

## Kaman Cevizlerinde Apomiksis Olasılığının Dişi Çiçeklerin İzolasyonu ve Moleküler Yöntemlerle Araştırılması

Serkan AKCAN<sup>1</sup> Salih KAFKAS<sup>1</sup> Mehmet SÜTYEMEZ<sup>2</sup>  
Yaşar AKÇA<sup>3</sup> Sinan ETİ<sup>1</sup> Nurgül TÜREMİŞ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Adana

<sup>2</sup>Kahramanmaraş Sütçüimam Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Kahramanmaraş

<sup>3</sup>Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Tokat

### Öz

Bu çalışmada Kaman cevizlerinde apomiksis olasılığının, dişi çiçeklerin izolasyonu ve moleküler markör yöntemleriyle ortaya çıkarılması amaçlanmıştır. İzolasyon çalışmaları Kırşehir’de Kaman-1 ve Kaman-5 genotiplerinin orijinal ağaçlarında ve Kahramanmaraş’da aşılı ağaçlarda iki yıl süresince yapılmıştır. DNA analizlerinde apomiktik ceviz fidanı üretimi yapan iki farklı fidan üreticisinden alınan Kaman-1 ve Kaman-5 genotiplerine ait 40 adet bitki ve ayrıca apomiktik olduğu belirtilen fidanlarla önceden kurulmuş ve meyve vermeye başlamış 20 ağaç kullanılmıştır. 62 adet ceviz genotipi ISSR ve SRAP yöntemleri kullanılarak karakterize edilmişlerdir. SRAP tekniği cevizde ilk defa bu çalışmada kullanılmıştır. Kaman-1 genotipine ait çöğürlerde 10 SRAP primer çifti toplam 94 adet bant üretmiş ve bunların 52 adedinin polimorfik olduğu belirlenmiştir. ISSR analizlerinde ise 15 adet primer 112 adet bant vermiş ve bunların 67 adedinin polimorfik olduğu belirlenmiştir. Kaman-5 genotipine ait çöğürlerde ise 10 SRAP primer çifti toplam 91 adet bant üretmiş ve bunların 48 adedinin polimorfik olduğu belirlenmiştir. ISSR analizlerinde ise 15 adet primer 92 adet bant vermiş ve bunların 54 adedinin polimorfik olduğu belirlenmiştir. ISSR yönteminin, SRAP tekniğine göre birbirine yakın ceviz genotiplerini daha iyi ayırdığı belirlenmiş ve iki yöntemden elde edilen genetik benzerlik katsayıları arasındaki korelasyon düşük (0.22) bulunmuştur. İzolasyon çalışmaları ve moleküler analizler sonucunda apomiktik olduğu iddia edilerek satılan ceviz fidanlarının apomiktik olmadıkları ortaya çıkmıştır. Bunların ötesinde, bu bitkilerde çok geniş bir varyasyonun olduğu ve hatta denemede yer alan bazı bitkilerin farklı ana bitkilerin çöğürleri olabileceği belirlenmiştir. Sonuç olarak, üreticilerin apomiktik olarak satılan ceviz fidanlarını satın almamaları, bunun yerine aşılı ve ismine doğru çeşitlerle ceviz bahçesi kurmaları gerektiği belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Ceviz, SRAP, ISSR, apomiksis, *Juglans regia* L.

### Determination of Apomixis Possibility in Kaman Walnut Genotypes by Bagging of Pistillate Flowers and Molecular Markers

#### Abstract

This study aimed to explain apomixis possibility in Kaman walnut genotypes by bagging of female flowers and molecular marker analysis. Bagging study in Kaman-1 and Kaman-5 genotypes was performed in Kırşehir using original seedling trees and in Kahramanmaraş using grafted trees during two years. In molecular analysis, 40 Kaman-1 and Kaman-5 seedlings that are sold as apomictic by two different nurserymen and 20 mature seedling trees were used. All walnut seedlings were characterized by ISSR and SRAP markers. In this study, it is the first attempt to use SRAP technique in walnut. In Kaman-1, 10 SRAP primer pairs produced totally 94 bands and 52 of them were polymorphic, while 15 ISSR primers amplified 112 bands and 67 of them were polymorphic. In Kaman-5 10 SRAP primer pairs produced totally 91 bands and 48 of them were polymorphic, while 15 ISSR primers amplified 92 bands and 54 of them were polymorphic. ISSR markers differentiated closely related walnut seedlings better than SRAP ones, and the correlation between ISSR and SRAP genetic similarity matrices was found very low (0.22). The results of bagging and molecular studies clarified that walnut seedlings sold as apomictic by nurserymen are definitely not apomictic. Moreover, a large variation among the seedlings was determined and some of the seedlings are probably seedlings of the other walnut trees. In conclusion, it is suggested to the walnut farmers that walnut seedling sold as apomictic shouldn't be bought and they have to establish their walnut orchards with true to name grafted walnut plants.

**Key Words :** Walnut, SRAP, ISSR, apomixis, *Juglans regia* L.

## Giriş

*Dicotyledoneae* sınıfı, *Juglandales* takımı, *Juglandaceae* familyası, *Juglans* cinsinden olan cevizin; en çok *J. regia* türünün ticareti ve kültürü yapılmaktadır. Ülkemizin hemen hemen her bölgesinde ceviz yetiştiriciliği yapılmakta olup 2005 yılı istatistiklerine göre, Türkiye yıllık 133 000 ton ceviz üretimiyle dünyada 4. sırada yer almaktadır (Anonim, 2005). Türkiye’de 4 milyon civarında ceviz ağacı bulunmasına rağmen çoğu tohumdan çıktığı için her biri ayrı bir genotip durumundadır. İslah açısından bakıldığında bu durum çok önemli olsa da, ihracatta bir yeknesaklık sağlama bakımından dezavantajdır.

Türkiye’nin dünya ceviz ihracatında rekabet edecek güce gelmesinin tek yolu standart çeşitlerle kapama bahçeler kurmaktır. Nitekim son zamanlarda ülkemizde yoğun aşılı ceviz fidanı talebini karşılamak için ceviz çöğürleri tırpanlanarak yeni süren sürgünlerin aşısı sürgünü olarak tanıtılması ve bu gibi çöğürlerin aşılı ceviz fidanı olarak satılması, apomiktik olduğu iddia edilerek bazı fidan üreticilerinin yüksek fiyattan tohum veya çöğür satması, yaygın olarak karşımıza çıkan bir sorundur. Üreticiler bu durumu ancak ağaçların uzun süre meyveye yatmamasından ve meyveye yatan ağaçların meyvelerinin birbirinden çok farklı olmasından anlamaktadırlar. Uzun yıllar sonra anlaşılan bu sorun, sadece üreticiye zarar vermekle kalmayıp aynı zamanda ülkemiz ceviz yetiştiriciliğine de büyük zararlar vermektedir. Apomiktik olarak satılan genotiplerin apomiktik özelliğe sahip olması durumunda ise cevizlerde çok ciddi bir sorun olan çoğaltma ve fidan üretiminde bir homojenlik sağlanacaktır. Bu nedenle, cevizlerde apomiksisin incelenerek durumun genetiksel olarak ortaya konulması, hem pratik açıdan hem de ileride yapılacak ıslah çalışmalarına da genetik bilgi sağlaması bakımından oldukça önemlidir.

Genetik çeşitliliği belirlemek için kullanılan morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal yöntemler çevresel faktörlerden etkilenmekte ve oldukça zaman almaktadır. DNA markör tekniklerinin geliştirilmesiyle farklı ekolojilerdeki genetik materyaller daha kolay karakterize edilebilmektedir. Günümüzde SSR, ISSR, AFLP ve SRAP gibi moleküler markör teknikleri bu amaçla yoğun bir şekilde kullanılmaktadır. İşte bu çalışmanın amacı, ticari olarak satılmakta olan ceviz fidanlarının apomiktik olup olmadığını, çiçeklerin izole edilmesiyle ve DNA düzeyinde, moleküler markör tekniklerini kullanarak belirlemektir. Böylece eğer üretilen çöğürler apomiktik iseler, bu şekilde fidan üretimine ülke olarak daha fazla destek verilmesi, aksi durumda ise bir an önce büyük bir yanıltan geri dönülmesi için girişimde bulunulması gerekecektir.

## Materyal ve Metot

### Materyal

Kırşehir’in Kaman ilçesinde bulunan ve apomiktik oldukları belirtilen Kaman-1 ve Kaman-5 genotipleri ile, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi (KSÜ)’nde aşılı olarak bulunan Kaman-1 ve Kaman-5 genotipleri, dişi çiçeklerin izolasyonu çalışmasında kullanılmıştır.

Ayrıca cevizde apomiksisi moleküler olarak belirlemek amacıyla, Kaman-1 ve Kaman-5 çeşitlerinden apomiktik ceviz fidanı ürettiklerini belirten iki farklı üreticiden alınan toplam 40 adet bitki ile bu iki çeşidin apomiktik olduğu belirtilen tohumlarıyla önceden kurulmuş ve kısmen meyve vermeye başlamış 20 ağaç, materyal olarak kullanılmıştır. Bunların ötesinde Kaman-1 ve Kaman-5 genotiplerinin orijinal ana ağaçları da kontrol olarak kullanılmış olup, böylece toplam 62 adet bitki, moleküler çalışmalarda materyal olarak kullanılmıştır.

## **Metot**

### **Apomiksisin İzolasyon Çalışmalarıyla Belirlenmesi**

Birinci olarak, Kırşehir'in Kaman ilçesindeki Kaman-1 ve Kaman-5 genotiplerine ait orijinal ağaçların ve KSÜ'ndeki aynı genotiplere ait aşılı ağaçların apomiktik meyve oluşturup oluşturmadıkları izolasyon çalışmaları ile belirlenmeye çalışılmıştır. Bu amaçla her bir genotipte 300 civarında dişi çiçek, çiçek tozu geçirmeyen çok ince sentetik kumaş torbalarla izole edilmiş ve benzer sayıda dişi çiçek de doğal tozlanmaya bırakılmıştır. Dişi çiçekler açmadan çok önce yani daha tomurcuklar görülür görülmez izolasyon yapılmıştır. Dişi çiçeklerin reseptiflik dönemi geçtikten yaklaşık 10 gün sonra ise izolasyon torbaları çıkartılmıştır. İzolasyon çalışmaları 2005 ve 2006 yıllarında yapılmış, ancak Kaman'da 2006 yılında don zararı olması nedeniyle 2007 yılında da izolasyon tekrarlanmıştır. Sonuçta izole edilen ve edilmeyen çiçeklerde meyve tutan çiçek sayısı ve oranı belirlenmiştir.

### **Apomiksisin DNA Analizleri ile Belirlenmesi**

İkinci olarak, apomiktik olarak ceviz fidanı üretimi yaptığı belirtilen iki farklı fidan üreticisinden Kaman-1 ve Kaman-5 genotiplerine ait 20'er adet bitki temin edilmiştir. Ayrıca firmaların ürettiği ve apomiktik olduğu belirtilen fidanlarla önceden Kaman'da kurulmuş ve bazı ağaçları meyve vermeye başlamış Kaman-1 ve Kaman-5 genotiplerine ait birer bahçeden 10'ar ağaç etiketlenerek denemeye alınmıştır. Her bir bitkiden DNA izolasyonu için yaprak örneği alınmış ve bitkiler arasında DNA seviyesinde farklılık olup olmadığı ISSR ve SRAP moleküler markör yöntemleri kullanılarak belirlenmiştir.

DNA izolasyonu Doyle ve Doyle'nin (1987) geliştirdiği ve Kafkas ve ark'nın (2005) modifiye ettiği yönteme göre yapılmıştır. ISSR analizleri Zietkiewicz ve ark. (1994)'nin geliştirdiği ve Doğan'ın (2006) cevize uyarladığı yönteme göre, SRAP analizleri ise Li ve Quiros'un (2001) geliştirmiş olduğu yönteme göre yapılmıştır. ISSR analizlerinde Doğan'ın (2006) belirlediği 15 adet polimorfik primer, SRAP analizlerinde ise 120 primer kombinasyonu arasından seçilen 10 adet primer kombinasyonu kullanılmıştır.

ISSR ve SRAP analizleri sonucunda elde edilen PCR ürünleri 1 x TBE tampon çözeltisinde (89 mM Tris-Cl, 89 mM borik asit, 20 mM EDTA) %2'lik agaroz jelde koşularak etidyum bromit ile boyanmış ve UV ışık altında fotoğrafları çekilmiştir.

### **Verilerin Değerlendirilmesi**

SRAP ve ISSR amplifikasyon ürünleri var (1) yada yok (0) şeklinde değerlendirilmiş ve elde edilen veriler NTSYSpc 2.11V (Rohlf, 2004) bilgisayar paket programında analiz edilmiştir. Kaman-1 ve Kaman-5 genotipleri için ayrı ayrı soyağaçları SRAP ve ISSR verilerinin birlikte değerlendirilmesi ile ve Jaccard genetik benzerlik indeksine göre UPGMA yöntemi kullanılarak elde edilmiştir. Bunların ötesinde çalışmada kullanılan ISSR ve SRAP primerlerinin ayırma güçleri (Prevost ve Wilkinson, 1999) ve polimorfizm bilgi içerikleri (Smith ve ark., 1997) de hesaplanmıştır.

## **Bulgular ve Tartışma**

### **İzolasyon Çalışmaları Sonuçları**

2005 yılı ilkbaharında izolasyon çalışmaları Kırşehir'in Kaman ilçesindeki Kaman-1 ve Kaman-5 genotiplerine ait orijinal ağaçlar ile bu genotiplerin KSÜ'nde aşılı bitkilerinde yapılmıştır. 2006 yılında da her iki lokasyonda izolasyon çalışması yapılmış ancak Kaman'da don zararı olduğu için bu lokasyonda izolasyon çalışması 2007 yılında da tekrar edilmiştir.

Uygulamalarda izole edilen çiçek sayıları 301 ile 453 arasında değişmiş olup; gerek 2005 ve 2006 yıllarında K.Maraş'da, gerekse 2005 ve 2007 yıllarında Kaman'da yapılan izolasyon

alışmalarında meyve tutumu sağlanamamıştır. Kontrol olarak bırakılan çiçeklerde meyve tutma oranı Kaman-1 genotipinde %42.9 ile %61.1 arasında, Kaman-5 genotipinde ise %46.3 ile %57.6 arasında değişim göstermiştir.

İki yıl süresince gerek Kaman ve gerekse K.Maraş'da yapılan izolasyon çalışmaları sonucunda hiç meyve elde edilememesi bu genotiplerin apomiktik meyve vermediğini göstermiştir.

#### **Kaman-1 ögürlerinde DNA Analiz Sonuçları**

Kaman-1 genotipi ögürlerinde ISSR analizleri sonucunda kullanılan 15 adet primerden toplam 112 bant elde edilmiş ve 67 tanesinin polimorfik olduğu belirlenmiştir. Polimorfizm oranı ise %57.85 olarak hesaplanmıştır. En düşük polimorfizm oranı (%25) 858 no'lu ISSR primerinden elde edilirken, en yüksek polimorfizm oranı ise (%87.50) 826 no'lu ISSR primerinden elde edilmiştir. Kullanılan tüm primerler ise ortalama 7.47 bant üretmiştir (izelge 1).

ISSR primerlerinin ortalama polimorfizm bilgi içeriği değeri 0.66 olarak bulunmuştur. En yüksek (0.85) polimorfizm bilgi içeriği değeri 829 no'lu ISSR primerinden elde edilirken, en düşük (0.37) polimorfizm bilgi içeriği ise 834 no'lu primerden elde edilmiştir. Primer çiftlerinin toplam ayırma gücü değeri 15.52 olarak hesaplanmıştır. En yüksek (1.51) ayırma gücü değeri 834 no'lu primerden elde edilmiş olup, en düşük (0.62) ayırma gücü değeri ise 829 no'lu primerden elde edilmiştir (izelge 1).

Çizelge 1. ISSR primerlerinin Kaman-1 genotiplerinde PCR amplifikasyonu sonucu elde edilen toplam bant sayıları (TBS), polimorfik bant sayıları (PBS), polimorfizm oranı (PO), polimorfizm bilgi içeriği (PBİ) ve ayırma gücü (AG) değerleri.

| <b>Primer</b>   | <b>TBS</b>  | <b>PBS</b>  | <b>PO</b>    | <b>PBİ</b>  | <b>AG</b>    |
|-----------------|-------------|-------------|--------------|-------------|--------------|
| <b>808</b>      | 10          | 7           | 70.00        | 0.64        | 1.05         |
| <b>810</b>      | 7           | 3           | 42.86        | 0.62        | 1.08         |
| <b>811</b>      | 9           | 6           | 66.67        | 0.81        | 0.67         |
| <b>814</b>      | 8           | 4           | 50.00        | 0.76        | 0.91         |
| <b>815</b>      | 9           | 7           | 77.78        | 0.58        | 1.10         |
| <b>823</b>      | 7           | 3           | 42.86        | 0.45        | 1.47         |
| <b>826</b>      | 8           | 7           | 87.50        | 0.72        | 0.91         |
| <b>829</b>      | 8           | 4           | 50.00        | 0.85        | 0.62         |
| <b>834</b>      | 8           | 6           | 75.00        | 0.37        | 1.51         |
| <b>846</b>      | 8           | 4           | 50.00        | 0.68        | 1.00         |
| <b>853</b>      | 7           | 6           | 85.71        | 0.70        | 0.91         |
| <b>854</b>      | 5           | 2           | 40.00        | 0.68        | 1.00         |
| <b>855</b>      | 9           | 4           | 44.44        | 0.76        | 0.90         |
| <b>856</b>      | 5           | 3           | 60.00        | 0.58        | 1.22         |
| <b>858</b>      | 4           | 1           | 25.00        | 0.66        | 1.17         |
| <b>Toplam</b>   | <b>112</b>  | <b>67</b>   |              |             | <b>15.52</b> |
| <b>Ortalama</b> | <b>7.47</b> | <b>4.47</b> | <b>57.85</b> | <b>0.66</b> | <b>-</b>     |

Polimorfik olduğu tespit edilen 10 adet SRAP primer çiftinin Kaman-1 genotiplerine uygulanması sonucunda toplam 94 banttan 52 tanesinin polimorfik olduğu ve ortalama polimorfizm oranının %54.5 olduğu belirlenmiştir. En yüksek polimorfizm oranı (%83.33) Me3-Em13 primer çiftinden elde edilirken, en düşük polimorfizm oranı (%20) ise Me3-Em10 primer çiftinden elde edilmiştir. Primer çiftleri ortalama 9.4 bant üretmiştir (izelge 2).

Kaman-5 genotiplerinde ortalama polimorfizm bilgi içeriği değeri 0.63 olarak belirlenmiştir. En yüksek (0.97) polimorfizm bilgi içeriği değeri Me3-Em3 primer çiftinden elde edilirken, en düşük (0.40) polimorfizm bilgi içeriği değeri ise Me3-Em2 primer çiftinden elde edilmiştir.

Ayırma güçleri (AG) bakımından primer çiftleri karşılaştırıldığında; toplam ayırma gücü değeri 8.97 olarak belirlenmiş olup, en yüksek (1.40) ayırma gücü değeri Me3-Em4, en düşük (0.26) ayırma gücü değeri ise Me3-Em3 primer çiftinden elde edilmiştir (Çizelge 2).

Çizelge 2. SRAP primer çiftlerinin Kaman-1 genotiplerinde PCR amplifikasyonu sonucu elde edilen toplam bant sayıları (TBS), polimorfik bant sayıları (PBS), polimorfizm oranı (PO), polimorfizm bilgi içeriği (PBI) ve ayırma gücü (AG) değerleri.

| Primer Çifti    | TBS        | PBS        | PO           | PBI         | AG          |
|-----------------|------------|------------|--------------|-------------|-------------|
| Me1-Em10        | 10         | 7          | 70.00        | 0.57        | 0.45        |
| Me2-Em1         | 12         | 6          | 50.00        | 0.77        | 0.89        |
| Me3-Em1         | 10         | 5          | 50.00        | 0.53        | 1.30        |
| Me3-Em2         | 12         | 7          | 58.33        | 0.40        | 0.87        |
| Me3-Em3         | 10         | 4          | 40.00        | 0.97        | 0.26        |
| Me3-Em4         | 9          | 3          | 33.33        | 0.47        | 1.40        |
| Me3-Em9         | 10         | 6          | 60.00        | 0.73        | 0.87        |
| Me3-Em10        | 5          | 1          | 20.00        | 0.66        | 1.17        |
| Me3-Em13        | 6          | 5          | 83.33        | 0.61        | 1.14        |
| Me10-Em12       | 10         | 8          | 80.00        | 0.61        | 0.61        |
| <b>Toplam</b>   | <b>94</b>  | <b>52</b>  | <b>-</b>     | <b>-</b>    | <b>8.97</b> |
| <b>Ortalama</b> | <b>9.4</b> | <b>5.2</b> | <b>54.50</b> | <b>0.63</b> | <b>-</b>    |

A ve B fidan üreticisinden satın alınan çöğürler ile tohumdan çıkmış ve meyve vermeye başlamış 28 adet Kaman-1 çöğürlerine ve ayrıca orijinal Kaman-1 genotipine uygulanan ISSR ve SRAP teknikleri ile elde edilen verilerin birlikte değerlendirilmesi ile yapılan UPGMA analizleri sonuçlarına göre oluşan soyağacında (Şekil 1) genel olarak iki ana grup oluşmuştur. Birinci grupta Kaman-1 genotipi dahil olmak üzere 22 genotip bulunurken, ikinci grupta 6 genotip yer almıştır. Birinci grup kendi arasında üç gruba ayrılmıştır. Tohumdan çıkmış ve meyve vermeye başlamış bir genotip ise (Tohum-K1-10) bu iki grubun dışında kalmıştır. Grup dışı kalan bu genotip ile birlikte ikinci grupta yer alan genotiplerin Kaman-1 tohumundan çıkmamış olma ihtimalleri oldukça yüksektir. Birinci grupta yer alan genotiplerin ise büyük bir ihtimalle çiçek tozu kaynağına göre gruplaştıkları tahmin edilmektedir. Birbirine en yakın bitkiler FÜA-K1-5 ile FÜA-K1-6 bulunurken, Kaman-1 genotipine en yakın çöğür ise FÜA-K1-8 olmuştur.

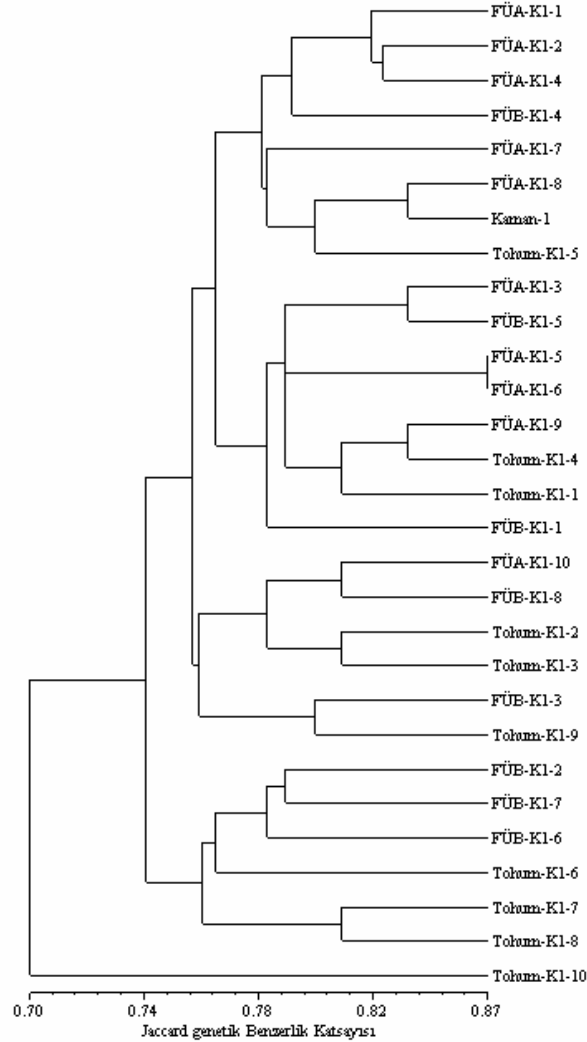
Elde edilen bu sonuçlara göre fidancılardan aşısız apomiktik olarak satışını yaptığı Kaman-1 bitkilerinin apomiktik olmadıkları, birbirlerinden genetik olarak farklı oldukları belirlenmiştir. Bunların ötesinde ‘apomiktik Kaman-1’ olarak satış yapılan bazı bitkilerin Kaman-1 çöğürü bile olamayabileceği yapılan DNA analizleri sonucunda ortaya çıkmıştır.

#### **Kaman-5 Çöğürlerinde DNA Analiz Sonuçları**

Kaman-5 çöğürlerine 15 adet ISSR primerinin uygulanması sonucunda toplam 92 bant elde edilmiş olup, 54 tanesinin polimorfik olduğu belirlenmiştir. Polimorfizm oranı ise %54.62 olarak hesaplanmıştır. En yüksek polimorfizm oranı (%83.33) 855 no’lu primerden elde edilirken, primer başına ortalama 3.53 polimorfik bant düşmüştür. Primerlerin ortalama polimorfizm bilgi içeriği değeri 0.73 olarak belirlenmiş olup, en yüksek (0.99) polimorfizm bilgi içeriği değeri 823 no’lu primerden, en düşük (0.28) polimorfizm bilgi içeriği değeri ise 853 no’lu primerden elde edilmiştir. Primerlerin toplam ayırma gücü değeri 13.95 olarak bulunmuştur. En yüksek (1.70) ayırma gücü değeri 853 nolu primerden elde edilirken, en düşük (0.06) ayırma gücü değeri ise 823 no’lu primerden elde edilmiştir (Çizelge 3).

Kaman-5 çöğürlerine polimorfik olduğu belirlenen 10 SRAP primer çiftinin uygulanması sonucunda toplam 91 bant elde edilmiş ve 48 tanesinin polimorfik olduğu belirlenmiştir.

Polimorfizm oranı ise %53.67 olarak hesaplanmıştır. En düşük polimorfizm oranı (%33.3) Me10-Em9 primer çiftinden elde edilirken, en yüksek polimorfizm oranı (%70) ise Me10-Em8 primer çiftinden elde edilmiştir. SRAP primerleri ortalama 9.1 bant üretmiştir (Çizelge 4).



**Şekil 1.** Apomiktik oldukları iddia edilen Kaman-1 ceviz çöğürlerine uygulanan DNA analizleri (ISSR ve SRAP) sonucunda elde edilen soyağacı (FÜA: Fidan Üreticisi A, FÜB: Fidan Üreticisi B, K1: Kaman 1, K5: Kaman-5, Tohum: Tohumdan çıkmış meyve vermeye başlamış ağaç).

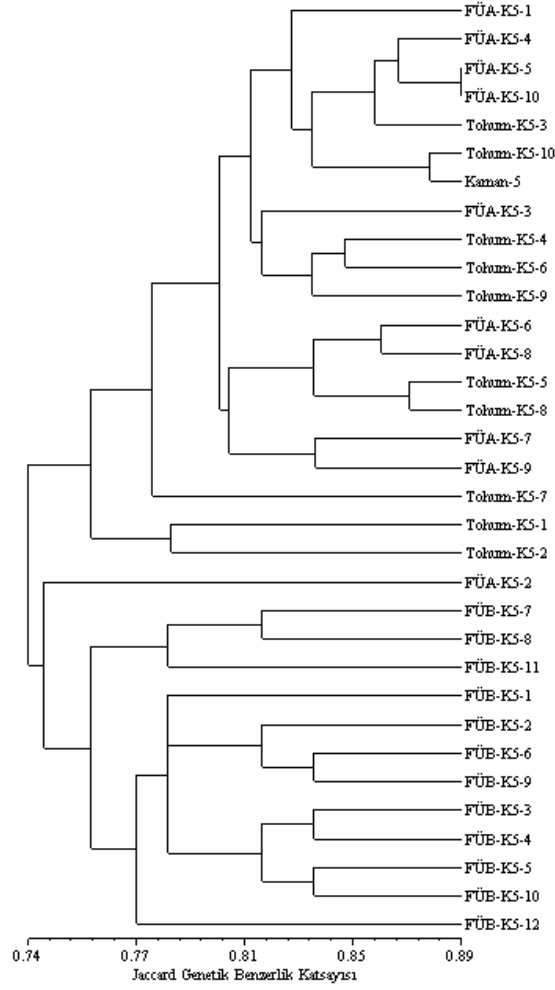
Çizelge 3. ISSR primerlerinin Kaman-5 genotiplerinde PCR amplifikasyonu sonucu elde edilen toplam bant sayıları (TBS), polimorfik bant sayıları (PBS), polimorfizm oranı (PO), polimorfizm bilgi içeriği (PBİ) ve ayırma gücü (AG) değerleri.

| Primer          | TBS         | PBS         | PO           | PBİ         | AG           |
|-----------------|-------------|-------------|--------------|-------------|--------------|
| 808             | 9           | 7           | 77.78        | 0.73        | 0.85         |
| 810             | 10          | 6           | 60.00        | 0.77        | 0.84         |
| 811             | 5           | 4           | 80.00        | 0.75        | 0.79         |
| 814             | 9           | 4           | 44.44        | 0.74        | 0.89         |
| 815             | 4           | 2           | 50.00        | 0.52        | 1.30         |
| 823             | 4           | 1           | 25.00        | 0.99        | 0.06         |
| 826             | 12          | 9           | 75.00        | 0.73        | 0.94         |
| 829             | 4           | 2           | 50.00        | 0.85        | 0.76         |
| 834             | 7           | 4           | 57.14        | 0.83        | 0.67         |
| 846             | 6           | 4           | 66.67        | 0.54        | 1.33         |
| 853             | 4           | 1           | 25.00        | 0.28        | 1.70         |
| 854             | 4           | 1           | 25.00        | 0.70        | 1.10         |
| 855             | 6           | 5           | 83.33        | 0.60        | 1.18         |
| 856             | 4           | 3           | 75.00        | 0.96        | 0.40         |
| 858             | 4           | 1           | 25.00        | 0.67        | 1.15         |
| <b>Toplam</b>   | <b>92</b>   | <b>54</b>   | <b>-</b>     | <b>-</b>    | <b>13.95</b> |
| <b>Ortalama</b> | <b>6.13</b> | <b>3.60</b> | <b>54.62</b> | <b>0.71</b> | <b>-</b>     |

SRAP primer çiftlerinin ortalama polimorfizm bilgi içeriği değeri 0.55 olarak bulunmuştur. En yüksek (0.79) polimorfizm bilgi içeriği değeri Me10-Em9 primer çiftinden elde edilirken, en düşük (0.20) polimorfizm bilgi içeriği ise Me3-Em5 primer çiftinden elde edilmiştir. Primer çiftlerinin toplam ayırma gücü değeri 11.75 olarak bulunmuştur. En yüksek (1.76) ayırma gücü değeri Me3-Em5 primer çiftinden elde edilmiş olup, en düşük (0.73) ayırma gücü değeri ise Me10-Em8 primer çiftinden elde edilmiştir (Çizelge 4).

Çizelge 4. SRAP primer çiftlerinin Kaman-5 genotiplerinde PCR amplifikasyonu sonucu elde edilen toplam bant sayıları (TBS), polimorfik bant sayıları (PBS), polimorfizm oranı (PO), polimorfizm bilgi içeriği (PBİ) ve ayırma gücü (AG) değerleri.

| Primer Çifti    | TBS         | PBS         | PO           | PBİ         | AG           |
|-----------------|-------------|-------------|--------------|-------------|--------------|
| Me2-Em4         | 12          | 6           | 50.00        | 0.56        | 1.15         |
| Me3-Em2         | 9           | 4           | 44.44        | 0.43        | 1.48         |
| Me3-Em4         | 12          | 5           | 41.67        | 0.52        | 1.31         |
| Me3-Em5         | 6           | 4           | 66.67        | 0.20        | 1.76         |
| Me3-Em17        | 9           | 5           | 55.56        | 0.58        | 1.22         |
| Me3-Em20        | 8           | 4           | 50.00        | 0.59        | 1.17         |
| Me6-Em7         | 8           | 5           | 62.50        | 0.64        | 1.07         |
| Me9-Em6         | 8           | 5           | 62.50        | 0.67        | 1.09         |
| Me10-Em8        | 10          | 7           | 70.00        | 0.52        | 0.73         |
| Me10-Em9        | 9           | 3           | 33.33        | 0.79        | 0.77         |
| <b>Toplam</b>   | <b>91</b>   | <b>48</b>   |              |             | <b>11.75</b> |
| <b>Ortalama</b> | <b>9.10</b> | <b>4.80</b> | <b>53.67</b> | <b>0.55</b> | <b>-</b>     |



**Şekil 2.** Apomiktik oldukları iddia edilen Kaman-5 ceviz çöğürlerine uygulanan DNA analizleri (ISSR ve SRAP) sonucunda elde edilen soyağacı (FÜA: Fidan Üreticisi A, FÜB: Fidan Üreticisi B, K1: Kaman 1, K5: Kaman-5, Tohum: Tohumdan çıkmış meyve vermeye başlamış ağaç).

A ve B fidan üreticisinden satın alınan çöğürler ile tohumdan çıkmış ve meyve vermeye başlamış çöğür ağaçları kapsayan 32 adet Kaman-5 çöğürlerine ve Kaman-5 genotipine uygulanan ISSR ve SRAP tekniği ile elde edilen verilerin birlikte değerlendirilmesi ile yapılan UPGMA analizleri sonuçlarına göre ortaya çıkan soyağacında (Şekil 2) iki ana grup oluşmuştur. Birinci grupta Kaman-5 genotipi dahil olmak üzere 20 çöğür yer alırken, geri kalan 13 çöğür ikinci grupta yer almıştır. Birbirine en yakın çöğürler FÜA-K5-5 ile FÜA-K5-10 bulunurken, Kaman-5 genotipine en yakın çöğür ise FÜA-K5-10 olmuştur.

Yapılan analizler sonucunda tüm çöğürler birbirinden ve Kaman-5 genotipinden genetik olarak farklı bulunmuş olup apomiktik olmadıkları belirlenmiştir. B fidan üreticisinden satın alınan tüm çöğürler ile A fidan üreticisinden satın alınan 1 adet çöğürün (FÜA-K5-2) Kaman-5 genotipinden uzak olması ve birlikte ikinci grupta toplanması bu bitkilerin apomiktik olmamalarının ötesinde Kaman-5 çöğürü bile olma ihtimallerinin çok düşük olduğunu göstermiştir.



## Sonuç

Bu araştırmada SRAP tekniği cevizde ilk defa uygulanmış ve çalışma sonucunda cevizde ISSR ve SRAP yöntemlerini karşılaştırma olanağı da ortaya çıkmıştır. SRAP yönteminden daha fazla toplam ve polimorfik bant elde edilirken, ISSR tekniğinde polimorfizm oranı daha yüksek olmuştur. Her iki yöntemden elde edilen genetik benzerlik katsayıları karşılaştırıldığında, değerlerin SRAP'ta ISSR'a göre biraz daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu durum da ISSR yönteminin SRAP tekniğine göre birbirine yakın ceviz genotiplerini biraz daha iyi ayırdığını ortaya çıkarmıştır. Her iki yöntemden elde edilen genetik benzerlik katsayıları arasındaki korelasyon ise oldukça düşük (0.22) bulunmuştur. Bu çalışmayla SRAP tekniği cevizde ilk defa başarıyla adapte edilmiş, uygulanmış ve cevizde bundan sonra yapılacak moleküler çalışmalarda da uygulanabileceği gösterilmiştir.

Bu çalışmada polimorfizm oranları beklentinin çok üzerinde bulunurken, genetik benzerlik katsayıları ise beklentinin altında bulunmuştur. Çünkü, aynı ana bitkiden elde edilen tohumlardan çıkmış yavru bitkilerin ana bitkiye genetik olarak daha fazla yakın olması beklenir. Nitekim bazı bitkilerde bu durum açık bir şekilde görülmüş ve bu bitkilerin ana çeşide olan genetik benzerlik katsayısı yüksek olmuştur. Ancak bazı bitkiler ana bitkiden genetik olarak çok uzak bulunmuştur. Bu durum da satılan aşısız fidanların tohum kaynağının sadece Kaman-1 veya Kaman-5 değil, başka tohum kaynaklarıyla karışık olma ihtimalinin olduğunu göstermiştir. Bunların ötesinde 2 yıl süresince Kaman-1 ve Kaman-5 orijinal ağaçlarında yapılan izolasyon çalışmalarında izole edilen çiçeklerden hiç meyve elde edilememesi de bu ceviz genotiplerinin apomiktik tohum üretmediklerini çok açık bir şekilde göstermiştir.

Kırşehir'in Kaman ilçesinde yılda tahminen 80 000-100 000 adet aşısız ceviz fidanı satışı yapılmaktadır. Bu da yaklaşık 5000-6000 da ceviz bahçesinin her yıl aşısız fidanlarla kurulduğunu göstermektedir. Ayrıca bu aşısız fidanlar apomiktik özellikte olduğu düşünülerek yüksek fiyatla (5-10 YTL) satılmaktadır. Satın alan üreticiler durumu ancak bahçenin kurulmasından 5-10 yıl sonra ağaçların geç meyveye yatması ve hasat edilen meyvelerin birörnek olmaması nedenleriyle anlayabilmektedirler. Aşısız ceviz fidanı satışı bu ilçede yaklaşık 15 yıldır devam etmektedir. Bu durum gerek üreticiler açısından ve gerekse ülke ekonomisi açısından büyük kayıp olup, bu şekilde cevizde dünya ihracatında pay sahibi olabilmemiz mümkün değildir. Çünkü pazar, diğer meyve türlerinde olduğu gibi, özellikleri belli ve birörnek meyve talep etmektedir.

Sonuç olarak, ceviz üreticilerinin yeni bahçe kurarken apomiktik olarak satılan çöğürleri tercih etmemeleri, bunun yerine ismine doğru aşı ve sertifikalı fidanlarla bahçe kurmalarının, ülkemizde birörnek ceviz üretimi ve dış satımı açısından çok önemli olduğu ortaya çıkmıştır.

## Teşekkür

Dişi çiçeklerin izolasyonu çalışmalarında katkılarından dolayı Sayın Arif GÖÇMEN, Hakan KARADAĞ, Sebahattin YILMAZ ve Yıldız DOĞAN'a teşekkürü borç biliriz. Bu çalışma TÜBİTAK-TOVAG grubu tarafından 104 O 139 No'lu proje ile desteklenmiştir.

## Kaynaklar

- Anonim, 2005. FAO Web Page. (<http://www.fao.org>).
- Doğan, Y., 2006. Bazı Ceviz (*Juglans regia* L.) Çeşit ve Genotiplerinin Moleküler Markör Teknikleri İle Karakterizasyonu. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, 69 sayfa. (Yayımlanmamış).
- Doyle, J.J., Doyle, J.L., 1987. A Rapid Isolation Procedure for Small Quantities of Fresh Leaf Tissue. *Phytochemical Bulletin*. 19: 11-15.

- Kafkas, S., Özkan, H., Sütyemez, M., 2005. DNA Polymorphism and Assessment of Genetic Relationships in Walnut Genotypes Based on AFLP and SAMPL Markers. *J. Amer Soc. Hort. Sci.* 130(4):585-590.
- Li, G., Quiros, C.F., 2001. Sequence-Related Amplified Polymorphism (SRAP) a New Marker System Based on A Simple PCR Reaction: Its Application to Mapping and Gene Tagging in Brassica. *Theor. Appl. Genet.* 103:455-461
- Prevost, A., Wilkinson, M.J., 1999. A New System of ComprasingPCR Primers Applied to ISSR Fingerprinting of Potato Accessions. *Theoretical and Applied Genetics*, 98: 107-112.
- Rohlf, F.J., 2004. NTSYSpc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Version 2.1. Exeter Software. Setauket. New York.
- Smith, J.S.C., Chin, E.C.L., Shu, H., Smith, O.S., Wall, S.J., Senior, M.L., Mitchiel, S.E., Kresorich, S., Tiegle, J., 1997. An Evaloution of The Utility of SSR Loci as Molecular Marker in Maize (*Zea mays*): Comparisons with Data from RFLP and Pedigree. *Theoretical and Applied Genetics*, 95: 163–173.
- Zietkiewicz, E., Rafalski, A., Damian, L., 1994. Genome Fingerprinrtng by Simple Sequence Repeat (SSR) Anchored Polymerase Chain Reaction Amplification. *Genomics*. 20(2): 176-183.