

PİNOT NOİR ÜZÜM ÇEŞİDİNDE SPONTAN MUTASYON OLUŞUMUNUN MORFOLOJİK VE MOLEKÜLER OLARAK İNCELENMESİ

Onur ERGÖNÜL¹, Tamer UYSAL¹, Cengiz ÖZER¹, Canan YÜKSEL ÖZMEN²

¹Zir. Yük. Müh., Bağcılık Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, TEKİRDAĞ

²Dr., Biyolog, Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, ANKARA

Geliş tarihi / Received: 11.09.2017, Kabul tarihi / Accepted: 20.06.2018

ÖZET

İslah çalışmalarında mutajen kullanılarak uyarılmış mutasyon uygulamaları yürütüldüğü gibi, doğada da ender olarak spontan mutasyonlar görülebilmektedir. İster uyarılmış ister spontan mutasyon sürecinde tüm hücre tabakaları, gen bölgeleri aynı değişime uğramayarak aynı doku üzerinde morfolojik olarak mutant ve mutant olmayan farklı dokuların görüldüğü kimera oluşabilmektedir. Her iki durumu içine alabilecek benzer bir durum, arazi çalışmaları esnasında Tekirdağ'ın Şarköy İlçesindeki Pinot noir üzüm çeşidi ile tesis edilmiş üretici bağında tespit edilmiştir. Aynı omca üzerinde farklı tane rengine sahip salkımların olduğu bu durum morfolojik ve moleküler olarak incelenmiş, tane kabuk renginin değiştiği mutant genotip ile orijinal Pinot noir çeşidi kıyaslanmıştır. Morfolojik farklılıkları ortaya koymak adına OIV tanımlayıcı skalası kullanılarak 24 ampelografik karakter üzerinde değerlendirmeler yapılmış, değerlendirme sonucunda başta tane kabuk rengi olmak üzere bazı karakterlerde farklılıklar tespit edilmiştir. OIV tanımlayıcı skalasında bulunan 6 SSR (Simple Sequence Loci) lokusu ile yapılan moleküler tanı analizinde ise iki örnek arasında mutasyon polimorfizm tespit edilememiştir. Ayrıca iki örnek, asmada renk karakterini kontrol eden Myb ilişkili gen grubu açısından da değerlendirilmiştir. Analizler ve mevcut literatürler ışığında, oluşan mutasyonun Myb ilişkili gen grubu kaynaklı olmadığı saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Mutasyon, kimera, *Vitis*, Myb ilişkili gen grubu

MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR INVESTIGATION OF SPONTANEOUS MUTATION FORMATION IN PINOT NOIR GRAPE

ABSTRACT

Mutagenic mutations have been carried out in breeding studies, as well as spontaneous mutations rarely seen in nature. Both in the stimulated mutation and in the spontaneous mutation process, all cell layers and gene regions can not undergo the same variation. The presence of mutant and non-mutant parts on the same tissue is called chimera. A similar situation that could include both cases was determined in a vineyard established with Pinot noir grape variety in Şarköy district of Tekirdağ during the field studies. This situation that the bunches with different colored berries on the same vine are examined morphologically and molecularly. The original Pinot noir variety was compared with the mutant Pinot noir. In order to demonstrate the morphological differences, 24 ampelographic characters were evaluated using the OIV descriptive scale. As a result of the morphological evaluation, differences were found in some other characters as well as berry color. In the molecular diagnostic analysis performed with 6 SSR (Simple Sequence Loci) loci on the OIV descriptor scale, mutation polymorphism could not be detected between two samples. In addition, two samples were evaluated for the gene group associated with Myb, which controls color characteristics in grape. According to the analyzes and available literature, it was determined that the mutation formed was not caused by the Myb related gene group.

Keywords: Mutation, chimera, *Vitis*, Myb gene group

GİRİŞ

Mutasyonlar, kalıtım materyali (DNA, RNA veya plasmid) fiziksel ve kimyasal yapısının değişmesi sonucu DNA dizinindeki,

genetik açılım veya rekombinasyon kökenli olmayan kalıtsal değişimler olarak tanımlanmaktadır [15]. Diğer bir deyişle mutasyon terimi kromozomlardaki sayı ve yapı değişiklikleri ile genlerdeki değişimleri

içermektedir [10]. Doğada farklı nedenlerle kendiliğinden spontan mutasyonlar oluşabildiği gibi değişik mutajenler kullanılarak ta uyarılmış mutasyonlar ortaya çıkabilmektedirler. Yapısal olarak değerlendirildiğinde mutasyonların içsel ve dışsal faktörler nedenleriyle ortaya çıktığı söylenebilir. İçsel faktörler olarak bitkinin genetik yapısı ve genetik yatkınlığı, dışsal faktörler olarak ta beslenme, sıcaklık, doğal radyasyon, kimyasal maddeler ve yüksek oksijen basıncı sayılabilir.

Günümüzde ekonomik olarak yetiştirilen bazı çeşitlerin mutasyonlar sonucu ortaya çıktığı bilinmektedir. Dolayısıyla mutasyon bir ıslah yöntemidir. Yeni çeşit elde etmedeki rolünden başka mutasyonlar, moleküler karakterizasyonu yapılmamış özelliklerin gen bölgelerinin belirlenmesi, tanımlama ve seleksiyon çalışmalarında kullanılabilecek markır tespit edilmesi açısından da önemlidirler. Dolayısıyla özel fenotipik karakterli klonlar fonksiyonel genomik çalışmalar için bitkisel materyal sağlayabilmektedir.

Asma çeşit popülasyonları içerisinde görülen somatik mutasyonlar çoğunlukla tane şekli ve rengi bakımından değişim ortaya koymaktadır. Bunun yanı sıra meyve eti renklenmesi, verim seviyesi, sürgün ucu tüylülüğü, geniş yapraklılık, taç gelişimi, tanede mumsu tabaka özellikleri ve salkım yapısı gibi özellikler somatik mutasyonlar sonucu değişim gösterebilen karakterlerdir [12]. Özellikle tane kabuk renginde görülen mutasyonlar hiçte azımsanmayacak sıklıkta görülebilmektedir.

Klonal polimorfizmler, SNP'lerden (Single Nucleotid Polimorfizm–Tekli Nükleotid Polimorfizmi), birçok mikrosatelit lokusun boyut polimorfizminden, retrotransposon Gret 1'in kısmi olarak eksilmesinden, genler arasındaki hatalı rekombinasyondan ve bilinmeyen mekanizmalar tarafından gerçekleşen büyük çaplı eksilmelerden kaynaklanabilmektedir. Çok yıllık tür olan asma, uzun üretim dönemi boyunca aşılama, budama, patojen etkileri ve ultraviyole radyasyon tarafından güçlü bir şekilde etkilenebilir özellikte olması nedeni ile retrotransposon genler asmanın genomik esnekliğine katkı sağlayabilmektedir [12].

Asmalarda tane kabuk rengi, antosiyaninler olarak isimlendirilen kırmızı renk pigmentlerinin birikmesi ile oluşmaktadır [6]. Üzümün kabuk rengi, antosiyanin kompozisyonu ve miktarına bağlı olarak değişiklik göstermekle birlikte tane rengi koyu siyahtan kırmızıya, pembeden yeşile kadar çeşitlenebilmektedir. Siyah ve kırmızı çeşitler kabuklarında antosiyaninleri biriktirirken, beyaz çeşitler antosiyanin sentezleyememektedir. Asmada VvmybA1 gibi Myb ilişkili genler, UDP–glukose için genin ifadesini kontrol ederek antosiyanin biyosentezini düzenlemektedir. Birçok çalışmada VvmybA1'in gen ifadesinin antosiyanin biyosentez enzimleri ve kabuktaki antosiyanin birikimi ile ilgili olduğu belirlenmiştir [9].

Çeşit içerisinde aynı omca üzerinde farklı tane rengine sahip salkımların oluşması durumu, Tekirdağ'ın Şarköy İlçesindeki Pinot noir üzüm çeşidi ile tesis edilmiş üretici bağında tespit edilmiştir. Aynı omca üzerinde farklı tane rengine sahip salkımlar olduğu bu durum morfolojik ve moleküler olarak incelenmiş, tane kabuk renginin değiştiği mutant genotip ile orijinal Pinot noir çeşidi kıyaslanmıştır. Morfolojik farklılıkları ortaya koymak adına OIV tanımlayıcı skalası kullanılarak 24 ampelografik karakter üzerinde değerlendirmeler yapılmış OIV tanımlayıcı skalasında bulunan 6 SSR (Simple Sequence Loci) lokusu ile genetik tanı analizinde iki örnek arasında herhangi bir mutasyon polimorfizmi olup olmadığı tespit edilmeye çalışılmıştır. Ayrıca iki örnek, asmada renk karakterini kontrol eden Myb ilişkili gen grubu açısından da moleküler düzeyde tarama yapılmıştır.

MATERYAL VE METOT

Bitkisel Materyal

Renk mutasyonunun görüldüğü çeşit (Şekil 1), bilinen standart şaraplık bir çeşit olan Pinot noir'dir. Sadece Fransa'da 64 klonu bulunan Pinot noir'in uzun yıllardan beri yetiştiriciliğinin yapıldığı bilinmektedir. Bu çeşit ayrıca Asma Genom Projesi'nin referans çeşidi olarak kullanılmış ve tüm genomu sekanslanmıştır [16]. Çalışmada kullanılan bitkisel materyal Tekirdağ İli Şarköy ilçesinde

bulunan yaklaşık 20 da alanda kurulu 8 yaşındaki bağdan tedarik edilmiştir.

Ampelografik Değerlendirmeler

Ampelografik değerlendirmeler 2016 ve 2017 yıllarında ilgili bağdan, hem mutant hem de orijinal Pinot noir çeşidine ait örnekler üzerinde Tekirdağ Bağcılık Araştırma Enstitüsü bünyesinde yürütülmüştür. Bu değerlendirmeler Haziran 2007'de yayınlanan Uluslararası Bağcılık ve Şarapçılık Organizasyonu (OIV)'nın tanımlayıcı skalasındaki 24 ampelografik özellik üzerinde yapılmıştır (Çizelge 4).



Şekil 1. Spontan mutasyonun görüldüğü Pinot noir çeşidi

Figure 1. Pinot noir variety with spontaneous mutation

DNA Ölçümleri ve İzolasyonu

Moleküler analizler için sürdürülmek üzere kışlık sürgünler hem mutant bölgeden hem de orijinal Pinot noir çeşidinden 2016 yılında alınmış ve Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsüne gönderilmiştir. Moleküler düzeydeki çalışmalar bu kurumda yürütülmüştür.

DNA izolasyonları aşağıda metot açıklaması verilen Lefort ve ark. [11] yöntemine göre yapılırken, DNA kalite ve miktar ölçümleri amacı ile agaroz jel elektroforezi (%1) ve Nanodrop ND-1000 spektrofotometre kullanılarak yapılmıştır.

•Genç yaprak veya sürgün ucu sıvı azotla ezildi,

•100 mg alınarak 2 µl ependorf tüplere aktarıldı,

•Tüplerin üzerine 1 ml DNA ekstraksiyon solüsyonu eklendi,

•65°C'de arasıra çalkalanarak 15 dk bekletildi,

•0.5 ml kloroform/isoamil alkol (24:1) karışımı eklenerek, 30 dk buz üzerinde bekletildi,

•Oda sıcaklığında, 14.000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi,

•Üst sıvı, temiz bir ependorf tüpe aktarıldı,

•Üzerine 0.8 ml isopropanol eklendi,

•Örnekler, 15–20 dk buz üzerinde tutularak 14.000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi,

•Üst sıvı tekrar yeni bir ependorf tüpe aktarıldı,

•Pellet (alt katı) üzerine 1 ml %70'lik ethanol eklenerek, 14.000 rpm'de 2 dk santrifüj edildi,

•DNA, 50–100 µl H₂O'da çözüldü,

•Her 100 µl için 1 µl RNase-A eklenerek, 37°C'de 15 dk bekletilerek, RNA uzaklaştırıldı.

İzolasyon çözeltisi (50 ml için);

2 ml TRIS (50 mM, pH 8.0)

4 ml EDTA (50 mM, pH 8.0)

10 ml LiCl (4M)

1 g CTAB (%1)

2 g PVP (%2)

0.5 ml TWEEN 20 (%0.5)

%0.2 β-Mercapto Ethanol

Kloroform/isoamil alkol; (24:1) (hacim: hacim)

RNase-A (Applichem); 100 mg/ml

SSR PCR Reaksiyonları

SSR PCR reaksiyonu; 15–200 ng DNA, 5 pmol ileri (forward) primer, 5 pmol floresan işaretlemiş ters (revers) primer, 0.5 mM toplam dNTP, 0.5 ünite Go Taq DNA Polymerase (Promega) (1.5 mM MgCl₂ içermekte), 3 µl buffer (5x buffer) olmak üzere 15 µl'de gerçekleştirilmiştir.

SSR PCR reaksiyonu için kullanılan PCR programı:

1. 94°C'de 3 dk,

2. 94°C'de 1 dk,

3. 48–66°C'de 1 dk,

4. 72°C'de 2 dk,

5. 72°C'de 10 dk olmak üzere toplam 35 döngü olarak uygulanmıştır.

PCR sonrası lokuslara ait PCR ürünleri %2'lik agaroz jel elektroforezinde 100 bp Marker ile kontrol edildikten sonra, amplifikasyonu gerçekleşmiş örneklerde kapilleri elektroforez aşaması gerçekleştirilmiştir.

SSR Lokuslarına Ait Primerler

Üzümde standart set olarak kabul gören 6 SSR primeri (VVS2, VVMD5, VVMD7, VVMD27, VrZAG62 ve VrZAG79) kullanılmıştır [14]. Her forward primer D4 (mavi), D3 (yeşil) ve D2 (siyah) (Proligo, Fransa) renklerde floresan işaretlenmiş olup primerlere ait baz dizileri, kullanılan floresan boya ve Tm (bağlanma sıcaklığı) değerleri Çizelge 1’de verilmiştir.

Kapilleri Elektroforez ve Allel Görüntülenmesi

Kapilleri elektroforez amacıyla Beckman CEQTM 8800 Genetik Analiz Sistemi kullanılmıştır. PCR ürünleri işaretlemede kullanılan floresan (Proligo, wellred işaretli primerler, Fransa) boyalara göre değişik oranlarda (1:5, 1:10 gibi) 20 µl SLS (Sample Loading Solution) ile seyreltilmiştir. Üzerlerine 0.4 µl Size Standart-400 eklendikten sonra CEQTM 8800 Genetik Analiz Sistemi’nde elektroforez edilmiştir. Her bir lokusa ait pikler; tipleri ve renkleri göz önüne alınarak heterozigot ve homozigot olarak görüntülenmiştir.

Myb Polimorfizminin Belirlenmesi

Asmada renk karakterini kontrol eden Myb ilişkili gen grubu açısından genotiplerin taranmasına yönelik Azuma ve ark. [1]’de verilen VvMybA1 primerleri kullanılmıştır (Çizelge 2).

PCR Reaksiyonu

PCR reaksiyonu; 150 ng DNA, 5 pmol ileri (forward) primer, 5 pmol ters (revers) primer, 0.5 mM toplam dNTP, 0.5 ünite Go Taq DNA Polymerase (Promega) (1.5 mM MgCl₂ içermekte), 3 µl buffer (5x buffer) olmak üzere 15 µl’de gerçekleştirilmiştir.

PCR reaksiyonu için kullanılan PCR programı:

1. 95°C’de 3 dk,
2. 94°C’de 1 dk,
3. 60°C’de 1 dk,
4. 72°C’de 1 dk,
5. 72°C’de 5 dk olmak üzere toplam 35 döngü olarak uygulanmıştır.

PCR ürünleri %2’lik agaroz jel elektroforezinde 100 bp Marker eşliğinde, 45 dk elektroforez tankında yürütülmüş ve

agaroz jel elektroforez görüntüleme sisteminde görüntülenmiştir.

Çizelge 1. Kullanılan SSR lokuslarına ait primerlerin baz dizileri, işaretleme boyası ve PCR Tm değerleri

Table 1. Base sequences, marking paint and PCR annealing temperatures of the primers used in the SSR locus

No	Lokus adı	Primer dizileri (5’...3’)	İşaretleme boyası	Tm (°C)
1	VrZAG79F**	agattgtggaggagggaacaaac cg	Yeşil	66
	VrZAG79-R	tgccccattttcaactcccttc		
2	VVMD7-F**	agagttgcggagaacaggat	Yeşil	55
	VVMD7-R	cgaaccttcacacgcttgat		
3	VVMD27-F**	gtaccagatctgaatacatcgttaa gt	Siyah	55
	VVMD27-R	acgggtatagagcaaacgggtg		
4	VVS2-F**	cagcccgttaaatgtatccatc	Mavi	55
	VVS2-R	aaattcaaaattctaattcaactgg		
5	VVMD5-F**	ctagagctacgccaatccaa	Siyah	55
	VVMD5-R	tataccaaaaatcatattcctaaa		
6	VrZAG62-F**	gggtgaaatgggcaccgaacacac gc	Mavi	55
	VrZAG62-R	ccatgtctctcctcagcttcagc		

**Floresan işaretli

Çizelge 2. Kullanılan primerler

Table 2. Primers of VvmybA1 alleles

Primer	İleri Primer Dizisi 5’...3’	Geri Primer Dizisi 5’...3’
VvMybA1a	aaaaaggggggcaatgtaggg accc	gaacctccttttgaagtgggtgac t
VvMybA1b/c	ggacgttaaaaaatgggtgcac gtg	gaacctccttttgaagtgggtgac t

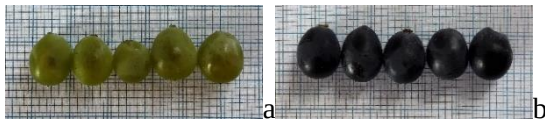
BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmada Pinot noir üzüm çeşidinin mutanti ile orijinali arasında ampelografik ve moleküler düzeyde farklılıklar ortaya konmaya çalışılmıştır. 2016 ve 2017 yıllarında OIV’nin tanımlayıcı skalasında bulunan 24 özellik üzerinde yapılan değerlendirmelerde iki genotip arasında 21 özellikte farklılık bulunmazken, geriye kalan üç özellik üzerinde farklılık gözlenmiştir (Çizelge 4). Bunlardan OIV 225 kodlu tane kabuk renginde mutant genotipte yeşil sarı olan tane kabuk rengi orijinal genotipte mavi-siyah olarak belirlenmiştir (Şekil 2). Ampelografik farklılığın gözlemlendiği diğer özellik ise OIV 79 kodlu yaprak sapı cebinin açıklık durumunda ortaya çıkmış, mutant genotipte yaprak sapı açıklığı kapalı durumda iken orijinal Pinot noirde üst üste binmiş konumda tespit edilmiştir (Şekil 3). Farklılığın gözlemlendiği

diğer özellik ise OIV 75 kodlu olgun yaprak üst yüzeyindeki kabarıklık özelliğinde görülmüş, mutant genotipte kabarıklık yok veya çok zayıf durumda iken orijinal Pinot noirde orta seviyede kabarıklık tespit edilmiştir (Şekil 4). Araştırmada üzümde standart set olarak kabul gören ve OIV tanımlayıcı listesinde bulunan VVS2, VVMD5, VVMD7, VVMD27, VrZAG62 ve VrZAG79 mikrosatellit lokuslarına ait PCR reaksiyonları sonucunda, lokuslar istenilen büyüklükte (bp) başarılı şekilde çoğaltılmıştır [14]. Araştırmada kullanılan SSR lokuslarına ait belirlenen allel pik profilleri ve büyüklüklerine (bp) göre 2 örnek arasında herhangi bir farklılık (polimorfizm) olmadığı gözlemlenmiştir (Çizelge 3).

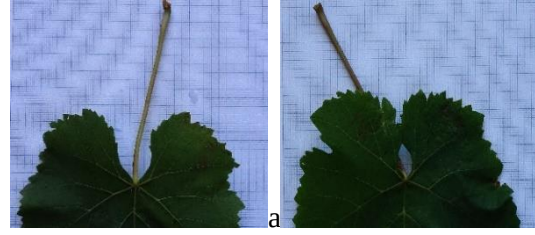
Özellikle OIV tanımlayıcı skalasında bulunan SSR markırların, genel itibarıyla çeşit tanımlamada kullanılan belirteçler olduğu için klonal düzeydeki farklılıkları ortaya koymamaları normal görülmektedir. SSR markırların klonal düzeydeki polimorfizmleri belirlemekte yetersiz kaldığını bildiren birçok literatür mevcuttur [6, 13]. Yine de bu bulgular değerlendirilen durumun bir mutasyon olduğunun, çeşit üzerinde herhangi bir aşılama işleminin yapılmadığının da bir göstergesi kabul edilebilir.

Asmanın kabuk rengi antosiyanin kompozisyonu ve miktarı tarafından belirlenir. Siyah ve kırmızı çeşitler kabuklarında antosiyaninleri biriktirirler, buna karşın beyaz çeşitler onları sentezleyemezler. Üzümün tane renk kalıtımı konusunda yapılan yayınlarda [3], tane renginin 2 gen tarafından kontrol edildiği ve buna göre siyah renk için olan genin (B---) kırmızı ve beyaz renge, kırmızı renge (bbR-) beyaz renge (bbrr) dominant olduğu belirtilmektedir.



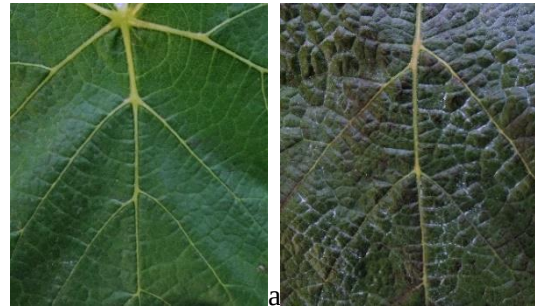
Şekil 2. Genotipler arasında tane kabuk rengi farklılığı (a: resim mutant genotip, b: orijinal genotip)

Figure 2. Difference berry skin colour between genotypes (a: mutant genotype, b: original genotype)



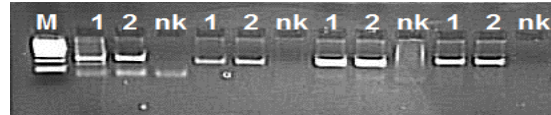
Şekil 3. Genotipler arasında yaprak sap cebi açıklığı (a: mutant genotip, b: orijinal genotip)

Figure 3. Degree of petiole sinus opening between genotypes (a: mutant genotype, b: original genotype)



Şekil 4. Genotipler arasında yaprak üst yüzey kabarıklığı (a: mutant genotip, b: orijinal genotip)

Figure 4. Blistering of upper side in mature leaf between genotypes (a: mutant genotype, b: original genotype)



Şekil 5. Sırası ile VrZAG62, VVMD27, VVMD5 ve VVMD7 SSR lokuslarına ait 2 örnekte (1: orijinal PN, 2: mutant PN) PCR görüntüsü (M: marker-100 bp, nk: negatif kontrol)

Figure 5. PCR image in two samples (1: original PN, 2: mutant PN) of VrZAG62, VVMD27, VVMD5 and VVMD7 SSR loci

Çizelge 3. Orijinal PN ve Mutant PN genotiplerinin 6 lokustaki allel büyüklükleri (bp)

Table 3. Allele size in six loci of original PN and Mutant PN genotypes (bp)

Örnek	VrZAG79	VVMD7	VVMD27	VVS2	VVMD5	VrZAG62
Orijinal PN	244:252	238:244	185:195	133:143	226:236	186:196
Mutant PN	244:252	238:244	185:195	133:143	226:236	186:196

Bunun aksine Doligez ve ark. [7] ve Fischer ve ark. [8] ise tanedeki antosiyanin varlığı veya yokluğunun kromozom 2 üzerindeki bir lokus tarafından belirlenen monogenik bir özellik olduğunu belirtmişlerdir. Üzümde, *V. labrusca*'nın VmybA1-1 gibi Myb ilişkili genlerinin UDP-glukose için genin ifadesini kontrol ederek antosiyanin biyosentezini düzenlediği, VmybA1-1'in homoloğu olan VvmybA1 geninin de *V. vinifera*'da aynı fonksiyona sahip olduğu belirtilmiştir. Tespit edilen Myb ilişkili bu genin antosiyanin biyosentezindeki tüm genlerin ifadesini arttırdığı yapılan çalışmalarla ortaya çıkarılmıştır [9]. Ek olarak

VvmybA1 geninin ifadesi, antosiyanin biyosentez enzimleri ve kabuktaki antosiyanin birikimi ile ilişkilidir. Ancak VvmybA1'in ifadesi, bir retrotransposon gen olan Gret-1'i içeren VvmybA1a alleli ile inaktif hale gelmektedir. Azuma ve ark. [1]'de üzerinde çalışılan beyaz çeşitler VvmybA1a için homozigot iken kırmızı veya siyah çeşitler VvmybA1a ve VvmybA1c için heterozigottu. Bu çalışmaya göre VvmybA1 üzümde kabuk rengini belirleyen ana gen olarak vurgulanmıştır. Ancak VvmybA1'in tek başına bir belirleyici olup olmadığı kesinlik kazanmamıştır.

Çizelge 4. OIV tanımlayıcı skalasına ait ampelografik değerlendirmeler

Table 4. Ampelographic evaluations according to OIV descriptor scale

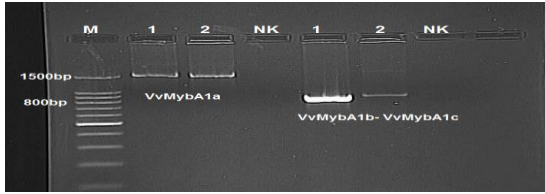
OIV Kod	OIV Karakteri	Mutant PN	Orijinal PN	Mutant PN	Orijinal PN
67	Olgun yaprak ayası şekli	4	4	Dairesel	Dairesel
70	Ana damarların antosiyanin renklenmesi	2	2	Sadece sap cebi civarında	Sadece sap cebi civarında
74	Olgun yaprak Profili	2	2	Ana damarda katlı	Ana damarda katlı
75	Yaprak Üst Yüzeyinde Kabarıklık	1	5	Yok veya çok zayıf	Orta
76	Olgun Yaprak Dış Şekli	4	4	Konveks	Konveks
79	Yaprak sapı cebinin açıklık durumu	3	4	Hafif açık	Hafifçe üst üste binmiş
81-1	Yaprağın sap cebi kısmında dış varlığı	1	1	Yok	Yok
81-2	Damarla sınırlanmış sap cebi durumu	1	1	Yok	Yok
84	ana damarlar üzerinde yatık tüy yoğunluğu	1	1	Yok veya çok az	Yok veya çok az
87	Ana damarlar üzerinde dik tüy yoğunluğu	1	1	Yok veya çok az	Yok veya çok az
202	Salkım uzunluğu (cm)	3	3	Kısa, 10-14 cm	Kısa, 10-14 cm
204	Salkım sıklığı	9	9	Çok sık	Çok sık
208	Salkım şekli	2	2	Konik	Konik
209	Birincil salkımların kanat sayısı	2	2	1-3 kanat	1-3 kanat
220	Tane uzunluğu (mm)	3	3	Kısa, 8-14 mm	Kısa, 8-14 mm
221	Tane eni (mm)	3	3	Kısa, 8-14 mm	Kısa, 8-14 mm
223	Tane şekli	3	3	Geniş elipsoid	Geniş elipsoid
225	Kabuk rengi	1	6	1: yeşil-sarı	6: mavi siyah
230	Tane içi et rengi	1	1	Renksiz	Renksiz
235	Tane sertliği	1	1	Yumuşak	Yumuşak
236	Özel tat	1	1	Yok	Yok
241	Çekirdek oluşumu	3	3	Tam	Tam
502	Tek salkım ağırlığı (g)	2	2	Düşük, yaklaşık 200 g (144 g)	Düşük, yaklaşık 200 g (167 g)
503	Tek tane ağırlığı (g)	1	1	Çok düşük, yaklaşık 1 g (0.88 g)	Çok düşük, yaklaşık 1 g (1.15 g)

Azuma ve ark. [2]'e göre üzümde tane renk lokusu kromozom 2 üzerinde yerleşmiş 200 kb'lık bir bölgeye yayılan Myb ve Myb benzeri genlerin grubudur. Yakushiji ve ark. [17]'de siyah renkli Pinot noir'den beyaz renkli Pinot blanc'a olan tane renk mutasyonu incelenmiş, sonuçta Pinot noir'den fonksiyonel VvmybA1c allelinin silinmesiyle antosiyanin biyosentezi engellenerek Pinot blanc'ın oluştuğu ortaya konmuştur.

Araştırmamızda asma için renk karakterini kontrol eden Myb ilişkili gen grubu açısından

genotiplerin taranmasına yönelik Azuma ve ark. (2007)'de verilen VvMybA1 primerleri kullanılmıştır. Ortaya çıkan tane renk mutasyonunun, VvmybA1 geninde VvmybA1c allelinin bulunmamasından kaynaklanmadığı, her iki genotipte de VvmybA1c allelinin bulunduğu belirlenmiştir (Şekil 6). Yakushiji ve ark. [17]'de oldukça benzer bir durum olarak Pinot noir çeşidinden renk mutasyonu sonucu elde edilen ve beyaz tane rengine sahip Pinot blanc, VvmybA1'nin VvmybA1a ve VvmybA1c alleli açısından

değerlendirilmiştir. Çalışmamız sonuçlarından farklı olarak burada VvmybA1 geninden VvmybA1c allelinin silindiği ve böylece renk mutasyonunun gerçekleştiği tespit edilmiştir. Renk mutasyonunun ilgili gen bölgesi taramalarıyla tespit edildiği çalışmaların varlığına karşın, renk mutasyonu açısından VvmybA1'in tek başına bir belirleyici olmayabileceğini vurgulamıştır [1]. Moleküler polimorfizmlerin büyük kısmını hareketli elementlerin (Gret-1 gibi transposon genler) oluşturmalarına karşın küçük te olsa bir kısmının ise SNP ve indel kaynaklı olabileceğine değinen [5, 18] ve değişik çeşitlerde VvmybA1 geninde görülen baz değişimlerini bildiren [17] çalışmalar mevcuttur.



Şekil 6. VvMybA1a ve VvMybA1b/c primerlerinin 2 genotipe ait PCR görüntüsü (M: marker, NK: negatif kontrol, 1: Orijinal PN, 2: Mutant PN)

Figure 6. PCR image of VvMybA1a and VvMybA1b/c primers in two samples (M: marker, NK: negative control, 1: Original PN, 2: Mutant PN)

SONUÇ

Araştırmada, Tekirdağ İli Şarköy İlçesinde Pinot noir üzüm çeşidi ile tesis edilmiş üretici bağında tespit edilen spontan tane renk mutasyonu üzerinde çalışılmıştır. Mutant ve orijinal Pinot noir genotiplerinden alınan örneklerin ampelografik ve moleküler düzeydeki farklılıkları bulunmaya çalışılmış, ampelografik değerlendirmeler 2016 ve 2017, moleküler çalışmalar ise sadece 2016 yılında alınan örnekler üzerinde yürütülmüştür. OIV tanımlayıcı skalasında bulunan 24 ampelografik özellikte 3 karakterde farklılıklar gözlenmiştir. Tane rengindeki farklılığın dışında diğer ampelografik farklılık OIV 79 kodlu yaprak sapı cebinin açıklık durumunda ortaya çıkmış, mutant genotipte

yaprak sapı açıklığı hafif açık durumda iken orijinal Pinot noirde hafifçe üst üste binmiş konumda tespit edilmiştir. OIV 75 kodlu olgun yaprak üst yüzeyinde kabarıklık durumu özelliğinde ise mutant Pinot noir'de kabarıklık yok veya çok zayıf bulunurken orijinal Pinot noir'de orta seviyede kabarıklık tespit edilmiştir. Yine OIV'nin tanımlayıcı skalasında bulunan 6 SSR primeri kullanılarak iki genotip değerlendirilmiş, ancak kullanılan primerler çeşit bazında herhangi bir farklılık göstermemiş dolayısıyla SSR polimorfizmi tespit edilememiştir. Son olarak asmada renk karakterini kontrol eden Myb ilişkili gen grubu ile ilgili VvmybA1 geninin VvmybA1a ve VvmybA1b/c allelleri her iki genotipte taranmış, elde edilen sonuçlara göre, bu 2 allelin 2 örnekte de bulunduğu gözlemlenmiş bu nedenle görülen mutasyonun Myb gen grubu kaynaklı olmadığı tespit edilmiştir.

Tüm bu gözlem ve analizlerin dışında, aynı omca üzerinde farklı tane rengine sahip salkımlar olduğu gibi bunun yanında tek salkım içerisinde farklı renkli tanelerin, hatta bir tanede ise tanenin bir bölümünün farklı, diğer bölümünün farklı renkte olduğu durumlar da gözlenmiştir. Bu durum sadece 2016 yılında gözlenmiş olup 2017 yılında görülmemiştir. Söz konusu durumun kalıcı bir mutasyon yerine kimerik bir yapıya işaret ettiği düşünülmekte olup konu burada detaylandırılmamıştır.

TEŞEKKÜR

Çalışma sürecinde gerek ilgisi gerekse bizlere verdiği teknik bilgi desteğinden dolayı Sayın Prof. Dr. Ali ERGÜL ile araştırmanın yapılması adına bizlere kolaylık sağlayarak bağında çalışmamıza izin veren Sayın Hüseyin ACAR'a yazarlar olarak teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Azuma, A., Kobayashi, S., Yakushui, H., Yamada, M., Mitani, N., Sato, A. 2007. VvmybA1 Genotype Determines Grape Skin Color. *Vitis Geilweilerhof* 46(3):154.
2. Azuma, A., S. Kobayashi, N. Goto Yamamoto, M. Shiraishi, N. Mitani, H. Yakushiji, 2009. Color Recovery in Berries of Grape (*Vitis vinifera* L)

- Benitaka a Bud Sport of Italia, is Caused by a Novel Allele at the VvmybA1 Locus. *Plant Sci* 176:470–478.
3. Barritt, B.H. and J. Einset, 1969. The Inheritance of Three Major Fruit Colors in Grapes. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 94:87–89.
 4. Carrasco, D., G. De Lorenzis, D. Maghradze, E. Revilla, A. Bellido, O. Failla and R. Arroyo García, 2015. Allelic Variation in the VvMYBA1 and VvMYBA2 Domestication Genes in Natural Grapevine Populations (*Vitis vinifera* subsp. *sylvestris*). *Plant Systematics and Evolution* 301(6):1613-1624.
 5. Carrier, G., L. Le Cunff, A. Dereeper, D. Legrand and F. Sabot, 2012. Transposable Elements Are a Major Cause of Somatic Polymorphism in *Vitis vinifera* L. *Plos One* 7(3):e32973.doi:10.1371/journal.pone.0032973
 6. Değirmenci, D., 2006. Sultani Çekirdeksiz ve Kalecik Karası Üzüm Çeşitlerinde Uyarılmış Mutasyon Etkilerinin Sitogenetik Tanımlanması (Doktora Tezi). Ankara Üniversitesi Fen Bil. Enst. 116s.
 7. Doligez, A., A. Bouquet, Y. Danglot, F. Lahogue, S. Riaz, C.P. Meredith and K.J. Edwards, 2002. Genetic Mapping of Grapevine (*Vitis vinifera* L.) Applied to the Detection of Qtls for Seedlessness and Berry Weight. *Theor. Appl. Genet.* 105: 780–795.
 8. Fischer, B.M., I. Salakhutdinov, M. Akkurt, R. Eibach, K.J. Edwards, R. Töpfer and E.M. Zyprian, 2004. Quantitative trait Locus Analysis of Fungal disease Resistance Factors on a Molecular Map of Grapevine. *Theor. Appl. Genet.* 108:501–515.
 9. Kobayashi, S., M. Ishimaru, K. Hiraoka and C. Honda, 2002. Myb-Related Genes of the Kyoho Grape (*Vitis labruscana*) Regulate Anthocyanins Biosynthesis. *Planta* 215:924–933.
 10. Kunter, B. ve D. Değirmenci Karataş, 2011. Asmalarda Mutasyonlar ve Mutant *Vitis vinifera* L. Çeşitleri. *YYÜ Tar. Bil. Derg.* 21(2):146–151.
 11. Lefort, François and C. Gerard Douglas, 1999. An Efficient Micro Method of DNA Isolation from Mature Leaves of Four Hardwood Tree Species Acer, Fraxinus, Prunus and Quercus. *Annals of Forest Science* 56(3):259–263.
 12. Pelsy, F., 2010. Molecular and Cellular Mechanisms of Diversity within Grapevine Varieties. *Heredity* 104:331–340.
 13. Regner, F., R. Hock and J.L. Santiago, 2006. Highly Variable Vitis Microsatellite Loci Fort the Identification of Pinot Noir Clones. *Vitis* 45(2):85–91.
 14. This, P., A. Jung, P. Boccacci, J. Borrego, R. Botta, L. Costantini, M. Crespan, G.S. Dangl, C. Eisenheld, F. Ferreira Monteiro, M.S. Grando, J. Ibanez, T. Lacombe, V. Laucou, N. Magalhaes, C.P. Meredith, N. Milani, E. Peterlunger, F. Regner, L. Zulini and E. Maul, 2004. Development of a Standard Set of Microsatellite Reference Alleles for Identification of Grape Cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*, 109:1448–1458.
 15. Van Harten, A.M., 1998. Mutation Breeding: Theory and Practical Applications. Cambridge Univ. Press. Cambridge. 353p.
 16. Velasco, R., A. Zharkikh, M. Troggio, D. A. Cartwright, A. Cestaro, D. Pruss and G. Malacarne, 2007. A High Quality Draft Consensus Sequence of the Genome of a Heterozygous Grapevine Variety. *Plos One*, 2(12):e1326.
 17. Yakushiji, H., S. Kobayashi, N. Goto Yamamoto, S. Tae Jeong, T. Sueta and N. Mitani, 2006. A Skin Color Mutation of Grapevine, from Black Skinned Pinot Noir to White Skinned Pinot Blanc, is caused by Deletion of the Functional VvmybA1 Allele. *Biosci Biotechnol Biochem* 70:1506–1508.
 18. Yanshuai, X., J. Nan, Z. Yaguang, W. Min, R. Junpeng and T. Jianmin, 2017. A SNP in the Promoter Region of the VvmybA1 Gene is Responsible for Differences in Grape Berry Color Between two Related Bud Sports of Grape. *Plant Growth Regul.* 82:457–465.