



T.C.
NECMETTİN ERBAKAN
ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



İNCİR (*Ficus carica* L.) GENOMUNDA
SEKANS TEMELLİ SSR (BASİT DİZİ
TEKRARI) MARKÖRLERİNİN
GELİŞTİRİLMESİ

Şeyma Nur ERDEĞER

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Ağustos -2019
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

TEZ KABUL VE ONAYI

Şeyma Nur ERDEĞER tarafından hazırlanan “İncir (*Ficus carica* L.) Genomunda Sekans Temelli SSR (Basit Dizi Tekrarı) Markörlerinin Geliştirilmesi” adlı tez çalışması 05/08/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan

Prof. Dr. Önder TÜRKMEN

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Ali Tevfik UNCU

Üye

Doç. Dr. Emrah TORLAK

İmza

.....

.....

.....

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. S. Savaş DURDURAN
FBE Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

Şeyma Nur ERDEĞER

Tarih:

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İNCİR (*Ficus carica* L.) GENOMUNDA SEKANS TEMELLİ SSR (BASİT DİZİ TEKRARI) MARKÖRLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ

Şeyma Nur ERDEĞER

Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Ali Tevfik UNCU

2019, 51+xi Sayfa

Jüri

Dr. Öğr. Üyesi Ali Tevfik UNCU
Prof. Dr. Önder TÜRKMEN
Doç. Dr. Emrah TORLAK

İncir, *Ficus carica* L. ($2n = 2x = 26$), dünya çapında tüketilen Moraceae ailesine ait bir meyvedir. İncir önemli bir tarım ürünüdür ve ekonomik değeri yüksektir. FAOSTAT'ın 2017 verilerine göre, Türkiye 305.689 tonla dünyanın en çok incir üreten ülkesidir. Bu çalışmanın amacı incir genomuna özgü ko-dominant, yeni ve çok sayıda SSR markörü geliştirmektir. Bu markörler kullanılarak Türk incir çeşitlerinin moleküler karakterizasyonu için bir veri kaynağı oluşturulabilir. Bu markörler ayrıca markör destekli ıslah, tohum sertifikasyonu, incir türlerinin korunması ve daha birçok moleküler çalışmada kullanılabilir.

Bu çalışmada *Ficus carica* L. genomu (BDEM00000000), NCBI veri tabanından indirilmiş ve GMATA programı kullanılarak incirde SSR markörü geliştirmek amaçlanmıştır. SSR bölgeleri araştırılırken şu parametreler kullanılmıştır; minimum tekrar sayısı:6, minimum-maksimum boy:3 nükleotid. SSR bölgelerinin sayısı 11287 olarak bulunmuştur. Bu bölgelerde en çok tekrar eden motifler AAT ve TTA 'dır. SSR bölgelerinden 9223 tane eşsiz SSR markörü geliştirilmiştir. Bu markör setleri ile e-PCR yapılmıştır. Ayrıca markörleri test etmek amacıyla kapiler elektroforez yapılmış ve 10 markörden 7 tanesi polimorfik bant üretmiştir. Bu markörlerin PIC değeri 0.47 ve markör başına polimorfik alel sayısı da 3.71 olarak bulunmuştur.

İncirde bulunan markörler Blast2GO programı kullanılarak Moraceae ailesine ait protein sekanslarıyla blast edilmiş 3333 markör bulunmuştur. 1824 markör de anotasyon edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: blast , *Ficus carica* L., gen anotasyonu, SSR markörleri, SSR geliştirme,

ABSTRACT

MS THESIS

DEVELOPMENT OF SEQUENCE BASED SSR (SIMPLE SEQUENCE REPEAT) MARKERS IN FIG (*Ficus carica* L.) GENOME

Şeyma Nur ERDEĞER

THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF
NECMETTİN ERBAKAN UNIVERSITY

THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
IN MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS

Advisor: Asst. Prof. Dr. Ali Tevfik UNCU

2019, 51+xi Pages

Jury

Asst. Prof. Dr. Ali Tevfik UNCU

Prof. Dr. Önder TÜRKMEN

Assoc. Prof. Dr. Emrah TORLAK

Fig, *Ficus carica* L. ($2n = 2x = 26$), is a worldwide consumed fruit that belongs to the Moraceae family. Fig is an important crop and has high economic value. According to FAOSTAT data in 2017, Turkey is most fig producer with 305,689 tonnes in the world. The aim of this study is to find co-dominant, new and a lot of SSR markers specific to the fig genome. Using markers can become a data source for molecular characterization of Turkish fig varieties. They can also be used in studies such as marker assisted selection, seedling certification, fig varieties protect and a lot of other molecular studies.

In this study, *Ficus carica* L. genome (BDEM00000000) were retrieved from NCBI database and used GMATA software to development of SSR markers in fig. For mining markers were used parameters; minimum repeat time: 6 and min.-max. length: 3. The number of SSRs found is 11287. The most repeated motifs are AAT and TTA. Developed 9223 unique SSR markers from this SSR regions. And also e-PCR was made with designed markers. And also capillary electrophoresis was performed to test the markers and 7 from 10 markers produced polymorphic bands. PIC value is 0.47 for these markers and the number of polymorphic alleles per marker was 3.71.

Blasted markers of fig *Ficus carica* L. with protein sequences of Moraceae family using Blast2GO software and finding 3333 markers. And also annotated 1824 markers.

Keywords: blasted, *Ficus carica* L., gene annotation, SSR development, SSR markers

ÖNSÖZ

Çalışmalarım ve yüksek lisans eğitimim süresince her türlü bilgi ve tecrübesini bizden esirgemeyen Sayın Dr. Öğr. Üyesi Ali Tevfik Uncu ve Dr. Öğr. Üyesi Ayşe Özgür Uncu hocalarıma teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca Sayın Doç. Dr. Emrah Torlak hocama çalışmalarımızda bize destek olduğu için teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimimde birlikte çalıştığım ve bu süreç boyunca birçok şeyi paylaştığım arkadaşım Fatıma ŞEN' e de teşekkür ederim.

Şeyma Nur ERDEĞER
KONYA-2019

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
ÖNSÖZ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ	ix
TABLolar LİSTESİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	2
2.1. İncir	2
2.1.1. İncirin besinsel değerleri ve kuru incir	3
2.1.2. İncirin dünya çapında ki dağılımı ve ekonomik değeri	5
2.1.3. İncir ve iklim koşulları	6
2.1.4. İncir meyvesinin büyümesi, gelişmesi ve olgunlaşması	6
2.1.5. Etilene yanıt	7
2.2. Moleküler Markörler	8
2.3. PCR Temelli Olmayan Markörler	9
2.3.1. RFLP (Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi)	9
2.4. PCR Temelli Markörler	9
2.4.1. Sekans spesifik olmayan PCR temelli teknikler	10
2.4.2. RAPD (Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA)	10
2.4.3. AFLP (Çoğaltılmış parça uzunluk polimorfizmi)	10
2.4.4. Sekans spesifik PCR temelli markörler	10
2.4.5. SNP (Tek nükleotit polimorfizmi)	11
2.4.6. RAMP (Rastgele çoğaltılmış mikrosatellit polimorfizmi)	11
2.4.7. SCAR (Sekansla karakterize çoğaltılmış bölgeler)	11
2.5. SSR Markörü	12
2.5.1. SSR markörlerinin oluşumu	14
2.5.2. SSR markörlerinin sınıflandırılması	15
2.5.3. SSR markörü geliştirmek	16
3. MATERYAL VE YÖNTEM	19
3.1. İncir Referans Genomu Kullanılarak Yeni Nesil SSR Markörlerinin Geliştirilmesi İçin Biyoinformatik Analizler:	19
3.1.1. Genom çapında SSR bölgelerinin keşfi	19
3.1.2. Markör geliştirme ve haritalama	20
3.2. Geliştirilen SSR markörlerinin Blast2GO programı kullanılarak blast ve gen anotasyonlarının yapılması:	23

3.3. DNA İzolasyonu:	23
3.4. SSR Markör Analizleri:	25
3.5. Kapiler Elektroforez	26
3.6. Darwin Programı ile Çeşitlilik Analizi	27
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA.....	28
4.1. GMATA Programı Kullanılarak SSR Bölgelerinin Keşfi ve Markör Geliştirilmesi:.....	28
4.2. Blast2GO Programı Kullanılarak Gen Fonksiyonlarının Belirlenmesi:	31
4.3. Geliştirilen SSR Markörlerinin İncir Genotiplerinde Test Edilmesi	36
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	40
KAYNAKÇA	41
ÖZGEÇMİŞ	51

ŞEKİLLER LİSTESİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Sarılop incirinin taze ve kuru hali	3
2.2. FAOSTAT 2017 verilerine göre dünyada ki incir üretiminin ülkeler bazında dağılımı	6
2.3. SSR markörlerinin alleler arası boy uzunluk polimorfizmi ve genotiplenmesi	12
2.4. Mikrosatelit geliştirme, dağılım ,fonksiyon ve uygulama alanlarını gösteren şema	13
2.5. SSR markörü geliştirme adımları	17
3.1. GMATA SSR bölgelerinin araştırılması	20
3.2. GMATA programında SSR markörü geliştirmek	21
3.3. GMATA programı e-Mapping(e-PCR)	22
3.4. GMATA programı çalıştırma iş akış şeması	23
4.1. <i>Ficus carica</i> L.'de geliştirilen SSR markörlerinin Moraceae ailesinin protein sekanslarıyla blast sonucu elde edilen dağılımı	32
4.2. Blast, anotasyon ve haritalanan markör sayılarının grafiksel gösterimi	32
4.3. Blast2GO anotasyon sonucu sekansların biyolojik proses, moleküler fonksiyon ve hücresel bileşim dağılımları	35
4.4. Markör 323, 4820, 5723'ün PCR sonucu incir genotiplerinde oluşturduğu polimorfik bantlar	37
4.5. Markör 2021 ile incir genotiplerinde yapılan PCR ürünlerinin kapiler elektroforezde yürütülmesi sonucu oluşan polimorfik pikler	38
4.6. DARwin programında Neighbor joining yöntemi ile SSR markörleri kullanılarak çizilen incir çeşitlilik ağacı	39

TABLULAR LİSTESİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Kuru incirde bulunan besin öğeleri ve değerleri	4
2.2. Bazı meyveler ve polifenol içerikleri	5
2.3. İncirde farklı sıcaklıklarda solunum ve etilen üretimi	8
2.4. Moleküler bitki genetiğinde kullanılan markörler ve özellikleri	9
3.1. PCR reaksiyonunda kullanılan markörlerin primer bilgileri	25-26
3.2. PCR amplifikasyonu için seçilen markörlerin SSR bölgelerinde motif ve sekans bilgileri	26
4.1. Genomda bulunma sıklığına göre ilk 10 SSR motifi ve sayıları	28
4.2. Tüm genom çapında en çok bulunan ilk beş SSR motiflerinin tekrar sayıları ve pozisyonları	29-30
4.3. Bulunan SSR bölgelerinin boyları ve genomda toplam bulunma sayıları	30
4.4. e-Mapping sonucu elde edilen sonuçlara göre markörlerin allel sayılarına göre bulunma oranları	32
4.5. 70% ve üzeri blast olan markörlerin etilenle ilişkili proteinlerle benzerlik yüzdesi	33
4.6. Markörler ve oksinle ilgili proteinlerle benzerlik yüzdesi	34
4.7. PCR amplifikasyonu için seçilen markörlerin anotasyon sonuçları ve yüzdeleri	35
4.8. Markörlerin polimorfik alel sayısı ve PIC değerleri	36

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

bç	: baz çifti
Mb	: mega baz
ml	:mililitre
µl	: Mikrolitre

Kısaltmalar

AFLP	:Amplified Fragment Length Polymorphisms
cDNA	: Complementary DNA
cpSSR	: cloroplastic SSR
DNA	:Deoxyribonucleic Acid
EST	:Expressed Sequence Tags
GMATA	:Genome-wide Microsatellite Analyzing Toward Application
HPLC	: high-performance liquid chromatography
MMR	: Mismatch Repair
mRNA	: Messenger RNA
mtSSR	: mitokondriyal SSR
NCBI	: National Center for Biotechnology Information
NGS	:Next-Generation Sequencing
nuSSR	:nükleer SSR
PCR	: Polymerase Chain Reaction(Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
RAPD	: Random Amplification of Polymorphic Dna
RFLP	:Restriction Fragment Length Polymorphisms
RNA	:Ribonucleic Acid
SCAR	:Sequence characterized amplified regions
SNP	:Single nucleotide polymorphism
SSR	:Simple Sequence Repeats (basit dizi tekrarları)
Tm	:Temprature melting
UV	:Ultraviyole

1. GİRİŞ

İncirin (*Ficus carica* L.) kökeni batı Asya ve Akdeniz bölgesine dayanır. Ülkemizin de içinde bulunduğu bu coğrafyanın karakteristik ve ekonomik değeri yüksek bir tarım ürünüdür. Türkiye dünya çapında taze ve kuru incir üretiminde merkez konumundadır. Ayrıca çok sayıda incir genetik kaynağını da bulundurması ülkemiz açısından önemli bir avantajdır.

İncir taşıdığı besin öğeleri açısından zengin bir meyve olması itibariyle hem uluslararası bilim dünyasında hem de ülkemiz tarımı açısından bilimsel yatırım yapılması gereken bir bitki türüdür. Ancak literatürde genomik düzeyde yapılmış çalışma sayısı domates, soya, zeytin gibi birçok tarım ürünü ile kıyaslandığında yok denilecek kadar azdır. Bu durumun başlıca sebebi incir genomuna ait DNA sekans bilgisinin az olmasıdır. Ancak 2017 yılında gerçekleştirilen ilk tüm genom DNA sekanslama çalışmaları sonucu bilimsel veri tabanlarında bilim insanlarının kullanımına açık draft incir genomu yüklenmiştir. Son yıllarda bitki moleküler genetiği çalışmalarında biyoinformatik araçların da kullanımının hızlı bir şekilde artmasıyla birlikte genom çapında yapılan analizler çoğalmıştır. Bu tezin en temel amacı biyoinformatik araçlar kullanılarak incir genomuna özgün ko-dominant, yeni ve çok sayıda SSR markörlerinin bilimsel literatürde ilk kez geliştirilmiş olmasıdır. Bu kapsamda GMATA programı kullanılarak çok sayıda SSR markörü geliştirilmiş ve aynı zamanda geliştirilen markörler Blast2GO programı kullanılarak analiz edilmiş ve gen fonksiyonları saptanmıştır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. İncir

İncir, *Ficus carica L.* ($2n = 2x = 26$), çapraz tozlaşan dünya çapında tüketilen, Moraceae ailesine ait bir meyvedir. Moraceae ailesi 60 cins ve 2000' den fazla ağaç, çalı ve bitki türünü barındırır. *Ficus* cinsi, yaklaşık 48 altcinsten sınıflandırılan 1000'den fazla tür içerir (İkten ve ark., 2018). İncir çoğunlukla Akdeniz bölgesinde yetişen ve insanlık tarihinin bilinen en eski ürünlerinden biridir (Haddou ve ark., 2018). Tarihi kökeni muhtemelen Güney Arabistan (Condit 1947; Zukovskij 1950; Storey 1975) ya da incir ağaçlarının yabani formlarının gözlemlenebildiği Türkiye ve İran da dahil olmak üzere Akdeniz bölgesinin doğusudur (Khoshbakht ve Hammer 2006).

İncir referans genomu 2017 yılında Mori ve ark. tarafından yapılan çalışmanın sonucunda NCBI veri tabanına yüklenmiştir. İncirin referans genomunun büyüklüğü 247.09 Mb' dir.

İncir iki farklı morfolojiye sahip gynodioecious (dişi çiçek ve hermafrodit çiçek içeren) bir türdür. Dişi ağaçlar meyvelerinde daha sonra yenilebilir incir haline gelecek olan çok sayıda dişi çiçek içerir. Kaprifig olarak adlandırılan ağaçlar ise dişi ağaçlarda ki dişi çiçeklerden daha kısa boyuncuğa sahip dişi çiçek ve erkek çiçek içerir. Sadece kaprifigler polen ürettiği için üreme sistemi fonksiyonel olarak iki evcikli (dioecious) (Kjellberg ve ark., 1987).

İncir sadece kendine özgü bir eşek arası (Agaonidae ailesine ait) tarafından tozlaştırılır. Ve bu eşekaraları sadece birlikte yaşadığı meyvenin içine yumurtlayabilir. Yani her iki türün de çoğalmak için birbirine ihtiyacı vardır (Janzen, 1979). İncirin tozlaşmasını sağlayan bu eşekarısı türü *Blastophaga psene L.*'dir (Wagner ve ark., 1999).

İncir ağaçları yaprak döken ağaçlardır ve çok hızlı büyürler. Ağacın odun yapısının kalınlığı azdır ve çabuk kırılır. Dallarının içinde bir öz bulunur. Bu öz bitkinin kırılan tüm yapılarından üretilir ve insan cildini rahatsız edici bir yapısı vardır. Olgunluğa ulaşmış ağaçların uzunluğu genotiplere göre değişmekle birlikte 3 ila 10 metre arasındadır (Stover 2007).

Türkiye incir genetik kaynakları açısından zengin bir çeşitlilik barındırır. Bu kaynak 272 adet dişi incir ve 58 adet erkek incir genotip veya çeşidinden oluşur. Ülkemiz ayrıca dünya çapında kaliteli bir kurutmalık incir üretim merkezidir. En başlıca

kurutmalık incirler Sarılop ve Sarı Zeybek'dir
(<https://arastirma.tarimorman.gov.tr/incir>).



Şekil 2.1: Sarılop incirinin taze ve kuru hali (<https://arastirma.tarimorman.gov.tr/incir>)

Ayrıca incir çeşitlerinin karakterizasyonu için moleküler markörler kullanılarak çok sayıda çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalardan bazıları şöyledir: SSR'ler (Khadari ve ark., 2001; Giraldo ve ark., 2005; ; 2008; Achtak ve ark., 2009; Çalışkan ve ark., 2012; Perez-Jimenez ve ark., 2012; Ganopoulos ve ark., 2015; Ferrara ve ark., 2016), AFLP'ler (Cabrita ve ark., 2001), RAPD'ler (Khadari ve ark., 1995; Galderisi ve ark., 1999; Cabrita ve ark., 2001; Papadopoulou ve ark., 2002; Chessa ve Nieddu, 2005; De Masi ve ark., 2005; Salhi-Hannachi ve ark., 2005; Sadder ve Ateyyeh, 2006), RFLP'ler (Khadari ve ark., 2005).

2.1.1. İncirin besinsel değerleri ve kuru incir

İncir, önemli miktarda protein, vitamin (özellikle A, C, K), mineral (magnezyum, manganez, kalsiyum, potasyum dahil) ve diyet lifi kaynağıdır. Ayrıca incir meyvesi 18 amino asit içerir ve aspartik asit, glutamik asit, prolin, alanin, serin, lösin miktar olarak en çok bulunanlardır (USDA Nutrient Database, Raw Figs).

Çalışkan ve Polat'ın yaptıkları çalışmada (2012), HPLC ile incirde ki baskın şekerlerin fruktoz (56%) ve glikoz (43%) olduğu belirlenmiştir. Fruktoz nispeten glikozdan daha tatlıdır (Setser 1993). Bu yüzden, incir genotiplerinin tatlılık durumu fruktozun oranına bağlıdır (Çalışkan 2011).

Koyu renkli incir türleri açık renklilere göre daha yüksek seviyede polifenol, antosiyanin ve daha yüksek bir antioksidan aktivitesi gösterir. Antioksidan aktivitesinin çoğu bileşeni, örneğin antosiyanin ve flavonoidler, incirin yüzeyinde bulunur. Siyanidin (incirde sadece antosiyanin) incirin yüzey renginin ana bileşenidir (Solomon ve ark. 2006).

İncir kuru ve taze şekilde tüketilebilir. Kuru incirin, birçok kullanışlı formu vardır. Hepsisi tüketici içindir ve endüstriyel ürünlerde macun, konsantre, nugget, toz ve küp şeklinde kullanılır. Genellikle, kuru incirlere küf oluşumunu ve maya fermentasyonunu engellemek için potasyum sorbat eklenir. İncirler sodyum, yağ ve diğer bitkiler gibi kolesterol (Tablo 2.1) içermez (Vinson, 1999).

Birçok incir kurutma metodu vardır. Bunlar; geleneksel güneşte kurutma, solar kurutma, mekanik dehidrasyon ve osmatik dehidrasyondur (Flaishman ve ark. 2008).

Tablo2.1. Kuru incirde bulunan besin öğeleri ve değerleri (Vinson, 1999)

Besinsel bileşen	100 g servis başına miktar	Günlük değer (%)
Toplam kalori	283	–
Yağdan gelen kalori	4.7	–
Toplam yağ	0.52 g	0
Doymuş yağ	0.0 g	0
Cholesterol	0.0 mg	0
Sodyum	12.26 mg	0
Potasyum	609 mg	7
Kalsiyum	133.0 mg	6
Demir	3.07 mg	6
Toplam karbonhidrat	66.16 g	9
Toplam besinsel lif	12.21 g	
Çözülemez	8.47 g	20
Çözülebilir	3.47 g	
Şekerler	49.0 g	–
Protein	3.14 g	–
Vitamin A	9.76 IU	<2
Vitamin C	0.68 mg	<2

Kuru incir ayrıca yaygın olarak tüketilen meyvelerin arasında polifenol konsantrasyonu (Tablo 2.2) en yüksek olan meyvedir(Miura ve ark. 1998).

Tablo 2.2. Bazı meyveler ve polifenol içerikleri (Miura ve ark. 1998)

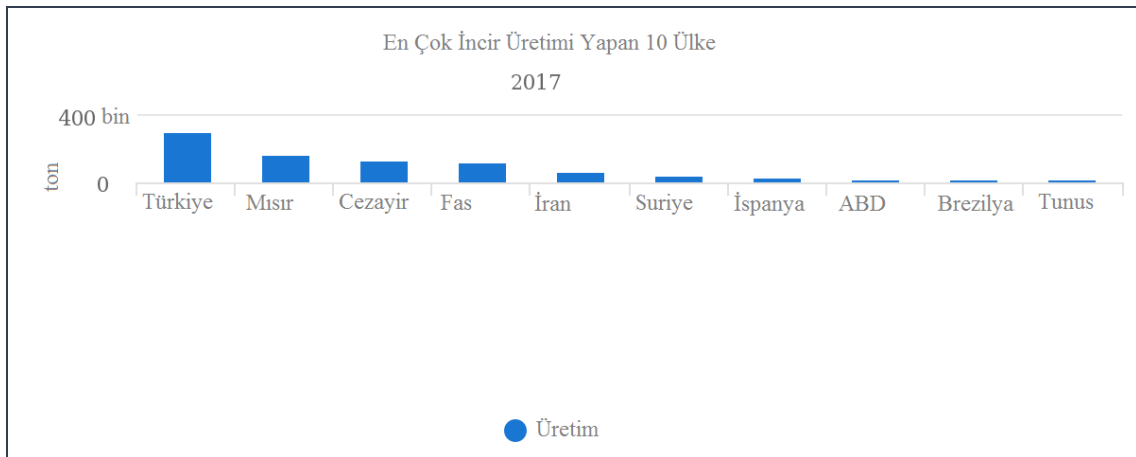
Meyveler (mg/100 g)	Toplam polifenoller
Elma	27–298
Yaban mersini	135–280
Kiraz	60–90
İncir	1.090–1.110
Üzüm	50–490
Greyfurt	50
Portakal	50–100
Erik	4–225
Çilek	38–218

İncirin meyvesi, kökü ve yaprakları birçok hastalığı tedavi etmek için geleneksel tıpta kullanılmaktadır. Bu hastalıklara sindirim sistemiyle ilgili, kolik (karın ağrısı), sindirim güçlüğü, iştah eksikliği ve diyare; solunum sistemiyle ilgili, boğaz ağrısı, öksürük ve bronş problemleri; kalp-damar hastalıkları; iltihap önleyici ve antispasmodik tedavi örnek olarak verilebilir (Duke, 2002; Werbach, 1993)

2.1.2. İncirin dünya çapında ki dağılımı ve ekonomik değeri

İncir Akdeniz bölgesinde ilk kültüre alınan meyvelerden biridir ve incir türleri için yabancı bir genetik kaynak birçok ülkede hala bulunmaktadır. Suriye ve Anadolu incir ağaçlarının doğal habitatıdır ve kuzey Afrika, İspanya, Meksika, Şili, Peru ve Kaliforniya'ya buradan transfer edilmiştir. Ayrıca Fransa yoluyla Güney Amerikaya ve Anadolu'dan Hindistan, İran ve Mezopotamya'ya taşınmıştır (Condit, 1947).

İncir ekonomik değeri yüksek bir üründür. 2017 yılında dünya incir üretimi 1.152.799 ton olmuştur ve bu üretimin en büyük payı 26% oranıyla (305.689 ton) Türkiye'ye aittir (Şekil 2.2). En çok üretim yapan diğer ülkeler sırasıyla Mısır, Cezayir, Fas, İran, Suriye Arap Cumhuriyeti, Amerika Birleşik Devletleri, Brezilya, İspanya ve Tunusur (FAOSTAT <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>).



Şekil 2.2. FAOSTAT 2017 verilerine göre dünyada ki incir üretiminin ülkeler bazında dağılımı

2.1.3. İncir ve iklim koşulları

İnciri büyütmek ve üretmek iklim koşullarıyla sıkı bir ilişki içindedir. Genellikle incir, en güzel Akdeniz bölgesinde ve kuru-sıcak iklimlerde büyür ve yüksek kalitede meyve oluşur. Sonbaharda sıcaklığın düşmesi, soğuk kış koşulları, gelişim sıcaklığının değişmesi ve yağmur, ağacın büyümesini ve ürün oluşumu etkiler. İncir sıcak çorak alanlarda büyüdüğünde, kış sıcaklığı 6-10 °C'ın üzerine çıktığında, yaprak dökümü olur ve dormansiden çıkar (Flaishman ve ark, 2008) .

İncir yaprak döken subtropikal ağaçlardır ve yazın sıcağından ziyade kışın düşük sıcaklıkları büyümesini daha çok sınırlandırır. Tipik incir yetiştirilen yerler sıcak ve kuru bir yaz, nispeten düşük nem ve ılıman bir kış ile karakterize bölgelerdir. Kış sıcaklıkları özellikle genç ağaçlar için -5 °C ve -10 °C arasında olduğunda don olayı görülerek ağaca zarar verebilir (Ferguson ve ark. 1990).İklim koşulları incirin boyutunu, şeklini, yüzeyini ve meyvenin etli kısmının rengini belirgin şekilde etkiler (Condit, 1947).

İncir ağaçları yüksek kalsiyum içerikli toprak, tuzluluk ve kuraklık gibi uç koşullara adaptasyon sağlayabilir (Aksoy, 1998; Golombek ve Ludder 1990).

2.1.4. İncir meyvesinin büyümesi, gelişmesi ve olgunlaşması

İncir meyvesinin (syconium) büyümesi üç farklı aşamadan meydana gelir. İlk aşama (periyod I) , büyümenin ilk altı haftası süresince, hızlı bir çap artışı ve yavaş şekilde şeker içeriğinde, kuru ve yağ ağırlık ve nem miktarında düşük bir artış gözlenir.

İkinci aşamada (periyod II) , birbirini izleyen sonraki dört hafta, büyüme çapında, nem miktarında, kuru ve yaş ağırlık oluşturma oranında bir düşüş olur. Bu aşama süresince şeker içeriğinde nispeten bir değişiklik gözlenmez. Büyümenin üçüncü aşamasında (periyod III), olgunlaşmadan önceki dört hafta boyunca, büyüme çapında, kuru ve yaş ağırlık oranlarında ve hem nem hem de şeker içeriğinde gözle görülür derece artış olur. Bu aşama boyunca olgunlaşmış meyvenin şeker içeriğinin 90%' dan fazlası oluşturulmuş olur. Ayrıca kuru ağırlığının 70%' den fazlası da bu aşama boyunca oluşturulur (Crisosto ve ark. 2011).

2.1.5. Etilene yanıt

İncir klimakterik bir meyvedir yani etilen üretimi yaparak meyve olgunlaşmasını sağlar ve bu özellik büyümenin üçüncü aşamasının başında pik yapar. Hasat öncesi etilen uygulaması meyve gelişiminin aşamalarına bağlı olarak farklı etkiler gösterir (Crane ve ark. 1970b; Marei ve Crane, 1971). Periyod I'de yapılan etilen uygulaması meyve gelişmesini engeller ve meyvenin dökülmesine yol açar. Periyod II' de yapılan etilen uygulaması, meyvenin gelişmesini indükler ve sonunda dökülmesine neden olur. Ayrıca bu aşamadaki uygulama, meyve tam olgunlaşmadan dış kabuk renginin değişmesine de neden olur, şeker ve tadı eksik olur ve unumsu bir yapıdadır. Etilen periyod II'nin sonunda ya da periyod III' te uygulanırsa büyüme ve olgunlaşmaya neden olur (Crane ve ark., 1970a, 1970b).

Hasat sonrası etilen uygulamasının (devamlı 10 ppm eklenmesi) ' Brown Turkey', 'Kadota' ve Sierra' incir genotiplerinde 0,5 ya da 20 °C' de saklandığında meyve kalitesine bir etkisi olmamaktadır. Etilen maruz bırakılan ve 20 °C' de saklanan olgunlaşmamış ' Brown Turkey' incirinin sadece mor yüzey renginin oranı etkilenmiştir ve mor renk yedi günde 8,3%' den 100% ' e artmıştır. (Crisosto ve ark. , 2007a). Sıcaklığın arttırılmasına bağlı olarak incirde ki etilen üretiminin ve solunumun artışı Tablo 2.3 'de verilmiştir (Crisosto ve ark. 2011).

Tablo 2.3. İncirde farklı sıcaklıklarda solunum ve etilen üretimi. (Crisosto ve ark. 2011)

Sıcaklık (°C)	Solunum (ml CO ₂ kg ⁻¹ hr ⁻¹)	Etilen üretimi (µl C ₂ H ₄ kg ⁻¹ hr ⁻¹)
0	2-4	0.4-0.8
5	5-8	0.8-1.5
10	9-12	1.5-3.0
20	20-30	4.0-6.0

2.2. Moleküler Markörler

Bitkilerde kullanılan çeşitli tipte moleküler markörlerin temel prensipleri ve yöntemleri farklılık gösterir (Tablo2.4). Araştırmacılar için ana zorluk, bu markörlerin bir veya daha fazlasını kendi amaçları için seçmekte yatar. İdeal genetik markör tipi yüksek derecede polimorfik olmalı, kodominant kalıtım göstermeli ve genom boyunca eşit olarak dağılmalıdır. Ayrıca, markör sekanslarının erişilmesi kolay olmalı ve analizler, laboratuvarlar, popülasyonlar ve/veya türler arasında düşük maliyetli, yüksek verimli, tekrarlanabilir ve aktarılabılır olmalıdır. Ne yazık ki, tüm bu gereksinimleri tam karşılayan markör türü mevcut değildir. Bununla birlikte, özel çalışma türüne göre, ihtiyaca en uygun olanı bulmak için farklı moleküler markör sistemleri arasından seçim yapılabilir. Çeşitli moleküler markörler arasında seçim yaparken bir dizi faktör dikkate alınmalıdır:

- (a) Markör sistemi kullanılabilirliği
- (b) Teknik gereklilikler ve zaman
- (c) Çalışma popülasyonunda ki tahmini polimorfizm seviyeleri
- (d) Mevcut DNA'nın miktarı ve kalitesi
- (e) Laboratuvar, popülasyon, pedigri ve türler arasında aktarılabılırlik
- (f) İncelenecek popülasyonun büyüklüğü ve yapısı
- (g) Kalifiye eleman ve araçların mevcudiyeti
- (h) Maliyet
- (i) Markör kalıtım metodu (örn. dominant vs codominant) ve popülasyonda ihtiyaç duyulan genetik bilginin türü (Staub ve ark. 1996 ; Rungis ve ark. 2005).

Tablo 2.4. Moleküler bitki genetiğinde kullanılan markörler ve özellikleri (Meksem K ve Kahl G, 2005)

Markör Tekniği	PCR Temelli Olması	Polimorfizim	Dominantlık	Verimlilik	Otomasyon	Maliyet
RFLP	Hayır	Düşük/Orta	Kodominant	Yüksek	Düşük	Yüksek
RAPD	Evet	Orta/Yüksek	Dominant	Düşük	Orta	Düşük
SCARS	Evet	Yüksek	Kodominant	Yüksek	Orta	Orta
AFLP	Evet	Yüksek	Dominant	Yüksek	Orta/Yüksek	Orta
SSR	Evet	Yüksek	Kodominant	Yüksek	Orta/Yüksek	Düşük

2.3. PCR Temelli Olmayan Markörler

2.3.1. RFLP (Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi)

RFLP hibridizasyona dayalı tek tekniktir ve kullanılan ilk moleküler markördür. Bu teknikte restriksiyon (kesim) enzimleri kullanılır ve bu enzimler izole edilen DNA da spesifik olarak tanıdıkları bölgelerden kesim yaparak farklı boylarda parçalar oluşturur. Aynı türün farklı bireyleri arasında oluşan bu boy farklılıklarının sebebi insersiyon (baz eklenmesi)-delesyon (baz çıkarılması), nokta mutasyonu, translokasyon (yer değiştirme), dublikasyon ve inversiyondur. Kesim enzimlerinin tanıma bölgelerinde eğer bir polimorfizm oluştuysa, enzim bu bölgeden kesim yapamaz. Eğer polimorfizm sadece bir kromozomda ki tek allelde oluştuysa bu durumda hem kesim yapılan bant hem de kesim yapılmamış bant oluşur ve bu markör için o bölge heterozigot olarak adlandırılır. Bu polimorfizmler agaroz veya poliakrilamid jelde DNA ürünlerinin yürütülmesi ve ayrılması sonucu tespit edilebilir (Nadeem ve ark. 2018).

2.4. PCR Temelli Markörler

Polimeraz zincir reaksiyonunda, seçici şekilde DNA parçalarının yanlarına sekansla örtüşen oligonükleotid primerler kullanılarak istenen sekans bölgesi çoğaltılır (Saiki ve ark. 1985).

PCR temelli teknikler, rastgele prime edilmiş (sekans spesifik olmayan teknikler)ve sekans spesifik teknikler olarak ikiye ayrılır (Agarwal, 2008).

2.4.1. Sekans spesifik olmayan PCR temelli teknikler

2.4.2. RAPD (Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA)

Bu teknik 1990 yılında birbirinden bağımsız iki ayrı grup Welsh ve McClelland, (1990) ve Williams ve ark.(1990) tarafından geliştirilmiştir. Bu teknikte tek, kısa ve rastgele bir oligonükleotit primer (10 nükleotit) kullanılarak PCR ile genomik DNA' nın amplifikasyonu yapılır. PCR sırasında amplifikasyon, hibridizasyon bölgelerine bağlanan primerlerin birbirine benzer ve ters yönde (forward ve revers primer) olduğunda gerçekleşir. PCR ürünü agaroz jel elektrodorezinde yürütülerek polimorfizm bantların var-yok durumuna göre değerlendirilir. DNA' nın miktarı ve kalitesi, magnezyum klorürün konsantrasyonu, PCR tamponu, annealing (tavlama) sıcaklığı ve DNA polimerazın tipi gibi önemli faktörler bu markörün tekrarlanabilirliğini etkiler (Nadeem ve ark. 2018). İncir çeşitlerinin moleküler karakterizasyonu için farklı markör teknikleri kullanılarak çok sayıda çalışma yapılmıştır.

2.4.3. AFLP (Çoğaltılmış parça uzunluk polimorfizmi)

AFLP markörü çift taraflı kesilmiş restriksiyon ürününün seçici çoğaltılmasına dayanır. PCR amplifikasyonu için spesifik primer bağlanma bölgesi olarak görev yapan restriksiyon fragmentlerinin ucuna bağlanan adaptörler kullanılır. Daha spesifik bir amplifikasyon için adaptör sekanslarına 1-3 arası nükleotit eklenebilir. AFLP markörlerinin tekrarlanabilirliği yüksektir. Farklı primer kombinasyonları ile amplifikasyon için tek restriksiyon kesimi kullanılarak üretilen marker sayısı sınırsızdır. Ancak bu markörlerin maliyeti yüksektir ve dominant kalıtım gösterirler. SSR' larda olduğu gibi yüksek çözünürlüklü elektroforeze ya da otomatik sekanslamaya ihtiyaç duyarlar (Jehan ve Lakhanpaul, 2006)

2.4.4. Sekans spesifik PCR temelli markörler

Yüksek verimli sekanslama teknolojilerinin gelişmesiyle birlikte, bir çok bitki türünün genomları için DNA sekansları hakkında bol miktarda bilgi üretildi (Goff ve ark., 2002; The Arabidopsis Genome Initiative 2000; Yu ve ark. 2002). Çok sayıda hasat ürünü için üretilen EST'ler ve binlerce sekans, güçlü biyoinformatik araçlar

kullanılarak varsayılan fonksiyonel genler açıklandı. Belirli fenotipler ile DNA dizi bilgisini ilişkilendirmek için diziye spesifik moleküler markör teknikleri tasarlandı (Agarwal, 2008).

2.4.5. SNP (Tek nükleotit polimorfizmi)

SNP'ler SSR ve RFLP markörlerinden sonra gelen üçüncü nesil moleküler markör teknolojisidir (Peter G., 2001). SNP'lerin temel avantajı, orta düzeyde bir maliyetle otomasyona uygun olarak yüksek verimli bir analiz için iyi potansiyele sahip olmalarıdır (Chen ve Sullivan, 2003). Tek nükleotit polimorfizmleri, bir popülasyonda ki normal bireylerde farklı sekans allellerinin var olduğu, genomik DNAda ki tek baz çifti pozisyonlarıdır. Burada ki allel frekansı en az 1% veya daha fazlası olmalıdır. SNP'leri tanımlamanın en direk yolu sekanslama analizleridir. Ayrıca EST veri tabanlarında arama, keserek test etme, moleküler markörler vs. kullanılarak da SNPler bulunabilir (Jehan ve Lakhanpaul, 2006).

2.4.6. RAMP (Rastgele çoğaltılmış mikrosatellit polimorfizmi)

PCR bazlı bu teknikte, genomik DNA ilk olarak isteğe bağlı primerler (RAPD) kullanılarak amplifiye edilir. Daha sonra bu amplifikasyon ürünleri elektroforetik olarak ayrılır, kurutulan jel mikrosatellit oligonükleotit problemleriyle hibridize edilir. Bu markörler kombine edildikleri için testin hızlı olmasını sağlarlar, yüksek hassasiyet, değişkenliğin tespiti ve önceden DNA sekans bilgisine gerek olmaması gibi birçok avantaja sahiptir (Joshi ve ark., 1999).

2.4.7. SCAR (Sekansla karakterize çoğaltılmış bölgeler)

SCAR'lar sekans spesifik oligonükleotit primerler kullanılarak PCR amplifikasyonu yoluyla tanımlanan genetik olarak belirlenmiş bölgelerde genomik DNA fragmentlerini temsil eden PCR temelli markörlerdir (Paran ve Michelmore 1993; McDermott ve ark. 1994).

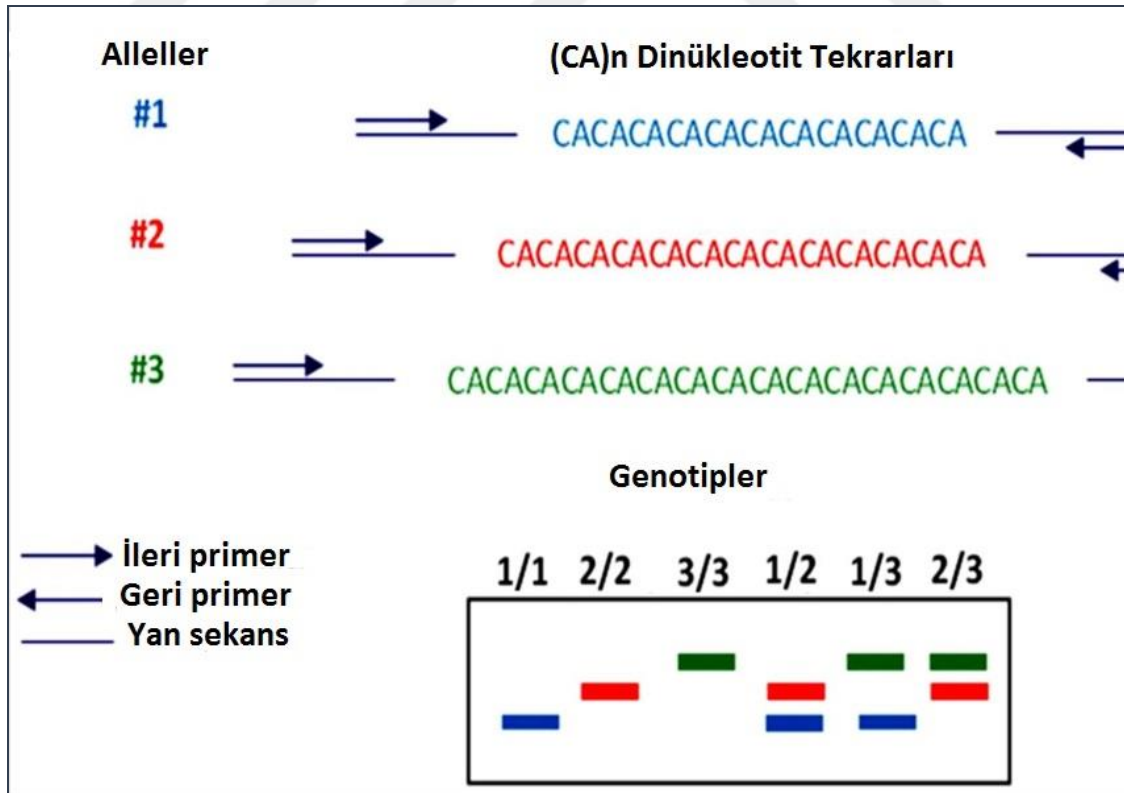
SCAR'ların türetilmesi rastgele prime edilmiş markör teknolojilerinin (RAPD ve AFLP) amplifiye ürünlerinin klonlanmasını içerir ve bu klonlama ürünlerinin iki ucu

sekanslanır. Bu sekans 15-30 nt spesifik primer çiftleri (klonlanan parçalara benzer boyda tek ana bantları amplifiye eden) tasarlamak için kullanılır (Agarwal, 2008).

Bu markörde bandın varlığı ya da yokluğu sekansta ki değişimi gösterir. SCAR markörleri genellikle dominant markörlerdir, ama onların bazıları restriksiyon enzimleriyle kesilerek ko-dominant markörlere dönüştürülebilir (Joshi ve ark, 1999).

2.5. SSR Markörü

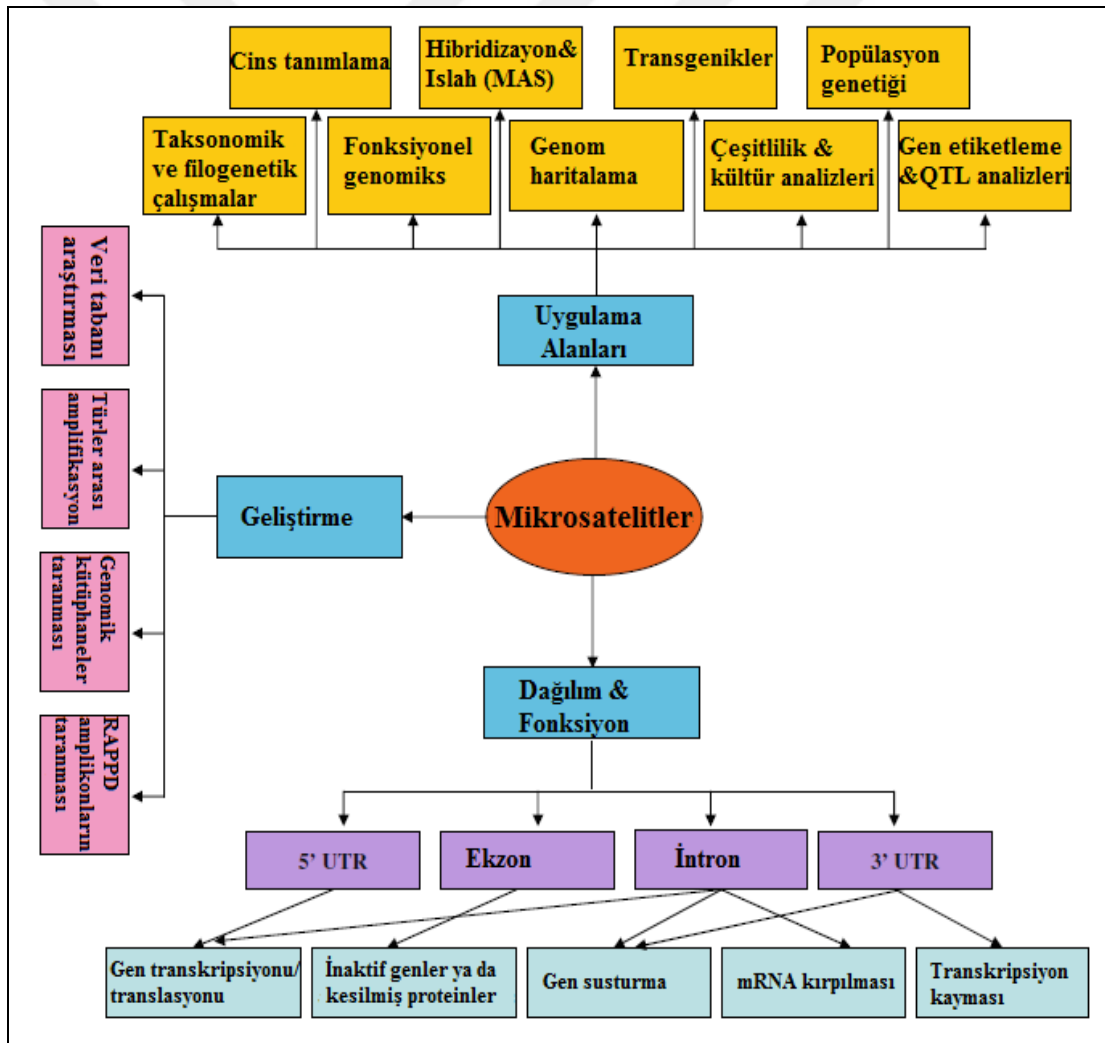
Moleküler bitki genetiğinde çeşitli markörler kullanılmaktadır(RFLP, RAPD, AFLP, SSR, SNP gibi) (İkten ve ark. 2018). Bitkilerde kullanılan çeşitli tipte moleküler markörlerin temel prensipleri ve metodolojileri farklılık gösterir. Çalışmaya uygun olan moleküler markör tipi seçilmelidir. Bu tez çalışmasında SSR markörleri geliştirilip, çalışılacaktır. Basit dizi tekrarları olarak bilinen SSR'lar (mikrosatellitler), genomda çok sayıda bulunur ve 1-6 nükleotitten oluşan art arda tekrar eden (Şekil 2.3) motiflerdir(Beckmann ve Weber, 1992). SSRlar nükleer genom boyunca hem kodlanan hem de kodlanmayan bölgelerde dağılım gösterir (Kalia ve ark. 2011).



Şekil 2.3. SSR markörlerinin alleler arası boy uzunluk polimorfizmi ve genotiplenmesi (Anonim)

SSR markörleri bitki genetiğinde ve ıslahında büyük öneme sahiptir. Bu önemin sebebi onların hiperdeğişkenlik, çok allelik doğa, tekrarlanabilirlik, ko-dominant kalıtım, bol sayıda bulunma, genom boyunca dağılım(organel genomları da dahil), kromozoma özgü yerleşme, otomasyona uygunluk ve yüksek verimli genotipleme özelliklerinden kaynaklanır(Parida ve ark. 2009).

SSR'ler yabancı türler için genetik uzaklık temelinde yapılan çeşitlilik çalışmalarında, gen akışı ve crossing-over oranlarının tahmininde, evrimsel çalışmalarda; kültüre alınmış bitkilerde ise bağlantı haritaları oluşturmak, QTL çalışmalarında , genotipler arası akrabalık dercesinin belirlenmesi, markör destekli ıslah ve DNA parmak izi (fingerprint) çalışmalarında (Şekil 2.4) kullanılmaktadır (Jonah ve ark. 2011; Kalia ve ark., 2011).



Şekil 2.4. Mikrosatelit geliştirme, dağılım, fonksiyon ve uygulama alanlarını gösteren şema (Kalia ve ark. 2011).

2.5.1. SSR markörlerinin oluşumu

SSR evrimi, yani SSR'deki tekrar sayısında artış veya azalma ile sonuçlanan herhangi bir değişiklik, mutasyon oranı ile ilişkilidir. Mikrosatellit oluşumu evrimsel olarak dinamik bir süreçtir ve son derece karmaşık olduğu kanıtlanmıştır (Ellegren 2004; Pearson ve ark. 2005). Mikrosatellit oluşumu için olası açıklamalar şöyledir; tek iplikli DNA kayması, çift iplikli DNA rekombinasyonu (eşit olmayan crossing-over ve gen dönüşümü), uyumsuzluk / çift iplik kopması onarımı ve retro-transpozisyon. DNA replikasyonu sırasında DNA polimeraz III' ün DNA kalıp zincirinde ki tekrarlanan bölgede kayması, yeni oluşturulan DNA zincirinde, hatalar onarılmazsa, tekrarlanan bölgenin genişlemesine veya daralmasına neden olabilir (Wang ve ark. 2009a). Slip-strand (iplik kayması) yanlış eşleştirme hataları, yanlış eşleşme onarımı (MMR) ile düzeltilir, dolayısıyla SSR stabilitesi, DNA kayması ve MMR sisteminin etkinliği arasında ki bir dengeye bağlıdır. MMR geni mutasyona uğradığında veya arızalı olduğunda, SSR instabilitesi artar. Li ve ark. (2002), bozuk MMR ve insan kanserine bağlı SSR kararsızlığı arasındaki ilişkiyi gözden geçirmişlerdir. Ayrıca, UV ışınlanması, c-irradiasyonu ve oksidatif stres gibi dışsal stresin neden olduğu DNA hasarı, kayma mutasyonlarını tetikleyebilir ve SSR'lerde mutasyon oranlarını arttırabilir (Jackson ve ark. 1998; Chang ve ark. 2002; Li ve ark. 2002; Trifonov 2003). Kayma ve nokta mutasyonları arasındaki denge de SSR'lerin dengeli dağılımı için önemlidir (Kruglyak ve ark. 1998; Ellegren 2002). Replikasyon kayması mikrosatellit bölgesinde büyümeyi arttırır, oysa nokta mutasyonu uzun bir tekrar dizisini iki veya daha kısa parçalara ayırır. Bu nedenle kayma ve nokta mutasyonlarının göreceli frekanslarındaki değişiklikler, bir genomdaki SSR'lerin dağılımı üzerinde doğrudan etkiye sahip olabilir (Li ve ark. 2002) ve daha uzun SSR'lere yol açan daha yüksek bir kayma oranına neden olabilir (Kruglyak ve ark. 1998). Kayma ve rekombinasyonun etkileşimi de SSR stabilitesini etkileyebilir (Li ve ark. 2002). Retrotranspozonlar, herhangi bir RNA molekülünden ters transkribe edildikten sonra kromozomlara yerleştirilen tekrarlayan DNA parçalarıdır. Mikrosatellit geliştirilmesine, bir kısım sekanslanmış insan ve pirinç genomu DNA'sının analizi ile retro-transpozisyon olayları eşlik etmiştir (Nadir ve ark. 1996; Temnykh ve ark. 2001). Genler arasındaki retrotranspozonların yerleştirilmesi ve birikmesi, muhtemelen bitki genomunun genişlemesinde önemli bir rol oynamıştır (Bennetzen 2000). Yabani buğdayda, ortalama tekrar uzunluğu ile sentromerden SSR lokus mesafesi arasındaki etkileşimin, SSR lokusundaki tekrar boyutundaki allel sayısı ve varyasyonu üzerinde

güçlü bir etkiye sahip olduğu bildirilmiştir. Bu etkinin, rekombinasyon bağımlı DNA onarımı sırasında replikasyon kaymasının olası etkisini yansıtabileceği önerilmiştir (Li ve ark. 2000).

2.5.2. SSR markörlerinin sınıflandırılması

Mikrosatellitler, büyüklüklerine, tekrar birim tipine ve genomdaki konumuna bağlı olarak çeşitli şekilde sınıflandırılmıştır. Tekrar motifi başına nükleotid sayısına bağlı olarak, SSR'ler mono-, di-, tri-, tetra-, penta- veya heksanükleotitler olarak sınıflandırılmıştır. Tekrarlama motiflerinde nükleotidlerin düzenlenişine bağlı olarak, Weber (1990), sınıflandırma için mükemmel, kusurlu ve bileşik mikrosalit terimlerini kullanmış ve Wang ve ark. (2009a) mikrosatellitleri basit, basit kusurlu, bileşik mükemmel veya bileşik kusurlu olarak sınıflandırmıştır. Kusursuz tekrarlar, tek bir tekrar motifinin art arda dizileridir, kusurlu tekrarlar ise, bazı yerlerde tekrarlamayan motifler sayesinde mükemmel tekrarlar kesintiye uğrar. Bileşik mikrosatellitlerde, çeşitli konfigürasyonlarda iki temel tekrar motifi birlikte bulunur.

Genomik SSR'lerin çoğu nükleer SSR'lerdir, ancak mikrosatitler mitokondri ve kloroplastlarda da bulunur. Genomda ki yerlerine göre, mikrosatellitler nükleer (nuSSR), mitokondriyal (mtSSR) veya kloroplastik SSR'ler (cpSSR) olarak sınıflandırılabilir. Weising ve Gardner (1999) Nicotiana'da kloroplastik SSR'leri (cpSSR) keşfettikleri sırada, Soranzo ve ark. (1999) Pinus türlerinde mitokondriyal SSR'leri (mtSSR) keşfetmiştir.

Son yıllarda, cpSSR'ler, doğal popülasyonlardaki genomik varyasyonları ve doğal popülasyonlardaki gen akışını (Provan ve ark. 2001) araştırmak için yaygın olarak kullanılmıştır. Ayrıca, yapılacak bir karşılaştırma biparental (nuSSR) ve uniparental (organellar yani cpSSR ve mtSSR) markörler ile saptanan değişkenlik modelleri aynı zamanda popülasyon ve evrimsel biyologlar için bilgi sağlayabilir (Powell ve ark. 1996).

2.5.2.1. Tekrar başına nükleotid sayısına göre

- Mononükleotit (A)_n
- Dinükleotit (CA)_n
- Trinükleotit (CGT)_n

- Tetranükleotit (CAGA) n
- Pentanükleotit (AAATT) n
- Heksanükleotit (CTTTAA) n (n = değişkenlerin tekrar sayısı)

2.5.2.2. Tekrar motiflerindeki nükleotidlerin düzenlenişine göre

- Saf veya mükemmel veya basit mükemmel (Pure or perfect or simple perfect) (CA) n
- Basit kusurlu (Simple imperfect) (AAC) n ACT (AAC) n + 1
- Bileşik veya basit bileşik (Compound or simple compound) (CA) n (GA) n
- Kesilmiş veya kusurlu veya bileşik kusurlu (Interrupted or imperfect or compound imperfect) (CCA) n TT (CGA) n + 1

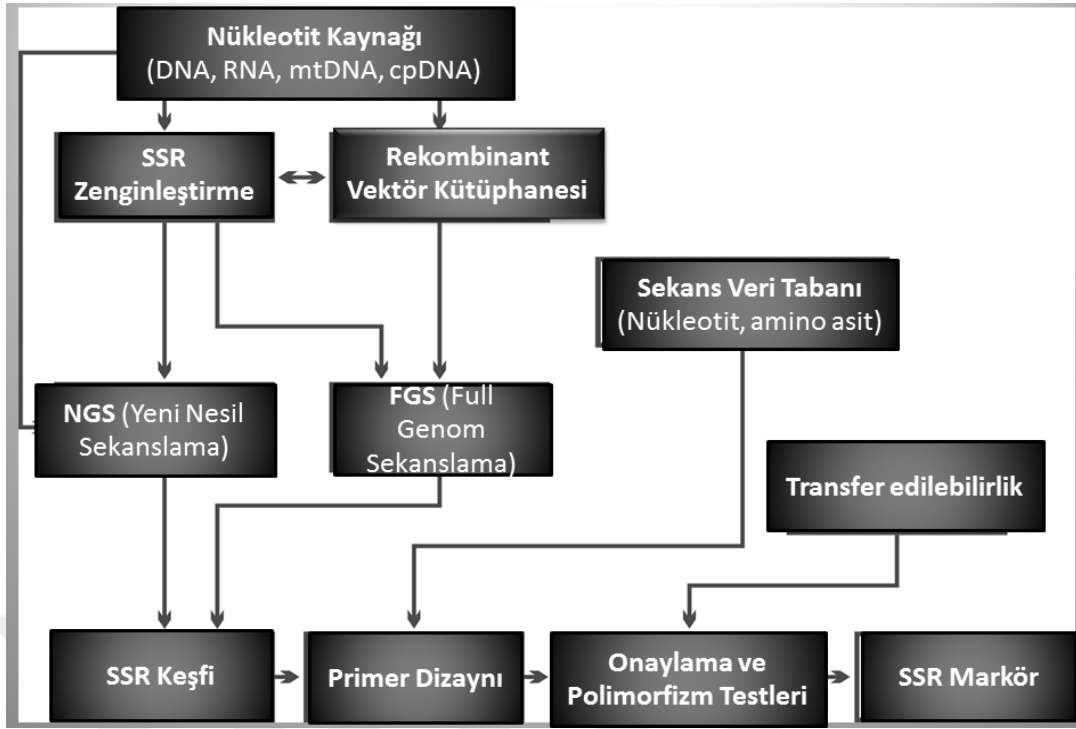
2.5.2.3. Genomdaki SSR'lerin konumuna göre

- Nükleus (nuSSRs)
- Kloroplastik (cpSSRs)
- Mitokondriyal (mtSSRs)

2.5.3. SSR markörü geliştirmek

SSR markörlerinin gelişimi temel olarak aşağıdaki aşamalara ayrılabilir: (i) SSR'lerin meydana geldiği nükleotid dizilerinin önceden bilgisi; (ii) SSR'yi kuşatan bölgelere tamamlayıcı olan oligonükleotitlerin (veya primerlerin) tasarımı; (iii) PCR ile primerleri doğrulama ve reaksiyon ürününün elektroforez ve bireyler (Mason, 2015) arasındaki polimorfizmlerinin (iv) tespiti.

Bir SSR markörünü geliştirmek için aşağıda Şekil 2.5'de ki şema izlenebilir.



Şekil 2.5. SSR markörü geliştirme adımları (Vieira ve ark. 2016)

Mikrosatellitler orijinal olarak bitki genomlarının hem kodlanan hem de kodlayıcı olmayan bölgelerinden geliştirilmiştir ve çeşitli DNA kütüphaneleri (SSR için zenginleştirilmiş genomik, genomik, bakteriyel yapay kromozom ve cDNA kütüphaneleri) dahil olmak üzere SSR'leri aramak için çeşitli kaynaklar (İfade edilmiş sekans etiketi (EST) veri tabanları da dahil olmak üzere açık veri tabanları gibi) kullanılmıştır (Hanai ve ark. 2007).

SSR'lerin araştırılmasında ilk adım, zenginleştirilmiş genomik kütüphanelerin oluşturulmasını ve çeşitli zenginleştirme yöntemlerinin başarılı bir şekilde geliştirilmesini içermektedir (Billotte ve diğerleri, 1999; Maio ve Castro, 2013). Genomik kütüphaneleri oluşturmak ve dizilemek için DNA parçalara ayrılır, adaptörlere bağlanır ve *Escherichia coli*'nin dönüştürülmesi için vektörlere eklenir. Çoğu protokol, seçici hibridizasyon, PCR veya her iki teknik kullanılarak elde edilebilen tekrarlayan sekanslar için zenginleştirme aşamasını içerir (Senan ve ark., 2014). Hibridizasyon ile zenginleştirmede, pozitif klonlar radyoaktif veya kimyasal olarak etiketlenmiş SSR problemleri kullanılarak tespit edilir. Son olarak, bu klonlar PCR amplifikasyonu ve dizileme ile seçilir (Semagn ve ark., 2006; Blair ve ark., 2009). Bir kütüphaneyi zenginleştirmenin diğer bir yolu, streptavidin kaplı tanecikler tarafından yakalanan

biyotinlenmiş SSR problemleri kullanılmaktadır (Nunome ve ark., 2006). Yakalanan DNA elüe edilir, çoğaltılır, klonlanır ve dizilenir.

Şu anda, 454 ve Illumina, SSR belirteçleri geliştirmek için en yaygın kullanılan NGS platformlarıdır. Bununla birlikte, PacBio SMRT dizileme teknolojisi, mikrosatellitlerin keşfedilmesi için ekonomik olarak uygun bir alternatif olarak kabul edilmektedir (Grohne ve ark, 2013).

Ficus carica L. için mikrosatellit markörleri geliştirilmesi daha önce sadece beş çalışmada yapılmıştır (Khadari ve ark. 2001; Giraldo ve ark.. 2005; Bandelj ve ark. 2007; Garcia ve ark. 2012; Knap ve ark. 2016).

Khadari ve ark. (2001) TC ve TG motifleri için zenginleştirilmiş genomik kütüphaneri taramışlar ve 8 adet polimorfik markör bulmuşlardır. Giraldo ve ark. (2005) CT/AG tekrar motifleri için zenginleştirilmiş genomik kütüphaneleri kullanarak 26 adet polimorfik SSR, Bandelj ve ark. (2007) GA/TC ve GT/AC motifleri için zenginleştirilmiş genomik DNA kütüphanelerini kullanarak 15 tane, Garcia ve ark. (2012) yaptıkları çalışma da *Ficus carica* L.'nin de içinde bulunduğu 5 *Ficus* türünde 20 adet mikrosatellit markörü, Knap ve ark. (2016) GA/TC ve GT/AC motifleri için zenginleştirilmiş genomik kütüphanelerden 16 adet SSR markörü geliştirmişlerdir.

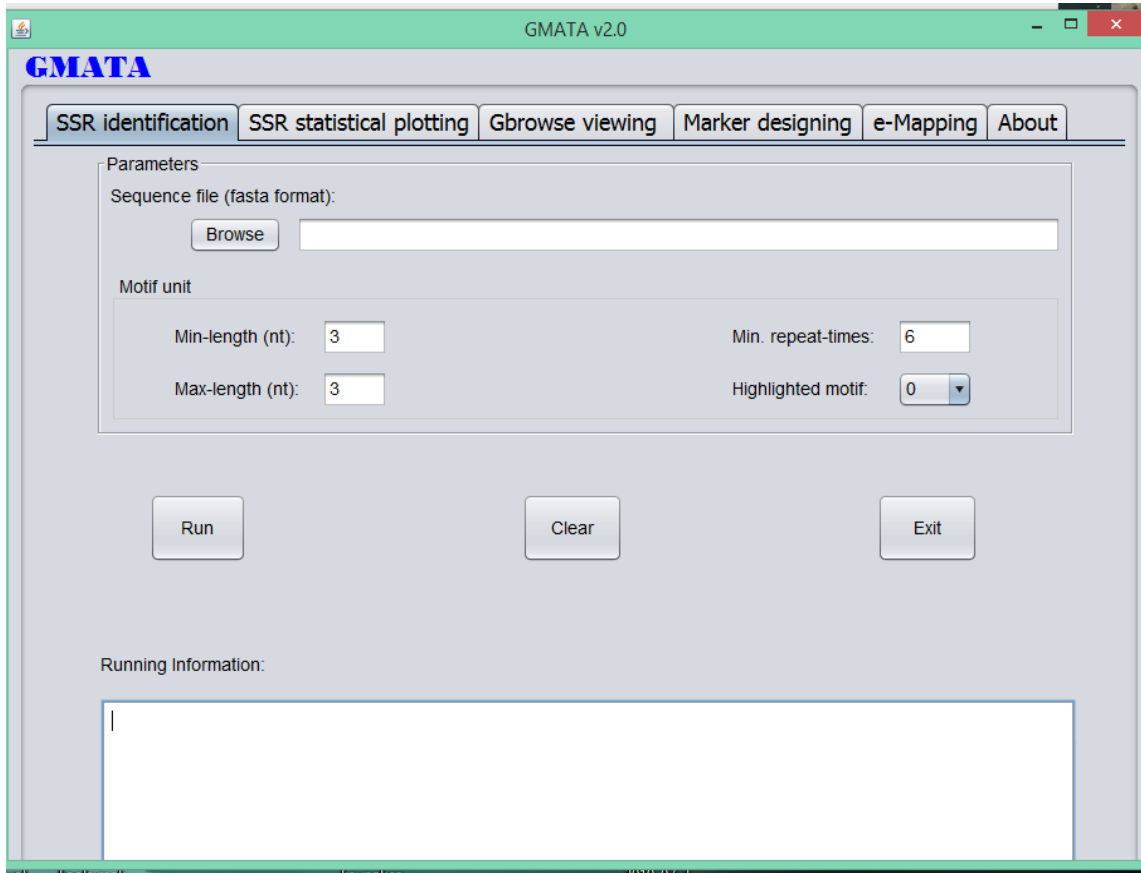
3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. İncir Referans Genomu Kullanılarak Yeni Nesil SSR Markörlerinin Geliştirilmesi İçin Biyoinformatik Analizler:

3.1.1. Genom çapında SSR bölgelerinin keşfi

İncir referans genomu Mori ve ekibi tarafından 2017 yılında yayınlanmış olup genomun son draft hali (BDEM000000000) 2018 yılında NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=figus%20carica>) veritabanında erişime sunulmuştur. Önerilen incir genomuna ait DNA dizi bilgisi FASTA formatında indirilerek imperfect ve perfect SSR markörlerinin tespiti için biyoinformatik analizlere tabi tutulmuştur. Biyoinformatik analizler için kullanılan araçlar ve izlenen yöntem aşağıda verilmiştir.

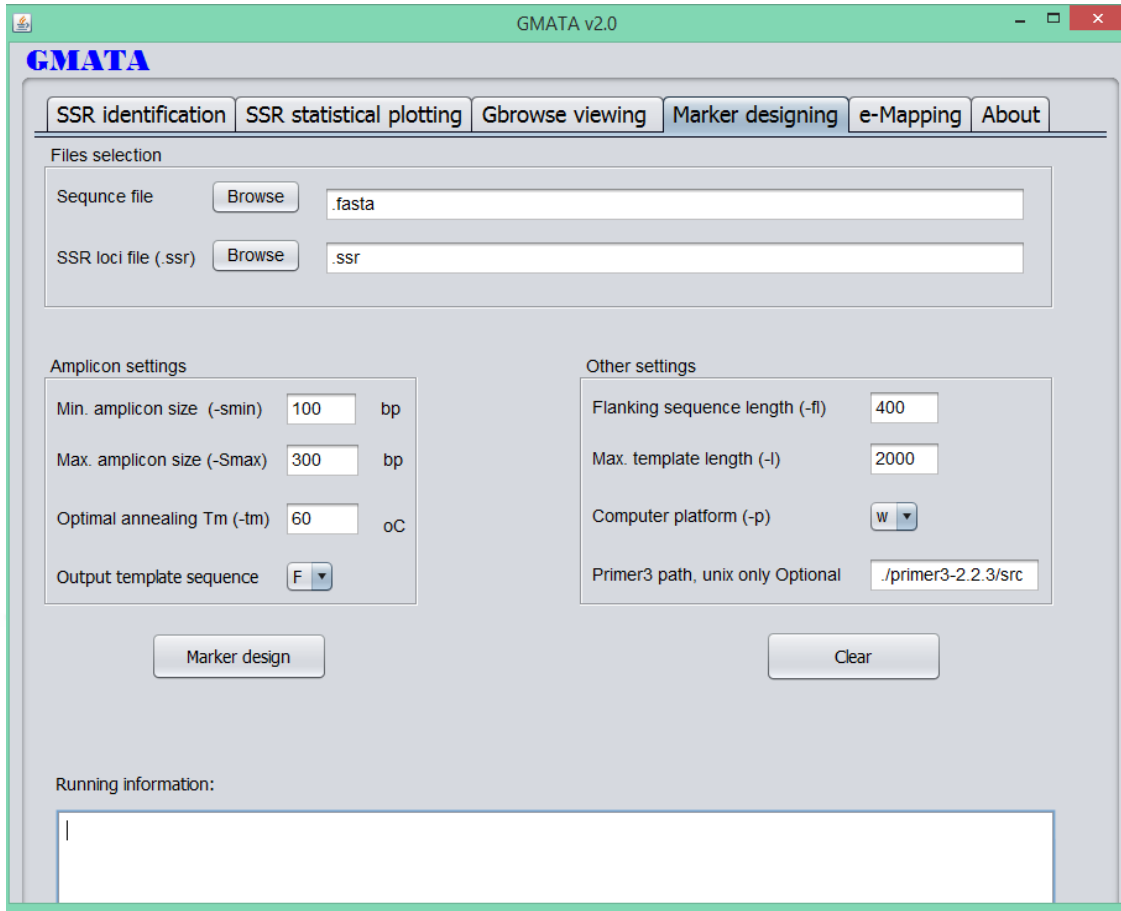
Illumina GAIIx, MiSeq ve HiSeq 2000 gibi yeni nesil sekanslama platformları kullanılarak geliştirilen incir referans genomu (Mori ve ark. 2017) GMATA (Wang X ve Wang L. 2016) yazılımı kullanılarak büyük veri analiz edilmiştir. Amaç genom üzerinde bulunan tekrarca zengin bölgelerin belirlenmesi ve bu analiz yapılırken imperfect SSR olası lokuslarının da analizlerden elde edilmesidir. R, Perl script ve JAVA programları GMATA yazılımının bulunduğu dosyanın içinde bulunmalıdır ve ayrıca oluşturulan her bir dosyanın ismi boşluk bırakılmadan yazılmalıdır. Basit dizi tekrarlarının bulunması için 'SSR identification' aracı kullanılarak fasta formatında ki dosya yüklendi. Kullanılan arama parametre filtreleri: Minimum boy: 3 nt, Maximum boy: 3 nt, Minimum tekrar sayısı: 6 şeklindedir (Şekil 3.1). Bu analiz sonucu program tarafından '.ssr' uzantılı bir dosya oluşturulur ve bu dosyada, bulunan SSR'lerin motifleri ve tekrar sayıları, ve her bir SSR bölgesinin başlama ve bitme pozisyonlarını içeren bilgi mevcuttur.



Şekil 3.1. GMATA SSR bölgelerinin araştırılması

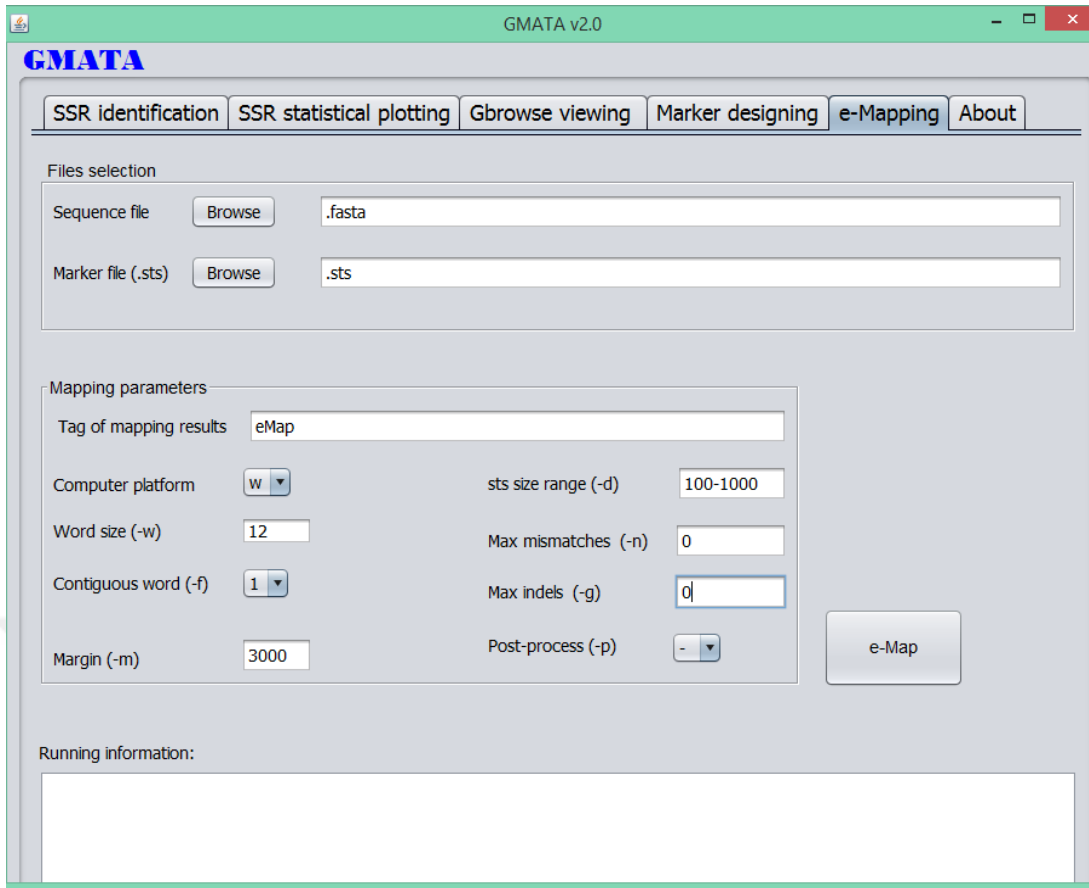
3.1.2. Markör geliştirme ve haritalama

Bulunan aday SSR bölgeleri barkod PCR primerlerinin geliştirilmesi için GMATA programı kullanılarak analiz edilmiştir. GMATA programının 'Marker designing' aracı ile incirin sekans dosyası '.fasta' formatında ve daha önce oluşturulmuş SSR dosyası '.ssr' formatında sisteme yüklenmiştir. Markör geliştirme parametreleri şu şekilde ayarlanmıştır: Minimum amplikon boyu: 100 bç, maksimum amplikon boyu: 300 bç, erime sıcaklığı (T_m) 60 °C, Flanking (yan) sekans uzunluğu: 400 bç, Maksimum template(kalıp) uzunluğu: 2000 bç (Şekil 3.2). Bu parametreler ile yapılan analiz sonucu program '.mk' ve '.sts' uzantılı iki adet dosya oluşturmuştur. '.mk' dosyası geliştirilen markörlerin ileri ve geri primer sekanslarını, bu primerlerin T_m değerlerini, pozisyonlarını ve oluşturdukları sekans ürününün uzunluk bilgisini de veren bir içeriğine sahiptir. '.sts' ise daha sonra 'e-Mapping' (eletronik haritalama) de kullanılmak üzere ileri ve geri primer sekansları ve sekans ürününün uzunluk bilgisini içeren bir dosya türüdür.



Şekil 3.2. GMATA programında SSR markörü geliştirmek

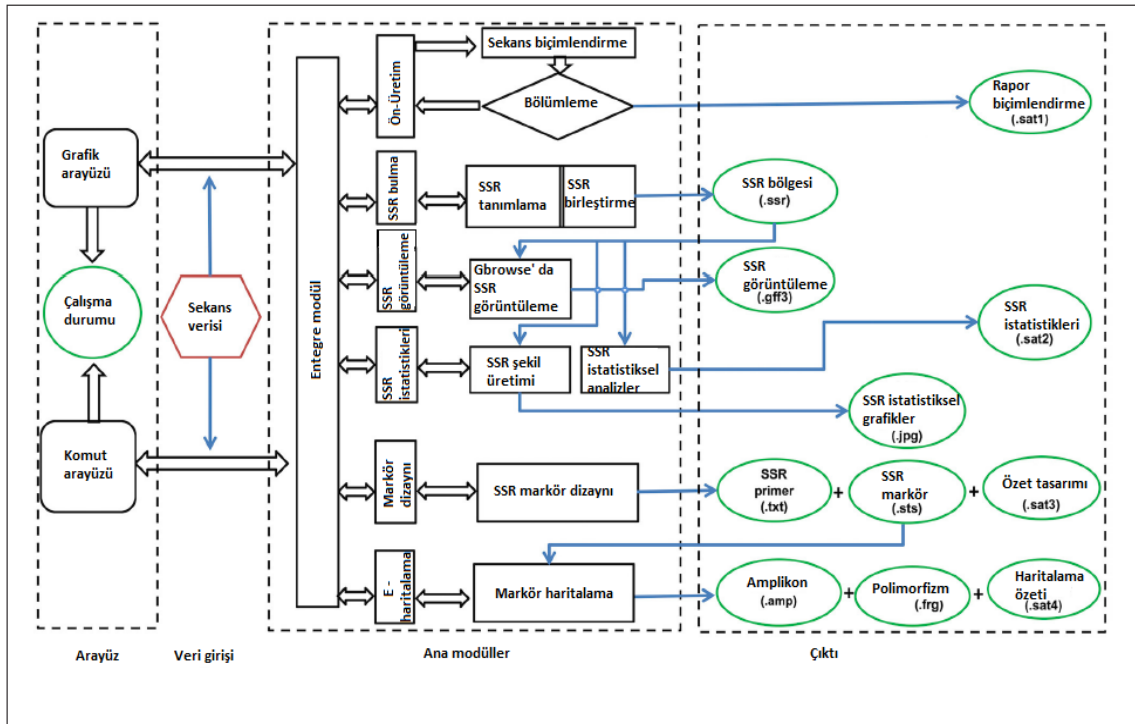
'e-Mapping' genomik sekans boyunca tasarlanan markörleri fiziksel haritalama yapmak için kullanılan bir e-PCR (eletronik-PCR) (Schuler 1997) algoritmasıdır. e-Mapping aracı kullanılırken FASTA formatındaki incir genom sekansı ve daha önce markör tasarlama aracından elde edilen '.sts' dosyası kullanılır. Bu araç kullanılırken maksimum indel (insersiyon-delesyon) sayısı: 0, maksimum mismatches (yanlış eşleşme): 0 olarak ayarlanır (Şekil 3.3). Analiz sonucu '.eMap' uzantılı dosyalar üretilir ve bu dosyalar amplifiye edilmiş fragment (çoğaltılmış parça) uzunluklarını ve markörlerin kaç allele sahip oldukları hakkında bilgileri içerir.



Şekil 3.3. GMATA programı e-Mapping(e-PCR)

Ayrıca ‘e-Mapping’ kullanılarak örneğin incir için geliştirilmiş markörlerin transfer edilebilirlikleri de ölçülebilir. Bunun için e-Mapping aracında ‘sequence file’ sekmesine markörleri transfer etmek istediğimiz türün genomik sekansı FASTA formatında yüklenir. ‘Marker file’ sekmesine ise incirde bulunan ‘.sts’ uzantılı markör dosyası eklenir. Analiz sonucu oluşan ‘.eMap.frg’ uzantılı dosyada transfer edilen markörler ve bu iki türde oluşturdukları ampikon boyları verilir. Bu markörlerden polimorfik olanlar seçilerek iki tür arasında sekans bazında tür ayrımı için kullanılabilir.

GMATA programının genel iş akış şeması Şekil 3.4’te verilmiştir.



Şekil 3.4. GMATA programı çalıştırma iş akış şeması (Wang X ve Wang L, 2016)

3.2. Geliştirilen SSR markörlerinin Blast2GO programı kullanılarak blast ve gen anotasyonlarının yapılması:

GMATA yazılımından elde edilen SSR markör sekansları FASTA formatına çevrilmiştir. Moraceae familyasına ait 45.193 adet protein sekansı NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/ipg/?term=moraceae>) veri tabanından FASTA formatında indirilmiştir. 'Make Local Database' sekmesi ile bu dosyalar Blast2GO (<https://www.blast2go.com>) programına aktarılmıştır. Blastx algoritması ve E-değeri 1E-15 kullanılarak peptit alignmenti yapılmıştır. Blast2GO programı protein sekansları ve SSR markör sekansları arasında önemli eşleşmeleri tanımlamıştır. Geliştirilen SSR markörlerine ilişkin veri ve fonksiyonel anotasyon verilerine <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.9264515> adresinden erişilebilir.

3.3. DNA İzolasyonu:

İncir genotiplerine (Sarılop, Bardacık, Sarızeybek, Delice-yabani-, Bursa siyahı, Kara incir) ait yaprak dokularından DNA örnekleri, bu amaçla seçilmiş olan DNA

parçalarının çoğaltılması, geliştirilecek olan SSR markörlerinin genotiplenmesi aşamasında kullanılmıştır.

Pens yardımıyla küçük küçük parçalara ayrılmış 100 mg yaprak doku örnekleri 2 mL' lik ependorf tüplerine konulmuş, üzerine 800 µL CTAB (cetyl trimethylammonium bromide) ekstraksiyon tampon çözeltisi (%2 CTAB, 100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 20 mM EDTA (pH 8.0), 1.4 M NaCl, %1 PVP-40) eklenmiştir ve Qiagen TissueLyzerII cihazında parçalanmıştır. Karışıma 100 µL merkaptolanol eklenerek, vortex cihazı ile karışımın homojenizasyonu sağlanmıştır. Örnekler, hücre duvarlarının yıkılması amacı ile 1 saat süreyle 65°C' de inkübe edilmiş, inkübasyonun ardından belirtilen oranlarda karışılmış olan fenol:kloroform:izoamil alkol (25:24:1) örneğe eklenerek, önce vortex cihazı ile karıştırılıp, ardından oda sıcaklığında 10 dakika 14.000 rpm'de santrifüjlenmiştir. Süpernatant(üst faz), temiz bir 2 ml'lik deney tüpüne aktararak, 600 µL hacimce belirtilen oranlarda hazırlanmış kloroform:izoamil alkol (24:1) örneğe eklenmiştir. Oda sıcaklığında 10 dakika 14.000 rpm'de santrifüj işleminin ardından, üst faz temiz bir 1.5'lik ependorf tüpe aktarılmış, toplam hacminin altıda biri oranında (150 µL) %100'lük izopropanol ile karıştırılmıştır. DNA peletinin elde edilmesi için ependorf tüpler +4 °C sıcaklığında 60 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Peletin (DNA çöktürüsü) izopropanolden temizlenmesi amacı ile inkübasyonun ardından örnek 14.000 rpm 10 dakika oda sıcaklığında santrifüjlenmiş ve üst faz atılmıştır. Ependorf deney tüpünün alt duvarında elde edilmiş olan DNA peletinin üzerine 200 µL %70'lik etanol eklenerek yıkama yapılmıştır, yıkamanın ardından oda sıcaklığında 5 dakika süreyle 14.000 rpm'de santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. Etanol fazı santrifüjün ardından atılmıştır. Deney tüpü 50°C'de 2 dakika kapağı açık şekilde bekletilip DNA peletinin etanolden tamamen arındırılması sağlanmıştır. Otoklav cihazında sterilize edilmiş 100 µL distile su, DNA'nın süspansiyonu edilmesi amacı ile deney tüpünde bulunan DNA peletinin üzerine eklenmiştir. Opsiyonel olarak 4°C'de bir müddet bekletilmesi, DNA'nın daha homojen şekilde süspansiyon olmasına katkı sağlamaktadır. Ekstrakte edilmiş olan DNA örneklerine 1 µL RNase enzimi eklenerek DNA ekstraksiyonu sırasında, DNA ile birlikte izole edilmiş olması muhtemel olan RNA'nın degradasyonu için tüpler 37°C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. Ekstrakte edilmiş olan DNA örneklerinin saflığı ve konsantrasyonu, Nanodrop spektrofotometre cihazı ile ölçülmüştür.

3.4. SSR Markör Analizleri:

Bulunan markörleri PCR amlifikasyonu ile doğrulamak için rastgele 10 adet markör seti seçilmiştir (Tablo 3.1)

İncir yaprak DNA örneklerinden tez çalışması kapsamında geliştirilmiş olan SSR markörünün çoğaltılması için gerçekleştirilecek olan PCR reaksiyonu için 1x AmplitaqGold® PCR Tamponu, 200 µM her bir dNTP (Promega), 2.5 mM MgCl₂, 300 nM forward(ileri) primer, 300 nM revers(geri) primer, 0.5 ünite AmplitaqGold® polimeraz enzimi (Applied Biosystems Foster City CA), 1.0µL incir yaprak DNA'sı ve nükleaz içermeyen H₂O kullanılarak bir protokol oluşturulmuştur. Herbir kuyucukta ki PCR reaksiyonunun hacmi 20µL'dir. PCR reaksiyonları 35 döngü yapılmıştır. PCR cihazında ürünleri çoğaltmak için sıcaklık ve süre şu şekilde ayarlanmıştır:

- Başlangıç DNA denatürasyonu: 95°C → 10 dakika,
- Denatürasyon : 95°C → 30 saniye
- Tavlama (annealing) reaksiyonu: 60°C → 30 saniye
- Uzama (elongation) : 72°C → 30 saniye
- Son uzama: 72°C → 10 dakika
- 4°C'de bekletme.

Tablo 3.1. PCR reaksiyonunda kullanılan markörlerin primer bilgileri

Markör ismi	Sol primer sekansı	Sol primer TM	Sağ primer sekansı	Sağ primer TM	Sol primer pozisyonu	Sağ primer pozisyonu	Ürün boyu
MK162	TTGGCATCAT CTTGTTTTGG	59.518	AGCAAAACC CAATTGTGG AC	59.836	379	632	254
MK323	GCCATTGAG CCCTAATTTC A	60.038	TCGGAAAGT GATGCACAA AC	59.697	312	463	152
MK671	ATTCTTGTGG GTGGGTGGT	60.080	GTTACCGCC ACGTTCTTCA T	60.000	314	574	261
MK2021	ACCGTTTGG GAACCAATT CT	60.590	GAAAGCGAA GCGATTAAA CA	58.187	248	524	277
MK3858	TTCTCTCGCA CGGTTAGGT C	60.397	CAGCAGCTC AGACTTTGC AC	59.929	319	463	145
MK4820	CCAACAAGG AAAGTGGAA GC	59.711	AAGGCAGTT TCCCAAGTT T	59.976	319	614	296

MK5156	TTGGAATTG GAGTTGGAA GG	59.903	ACGATGATG ACGTCGACA AA	60.120	265	479	215
MK5723	GAACTCGCC ATACCGGAT TA	59.923	TCCCAAGTC CCATTCTTT G	59.903	209	494	286
MK7647	CCATCCCTGT GGCTGTAA T	59.813	CAGGGAGTA AAGTGCTAA TAATGTG	58.425	328	591	264
MK9101	AAGGGTTTT GCTTGATAC GC	59.229	AAAAGGAAG AGACGGACC AAA	60.096	148	293	146

Seçilen 10 adet primer setinin hangi SSR bölgelerini ve motiflerini çoğaltacağı Tablo 3.2. verilmiştir.

Tablo 3.2. PCR amplifikasyonu için seçilen markörlerin SSR bölgelerinde motif ve sekans bilgileri

Markörler	SSR sekans uzunluğu	SSR başlama pozisyonu	SSR sonlanma pozisyonu	SSR tekrar sayısı	SSR Motifi
FicuscaricaSSRMK162	1276110	1071944	1071982	13	CAT
FicuscaricaSSRMK323	1052852	642374	642412	13	ATA
FicuscaricaSSRMK671	857006	782074	782103	10	CCG
FicuscaricaSSRMK2021	416045	2985	3026	14	TTA
FicuscaricaSSRMK3858	238160	100391	100426	12	AGA
FicuscaricaSSRMK4820	180767	53612	53647	12	GCT
FicuscaricaSSRMK5156	160260	35166	35198	11	GTA
FicuscaricaSSRMK5723	134902	76470	76502	11	GAA
FicuscaricaSSRMK7647	54197	9103	9132	10	TAT
FicuscaricaSSRMK9101	670	182	220	13	TCT

3.5. Kapiler Elektroforez

Altı adet incir genotipine ait DNA örneklerinden çoğaltılmış olan SSR markörleri, Qiaxcel Fragment Analyzer (Qiagen Sample&Assay Technologies) kapiler elektroforez sistemi ile görüntülenmiştir. Qiaxcel DNA High Resolution Kitin kullanıma hazır kapiler kartuşu, dye-gel karışımı ile dolduruldu, kapiler elektroforez analizi için kullanılmıştır. Seçilen 10 markör setinin incir genotiplerinde oluşturduğu polimorfik bantlar ve alel sayıları saptanmıştır.

3.6. Darwin Programı ile Çeşitlilik Analizi

PIC (Polymorphism information content) değeri altı incir genotipi için hesaplanmıştır.

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^k p_i^2$$

Her genotip için belli bir lokus açısından alel değerleri: var (present) = 1, yok (absent) = 0 gibi değerlerle skorlanacaktır. Bu şekilde oluşturulan veriler Nei ve Li tarafından geliştirilen genetik benzerlik indeksinin (The Nei index of genetic similarity) hesaplanmasında kullanılmıştır (Nei ve Li 1979). Elde edilen bu değerler Darwin (Perrier ve Jacquemoud-Collet 2006) yazılımında Neighbour-joining yöntemi uygulanarak incir genotipleri arasındaki genetik bağlantıyı gösteren bir ağaç çizilerek çeşitlilik analizi yapılmıştır.

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

Mori ve ark.(2017) tarafından yayınlanmış 247.09 Mb boyunda ki *Ficus carica* L. referans genomu (BDEM00000000) NCBI veri tabanından FASTA formatında indirilmiştir ve GMATA programında kullanılmıştır. Ayrıca Moraceae familyasına ait NCBI veri tabanından indirilmiş olan 45.193 adet protein sekansı da Blast2GO programında kullanılmıştır.

4.1. GMATA Programı Kullanılarak SSR Bölgelerinin Keşfi ve Markör Geliştirilmesi:

GMATA programı kullanılarak en düşük tekrar sayısı 6 olan trinükleotitli tekrar motifleri araştırılmıştır ve 11287 adet SSR bölgesi bulunmuştur. Trinükleotitli SSR'ların kodlanan bölgelerde daha sık görüldüğü ve bunun sebebinin ekspres edilmiş sekanslarda çerçeve kayması mutasyonunu önlemek amacıyla olduğu düşünülür (Metzgar ve ark. 2000; Morgante ve ark. 2002; Li ve ark. 2004).

İncirin 247.09 MB genomu boyunca ortalama 21.28 kilobazda bir SSR bölgesi bulunmaktadır. Bu SSR bölgelerini 60 çeşit trinükleotitli motifler oluşturmaktadır ve en çok tekrar eden motifler AAT, TTA ve ATT olmuştur (Tablo 4.1). Bu motifler sırasıyla tüm SSR'ların 19.5 %, 14.12 %, 8.9 % 'unu oluşturmaktadır.

Tablo 4.1. Genomda bulunma sıklığına göre ilk 10 SSR motifleri ve sayıları

	Motif	Genomda bulunma sayısı
1	AAT	2201
2	TTA	1594
3	ATT	1005
4	AAG	760
5	TTC	609
6	TAT	548
7	ATA	463
8	TAA	439
9	TCT	432
10	GAA	377

Bu sonuçlarla benzer şekilde, Uncu (2018) tarafından *C. chinense* genomunda yapılan çalışmada trinükleotitli SSR'larda en sık tekrar eden motif olarak AAT bulunmuştur ve tüm motifler arasında 14.3% oranında temsil olmaktadır. Buna karşın Li ve ark (2004) bitkilerde en sık görülen üçlü motifin AAG olduğunu belirtirken, tahıllarda en yaygın üçlü motif CCG'dir (Cordeiro ve ark. 2001; Varshney ve ark. 2002; Thiel ve ark. 2003).

En sık tekrar eden 5 motif için 10'ar tane temsilen verilmiş SSR bölgesinin başlama ve bitiş pozisyonları ve motiflerin tekrar sayısı tablo 4.2'de bulunmaktadır.

Tablo 4.2. Tüm genom çapında en çok bulunan ilk beş SSR motiflerinin tekrar sayıları ve pozisyonları

	SSR ismi	Motif	Tekrar sayısı	Başlama	Bitiş
1	SR7	AAT	7	232898	232918
2	SSR77	AAT	8	95008	95031
3	SSR144	AAT	6	199724	199741
4	SSR205	AAT	8	173432	173455
5	SSR257	AAT	6	94145	94162
6	SSR298	AAT	7	131988	132008
7	SSR353	AAT	8	49619	49642
8	SSR417	AAT	12	405745	405780
9	SSR453	AAT	6	413885	413902
10	SSR511	AAT	7	609389	609409
11	SSR1	TTA	7	13837	13857
12	SSR519	TTA	10	842715	842744
13	SSR583	TTA	8	252701	252724
14	SSR605	TTA	7	638349	638369
15	SSR631	TTA	13	81165	81203
16	SSR644	TTA	9	356325	356351
17	SSR711	TTA	6	731689	731706
18	SSR761	TTA	6	625953	625970
19	SSR947	TTA	13	478358	478396
20	SSR1041	TTA	7	291782	291802
21	SSR1057	ATT	6	63332	63349
22	SSR1118	ATT	12	382287	382322
23	SSR1196	ATT	8	130972	130995
24	SSR1208	ATT	7	380608	380628
25	SSR1249	ATT	7	503134	503154
26	SSR1292	ATT	8	329601	329624
27	SSR1346	ATT	6	280902	280919
28	SSR1427	ATT	7	17285	17305
29	SSR1458	ATT	7	258812	258832

30	SSR1484	ATT	6	187477	187494
31	SSR1483	AAG	8	185780	185803
32	SSR1544	AAG	7	287306	287326
33	SSR1604	AAG	7	71055	71075
34	SSR1659	AAG	6	1799	1816
35	SSR1741	AAG	8	139619	139642
36	SSR1764	AAG	6	2564	2581
37	SSR1818	AAG	8	475208	475231
38	SSR1882	AAG	6	426666	426683
39	SSR1979	AAG	10	4233	4262
40	SSR2007	AAG	7	8924	8944
41	SSR2014	TTC	7	224574	224594
42	SSR2077	TTC	6	395646	395663
43	SSR2126	TTC	9	366680	366706
44	SSR2169	TTC	6	410250	410267
45	SSR2239	TTC	6	434935	434952
46	SSR2350	TTC	9	192567	192593
47	SSR2445	TTC	7	259158	259178
48	SSR2489	TTC	7	284665	284685
49	SSR2553	TTC	7	256214	256234
50	SSR2645	TTC	8	319053	319076

Arama parametreleri trinükleotitli en az 6 tekrardan oluşan motifler olarak ayarlandığı için en küçük SSR boyu $6 \times 3 = 18$ nükleotit olarak bulunmuştur ve bu boyda 4761 SSR bölgesi bulunmuştur. Diğer SSR bölgelerinin boyu için katları şeklinde $18 \times 3 = 54$ 'e kadar Tablo 4.3' verilmiştir.

Tablo 4.3. Bulunan SSR bölgelerinin boyları ve genomda toplam bulunma sayıları

SSR bölgelerinin boyu	Toplam bölge
18	4761
21	2777
24	1591
27	945
30	573
33	318
36	171
39	78
42	43
45	19
48	4
51	3
57	2
54	2

Bulunan mikrosatellit bölgelerinden GMATA programının bir fonksiyonu olan marker geliştirme aracı kullanılarak 9223 adet eşsiz SSR markörü geliştirilmiştir (<https://doi.org/10.6084/m9.figshare.9264515>). Yani tüm SSR bölgelerinin 81,71 % 'i için markör seti oluşturulmuştur.

Daha önce ki çalışmalarda *Ficus carica* L.'de mikrosatellit markörü geliştirmek için genomik DNA kütüphanelerinin zenginleştirilmesi yapılmıştır (Khadari ve ark. 2001; Giraldo ve ark.. 2005; Bandelj ve ark. 2007; Garcia ve ark. 2012; Knap ve ark. 2016). Bu çalışmanın farkı ilk defa incirin referans genomu (Mori ve ark. 2017) kullanılarak biyoinformatik analizler ile tüm genom çapında SSR markörü geliştirilmiş olmasıdır.

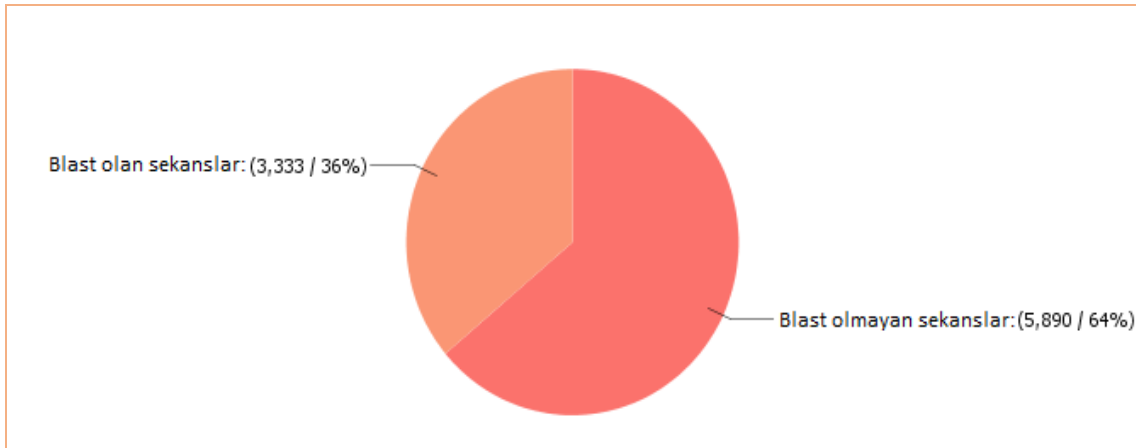
GMATA programının bir diğer aracı olan 'e-Mapping' kullanılarak yapılan amplifikasyon sonucu %99 oranında tek allelli PCR ürünleri oluşmuştur (Tablo 4.4).

Tablo 4.4. e-Mapping sonucu elde edilen sonuçlara göre markörlerin allel sayılarına göre bulunma oranları

Alleller	Toplam markörler	Oran
1	9138	% 99.078
2	70	% 0.759
3	12	% 0.130
4	3	% 0.033

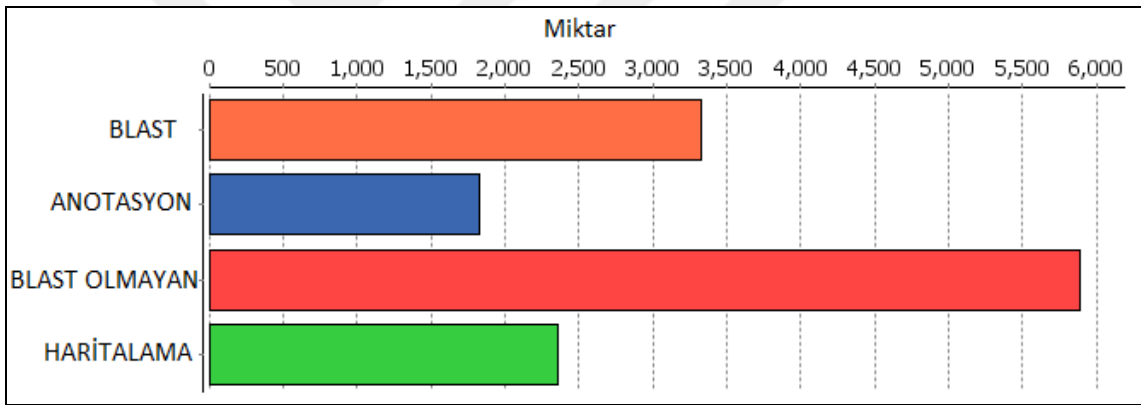
4.2. Blast2GO Programı Kullanılarak Gen Fonksiyonlarının Belirlenmesi:

GMATA programı kullanılarak bulunan SSR markörleri *Ficus carica* L.'nin de içinde bulunduğu Moraceae familyasına ait NCBI veri tabanından indirilmiş olan 45.193 adet protein sekansı ile E-değeri 1E-15 kullanılarak Blast2GO programında blast edilmiştir ve 3333 markör protein sekanslarıyla örtüşmüştür (<https://doi.org/10.6084/m9.figshare.9264515>). Toplamda 9223 markörden 36%' sının gen fonksiyonları atanmıştır (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. *Ficus carica* L.'de geliştirilen SSR markörlerinin Moraceae ailesinin protein sekanslarıyla blast sonucu elde edilen dağılımı

Ayrıca Blast2GO yazılımı kullanılarak gen anotasyonu yapıldı ve 1824 markör anotasyonu bulundu (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Blast, anotasyon ve haritalanan markör sayılarının grafiksel gösterimi

Anotasyon sonucunda birçok markör Moraceae ailesinden gelen çeşitli sayıda protein ile 100% blast olmuştur. Bu sonuç *Ficus carica*'nın olası protein çalışmaları için bir veri kaynağı oluşturabilir. Örneğin Markör 26, *Morus notabilis*'ten gelen 'etilen duyarlı transkripsiyon faktörü SHINE 2' proteini ile tam örtüşmüştür. Bu Markör kullanılarak etilen biyosentezi veya transkripsiyon faktörlerinin araştırılması çalışmaları *Ficus carica*'da da yapılabilir. Ayrıca etilen ilişkili transkripsiyon faktör proteinleri ile örtüşen 28 markör vardır. Bunlardan 70% oranının üzerinde 20 tane markör tespit edilmiştir (şekil 4.5).

Bitkiler, ürün gelişimini, fizyolojisini, üretkenliğini etkileyen çok çeşitli streslere maruz kalırlar. Bitkiler hareketsiz olduğundan, kuraklık, soğuk, sıcak, tuzluluk, besin kıtlığı ve değişken ışık koşulları bitkinin büyümesini ve gelişimini etkiler. Bitkiler

tarafından strese karşı toleransı arttırmak için farklı mekanizmalara adaptasyon sağlanmıştır ve hayatta kalmak için hızlı savunma tepkisi olarak bir dizi sinyal iletim yolağı geliştirilmiştir (Zhu ve ark. 2013). Birçok hücrel proteinlerden geçen hücre dışı sinyaller için cevap olarak, çeşitli transkripsiyon faktörleri stres ilişkili genlerin transkripsiyonel aktivitesini modüle eder. Transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonu (ifadelenmesi) dokuya ya da gelişim evresine özel bir olaydır (Thirugnanasambantham ve ark. 2014). AP2/etilen duyarlı faktör (ERF), biyotik ve abiyotik strese cevapta ifade edilen transkripsiyon faktörlerinin en geniş gruplarından biridir (Thirugnanasambantham ve ark. 2014).

Etilen meyve olgunlaşmasında rol oynayan en önemli hormondur. Ve etilen üretimini indüklemek için zeytinyağı, oksin ve etilen (sentetik halleri:ethrel/ethephon) kullanılır. Linolenik asit de etileni indüklemektedir ve hızlı bir şekilde etilenin üretimini sağlamaktadır. Bu uygulamalar incir meyvesinin gelişme ve olgunlaşmasının son aşamasında yapılmaktadır(Owino ve ark. 2006). Hasat öncesi etilen uygulaması meyve gelişiminin hangi aşamada (periyod I, II, III) bulunduğuna bağlı olarak farklı etkiler gösterir (Crane ve ark. 1970b; Marei ve Crane, 1971)

Tablo 4.5. 70% ve üzeri blast olan markörlerin etilenle ilişkili proteinlerle benzerlik yüzdesi

Sekans ismi	Sekans tanımlaması	Benzerlik yüzdesi
MK26	Etilene duyarlı transkripsiyon faktörü SHINE 2	100.00%
MK27	Etilene duyarlı transkripsiyon faktörü SHINE 2	77.08%
MK77	Etilene duyarlı transkripsiyon faktörü 1B	82.20%
MK366	Etilene duyarlı transkripsiyon faktörü	77.66%
MK528	Etilene duyarlı transkripsiyon faktörü ERF003	81.61%
MK615	AP2-benzeri etilene duyarlı transkripsiyon faktörü AIL1	73.91%
MK909	Etilene duyarlı transkripsiyon faktörü ERF061	88.78%
MK927	Etilene duyarlı transkripsiyon faktörü ERF034	75.00%
MK1616	Etilene duyarlı transkripsiyon faktörü TINY	87.50%
MK2274	AP2-benzeri etilene duyarlı transkripsiyon faktörü BBM1	76.47%
MK2473	Etilene duyarlı transkripsiyon faktörü ERF022	80.81%
MK3190	AP2-benzeri etilene duyarlı transkripsiyon faktörü At1g16060	100.00%
MK3355	Etilene duyarlı transkripsiyon faktörü RAP2-7 izoform X2	90.48%
MK3408	Etilene duyarlı transkripsiyon faktörü ERF010	85.71%
MK4038	AP2-benzeri etilene duyarlı transkripsiyon faktörü ANT	71.61%
MK5382	Etilene duyarlı transkripsiyon faktörü RAP2-10	90.58%
MK5433	Etilene duyarlı transkripsiyon faktörü ABI4	100.00%
MK5989	Etilene duyarlı transkripsiyon faktörü	84.31%
MK6020	AP2-benzeri etilene duyarlı transkripsiyon faktörü At1g79700	77.50%
MK7207	Etilene duyarlı transkripsiyon faktörü ERF014	84.71%

Oksin bir bitkinin gelişimi boyunca en başlıca büyüme tepkilerinde önemli bir rol oynar. Oksinlerin, tropizmalar, apikal baskınlık ve kök başlatma gibi tüm bitki seviyesinde farklı cevapları ve hücre büyümesi, bölünmesi ve farklılaşması gibi hücresel seviyede yanıtları düzenlediği ya da etkilediği düşünülmektedir. Temel oksin yanıt genleri üç ana sınıftır(*Aux/IAA*'lar, *SAUR*'ler ve *GH3*'ler) (Hagen ve Guilfoyle, 2002). Bu üç sınıfta ki genler oksin uygulamasından sonra hızlı bir şekilde aktive olur ve genlerin aktivasyonu için protein sentezine ihtiyaç duyulmaz(Tiwari ve ark., 2003).

Gen anotasyonları sonucunda oksinle ilgili 27 protein bulunmuştur ancak 70%'nin üzerinde 16 tane protein vardır (Tablo 4.6).

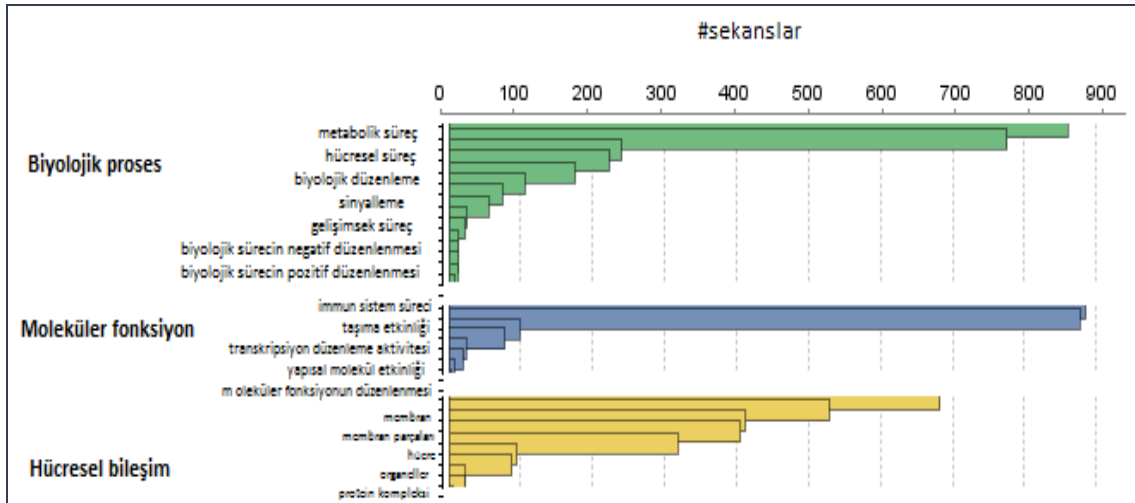
Tablo 4.6. Markörler ve oksinle ilgili proteinlerle benzerlik yüzdesi

Sekans ismi	Sekans tanımlaması	Benzerlik yüzdesi
MK1486	Oksin duyarlı protein IAA1	84.21%
MK1787	Oksin duyarlı protein SAUR21	89.47%
MK2769	Muhtemel Oksin akışı taşıyıcı bileşeni 1c	100.00%
MK2909	Oksin duyarlı protein SAUR32	93.39%
MK3234	Oksin duyarlı protein SAUR19	78.49%
MK3235	Oksin duyarlı protein SAUR50	83.78%
MK3464	Oksin akışı taşıyıcı bileşeni 3	92.09%
MK3995	Oksin yanıt faktörü 6	92.31%
MK3996	Oksin yanıt faktörü 6	96.95%
MK4885	Oksin akışı taşıyıcı bileşeni 2	76.44%
MK5729	Oksin yanıt faktörü 6	96.10%
MK5785	Muhtemel Oksin akışı taşıyıcı bileşeni 1c	93.10%
MK6372	Oksin yanıt faktörü 4 izoform X1	90.62%
MK6443	Oksinle indüklenmiş protein 5NG4	95.16%
MK7509	Oksin taşıyıcı benzeri protein 2	100.00%

100% şekilde benzer blast olan markör sayısı 189'dur. Bu blast sonuçlarından bazıları şöyledir; ubiquitin benzeri protein 5, vezikül ile ilişkili zar proteini 711, ras ile ilgili protein Rab11D, Serin / treonin-protein kinaz SAPK2, beta-galaktosidaz 1, çinko taşıyıcı 2, çinko parmak proteini ZAT9, kalsiyum bağımlı protein kinaz 1, 40S ribozomal protein S20-2, mitokondriyal iç membran proteaz ATP23, GTP bağlayıcı protein SAR1A, etilene duyarlı transkripsiyon faktörü ABI4, peroksizom biyogenezi proteini 22, RNA polimeraz sigma faktörü sigB, potasyum kanalı KOR1 izoformu X3, splicing (ekleme) faktörü 3B alt ünite 2, transkripsiyon faktörü LHW vs.

İncir için tanımlanmış 207 adet protein grubu vardır (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/ipg/?term=Ficus%20carica>) ve bu çalışmada bulunan anotasyon verileri, incirde yapılacak olan olası protein tanımlama çalışmalarına büyük katkı sağlayacaktır.

Ayrıca markörlerin moleküler fonksiyon, hücresel bileşim, biyolojik proses bakımından fonksiyonları saptanmıştır (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Blast2GO anotasyon sonucu sekansların biyolojik proses, moleküler fonksiyon ve hücresel bileşim dağılımları

Bulunan markörleri PCR amplifikasyonu ile doğrulamak için rastgele 10 adet markör seti seçilmiştir. Seçilen bu markörlerin sadece 4 tanesi protein sekanslarıyla örtüşmüştür ve Moraceae ailesine ait *Morus notabilis* (dut)'den gelen bu proteinlerle 72.09% - 96.55% arasında benzer bulunmuştur (Tablo 4.4).

Tablo 4.7. PCR amplifikasyonu için seçilen markörlerin anotasyon sonuçları ve yüzdeleri

Markör	Anotasyon edilen protein	Benzeme Yüzdesi	Geldiği kaynak
Markör 2021	metilesteraz 17	79.31%	<i>Morus notabilis</i>
Markör 3858	sialidaz	72.09%	<i>Morus notabilis</i>
Markör 4820	WD tekrar içeren protein 55	96.55%	<i>Morus notabilis</i>
Markör 5723	galaktolipaz DONGLE, kloroplastik	82.47%	<i>Morus notabilis</i>

4.3. Geliştirilen SSR Markörlerinin İncir Genotiplerinde Test Edilmesi

Geliştirilen markörlerin laboratuvar ortamında test edilmesi için PCR yapılmıştır. PCR ürünleri kapiler elektroforezde yürütülerek her bir markör için polimorfik alel sayısı ve PIC değerleri hesaplanmıştır. 7 adet markör polimorfik bant üretirken 3 tanesi monomorfik bant üretmiştir. Polimorfik markörler için ortama alel sayısı 3.71 ve ortama PIC değeri 0.47 bulunmuştur. En yüksek alel sayısına sahip olan markör, *FicuscaricaSSRMK2021*'dir. Benzer bir çalışmada Boudchicha ve ark. (2018), Cezayir yerel incir kaynaklarını kullanarak 34 incir genotipi ile daha önceden geliştirilmiş 24 SSR markörünü genetik çeşitlilik için test etmişlerdir. Test sonucunda toplamda 79 adet polimorfik bant oluşmuştur. Her bir lokus için ortalama alel sayısı 3.59 olarak bulunmuştur ve ortalama PIC değeri 0.46'dır.

Tablo 4.8. Markörlerin polimorfik alel sayısı ve PIC değerleri

Markör Adı	PIC	Polimorfik Alel sayısı
<i>FicuscaricaSSRMK162</i> *	N	0
<i>FicuscaricaSSRMK 323</i>	0.52	4
<i>FicuscaricaSSRMK 671</i>	0.46	2
<i>FicuscaricaSSRMK 2021</i>	0.55	6
<i>FicuscaricaSSRMK 3858</i> *	N	0
<i>FicuscaricaSSRMK 4820</i>	0.36	5
<i>FicuscaricaSSRMK 5156</i>	0.48	3
<i>FicuscaricaSSRMK 5723</i>	0.44	4
<i>FicuscaricaSSRMK 7647</i>	0.52	3
<i>FicuscaricaSSRMK 9101</i> *	N	0
Polimorfik Toplam alel		26
polimorfik markör ortalama PIC/alel	0.47	3.71

*= monomorfik alele sahip olan markörler,

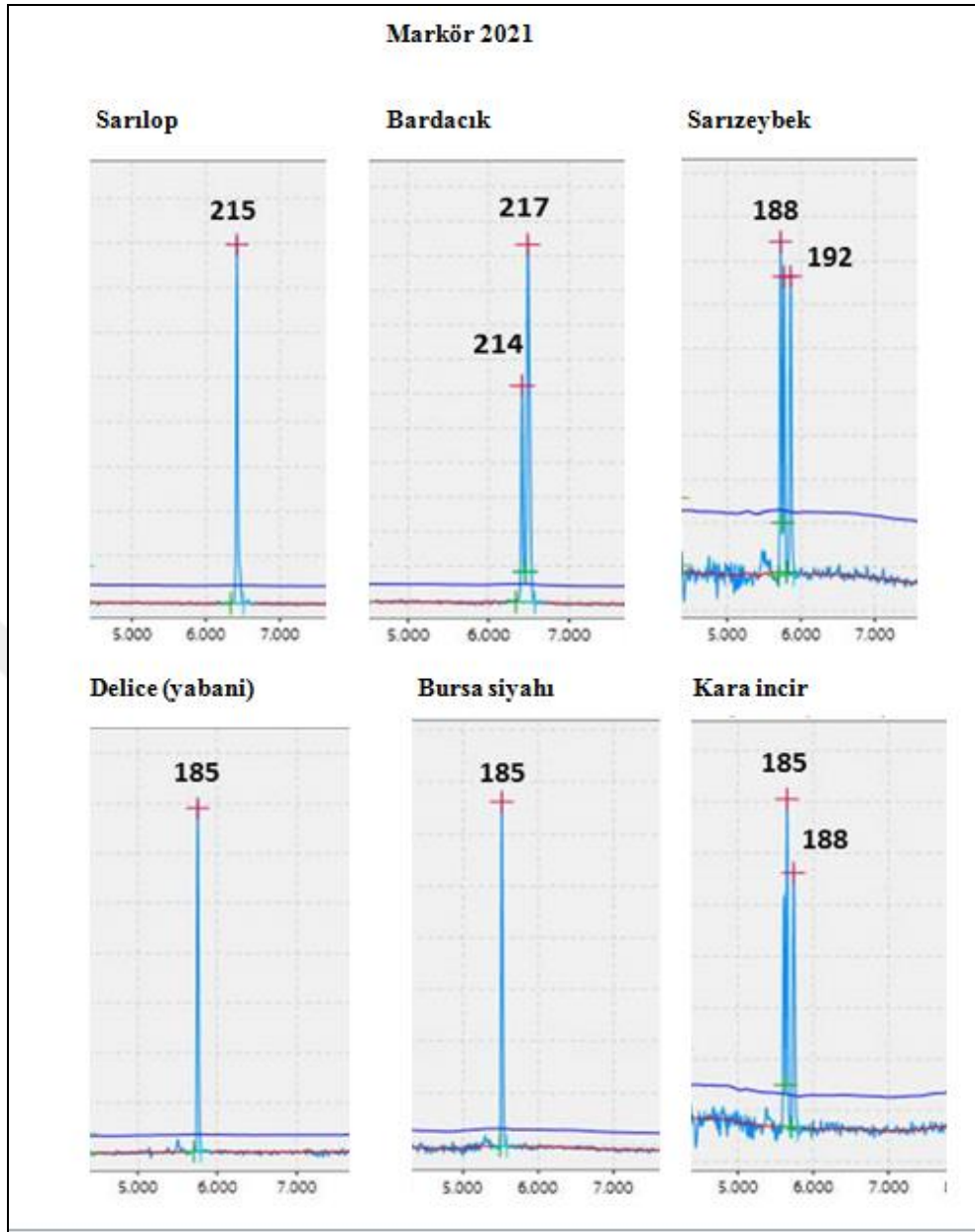
koyu renkle yazılanlar = en yüksek polimorfizm gösteren markörler

Yapılan kapiler elektroforez sonucunda tablo da koyu renkle yazılı markörler en çok alel üreten markörlerdir ve bu markörlerin bant görüntüleri Şekil 4.4 ve Şekil 4.5'de verilmiştir.



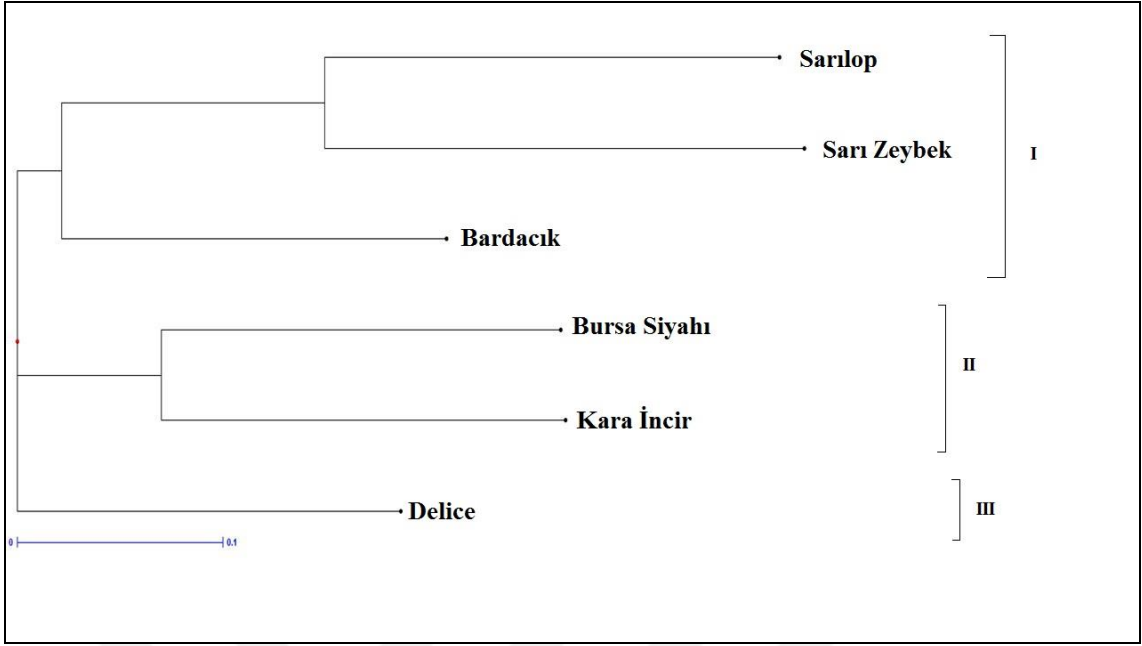
Şekil 4.4. Markör 323, 4820, 5723'ün PCR sonucu incir genotiplerinde oluşturduğu polimorfik bantlar

Markör 2021 ile yapılan PCR sonucunda elde edilen ürünler kapiler elektroforezde yürütülmüş ve en çok polimorfik alel bu markör tarafından üretilmiştir. Bu lokus açısından 'Sarılop', 'Delice' ve 'Bursa siyahı' genotipleri homozigot boy oluştururken, 'Bardacık', 'Sarızeybek' ve 'Kara incir' heterozigot boy vermişlerdir. Markör 2012 kullanılarak 'Bardacık', 'Sarızeybek', 'Kara incir' 'Sarılop' polimorfik boy oluşturdukları için ayırt edilebilir ancak 'Delice' ve 'Bursa siyahı' genotiplerini ayırt etmek için ek bir polimorfik marköre ihtiyaç vardır (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Markör 2021 ile incir genotiplerinde yapılan PCR ürünlerinin kapiler elektroforezde yürütülmesi sonucu oluşan polimorfik pikler

Polimorfik bantlar 6 adet incir genotipini üç ana gruba ayırmıştır. I. grup, ‘Bardacık’, ‘Sarılop’ ve ‘Sarı Zeybek’ genotiplerinden oluşmuştur. Ayrıca I. grup kendi içinde ‘Bardacık’ genotipini diğer ikisinden ayırmıştır. II. grupta ‘Bursa siyahı’ ve ‘Kara incir’ bulunmaktadır. ‘Delice’ genotipi yabancı tür olduğu için diğer beş genotipten ayrılarak tek başına III. grubu oluşturmuştur (Şekil 4.6). İncir genotiplerinin renk fenotiplerine bakıldığında sarı olanlar I. grupta, siyah olanların ise II. grupta toplanmıştır.



Şekil 4.6. DARwin programında Neighbor joining yöntemi ile SSR markörleri kullanılarak çizilen incir çeşitlilik ağacı

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

İncir, çoğunluğu Akdeniz bölgesinde yetişen besin değeri ve ekonomik getirisi yüksek bir tarım ürünüdür. Besin değeri açısından zengin ve faydalı bir içeriğe sahip olduğundan taze ve kuru olarak sıkça tercih edilen bir meyvedir. Ülkemiz incir çeşitlerinin ana kaynağını oluşturan en önemli yerlerden biridir. Ayrıca dünyada en çok incir üretimi yapan ülke Türkiyedir. Ülkemiz bu açıdan önemli bir kaynak olduğu için çeşit ve genotiplerin saptanması son derece önemlidir. Dünya çapında incir çeşit ve genotiplerinin belirlenmesi için moleküler markörler kullanılarak çok sayıda çalışma yapılmıştır. bu çalışmaların büyük bir kısmını SSR markörleri oluşturmaktadır. Ancak genomik DNA kütüphaneleri kullanılarak geliştirilmiş SSR markörle sınırlı sayıdadır.

Yapılan bu çalışmanın önemi incir referans genomu kullanılarak yapılan ilk SSR markör çalışması olmasıdır. Bu çalışmada *Ficus carica* L. için 11287 adet üç tekrarlı SSR bölgeleri tespit edilmiştir. Bu bölgeler için 9223 SSR markörü geliştirildi. Bu markör setleri kullanılarak ilk olarak e-PCR ve daha sonra ise gerçek PCR yapılmıştır. PCR ürünleri kapiler elektroforez kullanılarak test edilmiştir. 10 adet markörden 7 tanesi polimorfik bant oluşturmuştur. Ortalama PIC değeri 0.47 olarak hesaplanmış ve polimorfik markör başına düşen ortalama alel sayısı 3.71 olarak bulunmuştur.

Elde edilen markör setleri ile Moracea ailesinin protein sekansları blast edilmiş ve gen fonksiyonları tanımlanmıştır. Markörlerin 100% örtüştüğü birçok protein sekansı bulunmuştur.

Ayrıca bulunan fonksiyonlar kullanılarak incir için protein verilerinin çoğaltılacağı ve geliştireceği düşünülmektedir.

İncir genomuna özel tanımlanan markörler incir ıslah programları dahilinde seçim ve haritalama çalışmalarında kullanılacak moleküler araçları oluşturacaktır. Genom-spesifik markör seti, markör destekli ıslah uygulamaları için önemli bir moleküler araç olmakla birlikte ülkemiz incir çeşitlerinin korunması, fidan sertifikasyonu , incir ve incirden üretilen ürünlerin izleme ve takibi çalışmalarında da kullanılabilir.

KAYNAKÇA

- Achtak, H., Oukabli, A., Ater, M., Santoni, S., Kjellberg, F., Khadari, B., 2009, Microsatellite markers as reliable tools for fig cultivar identification. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 134:624-31.
- Agarwal, M., Shrivastava, N., Padh, H., 2008, Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences, *Plant Cell Rep* 27:617–631.
- Aksoy, U., 1998, Why figs? An old taste and a new perspective. *Acta Hort.* 480:25–27.
- Bandelj, D., Javornik, B. ve Jakse, J., 2007, Development of microsatellite markers in the common fig, *Ficus carica* L. *Molecular Ecology Notes* ,7, 1311–1314.
- Beckmann, JS., Weber, JL., 1992, Survey of human and rat microsatellites. *Genomics*. 12(4):627–631.
- Bennetzen, JL., 2000, Transposable element contributions to plant genome evolution. *Plant Mol Biol* 42:251–269.
- Billotte, N., Lagoda, P.J.L., Risterucci, A.M. ve Baurens, F.C., 1999, Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. *Fruits* 54:277-288.
- Blair, M.W., Torres, M.M., Pedraza, F., Giraldo, M.C., Buendía, H.F. ve Hurtado, N., 2009, Development of microsatellite markers for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) based on screening of non-enriched, small-insert genomic libraries. *Genome* 52:772-782.
- BLAST2GO, Functional Annotation and Genomics Tool, <https://www.blast2go.com>, [Ziyaret Tarihi: 2 Ocak 2019]
- Boudchicha, R.H., Hormaza, J.I., Benbouza, H., 2018, Diversity analysis and genetic relationships among local Algerian fig cultivars (*Ficus carica* l.) using SSR markers. *South African Journal of Botany* 207–215
- Cabrita, L.F., Aksoy, U., Hepaksoy, S. ve Leitao, J.M., 2001, Suitability of isozyme, RAPD and AFLP markers to assess genetic differences and relatedness among fig (*Ficus carica* L.) clones. *Scientia Hort.* 87:261–273.
- Caliskan, O., Polat, A.A., Celikkol, P., Bakir, M., 2012, Molecular characterization of autochthonous Turkish fig accessions. *Spanish Journal of Agricultural Research* 10(1):130-140.
- Caliskan, O., Polat, A.A., 2011, Phytochemical and antioxidant properties of selected fig (*Ficus carica* L.) accessions from the eastern Mediterranean region of Turkey. *Sci Hort* 128:473–8.

- Chang, C.L., Marra, G., Chauhan, D.P., Ha, H.T., Chang, D.K., Ricciardiello, L., Randolph, A., Carethers, J.M., Boland, C.R., 2002, Oxidative stress inactivates the human DNA mismatch repair system. *Am J Physiol Cell Physiol* 283: 148–154
- Chen, X. ve Sullivan, P.F., 2003, Single nucleotide polymorphism genotyping: biochemistry, protocol, cost and throughput. *Pharmacogenomics J.* 3, 77–96
- Chessa, I. ve Nieddu, G., 2005, Analysis of diversity in the fruit tree genetic resources from a Mediterranean island. *Genet. Resources Crop Evol.* 52:267–276.
- Condit, I.J., 1947, The fig. *Chronica Botanica Co.* Waltham
- Cordeiro, G.M., Casu, R., McIntyre, C.L., Manners, J.M., Henry, R.J., 2001, Microsatellite markers from sugarcane (*Saccharum* spp.) ESTs across transferable to *Erianthus* and *Sorghum*. *Plant Sci* 160:1115–1123
- Crisosto, H., Ferguson, L., Bremer, V., 2011, Fig (*Ficus carica* L.) *Postharvest Biology and Technology of Tropical and Subtropical Fruits*, pp.134-160e
- Crane, J.C., Marei, N. ve Nelson, M.M., 1970a , ‘Ethrel speeds growth and maturity of figs’ ,*California Agr* , 24 (3), 8 – 10 .
- Crane, J.C., Marei, N. ve Nelson, M.M., 1970b , ‘Growth and maturation of fig fruits stimulated by 2-chloroethylphosphonic acid’ , *J Amer Soc Hort Sci*, 95 (3), 367 – 370 .
- Crisosto, C.H., Bremer, V., Garner, D., Stover, E., Ferguson, L., 2007a , Evaluating the roles of ethylene and storage temperature on fresh fig postharvest changes. <http://groups.ucanr.org/freshfig/index.cfm>
- Crisosto, C.H. ve Crisosto, G.M., 2001 , ‘Understanding consumer acceptance of early harvested “Hayward” kiwifruit’ , *Postharvest Biol Technol*, 22 , 205 – 213 .
- De Masi, L., Castaldo, D., Galano, G., Minasi, P., Laratta, B., 2005, Genotyping of fig (*Ficus carica* L.) via RAPD markers. *J. Sci. Food Agr.* 85:2235–2242.
- Duke, J. A., Bugenschutz-godwin, M. J., Du collier, J., Duke, P.K., 2002, Hand Book of Medicinal Herbs, *CRC Press*
- Ellegren, H., 2002, Microsatellite evolution: a battle between replication slippage and point mutation. *Trends Genet* 18:70
- Ellegren, H., 2004, Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nat Rev Genet* 5:435–445
- FAOSTAT ,2017, (<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>)
- Ferguson, L., Michailides, T.J., Shorey, H., 1990, The California fig industry. *Hort. Rev.*12:409–490.

- Ferrara, G., Mazzeo, A., Pacucci, C., Matarrese, A.M.S., Tarantino, A., Crisosto, C., Gadaleta, A., 2016, Characterization of edible fig germplasm from Puglia, southeastern Italy: Is the distinction of three fig types (Smyrna, San Pedro and Common) still valid? *Scientia Horticulturae* 205:52-58.
- Flaishman, M.A., Rodov, V., Stover, E., 2008, The Fig: Botany, Horticulture, and Breeding. *Horticultural Reviews*, Volume 34.
- Galderisi, U., Cipollaro, M., Di Bernardo, G., De Masi, L., Galano, G., Cascino, A., 1999, Identification of the edible fig 'Bianco del Cilento' by random amplified polymorphic DNA analysis. *Hort- Science* 34:1263–1265.
- Ganopoulos, I., Xanthopoulou, A., Molassiotis, A., Karagiannis, E., Moysiadis, T., Katsaris, P., Madesis, P., 2015, Mediterranean basin *Ficus carica* L.: from genetic diversity and structure to authentication of a protected designation of origin cultivar using microsatellite markers. *Trees* 29:1959.
- Garcia, M., Ban, A., Tzeng, H.Y., Peng, Y.Q., Chou, L.S., Kjellberg, F., 2012, PORTABLE MICROSATELLITE PRIMERS FOR *FICUS* (MORACEAE) *American Journal of Botany*: e187–e192.
- Giraldo, E., Lopez-Corrales, M., Hormaza, J.I., 2008, Optimization of the management of an ex-situ germplasm bank in common fig with SSRs. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 133:69-77.
- Giraldo, E., Viruel, M.A., López-corrales, M., Hormaza, J.I., 2005, Characterisation and cross-species transferability of microsatellites in the common fig (*Ficus carica* L.) *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* 80 (2) 217–224
- Goff, S.A., Ricke, D., Lan, T.H., Presting, G., Wang, R., Dunn, M., Glazebrook, J., Sessions, A., Oeller, P., Varma, H. ve ark. (2002) A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. japonica). *Science* 296:92–100
- Golombek, S., Lüdders, P., 1990, Effects of short-term salinity on leaf gas exchange of the fig (*Ficus carica* L.). *Plant & Soil* 148:21–27.
- Grohme, M.A., Soler, R.F., Wink, M., Frohme, M., 2013, Microsatellite marker discovery using single molecule real-time circular consensus sequencing on the Pacific Biosciences RS. *BioTechniques* 55:253-256.
- Haddou, L.A., Charafi, J., Blenzar, A., Messaoudi, Z., Outghouliast, H., 2018, Molecular Characterization and Study of Genetic Relationships among local Cultivars of the Moroccan fig (*Ficus carica* L.) using Microsatellite and ISSR Markers. *International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology* Vol-3, Issue-1, 2456-1878
- Hagen, G. ve Guilfoyle, T., 2002, Auxin-responsive gene expression: genes, promoters and regulatory factors *Plant Molecular Biology* 49: 373–385

- Hanai, L.R., de Campos, T., Camargo, L.E.A., Benchimol, L.L., de Souza, A.P., Melotto, M., Carbonell, S.A.M., Chioratto, A.F., Consoli, L., Formighieri, E.F. ve ark., 2007, Development, characterization, and comparative analysis of polymorphism at common bean SSR loci isolated from genic and genomic sources. *Genome* 50:266-277.
- Ikten, H., Solak, S., Yılmaz, Y., 2018, Transferability of SSR Markers From Related *Ficus* Species to *Ficus Caïca* L. and Assessment of Effectiveness of the Markers. *Applied Ecology and Environmental Research* 16(2):1909-1918.
- İncir Araştırma EnstitüsüMüdürlüğü, <https://arastirma.tarimorman.gov.tr/incir>, [Ziyaret Tarihi: 08 Temmuz 2019]
- Jackson, A.L., Chen, R., Loeb, L.A., 1998, Induction of microsatellite instability by oxidative DNA damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:12468–12473
- Janzen, D.H., 1979, “How to be a fig,”. *Annual Review of Ecology and Systematics*, vol. 10, pp. 13–51.
- Jehan, T. ve Lakhanpaul, S., 2006, single nucleotide polymorphism(SNP)-Methods and applications in plant genetics:A review. *Indian Journal of Biotechnology* . vol.5 pp435-459
- Jonah, P., Bello, L., Lucky, O., Midau, A., Moruppa, S., 2011, Review: the importance of molecular markers in plant breeding programmes. *Glob J Sci Front Res* 11:eV-vers1.
- Joshi, S.P., Ranjekar, P.K., Gupta, V.S., 1999, Molecular markers in plant genome analysis. *Current Science* vol. 77. No. 2.
- Kalia, R.K., Rai, M.K., Kalia, S., Singh, R., Dhawan, A. K., 2011, Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. *Euphytica* 177:309–334
- Khadari, B., Grout, C., Santoni, S., Kjellberg, F., 2005, Contrasted genetic diversity and differentiation among Mediterranean populations of *Ficus carica* L.: a study using mtDNA RFLP. *Genet Resour Crop Evol* 52:97–109
- Khadari, B., Hochu, I., Santoni, S. ve Kjellberg, F., 2001, Identification and characterization of microsatellite loci in the common fig (*Ficus carica* L.) and representative species of the genus *Ficus*. *Molecular Ecology Notes* ,1, 191-193
- Khadari, B., Lashermes, P., Kjellberg, F., 1995, RAPD fingerprints for identification and genetic characterization of fig (*Ficus carica* L.) genotypes. *J. Genet. Breed.* 49:77–86.
- Khoshbakht, K., Hammer, K., 2006, Savadkouh (Iran) – an evolutionary center for fruit trees and shrubs. *Genet Resour Crop Evol* 53:641–651
- Kjellberg, F., Gouyon, P.H., Ibrahim, M., Raymond, M. ve Valdeyron, G., 1987, The stability of the symbiosis between dioecious figs and their pollinators: a study of

- Ficus carica* L. and *Blastophagapsenes* L. Evolution (*Int. J. Org. Evol.*) 41:693–704.
- Knap, T., Jaks, J., Cregeen, S., Javornik, B., Hladnik, M., Bandelj, D., 2016, Characterization and defining of a core set of novel microsatellite markers for use in genotyping and diversity study of Adriatic fig (*Ficus carica* L.) germplasm. *Braz. J. Bot*
- Kruglyak, S., Durrett, R.T., Schug, M.D., Aquadro, C.F., 1998, Equilibrium distributions of microsatellite repeat length resulting from a balance between slippage events and point mutation. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:10774–10778
- Li, Y.C., Korol, A.B., Fahima, T., Beiles, A., Nevo, E., 2002, Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Mol Ecol* 11:2453–2465
- Li, Y.C., Korol, A.B., Fahima, T., Nevo, E., 2004, Microsatellites within genes: Structure, function and evolution. *MolBiolEvol* 21:991–1007.
- Maio, A.D. ve Castro, O.D., 2013, SSR-Patchwork: An optimized protocol to obtain a rapid and inexpensive SSR library using first-generation sequencing technology. *Appl Plant Sci* 1:1200158.
- Marei, N. ve Crane, J.C., 1971, Growth and respiratory response of fig (*Ficus carica* L. cv.Mission) fruits to ethylene. *Plant Physiol.* 48:249–254.
- Mason, A.S., 2015, SSR Genotyping. In: Batley J (ed) Plant Genotyping. *Springer*, New York, NY, pp 77-89.
- Matsuoka, Y., Mitchell, S.E., Kresovich, S., Goodman, M., Doebley, J., 2002, Microsatellites in *Zea*-variability, patterns of mutations and use for evolutionary studies.*Theor. Appl. Genet.*, 104, 436-450.
- McDermott, J.M., Brandle, U., Dutly, F., Haemmerli, U.A., Keller, S., Muller, K.E., Wolf, M.S., 1994, Genetic variation in powdery mildew of barley: development of RAPD, SCAR and VNTR markers. *Phytopathology* 84:1316–1321.
- Meksem, K. ve Kahl, G., 2005, The Handbook of Plant Genome Mapping, Genetic and Physical Mapping, *Wiley-VCH, Weinheim*, 380 p.
- Metzgar, D., Bytof, J., Wills, C., 2000, Selection against frameshift mutations limits microsatellite expansion in coding DNA. *Genome Res* 10:72–80.
- Miura, Y., Kondo, K., Saito, T., Shimada, H., Fraser, P.D., Misawa, N., 1998, Production of carotenoids lycopene, 13-carotene and astaxanthin in the food yeast *Gandida of utilis*. *Appl Environ Microbiol* 64:1226.
- Morgante, M., Hanafey, M., Powell, W., 2002, Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes. *Nat Genet* 30:194–200.

- Mori, K., Shirasawa, K., Nogata, H., Hirata, C., Tashiro, K., Habu, T., Kim, S., Himeno, S., Kuhara, S., Ikegami, H., 2017, Identification of *RAN1* orthologue associated with sex determination through whole genome sequencing analysis in fig (*Ficus carica* L.). *Scientific Reports* 7:41124
- Mullis, K.B., Faloona, F., 1987, Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase chain reaction. *Methods Enzymol* 155:350–355
- NCBI, National Center for Biotechnology Information, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=ficus%20carica>, [Ziyaret Tarihi: 2 Kasım 2018]
- NCBI, National Center for Biotechnology Information, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/ipg/?term=Ficus%20carica>, [Ziyaret Tarihi: 7 Kasım 2018]
- NCBI, National Center for Biotechnology Information <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/ipg/?term=moraceae>, [Ziyaret Tarihi: 7 Kasım 2018]
- Nadeem, M.A., Nawaz, M.A., Shahid, M.Q., 2018, DNA molecular markers in plant breeding: current status and recent advancements in genomic selection and genome editing *BIOTECHNOLOGY & BIOTECHNOLOGICAL EQUIPMENT*, VOL. 32, NO. 2, 261–285
- Nadir, E., Margalit, H., Gallily, T., Ben-Sasson, S.A., 1996, Microsatellite spreading in the human genome: evolutionary mechanisms and structural implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:6470–6475
- Nei, M. ve Li, W.H., 1979, Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 76, No. 10, pp. 5269-5273
- Nunome, T., Negoro, S., Miyatake, K., Yamaguchi, H. ve Fukuoka, H., 2006, A protocol for the construction of microsatellite enriched genomic library. *Plant Mol Biol Report* 24:305-312.
- Owino, W.O., Manabe, Y., Mathooko, F.M., Kubo, Y., Inaba, A., 2006, Regulatory mechanisms of ethylene biosynthesis in response to various stimuli during maturation and ripening in fig fruit (*Ficus carica* L.) *Plant Physiology and Biochemistry* 44 : 335–342
- Papadopoulou, K., Ehaliotis, C., Tourna, M., Kastanis, P., Karydis, I., Zervakis, G., 2002, Genetic relatedness among dioecious *Ficus carica* L. cultivars by random amplified polymorphic DNA analysis, and evaluation of agronomic and morphological characters. *Genetics* 114:183–194.
- Paran, I., Michelmore, R.W., 1993, Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theor Appl Genet* 85:985–999

- Parida, S.K., Kalia, S.K., Sunita, K., Dalal, V., Hemaprabha, G., Selvi, A., Pandit, A., Singh, A., Gaikwad, K., Sharma, T.R., Srivastava, P.S., Singh, N.K., Mohapatra, T., 2009, Informative genomic microsatellite markers for efficient genotyping applications in sugarcane. *Theor Appl Genet* 118:327–338
- Pearson, C.E., Edamura, N.K., Cleary, J.D., 2005, Repeat instability: mechanisms of dynamic mutations. *Nat Rev Genet* 6: 729–742
- Perez-Jimenez, M., Lopez, B., Dorado, G., Pujadas-Salva, A., Guzman, G., Hernandez, P., 2012, Analysis of genetic diversity of southern Spain fig tree (*Ficus carica* L.) and reference materials as a tool for breeding and conservation. *Hereditas* 149:108-113.
- Perrier, X., Jacquemoud-Collet, J.P., 2006, DARwin software <http://darwin.cirad.fr/>
- Peter, G., 2001, An assessment of the utility of single nucleotide polymorphisms (SNPs) for forensic purposes. *Int J Legal Med*, 114:204–210.
- Powell, W., Machray, G.C., Provan, J., 1996, Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends Plant Sci* 1:215–222
- Provan, J., Powell, W., Hollingsworth, P.M., 2001, Chloroplast microsatellites: new tools for studies in plant ecology and evolution. *Trends Ecol Evol* 16:142–147
- Rungis, D., Hamberger, B., Berube, Y., Wilkin, J., Bohlmann, J., Ritland, K., 2005, Efficient genetic mapping of single nucleotide polymorphisms based upon DNA mismatch digestion. *Mol. Breed.*, 16, 261–270
- Sadder, M. ve Ateyyeh, A., 2006, Molecular assessment of polymorphism among local Jordanian genotypes of the common fig (*Ficus carica* L.). *Scientia Hort.* 107:347–351.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., Arnheim, N., 1985, Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia *Science* Vol. 230, Issue 4732, pp. 1350-1354
- Salhi-Hannachi, A., Khaled, C., Messaoud, M., Mohamed, M., Mokhtar, T., 2005, Comparative analysis of genetic diversity in two Tunisian collections of fig cultivars based on random amplified polymorphic DNA and inter simple sequence repeats fingerprints. *Genet. Resources Crop Evol.* 52:563–573.
- Schlotterer, C. ve Tautz, D., 1992, Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Res.*, 20, 211-215.
- Schuler, G.D., 1997, Sequence mapping by electronic PCR. *Genome Res* 7:541–550.
- Semagn, K., Bjørnstad, Å., Ndjioudjop, M.N., 2006, An overview of molecular marker methods for plants. *Afr J Biotechnol* 5:2540-2568.

- Senan, S., Kizhakayil, D., Sasikumar, B., Sheeja, T.E., 2014, Methods for development of microsatellite markers: an overview. *Not Sci Biol* 6:1-13.
- Setser, C.S., Macrae, R., Robinson, R.K., Sadler, M.J., 1993, Encyclopaedia of food science. *Food Technological Nutrition Academia Press*
- Solomon, A., Golubowicz, S., Yablowicz, Z., Grossman, S., Bergma, M. ve ark., 2006, Antioxidant activities and anthocyanin content of fresh fruits of common fig (*Ficus carica* L.), *J Agric Food Chem*, 54 (20), 7717 – 7723 .
- Soranzo, N., Provan, J., Powell, W., 1999, An example of microsatellite length variation in the mitochondrial genome of conifers. *Genome* 42:158–161
- Staub, J.E., Serquen, F.C., 1996, Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding. *Hort Sci.*, 31, 729–740.
- Storey, W.B. ve ark., 1975, Figs. In: Janick J, Moore J (eds) Advances in fruit breeding. *Purdue University Press*, Indiana, pp 568– 589
- Stover, E. ve Aradhya, M., 2007, The Fig: Overview of an Ancient Fruit. *HortScience* vol. 42(5)
- Thiel, T., Michalek, W., Varshney, R.K., Graner, A., 2003, Exploiting EST databases for the development of cDNA derived microsatellite markers in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theor Appl Genet* 106:411–422
- Thirugnanasambantham, K., Durairaj, S., Saravanan, S., Karikalan, K., Muralidaran, S., Islam, V.I.H., 2014, Role of Ethylene Response Transcription Factor (ERF) and Its Regulation in Response to Stress Encountered by Plants. *Plant Mol Biol Rep* Volume 33, Issue 3, pp 347–357
- Temnykh, S., DeClerck, G., Lukashova, A., Lipovich, L., Cartinhour, S., McCouch, S., 2001, Computational and experimental analysis of microsatellites in rice (*Oryza sativa* L.): frequency, length variation, transposon associations, and genetic marker potential. *Genome Res* 11:1441–1452
- The Arabidopsis Genome Initiative, 2000, Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408:796–815
- Tiwari, S.B., Hagen, G., Guilfoyle, T., 2003, The Roles of Auxin Response Factor Domains in Auxin-Responsive Transcription. *The Plant Cell*, Vol. 15, 533–543
- Trifonov, E.N., 2003, Tuning function of tandemly repeating sequences: a molecular device for fast adaptation. In: Wasser SP (ed) Evolutionary theory and processes: modern horizons, papers in honor of Eviatar Nevo. *Kluwer*, Amsterdam, pp 1–24
- Uncu, A.T., 2018, Genome-wide identification of simple sequence repeat (SSR) markers in *Capsicum chinense* Jacq. with high potential for use in pepper introgression breeding *Biologia*, <https://doi.org/10.2478/s11756-018-0155-x>

- USDA Nutrient Database, Raw Figs, <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/09089> ,
[Ziyaret Tarihi: 15 Mayıs 2019]
- Varshney, R.K., Thiel, T., Stein, N., Langridge, P., Graner, A., 2002, In silico analysis on frequency and distribution of microsatellites in ESTs of some cereal species. *Cell Mol Biol Lett* 7:537–546
- Vieira, M.L.C., Santini, L., Diniz, A.L. ve Munhoz, C.F., 2016, Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful. *Genetics and Molecular Biology*, 39, 3, 312-328
- Vinson, J.A., 1999, The functional food properties of figs. *Cereal Foods World*, 44, 82–87.
- Wagner, W.L., Herbst, D.R., ve Sohmer, S.H., 1999, *Manual of the Flowering Plants of Hawaii*, vol. 83, University of Hawaii and Bishop Museum Press, Honolulu, Hawaii, USA
- Wang, M.L., Barkley, N.A., Jenkins, T.M., 2009a, Microsatellite markers in plants and insects. Part I. Applications of biotechnology. *Genes Genomes Genomics* 3:54–67
- Wang, X. ve Wang. L., 2016, GMATA: An Integrated Software Package for Genome-Scale SSR Mining, Marker Development and Viewing. *Front Plant Sci.* 13;7:1350
- Weber, J.L., 1990, Informativeness of human (dC-dA)_n – (dGdT)_n polymorphisms. *Genomics* 7:524–530
- Weising, K., Gardner, R.C., 1999, A set of conserved PCR primers for the analysis of simple sequence repeat polymorphisms in chloroplast genomes of dicotyledonous angiosperms. *Genome* 42:9–19
- Welsh, J., McClelland, M., 1990, Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 18 (24):7213–7218.
- Werbach, M., 1993, *Healing with Food*, Harper Collins, New York, NY, USA
- Williams, J.G., Kubelik, A.R., Livak, K.J. ve ark., 1990, DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.*;18(22):6531– 6535.
- Yu, J., Hu, S., Wang, J., Wong, G.K., Li, S., Liu, B., Deng, Y., Dai, L., Zhou, Y., Zhang, X. ve ark., 2002, A draft sequence of the rice Genome (*Oryza sativa* L. ssp. indica). *Science* 296:79–92
- Zhu, Z., Shi, J., Xu, W., Li, H., He, M., Xu, Y., Xu, T., Yang, Y., Cao, J., Wang, Y., 2013, Three ERF transcription factors from Chinese wild grapevine *Vitis pseudoreticulata* participate in different biotic and abiotic stress-responsive pathways. *J Plant Physiol* 170:923–933.

Zukovskij, P.M., 1950, Ficus. Cultivated plants and their wild relatives. *State Publishing House Sov Sci Mosc* 1950:58–59



ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Şeyma Nur ERDEĞER
Uyruğu : T,C
Doğum Yeri ve Tarihi : Ankara-Altındağ/ 02.09.1995
Telefon : 05442565334
Faks :
e-mail : seymanurerdeger@outlook.com

EĞİTİM

Derece	Adı, İlçe, İl	Bitirme Yılı
Lise	: Aydınlikevler Anadolu Lisesi, Aydınlikevler,Ankara	2013
Üniversite	: Necmettin Erbakan Üniversitesi, Meram, Konya	2017
Yüksek Lisans	: Necmettin Erbakan Üniversitesi, Meram, Konya	
Doktora	:	

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görevi
2016	TÜBİTAK MAM Genetik Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü	Stajyer
2018	Moleküler Bitki Fizyolojisi,Max Planck Enstitüsü	Stajyer

UZMANLIK ALANI

YABANCI DİLLER

İngilizce

BELİRTMEK İSTEĞİNİZ DİĞER ÖZELLİKLER

YAYINLAR