

Bazı Birbirine Benzer Elma (*Malus domestica* L.) Genotiplerinde Pomolojik ve Moleküler Yöntemlerle Genetik Akralalık Derecelerinin Tespiti

Selda DALER*¹, Mehmet Atilla AŞKIN², Yaşar KARAKURT³

¹Bozok Üniversitesi, Tarım ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, 66900, Yozgat

²Süleyman Demirel Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, 32200, Isparta

³Süleyman Demirel Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, 32200, Isparta

(Alınış / Received: 01.04.2016, Kabul / Accepted: 14.11.2016, Online Yayınlanma / Published Online: 13.12.2016)

Anahtar Kelimeler

Elma (*Malus domestica* L.),
Pomolojik özellikler,
Moleküler teknikler,
RAPD,
Genetik akrabalık tespiti

Özet: Bu çalışmada ülkemizde yetiştiriciliği yapılan 6 elma çeşidinde rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA (randomly amplified polymorphic DNA, RAPD) tekniği kullanılarak akrabalık ilişkileri belirlenmiştir. Yapılan moleküler analiz sonucunda 10 adet RAPD primeri, 47 adet polimorfik bant üretmiştir. En fazla sayıda polimorfik bant (9 adet), S 101 ve S 443 primerlerinden elde edilirken, en az sayıda polimorfik bant (2 adet) S 35, S 128 ve S 165 primerlerinden elde edilmiştir. Primer başına düşen ortalama polimorfik bant sayısı 4,7 adet olmuştur. Tüm çeşitler arasında, en yüksek benzerlik indeksi Mutsu ve Gelendost arasında (0,878) görülürken, en düşük oran Starkrimson ile Gelendost çeşidi arasında (0,573) tespit edilmiştir. Dendrogram, bütün çeşitlerin tek ana grupta toplandığını, Starkrimson çeşidinin diğer çeşitlere göre çok farklı bir dallanma gösterdiğini ve toplamda 3 alt grubun bulunduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca UPOV kriterlerine göre meyve ağırlığı, meyve eni, meyve boyu, meyve şekil indeksi, meyve eti sertliği, meyve kabuk rengi, meyve suyu pH'ı, SÇKM (suda çözünebilir kuru madde), meyve sapı uzunluğu, meyve sapı kalınlığı, sap çukuru eni, sap çukuru derinliği, çiçek çukuru eni, çiçek çukuru derinliği, çekirdek evi boyu, çekirdek evi eni, çekirdek boyu, çekirdek eni ve çekirdek kalınlığı gibi pomolojik analizler de yapılmış olup bu analizlerin sonucunda çeşitler arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemli bulunmuştur.

Detection of Genetic Relativity in Some Similar Apple (*Malus domestica* L.) Varieties Using Pomological and Molecular Techniques

Keywords

Apple,
(*Malus domestica* L.),
Pomological properties,
Molecular techniques,
RAPD,
Determination
Genetic relationships

Abstract: In this study, genetic relationships among six apple varieties cultivated in our country were determined using RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) molecular markers technique. 10 RAPD primers produced 47 polymorphic bands. The number of polymorphic bands (9) were obtained from primers S 101 and S 443 while the least number of polymorphic bands (2) were obtained from primers S 35, S 128 and S 165. The average number of polymorphic bands per primer was 4,7. Among varieties, the highest similarity index was determined between Mutsu and Gelendost (0,878) but the lowest similarity index was identified between Starkrimson and Gelendost (0,573). The clustering analysis showed two main groups. While Starkrimson formed a main group, all of the the other varieties were clustered in the secon main group. The second main group were divided into three subgroups. While Golden Delicious variety were clustered into one subgroup, Mutsu and Gelendost formed the second subgroup. The third subgroup contained Anglyska Zelena and Dlatro Prevuzhodna varieties. Moreover, we have also compared the varieties pomologically based on the UPOV criteria. The results showed significant differences among varieties in terms of fruit weight, fruit width, fruit length, fruit shape index, fruit firmness, fruit peel color, fruit juice, pH, total soluble solids, pedicel length, pedicel thickness, pedicel bowl width, pedicel bowl depth, flower bowl width, flower bowl depth, seed bowl depth, seed bowl width, core lenght, core width and core thickness.

1. Giriş

Elma, tüm dünyada yaygın olarak yetiştirilen ve çokça tüketilen bir meyvedir. Dünyanın farklı bölgelerine yayılmış olan çok sayıda elma türü ve binlerce elma çeşidi mevcuttur. Anadolu'nun sahip olduğu coğrafik ve ekolojik durumu, dünya üzerinde çok az ülkede var olan büyük bir meyve yetiştirme potansiyeli oluşturmaktadır. Bu sebeple Türkiye, tropik ve bazı subtropik meyveler dışında tüm ılıman iklim meyveleri ile bazı subtropik meyveleri büyük miktarlarda ve en yüksek kalitede yetiştirebilecek durumdadır. Türkiye bu kadar büyük potansiyele sahip olmasına karşın bugünkü durumda, ne yazık ki, bu potansiyeli gereği gibi kullanamamaktadır.

Modern meyvecilikte birim alandan daha çok ve yüksek kalitede ürün elde etmek esastır. Elma yetiştiriciliğinde ülkemizde dekara ortalama 1800 kg ürün alınırken; gelişmiş ülkelerde dekara ortalama 3000-3500 kg ürün alınmaktadır. Bunun nedeni gelişmiş ülkelerde klasik meyvecilik yerine modern meyveciliğin yapıyor olmasıdır [1].

Ülkemizde elma yetiştiriciliğinin önemli sorunlarından birisi de ismine doğru aşılı elma fidanları ile kapama bahçelerinin kurulmasında karşılaşılan hatalardır. Aşı ve klonal çoğaltılan kültür çeşitlerimizin her bakımdan tamamıyla aynı kalıtsal yapıda olmaları beklense de, sonradan bu çeşitler içerisinde ortaya çıkan mutasyonlar ve kısmen de çekirdekten yetişen çöğürler arasında, bazı standart çeşitlere çok benzeyenlerin karışması gibi nedenlerle, bugün elimizde bulunan birçok kültür çeşidi artık temiz ve bir örnek yapıda çeşit olmaktan çıkarak, karışık bir tip karakterini almış bulunmaktadır [2]. Çeşitlerin ismine doğru olarak kısa bir süre içinde tanımlanması meyvecilikte çok önemlidir. Ancak genetik çeşitliliği karakterize etmek için kullanılan morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal yöntemler oldukça zaman almakta ve çevresel faktörlerden etkilenmektedir [3].

Günümüzde, verim artışı sağlamak için klasik bitki ıslahı programlarını tamamlayan ve destekleyen yeni biyoteknolojik yöntemlerin kullanılması alternatif olarak ortaya çıkmıştır [4]. Gen kaynaklarının korunmasında ve ıslah çalışmalarında ilk basamak olan genetik çeşitliliğin belirlenmesinde genetik markörler önemli bir araçtır [5]. DNA markör yöntemlerinden, tek bir kısa ve rastgele oligonükleotid primer kullanılarak, bilinmeyen DNA dizilerinin amplifikasyonu prensibine dayalı olan RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) tekniği, farklı seviyelerdeki DNA farklılıklarını tespit ederek tür içinde ve arasında varyasyonların belirlenmesinde son yıllarda kullanılan ekonomik ve hızlı bir teknik olmuştur [6, 7, 8].

Bu çalışma ile meyve kabuk rengi ve fiziksel özellikleri bakımından birbirine çok yakın benzerlik

gösteren ve bazı elma üretim bölgelerimizde aynı isim ile de anılmakta olup, çeşit karışıklığına sebebiyet veren kırmızı ve yeşil kabuk rengine sahip 3'er adet elma çeşidinin kendi grupları içerisinde UPOV kriterlerine göre pomolojik analizlerinin yapılması ve moleküler yöntemlerle genetik yapılarının belirlenerek akrabalık ilişkilerinin moleküler düzeyde saptanması amaçlanmıştır. İncelenen elma çeşitleri arasındaki akrabalık ilişkileri, uygulama kolaylığı ve diğer metotlar içerisinde ekonomik oluşu sebebiyle RAPD moleküler tekniği kullanılarak araştırılmıştır.

2. Materyal ve Metot

Bazı elma (*Malus domestica* L.) çeşitlerinde genetik akrabalık derecelerinin tespit edilmesi amacıyla yapılan bu çalışma, 2014-2015 yılları arasında Süleyman Demirel Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü Pomoloji Laboratuvarı ile Biyoteknoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Laboratuvarı'nda yürütülmüştür.

2.1. Bitki materyali

Bitkisel materyal olarak Eğirdir Meyvecilik Araştırma İstasyon Müdürlüğü Elma Koleksiyonu'ndan temin edilen Starkrimson (kırmızı renkli, çok iri meyveli, hasat tarihi: 15-30 Eylül), Dlatro Prevuzhodna (kırmızı renkli, çok iri meyveli, hasat tarihi: 15-30 Eylül), Anglyska Zelena (kırmızı renkli, iri meyveli, hasat tarihi: 15-30 Eylül), Golden Delicious (yeşil renkli, iri meyveli, hasat tarihi: 10-20 Eylül), Gelendost (yeşil renkli, çok iri meyveli, hasat tarihi: 10-20 Eylül) ve Mutsu (yeşil renkli, çok iri meyveli, hasat tarihi: 10-20 Eylül) olmak üzere 6 farklı elma çeşidi kullanılmıştır. Pomolojik özelliklerinin belirlenmesinde her bir özellik için, aynı çeşidi temsil eden her 5 ağaçtan alınan 30'ar adet tam olgunlaşmış meyve kullanılmıştır.

2.2. Pomolojik özellikler

Meyve ağırlığı değerleri 0,001 g hassasiyetindeki terazi (AXIS AGN200C) yardımı ile ölçülürken; meyve uzunluğu, meyve çapı, meyve sap uzunluğu, meyve sap kalınlığı, sap çukuru eni, sap çukuru derinliği, çiçek çukuru eni, çiçek çukuru derinliği, çekirdek evi eni, çekirdek evi derinliği, çekirdek uzunluğu, çekirdek kalınlığı ve çekirdek genişliğine ait değerler kumpas (Astor 300) yardımı ile mm cinsinden ölçülmüştür. Meyve şekil indeksi, ortalama meyve uzunluğunun (mm) ortalama meyve çapına (mm) oranı tespit edilerek kaydedilmiştir. Meyve eti sertliği, dijital el penetrometresi (PCE-PTR 200) kullanılarak ölçülmüştür. Meyve kabuk rengi, 30 adet meyvede renk ölçer (KonicaMinolta, CR-400) ile ölçülmüş ve meyve kabuk rengine ait veriler L*, a* ve b* cinsinden kaydedilmiştir. Asitlik derecesi (pH), meyvelerin suyu çıkarılarak pH metre (Mettler ToledoPh/Ion S220) yardımı ile belirlenirken; suda

çözünebilir kuru madde miktarı (SÇKM) refraktometre (HANNA, HI 96801) yardımı ile % Brix cinsinden kaydedilmiştir. Elde edilen verilere ait istatistiksel analizler SSPS 20 programı ile analiz edilmiştir.

2.3. Moleküler analizler

Her bir çeşidin DNA yapısındaki farklılıklar, RAPD tekniği kullanılarak belirlenmiştir. Bitki genomik DNA izolasyonu amacıyla bitkisel materyal olarak yaprak kullanılmış olup, bazı modifikasyonlar yapılarak Doyle ve Doyle, (1990) prosedürü uygulanmıştır. DNA konsantrasyonunun belirlenmesi amacıyla Spektrofotometrik analizler yapılmış ve dilüsyonun 260 ve 280 nm' deki değerleri ölçülmüştür. DNA kalitesinin belirlenmesi için %1'lik agaroz jeli kullanılmış, jel üzerine yüklenen örnekler 75 voltta, 60 dk süresince elektroforez cihazında (BioRad, Wide Mini Subcell GT) yürütülmüş ve sonrasında Jel görüntüleme cihazında (Kodak Gel Logic 200 Imaging System, Digital CCD Camera) fotoğrafları çekilmiştir. PCR reaksiyonuna kullanılan RAPD primerleri daha önceki çalışmalarda kullanılan ve yüksek oranda polimorfizm gösteren primerler arasından seçilmiş olup, primer sekansları Tablo 1'de sunulmuştur.

Tablo 1. RAPD-PCR analizlerinde kullanılan primerlerin adı ve sekansları

Primer Adı	Primer Sekansı (5'→3')
S 32	TCGGCGATAG
S 35	TTCCGAACCC
S 101	GGTCGGAGAA
S 125	CCGAATTCCC
S 126	GGGAATTCCGG
S 128	GGGATATCGG
S 139	CCTCTAGACC
S 165	TGTTCCACGG
S 188	TTCAGGGTGG
S 443	CTGTTGCTAC

DNA'lar, 1,25 µl 10x Buffer, 2 µl 25 mM MgCl₂, 1,25 µl 2 mM dNTP, 0,5 µl 10µM Primer, 0,125 µl 5U taq DNA polimeraz, 50 ng DNA ve ddH₂O içeren 12,5 µl toplam hacimli karışım içerisinde çoğaltılmıştır. PCR programı 94°C'de 3 dk ilk DNA denatürasyonunun ardından toplam 40 döngü olacak şekilde 94°C'de 30 sn denatürasyon, 38°C'de 1 dk bağlanma ve 72°C'de 2 dk polimerizasyondan sonra 72°C'de 10 dk son uzama evresi olacak şekilde düzenlenmiştir [9].

PCR işleminden sonra örnekler %2'lik agaroz jel elektroforezinde 75 Voltta 90-120 dakika süre ile yürütülmüş ve oluşan bantlara göre primerlerin çalışıp çalışmadıkları belirlenmiştir. Jelin ilk ve son kuyucuğuna elektroforez işlemi sonucunda oluşacak bantların doğru şekilde yorumlanmasını sağlayacak olan DNA markörü (ladder, 0,1-3 kb) yüklenmiştir. Elektroforez tankından çıkarılan jel, görüntüleme

cihazında UV ışık altında incelenerek fotoğrafı çekilmiştir.

RAPD-PCR analizlerinin tekrarlına bilirliğini araştırmak amacıyla diğer tüm koşullar sabit tutularak bazı genotiplerde, birbirinden bağımsız PCR işlemleri yapılmış ve PCR sonucunda oluşan bantların tekrarlına bilirlik durumları değerlendirilmiştir. Birbirinden bağımsız 5 ayrı PCR denemesi sonucunda Tablo 1'de sekansları verilen RAPD primerlerinin analiz edilen genotip üzerinde aynı bantları oluşturdukları tespit edilerek moleküler çalışma bakımından güvenilirlikleri onaylanmıştır.

Çalışmada kullanılan RAPD primerlerinin polimorfizm oranı, primerlerden elde edilen polimorfik bant sayılarının, toplam bant sayısına bölünüp 100 ile çarpılması sonucu elde edilmiştir. Benzerlik indeksleri ve dendrogramlarının oluşturulması amacıyla çeşitlerin oluşturduğu parmak izleri, bant varlığı 1 veya yokluğu 0 şeklinde kaydedilmiştir [10].

Çeşitler arasındaki genetik uzaklıklar, Jaccard benzerlik indeksi katsayısı yardımıyla tespit edilmiştir. Çok boyutlu derecelendirme ve dendrogramlar, UPGMA (Ağırlıklı Olmayan Aritmetik Ortalama Eş Grup Metodu) ve NTSYS hazır paket programları ile oluşturulmuştur [11].

3. Bulgular

Starkrimson (Şekil 1), Anglyska Zelena (Şekil 2), Dlatro Prervuzhodna (Şekil 3), Golden Delicious (Şekil 4), Gelendost (Şekil 5) ve Mutsu (Şekil 6) çeşitlerine ait meyve görünümü aşağıdaki gibidir.



Şekil 1. Starkrimson çeşidinin meyve görünümü



Şekil 2. Anglyska Zelena çeşidinin meyve görünümü



Şekil 3. Dlatro Prervuzhodna çeşidinin meyve görünümü



Şekil 4. Golden delicious çeşidinin meyve görünümü



Şekil 5. Gelendost çeşidinin meyve görünümü



Şekil 6. Mutsu çeşidinin meyve görünümü

Elma çeşitlerine ait meyve özellikleri ve istatistik değerlendirmeleri aşağıda listelenmiştir (Tablo 2, 3, 4, 5, 6, 7 ve 8).

Tablo 2. Elma çeşitlerinde meyve ağırlığı, meyve eni ve meyve boyu değerleri

Çeşit	Meyve Ağırlığı (g)	Meyve Eni (mm)	Meyve Boyu (mm)
Gelendost	190,64 b	74,68 b	67,64 b
Mutsu	260,33 a	84,67 a	72,72 a
Golden D.	138,49 d	68,16 c	60,41 c
Dlatro P.	200,11 ab	77,52 b	69,07 b
Starkrimson	231,77 ab	83,80 a	68,62 b
Anglyska Z.	162,86 bc	71,16 bc	62,42 c

*Aynı sütunda farklı harfi alan ortalamalar arasındaki farklılık önemlidir ($P \leq 0.05$)

Meyve ağırlığı 138,49-260,33 g arasında değişirken, meyve eni 68,16-84,67 mm ve meyve boyu ise 60,41-72,72 mm arasında kaydedilmiştir (Tablo 2).

Tablo 3. Elma çeşitlerinde meyve kabuk rengi değerleri

Çeşit	Meyve Kabuk Rengi		
	L	a	b
Gelendost	76,55 a	-5,97 b	31,88 b
Mutsu	68,32 b	-12,38 c	37,82 a
Golden D.	73,90 ab	-8,62 b	34,48 a
Dlatro P.	39,21 c	36,25 a	10,90 c
Starkrimson	33,07 d	30,64 a	6,26 c
Anglyska Z.	38,00 c	33,87 a	9,47 c

*Aynı sütunda farklı harfi alan ortalamalar arasındaki farklılık önemlidir ($P \leq 0.05$)

Meyve kabuğu rengi L^* değeri 33,07 ile 76,55; a^* değeri -12,38 ile 36,25 ve b^* değeri 6,26 ile 37,82 arasında bulunmuştur. Meyve kabuk rengi değerleri bakımından çeşit arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemli bulunmuştur.

Tablo 4. Elma çeşitlerinde meyve şekil indeksi, meyve eti sertliği, pH ve ŞÇKM değerleri

Çeşit	Meyve Şekil İndeksi	Meyve Eti Sertliği (lb)	pH	ŞÇKM Brix (%)
Gelendost	0,90 a	16,01 a	3,53 b	16,53 a
Mutsu	0,85 b	16,63 a	3,58 b	15,11 b
Golden D.	0,88 ab	15,81 b	3,96 ab	14,16 bc
Dlatro P.	0,89 a	16,30 a	4,35 a	15,47 b
Starkrimson	0,81 c	16,61 a	4,20 a	13,94 c
Anglyska Z.	0,87 ab	16,10 a	3,94 ab	13,79 c

*Aynı sütunda farklı harfi alan ortalamalar arasındaki farklılık önemlidir ($P \leq 0.05$)

Tablo 5. Elma çeşitlerinde sap uzunluğu, sap kalınlığı ve sap çukuru eni değerleri

Çeşit	Sap Uzunluğu (mm)	Sap Kalınlığı (mm)	Sap Çukuru Eni (mm)
Gelendost	38,16 a	3,72 a	16,57 c
Mutsu	32,45 b	3,95 a	23,48 a
Golden D.	26,87 bc	2,84 c	16,77 c
Dlatro P.	23,81 c	3,46 b	19,85 b
Starkrimson	24,76 c	3,96 a	21,41 ab
Anglyska Z.	29,62 b	2,73 c	23,79 a

*Aynı sütunda farklı harfi alan ortalamalar arasındaki farklılık önemlidir ($P \leq 0.05$)

Öte yandan çeşitlerin meyve şekil indeksi değerleri 0,81-0,90, meyve eti sertliği 15,81-16,63 lb, pH değerleri 3,53-4,35 ve suda çözünür kuru madde

oranı (SÇKM) ise % 13,79-16,53 arasında kaydedilmiştir.

Bununla birlikte, meyve sapı uzunluğu 23,81-38,16 mm, meyve sapı kalınlığı 2,73-3,96 mm, sap çukuru eni 16,57-23,79 mm arasında kaydedilmiştir.

Tablo 6. Elma çeşitlerinde sap çukuru derinliği, çiçek çukuru eni ve çiçek çukuru derinliği değerleri

Çeşit	Sap Çukuru Derinliği (mm)	Çiçek Çukuru Eni (mm)	Çiçek Çukuru Derinliği (mm)
Gelendost	14,76 cd	19,14 b	14,16 b
Mutsu	19,64 b	18,59 b	10,21 c
Golden D.	13,61 d	23,31 a	13,84 b
Dlatro P.	14,10 d	16,49 c	14,23 b
Starkrimson	23,14 a	18,26 b	17,87 a
Anglyska Z.	16,11 c	22,27 a	16,39 a

*Aynı sütunda farklı harfi alan ortalamalar arasındaki farklılık önemlidir ($P \leq 0.05$)

Diğer pomolojik ölçütlerden olan sap çukuru derinliği 13,61-23,14 mm, çiçek çukuru eni 16,49-23,31 mm ve çiçek çukuru derinliği 10,21-17,87 mm aralığında kaydedilmiştir.

Tablo 7. Elma çeşitlerinde çekirdek evi boyu ve çekirdek evi eni değerleri

Çeşit	Çekirdek Evi Boyu (mm)	Çekirdek Evi Eni (mm)
Gelendost	23,34 a	19,14 d
Mutsu	23,44 a	18,75 e
Golden D.	21,40 b	21,51 a
Dlatro P.	23,93 a	20,69 b
Starkrimson	23,79 a	21,78 a
Anglyska Z.	23,16 ab	20,13 c

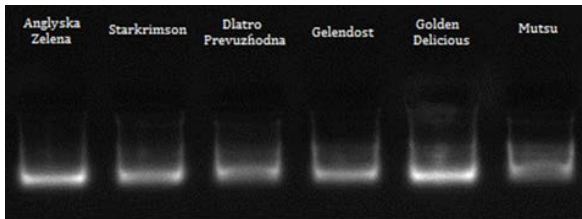
*Aynı sütunda farklı harfi alan ortalamalar arasındaki farklılık önemlidir ($P \leq 0.05$)

Çeşitlere ait çekirdek evi boyu değerleri 21,40-23,93 mm ve çekirdek evi eni değerleri ise 18,75-21,78 mm arasında kaydedilmiştir.

Tablo 8. Elma çeşitlerinde çekirdek boyu, çekirdek eni ve çekirdek kalınlığı değerleri

Çeşit	Çekirdek Boyu (mm)	Çekirdek Eni (mm)	Çekirdek Kalınlığı (mm)
Gelendost	8,51 b	4,61 ab	2,11 d
Mutsu	9,65 a	4,35 b	2,36 c
Golden D.	8,17 b	4,54 ab	3,73 b
Dlatro P.	7,66 c	3,28 c	3,47 b
Starkrimson	7,47 c	5,48 a	4,67 a
Anglyska Z.	6,92 d	3,21 c	2,74 c

*Aynı sütunda farklı harfi alan ortalamalar arasındaki farklılık önemlidir ($P \leq 0.05$)



Şekil 7. Araştırmada kullanılan 6 elma çeşidine ait yapraklardan elde edilen genomik DNA'lar

Farklı elma çeşitlerine ait yapraklar kullanılarak DNA izolasyonu yapılmış olup, yapılan agaroz jelinin görüntüsü Şekil 7'de gösterilmektedir.

Nükleotidlerin heterosiklik halkaları 260 nm dalga boyundaki ışığı maksimum emme özelliği taşıdığından bu dalga boyundaki emme derecesi nükleik asitlerin miktarının bir ölçüsü olarak kabul edilmektedir [12]. DNA'lar kalite bakımından değerlendirildiğinde, kaliteli DNA'larda saflığın A260/A280 oranının yaklaşık 2,0 civarında bulunması beklenmektedir [13]. DNA'nın miktar ve saflığı, spektrofotometrede 260 ve 280 nm dalga boylarında ölçülerek elde edilen değerlerle belirlenmiştir. Ölçümler neticesinde elde edilen DNA saflık oranları 1,73-1,97 arasında bulunmuştur (Tablo 9).

Tablo 9. Spektrofotometre ile belirlenen DNA yoğunlukları ve saflık değerleri

Çeşit	DNA yoğunluğu (ng/µl)	Saflık Değeri OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀
Starkrimson	445,04	1,86
Dlatro P.	367,6	1,82
Anglyska Zelena	621,23	1,97
Golden Delicious	669,19	1,77
Gelendost	375,66	1,73
Mutsu	318,4	1,95

Yoğunlukları tespit edildikten sonra yapılan moleküler çalışmada, kullanılan 10 primerden net okunabilir toplam 81 bant elde edilmiştir. Bantların varlığı 1 ve yokluğu 0 ile gösterilmek suretiyle bir matriks oluşturulmuştur.

Oluşan bantlardan 34 adedi monomorfik bulunurken (%42), 47 adedi de polimorfik bulunmuştur (%58). Bant sayıları karşılaştırıldığında en yüksek sayıda bant S 101, S 125 ve S 443 (11 adet) primerlerinden elde edilirken, en düşük sayıda bant S 139 (4 adet), S 35 (5 adet) ve S 188 (5 adet) primerlerinden elde edilmiştir.

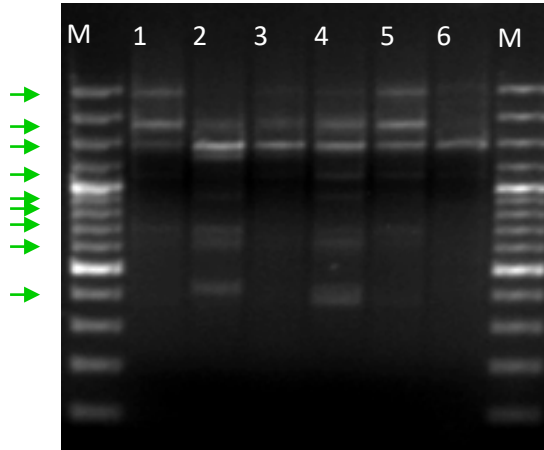
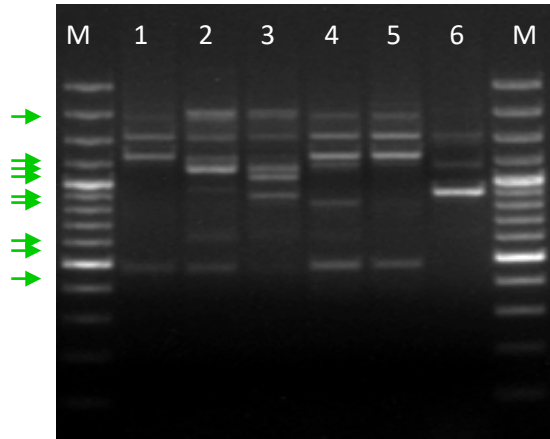
Yapılan değerlendirmeler sonucu elde edilen toplam bant sayıları, polimorfik bant sayıları, monomorfik bant sayıları, bant aralığı ve polimorfizm oranı değerleri Tablo 10'da verilmiştir.

Çalışmada kullanılan RAPD primerinden elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin görünüşlerine ait resimler Şekil 8 ve Şekil 9'da sunulmuştur.

En yüksek polimorfizm oranına sahip primerlerden olan S 101 no'lu RAPD primerinde 2800, 1800, 1500, 1400, 1100, 900, 850, 750, 700, 600 ve 400 bp olmak üzere 11 adet bant elde edilmiştir. Bu bantlardan 1500 ve 700 bp monomorfik bulunurken, 2800, 1800, 1400, 1100, 900, 850, 750, 600 ve 400 bp ise polimorfik bulunmuş ve Şekil 8 üzerinde oklarla gösterilmiştir. Elde edilen bant aralığı 400 ile 2800 bp arasında değişme göstermiştir.

Tablo 10. Çalışmada 81 adet bant veren 10 primer ve bant sayıları

Primer	Toplam Bant Sayısı (Adet)	Monomorfik Bant Sayısı (Adet)	Polimorfik Bant Sayısı (Adet)	Bant Aralıkları (pb)	Polimorfizm Oranları (%)
S 32	10	4	6	200-1800	60
S 35	5	3	2	450-1750	40
S 101	11	2	9	400-2800	81,8
S 125	11	6	5	450-2600	45,4
S 126	10	4	6	350-2600	60
S 128	8	6	2	400-1900	25
S 139	4	1	3	1300-2900	75
S 165	6	4	2	800-2700	33,3
S 188	5	2	3	400-2700	60
S 443	11	2	9	490-2000	81,8
Toplam	81	34	47	200-2900	58

**Şekil 8.** Primer S 101. M: DNA markörüdür ve 3000 bp'den başlayarak 100 bp'e kadar olan bantları göstermektedir. 1: Anglyska Zelena, 2: Mutsu, 3: Golden Delicious, 4: Gelendost, 5: Dlatro Prevuzhodna, 6: Starkrimson elma çeşidini simgelemektedir. Ok işaretleri polimorfik bantları göstermektedir (2800, 1800, 1400, 1100, 900, 850, 750, 600 ve 400 bp).**Şekil 9.** Primer S 443. M: DNA markörüdür ve 3000 bp'den başlayarak 100 bp'e kadar olan bantları göstermektedir. 1: Anglyska Zelena, 2: Mutsu, 3: Golden Delicious, 4: Gelendost, 5: Dlatro Prevuzhodna, 6: Starkrimson elma çeşidini simgelemektedir. Ok işaretleri polimorfik bantları göstermektedir (2000, 1300, 1200, 1100, 950, 900, 650, 600 ve 490 bp).

En yüksek polimorfizm oranına sahip primerlerden bir diğeri olan primer S 443 ile yapılan analizde elde edilen bant aralığı 490 ile 2000 bp arasında değişim

göstermiştir. En belirgin bantlar 2000, 1550, 1400, 1300, 1200, 1100, 950, 900, 650, 600 ve 490 bp olmak üzere 11 adet bant elde edilmiştir. Bu bantlardan 1550 ve 1400 bp monomorfik, 2000, 1300, 1200, 1100, 950, 900, 650, 600 ve 490 bp ise polimorfik olarak belirlenmiş ve Şekil 9 üzerinde oklarla gösterilmiştir.

Araştırmada yer alan tüm elma çeşitleri arasındaki Jaccard genetik benzerlik katsayıları Tablo 11'de benzerlik matrisinde verilmiştir. Tablo 11'de yer alan çeşitler numaralar verilerek isimlendirilmiştir: 1. Anglyska Zelena, 2. Mutsu, 3. Golden Delicious, 4. Gelendost, 5. Dlatro Prevuzhodna, 6. Starkrimson.

Tablo 11. Araştırmada kullanılan 6 elma çeşidinden elde edilen benzerlik matrisi

Çeşit	1	2	3	4	5	6
1	1,000					
2	0,634	1,000				
3	0,707	0,780	1,000			
4	0,756	0,878	0,756	1,000		
5	0,854	0,707	0,683	0,829	1,000	
6	0,646	0,598	0,695	0,573	0,622	1,000
Ort	0,766	0,766	0,770	0,798	0,782	0,689

İstatistiksel analiz sonuçlarına göre, elma çeşitleri arasındaki genetik benzerlik indekslerinin 0,573 ile 0,878 arasında değişim gösterdiği belirlenmiştir.

Çeşitler arasındaki en yakın benzerlik (0,878) Gelendost ve Mutsu çeşitleri arasında belirlenirken, bunu sırasıyla Dlatro Prevuzhodna ile Anglyska Zelena (0,854) ve Dlatro Prevuzhodna ile Gelendost (0,829) arasındaki benzerlikler takip etmiştir (Tablo 11).

Çeşitler arasındaki en az benzerlik (0,573) Gelendost ile Starkrimson çeşitleri arasında belirlenirken, bunu 0,598 ile Mutsu ile Starkrimson ve 0,622 ile Dlatro Prevuzhodna ile Starkrimson çeşitleri arasındaki benzerlikler izlemiştir (Tablo 11).

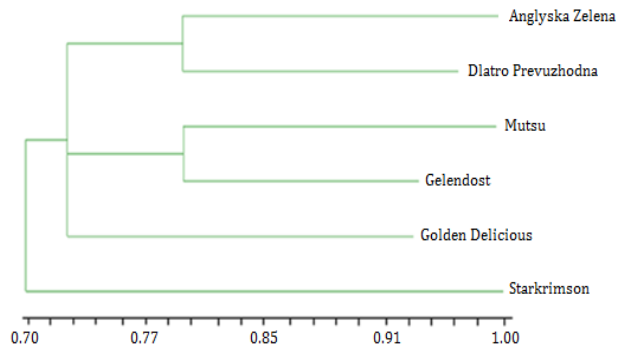
Çeşitler içerisinde diğer çeşitlere benzerliği ortalama olarak en yüksek olan çeşit Gelendost (0,798) olarak tespit edilmiştir. Bu çeşidi Dlatro Prevuzhodna (0,782) ve Golden Delicious (0,770) çeşitleri takip etmiştir (Tablo 11).

Çeşitler içerisinde diğer çeşitlere benzerliği ortalama olarak en düşük olan çeşit 0,689 Jaccard katsayısı değeriyle Starkrimson olarak belirlenirken, bunu 0,766 Jaccard katsayısıyla Anglyska Zelena ve Mutsu takip etmiştir.

Kırmızı meyve kabuk rengine sahip çeşitler incelendiğinde genetik olarak birbirine en yakın benzerlik gösteren çeşitlerin Dlatro Prevuzhodna ve Anglyska Zelena (0,854) olduğu görülmektedir. Birbirlerine genetik olarak en yakın ikinci grup Starkrimson ve Anglyska Zelena (0,646) çeşitleri olarak belirlenmiştir. Kırmızı çeşitler içerisinde birbirine genetik olarak en uzak çeşitlerin ise Dlatro Prevuzhodna ve Starkrimson (0,622) olduğu gözlemlenmektedir (Tablo 11).

Meyve kabuk rengi yeşil olan çeşitler incelendiğinde ise birbirine genetik olarak en yakın bulunan çeşitlerin Mutsu ve Gelendost (0,878) olduğu belirlenmiştir. Birbirine genetik olarak en yakın bulunan diğer çeşitler ise Golden Delicious ve Mutsu (0,780) çeşitlerine aittir. Benzerlik matrisinde de belirtildiği gibi yeşil meyve kabuk rengine sahip çeşitler incelendiğinde genetik olarak birbirine en uzak çeşitlerin Golden Delicious ve Gelendost (0,756) olduğu görülmektedir (Tablo 11).

Çalışmada yer alan elma çeşitleri arasındaki benzerlikleri belirlemek amacıyla oluşturulan matris, kümeleme analizine tabi tutulmuş ve gruplar arası benzerlik dendrogramı Şekil 10'da verilmiştir.



Şekil 10. Elma çeşitlerine ait UPGMA'dan elde edilen benzerlik dendrogramı

Benzerlik dendrogramı incelendiğinde çalışmada kullanılan çeşitlerin %70 oranında benzerlik gösterdiği belirlenmiştir.

Araştırmada kullanılan 6 elma çeşidinin benzerlik dendrogramı incelendiğinde (Şekil 10) çeşitlerin 2 ana grup oluşturduğu gözlemlenmiştir. Starkrimson çeşidi tek başına bir ana grubu diğer çeşitlerde ikinci ana grubu oluşturmuştur. İkinci ana grup üç alt gruba ayrılmıştır. Golden Delicious çeşidi tek başına alt gruplardan birini oluştururken, Mutsu ve Gelendost birlikte bir alt grup oluşturmuşlardır. Anglyska

Zelena ve Dlatro Prevuzhodna çeşitleri de üçüncü alt grubu oluşturmuşlardır.

4. Tartışma ve Sonuç

Bu çalışmada ülkemizin önemli elma çeşitlerinden olan ve "Eğirdir Meyvecilik Araştırma İstasyon Müdürlüğü" elma koleksiyonundan temin edilen Starkrimson, Dlatro Prevuzhodna, Anglyska Zelena, Golden Delicious, Gelendost ve Mutsu çeşitlerinin karakterizasyonu hem uluslararası UPOV kriterleri ile morfolojik olarak, hem de RAPD markörleri ile DNA boyutunda yapılmıştır.

Araştırmamızda izlenen CTAB prosedürüne göre her genotip için elde edilen saf DNA, agaroz jel ortamında yürütülmek suretiyle görüntülenmiş, aynı zamanda spektrofotometre yardımıyla yoğunlukları belirlenmiştir. Yapılan çalışmalarda (Kaufman ve ark., 1999; Doyle ve Doyle, 1990; Porebski ve ark., 1997; Kim ve ark., 1997) kullanılan DNA ekstraksiyon metodu ile bizim uyguladığımız metod arasında temel farklar bulunmamaktadır [14,15,16,17]. Elma (*Malus*) bitkisinin yüksek oranda polisakkarit ve polifenollü bileşikler içerdiği (Kim ve ark., 1997) ve bu unsurların saf DNA elde edilmesini kısıtladığı; bunu önlemek için polyvinyl pyrrolidone (PVP) kullanımının gerekli olduğu vurgulanmıştır [17]. Bizim takip ettiğimiz yöntemde de polyvinyl pyrrolidone (PVP) kullanılmıştır. Kaya (2008)'nin çalışması sonucu elde ettiği değerlere göre DNA yoğunlukları 11.55 ng/µl (VANEL-010) ile 23.32 ng/µl (VANEL-134) arasında değişmiştir [18]. Bu sonuçlar çalışmamızdan elde edilen DNA miktarları (318.4-669.19 ng/µl) ile kıyaslandığında daha düşük olduğu gözlemlenmektedir.

Çalışmamızdan elde edilen genomik DNA'lar, PCR ortamında uygun görülen primerler (S 32-35-101-125-126-128-139-165-188-443) kullanılarak çoğaltılmıştır. Önceki araştırmalarda kullanılan benzer primerlerin tanımlanması sonuç verdiği bildirilmiştir [9]. Ertürk ve Akçay (2010) yaptıkları çalışmada araştırmamızda kullanılan 10 primer de dahil olmak üzere toplam 38 adet primer kullanmışlar ve *Malus communis* L. türünde 206 adedi polimorfik olmak üzere toplam 843 okunabilir bant elde etmişlerdir [9]. Bu sonuçlarla bizim sonuçlarımız arasında paralellik mevcuttur. Kullanılan benzer primerler sonuç vermiş ve genotipler arasındaki genetik farklılıklar belirlenebilmiştir. Aynı zamanda çalışmamızda en yüksek polimorfizm oranına sahip primerlerden birisi olan S 101 primeri (%81.8), araştırmacıların kullandıkları 38 primer içerisinde yine en yüksek polimorfizm oranına sahip primer (%66.0) olarak belirlenmiştir.

Çalışmamızdan elde edilen benzerlik matrisi ve dendrogram incelendiğinde genotipler arasında yüksek benzerlik gösteren kombinasyonların bulunduğu gözlemlenmektedir. Muzher ve ark.

(2007), en yüksek benzerlik oranının; RAPD uygulamasında Golden Delicious/Dershawı çeşitleri arasında (%76.7), AFLP uygulamasında ise Khlati/Dershawı çeşitleri arasında (%72.9) olduğunu tespit etmişlerdir [19]. Zhou ve Li (2000) elde ettikleri verileri UPGMA gruplama metoduyla işleyerek dendrogram elde etmişler ve sonuç olarak *M. domestica* cv. 'Golden Delicious' kültür elmasına en yakın elma türünün *M. sieversii* olduğunu belirlemişlerdir [20].

Bu araştırmalardan elde edilen sonuçlarla bizim sonuçlarımız arasında tam bir benzerlik bulunmamaktadır. En yüksek benzerlik oranı bakımından Muzher ve ark., (2007)'nin gerçekleştirdiği çalışmada daha yakın (0.767) sonuçlara ulaşılmış [19] ancak yüksek benzerlik oranı bakımından izlenen değer (0.878) bizim bulgularımızda gerçekleşmiştir.

Bu sonuç açıkça şunu göstermektedir ki, incelenen genotipler arasındaki genetik benzerlikler yüksek düzeydedir. Bir başka ifadeyle; önceki çalışmalarda elde edilen en yüksek benzerlik oranının, bizim çalışmamızda çok daha yüksek çıkmasının muhtemel sebebi, genotiplerimiz arasındaki genetik benzerliğin yüksek düzeyde olmasından kaynaklanmaktadır.

Morfolojik bakımdan birbirine çok benzer özellikler gösteren elma çeşitleri için oluşturulan dendrogram ve benzerlik indeksleri neticesinde, çeşitlerin akrabalık dereceleri tespit edilmiş olup çeşitler arasında önemli derecede genetik farklılık olduğu belirlenmiştir. Elde edilen sonuçların bundan sonra yapılacak ıslah ve genetik haritalama çalışmalarına ışık tutacağı düşünülmektedir.

Teşekkür

4012-YL1-14 No'lu Proje ile çalışmamı maddi olarak destekleyen Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Başkanlığı'na teşekkür ederim.

Kaynakça

- [1] Kaşka, N. 2003. Türkiye'de Ilıman İklim Meyvelerinin Dünü, Bugünü ve Yarını. 4. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi, 8-12 Eylül, Antalya, 1-5.
- [2] Doğan, Y. 2006. Bazı ceviz (*Juglans regia* L.) çeşit ve genotiplerinin moleküler markör teknikleri ile karakterizasyonu. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 69s, Adana.
- [3] Eltez, M. 1983. Niğde yöresinde üstün özellikli ve özellikle meyve periyodisitesi göstermeyen amasya elma tiplerinin seleksiyonu. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, (Basılmamış) Doktora tezi, 234s, Adana.

- [4] Surgun, Y. 2008. Bazı pamuk çeşitlerinde genetik farklılığın RAPD tekniği ile belirlenmesi. Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 68s, Muğla.
- [5] Velioglu, E., İçgen, Y., Çengel, B., Öztürk, H., Kaya, Z. 2003. moleküler belirteçler yardımıyla kızılçam (*Pinus brutia* Ten.) tohum meşcerelerinde, tohum bahçelerinde ve ağaçlandırmalarında bulunan genetik çeşitliliğin karşılaştırılması. OATIAM, Teknik Bülten No:10, Ankara.
- [6] Carlson, J. E., Tulsieram, L. K., Glaubitz, J. C., Luk, V. W. K., Kauffeldt, C., Rutledge, R. 1991. Segregation of Random Amplified DNA Markers in F1 progeny of conifers. Theoretical and Applied Genetics, 83(1991), 194-200.
- [7] Roy, A., Frascaria, N., MacKay, J., Bousquet, J., 1992. Segregating Random Amplified Polymorphic DNAs (RAPD) in *Betula alleghaniensis*. Theoretical and Applied Genetics, 85(1992), 173-180.
- [8] Bardakçı, F., 2001. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers. Turkish Journal of Biology, 25(2001), 185-196.
- [9] Ertürk, Ü., Akçay, M. E. 2010. Genetic variability in accessions of 'Amasya' apple cultivar using RAPD markers. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca, 38:3(2010), 239-245.
- [10] Maltaş, E. 2011. *Ginkgo biloba*'nın kimyasal ve moleküler yöntemlerle analizi. Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 187s, Konya.
- [11] Işık, R. 2012. Bazı taze fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) genotiplerinin morfolojik ve moleküler karakterizasyonu. Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 100s, Konya.
- [12] Olgun, A., Topal, A. ed. 1999. DNA'nın analizi. Moleküler biyolojide kullanılan yöntemler. İstanbul Üniversitesi, Biyoteknoloji ve Genetik Mühendisliği Araştırma ve Uygulama Merkezi, Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul, 236s.
- [13] Hoisington, D. 1992. Laboratory protocols. CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory, Mexico, 23s.
- [14] Kaufman, B., Richards, S., Diering, D. A. 1999. DNA isolation method for high polysaccharide lesquerella species. Industrial Crops and Products, 9(1999), 111-114.
- [15] Doyle, J. J., Doyle, J. L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus, 12(1990), 13-15.
- [16] Porebski, S., Bailey, L. G., Baum, B. R. 1997. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plant containing high polysaccharide and polyphenol components. Plant Molecular Biology Reporter, 15:1(1997), 8-15.

- [17] Kim, C. S., Lee, C. H., Shin, J. S., Chung, Y. S., Hyung, N. I. 1997. A simple and rapid method for isolation of high quality genomic DNA from fruit trees and conifers using PVP. *Nucleic Acids Research*, 25:5(1997), 1085-1087.
- [18] Kaya, T. 2008. Van merkez, Edremit ve Gevaş ilçeleri elma genetik kaynaklarının fenolojik, morfolojik, pomolojik ve moleküler tanımlanması. Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 253s, Van.
- [19] Muzher, B. M., Younis, R. A. A., El-Halabi, O., İsmail, O. M. 2007. Genetic identification of some syrian local apple (*Malus* sp.) cultivar using molecular markers. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 3:6(2007), 704-713.
- [20] Zhou, Z. Q., Li, Y. N. 2000. The RAPD evidence for the phylogenetic relationship of the closely related species of cultivated apple. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 47(2000), 353-357.