

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI
2020-YL-002

**İNCİRDE (*Ficus carica* L.) RAPD, SRAP VE SCAR
BELİRTEÇLERİ İLE CİNSİYETİN BELİRLENMESİ**




Ahmet Rıza AĞIR

**Tez Danışmanı
Doç. Dr. Zeynel DALKILIÇ**

AYDIN

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Ahmet Rıza AĞIR tarafından hazırlanan “İncirde (*Ficus carica* L.) RAPD, SRAP ve SCAR Belirteçleri ile Cinsiyetin Belirlenmesi” başlıklı tez, 27.12.2019 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

	Unvanı, Adı Soyadı	Kurumu	İmzası
Başkan	Doç. Dr. Zeynel DALKILIÇ	Aydın Adnan Menderes Üniv.	
Üye	Prof. Dr. Sadiye GÖZLEKÇİ	Akdeniz Üniv.	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Emre SEVİNDİK	Aydın Adnan Menderes Üniv.	
:			

Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu (tezin türü) tezi, Enstitü Yönetim KurulununSayılı kararıyla(tarih) tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Gönül AYDIN
Enstitü Müdürü

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Bu tezde sunulan tüm bilgi ve sonuçların, bilimsel yöntemlerle yürütülen gerçek deney ve gözlemler çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce, sonuç ve bilgilere bilimsel etik kuralların gereği olarak eksiksiz şekilde uygun atıf yaptığımı ve kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

27.12.2019

Ahmet Rıza AĞIR

ÖZET

İNCİRDE (*Ficus carica* L.) RAPD, SRAP VE SCAR BELİRTEÇLERİ İLE CİNSİYETİN BELİRLENMESİ

Ahmet Rıza AĞIR

Yüksek Lisans Tezi, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Zeynel DALKILIÇ

2019, 55 sayfa

Türkiye'nin en önemli zirai ihracat ürünlerinden biri olan incir (*Moraceae Ficus carica* L. $2n=2x=26$) ginodioik bir bitkidir. Dişi bitkilerin meyveleri taze ve kuru olarak tüketilmekte ve erkeklere göre daha çok ticari öneme sahiptir. İncirde melez tohumdan (çöğür) elde edilen bitkilerin cinsiyetinin morfolojik olarak belirlenmesi gençlik kısırlığı yüzünden 5-7 yıl sürmektedir. İncirde ıslah çalışmalarını hızlandırmak için cinsiyete bağlı belirteçlerin bulunması çok önemli olup incirde cinsiyeti belirleyen bölgeye ait belirteç bulmak amacıyla 2016-2017 yıllarında yapılan bu çalışmada ticari önemi yüksek yerli 5 dişi ('Sarılop', 'Siyah Orak', 'Bursa Siyahı', 'Morgüz', 'Yeşilgüz') ve 5 erkek ('Kaba', 'Karabulut', 'Kıbrıslı', 'Taşlık', 'Yanako') incir çeşidi kullanılmıştır. Cinsiyete göre oluşturulan kümelerde BSA (Küme Açılım Analizi) ile 110 RAPD (Rastgele Çoğaltılmış DNA Polimorfizmi) primeri ve 154 SRAP (Baz Dizisi İlişkilendirilmiş Çoğaltılmış Polimorfizim) primer kombinasyonu test edilmiştir. RAPD ve SRAP primerlerinin hiçbirisi cinsiyete bağlı polimorfik bant oluşturmamıştır. İncir genomunda cinsiyetle bağlantılı gen bölgesi içinde olduğu belirtilen 7 SCAR primerinden sadece MADF4 ve MADF6 primerleri sırasıyla 1.450 bp ve 1.300 bp boyutunda erkek cinsiyetine bağlı bant oluşturmuşlardır. Bu çalışmaya göre MADF4 ve MADF6 SCAR primerleri ile çiçeklenme öncesi gençlik kısırlığı döneminde yerli dişi ve erkek incir çeşitlerinin cinsiyeti %100 güvenilirlikle belirlenebilir.

Anahtar Kelimeler: *Ficus carica*, Cinsiyete bağlı belirteç, Bitki ıslahı, BSA, RAPD, SCAR, SRAP

ABSTRACT

IDENTIFICATION OF SEX IN FIGS (*Ficus carica* L.) WITH RAPD, SRAP AND SCAR MARKERS

Ahmet Rıza AĞIR

M.Sc. Thesis, Department of Horticulture

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Zeynel DALKILIÇ

2019, 55 pages

Fig is one of Turkey's most important agricultural export products (Moraceae *Ficus carica* L. $2n=2x=26$) is a gynodioecious plant. Fruits of female plants are consumed fresh and dry and have more commercial importance than males. Morphological determination of the sex of the plants from the hybrid seed takes 5-7 years due to youth infertility. In order to accelerate the breeding studies in figs, it is very important to find sex-related markers. In the study conducted in 2016-2017, five female ('Sarılop', 'Siyah Orak', 'Bursa Siyahı', 'Morgüz', 'Yeşilgüz') and five male ('Kaba', 'Karabulut', 'Kıbrıslı', 'Taşlık', 'Yanako') fig cultivars were used 110 RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) primers and 154 SRAP (Sequence-Related Amplified Polymorphism) primer combinations were tested in clusters with BSA (Bulked Segregant Analysis). Bulks formed by sex. None of the RAPD and SRAP primers produced a gender-dependent polymorphic band. Only MADF4 and MADF6 primers formed the male sex-dependent band of 1.450 bp and 1.300 bp, respectively, out of the seven SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) primers that were found to be within the sex-related gene region. According to this study, MADF4 and MADF6 SCAR primers can be used with 100% reliability to determine the sex of native female and male fig cultivars in juvenile period before flowering.

Key Words: *Ficus carica*, Sex-linked marker, plant breeding, BSA, RAPD, SCAR, SRAP

ÖNSÖZ

Anadolu'nun da yer aldığı Akdeniz coğrafyası kadim meyve incirinin gen merkezi ve ilk yetiştiriciliğinin yapıldığı bölgedir. Türkiye'nin coğrafi ve ekolojik avantajları incir yetiştiriciliğinde ilk sırada olmasını sağlamaktadır. Ne yazık ki ülkemiz buna rağmen birçok tarım ürünü olduğu gibi potansiyelinin altında üretim ve ihracat yapmaktadır. Yapılacak ıslah çalışmaları ile güzel ülkemizin incirden kazancı çok daha fazla olabilir. Klasik meyve ıslahı programlarında seleksiyon uzun yıllar aldığından moleküler belirteçlerin istenilen özellikleri saptamada kullanılması bu programların hem maliyetini hem de süresini kısaltacak ve başarı şansını da arttıracaktır. Bitkilerde cinsiyet tayini, karmaşık içsel genetik programlar ve çevresel etkilere verilen tepkilerle kontrol edilir. Dünyadaki çiçekli bitkilerin büyük çoğunluğu hermafroditken, bunların yaklaşık %4-6'sı dioiktir. Erkek ve dişi bitkiler farklı ekonomik önemlere sahiptir. Ancak çoğu dioik bitkinin cinsiyeti gençlik kısırlığı döneminden çıkmadan belirlenemez. Bu nedenle dioik bitkilerin gençlik kısırlığı döneminde cinsiyetlerinin saptanması ıslah programlarının süresinin kısaltılmasına büyük katkı sağlayacaktır.

Bu çalışmanın her aşamasında bana yardımcı olan, beni moleküler biyoloji ile tanıştıran ve her buluşmamızda fikirleri ile ufkumu genişleten değerli danışmanım Doç. Dr. Zeynel DALKILIÇ'a şükranlarımı sunarım.

Çalışmamın laboratuvar aşamasının yürütülmesine imkân sağlayan ADÜ Tarımsal Biyoteknoloji ve Gıda Güvenliği Uygulama ve Araştırma Merkezi (TARBİYOMER)'ne teşekkür ederim. Yardım ve bilgilerini benden esirgemeyen Arş. Gör. Nezih ATA'ya, deneylerde kullanılan kimyasalların hazırlanmasında benimle tecrübelerini paylaşan Öğr. Gör. Dr. Adem YAVAŞ'a çok teşekkür ederim. Son olarak tüm öğrenim hayatım boyunca beni destekleyen aileme ve özellikle bana hayatım boyunca tereddütsüz inanan annem Sevim AĞIR'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmasını ZRF-16026 numaralı proje ile maddi yönden destekleyen ADÜ BAP birimine teşekkür ederim.

Ahmet Rıza AĞIR

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI	v
ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
ÖNSÖZ	xi
KISALTMALAR DİZİNİ	xv
ŞEKİLLER DİZİNİ	xvii
ÇİZELGELER DİZİNİxix
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	7
2.2. RAPD	7
2.2. SRAP	7
2.3. SCAR	8
2.4. BSA	8
2.5. Bitkilerde Cinsiyeti Belirlemeye Yönelik Yapılmış Çalışmalar	8
2.6. İncirde Yapılan Moleküler Belirteç Çalışmaları	10
3. MATERYAL VE YÖNTEM	14
3.1 Materyal	14
3.2 Yöntem	14
3.2.1. DNA Çıkartılması	15
3.2.2. BSA Analizi	17
3.2.3. RAPD-PCR Analizi	17

3.2.4. SRAP PCR Analizi	19
3.2.5. SCAR-PCR Analizi	21
3.2.4. Agarose Jel Elektroforezi	23
3.2.5. Verilerin Değerlendirilmesi	24
4. BULGULAR	26
4.1. DNA Çıkartılması.....	26
4.1.1. 16/06/2016 Tarihindeki DNA Çıkartılması	26
4.1.2. 22/09/2016 Tarihindeki DNA Çıkartılması	27
4.2. PCR Uygulamaları.....	28
4.2.1. Sipariş Verilen Primerler ile Yapılan RAPD-PCR.....	28
4.2.2. Operon Primerler ile Yapılan RAPD-PCR.....	30
4.2.3. SRAP-PCR Analizleri	34
4.2.4. SCAR-PCR Analizleri.....	40
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	44
KAYNAKLAR.....	47
ÖZGEÇMİŞ.....	55

KISALTMALAR DİZİNİ

AFLP	Çoğaltılmış Parça Uzunluğu Polimorfizmi (Amplified Fragment Length Polymorphism)
bp	Baz çifti (base pair)
BSA	Küme Açılım Analizi (Bulked Segregant Analysis)
CTAB	Cetil Trimetil Amonyum Bromit
dk	Dakika
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
EtOH	Etil alkol (Etanol)
FAO	Gıda ve Tarım Örgütü (Food and Agriculture Organization)
ISSR	Basit Dizi Tekrarları Arası (Inter-Simple Sequence Repeat)
M	Molar
Mbp	Mega base pair
mg	Miligram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
nM	Nanometre
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
ppm	Parts Per Million
primer	Başlatıcı
PVP	Polivinilpirrolidon

RAPD Rastgele oğaltılmış Polimorfik DNA (Random Amplified Polymorphic DNA)

rpm Revolutions per minute

s saniye

SCAR Baz Dizisi Tanımlanmış oğaltılmış Bölge (Sequence Characterized Amplified Region)

SRAP Baz Dizisi İlişkilendirimiş oğaltılmış Polimorfizm (Sequence-Related Amplified Polymorphism)

SSR Basit Dizi Tekrarı (Simple Sequence Repeat)

Taq *Thermus aquaticus*

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. Agaroz jel elektroforezi	24
Şekil 3.2. Jel görüntüleme	25
Şekil 4.1. 16/06/2016 tarihinde yapılan izolasyonundan elde edilen DNA jeli. .	26
Şekil 4.2. 22/09/2016 tarihinde yapılan izolasyonundan elde edilen DNA jeli. .	28
Şekil 4.3. Sipariş verilen primerler ile yapılan RAPD-PCR’da oluşan bant jeli.	30
Şekil 4.4. Operon primerleri ile yapılan RAPD-PCR’da oluşan bant jeli.	30
Şekil 4.5. SRAP primerleri ile yapılan PCR’da oluşan bant jeli.	34
Şekil 4.6. SCAR primerlerinin bağlanma sıcaklığı 35°C’eki bant deseni.	40
Şekil 4.7. İkinci küme açılım analizinde SCAR belirteçlerinin oluşturduğu bant deseni.	41
Şekil 4.8. MADF4 primerinden oluşan PCR ürününün jel görüntüsü.	42
Şekil 4.9. MADF6 primerinden oluşan PCR ürününün jel görüntüsü.	43

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Ülkelere göre incir üretim miktarları	2
Çizelge 3.1. Kullanılan incir çeşitleri.....	15
Çizelge 3.2. DNA izolasyonunda kullanılan tampon çözelti	17
Çizelge 3.3. Sipariş verilen RAPD primerlerinin baz dizilimleri.....	18
Çizelge 3.4. PCR karışımı.....	19
Çizelge 3.5. RAPD primerleri için PCR döngüsü.....	19
Çizelge 3.6. Li ve Quiros (2001), Gulsen vd. (2007), Oruç (2012)'a göre primer dizilimleri.....	20
Çizelge 3.7. SRAP primerleri için PCR Döngüsü.....	20
Çizelge 3.8. SCAR denemesinde kullanılan primerler.	21
Çizelge 3.9. SCAR analizi için bir örneklik PCR bileşenleri miktarı.	22
Çizelge 3.10. SCAR analizinde a) hesaplanan ve b) kullanılan primer bağlanma sıcaklıkları.....	22
Çizelge 3.11. SCAR analizinde kullanılan PCR döngüsü.....	23
Çizelge 4.1. 16/06/16 tarihli izolasyonda elde edilen DNA'ların miktar ve kalitesi.	27
Çizelge 4.2. 22/09/16 tarihli izolasyonda elde edilen DNA miktarı ve kalitesi. .	29
Çizelge 4.3. Sipariş verilen primerlerin RAPD-PCR'da oluşturduğu polimorfik ve toplam bant sayıları.....	29
Çizelge 4.4. Operon primerlerinin RAPD-PCR'da oluşturduğu polimorfik ve toplam bant sayıları.....	31

Çizelge 4.5. SRAP primerlerinin PCR’da oluşturduğu polimorfik ve toplam bant sayıları.	35
Çizelge 4.6. SCAR primerlerinin oluşturduğu bant sayıları ve seviyeler.....	41
Çizelge 4.7. MADF4 primerinin PCR’da oluşturduğu bant deseni.....	42
Çizelge 4.8. MADF6 primerinin PCR’da oluşturduğu bant deseni.....	43

1. GİRİŞ

İncir (*Ficus carica* L), Moraceae (Dutgiller) familyasına ait diploid yapıda ($2n=2x=26$) bir bitkidir. Moraceae familyası içinde 1400'den fazla tür bulunurken, özelinde *Ficus* cinsi 800'e yakın tür içererek kapalı tohumlular içerisinde ağaç ve çalı formunda en çok üyeye sahip cinslerden birisidir (Frodin, 2004). Moraceae familyası morfolojilerine göre *Ficus*, *Synocia*, *Sycidium*, *Sycomorus*, *Pharmacosycea*, *Urostigma* olmak üzere altı alt cinse (subgenus) ayrılır. Tek evcikli (monoik) alt cins *Urostigma*, 280 tür ile en genişleridir ve türlerin çoğu hemiepiphyte (hava kök sistemi) özelliktedirler. *F. carica*, cinsinin yaprak dökken önemli bir üyesidir (Rønsted vd., 2008). *F. carica*'nın kurutulmuş meyvelerinin önemli vitamin, mineral, karbonhidrat, şeker, organik asit ve fenolik bileşik kaynağı olduğu belirtilmiştir (Jeong ve Lachance, 2001; Veberic vd., 2008). Taze ve kuru incir aynı zamanda yüksek miktarda lif ve polifenol içermektedir (Vinson, 1999, Vinson vd., 2005). İncir, proantosiyanidin gibi fenolik bileşiklerce çok zengin bir meyvedir. Hatta iyi birer fenolik bileşik kaynağı olarak gösterilen çay ve kırmızı şaraptan daha çok fenol içerir. İncirin meyvesi, kökü ve yaprakları geleneksel tıpta hazımsızlık, ishal, kabızlık gibi mide ve bağırsak rahatsızlıklarında, solunum yolu hastalıklarında ve kardiyovasküler hastalıklarda tedavi amaçlı kullanılır. Kuru ciltlere faydalı olan klorojenik asit, flavonlar ve flavonoller taze ve kuru incir meyvelerinden izole edilmiştir. İncir kültüre alınmış en eski meyve türlerinden biridir (Vinson, 1999; Vallejo vd., 2012).

Aşağı Ürdün Vadisinde Neolitik alanlarda yapılan kazılar yetiştiriciliğinin günümüzden 11,400 ile 11,200 yıl kadar önceye dayandığını göstermektedir (Kislev vd., 2006). İncirin gen merkezi Anadolu ve Mezopotamya'dır ve buralardan, önce diğer Akdeniz bölgelerine daha sonra da dünyaya yayılmıştır (Condit, 1969; Flaishman vd., 2008; Flaishman vd., 2017). İncir botanik ismini Anadolu'nun batısındaki Caria bölgesinden almaktadır Bu yüzdendir ki ülkemizdeki incir popülasyonları incir yetiştiriciliği için zengin birer gen kaynağı oluşturmaktadır (Hanelt vd., 2001; Çalışkan, 2012). İncir tropik ve subtropik iklim kuşağının egemen olduğu bölgelerde geniş alanlarda yetiştirilebilen ve geniş bir uyum yeteneğine sahip olan bir türdür. Ege bölgesindeki Büyük ve Küçük Menderes havzaları iklimi ve toprak yapısı göz önüne alındığında taze ve kurutmalık incir yetiştiriciliği için idealdir (Aksoy vd., 2001; Akaroğlu vd., 2003; Özen, 2007). Türkiye iklim avantajları sayesinde dünya incir üretiminde birinci

sırada yer almaktadır (Çizelge 1.1). Her ne kadar ülkemiz dünyada incir üretiminde birinci olması ile söz sahibi olsa da yine 2017 yılı FAO verilerine bakıldığında, Türkiye birim alandan elde ettiği verim ile rakiplerinden geride kalmıştır. Çizelge 1.2’de görüldüğü üzere İsrail 182.443 hg/ha verim ile ülkemizin 3 katından fazla verim elde etmiştir (Anonim, 2017). Geçmiş yıllardan günümüze doğru dünyada incire olan ilgi artmakta, bu da dolayısıyla üretimini arttırmaktadır (Çalışkan, 2012). İncir ağacı varlığı açısından ülkemizi irdeleyecek olursak Ege bölgesi özellikle Aydın, (Germencik ve Ortaklar ilçeleri) ve İzmir (Tire ve Ödemiş ilçeleri) ülkemizdeki incir ağaçlarının büyük bir bölümünü (%70) bünyesinde barındırmaktadır. Bu bölgedeki plantasyonların tamamına yakın kısmı, kurutmalık ‘Sarılop’ çeşidi ile kurulmuştur. Türkiye’de Menderes havzaları dışında üretilen incirin tamamına yakın kısmı sofralık meyve olarak tüketilmektedir ve en yaygın sofralık çeşit ise ‘Bursa Siyahı’dır (Aksoy vd., 2001; Anonim, 2017). 2017 tarihli Dünya Tarım Örgütü (FAO) verileri incelendiğinde, Türkiye 305.689 ton incir üretim miktarı ile dünyada birinci sırada yer alırken, ülkemizi sırasıyla Mısır 177.135 ton ve Fas 137.934 ton ile takip etmektedir. Bunların dışında Cezayir, İran, Suriye de önemli incir üreticileri olarak görülmektedir.

Çizelge 1.1. Ülkelere göre incir üretim miktarları (Anonim, 2017)

Ülkeler	Üretim Miktarı (ton)	Üretim (%)	Alan (ha)	Verim (ton/ha)
Türkiye	305.689	26,5	50.330	60.737
Mısır	177.135	15,4	28.617	61.898
Fas	137.934	12,0	60.533	22.786
Cezayir	128.684	11,2	40.932	31.438
İran	70.730	6,1	54.200	13.050
Suriye	43.084	3,7	9.491	45.395
İspanya	36.380	3,2	13.564	26.821
ABD	28.300	2,5	2.590	109.266
Brezilya	25.883	2,2	2.591	99.896
Tunus	22.529	2,0	15.391	14.637
Diğer	166.451	14,4	37.291	-
Toplam (Dünya)	1.152.799	100,0	315.530	36.535

İstatistiksel verilerden de anlaşılacağı üzere ülkemiz, incir yetiştiriciliği açısından dünyadaki en önemli ülke olmasına rağmen potansiyelini kullanamamaktadır (Çalışkan, 2012). İncirden elde edilen gelirin artırılması birim alandaki verimle doğru orantılıdır. Kültürel işlemlerin yanı sıra üretimde artışın sağlanmasının en iyi yollarından biri de bitki ıslahıdır (Güleç vd., 2010). Bitki ıslahı uygulamalı bahçe bitkileri biliminin dinamik bir alanıdır. Islah, genetik varyasyonlara dayanır ve yetiştiriciler ile tüketicilerin ilgisini çeken özellikler dâhilinde yeni bitkilerin geliştirilmesini amaçlar (Berg, 1989). Ancak klasik meyve ıslahının bazı zorlukları vardır ki, en önemlisi de gençlik kısırlığı (juvenility) dönemidir (Flachowsky vd., 2009; Luo vd., 2019). Gençlik kısırlığı bitki tohumunun çimlenmesini takiben ilk çiçeklerini oluşturduğu döneme kadar geçen süreyi ifade eder ve bitkilerin çiçek oluşturmamadıkları dönem olarak tanımlanır (Goldschmidt ve Lasko, 2005; Zimmerman, 1973). Gençlik kısırlığı türlere göre çeşitlilik göstermekle beraber zeytinde 4-5 yılı (Moreno-Alías vd., 2010), elmada 7-8 yılı (Flachowsky vd., 2009; Luo vd., 2019) bulmaktadır.

Meyve çeşit ıslahı programının tamamlanması eğer arzu edilen çeşit özelliklerini birden fazla gen kontrol ediyorsa veya bu özellikler yabani genotiplerden geliyorsa (hastalık dayanıklılığı, stres toleransı, vb.) 20-30 yılı bulmaktadır (Hsu vd., 2006). Meyve ıslah programları uzun zaman aldığı gibi oldukça masraflıdır. Flachowsky ve arkadaşlarının 2009'da yaptığı çalışmada bir elma çeşidinin eldesi toplamda 15-20 yıl sürmüş ve tahminen 400.000 Euro'ya ulaşmıştır. Başarı bitki ıslahında hızlı ve doğru seleksiyona bağlıdır (Frankel, 1974). Storey (1975)'e göre çoğürden yetişen incir bitkilerinin gençlik kısırlığını atlatmaları 5 ile 7 yıl sürmektedir ve bu bir ıslah programı için oldukça uzun bir süredir. 1998'de Doyle ve Ferguson, incir ıslah programı ile elde ettikleri fidanların cinsiyet tayinini henüz ilk yıllarda yapamadıkları için yıllarca fidanlıkta bakım işlemlerini yapmışlar ve 6-7 yıl sonra elde ettikleri fidanların yaklaşık %50'sini erkek oldukları için elimine etmişlerdir. Birçok dioik meyvede olduğu gibi incirde de dişi ağaçların meyveleri ticari olarak değerlidir. Daha önceden bahsedildiği gibi gençlik kısırlığı dönemini atlatmadan önce incir ağaçlarının cinsiyeti meyve verene kadar morfolojik belirteçler ile sağlıklı bir şekilde henüz anlaşılammaktadır (Condit, 1969). Bu nedenle incir ıslahında tohumlar çimlendikten sonra erken dönemde cinsiyetin belirlenmesi ıslah çalışmalarına hız kazandıracak, emek ve maddi anlamda tasarruf sağlayacaktır (Storey, 1975). İncirin cinsiyeti erken dönemde morfolojik olarak

belirlenemediğinden cinsiyeti kontrol eden sistemin moleküler düzeyde moleküler belirteçler ile belirlenebilmesi çok yarar sağlayacaktır (Mori vd., 2017).

Bitkilerde cinsiyet sistemleri aşırı derecede çeşitlilik gösterir ve bunun kökenini, evrilişini anlamak için ekoloji, gelişim biyolojisi ve genetik gibi farklı alanlardan veri gereklidir. Bahsedilen cinsiyet sistemleri gamet üreten morfolojik yapıların dağılımı ve işlevlerini ifade etmektedir (Sakai ve Weller, 1999). Hayvanlarda hâkim cinsiyet sistemi yani erkek ve dişi özelliklerin ayrı bireylerde bulunması “gonochory” bitkilerde çok nadir görülür. Kara bitkilerinde cinsiyetin kesin ayrımı yani çift evcıklilik 300.000 bitkide 29.000 yani %9-10 oranında görülür. Bu oran çiçekli bitkilerde (angiosperm) yaklaşık 2.500.000 türde %6 (14.620 tür) oranındadır (Renner ve Ricklefs, 1995).

Yaygın incir monoik bir ataya sahipken (Machado vd., 2001) sonrasında erkek (ilek) ve dişi incir olacak şekilde ginodioik formlarda türleri oluşmuştur. İncirde hermafrodit bitkiler ilek (tozlayıcı) olarak işlev gördüğünden ginodioik türler işlevsellik anlamında dioiktir (Anstett vd., 1997). İncir morfolojik açıdan “yalancı meyve” olarak adlandırılır. Çünkü İncirde meyve ovaryumdan değil, çiçek tablasının (receptaculum) kalınlaşıp, etlenmesi ile oluşur ve bu yapıya “syconium” denir. Dişi incir meyvelerinde sadece dişi çiçekler bulunurken, erkek incir meyvelerinde erkek çiçekler ve dişi çiçekler bulunur. Bu durumda incir “ginodioik”tir (Patel ve McKey, 1998). Ancak ilek meyvesinde bulunan dişi çiçekler “gal çiçeği” olarak adlandırılır, fonksiyonel değildir, meyve vermezler. Bu durumda dişi ve erkek ağaçlar söz konusu olacağından kültür inciri *Ficus carica* L. çift evcikli yani “dioik”tir (Armstrong; 2006). Dioik kelimesi kökeni Yunanca’dır ve “iki evcikli” anlamına gelir (Ming vd., 2011).

İki evcikli bitkilerde cinsiyetin tayini çevresel veya genetik etkenlerden dolayı olabilir. Bu bitkilerin çok küçük bir bölümü cinsiyet kromozomu geliştirebilmiştir. Genetiğe bağlı cinsiyet oluşumu, tek bir lokusa, birden çok birbiriyle bağlantılı otozomal lokusa, birbiriyle ilişkisiz çoklu otozomal lokusa veya heteromorfik kromozomlar üzerindeki birkaç gene bağlı olarak gerçekleşebilir (Parrish vd., 2004). Cinsiyet kromozomları 15 familyaya ait az sayıda türde görülmektedir. Söz konusu cinsiyet kromozomları 5 familyaya ait bazı türlerin dışında homomorfiktirler (Ainsworth, 2005). Bir başka deyişle, şekil veya boyutları ile otozomlardan ayırt edilemezler. Hayvanlar ve böcekler gibi heteromorfik cinsiyet kromozomlarına sahip bitki familyaları Cannabidaceae, Hepaticae,

Cucurbitaceae, Caryophyllaceae ve Polygonaceae'dir. Bugüne kadar, iki evcikli bitkilerde iki ana cinsiyet belirleme mekanizması tespit edilmiştir. Bunlar kromozomal cinsiyet belirleme teorisi ve cinsiyeti belirleyen genler teorisidir (Ming vd., 2011). Bitkilerde cinsiyet kromozomları ile en yaygın cinsiyet belirleme sistemi XX-XY sistemidir (Matsunaga ve Kawano, 2001). Bu sistemde erkekler heterogametik yani XY ve dişiler homogametik yani XX'dir. *Silene latifolia* ve *Carica papaya* bitkilerinin Y kromozomu, dişi gelişiminin baskılanmasında ve başçık (anther) gelişiminin başlatılıp tamamlanmasında işlev görür (Jamilena vd., 2008).

Klasik meyve ıslahında karşılaşılan cinsiyetin erken tayini gibi tüm sorunlara alternatif, belirteç destekli seleksiyondur (Francia vd., 2004). Moleküler belirteçlerin kullanımı kolay, pratik, daha güvenilir ve çevresel değişimler tarafından etkilenmezler. PCR temelli moleküler belirteçler bitki ıslahında bireylerin erken dönemde DNA düzeyinde belirlenebilmesini sağlamaktadır (Collard ve Mackgill, 2008). Bir moleküler belirteç (DNA marker, markör, işaretleyici), farklılıkları (polimorfizmleri) ortaya çıkaran, ayırt edilmesi kolay iki değişik şekilde (var/yok) gözlemlenen bir DNA dizisidir. Tercih edilen moleküler belirteç, analiz edilen özellikteki mümkün olan en geniş çeşitlilik aralığını göstermelidir ve çevresel faktörlerden etkilenmemelidir. Etkili bir moleküler belirtecin tekrarlanabilirliği garantili ve tespit edilmesi kolay olmalıdır. Moleküler belirteçler, gelişim aşamalarından bağımsız olarak bireyler arasındaki varyasyon analizlerini kolaylaştırır. Bu durum özellikle bitkilerin cinsiyet tayini çalışmalarında faydalıdır. Polimeraz zincir reaksiyonunda istenilen bölgelerin çoğaltılabilmesinin ve bu teknolojiye yararlanabilmenin ön şartı, saf bozulmamış ve yüksek kaliteli DNA elde edilmesidir (izolasyonudur). Ancak aromatik ve tıbbi bitkiler gibi bitkiler sahip oldukları benzersiz kimyasal yapıları nedeniyle yüksek seviyede polisakkaritler, fenoller ve flavonoidler gibi ikincil metabolitler içerirler. Yüksek moleküler ağırlıklı DNA'nın izole edilmesi ve saflaştırılması bitkisel ikincil metabolitlerin bulaşması ile zorlaşmaktadır (Sunil vd., 2012). Bu maddelerce bulaşık DNA örnekleri PCR çoğaltımı için uygun değildir (Puchoo ve Venkatasamy, 2005).

DNA belirteçleri, belli özelliklerle bağlantılı olduğu tespit edilen bireyler arasındaki özel DNA varyasyonlarıdır. Bu farklı DNA veya genetik varyantlar (değişkenler) 'allel' olarak bilinirler. DNA belirteçleri genomun her bölgesine dağılır, gelişme döneminin her safhasında tespit edilebilir, çevre ve mevsimden

etkilenmezler. Bunlara örnek Rastgele oğaltılmış DNA Polimorfizmi (RAPD), oğaltılmış Parça Uzunluğu Polimorfizmi (AFLP), Basit Dizi Tekrarı (SSR), Basit Dizi Tekrarları Arası (ISSR) verilebilir (Khosla ve Kumari, 2015).

Bu yüksek lisans tez çalışmasının başladığı 2016 yılına kadar da incirde cinsiyete bağlı %100 tekrarlanabilir bir belirteç bulunamamıştır.

Bu çalışmanın amacı incir ışlahında önemli olan erken dönemde cinsiyetin saptanabilmesi için cinsiyete bağlı moleküler belirteç(ler) elde etmektir. Böylece zaman ve para kaybının en aza indirilmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla önce incirden DNA izolasyon yöntemi seçilip kullanılan çeşitler için standartize edilmiştir. Sonrasında kullanılacak moleküler belirteçler belirlenip bunların PCR döngüleri standartize edilmiştir. Son olarak 110 RAPD primeri, 182 SRAP primeri kombinasyonu ve 2017 yılında Mori vd. (2017) yapmış olduğu çalışmada buldukları erkek cinsiyetine bağlı 7 farklı SCAR moleküler primerinin bazı yerli dişi ve erkek incir bitkilerine uygulanabilirliği test edilmiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. RAPD

RAPD (Rastgele Çoğaltılmış DNA Polimorfizmi) 1990'da iki farklı araştırmacı grubu tarafından keşfedilmiş PCR tabanlı bir belirteç sistemidir (Welsh ve McClelland, 1990; Williams vd., 1990). Bu sistem genomdaki baz dizilimi bilgisine ihtiyaç olmadan rastgele 10-mer uzunluğunda sentezlenen tek primer kullanılarak PCR yardımıyla DNA'nın çoğaltılmasına dayanır. RAPD yönteminde polimorfizm, çoğaltılan DNA parçası bir bireye bağlanıp diğerine bağlanmadığında görülmektedir. Genelde RAPD belirteçleri dominanttır. Bu özelliği nedeniyle heterozigotları dominant homozigotlardan ayırmak mümkün değildir. RAPD analizi, RFLP analizlerine kıyasla zamandan ve işçilikten tasarruf sağlayabilir (Landry and Michelmor, 1987). 1990'lardan sonra RAPD belirteçleri ekonomik ve ekolojik yönden önemli bitkilerde cinsiyetin belirlenmesi için başarıyla kullanılmıştır. Örneğin *Pistacia vera* (Hormaza vd., 1994), *Actinidia deliciosa* var. *deliciosa* (Shirkot vd., 2002), *Momordica dioica* (Baratakke vd., 2013).

2.2. SRAP

SRAP (Sequence Related Amplified Polymorphism), PCR tekniğine dayalı olup DNA'daki açık okuma bölgelerinin (ORFs, Open Reading Frames) çoğaltılması ve gen etiketleme temeline dayanır. SRAP primerleri ilk kez brokoli, karnabahar ve kale (*Brassica* spp.) gibi türlerde ortaya çıkartılmış PCR tabanlı belirteçlerdir (Li ve Quiros, 2001). SRAP primerleri oluşturulurken önce merkezde CCGG bazları kullanılarak ORF bölgelerindeki ekzonlar (gen kodlayan bölge) hedef alınır. İleri (forward) primeri (başlatıcı) 17 nükleotid, geri (reverse) primeri 18 nükleotid uzunluğundadır. İleri primerler DNA'nın ekzon bölgelerini çoğaltırken, geri primerler DNA'nın intron (gen kodlamayan bölge) ve promoter (kodlama başlangıcı tanıma) bölgelerini çoğaltır. İleri primerlerde 5' ucundaki ilk 14 nükleotid, geri primerlerde ilk 15 nükleotit aynıdır. 3' ucuna yakın olan üç nükleotid rastgele seçim sonucu oluşturulur (Li ve Quiros, 2001). SRAP belirteç sistemi kolay uygulanabilen, tekrarlanabilen, ucuz ve etkili bir sistem olarak değerlendirilmiş, genetik çeşitliliğin, genetik ilişkilerin araştırılması, parmakizi çalışmalarında uygulanabilecek etkili ve ucuz bir işlem olarak kullanılmaktadır (Uzun, 2009; Filiz ve Koç, 2011).

2.3. SCAR

SCAR (Baz Dizisi Tanımlanmış Çoğaltılmış Bölge) oligonükleotid primerler kullanılarak, tek lokusun genetik olarak belirlenmesine yönelik PCR tabanlı belirteç sistemidir. Bu belirteçler genomun değişik yerlerine dağılmış bazen çoklu kopyaya da sahip olabilmektedirler. Bu sistem PCR ile çoğaltılmış RAPD ürününün jelden saflaştırılarak geri kazanılması, klonlanması ve baz diziliminin çıkartılması esasına dayanır. Bu elde edilen baz diziliminden yararlanılarak her iki DNA sarmalının ucuna uygun 20-24-mer uzunluğunda yeni primerler düzenlenir. Yeni sentezlenen bu SCAR primeri kullanılarak yapılan PCR'da, başlangıçtaki PCR'da elde edilip klonlanan RAPD bandı ya da ona çok yakın büyüklükte tek bant elde edilir (Paran ve Michelmore, 1993). Peygamber süpürgesi türlerindeki (*Artemisia* spp.) yüksek artemisinin miktarı içeren bireylerin belirlenmesinde SCAR belirteç sistemi kullanılmıştır (Asghari vd., 2015).

Paran ve Michelmore (1993) RAPD belirteçlerinin SCAR belirteçlerine dönüştürülmesini önermiştir. RAPD-SCAR belirteçleri başarılı bir şekilde *Asparagus officinalis* (Gao vd., 2007), *Momordica dioica* (Baratakke vd., 2013) gibi ekonomik öneme sahip bitkilerde kullanılmıştır.

2.4. BSA

BSA (Küme Açılım Analizi), genomun özel bölgeleriyle ilişkili belirteçleri tanımlamak için keşfedilen bir yöntemdir. Orijini tek bir melezleme olan, izole bir popülasyondan gelen iki tane kümede DNA örneklerinin karşılaştırılmasına dayanır. Bir özellik için karşılaştırılan iki küme, kümeyi oluşturan 14-20 adet bireyleri birbirinden ayıran belirteçleri saptamak için analiz edilirler (Michelmore vd., 1991).

2.5. Bitkilerde Cinsiyeti Belirlemeye Yönelik Yapılmış Çalışmalar

Kivide (*Actinidia chinensis*) cinsiyete bağlı RAPD belirteçleri bulmak için 500 rastgele primer seçilmiştir. Dişi ve erkek olarak ayrılan yavru bireylerden oluşan gen havuzlarında bu 500 primer taranmıştır. SmX adlı işaretleyicinin erkek ebeveynden dişi dölle geçtiği ve SmY adlı işaretleyicinin de erkek ebeveynden erkek dölle kalıtıldığı tespit edilmiştir. Cinsiyete bağlı moleküler belirteçlerin kalıtım çalışmaları sonuçlarına göre kivide erkek cinsiyetin heterogametik olduğu XY kromozom sistemi bulunduğu belirlenmiştir (Harvey vd., 1997).

Gill vd. (1998) *Actinidia* melez popülasyonlarını büyük ölçekte tarayabilmek için SmX ve SmY adlı RAPD primerlerini dizilime göre SCAR primerlerine çevirmişlerdir. Ayrıca bu iki cinsiyete bağlı SCAR primerlerinin coğrafi olarak başka bölgelerdeki *A. chinensis* bitkilerinde bant ürettiği gözlemlenmiştir. Ancak *Actinidia* cinsinin uzak akrabalarında cinsiyete bağlı bant üretmemiştir.

Deputy vd. (2002) papaya (*Carica papaya*) bitkisinde cinsiyeti belirleyen *Sex1* genine bağlı moleküler belirteçler geliştirmişlerdir. Üç RAPD ürünü klonlanmış ve DNA dizilimlerinin bir bölümü sekanslanmıştır. Bu dizilimlere dayanarak SCAR primerleri sentezlenmiştir. SCAR T12 ve SCAR W11 primerleri hermafrodit ve erkek bitkilerde bant oluştururken dişi bitkilerin çok azında bant oluşturmuştur. SCAR T1 primeri tüm papaya bitkilerinde cinsiyete bağlı olmaksızın bant oluşturmuştur. SCAR T12 ve SCAR W11 primerleri SunUp × Kapoho melezlemesinden elde edilen 182 F2 popülasyonunda hiç rekombinasyon göstermemiştir. Bu sonuçlara dayanarak, papaya bitkilerinin cinsiyetini hızlı ve doğru bir şekilde belirlemek için W11 veya T12 belirteçlerinin kullanımıyla PCR tabanlı yeni bir teknik geliştirilmiştir. Hermafrodit papaya bitkilerinden oluşan popülasyonda SCAR T12 cinsiyeti belirleyici olarak SCAR T1'de kontrol olarak kullanılmış ve %99.2 doğruluk sağlanmıştır.

Kafkas vd. (2001) *Pistacia atlantica*, *P. eurycarpa* ve *P. terebinthus*'ta 10 dişi ve 10 erkek bitkiden elde ettikleri DNA'yı eşit miktarda karıştırarak BSA hazırlamışlardır. DNA örnekleri Operon Technologies, USA A, B, C, D, E, L, R, AC, AF, AG, AH, AI, AJ ve AK seti ile University of British Columbia, Canada Set 1 ve 4 RAPD primerleri ile test edilmiştir. Polimorfizm elde edilen primerler ikinci testte 20 adet dişi ve 20 adet erkek birey içeren DNA kümesinde test edilmiştir. Kullanılan toplam 472 RAPD primerinden BC156 ve BC360 primerlerinin oluşturduğu bantların *P. eurycarpa*'da eşey ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir. BC156-1300 bandı bir dişi birey hariç tüm dişi bireylerde mevcutken, erkek bireylerin hiçbirinde gözlenmemiştir. BC360-500 bandı ise test edilen 37 dişi bireyin 31 adedinde tespit edilirken hiçbir erkek bireyde gözlenmemiştir. *P. atlantica*'da OPAK09-850 bandı test edilen 46 dişi bireyin hepsinde tespit edilirken, 38 erkek bireyin hiçbirinde gözlenmemiştir.

Khodaeiaminjan vd. (2017) SSR ve SCAR belirteçleri kullanılarak cinsiyet ile ilişkili moleküler belirteçler bulmuşlar ve SNP (Tek Nükleotid Polimorfizmi) belirteçleri geliştirmişlerdir. *P. vera* 'Siirt' ve 'Bağyolu' melezlemesinden elde

edilen 122 F₁ bitkisinde çalışılmıştır. Araziye 2004 yılında dikilen bireylerden 85 adedi 2016 yılında çiçek açmıştır. Toplam 344 SSR primer kombinasyonu kullanılmıştır. Bunlardan 105 adedi eşey yönünden polimorfizm göstermiştir. Çalışmada eşey ile ilişkili 9 yeni SNP belirteci bulunmuştur. Bu 9 belirteç dişi bireylerde heterozigot (ZW) ve erkek bireylerde homozigot (ZZ) bant deseni vermiştir. Elde edilen SSR belirteçlerinden 4 adedi erkek eşey ile ilişkili bir lokusa bağlı bulunmuştur.

2.6. İncirde Yapılan Moleküler Belirteç Çalışmaları

Saleeb (1965) ve Storey (1975) yapmış olduğu iki farklı dişi çeşit incir ve ilek melezleme çalışmasından elde ettiği tüm melezlerin erkek olduğunu gözlemlemiştir. Çalışmada kullanılan erkek incirler ilek × ilek (GA/GA) melezlemesinden elde edilmiştir. Sonuç olarak ortaya atılan hipoteze göre cinsiyet incirde iki çok yakın allel çifti tarafından belirlenmektedir fakat hangi kromozom üzerinde oldukları meçhuldür. Birinci gen dişi üreme organında dişicik borusunun boyunu kontrol eder (G alleli kısa dişicik borusu, g alleli uzun dişicik borusuna baskındır) ve ikinci gen de erkek organın varlığını kontrol eder (A alleli erkek organ varlığı a alleli erkek organ yokluğu üzerine baskındır). Doğada erkek incir heterogametiktir (GA/ga) bunun yanında dişiler homogametiktir (ga/ga).

Khadari vd. (1995) Fransa'da 21 dişi incirlerin RAPD-PCR yöntemiyle genetik farklılıkları çalışılmıştır. Denemede 85 RAPD primeri test edilmiş 27 adedi incir bitkileri arasında polimorfizm göstermiştir. PCR'da primer bağlanma (annealing) sıcaklığı olarak 35°C kullanılmıştır. Kullanılan 12 RAPD primerinden 19 adet polimorfik bant elde edilmiştir.

Elisiário vd. (1998) Portekiz'deki dişi incir koleksiyonundaki 55 dişi incir ağacında izoenzim ve RAPD yöntemlerini kullanarak yaptıkları çalışmada, PCR bağlanma sıcaklığını 36°C olarak kullanmışlardır. Çalışmada 43 adet RAPD primeri kullanılmıştır. İzoenzimler yoluyla ayırt edilemeyen incir bireyleri arasındaki farklılıklar RAPD ile belirlenmiştir.

Galderisi vd. (1999) İtalya'da 6 dişi incir çeşidi ve bunların klonlarından oluşan toplam 13 bireyde, RAPD yöntemi ile 20 adet 10 baz dizilimli primerden seçilen 5 adet primerle klonlar arasındaki farklılıkları tespit etmişlerdir. Morfolojik ve

fenolojik olarak birbirinden ayrılamayan Dattato ve Bianco del Cilento gibi dişi incir çeşitleri arasında 5 primer yardımıyla farklılık tespit edilebilmiştir.

Cabrita vd. (2001) önceden belirlenmiş zirai olarak kaliteli 11 ‘Sarılop’ ve bir adet ‘Sarı Zeybek’ klonu izoenzim, RAPD ve AFLP moleküler belirteç sistemleriyle analiz etmişlerdir. 5 farklı izoenzim sistemi adı geçen iki çeşidin birbirleriyle ayrımını sağlamıştır. Kullanılan 31 adet 10 bazlık RAPD moleküler belirteci ‘Sarılop’ klonlarını iki genetik benzerlik grubuna ayırmayı sağlamış fakat klonların bireyler olarak ayrımını sağlayamamıştır. AFLP belirteçleri RAPD’e 42.4/6.1 oranla daha fazla farklılık tespit edilmesini sağlamıştır. Ayrıca *EcoRI/MseI* primerleri tüm ‘Sarılop’ klonlarının genotip olarak ayrımını sağlamıştır.

Khadari vd. (2001) Fransa’da *Ficus carica* ve 17 adet değişik *Ficus spp.*’ye ait bitki örneklerinin tanımlanmasında 8 adet microsatellit (SSR) primeri kullanmışlardır. PCR’da primer bağlanma sıcaklığı 50-55°C’ye ayarlanmıştır. Denemede 7 primer ile bitkiler arasında farklılık bulunmuştur.

Papadopoulou vd. (2002) Yunanistan’da 63 adet değişik dişi incir ve 3 adet erkek incir tip ve çeşidi arasındaki akrabalık derecesini 7 adet 10 baz dizimli primerle RAPD yöntemini kullanarak belirlemişlerdir. Seçilen primerlerden elde edilen polimorfizm % 47.6 ile % 92.0 arasında değişmiştir. Sonuç olarak kullanılan incir genotiplerinin soy ağacı çıkarılmıştır.

Khadari vd. (2003) Fransa’da *Ficus carica* ve 17 adet değişik *Ficus spp.*’ye ait bitki örneklerinin tanımlanmasında 8 adet microsatellit (SSR) primeri kullanmışlardır. PCR’da primer bağlanma sıcaklığı 50-55°C’ye ayarlanmıştır. Denemede 7 primer ile bitkiler arasında farklılık bulunmuştur.

Khadari vd. (2003) Fas’ın çeşitli yerlerinden toplanan ve arasında 8 adet erkek incir olan toplam 72 adet incir genotipinde yaptıkları çalışmada, ISSR (8 primer) ve SSR (6 primer) yöntemleriyle Fas’ta incir gen kaynaklarının moleküler karakterizasyonunu yapmışlardır. Soy ağacında 4 grup oluşmuş, kullanılan 8 adet erkek incir aynı grupta yer almıştır. Aynı bölgelerden getirilen genotipler soy ağacında farklı gruplarda yer almışlardır.

Aka-Kaçar vd. (2003) Türkiye’nin çeşitli bölgelerinden topladıkları 30 adet dişi incir çeşidinin yakınlık durumları 12 adet 10 baz dizimli primerle RAPD

yöntemini kullanarak belirlemişlerdir. PCR programında primer bağlanma sıcaklığı 35°C olarak belirlenmiştir. Toplamda elde edilen 58 banttın 37 adedi polimorfiktir. Çoğaltılan bantların boyutları 200-1600 bp arasında değişmiştir. Analiz sonucunda kullanılan 30 çeşit içerisinde Mor 3 ve Mor 4 çeşitleri dışındaki tüm çeşitler arasındaki farklılık 12 adet primer ile tespit edilmiştir. Çeşitlerin oluşturduğu benzerlik matrisine göre soy ağacı çıkartılmıştır.

De Masi vd. (2003) İtalya'da iki farklı dişi incir klonunun ('Bianco del Cilento' ve 'Dottato') bitkileri arasındaki benzerliği belirledikleri çalışmada, PCR bağlanma sıcaklığını 40°C olarak kullanmışlardır. Toplam 20 adet RAPD primeri kullanılmıştır. Çalışılan bireylerin klonları arasında soyağacı UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Means) yöntemi ile çıkartılmıştır.

Parrish vd. (2004) *Ficus fulva*'da yapılan çalışmada erkeklığe özel AFLP belirteci tespit etmişlerdir. Ancak erkek spesifik AFLP belirteci baz dizilimi çıkartılıp SCAR belirtecine çevrildikten sonra erkek ve dişi bireylerde aynı bandı vermiştir.

Khadari vd. (2004) Fas'ın çeşitli yerlerinden toplanan ve arasında 8 adet erkek incir olan toplam 72 adet incir genotipinde yaptıkları çalışmada, ISSR (8 primer) ve SSR (6 primer) yöntemleriyle Fas'ta incir gen kaynaklarının moleküler karakterizasyonunu yapmışlardır. Soy ağacında 4 grup oluşmuş, kullanılan 8 adet erkek incir aynı grupta yer almıştır. Aynı bölgelerden getirilen genotipler soy ağacında farklı gruplarda yer almışlardır.

Mestav (2005) Aydın ilinden seçilen 23 adet erkek incir çeşidi ve klonları ile yapılan çalışmada RAPD yöntemi ile toplam 30 adet 10 baz dizimli primer test etmiştir. Çeşitlerin soy ağacı çıkartılmıştır. Çeşitlerin genotipleri arasındaki en yüksek benzerlik %98 ile 'Yanako'-1 ve 'Yanako'-2 arasında çıkmıştır.

Sadder ve Ateyyeh (2006) Ürdün'de mevcut olan yaygın incirin yerel genotipleri arasındaki polimorfizmi değerlendirmişlerdir. Baharda 20 farklı genotipten DNA izolasyonu için yaprak örnekleri toplanmıştır. Bunlara iki yabancı bir de yabancı çeşit eklenmiştir. Genotipler RAPD yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir. 19 primerden 6'sı polimorfik profiller oluşturmuştur. Oluşan 62 bandın 48'i (%77) polimorfiktir. Jaccard benzerlik indeksi kullanıldığında F20 ile F22 arasında %90 benzerlik olduğu görülürken diğer genotipler arasında daha az benzerlik

saptanmıştır (F11 ve geri kalan arasında %3-18 arasında değişmektedir). Analiz edilen veriler, yerel incirin genetik havuzunda iyi bir değişkenlik göstermektedir ve bu da bölge için potansiyel ıslah programlarına dahil edilmesinde değerli bir kaynaktır.

İkten (2007) RAPD, SSR, ISSR ve SRAP primerleri kullanılarak yürütülen çalışmada toplam 192 genotip arasındaki filogenetik ilişkileri ortaya koymuştur. Ayrıca, ilişkilendirme haritalaması yöntemi kullanılarak bazı önemli meyve karakterleri için işaretleyiciler geliştirilmiştir. Sonuç olarak 5 işaretleyicinin erkek/dişi fenotipini %77 oranında açıkladığı tespit edilmiştir.

Dalkılıç vd. (2011) 85 RAPD primerinin test edildiği bir çalışmada 43 farklı ilek genotipini karakterize etmişlerdir. Kullanılan primerlerin 36 tanesinden 272 bant elde edilmiş ve bunların 76 adedi (%27.9) polimorfik olarak gözlemlenmiştir. Primerlerin PIC değerleri 0.16-0.50 arasında bulunmuştur.

Mori vd. (2017), Japonya'daki en geleneksel incir çeşidi olan Horaishi'yi deney materyali olarak kullanmışlar ve tüm genomunu Illumina platformunu kullanarak shotgun yöntemiyle sekanslamışlardır. 16.124 adet SNP ile yaptıkları tüm incir genomu bağlantı analizi ile incirde cinsiyete bağlı lokus bulmuşlar. Bulunan lokus CAPS belirtecine çevrilmiş ve PCR ürünleri PciI ve HpyCH4IV enzimleri ile kesilmiştir. Sonuç olarak *RESPONSIVE-TO-ANTAGONIST1* (*RANI*) bölgesinin erkek organ oluşumunu kontrol eden lokus olduğu kanısına varılmıştır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Çalışmada bitkisel materyal olarak Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı'na ait arazide bulunan 5 çeşit dişi ve 5 çeşit erkek (ilek) incir çeşidinin çelikten çoğaltılan 2 yaşındaki ağaçları kullanılmıştır. 5 dişi ('Bursa Siyahı', 'Siyah Orak', 'Morgüz', 'Sarılop', 'Yeşilgüz') ve 5 erkek ('Kaba' ilek, 'Karabulut', 'Kıbrıslı', 'Taşlık', 'Yanako') incir çeşidinin yaprakları bu çalışmanın bitkisel materyalini oluşturmuştur (Çizelge 3.1). Çalışmada 110 RAPD primeri, 168 SRAP primeri kombinasyonu ve 7 SCAR primeri kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

Bu çalışma, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Güney Yerleşkesi'nde bulunan Tarımsal Biyoteknoloji ve Gıda Güvenliği Uygulama ve Araştırma Merkezi (TARBİYOMER) laboratuvarında 2016-2017 yılları arasında yürütülmüştür. Bitkilerden alınan yaprakların DNA izolasyonu, modifiye edilmiş CTAB protokolüne (Doyle ve Doyle, 1990) göre yapılmıştır. Sonrasında, dişi ve erkek incir çeşitlerinden elde edilen DNA'lar arasındaki cinsiyete dayalı genetik farklılıklar PCR temelli moleküler belirteçler ile (RAPD, SRAP, SCAR) saptanmaya çalışılmıştır. RAPD ve SRAP primerleri için PCR koşulları optimize edilip, uygun DNA, tampon (buffer), MgCl₂, dNTP, primer, *Taq* enzimi miktarları belirlenmiştir. BSA analizi dişi ve erkek kümelerin genetik farklılıklarını ortaya çıkarmak için kullanılmıştır. Kümeler oluşturulurken 5 dişi incirin DNA'sından eşit miktarda (10 µl) alınıp 1,5 ml'lik bir Eppendorf tüpünde (dişi küme) ve 5 erkek incirin DNA'sından eşit miktarda (10 µl) alınıp 1,5 ml'lik başka bir Eppendorf® tüpünde (erkek küme) karıştırılmıştır. Kümeler elde edilen primerler ile taranıp, polimorfik bant veren primerler ayrıca her kümeyi oluşturan 5'er bireyler ile taranması için seçilmiştir.

Çizelge 3.1. Kullanılan incir çeşitleri (Eroğlu, 1982; Çalışkan, 2012)

	Çeşit	Tozlanma Tipi	Hasat Olgunlaşma	Tüketim
Dişi	‘Bursa Siyahi’	İzmir (Smyrna)	15 Ağustos-1 Kasım	Taze
	‘Morgüz’	İzmir	10 Ağustos-25 Kasım	Taze
	‘Sarılöp’	İzmir	31 Temmuz-15 Eylül	Taze, Kuru
	‘Siyah Orak’	Adi (partenokarp)	15 Haziran 5 Temmuz	Taze
	‘Yeşilgüz’	İzmir	5 Ağustos-20 Ekim	Taze
Erkek	‘Kaba’	İlek	15 Haziran	Reçel
	‘Karabulut’	İlek	15 Haziran	Reçel
	‘Kıbrıslı’	İlek	12-19 Haziran	Reçel
	‘Taşlık’	İlek	12-18 Haziran	Reçel
	‘Yanako’	İlek	12-23 Haziran	Reçel

3.2.1. DNA Çıkartılması

Bu çalışmada DNA izolasyonu ticari solüsyonlar yerine daha ekonomik olması açısından önce klasik DNA izolasyon yöntemleri kullanılmıştır.

16/06/16 tarihinde yapılan DNA izolasyonu: 15 ml’lik mavi kapaklı Falcon® tüplerinde Doyle ve Doyle (1990)’dan değiştirilmiş %1 CTAB (hexadecyltrimethylammonium bromide) yöntemine göre yapılmıştır.

- Her örneğin taze yaprakları 2 g olarak tartılmış ve %70’lik etil alkol çözeltisi ile temizlenmiştir. Yapraklar porselen havanda ayrı ayrı sıvı azot ile dondurulmuş ve havan tokmağı ile toz haline getirilmiştir. Sonrasında örnekler 50 ml konik santrifüj tüplerine aktarılmış hiç zaman kaybetmeden üzerlerine önceden 65°C’ye getirilmiş 25 ml %1 CTAB (Sigma Cat. No. H-6269) solüsyonu, 0,5 ml 2-mercaptoethanol (2-ME) ve 0,25 ml 10mg/ml proteinase K eklenmiştir. Yapraklar hızlıca havan ile ezilip yapraklar toz halindeyken CTAB solüsyonu eklenmeden önce %1 PVP (Polyvinylpyrrolidone) solüsyonu

eklenmiştir. Çünkü sonrasında CTAB eklendiğinde solüsyonun kahverengileştiği gözlenmiştir.

2. Tüm örnekler 50 ml'lik konik santrifüj tüplerinde 65°C'deki sıcak su tankında 1 saat bekletilmiştir.
3. Süre sonunda tüpler buz üzerinde 10 dk soğutulmuştur ve tüplere 20 ml 25:24:1 (v/v) oranında hazırlanmış fenol:kloroform:iso-amil alkol eklenip tüm tüpler alt üst edilmiştir. Sonrasında 10 dk 12.000 rpm hızda ve 20°C'de santrifüj edilmişlerdir.
4. Tüplerdeki sıvı üst kısım (supernatant) yeni tüplere aktarılmıştır ve üzerlerine 20 ml fenol: kloroform: isoamilalkol karışımından konulmuştur ve 10 dk 12.000 rpm hızda ve 20°C'de santrifüj edilmişlerdir. Bu işlem 2 kez daha süpernatantın rengi şeffaf olana kadar devam etmiştir. Süpernatant pipet ile çekilirken altındaki kloroform katmanından pipetle çekmemeye dikkat edilmiştir.
5. Yeni tüplere aktarılan süpernatantların miktarlarınının 2,5 katı kadar -20°C'deki 2-propanol (AppliChem, Kat. No: A3928,1000, Darmstadt, Almanya)ilave edilmiştir. Tüplerdeki sıvılar nazikçe altüst edilmiştir.
6. Tüplerdeki DNA'ların çökmesi için buzdolabında 4°C'de birgün bekletilmiştir.
7. Buzdolabından alınan tüpler DNA'ların tüplerin dibinde topaklanmaları için 12.000 rpm hızda ve 20°C'de 10 dk santrifüj edilmişlerdir.
8. Tüplerin dibindeki çökeltiler düşürülmeden sıvı kısımlar dökülmüştür ve %70'lik 0,5 ml etanol tüplere eklenip hafifçe tüplere vurularak DNA örnekleri yıkanmış ve etanol dökülmüştür. Tüpler kurumaları için kapakları açık olarak oda sıcaklığında bekletilmişlerdir.
9. Tüplere 1 ml %1'lik TE çözeltisi eklenmiş ve DNA'lar içinde çözdürülmüştür. Tüplere 1 µl (10 mg/ml) RNase A (Sigma R6513) eklenip 37°C'de yaklaşık 10 dk inkübe edilmiştir ve buzdolabında 0,5 ml çözeltiler 4°C'de geri kalanları stok olarak -20°C'de saklanmıştır.

Bireylerden elde edilen DNA miktarları ve saflıkları spektrofotometrede ölçülmüştür. Önce nükleik asitlerin maksimum absorbans gösterdiği 260 nm sonra da amino asitler ve fenolik bileşiklerin maksimum absorbans gösterdiği 280 nm dalga boyundaki ışığı absorbe etme oranlarına göre belirlenmiştir.

22/09/16 tarihinde yapılam DNA izolasyonu: İkinci DNA izolasyonu Monsanto Biotechnology Regulatory Sciences (2004) ve değiştirilmiş %2 CTAB+PVP (toz) yönteminin kombinasyonuna göre yapılmıştır. DNA Ekstraksiyonu çözeltisi: 100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 20 mM sodyum EDTA (Etilen Diamine Tetra Asetik Asit) ve 1,4 M NaCl ve %2 CTAB olarak hazırlanmış çözeltiliye %0,2 β -mercaptoethanol solüsyon kullanmadan hemen önce ilave edilmiştir (Çizelge 3.2). Bu yöntemde toplam genomik DNA elde etmek için önce yapraklar %70'lik saf alkol ile yıkanmış sonrasında sıvı azot ile dondurulmuş ve havanda mortar yardımıyla toz haline getirilirken. Toz formda PVP eklenmiştir. Böylece polifenolik bileşikler PVP tarafından uzaklaştırılmıştır (Arif vd., 2010).

Çizelge 3.2. DNA izolasyonunda kullanılan tampon çözelti

Solüsyon	Konsantrasyon
CTAB	%2,0
NaCl	1,4 M
EDTA (0,5M) pH 8,0	0,2 M
TRIS pH 8,0	0,1 M

3.2.2. BSA Analizi

Michelmore vd. (1991) kaynak alınarak yapılan yöntemde, cinsiyetleri aynı olan örneklerden eşit miktarlarda alınıp karıştırılarak DK (Dişi Küme) ve EK (Erkek Küme) oluşturulmuştur. Dişi kümedeki örnekler D 1-5'e kadar erkek kümedeki bireyler de E 1-5'e kadar kodlanarak isimlendirilmiştir. Her bir primer önce cinsiyete göre oluşturulan kümelerde denenmiştir. Polimorfik bant oluşturan primerler kümeleri oluşturan her bireyde tek tek denenmiştir.

3.2.3. RAPD-PCR Analizi

Çalışmada RAPD primerleri olarak rastgele 10-mer düzenerek sipariş verilmiş 10 adet PM 1-10 primerleri (Çizelge 3.3) (Kara, 2014) ve RAPD 10-mer kitlerinden (Operon, Alameda, CA, ABD) OPA1-20, OPB1-20, OPC1-20, OPD1-20 ve

OPH1-20 serileri olmak üzere toplamda 110 RAPD primer kullanılmıştır. Bu primerler öncelikle 5 dişi ve 5 erkek bireyin cinsiyetine göre oluşturulan iki kümelerde polimorfizm elde edebilmek için denenmiştir. PCR hazırlığı için öncelikle ana karışım (master mix) oluşturulmuştur. Karışımı hazırlanırken elde bulunan bitki örneklerinin toplam sayısı esas alınmıştır. Her bir örnek için belirli oranda materyal kullanılacağından ana karışım, her 10 örnek için 1 fazla olacak şekilde hazırlanmıştır. Polimorfizm görülen primerler sonrasında kümeyi oluşturan her 5 birey için ayrı ayrı denenmiştir. PCR ideal solüsyonu ve döngü koşullarını bulmak adına ön denemeler yapılmış ve Dalkılıç vd. (2011)'nin kullandığı PCR çoğaltma ve döngü koşulları değiştirilerek 15 µl toplam hacimde reaksiyonlar gerçekleştirilmiştir. PCR solüsyonu her bir örnek için 0,2 ml'lik Eppendorf® tüp içerisinde 1,5 µl 10× Buffer *Taq* tampon, 1,5 µl MgCl₂, 1,0 µl dNTP, 0,2 µl *Taq* DNA polymerase, 1,0 µl primer ve 1,0 µl genomik DNA eklenmiştir. Üzerine karışımı 15,0 µl'ye tamamlayınca kadar 8,8 µl steril ddH₂O eklenerek karıştırılmıştır (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.3. Sipariş verilen RAPD primerlerinin baz dizimleri (Kara, 2014)

Primer No	Baz dizilimi (bp)
PM1	5'-GTACCGGTCC-3'
PM2	5'-GTACCGGTTCG-3'
PM3	5'-GTACCGGTCA-3'
PM4	5'-GTACCGGTCT-3'
PM5	5'-GTACCGGTGC-3'
PM6	5'-GTACCGGTAC-3'
PM7	5'-GTACCGGTTC-3'
PM8	5'-GTACCGGCC-3'
PM9	5'-GTACCGGGCC-3'
PM10	5'-GTACCGGACC-3'

Çizelge 3.4. PCR karışımı

PCR Bileşenleri	Miktar (µl)
ddH ₂ O	8,8
PCR Buffer (10×)	1,5
MgCl ₂ (25mM)	1,5
dNTP (mM)	1,0
Primer	1,0
<i>Taq</i> enzim	0,2
DNA	1,0
TOPLAM	15,0

Her bir tüpün üzerine numaraları yazılmıştır. Tüpler PCR cihazına yerleştirmeden önce kapaklarının kapalı olup olmadığı kontrol edilmiştir. Daha sonra tüpler PCR cihazına (BioRad® thermal cycler) yerleştirilmiştir (Çizelge 3.5).

Çizelge 3.5. RAPD primerleri için PCR döngüsü

Ön denatürasyon	Denatürasyon	Primer bağlanma	Yeni iplikçik yazılımı	Son yazılım	Toplam döngü sayısı
94°C 30 sn	94°C 25 sn	35°C 45sn	72°C 1 dk	72°C 5 dk	35

3.2.4. SRAP PCR Analizi

Çalışmada kullanılan SRAP primer listesi Çizelge 3.6'da verilmiştir. Toplam 154 SRAP primer kombinasyonu kullanılmıştır. Her primer iş yükünü azaltmak adına önce BSA yapılmış, polimorfizm görülen primerler sonrasında her birey için denenmiştir. SRAP analizinde Li ve Quiros (2001), Budak vd. (2004), An vd. (2008), Oruç (2012), ve Uzun (2009)'dan değiştirilerek kullanılan primerlerdir (Çizelge 3.6).

İleri Me 1, 2, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13

Geri Em: 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15

PCR solüsyonu: Her örnek için 7,8 µl steril ddH₂O, 1,5 µl 10× PCR tamponu (buffer), 1,5 µl MgCl₂, 1,0 µl dNTP, 0,2 µl *Taq* DNA polymerase enzimi, 1,0 µl ileri primer, 1,0 µl geri primer ve 1,0 µl DNA toplam 15,0 µl'dir (Çizelge 3.7).

Çizelge 3.6. Li ve Quiros (2001), Gulsen vd. (2007), Oruç (2012)'a göre primer dizilimleri

İleri	(5'→3')	Geri	(5'→3')
Me1	TGAGTCCAAACCGGATA	Em1	GACTGCGTACGAATTAAT
Me2	TGAGTCCAAACCGGAGC	Em3	GACTGCGTACGAATTGAC
Me4	TGAGTCCAAACCGGACC	Em4	GACTGCGTACGAATTTGA
Me6	TGAGTCCAAACCGGACA	Em5	GACTGCGTACGAATTAAC
Me7	TGAGTCCAAACCGGACG	Em6	GACTGCGTACGAATTGCA
Me8	TGAGTCCAAACCGGACT	Em7	GACTGCGTACGAATTCAA
Me9	TGAGTCCAAACCGGAGG	Em8	GACTGCGTACGAATTCAC
Me10	TGAGTCCAAACCGGAAA	Em9	GACTGCGTACGAATTCAG
Me11	TGAGTCCAAACCGGAAC	Em10	GACTGCGTACGAATTCAT
Me12	TGAGTCCAAACCGGAGA	Em11	GACTGCGTACGAATTCTA
Me13	TGAGTCCAAACCGGAAG	Em12	GACTGCGTACGAATTCTC
		Em13	GACTGCGTACGAATTCTG
		Em14	GACTGCGTACGAATTCTT
		Em15	GACTGCGTACGAATTGAT

Çizelge 3.7. SRAP primerleri için PCR Döngüsü

Ön denatürasyon	Denatürasyon	Primer bağlanma	Yeni iplikçik yazılımı	Son yazılım	Toplam döngü sayısı
94°C 30 sn	94°C 25 sn	35°C 45sn	72°C 1 dk	72°C 5 dk	35

3.2.5. SCAR-PCR Analizi

Mori vd. (2017) çalışmasında kullanılan ve erkek cinsiyetine bağlı olan her biri ileri (F) ve geri (R) olmak üzere 7 adet primer (MADF1-7) özel Sentromer DNA Teknolojileri Ltd. Şti. firmasına sentezletirilmiştir. Primerlerin listesi ve baz dizilimleri Çizelge 3.8’de, PCR karışımı Çizelge 3.9’da verilmiştir. 0,2 ml (200 µl)’lik PCR tüplerine 1,5 µl 10× Buffer, 0,6 µl 25 mM MgSO₄, 1,0 µl 3 mM dNTP, 1,0 µl ileri ve 1,0 µl geri primer, 0,2 µl *Taq* DNA polymerase ve 1,0 µl genomik DNA eklenmiştir. PCR karışımı üzerine 7,8 µl ddH₂O eklenmiştir. PCR toplam hacmi 15,0 µl’dir. Sonrasında tüpler PCR cihazına yerleştirilmiştir. İlk denemede tüm primerlerin annealing dereceleri 35°C olarak ayarlanmıştır. İkinci PCR analizinden önce T.M Calculator (<https://tmcalculator.neb.com/#!/main>)’den her bir primerin bağlanma (annealing) sıcaklığı hesaplanmıştır (Çizelge 3.10a). İş yükünü azaltmak için primer bağlanma sıcaklıkları birbirine yakın olan primerler aynı sıcaklıkta test edilmiştir (Çizelge 3.10b). SCAR analizleri için PCR döngüsü Çizelge 3.11’de verilmiştir. SCAR-PCR denemeleri 3 tekerrürlü yapılmıştır.

Çizelge 3.8. SCAR denemesinde kullanılan primerler (Mori vd., 2017)

Primer	İleri (F), Geri (R)	Baz dizilimi (5’→3’)
MADF1	F	CAGCAATCCCTGATACAAG
	R	CAGCAATCCCATACATTATTC
MADF2	F	TGACGATGCAGCAAGTGAAGGGC
	R	TGACGATGCACGACATTGGTGGATG
MADF3	F	CCTGGGTCATCTACATAATAACC
	R	CCTGGGTCATTATAGAAAGAACC
MADF4	F	TCTCTAGGGGGCAGCATGGACAGTTTTTC
	R	TCTCTAGGGGGGGGGGGCGGATTTTTTG
MADF5	F	GATCTAACC GA ACTAGAAATGG
	R	GATCTAACC GAAAACAAATGTC
MADF6	F	CACTCGGCAAGATGGGAAAGAG
	R	CACTCGGCATCAGGAGGTC
MADF7	F	GCTGAAGAAGGTAATTAGAGC
	R	GCTGAAGAAGAAGCTGAATTG

Çizelge 3.9. SCAR analizi için bir örneklik PCR bileşenleri miktarı

PCR Bileşenleri	Miktar (μ l)
ddH ₂ O	7,8
PCR Buffer (10 \times)	1,5
MgSO ₄ (25mM)	1,5
dNTP (3mM)	1,0
Primer İleri (F)	1,0
Primer Geri (R)	1,0
<i>Taq</i> enzim	0,2
DNA	1,0
Toplam	15,0

Çizelge 3.10. SCAR analizinde a) hesaplanan ve b) kullanılan primer bağlanma sıcaklıkları

a)

Primer	MADF1	MADF2	MADF3	MADF4	MADF5	MADF6	MADF7
Sıcaklık (°C)	51	68°C	54	68-70	52	60	50

b)

Primer	MADF1	MADF2	MADF3	MADF4	MADF5	MADF6	MADF7
Sıcaklık (°C)	50	68	54	68	50	60	50

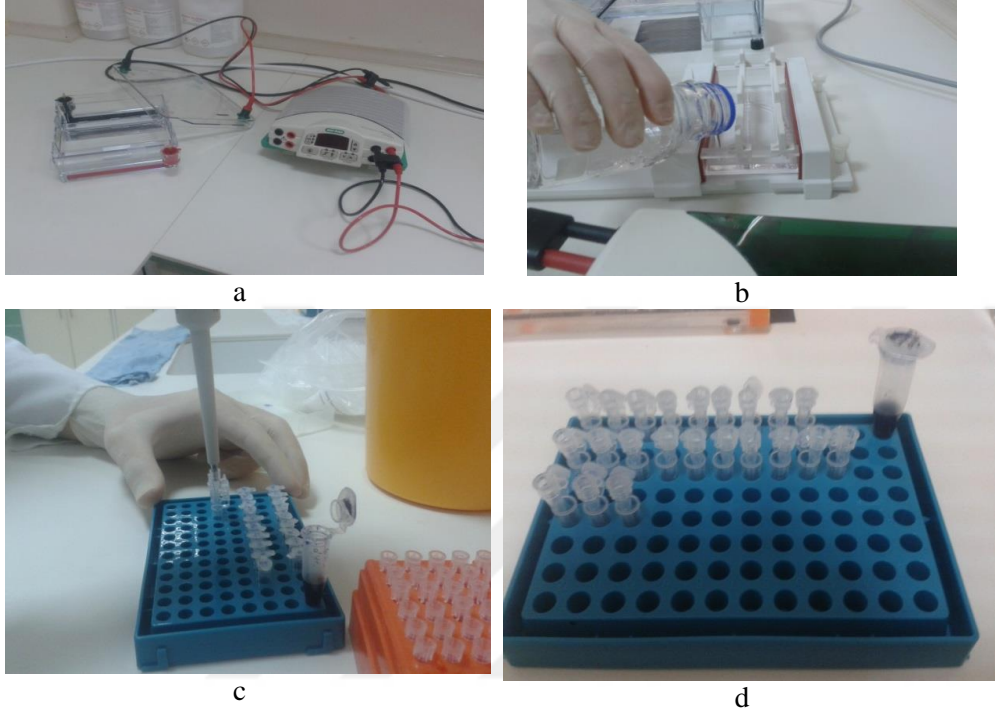
Çizelge 3.11. SCAR analizinde kullanılan PCR döngüsü

Ön ayrılma	Ayrılma	Primer bağlanma	Uzama	Son uzama	Toplam döngü sayısı
94°C 3dk	94°C 45 sn	Her primer için ayrı °C 45sn	72°C 45 sn	72°C 10 dk	35

Her primer önce küme açılım analizine göre dişi ve erkek kümelerde denenmiştir. Kümelerde polimorfik bant oluşturan primerler tekrar bireylerde teker teker denenmiştir.

3.2.6. Agaroz Jel Elektrofrez

RAPD, SRAP, SCAR belirteçleri ile elde edilen çoğaltma ürünlerinden 10 µl alınmış ve 2 µl yükleme tampon eklenmiştir (Şekil 3.1). %2'lik agaroz jel hazırlığı için (%1 agaroz +%1 Nusieve GTG agarose FMC) ve 50 ml 0.5× TBE (45mM Tris base, 45 mM borik asit, 1mM EDTA, pH: 8.3) (Sambrook ve Russell, 2001) 250 ml'lik Erlenmeyer içerisinde karıştırılmıştır. Kaynayınca kadar mikro dalga fırında ısıtılmıştır. Musluk suyu altında deriyi yakmayacak kadar soğutulan Erlenmeyer içerisine 5 µl jel boyası (EZ-Vision®) eklenmiştir. Jel kalıbına üzerinde dişler bulunan taraklar yerleştirilmiştir. Jel kalıbına sıvı jel dökülüp soğuması beklenmiştir. Jel tankı (BIO-RAD® Wide Mini, İtalya) içerisine 1× TBE konulmuş ve boyanmış DNA örneklerinden 5'er µl ve boyanmış 100 bp'lik DNA standardı (DNA ladder, Fermentas GeneRuler 100bp DNA Ladder Plus, 10 mM Tris-HCl, pH 7,6 1 mM EDTA ABM Applied Biological Materials Inc. Cat. No.: G193)'dan 1 µl jelde oluşturulan tarak çukurlarına yüklenmiştir. DNA'lar jel üzerinden yürütülmesi işlemine hazır hale getirilmiştir. Jel elektrofrez 1× TBE (Tris, Borik asit, EDTA) (Sambrook ve Russell, 2001) tampon çözeltisi içerisinde 100V'da yaklaşık 1 saat koşturulmuştur. UV ışık altında (302 nm) renkli kamera kullanılarak fotoğrafları çekilmiştir (Edas 290, Eastman Kodak Company, Rochester, NY, ABD) (Şekil 3.2).



Şekil 3.1. Agaroz jel elektroforezi a) Jel tankı, b) Hazırlanan jelin, jel kalıbına dökülmesi, c) PCR'dan çıkarılan tüplerin içerisine 2 μ l 6 \times yükleme boyası eklenmesi, d) Yükleme boyası eklenmiş hazır tüpler

3.2.7. Verilerin Değerlendirilmesi

Moleküler belirteçlerin oluşturulması için dişi (5 adet) ve erkek (5 adet) toplam 10 adet incirde, RAPD, SRAP ve SCAR primerlerinin kullanılması ile jel üzerinde elde edilen bantlar cinsiyete bağlı polimorfizm olması durumunda var (1) ya da yok (0) olarak Excel bilgisayar programına girilerek değerlendirilmiştir. Görüntülerde net olarak ayırt edilebilen bantlar değerlendirmeye alınmıştır ve bantların durumuna göre benzerlik matrisi oluşturulmuştur.



Şekil 3.2. Jel görüntüleme, a) DNA'ın taraklara yüklenmesi, b) DNA'nın jel üzerinde yürütülmesi, c) Jel üzerinde DNA'ların 150 V'ta 15 dk yürütülmesi, d) Jel üzerinde okunmaya hazır bantlar, e) Bantların UV altında okunması

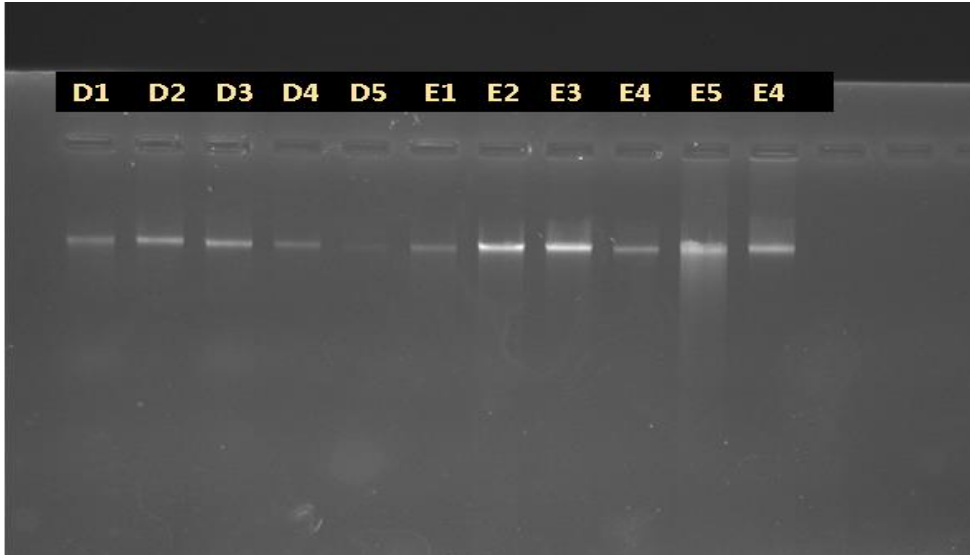
4. BULGULAR

4.1. DNA Çıkartılması

Yapılan iki farklı DNA izolasyonu çalışmasında yapraklar havanda sıvı azot ile dondurularak havan tokmağı ile ezilip toz haline getirilmiştir.

4.1.1. 16/06/2016 Tarihindeki DNA Çıkartılması

Dalkılıç vd. (2011)'nde belirtilen yönteme göre bireylerden elde edilen DNA'ların saflık ve miktar değerleri spektrofotometre (NanoDrop® ND1000, Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA) yardımıyla belirlenmiştir. Çalışmada elde edilen DNA'ların saflıkları 1,03-2,02 arasında değişmiştir. DNA saflık derecesini ölçmek için 260 ve 280 nm boyunda solüsyonların ışık absorbans değerlerinin 1,8-2,0 arasında olması saflığı ideal olarak değerlendirilmektedir. Bu değerlere göre elde edilen DNA'lar yeterince saflaştırılmamıştır. PCR ile belirteçleri çoğaltmak için elde edilen DNA'ların saflıkları yeterli olmuştur fakat 2 ay sonra jel elektroforezi çalışmalarında bantlar net elde edilememeye başlamıştır (şekil 4.1,  izelge 4.1).



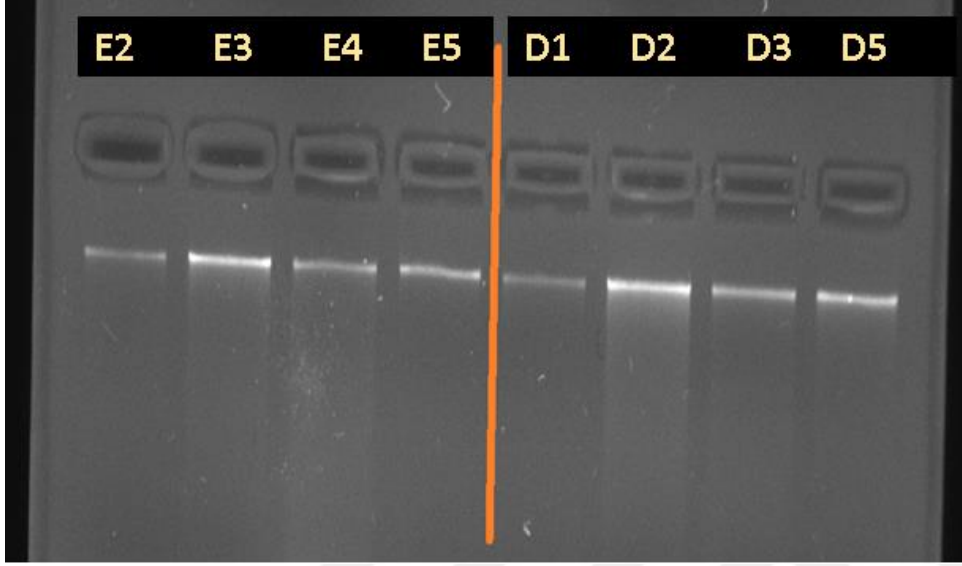
şekil 4.1. 16/06/2016 tarihinde yapılan izolasyonundan elde edilen DNA jeli

Çizelge 4.1. 16/06/19 tarihli izolasyonda elde edilen DNA'ların miktar ve kalitesi

	Örnek	Nükleik asit konsantrasyonu (ng/µl)	260 nm / 280 nm
	Referans	0,0	1,07
Dişi	'Siyah Orak'	45,0	1,13
	Mor Güz	42,0	1,13
	'Sarılop'	46,0	1,21
	'Bursa Siyahı'	40,0	1,03
	Yeşil Güz	42,0	1,13
	Ort.	43,0	1,25
	Referans	0,0	1,07
Erkek	'Karabulut'	46,0	1,17
	'Kıbrıslı'	39,0	1,11
	'Yanako'	45,0	1,16
	'Taşlık'	40,8	1,10
	'Kaba'	51,0	1,21
	Ort.	44,3	1,16

4.1.2. 22/09/2016 Tarihindeki DNA Çıkartılması

Monsanto Biotechnology Regulatory Sciences (2004)'te belirtilen yönteme göre bireylerden elde edilen DNA'ların saflık ve miktar değerleri spektrofotometre ile (NanoDrop® ND1000) ile belirlenmiştir. Moleküler düzeyde yapılan çalışmalarda DNA'nın saflığının 1,8-2,0 arasında olması ideal olarak nitelendirilmektedir. Çalışmada elde edilen DNA'ların saflıkları 1,60-1,86 arasında değişmiştir. DNA saflık derecesini ölçmek için 260 ve 280 nm boyunda solüsyonların ışık absorbans değerlerinin 1,8-2,0 arasında olması saflığı ideal olarak değerlendirilmektedir. DNA'lar yeterince saflaştırılmıştır. DNA miktarları ilk yönteme göre daha fazladır. PCR ile belirteçleri çoğaltmak için elde edilen DNA'ların saflıkları yeterli olmuştur (Şekil 4.2, Çizelge 4.2)



Şekil 4.2. 22/09/2016 tarihinde yapılan izolasyonundan elde edilen DNA jeli

4.2. PCR Uygulamaları

4.2.1. Sipariş Verilen Primerler ile Yapılan RAPD-PCR

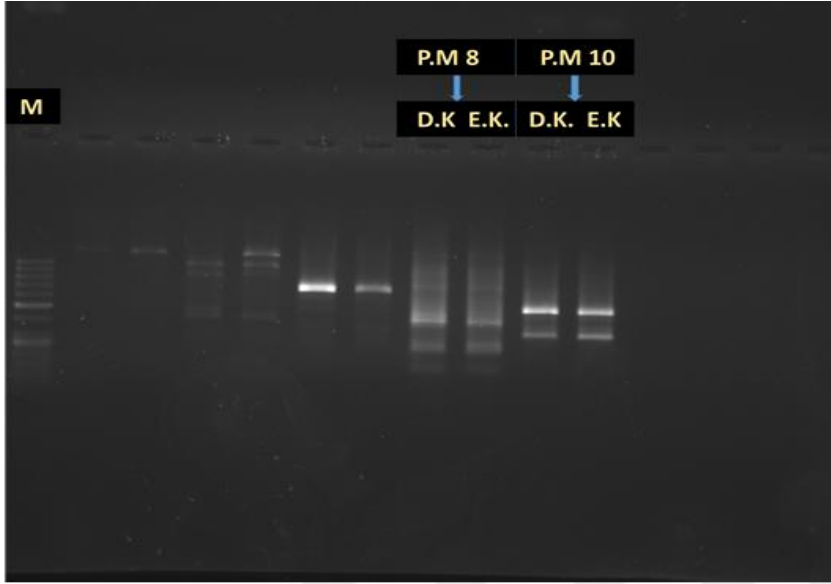
Sipariş verilen primerlerinin oluşturduğu polimorfik ve toplam bant sayıları Çizelge 4.3'te verilmiştir. Kullanılan 7 primer önce bulk analizinde test edilmiştir ve hiçbirinde polimorfik bant elde edilmediğinden bireyler tek tek bu primerlerle denenmemiştir. Test edilen primerlerden bazılarına ait DNA bant desenleri Şekil 4.3'te verilmiştir.

Çizelge 4.2. 22/09/16 tarihli izolasyonda elde edilen DNA miktarı ve kalitesi

	Örnek	Nükleik asit konsantrasyonu (ng/µl)	260 nm / 280 nm
	Referans	0.0	1.07
DİŞİ	‘Siyah Orak’	365.0	1.84
	‘Morgüz’	26.2	1.63
	‘Sarılöp’	144.0	1.82
	‘Bursa Siyahı’	284.0	1.69
	Yeşil Güz	207.0	1.80
	Ort.	252.0	1.76
	Referans	0.0	1.07
ERKEK	‘Karabulut’	259	1.80
	‘Kıbrıslı’	135	1.76
	‘Yanako’	108	1.60
	‘Taşlık’	336	1.84
	‘Kaba’ İlek	283	1.86
	Ort.	224.2	1.77

Çizelge 4.3. Sipariş verilen primerlerin RAPD-PCR’da oluşturduğu polimorfik ve toplam bant sayıları

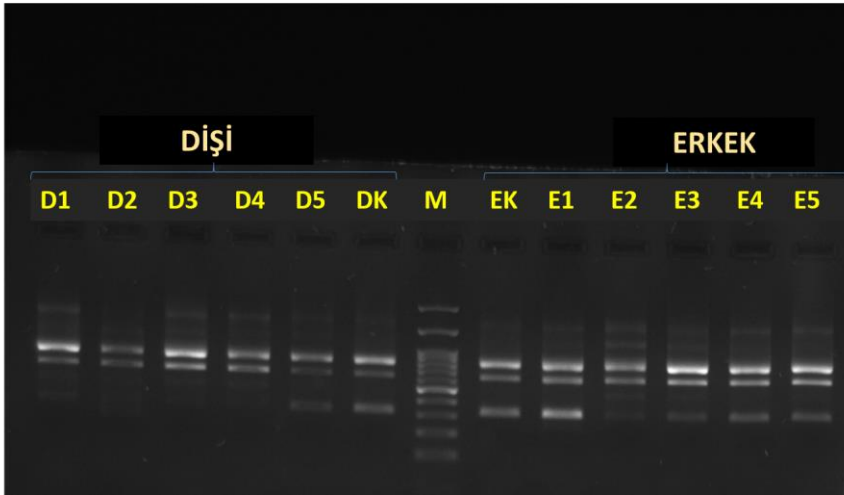
Primer	Polimorfik bant (adet)	Toplam bant (adet)	Bant aralığı (bp)
PM1	0	3	-
PM2	0	7	1500-500
PM 3	0	3	-
PM 7	0	5	2200-500
PM 8	0	6	2000-300
PM 9	0	1	1400
PM 10	0	8	1500-450
Toplam	0	33	



Şekil 4.3. Sipariş verilen primerler ile yapılan RAPD-PCR’da oluşan bant jeli

4.2.2. Operon Primerler ile Yapılan RAPD-PCR

Kullanılan Operon primerlerinden BSA analizinde polimorfik bant verdiği tahmin edilen primerler dişi ve erkek bireyler ile tek tek dtest edildiğinde polimorfizmin olmadığı tespit edilmiştir. Monomorfik bant verileri Çizelge 4.4’te belirtilmiştir. Test edilen primerlerden bazılarına ait DNA bant desenleri Şekil 4.4’te verilmiştir.



Şekil 4.4. Operon primerleri ile yapılan RAPD-PCR’da oluşan bant jeli

Çizelge 4.4. Operon primerlerinin RAPD-PCR’da oluşturduğu polimorfik ve toplam bant sayıları

Primer	Baz dizilimi 5'→3'	Toplam bant sayısı (adet)	Polimorfik bant sayısı (adet)	Bant büyüklüğü (bp)
OPA-1	CAGGCCCTTC	-	-	-
OPA-2	TGCCGAGCTG	6	0	400-1500
OPA-3	AGTCAGCCAC	5	0	500-1500
OPA-4	AACTGGGCTG	3	0	600-1250
OPA-5	AGGGGTCTTG	7	0	400-2200
OPA-6	GGTCCCTGAC	3	0	300-1250
OPA-7	GAAACGGGTG	6	0	520-1300
OPA-8	GTGACGTAGG	5	0	500-1300
OPA-9	GGGTAACGCC	5	0	400-1000
OPA-10	GTGATCGCAG	6	0	600-1250
OPA-11	CAATCGCCGT	8	0	150-1400
OPA-12	TCGGCGATAG	4	0	450-2200
OPA-13	CAGCACCCAC	7	0	400-2900
OPA-14	TCTGTGCTGG	3	0	600-800
OPA-15	TTCCGAACCC	8	0	500-2800
OPA-16	AGCCAGCGAA	5	0	700-1500
OPA-17	GACCGCTTGT	6	1	450-2250
OPA-18	AGGTGACCGT	5	1	700-1500
OPA-19	CAAACGTCGG	4	0	500-1400
OPA-20	GTTGCGATCC	-	-	-
OPB-1	GTTTCGCTCC	5	0	300-3000
OPB-2	TGATCCCTGG	3	0	450-1500
OPB-3	CATCCCCCTG	7	0	300-2250
OPB-4	GGACTGGAGT	7	0	280-1500
OPB-5	TGCGCCCTTC	7	0	600-1700
OPB-6	TGCTCTGCC	6	0	500-1500
OPB-7	GGTGACGCAG	4	0	490-1800
OPB-8	GTCCACACGG	5	0	600-1500
OPB-9	TGGGGGACTC	7	0	600-3000
OPB-10	CTGCTGGGAC	9	0	450-2250

Çizelge 4.4. devam

Primer	Baz dizilimi 5'→3'	Toplam bant sayısı (adet)	Polimorfik bant sayısı (adet)	Bant büyüklüğü (bp)
OPB-11	GTAGACCCGT	3	0	350-600
OPB-12	CCTTGACGCA	6	0	300-2250
OPB-13	TCCCCCGCT	6	0	600-2300
OPB-14	TCCGCTCTGG	5	0	550-1500
OPB-15	GGAGGGTGTT	6	0	250-1400
OPB-16	TTTGCCCGGA	4	0	300-1250
OPB-17	AGGGAACGAG	6	0	400-2200
OPB-18	CCACAGCAGT	3	0	200-1500
OPB-19	ACCCCCGAAG	4	0	600-1000
OPB-20	GGACCCTTAC	5	0	450-2250
OPC-1	TTCGAGCCAG	5	0	600-2200
OPC-2	GTGAGGCGTC	6	0	350-1100
OPC-3	GGGGGTCTTT	6	0	360-1250
OPC-4	CCGCATCTAC	7	0	210-1400
OPC-5	GATGACCGCC	9	0	350-2250
OPC-6	GAACGGACTC	6	0	300-1500
OPC-7	GTCCCACGA	3	0	600-1500
OPC-8	TGGACCGGTG	5	0	400-1400
OPC-9	CTCACCGTCC	5	0	350-1000
OPC-10	TGTCTGGGTG	5	0	350-1450
OPC-11	AAAGCTGCGG	7	0	350-1400
OPC-12	TGTCATCCCC	4	0	200-1400
OPC-13	AAGCCTCGTC	7	0	500-2150
OPC-14	TGCGTGCTTG	7	0	500-2200
OPC-15	GACGGATCAG	7	0	400-2200
OPC-16	CACACTCCAG	8	0	400-1600
OPC-17	TCCCCCCAG	3	0	900-1500
OPC-18	TGAGTGGGTG	3	0	500-1500
OPC-19	GTTGCCAGCC	6	0	500-2200
OPC-20	ACTTCGCCAC	3	0	490-1250

Çizelge 4.4 devam

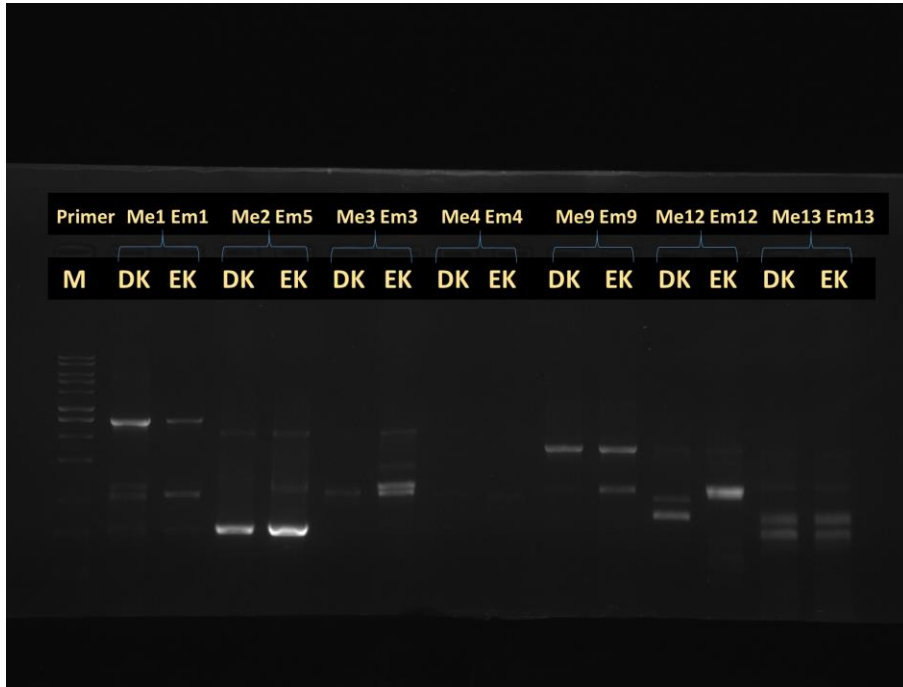
Primer	Baz dizilimi 5'→3'	Toplam bant sayısı (adet)	Polimorfik bant sayısı (adet)	Bant büyüklüğü (bp)
OPD-1	ACCGCGAAGG	5	0	400-1500
OPD-2	GGACCCAACC	7	0	450-1500
OPD-3	GTCGCCGTCA	6	0	300-2900
OPD-4	TCTGGTGAGG	1	0	800
OPD-5	TGAGCGGACA	6	0	350-2250
OPD-6	ACCTGAACGG	2	0	1100-2000
OPD-7	TTGGCACGGG	8	0	400-2800
OPD-8	GTGTGCCCCA	6	0	400-1250
OPD-9	CTCTGGAGAC	6	0	450-2300
OPD-10	GGTCTACACC	3	0	500-2250
OPD-11	AGCGCCATTG	10	0	250-1700
OPD-12	CACCGTATCC	7	0	500-2800
OPD-13	GGGGTGACGA	6	0	600-1480
OPD-14	CTTCCCAAG	4	0	400-1100
OPD-15	CATCCGTGCT	5	0	500-3000
OPD-16	AGGGCGTAAG	6	0	300-800
OPD-17	TTTCCACGG	-	-	-
OPD-18	GAGAGCCAAC	4	0	350-1250
OPD-19	CTGGGGACTT	3	0	500-1400
OPD-20	ACCCGGTCAC	8	3	150-1400
OPH-1	GGTCGGAGAA	5	0	1400-3000
OPH-2	TCGGACGTGA	6	0	400-1500
OPH-3	AGACGTCCAC	6	0	500-1500
OPH-4	GGAAGTCGCC	7	0	200-1500
OPH-5	AGTCGTCCCC	6	0	400-1500
OPH-6	ACGCATCGCA	3	0	400-1900
OPH-7	CTGCATCGTG	5	0	400-3000
OPH-8	GAAACACCCC	5	0	500-1300
OPH-9	TGTAGCTGGG	5	0	500-3000
OPH-10	CCTACGTCAG	-	-	-
OPH-11	CTTCCGCAGT	5	0	300-1550
OPH-12	ACGCGCATGT	7	0	300-2700

Çizelge 4.4 devam

Primer	Baz dizilimi 5'→3'	Toplam bant sayısı (adet)	Polimorfik bant sayısı (adet)	Bant büyüklüğü (bp)
OPH-13	GACGCCACAC	7	0	500-1500
OPH-14	ACCAGGTTGG	7	0	600-1600
OPH-15	AATGGCGCAG	8	0	600-2800
OPH-16	TCTCAGCTGG	3	0	300-900
OPH-17	CACTCTCCTC	4	0	600-1550
OPH-18	GAATCGGCCA	7	0	1000-1400
OPH-19	CTGACCAGCC	8	0	500-3000
OPH-20	GGGAGACATC	7	0	-

4.2.3. SRAP-PCR Analizleri

Çalışmada kullanılan 182 farklı SRAP primer kombinasyonu kullanılmıştır. SRAP primerleri BSA analizleri ile denenmiştir. Monomorfik bantlar oluşturmalarına rağmen hiç polimorfik bant oluşturmamıştır (Şekil 4.5, Çizelge 4.5).



Şekil 4.5. SRAP primerleri ile yapılan PCR'da oluşan bant jeli

Çizelge 4.5. SRAP primerlerinin PCR’da oluşturduğu polimorfik ve toplam bant sayıları

Primer	Toplam bant sayısı (adet)	Polimorfik bant sayısı (adet)
Me1-Em1	4	0
Me1-Em3	3	0
Me1-Em4	5	0
Me1-Em5	3	0
Me1-Em6	9	0
Me1-Em7	7	0
Me1-Em8	6	0
Me1-Em9	5	0
Me1-Em10	1	0
Me1-Em11	-	0
Me1-Em12	4	0
Me1-Em13	6	0
Me1-Em14	2	0
Me1-Em15	3	0
Me2-Em1	8	0
Me2-Em3	6	0
Me2-Em4	4	0
Me2-Em5	6	0
Me2-Em6	7	0
Me2-Em7	5	0
Me2-Em8	-	0
Me2-Em9	3	0
Me2-Em10	4	0
Me2-Em11	-	0
Me2-Em12	5	0
Me2-Em13	5	0
Me2-Em14	4	0
Me2-Em15	2	0

Çizelge 4.5 devam

Primer	Toplam bant sayısı (adet)	Polimorfik bant sayısı (adet)
Me4-Em1	5	0
Me4-Em3	4	0
Me4-Em4	1	0
Me4-Em5	3	0
Me4-Em6	5	0
Me4-Em7	6	0
Me4-Em8	3	0
Me4-Em9	7	0
Me4-Em10	2	0
Me4-Em11	-	0
Me4-Em12	-	0
Me4-Em13	-	0
Me4-Em14	-	0
Me4-Em15	-	0
Me6-Em1	5	0
Me6-Em3	7	0
Me6-Em4	6	0
Me6-Em5	2	0
Me6-Em6	4	0
Me6-Em7	3	0
Me6-Em8	-	0
Me6-Em9	6	0
Me6-Em10	3	0
Me6-Em11	-	0
Me6-Em12	3	0
Me6-Em13	5	0
Me6-Em14	-	0
Me6-Em15	-	0
Me7-Em1	3	0
Me7-Em3	4	0
Me7-Em4	3	0
Me7-Em5	3	0

Çizelge 4.5 devam

Primer	Toplam bant sayısı (adet)	Polimorfik bant sayısı (adet)
Me7-Em6	4	0
Me7-Em7	6	0
Me7-Em8	-	0
Me7-Em9	7	0
Me7-Em10	4	0
Me7-Em11	-	0
Me7-Em12	-	0
Me7-Em13	-	0
Me7-Em14	-	0
Me7-Em15	-	0
Me8-Em1	5	0
Me8-Em3	5	0
Me8-Em4	3	0
Me8-Em5	4	0
Me8-Em6	2	0
Me8-Em7	3	0
Me8-Em8	4	0
Me8-Em9	-	0
Me8-Em10	-	0
Me8-Em11	-	0
Me8-Em12	-	0
Me8-Em13	-	0
Me8-Em14	-	0
Me8-Em15	-	0
Me9-Em1	9	0
Me9-Em3	5	0
Me9-Em4	7	0
Me9-Em5	6	0
Me9-Em6	8	0
Me9-Em7	9	0
Me9-Em8	31	0
Me9-Em9	2-	0

Çizelge 4.5 devam

Primer	Toplam bant sayısı (adet)	Polimorfik bant sayısı (adet)
Me9-Em10	3	0
Me9-Em11	-	0
Me9-Em12	3	0
Me9-Em13	9	0
Me9-Em14	6	0
Me9-Em15	-	0
Me10Em1	2	0
Me10-Em3	7	0
Me10-Em4	-	0
Me10-Em5	4	0
Me10-Em6	10	0
Me10-Em7	5	0
Me10-Em8	3	0
Me10-Em9	6	0
Me10-Em10	6	0
Me10-Em11	-	0
Me10-Em12	6	0
Me10-Em13	5	0
Me10-Em14	5	0
Me10-Em15	-	0
Me11-Em1	3	0
Me11-Em3	5	0
Me11-Em4	-	0
Me11-Em5	-4	0
Me11-Em6	5	0
Me11-Em7	-	0
Me11-Em8	3	0
Me11-Em9	4	0
Me11-Em10	6	0
Me11-Em11	-	0
Me11-Em12	2	0
Me11-Em13	8	0

Çizelge 4.5 devam

Primer	Toplam bant sayısı (adet)	Polimorfik bant sayısı (adet)
Me11-Em14	4	0
Me11-Em15	-	0
Me12-Em1	3	0
Me12-Em3	4	0
Me12-Em4	-	0
Me12-Em5	-	0
Me12-Em6	5	0
Me12-Em7	3	0
Me12-Em8	3	0
Me12-Em9	-	0
Me12-Em10	6	0
Me12-Em11	6	0
Me12-Em12	5	0
Me12-Em13	6	0
Me12-Em14	6	0
Me12-Em15	2	0
Me13-Em1	5	0
Me13-Em3	5	0
Me13-Em4	8	0
Me13-Em5	-	0
Me13-Em6	4	0
Me13-Em7	3	0
Me13-Em8	-	0
Me13-Em9	6	0
Me13-Em10	-	0
Me13-Em11	5	0
Me13-Em12	4	0
Me13-Em13	6	0
Me13-Em15	3	0

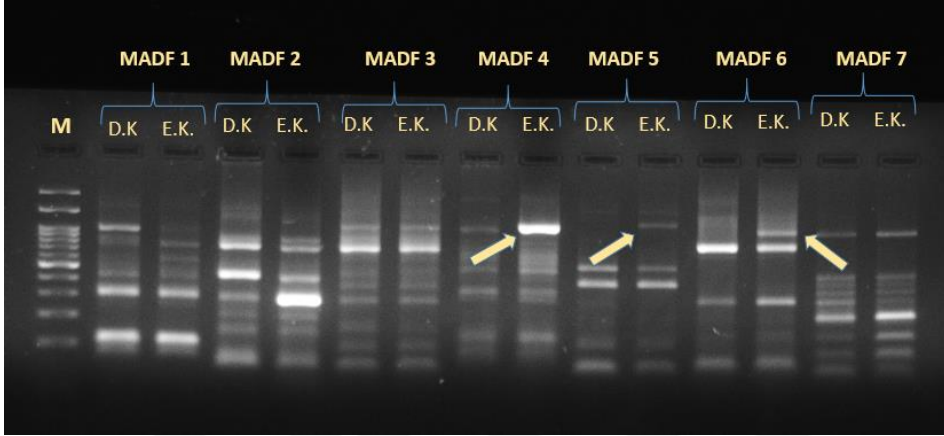
4.2.4. SCAR-PCR Analizleri

İlk küme açılım analizinde test edilen 7 adet SCAR primerlerinin hepsinin bağlanma sıcaklıkları 35°C olarak PCR analizi yapılmıştır. Analiz sonucunda çok sayıda monomorfik bant elde edilmiştir. Hiç polimorfizm gözlenmemiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. SCAR primerlerinin bağlanma sıcaklığı 35°C'deki bant deseni (M: DNA standardı 100 bp, D.K.: Dişi Küme, E.K.: Erkek Küme)

İkinci küme açılım analizinden önce her bir SCAR primerinin bağlanma sıcaklıkları hesaplanmış ve her primerin PCR döngüleri yeni değerlere göre değiştirilmiştir. Primer bağlanma sıcaklıkları değiştirildikten sonra yapılan PCR'da toplamda 47 bant oluşturmuştur. MADF4, MADF5 ve MADF6 primerleri dişi-erkek kümelerinde erkek cinsiyetine bağlı birer polimorfik bant oluşturmuştur (Şekil 4.7).

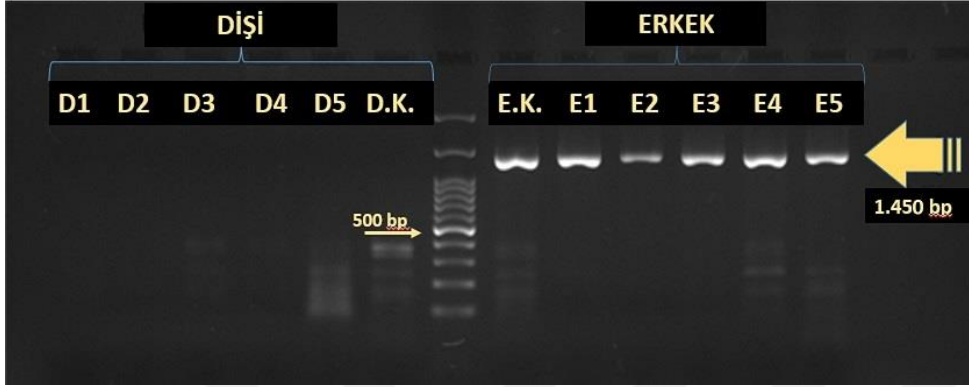


Şekil 4.7. İkinci küme açılım analizinde SCAR belirteçlerinin oluşturduğu bant deseni (M: DNA standardı 100 bp, D.K.: Dişi Küme, E.K.: Erkek Küme)

Küme açılım analizinden sonra her bir SCAR primeri tüm bireylerde tek tek test edilmiştir. Primerler 5 erkek ve 5 dişi bireyde toplamda 42 bant oluşturmuştur. Bu primerlerden MADF4 ve MADF6 SCAR primerleri erkek cinsiyetine bağlı polimorfik bant vermiştir. MADF5 primeri bireylerde test edildiğinde polimorfizm oluşmamıştır (Çizelge 4.6). MADF4 primerinin oluşturduğu polimorfik bant 1.450 kb seviyesindedir (Şekil 4.8, Çizelge 4.7). MADF6 primerinin oluşturduğu bant 1.300 kb seviyesindedir (Şekil 4.9, Çizelge 4.8).

Çizelge 4.6. SCAR primerlerinin oluşturduğu bant sayıları ve seviyeleri

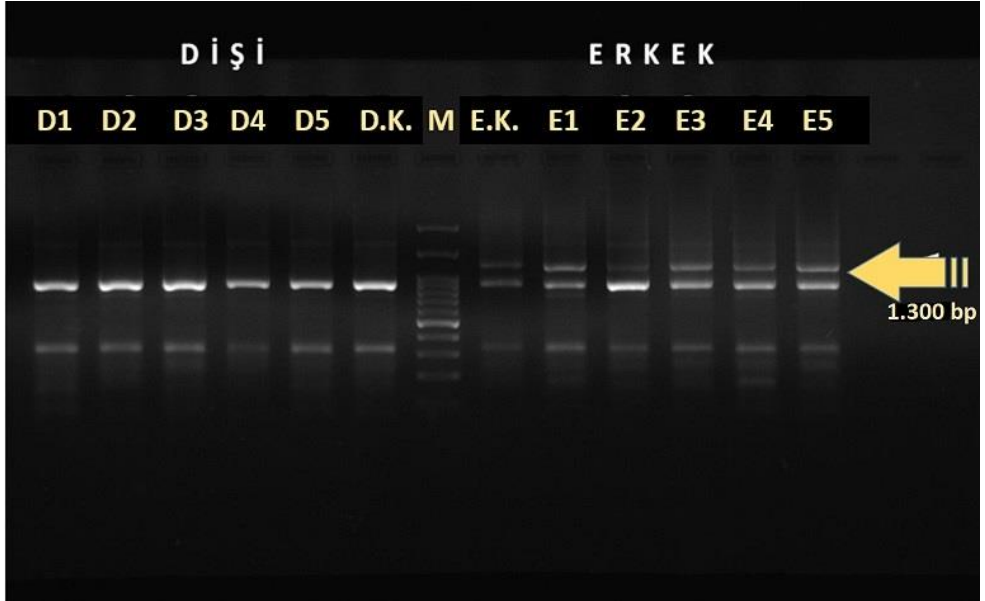
Primer	Toplam bant (adet)	Polimorfik bant (adet)	Bant Büyüklüğü (bp)
MADF1	7	0	2000-200
MADF2	5	0	1500-300
MADF3	3	0	1300-300
MADF4	4	1	1450-180
MADF5	7	0	2500-150
MADF6	5	1	1300-200
MADF7	6	0	1100-100
Toplam	42	2	



Şekil 4.8. MADF4 primerinden oluşan PCR ürününün jel görüntüsü (M: DNA standardı 100 bp, D.K: Dişi Küme, E.K.: Erkek Küme)

Çizelge 4.7. MADF4 primerinin PCR’da oluşturduğu bant deseni

D1	D2	D3	D4	D5	DK	M	EK	E1	E2	E3	E4	E5
0	0	0	0	0	0	1.450	1	1	1	1	1	1
0	0	1	0	1	1	390	1	0	0	0	1	0
0	0	0	0	1	1	250	1	0	0	0	1	1
0	0	0	0	1	1	150	1	0	0	0	1	1



Şekil 4.9. MADF6 primerinden oluşan PCR ürününün jel görüntüsü (M: DNA standardı 100 bp, D.K: Dişi Küme, E.K.: Erkek Küme)

Çizelge 4.8. MADF6 primerinin PCR'da oluşturduğu bant deseni

D1	D2	D3	D4	D5	DK	M	EK	E1	E2	E3	E4	E5
0	0	0	0	0	0	1.300	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	900	1	1	1	1	1	1
1	1	1	1	1	1	350	1	1	1	1	1	1
1	0	0	0	1	1	190	1	1	0	0	1	0

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bitki moleküler biyolojisi alanında yüksek kalitede DNA izolasyonu önemli adımlardan ilkidir. PCR temelli moleküler düzeydeki araştırmaların devamlılığını ve başarısını iyi miktar ve kalitede izole edilmiş DNA sağlar. Bitkiler, DNA çıkarılırken problemler yaratan ikincil metabolitler ihtiva eder (Nakum vd., 2019). Günüümüzde bitki dokularından nükleik asit elde etmek için birçok yöntem olmasına rağmen bunlar bu yöntemin ilk örneklerinden olan Dellaporta vd. (1983) ve Saghai-Marood vd. (1984) protokollerinin modifiye edilmiş halleridir. Doyle ve Doyle (1987, 1990)'un bulduğu protokol birçok bitkide iyi sonuçlar vermiştir.

Bu çalışma ile tescilli ve yerli 5 farklı dişi ve 5 farklı erkek dioik incir genotiplerinin DNA izolasyonları önce CTAB yöntemine göre 1.5 ml'lik Eppendorf® tüplerinde ve sonrasında değiştirilmiş CTAB+ SDS yöntemi ile 50 ml'lik Falcon® tüplerde yapılmıştır.

İncirde yapılan DNA izolasyon çalışmalarında genel olarak genç yaprakların kullanılması önerilmiştir. Böylelikle hem daha çok DNA elde edilebilmekte hem de bitkisel polisakkaritler, lipidler ve proteinler gibi DNA'ya bağlanan ve saflaştırılmasını zorlaştıran ikincil metabolitlerin miktarı genç yapraklarda az olduğundan DNA izolasyonu daha kolay olmaktadır (Ikegami vd., 2008; Aradhya vd., 2010; Dalkılıç vd., 2011).

Moleküler düzeyde yapılan çalışmalarda DNA'nın saflılığının 1.8-2.0 nm arasında olması ideal olarak nitelendirilmektedir. İlk izolasyondan elde edilen DNA örneklerinin saflık dereceleri 1.03 ile 1.21 nm arasında değişiklik göstermiştir. Bu durum ikincil metabolitlerce bulaşık DNA örnekleri elde edildiğinin göstergesidir. İncir bitkisi, incir sütü (lateks) denilen özünde içerdii fenoller ve flavanoidlerce bilinir (Vallejo vd., 2012). İncir bitkisindeki latekste bulunan proteolitik enzim 'ficin' buna iyi bir örnek olabilir (Starr vd., 2003). Bu tez çalışmasında, ilk yapılan PCR reaksiyonları sonrasında yapılan jel elektroforezi uygulamalarında primerlerin iyi bağlanamadığu kötü bant desenlerinden anlaşılmıştır. PCR için yeterli saflıkta DNA elde edilmesine rağmen stokta -4°C de saklanan bitki DNA'ları ile yapılan PCR ürünlerin jel elektroforezi resimlerindeki bantların bulanık (smear) olmaya başladıkları Eylül 2016'da gözlemlenmiştir.

DNA saflığı bu alanda yapılan önceki çalışmalarda (Khadari vd., 1995, Galderisi vd., 1999; Cabrita vd., 2001) taze yaprak kullanımına bağlı olarak daha iyiyken, yapılan bu çalışmada mecburi olarak yaşlı yaprak kullanılması nedeniyle yaşlı yaprakların içerisinde bulunan ikincil metabolitlerden dolayı yüksek saflıkta DNA elde edilmesini engellemiştir. Bu yüzden genç incir yapraklarında gayet iyi işleyen Dalkılıç vd. (2011) kullandıkları DNA izolasyon yöntemi Monsato Biotechnology Regulatory Sciences (2004) ve Murray ve Thompson (1980) yöntemleri ile kombine edilerek değiştirilmiş ve kullanılmıştır ,

Bu çalışmaya göre eğer incirde yaşlı yapraklar DNA materyali olarak kullanılacaksa PVP toz haline getirilen yapraklara yine toz halinde CTAB solüsyonundan önce eklenmelidir. Çünkü PVP solüsyon halinde eklendiğinde havanın soğukluğu nedeniyle donmaktadır. Ayrıca izolasyon basamakları yaşlı bitki dokuları ile çalışılırken 50 ml'lik Falcon® tüplerde daha büyük hacimli solüsyonlarla Materyal ve Yöntem bölümünde anlatıldığı şekliyle yapılmalıdır.

RAPD, SRAP ve SCAR primerleri ile cinsiyete bağlı bir gen bölgesi bulmak amacı ile yerli tescilli 5 farklı dişi ve 5 farklı erkek incir genotipi taranmıştır. Kullanılan RAPD ve SRAP primerleri ile monomorfik bantlar elde edilmesine rağmen dişi ve erkek genotipler arasında cinsiyete bağlı polimorfik bir bant elde edilememiştir.

Mori vd. (2017) çalışmasında elde edilen ve hali hazırda erkek cinsiyetine bağlı olduğu söylenen 7 adet RAPD-SCAR primerlerinin hepsi dişi ve erkek cinsiyet kümelerinde denenmiştir. Aynı SCAR primerleri kullanılmasına rağmen Mori vd. (2017)'nin çalışmasının aksine, bazı yerli incir çeşitlerinin kullanıldığı bu tez çalışmasında sadece iki primerin incirde erkek cinsiyet ile ilişkilendirilebileceği bulunmuştur. Küme açılım analizleri sonucunda öncelikle MADF4, MADF5 ve MADF6 primerlerinin PCR ürünlerinin jel görüntülerinde erkek cinsiyetine bağlı polimorfik bant elde edilmiştir. MADF1, MADF2, MADF3 ve MADF7 primerleri polimorfik bant(lar) oluşturmamışlardır. Sonrasında sadece küme açılım analizlerinde polimorfik bant veren primerler tüm dişi ve erkek çeşitlerde denenmiştir. Bunun sonucunda MADF5 primerinde gözlemlenen polimorfik bandın tek tek bireylerde oluşmadığı görülmüştür. İncirin ilk taslak genom diziliminin çıkartıldığı çalışmada Mori vd. (2017), 7 MADF SCAR belirtecinin

yer aldığı *RANI* genom bölgesinin muhtemelen cinsiyet ile ilişkili olduğunu belirtmektedirler.

MADF4 primeri 1.450 bp boyutunda erkek cinsiyetine %100 bağlı bir polimorfik bant oluşturmuştur. MADF6 primeri ise 1.300 bp boyutunda erkek cinsiyetine %100 bağlı polimorfik bant oluşturmuştur.

Bu çalışmanın uygulamada yerli incir ıslah çalışmalarına katkısı; tohumdan çoğaltılan ve gençlik kısırlığı devresi çok uzun süren (yaklaşık 5 yıl) incirde, çöğürlerde cinsiyetin erken dönemde belirlenebilmesi için MADF4 ve MADF6 SCAR primerleri %100 başarı ile kullanılabilir. Bu ve benzeri cinsiyete bağlı moleküler belirteçlerin ıslah çalışmalarında kullanılması incirde ıslah programlarının süresini kısaltabilecek, başarısını arttırabilecek ve maliyetini düşürebilecektir.

Cinsiyetle bağlantılı moleküler belirteçler bazı iki evcikli bitkilerde tanımlanmıştır. Bunların bir kısmının cinsiyet kromozomları yoktur. Cinsiyet otozomlar üzerindeki cinsiyeti kontrol ettiği düşünülen bölgeler tarafından belirlenmektedir. *Populus* spp., *Salix* spp. veya *Actinidia* spp. örneklerinde olduğu gibi kromozomların birbirinden fark edilmesi çok zordur.

Moleküler yöntemler, bitkilerde cinsiyetin büyüme ve gelişmenin herhangi bir aşamasında kolayca tanımlanması için değerli birer araç olarak kullanılabilir. DNA analizleri ile en zor durumlarda bile DNA'daki bir bazlık değişim belirlenerek bireyler birbirlerinden ayırt edilebilir. AFLP, RAPD, SRAP, SCAR, ISSR ve SSR analizleri gibi sistemler çeşit belirlemede kullanışlı birer araçtır. Ancak her bitkiye uygulanabilirlikleri kısıtlıdır. Bazı çabalara rağmen diok bitkilerin gençlik kısırlığı safhasında cinsiyetlerinin belirlenmesi için daha çok güvenilir ve hızlı metodlara ihtiyaç vardır.

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar ileride yapılacak yerli ve yabancı incir çeşitlerindeki cinsiyet belirlenmesi çalışmalarında yol gösterici olabilecektir.

KAYNAKLAR

- Ainsworth, C. 2005. Sex Determination in Plants. BIOS Scientific Publishers, Oxford, UK. 227 p. Taylor and Francis e-Library.
- Akaroğlu, Ő. N., Aksoy, U., Dolgun, O., Günver Dalkılıç, G., Őahin, N., Őahin, B. 2003. Aydın İli Erkek İncir (*Ficus carica* var. *caprificus* L.) Yetiştiriciliğinin Geliştirilmesi zerine Araştırmalar. TÜBİTAK TOGTAG-TARP-2574-6 no'lu proje raporu.
- Aksoy, U., Can, H. Z., Hepaksoy, S., Őahin, N. 2001. İncir Yetiştiriciliği. TÜBİTAK TARP Türkiye Tarımsal Araştırma Projesi Yay., İZmir, 45 s.
- Anonim, 2017. <http://www.fao.org>. Erişim tarihi: 26.12.2019.
- Anstett, M. C., Hossaert-McKey, M., Kjellberg, F. 1997. Figs and fig pollinators: evolutionary conflicts in a coevolved mutualism. **Trends in Ecology and Evolution**, 12(3): 94-99.
- Aradhya, M., E. Velasco, Koehmstedt, A. 2010. Genetic structure and differentiation in cultivated fig (*Ficus carica* L.). **Genetica**, 138(6): 681-694.
- Arif, I. A., Bakir, M. A., Khan, H. A., Ahamed, A., Al Farhan, A. H., Al Homaidan, A. A., Al Sadoon, M., Bahkali, A. H., Shobrak, M. 2010. A simple method for DNA extraction from mature date palm leaves: impact of sand grinding and composition of lysis buffer. **International Journal of Molecular Sciences**, 11(9): 3149-3157.
- An, H. J., Jin, S.-B., Kang, B. C., Park, H. G. 2008. Production of somatic hybrids between Satsuma mandarin (*Citrus unshiu*) and Navel Orange (*Citrus sinensis*) by protoplast fusion. **Journal of Plant Biology**, 51(3): 186-191.
- Armstrong, W. P. 2006. Sex determination and life cycle of *Ficus carica*. Aug. 2006. <https://www2.palomar.edu/users/warmstrong/pljun99b.htm>. Erişim tarihi: 15.08.2019.
- Asghari, Naghavi, M. R., Hosseinzadeh, A. H., Ranjbar, M., Poorebrahim, M. 2015. Sequence characterized amplified region marker as a tool for selection of high-artemisinin containing species of Artemisia. **Research in Pharmaceutical Sciences**, 10(5): 453-459.
- Baratakke, R. C., Patil, C. G., Poornima, B., Sankannavar, S.H. 2013. Molecular tool for sex identification (female) in *Momordica dioica* Roxb with

- reference to medicinal values. **International Journal of Ayurveda and Pharma Research**, 4(4): 487-490.
- Berg, C. C. 1989. Classification and distribution of *Ficus*. **Experientia**, 45(7): 605-611.
- Budak, H., Shearman, R. C., Parmaksiz, I., Gaussoin, R. E., Riordan, T. P., Dweikat, I. 2004. Molecular characterization of Buffalograss germplasm using sequence-related amplified polymorphism markers. **Theoretical and Applied Genetics**, 108: 328-334.
- Cabrita, L. F., Aksoy, U., Hepaksoy, S., Leitão, J. M. 2001. Suitability of isozyme, RAPD and AFLP markers to assess genetic differences and relatedness among fig (*Ficus carica* L.) clones. **Scientia Horticulturae**, 87(4): 261-273.
- Collard, B. C. Y., Mackill, D. J. 2008. Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, 363(1491): 557-572.
- Condit, I. J. 1969. *Ficus*: The exotic species. University of California, **Division of Agricultural Sciences**, California, 363 p.
- Çalışkan O. 2012. Türkiye’de sofralık incir yetiştiriciliğinin mevcut durumu ve geleceği. **Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi**, 26(2): 71-87.
- Dalkılıç, Z., Mestav, H. O., Günver-Dalkılıç, G., Kocataş, H. 2011. Genetic diversity of male fig (*Ficus carica caprificus* L.) genotypes with random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. **African Journal of Biotechnology**, 10(4): 519-526.
- De Masi, L., Cipollaro, M., Di Bernardo, G., Galderisi, U., Galano, G., Casciino, A., Grassi, G., Pavone, E., Simeone, A. 2003. Clonal election and molecular characterisation by RAPD analysis of the fig (*Ficus carica* L.) “Dottato” and “Bianco del Cilento” cultivars in Italy. **Acta Horticulturae**, 605: 65-68.
- Dellaporta, S. L., Wood, J., Hicks, J. B. 1983. A plant DNA miniprep: Version II. **Plant Molecular Biology Reporter**, 1(1): 19-21.
- Deputy, J. C., Ming, R., Ma, H., Liu, Z., Fitch, M. M. M., Wang, M., Manshardt, R., Stiles, J. I. 2002. Molecular markers for sex determination in papaya (*Carica papaya* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, 106(1): 107-111.

- Doyle, J. J., Doyle, J. L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, 19: 11-15.
- Doyle, J. F., Doyle, J. L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, 12: 13-15.
- Elisiário, P. J., Neto, M. C., Cabrita, L. F., Leitão, J. M. 1998. Isozyme and RAPDs characterisation of a collection of fig (*Ficus carica* L.) traditional varieties. **Acta Horticulturae**, 480: 149-154.
- Eroğlu, A. S. 1982. İncir Aratırmaları Projesi (İslah): İncir seleksiyonu. Erbeyli İncir Araştırma Enstitüsü, Aydın, Türkiye, p. 301.
- Filiz, E., Koç, İ. 2011. Bitki biyoteknolojisinde moleküler markörler. **GOÜ Ziraat Fakültesi Dergisi**, 28(2): 207-214.
- Flachowsky, H., Hanke, M. V., Peil, A., Strauss, S. H., Fladung, M. 2009. A review on transgenic approaches to accelerate breeding of woody plants. **Plant Breeding**, 128(3): 217-226.
- Flaishman, M. A., Peer, R., Freiman, Z. E., Izhaki, Y., Yablovitz, Z. 2017. Conventional and molecular breeding systems in fig (*Ficus carica* L.). **Acta Horticulturae**, 1173: 1-10.
- Flaishman, M., Rodov, V., Stover, E. 2008. The fig: botany, horticulture, and breeding. **Horticultural Reviews**, 34: 113-197.
- Francia, E., Rizza, F., Cattivelli, L., Stanca, A. M., Galiba, G., Toth, B., Pecchioni, N. 2004. Two loci on chromosome 5H determine low-temperature tolerance in a 'Nure'(winter) × 'Tremois'(spring) barley map. **Theoretical and Applied Genetics**, 108(4): 670-680.
- Frankel, O. H. 1974. Genetic conservation: our evolutionary responsibility. **Genetics**, 78(1): 53-65.
- Frodin, D. G. 2004. History and concepts of big plant genera. **TAXON**, 53(3): 753-776.
- Gao, W.J., Li, R.L., Li, Sh. F., Deng, Ch. L. Li, S.P. 2007. Identification of two markers linked to the sex locus in dioecious *Asparagus officinalis* plants. **Russian Journal of Plant Physiology**, 54(6): 816- 821.
- Goldschmidt, E. E., Lakso, A. N. 2005. Fruit tree models: scope and limitations. <https://economics.agri.huji.ac.il/pubs> Erişim tarihi: 15.08.2019.
- Güleç, T. E., Yıldırım, A., Sönmezoğlu, Ö. A. 2010. Bitkilerde markör destekli seleksiyon. **Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi**, 2: 67-79.

- Hanelt, P., Büttner, R., Mansfeld, R. 2001. Mansfeld's Encyclopedia of Agricultural and Horticultural Crops (except Ornamentals). Berlin, Germany, **Springer**, 3645 p.
- Harvey, C. F., McNeilage, M. A., Gill, G. P., Fraser, L. G. 1997. Sex determination in *Actinidia*. 1. Sex-linked markers and progeny sex ratio in diploid *A. chinensis*. **Sexual Plant Reproduction**, 10(3): 149-154.
- Hormaza, J. I., Dollo, L., Polito, V.S. 1994. Identification of a RAPD marker linked to sex- determination in *Pistachio vera* using bulked segregant analysis. **Theoretical and Applied Genetics**, 89: 9-13.
- Ikegami, H., Nogata, H., Hirashima, K., Awamura, M., Nakahara, T. 2008. Analysis of genetic diversity among European and Asian fig varieties (*Ficus carica* L.) using ISSR, RAPD, and SSR markers. **Genetic Resources and Crop Evolution**, 56(2): 201-209.
- Jamilena, M., Mariotti, B., Manzano, S. 2008. Plant sex chromosomes: molecular structure and function. **Cytogenetics and Genome Research**, 12: 255-264.
- Jeong, W. S., Lachance, P. A. 2001. Phytosterols and fatty acids in fig (*Ficus carica* var. Mission) fruit and tree components. **Food Chemistry and Toxicology**, 66: 278-281.
- Kafkas, S., Çetiner, S., Perl-Treves, G. D. S., R., Nissimlevi A. N. A. 2001. Development of sex-associated RAPD markers in wild *Pistacia* species. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, 76(2): 242-246.
- Kara, C. 2014. Nagami kamkatı aşısı kalemlerinin kobalt-60 ışınlamasına dayanımının belirlenmesi ve farklı genotiplerin RAPD belirteçleri ile tanımlanması. Yüksek Lisans Tezi (basılmamış). Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın, 47 s.
- Khadari, B. Lashermes, P. H., Kjellberg, F. 1995. RAPD fingerprints for identification and genetic characterization of fig (*Ficus carica* L.) genotypes. **Journal of Genetics and Breeding**, 49: 77-86.
- Khadari, B., I. Hochu, S. Santoni, A. Oukabli, M. Ater, J. P. Roger, Kjellberg, F. 2003. Which molecular markers are best suited to identify fig cultivars: a comparison of RAPD, ISSR and microsatellite markers. **Acta Horticulturae**, 605: 69-75.
- Khodaeiaminjan, M., Kafkas, E., Güney, M., Kafkas, S. 2017. Development and linkage mapping of novel sex-linked markers for marker-assisted

- cultivar breeding in pistachio (*Pistacia vera* L.). **Molecular Breeding**, 37: 98.
- Khosla, P. K., Kumari, A. 2015. Methods of sex determination in dioecious angiospermous plants. **Lakshya Journal of Science Management**, 1: 1-9.
- Kislev, M.E., Hartmann, A., Bar-Yosef, O. 2006. Fig early domesticated in the Jordan Valley. **Science**, 312(5778): 1372-1374.
- Landry, B.S., Michelmore, R.W. 1987. Methods and applications of restriction fragment length polymorphism analysis to plant. In: Kosige, T., Hollaender, A. (Eds.), *Tailoring Genes for Crop Improvement*. Plenum Publishing Corp., New York, pp. 25-44.
- Li, G., Quiros, C. F. 2001. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brassica*. **Theoretical and Applied Genetics**, 103: 455-461.
- Luo, F., van de Weg, E., Vanderzande, S., Norelli, J. L., Flachowsky, H., Hanke, V., Peace, C. 2019. Elucidating the genetic background of the early-flowering transgenic genetic stock T1190 with a high-density SNP array. **Molecular Breeding**, 32: 21.
- Machado, C. A., Jouselin, E., Kjellberg, F., Compton, S. G., Herre, E. A. 2001. Phylogenetic relationships, historical biogeography and character evolution of fig-pollinating wasps. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 268 (1468): 685-694.
- Matsunaga, S., Kawano, S. 2001. Sex determination by sex chromosomes in dioecious plants. **Plant Biology**, 3(5): 481-488.
- Mestav, H. O. 2005. Bazı erkek incir çeşitlerinin RAPD belirteçleri ile tanımlanması. Yüksek Lisans Tezi (basılmamış). Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın, 39 s.
- Michelmore, R. W., Paran, I., Kesseli, R. V. 1991. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, 88: 9828-9832.
- Ming, R., Bendahmane, A., Renner, S. S. 2011. Sex chromosomes in land plants. **Annual Review of Plant Biology**, 62: 485-514.

- Monsanto Biotechnology Regulatory Sciences. 2004. A recommended procedure for DNA extraction from plant tissues. Monsanto Company.
- Moreno-Alias, I., Rapoport, H. F., León, L., De la Rosa, R. 2010. Olive seedling first-flowering position and management. **Scientia Horticulturae**, 124(1): 74-77.
- Mori, K., Shirasawa, K., Nogata, H., Hirata, C., Tashiro, K., Habu, T., Kim, S., Kuhara, S., Ikegami, H. 2017. Identification of RAN1 orthologue associated with sex determination through whole genome sequencing analysis in fig (*Ficus carica* L.). **Nature Scientific Reports**, 7: 41124.
- Murray, M. G., Thompson, W. F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. **Nucleic Acids Research**, 8(19): 4321-4325.
- Nakum, A., Kuvad, R., Chudasama, K., Thaker, V. 2019. Protocol for DNA extraction and molecular characterization in medicinal plant *Carica papaya* L. varieties. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, 8(2): 514-520.
- Oruç, G. 2012. Kan portakallarının bazı çiçek tozu özelliklerinin incelenmesi ve Clementine × kan portakalı melezlerinin SRAP belirteçleri ile belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi (basılmamış). Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın, 83 s.
- Özen, M. 2007. İncir Yetiştiriciliği. T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü, Erbeyli İncir Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Yayınları, İncirliova, Aydın, 145 s.
- Papadopoulou, K., C. Ehaliotis, M. Tourna, P. Kastanis, I. Karydis, Zervakis, G. 2002. Genetic relatedness among dioecious fig (*Ficus carica* L.) cultivars by random amplified polymorphic DNA analysis, and evaluation of agronomic and morphological characters. **Genetica**, 114(2): 183-194.
- Paran, I., Michelmore, R. W. 1993. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. **Theoretical and Applied Genetics**, 85: 985-993.
- Parrish, T. L., Koelewijn, H. P., van Dijk, P. J. 2004. Identification of a male-specific AFLP marker in a functionally dioecious fig, *Ficus fulva* Reinw. ex Bl. (Moraceae). **Sexual Plant Reproduction**, 17: 17-22.
- Patel, A., McKey, D. 1998. Sexual specialization in two tropical dioecious figs. **Oecologia**, 115(3): 391-400.

- Puchooa, D., Venkatasamy, K. 2005. A Protocol for the isolation of DNA from *Trochetia boutoniana*. **International Journal of Agriculture & Biology**, 7: 82-85.
- Renner, S. S., Ricklefs, R. E. 1995. Dioecy and its correlates in the flowering plants. **American Journal of Botany**, 82(5): 596-606.
- Rønsted, N., Weiblen, G. D., Savolainen, V., Cook, J. M. 2008. Phylogeny, biogeography, and ecology of *Ficus* section *Malvanthera* (Moraceae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 48(1): 12-22.
- Saghai-Marooif, M.A., Soliman, K. M., Jorgensen, R. A., Allard, R. W. 1984. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, 81: 8014-8018.
- Sadder, M. T., Atteyyeh, A. F. 2006. Molecular assessment of polymorphism among local Jordanian genotypes of the common fig (*Ficus carica* L.). **Scientia Horticulturae**, 107(4):347-351.
- Sakai, A. K., Weller, S. G. 1999. Gender and sexual dimorphism in flowering plants: a review of terminology, biogeographic patterns, ecological correlates, and phylogenetic approaches. In: *Gender and Sexual Dimorphism in Flowering Plants*, Eds: M. A. Geber, T. E. Dawson, LF Delph, pp: 1-31. Springer, Berlin, 305 p.
- Saleeb, W. F. 1965. Genetics and cytology of syconium persistence in *Ficus carica*. Ph. D. dissertation (unpublished). University of California, Riverside, USA, 79 p.
- Sambrook, J. F., Russell, D. W. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd edition. Vol. 1. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, New York, NY, USA.
- Shirkot, P., Sharma, D. R., Mohopatra, T. 2002. Molecular identification of sex in *Actinidia deliciosa* var. *deliciosa* by RAPD markers. **Scientia Horticulturae**, 94: 33-39.
- Starr, F., Starr, K., Loope, L. 2003. *Ficus carica*. United States Geological Survey-Biological Resources Division. Maui, Hawaii: Haleakala Field Station.
- Storey, W. B. 1975. Figs. pp: 568-589. In: *Advances in Fruit Breeding*. Eds: J. Janick, J. N. Moore. Purdue University Press, West Lafayette, IN, USA.

- Sunil, K. S., Muthusamy, T., Kandasamy, K. 2012. DNA extraction protocol for plants with high levels of secondary metabolites and polysaccharides without using liquid nitrogen and phenol. **ISRN Molecular Biology**, 2012: 20504.
- Uzun, A. 2009. Turunçgillerde genetik çeşitliliğin SRAP markırları ile karakterizasyonu. Doktora Tezi (basılmamış). Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, 369 s.
- Vallejo, F., Marín, J. G., Tomás-Barberán, F. A. 2012. Phenolic compound content of fresh and dried figs (*Ficus carica* L.). **Food Chemistry**, 130(3): 485-492.
- Veberic, R., Colaric, M., Stampar, F. 2008. Phenolic acids and flavonoids of fig fruit (*Ficus carica* L.) in the northern Mediterranean region. **Food Chemistry**, 106: 153-157.
- Vinson, J. A. 1999. The functional food properties of figs. **Cereal Foods World**, 44(2): 82-87.
- Vinson, J. A., Zubik, L., Bose, P., Samman, N., Proch, J. 2005. Dried fruits: excellent in vitro and in vivo antioxidants. **Journal of the American College of Nutrition**, 24(1): 44-50.
- Welsh, J., McClelland, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**, 18(24): 7213-7218.
- Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., Tingey, S. V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, 18(22): 6531-6535.
- Zimmerman, R.H. 1973. Juvenility and flowering of fruit trees. **Acta Horticulturae**, 34: 139-142.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Ahmet Rıza AĞIR

Doğum Yeri ve Tarihi : Trabzon – -25.03.1988

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : Adnan Menderes Üniversitesi Ziraat Mühendisliği
Bahçe Bitkileri Bölümü

Yüksek Lisans Öğrenimi : Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Ana
Bilim Dalı Bahçe Bitkileri Bölümü

Bildiği Yabancı Diller : İngilizce

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

- a) Makaleler
 - SCI
 - Diğer
- b) Bildiriler
 - Uluslararası
 - Ulusal
- c) Katıldığı Projeler
- d)

İŞ DENEYİMİ

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl :

İLETİŞİM

E-posta Adresi : ahmet.riza.agir@gmail.com

Tarih : 27.12.2019