

NKÜ.BAP.00.24.AR.14.19 nolu proje

**GANOS DAĞLARI DOĞAL FLORASINDAN
TOPLANAN KÜLTÜR ASMASI (*Vitis vinifera* L.)
GENETİK MATERYALLERİNİN MOLEKÜLER
KARAKTERİZASYONUNUN YAPILMASI**

Yürütücü : Doç. Dr. Elman BAHAR
Araştırmacılar : Doç. Dr. İlknur KORKUTAL
Doç. Dr. Demir KÖK
Zir. Yük. Müh. Tamer Uysal
Zir. Yük. Müh. Zeliha O. Özalp

2017 - TEKİRDAĞ

ÖNSÖZ

“Ganos Dağları Doğal Florasından Toplanan Kültür Asması (*Vitis vinifera* L.) Genetik Materyallerinin Moleküler Karakterizasyonunun Yapılması” adlı proje NKU.BAP.00.24.AR.14.19 no ile Namık Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından (NKÜBAP) desteklenmiştir. Trakya bölgesi, Ganos (Işıklar) Dağları’nda bulunan asma biyo-çeşitliliğinin moleküler markörler ile genetik karakterizasyonları daha önce yapılmamıştır. Bu proje ile var olan asma doğal kaynaklarımızın tespiti yapılmaya çalışılmış ve toplanan örneklerin moleküler karakterizasyonu tespit edilmiştir. Bu projenin gelecek çalışmalara ışık tutması amaçlanmıştır. Elde edilen bulgular ile gelecekte asma çoğaltımı, ıslah çalışmaları ve bölgesel kültür asma çeşitlerinin geliştirilmesi adına pratikte yararı olacaktır. SSR markörleri ile yapılacak diğer çalışmalar ile karşılaştırılmasına olanak sağlayacağı düşünülmektedir.

İÇİNDEKİLER	Sayfa No
ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	ii
ÇİZELGE DİZİNİ	iii
ŞEKİL DİZİNİ	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
GİRİŞ	1
GEREÇ ve YÖNTEM	8
BULGULAR ve TARTIŞMA	19
SONUÇ ve ÖNERİLER	43
KAYNAKLAR	45

ÇİZELGE DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 1. CTAB DNA izolasyon protokolü uygulanırken kullanılan kimyasallar.	14
Çizelge 2. Floresan İşaretli Primer Baz Dizileri	15
Çizelge 3. Floresan işaretli primerler baz dizileri	16
Çizelge 4. 24 genotipte incelenen ampelografik özellikler için temel bileşen değerleri.	21
Çizelge 5. 24 genotip ve Trakya Bölgesi çeşitlerinde incelenen ampelografik özellikler için temel bileşen değerleri.	25
Çizelge 6. Trakya Bölgesi yerel çeşitleri ve araştırmada elde edilen genotiplerin incelenen Ampelografik karaktere göre temel bileşenler analizi yakınlıkları.	27
Çizelge 7. Trakya Bölgesi çeşitlerinde incelenen ampelografik özellikler için temel bileşen değerleri.	30
Çizelge 8. İlk izolasyon sonucu elde edilen DNA miktarları.	34
Çizelge 9. İkinci izolasyon sonucu elde edilen DNA miktarları.	34
Çizelge 10. Altı belirteç için iki temel bileşen değerleri	35

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1. Ganos Dağı konumu	8
Şekil 2. Proje ekibinden örnek toplama çalışmaları	10
Şekil 3. Optimizasyon çalışması için örnek gradient PCR sonucu.	15
Şekil 4. Yeni primerlerin optimizasyon çalışması için örnek PCR sonucu.	17
Şekil 5. Bazı ampelografik özellikleri incelenen 24 genotipe ait yaprak fotoğrafları	20
Şekil 6. 24 genotipin 18 ampelografik (OIV) karaktere bağlı olarak iki temel bileşene göre faktör haritası.	21
Şekil 7. 24 genotipin 18 ampelografik (OIV) karaktere bağlı olarak iki temel bileşene göre faktör haritası.	22
Şekil 8. 24 genotipin 18 ampelografik (OIV) karaktere bağlı olarak iki temel bileşene göre kümeleme analizi grafiği.	23
Şekil 9. İncelenen 24 genotipin 18 ampelografik (OIV) karaktere göre kümeleme analizi dendogramı.	24
Şekil 10. 24 genotip ve Trakya Bölgesi çeşitlerinde 8 ampelografik (OIV) karaktere bağlı olarak iki temel bileşene göre değişkenler faktör haritası.	25
Şekil 11. 24 genotip ve Trakya Bölgesi çeşitlerinde 8 ampelografik (OIV) karaktere bağlı olarak iki temel bileşene göre faktör haritası.	28
Şekil 12. 24 genotip ve Trakya Bölgesi çeşitlerinin 8 ampelografik karaktere göre kümeleme dendogramı.	29
Şekil 13. Trakya Bölgesi çeşitlerinde 8 ampelografik (OIV) karaktere bağlı olarak iki temel bileşene göre değişkenler faktör haritası.	31
Şekil 14. Trakya Bölgesi çeşitlerinde incelenen ampelografik (OIV) karaktere bağlı olarak iki temel bileşene göre faktör haritası.	32
Şekil 15. Trakya Bölgesi çeşitlerinin incelenen Ampelografik karaktere göre kümeleme dendogramı.	33
Şekil 16. 17 allelin iki temel bileşene göre faktör haritası	36
Şekil 17. İncelenen 34 genotipin (6 belirteç) iki temel bileşene göre faktör haritası.	36
Şekil 18. İncelenen 34 genotipin (6 belirteç) iki temel bileşene göre kümeleme haritası.	37
Şekil 19. İncelenen 34 genotipin 6 belirtece göre kümeleme analizi dendogramı.	38
Şekil 20. 34 genotipin seçilen anaçlar ile karşılaştırıldığı (3 belirteç) temel bileşenler analizi faktör haritası.	39
Şekil 21. 34 genotipin seçilen anaçlar ile karşılaştırıldığı (3 belirteç) kümeleme dendogramı.	41
Şekil 22. 34 genotipin seçilen bölgede yaygın olarak bulunan bazı yerli ve yabancı çeşitler ile karşılaştırıldığı (3 belirteç) kümeleme dendogramı.	42

ÖZET

Bu proje, Trakya Bölgesi Ganos (Işıklar) Dağları doğal florasına adapte olmuş ve varlığını sürdüren *Vitis vinifera* L. asma formlarına ait popülasyonların tespiti ve bunlardan elde edilen materyallerin moleküler markörler (SSR) ile genetik karakterizasyonlarının belirlenmesi amacıyla yapılmıştır. DNA izolasyonları için kullanılan materyaller 2014 ve 2016 yılları Mayıs, Haziran, Temmuz aylarında dağların kuzey ve güney yamaçlarından 40° 53' K - 27° 26' D ve 40° 35' K - 27° 00' D koordinatları arasından Karaevli altı, Kumbağ, Naip-Işıklar arası, Mermer-Yeniköy arası, Uçmakdere köyü, Gaziköy, Hoşkoy-Mürefte-Şarköy hattı olmak üzere 7 farklı alandan toplanmıştır. Örnekler, Arkeolojik çalışmalar sonucu belirlenmiş olan eski uygarlıkların yerleşim alanları çevresinden, köylerde yaşayanların bilip tespit ettikleri asmalardan ve asma bulunması ihtimali yüksek olan bölge ve dere yataklarından olmak üzere 3 farklı yöntemle toplanmıştır. 2014 yılında yapılmış olan sörvey çalışmalarında belirlenen 103 örnekten salkım gösteren 34 tanesinden materyal alınmış ve moleküler karakterizasyonları yapılmıştır. Genotiplerin gerek ampelografik özellikler ve gerek moleküler özellikler açısından çoğunlukla birbirlerinden farklı olduğu saptanmıştır. Aynı bölgeden alınan genotiplerin ampelografik ve genetik olarak farklı özellikler gösterebildiği, aynı zamanda farklı bölgelerden toplanan bazı genotiplerin de birbirleriyle benzer özellikler taşıdığı saptanmıştır. Elde edilen genetik materyallerden 24 tanesi 18 ampelografik karakter açısından kendi içlerinde ve 8 ampelografik özellik açısından Trakya Bölgesi'nde bulunan yerel çeşitlerle karşılaştırılmıştır. Genotiplerin ampelografik olarak kendi içlerinde yapılan karşılaştırmada 5 ayrı küme oluşmuştur. 34 genotipin moleküler olarak (6 belirteç) iki temel bileşene göre yapılan kümeleme haritasında ise 3 ayrı küme oluşmuştur. Çalışma kapsamında yalnızca 6 lokus incelenebilmiştir, fakat bölgemizdeki genetik çeşitlilik göz önüne alındığında materyaller ve bölgesel çeşitler arasındaki genetik ilişkilerin belirlenebilmesi için daha fazla lokusta, detaylı çalışılması gerekmektedir. Sonuç olarak geniş kapsamlı çalışmalarla bölgeden daha fazla genotip toplanması, ampelografik ve moleküler karakterizasyonlarının yapılması, genetik materyal olarak koleksiyon haline getirilmesi vb. işlemlerin biyolojik çeşitliliğimizin korunması ve gelecekteki ıslah çalışmaları için materyal sağlanması bakımından büyük önem taşıdığı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Vitis vinifera* L., SSR, Moleküler Karakterizasyon, Biyoçeşitlilik, Ganos (Işıklar) Dağları.

Molecular Characterisation of Grapevine (*Vitis vinifera* L.) Genetic Materials Collecting in Natural Flora of Ganos Mountains

ABSTRACT

This project carried out Trakya Region Ganos (Işıklar) Mountains which are adapted in natural flora and living grapevine forms that belongs to the *Vitis vinifera* L. determine the population and identify this materials with molecular markers (SSR) to determine the genetic characterisation. Materials which are used for DNA isolation collected in 2014 and 2016 years; May, June and July months; and north and south sides of Ganos Mountains. Materials exist in 40° 53' N - 27° 26' E and 40° 35' N - 27° 00' E coordinates; Karaevli altı, Kumbağ, between Naip-Işıklar, between Mermer-Yeniköy, Uçmakdere village, Gaziköy, Hoşköy-Müreftte-Şarköy line collecting from 7 different areas. Samples were collected 3 different methods; searching grapevines in the well known oldest settlement areas which were about archaeological excavation areas; also asking the villagers, and some districts and river beds. 34 samples were selected according to the their bunch among the 103 samples which were specify in 2014 surveys, and molecular characterization was done. Genotypes differed from each other both ampelographic and molecular properties. It has been found that genotypes which were collecting the same area, shows ampelographic and genetic differences; and at the same time some genotypes which were collecting from different areas shows similar properties. Twenty-four of the genetic materials obtained were compared with local varieties in the Trakya region in terms of 18 ampelographic characters and 8 ampelographic characteristics. Ampelographic comparison of genotypes in with their own, it separate 5 sets. 34 genotypes were formed by molecular clustering (6 markers) in the clustering map based on two basic components it separate 3 sets. Only 6 loci could be studied in this research, but considering the genetic diversity in our region, more locus and detailed studies are needed to determine the genetic relationships between the collected materials and regional varieties. As a result collecting more extensive genotype, doing ampelographic and molecular characterisation, preparing for collection, etc. for the protection of biodiversity and material supply for the future breeding programs is considered to be of great importance.

Key words: *Vitis vinifera* L., SSR, Molecular characterisation, Bio-diversity, Ganos (Işıklar) Mountains.

GİRİŞ

Kültür asma'sının (*Vitis vinifera* L.) anavatanı Anadolu-Kafkasya (Karadeniz'in güneyi ile Hazar Denizi arasında kalan bölge) olup MÖ 3500'lü yılların öncesine dayanan köklü bir tarihsel geçmişe sahiptir. Asma kültürü buradan başlamış olup, dünyaya yayılmıştır ve dünyada yetiştirilen üzüm çeşitlerinin kaynağı bu bölgedir (Winkler 1962). Trakya bölgesi ve dolayısıyla Ganos Dağları da MÖ 2000 yıllarına kadar uzanan bir bağcılık kültürünün ve doğal melezlerin yayılma alanıdır (Çelik 2011).

Ayrıca, ülkemizin geneli Asya, Avrupa ve Afrika kıtaları arasında bitkisel çeşitlilik bakımından köprü konumundadır. Farklı coğrafi özellikleri, coğrafi farklılığın getirdiği iklim çeşitliliği ve üç farklı bitki alanının kesişme noktasında yer almaktadır. Bu nedenle Türkiye, bitki çeşitliliği yönünden dünyanın en önemli merkezlerindedir (Kesici ve ark. 2010).

Oraman (1955) ve Winkler (1962)'e göre çok eski tarihlerde bağcılık ve şarapçılık benzer şekilde asma kültürünün ve bağcılığın anavatanı olan Anadolu'dan doğu ve batı ülkelerine taşınmıştır. Çelik ve ark. (1998) yurdumuzda bu kadar eski ve köklü geçmişi olan asmanın önemli ölçüde çeşit zenginliğine sahip olduğunu, tarım bölgelerinde bazıları yerel isimlerle de anılmakla birlikte değişik özelliklere sahip 1 000'i aşan sayıda üzüm çeşidinin yetiştirildiğini ancak, çeşit zenginliğine rağmen ekonomik anlamda yetiştiriciliği yapılanların sayısının 30-35 kadar olduğunu bildirmektedir.

2014 yılı FAO verilerine göre, 7 124 512 ha alandan dünya ticaretine konu toplam 74 499 859 ton üzüm üretilmektedir (FAO 2017). Bu üzümün %71'i şaraplık, %27'si sofralık, %2'si ise kurutmalık olarak değerlendirilmektedir. Aynı şekilde FAO verilerine göre 2000 ile 2011 yılları arasındaki değişimde bağ alanlarında %3,5 azalma, üretimde ise %6,3'lük artış meydana gelmiştir (Çelik 2013). Türkiye dünyada bağ alanı olarak 467 093 ha ile 5. ve üretim miktarı açısından 4 175 356 ton ile 6. sırada yer almaktadır (FAO 2017). TÜİK 2015 yılı verilerine göre Türkiye'de üretilen üzümün yaklaşık %51,83'ü sofralık, %36,57'si kurutmalık ve %11,60'ı şaraplık-şıralık olarak değerlendirilmektedir. Ayrıca ülkemizde üzüm; üzüm suyu, pekmez, köfter, reçel, bulama, hardaliye gibi geleneksel ürünlere de işlenmektedir (TÜİK 2017).

Asma sistematik olarak *Rhamnales* takımında yer almaktadır. Bu takımın üç familyasından (*Rhamnaceae*, *Leeaceae* ve *Vitaceae*) sadece *Vitaceae* (*Vitidaceae*, *Ampelidaceae*, *Ampelidae*) familyasında bulunan bitkiler, bilinen anlamda asmaları tanımlamaktadır. Galet (1988), *Vitaceae* familyasına ait asmalarda 14 cins ve 1000'in üzerinde tür bulunduğunu ifade etmiştir. Kültür asmalarının tümü *Vitis* cinsine aittir. *Vitis* cinsi iki alt cinsten oluşmaktadır. Bunlar, kromozom sayısı $2n = 38$ olan *Euvitis* ve $2n = 40$ olan *Muscadinia*'dır (Çelik ve ark. 1998). *Vitis* cinsi içerisinde yer alan *Vitis vinifera* L. türü ticari öneme sahip çeşitleri bünyesinde barındırmaktadır. Bu tür içerisindeki çeşitler dünya üzüm üretiminin %90'ından fazlasını meydana getirmektedir. *Vitis vinifera* L.'ların yoğun olarak yetiştiği ülkeler Avrupa kıtasında bulunurken, ABD dışında üzüm üretimi ile uğraşan diğer ülkelerin hepsinde yalnızca bu tür yetiştirilmektedir (Ağaoğlu 1999). Araştırmalar, *Vitis vinifera* L. türünün 30 000 civarında çeşidinin mevcut olduğunu, fakat bunların yarısına yakın (15 000) bir kısmının, genetik anlamda farklı olabileceğini göstermiştir (Yıldırım 2010; Şensoy ve Balta 2011). Ayrıca, tür içerisinde çeşitler, tipler, klonlardan oluşan gerek genetik gerek ekolojik anlamda önemli bir açılımın olduğu bilinmektedir. Bu türler daha çok kültür formu (*Vitis vinifera* L. ssp. *sativa*) ve yabani formlar (*Vitis vinifera* L. ssp. *sylvestris*) (De Mattia ve ark. 2008), olmak üzere tanımlanmakta ve Ganos dağlarında dere kenarları ile eski yerleşim yerlerinde doğal olarak yayılım göstermektedir. Ayrıca

Tassie (2010), Dünya üzerinde 5000-6000 adet *Vitis vinifera* L. olduğunu ve bunların çok az bir kısmının ticarete konu olduğunu belirtmiştir.

Tekirdağ Bağcılık Araştırma Enstitüsü, ülkemiz genelinden yaklaşık 1436 çeşit toplayarak asma genetik potansiyelinin tanımlanması ve korunması amacı ile Milli Koleksiyon Bağı oluşturmuştur. Ampelografik çalışmaların tamamlandığı bu koleksiyonda farklı veya benzer morfolojik özelliklere sahip ancak aynı isimle adlandırılan çeşit grupları (Homonim ve Sinonim) ile karşılaşılmaktadır (Yıldırım 2010).

Trakya Bölgesinde bağcılık yapılan önemli bir üretim alanı olan ve tarihte Ganohora diye bilinen, Uçmakdere - Şarköy kıyı bölgesi ve Ganos Dağları'nın güney yamaçlarına yaslanan tepelerdir. Terroir açısından irdelendiğinde (Bahar ve ark. 2010) de bu bölgeler bağcılık açısından oldukça uygun özellikler taşımaktadır. Trakya'da antik dönemlerden beri yapılan bağcılık bu alanda biyo-çeşitliliğin oluşmasına ve artmasına yol açmıştır. *Vitis vinifera* ssp. slyvestris ve *Vitis vinifera* ssp. sativa Ganos Dağları'nda dere kenarlarında ve eski yerleşim alanlarında doğal olarak yayılım göstermektedir (Çelik 2011).

Ganos Dağı'ndaki bitki yoğunluğunun 400-900m yükseklikte ve Güney, Güneydoğu ve Kuzeybatı yönündeki yamaçlarda yoğunlaşmıştır. Özellikle Güney ve Güneydoğu yamaçlarının bitki açısından fazlalığı Ganos Dağı'nın denize paralel olmasından kaynaklanmaktadır (Özyavuz 2011). Ganos'ların güney yamaçları genellikle Akdeniz türlerinin oluşturduğu kuru ormanlarla kaplıdır (Dönmez ve ark. 2012).

Ganos Dağı eteklerinde bulunan Naip Köyü yakınlarında yağmalanmamış bir tümülüsü (MÖ. 4. Yüzyıla) inceleyen Delemen (2006), taştan yapılmış tek odalı bir mezar olan tümülüs içinde Thasian tipi amfora, gümüş su kapları, mermer mobilyalar olduğunu belirtmiştir.

Koçel Erdem (2010), araştırmalarında Propontis (Marmara Denizi) kıyısında yer alan Gaziköy (Ganos), Hoşköy (Hora) antik kentleri ile Şenköy Bezirci Mevkii'nde ve Kızılcaerzi Fener Karadutlar Mevkii'nde kıyı yerleşmelerini tespit etmiştir. Antik kaynaklarda MÖ. 5 ve 4. yüzyıllarda bölgeye hakim olan Traklar'ın Odrys Sülalesi yönetimi hakkında bilgi verilmektedir. Araştırmacı bu yerleşmelerin Prehistorik Devir' den Bizans Devri'ne dek iskan edilmiş ve günümüze kadar yaşatılmış olduğunu ifade etmiştir. Ganos (Işıklar) Dağı'nın zirvesi olan Kartaltepe - Bakacaktepe'de, diğeri ise Şarköy Dolucatepe'de Demir Devri'nden Bizans Devri'ne kadar kullanılmış olduğu belirlenen iki önemli kutsal alan tespit etmiştir. Dolucatepe üzerinde muhtemelen Apollon'a adanmış bir tapınak bulunduğunu kaydetmiştir. Bu sonuca da Arkaik Devir mermer Kuros heykeli (Apollon) ile mızrak ucu türündeki maden eserlerden varmıştır. Bu alanın Arkaik Devir'den Roma Devri' ne kadar kullanılmış bir kült alanı olduğunu söylemiştir. Ayrıca MS. 12. yüzyıla tarihlenen Ganos amforalarına ait birçok buluntuya rastladığını belirtmiştir. Bölgenin, Geç Antik Devir'de önemli ölçüde seramik üreten ve yakın bölgelere şarap sevkeden önemli bir merkez konumunda olduğunu belirtmiştir.

Yankı (2010), MS 330 yılından itibaren Roma İmparatorluğu başkenti olan İstanbul'a Ganos Dağı çevresinden Ganitikos adlı şarapların gönderildiğini belirtmiştir. Buradan yapılan şarap ticaretine bağlı olarak amfora üretimi ve ticareti de canlanmıştır. Bu civarda manastırlarda üzüm yetiştiriciliğinin yapıldığı ve bunların şarap üretimi ve ticareti konusunda vergi muafiyetleri tanınmıştır.

Galet (1998), ampelografiyi asmanın yaprak, sürgün ucu, salkım ve tanelerinin morfolojik yapısının botanikle ilişkili bir şekilde IPGRI, UPOV ve OIV kriterlerine göre belirlendiği bir tanımlama ve sınıflama olarak isimlendirmiştir. Ampelografi aynı zamanda moleküler markörler kullanılıncaya kadar, 19. yy'da asma gen bankasında

bulunan çeşitlerin tanımlanması için kullanılan en önemli yöntemdir (De Souza Leao 2011). Asma DNA profillerinin analizinden önce yapılan ampelografik tanımlamalar temelde bitki fenotipine bağlı olarak yapılmıştır (Bisson 2011).

En az 10 000 üzüm çeşidinin bulunduğu Grape Germplasm Collection of EMBRAPA Semiárido gen bankasından ıslah programları içinde yer alan örnekler alan De Souza Leao ve ark. (2011), 4 mevsim boyunca Brezilya Bahia'da 136 sofralık üzüm çeşidini 12 morfo-agronomik ve 6 ayırık (discrete) özellik bakımından değerlendirmişlerdir. Sofralık üzüm çeşitleri arasında belirgin bir genetik çeşitlilik olduğu gözlemlenmiş ancak cluster analiz yönteminde bağımsız ve sürekli fenotipik tanımlayıcıların ayrımını ortaya koyamamışlardır.

İlk DNA testleri CSIRO'da 1990'lı yıllarda DNA parmak izi tanımlama ile yapılmıştır. Bu teknoloji günümüzde daha geliştirilmiş ve alınan herhangi bir asma dokusundan kısa sürede tanımlama yapılabilir. OIV "Descriptor List for Grape Varieties and Vitis Species" listesinin ikinci sürümünde ampelografik niteliklerin yanı sıra izoenzim karakteristikleri ve fitopatolojik özellikler de eklenmiştir (Tassie 2010). Asmanın (*Vitis vinifera* L.) genomu hakkındaki bilgiler incelendiğinde, diğer çok yıllık bitkilere oranla nispeten küçük bir genoma sahip olduğu görülmektedir (Arumuganathan ve Earle 1991). Elde edilen sonuçlara göre asma genomu 475-500 Mb genom büyüklüğüne sahip bulunmaktadır (Thomas ve Scott 1993). Asma diploid bir bitki olup, üzüm genomu 19 kromozomdan oluşmaktadır. Genomik DNA kapsamı, bir türün kromozomlarının toplam büyüklüğü ile ilişkilidir ve *Vitis* cinsindeki türlerin ortalama kromozom büyüklüğünün 0,85-1,07 m arasında olduğunu ifade etmiştir (Lodhi ve ark. 1994).

Yabancı tozlanan çok yıllık bir bitki olması nedeniyle asma, ürün görmek için beklenen sürenin uzunluğu (2-5 yıl), kendilenme depresyonu ve somatik mutasyonlar ile himeyrelere görülmesi gibi problemlerle karşı karşıyadır. Ayrıca, uygun genetik stokların olmaması asmaya yönelik genetik bilgi elde edilmesini sınırlamaktadır. Asmalar yüksek oranda heterozigottur ve klonal çoğaltma yoluyla korunmaları bir örnek ve homozigot ebeveyn hatları oluşturma ihtiyacını ortadan kaldırmaktadır. Diğer çok yıllık bitkilere göre daha kısa gençlik kısırlığı dönemine sahip olmalarına rağmen asmalarda seleksiyon, fide döneminin erken aşamalarında fenotip ve genotip arasında bir korelasyon belirsizliği nedeniyle yapılmamaktadır. Bu problemi aşmanın bir yolu; moleküler markörler kullanarak çevresel varyansı azaltmak suretiyle kalıtım derecesini araştırmaktır (Yaşa 2005).

Temel prensibi, DNA dizilimindeki değişikliklerin tespiti olan DNA markörleri ise sayılarının çokluğu ve çevre koşullarından etkilenmemeleri gibi sebeplerle, oldukça tercih edilen bir yöntem olma özelliğine sahiptir. İlk dönemlerde yapılan çalışmalarda daha çok izo-enzim markörlerine yer verildiği görülmektedir. Günümüzde dünyada en yaygın kullanılmakta olanları; RFLP, RAPD, Mikrosatellitler (SSR veya Mikrouydular veya Basit Dizilim Tekrarları) ve AFLP gibi DNA markörleridir (Şensoy ve Balta 2011). Asmada kullanılan moleküler belirteçlerin en önemlilerinden birisi ise; SSR veya mikrosatellit belirteçlerdir (Yıldırım 2010). Çeşit tanımlama amaçlı uygulamalar, cins, tür ve çeşitler arasında farklılık (poli-morfizm) gösterecek markörlerden yararlanılarak, gen kaynaklarının tanımlanabilmesini ve sınıflandırılabilmesini gerçekleştirmektedir (Ağaoğlu ve Ergül 1999).

PCR ile çoğaltılmış mikrosatellit markörler, özel lokusa sahip ve yüksek miktarda polimorfik olmanın avantajına sahiptir. Allel büyüklüğünün belirlenmesi, elektroforez aracılığıyla elde edilir. Bu markörler kodominanttır ve bu sayede homozigot ve heterozigotların ayrımına izin verir. Mikrosatellit profili (analiz edilen

lokusta belirlenen baz çifti), verilen allel büyüklüğüyle temsil edilir. Sonuçta, pratik açıdan mikrosatellit markörlerin, tekrarlanabilirliği ve standardizasyonu çok kolaydır ve bu nedenle farklı laboratuvarlar arasındaki verilerin transferi ve karşılaştırılması olanağı mevcuttur (Sefc ve ark. 2009).

Bitkideki genetik haritalama çalışmalarında ve genom projelerinde SSR markörlerin önemi her geçen gün artmaktadır (Fischer ve ark. 2004; Akkurt ve ark. 2007; Velasco ve ark. 2007). Kodominantlık, diğer DNA markörlerine göre yüksek polimorfiklik sağlama vb. özellikleri ile asma tanımlama ve diğer çalışmalarda SSR markörler önemli avantajlar sağlamaktadır. Bağcılık çalışmalarında gen kaynaklarının tanımlanması ve korunması çalışmalarına bakıldığında temel olarak; doğal gen kaynaklarının ön plana çıktığı görülmektedir. Diğer ifade ile hibrit bitkileri, ebeveynleri olan doğal gen kaynakları bitkilerinden daha üstün özelliklere sahip olup, öncelikle tescil ve genetik olarak karakterize edilmelidir. Yeni çeşitlerin tanımlanması; doğru melezleme kombinasyonunun kontrolü ve bu çeşitlerin çoğaltımı aşamasında, ıslahçı araştırmacıların, kurumların ve hatta ülkelerin haklarının korunması açısından da büyük önem taşımaktadır (Karauz 2013).

Son yapılan çalışmalarda çeşitler DNA'larının tanımlanmasıyla daha net bir bilgi elde edileceği ifade edilmekte olup, DNA tanımlamasının (bitki hangi gelişme evresinde olduğu ve çevre-hijyen koşulları dikkate alınmaksızın) hücre ve dokuları tanımlayacağı için avantajlı olduğunu bildirilmektedir. Bitkiden alınan her türlü dokunun (odun, yaprak, tane, vb.) DNA tanımlaması kullanılarak yılın herhangi bir zamanında analiz edilebileceğini kaydedilmekte ve bu şekilde tanımlama yapmak için zamana bağlı olunmayacağı belirtilmektedir. Ayrıca bu çalışmalarda, istenildiğinde üzüm ürünlerinin (üzüm suyu, şarap, vb.) de analizi ile DNA profilinin ortaya konmasının mümkün olduğunu ifade edilmektedir (Sefc ve ark. 2009).

Literatüre bakıldığında farklı araştırmacılar tarafından moleküler teknikler kullanılarak genetik çeşitliliği belirlemeye yönelik çeşitli çalışmalar yapılmıştır. İlk asma mikrosatellit çalışmaları Avusturya'da Thomas ve Scott (1993) tarafından yapılmıştır. Toplamda 26 *Vitis vinifera* L. çeşidi, 6 *Vitis* türü ile *Vitis rotundifolia*'da yapılan çalışmaya daha sonra 80'den fazla genotip eklenmiştir. Thomas ve ark. (1994) tarafından yürütülen diğer bir çalışmada ise; 5A Teleki ve Kober 5BB anaçlarının SSR analizleri gerçekleştirilmiş, kullanılan primerler itibari ile ayırım sağlanamamıştır. Yine Avusturya'dan alınan ve ticari öneme sahip 18 sofralık üzüm çeşidi 11 mikrosatellit markörü ile tanımlanmış, böylelikle genetik markörlerin ticari üzüm çeşitlerinde isim doğruluğu tespitinde kullanılabilirliği kanıtlanmıştır (Sefc ve ark. 2009).

Regner ve ark. (2001), *Vitis* türlerine ait 1200 kadar örneğin genetik tanımlamasını SSR, ISSR, AFLP ve RAPD gibi tekniklerle yapmışlardır. Ayrıca Avusturya'dan alınan 300'den fazla çeşitte 40 mikrosatellit markörü deneyerek genetik farklılık ve orijin araştırmaları gerçekleştirmişlerdir. Fossati ve ark. (2001), İtalya Schiave grubuna ait 10 üzüm çeşidinde hem AFLP hem de SSR markörlerle çalışmışlardır. Ayrıca bu çalışmada; Schiave çeşidine ait 33 farklı tipte AFLP analizi yapılarak homonim ve sinonim çeşitleri bulunmuştur.

Ülkemizde yapılan bir çalışmada Bozcaada, Hafızali, Kadın parmağı gibi 17 yerli asma kültür çeşidinin genetik tanımlaması RAPD markörleri aracılığı ile yapılmıştır. Çalışmada 22 primer kullanılmış, 179 bant amplifiye edilmiş bunlardan 110 tanesinin polimorfik olduğu saptanmıştır (Ergül ve ark. 2002).

Anadolu'da asmanın orijini olduğuna destek olan bir çalışmada (Arroyo-Garcia ve ark. 2006), 130 farklı lokasyondan toplanan 1201 asma genotipi (513 *Vitis vinifera* ssp. *sativa*, 688 *Vitis vinifera* ssp. *sylvestris*) kullanılarak 9 kloroplast SSR primeri

kullanılmıştır. Bu çalışmada üzümün iki orjininden birinin Anadolu diğ erinin ise İspanya oldu ğ u tespit edilmiştir. Vouillamoz ve ark. (2006), Türkiye, Gürcistan ve Ermenistan'dan toplanan 116 genotipte 6 mikrosatellit markör (VVMD5, VVMD7, VVMD27, VrZAG62, VrZAG79 ve VVS2) ile genetik analizler yapmışlardır. Türk çeşitlerinden Dımışkı, Luvanek, Morek, Sungurlu ve Vilki'de 3 allel durumu gözlenmiştir. Ayrıca, Türkiye'deki çeşitler ile dünya çapında tanınmış diğ er çeşitler arasında sinonim ilişkisi araştırılmış buna göre, İridaneli ile Italia, Parmak ile Jerusalem Bleu çeşitlerinin sinonim olabileceğ i belirtilmiştir.

Tangolar ve ark. (2009) çalışmada core set'in de içinde oldu ğ u on dört SSR primeri kullanmışlardır. Adana ve çevresindeki 59 asma kültür çeşidinde toplam 117 allel tanımlanmıştır. Ortalama allel sayısı 8,357 ve beklenen ve gözlenen heterozigoti oranı sırasıyla 0,743 ve 0,749 olarak belirlenmiştir. Hızarcı ve ark. (2012) Kuzeydoğ u Anadolu'daki Yusufeli bölgesinde bulunan 27 asma kültür çeşidinde yaptıkları çalışmada 6 farklı SSR primeri kullanarak genetik karakterizasyonu ve 2 tane bilinen Cabernet-Sauvignon ve Merlot kültür çeşitleri ile parmak izi belirleme çalışması yapılmıştır. Çalışmanın sonucunda toplam 52 allel belirlenmiştir ve her lokus başına ortalama allel değ eri 8,67 olarak bulunmuştur.

Ülkemize ait bazı üzüm çeşitlerini RAPD markörler kullanarak tanımlamaları Ergül ve ark. (2002) tarafından yapılmıştır. Araştırmacılar 17 üzüm çeşidini kullandıkları cluster analizi sonucunda iki ana grup belirlemişlerdir. Bir grubun 3, diğ erinin 14 üzüm çeşidi içerdiğ ini ortaya koymuşlardır. Genetik farklılık ve bölgesel ayırım yaparak da 4 grup meydana gelmiştir. Birinci grupta Hafızali, Razakı, Müşküle ve Kadın Parmağ ı üzüm çeşitlerinin yer aldığını, bu grubun Ege ve Marmara Bölgelerinden geldiğini, Hafızali ile Razakı'nın yüksek benzerlik gösterdiğ ini saptamışlardır. İkinci gruptaki Hasandede ve Emir çeşitlerinin de benzer olduklarını, ayrıca Kozak beyazı ve Kozak siyahı'nın da akraba oldu ğ u tespit etmişlerdir. Öküzgözü üzüm çeşidinin Doğ u Anadolu, Papazkarası çeşidinin Trakya'da yer alarak otokton olduklarını ifade etmişlerdir.

Tekirdağ Milli Koleksiyon bağında bulunan; Güneydoğ u Anadolu orijinli 55 (*Vitis vinifera* L.) üzüm çeşidini SSR markörleri kullanarak tanımlayan Boz ve ark. (2011), yaptıkları araştırmada Cabernet-Sauvignon, Merlot ve Pinot Noir çeşitleri referans olarak kullanılmışlardır. Lefort ve ark. (1998) prokolü ile yapılan DNA izolasyonu sonucunda, araştırmacılar SSR yönteminin diğ er tanımlama yöntemlerinden daha avantajlı ve 14 SSR markörünün çeşit-klon tanımlamada ve ayrıca akrabalık analizinde daha etkin oldu ğ unu belirtmişlerdir. Ayrıca, sinonim ve homonim olan çeşitleri de ortaya koymuşlar ve ülkemizde homonim çeşitlerin çok sayıda bulunduğ unu belirtmişlerdir.

Türkiye'nin Güneydoğ u'sunda bulunan yabancı ve kültüre alınmış asmaların genetik çeşitliliğ inin belirlenmesi amacıyla yürüttükleri bir çalışmada Karataş ve ark. (2014b) 21 yabancı ve 13 kültür asmasını incelemişlerdir. Referans çeşitleri olarak Cabernet-Sauvignon ve Merlot üzüm çeşitlerini kullanılmışlar ve yabancı asmaları nehir yataklarından, tepelerden ve vadilerden almışlardır. Örnekler özellikle uzun zamandır bağıcılık yapılmayan ve yerleşim alanında bulunmayan yerlerden toplanmış, sera koşullarında biriktirilmiş ve sürgün ucu örneklerinden DNA analizi yapılmıştır. Yabancı asmalardan alınan yaprak ve çiçek örneklerinin ampelografik tanımlamaları sonucu *silvestris* ile birçok benzer morfolojik özellik gösterdiğ i belirlenmiştir. *Vitis silvestris*'in kültür asmalarıyla melezlenmesi ile çok geniş alanlara yayıldığı bunun da çoğunlukla kuşlar nedeniyle oldu ğ u ifade edilmiştir. Yabancı aksesyonların farklı genetik profilleri oldu ğ u belirlenmiştir. Araştırmacılar nSSR ve cpSSR markörlerinin kültür ve yabancı

asmalarda genetik farklılıkların ortaya konmasında ve akrabalık seviyelerinin belirlenmesinde kullanışlı olduğunu saptamışlardır.

Geniş çaplı DNA tanımlamalarının öncelikle sinonim ve homonim çeşitler üzerinde yürütüldüğü Avrupa'da, araştırmacılar son yıllarda daha az bilinen çeşitlerle ilgilenmeye başlamıştır. Yeni DNA teknikleri kullanılarak profillerinin çıkarılması, çeşitler ve dolayısıyla şaraptaki varietal tatların doğru ortaya konması bakımından da önemlidir (Tassie 2010).

Macar üzüm çeşitlerinin DNA genotiplerinin ortaya konmasında Kiss ve ark. (2007) çalışmışlardır.

Hindistan'da yetiştirilen 43 çekirdeksiz üzüm çeşidinin DNA profilini çıkaran ve akrabalık durumlarını 14 ISSR markörü kullanarak belirleyen Argade ve ark. (2009), 119 bant değerlendirmişler ve bunların %79'unu polimorfik olarak kaydetmişlerdir. Yaptıkları UPGMA cluster analizi sonucunda çeşitler arasında yüksek derecede benzerlik saptamışlardır.

2006-2007 deneme yıllarında Garcia-Munoz ve ark. (2011) tarafından bir çalışma yürütülmüş ve OIV tanımlayıcılarından 57 tanesi kalitatif ve kantitatif özellikleri belirlemek amacıyla kullanılmıştır. İspanya Balearik adalarında yürütülen çalışmada öncelikle ampelografik tanımlama, sonrasında da SSR metodunu kullanmışlardır. İncelenen çeşitlerde; birçok kriterinin benzer olduğu ve ayrıca ampelografik tanımlayıcıların, agronomik parametrelerin ve fenolojinin dolu fırtınalarından da etkilenecek değişebildiğini belirlemişlerdir. 17 farklı şaraplık üzüm çeşidini inceleyen araştırmacılar; Beba roja çeşidinin Beba blanca olarak bilinen üzüm çeşidinin bir somatik mutanı olduğunu saptamışlardır.

Güney İtalya'da yetiştirilen Aglianico aksesyonlarının ampelografik ve moleküler tanımlamasını yapan Alba ve ark. (2011), denemelerinde 31 aksesyon, 30 ampelografik tanımlayıcı ve 13 SSR ile 10 AFLP primeri kullanmışlardır. Ampelografik olarak değerlendirilen olgun yaprak ile ilgili önemli; sürgün ve tane ile ilgili çok az varyasyon belirlemişlerdir. Aynı şekilde bütün SSR lokuslarında moleküler monomorfizm ve AFLP'lerde de çok yüksek genetik benzerlik olduğunu saptamışlardır. Sonuçta Aglianico nero ve Aglianico del vulture nero çeşitlerinin aynı genotipe sahip olduğu ortaya koymuşlardır.

İspanya'nın Huesca bölgesinde yetiştirilen; otokton ve soyu tükenme tehlikesi altında olan üzüm çeşitlerinin ampelografik ve DNA analizlerini yaptıkları araştırmalarında Casanova ve ark. (2011), 1960 yılı öncesinde dikilen bağlardaki 47 aksesyon üzerinde çalışmışlardır. Ayrıca Movera (Zaragoza) Asma Gen Bankası'nda bulunan 36 aksesyonu da denemelerine dahil etmişlerdir. İki yıl üst üste yürüttükleri ampelografi çalışmalarında 50 OIV kriterini incelemişler ve DNA analizlerini VVS2, VVMD5, VVMD7, VVMD27, VrZAG62 ve VrZAG79 mikrosatellitleriyle yürütmüşlerdir. Ampelografik sonuçlar ile cluster analizi sonuçlarını karşılaştırmışlar ve aksesyonların çoğu tanımlanmıştır. Yeni iki beyaz çeşit; Carrillera ile Moscatel ve 6 renkli çeşit; Macicillo, Bomogastro, Angelina, Terrer, Parraleta Roja ile Garnacha Gorda tanımlamışlardır. Birkaç yeni sinonim ve 7 adet tanımlanamayan aksesyon olduğunu kaydetmişlerdir ve 23 *Vitis vinifera* çeşidi soyunun tehlikede olduğunu ve bu çeşitlerin yetiştikleri bölgede koruma altına alınması gerektiğini saptamışlardır.

Imazio ve ark. (2013) Gürcistan' da arkeolojik ve paleobotanik çalışmalarla bulunan *Vitis silvestris*' ten evrimleşmiş *Vitis vinifera*' ları araştırmışlar ve 20 mikrosatellit (SSR) kullanarak gen bankasından aldıkları 112 Gürcistan aksesyonunu, doğada kendiliğinden yetişen 18 yabani *silvestris* bitkisini, Fransız Vassal Koleksiyonu ile karşılaştırılarak incelemişlerdir. Veriler incelendiğinde Gürcistan çeşitlerinin Doğu

Avrupa ve Kafkasya' da yer alan komşu ülke çeşitleri ile akrabalıklarının bulunduğu belirlenmiştir. Doğada hala bozulmamış halde Gürcistan yabani asmasının bulunduğu da ortaya konmuştur. Ayrıca Gürcistan' da yetiştirilen kültür ve yabani asmanın diğerlerinden farklı ve eşsiz olduğu görülmüştür. Asma genetik kaynaklarını korumak için Gürcistan'ın daha yakından incelenmesi gerekliliği de bir kez daha ortaya konmuştur.

Akdeniz Endülüs bağlarında yetiştirilen geleneksel Reli Almunecar üzüm çeşidi (kurutmalık) ampelografik ve moleküler olarak (20 mikrosatellit kullanarak) Jimenez-Cantizano ve ark. (2013) tanımlamışlardır. Geçmişteki verilerden yola çıkan araştırmacılar; antik Almunecar çeşidinin İskenderiye Misketi çeşidinin bir klonu olduğunu belirlemişler ve Rancho de la Merced Gen Bankası'nda korumaya alınmasını sağlamışlardır.

Ribolla Gialla (İtalya), Rebula (Slovenya) ve Robola (İonya Adaları) çeşitlerinin genetik araştırmasını yapan De Lorenzis ve ark. (2013), İtalya'da yetiştiriciliği 1960'lı yıllardan itibaren azalan Ribolla Gialla üzüm çeşidinin; orijini, Rebula ve Robola üzüm çeşitleriyle olan genetik ilişkisi belirlenmeye çalışmışlardır. DNA parmak izi yöntemiyle 35 SSR lokusu incelenmiştir. Bu çeşitle 19 aksesyonun morfolojik olarak benzer olduğu belirlenmiştir. Robola'nın akraba, Rebula'nın ise sinonim olduğu ortaya konmuştur.

Diaz-Losada ve ark. (2013), Galiçya Bölgesinde tükenmeye yüz tutmuş Albilla çeşidi ve bunun akrabası olan 3 İspanyol Albillo üzüm çeşidini 6 mikro satelit (SSR), 55 OIV tanımlayıcısı ve 45 filometrik karakter ile tanımlamışlardır. Albilla çeşidi Xunta de Galiçya EVEGA Gen Bankası'ndan, Albillo çeşitleri ise Kanarya Adaları'ndan temin edilmiştir. Araştırmacılar sonuçta her ikisinin farklı genotipe sahip olduğunu ve Albilla'nın Galiçya'nın otokton bir çeşidi olduğunu kaydetmişlerdir.

Trakya Bölgesinde bağcılık yapılan önemli bir üretim alanı tarihte Ganohora diye bilinen, Uçmakdere-Şarköy arasında bulunan kıyı bölgesi ve Ganos dağlarının güney yamaçlarına yaslanan tepeleridir (Çelik 2011). Ganos dağlarında bulunan asma genetik biyo-çeşitliliğinin daha önce moleküler markörler ile tanımlanması yapılmamıştır. Bu bölgedeki asmaların morfolojik tanımlanması daha önceki literatürde yapılmış; fakat günümüzde erişilememektedir. Bölgedeki asma biyo-çeşitliliğinin moleküler karakterizasyonunun tanımlanması ileride yapılacak ıslah çalışmaları ve moleküler çalışmalarda genotiplerin belirlenmesi için bir ön çalışma niteliğinde olmuştur. Bu çalışmanın sonucunda elde edilmiş bulgular ile gelecekte asma çoğaltımı, ıslah çalışmaları ve bölgesel kültür asma çeşitlerinin geliştirilmesi adına pratikte yararı olacaktır. İleride SSR markörleri ile yapılacak diğer çalışmalar ile karşılaştırılabilecektir.

Bu çalışma, Trakya Bölgesi Ganos (Işıklar) Dağları doğal florasına adapte olmuş ve varlığını sürdüren *Vitis vinifera* L. asma formlarına ait popülasyonların ileride yapılabilecek ıslah çalışmaları için tespiti ve bunlardan elde edilen materyallerin moleküler markörler (SSR) ile genetik karakterizasyonlarının belirlenmesi amacıyla yapılmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Konum:

Ganos Dağı doğal florasında *Vitis vinifera* L.'ya ait birçok asma yetişmektedir. Tekirdağ ili sınırları içinde yer alan Ganos Dağı'nın diğer bir ismi de Işıklar Dağı'dır. Bu dağ Şarköy ilçe sınırları ile ilimize adını veren Tekir Dağları'nın en yüksek (945m) yeridir. Dağ ikinci jeolojik zamanda Kuzey Anadolu dağ kuşağı içinde yer alır. Dağ adını Ksenofon'un Trak kralı Seuthes'e ait kıyı şehri olduğunu yazdığı ve bugün Gaziköy sınırlarında yer alan antik Ganos yerleşim yerinden almaktadır.



Şekil 1. Ganos Dağı konumu

Ganos Dağı; Trakya'nın güneyinde 40° 35' ve 40° 52' Kuzey paralelleri ile 26° 58' ve 27° 27' Doğu meridyenleri arasında yer almakta (Şekil 1) ve Kuzeydoğu - Güneybatı yönünde uzanmaktadır (Özşahin 2015b). Akarsular tarafından, çok parçalanmış görünümlü olup doğu ve güney tarafında Marmara Denizi; kuzeyde Işıklar, Semetli, Ormanlı, Beyoğlu Palamut, Yayağaç gibi köyler arasında yer almaktadır. Bölgede birçok dağ köyü ve çok sayıda tepe de yer almaktadır. Bu tepelerden bazıları; Hünkar tepesi (945m), Uçakbaşı tepesi (924m), Kartaltepe (879m), Bayraktepe (750m), Mursallı tepe (678m), Beşiktepe (671m), Yaylatepe (654m) ve Manastırtepe (646m) olarak sıralanmaktadır (Yarcı 2000). Deniz seviyesinden itibaren bir duvar gibi aniden yükselen bu dağlık kütle, yaklaşık 5km' lik bir mesafede 924m (Uçaktaşı-Radar T.) yüksekliğe erişir. Bu duruma göre dağ alanındaki yükselti farkı 924m'dir (Özşahin 2015a ve 2015c). Dağın uzunluğu 35km, genişliği 10km'dir. Yıllık ortalama 13,7°C ve 540-680mm yağış görülür. Yıllık toplam yağış 582,9 mm, yıllık bağıl nem ortalaması %67-75 arasında değişim gösterir. En yağışlı ay Aralık, en yağışsız ay ise Ağustos olup; hakim rüzgar yönü K ve KD yönleridir. Rüzgar hızı uzun yıllar ortalaması 2-5m/sn olarak kaydedilmiştir. 400 ile 900m arasında bitki yoğunluğu görülür (Üstün 2007 ve 2008).

Ganos Dağı'nın zirvelerine çıkıldıkça, yükselti nedeniyle sıcaklık ve yağış koşulları değişir. Bu nedenle kütlenin üzerinde yıllık ortalama sıcaklık 10°C'nin altında,

yıllık toplam yağış ise 1000mm'nin üzerindedir (Dönmez 1990). Dağın eteklerinde yağışlar 700mm'nin altına düşmemektedir (Çoban 2004). Genel olarak yarı nemli Marmara iklimi etkisi altındadır (Koçman 1993).

Ganos'ların zirve kesimlerinde Temmuz ayı sıcaklıkları 18°C, büyük kısmında da 18-20°C arasındadır. Tekirdağ'da Ocak ayı ortalama sıcaklığı 4,3°C, Temmuz ayı ortalama sıcaklığı 23,4°C, yıllık ortalama sıcaklık ise 13,7°C'dir. Tekirdağ' da vejetasyon dönemi başında don oranı %18, bitiminde %5'tir. Vejetasyon dönemi boyunca nispi nem %65'in altına inmez. Ganos'ların nemli orman sahasında şiddetli rüzgar görülmediğinden, bu alandaki nemli ormanlar rüzgarın kurutucu ve tahrip edici etkisinden büyük ölçüde zarar görmez. Esen rüzgarların %81'inin hızı 6m/sn'den azdır. Ganoslardaki nemli orman sahaları bütünüyle kireçsiz kahverengi orman topraklarıyla kaplıdır. Orta derecede organik madde içeren bu toprağın pH değeri yağış nedeniyle düşüktür. Toprak nötr reaksiyon verir. Toprak suyunu tutma kapasitesi yüksektir (Çoban 2004).

Araştırmalar sonucunda; Ganos Dağı toprak nem rejiminin Xeric, sıcaklık rejiminin ise termik olduğu belirlenmiştir. Bu alanda bulunan toprak ordoları ise Alfisol, Entisol, İnceptisol, Mollisol ve Andisol olarak sıralanmıştır (Ekinci 1990).

Örnek alma:

Sörvey ve örnek toplama çalışmalarında Bitki Genetik Kaynaklarının standart toplama formatları kullanılmıştır. Farklı vejetasyon dönemlerinde alınan örnekler "2nd Edition of the OIV Descriptor List for Grape Varieties and *Vitis* species" listesinde yer alan 29 tanımlama karakterinden faydalanılarak değerlendirilmiştir (GENRES 081-2001; OIV 2009).

Örnek toplamada üç farklı yol izlenmiştir;

1. Arkeolojik çalışmalar sonucu belirlenmiş olan eski uygarlıkların yerleşim alanları [Işıklar Eski Kilise, Sütlüce Manastırı, Bilinmeyen Kilise, Heraion Teikhos, Hieron Oros (Kartalkaya), Kaletepe, Güzelköy (Melen) Manastır mevkii, vb.] veya yakınlarında inceleme yapılmış ve bulunan örnekler alınmıştır (Karataş ve ark. 2014b).

2. Köylerde yaşayanların bilip tespit ettikleri (Hoşköy, Gaziköy, Işıklar, vb.) asmalardan örnek alınmıştır.

3. Asma bulunması ihtimali yüksek olan bölge ve dere yataklarından (Çitlenbik deresi, Gübürlük deresi, Polatandere, Mermer deresi, Menekşe deresi, Kavaklar deresi, Karadere, Ayvasıl deresi, Uçmakdere, Çınarlidere, vb.) aramak suretiyle örnekler toplanmıştır (Çelik ve ark. 2005).

Sneider (2008), OIV listesinde şu anda 103 tanımlayıcı kriter bulunduğunu ve bunların 28'inin genel bilgi veren, 54'ünün primer tanımlayıcı (asmaın morfolojik ve karakteristik özelliklerini belirleyen), 21'inin de ikincil tanımlayıcı (asma fizyolojisi ve germplazm özelliklerini belirleyen) kriter olduğunu açıklamıştır. Buna ek olarak ileride GENRES 081-2001 tarafından 6 yeni tanımlayıcının moleküler marker tekniklerine dayalı olarak eklenebileceğini ifade etmiştir.

İlk DNA izolasyonları için kullanılan materyal Trakya Bölgesi Ganos Dağlarının kuzey ve güney yamaçlarından 2014 yılı Mayıs, Haziran ve Temmuz aylarında asmaların sürgün ucunda yeni açılmakta olan genç yapraklardan temin edilmiştir. Örnekler 40° 53' K ile 27° 26' D ve 40° 35' K ile 27° 00' D koordinatları arasından salkım taşıdığı belirlenen asmalardan alınmıştır. Araştırma kapsamına dahil edilen asmalardan toplanan örnekler, etiketlenerek buz ile laboratuvara getirilmiş ve DNA izolasyonuna kadar -80°C'de muhafaza edilmiştir.

Moleküler karakterizasyonların yapılabilmesi için PCR optimizasyon işlemleri devam ederken bölümümüz laboratuvarlarının başka bir binaya taşınması söz konusu olmuş ve taşınma sırasında gerçekleşen teknik aksaklıklardan ötürü DNA örneklerinin ve diğer gerekli malzemelerin bulunduğu dondurucunun elektriği kesilmiştir. Bu şartlarda uzun süre kalan DNA örnekleri kullanılamaz duruma gelmiştir. Dolayısıyla DNA izolasyonlarının tekrarlanabilmesi amacıyla yeniden örnek almak için 2014 yılında sörvey gerçekleştirilen bölgelerde Temmuz-Ağustos 2016'da tekrar sörvey ve örnek toplama çalışmaları yapılmıştır. Örnekler yine salkım taşıdığı belirlenen asmalardan alınmıştır. Bu çalışmalar sırasında daha önce örnek alınan birçok alanda, özellikle orman içleri ve dere yatakları gibi alanlarda, tahribat olduğu görülmüş ve önceki sörvey çalışmasında etiketlenmiş olan bazı örneklerle ulaşılamamıştır (Şekil 2).



Şekil 2. Proje ekibinden örnek toplama çalışmaları

Yapılan sörvey çalışmaları sonucunda vejetasyon dönemindeki omcalardan OIV standartlarında belirtilen sayı ve şekilde genç sürgün ucu, sürgün, genç ve olgun yaprak örnekleri alınmıştır. Bu örneklerde bazı ampelografik ölçümler yapılmış ve her karaktere ait sonuçlar bir notasyon değeri ile ifade edilmiştir.

Çalışmada kullanılan notasyon değerleri şu şekildedir;

OIV 68 Olgun yaprak: Lob sayısı

(1- Yok, 2- Üç, 3- Beş, 4- Yedi, 5- Yedi' den fazla)

OIV 601 Olgun yaprak: N1 Damar uzunluğu

(1- Çok kısa ≤ 75 mm, 3- Kısa 105 mm, 5- Orta 135 mm, 7- Uzun 165 mm, 9- Çok uzun ≥ 195 mm)

OIV 602 Olgun yaprak: N2 Damar uzunluğu

(1- Çok kısa ≤ 65 mm, 3- Kısa 85mm, 5- Orta 105 mm, 7- Uzun 125 mm, 9- Çok uzun ≥ 145 mm)

OIV 603 Olgun yaprak: N3 Damar uzunluğu

(1- Çok kısa ≤ 35 mm, 3- Kısa 55mm, 5- Orta 75 mm, 7- Uzun 95 mm, 9- Çok uzun ≥ 115 mm)

OIV 604 Olgun yaprak: N4 Damar uzunluğu

(1- Çok kısa ≤ 15 mm, 3- Kısa 25mm, 5- Orta 35 mm, 7- Uzun 45 mm, 9- Çok uzun ≥ 55 mm)

OIV 066-5 Olgun yaprak: Yaprak sapı cebi – üst cep arası uzunluk

(1- Çok kısa ≤ 30 mm, 3- Kısa 50mm, 5- Orta 70 mm, 7- Uzun 90 mm, 9- Çok uzun ≥ 110 mm)

OIV 605 Olgun yaprak: N3-N4 arası yaprak cebi uzunluğu

(1- Çok kısa ≤ 4 mm, 3- Kısa 8mm, 5- Orta 12 mm, 7- Uzun 16 mm, 9- Çok uzun ≥ 20 mm)

OIV 606 Olgun yaprak: Yaprak sapı cebi – alt cep arası uzunluk

(1- Çok kısa ≤ 30 mm, 3- Kısa 45mm, 5- Orta 60 mm, 7- Uzun 75 mm, 9- Çok uzun ≥ 90 mm)

OIV 070-1 Olgun yaprak: Ana damarın antosiyanin renklenmesi

(1- Antosiyanin yok, 2- Sadece petiolde, 3- Birinci lob üzerinde, 4- İkinci lob üzerinde, 5- İkinci lobdan sonra)

OIV 076-1 Olgun yaprak: Diş şekli

(1- İki tarafı çukur (konkav), 2-İki tarafı düz, 3- İki tarafı tümsek (konveks), 4- Bir tarafı çukur, bir tarafı tümsek, 5- Karışık)

OIV 612 Olgun yaprak: N2 diş uzunluğu

(1- Çok kısa ≤ 6 mm, 3- Kısa 10 mm, 5- Orta 14 mm, 7- Uzun 18 mm, 9- Çok uzun ≥ 22 mm)

OIV 614 Olgun yaprak: N4 diş uzunluğu

(1- Çok kısa ≤ 6 mm, 3- Kısa 10 mm, 5- Orta 14 mm, 7- Uzun 18 mm, 9- Çok uzun ≥ 22 mm)

OIV 613 Olgun yaprak: N2 diş genişliği

(1- Çok kısa ≤ 6 mm, 3- Kısa 10 mm, 5- Orta 14 mm, 7- Uzun 18 mm, 9- Çok uzun ≥ 22 mm)

OIV 615 Olgun yaprak: N4 diş genişliği

(1- Çok kısa ≤ 6 mm, 3- Kısa 10 mm, 5- Orta 14 mm, 7- Uzun 18 mm, 9- Çok uzun ≥ 22 mm)

OIV 81 Olgun yaprak: Sap cebi özelliği

(1- Özelliği yok, 2- Sap cebi sapın sonunda damarlara doğru damarcıklarla sınırlanmış, 3- Uçta sıklıkla bir diş mevcut)

OIV 083-1 Olgun yaprak: Yaprak üst ceplerinin taban şekli

(1- V şeklinde, 2- U şeklinde, 3- Y şeklinde, 4- W dibi dişli)

OIV 083-2 Olgun yaprak: Yaprak alt ceplerinin taban şekli

(1- V şeklinde, 2- U şeklinde, 3- Y şeklinde, 4- W dibi dişli)

OIV 084 Olgun yaprak: Yaprak alt yüzü yatık tüylülük derecesi

(1- Yok veya çok zayıf, 3- Zayıf, 5- Orta, 7- Sık, 9- Çok sık)

DNA İzolasyonlarının Yapılması

Çalışma boyunca genotiplerde toplam iki defa DNA izolasyonu işlemleri gerçekleştirilmiştir. İlk izolasyon işlemleri Temmuz 2014'de gerçekleştirilmiş fakat moleküler karakterizasyonların yapılabilmesi için PCR optimizasyon işlemleri devam ederken daha önce de belirtildiği gibi, gerçekleşen elektrik kesintisi sonucu DNA örnekleri kullanılamaz duruma gelmiştir. Bu sebeple DNA izolasyonları Eylül 2016'da tekrarlanmıştır.

Tüm izolasyon işlemleri Doyle ve Doyle (1987) CTAB protokolü modifiye edilerek yapılmıştır. Protokolün basamakları şu şekildedir;

- Örnekler üzerine sıvı azot konularak ezildi ve toz haline getirildi.
- 2 ml'lik tüplere konulan yaklaşık 0,5 g örnekler üzerine 1 ml EB eklenerek 10 saniye kadar yüksek devirde vortekslendi.
- Parçalanan örnekler yarım saat boyunca 56° - 65° C'de su banyosuna kondu ve 10 dakikalık aralıklarla karıştırıldı.
- Örnekler, inkübasyon işlemi bittikten sonra oda sıcaklığına gelene kadar beklendi, daha sonra üzerine 1000 μ l CO eklenip nazikçe karıştırıldı.
- 16000g/ 20° - 23° C / 10 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası tüpte oluşan 3 fazdan en üstte bulunan, DNA'yı içeren sulu faz alınıp yeni 2ml'lik tüplere aktarıldı.

- Tüpe 100µl %10 CTAB eklendi ve karıştırıldı.
- CTAB eklendikten sonra tekrar 800 µl CO eklendi ve karıştırıldı.
- 16000g/ 20°-23°C / 10 dakika santrifüj edildi.
- Tüp içinde tekrar oluşan 3 fazdan en üst sulu faz yeni 2ml'lik tüpe aktarıldı.
- Örneklerin üzerine 1ml 2-propanol eklendi ve hafifçe karıştırıldı.
- DNA bu çözeltinin içinde 1 gece -20°C'de bırakıldı, DNA'nın çökmesi sağlandı.
- Ertesi gün örnekler 16000g /10 dk spin edildi. DNA'nın pellet halinde tüpün dibine yapışması sağlandı.
- Tüpler boşaltıldı ve üzerlerine 1ml %96 ethanol eklendi, 16000g/ 10dk santrifüj edildi.
- Tüpler tekrar boşaltılıp, üzerlerine %70 ethanol eklenerek 16000g/5dk santrifüj edildi.
- Tüpler tekrar boşaltıldı, kurumaları için kurutma kâğıdı üzerine ters çevrildi, yaklaşık 15 dk. kadar kurutuldu.
- Tüpler tamamen kuruduktan sonra örnekler üzerine 100µl TE eklendi. TE içindeki örnekler 1 gece 4°C'de bırakılıp, ertesi gün daha sonra kullanılmak üzere -20°C'ye kaldırıldı.

İkinci kez yapılan DNA izolasyonları için örnek alma işlemleri vejetasyonun ilerleyen dönemlerinde yapılmak zorunda kalınmıştır. Bu sebeple yapraklarda yüksek miktarda fenolik madde olduğu gözlenmiştir. İzole edilen DNA örneklerindeki kalıntıların temizlenmesi için fenolle yıkama prosedürü uygulanmıştır (Moore ve Dowhan 2002). Protokolün basamakları şu şekildedir;

- Eşit oranlarda (1:1) DNA örneği ve fenol/kloroform/izoamil alkol (25:24:1) 1,5 ml tüplerde karıştırıldı.
- Örnekler 15 saniye boyunca yüksek devirde vortekslendi daha sonrasında oda sıcaklığında 15 saniye 16000g hızda santrifüjlendi.
- Karışımda oluşan faz ayrımından sonra en üst sıvı faz yeni tüpe aktarıldı.
- Örnekler üzerine, örnek hacminin 1/10'u kadar 3M NaAc (pH 5,2) eklendi ve kısa süre vortekslendi.
- Örnekler üzerine 500 µl %100 soğutulmuş etanol eklendi ve tekrar vortekslendi. Daha sonra örnekler 1 saat -20°C'ye kaldırıldı.
- Bekleme sonrasında örnekler 16000g/ 20°-23°C / 10 dakika santrifüj edildi.
- Tüpler boşaltıldı ve üzerlerine 1ml %70 ethanol eklendi, 16000g/ 5dk santrifüj edildi.
- Tüpler tekrar boşaltıldı, kurumaları için kurutma kağıdı üzerine ters çevrildi, yaklaşık 15 dk. kadar kurutuldu.
- Tüpler tamamen kuruduktan sonra örnekler üzerine 100µl TE eklendi. TE içindeki örnekler 1 gece 4°C'de bırakılıp, ertesi gün daha sonra kullanılmak üzere -20°C'ye kaldırıldı.

Fenolle temizleme işlemleri sonrasında her örnekten 2,5 µl DNA ve 0,5 µl yükleme boyası (loading dye) ile karıştırılarak %1'lik agaroz jellerinde (Bantların UV altında görüntülenmesi için RedSafe Nucleic Acid Staining Solution içeren) 1X TBE tamponunda 80 Voltta 30 dk yürütülmüştür.

Protokol uygulanırken kullanılan solüsyonlar Çizelge 1'de görüldüğü gibidir.

Çizelge 1. CTAB DNA izolasyon protokolü uygulanırken kullanılan kimyasallar.

Kimyasal Adı	İçeriği
Ekstaksiyon Tamponu (EB)	50 mM Tris-HCl, pH 8.0 700 mM NaCl 10mM EDTA %1 (w/v) cetyltriethylammoniumbromide (CTAB) %1 (v/v) beta-mercaptoethanol
Kloroform: Oktanol karışımı (CO)	<ul style="list-style-type: none">• Chloroform:Oktanol 24:1 (v:v)
CTAB Stok	<ul style="list-style-type: none">• %10 (w/v) CTAB
NaCl Stok	<ul style="list-style-type: none">• 5 M NaCl
Ethanol	<ul style="list-style-type: none">• %96 (v/v)• %70 (v/v)
2-propanol	<ul style="list-style-type: none">• %100 2-propanol
TE	<ul style="list-style-type: none">• 1M Tris-Cl• 0.5M EDTA pH 8.0

Fenolle temizleme işlemi sonrasında elde edilen DNA örneklerinde ayrıca polisakkarit kalıntıları olduğu da gözlenmiştir. Bu durumun giderilebilmesi için örnekler üzerine 5M NaCl ve 1000 µl 2-propanol eklenerek bir gece -20°C’de inkübe edilmiş, daha sonra CTAB protokolünün son beş adımı tekrarlanmıştır.

Tüm işlemler sonrasında tekrar her örnekten 9µl DNA ve 1µl yükleme boyası (loading dye) ile karıştırılarak %1’lik agaroz jellerinde (Bantların UV altında görüntülenmesi için RedSafe Nucleic Acid Staining Solution içeren) 1X TBE tamponunda 80 Voltta 30 dk yürütülmüştür. İzole edilen DNA’ların kantiteleri Tekirdağ Bağcılık Araştırma İstasyonu Müdürlüğü laboratuvarlarında bulunan Thermo Scientific NanoDrop 1000 Spectrophotometer kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar kullanılarak tüm örneklerden stok halinde ayırmakla beraber, seyreltme yapılarak DNA miktarları 50ng’a ayarlanmıştır.

SSR Belirteçlerinin Seçimi

Çalışmada asmada moleküler çalışmalarında kullanılan “core set” primerleri Schuelke (2000)’nin metodu kullanılarak floresan işaretlemeye tabi tutulmuştur. Bu metoda göre foward primerlerinin başlarına universal M13 kuyruğu eklenerek sentezlenmektedir ve PCR reaksiyon karışımı hazırlanırken, karışım içerisine floresan işaretli M13 primerleri de eklenmektedir. Çalışmada kullanılan primerler ve dizileri Çizelge 2’de görüldüğü gibidir.

Çizelge 2. Floresan İşaretli Primer Baz Dizileri

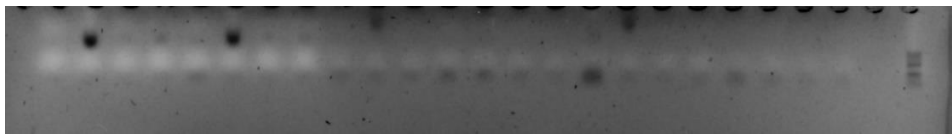
Primer Adı	Foward Dizisi	Reverse Dizisi
VVMD5	TGTAAAACGACGGCCAGTCTAGAGCTACGCC AATCCAA	TATACCAAAAATCATATTCC TAAA
VVMD7	TGTAAAACGACGGCCAGTAGAGTTGCGGAGA ACAGGAT	CAGACCTTCACACGCTTGA T
VVMD27	TGTAAAACGACGGCCAGTGTACCAGATCTGAA GACATCCGTAAGT	ACGGGTATAGAGCAAACGG TGT
VVS2	TGTAAAACGACGGCCAGTCAGCCCGTAAATG TATCCATC	AAATTCAAATTCTAATTCA ACTGG
VrZAG62	TGTAAAACGACGGCCAGTGTTGTAAATGGGC ACCGAACACACGC	CCATGTCTCTCCTCAGCTTC TCAGC
VrZAG79	TGTAAAACGACGGCCAGTAGATTGTGGAGGA GGGAACAAACCG	TGCCCCCATTTTCAAACCTCC CTTCC
Üniversal M13	FAM-TGTAAAACGACGGCCAGT	
Üniversal M13	HEX-TGTAAAACGACGGCCAGT	
Üniversal M13	TET-TGTAAAACGACGGCCAGT	

Schuelke metoduna göre hazırlanan PCR reaksiyon karışımı içeriği 20µl için şu şekildedir;

1. Örnek DNA (50ng)	2µl
2. dNTP mix (10mM)	1 µl
3. 10X Standard Taq Reaction Buffer (MgCl ₂ Free)	2,5 µl
4. MgCl ₂ (25mM)	1,5 µl
5. Taq Polimeraz	0,125 µl
6. Foward Primer	0,5 µl
7. Reverse Primer	1 µl
8. Floresan İşaretli M13 Primer	1 µl
9. ddH ₂ O	10,348 µl

Schuelke metoduna göre PCR koşulları oluşturulurken, primerlere kuyruk eklenmesi sebebiyle, primere özgü T_m (melting temperature) sıcaklık derecesinde yükselme gerçekleşmektedir. Bu sebeple çalışma başlangıcında PCR optimizasyonunun sağlanması için gradient PCR yapılmıştır. Gradient PCR sonuçlarına göre, primerlere özgü yeni T_m derecelerinin 63-57°C arasında olduğu belirlenmiştir (Şekil 3).

Örneklerin PCR işlemleri sırasında uyulan koşullar şu şekildedir; 94°C'de 4 dakika ilk denatürasyon, 30 döngü boyunca 94°C'de 30 saniye, 63-57°C'de 45 saniye ve 68°C'de 45 saniye, 8 döngü boyunca M13 bağlantısının gerçekleşmesi için 94°C'de 30 saniye, 53°C'de 45 saniye ve 68°C'de 45 saniye ve son olarak son uzatma için 68°C'de 20 dakika.



Şekil 3. Optimizasyon çalışması için örnek gradient PCR sonucu.

Floresan işaretli bu primerlerin elektrik kesintisi sebebiyle kaybedilmesi sonucu primerlerin tekrar sentezlenmesi mecburiyeti oluşmuştur. Tekrar floresan işaretleme yapılabilmesi için kaynak sağlanamamış ve yeni sentezletilecek primerlerde değişikliğe gidilmesine karar verilmiştir. Yeniden sentezlenen primerler ile ilgili bilgiler Çizelge 3'de görüldüğü gibidir.

Çizelge 3. Floresan işaretsiz primerler baz dizileri

Primer Adı	Foward	Reverse
VVMD5	CTAGACCTACGCCAATCCAA	TATACCAAAAATCATATTCCTAAA
VVMD6	ATCTCTAACCTAAAACCAT	CTGTGCTAAGACGAAGAAGA
VVMD7	AGAGTTGCGGAGAACAGGAT	GCAACCTTCACACGCTTGAT
VVMD8	TAACAAACAAGAAGAGGAAT	AGCACATCCACAACATAATG
VrZAG67	ACCTGGCCCGACTCCTCTTGATGC	TCCTGCCGGCGATAACCAAGCTATG
VrZAG79	AGATTGTGGAGGAGGGAACAAACCG	TGCCCCCATTTTCAAACCTCCCTCC

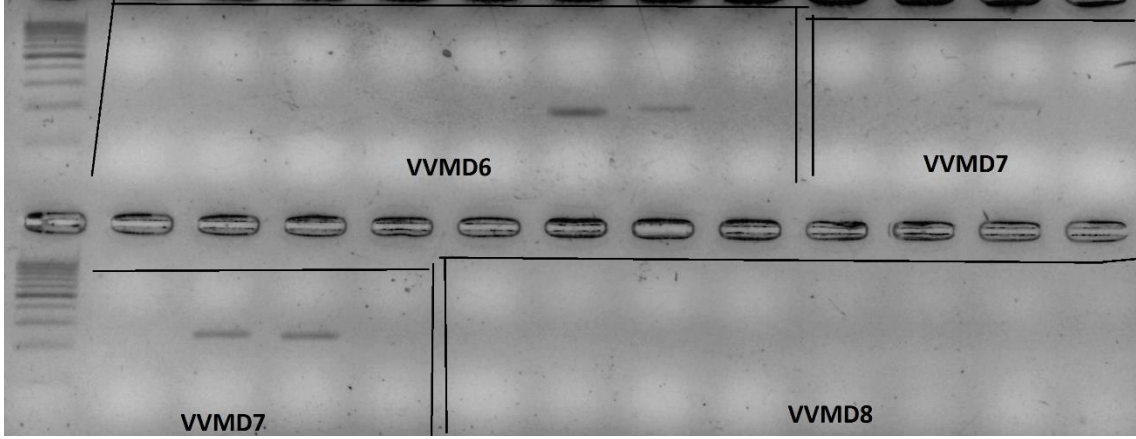
Yeni primerlerin optimizasyon işlemleri için yapılan Gradient PCR'da kullanılan reaksiyon karışımı içeriği şu şekildedir;

- | | |
|--|---------|
| 1. Örnek DNA (50ng) | 3µl |
| 2. dNTP mix (10mM) | 2 µl |
| 3. 10X Standard Taq Reaction Buffer (MgCl ₂ Free) | 2,5 µl |
| 4. MgCl ₂ (25mM) | 2,5 µl |
| 5. Taq Polimeraz | 0,3 µl |
| 6. Foward Primer | 2 µl |
| 7. Reverse Primer | 2 µl |
| 8. ddH ₂ O | 10,7 µl |

Örneklerin Gradient PCR işlemleri sırasında uyulan koşullar şu şekildedir; 95°C'de 4 dakika ilk denatürasyon, 30 döngü boyunca 94°C'de 30 saniye, 65-50°C'de 30 saniye ve 72°C'de 60 saniye ve son olarak son uzatma için 72°C'de 15 dakika.

Gradient PCR için deney tasarımı şekilde görüldüğü gibi yapılmıştır.

Primer 1		Primer 2		Primer 3		Primer 4		Sıcaklık (° C)
Örnek 1	Örnek 9	Örnek 1	Örnek 9	Örnek 1	Örnek 9	Örnek 1	Örnek 9	65,0
Örnek 2	Örnek 10	Örnek 2	Örnek 10	Örnek 2	Örnek 10	Örnek 2	Örnek 10	63,8
Örnek 3	Örnek 11	Örnek 3	Örnek 11	Örnek 3	Örnek 11	Örnek 3	Örnek 11	62,0
Örnek 4	Örnek 12	Örnek 4	Örnek 12	Örnek 4	Örnek 12	Örnek 4	Örnek 12	59,1
Örnek 5	Örnek 13	Örnek 5	Örnek 13	Örnek 5	Örnek 13	Örnek 5	Örnek 13	55,7
Örnek 6	Örnek 14	Örnek 6	Örnek 14	Örnek 6	Örnek 14	Örnek 6	Örnek 14	52,9
Örnek 7	Örnek 15	Örnek 7	Örnek 15	Örnek 7	Örnek 15	Örnek 7	Örnek 15	51,0
Örnek 8	Örnek 16	Örnek 8	Örnek 16	Örnek 8	Örnek 16	Örnek 8	Örnek 16	50,0



Şekil 4. Yeni primerlerin optimizasyonu için örnek PCR sonucu.

PCR İşlemleri

PCR koşulları 95°C'de 4 dakika ilk denatürasyon, sonrasında 35 döngü olacak şekilde 94°C'de 30 saniye, gradient PCR işlemi ile belirlenen sıcaklıklarda 30 saniye ve 72°C'de 1 dakika, son olarak yine 72°C'de 15 dakika son uzatma yapılacak şekilde ayarlanmıştır. DNA amplifikasyonları yukarıda verilen koşullarda BIORAD T-100 Thermal Cycler kullanılarak yapılmıştır.

İstatistik Analizler

Elektroforez işlemleri %10 µl/ml (v/v) etidyum bromit ile boyanmış %2'lik agaroz jellerde 130 Voltta 35 dakika yürütüldükten sonra UV jel görüntüleme sistemi ile görüntülenmiştir. Görüntüsü alınan jellerde GelAnalizer 2010a kullanılarak bant büyüklükleri belirlenmiş, daha sonra bu büyüklüklerden faydalanılarak skor tabloları oluşturulmuştur.

Kümeleme (Cluster) Analizi

Kümeleme analizi Ward metodu (en küçük varyans) ile R istatistik programı (3.3.2 Sincere Pumpkin Patch) kullanılarak yapılmıştır.

Kümeleme analizi için verilerin hazırlığında kullanılan kod aşağıdaki gibidir.

```
>mydata <- na.omit(mydata)
>mydata <- scale(mydata)
>wss <- (nrow(mydata)-1)*sum(apply(mydata,2,var))
>for (i in 2:15) wss[i] <- sum(kmeans(mydata, centers=i)$withinss)
>plot(1:15, wss, type="b", xlab="Number of Clusters", ylab="Within
groups sum of squares")
>fit <- kmeans(mydata, 5) # 5 cluster solution
>aggregate(mydata,by=list(fit$cluster),FUN=mean)
>mydata <- data.frame(mydata, fit$cluster)
```


Toplanan tüm veriler öncelikle Ward metoduna göre önyüklenmiş p değerleri ile hiyerarşik kümeleme analizi (Ward Hierarchical Clustering with Bootstrapped p values) yapılmıştır.

```
>library(pvclust)
>fit <- pvclust(mydata, method.hclust="ward.D2",
method.dist="euclidean")
>plot(fit)
>pvrect(fit, alpha=.95)
```

Temel Bileşenler Analizi

Temel bileşenler analizi (PCA) R istatistik programında FactoMiner kütüphanesi kullanılarak yapılmıştır (Husson ve ark. 2010).

PCA için kullanılan kod şu şekildedir;

```
>library(FactoMiner)
>res.pca<-PCA(mydata)
```

BULGULAR ve TARTIŞMA

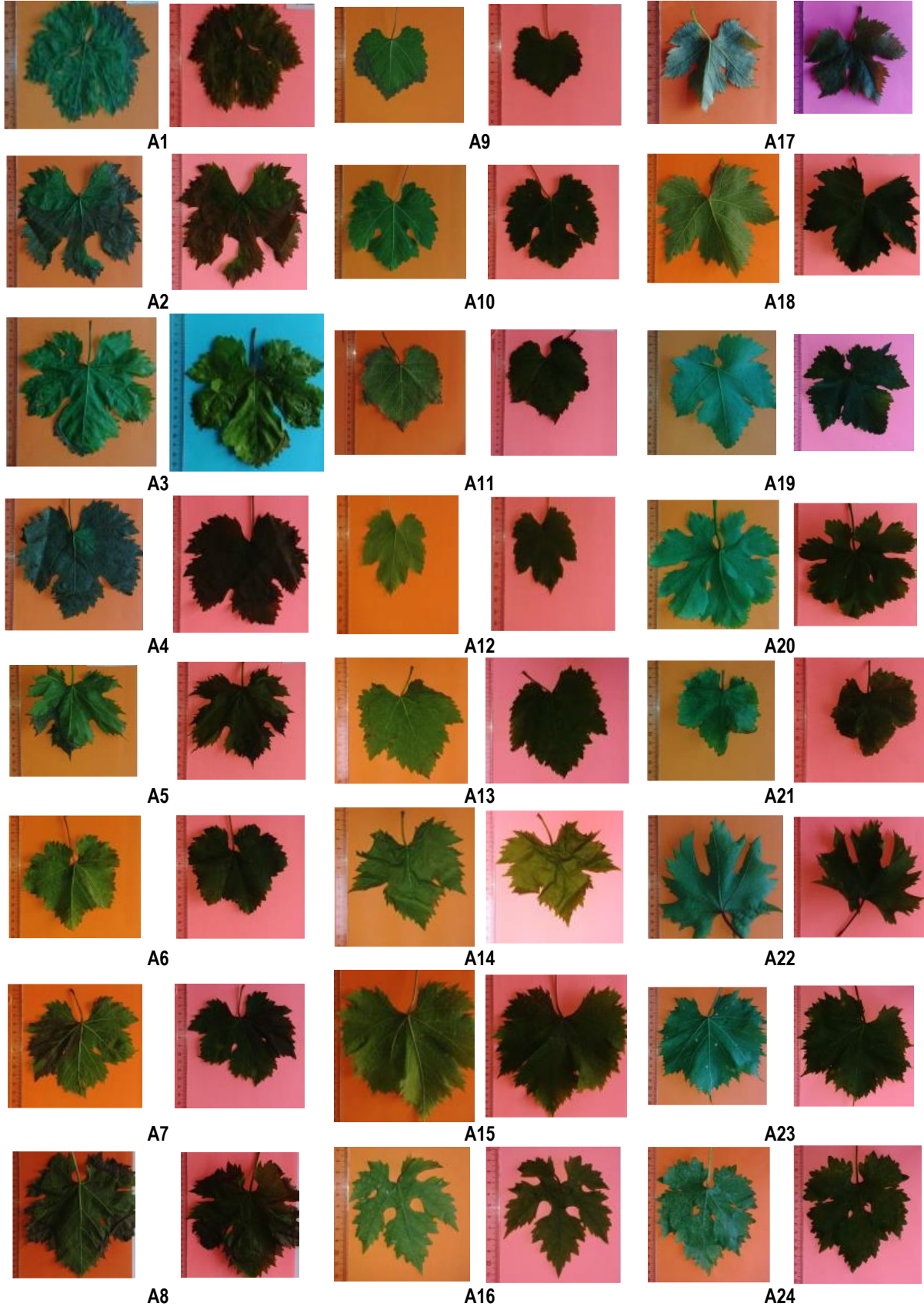
Ampelografi Çalışmaları

Bölgeden toplanan 24 genotipte bazı yaprak ve sürgün özellikleri incelenmiş (OİV.68, OİV.601, OİV.602, OİV.603, OİV.604, OİV.066-5, OİV.605, OİV.606, OİV.070, OİV.076, OİV.612, OİV.614, OİV.613, OİV.615, OİV.81, OİV.083-1, OİV.083-2, OİV.84). İncelenen genotiplere ait fotoğraflar Şekil 5’de görüldüğü gibidir.

Kümeleme (Cluster) ve Temel Bileşenler Analizleri (PCA)

Kümeleme ve temel bileşenler analizleri iki aşamada gerçekleştirilmiştir. İlk aşamada ölçümü yapılan tüm genotipler birbirleriyle karşılaştırılmıştır. Yapılan PCA sonucunda iki önemli bileşen ortaya çıkmış ve bu iki bileşenin toplam varyasyonun %54,99’unu açıkladığı görülmüştür (Çizelge 4). %41.9 toplam varyasyonu içeren ilk bileşen grubunda en yüksek etkinliğe sahip karakterler OİV.602, OİV.603 ve OİV.614 olurken, toplam varyansın %13.2’sini içeren ikinci bileşen grubunda en yüksek etkinliğin OİV.066-5, OİV.613 ve OİV.604 karakterlerinde olduğu görülmüştür.

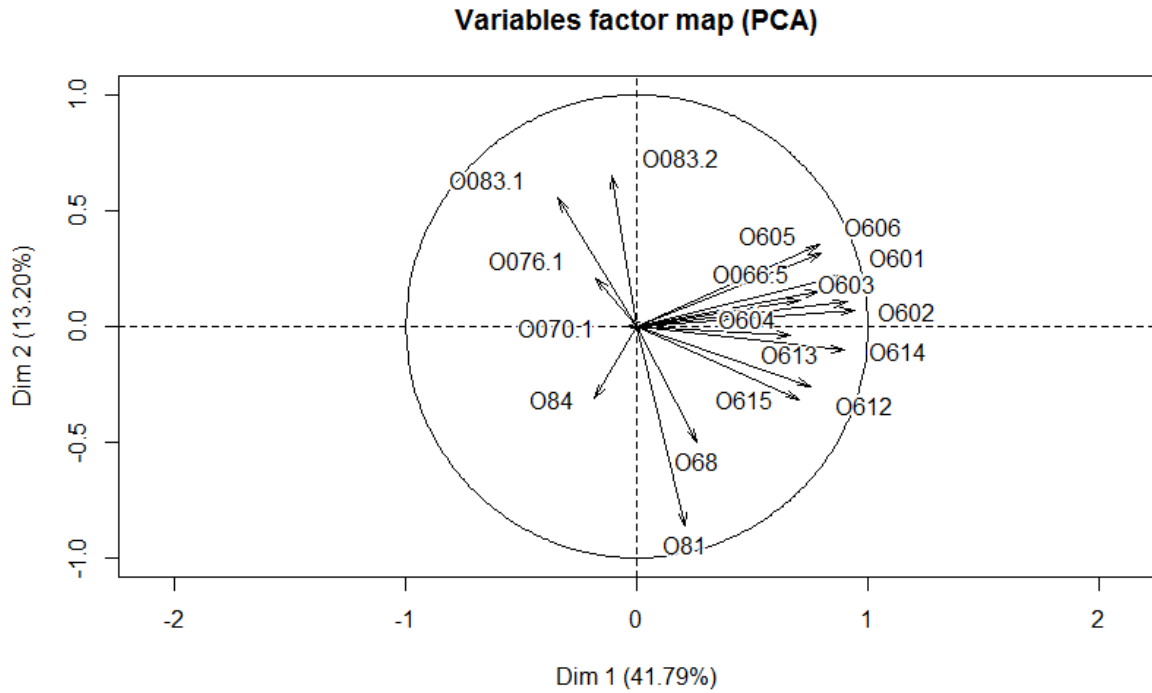
Değişkenlere ait faktör haritası incelendiğinde karakterlerin haritanın dört bölümünde de bulunduğu görülmektedir (Şekil 6). Her iki bileşen açısından da pozitif olan ilk grupta OİV.083.2, OİV.605, OİV.606, OİV.066.5, OİV.601, OİV.602, OİV.603 ve OİV.604 karakterleri yer almaktadır. Bu karakterlerin tümü her iki bileşen için de pozitif etkili olmuştur. Birinci bileşen için pozitif, ikinci bileşen için negatif olan ikinci grupta OİV.614, OİV.613, OİV.612, OİV.615, OİV.68 ve OİV.81 karakterleri yer almaktadır. Bu karakterlerin birinci bileşene katkıları pozitif olurken, ikinci bileşen açısından negatif etkili olmuşlardır. Birinci bileşen açısından negatif, ikinci bileşen açısından pozitif olan diğer üçüncü grupta OİV.83.1, OİV.76.1 ve OİV.70.1 karakterleri yer almıştır. Her iki bileşen için negatif olan dördüncü grupta ise OİV.84 karakteri tek başına yer almıştır.



Şekil 5. Bazı ampelografik özellikleri incelenen 24 genotipe ait yaprak fotoğrafları.

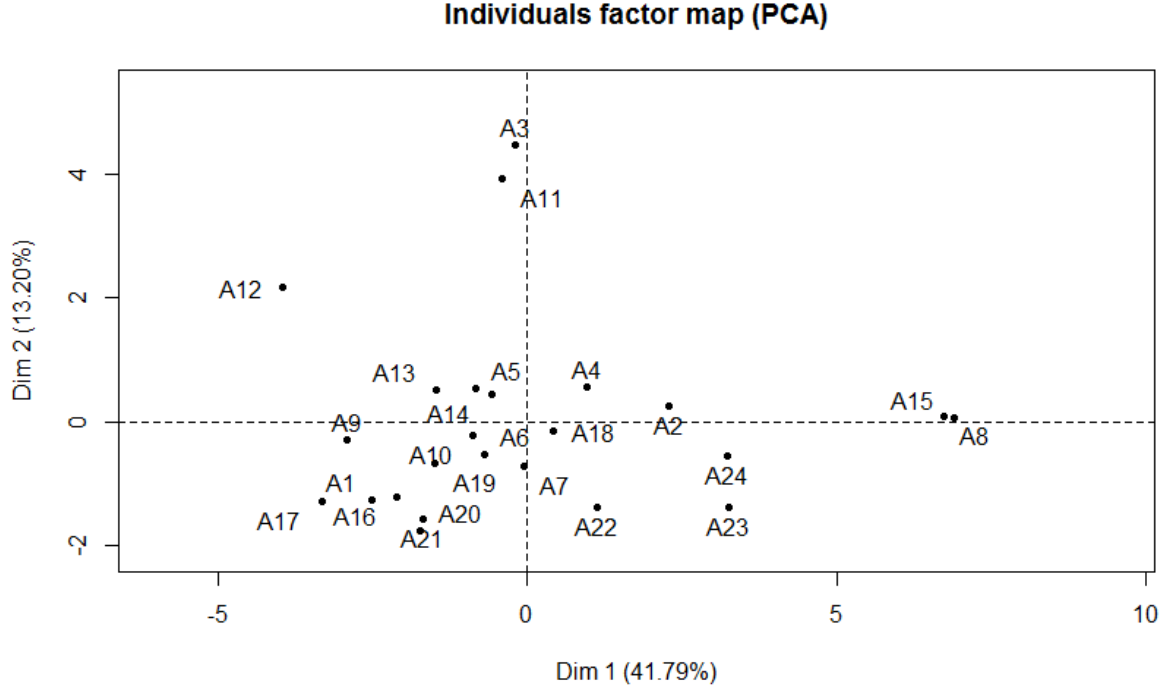
Çizelge 4. 24 genotipte incelenen ampelografik özellikler için temel bileşen değerleri.

Karakter	Temel Bileşen Katkısı		Temel Bileşen Koordinatları	
	Bileşen 1	Bileşen 2	Bileşen 1	Bileşen 2
OİV.68	0,896	1,062	0,259	-0,502
OİV.601	0,896	2,029	0,898	0,219
OİV.602	11,720	1,931	0,938	0,067
OİV.603	10,948	4,802	0,907	0,106
OİV.604	6,672	5,681	0,708	0,116
OİV.066-5	8,296	9,478	0,790	0,150
OİV.605	8,485	4,173	0,798	0,314
OİV.606	8,325	5,256	0,791	0,353
OİV.070	0,027	4,539	-0,045	-0,003
OİV.076	0,421	1,871	-0,178	0,210
OİV.612	7,563	2,797	0,754	-0,257
OİV.614	10,747	4,445	0,899	-0,102
OİV.613	5,857	6,471	0,663	-0,039
OİV.615	6,541	4,228	0,701	-0,317
OİV.81	0,585	3,132	0,209	-0,862
OİV.083-1	1,573	1,290	-0,344	0,553
OİV.083-2	0,163	1,797	-0,111	0,653
OİV.84	0,448	4,105	-0,183	-0,312
Eigen Değerleri	7,523	2,376		
% Varyans	41,794	13,202		
%Kümülatif Varyans	41,794	54,997		



Şekil 6. 24 genotipin 18 ampelografik (OIV) karaktere bağlı olarak iki temel bileşene göre faktör haritası.

İncelen 24 genotipin iki temel bileşene göre faktör haritası incelendiğinde genotiplerin yoğunluğu her iki temel bileşen açısından negatif olan dördüncü bölgede olmakla beraber haritanın dört bölgesinde de dağılmış olduğu görülmektedir (Şekil 7).

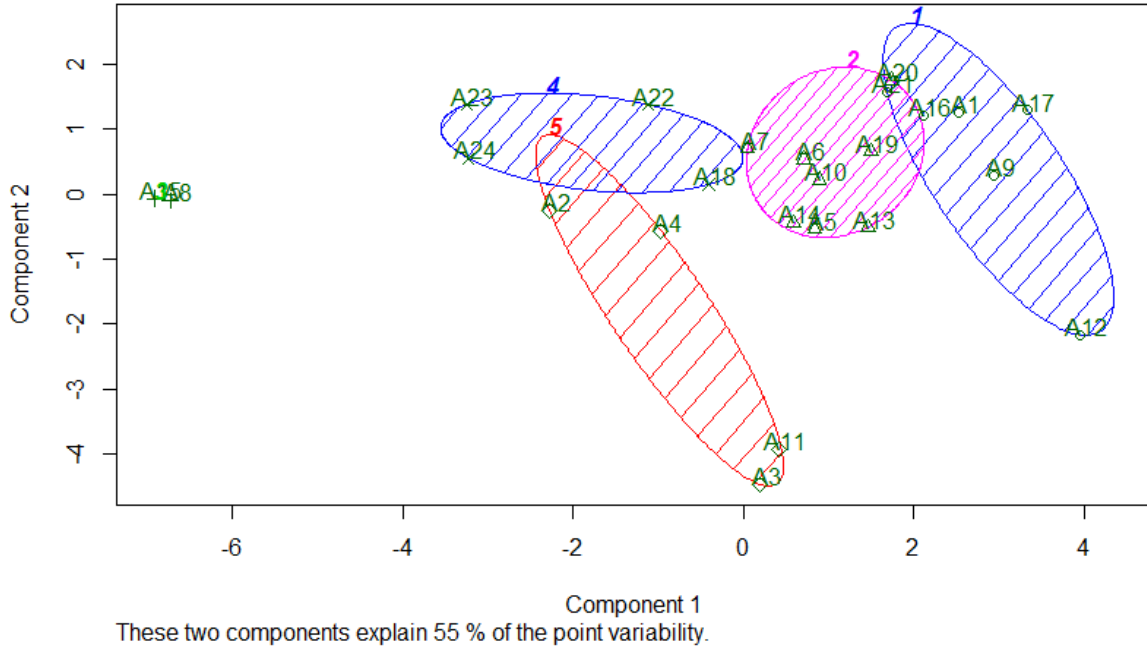


Şekil 7. 24 genotipin 18 ampelografik (OIV) karaktere bağlı olarak iki temel bileşene göre faktör haritası.

Her iki bileşenin de pozitif olduğu birinci bölgede A15, A2, A8 ve A4 olmak üzere dört genotip yer almış, bunlar arasında A15 ve A8 genotiplerinin birbirine yakın noktalarda ve A4 ile A2 genotiplerinin de birbirine yakın noktalarda bulunmasıyla iki ayrı küme oluştuğu görülmektedir. Birinci bileşenin pozitif, ikinci bileşenin negatif olduğu ikinci bölgede A24, A18, A22 ve A23 olmak üzere 4 genotip yer almıştır. Bunlar arasında A23 ve A24 birbirine daha yakın olmak üzere tüm genotipler birbirine hemen hemen eşit uzaklıkta bulunmaktadır. Birinci bileşenin negatif, ikinci bileşenin pozitif olduğu üçüncü bölgede A12, A13, A14, A11, A3 ve A5 olmak üzere 6 genotip yer almıştır. Bunlar arasında A12 tüm genotiplerden uzak olarak tek başına, A3 ve A11 birbirine yakın noktalarda, diğer tüm genotiplerden uzakta ve diğer genotipler de iki eksenin kesişim noktasına yakın olmak üzere beraber kümelenmiştir. Her iki bileşenin de negatif olduğu dördüncü bölgede ise A17, A1, A7, A10, A9, A21, A19, A6, A16 ve A20 olmak üzere 10 genotip yer almıştır. Bu grupta genotiplerin iki eksenin kesişim noktasına yakın ve beraber kümelenildiği görülmektedir.

İki temel bileşen göz önüne alınıp kümeleme analizi yapıldığında incelenen 24 genotipin 5 kümeye ayrıldığı Şekil 7'de görülmektedir. Birinci kümede A17, A9, A12, A1, A16, A20 ve A21 yer almıştır. İkinci kümede A21, A19, A13, A10, A6, A5, A14 ve A7 yer almıştır. A21 genotipinin her iki kümenin kesiştiği alanda yer aldığı görülmüştür. Üçüncü küme tüm diğer kümelerden uzakta A15 ve A8 genotiplerini içermektedir.

Dördüncü kümede A22, A18, A23 ve A24 genotipleri yer alırken, beşinci kümede A2, A4, A11 ve A3 genotipleri yer almıştır.



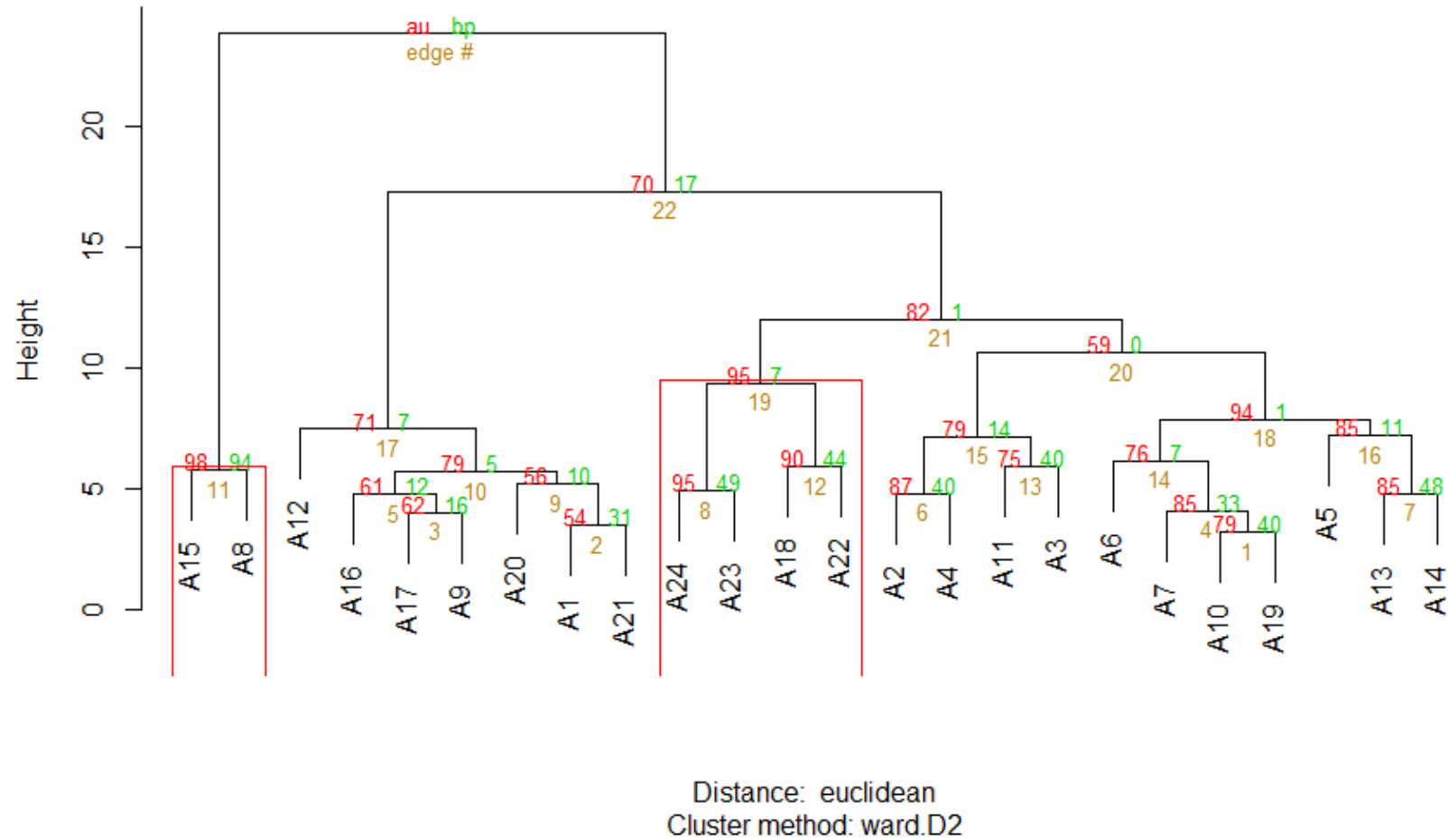
Şekil 8. 24 genotipin 18 ampelografik (OIV) karaktere bağlı olarak iki temel bileşene göre kümeleme analizi grafiği.

İncelenen genotiplerin kümeleme analizi dendogramı Şekil 8'de verilmiştir. Dendogram incelendiğinde genotiplerin iki ana küme altında gruplandığı görülmektedir. İlk kümede temel bileşenler analizinde de olduğu gibi A8 ve A15 genotipleri yer almakta, diğer tüm genotipler ikinci ana kümede yer almıştır.

Oluşan ikinci ana küme de kendi içerisinde iki alt gruba ayrılmış, ilk alt grupta A12, A16, A17, A9, A20, A1 ve A21 yer almıştır. İkinci alt grupta ise A23, A24, A18, A22, A2, A4, A11, A3, A6, A7, A10, A19, A5, A13 ve A14 genotipleri yer almıştır. Dolayısıyla OIV'ye ait 18 ampelografik karaktere göre A8 ve A15 genotiplerinin birbirleriyle çok benzer bireyler olduğunu söylemek mümkün gözükmemektedir. Ayrıca A24 ile A23 ve A18 ile A22 genotiplerinin de birbirlerine çok yakın oldukları görülmektedir. Ayrı bir grup oluşturan A12, A16, A17, A9, A20, A1 ve A21 genotiplerinin içerisinde A12 genotipi tek başına yer alırken, A17 ve A9 yakın, A16 ise onlarla yakın ilişkili olarak görülmektedir. Bu grup içerisindeki A1 ile A21 yine birbirine yakın genotipler olarak gözükmemektedirken A20 genotipinin de bunlarla yakın ilişkili olduğu anlaşılmaktadır.

A2, A4, A11, A3, A6, A7, A10, A19, A5, A13 ve A14 genotiplerinin oluşturduğu diğer bir grupta A2 ile A4 ve A11 ile A3 genotiplerinin birbirleriyle çok benzer ve iki grubun birbiriyle yakın ilişkili oldukları görülmektedir. A6, A7, A10 ve A19 genotipleri arasındaki ilişki A13, A14 ve A15 arasındaki ilişkiye benzer şekildedir. A13 ve A14 birbiriyle çok yakın ilişkili ve A15 genotipinin de bunlarla bağlantılı olduğu görülmektedir. Tüm genotipler içerisinde A8 ile 15 genotiplerinin oluşturduğu grup ile A13 ve A14 genotiplerinin oluşturduğu grup birbirleriyle en az ilişkili olmuştur (Şekil 9).

Cluster dendrogram with AU/BP values (%)



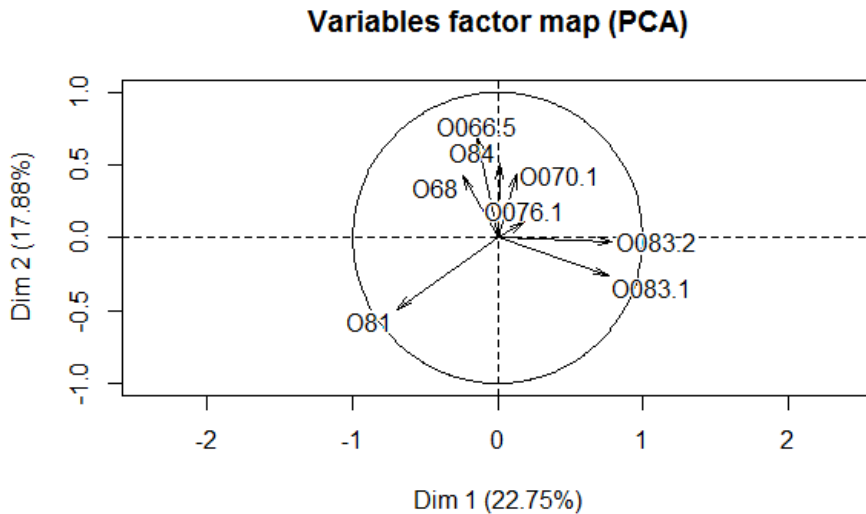
Şekil 9. İncelenen 24 genotipin 18 ampelografik (OIV) karaktere göre kümeleme analizi dendrogramı.

Çizelge 5. 24 genotip ve Trakya Bölgesi çeşitlerinde incelenen ampelografik özellikler için temel bileşen değerleri.

Karakter	Temel Bileşen Katkısı		Temel Bileşen Koordinatları	
	Bileşen 1	Bileşen 2	Bileşen 1	Bileşen 2
OIV.68	3,269	12,730	-0,243	0,426
OIV.066-5	1,117	33,538	-0,142	0,692
OIV.070	0,905	13,315	0,128	0,436
OIV.076	1,780	0,877	0,180	0,112
OIV.81	26,716	16,755	-0,697	-0,489
OIV.083-1	32,007	4,781	0,763	-0,261
OIV.083-2	34,196	0,047	0,788	-0,026
OIV.84	0,006	17,954	0,010	0,506
Eigen Değerleri	1,820	1,430		
% Varyans	22,75	17,882		
%Kümülatif Varyans	22,75	40,636		

Çalışmada yer alan 24 genotip bazı ampelografik özellikler bakımından Trakya Bölgesi çeşitleri karşılaştırılmıştır. Karşılaştırılan bu özellikler ve ilgili değerler Çizelge 5'de yer almaktadır. İncelenen sekiz karakter ile yapılan temel bileşenler analizi sonucunda toplam varyasyonun %40,636'sını açıkladıkları görülmüştür. İncelenen karakterlerden birinci bileşen için en çok katkı sağlayanlar OIV.083-1, OIV.083-2 ve OIV.081 olurken, ikinci bileşen için OIV.066-5 karakteri olmuştur.

Dikkate alınan karakterlerin iki temel bileşene göre faktör haritası (Şekil 10) incelendiğinde her iki bileşen için pozitif olan birinci bölgede OIV.070, OIV.076 ve OIV.084 karakterlerinin, birinci bileşenin pozitif, ikinci bileşenin negatif olduğu ikinci bölgede OIV.083-1 ve OIV.083-2 karakterlerinin, birinci bileşenin negatif, ikinci bileşenin pozitif olduğu üçüncü bölgede OIV.068 ve OIV.066-5 karakterlerinin, her iki bileşenin de negatif olduğu dördüncü bölgede ise OIV.081 karakterinin bulunduğu görülmektedir.



Şekil 10. 24 genotip ve Trakya Bölgesi çeşitlerinde 8 ampelografik (OIV) karaktere bağlı olarak iki temel bileşene göre değişkenler faktör haritası

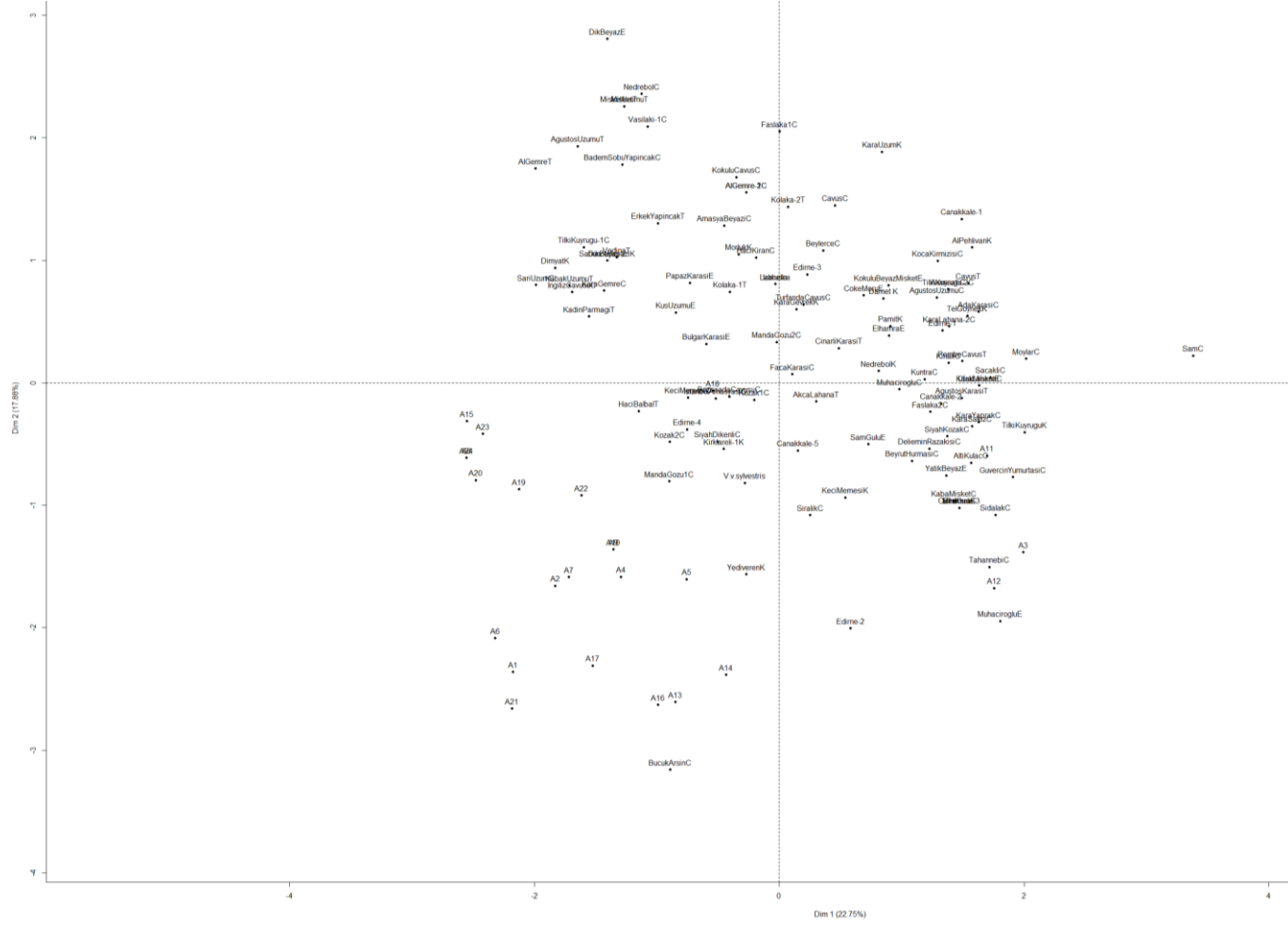
24 genotip ve Trakya Bölgesi yerel kültür çeşitleri ile yapılan temel bileşenler analizi sonucunda toplanan genotiplerin yalnızca iki grup içerisinde yer aldığı görülmüştür. Sekiz ampelografik özellik ile yapılan temel bileşenler analizine göre A11, A12 ve A2 genotipleri birinci temel bileşenin pozitif, ikinci temel bileşenin negatif olduğu ikinci bölgede Çanakkale çeşitleri; Altı Kulaç, Beyrut Hurması, Çanakkale-2, Çanakkale-3, Çanakkale-5, Deli Emin Razakisi, Elhamra, Faslaka-2, Güvercin Yumurtası, Kaba Misket, Karalahana, Karasakız, Karayaprak, Muhaciroğlu, Sıdalak, Şıralık, Siyah Kozak, Tahannebi ile Edirne çeşitleri; Edirne-2, Muhaciroğlu, Şam Gülü, Ufak Misket, Yatık Beyaz ile Kırklareli çeşitleri; Keçi Memesi, Miri Kara ve Tilki Kuyruğu ile Tekirdağ çeşitleri; Ağustos Karası ve Akça Lahana ile beraber yer almışlardır. A1, A10, A13, A14, A15, A16, A17, A18, A19, A2, A20, A21, A22, A23, A24, A4, A5, A6, A7, A8 ve A9 genotipleri Çanakkale çeşitleri Bozcaada Çavuşu, Buçuk Arşın, İstanbul Amasyası, Keçi Memesi, Kozak-1, Kozak-2, Manda Gözü-1, Siyah Dikenli ile Edirne çeşidi Edirne-4 ile Kırklareli çeşitleri Kırklareli-1 ve Yediveren ile Tekirdağ çeşidi Hacı Balbal ve *V. vinifera* spp. *sylvestris* ile beraber her iki bileşenin de negatif olduğu dördüncü bölgede yer almıştır (Çizelge 6, Şekil 11).

24 genotip ve Trakya Bölgesi yerel kültür çeşitleri ile yapılan kümeleme analizi incelendiğinde toplanan genotiplerin 3 farklı alt kümede de bulunduğu görülmektedir (Şekil 11). Dendogram incelendiğinde A18 genotipinin Tekirdağ çeşidi Hacı Balbal ile en yakın ve Çanakkale çeşitleri Bozcaada Çavuşu ve Siyah Dikenli ile yakın olduğu; A11 genotipinin Kara Sakız çeşidi (Çanakkale) ile en yakın, A3 genotipinin Tahannebi çeşidi (Çanakkale) ile en yakın, A12 genotipinin Muhaciroğlu çeşidi (Edirne) ile en yakın olduğu ve diğer genotiler A17, A1, A16, A20, A22, A7, A19, A10, A9, A15, A24, A8, A4, A5, A13, A14, A23, A6, A2 ve A21'in Manda Gözü-2 (Çanakkale), Edirne-4, Kozak-2 (Çanakkale), Manda Gözü-1 (Çanakkale) ve Buçuk Arşın (Çanakkale) çeşitleri ile aynı küme içerisinde yer aldığı görülmüştür (Şekil 12).

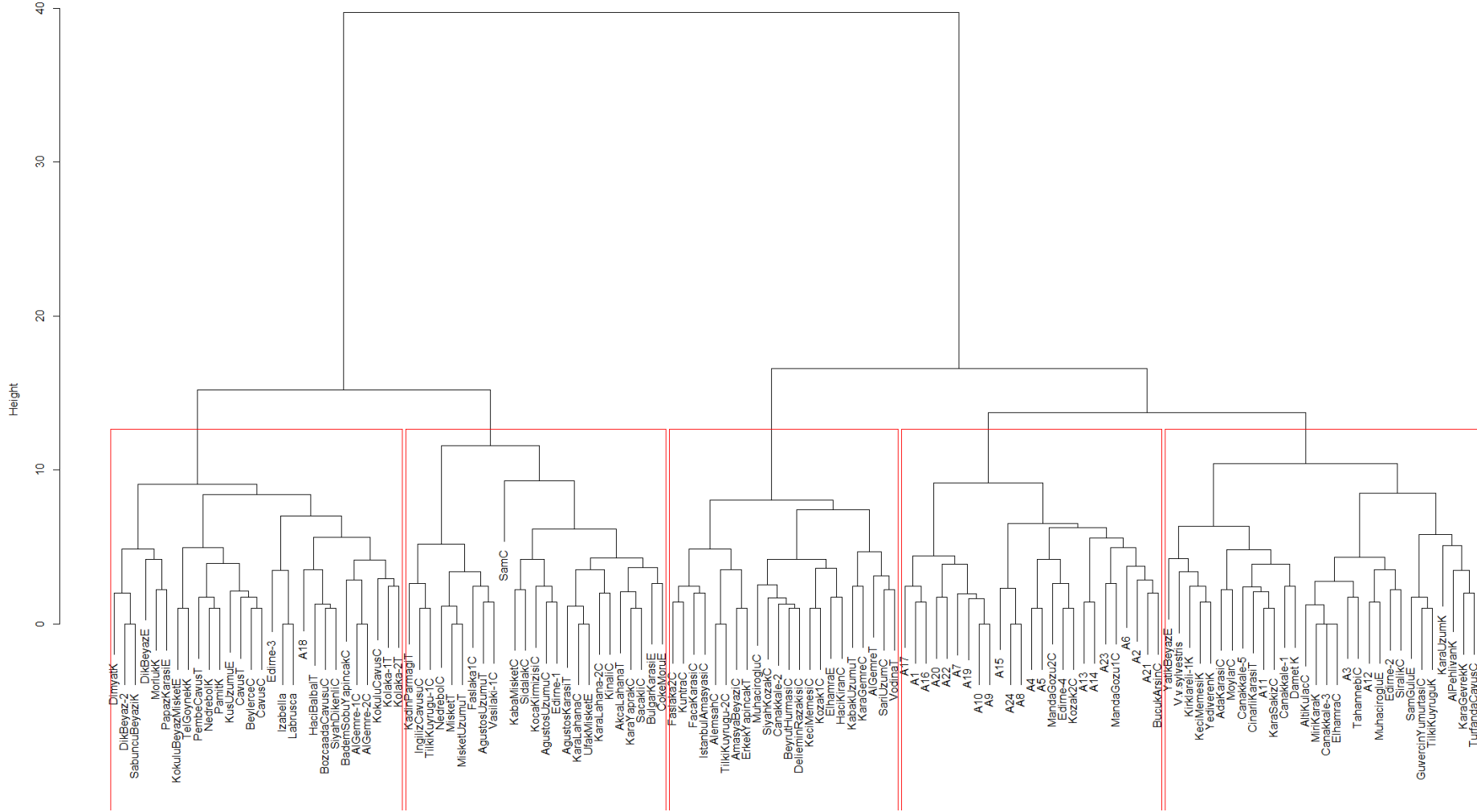
Trakya Bölgesi yerel çeşitleri ayrıca kendi içlerinde 39 ampelografik özellik açısından (Boz ve ark. 2012) da kümeleme ve temel bileşenler analizlerine tabi tutulmuştur. İlgili değerler Çizelge 7'de ve ilgili dağılımlar Şekil 13, Şekil 14 ve Şekil 15'de olduğu gibidir.

Çizelge 6. Trakya Bölgesi yerel çeşitleri ve araştırmada elde edilen genotiplerin incelenen Ampelografik karaktere göre temel bileşenler analizi yakınlıkları.

1. Bölge (+,+)	2. Bölge (+,-)	3. Bölge (-,+)	4. Bölge (-,-)
Ada karası Ç	A11	Ağustos üzümü T	A1
Ağustos üzümü Ç	A12	Algemre 1 Ç	A10
Alemşah Ç	A3	Algemre 2 Ç	A13
Alpehlivan K	Ağustos karası T	Algemre T	A14
Beylerce Ç	Akça lahana T	Amasya beyazı Ç	A15
Çanakkale 1	Altikulaç Ç	Badem söbü yapıncak Ç	A16
Çavuş Ç	Beyrut hurması Ç	Bulgar karası E	A17
Çavuş T	Çanakkale 2	Dik beyaz 2 E	A18
Çınarlı karası T	Çanakkale 3	Dik beyaz E	A19
Çoke moru E	Çanakkale 5	Dimyat K	A2
Damet K	Deliemin razakısı Ç	Erkek yapıncak T	A20
Edirne 1	Edirne 2	Hacıkıran Ç	A21
Edirne 3	Elhamra Ç	İngiliz çavuşu Ç	A22
Elhamra E	Faslaka 2 Ç	İzabella	A23
Foça karası Ç	Güvercin yumurtası Ç	Kabak üzümü T	A24
Faslaka 1 Ç	Kaba misket Ç	Kadın parmağı T	A4
Karagevrek K	Karalahana Ç	Karagemre Ç	A5
Karalahana 2 Ç	Karasakız Ç	Kokulu çavuş E	A6
Kara üzüm K	Karayaprak Ç	Kolaka 1 T	A7
Kınalı Ç	Keçi memesi K	Kuş üzümü E	A8
Koca kırmızısı Ç	Miri kara K	Labrusca	A9
Kokulu beyaz misket Ç	Muhaciroğlu Ç	Manda gözü 2 Ç	Bozcaada çavuşu Ç
Kolaka 2 T	Muhaciroğlu E	Misket T	Buçuk arşın Ç
Kuntra Ç	Şam gülü E	Misket üzümü T	Edirne 4
Moylar Ç	Sıdalak Ç	Morluk K	Hacı balbal T
Nedrebolu K	Şıralık Ç	Nedrebol Ç	İstanbul amasyası Ç
Pamit K	Siyah kozak Ç	Papazkarası E	Keçi memesi Ç
Pembe çavuş T	Tahannebi Ç	Sabuncu beyazı K	Kırklareli 1
Saçaklı Ç	Tilki kuyruğu K	Sarı üzüm Ç	Kozak 1 Ç
Tel göynek K	Ufak misket E	Tilki kuyruğu 1 Ç	Kozak 2 Ç
Tilki kuyruğu 2 Ç	Yatık beyaz E	Vasilaki 1 Ç	Manda gözü 1 Ç
Turfanda çavuş Ç		Vodina T	Siyah dikenli Ç
			V. vin. ssp Sylvestris
			Yediveren
	3 genotip Ganos D.		21 genotip Ganos D.
16 adet Çanakkale	17 adet Çanakkale	12 adet Çanakkale	8 adet Çanakkale
7 adet Kırklareli	3 adet Kırklareli	3 adet Kırklareli	2 adet Kırklareli
5 adet Edirne	6 adet Edirne	6 adet Edirne	1 adet Edirne
4 adet Tekirdağ	2 adet Tekirdağ	9 adet Tekirdağ	1 adet Tekirdağ
		Labrusca	V. vin. ssp Sylvestris
		İzabella	



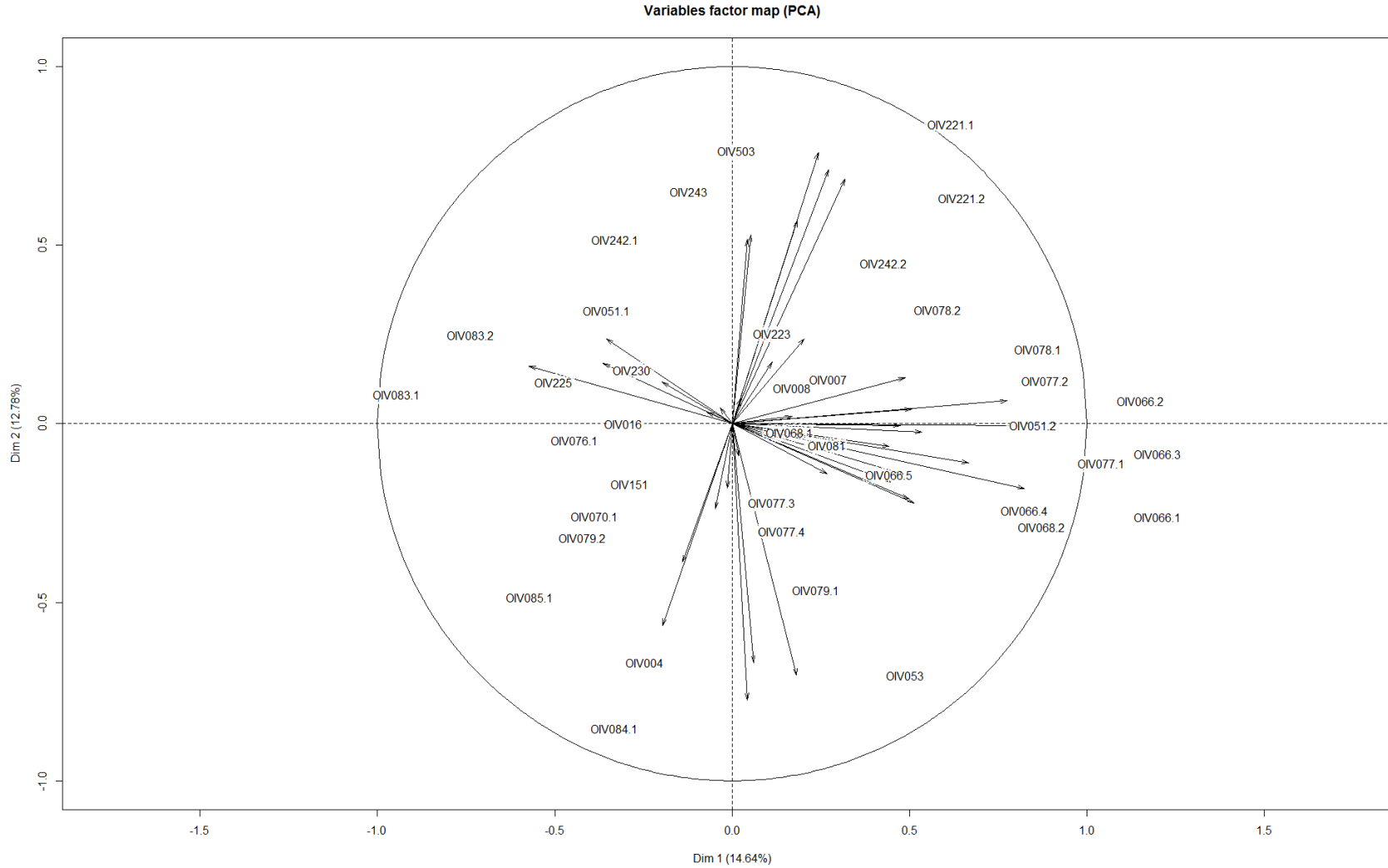
Şekil 11. 24 genotip ve Trakya Bölgesi çeşitlerinde 8 ampelografik (OIV) karaktere bağlı olarak iki temel bileşene göre faktör haritası.



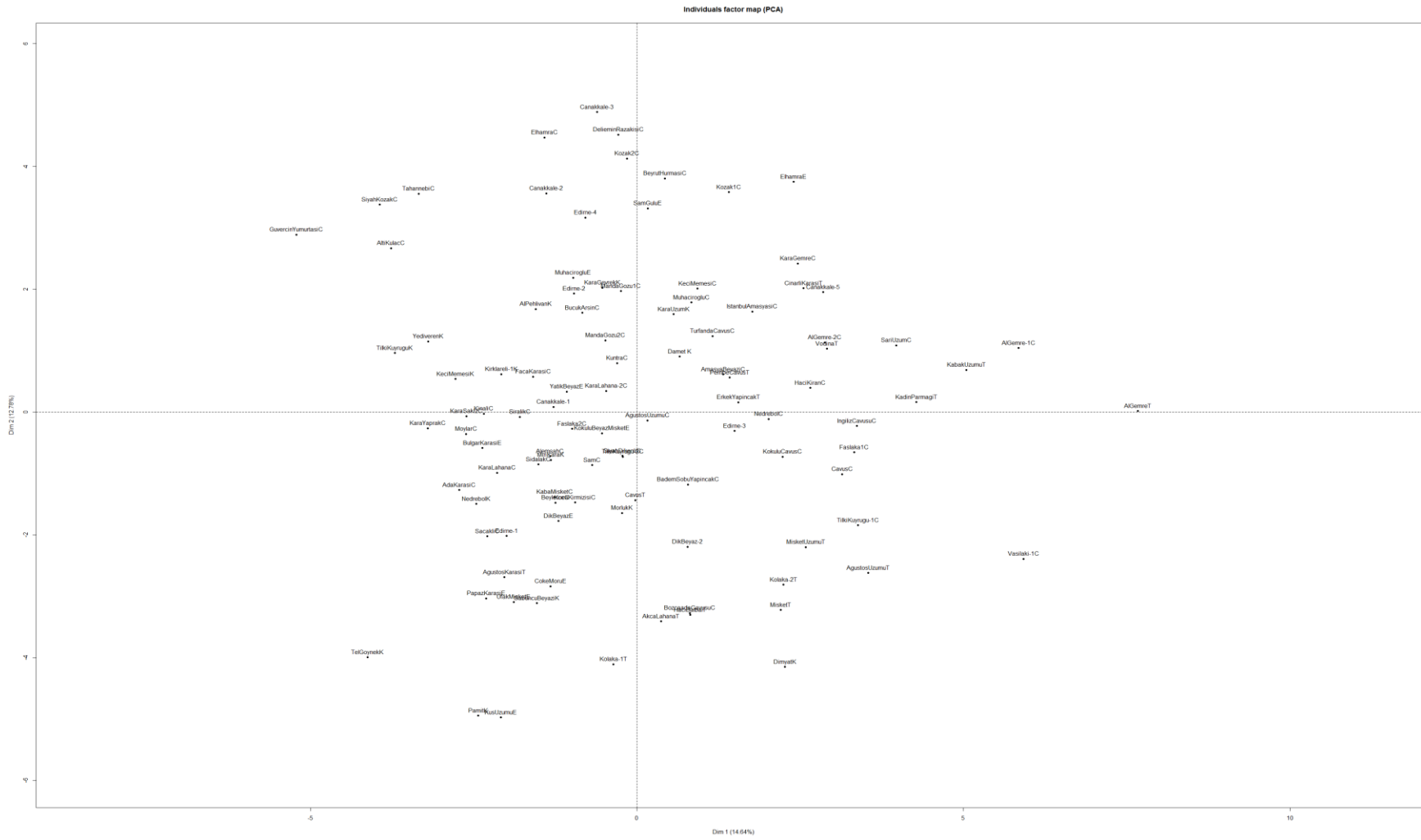
Şekil 12. 24 genotip ve Trakya Bölgesi çeşitlerinin 8 ampelografik karaktere göre kümeleme dendrogramı.

Çizelge 7. Trakya Bölgesi çeşitlerinde incelenen ampelografik özellikler için temel bileşen değerleri.

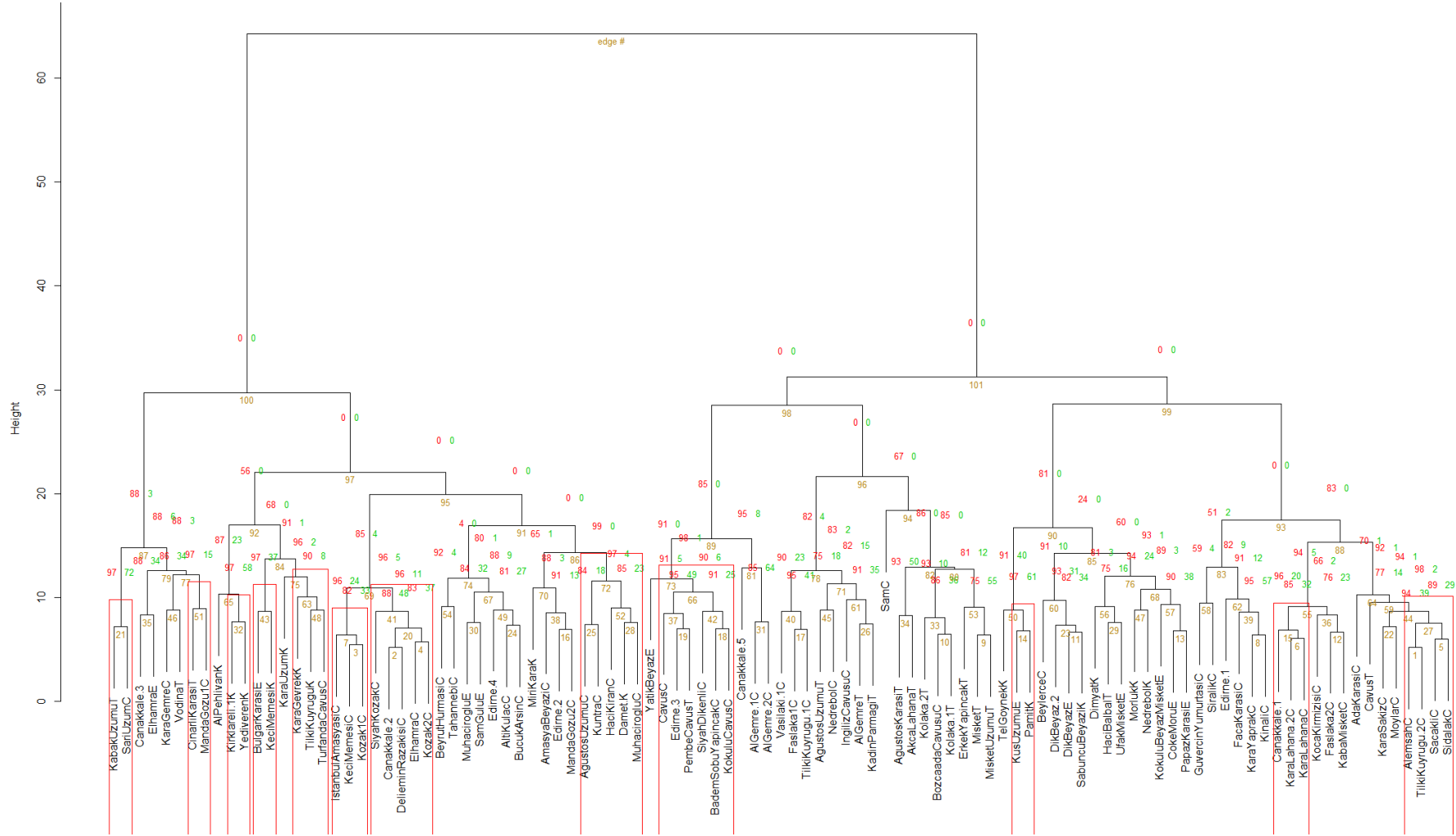
Karakter	Temel Bileşen Katkısı		Temel Bileşen Koordinatları	
	Bileşen 1	Bileşen 2	Bileşen 1	Bileşen 2
OIV004	6,406	8,974	6,0468	-6,687
OIV007	2,020	4,156	-3,395	4,551
OIV008	4,998	7,998	1,689	1,996
OIV016	1,232	6,326	-2,652	-5,615
OIV051.1	2,208	1,138	3,550	2,381
OIV051.2	3,930	5,371	4,736	-5,174
OIV053	5,813	9,956	1,821	-7,044
OIV066.1	1,189	6,588	8,241	-1,812
OIV066.2	1,052	8,268	7,749	6,419
OIV066.3	1,187	5,564	8,231	-5,266
OIV066.4	3,533	5,416	4,491	-1,642
OIV066.5	3,437	8,166	4,429	-6,379
OIV068.1	5,012	1,116	5,349	-2,359
OIV068.2	4,332	8,822	4,972	-2,096
OIV070.1	3,319	6,470	-1,376	-1,795
OIV076.1	8,806	2,074	-7,089	3,215
OIV077.1	7,772	2,418	6,660	-1,097
OIV077.2	4,486	3,466	5,060	4,156
OIV077.3	4,120	4,057	4,849	-1,422
OIV077.4	4,608	9,845	5,128	-2,215
OIV078.1	4,162	3,363	4,874	1,294
OIV078.2	7,298	1,140	2,041	2,383
OIV079.1	3,419	3,005	-1,397	3,870
OIV079.2	3,901	1,146	-4,719	-2,390
OIV081	1,246	3,894	2,666	1,393
OIV083.1	5,745	5,267	-5,726	1,620
OIV083.2	2,324	5,717	3,642	1,688
OIV084.1	3,252	1,199	4,308	-7,731
OIV085.1	6,798	6,408	-1,969	-5,651
OIV151	5,553	1,592	1,780	-8,908
OIV221.1	1,031	1,156	2,426	7,593
OIV221.2	1,297	1,016	2,720	7,118
OIV223	2,270	6,003	1,138	1,729
OIV225	6,867	2,753	-1,979	1,171
OIV230	9,982	1,006	2,387	7,083
OIV242.1	3,346	5,349	4,370	5,163
OIV242.2	4,797	5,618	5,232	5,291
OIV243	5,923	6,510	1,838	5,696
OIV503	1,773	9,418	3,181	6,851
Eigen Değerleri	5,707	4,984		
% Varyans	14,635	12,779		
%Kümülatif Varyans	14,635	27,414		



Şekil 13. Trakya Bölgesi çeşitlerinde 8 ampelografik (OIV) karaktere bağlı olarak iki temel bileşene göre değişkenler faktör haritası.



Şekil 14. Trakya Bölgesi çeşitlerinde incelenen ampelografik (OIV) karaktere bağlı olarak iki temel bileşene göre faktör haritası.



Şekil 15. Trakya Bölgesi çeşitlerinin incelenen 39 ampelografik karaktere göre kümeleme dendrogramı.

Moleküler Karakterizasyon

Çalışma sırasında genotiplerden DNA izolasyonu işlemleri iki defa yapılmıştır. İlk izolasyon ve ikinci izolasyona ait elde edilen DNA miktarları Çizelge 8 ve 9'da verilmiştir.

Çizelge 8. İlk izolasyon sonucu elde edilen DNA miktarları.

Örnek No	ng/µl	Örnek No	ng/µl
A1	40,47	A13	13,89
A3	10,19	A15	43,33
A4	69,72	A16	1,61
A5	13,17	A17	205,14
A6	44,54	A18	7,98
A7	124,24	A20	142,75
A8	13,13	A21	307,74
A9	11,09	A22	292,96
A10	372,9	A23	424,75
A11	24,7	A24	309,5
A12	246,9		

Çizelge 9. İkinci izolasyon sonucu elde edilen DNA miktarları.

Örnek	ng/ul	260/280 nm	Örnek	ng/ul	260/280 nm
A1	4,14	1,34	A18	114,75	1,77
A2	329,21	2,09	A19	56,72	2,12
A3	122,99	1,99	A20	122,04	1,7
A4	213,8	1,83	A21	45,56	1,47
A5	113,39	1,91	A22	54,95	1,78
A6	111,95	1,63	A23	128,4	2
A7	225,49	2,13	A24	184,35	1,48
A8	250,57	2,14	A25	2,1	5,3
A9	43,09	1,83	A26	46,95	1,45
A10	33,07	2,02	A27	51,68	2,14
A11	96,27	1,93	A28	69,03	1,98
A12	212,74	1,45	A29	71,7	1,99
A13	73,58	1,82	A30	167,65	1,68
A14	110,03	2,01	A31	49,34	2,02
A15	2,26	1,64	A32	23,94	2,2
A16	139,14	2,01	A33	465,14	2
A17	28,24	1,65	A34	26,75	1,91

Elde edilen DNA'lar PCR işlemleri için yeterli miktar ve kalitede olmuştur, Moleküler karakterizasyon işlemleri OIV tarafından "core set" olarak önerilen toplam altı SSR belirteci kullanılarak yapılmıştır. PCR işlemleri sonrasında görüntüsü alınan jellerde "GelAnalizer 2010a" kullanılarak bant büyüklükleri belirlenmiş, daha sonra bu

büyükliklerden faydalanılarak skor tabloları oluşturulmuştur. Bu tablolardan faydalanılarak Ward (en küçük varyans) metodu ile istatistik analizler gerçekleştirilmiştir. Kullanılan altı belirteç toplam 17 farklı allel üretmiştir.

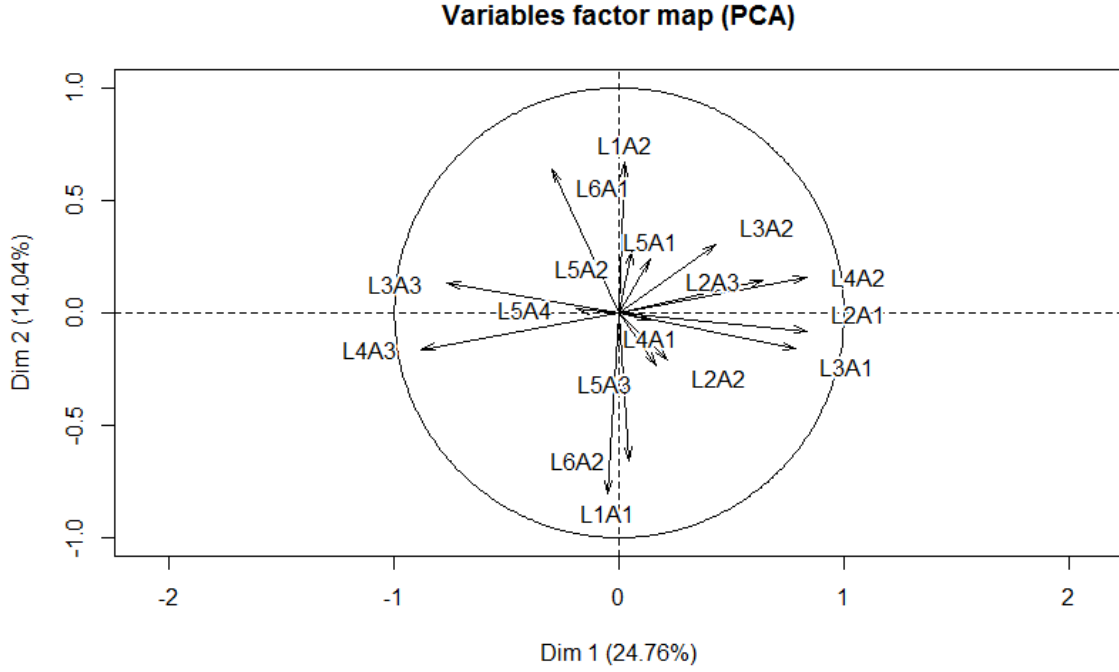
Çizelge 10. Altı belirteç için iki temel bileşen değerleri.

Belirteç	Allel	Temel Bileşen Katkısı		Temel Bileşen Koordinatları	
		Bileşen 1	Bileşen 2	Bileşen 1	Bileşen 2
VVMD5 (L1)	A1	0,061	27,317	-0,0508	-0,807
	A2	0,012	18,688	0,022	0,667
VVMD6 (L2)	A1	16,585	0,269	0,835	-0,0802
	A2	1,114	1,857	0,216	-0,210
	A3	9,760	0,843	0,640	0,141
VVMD7 (L3)	A1	14,650	1,052	0,785	-0,158
	A2	4,361	3,864	0,428	0,303
	A3	13,937	0,731	-0,765	0,132
VVMD8 (L4)	A1	0,467	0,039	0,140	-0,030
	A2	16,447	1,061	0,832	0,159
	A3	18,427	1,100	-0,880	-0,162
VrZAG64 (L5)	A1	0,450	2,395	0,137	0,239
	A2	0,079	3,239	0,057	0,278
	A3	0,627	2,308	0,162	-0,234
	A4	0,881	0,011	-0,192	0,016
VrZAG79 (L6)	A1	2,091	17,067	-0,296	0,638
	A2	0,043	18,149	0,042	-0,658
Eigen Değerleri		4,209	2,386		
% Varyans		24,758	14,037		
%Kümülatif Varyans		24,758	38,796		

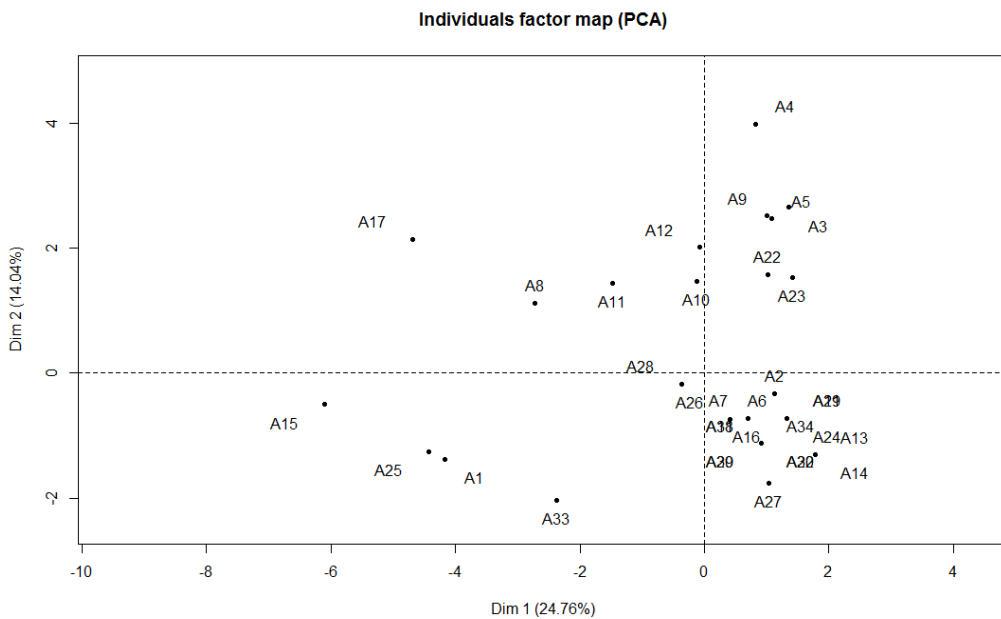
Altı belirteç için yapılan temel bileşenler analizinde iki önemli bileşenin ortaya çıktığı ve bu iki temel bileşenin genotipler arasındaki toplam varyasyonun %38,796'sını içerdiği görülmüştür (Çizelge 10). Altı belirtecin ürettiği 17 allel içerisinde birinci temel bileşen için en yüksek etkinliğin VVMD6 belirtecinin 1, ve 3, allelinde, VVMD7 belirtecinin 1, ve 3, allelinde ve VVMD8 belirtecinin 2 ve 3, allellerinde olduğu görülmüştür. İkinci temel bileşen için en yüksek etkinlikler ise VVMD5 ve VVMD7 belirteçlerinin tüm allellerinde olmuştur.

Allellere ait faktör haritası incelendiğinde karakterlerin haritanın dört bölümünde de bulunduğu görülmektedir (Şekil 16). Her iki bileşenin pozitif olduğu ilk bölümde VVMD5 belirtecinin ikinci alleli (L1A1), VVMD6 belirtecinin üçüncü alleli (L2A3), VVMD7 belirtecinin ikinci alleli (L3A2), VVMD8 belirtecinin ikinci alleli (L4A2) ve VrZAG64 belirtecinin bir ve ikinci allelleri (L5A1, L5A2) bulunmaktadır. Birinci bileşenin pozitif, ikinci bileşenin negatif olduğu ikinci bölümde VVMD6 belirtecinin bir ve ikinci allelleri (L2A1, L2A2), VVMD7 belirtecinin birinci alleli (L3A1), VVMD8 belirtecinin

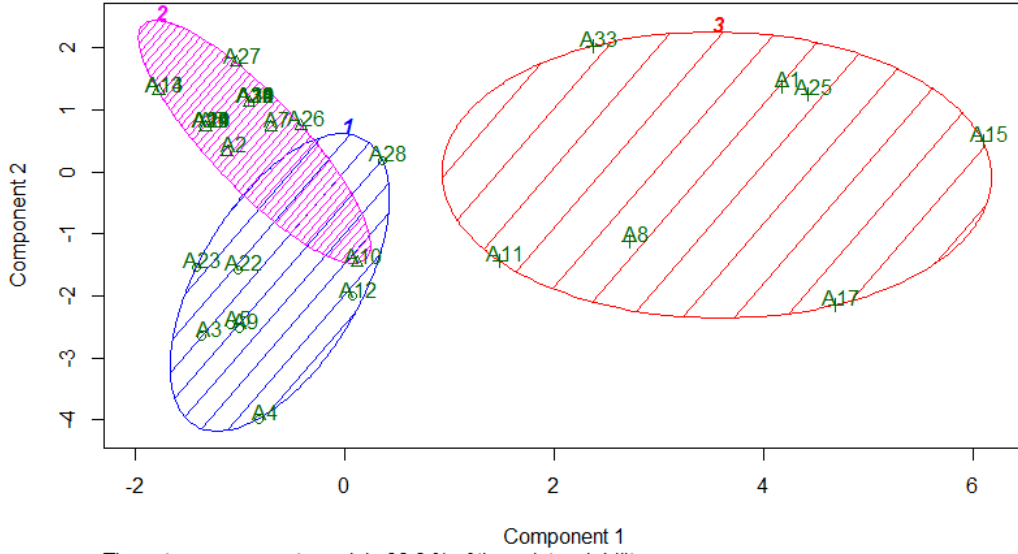
birinci alleli (L4A1), VrZAG64 belirtecinin üçüncü alleli (L5A3) ve VrZAG79 belirtecinin ikinci alleli (L6A2) yer almıştır. Birinci bileşenin negatif, ikinci bileşenin pozitif olduğu üçüncü bölümde VVMD7 belirtecinin üçüncü alleli (L3A3), VrZAG64 belirtecinin dördüncü alleli (L5A4) ve VrZAG79 belirtecinin birinci alleli (L6A1) olmak üzere üç allel yer almıştır. Her iki bileşenin de negatif olduğu dördüncü bölümde ise VVMD5 belirtecinin birinci alleli (L1A1) ve VVMD8 belirtecinin üçüncü alleli (L4A3) yer almıştır.



Şekil 16. 17 allelin iki temel bileşene göre faktör haritası.



Şekil 17. İncelenen 34 genotipin (6 belirteç) iki temel bileşene göre faktör haritası.



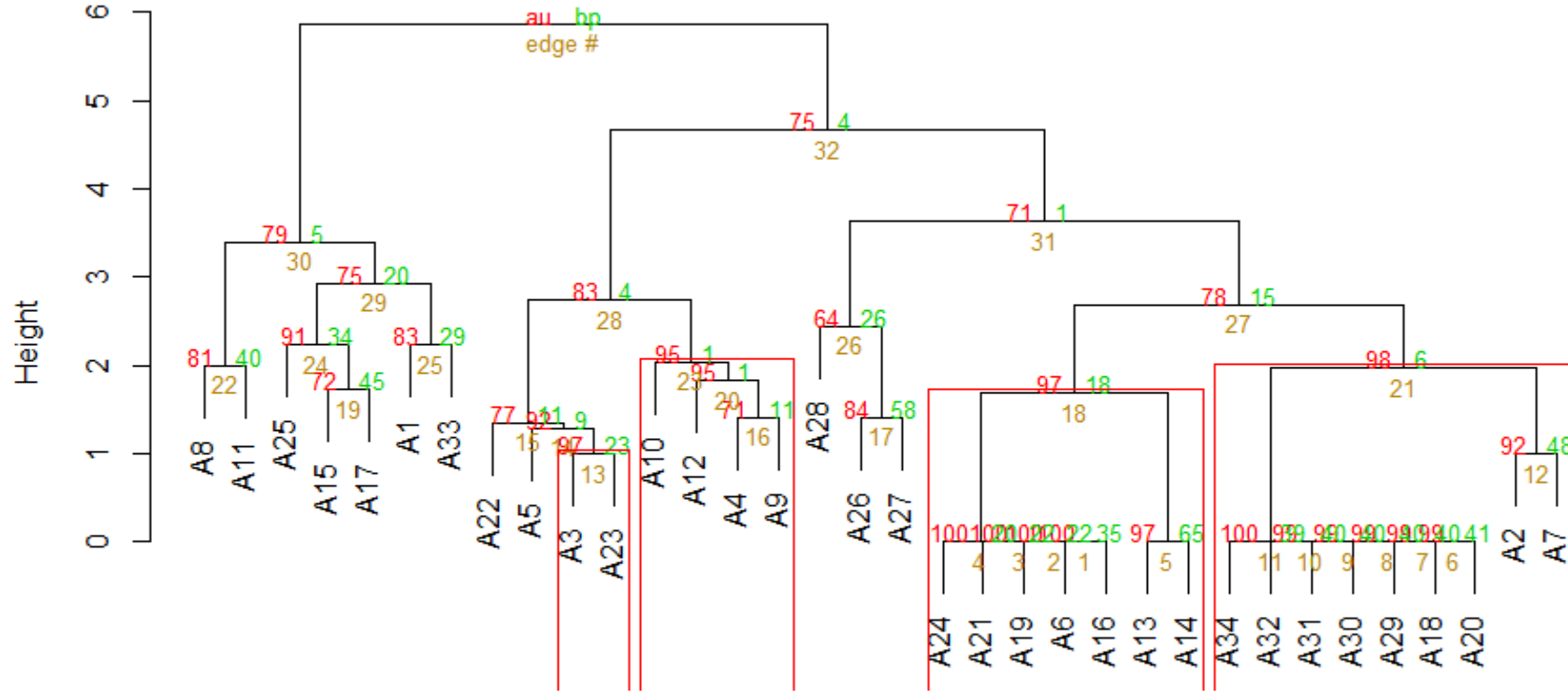
These two components explain 38.8 % of the point variability.

Şekil 18. İncelenen 34 genotipin (6 belirteç) iki temel bileşene göre kümeleme haritası.

Şekil 17 ve 18 incelendiğinde çalışmada incelenen 34 genotipin üç ana kümede toplandığı görülmektedir. Oluşan ilk kümede A3, A4, A5, A9, A12, A22, A23 ve A28 genotipleri yer almaktadır. İkinci kümede ise A2, A6, A7, A10, A13, A14, A16, A18, A19, A20, A21, A24, A26, A27, A29, A30, A31, A32 ve A34 olmak üzere 19 genotip yer almıştır. Diğer iki kümeden tamamen bağımsız olan, üçüncü ve son kümede ise A1, A8, A11, A15, A17, A25 ve A33 genotipleri yer almıştır, Faktör ve kümeleme haritalarında benzer şekilde, kümeleme analizinde de genotipler aynı gruplar içerisinde yer almıştır (Şekil 19).

Genotiplerin kendi içlerinde incelendiği ampelografik ve moleküler iki kümeleme analizi (Şekil 9 ve Şekil 19) karşılaştırıldığında; genotiplerin benzer dağılımlar gösterdiği gözlenmiştir. Ampelografik verilere göre yapılan kümeleme analizinde (Şekil 8) ilk küme içerisinde yer alan A8 ve A15, moleküler verilere göre yapılan ikinci kümeleme de ilk küme içerisinde yer almış, bu iki genotipe ek olarak, ampelografik analizde ikinci küme içerisinde yer alan A1, A11, A17 ve moleküler analizde dahil edilen A25 ve A33 genotipleri de bu küme içerisinde yer almıştır, A22, A5, A3, A23, A10, A12, A4, A9, A24, A21, A19, A6, A16, A13, A14, A18, A20, A2, A7 her iki analizde de ikinci küme içerisinde yer almıştır. Moleküler kümeleme analizinde ilk defa eklenen A28, A26, A27, A34, A32, A31, A30 ve A29 genotiplerinin de ikinci küme içerisinde yer aldığı görülmüştür. Her iki dendogram incelendiğinde A13 ve A14 genotiplerinin beraber dağıldığı görülmüştür. Buna ek olarak A8 ve A15; A12 ve A9; A6 ve A19 genotipleri de her iki dendogramda birbirine oldukça yakın dağılım göstermiştir.

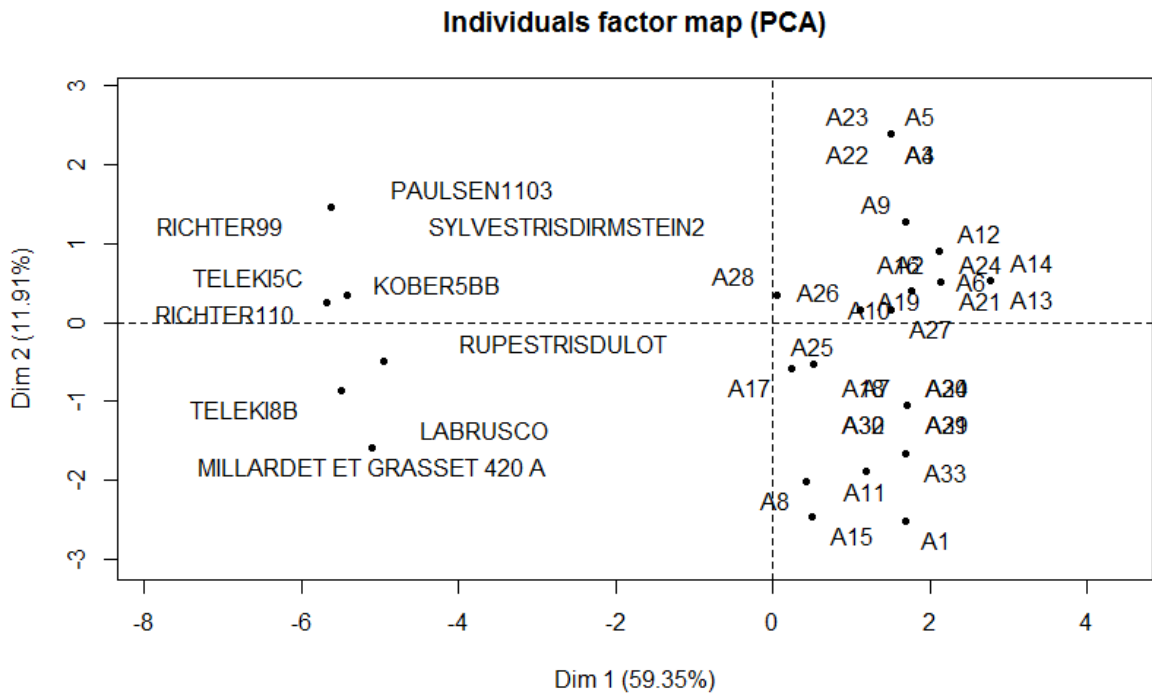
Cluster dendrogram with AU/BP values (%)



Distance: euclidean
Cluster method: ward.D2

Şekil 19. İncelenen 34 genotipin 6 belirtece göre kümeleme analizi dendrogramı.

Moleküler karakterizasyonu yapılan genotiplere VIVC (*Vitis International Variety Catalogue*)'den elde edilen veriler eklenerek, genotipler bölgemizde yaygın olarak kullanılan anaçlar Kober 5BB, *Rupestris du lot*, Teleki 8B, Richter 110, Teleki 5C, Paulsen 1103, Richter 99, *Sylvestris dirmstein 2*, *Labrusca* ve Millardet Et Grasset 420 A ile karşılaştırılarak temel bileşenler ve kümeleme analizleri yapılmıştır. Karşılaştırmada her iki grupta da kullanılmış olan VVMD5, VVMD7 ve VrZAG79 belirteçlerine ait verilerden faydalanılmıştır.



Şekil 20. 34 genotipin seçilen anaçlar ile karşılaştırıldığı (3 belirteç) temel bileşenler analizi faktör haritası.

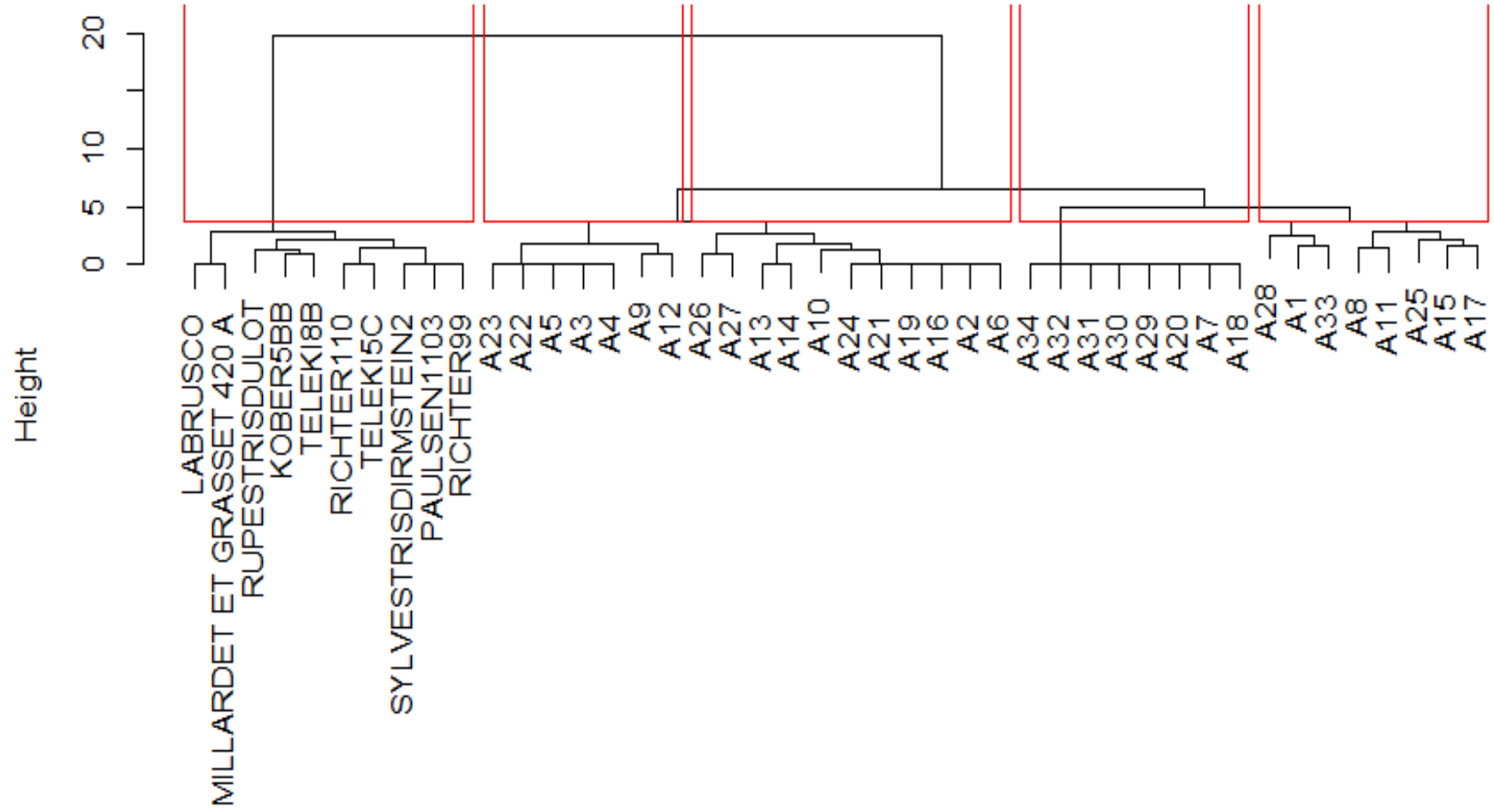
Yapılan analizler sonucunda incelenen genotiplerin hiçbirinin seçilen anaçlar ile bu üç karakter açısından aynı küme içerisinde yer almadığı görülmüştür (Şekil 20 ve Şekil 21).

VIVC'den alınan 3 belirtecin bazı yerel ve yabancı kültür çeşitlerine ait verileri kullanılarak çalışmada yer alan genotiplerin karşılaştırıldığı kümeleme analizi dendogramında (Şekil 22) genel olarak çalışmada yer alan genotiplerin diğer çeşitlerden ayrı dağılım gösterdiği görülmüştür.

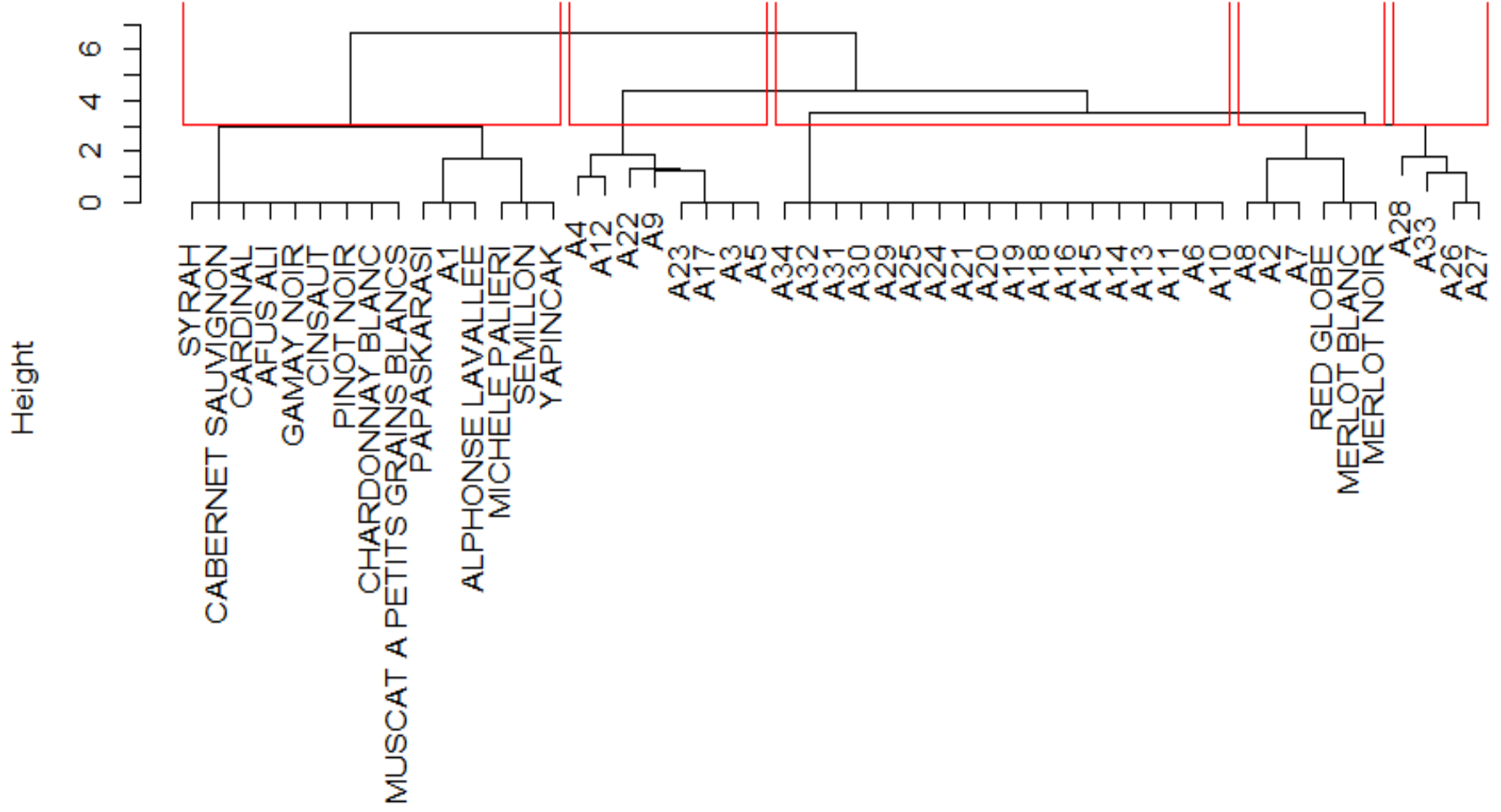
İncelenen bu çeşitler ile çalışmada yer alan genotipler arasındaki en yakın bağlantının (3 belirtece göre) A8, A2, A7 genotipleri ile Red Globe, Merlot Blanc, Merlot

Noir eşitleri arasında ve A1 genotipi ile Papaz Karası ve Alphonse Lavellee eşitleri arasında olduğu görülmüştür.

Ana ve kültür eşitleri ile yapılan bu karşılaştırmalar araştırmamız açısından oldukça iyi sonuçlar vermekle birlikte karşılaştırmada kullanılan 3 belirtecin genotipler, anaçlar ve kültür eşitleri arasındaki olası ilişkilerin anlaşılması için yetersiz olduğu ve bu ilişkilerin anlamlandırılması için daha fazla belirteç ile analizlerin yapılması faydalı olacaktır.



Şekil 21. 34 genotipin seçilen anaçlar ile karşılaştırıldığı (3 belirteç) kümeleme dendogramı.



Şekil 22. 34 genotipin seçilen bölgede yaygın olarak bulunan bazı yerli ve yabancı çeşitler ile karşılaştırıldığı (3 belirteç) kümeleme dendrogramı.

SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada, Trakya bölgesinde yer alan Ganos (Işıklar) Dağları doğal florasında bulunan asmalardan (*Vitis vinifera* L.) 34 genetik materyal toplanmıştır. Ampelografik ölçümlerle bu asmaların sürgün ucu, genç yaprak ve olgun yaprak özellikleri belirlenirken, DNA'ları izole edilerek 6 belirteç (VVMD5, VVMD6, VVMD7, VVMD8, VrZAG64, VrZAG79) ile moleküler karakterizasyonları yapılmıştır. Örnekler Karaevli altı, Kumbağ, Naip-Işıklar arası, Mermer-Yeniköy arası, Uçmaktedere köyü, Gaziköy, Hoşköy-Mürefte-Şarköy hattı olmak üzere 7 farklı alandan toplanmıştır. Çalışma sonucunda:

-Elde edilen genetik materyallerden 24 tanesi 18 ampelografik karakter açısından kendi içlerinde ve 8 ampelografik özellik açısından Trakya Bölgesi'nde bulunan yerel çeşitlerle karşılaştırılmıştır. Genotiplerin ampelografik olarak kendi içlerinde yapılan karşılaştırmada 5 ayrı küme oluşmuştur. 34 genotipin moleküler olarak (6 belirteç) iki temel bileşene göre yapılan kümeleme haritasında ise 3 ayrı küme oluşmuştur.

-Ampelografik karşılaştırmada birbirlerine çok yakın ilişkili olarak bulunan A8 ve A15 genotipleri, moleküler karakterizasyonlar sonucunda da aynı kolda ve birbirlerine yakın olarak bulunmuşlardır. Benze sonuçlar diğer genotiplerde de söz konusudur.

-Genotiplerin gerek ampelografik özellikler ve gerek moleküler özellikler açısından çoğunlukla birbirlerinden farklı olduğu saptanmıştır.

-8 ampelografik karaktere göre yapılan dendogram sonucunda, belirlenen 24 genotipin genellikle Trakya bölgesi lokal çeşitlerinden farklı oldukları görülmüştür. Bunlardan A18, A11 ve A3 bu çeşitlerle yakınlık gösterirken, Çanakkaleden Manda gözü1, Manda gözü 2 ve Kozak 2 ile Edirne 4 çeşitleri kalan 21 genotipe yakın bulunmuştur.

-Ayrıca Trakya bölgesi yerel çeşitlerinin 39 ampelografik karaktere göre kümeleme dendogramı yapılmış ve birbirine yakın ve uzak olanlar belirlenmiştir. Böylece 8 ve 18 karakterle yapılan kümelemelerde sapmalar olduğu görülmüştür.

-Çalışmada aynı bölgeden alınan genotiplerin ampelografik ve genetik olarak farklı özellikler gösterebildiği, aynı zamanda farklı bölgelerden toplanan bazı genotiplerin de birbirleriyle benzer özellikler taşıdığı saptanmıştır.

-VIVC'den alınan 3 belirtecin bazı yerel ve yabancı kültür çeşitlerine ait verileri ve çalışmada yer alan genotiplerin karşılaştırıldığı kümeleme analizi dendogramında incelenen genotiplerin diğer kültür çeşitlerinden ayrı dağılım gösterdiği görülmüştür. Çalışmada yer alan genotipler arasındaki en yakın bağlantının (3 belirtece göre) A8, A2, A7 genotipleri ile Red Globe, Merlot Blanc, Merlot Noir çeşitleri arasında ve A1 genotipi ile Papaz Karası ve Alphonse Lavellee çeşitleri arasında olduğu görülmüştür. Ayrıca elde edilen genotiplerin hiçbirinin bölgede yaygın olarak kullanılan anaçlar ile bu üç karakter açısından aynı küme içerisinde yer almadığı görülmüştür.

-Bu çalışma ile elde edilen genetik materyalin kültüre alınıp morfolojik özelliklerinin belirlenmesi ve fenolojik gelişimlerinin gözlenmesi gereklidir.

-Çalışma kapsamında yalnızca 6 lokus incelenebilmiştir, fakat bölgemizdeki genetik çeşitlilik göz önüne alındığında materyaller ve bölgesel çeşitler arasındaki genetik ilişkilerin belirlenebilmesi için daha fazla lokusta, detaylı çalışılması gerekmektedir.

-Bölgenin yerel çeşitleriyle (Tekirdağ, Edirne, Çanakkale, Kırklareli) ilgili kapsamlı bir karakterizasyon ve karşılaştırma çalışması tarafımızdan yapılamamıştır.

Buna ek olarak bölgenin bağcılık haritasının çıkarılması, ekonomik değeri olan yerel çeşitlerimizin tanınması ve geliştirilmesi için faydalı olacaktır.

Sonuç olarak geniş kapsamlı çalışmalarla bölgeden daha fazla genotip toplanması, ampelografik ve moleküler karakterizasyonlarının yapılması, genetik materyal olarak koleksiyon haline getirilmesi vb. işlemlerin biyolojik çeşitliliğimizin korunması ve gelecekteki ıslah çalışmaları için materyal sağlanması bakımından büyük önem taşıdığı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Ağaoğlu YS, Ergül A, 1999. Amasya Üzüm Çeşidi Ekotiplerinin RAPD Markörler ile Genetik Tanımlamaları. Türkiye III, Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi, 14-17 Eylül 1999. 369-372. Kızılcahamam, Ankara.
- 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. and *Vitis* sp.). *Molecular Breeding* 19(2): 103-111.
- Alba V, Anaclerio A, Gasparro M, Caputo AR, Montemurro C, Blanco A, Antonacci D, 2011. Ampelographic and Molecular Characterisation of Aglianico Accessions (*Vitis vinifera* L.) Collected in Southern Italy. *S. Afr. J Enol. Vitic.* 32(2): 164-173.
- Argade NC, Tamhankar SA, Karibasappa GS, Patil SG, Rao VS, 2009. DNA Profiling and Assessment of Genetic Relationships Among Important Seedless Grape (*Vitis vinifera*) Varieties in India Using ISSR Markers. *J. Plant Biochemistry & Biotechnology* 18(1): 45-51.
- Arroyo-Garcia R, Ruiz-Garcia L, Bolling L, Ocete R, Lopez MA, Arnolda C, Ergül A, Söylemezoğlu G, Uzun Hİ, Cabello F, Ibanez J, Aradhya MK, Atanassov A, Atanassov I, Balint S, Ceniz JL, Constantini L, Goirslavets S, Grando MS, Klein BY, McGovern PE, Merdinoğlu D, Pejic I, Pelsy F, Primikirios N, Risovannaya V, Roubelakis-Angelakis KA, Snoussi H, Sotiri P, Tamhankar S, This P, Troshin L, Malpica JM, Lefort F, Martinez-Zapater JM, 2006. Multiple Origins of Cultivated Grapevine (*Vitis vinifera* L. ssp. *sativa*) Based on Chloroplast DNA Polymorphisms. *Molecular Ecology*. 15: 3707-3714.
- Bahar E, Korkutal İ, Boz Y, 2010. Tekirdağ ili Şarköy ilçesi' nin Terroir Açısından Değerlendirmesi. Tekirdağ İli Değerleri Sempozyumu (18 Eylül-21 Ekim 2010). Şarköy Değerleri Sempozyumu, 14 Ekim 2010. Bildiriler Kitabı. 35-42.
- Bisson J, 2011. Observations Philologiques et Taxonomiques en Ampélographie, *Bulletin de l'OIV*. 84(962-963-964): 237-248.
- Boz Y, Bakır M, Çelikkol BP, Kazan K, Yılmaz F, Çakır B, Aslantaş Ş, Söylemezoğlu G, Yaşasın AS, Özer C, Çelik H, Ergül A, 2011. Genetic Characterization of Grape (*Vitis vinifera* L.) Germplasm from Southeast Anatolia by SSR Markers, *Vitis* 50(3): 99-106.
- Boz Y, Uysal T, Yaşasın AS, Gündüz A, Avcı GG, Sağlam M, Kıran T, Öztürk L, 2012. Türkiye Asma Genetik Kaynakları. Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü. Tekirdağ Bağcılık Araştırma İstasyonu. 411s.
- Casanova J, Mozas P, Ortiz JM, 2011. Ampelography and Microsatellite DNA Analysis of Autochthonous and Endangered Grapevine Cultivars in the Province of Huesca (Spain). *Spanish J Agric. Res.* 9(3): 790-800.
- Çelik H, Ağaoğlu YS, Fidan Y, Marasalı B, Söylemezoğlu G, 1998. Genel Bağcılık. Sunfidan A.Ş. Mesleki Kitaplar Serisi 1, 253s, Ankara.
- Çelik S, 2011. Bağcılık (Ampeloloji), Cilt 1, 3, Baskı, Tekirdağ, 423s.
- Çelik S, Bahar E, Korkutal İ, Kök D, 2005. Türkiye'de Doğal Olarak Yetişen Yabani Asmanın (*V. vinifera* ssp. *silvestris*) Tanımlanması ve Üretimde Kullanılabilme Olanakları Üzerine Araştırma. 6. Türkiye Bağcılık Sempozyumu, Bildiriler – Cilt: 1, Sayfa: 22-31, 19-23 Eylül 2005, Tekirdağ.
- Çelik H, 2013. Türkiye Bağcılığında Üretim Hedefleri. Vizyon 2023 Bağcılık Çalıştayı. Tekirdağ Bağcılık Araştırma İstasyonu. 26-27 Haziran 2013.
- Çoban A, 2004. Ganos Dağlarındaki Kayın Kalıntıları ve Yeni Bitki Türleri. *Türk Coğrafya Dergisi* 42: 47-58.

- Delemen İ, 2006. An Unplundered Chamber Tomb on Ganos Mountain in Southeastern Thrace. *American Journal of Archaeology*. 110(2): 251-273.
- De Lorenzis G, Imazio S, Rusjan D, Vouillamoz JF, Nikolaou N, Failla O, Scienza A, 2013. Genetic investigation of grapevine varieties 'Ribolla Gialla' (Italy), 'Rebula' (Slovenia) and 'Robola' (Ionian Islands). *Scientia Horticulturae* 150: 425-431.
- De Mattia F, Imazio S, Grassi F, Lovicu G, Tardaguila J, Failla o, Maitt C, Scienza A, Labra M, 2008. Genetic Characterization of Sardinia Grapevine Cultivars by SSR Markers Analysis. *J Int. Sci. Vigne Vin* 41(4): 175-184.
- De Souza Leao PC, Cruz CD, Motoike SY, 2011. Genetic Diversity of Table Grape Based on Morphoagronomic Traits. *Sci. Agric. (Piracicaba. Braz.)*. 68(1): 42-49.
- Doyle JJ, Doyle JL, 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11-15.
- Dönmez Y, 1990. Trakya'nın Bitki Coğrafyası. İ.Ü. Yayın No 3601. Coğrafya Enstitüsü Yayın No 51. İstanbul.
- Dönmez Y, Aydınözü D, Büyükoğlan F, İbret Ü, 2012. Floristik Bölgeler Açısından Trakya'nın Bitki Toplulukları. İstanbul Üniversitesi Edebiyat Fakültesi Coğrafya Bölümü, Coğrafya Dergisi, 25: 1-13.
- Ekinci H, 1990. Türkiye Genel Toprak Haritasının Toprak Taksonomisine Göre Düzenlenebilir Olanaklarının Tekirdağ Bölgesi Örneğinde Araştırılması. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü. Toprak Anabilim Dalı, Adana.
- Ergül A, Marasalı B, Ağaoğlu YS, 2002. Molecular discrimination and identification of some Turkish grape cultivars (*Vitis vinifera* L.) by RAPD markers. *Vitis* 41(3): 159-160.
- FAO. 2017. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> sayfasından alınmıştır. Erişim tarihi: 11.01.2017.
- Fischer BM, Slakhutdinov I, Akkurt M, Eibach R, Edwards KJ, Topher R, Zyprian EM, 2004. Quantitative Trait Locus Analysis of Fungal Disease Resistance Factors on a Molecular Map of Grapevine. *Theor. Appl. Genet.* 108: 501-515.
- Fossati T, Labra M, Castiglione S, Failla O, 2001. The use of AFLP and SSR molecular markers to decipher homonyms and synonyms in grapevine cultivars: the case of the varietal group known as "Schiave". *Theor. Appl. Genet.* 102: 200-205.
- Galet P, 1988. Cépages et Vignobles de France, Tome 1, Les Vignes Américaines (2nd ed.), Imprimerie Charles Déhan, Montpellier, France, 56p.
- Galet P, 1998. Grape Varieties and Rootstocks Varieties, Oenoplurimédia, Paris, France, 315 p.
- Garcia-Munoz S, Munoz-Organero G, Andres MT, Cabello F, 2011. Ampelography- an old Technique with Future Uses: the Case of Minor Varieties of *Vitis vinifera* L, from the Balearic Islands. *J Int. Sci. Vigne Vin*. 45(3): 125-137.
- GENRES 081-2001. European Union Project GENRES 081, 2001. Primary and Secondary Descriptor List for Grapevine Cultivars and Species (*Vitis* L.), Institut für Rebenzüchtung Geilweilerhof, Siebeldingen, Germany.
- Hızarcı Y, Ercişli S, Yüksel C, Ergül A, 2012. Genetic characterization and relatedness among autochthonous grapevine cultivars from Northeast Turkey by Simple Sequence Repeats (SSR). *Journal of Applied Botany and Food Quality* 85, 224 - 228.
- Husson F, Lê S, Pagès J, 2010. Exploratory Multivariate Analysis by Example Using R. Chapman & Hall, ISBN 978-1-4398-3580-7.

- Imazio S, Maghradze D, De Lorenzis G, Bacileri R, Laucou V, This P, Scienza A, Failla O, 2013. From the Cradle of Grapevine Domestication: Molecular Overview and Description of Georgian Grapevine (*Vitis vinifera* L.) Germplasm. *Tree Genetics & Genomes* 9: 641-658.
- Jimenez-Cantizano A, Lara M, Ocete ME, Ocete R, 2013. Short Communication, Characterization of the Reli Almuñécar Grapevine Cultivar. *Global Journal of Science Frontier Research Bio-Tech & Genetics* 13(1): 11-17.
- Karataş DD, Karataş H, Laucou V, Sarıkamış G, Riahi L, Bacileri R, This P, 2014b. Genetic Diversity of Wild and Cultivated Grapevine Accessions from Southeast Turkey. *Hereditas* 151: 73-80.
- Karauz A, 2013. Melezleme Islahı ile Elde Edilen Bazı Üzüm Çeşitlerinin Ebeveyn Analizleri ve Çekirdeksiz Fertlerin Marköre Dayalı Reaksiyonu. Namık Kemal Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü. Doktora Tezi, 90s.
- Kesici A, Haspolat G, Oğuz B, 2010. Ülkemiz Florasında Doğal Olarak Yayılış Gösteren Süs Bitkilerinin Survey-Toplanması, Muhafazası ve Değerlendirilmesi. *Anadolu J AARI* 20(2): 89-95.
- Kiss E, Kozma P, Halasz G, 2007. Hungarian Vitis Microsatellite Database. OIV 2007.
- Koçel Erdem Z, 2010. Tekirdağ Ganos 2009 Survey. *Anatolia Antiqua*. 18: 305-320.
- Koçman A, 1993. Türkiye İklimi. 72. Cilt. Ege Ün. Edebiyat Fak. Coğrafya Bölümü. İzmir, 83s.
- Lefort F, Lally M, Thompson D, Douglas GC, 1998. Morphological Traits Microsatellite Fingerprinting and Genetic Relatedness of a Stand of Elite Oaks (*Q. robur* L.) at Tuallynally. Ireland. *Silvae Genet.* 47: 5-6.
- Lodhi MA, Ye GN, Weeden NF, Reisch BI, 1994. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* species. *Plant Mol. Biol. Rep.* 12: 6-13.
- Moore DD, Dowhan D, 2002. Preparation and Analysis of DNA. *Current Protocols in Molecular Biology*. <http://dx.doi.org/10.1002/0471142727.mb0200s58>.
- OIV 2009. 2nd Edition of the OIV Descriptor List for Grape Varieties and *Vitis* species. 178p. Organisation Intergouvernementale cree par l'Accord International du 3 Avril 2001 <http://www.oiv.int/oiv/info/enplublicationoiv#grape>. Erişim Tarihi 24,02,2014.
- Oraman N, 1955. Yeni Bağcılık. Ankara Üniv. Ziraat Fak. Yayınları: 78, Ders Kitabı: 31, Ankara.
- Özşahin E, 2015a. Ganos Dağı ve Yakın Çevresinin Tektonik Jeomorfolojisi (Tekirdağ). *Uluslararası Sosyal Araştırmalar Dergisi* 8(37): 398-418.
- Özşahin E, 2015b. Hoşköy Deresi Havzası'nın (Tekirdağ) Jeomorfometrik Özellikleri. *International Journal of Social Science* 33: 99-120.
- Özşahin E, 2015c. Coğrafi Bilgi Sistemleri Yardımıyla Heyelan Duyarlılık Analizi: Ganos Dağı Örneği (Tekirdağ). *Harita Teknolojileri Elektronik Dergisi* 7(1): 47-63.
- Özyavuz M, 2011. Bitki Örtüsünün Ekolojik Şartlarının Coğrafi Bilgi Sistemleri ve Uzaktan Algılama Teknikleri ile Analizi, Ganos (Işıklar) Dağı, Tekirdağ. *Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi* 8(2): 37-48.
- Schuelke M, 2000. An Economic Method for the Fluorescent Labeling of PCR Fragments. *Nat Biotechnol.* 18: 233-234. doi: 10.1038/72708.
- Sneider A, 2008. GENRES 081 Descriptors for *Vitis* and the Priority Descriptor List. Report of a Working Group on *Vitis*: First Meeting. 35-39.

- Sefc KM, Pejic I, Maletic E, Thomas MR, Lefort F, 2009. Microsatellite markers for grapevine: tools for cultivar identification and pedigree reconstruction, Book chapter of Grapevine molecular Physiology and Biotechnology 565-596. Print ISBN: 978-90-481-2304-9.
- Şensoy RİG, Balta F, 2011. Determination of Some Local Grape Genotypes Belong to Van Region and Their Characterization by RAPD Markers, İğdir Univ, J, Inst, Sci, & Tech, 1(3): 41-56.
- Tangolar SG, Soydam S, Bakır M, Karaağaç E, Tangolar S, Ergül A, 2009. Genetic Analysis of Grapevine Cultivars from the Eastern Mediterranean Region of Turkey, Based on SSR Markers. Tarım Bilimleri Dergisi 15(1): 1-8.
- Tassie L, 2010. Vine identification – knowing what you have, Australian Government, Grape and Wine Research and Development Corporation. Fact Sheet. August 2010, 8p.
- Thomas MR, Cain P, Scott NS, 1994. DNA Typing of Grapevines: a Universal Methodology and Database for Describing Cultivars and Evaluating Genetic Relatedness. Plant Mol. Biol. 25: 939-949.
- Thomas MR, Scott NS, 1993. Microsatellite Repeats in Grapevine Reveal DNA Polymorphisms when Analysed as Sequence Tagged Sites (STSs). Theoret. Appl. Genet. 86: 985-990.
- TÜİK 2017. Türkiye İstatistik Kurumu, www.tuik.gov.tr
- Üstün B, 2007. Toprak Erozyonu Modellemesinde Uzaktan Algılama; Ganos Dağı Örneği. 11. Türkiye Harita Bilimsel ve Teknik Kurultayı Bildirileri Poster bildiri. Ankara.
- Üstün B, 2008. Soil Erosion Modelling by Using GIS & Remote Sensing: A Case Study, Ganos Mountain. The International Archives of the Photogrammetry, Remote Sensing and Spatial Information Sci. Vol. XXXVII, Part B7, Beijing.
- Velasco R, Zharkikh A, Troggio M, Cartwright D, Cestaro A, Pruss D, Pindo M, FitzGerald L, Vezzulli S, Reid J, Malacarne G, Iliev D, Coppola G, Wardell B, Micheletti D, Macalma T, Facci M, Mitchell J, Perazzolli M, Eldredge G, Gatto P, Oyzerski R, Moretto M, Gutin N, Stefanini M, Chen Y, Segala C, Davenport C, Demattè L, Mraz A, Battilana J, Stormo K, Costa F, Tao Q, Si-Ammour A, Harkins T, Lackey A, Perbost C, Taillon B, Stella A, Solovyev V, Fawcett J, Sterck L, Vandepoele K, Grando M, Toppo S, Moser C, Lanchbury J, Bogden R, Skolnick M, Sgaramella V, Bhatnagar S, Fontana P, Gutin A, Peer Y, Salamini F, Viola R. High quality draft consensus sequence of the genome of a heterozygous grapevine variety. PLoS ONE. 2007;2:e1326. doi: 10.1371/journal.pone.0001326.
- Winkler AJ, 1962. General Viticulture. Univ. Calif. Press. Berkeley.
- Yankı M, 2010. Marmara Bölgesi'nde Şarap Tarihi ve Turizmi. Tekirdağ İli Değerleri Sempozyumu (18 Eylül-21 Ekim 2010). Şarköy Değerleri Sempozyumu, 14 Ekim 2010, Bildiriler Kitabı, 35-42.
- Yaşa Z, 2005. Asma (*Vitis vinifera* L.)'da Önemli Vegetatif ve Generatif Karakterler ile Hastalıklara Dayanım Özelliklerine Yönelik Genom Haritalaması. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Fakültesi Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı. Doktora Tezi. Ankara, 123s.
- Yıldırım N, 2010. Kara (Siyah) Üzüm Gruplarının SSR (Simple Sequence Repeat) Markörlere Dayalı Karakterizasyonu ve Ülke Asma Kaynakları ile Genetik İlişkisi. Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü. YL Tezi, Ankara, 71s.