

[EK-11](#)

**BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ KOORDİNASYON BİRİMİ
KOORDİNATÖRLÜĞÜNE**

Proje No: 09B4347002

Proje Yöneticisi: Prof. Dr. Gökhan Söylemezoğlu

Proje Konusu: Asmalarda Külleme ve Mildiyö Hastalıklarına Dayanıklı Çeşit Islahında Marköre Dayalı Seleksiyon (Marker Assisted Selection-MAS) Yöntemi ile Hızlandırılmış Seleksiyon

Yukarıda bilgileri yazılı olan projemin kesin raporunun e-kütüphanede yayınlanmasını;

İstiyorum

İstemiyorum

...../...../.....

Proje Yöneticisi
İmza

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJESİ
KESİN RAPORU**

Proje başlığı:

Asmalarda Külleme ve Mildiyö Hastalıklarına Dayanıklı Çeşit Islahında Marköre Dayalı Seleksiyon
(Marker Assisted Selection-MAS) Yöntemi ile Hızlandırılmış Seleksiyon

Proje yürütücüsü:

Prof. Dr. Gökhan Söylemezoğlu

Proje yardımcı araştırmacıları:

Prof. Dr. Ali Ergül
Yard. Doç. Dr. Murat Akkurt
Yard. Doç. Dr. Atilla Çakır

Proje No:

09B4347002

Başlangıç tarihi: 15.05.2009

Bitiş tarihi: 15.06.2012

Rapor tarihi: 30.07.2012

**Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Ankara - " 2012 "**

I. Projenin Türkçe adı: Asmalarda Külleme ve Mildiyö Hastalıklarına Dayanıklı Çeşit İslahında Marköre Dayalı Seleksiyon (Marker Assisted Selection-MAS) Yöntemi ile Hızlandırılmış Seleksiyon

Özet

Külleme ve mildiyö hastalıklarına dayanıklı yeni ve kaliteli üzüm çeşitlerinin ıslahı amacıyla başlatılan projede, ülkemizin mantar kökenli hastalıklara karşı hassas ancak çok kaliteli kırmızı şaraplık üzüm çeşitlerinden olan “Kalecik Karası” ve “Boğazkere” çeşitleri ile Almanya Geilweilerhof Asma Islahı Enstitüsünde külleme ve mildiyö hastalıklarına dayanıklı olarak ıslah edilen, kaliteli, kırmızı şaraplık üzüm çeşidi “Regent” çeşitlerinin melezlenmesinden oluşan, “Kalecik Karası x Regent” ve “Boğazkere x Regent” olmak üzere iki adet melezleme kombinasyonu kullanılmıştır. Projede iki yıl üst üste yürütülen melezlemeler ve elde edilen hibrit tohumların (çekirdeklerin) bitkiye dönüştürülmesi çalışmaları sonucunda “Boğazkere x Regent” kombinasyonunda 695 adet, “Kalecik Karası x Regent” kombinasyonunda 68 adet F1 bitkisi elde edilmiştir. “Boğazkere x Regent” kombinasyonunda sağlıklı gelişen 165, “Kalecik Karası x Regent” kombinasyonunda 27 adet F1 bitkisi seçilmiş ve külleme ve mildiyö hastalıklarına dayanıklılıkla ilişkili markörler ile PCR analizleri yapılarak, söz konusu hastalıklara dayanıklı olma olasılığı yüksek fenotipler, Marköre Dayalı Seleksiyon (MDS= Marker-Assisted Selection:MAS) tekniği ile erken dönemde teşhis edilmiştir.

MDS sonucu “Boğazkere x Regent” melezleme populasyonunda F1 bitkilerinden 24 adeti hastalıklara dayanımla ilişki hiçbir markör ile pozitif sonuç vermediği için erken seleksiyonla ıslah çalışmalarından elenmiştir. Toplam 108 adet F1 en az 1 veya 2 markör ile pozitif sonuç verdiği için ümitvar olarak ikinci aşamaya alınmışlardır. **MDS sonrası 36 adet F1 bitkisi ise 3 ve daha fazla markör ile pozitif sonuç verdikleri için hastalıklara dayanıklı olma olasılıkları yüksek olduğu gerekçesiyle erken seleksiyon ile dayanıklı çeşit adayları olarak seçilmişlerdir.** “Kalecik Karası x Regent” populasyonunda 10 numaralı birey dışındaki tüm F1 bitkileri en az bir markör yönüyle pozitif olduklarından ümitvar olarak seçilmişlerdir.

Projenin İngilizce adı: An accelerated selection via Marker-Assisted Selection (MAS) method for Resistant Cultivars Breeding in grapevine against powder and downy mildew

Abstarct:

This project was initiated for improvement of quality grape varieties resistant to powder and downy mildew. For this purpose used two crossing population of "Kalecik Karası x Regent" and "Boğazkere x Regent" which consist the cross between good quality, but susceptible to fungal diseases red wine grape varieties of our country "Kalecik Karası" and "Boğazkere" and high quality red wine grape variety "Regent" which are bred to be durable resistant against powder and downy mildew in Grapevine Breeding Institute of Geilweilerhof in Germany.

The project carried out in two consecutive years. As a result of hybridization study in "Boğazkere x Regent" combination 695 and in "Kalecik Karası x Regent" combination 68 F1 plants were obtained. In "Boğazkere x Regent," combination 165 and in "Kalecik Karası x Regent" combination 27 healthy developed progeny were selected for the PCR analyses. The selected progenys were screened with use of PCR markers associated against powdery and downy mildew resistant. As a results of Marker-Assisted Selection (MAS) technique high probability of being resistant phenotypes were selected in the early period.

According to MAS in "Boğazkere x Regent" population 24 of F1 plants was eliminated in the early selection because they have not positive results with any of resistant correlated markers. A total of 108 F1 were selected to the second stage of breeding work they have at least gives a positive result with one or two markers. After MAS 36 of F1 plant were given a positive results with three or more markers correlated disease resistant. They have been selected as an resistant varieties candidates with early selection. In "Kalecik Karası x Regent" population have been selected all F1 progenies except the F1 number 10 to the second stage of breeding work that all of the F1 plants gave positive results with at least one marker.

II. Amaç ve Kapsam:

Ülkemizin bağcılık konusunda dış pazarda rekabet şansını sürdürmesi, geleneksel yöntemlerin yanı sıra, bitki biyoteknolojisi alanındaki gelişmelerden de yararlanarak, yeni ve kaliteli üzüm çeşitlerinin elde edilmesine bağlıdır. Ülkemizde yeni üzüm çeşitlerinin elde edilmesine yönelik çalışmalar halen geleneksel melezleme ıslahı yöntemi ile yürütülmektedir. Ülkemizde ve dünyada bağcılığı sınırlandıran en önemli faktörlerden ikisi külleme (*Erysiphe necator*) ve mildiyö (*Plasmopora viticola*) mantar kökenli hastalıklarıdır. Ülkemizde külleme ve mildiyö hastalıklarına dayanıklı yeni çeşit geliştirilmesine yönelik Tekirdağ Bağcılık Araştırma Enstitüsünde 1986 yılında başlatılan çalışmalarda günümüze kadar bir adet aday tescil edilmek üzere Gıda Tarım ve hayvancılık Bakanlığına bildirilmiştir. Bunun nedeni geleneksel melezleme ıslahı yöntemi ile yeni çeşit geliştirmenin yoğun iş gücü, geniş alan ve uzun süreler gerektirmesidir.

Geleneksel melezleme ıslahı yöntemini zorlaştıran dezavantajları ortadan kaldırmak amacıyla son yıllarda biyoteknolojik yöntemlerden yararlanılmaktadır. Marköre Dayalı Seleksiyon (MDS) yöntemi ile arzu edilen karakterler ile bağlantılı moleküler markörler asma ıslahında kullanılarak, daha kesin sonuçlara, çok daha kısa sürede ulaşmak mümkündür. Bu bilgiler ışığında projenin amaçları aşağıdaki gibidir:

- 1) Asmanın heterozigotik kalıtsal yapısının sonucu F1 bitkilerinde geniş bir açılım görülmekte, bu da melezleme sonrası popülasyonda arzu edilen özellikteki bireylerin sayısının çok düşük olmasına neden olmaktadır. **MDS yöntemi ile mantari hastalıklara dayanımla bağlantılı moleküler markörler kullanarak çok sayıda F1 bitkisini, çok daha kısa sürede taramak ve dayanıklı bireylerin frekansını artırmak,**
- 2) Klasik yöntemler ile melezleme sonrasında F1 bitkilerinde dayanıklı bireylerin gözlemlenerek seçilmesi, asmada görülen uzun gençlik kısırlığı süresi nedeniyle ancak 4.-5. yıllarda mümkün olabilmektedir. Bu nedenle geleneksel melezleme ıslahı çalışmalarının sonuçlanması uzun yıllar almaktadır (15-25 yıl). **MDS yöntemi ile melezlemenin ardından dayanıklı bireyleri moleküler markörler kullanarak seçmek ve ıslah sürecini önemli ölçüde kısaltmak,**
- 3) **Zamandan, iş gücünden ve alan kullanımından tasarruf edilerek, ıslah çalışmalarının çok daha verimli ve ekonomik olmasını sağlamak,**
- 4) **Projenin devamındaki çalışmalar sonrası yeni ve dayanıklı bireylerin tescil edilmesi sonucu, hastalıklardan korunma amaçlı kullanılan kimyasal mücadele ilaçlarının miktarını minimum seviyeye indirmek, kimyasal kullanımından kaynaklanan masraf ve çevre kirliliğini önemli ölçüde azaltmak amaçlanmıştır.**

III. Materyal ve Yöntem

1. Materyal temini ve hibrit bitkilerin eldesi

Çalışma 2009-2012 yılları arasında Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü Araştırma ve Uygulama Bağı, Ziraat Fakültesi Kalecik Bağcılık Araştırma İstasyonu, Çengeller Yazısı Kibrit Deresi Mevkii No:1 Kalecik adresindeki BAK Şarapçılığa ait bağ, Bahçe Bitkileri Bölümü seraları ve Bahçe Bitkileri Bölümü Moleküler Biyoloji ve Hasat Sonrası Fizyoloji laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

Projenin melezleme ıslahı çalışmalarında bitkisel materyal olarak; ülkemizin mantar kökenli hastalıklara karşı hassas ancak çok kaliteli kırmızı şaraplık üzüm çeşitlerinden olan “Kalecik Karası” ve “Boğazkere” çeşitleri ile Almanya Geilweilerhof Asma İslahı Enstitüsünde külleme ve mildiyö hastalıklarına dayanıklı olarak ıslah edilen, kaliteli, kırmızı şaraplık üzüm çeşidi “Regent” çeşitleri kullanılmıştır. Araştırmada “Kalecik Karası x Regent” ve “Boğazkere x Regent” olmak üzere iki adet melezleme kombinasyonu oluşturulmuştur.

Proje kapsamında melezleme çalışmalarında ana ebeveyn olarak seçilen çeşitlerden “Kalecik Karası” na ait Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Araştırma Uygulama bağı, “Boğazkere” çeşidine ait BAK Şarapçılığa ait bağ ve baba ebeveyn olarak seçilen “Regent” çeşidine ait Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Kalecik Araştırma ve Uygulama İstasyonu bağından 20’şer adet sağlıklı omca seçilerek işaretlenmiştir.

1.1 Ana ebeveynlere ait salkımların emaskulasyonu ve emaskule edilmiş salkımların izolasyonu:

Ana çeşitlere ait salkımlarda, kendi çiçek tozlarıyla döllenmenin önlenmesi amacıyla çiçeklenme başlangıcından önce emaskulasyon işlemi yapılmıştır. Bu işlem, taç halkası (korolla)’nın yaklaşık 2 mm’lik kısmının erkek organ başçıkları ile birlikte kesilip atılması suretiyle gerçekleştirilmiştir. Emaskulasyon işlemi salkımlar üzerinde 100-150 adet çiçek dişi organ kalacak şekilde tamamlanmış, ardından geriye kalan çiçekler kesilip atılarak salkımdan uzaklaştırılmıştır.

Emaskule edilen salkımlar 25 x 30 cm ebatlarında parşömen keseler içine alınarak, yabancı tozlanmaya karşı izole edilmişlerdir. Her bir salkımın üzerine emaskulasyon tarihi ve çeşidin adı yazılı etiketler asılmıştır (Şekil 1).



Şekil 1: Emaskulasyon işlemi tamamlandıktan sonra parşömen kese kağıdı ile izole edilmiş Kalecik Karası üzüm çeşidine ait salkımın deneme omcası üzerindeki görünüşü.

1.2 Emaskule edilen salkımların tozlanması ve izolasyonu:

Emaskulasyon işleminden sonra izole edilen salkımların çiçek tozu kabul etme durumları, emaskulasyonu takip eden iki üç gün içerisinde kese kağıtları açılıp, çiçeklerin dişicik tepeleri kontrol edilerek belirlenmiştir. Dişicik tepesinde şekerli beyaz damlacık görüldüğü anda, babalık çeşide ait çiçek tozlarının bir suluboya fırçası yardımıyla ana çeşidin dişi organı üzerine serpilmesi suretiyle tozlama gerçekleştirilmiştir (Şekil 2). Bu şekilde melezlenen salkımlar yabancı tozlanmaya karşı parşömen kese kağıtları içerisine alınarak yeniden izole edilmişlerdir. Birinci tozlamayı takip eden iki günde, yukarıda açıklanan işlemler tekrarlanarak salkımlarda ikinci ve üçüncü tozlama işlemi yapılmıştır.

Bağ içerisindeki tüm üzüm çeşitlerinde tozlanma ve dölleme olaylarının tamamlanıp, tane tutumunun gerçekleşmesinin görülmesinden sonra, izole edilen melez salkımlarda keseler açılarak salkımlara etiketleri asılmıştır. Ardından melezleme yapılan salkımlarda hasat zamanına kadar olgunluk düzenli olarak takip edilmiştir.



Şekil 2: ‘Regent’ üzüm çeşidine ait çiçek tozları ile Kalecik Karası çeşidine ait emaskule edilmiş bir salkımın tozlanmasına ait görüntü

1.3 Melezlenen salkımların hasadı ve çekirdeklerin çıkartılması:

Melezleme yapılan “Kalecik Karası x Regent” kombinasyonu ve “Boğazkere x Regent” kombinasyonuna ait salkımlar olgunlaşmanın ardından etiketleriyle birlikte hasat edilmişlerdir. Hasat edilen üzüm tanelerinden, hibrit çekirdekler çıkartılarak meyve etinden iyice arındırılmış, yıkanıp temizlenmişlerdir (Şekil 3).



Şekil 3: Melez salkımlardan hibrit çekirdeklerin çıkarılma işlemine ait bir görüntü

Çekirdekler mantari enfeksiyonlara karşı fungusit (300 gr/100 lt) ile muamele edilerek, gölgede kurumaya bırakılmışlardır. Kurutulan hibrit tohumlar, 250'şerlik gruplar halinde petri kaplarına alınarak etiketlenmiş ve katlama tarihine kadar oda sıcaklığında muhafazaya alınmışlardır (Şekil 4).



Şekil 4: Katlama zamanına kadar petri kaplarında muhafaza edilen “Boğazkere x Regent” kombinasyonuna ait melez tohumların görüntüsü.

1.4 Hibrit Tohumların Katlanması

Her iki melezleme kombinasyonundan elde edilen hibrit tohumlar katlamaya alınmışlardır. Bu amaçla katlamada kullanılacak dere kumu elekten geçirildikten sonra otoklavlanarak sterilize edilmiş, nemlendirildikten sonra 18 x 10 x 7 cm ebatlarındaki şeffaf plastik kaplara doldurulmuştur. Hibrit tohumlar mantari enfeksiyonlara karşı fungusitle ilaçlanmış ve ardından katlama ortamına serilmişlerdir. Üzerleri nemli dere kumu ile örtüldükten sonra sıcaklığı +5 C⁰'ye ayarlanmış inkübatörlerde katlamaya alınmışlardır.

1.5 Hibrit tohumların katlamadan çıkarılması

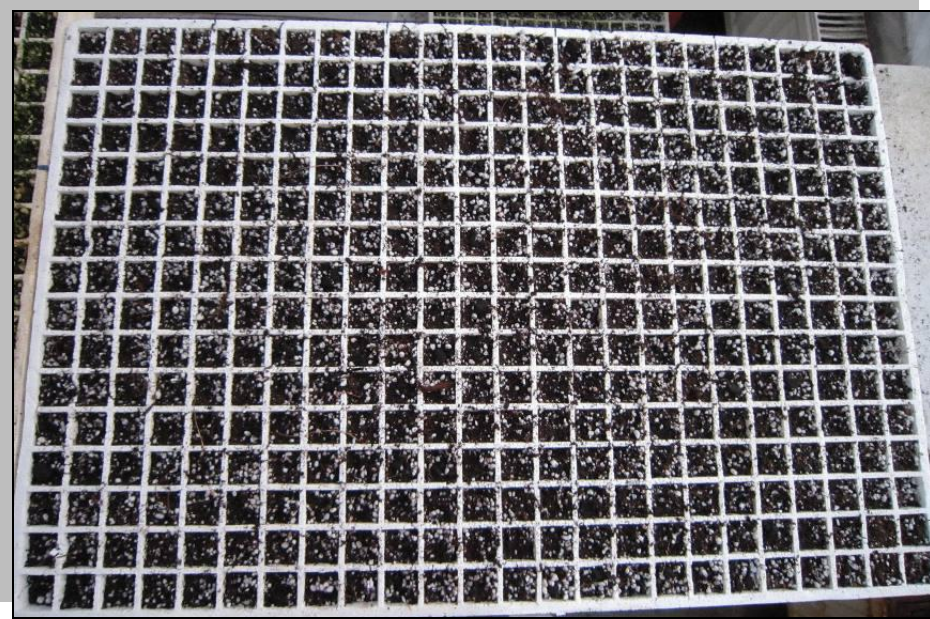
Her iki melezleme kombinasyonunda katlamaya alınan tohumlar, 90. günün sonunda, katlamadan çıkarılmışlardır. Tohumlar 2.00 mm'lik elekler içerisinde su ile yıkanarak kumdan arındırılmışlardır (Şekil 5).



Şekil 5: “Boğazkere×Regent” melezleme kombinasyonuna ait hibrit tohumların katlamadan çıkarıldıktan sonra kumdan arındırılmalarına ait bir görüntü.

1.6 Hibrit tohumların çimlendirilmesi

Hibrit tohumlar, Perlit (1/2) + Torf (1) + Vermikulit (1/3) karışımından oluşan çimlendirme ortamı viyol kaplarına 1,5 cm derinlikte ekilmişlerdir. Tohum ekimi yapılan viyoller, sıcaklık, nem ve havalandırması kontrol altında olan çimlendirme odasına alınmıştır (Şekil 6). Çimlendirme odası sıcaklığı 24 °C, nisbi nem %75 olacak şekilde ayarlanmıştır.



Şekil 6: Viyollere ekilmiş tohumların çimlendirme odalarına alınmasına ait görüntü

1.7 F1 bitkiciklerinin şaşırtılması

Çimlendirme odasında bulunan tohumlar çimlenmenin görülmesinin ardından, köklendirme serasına nakledilmişlerdir. Köklenen bitkicikler, 3-5 adet gerçek yapraklarının çıktığı dönemde, içerisinde Perlit (1) + Torf (1) + Kokopit (1) karışımı bulunan siyah polietilen torbalar içerisinde şaşırtılmışlardır (Şekil 7). Polietilen torbalar içerisinde şaşırtılan her iki kombinasyona ait F1 bitkileri numara verilmek suretiyle etiketlenmiştir



Şekil 7:Hibrit bitkilerinin şaşırtılma işleminin görüntüsü

2. F1 bitkilerinden DNA izolasyonu için yaprak örneklerinin alınması

Köklendirme serasında bitkilerden DNA izolasyonu için yapraklar alınmıştır. Bu amaçla her bir F1 bitkisinin sürgün ucundan itibaren, ilk üç adet genç yaprağı alınarak, etiketi ile birlikte alüminyum folyo ile sarıldıktan sonra şeffaf polietilen torbalara konulmuştur. Buz üzerinde biriktirilen torbalar vakit geçirmeden Moleküler Biyoloji laboratuvarına götürülerek, burada DNA izolasyonu zamanına kadar muhafaza edilmek üzere, sıvı azota daldırılarak şok bir dondurmanın ardından, -80°C ' deki derin dondurucuda muhafaza edilmişlerdir.

3. Genomik DNA izolasyonları:

F1 bitkilerinden DNA izolasyonları sağlıklı genç yaprak örnekleri kullanılarak, "Lefort et.al. (1998)" protokolü ile gerçekleştirilmiştir.

Protokol aşağıda açıklanan şekilde uygulanmıştır.

1. Havan içerisine konan yaprak örnekleri sıvı azot ile dondurularak, havaneli yardımıyla un kıvamına gelene kadar ezilmiştir. Ezilen yaprak örneklerinden 50 mg alınarak 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüplere konulmuştur.
2. Tüplerin zerine 1 ml DNA ekstraksiyon solüsyonu ilave edilmiş ve homojen hale gelinceye kadar karışması sağlanmıştır.
3. Örnekler su banyosunda 65⁰C'de 15 dakika bekletilmiştir,
4. Su banyosunun ardından üzerlerine 0,5 ml kloroform/isoamilalkol (24:1) karışımı eklenmiş, iyice çalkalandıktan sonra 30 dakika buz üzerinde bekletilmiştir.
5. Örnekler oda sıcaklığında, 5 dakika 14.000 rpm hızında santrifüj edildikten sonra, ependorf tüpün st kısmındaki sıvı, temiz ependorf tüplere aktarılmıştır.
7. Daha sonra örneklerin üzerine 0,8 ml isopropanol eklenmiş ve 15–20 dakika buz üzerinde bekletilmiştir.
8. Örnekler 1 dakika 14.000 rpm hızda santrifüj edildikten sonra bir gece –20⁰C bekletilmişlerdir.
9. Ertesi gün üste bulunan sıvı kısım uzaklaştırıldıktan sonra dipte kalan pelet üzerine 1 ml % 70'lik ethanol eklenmiş ve 2 dakika 14.000 rpm hızında santrifüj edilmiştir.
10. Daha sonra tüplerden ethanol uzaklaştırılmış ve ependorf tüplerin ağzı açık bırakılarak alkolün tamamen uçması sağlanmıştır.
11. Son ařamada dipte bulunan DNA, 50-100 l H₂O (nuclease free)'da üzülmüştür.
12. Her 100 l için 1 l RNase-A eklenerek, 37⁰C'de 15 dakika etüvde bekletilerek RNA uzaklaştırılmıştır.

3. DNA miktar ve saflık lmleri:

İzole edilen DNA rneklerinin miktar ve saflığına, agaroz jel görüntüleri ile birlikte spektrofotometrik (NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer) lmler sonucu karar verilmiştir. Spektrofotometre lmleri her bir örnek için iki tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

Spektrofotometre ile miktar ve saflıkları tayin edilen DNA rnekleri daha sonra PCR uygulamaları için 100 ng/l' ye seyreltilmiştir. Stok ve seyreltik DNA rnekleri 20⁰C' de muhafaza altına alınmıştır.

4. Hibrit genotiplere ait DNA'ların külleme ve mildiyö hastalıklarına dayanıklılıkla ilişkili moleküler markörler ile PCR ortamında oğaltımları

F1 bitkilerine ait yaprak örneklerinden izole edilen DNA' lar, Tablo 1' de ayrıntılı özellikleri verilen külleme ve mildiyö ile ilişkili oldukları belirlenmiş primerler kullanılarak PCR ortamında

çoğaltılmışlardır. Proje önerisinde külleme ile ilişkili olarak seçilen VvGLP3 primerinin son yıllarda dayanıklılıkla ilişkili çalışmalarda kullanılmaması üzerine projeden çıkarılarak yerine UDV015 (Tablo1) primeri eklenmiştir.

PCR analizi için hazırlanan PCR master mixi aşağıdaki gibi hazırlanmıştır.

PCR master mix karışımı:

DNA	: 20-100 ng
Primer çifti	: 20-50 pmol
dNTP	: 200-500 mM
MgCl ₂	: 1,5-3,5 mM
DNA Polimeraz	: 0,5-1,5 Ünite
10X Bufer	: 2,5 µl
Toplam hacim	: 25 µl

Hazırlanan PCR karışımları 200 µl PCR tüpleri içerisine konulmuş ve PCR analizleri Biometra marka Termocycler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. PCR koşulları tüm primerler için aşağıda açıklandığı şekilde gerçekleştirilmiştir.

PCR koşulları:

1. 94 °C' de 4 dak ön denaturasyon
2. 94 °C' de 1 dak denatürasyon,
3. primer annealing sıcaklığı °C 1 dak (annealing),
4. 72 °C' de 1 dak yeni iplikçiğin yazımı (extension),
5. 72 °C' de 10 dak son yazılım,

2-4 basamaklar 35 döngü olarak uygulanmıştır.

5. PCR Ürünlerinin görüntülenmesi

Thermocycler'den çıkarılan PCR çoğaltım ürünleri agaroz jel elektroforez tekniği ile ayrılarak UV ışık altında görüntülenmiştir. PCR amplifikasyon ürünleri, SCAR primerleri için %1.5-2'lik agaroz jelde, SSR primerlerinde %2'lik agaroz jelde yürütülmüş ve çoğaltım ürünü bantlar görüntülenmiştir.

100 ml %1.5'luk agaroz jel hazırlığı için aşağıdaki adımlar takip edilmiştir.

- 1.5 gr agaroz tartılarak, 100 ml'lik erlene konulmuş, üzerine 100 ml 1x TBE (Tris, Borik asit, EDTA) çözeltisi eklenmiştir.
- Hafifçe çalkalanıp, agarozun erimesi amacıyla mikrodalga fırında kaynatılmıştır. Kaynama başlangıcında mikrodalgadan çıkarılan çözelti, musluk suyu altında tutularak bir miktar soğutulmuş ardından 7.5 µl Ethidium Bromid eklenmiştir.
- Ethidium'un çözelti içerisinde dağılması amacıyla erlen hafif şiddette çalkalanmış, ardından hava kabarcığı oluşturmadan yavaş ve dikkatli bir şekilde jel taşıyıcı tepsiye dökülmüştür.
- Jelin polimerize olması için 30 dakika çeker ocak altında bekletilmiştir.

Tablo 1: Projede kullanılan moleküler markörler ve ilişkili oldukları özellikler ile bunların dayandıkları yayınların listesi

Markör	İleri Primer (forward)	Geri Primer (reverse)	Beklenen allel büyüklüğü (bp)	İlgili Yayın ve Bağlantılı olduğu özellik
VMC8g9	AAC ATT ATC AAC ATG GTT TTA	ATA TTC ATC CTT CCC ATC ACT A-	160	Monlar. et al.2007, Debreceni et al. 2010/ SSR, Mildiyö, Run1
VMC1g3.2	GAT AGT TAC CAT ACT TAG TCG GA-	ACT TAG CTT CAG AAG AAA ATA GA-	122	Merdinoğlu et al. 2006, Eibach et.al. 2007, Debreceni et al. 2010; SSR, Mildiyö, Rpv1
GLP1-12	GGA ATA TTT ACT TGG ACA TCG-	CAT TTG AAT TGG AGC ATA CTC-	EcoR1 kesim ür. 670 bp/200 bp	Donald et al. 2002; (Merdinoğlu et al. 2006); CAPS/Run1 Külleme
ScORA7-760	GAA ACG GGT GTG AGG CAA AGG TGG-	-GGC CAT TAG GAA ATC AAC ATT AC-	760	Akkurt et al. 2007; SCAR, Külleme
ScORN3-32	-GGT ACT CCC CAT TAA CGA CAG C-	-GTA CTC CCC CCA ACA TAG CCA T-	885	Akkurt et al. 2007 ; SCAR, Külleme
UDV-015 (VvGLP3 yerine)	TGC ACA TTT CCC TCC TTA G	CGG GTT ACT GGG AAG GGT AT	183	Welter et al. 2007, Eibach et al. 2007; SSR/Rpv1/Mildiyö
ScPRA14	TCT GTG CTG GAG AAG AGA TGA G	TCT GTG CTG GCA GTC ATT ATT A-	460	Akkurt et al. yayınlanmamış/ Mildiyö

5.1 PCR ürünlerinin jele yüklenmesi

Taşıyıcı tepside dikkatlice alınan jel, elektroforez tankı içerisine yerleştirildikten sonra tankın içine jelin üstünü kapatacak kadar 1x TBE (Tris, Borik asit, EDTA) çözeltisi doldurulmuştur. PCR amplifikasyon ürünleri jele yüklenmiştir. Örnekler 100 V'da 60 dakika yürütüldükten sonra UV ışık

altında “SynGene Jel Görüntüleme Sistemi” ile görüntülenmiştir.

6. PCR ürünlerinin kapilar elektroforezi

PCR aşaması tamamlanan SSR lokuslarına ait çoğaltım ürünlerinin agaroz jelde amplifikasyon kontrolü yapıldıktan sonra, allel büyüklükleri Beckman Coulter (Fullerton, CA) fragment analiz cihazında gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla SLS (Sample loading solution) solusyonu ile uygun oranlarda (20µl) seyreltilen amplifikasyon ürünlerinin üzerine 0.4 µl DNA Standard Kit-400 (Genomelab) eklenmiş ve CEQ 8800XL capillary DNA analysis system (Beckman Coulter, Fullerton, CA) sisteminde elektroforez edilmiştir. Pik büyüklükleri ise sisteme ait fragment analizi yazılımları ile tespit edilmiştir.

IV. Analiz ve Bulgular

1. Melezleme sonuçları ve F1 Hibrit Bitkilerinin elde edilmesi

Melezleme yapılan “Kalecik Karası x Regent” ve “Boğazkere x Regent” kombinasyonlarına ait salkımlarda tozlanma ve döllemenin tamamlanıp, tane tutumunun gerçekleşmesinin ardından, keselerin ağızları açılarak etiketleri asılmış ve melezleme yapılan salkımlarda olgunluk takip edilmiştir (Şekil 8).



Şekil 8: Tane tutumundan sonra kesesinden çıkarılmış ‘Boğazkere’ çeşidine ait bir salkımın görüntüsü

Olgunlaşan melez salkımlar etiketleri ile birlikte hasat edilmişlerdir (Şekil 9). Hasat edilen

üzüm tanelerinden, hibrit çekirdekler çıkartılarak meyve etinden iyice arındırılmış, yıkanıp temizlenmişlerdir (Şekil 10).

İki yıl süren melezleme çalışmaları sonucu; “Kalecik Karası x Regent” kombinasyonunda 380 , “Boğazkere x Regent” kombinasyonundan 1650 adet melez tohum (çekirdek) elde edilmiştir. Kurutulan hibrit fenotiplere ait tohumlar, petri kaplarına alınarak etiketlenmiş ve katlama tarihine kadar +4 °C de muhafazaya alınmışlardır (Şekil 10).



Şekil 9: Olgunluk zamanındaki “Boğazkere x Regent” kombinasyonuna ait bir salkımın görüntüsü.



Şekil 10 “Boğazkere x Regent” kombinasyonuna ait bir salkımdan çekirdeklerin çıkartılarak kurutma işlemine ait görüntü

Her iki melezleme kombinasyonundan elde edilen hibrit tohumlar katlamaya alınmışlardır. Bu

amaçla katlamada kullanılacak dere kumu elekten geçirildikten sonra otoklavlanarak sterilize edilmiş, nemlendirildikten sonra 18 x 10 x 7 cm ebatlarındaki şeffaf plastik kaplara doldurulmuştur. Hibrit tohumlar mantari enfeksiyonlara karşı fungusitle ilaçlanmış ve ardından katlama ortamına serilmişlerdir. Üzerleri nemli dere kumu ile örtüldükten sonra sıcaklığı +4 °C'ye ayarlanmış inkübatörlere konulmuşlardır. (Şekil 11 ve 12)



Şekil 11. Nemli dere kumu içerisinde katlamaya alınan melez tohumlar



Şekil 12: Tohumların katlama işlemine tabi tutulduğu inkübatörlerin görüntüsü

90. günün sonunda, katlamaya son verilerek tohumlar inkübatörden çıkarılmışlardır. 2.00 mm'lik elekler içerisinde su ile yıkanarak kumdan arındırılmışlardır.

Her iki kombinasyonda tohumlar, katlamanın ardından, çimlendirilmeye alınmıştır. Hibrit tohumlar, Perlit (1/2) + Torf (1) + Vermikulit (1/3) karışımından oluşan çimlendirme ortamı serili 216'lık viyol kaplarına 1,5 cm derinlikte ekilmişlerdir. Tohum ekimi elle gerçekleştirilmiştir.. Çimlendirme odası sıcaklığı 24 °C, nisbi nem %75 olacak şekilde ayarlanmıştır. Ekim yapılan tohumlar ilk kökcüklerin çıktığında, köklendirme serasına alınmışlardır (Şekil 13).



Şekil 13: Çimlenen “Regent x Boğazkere” kombinasyonuna ait bitkilerin köklendirme serasındaki görünümüleri

İki yıl üst üste yürütülen melezlemeler ve ardından hibrit çekirdeklerin bitkiye dönüştürülmesi çalışmaları sonucunda “Boğazkere x Regent” kombinasyonunda 695 adet, “Kalecik Karası x Regent” kombinasyonunda 68 adet F1 bitkisi elde edilmiştir.

“Kalecik Karası x Regent” ve “Boğazkere x Regent” melezleme kombinasyonlarında siyah polietilen torbalarda gelişimlerini sürdüren F1 bitkilerinden DNA izolasyonlarında kullanılmak üzere yaprak örnekleri Ağustos 2011 dönemi boyunca toplanmıştır. Her bir F1 bitkisinin sürgün ucundan itibaren ilk üç genç yaprağı alınarak, etiketi ile birlikte alüminyum folyo ile sarıldıktan sonra şeffaf polietilen torbalara konulmuştur (Şekil 14). Buz üzerinde biriktirilen torbalar vakit geçirmeden laboratuvara götürülerek, burada izolasyon zamanına kadar muhafaza edilmek üzere, sıvı azota

daldırılarak şok bir dondurmanın ardından, -80 °C deki derin dondurucuda muhafaza edilmiştir.



Şekil 14. “Kalecik Karası x Regent” kombinasyonunda F1 bitkilerinde sürgün ucundan itibaren ilk üç genç yaprağın DNA izolasyonu amacıyla alınmasına ait bir görüntü.

2. F1 bitkilerinden genomik DNA izolasyonları ve elde edilen DNA’ların miktar ve saflık ölçümleri

“Boğazkere x Regent” kombinasyonundan 167 adet, “Kalecik Karası x Regent” kombinasyonunda 27 adet yaprak örneğinden DNA izolasyonları Lefort et al. (1998) yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Elde edilen DNA’lar Agaroz jel elektroforez tekniği ile görüntülemenin ardından Nanodrop Spektrofotometre ile miktar ve saflıkları ölçülmüştür. Tablo 2’ de her iki kombinasyona ait elde edilen DNA örneklerinin miktar ve saflık ölçümleri yer almaktadır.

Miktarları ölçülen DNA örnekleri PCR analizlerinde kullanılmak üzere 100 ng/µl’ ye seyreltilmiştir.

Tablo2: “Boğazkere x Regent” (BR) ve “Kalecik Karası x Regent” (KR) kombinasyonlarında F1 bitkilerinin numaralandırmaları ve numaralandırılan örneklerin DNA miktar ve saflıkları

Örnek	Miktar (ng/ul)	Saflık (260/280)
No	0,00	NaN
2BR	140,01	1,48
2BR	136,70	1,50
3BR	220,60	1,64
3BR	221,27	1,65
4BR	155,71	1,55
4BR	154,21	1,56
6BR	98,68	1,38
6BR	101,44	1,37
7BR	101,02	1,43
7BR	98,21	1,44
8BR	33,46	1,20
8BR	31,41	1,14
9BR	222,13	1,70
9BR	223,51	1,70
10BR	138,56	1,54
10BR	138,55	1,56
11BR	93,90	1,68
11BR	97,75	1,66
13 BR	106,61	1,47
13 BR	105,19	1,46
12BR	178,17	1,61
12BR	179,83	1,61
14BR	143,56	1,49
14BR	144,54	1,49
15BR	94,22	1,46
15BR	56,97	1,41
16BR	183,69	1,58
16BR	180,65	1,58
17BR	149,67	1,57
17BR	150,95	1,55
18BR	87,29	1,49
18BR	76,60	1,51
19BR	49,47	1,43
19BR	106,68	1,44
20BR	291,00	1,72
20BR	270,84	1,72
21 BR	279,92	1,50
21 BR	286,24	1,44
22 BR	136,50	1,70
22 BR	142,83	1,69
23 BR	120,07	1,56
23 BR	148,07	1,49
24 BR	93,17	1,38
24 BR	83,00	1,42
25 BR	119,64	1,48
25 BR	90,20	1,50

Örnek No	Miktar (ng/ul)	Saflık
No	0,00	NaN
26 BR	115,97	1,70
26 BR	118,62	1,68
27 BR	79,30	1,48
27 BR	85,93	1,44
28 BR	130,78	1,41
28 BR	133,72	1,42
29 BR	101,60	1,64
29 BR	111,85	1,55
30 BR	163,88	1,51
30 BR	227,80	1,39
31 BR	137,50	1,59
31 BR	179,47	1,43
32 BR	79,17	1,47
32 BR	75,79	1,48
33 BR	144,12	1,49
33 BR	176,74	1,43
35 BR	78,31	1,51
35 BR	79,77	1,50
36 BR	110,84	1,53
36 BR	113,40	1,51
37 BR	77,33	1,47
37 BR	78,36	1,41
38 BR	81,43	1,36
38 BR	85,60	1,38
39 BR	91,21	1,54
39 BR	92,35	1,52
40 BR	171,28	1,52
40 BR	160,99	1,56
41 BR	105,74	1,42
41 BR	106,38	1,43
42 BR	87,19	1,37
42 BR	84,30	1,45
43 BR	166,79	1,41
43 BR	137,75	1,51
44 BR	64,21	1,35
44 BR	63,95	1,34
45 BR	132,45	1,54
45 BR	132,30	1,56
46 BR	98,73	1,52
46 BR	97,43	1,54
47 BR	34,54	1,31
47 BR	34,62	1,31
48 BR	77,56	1,54
48 BR	78,86	1,55
49 BR	28,05	1,35
49 BR	27,36	1,37

Örnek No	Miktar (ng/ul)	Saflık (260/280)
50 BR	52,80	1,34
50 BR	33,23	1,32
51 BR	163,78	1,60
51 BR	157,91	1,63
52 BR	144,63	1,69
52 BR	150,76	1,66
53 BR	80,15	1,43
53 BR	79,29	1,46
54 BR	20,41	1,42
54 BR	68,71	1,45
55 BR	63,54	1,49
55 BR	63,48	1,51
56 BR	60,97	1,42
56 BR	61,78	1,43
57 BR	74,77	1,58
57 BR	74,81	1,59
58 BR	54,78	1,49
58 BR	68,64	1,54
59 BR	80,10	1,40
59 BR	78,56	1,41
60 BR	76,37	1,42
60 BR	76,68	1,43
61 BR	170,45	1,63
61 BR	176,35	1,60
62 BR	151,96	1,46
62 BR	145,36	1,51
63 BR	255,28	1,78
63 BR	215,47	1,82
64 BR	56,17	1,38
64 BR	53,37	1,40
65 BR	123,34	1,63
65 BR	123,85	1,63
66 BR	137,72	1,41
66 BR	109,96	1,53
67 BR	89,30	1,43
67 BR	87,57	1,42
68 BR	53,79	1,45
68 BR	57,77	1,37
69 BR	325,26	1,34
69 BR	173,49	1,49
71 BR	43,65	1,22
71 BR	43,52	1,27
72 BR	146,75	1,51
72 BR	128,90	1,59
73 BR	57,33	1,50
73 BR	56,30	1,54
74 BR	67,02	1,15
74 BR	53,49	1,31
75 BR	64,91	1,37
75 BR	66,16	1,40
76 BR	74,21	1,53
76 BR	73,63	1,51
77 BR	41,61	1,36
77 BR	41,85	1,37
78 BR	66,29	1,52
78 BR	65,79	1,54

Örnek No	Miktar (ng/ul)	Saflık (260/280)
79 BR	105,73	1,60
79 BR	107,86	1,60
80 BR	76,01	1,42
80 BR	71,91	1,47
81 BR	38,44	1,36
81 BR	25,95	1,32
82 BR	59,33	1,33
82 BR	58,97	1,30
83 BR	90,73	1,52
83 BR	88,90	1,52
84 BR	76,69	1,39
84 BR	78,28	1,40
85 BR	65,85	1,44
85 BR	65,02	1,43
86 BR	61,13	1,40
86 BR	60,26	1,39
87 BR	131,30	1,65
87 BR	133,03	1,64
88 BR	89,94	1,43
88 BR	91,94	1,40
89 BR	119,30	1,62
89 BR	117,68	1,64
91 BR	171,06	1,62
91 BR	172,38	1,62
92 BR	42,55	1,34
92 BR	42,38	1,34
93 BR	62,82	1,40
93 BR	61,36	1,41
94 BR	59,43	1,24
94 BR	59,88	1,22
95 BR	43,23	1,14
95 BR	43,64	1,14
96 BR	75,93	1,30
96 BR	76,28	1,31
97 BR	59,28	1,30
97 BR	59,08	1,33
98 BR	133,67	1,48
98 BR	134,89	1,47
99 BR	233,54	1,76
99 BR	235,23	1,76
100 BR	135,90	1,36
100 BR	130,66	1,36
102 BR	211,35	1,58
102 BR	205,30	1,64
103 BR	82,31	1,39
103 BR	81,77	1,40
104 BR	191,21	1,69
104 BR	187,74	1,67
107 BR	135,77	1,55
107 BR	131,61	1,51
108 BR	76,12	1,43
108 BR	71,13	1,37
110 BR	94,44	1,52
110 BR	90,76	1,48
111 BR	86,57	1,44
111 BR	84,42	1,41

Örnek No	Miktar (ng/ul)	Saflık (260/280)
112 BR	81,57	1,50
112 BR	85,95	1,46
113 BR	80,89	1,49
113 BR	78,66	1,48
114 BR	78,90	1,43
114 BR	78,78	1,41
116 BR	110,03	1,45
116 BR	107,86	1,42
117 BR	228,95	1,71
117 BR	227,81	1,70
119 BR	64,73	1,44
119 BR	67,10	1,42
122 BR	104,73	1,20
122 BR	104,63	1,20
126 BR	135,50	1,36
126 BR	130,99	1,36
127 BR	153,80	1,20
127 BR	122,65	1,41
128 BR	131,01	1,45
128 BR	131,72	1,40
129 BR	117,00	1,48
129 BR	113,09	1,45
130 BR	180,55	1,38
131 BR	115,99	1,55
131 BR	114,37	1,55
133 BR	129,77	1,47
133 BR	129,37	1,48
134 BR	110,99	1,43
134 BR	111,02	1,38
137 BR	86,18	1,32
137 BR	84,42	1,33
138 BR	134,60	1,46
138 BR	134,92	1,45
139 BR	287,09	1,49
139 BR	225,21	1,66
143 BR	98,15	1,33
143 BR	101,22	1,32
144 BR	201,90	1,69
144 BR	196,72	1,68
146 BR	108,35	1,53
146 BR	104,59	1,50
147 BR	126,19	1,53
147 BR	127,65	1,52
122 BR	104,73	1,20
122 BR	104,63	1,20
126 BR	135,50	1,36
126 BR	130,99	1,36
127 BR	153,80	1,20
127 BR	122,65	1,41
128 BR	131,01	1,45
128 BR	131,72	1,40
129 BR	117,00	1,48
129 BR	113,09	1,45
130 BR	180,55	1,38
131 BR	115,99	1,55
131 BR	114,37	1,55

Örnek No	Miktar (ng/ul)	Saflık (260/280)
133 BR	129,77	1,47
133 BR	129,37	1,48
134 BR	110,99	1,43
134 BR	111,02	1,38
137 BR	86,18	1,32
137 BR	84,42	1,33
138 BR	134,60	1,46
138 BR	134,92	1,45
139 BR	287,09	1,49
139 BR	225,21	1,66
143 BR	98,15	1,33
143 BR	101,22	1,32
144 BR	201,90	1,69
144 BR	196,72	1,68
146 BR	108,35	1,53
146 BR	104,59	1,50
147 BR	126,19	1,53
147 BR	127,65	1,52
135 BR	319,19	1,80
135 BR	319,55	1,81
132 BR	161,21	1,72
132 BR	160,57	1,76
157 BR	253,33	1,75
157 BR	253,04	1,75
152 BR	135,73	1,78
152 BR	133,90	1,77
121 BR	75,12	1,71
121 BR	75,77	1,72
158 BR	243,57	1,82
158 BR	243,79	1,85
151 BR	279,99	1,79
151 BR	276,47	1,79
156 BR	304,39	1,77
156 BR	295,65	1,77
141 BR	244,51	1,75
141 BR	242,90	1,74
145 BR	141,42	1,68
145 BR	135,48	1,69
125 BR	100,42	1,64
125 BR	93,97	1,68
123 BR	234,23	1,77
123 BR	236,60	1,75
118 BR	392,04	1,75
118 BR	396,75	1,76
124 BR	120,51	1,74
124 BR	122,79	1,72
140 BR	148,18	1,74
140 BR	139,72	1,74
142 BR	178,56	1,70
142 BR	173,17	1,71
162 BR	248,70	1,74
162 BR	247,63	1,75
136 BR	111,33	1,72
136 BR	114,87	1,72
101 BR	556,61	1,83
101 BR	564,73	1,83

Örnek No	Miktar (ng/ul)	Saflık (260/280)
339 BR	145,39	1,39
339 BR	123,61	1,44
326 BR	204,56	1,49
326 BR	152,35	1,63
209 BR	429,09	1,44
209 BR	429,70	1,43
258 BR	258,23	1,51
258 BR	110,33	1,58
262 BR	119,10	1,38
262 BR	117,90	1,46
210 BR	520,66	1,42
210 BR	512,07	1,42
330 BR	117,06	1,09
330 BR	106,46	1,15
325 BR	134,13	1,46
325 BR	125,75	1,51
312 BR	81,44	1,45
312 BR	121,41	1,39
318 BR	147,91	1,43
318 BR	131,84	1,52
385 BR	97,76	1,43
385 BR	98,40	1,44
311 BR	188,70	1,66
311 BR	182,68	1,70
319 BR	436,01	1,62
319 BR	441,39	1,62
340 BR	287,93	1,45
340 BR	294,64	1,44
142 BR	177,46	1,63
142 BR	178,68	1,60
292 BR	150,91	1,37
292 BR	101,71	1,47
269 BR	136,95	1,55
269 BR	127,66	1,58
202 BR	526,83	1,35
202 BR	522,15	1,35
205 BR	106,56	1,56
205 BR	104,55	1,54
200 BR	221,53	1,64
200 BR	227,20	1,63
277 BR	53,26	1,52
277 BR	54,37	1,47
277 BR	52,58	1,47
235 BR	76,68	1,57
235 BR	77,40	1,54
296 BR	496,14	1,84
296 BR	505,39	1,84
224 BR	92,29	0,62
224 BR	99,57	0,65
224 BR	11,05	1,03
237 BR	167,35	0,93
237 BR	168,72	0,95
267 BR	246,35	1,10
267 BR	250,24	1,12
REGENT	602,58	1,83
REGENT	607,69	1,83

Örnek No	Miktar (ng/ul)	Saflık (260/280)
126 BR	121,59	1,34
126 BR	120,06	1,35
127 BR	85,59	1,47
127 BR	89,68	1,50
159 BR	38,60	1,56
159 BR	41,02	1,53
106 BR	195,89	1,74
106 BR	167,70	1,81
161 BR	161,08	1,90
161 BR	160,86	1,89
163 BR	52,73	1,64
163 BR	59,72	1,59
160 BR	137,92	1,77
160 BR	125,05	1,80
239 BR	78,82	1,78
239 BR	71,16	1,83
239 BR	68,71	1,89
165 BR	175,11	1,85
165 BR	172,97	1,85
120 BR	51,75	1,61
120 BR	51,62	1,56
122 BR	117,92	1,17
122 BR	118,76	1,16
148 BR	161,04	1,82
148 BR	162,08	1,81
109 BR	631,47	1,93
109 BR	636,55	1,93
134 BR	113,67	1,47
134 BR	116,25	1,46
90 BR	241,01	1,88
90 BR	237,16	1,89
153 BR	64,47	1,58
153 BR	61,88	1,56
277 BR	83,81	1,90
277 BR	84,03	1,86
230 BR	141,21	1,81
230 BR	142,37	1,78
265 BR	204,59	1,90
265 BR	221,90	1,91
299 BR	77,80	1,92
299 BR	75,31	1,92
299 BR	78,03	1,86
285 BR	84,31	1,83
285 BR	83,41	1,89
329 BR	73,37	1,70
329 BR	71,51	1,73
327 BR	102,04	1,69
327 BR	87,90	1,80
322 BR	85,65	1,74
322 BR	76,67	1,86
334 BR	61,36	1,90
334 BR	63,87	1,89
348 BR	112,23	1,95
348 BR	109,33	1,93
225 BR	50,30	1,82
225 BR	51,67	1,79

Örnek No	Miktar (ng/ul)	Saflık (260/280)
207 BR	110,18	1,86
207 BR	107,82	1,85
245 BR	65,06	1,51
245 BR	62,04	1,49
235 BR	51,66	1,85
235 BR	52,10	1,87
252 BR	68,09	1,88
252 BR	67,75	1,91
247 BR	94,60	1,83
247 BR	91,18	1,86
261 BR	77,43	1,86
261 BR	77,50	1,87
260 BR	61,91	1,85
260 BR	63,61	1,87
243 BR	59,17	1,94
243 BR	60,42	1,90
206 BR	67,12	1,88
206 BR	67,74	1,82
218 BR	82,08	1,86
218 BR	80,54	1,88
278 BR	68,85	1,88
154 BR	426,70	1,70
154 BR	430,19	1,71
207 BR	110,18	1,86
207 BR	107,82	1,85
245 BR	65,06	1,51
245 BR	62,04	1,49
235 BR	51,66	1,85
235 BR	52,10	1,87
252 BR	68,09	1,88
252 BR	67,75	1,91
247 BR	94,60	1,83
247 BR	91,18	1,86
261 BR	77,43	1,86
261 BR	77,50	1,87
260 BR	61,91	1,85
260 BR	63,61	1,87
243 BR	59,17	1,94
243 BR	60,42	1,90
206 BR	67,12	1,88
206 BR	67,74	1,82
218 BR	82,08	1,86
218 BR	80,54	1,88
278 BR	68,85	1,88
154 BR	426,70	1,70
154 BR	430,19	1,71
207 BR	110,18	1,86
207 BR	107,82	1,85
245 BR	65,06	1,51
245 BR	62,04	1,49
235 BR	51,66	1,85

Örnek No	Miktar (ng/ul)	Safılık (260/280)
1KR	53,11	1,29
1KR	52,83	1,31
2 KR	89,77	1,45
2 KR	88,91	1,45
3 KR	133,51	1,65
3 KR	134,32	1,69
5 KR	71,42	1,44
5 KR	71,78	1,40
6 KR	87,05	1,58
6 KR	88,96	1,53
7 KR	127,27	1,56
7 KR	122,44	1,66
8 KR	210,82	1,70
8 KR	209,39	1,69
9 KR	494,38	1,86
9 KR	492,70	1,89
10 KR	119,66	1,58
10 KR	94,77	1,74
11 KR	134,51	1,76
11 KR	104,14	1,91
12 KR	155,92	1,99
12 KR	156,73	1,99
13 KR	213,86	1,65
13 KR	194,08	1,73
14 KR	226,12	1,61
14 KR	184,37	1,72
15 KR	131,78	1,81
15 KR	136,33	1,75
16 KR	270,69	1,98
16 KR	259,73	1,97
17 KR	155,66	1,35
17 KR	120,36	1,45
18 KR	169,61	1,54
18 KR	145,59	1,59
19 KR	227,05	1,78
19 KR	223,64	1,79
20 KR	385,05	1,62
20 KR	343,37	1,75
21 KR	432,99	1,96
21 KR	437,14	1,88
22 KR	137,69	1,30
22 KR	121,34	1,35
23 KR	74,88	1,55
23 KR	72,57	1,63
24 KR	204,05	1,63
24 KR	192,84	1,70
25 KR	231,38	1,67
25 KR	162,00	1,93
26 KR	278,64	1,85
26 KR	249,61	1,94
27 KR	573,67	1,77
27 KR	609,22	1,72

*Her bir ölçüm 2 tekerrürlü yapılmış ve ölçüm ortalamalarına göre seyreltme işlemleri gerçekleştirilmiştir.

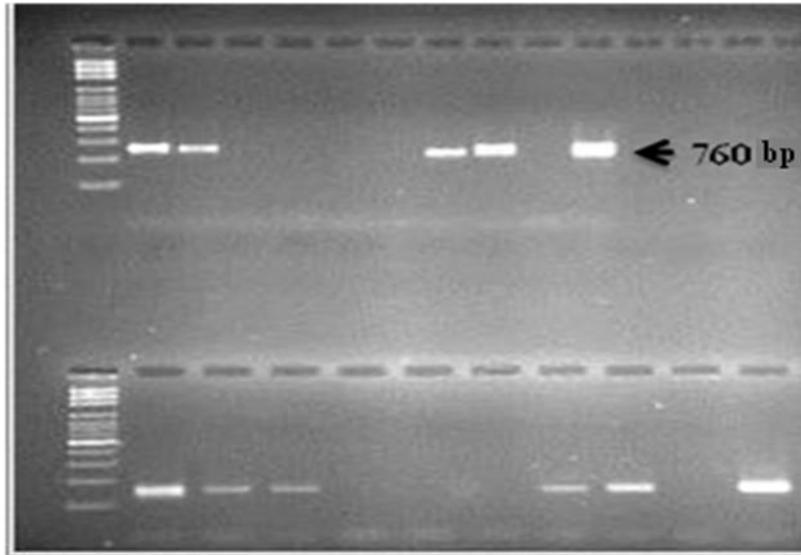
3. Külleme ve Mildiyö ile ilişkili primerler ile PCR Amplifikasyonları

DNA'ları izole edilen örneklerin SSR (Simple Sequence Repeats), SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) ve CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences) PCR tekniklerine uygun çoğaltımları Biometra Thermocycler 'da gerçekleştirilmiştir.

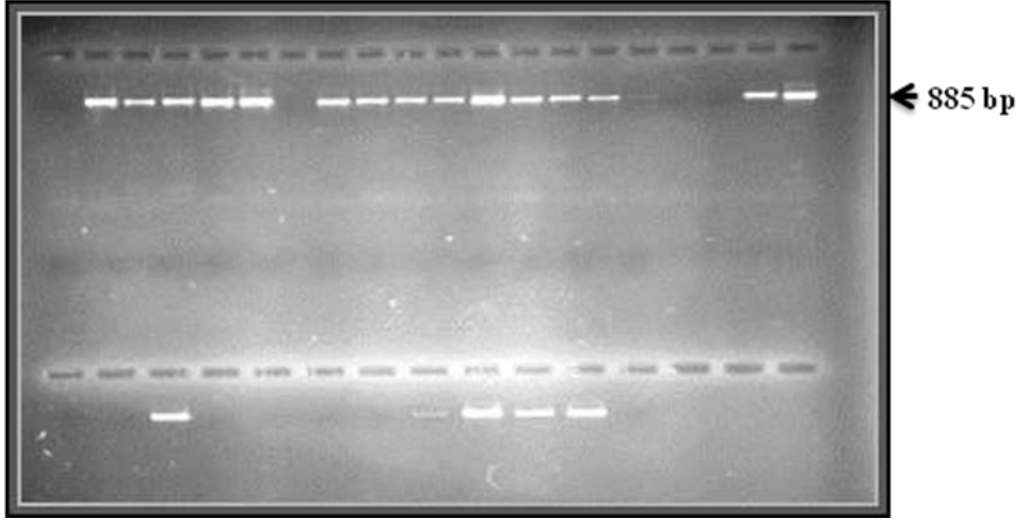
PCR amplifikasyon ürünleri, SCAR primerleri için (**ScORA7-760**, **ScORN3-32**, **ScORA14**) %1.5-2'lik agaroz jelde kontrol edilerek, SCAR primer yönüyle pozitif bant veren bireyler ilgili hastalık (külleme / mildiyö) yönüyle dayanıklı fenotip adayı olarak seçilmişlerdir (Şekil 15,16,17).

CAPS markörünün (**GLP1-12**) amplifikasyon ürünleri Merdinoğlu et al. (2006)' a göre EcoRI restriksiyon enzimi ile kesilmiş ve kesimin ardından 670 bp ve 200 bp alleller oluşan örnekler dayanıklı fenotip adayı olarak seçilirken, kesim oluşmayan örnekler hassas olarak değerlendirilmiştir (Şekil 18).

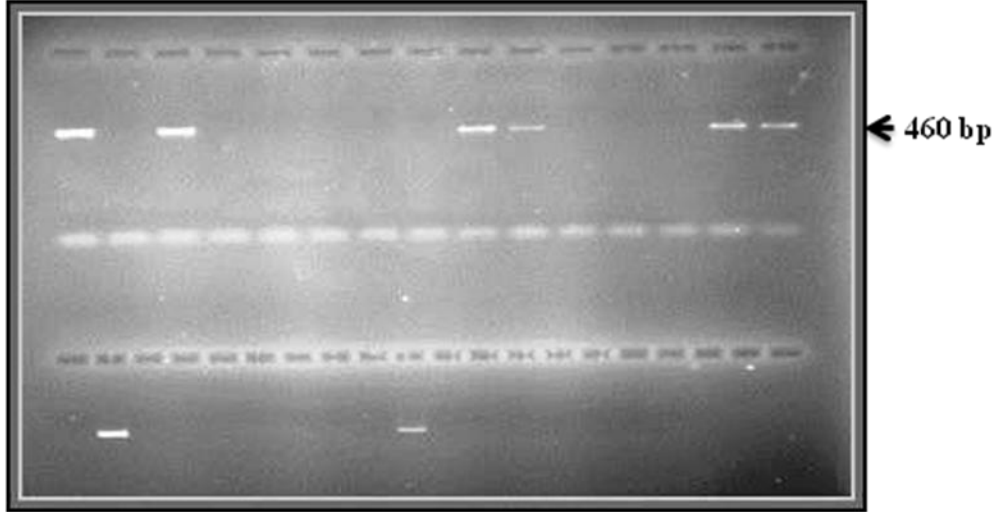
PCR aşaması tamamlanan SSR primerlerine (**VMC1g3.2**, **VMC8g9**, **UDV-015**) ait amplifikasyon ürünlerinin %2'lik agaroz jelde amplifikasyon kontrolü yapılmıştır (Şekil 19-24). Amplifikasyon oluşturan örneklerde allel büyüklükleri, Beckman Coulter (Fullerton, CA) Fragment Analizi cihazında belirlenmiştir. Dayanıklılıkla ilişkili allellere sahip oldukları belirlenen genotipler, belirlenerek, dayanıklı fenotip adayı olarak seçilmişlerdir.



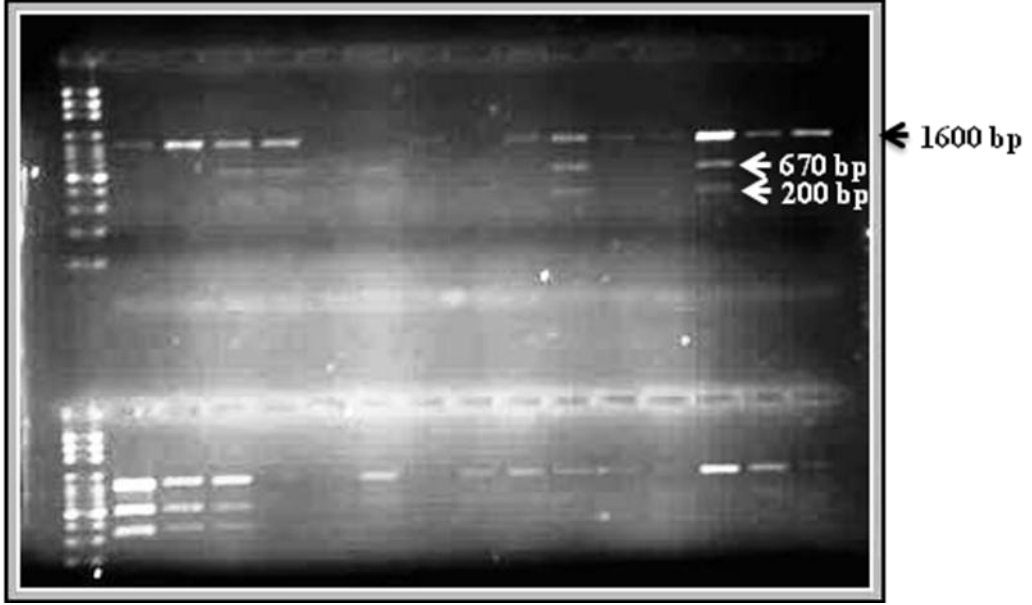
Şekil 15: ScOrA7-760 (SCAR) primeri ile çoğaltılan F1 bitkilerine ait örneklerin PCR ürünlerinin görüntüsü. 760 bp büyüklüğünde bant veren bireyler külemeye dayanıklı, bant oluşturmayanlar hassas olarak değerlendirilmiştir (Akkurt et al. 2007).



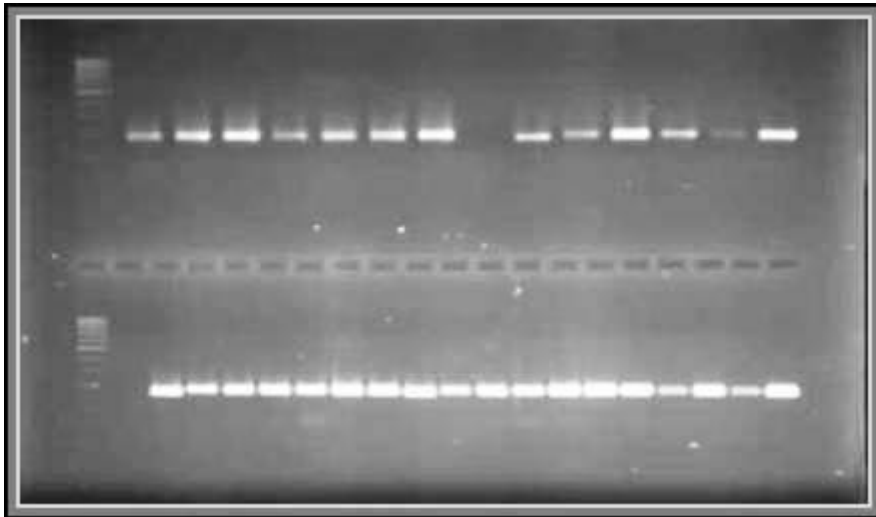
Şekil 16: ScOrN3-32 (SCAR) primeri ile çoğaltılan F1 bitkilerine ait örneklerin PCR ürünlerinin görüntüsü. 885 bp büyüklüğünde bant veren bireyler olası küllemeye dayanıklı, bant oluşturmayanlar hassas (Akkurt et al. 2007). (Bireylerin %80'i amplifikasyon oluşturduğundan bu primer MDS amaçlı kullanılmamıştır).



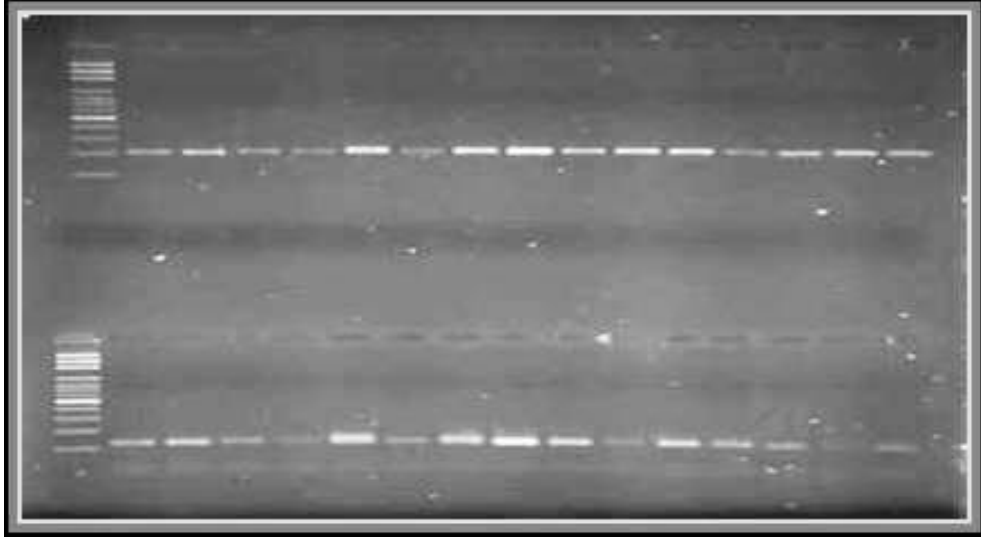
Şekil 17: ScPR-A14 (SCAR) primeri ile çoğaltılan F1 bitkilerine ait örneklerin PCR ürünlerinin görüntüsü. 460 bp büyüklüğünde bant veren bireyler olası mildiyöye dayanıklı, bant oluşturmayanlar hassas olarak değerlendirilmiştir (Akkurt et al. yayınlanmamış).



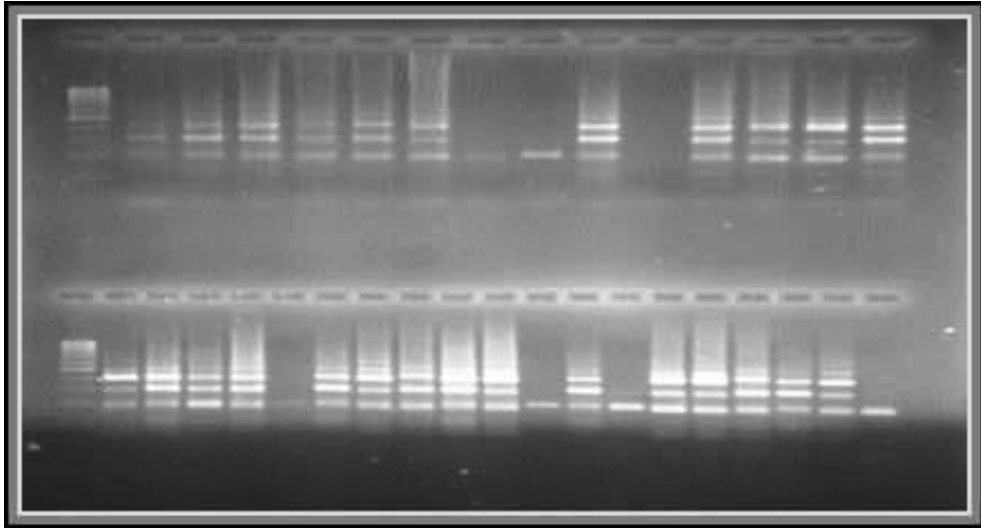
Şekil 18: GLP1-12 (CAPS) primeri ile çoğaltılan F1 bitkilerine ait PCR ürünlerinin, EcoRI restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesiminden sonraki görüntüsü. RunI geni ile ilişkili bireyler EcoR1 ile kesim ürünü 670 bp ve 200 bp bant oluşturmuş, hassas bireyler kesim oluşturmamıştır (Merdinoğlu et al. 2006).



Şekil 19: VMC8g9 (SSR) primeri ile çoğaltılan F1 bitkilerine ait örneklerin PCR ürünlerinin görüntüsü. Amplifikasyon kontrolü agaroz jelde yapılmış, allel büyüklükleri Beckman Coulter (Fullerton, CA) Fragment Analizi cihazında belirlenmiştir.



Şekil 20: VMC1g3.1 (SSR) primeri ile çoğaltılan F1 bitkilerine ait örneklerin PCR ürünlerinin görüntüsü. Amplifikasyon kontrolü agaroz jelde yapılmış, allel büyüklükleri Beckman Coulter (Fullerton, CA) Fragment Analizi cihazında belirlenmiştir.



Şekil 21: UDV015 (SSR) primeri ile çoğaltılan F1 bitkilerine ait örneklerin PCR ürünlerinin görüntüsü. Amplifikasyon kontrolü agaroz jelde yapılmış, allel büyüklükleri Beckman Coulter (Fullerton, CA) Fragment Analizi cihazında belirlenmiştir.

“Boğazkere x Regent” melezleme kombinasyonunda F1 bitkilerinin PCR analiz sonuçları toplu olarak Tablo 3’de yer almaktadır. “Kalecik Karası x Regent” kombinasyonuna ait F1 bitkilerinin PCR analiz sonuçlarının toplu bir incelemesi ise Tablo 4’de verilmiştir.

V. Sonuç ve Öneriler

Proje çalışmaları ile iki yıl üst üste yapılan melezleme çalışmaları, ardından hibrit tohumların çimlendirme, çimlenen tohumların bitkiye dönüştürülmesi sonucunda “Boğazkere x Regent” melezleme kombinasyonunda 695 adet F1 bitkisi elde edilmiştir.

“Kalecik Karası x Regent” kombinasyonunda melezleme çalışmaları üç yıl üst üste gerçekleştirilmiştir. Bunun nedeni ilk iki yılda tüm çabalara rağmen istenen sayıda tane tutan salkım, dolayısıyla hibrit tohum (çekirdek) elde edilememesidir. Buna bir de elde edilen tohumların çok düşük çimlenme oranı eklendiğinde elde edilen F1 hibrit bitki sayısı 68’de kalmıştır.

“Boğazkere x Regent” kombinasyonunda sağlıklı gelişen 165 adet F1 bitkisi seçilmiş ve külleme ve mildiyö hastalıklarına dayanıklılıkla ilişkili olarak farklı araştırmacılar tarafından tespit edilerek yayınlanan ve ayrıntılı özellikleri Tablo 1’de verilen markörler ile PCR analizleri yapılarak, söz konusu hastalıklara dayanıklı olma olasılığı yüksek fenotipler, erken dönemde teşhis edilmiştir. Yukarıdaki işlem basamakları ikinci kombinasyon olan “Kalecik Karası x Regent” kombinasyonunda toplam 27 adet bitkide gerçekleştirilebilmiştir.

VMC8g9 primeri ile 160 bp allele sahip olan genotipler, külleme hastalığına dayanıklılıkla ilişkili olduğu belirlenen Run1 (Resistenz uncinula necator; Külleme) geni ile sıkı ilişkili bulunmuştur (Merdinoğlu et al. 2006). Markörün küllemeye dayanıklılıkla ilişkili Marköre Dayalı Seleksiyon (MDS) amaçlı kullanımı farklı araştırmacılar tarafından denenmiş ve dayanıklılıkla ilişkisi doğrulanmıştır (Eibach et. al. 2007, Debreceni et. al. 2010). Ancak yukarıda verilen çalışmaların hepsinde populasyonlar *Muscadinia rotundifolia* melezlerinden oluşmaktadır. Projede, elde edilen F1 bitkilerinden hiçbirisinin 160 bp allele sahip olmadığı belirlenmiştir. Bu durumun Run1 geninin 2n=40 kromozoma sahip, *Muscadinia* alt cinsine ait *Muscadinia rotundifolia*’da belirlenmiş olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Nitekim proje populasyonumuzda kullandığımız ebeveynlerin tamamı 2n=38 kromozoma sahip Euvitis alt cinsine aittir. Melezlemelerimizde dayanıklılık kaynağı olarak kullandığımız ebeveyn, ‘Regent’ çeşidinin de 160 bp allele sahip olmadığı görülmüştür (Tablo 3-4). Bu nedenle projedeki populasyonlarımızda VMC8g9 primerinin Marköre Dayalı Seleksiyon (MDS=MAS) amaçlı kullanımının uygun olmadığı söylenebilir. Bu

nedenele bu primer sonuçları projede MDS amaçlı değerlendirmelerde kullanılmamıştır.

VMC1g3.1 markörü Merdinoğlu et al. (2006) tarafından Rpv1 (Resistenz Plasmopora viticola) geni ile ilişkili olarak *Muscadinia rotundifolia*' da belirlenmiştir. 122 bp allele sahip bireylerin *Plasmopora viticola* (mildiyö) hastalığına yüksek oranda dayanıklı olduğu yapılan araştırmalarda ortaya çıkarılmıştır (Merdinoğlu et al. 2006; Eibach et al. 2007, Debreceni et al. 2010). “Boğazkere x Regent” melezleme kombinasyonumuzda dayanıklı ebeveyn olan ‘Regent’ çeşidinin 122/139 bp allellere sahip olduğu, populasyondaki F1 bitkilerinden 78 adetinin de dayanıklılıkla ilişkili 122 bp allele sahip olduğu belirlenmiştir. “Kalecik Karası x Regent” kombinasyonunda ise toplam 19 adet bireyin 122 bp allele sahip olduğu belirlenmiştir. Bu bireyler mildiyö hastalığına dayanıklı olabilecekleri düşüncesiyle seçilmişlerdir.

Welter et al. (2007) “Regent x Lemberger” melezlemesinden oluşan populasyonu kullanarak geliştirdikleri genetik haritada, 15 numaralı kromozomda UDV015b markörü ile mildiyöye dayanım arasında sıkı bir ilişki tespit etmiş, Eibach et al. (2007) araştırmasında bu ilişkiyi destekler sonuçlara ulaşmıştır. Projede UDV015 primeri kullanarak yaptığımız PCR analizlerinde “Boğazkere x Regent” kombinasyonunda 45 adet bireyin, dayanıklı ebeveyn ‘Regent’ ile aynı allellere sahip olduğu belirlenmiştir. Bu bitkiler mildiyöye dayanıklı çeşit adayları olarak seçilmişlerdir. “Kalecik Karası x Regent” kombinasyonunda hiçbir F1 bitkisinin dayanıklı ebeveynin allellere sahip olmadığı belirlenmiştir.

Akkurt ve ark. (2007) ScORA7-760 markörü ile küllemeye dayanıklılık arasında güçlü bir ilişki tespit etmişlerdir. Projede “Boğazkere x Regent” melezleme kombinasyonunda 51 adet fenotip ScORA7-760 markörü ile 760 bp büyüklüğünde bant oluşturdıkları için küllemeye dayanıklı fenotip adayları olarak seçilmişlerdir. “Kalecik Karası x Regent” kombinasyonunda ise 27 adet F1 bitkisinden 19 adeti küllemeye dayanıklılıkla ilişkili banta sahip olduğu için dayanıklı çeşit adayları olarak seçilmiştir.

GLP1-12 CAPS primeri mildiyöye dayanıklılıkla ilişkili Rpv geni ile bağlantılı olarak *Muscadinia rotundifolia*'dan geliştirilmiştir (Merdinoğlu et al. 2006). GLP 1-12 primerinin amplifikasyon ürünleri EcoRI ile kesildiklerinde, dayanıklı bireyler 670 bp ve 200 bp olmak üzere iki allele ayrılırken, hassas bireyler kesim oluşturmamıştır (Merdinoğlu et al. 2006, Molnar et al.2007, Eibach et al. 2007 Debreceni et al. 2010). Projede üzerinde çalıştığımız populasyonlardan “Boğazkere x Regent” kombinasyonunda toplam 44, “Kalecik Karası x Regent” kombinasyonunda toplam 13 F1 bitkisi dayanıklı bireylerdeki kesim ürünü allellere (670 bp ve 200 bp) sahip olarak, dayanıklı fenotip adayları olarak seçilmişlerdir.

ScPR-A14 markörü mildiyöye dayanıklılıkla ilişkili olarak tespit edilmiştir (Akkurt et al.

yayınlanmamış). Dayanıklı bireyler SCPR-A14 primeri ile 460 bp büyüklüğünde amplifikasyon ürünü bant oluştururken, hassas bireyler bant oluşturmamışlardır. Buna göre “Boğazkere x Regent” kombinasyonunda 66 adet birey dayanıklı çeşit adayı olarak seçilirken, “Kalecik Karası x Regent” populasyonunda 3 adet birey dayanıklı çeşit adayı olarak seçilmiştir.

Külleme ile ilişkili markörlerden ScORN3-32 markörü ile hassas ‘Boğazkere’ çeşidi de dahil olmak üzere “Boğazkere x Regent” populasyonunda F1 bitkilerinin %80’ i, “Kalecik Karası x Regent” populasyonunda F1 bitkilerinin tamamı amplifikasyon ürünü oluşturmuştur. Bu nedenle, bu markör MDS ile erken seleksiyon amaçlı değerlendirmeye alınmamıştır.

PCR analizleri toplu olarak değerlendirildiğinde, MDS sonucu “Boğazkere x Regent” melezleme populasyonunda F1 bitkilerinden 24 adeti hastalıklara dayanımla ilişki hiçbir markör ile pozitif sonuç vermediği için erken seleksiyonla ıslah çalışmalarından elenmiştir (Tablo 3, mavi vurgu rengi ile işaretli bireyler). Toplam 108 adet F1 en az 1 veya 2 markör ile pozitif sonuç verdiği için ümitvar olarak ikinci aşamaya alınmışlardır. **MDS sonrası 36 adet F1 bitkisi ise 3 ve daha fazla markör ile pozitif sonuç verdikleri için hastalıklara dayanıklı olma olasılıkları yüksek olarak değerlendirilerek, erken seleksiyon ile dayanıklı çeşit adayları olarak seçilmişlerdir** (Tablo 3 yeşil vurgu rengi ile işaretli bireyler). “Kalecik Karası x Regent” populasyonunda 10 numaralı birey dışındaki tüm F1 bitkileri en az bir markör yönüyle pozitif olduklarından ümitvar olarak seçilmişlerdir (Tablo 4).

Projenin devamında, genotipik ve fenotipik verilerin karşılaştırılması ve kullanılan markörlerin etkinliğinin test edilmesi amacıyla, inokülasyon tekniği ile külleme ve mildiyöye dayanıklı ve hassas bireylerin testlemesi çalışmaları devam edecektir.

Tablo 3: “Boğazkere x Regent” melezleme kombinasyonunda F1 bitkilerinin PCR analiz sonuçları

Primer	VMC8g9 (Run1 külleme)		VMC1g3.2 (Rpv1 mildiyö)		UDV015 (Rpv1 mildiyö)		ScORA7-760 (kül.)	ScORN3-32 (kül.)	GLP1-12 (Rpv1 mildiyö)	ScPR-A14 (mildiyö)
	Allel Büyüklüğü bp	Allel Büyüklüğü bp	Allel Büyüklüğü bp	Allel Büyüklüğü bp	Allel Büyüklüğü bp	Allel Büyüklüğü bp	Bant var (1); bant yok (0)	Bant var (1); bant yok (0)	Kesim var (1); kesim yok (0)	Bant var (+); bant yok (-)
Regent	173	176	122	139	188	192	1	1	1	1
B.kere	163	168	127	155	169	177	0	1	0	0
2 ***	163	173	122		177	192	0	1	1	1
3 **	163	176	122		-	-	0	1	-	1
4 ***	163	173	127	139	188	192	1	1	-	1
6 ****	163	173	122	127	177	188	1	1	1	1
7 **	163	173	-	-	177	188	1	1	-	1
8 **	163	176	-	-	-	-	1	1	-	1
9 ****	163	173	122	127	188	192	1	1	-	1
10 *	163	173	122	127	177	-	0	1	-	-
11	163	-	-	-	-	-	0	1	0	-
12 **	163	176	122	139	177	-	0	1	0	1
13 ****	163	176	127	-	188	192	1	1	1	1
14 ****	163	173	122	127	188	192	1	1	0	1
15 *	163	173	127	-	177	-	0	1	0	1
16	163	176	127	-	177	-	0	1	0	0
17 *	163	176	122	139	177	192	0	1	0	1
18 **	163	173	122	127	177	188	0	1	0	1
19 *	163	173	127	-	177	-	0	1	-	1
20	163	173	127	-	177	-	0	0	-	0
21 ***	163	176	122	127	177	-	1	1	1	0
22 ***	163	176	122	139	177	188	1	1	1	0
23	163	176	127	-	177	-	0	0	0	0
24 ***	163	173	122	127	177	188	1	1	-	1

25 **	163	_	122	_	177	_	0	1	-	1
26 **	163	173	122	127	177	188	1	1	0	0
27 **	163	_	122	127	192	_	0	1	1	0
29 **	163	173	127	_	188	192	1	1	-	0
30 ***	163	176	127	139	188	192	1	1	1	1
32 ***	163	173	127	_	177	188	1	1	1	1
33 **	163	173	122	127	177	_	0	1	1	0
35 ****	163	176	122	139	188	192	1	1	1	1
36 **	163	176	_	_	188	192	1	1	-	0
37 **	163	176	127	139	177	188	1	1	-	1
38 **	163	173	127	_	177	192	1	1	1	0
39	163	176	127	139	177	192	0	1	-	0
40 ***	163	173	127	_	177	_	1	1	1	1
41 *	163	176	122	127	177	192	0	0	-	0
42	163	173	127	_	188	_	0	0	-	0
43 ***	163	173	_	_	188	192	1	1	-	1
45 **	163	_	122	139	177	192	1	1	-	0
46 **	163	176	122	127	177	_	0	1	-	1
47 *	163	176	127	139	177	_	0	1	-	1
48 ***	163	176	122	127	188	192	1	1	-	0
49 **	163	176	127	139	177	188	1	1	-	1
50 **	163	176	127	139	188	192	1	1	-	0
51 ****	163	173	122	127	177	188	1	1	1	1
52 *	163	_	127	_	177	192	0	1	1	0
53	163	176	_	_	177	188	0	0	-	0
54 ***	_	_	122	139	188	192	1	1	0	0
55 *	163	173	127	_	177	188	1	1	-	0
56 *	163	_	122	139	177	192	0	1	-	0
57**	163	173	127	139	188	192	1	1	0	0
58 *	163	173	127	139	177	188	1	1	-	0
59 **	_	_	122	139	188	192	0	0	-	0

60 ***	163	176	122	127	188	192	1	1	-	0
61	163	176	139	_	177	188	0	0	-	0
62 *	163	176	127	139	177	_	0	1	-	1
63 ***	163	176	122	127	177	_	0	1	1	1
64 *	163	173	122	127	192	_	0	1	0	0
65 **	163	176	_	_	188	192	1	1	-	0
66 **	163	173	127	139	188	192	1	1	1	0
67 *	163	176	122	127	177	192	0	0	-	0
68 *	163	_	127	139	192	_	1	1	-	0
69 *	163	173	122	127	_	_	0	0	-	0
71	163	176	127	139	177	192	0	1	0	0
72 **	163	176	127	_	188	192	1	1	0	0
73 *	163	176	127	139	177	192	0	1	0	1
74 *	163	_	_	_	177	192	0	1	-	1
75 *	163	176	122	127	177	192	0	0	-	0
76	163	_	127	139	177	_	0	1	-	0
77 *	163	_	122	_	177	_	0	1	-	0
78	163	173	127	139	_	_	0	1	-	1
79 *	163	_	122	127	177	192	0	1	-	0
80 **	163	173	127	_	177	188	0	1	1	1
81 *	163	_	127	_	177	_	0	1	0	1
82	163	176	127	139	177	_	0	1	-	0
83 ***	163	173	122	127	188	192	0	1	1	0
85 *	163	173	127	_	177	188	0	1	0	1
86	163	176	127	139	177	_	0	0	-	0
87 *	163	173	127	_	177	192	0	1	-	1
88	163	173	_	_	_	_	0	0	-	0
89 ****	163	173	122	139	188	192	0	1	1	1
91 *	163	176	_	_	177	192	0	1	-	1
92 *	163	_	127	139	177	_	0	1	1	0
93 **	163	173	127	_	188	192	1	1	0	1

94 **	163	173	-	-	188	192	0	0	-	1
95 **	163	173	127	-	188	192	1	1	-	0
96	163	176	139	-	177	188	0	0	-	0
97 **	163	176	122	139	177	188	0	1	-	1
98	163	176	-	-	177	188	0	0	-	0
99 **	163	176	-	-	177	188/192	1	1	-	0
102 *	-	-	127	-	177	188		1	0	1
103 **	163	176	122	139	177	188	1	1	-	0
104 *	163	176	-	-	177	188	1	1	-	0
107 *	163	176	122	139	177	188	0	1	-	0
108 *	-	-	-	-	177	188	1	1	1	0
90	-	-	127	-	177	192	0	1	0	0
101 **** *	163	176	122	139	177	188/192	1	1	1	1
109 ** *	-	-	125	127	177	188/192	1	1	1	0
110 ** ** *	163	173	122	127	188	192	1	1	-	1
111 *	163	173	-	-	188	192	0	0	-	0
112 ** *	163	173	122	127	177	188	0	1	1	1
113 *	163	173	-	-	169	177	0	1	1	0
114 *	163	173	-	-	177	188	0	1	-	1
117 **	163	173	122	139	169	175	0	1	0	1
119 **	163	173	127	139	188	192	1	1	-	0
122 **	163	176	122	127	177	188/192	0	1	-	0
123 *	163	173	-	-	188	192	0	0	-	0
124 *	163	176	122	127	177	188	0	1	-	0
125 *	163	-	122	127	177	192	0	1	-	0
126 *	163	176	122	139	177	188	0	0	-	0
127 *	-	-	126	127	177	188/192	0	0	-	0
129 **	163	176	-	-	188	192	0	1	-	1
131 *	163	173	122		177	188	0	1	-	0
132 **	163	173	127	139	177	188/192	0	1	0	1
133 **	163	173	-	-	177	192	0	1	1	1

134 **	173	176	139	146	177	188	1	1	0	1
135 *	163	173	122	127	177	188	0	0	0	0
136 *	163	173	122	139	177	188	0	1	0	0
137 *	163	173	139	146	177	188	0	0	1	0
139 *	163	173	-	-	177	188/192	0	0	-	0
140 *	163	176	122	127	177	188	0	1	0	0
141 *	163	-	122	139	177	192	0	0	-	0
142 **	163	173	122	127	177	192	0	1	0	1
144 *	163	173	127		177	188	0	1	0	1
145 **	163	176	122		188	192	0	0	-	0
146 *	163	176	127	139	-	-	0	1	-	1
148 **	163	176	-	-	177	192	0	1	1	1
151 **	163	173	-	-	188	192	0	1	1	0
152 *	163	173	127	139	177	188	0	0	1	0
154 **	163	176	126	127	177	188	1	1	1	0
156 **	163	176	122	139	169	175	0	1	-	1
157 **	163	176	-	-	177	188	1	1	0	1
158 ***	163	176	122	139	169	177	0	0	1	1
159 *	163	173	122	127	-	-	0	0	-	0
160 **	163	176	127	139	188	192	1	0	-	0
162	163	-	127		177	188	0	0	-	0
165 **	163	173	122	139	177	188	1	0	0	0
166 **	163	173	122	127	177	192	0	0	1	0
168 ***	163	173	122	139	177	188	1	1	1	1
200 ***	163	-	122		-	-	0	1	1	1
202 ***	-	-	122	127	177	188	1	0	1	0
205 ***	163	176	122	127	188	192	0	1	1	0
207 **	163	176	122	139	177		0	1	0	1
218 **	163	176	122	127	-	-	0	1	-	1
235 **	163	-	122	127	177	188	0	1	0	1
243 *	163	176	139	243	177	188/192	0	1	0	0

245 ***	163	176	122	127	177	188/192	0	1	-	1
260 **	163	176	122	127	177	-	0	1	0	1
261 *	163	173	122	139	169	177/188	0	1	0	0
262 ***	163	173	122	127	177	188/192	0	1	1	0
265	-	-	127		177	188	0	0	-	0
269	163	176	-	-	177	188	0	1	-	0
277	163	176	127	139	177	-	0	1	0	0
285 *	163	173	127		177	192	0	1	0	1
292 *	173	176	-	-	177	188/192	0	1	0	0
296	163	176	127		177	188	0	1	-	0
299 ***	163	176	122	139	-	-	0	1	1	1
311 *	163	-	149		177	188/192	0	1	1	0
312 *	163	176	122	139	177	188	0	1	0	0
318 ***	163	176	122	139	188	192	0	1	1	0
322 *	163	176	122	127	177	192	0	1	-	0
325	163	173	-	-	177	188	0	1	-	0
326 ***	163	173	122	127	177	192	0	0	1	1
327	163	173	143	-	177	188	0	1	0	0
330 **	163	176	122	139	177	188	0	1	1	0
334 *	163	176	122	139	177	188	0	1	0	0
339 **	163	176	122		177	188/192	0	1	0	0
348 **	163	176	122	127	177	188	0	1	0	1

*: Örneklerin kaç adet markör yönüyle pozitif olduğunu göstermektedir; *: Mildiyö ile ilişkili markörler yönüyle pozitif *: Külleme ile ilişkili markörler yönüyle pozitif; 327:Herhangi bir markör ile pozitif değil; 326: hastalıkara dayanıklılıkla ilişkili en az 3 markör yönüyle pozitif.

Tablo 4: “Kalecik Karası x Regent” melezleme kombinasyonunda F1 bitkilerinin PCR analiz sonuçları

Primer	VMC8g9		VMC1g3.2		UDV015		ScORA7-760	ScORN3-32	GLP1-12	ScPR-A14
	Allel Büyüklüğü bp	Allel Büyüklüğü bp	Allel Büyüklüğü bp	Allel Büyüklüğü bp	Allel Büyüklüğü bp	Allel Büyüklüğü bp	Bant var (1); bant yok (0)	Bant var (1); bant yok (0)	Kesim var (1); kesim yok (0)	Bant var (+); bant yok (-)
Regent	173	176	122	139	188	192	1	1	1	1
K. Karası	163	173	120	127	167	177	0	1	0	0
1 **	163	173	122	-	-	-	0	1	1	0
2 *	163	173	122	-	177	-	0	1	-	0
5 *	163	173	127	139	167	175	0	1	1	0
6 **	163	173	122	-	175	177	0	1	1	0
7 **	163	173	122	-	177	-	0	1	1	0
8 **	163	173	122	120	169	177	0	1	1	0
9 **	163	173	122	-	167	-	0	1	1	0
10	-	-	127	139	-	-	0	1	-	0
11 **	163	173	122	-	167	177	0	1	1	0
12 **	163	173	122	127	169	177	0	1	1	0
13 *	173	176	127	139	177	188	0	1	1	0
14 *	163	173	122	127	167	177	0	1	-	0
15 *	163	176	122	139	-	-	0	1	-	0
16 *	163	173	122	120	167	177	0	1	-	0
17 *	-	-	122	127	167	177	0	1	-	0
18 *	163	173	122	-	167	177	0	1	0	0
19 *	-	-	122	120	167	177	0	1	-	0
20 *	163	-	122	-	167	177	0	1	0	0
21 **	163	173	122	127	167	177	0	1	1	0
22 **	163	173	139	-	177	188	1	1	0	1
23 *	163	173	122	127	167	-	0	1	0	0
24 **	173	176	139	143	177	188	1	1	1	1
25 *	-	-	122	-	177	-	0	1	0	0
26 **	-	-	122	139	-	-	0	1	0	1
27 *	-	-	120	-	-	-	0	1	1	0

VI. Kaynaklar

Akkurt, M., Welter, L., Maul, E., Töpfer, R., Zyprian, E. 2007: Development of SCAR markers linked to powdery mildew (*Uncinula necator*) resistance in grapevine (*Vitis vinifera* L.). Mol. Breed. 19, 103-111.

Debreceni, D.K., Lencses, A.K., Szöke, A., Veres, A., Hoffman, S., Kozma, P., Kovacs, L.C., Heszky, L., Kiss, E. 2010: Marker-assisted selection for two dominant powdery mildew resistance genes introgressed into a hybrid grape population. Scientia Hort. 126:448-453.

Donald, T. M., Pellerone, F., Adam-Blondon, A. F., Bouquet, A., Thomas, M. R., Dry, I. B. 2002: Identification Of Resistance Gene Analogs Linked To A Powdery Mildew Resistance Locus In Grapevine. Theor. Appl. Genet. 104, 610-618.

Eibach, R., Zyprian, E., Welter, L., Töpfer, R. 2007: The use of molecular markers for pyramiding resistance genes in grapevine breeding. Vitis 46:120–140.

Molnar, S., Galbacs, Z., Halasz, G., Hoffmann, S., Kiss, E., Kozma, P., Vers, A., Galli, Zs., Szöke, A., Heszky, L. 2007: Marker assisted selection (MAS) for powdery mildew resistance in a grapevine hybrid family. Vitis 46, 212–213.

Welter, L. J., Baydar, N.G., Akkurt, M., Maul, E., Eibach, R., Töpfer, R., Zyprian, E. 2007: Genetic mapping and localization of Quantitative trait loci affecting fungal disease resistance and leaf morphology in grapevine (*Vitis vinifera* L.). Mol. Breeding 20:359-374.

Wiedemann-Merdinoglu, S., Prado, E., Coste, P., Dumas, V., Butterlin, G., Bouquet, A., Merdinoglu, D. 2006: Genetic Analysis Of Resistance To Downy Mildew From *Muscadinia Rotundifolia*. 9th Int.Conf. Grape Genet. Breed., Udine, Italy.

VII. Ekler

a) Mali Bilanço ve Açıklamaları

Proje toplam bütçesi: 79. 305 TL (proje bütçesi) + 27. 360 TL (Ek bütçe) = 106.665 TL

Gider Kalemleri:

1. yıl:

Makine Teçhizat: Kablosuz Hava İstasyonu

Sarf Malzeme:

Jiffy şişen tablet: Melezlemeden elde edilen bitkiciklerin şaşırtılması ve bitkiye dönüştürülmesinde kullanılmıştır

Sıvı azot: DNA izolasyonu için toplanan yaprak örneklerinin şok dondurulmasında kullanılmıştır.

Penset vb.: Melezleme çalışmalarında kullanılmıştır

Kimyasal sarf: DNA izolasyonlarında kullanılmıştır

2. ve 3. Yıl:

Kimyasal sarf malzeme: DNA izolasyonları, PCR analizleri ve Beckmann Fragment analizi için gerekli sarf malzemeler, ilgili analizlerde kullanılmıştır

Toplam gider: 84.869.18 TL

Kalan

21.795.82 TL

b) Makine ve Teçhizatın Konumu ve İlerideki Kullanımına Dair Açıklamalar

Projede makine teçhizat kodunda yalnızca kablosuz hava istasyonu satın alınmıştır. İstasyonun, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Araştırma ve Uygulama başına montajı yapılmış ve vejetasyon döneminde sıcaklık ve nem değerlerinin elde edilmesi amacıyla kullanılmaktadır.

Proje gider kalemlerindeki kimyasal sarf malzemeler, yukarıda açıklanan analizlerin gerçekleştirilmesi aşamalarında kullanılmıştır.

c) Yayınlar

Proje sonuçlarının değerlendirilmesi ve yayın hazırlığı devam etmektedir.