0.30	0.32	0.30	0.32	0.36	0.35	0.33	0.33	0.35	0.00	33	0.35	0.38	0.33	0.33	0.30	0.30	0.30	0.37	0.33	0.33	0.32	0.32	0.32	0.32	0.37	0.36	0.34	0.34	0.35	0.00	34	0.38	0.40	0.37	0.38	0.33	0.33	0.33	0.37	0.34	0.34	0.34	0.34	0.34	0.34	0.38	0.37	0.36	0.36	0.37	0.00	35	0.39	0.41	0.38	0.39	0.34	0.34	0.34	0.38	0.35	0.35	0.34	0.34	0.34	0.34	0.38	0.37	0.37	0.37	0.37	0.00	36	0.37	0.39	0.35	0.36	0.32	0.32	0.32	0.37	0.33	0.33	0.32	0.32	0.32
--	---	------	---	------	------	---	------	------	------	---	------	------	------	------	---	------	------	------	------	------	---	------	------	------	------	------	---	------	------	------	------	------	------	---	------	------	------	------	------	------	------	------	---	------	------	------	------	------	------	------	------	----	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	----	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	----	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	----	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	----	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	----	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	----	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	----	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	----	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	----	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	----	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	----	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	----	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	----	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	----	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	----	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	----	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	----	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	----	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	----	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	----	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	----	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	----	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	----	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	----	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	----	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	----	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------

Cizelge 2. RAPD, AFLP ve SSR verileri ile oluşturulan veri matrisi. (Devamı

Çizelge 2. RAPD, AFLP ve SSR verileri ile oluşturulan veri matrisi. (Devamı



Şekil 1. RAPD, AFLP ve SSR markör analizi verileri kullanılarak yapılan cluster analizi sonucunda elde edilen dendrogram.

Zeytin genetik kaynaklarında yer alan genotiplerin RAPD, AFLP ve SSR markör tekniklerinden elde edilen verilerin ayrı ayrı ve kombine edilerek değerlendirilmesi sonucu elde edilen düşük genetik uzaklık değeri belirlenen genotipler morfolojik özellikler bakımından da benzer özellikler göstermektedir. Örneğin Erdek yağlık, Gemlik ve Sinop no:2 genotipleri; Memecik, Taşarası-Aydın, Taşarası-Kuşadası ve Aşıyeli genotipleri; Yağ zeytini, Yerli yağlık, Dilmit, Erkence, Hurma kara genotipleri morfolojik karakterler bakımından büyük ölçüde benzerlikler göstermektedir. Uygulanan üç teknikten yalnızca SSR markör analizi sonucunda en yakın genetik uzaklık değeri bazı genotipler arasında 0.00 olarak belirlenmesine rağmen söz konusu genotiplerin üç yöntemin birlikte değerlendirilmesinde sinonim oldukları sonucuna ulaşlamamıştır. Çeşitler arasında sadece 1 veya 2 allel bakımından farklılık olması durumunda, çeşitlerin sinonim olarak kabul edilebilmesinin mümkün olabileceği belirtilmiştir (Muzzalupo ve ark., 2009); La Mantia ve ark., 2005). Buna göre çalışmada Kuşadası orijinli Yerli yağlık ve Kuşadası orijinli Yağ zeytini genotipleri 2 allelden daha fazla allel bakımından birbirlerinden farklılık göstermesi nedeniyle bu iki genotipin % 100 sinonim olduklarıını ifade etmek doğru olmayacaktır. Ancak DNA markör analizleri sonucunda genetik olarak birbirlerine çok yakın olması sinonim olduklarıunu düşündürmektedir. Grati Kamoun ve ark (2006), Rekik ve ark., (2008)'nın çalışmalarında kullandığı Tunus çeşitleriyle AFLP markör

analizi yapmışlar ve en düşük genetik uzaklık değerini (0.26), yine aynı genotipler (Chemlali Sfax ve Zalmati) arasında belirlemişlerdir. Muzałupo ve ark., (2009), 211 zeytin çeşidinde yaptıkları SSR markör analizi sonucunda 75 allel elde etmişler ve en yüksek genetik benzerlik değerini 0.94'den büyük bulmuşlardır. Genetik benzerlik değeri 0.94'den büyük olan çeşitleri sinonim olarak kabul etmişlerdir. Sinonim olarak kabul ettikleri çeşitler yalnızca bir allel bakımından birbirinden farklılık göstermektedir.

Üç farklı moleküler tekniğin uygulandığı bu çalışmada genotiplere özgü markörler belirlenmemiştir. Ancak; SSR markör tekniğinin diğerlerine göre genotipleri tanımlamada daha güvenilir sonuçlar verdiği belirlenmiştir. PIC değerleri hesaplandığında en yüksek PIC değeri 0.89 GAPU90 SSR primerinden elde edilirken, en düşük PIC değeri 0.10 ise C5 RAPD primerinden elde edilmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda zeytin genotiplerinin karakterizasyonunda GAPU90, GAPU108, GAPU71A ve GAPU103A SSR primerinin kullanılmasının avantaj sağlayabileceği belirlenmiştir.

TEŞEKKÜR

Çalışma, TÜBİTAK tarafından desteklenen 108G016 nolu projenin bir bölümü olarak yürütülmüş olup bütçe desteği nedeniyle TÜBİTAK'a teşekkürlerimi sunarım.

Kaynaklar

- Bartolini, G., Prevost, G., Messeri, C., Carignani, G., Menini, UG., 1998, Olive germplasm. Cultivars and World-Wide collections. FAO, Rome, Italy.
- Belaj A., Satovic Z., Ismaeli H., Panajoti D., Rallo L. and Trujillo I. 2003a, RAPD genetic diversity of Albanian olive germplasm and its relationships with other Mediterranean countries. Euphytica 130: 387-395.
- Belaj A., Satovic Z., Cipriani G., Baldoni L., Testolin R., Rallo L., Trujillo I. 2003b, Comparative study of the discriminating capacity of RAPD, AFLP and SSR markers and of their effectiveness in establishing genetic relationships in olive, Theor Appl Genet 107:736-744.
- Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M., Davis, R.W., 1980, Construction of a genetic map in man using restriction fragment length polymorphisms. Am J Hum Gen. 32:314-331.
- Cantini, C., Cimato, A., Sani, G., 1999, Morphological evaluation of olive germplasm present in Tuscany region. Euphytica, 109: 173-181.
- Carriero, F., Fontanazza, G., Cellini, F. and Giorio G., 2002, Identification of simple sequence repeats(SSRs) in olive (*Olea europaea* L.).Theor. Appl. Genet. 104: 301-307.

- Cordeiro, A.I.; Sanchez-Sevilla, J.F.; Alvarez-Tinaut, M.C. & Gomez-Jimenez, M.C., 2008, Genetic diversity assessment in Portugal accessions of *Olea europaea* by RAPD markers. *Biologia Plantarum*, 52, (4), 642-647.
- Doyle, J.J., Doyle, J.L., 1990, Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12.
- Felsenstein J., 2007, PHYLP (Phylogeny Inference Package) Version 3.67. Distributed by the author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle. <http://evolution.gs.washington.edu/phylip.html>.
- Grati-Kamoun, N., Mahmoud, F., Rebai, A. and Gargouri, A., 2006, Genetic diversity of Tunisian olive tree (*Olea europaea* L.) cultivars assessed by AFLP markers. *Genet. Resour. Crop Evol.* 53: 265-275.
- Gülşen, O. ve Mutlu, N., 2005, Bitki biliminde kullanılan genetik markırlar ve kullanım alanları. *Alatarım* 4(2):27-37.
- La Mantia, M., Lain, O., Caruso, T., Testolin, R., 2005, SSR based DNA fingerprints reveal the genetic diversity of Sicilian olive (*Olea europaea* L.) germplasm. *J. Hort. Sci. Biol.* 80:628-632.
- Muzzalupo, I., Lombardo, N., Musacchio, A., Noce, M.E., Pellegrino, G., Perri, E. and Sajjad, A., 2006, DNA sequence analysis of microsatellite markers enhances their efficiency for germplasm management in an Italian olive collection, *J Am Soc Hortic Sci* 131(3):352-359.
- Muzzalupo, I., Stefanizzi, F., Perri, E., 2009, Evaluation of olives cultivated in southern Italy by simple sequence repeat markers, *HortScience* 44(3):582-588.
- Nei, M., 1978, Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89, 583-590.
- Öztürk, F., 2006, Türkiye'de ve Dünya'da zeytincilik sektörünün genel görünümü. TAYEK, Ege tarımsal araştırma enstitüsü Müdürlüğü, yayın no: 125, 45-62.
- Rallo, L., Barranco, D. and Escobar, F., 1997, El cultivo del olivo. Ediciones mundi prensa. pp. 701.
- Rekik, I., Salimonti, A., Grati-Kamoun, N., Muzzalupo, I., Perri, E., Rebai, A., 2008, Characterisation and identification of Tunisian olive tree varieties by microsatellite markers. *HortScience* 43:1371-1376.
- Remesal-Rodríguez, J., 1996, Economía oleícola: En la antigüedad, p. 47-58. In: consejo oleicola internacional (Ed.), 'Enciclopedia mundial del olivo, plaza & Janes Editores S.A., Barcelona, Spain.
- SAS, 1995, SAS/STAT user's guide. Version 6.12. SAS Institute, Cary, North Carolina.
- Sefc KM, Lopes MS, Mendonca D, Dos Santos MR., 2000, Identification of microsatellite loci in olive (*Olea europaea*) and their characterization in Italian and Iberian olive trees. *Mol. Ecol.* 9: 1171-1173.
- Shahriari, M., Omrani, A., Falahati-Anbaran, A., Ghareyazei, B. & Nankali, A., 2008, Identification of Iranian olive cultivars by using RAPD and microsatellite markers. *Acta Hort.* 791:109-115.
- Vergari G., Patumi M., Fontanazza G., 1996, Use of RAPDs markers in the characterisation of olive germplasm. *Olivae*, 60: 19-22.
- Yıldırım, A., Kandemir, N., 2001, Bitki biyoteknolojisi-II genetik mühendisliği ve uygulamaları, genetik markörler ve analiz metodları. Selçuk Üniversitesi Basımevi s:334- 363.
- Zamora, R., Alaiz, M., Hidalgo, F. J., 2001, Influence of cultivar and fruit ripening on olive (*Olea europaea*) fruit protein content, composition, and antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* 49 (9), 4267-4270.
- Zohary, D., Spiegel-Roy, P., 1975, Beginning of fruit growing in the old world. *Science*, 187: 319-327.
- Zohary, D., Hopf, M., 1993, Domestication of plants in the old world. Oxford clarendon press, 137-143.

İLETİŞİM

Dr. Öznur ÇETİN
 Zeytincilik Araştırma Enstitüsü
 Üniversite Cad. No:43
 Bornova/İZMİR
 e-mail: oznur.cetin@tarim.gov.tr

