

**SSR MOLEKÜLER İŞARETLEYİCİLERİ
KULLANILARAK TÜRKİYE'DE YETİŞTİRİCİLİĞİ
YAPILAN SOĞAN ÇEŞİTLERİ ARASINDAKİ GENETİK
İLİŞKİNİN BELİRLENMESİ**

Ertan KANBUR



**T.C
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SSR MOLEKÜLER İŞARETLERYİCİLERİ KULLANILARAK TÜRKİYE'DE
YETİŞTİRİCİLİĞİ YAPILAN SOĞAN ÇEŞİTLERİ ARASINDAKİ GENETİK
İLİŞKİNİN BELİRLENMESİ**

Ertan KANBUR

Doç. Dr. Ahmet İPEK
(Danışman)

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**BURSA-2015
Her Hakkı Saklıdır**

TEZ ONAYI

Ertan Kanbur tarafından hazırlanan ‘‘SSR Moleküler İşretleyicileri Kullanılarak Türkiye’de Yetiştiriciliği Yapılan Soğan eřitleri Arasındaki Genetik İlişkinin Belirlenmesi’’ adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Doç. Dr. Ahmet İPEK

Bařkan: Doç. Dr. Ahmet İPEK İmza.
U. . Fen-Edebiyat Fakültesi
Bahçe Bitkileri Bölümü

 ye: Prof. Dr. Sezai TÜRKEL İmza.
U. . Fen-Edebiyat Fakültesi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

 ye: Doç. Dr. Dilek  NAL ÖZAKÇA İmza.
Bilecik Őeyh Edebalı  . Fen-Edebiyat Fakültesi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Ali Osman DEMİR
Enstitü Müdürü

.. /.. / 2015

Bilimsel Etik Bildirim Sayfası

U. Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı,

beyan ederim.

23 / 10 / 2015

Ertan KANBUR

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

SSR MOLEKÜLER İŞARETLEYİCİLERİ KULLANILARAK TÜRKİYE'DE YETİŞTİRİLCİĞİ YAPILAN SOĞAN ÇEŞİTLERİ ARASINDAKİ GENETİK İLİŞKİNİN BELİRLENMESİ

Ertan KANBUR

Uludağ Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Ahmet İPEK

Bu araştırmada Ülkemizde yaygın olarak soğan (*A. cepa L.*) üretiminde kullanılan soğan çeşitleri arasındaki genetik ilişkinin SSR moleküler işaretleyicileri ile belirlenmesi amaçlanmıştır. Araştırma kapsamında otuz altı adet soğan çeşidinin tohumları dokuz farklı firmadan temin edilmiştir. Soğan çeşitleri arasındaki genetik farklılık analizleri için 18 adet SSR moleküler işaretleyicileri kullanılmıştır. Dice benzerlik katsayısına göre elde edilen verilerden genetik benzerlik matrisi hesaplanmıştır. Analizleri yapılan soğan çeşitleri arasındaki genetik benzerlik %52 ile %95 arasında değişmiştir. Benzerlik matrisine göre oluşturulan UPGMA dendogramına göre %80 ve üzerinde benzerlik gösteren dokuz grup, %90 ve üzerinde benzerlik gösteren beş grup tespit edilmiştir. İki firmanın soğan çeşitleri arasındaki genetik benzerlik diğerlerine göre daha fazladır ve %80 ve üzerinde benzeyen dokuz gruptan dört tanesi bu iki firmaya ait soğan çeşitleridir. Farklı iki firma tarafından farklı isimler altında satılan iki soğan çeşidi arasındaki benzerlik %95 bulunmuştur. Bu durum benzer genotipe sahip bitkilerin her iki firma tarafından çoğaltılıp satıldığına işaret etmektedir. Soğan bitkisinin açık tozlaşan bir bitki olduğu düşünüldüğünde çeşitler arasında benzerliğin çok yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *A. cepa L.*, Soğan, SSR, Genetik ilişki, Moleküler markırlar.
2015, VII + 36 sayfa

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

ASSESSMENT OF GENETIC RELATIONSHIP AMONG ONION CULTIVARS GROWN IN TURKEY USING SSR MARKERS

Ertan KANBUR

Uludağ University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Assoc. Dr. Ahmet İPEK

This reaserch aims to assess the genetic relationship among the widely cultivated onion cultivars (*A. cepa L.*) in Turkey using SSR molecular markers. For this purpose seeds of thirty six onion cultivars were supplied from nine seed companies. Eighteen SSR molecular markers were used to analyse the genetic relationship. A genetic similarity matrix was calculated using the data with Dice similarities coefficient. Genetic similarities among the onion cultivars ranged from 52% to 95%. A UPGMA dendogram based on the similarity matrix revealed that there are nine groups at or above 80% genetic similarity level and 5 groups at or above 90% genetic similarity level. Onion cultivars supplied from two companies were most similar in comparison and the four groups out of the nine which has the genetic similarity level at or above 80% belongs to these two companies. Also one of the mentioned companies has a match of 95% genetic similarity level between an onion cultivar which is sold under a different name by another company. When it is considered that onions are open pollinated plants, these high genetic similarity levels can be considered fairly high.

Keywords: *A. cepa L.*, Onion, SSR, Genetic relationship, Molecular markers.

2015, VII + 36 pages

TEŞEKKÜR

Çalıőmalarıma destek olan danıőmanım Sayın Doç. Dr. Ahmet İPEK'e, yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen Belçika'da staj yapmama vesile olan ve akademik hayata umutla bakmamı sağlayan Sayın Prof. Dr. Sezai TÜRKEK'e ve hayatım boyunca bana sonsuz maddi ve manevi destek veren aileme teşekkür ederim.

Ertan KANBUR
23.10.2015

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	5
2.1. Moleküler İşaretleyiciler ve SSR Moleküler İşaretleyicileri.....	5
2.2. SSR Moleküler İşaretleyicilerinin Geliştirilmesi ve Kullanım Alanları	7
2.3. SSR Moleküler İşaretleyicileri ile Yapılmış Moleküler Çalışmalar	8
2.4. Soğanda Moleküler İşaretleyiciler ve SSR Moleküler İşaretleyicileri İle Yapılan Çalışmalar.....	11
2.4.1. Soğan Bitkisinde SSR Moleküler İşaretleyicileri ile Yapılmış Bazı Farklılık ve Çeşit Analizi Çalışmaları.....	11
2.4.2. SSR Moleküler İşaretleyicilerinin Geliştirilmesine Yönelik Yapılan Bazı Çalışmalar.....	12
2.4.3. Soğan Üzerinde Diğer Moleküler İşaretleyiciler ile Yapılmış Bazı Çalışmalar.....	12
3. MATERYAL VE YÖNTEM	13
3.1. Materyal.....	13
3.2. Yöntem	15
3.2.1. Tohumların Ekimi	15
3.2.2. Yaprakların Toplanması ve Kurutulması	15
3.2.3. Kurutulan Yaprakların Öğütülerek Toz Haline Getirilmesi.....	16
3.2.4. DNA Örneklerinin Elde Edilmesi	17
3.2.5. DNA Miktarının Ölçülmesi ve DNA Kalitesinin Testi.....	19
3.2.6. SSR Moleküler İşaretleyici Bölgelerinin PCR İle Çoğaltılması ve Analizleri ..	21
3.2.7. Veri Analizleri.....	25
4. BULGULAR.....	29
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	31
KAYNAKLAR DİZİNİ	32
ÖZGEÇMİŞ	36

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

Açıklama

%:	Yüzde
°C:	Santigrat derece
g:	Gravity (santrifuj birimi)
µg:	Mikrogram
µL:	Mikrolitre

Kısaltmalar

Açıklama

AFLP:	Amplified Fragment Length Polymorphism
bç:	Baz Çifti
cm:	Santimetre
DNA:	Deoksiribo Nükleik Asit
EDTA:	Ethylenediamine Tetra Acetic Acid
EMBL:	European Molecular Biology Laboratory
FAOSTAT:	Food and Agricultural Organization of the United Nations Statistics Division
FYD:	Farklılık, Yeksenaklık, Durulmuşluk Testleri
gr:	Gram
ISF:	International Seed Federation
M:	Molar
MAB:	Marker Assisted Backcrossing
MAS:	Marker Assisted Selection
mg:	Miligram
mL:	Mililitre
mM:	Milimolar
ng:	Nanogram
nm:	Nanometre
nM:	Nanomolar
PAPD:	Random Amplification of Polymorphic DNA
PCR:	Polymerase Chain Reaction
pH:	Hidrojen İyonu Konsantrasyonu
QTL:	Quantitative Trait Locus
RFLP:	Restriction Fragment Length Polymorphism
RNAse:	Ribonuclease
SSR:	Simple Sequence Repeat
STK:	Standart Tohumluk Kaydı
TE:	Tris, Edta Tamponu
Tris:	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
TTSM:	Tohumluk Tescil ve Sertifikasyon Müdürlüğü
TÜİK:	Türkiye İstatistik Kurumu
UPGMA:	Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Mean
UPOV:	Uluslararası Yeni Bitki Çeşitlerinin Korunması Birliği

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.2. SSR moleküler işaretleyicilerin geliştirilmesi ve uygulama alanları.....	7
Şekil 3.2.2. Yaprakların toplanması ve kurutulması.....	15
Şekil 3.2.3. Toz haline getirilmiş ve her biri 20 mg olan soğan yaprakları örnekleri.....	16
Şekil 3.2.4.2. Derecesi ayarlanabilir su tankı.....	17
Şekil 3.2.4.4. Santrifüjde elde edilen fazlar ve yeni tüpe aktarılan üstteki faz.....	18
Şekil 3.2.4.5. Yeni tüplere izopropanol eklenmesi ve gözle görünür hale gelen DNA yumağı.....	18
Şekil 3.2.5.1. DNA örneklerinin Qubit Fluorometer ile ölçülmesi.....	20
Şekil 3.2.5.2. DNA örneklerinin elektroforez tankında yürütülmesi ve ultraviyole ışık altından kamera ile fotoğrafının çekilmesi.....	20
Şekil 3.2.5.3. Ultraviyole ışık altında DNA örneklerinin gözlemlenmesi.....	20
Şekil 3.2.6.0. PCR sıcaklık koşulları ve döngü sayıları.....	21
Şekil 3.2.6.1. PCR için kullanılan Applied Biosystems thermal cycler.....	24
Şekil 3.2.6.2. SSR moleküler işaretleyicilerinin ayrıştırıldığı ve analiz edildiği LI-COR 4300 DNA analizatörü.....	24
Şekil 3.2.7.1. ACM147 ve ACM071 SSR moleküler işaretleyicilerinin SAGA GT programında görüntüsü.....	25
Şekil 3.2.7.2. ACM 147 ce ACM071 SSR moleküler işaretleyicilerinin SAGA GT programında yakından görünüşü.....	26
Şekil 3.2.7.3. ACM147 ve ACM071 SSR moleküler işaretleyicilerin manuel olarak polimorfik oluşlarının yorumlanması.....	26
Şekil 3.2.7.4. Otuz altı çeşit soğan arasındaki genetik yakınlığın dendogram ile gösterilmesi.....	28
Şekil 4.1.1.1. Dendogram ile yakınlığı gösterilen soğan çeşitlerinin ait olduğu firmalar ile gösterilmesi.....	30

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1. Moleküler işaretleyicilerin farklı nitelikleri.....	6
Çizelge 2.3. Bitkilerde SSR moleküler işaretleyicileri kullanılarak yapılan bazı uygulamalar.....	9-10
Çizelge 3.1. Soğanlar ve gün uzunlukları gereksinimi.....	13-14
Çizelge 3.2. Kullanılan oligonükleotid primerlerin özellikleri.....	22
Çizelge 3.3. Otuz altı çeşit soğanın basit benzerlik eşleşmesi matrisi.....	27

1.GİRİŞ

Morfolojik karakterler ve moleküler veriler göz önünde bulundurularak yapılan en son sınıflandırmada *Allium* cinsi 780 kadar tür ihtiva etmektedir ve yeni keşfedilen türlerle birlikte bu rakam 800'ü aşmıştır (Fritsch ve ark. 2010). Bu türler arasında ekonomik değeri olan süs bitkisi ve gıda amaçlı kullanılan birçok tür vardır. Bunlardan soğan (*A. Cepa L.*), sarımsak (*A. sativum*), pırasa (*A. ampeloprasum*), frenk soğanı (*A. schoenoprasum*) yenilebilir olanların en önemlileridir (Nguyen ve ark. 2008).

Allium türlerinin farklılık oluşturan aromaları, uçucu sülfür bileşenlerinin bitki dokusunun zarar görmesi ile alinaz enziminin S-alkenil sistein sülfoksitleri öncülerini hidrolize etmesinden kaynaklanır. *Allium* türleri kuzey ılıman bölgelerde yoğunur ve çok büyük bir miktarı içinde bulunduğumuz Avrasya ve Güney Afrika bölgesindedir. Soğan dahil tüm ekonomik öneme sahip yetiştiriciliği yapılan bitkilerle birlikte bu cinsin mensubu türlerin yaklaşık yüzde doksanı x=8 kromozoma sahiptir (Havey 1995).

Soğan *Allium* cinsi içinde en çok kültürü yapılan türdür ve 5000 yıldır kültürü yapıldığı bilinmektedir. Soğanın yabani hayatta varlığı bilinmemektedir ancak en yakın yabani akrabaları Türkmenistan, Özbekistan, Tacikistan ve Afganistan'ı içeren bölgede bulunan *A. galanthum* ve *A. vavilovii*'dir (Goldman ve ark. 2000).

Türkiye'de 2013 yılı TUİK (Türkiye İstatistik Kurumu) verilerine göre soğan üretimi 616 324 dekar alanda toplam 1 904 846 tondur. Kişi başı ortalama kuru soğan tüketim miktarı yıllık 18,4 kilogramdır. Ülkemizde sırasıyla en çok üretim yapılan şehirler Amasya, Ankara, Hatay, Eskişehir, Adana, Tokat, Bursa ve Çorum'dur.

FAOSTAT (Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü İstatistikleri) 2013 verilerine göre Türkiye soğan üretiminde dünyada altıncı sıradadır. Başlıca en büyük soğan üreten ülkeler sırasıyla Çin, Hindistan, Amerika Birleşik Devletleri, İran, Rusya, Türkiye ve Mısır'dır. TUİK 2013-2014 Denge Tabloları verilerine göre toplam sebze ürünlerindeki yurt içi üretimin yurt içi talebi karşılama derecesi %107,1'dir. Yetiştirilen toplam sebzelerin büyük kısmı yurt içinde tüketilirken sadece %7'lik bir kısmı ihraç edilmiştir. Kök ve yumru sebzeler grubunda yeterlilik derecelerinde birinci sırada %141,5 ile taze soğan ikinci sırada ise %113,3 ile kuru soğan yer almıştır.

Tarımsal üretimin başlangıcı tohumdur. Tohumun kendisi teknoloji ile geliştirilen yüksek değere sahip önemli bir gelir getiren üründür ve ülkeler için stratejik değere de sahiptir. 2012 yılı ISF (Uluslararası Tohum Federasyonu) verilerine göre dünya tohum pazarı hacmi yaklaşık 40 milyar dolardır. Amerika Birleşik Devletleri 12 milyar dolar ile dünya tohum pazarında en büyük yeri tutmaktadır. Türkiye dünya tohum pazarı büyüklük sıralamasında 11. Ülke konumunda olmasına rağmen sadece 750 milyon dolarlık bir büyüklüğe sahiptir.

Ülkemiz 2012 yılında yaklaşık 55 milyon dolar değerinde 21 761 ton tohum ihracatı yapmasına karşılık, yaklaşık 188 milyon dolar değerinde 26 938 ton tohum ithal etmiştir. İthalat ve ihracatta sebze ürünleri tohumu yaklaşık 1500 ton kadar az bir miktarda ticareti yapılırken en az olarak çiçek bitkileri tohumlarının ticareti yapılmıştır. Türkiye’de üretilen soğan miktarı ortalama 600 000 dekar alanda üretilmektedir. Ortalama olarak bir dekar alana 0,5 kg soğan tohumu ekildiği düşünüldüğünde, asgari 300 ton tohum ekimi yapıldığı düşünülebilir. Piyasa fiyatı kilogram başına soğan tohumlarının 50 ila 600 TL arası olduğu düşünüldüğünde önemli bir ekonomik değere sahip olduğu ve ekonomide yer teşkil ettiği görülmektedir.

Dünya nüfusunun hızla artması gıda ihtiyacını da arttırmaktadır. Dünya nüfusunun hızla daha da artacağı düşünüldüğünde ihtiyaç duyulan gıdanın güvenilir olmakla birlikte yeterli miktarda olması ve sağlıklı ve dengeli beslenmeyi sağlamalıdır. Teknolojinin gelişmesiyle birlikte, daha üstün özellikli ve verimli bitkilerin seçilebilmesi ve geliştirilmesi mümkün olmuştur. Elde edilen yeni çeşit bitkilerin diğer bitkilerden daha üstün olduğu resmi makamlarca belgelemesi gereklidir. Böylece geliştirilen çeşidin ıslah edici tarafından hakları korunurken, bitki hakkında bilgiler bağımsız ve güvenilir olacak ve dolaylı olarak üretimde kalite ve verim artışına katkı sağlayacaktır.

Türkiye’de ıslah edilen yeni bitki çeşitlerinin tescili ve sertifikasyonu Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı bünyesinde bulunan TTSM (Tohumluk Tescil Ve Sertifikasyon Müdürlüğü) tarafından yapılmaktadır. Bakanlık tarafından 26 755 sayılı ve 13.01.2008 Resmi gazetede yayınlanan ‘‘Bitki Çeşitlerinin Kayıt Altına Alınması Yönetmeliği’’ 4. Bölümünde yer alan sebze türlerine ait çeşitlerin kayıt altına alınması esasları ve kayıt altına alınabilecek sebze türleri listesi EK-2’de gösterilmiştir.

Bitkilerin kayıt sürecinde STK (Standart Tohumluk Kaydı) denemelerine alınır. Buradaki amaç çeşitlerin farklı, yeksenak ve durulmuş olduğunu saptamaktır. Sebze türlerinde FYD (Farklılık, Yeksenaklık, Durulmuşluk Testleri) en az bir lokasyonda iki yetiştirme sezon kurulur. FYD testinde çeşidin iki yetiştirme sezonunda elde edilen sonuçlara göre farklı, yeksenak ve durulmuş olduğu tespit edilen çeşit adaylarına STK raporu hazırlanır ve STK komitesince uygun görülmesi durumunda kayıt altına alınır.

FYD testlerinin kurulmasına esas olmak üzere çeşide ait teknik soru anketinin çeşidi geliştiren ıslahçı tarafından doldurulması gerekir. Teknik soru anketi TTSM tarafından hazırlanmış çeşide ait bazı özellikleri içeren teknik bir soru formudur. FYD testi ise teknik soru anketinde çeşide dair belirtilen özelliklerin doğrulanmasına ve morfolojik ve fizyolojik karakterlerin tespit edilerek var olan çeşitlerden farklı, yeksenak ve durulmuş olup olmadığına dair gözlemdir.

TTSM internet sitesinde tescil bölümünün altında yer alan ‘teknik soru anketleri’ bölümünde türlerin kendisine göre düzenlenmiş teknik soru anketine ulaşılmaktadır. Soğana ait teknik soru anketinde yer alan ve çeşitte kendini gösteren morfolojik ve fizyolojik özellikleri tanımlayan sorulardan bazıları; Her yalancı gövdede var olan yaprak sayısı, yeşil renginin tonu, soğanın büyüklüğü, yumrunun genel şekli, kuru kabuk ana rengi, kuru madde miktarı, hasat olgunluk zamanı ve erkek kısırılık özelliği gibidir. Sorulara yanıt olarak ankette yer alan az, orta, fazla; açık, orta, koyu; kısa, uzun, çok uzun; yuvarlak, oval, yumurta gibi derecesini belirten cevap kutucukları işaretlenmektedir.

Soğan iki yıllık bir bitki türü olduğu için soğanda yeni çeşitlerin geliştirilmesi oldukça uzun zaman almaktadır. Bu nedenle ülkemizdeki tohum firmaları soğanda ıslah programları oluşturmayı ve yeni soğan çeşitlerinin ıslahını tercih etmemektedirler. Fakat TTSM’de yerli tohum firmalarına ait birçok soğan çeşidi kayıtlı bulunmaktadır. Ülkemizde soğanda ıslah çalışmaları yapan tohum firmaları ve yurt dışında tohum ıslağı yapan firmaların Türkiye temsilcilikleri kendilerinin geliştirdiği soğan çeşitlerine ait tohumların, diğer tohum firmaları tarafından çoğaltılıp, çeşit olarak kayıt ve tescilini yaptırdıklarından sonra sattıklarını öne sürmektedirler. Bu durum soğanda ıslah çalışmaları yürüten firmaların cesaretini kırmakta ve ülkemizin ihtiyacı olan daha iyi özelliklere sahip yeni soğan çeşitlerinin ülkemizde geliştirilmesini engellemektedir.

Başka firmalara ait tohumların alınıp çoğaltılması bitki ıslahçı haklarını aynı zamanda gasp etmektedir. Bu durum soğan üretimi ile uğraşan çiftçilerin aynı çeşidi farklı firmalardan farklı isimler altında alarak farklı soğan çeşidini yetiştirdiklerini sanarak aynı ürünü elde etmesine yol açabilmektedir.

Başka firmaların tohumlarını alıp kendi tohumu gibi çoğaltan ve tescilini yaptıran firmalar yaptıkları bu olayın tespit edilemeyeceğini düşünmektedirler. Çünkü tohum tescili esnasında herhangi bir moleküler analiz istenmemektedir. Tohum tescili UPOV'un (Uluslar Arası Yeni Bitki Çeşitlerinin Korunması Birliği) morfolojik tanımlamalara göre yapılmaktadır. Dolayısı ile hangi çeşidin hangi firma tarafından çoğaltılıp kendi adlarına tescil ettirdikleri bilinmemektedir.

Morfolojik karakterlerin veya markırların gözlemlenmesi kolaydır fakat çevreden etkilenebilirler ve sayıları sınırlıdır. Çevrenin yanı sıra karakterlerin ekspresyonu epistatik ve pleotropik etkileşimlerden dolayı değişebilir. Bitki gelişim evresinde geç ortaya çıkabilirler bu yüzden gözlemlenebilmeleri için bitkinin tamamen gelişiminin tamamlanmasının beklenmesi gerekebilir ayrıca dominant ve resesif ilişkiye dayandıklarından homozigot bireyleri heterozigot bireylerden ayırmak mümkün değildir (Kumar 1999).

Türkiye soğan piyasasında satılan soğan çeşitleri arasındaki genetik benzerlikle ilgili herhangi bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır. Günümüzde firmalar kendilerine ait çeşitlerin tohumlarını izinsiz üretilip sattıkları için birbirlerini suçlamaktadırlar. Ancak bu durumun ne kadar yaygın olduğu bu güne kadar tespit edilmemiştir. Soğan üretiminde yaygın olarak kullanılan çeşitler arasındaki genetik ilişkinin belirlenmesi bu durumun ne kadar yaygın olup olmadığını ortaya koyacaktır.

Bu yüksek lisans tezinde Ülkemizde soğan üretiminde yoğun olarak kullanılan ve soğan tohumu üretiminde söz sahibi olan firmaların çeşitleri arasındaki genetik akrabalığın SSR moleküler işaretleyicileri kullanılarak belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Moleküler İşaretleyiciler ve SSR Moleküler İşaretleyicileri

Moleküler işaretleyiciler ya da spesifik olarak DNA (Deoksiribonükleik Asit) işaretleyicileri, genom seviyesinde farklılığı temsil eden belirli bir DNA parçasıdır. Morfolojik karakterlerin aksine her zaman stabildirler ve her dokuda her büyüme, gelişme, savunma durumu, pleotropik ve epistatik etki ve de çevreden etkilenmeden belirlenebilirler. İşaretleyici teknikleri PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) gerektiren ve gerektirmeyen olmak üzere iki temel grupta sınıflandırılabilirler.

Mikrosatellitler ya da SSR (Basit Dizi Tekrarları), AFLP (Çoğaltılan Parçaların uzunluk poliformizmi), RAPD (Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA) PCR-tabanlı işaretleyici tekniklerine; RFLP (Kesilen parçaların uzunluk poliformizmi) ise PCR gerektirmeyen işaretleyici sistemlerine örnek verilebilir ve evrimsel, ekolojik, taksonomik, filogenik ve bitki genetiği çalışmalarında kullanılan işaretleyici sistemleridir (Agarwal ve ark 2008).

Genomlar tekrar üniteleriyle doludur. İlk tekrarlı DNA motifleri 1960'lerde bulunmuş ve tekrarlanmış DNA dizileri, satallite DNA adını almıştır (Kit 1961; Sueoka 1961). Daha kısa tekrarlı diziler keşfedilmiş ve bunlar mini ve mikro satallite olarak adlandırılmıştır. Mikrosatellitler ilk olarak 1981 yılında insan B globülin bölgesinin sekans analizlerinde belirlenmiştir (Miesfeld ve ark 1981; Spritz 1981) fakat mikrosatellite terimi ilk kez Lit and Luty (1989) tarafından kullanılmıştır. Mikrosatellitler diğer adı ile SSR'lar 1 ila 6 baz çiftinden oluşan uzunluğu genelde 100 nükleotidden az tekrarlı nükleotid motifleridir (Tauttz 1989). SSR'lar genomların kodlanan ve kodlanmayan bölgelerinde yer alırlar. Tüm prokaryot ve ökaryotlarda bulunurlar (Zane ve ark. 2002).

SSR'lar genomda dağılmış ve yaygın olarak bulunurlar, diğer moleküler işaretleyicilere göre daha polimorfiktirler, eş baskındırlar, Mendel kalıtımı yolunu izlerler, tekrarlanabilirlikleri yüksektir, kromozom ve tür spesifik olmaları sebebi ile bitki genetiği ve ıslah çalışmalarında oldukça kullanışlıdırlar (Varshney ve ark. 2005; Miah ve ark. 2013). Önemli genlerin haritalanması, bitki ıslahı, markır destekli seleksiyon, temel genetik haritalama çalışmalarında ve genetik farklılık analizi gibi birçok genetik uygulamada kullanılırlar (Benemann ve ark. 2012).

Çizelge 2.1. Moleküler işaretleyicilerin farklı nitelikleri

Özellikler	Moleküler İşaretleyiciler			
	RAPD	RFLP	AFLP	SSR
PCR Temellilik	Evet	Hayır	Evet	Evet
Gerekli DNA miktarı (µg)	0.02	10	0.5-1.0	0.05
DNA Kalitesi	Yüksek	Yüksek	Düşük	Düşük
Allellerin Tespiti	Hayır	Evet	Hayır	Evet
MAS Faydası	Düşük/Orta	Orta	Düşük/Orta	Yüksek
İş Yüğü ve Masrafları	Düşük/Orta	Yüksek	Düşük/Orta	Yüksek
Sekans Bilgisi Gereksinimi	Gerekli Değil	Gerekli	Gerekli Değil	Esansiyel
Polimorfizm Miktarı	Düşük/Orta	Düşük	Düşük/Orta	Yüksek
Otomasyon	Orta	Düşük	Orta	Yüksek
Geliştirme Masrafı	Düşük	Düşük	Orta	Yüksek
Analiz Başı Masraf	Düşük	Yüksek	Orta	Düşük
Radyoaktif Tespit	Yok	Genelde	Yok	Yok
Doğruluk	Düşük	Yüksek	Orta	Yüksek
Dominantlık	Dominant	Eş baskın	Dominant ve Eş baskın	Eş baskın

Miah ve ark. 2013 ve Kalia ve ark. 2011'den adapte edilmiştir

SSR'lar farklı özelliklerine göre değişik şekilde sınıflandırılmaktadırlar. Sınıflandırılırken; her tekrar ünitesindeki baz çifti sayısına göre (mono, di, tri, tetra, ...), tekrar motiflerinin içindeki nükleotidlerin düzenlenmesine göre (perfect, imperfect, pure, interrupted, ...) ya da genomda buldukları yerlere göre, nükleer (nuSSR), mitokondriyal (mtSSR) veya kloroplastik (ctSSR) SSR'lar olarak isimlendirilirler. (Kalia ve ark. 2011). Ayrıca cDNA'ların sekanslanması ile bulunan SSR'lar EST-SSR olarak adlandırılırlar.

SSR evrimi, mutasyon oranı ile ilişkili olup SSR'ların sayıca tekrarlarının azalıp artması değişiklikleridir. SSR'ların nasıl oluştuğunu ortaya koyabilecek bazı durumlar; tek zincirli DNA kayması, DNA rekombinasyonu, yanlış eşleşme/çift zincir kırılması tamirleri ve retrotranspozisyonudur (Wang 2009).

Yukarıda bahsedilen moleküler işaretleyicilerin büyük çoğunluğu genomik DNA kütüphanelerinden (RFLP'ler ve SSR'lar için) veya genomik DNA'larını kullanarak rasgele PCR amplifikasyonu yapılarak (RAPD'ler) ya da her ikisi kullanılarak (AFLP'ler) geliştirilmiştir. Bir dizi moleküler işaretleyicileri tekniklerinin oluşturulması ve bunların modifikasyonların ile pek çok bitkiler üzerinde karşılaştırma çalışmaları mümkün hale gelmiştir (Kalia ve ark 2011).

2.2. SSR Moleküler İşaretleyicilerinin Geliştirilmesi ve Kullanım Alanları



Şekil 2.2. SSR moleküler işaretleyicilerin geliştirilmesi ve uygulama alanları (Miah ve ark. 2013 ve Kalia ve ark. 2011' den adapte edilmiştir)

SSR'lerde direkt olarak DNA kütüphanelerinden, SSR'larla zenginleştirilmiş kütüphaneler tarafından, EMBL ve NCBI gibi umuma açık veri sistemlerinde araştırılmasından veya türler arası transfer edilebilirlik ile bulunabilir. Şu anda EST veri tabanları aday genler için önemli bir kaynaktır çünkü direkt ilgilenilen özellikle ilgili moleküler işaretleyicileri ortaya koyabilir ve bunlar yakın türler arasında da transfer edilebilirler (Kalia ve ark. 2011).

Bitkilerde SSR moleküler işaretleyicilerinin kullanım alanları şöyledir:

1. Bitki ıslah çalışmalarında çaprazlamalarda kullanılacak daha uyum ebeveyn bitkileri seçmek için moleküler düzeyde genetik farklılıklarının değerlendirilmesi için kullanılabilir,
2. Agronomik ve hastalık direnç özellikleri için QTL (Kantitatif Özellik Lokusu) veya genlerin işaretlenmesi ve haritalanmasında kullanılabilir,
3. Genom haritalanmasında kullanılabilir,
4. Cinsiyet analizinde kullanılabilir,
5. Popülasyon yapısını taksonomik ve filogenetik araştırmalarında kullanılabilir,
6. Farklılık ve çeşit analizinde kullanılabilir,
7. Islah çalışmalarında ümit verici hatlarda MAS (Markır Destekli Seleksiyon) ve MAB'ta (Markır Destekli Geriye Melezleme) kullanılabilir.

2.3. SSR Moleküler İşaretleyicileri İle Yapılmış Moleküler Çalışmalar

SSR'lar genetik çalışmalarda tercih edilen popüler bir işaretleyicidir ve birçok farklı uygulamada kullanılmaktadır. Yaygın olarak genomu kapsamı ve birçok farklı genetik çalışmasında kullanılabilirliğinden bitki genetiği çalışmalarında da yer bulmuştur.

Çizelge 2.3. Bitkilerde SSR moleküler işaretleyicileri kullanılarak yapılan bazı uygulamalar

Bitki Türü	Uygulama	Referans
<i>Olea europea</i>	Zeytinlerde inter ve intra çeşit varyasyonlarının SSR moleküler işaretleyicileri ile analiz edilmiştir.	İpek ve ark. (2012)
<i>Olea europea</i>	SSR moleküler işaretleyicileri ile zeytinlerde çeşit analizi ve DNA parmak izlerinin belirlenmesi.	İpek ve ark. (2011)
<i>Olea europea</i>	SSR analizleri Türkiye'nin Güney Marmara bölgesinde üretilen zeytinlerin aynı genotipte olduğunu göstermiştir.	İpek ve ark. (2009)
<i>Zea mays</i>	Hibrit elde edilirken iki yöntem denenmiştir ve ebeveynsel unsurların belirlenmesinde moleküler işaretleyicilerin daha çok performans sağladığı görülmüştür.	Chuanchai ve ark. (2010)
<i>Glycine max</i>	nuSSR moleküler işaretleyicileri kullanılarak Çin ve Japon soya fasulyeleri arasındaki genetik farklılıklar karşılaştırılmıştır.	Guan ve ark. (2010)
<i>Prunus avium</i>	Türkiye'deki 29 yeni ve 49 yerli kiraz türleri arasındaki ilişkinin AFLP ve SSR moleküler işaretleyicileri ile belirlenmesi.	İpek ve ark. (2009)
<i>Hippophae L.</i>	Kuru büzülme hastalığı ile ilişkili ISSR moleküler işaretleyicilerinin belirlenmiştir.	Ruan ve ark. (2009)
<i>Oryza sativa</i>	Hibrit tohumlarda genetik saflığın belirlenmesi ve DNA parmak izinin belirlenmesi.	Hashemi ve ark. (2009)
<i>Carthamus tinctorius</i>	Hibrit tohumların saflık testi.	Naresh ve ark. (2009)

Çizelge 2.3. Devamı

Bitki Türü	Uygulama	Referans
<i>Hordeum vulgare</i>	Arpa sarı mozaik virüsüne karşı direnç sağlayan RYM4/RYM5 adlı gen bölgesi ile bağlantılı bir SSR moleküler işaretleyicileri geliştirilmiştir.	Tyrka ve ark. (2008)
<i>Humulus lupulus</i>	Erkeklik cinsiyeti ile yakın ilişkili 3 mikrosatallit tekrarı bulunmuştur.	Jakse ve ark. (2008)
<i>Oryza sativa</i>	Markır destekli geriye çaprazlama ile su derinliğine toleransı olan pirinç geliştirilmesi.	Neeraja ve ark. (2007)
<i>Triticum aestivum</i>	Buğday pas hastalığı direnç geni olan Lr22a direnç geninin SSR moleküler işaretleyicileri ile haritalanması.	Hiebert ve ark. (2007)
<i>Spinacia oleracea</i>	Ispanak çeşitlerinin ayırt edilmesinde genik SSR moleküler işaretleyicileri kullanılmıştır.	Khattak ve ark. (2007)
<i>Capsicum annuum</i>	Biberde genetik saflık testi ve hibritlerin teşhisi.	Juhasz ve ark. (2006)
<i>Cannabis sp.</i>	Cinsiyetle ilgili SSR moleküler işaretleyicileri bulunmuştur.	Rode ve ark. (2005)
<i>Pelargonium</i>	Sardunyada mikrosatallitlerle çeşit tanımlaması.	Becher ve ark. (2000)

2.4. Soğanda Moleküler İşaretleyiciler ve SSR Moleküler İşaretleyicileri İle Yapılan Çalışmalar

Soğan bitkisinde AFLP, RAPD, RFLP ve SSR gibi moleküler işaretleyiciler ve izozimlerin yer aldığı birçok çalışma gerçekleştirilmiştir. Bazen çalışmalar tek bir değil birkaç moleküler işaretleyici ile yürütülmüştür. Bu çalışmaların bir kısmının uygulama alanlarının konusunu genetik farklılık ve çeşit analizi, kromozom ve linkage haritalarının oluşturulması, taksonomik ve filogenetik çalışmalar oluşturmuştur.

Bu yüksek lisans tezinin konusunun ilişkili olduğu uygulama alanı SSR moleküler işaretleyicileri kullanılarak farklılık ve çeşit analizi yapmaktır. Ülkemizde soğanda SSR moleküler işaretleyicileri kullanılarak herhangi bir genetik farklılık ve çeşit analizine literatürde rastlanmamıştır. Fakat ülkemiz dışında yapılan çalışmalarda, SSR moleküler işaretleyicileri ile soğan dahil birçok bitkide genetik farklılık ve çeşit analizi yapılmıştır ve bu doğrultuda SSR moleküler işaretleyicilerinin geliştirildiği ayrıca çalışmalar yapılmıştır.

2.4.1. Soğan bitkisinde SSR moleküler işaretleyicileri ile yapılmış bazı farklılık ve çeşit analizi çalışmaları

Mallor ve ark. (2014), SSR moleküler işaretleyicilerini kullanarak İspanya yerel soğan türleri arasındaki genetik farklılığı ortaya koymak için bir genetik çalışma yapmışlardır. Bu analizleri gerçekleştirmek üzere 85 İspanyol yerel türü soğan ve 6 benzer *Allium* türü üzerinde 18 set SSR moleküler işaretleyicisi, 16 EST-SSR moleküler işaretleyicisi ve 2 genomik SSR moleküler işaretleyicisi kullanmışlardır.

Khar ve ark. (2011), SSR moleküler işaretleyicileri kullanarak ticari olarak kullanılan kısa gün Hindistan soğanı ile bazı yerel ve yabancı türler arasındaki genetik farklılığı belirlemek için çalışma yapmışlardır. Toplamda 46 *Allium* çeşidi kullanmışlardır ve bunlardan 34'ü kültürü yapılan soğan çeşitleridir ve 12'si yabancı türlerdir. Bu çalışmada 30'u genomik ve 30'u EST-SSR olmak üzere 60 SSR primeri kullanılmıştır.

Mahajan ve ark. (2009), 14 kısa gün ve 2 uzun gün soğanlarını 24 SSR moleküler işaretleyici bölgesine göre değerlendirilmiştir ve kullanılan 21 SSR primer çiftini polimorfik bulmuşlardır.

2.4.2. SSR moleküler işaretleyicilerinin geliştirilmesine yönelik yapılan bazı çalışmalar

Bu yüksek lisans tezi çalışmasında kullanılan 18 SSR moleküler işaretleyicisi Jakse ve ark. (2005) tarafından geliştirilmiştir. Jakse ve ark. (2005) çalışmalarında 35 elit soğan popülasyonunda 398 SNP, Indel ve SSR tespit etmişlerdir ve bütün popülasyonların ayırt edilebileceğini gözlemlemişlerdir ve bu çalışmada SSR moleküler işaretleyicileri bazı şirketler veya ıslah programlarındaki genetik kaynakların genelde birbirine benzer olduğunu ortaya koymuşlardır.

Baldwin ve ark. (2012), soğanda genetik farklılıkların belirlenebilmesi için genomik sekanslama yapmışlardır ve bulunan SSR motiflerine yönelik 166 primer seti dizayn etmişlerdir ve bunlardan 80'inin polimorfik olduğunu belirlemişlerdir.

Araki ve ark. (2010), *Allium* türleri içinde *cepa* ve *phyllodolon* bölümleri içinde yer alan yabani olan ve kültürü yapılan soğanlarda markır destekli seleksiyonda ve taksonomik çalışmalarda kullanılabilirlik üzere SSR moleküler işaretleyicileri geliştirmişlerdir.

2.4.2. Soğan üzerinde diğer moleküler işaretleyiciler ile yapılmış bazı çalışmalar

Park ve ark. (2008), soğanda erkek kısırlık geni bölgesi için bir linkage haritası çalışması yapmışlardır ve kısır olan ve olmayan soğanlar arasında 5 tane polimorfik olan RAPD moleküler işaretleyicisi belirlemişlerdir.

McCallum ve ark. (2001), cDNA'ların sekanslanmasının RFLP moleküler işaretleyicilerini ortaya çıkardığını anlatmışlardır. Haritalama kullanılmak üzere daha elverişli moleküler işaretleyiciler sağlamak ve AFLP, SSR ve diğer PCR-tabanlı moleküler işaretleyicilere tamamlayıcı olmak için PCR tabanlı CAP (Kesilmiş Çoğaltılmış Polimormizmi) SSCP (Tek Zincirli Konformasyon Polimorfizmi) geliştirmişlerdir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu araştırma (SSR Moleküler İşaretleyicileri Kullanılarak Türkiye’de Yetiştiriciliği Yapılan Soğan Çeşitleri Arasındaki Genetik İlişkinin Belirlenmesi) 2013-2014 yılları arasında Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümüne ait Biyoteknoloji ve Moleküler Biyoloji Laboratuvarında yürütülmüştür.

3.1. Materyal

Bitki materyali olarak ülkemizde soğan üretiminde yaygın olarak tercih edilen toplamda 36 soğan çeşidi kullanılmıştır. Soğan çeşitlerinin tohumları çeşit sahibi dokuz önde gelen firmalardan temin edilmiştir.

Çizelge 3.1. Soğanlar ve gün uzunlukları gereksinimi

NUMARA	FİRMA NUMARALARI	GÜN UZUNLUĞU
AC01	FİRMA 1	KISA GÜN
AC02	FİRMA 1	UZUN GÜN
AC03	FİRMA 2	KISA GÜN
AC04	FİRMA 2	UZUN GÜN
AC05	FİRMA 2	UZUN GÜN
AC06	FİRMA 3	KISA GÜN
AC11	FİRMA 4	KISA GÜN
AC12	FİRMA 4	KISA GÜN
AC13	FİRMA 9	UZUN GÜN
AC14	FİRMA 9	UZUN GÜN
AC15	FİRMA 5	UZUN GÜN
AC16	FİRMA 6	UZUN GÜN
AC17	FİRMA 6	UZUN GÜN
AC18	FİRMA 6	UZUN GÜN

Çizelge 3.1 Devamı

NUMARA	FİRMA NUMARALARI	GÜN UZUNLUĞU
AC20	FİRMA 6	UZUN GÜN
AC21	FİRMA 6	UZUN GÜN
AC22	FİRMA 6	UZUN GÜN
AC23	FİRMA 6	UZUN GÜN
AC24	FİRMA 6	UZUN GÜN
AC25	FİRMA 6	KISA GÜN
AC26	FİRMA 6	UZUN GÜN
AC27	FİRMA 6	KISA GÜN
AC28	FİRMA 6	UZUN GÜN
AC29	FİRMA 7	UZUN GÜN
AC30	FİRMA 8	KISA GÜN
AC31	FİRMA 8	UZUN GÜN
AC32	FİRMA 8	KISA GÜN
AC34	FİRMA 8	UZUN GÜN
AC35	FİRMA 8	UZUN GÜN
AC36	FİRMA 8	KISAGÜN
AC37	FİRMA 8	KISA GÜN
AC38	FİRMA 8	UZUN GÜN
AC39	FİRMA 8	UZUN GÜN
AC40	FİRMA 8	UZUN GÜN
AC41	FİRMA 8	UZUN GÜN
AC42	FİRMA 8	UZUN GÜN

3.2. Yöntem

3.2.1. Tohumların ekimi

Her bir çeşit soğan çeşidini temsilen her bir tohum çeşidi paketinden rastgele olarak alınan soğan tohumları bahçe toprağı içeren 15 cm çaplı saksılara dikilmiştir ve her bir soğan bitkisi dört ile altı genç yaprak sayısına ulaşana kadar büyütülmüştür.

3.2.2. Yaprakların toplanması ve kurutulması

Her bir saksıda oluşan genç soğanlardan kendi çeşitlerini temsilen birer tane en genç olduğunu düşündüğümüz, küçük ve taze yaprak alınmıştır ve kendi çeşidini temsil eden ve toplamda onar bireyden oluşan otuz altı ayrı popülasyon elde edilmiştir. En genç yaprakların seçilmesinin temel sebebi olgun yapraklardaki sekonder metabolitlerin yaşlı yapraklara göre daha fazla olmasıdır ve DNA izolasyonu işlemi bu sayede daha verimli olmaktadır.

Yaprakların elde edilmesinden sonra her biri 10'ar bireyden alınan yapraktan oluşan otuz altı popülasyon ayrı ayrı işaretlenmiş torbalara konularak dört gün boyunca liyofilizatörde kurutulmaya bırakılmıştır. Kurutma işlemi bittikten sonra bir sonraki aşama olan yaprakların öğütülerek toz haline getirilmesinde kullanılmak üzere -80°C'de saklanmıştır.

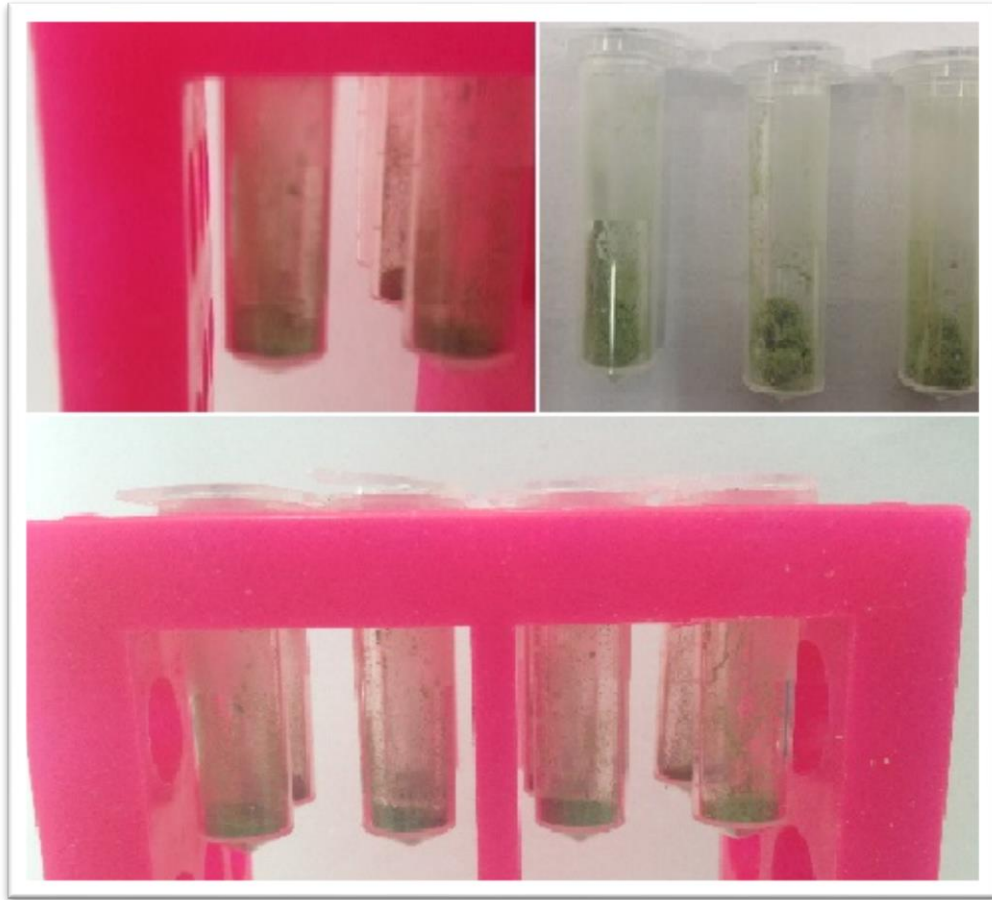


Şekil 3.2.2. Yaprakların toplanması ve kurutulması

Kurutulma işleminin liyofilizatörde olması bitki materyalinin yapısının korunmasında hayli önemlidir. Bitki materyali liyofilizasyon esnasında hiçbir sıcaklığa maruz kalmayacağı için hücrelerin genel yapısı ve moleküler yapısı zarar görmez. Liyofilizatörün çalışma prensibi, materyallerin dondurularak düşük basınç altında buzun buharlaştırılması şeklindedir.

3.2.3. Kurutulmuş yaprakların öğütülerek toz haline getirilmesi

Kurutulmuş ve buzdolabında muhafaza edilen yaprak örnekleri çıkartılarak oda sıcaklığına erişmeleri beklendikten sonra 2 ml'lik tüplere aktarılmıştır. Tüplerin içine yaprak örneklerinin parçalanması amacıyla üç tane 6 mm çapında cam bilye ile 3mm çapında olan beş cam bilye konularak öğütücü yardımı ile örnekler öğütülerek toz haline getirilmiştir.



Şekil 3.2.3. Toz haline getirilmiş ve her biri 20 mg olan soğan yaprakları örnekleri

3.2.4. DNA örneklerinin elde edilmesi

Aşağıda anlatılan DNA izolasyonu işleminde kullanılan solüsyonların bileşenleri:

1. **1M Tris (1L, pH:8.0):** 700 mL H₂O, 121.1 gr Trizmabase ve 40 mL HCL.
2. **0.5M EDTA (500 mL, pH:8.0):** 250 mL H₂O ve 84.05 g EDTA.
3. **%10'luk CTAB solüsyonu:** 25 gr CTAB tozu ve 250 mL H₂O.
4. **EB Tamponu:** 50 mL 1M'lık Tris, 700 mL H₂O, 40.92 g NaCl, 20 mL 0.5M'lık EDTA ve 10 gr CTAB.
5. **TE Tamponu:** 350 mL H₂O, 5M'lık 5 mL Tris ve 0.5mM'lık 0.1 mL EDTA.
6. **CO tamponu (Kloroform):** 480 mL kloroform ve 20 mL izoamil alkol.

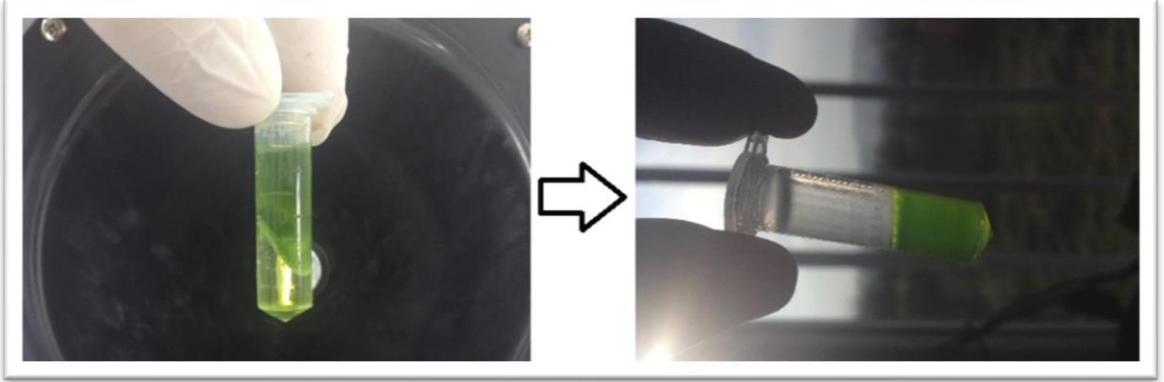
DNA izolasyonu için Futterer et al. (1995) tarafın anlatılan modifiye CTAB metodu kullanılmıştır.

1. Genomik DNA örneklerinin ekstrakte edilmesi için toz haline getirilen yaprak örneklerinden 20 mg olacak şekilde tartılmıştır ve her biri isimlendirilmiş 2 mL'lik tüplere konulmuştur. (bkz. Şekil 3.2.3)
2. DNA İzolasyonun ilk işlemi olarak hazırladığımız 50 mL'lik EB tamponun üzerine 500 µL %1'lik betamerkaptoetanol eklenmiştir ve hazırlanan bu karışımdan içinde 20 mg soğan tozu olan tüplerimize 1000 µL eklenmiştir. Her bir tüpteki soğan tozları eriyene kadar vorteks ile karıştırılmıştır ve ardından 64-65°C'de su banyosunda yarım saat bekletilmiştir.



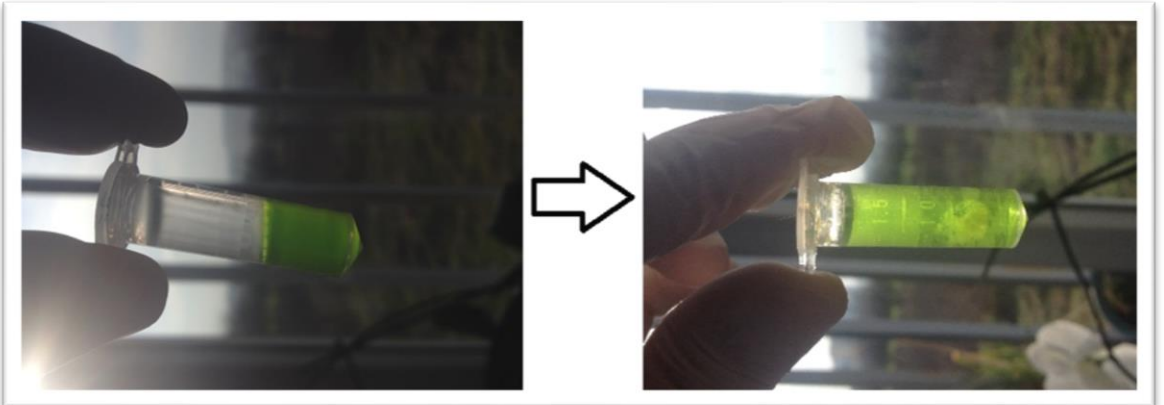
Şekil 3.2.4.2 Derecesi ayarlanabilir su tankı

3. Yarım saat sonra çıkarılan tüplerin içerisine 800 μ L CO tamponu eklenmiştir ve karıştırılmıştır.
4. Bir sonraki işlem olarak tüpler 25°C'de 20 000 g kuvvetinde 5 dakika santrifüj edilmiştir. Bu işlem sonucunda tüpler içinde iki farklı faz oluşmuştur ve bu üstteki faz 2 ml'lik yeni tüplere dikkatlice aktarılmıştır.



Şekil 3.2.4.4. Santrifüjde elde edilen fazlar ve yeni tüpe aktarılan üstteki faz

5. Yeni tüplere aktarılmış üst fazların üzerine 1000 μ L izopropanol eklenmiştir nazikçe karıştırılmıştır ve -20°C'de 30 dakika bekletilmiştir.

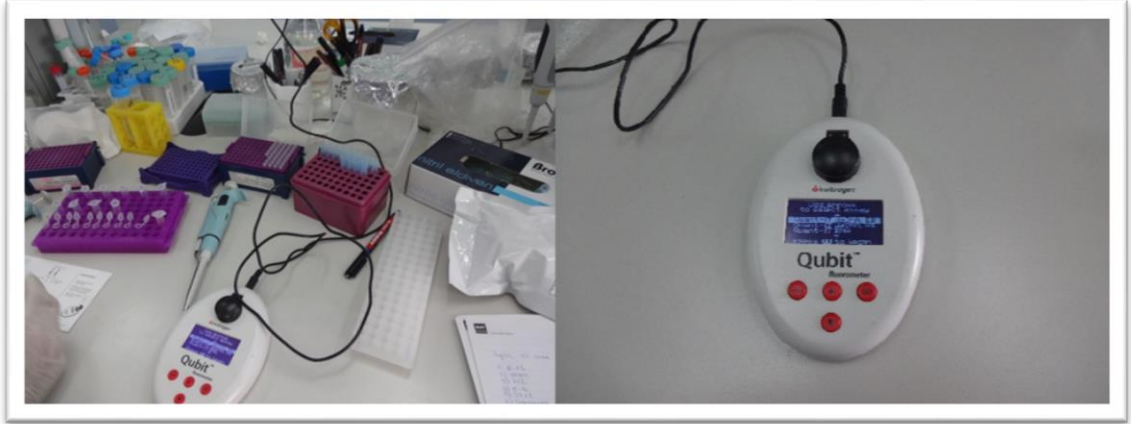


Şekil 3.2.4.5. Yeni tüplere izopropanol eklenmesi ve gözle görünür hale gelen DNA yumağı

6. İzopropanol ilave edildikten sonra yarım saat -20°C 'deki buzdolabında bekletilen örnekler çıkartılarak 25°C 'de 10 000 g kuvvetinde 5 dakika santrifüj edilmiştir ve dibe çöken çökelti düşürülmemek üzere üstte kalan kısım atılmıştır. Bu işlemin ardından $400\ \mu\text{L}$ 1M 'lık NaCl eklenmiştir ve parmak hareketleri yardımı ile çökelti bu solüsyon içerisinde eritilmiştir.
7. Çökelti solüsyon içinde difüze olduktan sonra tüplerin içine birer μL RNase eklenmiştir ve 37°C 'de yarım saat boyunca su tankında bekletilmiştir.
8. 37°C 'de yarım saat bekleyen tüpler su tankından çıkartılarak içlerine $500\ \mu\text{L}$ bağlanma solüsyonu eklenmiştir ve filtreli tüplere aktarılarak ve 4°C 'de dakikada 10 000 devir ile 2 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası filtreden alt kısma geçen sıvı dökülmüştür ve filtrenin üzerine $500\ \mu\text{L}$ yıkama solüsyonu konularak dakikada 10 000 devir ile santrifüj edilmiştir ve yine alta geçen kısım atılmıştır. Bu yıkama işlemi bir kez daha tekrarlanmıştır.
9. Yıkama işlemi bittikten sonra filtreler eski tüplerden çıkartılarak yeni tüplere yerleştirilmiştir. Filtrelerin üzerine $50\ \mu\text{L}$ elüsyon sıvısı konulduktan sonra oda sıcaklığında 2-3 dakika bekletilmiş ve dakikada 10 000 devir ile 2 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi ile DNA filtreden çıkmış olduğu için filtreler atılmıştır ve elde ettiğimiz DNA örnekleri bir sonraki aşamada kullanılmak üzere -20°C 'de saklanmıştır.

3.2.5. DNA miktarının ölçülmesi ve DNA kalitesinin testi

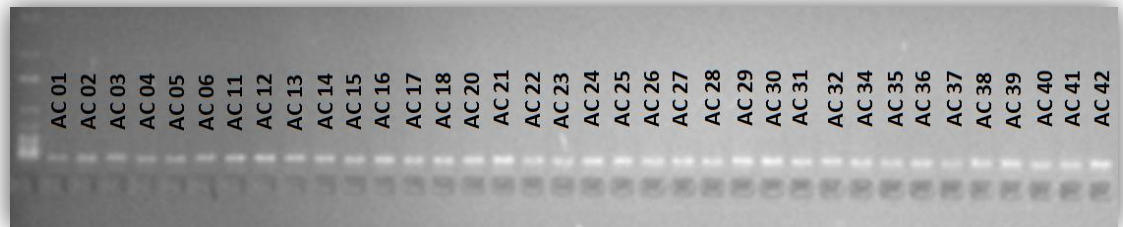
DNA örneklerinin elde edilmesinden sonra her bir örneğin konsantrasyonu Qubit Fluorometer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) ile ölçülmüştür ve her bir örneğin konsantrasyonu $50\ \text{ng/mL}$ olacak şekilde ayarlanmıştır. Konsantrasyonların eşitlenmesinden sonra DNA kalitesinin gözlenmesi için DNA örnekleri etidyum bromid içeren 1% 'lik agaroz jelde elektroforez edilmiştir.



Şekil 3.2.5.1 DNA örneklerinin Qubit Fluorometer ile ölçülmesi



Şekil 3.2.5.2 DNA örneklerinin elektroforez tankında yürütülmesi ve ultraviyole ışık altında kamera ile fotoğrafının çekilmesi



Şekil 3.2.5.3 Ultraviyole ışık altında DNA örneklerinin gözlemlenmesi

3.2.6. SSR moleküler işaretleyici bölgelerinin PCR ile çoğaltılması ve analizleri

Yapılan bu çalışmada kullanılan SSR moleküler işaretleyici bölgelerine ait primerler Jakse ve ark. (2005) tarafından geliştirilmiştir ve PCR koşulları aynı şekilde bu çalışmaya aktarılmıştır. Bu çalışmada Schuelke (2000) tarafından geliştirilen 3 primerli yöntem adapte edilmiştir. Bu yöntemde dayanarak; bir, çoğaltmak istenilen bölgeye ait sekans spesifik geri primer; iki, 700 veya 800 nm dalga boyunda LI-COR kızıl ötesi boya ile işaretlenmiş M13 primerleri (LI-COR, Lincoln, Neb., USA) ve 3. olarak bu primerlere spesifik olarak bağlanabilen ve bir ucunda (5'-GACGTTGTAAAACGACGGCC) sekansını taşıyan ileri primerler kullanılmıştır.

Her bir PCR reaksiyonu 20 µL karışımdan oluşmaktadır ve içeriği şöyledir: 1,0 U Taq DNA polimeraz enzimi (Fermentas, CA, USA) ve bununla birlikte sağlanan 1 x konsantrasyonlu reaksiyon tamponu, her bir dNTP'den 0,25 mM, 1,5 mM MgCl₂, 0,1 µM 5' kuyruğuna (5'-GACGTTGTAAAACGACGGCC) sekansı eklenmiş ileri primer, 0,20 µM geri primer, 0,20 µM 700 veya 800 nm dalga boyunda LI-COR kızıl ötesi boya ile işaretlenmiş M13 primerlerinden biri ve 50 ng DNA. Polimeraz zincir reaksiyonları Applied Biosystems thermal cycler (model 2720) (Foster City, CA, USA) cihazı ile yapılmıştır ve sıcaklık döngüleri aşağıdaki gibidir:

1.	95°C	4 dk.	}	28 Döngü
2.	94°C	30 sn.		
3.	55°C	45 sn.		
4.	72°C	1 dk. 20 sn.		
5.	94°C	30sn.	}	8 Döngü
6.	53°C	45sn.		
7.	72°C	1 dk. 20 sn.		
8.	72°C	8 dk.		
9.	+4°C	∞		

Şekil 3.2.6.0. PCR sıcaklık koşulları ve döngü sayıları

Çizelge 3.2. Kullanılan oligonükleotid primerlerin özellikleri

SSR	İleri primer sekansı	Geri primer sekansı	Tekrar Tipi
ACM017	CCTTCTCCCCATTCTCTTCC	CATCGTCCTCGTCCATC	(CAA)4
ACM018	GGGGAATGGTGGAGAATAGA	AACAGAGGCAAGAGGAGCG	(CTT)6
ACM024	CCCCATTTTCTTCATTTTCTCA	TGCTGTTGCTGTTGTTGTTG	(GCA)10-NNN- (GCA)4(ACA)4
ACM031	CCAAAGCCGACCTCCTCT	CGTGGGAAGACCAAGGGT	(AC)6
ACM068	CGAAGGTGAAGGTGTACGGT	CAAATGGCTGCAATAAGCAA	(TA)6
ACM071	TCTCATTTCAACTTTCTACCTATCC	CTGACATTTGCTCGACTGGA	(AG)10
ACM078	CGCAGAATCTCGTCCTTTTT	AATGGTTTGGAGGTCAGTCG	(TCG)7
ACM082	CACCGTTCCTCAGCTCACTT	AGAGGGACGAAATGAAAGCA	(TCT)13
ACM093	GCCAACAGTTTTCGTAAGTTGA	ATTCTCTTCGGCTTTCGTGA	(CCA)7
ACM094	GATGATGGCGAAGACACAGA	AAAAACGGCTTAGGAATTTAAC G	(TGG)5
ACM101	CCTTTGCTAACCAAATCCGA	CTTGTTGAGAAGGAGGACGC	(TCC)5
ACM102	TGGATTTGTGAACAACCGAA	GATGCAGGCAGTGTTTTGAA	(CAA)7
ACM105	CAAGTGGAGCGGGTATTTGT	GAGGCACAACCTCCTCTTCG	(ATG)5
ACM121	GCAAACATATAGTGCCGC	GAACCGATTCTACGAGCAGC	(TAT)5
ACM132	ATGGGGCCTGGTAAGTTTTT	TGCACACCGTTTCCATTTTA	(ACAT)14AC (CATG)4
ACM133	CCACATGGATGAAAAACACAA	CGCTGGTAGCTGAAGCAAAT	(CA)8(CG)6
ACM134	ACACACACAAGAGGGAAGGG	CACACACCCACACACATCAA	(GA)8
ACM138	ACGGTTTGATGCACAAGATG	CCAACCAACAGTTGATACTGC	(CTGC)11
ACM147	CACTTTCCCGTCTAATCGACA	TTCCCACAATCAAAACACCA	(CTC)5
ACM169	ACTTTCCCCCTCCAACATTC	TAGCACAAGGAGGGTCGAGT	(TA)30

Jakse ve ark. (2000)'den adapte edilmiştir

PCR ürünleri LI-COR cihazında yürütülmeden önce yeni bir plate'te her kuyuda hem 700 nm hemde 800 nm boya ile işaretli M13 primerli farklı iki reaksiyon olacak şekilde aktarılmıştır fakat bu işlem yapılırken reaksiyonlara ait DNA fragmentlerinin aynı veya çok yakın baz çifti uzunluğunda olmaması sağlanmıştır.

LI-COR cihazında PCR örneklerinin yükleneceği denatüre edici poliakrilamid (%6'lık Akrilamid, 20 µL TEMED, 200 µL APS) jel bir gün önceden hazırlanmıştır ve yükleme öncesinde kuyucukları oluşturan tarak çıkartılarak jeli içeren cam paneller cihazın düzgün okuma yapabilmesi için jel artıklarından titizlikle temizlenmiştir.

Yeni plate'e aktarılan PCR ürünleri 20 µL olacak şekilde formamide tamponu ile 20 kere seyreltilmiştir ve PCR cihazına konularak 5 dakika boyunca denatüre edilmiştir. Denatürasyon işlemi biter bitmez plate buz içine yerleştirilmiştir.

Yükleme işlemine geçmek üzere hazırlanan poliakrilamid jel LI-COR cihazına yerleştirilerek 1xTE tamponu tanklara doldurulmuştur. Hazırlanan poliakrilamid jeldeki kuyucuklar bir şırınga yardımı ile TE tamponu nazikçe püskürtülmek üzere temizlenmiştir ve buz üzerinde yerleşik bulunan PCR ürünlerinden belirli bir sıra ile 0,3 µL alınarak yüklenmiştir.

Yüklenen örneklerin her iki yanına IRDye700 ve IRDye800 (LI-COR) ile işaretlenmiş 50-350 bp'lik büyüklük standartlarının yüklenmesi ile 30 W, 45°C'de 15 dakika ön yürütme yapılmıştır ve son olarak 30 W, 35°C'de 4 saat ayrıştırılmıştır.



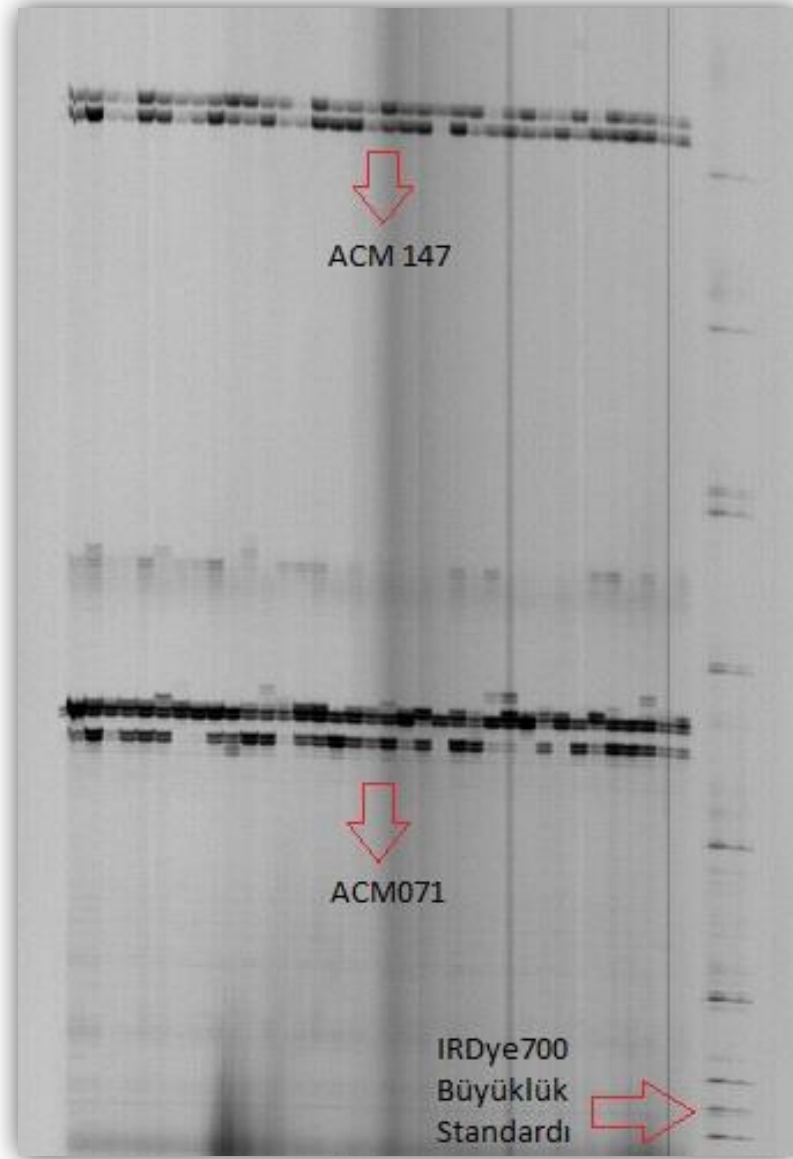
Şekil 3.2.6.1. PCR için kullanılan Applied Biosystems thermal cyclers



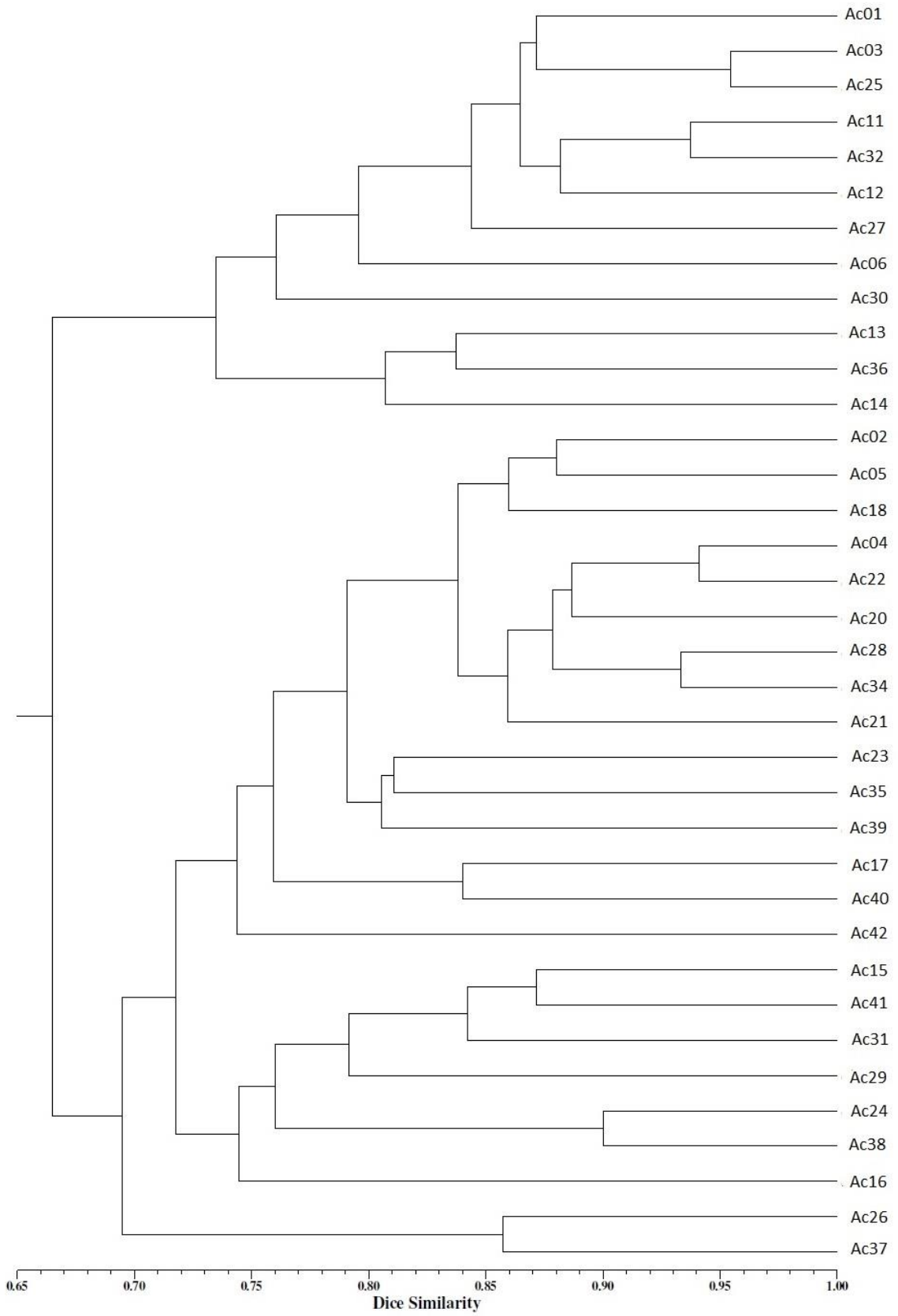
Şekil 3.2.6.2. SSR moleküler işaretleyicilerinin ayrıştırıldığı ve analiz edildiği LI-COR 4300 DNA analizatörü

3.2.7. Veri analizleri

SSR moleküler işaretleyicilerinin Jakse ve ark (2005) tarafından geliştirilen 18 soğan primeri kullanılarak PCR ile çoğaltılmasının ardından LI-COR DNA analizatöründe ayrıştırılmıştır ve SSR moleküler işaretleyicileri ve allel büyüklükleri SAGA GT Software (LI-COR) kullanılarak görüntülenmiştir. SSR moleküler işaretleyicilerinin varlığı (1), yokluğu (0) olarak manuel olarak değerlendirilip binari veri oluşturulmuştur.



Şekil 3.2.7.1. ACM147 ve ACM071 SSR moleküler işaretleyicilerinin SAGA GT programında görüntüsü



Şekil 3.2.7.4. Otuz altı çeşit soğan arasındaki genetik yakınlığın dendogram ile gösterilmesi

4. BULGULAR

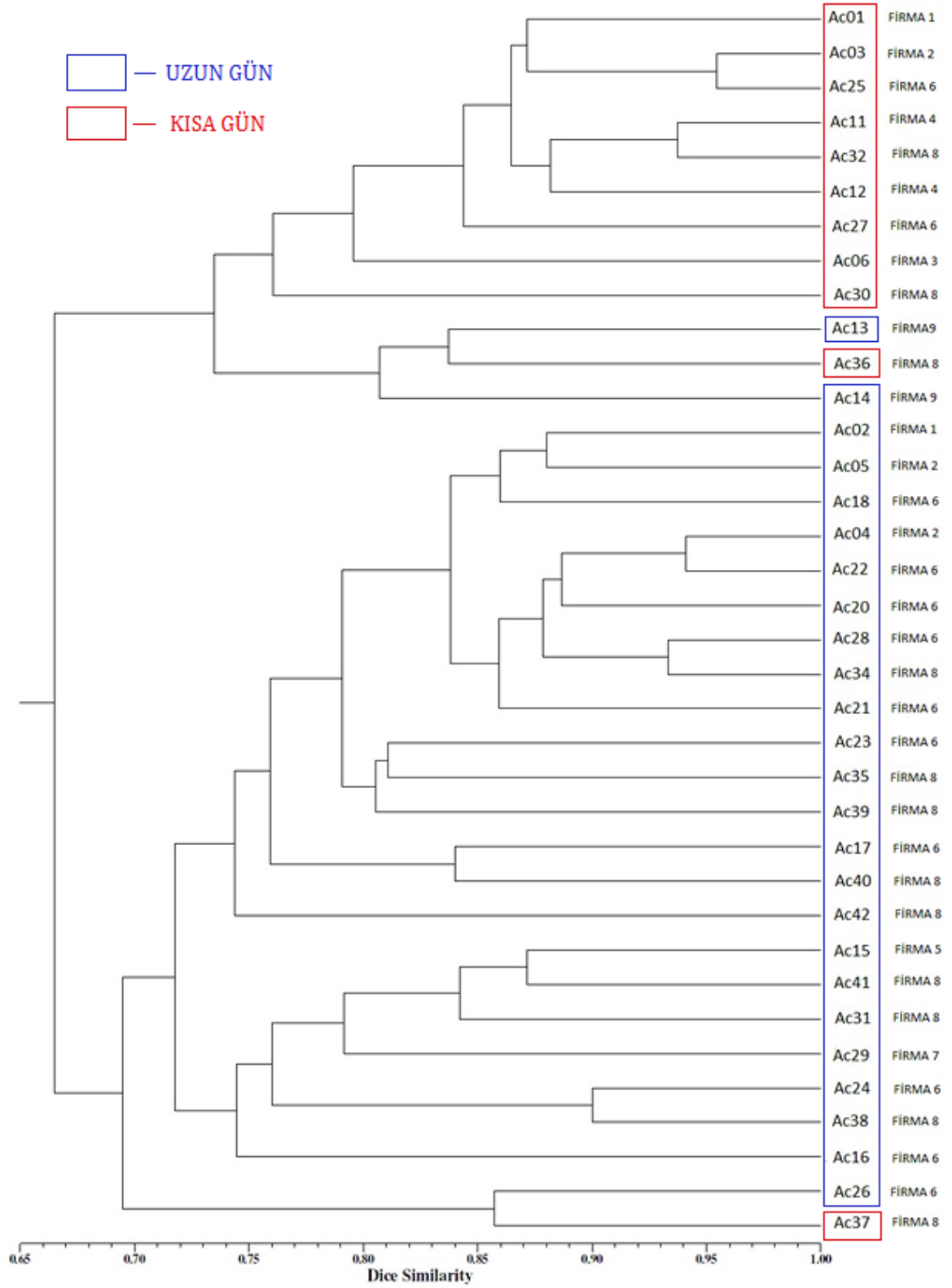
Onaltı SSR primer çifti 36 çeşit soğanda 45 polimorfik allel ortaya koymuştur. Polimorfik allel sayıları her bir SSR primeri için 1 (ACM68) ila 7 (ACM132) arasında değişmiştir.

Yapılan bu çalışmada, UPGMA'ya (aritmetik ortalamayı kullanarak ağırlıklı olmayan çift grup yöntemi) göre oluşturulan dendogramda sadece %80 ve üzerinde benzerlik gösteren çeşit gruplarının sayısı dokuzdur. Bu dokuz grubun kendi içinde ihtiva ettiği en az iki ve en çok dokuz tane farklı ve aynı firmalara ait soğan çeşitleri vardır. Daha yüksek benzeme oranı olan %90 ve üzerinde ikişer bireyden oluşan beş ayrı grup gözlenmiştir ve bu gruplardan biri %95 oranında bir benzerlik oranına sahiptir.

Benzerlik oranları en az %52 ile en çok %95 oranı arasındadır. **Ac05** ve **Ac12** soğan çeşitleri %52 birbirine ile en az benzeyen soğan çeşitleridir. **Ac03** ve **Ac25** soğan çeşitleri %95 ile birbirine en fazla benzeyen soğan çeşitleridir. Birbirine %80 ve daha fazla oranda benzeyen soğan çeşitlerinin ait olduğu firmalar açısından gözlemlendiğinde daha önce bahsedilen dokuz gruptan dört tanesi **Firma 6** ve **Firma 8** arasındadır. Bu çalışmada, firmalar arasından temin edilen soğan çeşitleri arasındaki sayıca benzerlik en çok **Firma 6** ve **Firma 8'dedir**.

Benzerlik oranı %90 ve üzerinde olan beş çift soğan çeşit grupları ve temin edilen firmalar aşağıdaki gibidir:

1. **Firma 6** (Ac24) [Uzun gün] ve **Firma 8** (Ac38) [Uzun gün] Benzerlik Oranı: %90
2. **Firma 6** (Ac28) [Uzun gün] ve **Firma 8** (Ac34) [Uzun gün] Benzerlik Oranı: %93
3. **Firma 2** (Ac04) [Uzun gün] ve **Firma 6** (Ac22) [Uzun gün] Benzerlik Oranı: %94
4. **Firma 4** (Ac11) [Kısa gün] ve **Firma 8** (Ac32) [Kısa gün] Benzerlik Oranı: %94
5. **Firma 2** (Ac03) [Kısa gün] ve **Firma 6** (Ac25) [Kısa gün] Benzerlik Oranı: %95



Şekil 4.1.1.1. Dendeogram ile yakınlığı gösterilen soğan çeşitlerinin ait olduğu firmalar ile gösterilmesi

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

UPGMA Dendogramı ile 36 soğan çeşidi gruplanmıştır. Mallor ve ark. 2014, tarafından yapılan çalışmanın aksine dendogramda oluşan dallar, gün uzunlukları ihtiyacına göre kısa gün ve uzun gün olmak üzere 2 ayrı ana gruba ayrılmıştır.

Bu çalışmada elde edilen genetik benzerlik oranları Mahajan ve ark. 2009 ile uyum içerisindedir fakat çalışmalarında kullanılan iki soğan çeşidi arasında %100 eşleşme bulmuşlardır. N-53 ve Bombay-red soğan çeşitleri arasındaki benzerliği %95 bulmuşlardır ve bu oran bu çalışmada kullanılan Ac03 ve Ac25 soğan çeşitleri arasındaki benzerlik ile aynıdır.

Mahajan ve ark. 2009, tarafından yapılmış çalışmada da gözlemlendiği gibi bazı SSR primerleri [ACM105, ACM133, ACM102] ile çoğaltılan SSR bölgesindeki allellerden sadece biri bir soğan çeşidinde gözlemlenirken; bazı primerler [ACM121, ACM147, ACM31] ile çoğaltılmış soğan çeşitleri SSR bölgesindeki bir allel diğer tüm soğan çeşitlerinde mevcut iken sadece bir soğan çeşidinde bulunmamaktadır.

Soğanların açık tozlaştığı düşünüldüğünde benzeme oranlarının biraz azalması normal karşılanabilir. Buna rağmen soğan çeşitlerinin temin edilen firmalar arasında %90'dan daha fazla ve hatta %95 seviyesinde benzemesi bu durumun tesadüf olmadığını göstermektedir.

ACM132, ACM138, ACM134, ACM102, ACM71, ACM78 primerleri en çok 7 ve en az 3 polimorfik allel ortaya koyması ile soğan çeşit analizlerinde kullanılabilirler oldukça elverişli SSR moleküler işaretleyici primerleridir ve TTSM tarafından detaylı çeşit analizlerinde kullanılabilir ve yeni çeşitlerin geliştirilmesinde farklı genotipte ebeveyn bireylerin seçilmesine yardımcı olabilir.

KAYNAKLAR

- Agarwal, M., Shrivastava, N., Padh. H. 2008.** Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Rep*, 27: 617-631.
- Araki, N., Masuzaki, S., Tsukazaki, H., Yaguchi, S., Wako, T., Tashiro, Y., Yamauchi, N., Shigyo, M. 2010.** Development of microsatellite markers in cultivated and wild species of sections *Cepa* and *Phyllodolon* in *Allium*. *Euphytica*, 173: 321-328.
- Baldwin, S., Pither-Joyce, M., Wright, K., Chen, L., McCallum, J. 2012.** Development of robust genomic simple sequence repeat markers for estimation of genetic diversity within and among bulb onion (*Allium cepa* L.) populations. *Mol Breeding*, 30: 1401-1411.
- Benemann, D.P., Machado, L.N., Arge, L.W.P., Bianchi, V.J., Oliveira, A.C., Maia, L.C., Peters J.A. 2012.** Identification, characterization and validation of SSR markers from the gerbera EST database. *Plant Omics Journal*, 5(2): 159-166.
- Chuanchai, P., Xuelin, T., Silapapun, A., Suthipong, P., Wei, L., Messmer, R. 2010.** Early hybrid testing in tropical maize: are molecular markers useful for selecting the parental component. *Kasetsart J Nat Sci*, 44: 70-78.
- Dice, L.R. 1945.** Measures of amount of ecologic association between species. *Ecology*, 26: 297-302.
- Ercisli, S., İpek, A., Barut, E. 2011.** SSR Marker-Based DNA Fingerprinting and Cultivar Identification of Olives (*Olea europaea*). *Biochem Genet*, 49: 555-561.
- Fritsch, R.M., Blattner, F.R., Gurushidze, M. 2010.** New classification of *Allium* L. subg. *Melanocrommyum* (Webb & Berthel) Rouy (*Alliaceae*) based on molecular and morphological characters. *Phyton*, 49: 145-220.
- Futterer, J., Gisel, A., Iglesias, V., Kloti, A., Kost, B., Mittelsten-Scheid, O., Neuhaus G., Neuhaus-Url, G., Schrott, M., Shillito, R., Spangenberg, G., Wang, Z.Y. 1995.** Standard molecular techniques for the analysis of transgenic plants: Potrykus I, Spangenberg G (eds) Gene transfer to plants. Springer-Verlag, New York, pp: 215-218.
- Goldman, I. L., Schroeck, G. Havey, M. J. 2000.** History of Public Onion Breeding Programs in the United States: Plant Breeding Reviews, ED: Janick, J., John Wiley and Sons, USA, 67-103.
- Gülen, H., İpek, A., Ergin, S., Akcay, M.e., Eris, A. 2010.** Assessment of genetic relationships among 29 introduced and 49 local sweet cherry accessions in Turkey using AFLP and SSR markers. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 85(5): 427-431.
- Guan, R., Chang, R., Li, Y., Wang, L., Liu, Z., Qiu, L. 2010.** Genetic diversity comparison between Chinese and Japanese soybeans (*Glycine max* (L.) Merr.) revealed by nuclear SSRs. *Genet Resour Crop Evol*, 57: 229-242.

- Hashemi, S.H., Mirmohammadi-Maibody, S.A.M., Nematzadeh, G.A., Arzani, A. 2009.** Identification of rice hybrids using microsatellite and RAPD markers. *Afr J Biol* 8: 2094-2101.
- Havey, M.J. 1995.** Onion and other cultivated alliums: Evolution of crop plants, ED: Smartt, J., Simmonds, N. W. Wiley, New York, 344-350.
- Hiebert, C.W., Thomas, J.B., Somers, D.J., McCallum, B.D., Fox, S.L. 2007.** Microsatellite mapping of adult-plant leaf rust resistance gene Lr22a in wheat. *Theor Appl Genet*, 115: 877-884.
- Ipek, A., Barut, E., Gülen, H., İpek, M. 2012.** Assessment of inter- and intra-cultivar variations in olive using SSR markers. *Scientia Agricola*, 69(5): 327-335.
- Ipek, A., Barut, E., Gulen, H., Oz, A.T., Tangu, N.A., Ipek, M. 2009.** SSR analysis demonstrates that olive production in the southern Marmara region in Turkey uses a single genotype. *Genetics and Molecular Research* 8(4): 1264-1272.
- Jakse, J., Martin, W., Mccallum, J., Havey, M.J. 2005.** Single Nucleotide Polymorphisms, Indels and Simple Sequence Repeats for Onion Cultivar Identification. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 130(6): 912-917.
- Jakse, J., Stajner, N., Kozjak, P., Cerenak, A., Javornik, B. 2008.** Trinucleotide microsatellite repeat is tightly linked to male sex in hop (*Humulus lupulus* L.). *Mol Breed*, 21: 139-148.
- Juha'sz, A.G., Sta'gel, A., A'cs, S., Zatyko', L. 2006.** Microsatellite markers and automated fragment analysis techniques for efficient and precise hybrid identification and genetic purity testing in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Acta Agr Hungarica*, 54: 141-146.
- Kalia, R.K., Rai, M.K., Kalia, S., Singh, R., Dhawan A. K. 2011.** Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. *Euphytica*, 177:309-334.
- Khar, A., Lawande, K.E., Negi, K.S. 2011.** Microsatellite marker based analysis of genetic diversity in short day tropical Indian onion and cross amplification in related *Allium* spp. *Genet Resour Crop Evol*, 58: 741-752.
- Khattak, J.Z.K., Christiansen, J.L., Torp, A.M., Andersen, S.B. 2007.** Genic microsatellite markers for discrimination of spinach cultivars. *Plant Breed*, 1.26: 454-456.
- Kumar, L.S. 1999.** DNA markers in plant improvement: An overview. *Biotechnology Advances*, 17: 143-182.
- Lammerts van Bueren E.T., Van Soest L.J.M, De Groot E.C., Boukema I.W., Osman, A.M. 2005.** Broadening the genetic base of onion to develop better-adapted varieties for organic farming systems. *Euphytica*, 146: 125-132.
- Litt, M., Luty, J.A. 1989.** A Hypervariable Microsatellite Revealed by In Vitro Amplification of a Dinucleotide Repeat within the Cardiac Muscle Actin Gene. *The American Society of Human Genetics*, 44: 397-401.

- Mahajan, V., Jakse, J., Havey, M.J., Lawande, K.E. 2009.** Genetic fingerprinting of onion cultivars using SSR markers. *Indian J. Hort.*, 66(1): 62-68.
- Mallor, C., Ardeno-Andres, M.S., Garces-Claver, A. 2014.** Assessing the genetic diversity of Spanish *Allium cepa* landraces for onion breeding using microsatellite markers. *Scientia Horticulturae*, 170: 24-31.
- Miah, G., Rafii, M.Y., Ismail, M.R., Puteh, A.B., Rahim, H.A., Islam, K.N., Latif, M.A. 2013.** A Review of Microsatellite Markers and Their Applications in Rice Breeding Programs to Improve Blast Disease Resistance. *International Journal of Molecular Sciences*, 14: 22499-22528.
- Miesfeld, R., Krystal, M., Arnheim, N. 1981.** A member of a new repeated sequence family which is conserved throughout eucaryotic evolution is found between the human β and P globin genes. *Nucleic Acids Research*, 9: 5931-5947.
- McCallum, J., Leite, D., Pither-joyce, M., Havey, M.J. 2001.** Expressed sequence markers for genetic analysis of bulb onion (*Allium cepa* L.). *Theor Appl Genet*, 103: 979-991.
- Naresh, V., Yamini, K.N., Rajendrakumar, P., Kumar, V.D. 2009.** EST-SSR marker-based assay for the genetic purity assessment of safflower hybrids. *Euphytica* 170: 347-353.
- Neeraja, C.N., Maghirang-Rodriguez, R., Pamplona, A., Heuer, S., Collard, B.C., Septiningsih, E.M., Vergara, G., Sanchez, D., Xu, K., Ismail, A.M., Mackill, D.J. 2007.** A marker-assisted backcross approach for developing submergence-tolerant rice cultivars. *Theor Appl Genet*, 115: 767-776.
- Nguyen, N.H., Driscoll, H.E., Specht, C.D. 2008.** A molecular phylogeny of the wild onions (*Allium*; Alliaceae) with a focus on the western North American center of diversity. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 47: 1157-1172.
- Park, J., Bang, H., Cho, D.Y., • Yoon M., Patil, B.S., Kim, S. 2013.** Construction of high-resolution linkage map of the Ms locus, a restorer-of-fertility gene in onion (*Allium cepa* L.). *Euphytica*, 192: 267-278.
- Rode, J., In-Chol, K., Saal, B., Flachowsky, H., Kriese, U., Weber, W.E. 2005.** Sex-linked SSR markers in hemp. *Plant Breed*, 124: 167-170.
- Ruan, C.J., Li, H., Mopper, S. 2009.** Characterization and identification of ISSR markers associated with resistance to dried-shrink disease in sea buckthorn. *Mol Breed* 24: 255-268.
- Spritz, R.A. 1981.** Duplication/deletion polymorphism 5'- to the human B globin gene. *Nucleic Acids Research*, 9(19): 537-5047.
- Tautz, D. 1989.** Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research*, 17: 6463-6471.

Tyrka, M., Perovic, D., Wardynska, A., Ordon, F. 2008. A new diagnostic SSR marker for selection of the Rym4/Rym5 locus in barley breeding. *J Appl Genet*, 49: 127-134.

Varshney, R.K., Graner, A., Sorrells, M.E. 2005. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. *TRENDS in Biotechnology*, 23(1): 48-54.

Wang, M.L., Barkley, N.A., Jenkins, T.M. 2009. Microsatellite Markers In Plants and Insects: Applications of Biotechnology. *Gens, Genomes and Genetics*, 3(Special Issue 1): 54-67.

Zane, L., Bargelloni, L., Patarnello, T. 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology*, 11: 1-16.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Ertan KANBUR
Doğum Yeri ve Tarihi : Mersin, 09.08.1988
Yabancı Dili : İngilizce
Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)
Lise : Şükrü Şankaya Anadolu Lisesi/ 2006
Lisans : Dumlupınar Üniversitesi/ 2013
Yüksek Lisans : Uludağ Üniversitesi/ 2015
Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl : U.Ü. Moleküler Biyoloji ve Genetik ABD
2013-2014, KU LEUVEN/ 2014
İletişim (e-posta) : kanburertan@gmail.com
Yayımları :