

Nar (*Punica granatum* L.)’da Bitki Boyu ile İlişkili Bir RAPD BelirteciMeryem ŞİMŞEK UÇKUN¹ , Zeynel DALKILIÇ^{*1} ¹ *Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Güney Yerleşkesi 09100 AYDIN*

Öz: Bu çalışmanın amacı, PCR-RAPD (polimeraz zincir reaksiyonu-rastgele çoğaltılmış DNA polimorfizmi) yöntemi kullanılarak bitki boyuyla ilişkili moleküler belirteçlerin belirlenmesidir. Bitki materyali olarak Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü bahçesinde bulunan bodur ve normal boylu nar bitkileri arasında melezleme ve kendileme ıslahı yöntemiyle elde edilen bitkiler kullanılmıştır. 2016 yılında *P. nana* × *P. granatum* melezlemesinde elde edilen 54 bitkinin boy ortalaması 55 cm, en kısa bitki boyu 38 cm, en uzun bitki boyu ise 79 cm olarak belirlenmiştir. *P. nana*’nın kendilenmesinde 50 bitkinin boy ortalaması 41 cm iken en kısa bitki 26 cm ve en uzun bitki 57 cm olarak ölçülmüştür. *P. granatum*’un kendilenmesinde 6 bitkinin boy ortalaması 37 cm iken, en kısa boylu bitki 30 cm, en uzun boylu bitki 42 cm’dir. Ana ebeveynin (*P. nana*) boyu 85 cm, baba ebeveynin (*P. granatum*) boyu ise 339 cm olarak ölçülmüştür. 2020 yılında yapılan ölçümlerde *P. nana* × *P. granatum* melezlemesinde 52 bitkinin boy ortalaması 184 cm iken, en kısa bitki 129 cm, en uzun bitki 250 cm boyundadır. *P. nana*’nın kendilenmesinde 44 bitkinin boy ortalaması 113 cm iken, en kısa bitki 59 cm, en uzun bitki 154 cm olarak ölçülmüştür. *P. granatum*’un kendilenmesinde 2 bitkinin boy ortalaması 173 cm iken, en kısa bitki 172 cm, en uzun bitki 174 cm’dir. Ana ebeveyn (*P. nana*) 110 cm, baba ebeveyn (*P. granatum*) ise 396 cm olarak ölçülmüştür. 2016 yılı verileri kullanılarak ana ve baba ebeveynle birlikte toplam 16 bitkinin yaprağından DNA çıkartılmıştır. RAPD primerlerini BSA ile test etmek amacıyla 7’şer melez bitkinin DNA’ları eşit miktarda karıştırılarak iki ayrı küme oluşturulmuştur. Test edilen 120 RAPD primerinden kalıcı polimorfizm gösterenler, iki kümeyi oluşturan bireyler ve ebeveyni ile birlikte analiz edilmiştir. OPM07 primerinden elde edilen 650 bp büyüklüğündeki bant ana ebeveyn, bodur nar kümesi ve bodur kendilemesindeki bitkilerde gözlenmezken; baba ebeveyn, normal boylu nar kümesi ve 4 normal boylu nar melezinde görülmüştür. Çalışma sonucunda OPM07-650 RAPD belirtecinin narda bitki boyu özelliği ile %57 ilişkili olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Punica granatum*, *P. nana*, bitki boyu, RAPD, PCR, BSA**A RAPD Marker Related to Plant Height in Pomegranate (*Punica granatum* L.)**

Abstract: The objective this study was to determine the markers related to plant height using PCR-RAPD (polymerase chain reaction-random amplified polymorphic DNA) method. As a plant material, dwarf and normal pomegranate parents and their hybrids were used in hybridization breeding and self-breeding methods located in ADU Faculty of Agriculture, Department of Horticulture. In the plant height measurements made in 2016; the height of the average, shortest, and longest plants, respectively, was in the hybridization of *P. nana* × *P. granatum*, out of 54 plants, 55 cm, 38 cm, and 79 cm; in *P. nana* selfing, out of 50 plants, 41 cm, 26 cm, and 57 cm; in *P. granatum* selfing, out of six plants 37 cm, 30 cm, and 42 cm. Female parent (*P. nana*) was 85 cm and male parent (*P. granatum*) was 339 cm. In the plant height measurements made in 2020; the height of the average, shortest, and longest plants, respectively, was in the hybridization of *P. nana* × *P. granatum*, out of 52 plants, 184 cm, 129 cm, and 250 cm; in *P. nana* selfing, out of 44 plants, 113 cm, 59 cm, and 154 cm; in *P. granatum* selfing, out of two plants 173 cm, 172 cm, and 174 cm; and female parent was 110 cm and male parent was 396 cm. DNA was extracted from the leaves of a total of 16 samples together with the parents using 2016 data. In order to test the RAPD primers, BSA was created using equal amounts of DNA of two different groups corresponding to the height of the hybrid plants. Among the 120 RAPD primers tested, the persistent bands gave polymorphisms in the bulks assessed in the further study which each individual and both parents tested for polymorphisms. The 650 bp band obtained from the OPM07 primer was not observed in the female parent, dwarf pomegranate bulk and self-pollinated dwarf plants, but that was observed in the male parent, normal height pomegranate bulk and the four normal height pomegranate hybrids. As a result of this study, OPM07-650 RAPD marker was able to determine 57% of the polymorphism in plant height characteristic in pomegranate.

Keywords: *Punica granatum*, *P. nana*, plant height, RAPD, PCR, BSA**GİRİŞ**

Nar (*Punica granatum* L., 2n=2x=16) Lythraceae (sinonim: Punicaceae) familyasına dahil, çok yıllık, ılıman, subtropik ve tropik bölgelerde yetiştirilen bir meyve türüdür. Son zamanda yapılan APG IV sistemi (Byng ve ark., 2016) çalışmalarında tek cinsle sahip olan Punicaceae familyası Lythraceae familyası içerisinde incelenmektedir. Bazı araştırmacılar *Punica* cinsini *P. granatum* L., *P. protopunica* Balf. ve *P. nana* L. olarak üç tür olarak değerlendirmekteyler (Rana ve ark., 2010). Narın anavatanının Güney Kafkasya,

İran, Afganistan, Güney Asya, Batı Asya, Anadolu ve Akdeniz arasındaki bölgeleri kapsadığı düşünülmektedir (Dokuzoğuz

***Sorumlu Yazar:** zdalkilic@adu.edu.tr Bu çalışma yüksek lisans tez ürünüdür ve Aydın ADÜ BAP birimi tarafından desteklenen ZRF-17022 numaralı yüksek lisans tezinden üretilmiştir.

Geliş Tarihi: 31 Mart 2022**Kabul Tarihi:** 28 Eylül 2022

ve Mendilcioğlu, 1978; Gözlekçi, 1997; Yılmaz, 2007; Holland ve ark., 2009; Gözlekçi, 2014; Braidı, 2015; Kahramanoğlu ve ark., 2020). Nar A tipi (erkek) ve B tipi (hermafrodit) (Onur, 1988) olmak üzere andomonoik (Wetzstein ve ark., 2011) çiçek yapısına sahiptir.

Tıbbî alanda yapılan çalışmalarda narın antioksidan içeriğinin yüksekliğinin yanında, bazı hastalıkların tedavisine yardımcı olduğu belirlenmiştir (Akçiçek ve ark., 2018). Nar tohumun toplam yağ oranı %7.9-16.0, punisik asit oranı %74-85 arasında değişmektedir (Verardo ve ark., 2014). Palmitik, stearik, arakidik ve behenik asit kapsamı sırasıyla %2.10-2.77, 1.35-2.01, 0.33-0.48 ve 0.16-0.22 arasında değişmektedir. Başlıca doymamış yağ asidi punisik asittir (%70.4-76.2) (Kıralan ve ark., 2009).

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)’na (Saiki ve ark., 1985) dayalı RAPD (Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA) yönteminin ana prensibi ilgili türe ait genomik DNA üzerinde rastgele seçilmiş tek bir 10 bp oligonükleotidi (10-mer) kullanılarak düşük bağlanma sıcaklığında rastgele olarak PCR ile çoğaltmasının yapılmasıdır. Elde edilen çoğaltma ürünü radyoaktif olmayan agaroz jel elektroforezinde yürütülür. Bantların varlığı (1) veya yokluğuyla (0) sonuç veren dominant belirteç sistemidir. RAPD yöntemi genotipler arasındaki polimorfizmi göstermekte kullanılabilir. 1990’lı yıllardan bu yana, RAPD belirteçleri farklı bitki türlerinin çeşitleri veya klonlarını tanımlamak için başarıyla kullanılmıştır (Williams ve ark., 1990; Welsh ve McClelland, 1990).

Küme açılım analizi (Bulked Segregant Analysis, BSA) genomun özel bölgeleriyle ilişkili belirteçleri tanımlamak için kullanılan bir yöntemdir. Orijini tek bir melezleme olan, izole bir popülasyondan gelen iki tane kümede DNA örneklerinin karşılaştırılmasına dayanır. Bir özellik için karşılaştırılan iki küme, kümeyi oluşturan 14-20 adet bireyi birbirinden ayıran belirteçleri saptamak için analiz edilirler. Aynı küme içerisindeki bireyler, ilgilenilen gen ya da özellik bakımından aynıdır, ancak diğer genler için farklıdır (Michelmore ve ark., 1991).

Hindistan’da ‘Ganesh’ × ‘Nana’ kombinasyonundan elde edilen F1 nar mezezi ‘Amlidana’ ismi ile tescil edilmiştir. Normale göre daha kısa boylu olması nedeniyle sık dikimli bahçelerde birim alandan elde edilecek meyve verimini artırmak amacıyla kullanılabilir (Jalılıkop, 2000).

Küçük (2003), ‘İzmir 1’, ‘İzmir 10’, ‘İzmir16’, ‘İzmir 23’, ‘İzmir 26’, ‘İzmir 1445’, ‘İzmir 1513’ çeşitleriyle yaptığı kendine tozlanma ve açık tozlanma çalışmasında, en düşük meyve tutma oranını kendine tozlanmada %10.0, açık tozlanmada %4.1 oranında ‘İzmir 1445’ çeşidinde belirlemiş, en yüksek meyve tutma oranını ise kendine tozlanmada %82.8, açık tozlanmada %94.2 oranında ‘İzmir 1513’ çeşidinde tespit etmiştir.

Hindistan’daki melezleme çalışmasında ‘Ganesh’, ‘Kabul Yellow’ doğal tip ve ‘Kabul Yellow’ rozet yapraklı mutant olmak üzere 3 nar ebeveyni kullanılmıştır. Ganesh’ çeşidinin F2 bireylerinde 0.12 frekansta rozet genotipinde bireylere rastlanmıştır. ‘Kabul Yellow’ çeşidinde ise bir adet resesif mutant klon tespit edilmiştir (Jalılıkop, 2003).

Holland ve ark. (2007) İsrail’de 40 çöğür arasından keşfedilen bir tesadüf çöğürünü Shani-Yonay ismi ile tescil ettirmişlerdir. ‘Shani-Yonay’ meyvesi, İsrail’de ağustosun üçüncü haftasında olgunlaşır. Dalları aşağıya sarkık şekilde çalimsı büyüme ve gelişme sergiler.

İran’da MTS × ND melezlemesinden elde edilen 37 adet F1 mezezi ve MTS, ND bireyleri meyve özellikleri bakımından 66 RAPD primeri ile test edilmiştir. Çalışma sonucunda %21.2 oranında polimorfizm tespit etmişlerdir. Meyve özelliklerinin genetik benzerlik ve farklılıkları tespit etmek için yeterli olmayacağı bildirilmiştir (Zamani ve ark., 2010).

2006-2009 yılları arasında Antalya’da narda melezleme çalışmaları yapılmıştır. ‘Hicaznar’ açık tozlanma (OPH), ‘Hicaznar’ × ‘Fellahyemez’ (H×F), ‘Hicaznar’ × ‘Ernar’ (H×E) ve ‘Hicaznar’ kendileme (H×H) melezleme kombinasyonları yapılmıştır. 2006’da bu kombinasyonlardan sırasıyla 26, 18, 13 ve 10 olmak üzere toplam 67 melez birey, ağaç ve meyve özellikleri bakımından ebeveynleri ile karşılaştırmışlardır. Tozlayıcı genotipin elde edilen melezler üzerinde doğrudan ve önemli etkilere sahip olduğu belirtilmiştir (Yazıcı ve Şahin, 2016).

Aksoy ve Dalkılıç (2019), ‘Tezere 35’, ‘Dr. Ercan 35’, ‘Efenar 35’ ve ‘Kamilbey 35’ nar çeşitlerinde açık tozlanma, kendine tozlanma ve karşılıklı tozlanma çalışmaları yapmıştır. En düşük meyve tutum oranı kendine tozlanmada %25.2 ve açık tozlanmada %60.1 ile ‘Tezere 35’ çeşidinde gözlemlenirken, en yüksek meyve tutum oranlarını kendine tozlanmada %62.4 ile ‘Efenar 35’ çeşidinde, açık tozlanmada %85.0 ile ‘Dr. Ercan 35’ çeşidinde gözlemlenmiştir. Melezleme çalışmalarında en yüksek meyve tutum oranını %49.7 ile ‘Kamilbey 35’ × ‘Dr. Ercan 35’ kombinasyonunda, en düşük meyve tutum oranını ise ‘Efenar 35’ × ‘Dr. Ercan 35’ kombinasyonunda olduğunu bildirmiştir. Irganlı genotipi ve ‘Hicaznar’ çeşidi arasında 28’er çiçekte karşılıklı melezleme yapmış ve Irganlı genotip × ‘Hicaznar’ kombinasyonunda hiçbir meyve tutumu gözlenmezken, ‘Hicaznar’ × Irganlı genotipi kombinasyonunda 9 adet meyve tutumu olduğu bildirilmiştir (Üstüntaş ve ark., 2019).

İran’da yapılan bir çalışmada, 24 adet nar genotipi 100 adet RAPD primeriyle test edilmiştir. Kullanılan 16 primerden polimorfik desen elde etmişler ve toplam 178 bandın 102 tanesinin polimorfik olduğu belirtilmiştir. Genotipler arasındaki genetik çeşitlilik düzeyini ortalama %57.3 oranında bulunmuştur (Sarkhosh ve ark., 2006). Ercisli ve ark. (2007) yaptıkları çalışmada ‘Çekirdeksiz’, ‘Kırmızı kabuk’, ‘Siyah nar’, ‘Nuz ekşi’, ‘Yeşil kabuk’, ‘Kırlı hanım’ çeşitleri

arasındaki yağ asidi kompozisyonundaki farklılıklar 76 RAPD primeriyle test edilmiştir. Toplamda 76 primerin 15'i polimorfik bantlar üretmiştir.

Durgac ve ark. (2008) Hatay yöresinde 6 farklı nar çeşidinde ('İncekabuk', 'Ekşi nar', 'Kan narı', 'Katırbaşı', 'Şerife', 'Tatlı') kullandıkları 100 RAPD primeriyle nar çeşitleri arasında %22 oranında polimorfizm tespit etmişlerdir.

Sarkhosh ve ark. (2009) İran'da 21 yumuşak çekirdekli nar çeşidinde 14 adet RAPD primerinden 146 toplam ve 43 adet polimorfik bant elde edilmiştir. Polimorfizm oranı ortalama %29.5 olarak belirlemişlerdir.

Narzary ve ark. (2010), Hindistan'da 87 adet narda genetik çeşitliliği belirlemek amacıyla 21 adet RAPD primeri kullanarak %92.4 oranında polimorfizm etmişlerdir.

Talebi Bedaf ve ark. (2011) yaptığı bir çalışmada 24 nar çeşidi arasındaki genetik varyasyonun karşılaştırılmasında 160 RAPD primerinden 13'ü tekrarlanabilir bantlar vermiştir. RAPD primerlerinden elde edilen toplam 131 banttan 29'u (%22.1) polimorfiktir. Ortalama PIC değeri 0.128 bulunmuştur.

Zhang ve ark. (2012) Çin'de 47 nar çeşidinde genetik çeşitliliği 11 RAPD primeri ile test etmişlerdir.

Yuan ve ark. (2018) tarafından Çin'de *P. granatum*'un ilk taslak genom haritası Black 127, 'Nana', 'Taishanhong' ve 'Wonderful' çeşitleri kullanılarak çıkarılmıştır. Nar için tahmin edilen 336 Mb uzunluğundaki genomun %81.5'i olan yüksek kaliteli 274 Mb'a karşılık gelmiştir. Bu taslak nar genom haritası N50 büyüklüğü 1.7 Mb olan 2177 adet genom omurgası (scaffold) ile 30903 gen içermektedir. Narın küfeya (*Cuphea* spp.), oya ağacı (*Lagerstroemia* spp.), *Nesaea* spp., *Rotala* spp. ve kırmızı kan çiçeği (*Lythrum* spp.) gibi *Lythraceae* familyasının bir üyesi olduğu teyit edilmiştir.

Bu çalışmanın amacı, bodur ve normal boylu nar bitkileri arasında yapılan melezlemeden elde edilen F1 bireyleri kullanılarak BSA ve RAPD yöntemi yardımıyla narda bitki boyu ile ilişkili moleküler belirteçlerin saptanmasıdır.

MATERYAL VE YÖNTEM

Bu çalışma Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Ziraat Fakültesi bahçesinde bulunan bodur nar (*P. nana*) ana, normal boylu nar (*P. granatum*) baba ve melez nar bireyleriyle yürütülmüştür. *P. nana*, 30 ila 50 cm boylanabilen, çiçekleri kırmızı-turuncu renkli, küçük nar meyveleri oluşturan çalı formunda bir bitkidir. *P. granatum*, 1-5 m boylanabilen çalı ya da ağaççık formunda, çok dallı taca sahip bir bitkidir.

Melezleme çalışmalarında elle tozlama işlemi çiçeklenme dönemi boyunca belirli aralıklarda toplam 176 çiçekte yapılmıştır. Melezlenmiş ve kendilenmiş çiçeklerden oluşan meyvelerden elde edilen tohumlar viyollerdeki perlit ortamına ekilmiştir. Çimlenen tohumlardan elde edilen çöğürler 3 litrelik plastik torbalara dikilmiş plastik örtülü

yüksek tünel içerisinde masalara yerleştirilmiştir. Daha sonra çöğürler 12 litrelik saksılara aktarılmış ve yüksek tünelin dışına büyüme ve gelişmelerine devam etmiştir. Bitkilerde boy ölçümü toprak yüzeyi ile en uçtaki yaprak arasındaki mesafe çelik şerit metreyle (cm) ölçülerek yapılmıştır. Melezlenmiş ve kendilenmiş çiçeklerden melez 7'şer adet nar bitkisinin DNA'sından eşit miktarda alınıp bitki DNA'sı içeren bodur ve normal boylu iki küme oluşturulmuştur. Oluşturulan birinci kümede en kısa boylu melez bitkiler ve ikinci kümede en uzun boylu melez bitkiler kullanılmıştır. DNA izolasyonu Doyle ve Doyle (1990), Mestav ve Dalkılıç (2007) ve Costa ve Roberts (2014)'ten değiştirilerek CTAB (%2) yöntemiyle yapılmıştır.

Çalışmada kullanılan küme açılım analizi Michelmores ve ark. (1991)'ne göre yapılmıştır. Bodur narın kendilenmesinden elde edilen 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 numaralı bireyler (7 adet) ve *P. nana* × *P. granatum* melezlemeden elde edilen 29, 35, 40, 42, 48, 50, 54 numaralı bireyler (7 adet) ile ana ve baba ebeveyn olmak üzere toplam 16 bireyin DNA'sı ayrı ayrı çıkartılmıştır. Yukarıda bahsedilen melez 7'şer adet nar bitkisinin DNA'sından eşit miktarda alınıp bitki DNA'sı içeren bodur ve normal boylu iki küme oluşturulmuştur.

PCR çözümü hazırlanmasında her bir örnek için 1.5 µl 10× tampon (buffer), 0.6 µl MgSO₄, 1 µl 3 mM dNTP, 1 µl primer, 0.2 µl Taq DNA polimeraz, 6 µl genomik DNA kullanılmış ve üzerine karışımı 15 µl'ye tamamlamak için 4.7 µl steril ddH₂O eklenmiştir. Hazırlanan tüpler bekletilmeden PCR cihazına yerleştirilmiştir. PCR cihazında: 4 dak 94°C, 25 s 94°C, 45 s 35°C, 1 dak 72°C, 34 döngü 5 dak 72°C programı ile çoğaltılmıştır. Çalışmada OPA1-20, OPB1-20, OPC1-20, OPD1-20, OPH1-20, OPM1-20 (Operon Technologies) olmak üzere 120 adet 10-mer uzunluğunda RAPD primeri kullanılmıştır. RAPD-PCR analizi polimorfizm gösteren primerler ile üç kez tekrarlanmıştır. PCR ürünleri %1.8'lik agaroz jelde ABM SafeView ile boyanmış, 90 V'ta 35-50 dak süresince yürütülmüş ve UV ışık altında fotoğraflanmıştır. PCR analizleri sonrasında DNA bantlarında DNA'nın var olması durumunda "1", olmaması durumunda ise "0" değerleri verilerek DNA bantları skorlanmış ve RAPD analizlerinde polimorfik bantlar kullanılmıştır.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Bitki Boyu Analizi:

2016 yılında yapılan ölçümlerde *P. nana* × *P. granatum* melezlemede 54 bitkinin boy ortalaması 55 cm iken, en kısa boylu bitki 38 cm, en uzun boylu bitki 79 cm olarak belirlenmiştir. *P. nana*'nın kendilenmesinde 50 bitkinin boy ortalaması 41 cm iken en kısa bitki 26 cm ve en uzun bitki 57 cm olarak ölçülmüştür. *P. granatum*'un kendilenmesinde 6 bitkinin boy ortalaması 37 cm iken, en kısa boylu bitki 30 cm, en uzun boylu bitki 42 cm olmuştur. Ana ebeveyn (*P. nana*) 85 cm, baba ebeveyn (*P. granatum*) ise 339 cm olarak ölçülmüştür (Çizelge 1).

Çizelge 1. *P. nana* × *P. granatum* melezlemesinden, *P. nana*’ın ve *P. granatum*’un kendilenmesinden elde edilen bitkiler ile ana ve baba ebeveynin boy ölçümü (cm) (2016)

No	<i>P. nana</i> × <i>P. granatum</i>		<i>P. nana</i>		<i>P. granatum</i>	
	N o bitki boyu (cm)	N o bitki boyu (cm)	N o bitki boyu (cm)	N o bitki boyu (cm)	N o bitki boyu (cm)	N o bitki boyu (cm)
29	54	1	26	1	30	
35	52	2	27	2	35	
40	50	3	30	3	38	
42	49	4	31	4	38	
48	47	5	32	5	39	
50	45	6	32	6	42	
54	38	7	33			
Ana	85					
Baba	339					

2020 yılında yapılan ölçümlerde *P. nana* × *P. granatum* melezlemesinde 52 bitkinin boy ortalaması 184 cm iken, en kısa bitki 129 cm, en uzun bitki 250 cm olarak saptanmıştır. *P. nana*’nın kendilenmesinde 44 bitkinin boy ortalaması 113 cm iken, en kısa bitki 59 cm, en uzun bitki 154 cm olarak ölçülmüştür. *P. granatum*’un kendilenmesinde 2 bitkinin boy ortalaması 173 cm iken, en kısa bitki 172 cm, en uzun bitki 174 cm olmuştur. Ana ebeveyn (*P. nana*) 110 cm, baba ebeveyn (*P. granatum*) ise 396 cm olarak ölçülmüştür.

RAPD Analiz Sonuçları:

Denemede kullanılan 120 adet 10-mer uzunluğunda RAPD primerinin 16 bireyde test edilmesiyle toplam 491 adet bant elde edilmiştir. Bu bantların 27 adedi polimorfik (%5.5), 464 adedi ise monomorfik (%94.5) olarak belirlenmiştir. Test edilen primerlerden OPA-10, OPB-2, OPB-3, OPD-1, OPD-17, OPH-10, OPH-20, OPM-1, OPM-20 PCR ürünü oluşturmamış ve kalan 111 primer farklı büyüklüklerde bant oluşturmuştur.

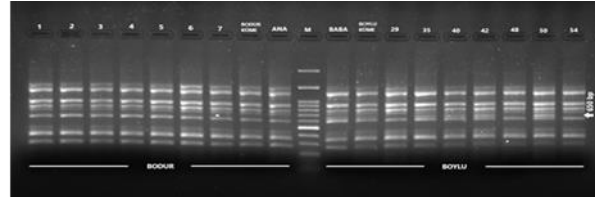
Bodur ve Normal Boylu Kümede Polimorfik Bantların Analizi:

Bodur ve normal boylu kümelerde polimorfizm gösteren RAPD primerleri, bodur kümeyi oluşturan 7 birey, bodur küme, ana ebeveyn, normal boylu kümeyi oluşturan 7 birey, normal boylu küme, baba ebeveynde ayrı ayrı test edilmiş ve sadece OPM7 primeri kalıcı polimorfizm göstermiştir.

Bitki Boyuna Bağlı Olan Polimorfik RAPD Primerinin Analizi:

Çalışmada kullanılan bodur ve normal boylu bireyler arasındaki boy farklılığı bant seviyelerine göre değerlendirilmiştir. OPM07 primerinde yaklaşık 650 bp büyüklüğündeki “bant 7”, bodur birey, bodur küme, ana

ebeveynde ve normal boylu bitkilerden 29, 48, 54 numaralı bireylerde gözlenmezken, baba ebeveyn, normal boylu küme, 35, 40, 42, 50 numaralı bireylerde gözlenmiştir. OPM07 primeri 1200-375 bp büyüklüğü arasında 9 monomorfik ve 1 polimorfik toplam 10 bant oluşturmuştur (Şekil 1). Fenotipik olarak boy özelliklerine göre bodur ve normal boylu olarak sınıflandırılmış olan bu bireylerde gözlenen bantın boyla ilgili olduğu ve boy ile %57 oranında ilişkili olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 1. OPM07 RAPD primerinin nar bitkilerindeki bant görüntüsü. Sütun 1-7: No. 1-7 arası bodur kümeyi oluşturan bireyler, 8: Bodur Küme, 9: Ana (*P. nana*), 10: M: 100 bp DNA standardı, 11: Baba (*P. granatum*), 12: Boylu Küme, 13: No. 29-54 arası boylu kümeyi oluşturan bireyler

TARTIŞMA

Yapılan kaynak taraması sonucunda narda farklı çeşitlerde yapılan melezleme çalışmalarından farklı sonuçlar elde edilmiştir. Jalikop (2003), ‘Ganesh’, ‘Kabul Yellow’ doğal tip ve ‘Kabul Yellow’ rozet yapraklı mutant olmak üzere 3 nar çeşidinde yaptığı melezleme çalışmasında, ‘Ganesh’ çeşidinin F2 bireylerinde rozet genotipinde bireylere rastladığını, ‘Kabul Yellow’ çeşidinde ise bir adet resesif mutant klon tespit ettiğini bildirmiştir. Ayrıca aynı araştırmacı, 2000 yılında yaptığı çalışmada, ‘Ganesh × ‘Nana çeşitlerinde melezleme çalışmalarından normale göre daha kısa boylu, iklim şartlarına uyum sağlayan Amlidana çeşidini elde etmiştir.

Zamani ve ark. (2010) İran’da (‘Malase-Tourshe-Saveh’) MTS × (‘Narm-Dane’) ND melezlemesinden 37 adet bitki elde etmişler. Aksoy ve Dalkılıç (2019) yaptıkları melezleme çalışmalarında en yüksek meyve tutma oranını %49.7 ile ‘Kamilbey 35’ × ‘Dr. Ercan 35’ kombinasyonunda, en düşük meyve tutma oranını ise ‘Efenar 35’ × ‘Dr. Ercan 35’ kombinasyonunda olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada bodur ile normal boylu arasında yapılan melezleme ve kendileme çalışmalarından *P. nana* × *P. granatum* melezlemelerinden 71 adet meyve, *P. nana*’nın kendilenmesinden 8 adet meyve, *P. granatum*’un kendilenmesinden ise 8 adet meyve elde edilmiştir. Yapılan kaynak taraması sonucunda narda bitki boyuyla ilgili az sayıda çalışmaya ulaşılmıştır. Farklı bitki türlerinde boy ile ilgili yapılan çalışmalarda farklı belirteçler tespit edilmiştir. Harel-Beja ve ark. (2015) narda yaptıkları meyve özellikleriyle ilgili QTL haritalama çalışmasında bitki boyu, meyve ağırlığı, meyve çapı, tane ağırlığı ve SÇKM ile ilişkili

buldukları QTL'lerin LG2 kromozomunda birbirlerine yakın olarak yerleşmiş olduklarını belirlemişlerdir. Çeltikte yapılan bir çalışmada bitki boyunun meyve özellikleri üzerinde pleiotropik bir etkiye sahip olduğunu belirtmiştir (Zhang ve ark., 2006; Yan ve ark., 2011). Muzda yapılan bir çalışmada 57 normal-59 bodur bireyde 66 RAPD primeri test edilmiş, bunlardan OPJ-04 primerinden 1.5 kb bant uzunluğunda %28.8 oranında boya bağlı polimorfizm tespit edilmiştir (Damasco ve ark., 1996; Ramage ve ark., 2004).

SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada *P. nana* × *P. granatum* bitkilerinde yapılan melezleme çalışmaları sonucu elde edilen bireyler arasından seçilen 14 adet F1 bitkisinde BSA kullanılarak, RAPD yönteminden yararlanılarak OPM07 primerinden 650 bp büyüklüğünde boya %57 ilişkili belirteç (OPM07-650) tespit edilmiştir. RAPD ve diğer moleküler belirteç yöntemlerinden yararlanılıp daha fazla belirteç bulunarak nar genomu üzerinde bitki boyu ile ilişkili yerlerin haritalanması çalışmaları yapılabilecektir. Moleküler belirteçlerin kullanımı, uzun süren bitki ıslah çalışmalarından daha çabuk, etkili ve güvenilir sonuçlar alınabilmesi açısından önem kazanmaktadır. Bu çalışma, ileride yapılacak çalışmalarda RAPD veya diğer moleküler belirteç sistemleri kullanılarak boy ve diğer morfolojik özellikler ile ilişkili daha yüksek sayıda moleküler belirtecin belirlenmesinde ve genom üzerinde haritalandırılmasında yararlı olabilecektir.

TEŞEKKÜR

Yazarlar, ADÜ'den Dr. Bülent BOZDOĞAN, Dr. Nezh ATA, Dr. Adem YAVAŞ, Zir. Yük. Müh. Ahmet Rıza AĞIR, Zir. Yük. Müh. Dilek KAYA YILMAZ, Zir. Yük. Müh. Pelin ÇAMOĞLU KONAK ve İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü (İYTE) Doğanlar-Frary Lab.'dan Tülin TAŞCIOĞLU'na DNA çıkartılması ve PCR analizlerindeki yardımları için ve ADÜ-TARBİYOMER'e denemenin laboratuvar bölümünün yürütülmesi için tanıdığı imkândan dolayı teşekkür ederler. Yüksek lisans tezinden hazırlanan bu çalışma ADÜ BAP ZRF-17022 numaralı proje ile desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

- Akçiçek E, Kayalar H, Ötleş S (2018) Nar Sağlıkta Yıldız. Gece Kitaplığı, Ankara, 392 S.
- Aksoy D, Dalkılıç Z (2019). Determination of blooming pollen and fruit set characteristics in *Punica granatum*. Not. Bot. Horti. Agrobi. Cluj-Napoca, 47(4): 1258-1263.
- Braidy N (2015) Pomegranates: Old Age Remedy for Today's Diseases. Nova Science Publishers, Inc., Hauppauge, NY, USA.
- Byng JW, Chase MW, Christenhusz MJM, Fay MF, Judd WS, Mabberley DJ, Sennikov AN (2016) An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the

orders and families of flowering plants: APG IV. Botanical Journal of the Linnaeus Society, 181: 1-20.

- Costa CM, Roberts RP (2014) Techniques for improving the quality and quantity of DNA extracted from herbarium specimens. Phytoneuron, 48:18.
- Damasco OP, Graham GC, Henry RJ, Adkins SW, Smith MK, Godwin ID (1996) Random amplified polymorphic DNA (RAPD) detection of dwarf off-types in micropropagated Cavendish (*Musa* spp. AAA) bananas. Plant Cell Reports, 16:118-123.
- Dokuzoğuz M, Mendilcioğlu K (1978) Ege bölgesi nar çeşitleri üzerinde pomolojik çalışmalar. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 15(2):133-157.
- Doyle JJ, Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus, 12(1):13-15.
- Durgac C, Ozgen M, Simsek O, Aka Kacar Y, Kiyga Y, Celebi S, Gunduz K, Serce S (2008) Molecular and pomological diversity among pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars in Eastern Mediterranean region of Turkey. African Journal of Biotechnology, 7:1294-1301.
- Ercisli S, Agar G, Orhan E, Yildirim N, Hizarci Y (2007) Interspecific variability of RAPD and fatty acid composition of some pomegranate cultivar (*Punica granatum* L.) growing Southern Anatolia Region in Turkey. Biochemical Systematics and Ecology, 35:764-769.
- Gözlekçi S (1997) Hicaznar (*Punica granatum* cv. Hicaznar) çeşidinin dölleme meyve gelişimi ve olgunlaşması üzerine araştırmalar. Doktora Tezi (basılmamış). Akdeniz Üniv. Fen Bil. Ens. Bahçe Bitkileri ABD, Antalya, 154 S.
- Gözlekçi S (2014) Dünyada ve Türkiye'de nar yetiştiriciliği. Nar Çalıştayı, T. C. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, 24-25 Kasım, Antalya, s: 11-21.
- Harel-Beja R, Sherman A, Rubinstein M, Eshed R, Bar-Ya'akov I, Trainin T, Ophir R, Holland D (2015) A novel genetic map of pomegranate based on transcript markers enriched with QTLs for fruit quality traits. Tree Genetics and Genomes, 11:109.
- Holland D, Hatib K, Bar-Ya'akov I (2009) Pomegranate: Botany, Horticulture, Breeding. Horticultural Reviews, 35:127-191.
- Holland D, Hatib K, Bar-Ya'akov I, Yonay E, Abd El Hadi F (2007) 'Shani-Yonay' pomegranate. Horticultural Science, 42(3):710-711.
- Jalilop SH (2000) Amlidana: a new pomegranate hybrid. Indian Horticulture, 47:22-23.
- Jalilop SH (2003) Rosetted siblings in F2 of a cross in pomegranate (*Punica granatum* L.) can be useful

- model for rosetting investigations. *Euphytica*, 131:333-342.
- Kahramanoglu I, Usanmaz S, Alas T (2020). Advances in breeding and cultivation of pomegranate. In: *Achieving Sustainable Cultivation of Tropical Fruits* (Ed: Yahia EM), Burleigh Dodds Science Publishing Limited, pp. 569-496, Cambridge, UK.
- Kıralan M, Gölükcü M, Tokgöz H (2009) Oil and conjugated linolenic acid contents of seeds from important pomegranate cultivars (*Punica granatum L.*) grown in Turkey. *Journal American Oil Chemists’ Society*, 86:985-990.
- Küçük E (2003) Bazı nar (*Punica granatum L.*) çeşitlerinin kendine verimlilik durumlarının saptanması. Yüksek Lisans Tezi (basılmamış). Ege Üniv. Fen Bil. Ens. Bahçe Bitkileri ABD, İzmir, 38 S.
- Mestav HO, Dalkılıç Z (2007) Bazı erkek incir çeşitlerinin RAPD belirteçleri ile tanımlanması. *ADÜ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 4(1-2):49-58.
- Michelmore RW, Paran I, Kesseli RV (1991) Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 88:9828-9832.
- Narzary D, Rana TS, Ranade SA (2010) Molecular analyses of genetic diversity in Indian pomegranates using RAPD, DAMD and ISSR. *Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology*, 4(Special issue 2):126-143.
- Onur C (1988) Nar. *Derim*, 5(Özel Sayı:4): 147-191.
- Ramage CM, Borda SD, Hamil SD, Smith MK (2004) A simplified PCR test for early detection of dwarf off-types in micropropagated Cavendish bananas (*Musa spp.* AAA). *Scientia Horticulturae*, 103:145-151.
- Rana TS, Narzary D, Ranade SA (2010) Systematics and taxonomic disposition of the genus *Punica L.* *Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology*, 4(Special Issue 2):19-25.
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985) Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230:1350-1354.
- Sarkhosh A, Zamani Z, Fatahi R, Ebadi A (2006) RAPD markers reveal polymorphism among some Iranian pomegranate (*Punica granatum L.*) genotypes. *Scientia Horticulturae*, 111:24-29.
- Sarkhosh A, Zamani Z, Fatahi R, Ranjbar H (2009) Evaluation of genetic diversity among Iranian soft-seed pomegranate accessions by fruit characteristics and RAPD markers. *Scientia Horticulturae*, 121:313-319.
- Talebi Bedaf M, Bahar M, Sharifnabi B, Yamchi A (2011) Evaluation of genetic diversity among Iranian pomegranate (*Punica granatum L.*) cultivars, using ISSR and RAPD markers. *Taxonomy and Biosystematics*, 3(8):35-44.
- Üstüntaş T, Dalkılıç Z, Günver-Dalkılıç G (2019) Effect of stigma exudate on pollen germination in pomegranate. *Acta Horticulturae*, 1254:109-113.
- Verardo V, Garcia-Salas P, Baldi E, Segura-Carretero A, Fernandez-Gutierrez A, Caboni AF (2014) Pomegranate seeds as a source of nutraceutical oil naturally rich in bioactive lipids. *Food Research International*, 65:445-452.
- Welsh J, McClalland M (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*, 18(24): 7213-7218.
- Wetzstein HY, Ravid N, Wilkins E, Martinelli AP (2011) A Morphological and histological characterization of bisexual and male flower types in pomegranate. *Journal of American Society for Horticultural Science*, 136(2):83-92.
- Williams JGK, Kubelik AE, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SC (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18:6531-6535.
- Yan W-H, Wang P, Chen H-X, Zhou H-J, Li Q-P, Wang C-R, Ding Z-H, Zhang Y-S, Yu S-B, Xing Y-Z, Zhang Q-F (2011) A major QTL, *Ghd8*, plays pleiotropic roles in regulating grain productivity, plant height, and heading date in rice. *Molecular Plant*, 4:319-330.
- Yazıcı K, Şahin A (2016) Characterization of pomegranate (*Punica granatum L.*) hybrids and their potential use in further breeding. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 40:813-824.
- Yılmaz C (2007) Nar. *Hasad Yayıncılık Ltd. Şti.*, İstanbul, 176 S.
- Yuan Z, Fang Y, Zhang T, Fei Z, Han F, Liu C, Liu M, Xiao W, Zhang W, Wu S, Zhang M, Ju Y, Xu H, Dai H, Liu Y, Chen Y, Wang L, Zhou J, Guan D, Yan M, Xia Y, Huang X, Liu D, Wei H, Zheng H (2018) The pomegranate (*Punica granatum L.*) genome provides insights into fruit quality and ovule developmental biology. *Plant Biotechnology Journal*, 16(7):1363-1374.
- Zamani Z, Zarei A, Fatahi R (2010) Characterization of progenies derived from pollination of pomegranate cv. *Malase-Tourshe-Saveh* using fruit traits and RAPD molecular marker. *Scientia Horticulturae*, 124:67-73.

Zhang Y, Luo L, Xu C, Zhang Q, Xing Y (2006) Quantitative trait loci for panicle size, heading date and plant height co-segregating in trait performance derived near-isogenic lines of rice (*Oryza sativa*). *Theoretical and Applied Genetics*, 113:361-368.

Zhang YP, Tan HH, Cao SY, Wang XC, Yang G, Fang JG (2012) A novel strategy for identification of 47 pomegranate (*Punica granatum*) cultivars using RAPD markers. *Genetics and Molecular Research*, 11(3):3032-3041.

