

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Seçkin KARATAŞ

CEVİZDE YENİ SSR PRİMERLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ

BAHÇE BİTKİLERİ BÖLÜMÜ

ADANA, 2017

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

CEVİZDE YENİ SSR PRİMERLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ

Seçkin KARATAŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BAHÇE BİTKİLERİ BÖLÜMÜ

Bu Tez 25/10/2017 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından
Oybirliği/Oyçokluğu ile Kabul Edilmiştir.

.....
Prof. Dr. Salih KAFKAS
DANIŞMAN

.....
Prof. Dr. N. Ebru KAFKAS
ÜYE

.....
Doç. Dr. Mehmet SÜTYEMEZ
ÜYE

Bu Tez Enstitümüz Bahçe Bitkileri Anabilim Dalında hazırlanmıştır.
Kod No:

Prof. Dr. Mustafa GÖK
Enstitü Müdürü

Bu Çalışma Ç. Ü. Araştırma Projeleri Birimi Tarafından Desteklenmiştir.
Proje No: ZF2013YL43

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge ve
fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat
Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

CEVİZDE YENİ SSR PRİMERLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ

Seçkin KARATAŞ

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

Danışman : Prof. Dr. Salih KAFKAS
Yıl : 2017 Sayfa :43
Jüri : Prof. Dr. Salih KAFKAS
: Prof. Dr. N. Ebru KAFKAS
: Doç. Dr. Mehmet SÜTYEMEZ

Cevizde referans genetik harita oluşturmak için çok sayıda basit dizi tekrarlarından (SSR) elde edilmiş polimorfik primerlere gereksinim vardır. Ancak literatürde yayımlanan SSR sayısı yeterli değildir. Bu nedenle, bu çalışmanın amacı, ileride cevizde genetik haritalama çalışmalarında kullanmak üzere yeni SSR primerleri geliştirmektir. Bu çalışma kapsamında gen bankasındaki *Juglans regia*'ya ait yapay bakteriyel kromozom dizilerindeki tekrar bölgelerden (BES-SSR) 200 adet SSR primer çifti dizayn edilmiştir. Tüm SSR primerleri 16 adet yerli ve yabancı ceviz çeşitlerinde hem bant üretme hem de polimorfizm bakımından analiz edilmiştir. Bunlardan 190 adet SSR primer çifti (%95) başarılı olarak amplifiye olmuş ve 92 adet primer çifti ise polimorfik bulunmuştur. Polimorfik 92 SSR primer çifti 2 ile 11 arasında, toplamda 324 ve lokus başına ortalama 3.6 adet allel üretmiştir. Polimorfizm bilgi içeriği (PBI) değeri 0.11 ile 0.88 arasında değişmiş ve ortalama 0.46 olarak belirlenmiştir. Elde edilen soyağacı yerli ve yabancı ceviz çeşitlerini iki gruba ayırmıştır. Sonuç olarak, bu çalışmada kapsamında cevizde ileride genetik çalışmalarda kullanılmak üzere 92 adet yeni polimorfik SSR primer geliştirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Ceviz, *J. regia*, SSR, mikrosatellit

ABSTRACT

MSc. THESIS

DEVELOPING NEW SSR MARKERS IN WALNUT

Seçkin KARATAŞ

ÇUKUROVA UNIVERSITY
INSTITUTE OF BASIC AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF HORTICULTURE

Supervisor	: Prof. Dr. Salih KAFKAS Year: 2017, Pages: 43
Jury	: Prof. Dr. Salih KAFKAS : Prof. Dr. N. Ebru KAFKAS : Assoc. Prof.Dr. Mehmet SÜTYEMEZ

It is necessary to have many polymorphic SSR (Simple Sequence Repeat) markers to construct a genetic linkage map in walnut. However, there are no adequate number of SSR markers in the literature. Therefore, the main objective of this study was to develop novel SSR markers for further genetic linkage mapping studies in walnut. For this purpose, a total of 200 SSR primer pairs were designed from bacterial artificial chromosome end sequences (BES-SSR) deposited in Genbank. All the SSR loci were tested for amplification and polymorphism in 16 local and foreign cultivars. A total of 190 (95%) SSR loci were amplified successfully and 92 were polymorphic. Polymorphic loci produced 324 alleles ranging between 2 to 11 with an average of 3.6 alleles. primer pairs from *J. regia* were designed and 190 primers (95%) had successfully amplification patterns. Polymorphism information contents (PIC) varied from 0.06 to 0.87 with an average of 0.42. The dendrogram separated local and foreign walnut cultivars in two groups. In conclusion, 92 polymorphic SSR markers were developed in this study to use them in further genetic studies in walnut.

Key Words: Walnut, *J. regia*. SSR, microsatellite

GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

Ceviz (*Juglans regia* L.) ticareti yapılan türler içerisinde Türkiye için büyük öneme sahiptir. FAO verilerine göre Türkiye yıllık 180.807 ton ceviz üretimiyle dünya sıralamasında Çin, ABD ve İran 'dan sonra 4. sırada yer almaktadır.

Türkiye'de ceviz yetiştiriciliği son yıllara kadar tohumdan yetiştirilen fidanlarla yapılmıştır. Bu durum üretim kalitesinde standardizasyonu sağlamak gibi konularda sorun oluşturmakla birlikte tohumdan üretimle oluşan geniş populasyon, ıslah çalışmaları için önemli bir genetik çeşitlilik sağlamıştır.

Türkiye'de cevizde ıslah çalışmaları 1970'li yıllardan beri yürütülmektedir. Geleneksel ıslah çalışmaları uzun yıllar alan, çevresel koşullardan etkilenen zorlu bir süreç içerir. Geleneksel ıslah yöntemleri moleküler ıslah yöntemleriyle desteklendiğinde ıslah süreci kısaltmakta ve daha etkili sonuçlar alınabilmektedir. Moleküler ıslahta çeşitli markör teknikleri kullanılmaktadır. Basit dizi tekrarları (SSR) en fazla kullanılan yöntemlerden biridir. SSR yöntemi kodominant olması, yüksek oranda tekrarlanabilirliği, polimorfizm göstermesi, genomda sıklıkla bulunması ve yüksek bilgi içeriğine sahip olması nedenleriyle tercih edilmektedir. Bu olumlu özelliklerinin yanında her tür için primer geliştirme zorunluluğu bulunmaktadır.

Cevizde bugüne kadar geliştirilen SSR primerlerinin sayısı çok sınırlı sayıda olması ve büyük bir kısmının *J. regia* dışındaki türlerden geliştirilmiş olması nedeniyle genetik haritalama çalışmalarında kullanılmak üzere yeni SSR primerlerine ihtiyaç vardır.

Chandler çeşidi dünyada en fazla ticareti yapılan çeşittir. Bu çalışmada NCBI (National Center for Biotechnology Information) gen bankasında bulunan *J. regia* türü içinde olan Chandler çeşidinin DNA dizileri kullanılarak 200 SSR primer çifti dizayn edilmiş olup bu primerlerin bant üretme durumları ile polimorfizm durumları bu çalışma kapsamında belirlenmiştir.

Dizayn edilen 200 adet SSR primer çiftinin testi Türkiye’den 8 çeşit (Maraş-12, Sütyemez-1, Sütyemez-2, Şebin, Kaman-1, Kaplan-86, Yalova-1 ve Bilecik), Amerika Birleşik Devletlerinden 5 (Chandler, Serr, Pedro, Midland ve Hartley) ve Fransa’dan 3 çeşit (Fernor, Franquette ve Fernette) kullanılarak yapılmıştır. Analiz edilen 200 SSR primer çiftinden 190 tanesi amplifikasyon verirken 10 primer çifti bant üretmemiştir. Amplifiye olan 190 SSR lokustan 92 tanesinin polimorfik olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada polimorfik olan 92 adet SSR primer çifti kullanılarak elde edilen benzerlik katsayıları ile 16 ceviz çeşidinin genetik akrabalık ilişkileri belirlenmiştir. UPGMA benzerlik indeksi kullanılarak oluşturulan soy ağacına göre elde edilen 2 ana grup oluşmuştur: Yerli çeşitler bir grubu oluştururken, yabancı orijinli çeşitler diğer grupta yer almıştır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmamın her aşamasında sabrını ve yardımlarını esirgemeyen, değerli bilgilerini ve tecrübelerini benimle paylaşan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Salih KAFKAS'a ve motivasyonumu her kaybettiğimde yanımda olup bana arkadaşlığı ile destek olan sevgili eşi, canım arkadaşım Prof. Dr. Ebru KAFKAS'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarında kullanmış olduğum bitki materyallerine sorunsuz ulaşmamı sağlayan Sayın Doç. Dr. Mehmet SÜTYEMEZ hocama teşekkür ederim.

Bahçe Bitkileri Bölümü Moleküler Genetik Laboratuvarında çalışmalarını yürüten ve bana sabır gösteren, yardım ve desteklerini esirgemeyen arkadaşlarım Hayat TOPÇU, Mortaza KHODAEIAMINJAN, Murat GÜNEY, Elmira ZIYA MOTALLEBPOUR, Aibibula PAIZILA ve Sina KEFAYATI'ye teşekkür ederim.

Yüksek Lisans çalışmalarım esnasında tüm bölüm olanaklarından yararlanmamı sağlayan Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölüm Başkanlığı'na, maddi destek veren Ç.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım esnasında maddi ve manevi desteğini esirgemeyen eşime, tezimi tamamlamam konusundaki manevi destekleri için babama ve anneme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

SAYFA

ÖZ	I
ABSTRACT.....	II
GENİŞLETİLMİŞ ÖZET	III
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
ÇİZELGELER DİZİNİ	VIII
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	XII
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	7
3. MATERYAL ve METOD	15
3.1. Materyal	15
3.2. Metod.....	16
3.2.1. DNA İzolasyonu	16
3.2.2. DNA Konsantrasyonun Belirlenmesi	17
3.2.3. SSR Primer Çiftlerinin Ceviz Çeşitlerinde Polimorfizm Durumlarının Belirlenmesi ve Çeşitlerin Karakterizasyonu	17
3.2.4. Verilerin Analizi	20
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	21
4.1. Cevizde Yeni SSR Markörlerinin Geliştirilmesi.....	21
4.2. Geliştirilen SSR Markörleri Kullanılarak 16 Ceviz Çeşidinde Genetik İlişkilerin Belirlenmesi	30
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	33
KAYNAKLAR	35
ÖZGEÇMİŞ	43



ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA

Çizelge 3.1. Denemede kullanılan ceviz çeşit ve genotipleri ile alındıkları genetik kaynaklar	15
Çizelge 3.2. SSR yönteminde PCR’da kullanılan bileşenler	18
Çizelge 3.3. SSR Yönteminde Kullanılan PCR sıcaklık ve döngü koşulları	19
Çizelge 4.1. SSR primer çiftlerinin sekansları, tekrar motifleri ve annealing sıcaklıkları	21
Çizelge 4.1. Primer adı, allel aralığı, allel sayısı (N_a), efektif allel sayısı (N_e), beklenen (H_e) heterozigositi, gözlenen (H_o) heterozigositi ve polimorfizm bilgi içeriği (PIC)	27
Çizelge 4.3. Toplam 92 SSR primer çifti kullanılarak 16 adet ceviz çeşidine ait genetik benzerlik indeksi	32



ŞEKİLLER LİSTESİ

SAYFA

Şekil 1.1. 2014 yılı kabuklu ceviz üretimi 2017	2
Şekil 2.1. 16 ceviz çeşidinden elde edilen dendrogram	20
Şekil 4.1. 92 SSR primeri kullanılarak 16 adet ceviz çeşidine ait dendrogram	31





SİMGELER VE KISALTMALAR

BAC	: Bacterial Artificial Chromosome
BES	: BAC-end sequence
CTAB	: Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide
dNTP	: Deoxy- Nucleoside Triphosphate
dATP	: Deoxyadenosine Triphosphate
DNA	: Deoxyribonucleic acid
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetic Acid
g	: Gram
HCl	: Hidrochloric Acid
M	: Molar
MgCl ₂	: Magnesium Chloride
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
NaCl	: Sodium Chloride
Na ₂ S ₂ O ₅	: Sodium Metabisulfite
ng	: Nanogram
PCR	: Polymerase Chain Reaction
AFLP	: Amplified Fragment Length Polymorphism
SCAR	: Sequenced Characterized Amplified Region
SNP	: Single Nucleotide Polymorphism
SRAP	: Sequence-Related Amplified Polymorphism
SSR	: Simple Sequence Repeat

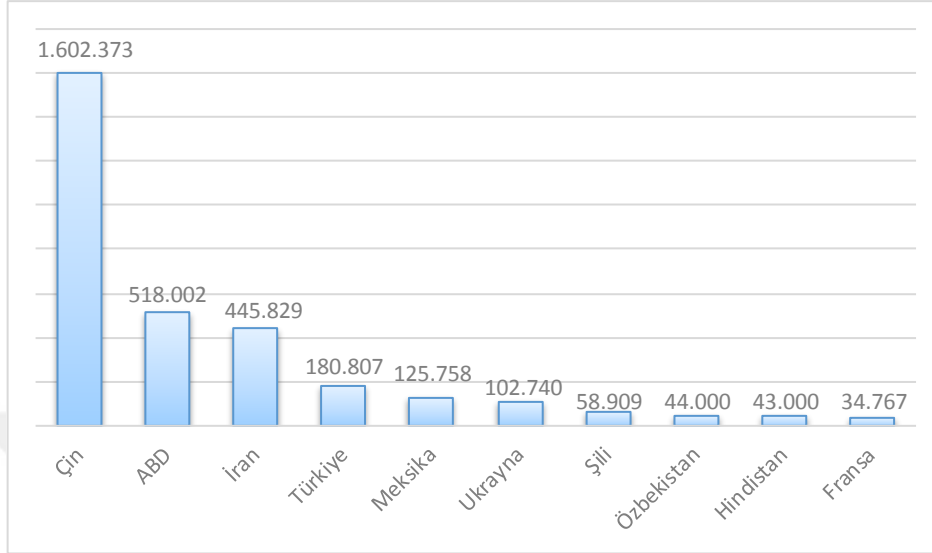


1. GİRİŞ

Juglans cinsi içerisinde 20 tür bulunmaktadır ve ceviz (*Juglans regia* L.) bunlardan biridir. En çok kültürü ve ticareti yapılan tür *Juglans regia*'dir. Ceviz rüzgarla tozlanan bir türdür (Manning, 1978). Cevizler monoik çiçek yapısına sahiptir. Protogeni (dişi çiçeğin erkek çiçekten erken olgunlaşması) ve protandri (erkek çiçeğin dişi çiçekten erken olgunlaşması) gösterirler (Forde ve Griggs, 1972). Bir önceki yılın sürgünleri üzerindeki yan tomurcukların olgunlaşmasından 10-100 adet erkek çiçek püskülleri (kedicik) oluşurken, aynı yılda gelişen sürgünlerin ucunda yaklaşık 1-12 adet dişi çiçekler oluşur (Şen, 1986). Ceviz diploittir ve $2n=32$ kromozoma sahiptir (Woodworth, 1930). Haploid sayıdaki kromozom çiftinin uzunlukları 1.55 ile 3.53 μm arasında değişim gösterir (Vahdati ve ark., 2014).

Cevizin anavatanı Güneydoğu Asya'dan başlayarak Kafkaslar ve İran'ın dahil olduğu ve Türkmenistan'nın güneyi, kuzey Afganistan, Tacikistan, Özbekistan ve batı Çin'i içeren Orta Asya ve güneydoğuya doğru kuzey Pakistan, Keşmir, Nepal ve kuzey Hindistan ile Tibet'i içeren Himalayalar bölgesidir (Leslie ve McGranahan, 1998).

FAO verilerine göre ceviz üreten ülkeler arasında Türkiye sırasıyla Çin, İran ve Amerika Birleşik Devletleri'nden sonra dünya üretiminde 4. sırada yer almaktadır (Şekil 1.1; Faostat, 2017). Dünya ceviz üretiminde ilk 10'u oluşturan ülkeler sırasıyla; Çin, ABD, İran, Türkiye, Meksika, Ukrayna, Şili, Özbekistan, Hindistan ve Fransa'dır.



Şekil 1.1. 2014 yılı kabuklu ceviz üretimi (Faostat, 2017)

Türkiye gerek ağaç sayısı gerekse üretim olarak dünya ceviz yetiştiriciliğinde önemli bir yere sahiptir. Ancak yetiştiriciliğin büyük çoğunluğu tohumdan yetiştirilen ağaçlarla yapıldığı için ürünlerde standardizasyon tam olarak sağlanamamaktadır. Bu durum gerek iç pazar gerekse dış pazarda sorunlara neden olmaktadır. Ancak tohumdan yetiştiricilik sonucu oluşan bu geniş populasyon ıslahçılar için zengin bir genetik kaynak oluşturmaktadır. Ülkemizde ilk ıslah çalışmaları 1970 yılında başlamıştır. Bugüne kadar yapılan çok sayıda seleksiyon çalışması sonucunda çok önemli standart çeşitler elde edilmiştir (Beyhan, 2009). Bunun yanında, son yıllarda standart çeşitler ile büyük bahçeler tesis edilmeye başlanmıştır.

Islah çalışmalarının temel hedeflerini yüksek ve kaliteli üretim, geniş yelpazede hasat dönemleri ve hastalık ve zararlılara dayanıklı çeşitler elde etme şeklinde sıralayabiliriz (Akça, 2005). Yürütülen ıslah çalışmaları sonucunda özellikle Ankara, Bitlis, Hakkari, Van, Malatya, Kırşehir, Konya, Sivas olmak

üzere birçok bölgeden 200'ün üzerinde ümitvar genotipler elde edilmiştir (Akça ve Karadağ, 2011).

Kaplan-86 Türkiye'nin Ege ve Akdeniz bölgelerinde yetiştirilebilen bir çeşittir. Düşük verimliliği nedeniyle ticari bir önem kazanamamıştır. Kabuklu meyve ağırlığı 24 g olup iç ağırlığı 9.6 g dır. Meyve içi %68 yağ ve %16 protein içermektedir. Kabuk içten kolay ayrılır. Hasat dönemi Ağustos'un 2. haftası başlar (Şen ve ark., 2006).

Chandler çeşidi dünyaca bilinen bir çeşittir. 1979 yılında Kaliforniya Üniversitesi tarafından geliştirilmiştir. Bugün Kaliforniya'da yaklaşık %50 oranında en fazla yetiştirilen çeşittir. Chandler meyvesi iri, oval bir şekle sahiptir. Kabuğu ince ve az pürüzlüdür. Yüksek iç kalitesi nedeniyle üreticiye dünya ceviz piyasasında oldukça yüksek fiyatlar sağlamaktadır.

Bitki ıslahı bir bitkinin genetik yapısını insanlığın ihtiyaçları doğrultusunda daha uygun hale getirmek için yapılan çalışmalar bütünüdür. Günümüzde ıslahçılar geleneksel ıslah yöntemlerini moleküler ıslah yöntemleriyle birleştirerek uzun süren ve oldukça uğraş gerektiren ıslah sürecini daha etkili bir hale getirmekte ve yüksek kaliteli çeşitleri daha kısa sürede elde edebilmektedir. Moleküler ıslah, moleküler markörlerin bitki genomu ve bağlantı haritaları kullanılarak istenilen genetik özelliklerde bitkilerin seçimi olarak tanımlanabilir (Vinod, 2006).

Moleküler markörler temel olarak kromozomlar üzerindeki belirlenmiş bölgelerdir. Genetik haritalar oluşturulurken ilgili genlerin yerleriyle alakalı referans noktaları sağlarlar (Staub ve ark., 1996; Semagn ve ark., 2006). İdeal bir markör yüksek polimorfizm, kodominant kalıtım, genom boyunca düzenli dağılan ve tekrarlanabilirlik gibi özelliklere sahip olmalıdır (Kumar ve ark., 2009).

Moleküler bitki ıslahında çeşitli moleküler markörler teknikleri kullanılmaktadır. Literatürde çeşitlerin tanımlanmasında ve genetik haritaların oluşturulmasında ilk kullanılan moleküler markör tekniklerinden, RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) tekniği olmuştur (Tanksley ve ark., 1989). RFLP kodominant bir tekniktir. Daha sonra PCR'a (Polymerase Chain

Reaction) dayalı teknikler geliştirilmiştir. PCR esaslı DNA moleküler markörleri, dominant ve kodominant olmak üzere iki gruba ayrılırlar. RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), ISSR (Inter-Simple Sequence Repeats), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), SRAP (Sequence Related Amplified Polymorphism) ve AP-PCR (Arbitrarily Primed PCR) dominant markör sistemlerinden bazılarıdır. Kodominant markörlerden bazıları ise SSR (Simple Sequence Repeat) STS (Sequence-Tagged-Site), SNP (Single Nucleotide Polymorphism), CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence) ve SCAR (Sequence Characterised Amplified Regions)'dır.

Cevizde genetik kaynakların karakterizasyonunda RFLP, RAPD, ISSR, SSR, AFLP ve SAMPL gibi çeşitli moleküler markörler kullanılmıştır (Fjellstrom ve ark., 1994; Nicese ve ark., 1998; Woeste ve ark., 2002; Potter ve ark., 2002; Dangl ve ark., 2005; Kafkas ve ark., 2005; Doğan ve ark., 2014).

SSR yönteminin kodominant olması, tekrarlanabilirliğinin yüksek olması, yüksek polimorfizm göstermesi ve bilgi içeriğinin yüksek olması nedenleriyle özellikle genetik haritalama, ebeveyn belirlleme ve populasyon genetiği çalışmalarında öncelikli olarak tercih edilen yöntem olmuştur. SSR yönteminin birçok avantajının yanında geliştirilen primerlerin türe özgü olması ve primer geliştirmenin maliyetli olması dezavantajları arasında yer almaktadır.

Cevizde bugüne kadar yapılan SSR primer geliştirme çalışmaları incelendiğinde ilk primer geliştirme çalışması Woeste ve ark. (2002) tarafından *J. nigra* türünde yapılmıştır. Çalışma sonucunda 30 adet SSR primeri geliştirilmiştir. Daha sonra Foroni ve ark. (2005) ile Dangl ve ark. (2005). *J. nigra*'da geliştirilen SSR primerlerini *J. regia* çeşitlerinde uygulamışlar ve sonuçta 20 adet SSR primerinin *J. regia* çeşitlerinde kullanılabileceğini bildirmişlerdir. Foroni ve ark. (2005) İtalya'da Woeste ve ark.'nın (2002) geliştirdikleri 23 adet SSR markörünü *J. regia* çeşitlerinde kullanmışlardır. Kullandıkları 23 adet SSR primer çiftinden 6 adedinin polimorfik olduğunu ve *J. regia*'da kullanılabileceğini saptamışlardır.

Dirlewanger ve ark. (2002), CT ile zenginleştirilen 41 mikrosatellit primer çifti rapor edilmiştir. Mikrosatellitlerin polimorfizmi 27 şeftali ve 21 kiraz çeşidinde test edilmiştir. Bitkilerdeki diğer cinslerden *Rosaceae*'de ve *Rosaceae*'ye ait olmayan diğer türlerde (*Castanea*, *Vitis* ve *Juglans*) test edilerek ve sırasıyla kestane ağaçları, asma ve ceviz ağaçlarında %80,5, %43.9 ve 31.7 amplifikasyon olduğunu vurgulamışlar. Ve sonuçta 9 primerin ceviz için uygun olduğu tespit edilmiştir.

Robichaud ve ark. (2006) siyah ceviz için 12 adet polimorfik SSR lokusu belirlemişler ve bu primerlerin ebeveyn ve genotip belirlemede kullanılabileceğini bildirmişlerdir. Ross-Davis ve ark. (2008) yaptıkları çalışmada, *J. cinerea* türünde 7 polimorfik mikrosatellit lokusu belirlemişlerdir. Hoban ve ark. (2008) *J. cinerea*'da genomik kütüphane oluşturmuşlar ve analizi yapılan 34 primer çifti içerisinde 13 tanesi polimorfik olduğu belirlenmiştir. Zhang ve ark. (2010) gen bankasındaki ceviz EST (Expressed Sequence Tags) sekanslarında tekrar dizisi aramışlar ve 123 adet SSR primer çifti dizayn etmişlerdir. Dizayn edilen primerlerden 41 tanesi polimorfik bulunmuştur.

Topcu ve ark. (2013) 'GA' ve 'AC' tekrar dizileri ile zenginleştirilerek oluşturulmuş 340 adet SSR primer çifti dizayn etmişler ve sonuçta 32 adet polimorfik primer geliştirmişlerdir. Topcu ve ark. (2015) farklı tekrar motifleri (GA, CA, AAC ve AAG) ile zenginleştirilmiş genomik kütüphaneleri kullanarak cevizde yeni 185 adet SSR primer geliştirmişlerdir. Ikhsan ve ark. (2016) yaptıkları çalışmada NCBI gen bankasında bulunan Chandler ceviz çeşidine ait dizileri kullanarak 307 adet yeni SSR primerini başarılı bir şekilde geliştirmişlerdir.

Bütün literatür incelendiğinde bugüne kadar geliştirilen primer sayısının yeterli olmadığı görülmektedir. Ayrıca geliştirilen SSR primerlerinin birçoğu *J. regia* türü dışında kalan diğer türlerden geliştirilmiştir. Bu durum genetik haritalama çalışmalarında kullanılacak polimorfik primer sayısını sınırlamaktadır. Bununla birlikte, özellikle genetik haritalama çalışmalarında kullanmak üzere çok

sayıda SSR primerine gereksinim vardır. İşte bu çalışmanın amacı, gen bankasında yer alan Chandler DNA dizilerini kullanarak SSR primeri geliştirmektir.



2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Woeste ve ark. (2002) *J. nigra* türünü kullanarak SSR geliştirme çalışması yapmışlar ve 30 adet SSR markörü geliştirmişlerdir. Araştırmacılar, geliştirdikleri SSR markörlerinin *J. nigra* ve diğer türlerde populasyon genetiği çalışmalarında, genetik haritalama çalışmalarında, çeşitlerin karakterizasyonunda ve ebeveyn velirleme çalışmalarında değerlendirilebileceğini belirtmişlerdir.

Dirlewanger ve ark. (2002) şeftalide 41 tane SSR markörü geliştirdikleri çalışmada, bu markörlerin cevizde amplifikasyon verip vermediğini test etmişlerdir. Sonuçta, 41 adet SSR primer çiftinden 9 adetinin cevizde kullanılabileceği belirlenmiştir.

Dangl ve ark. (2005) 47 adet *J. regia* ile *J. hindsii* x *J. regia* hibrit (Paradox) bitkilerinde en iyi 14 SSR primer çiftini belirlemişlerdir. Çalışmacılar, araştırmada kullanılan SSR primerlerinin akrabalık derecesi yüksek ceviz çeşitlerinin karakterizasyonunda ve gen havuzundaki genotiplerin ayrılmasında tesirli olduğunu belirtmişlerdir. İlerde cevizde yapılacak ıslah çalışmalarında da bu markörlerin değerli bir bilgi kaynağı olabileceğini belirtmişlerdir.

Foroni ve ark. (2005) İtalya'da yürüttükleri çalışmada Woeste ve ark.'nın (2002) geliştirdikleri 23 adet SSR markörünü *J. regia* türünden olan Sorrento çeşidinin 6 aşılı bitkisinde, 10 adet çöğüründe ve 6 değişik *J. regia* çeşidinde kullanmışlardır. Çalışmacılar, kullanılan 23 primerden 6 adetini polimorfik olarak belirlemiş ve *J. regia*'da kullanılabileceğini bulmuşlardır.

Victory ve ark. (2006) Amerika'da kerestesi değerli olan siyah cevizde (*J. nigra*) populasyonların genetik yapısını ortaya koymak ve genetik varyasyonu belirlemek için SSR yöntemini kullanmışlardır. Toplam 43 siyah ceviz populasyonu 12 adet polimorfizm gösteren mikrosatellit lokusu ile karakterize edilmiştir. Sonuçta, siyah cevizde genetik varyasyonun yüksek olduğu belirlenmiştir.

Robichaud ve ark. (2006) siyah ceviz (*J. nigra*) için 12 adet güvenilir ve polimorfik SSR lokusu tanımlamışlardır. Araştırmacılar, bu 12 lokusu 39 farklı siyah cevizin ağacının tohumdan çıkma 222 yavru bireyinde test ettikleri 17 lokus içerisinde seçmişlerdir. Araştırmacılar, belirlenen 12 SSR lokusunun ebeveyn ve genotip belirlemede kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Foroni ve ark. (2007) İtalya'da Sorrento cevizinin en popüler ceviz olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar, Caserta bölgesinde tohumdan çıkma 10 adet ve 6 adet aşılı Sorrento cevizi ile Sorrento yarımadasında yetişen 26 aşılı Sorrento cevizini 6 ceviz çeşidi ile birlikte 12 mikrosatellit primer çiftini kullanarak karakterize etmişlerdir. Araştırmacılar, toplam 66 allel belirlemişlerdir. Filogenetik analiz sonucunda Caserta grubu ile Sorrento yarımadası grubu birbirlerinden kolaylıkla ayrılmıştır.

Ross-Davis ve Woeste (2007) yaptıkları SSR çalışmasında, *J. cinerea* ceviz türünde 10 polimorfik mikrosatellit lokusu belirlemişlerdir. Bu lokusların diğer 9 *Juglans* türünü ve 5 türler arası melez de de çalıştığını bildirmişlerdir. *Juglans* türlerinde lokus başına allel sayısı 18 ile 32 arasında değişmiştir. Araştırmacılar belirlenen SSR lokuslarının *J. cinerea* populasyonlarının tanımlanmasında ve diğer *Juglans* türlerinden ayırt edilmesinde kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Wang ve ark. (2008) Çin'de 5 adet *J. regia* ve 4 adet *J. sigillata* türlerine ait olmak üzere toplam 9 populasyonda genetik çeşitliliği incelemek ve bu populasyonlar arasındaki genetik ilişkileri ortaya çıkarmak için mikrosatellit markörlerini kullanmışlardır. Populasyon seviyesinde orta seviyede bir genetik çeşitlilik olduğu belirlenirken, lokus başına düşen allel sayısı 1.75 ile 3.35 arasında değişim göstermiştir. Kullanılan 8 SSR primer çifti toplam 73 allel üretmiş ve bunların hepsi polimorfizm göstermiştir. UPGMA analizleri populasyonların coğrafik olarak dağıldığını belirlemişlerdir.

Ross-Davis ve ark. (2008) yaptıkları çalışmada *J. cinerea* türünde genetik çeşitliliği incelemişlerdir. Bitki örnekleri türün doğal yayılım alanı olan beş farklı

bölgede yetişen 157 olgun ağaçtan alınmıştır. Yedi SSR primer çifti kullanarak yaptıkları çalışma sonucunda, *J. cinerea* türündeki genetik çeşitliliğin daha önceki çalışmalarında belirtilenden daha yüksek olduğu sonucuna varmışlardır.

Hoban ve ark. (2008) *J. cinerea*'da genomik kütüphane oluşturmuşlar ve bunu 3 farklı tekrar dizisi ile (CA, GA, TAG) zenginleştirmişlerdir. Tekrar dizisi içeren 34 klonda primer dizayn edilmiş ve bu primerler 4 adet *J. cinerea* genotipinde bant üretme ve polimorfizm bakımından taranmıştır. Test edilen 34 primer çifti içerisinde 13 tanesinin polimorfik olduğu belirlenmiştir.

Pollegioni ve ark. (2008) *J. nigra* ve *J. regia* türlerinin Avrupa, Asya ve Kuzey Amerika'da ekonomik öneme sahip türler olduğunu bildirmişlerdir. Bu iki tür arasındaki melez türün ise *J. x intermedia* olarak adlandırıldığını ve kerestesinin değerli olduğunu belirtmişlerdir. Yaptıkları çalışmada SSR tekniğini kullanarak yeni melez türleri tanımlamak ve onların ebeveyn türünü belirlemeyi amaçlamışlardır. Kullanılan 10 mikrosatellit primer çifti de her iki türde bant üretmiştir. Primerlerin ürettiği toplam 112 allelin 68 tanesi *J. nigra*'da, 36 tanesi *J. regia*'da ve 8 tanesi de her iki türde amplifiye olmuştur. UPGMA analizleri çalışılan genotipleri, *J. regia*, *J. nigra* ve *J. x intermedia* olarak üç grupta toplamıştır. SSR analizlerinde 1 adet triploid melez bitki belirlenmiş ve bu bitki, iki genomu *J. nigra*'dan ve bir genomu da *J. regia*'dan almıştır. Yapılan sitolojik çalışmalar da bu melez bitkinin triploid olduğunu ve 48 kromozoma sahip olduğunu göstermiştir.

Karimi ve ark. (2010) 11 SSR primer çiftini İran ceviz populasyonlarının karakterizasyonunda kullanmışlardır. Çalışmada *J. regia* türüne ait yedi populasyon kullanılmıştır. Analiz edilen 11 mikrosatellit lokusu da yüksek polimorfizm göstermiştir. Locus başına allel sayısı 3-11 arasında değişmiş ve toplam 63 allel elde edilmiştir. Bu çalışma İran'daki *J. regia* populasyonunda yüksek genetik çeşitlilik olduğunu ortaya çıkarmıştır.

Ebrahimi ve ark. (2011) İran civarında uzun zamandır tohumla yayılan ve geniş alanlarda yetiştirilen ceviz ağaçları arasında büyük farklılıklar olduğunu

saptamışlardır. Araştırmacılar, bu çalışmada 31 İran ceviz genotipi yanında 4 yabancı çeşit arasındaki akrabalık ilişkileri ve genetik farklılıkların analizlerinde morfolojik karakterlere ek olarak SSR markörleri kullanmışlardır. SSR analizlerinde toplam 9 primer çifti analiz edilmiştir. Morfolojik özellikler ile birlikte SSR lokusları bakımından İran genotipleri ile yabancı çeşitler arasında oldukça yüksek farklılıklar olduğu belirlenmiştir.

Pollegioni ve ark. (2011) mikrosatellit markörleri kullanarak İtalyan ceviz çeşitleri üzerindeki uzun dönemli insan etkisini incelemişlerdir. İtalya'nın farklı bölgelerinden 456 örnek toplanmıştır. Tüm örnekleri karakterizasyonu için toplam 10 mikrosatellit markörü kullanılmıştır. Yapılan analizler sonucunda örnekler üç gruba ayrılmıştır.

Ruiz-Garcia ve ark. (2011) ceviz gen kaynağındaki genetik çeşitliliğini tanımlamak için mikrosatellit markörlerini kullanmışlardır. Toplam 19 mikrosatellit markörü gen havuzu içerisindeki 57 çeşit ve genotipin analizinde kullanılmıştır. Tüm örneklerde toplam 97 allel tanımlanmıştır. Bu çalışmayla elde edilen sonuçlar cevizde SSR markörlerinin kullanılan diğer markörlerden daha uygun olduğunu göstermiştir.

Yi ve ark. (2011) cevizde EST-SSR markörleri geliştirme çalışması yapmışlardır. Elde ettikleri dizilerde tekrar motifleri sırasıyla en fazla dinükleotid (%31.40), trinükleotid (%35.27), tetranükleotid (%6.28), pentanükleotid (%3.86) ve heksanükleotid (%23.19) olarak gözlenmiştir. Toplam 207 adet EST-SSR primer çifti dizayn edilmiş ve denenmiştir. Otuz SSR primer çifti başarıyla amplifiye olmuştur.

Chen ve ark. (2013) *Juglans mandshurica* türüne ait 20 SSR markörünün izolasyonunu ve karakterizasyonu gerçekleştirmişlerdir. SSR markörleri AG ve GT ile zenginleştirilmiş genomik kütüphanelerden geliştirilmiştir. 90 pozitif klondan sadece 50 primer çifti geliştirilmiştir. Daha sonra primer çiftleri beş farklı popülasyona ait 20 örnekte denenmiştir. Alle sayısı 1-17 arasında değişmiştir.

Zhang ve ark. (2013) *J. regia* için yeni SSR markörleri geliştirdiklerini bildirmişlerdir. Toplam 309 EST-SSR primer çifti dizayn edilmiş ve 77 tanesi 5 türü (*J. regia*, *J. nigra*, *C. cathayensis*, *C. dabieshanensis*, ve *A. sinensis*.) içeren 40 ceviz genotipinde analiz edilmiştir. Toplam 13 primer polimorfizm göstermiş ve 104 allel elde edilmiştir.

Topçu (2013) cevizde zenginleştirilmiş genomik kütüphane kullanarak yeni SSR markörleri geliştirmiştir. AC ve GA tekrarları ile zenginleştirilmiş *J. nigra*, türüne ait kütüphaneler kullanılmıştır. Toplam 340 primer (241 primer AC – 99 primer GA ile zenginleştirilmiş) başarıyla dizayn edilmiştir. Toplam 91 SSR primer çifti amplifiye olmuş ve 32 tanesi 20 ceviz çeşidinin karakterizasyonunda polimorfizm göstermiştir.

Doğan ve ark. (2014) RAPD, ISSR and SSR markörleri kullanarak ceviz genotiplerinin genetik karakterizasyonu ve değerlendirmesi üzerine çalışma yürütmüşlerdir. Türkiye, ABD ve Fransa'dan 59 ceviz genotipi kullanılmıştır. 25 RAPD, 25 ISSR and 16 SSR marköründen en yüksek polimorfizm oranı %91 ile SSR'dan elde edilmiştir. UPGMA metodu kullanılarak oluşturulan dendrogramda ceviz genotipleri üç ana gruba ayrılmıştır: Birinci grupta Kahramanmaraş ve Yalova orijinli genotipler, İkinci grupta Kırşehir, Tokat ve Çorum orijinli genotipler ve Üçüncü grupta ise yabancı çeşitler yer almıştır.

Chen ve ark. (2014) Çin'deki major ceviz çeşitlerini tanımlamak için SSR markörleri kullanmışlardır. *J. regia*'dan toplam 310 SSR primer çifti dizayn edilmiş, bunların 12 tanesi 35 çeşitte analiz edilmiştir. Allel sayısı 6 ile 16 arasında değişim göstermiştir. Ortalama polimorfizm bilgi içeriği 0.75 olarak belirlenmiştir.

Topçu ve ark. (2015) cevizde SSR primer geliştirme çalışması yaptıklarını bildirmişlerdir. *J. regia* türüne ait olan Maraş-18 çeşidinin genomik DNA'sı kullanılarak CA, GA, AAC and AAG tekrarları ile zenginleştirilmiş genomik kütüphaneler meydana getirilmiştir. Toplam 276 primer çifti dizayn edilmiş ve 246 tanesi başarıyla amplifiye olmuştur. Toplam 185 SSR lokusu 15 ceviz çeşidinin karakterizasyonunda polimorfizm göstermiştir. Allel sayısı 4.3 ortalama ile 2-10

arasında değişim göstermiştir. GA ile zenginleştirilmiş kütüphane allel sayısı, polimorfizm düzeyi, üretkenlik ve bilgi içeriği bakımından en iyi olarak belirlenmiştir.

Ikhsan ve ark.'nın (2016) yaptığı çalışmada *J. regia* için 558 adet BES-SSR primer çifti dizayn etmişlerdir. Dizayn edilen primerlerden 507 (%91)'inin amplifikasyon verdiği ve 307 tanesinin polimorfik olduğu belirlenmiştir. 8 adet ceviz çeşidinde 307 adet polimorfik SSR primerleri toplamda 1097 allel üretmiştir. Her bir lokustaki allel 2-11 arasında değişmiş ve ortalama 3.6 allel üretmiştir.

Ebrahimi ve ark. (2016) 3 farklı kıttadan 14 ülkeden 25 farklı bölgeden toplanan genotiplerle 10 adet SSR markörü kullanarak akrabalık ilişkilerini ve farklılıklarını incelemişlerdir. SSR markörlerinin allel aralıklarını 3-25 arasında değiştiğini ve ortalama allel büyüklüğünü 11.5 bulmuşlardır. Gözlenen heterozigotluk 0.62, beklenen heterozigotluk 0,73 olarak tespit etmişlerdir. Sonuçta 189 adet *J. regia* çeşidinin 10 adet SSR primeri kullanarak genetik akrabalık ve farklılıklarını ortaya koymuşlardır.

Dang ve ark. (2015) yaptıkları çalışmada yeni nesil sekanslama teknolojisini kullanarak 12 adet SSR primeri geliştirmişlerdir. Bu primewrleri 11 yerel popülasyondan toplanan 96 adet Çin cevizinde taramışlar ve her bir alleldeki lokus sayısının 5-12 arasında değiştiğini belirlemişlerdir. Gözlenen heterozigotluk oranının 0.288-0.748 arasında ve beklenen heterozigotluğun 0.337-0,751 arasında değiştiğini tespit etmişlerdir. Sonuçta bu türlerin yüksek genetik çeşitlilik ve gen akışına sahip olduğu saptanmıştır. Bu SSR markörlerinin gelecekte *J. regia*'da popülasyon ve evrim çalışmaları ile diğer *Juglans* türleri için de kullanılabileceğini belirtilmişlerdir.

Shah ve ark. (2016) 96 ceviz çeşidini 19 adet SSR markörü ile analiz ederek genetik akrabalıklarını belirlemişlerdir. 96 ceviz çeşidindeki genetik akrabalık ilişkisinin oranını %89.6 olarak tespit etmişlerdir. Kullanılan SSR markörlerinin ortalama PIC değerini 0.168 ve beklenen heterozigotluk oranının ortalamasını 0.043 olarak bulmuşlardır. Bu çalışmanın cevizde önemli özellikler

için haritalama çalışmalarını birleştirmede yardımcı olabileceği belirtilmiştir. Mikrosatellit markörlerinin çeşit tanımlama ve karakterizasyon çalışmalarında yararlı olabileceği belirlenmiştir.





3. MATERYAL ve METOD

3.1. Materyal

Bu çalışma kapsamında yeni SSR markörleri geliştirmek amacıyla *J. regia* türünde 200 SSR primer çifti dizayn edilmiştir. SSR primerleri NCBI (National Center for Biotechnology Information) gen bankasında bulunan ve Wu ve ark. (2012) tarafından elde edilen Chandler ceviz çeşidine ait DNA dizileri kullanılarak dizayn edilmiştir. Bu primerler, *J. regia* türü içerisinde farklı orijinlere sahip 16 adet ceviz çeşidi kullanılarak denenmiştir. Türkiye’den 7 çeşit (Maraş-12, Sütyemez-1, Sütyemez-2, Şebin, Kaman-1, Kaplan-86, Yalova-1 ve Bilecik), Amerika Birleşik Devletleri’nden 5 (Chandler, Serr, Pedro, Midland ve Hartley) ve Fransa’dan 3 (Fernor, Franquette ve Fernette) çeşit kullanılmıştır. Bitki örneklerinin tamamı Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Sert Kabuklu Meyveler Araştırma ve Uygulama Merkezinden sağlanmıştır.

Geliştirilen mikrosatellit primerlerinin test edilmesinde kullanılan çeşitler hakkında detaylı bilgi Çizelge 3.1’de yer almaktadır.

Çizelge 3.1. Denemede kullanılan ceviz çeşit ve genotipleri ile alındıkları genetik kaynaklar

No	Çeşit ve Genotip İsmi	Orijin	Genetik Kaynak
1	Yalova-1	Yalova/Türkiye	KSÜ
2	Kaplan-86	Yalova /Türkiye	KSÜ
3	Şebin	Giresun/Türkiye	KSÜ
4	Bilecik	Bilecik /Türkiye	KSÜ
5	Maraş-12	K.Maraş/Türkiye	KSÜ
6	Sütyemez-1	K.Maraş/Türkiye	KSÜ
7	Sütyemez-2	K.Maraş/Türkiye	KSÜ
8	Kaman-1	Kırşehir/Türkiye	KSÜ
9	Chandler	ABD	KSÜ
10	Pedro	ABD	KSÜ
11	Serr	ABD	KSÜ
12	Midland	ABD	KSÜ
13	Hartley	ABD	KSÜ
14	Franquette	Fransa	KSÜ
15	Fernor	Fransa	KSÜ
16	Fernette	Fransa	KSÜ

3.2. Metod

3.2.1. DNA İzolasyonu

Çizelge 3.1’de verilen ceviz çeşitlerine ait yaprak örneklerinden genomik DNA izolasyonu, Doyle ve Doyle (1987)’nin geliştirdiği ve Kafkas ve ark. (2006) tarafından modifiye edilen CTAB yöntemine göre yapılmıştır.

Bu yöntemde liyofilize edilerek kurutulmuş ceviz yaprak örneklerinden 50-100 mg tartılarak 2 ml’lik tüplere konulmuş ve bilye yardımı ile öğütücü makinesinde (Tissue lyzer) ezilmiştir. Ezilmiş yaprak örneklerinin bulunduğu 2 ml’lik tüplere 0,9 ml CTAB (100mM Tris-HCl, 1,4M NaCl, 20mM EDTA, %2 CTAB, %2 PVP, %0.1 Na₂S₂O₅) ilave edilerek örnekler, sıcaklığı 65°C ye ayarlanmış olan su banyosunda 1 saat bekletilmiştir. Su banyosuna konan, içerisinde yaprak örnekleri ve ekstraksiyon tampon çözeltisi bulunan 2 ml’lik tüpler her 5-10 dakikada bir hafifçe çalkalanarak bu işlem 1 saat boyunca devam etmiştir. Örnekler su banyosundan çıkarıldıktan sonra oda koşullarında 5-10 dakika bekletilerek örneklerin ısısının düşmesi sağlanmıştır. Isısı düşen örneklerle ekstraksiyon tampon çözeltisi ile eşit miktarda (0.9 ml) kloroform: isoamylalkol (24 : 1) ilave edilmiştir. Tüpler oda koşullarında her 2-3 dakikada bir hafifçe 15 dakika boyunca çalkalanmıştır. İçinde yaprak örneği, CTAB, kloroform: isoamylalkol bulunan tüpler daha sonra 14 rpm de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj olan örneklerin üst fazları alınarak yeni 1.5 ml’lik tüplere aktarılmıştır.

Yeni tüplere aktarılan üst fazların üzerine soğuk (-20°C de bekletilmiş) isopropanol ilave edilmiştir. Bu aşamada tüpler hafifçe çalkalanarak DNA’nın çökmesi sağlanmıştır. DNA’nın daha iyi çökmesini sağlamak için 1 gece -20 ‘C de bekletilmiştir. Soğuk ortamdan çıkarılan tüpler 2,000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilerek DNA’nın tüpün dibine çökmesi ve isopropanolün kolayca boşaltılması sağlanmıştır. İsoopropanolü boşaltılan tüpün içine, içerisinde 10mM Amonium asetat bulunan %76’lık ethanolden 1 ml ilave edilerek 15 dakika hafifçe çalkalanıp DNA’nın yıkanması sağlanmıştır. Daha sonra 2,000 rpm’de 2 dakika santrifüj

ediltiten sonra üst faz tüpten uzaklaştırılmıştır. DNA'lar oda koşullarında 1 gece bekletilerek kurutulmuştur. Kurutulan DNA'lar ultra saf su ile çözdürülerek miktarı saptanmıştır.

3.2.2. DNA Konsantrasyonun Belirlenmesi

DNA konsantrasyonlarının ölçümlerinde %0.8'lik agaroz jel ve qubit (invitrogen) cihazı kullanılmıştır. Agaroz jelde DNA konsantrasyonunun saptanması sırasında örnek başına toplam hacim 20 µl olacak şekilde 2 µl stok DNA, ve 18 µl su ve yükleme boyası (bromophenol blue, gliserol ve TBE) karışımı ile örnekler hazırlanmıştır.

Hazırlanan örneklerden 10 µl'si, %0.8 konsantrasyondaki agaroz jeldeki tarakların oluşturduğu gözlemlere yüklenmiştir. Elektroforezin yürütülme koşulları 120 voltta 40 dakika olarak gerçekleştirilmiştir. UV transilluminatör kullanılarak DNA yoğunlukları, konsantrasyonu belli λ DNA'lar (25ng-50ng-100ng-200ng) kullanılarak tahminen belirlenirken, Fluorometre ile DNA konsantrasyonu ise flourosan boya bulunduran kit kullanılarak saptanmıştır.

3.2.3. SSR Primer Çiftlerinin Ceviz Çeşitlerinde Polimorfizm Durumlarının Belirlenmesi ve Çeşitlerin Karakterizasyonu

Toplam 200 adet SSR primer çiftinde PCR'ı yapılacak olan tüm DNA'lar 10 ng'a ayarlanmıştır. SSR primer çiftlerinin DNA'ya bağlanma sıcaklıkları 58 derece olarak belirlenerek 16 ceviz genotipinde (Çizelge 3.1) polimorfizm bakımından SSR-PCR reaksiyonları yapılarak taranmıştır.

PCR ürünlerinin elektroforezi ABI 3130xl otomatik baz dizileme ünitesinde (kapiller elektroforez) yapılmıştır. SSR analizleri sonucu elde edilen bantların büyüklükleri birbirlerine çok yakın olduğu için agaroz jelde ayırmak mümkün olmadığından, elektroforez, kapiller elektroforez ile gerçekleştirilmiştir.

Araştırmada dizayn edilen 200 adet mikrosatellitlerden ileri primerlerin 5' uçlarına 18 bazdan oluşan M13 üniversal (5'-TGTAACGACGGCCAGT-3') baz dizisi ilave edilerek sentezletilmiştir (Schuelke, 2000). ABI 3130xl cihazında elektroforez edilecek örneklerin PCR reaksiyonlarında M13 üniversal baz dizisine özgü floresan boyalı (6-FAM, VIC, NED ve PET) primerler kullanılmıştır. PCR reaksiyonlarında 4 farklı boyanın kullanılması, 4 farklı primerin PCR ürünün de aynı kuyucukta analiz edilmesine olanak sağlamıştır. ABI 3130xl genetik analizör cihazında elektroforez edilecek örnekler için PCR 12.5 ul hazırlanmıştır. (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. SSR yönteminde PCR'da kullanılan bileşenler

PCR bileşenleri	Konsantrasyon
Tris-HCl, pH:8.8	75 mM
dNTP	200 mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	20 mM
MgCl ₂	2.0 mM
Tween 20	0.01%
İleri primer	10 nM
Geri primer	200 nM
FAM, VIC, NED, PET labeled M13 universal primer	200 nM
Hot-Start Taq DNA Polimeraz	1 Unit
DNA	10-20 ng

Sıcaklık ve döngü koşulları 94°C de 5 dakika ön denatürasyon, 30 döngü boyunca 94°C de 30 saniye denatüre edilecek. 56°C de 45 saniye annealing ve 72°C de 45 saniye uzama safhasının ardından, M13 için, 8 döngü boyunca 94°C 30 saniye denatürasyon, 53°C 45 saniye annealing ve 72°C 45 saniye uzama safhası aşamasının ardından 72°C de 10 dakika son uzama aşamasına tabi tutulmuştur. (Schuelke, 2000).

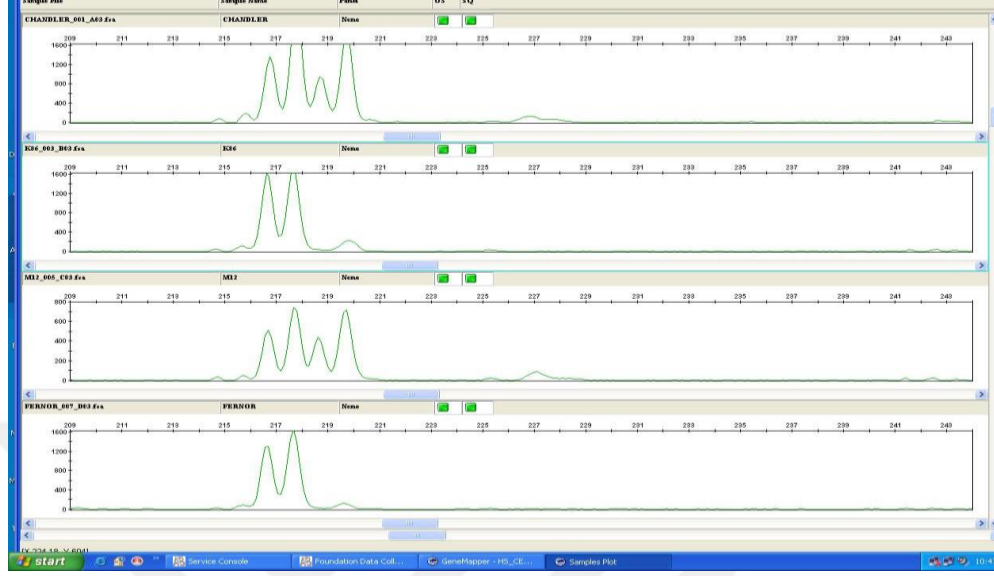
ABI 3130xl genetik analizör cihazında analiz edilen örneklerde PCR reaksiyonu için sıcaklık ve döngü koşulları (Schuelke, 2000)'ne göre bazı değişiklikler yapılarak gerçekleştirilmiştir. Bu koşullar Çizelge 3.3'te verilmiştir.

Çizelge 3.3. SSR yönteminde kullanılan PCR sıcaklık ve döngü koşulları

No	İşlem	Sıcaklık	Süre (sn)	Döngü sayısı
1	Denatürasyon-1	94 ⁰ C	300	1
2	Denatürasyon -2	94 ⁰ C	45	35
3	Primerin DNA'ya bağlanma sıcaklığı	56 ⁰ C	45	
4	Uzama safhası	72 ⁰ C	90	
5	Son Uzama safhası	72 ⁰ C	300	1

PCR reaksiyonlarından sonra dört farklı boya ile işaretlenmiş dört farklı PCR ürününden her bir örnek için 1 µl kullanılarak, 9.8 µl Hi-Di formamid ve 0.2 µl LIZ-500 size standart kullanılarak aynı kuyucuğa yüklenmiştir. Daha sonra örnekler 95 °C'de 5 dakika denatüre edilmiş ve denatürasyonun ardından örnekler buzda bekletilerek DNA'nın tek iplikli halde kalması temin edilerek elektroforezin uygulanması için ABI cihazına yüklenmiştir.

GeneMapper (version 4.0) bilgisayar programı kullanılarak DNA'ların amplifikasyon noktaları pikler halinde skorlanmış ve her boyanın temsil ettiği primer çiftlerinin oluşturduğu alleller ve allel büyüklükleri saptanmıştır. (Şekil 3.1)



Şekil 3.1. JRHR227005 primerinin ABI cihazındaki elektroferogram görüntüsü

3.2.4. Verilerin Analizi

Bu çalışmada yeni SSR markörleri geliştirmek amacıyla GenAlex v6.5 (Peakal ve Smouse, 2012) programı kullanılarak primerlerin allel sayısı (N_a), etkili allel sayısı (N_e), beklenen heterozigotluk değeri (H_e) ve gözlenen heterozigotluk değeri (H_o) hesaplanmıştır. PowerMarker v3.25 (Liu ve Muse, 2005) programı kullanılarak her bir SSR lokusu için polimorfik bilgi içeriği (PIC) hesaplanmıştır. NTSYS-pc:2.21 (Rohlf, 2011), paket program kullanılarak Jaccard benzerlik katsayısına göre UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) analizleri ile dendrogram elde edilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Cevizde Yeni SSR Markörlerin Geliştirilmesi

Bu çalışmada Chandler ceviz (*J. regia*) çeşidinden elde edilen (Wu ve ark., 2012) genomic DNA dizilerinden dizayn edilmiş toplam 200 BES-SSR primer çifti kullanılmıştır. Farklı orijinlerden 16 *J. regia* çeşidi (Maraş-12, Sütyemez-1, Sütyemez-2, Şebin, Kaman-1, Kaplan-86, Yalova-1, Bilecik, Chandler, Serr, Pedro, Midland, Fernor, Franquette, Fernette) yeni SSR primerlerinin polimorfizm düzeylerini belirlemek amacıyla kullanılmıştır. 200 primer çiftinden 190'ı (%95) başarıyla amplifikasyon sağlamıştır. 10 primer çifti (%5) PCR sonucunda amplifikasyon sağlamamıştır. 190 SSR primer çiftinin primer dizileri, tekrar motifleri ve allel büyüklükleri Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. SSR primer çiftlerinin sekansları, tekrar motifleri ve tahmini allel büyüklükleri

Primer Adı	Primer Sekansı	Allel büyüklüğü	Motif
JRHR224153	F- ATCTTGAATCCCCATCTTCGT R- GATCAGCTTCTTTCATTGTTGG	235	(TAGG) ₄
JRHR224150	F- GTGAAAATGCCATAGCTGGAC R- ACATAGGTACTTGCGGCCTTT	204	(TA) ₉
JRHR223961	F- CATTCAACAAGGCGAAAACCTCT R- ACTACCATCTCCCGAGAAACC	192	(GGT) ₅
JRHR223954	F- CTGCAGCCAGGAGTTTAGAGA R- CACTCAAGCTGCCTTTTGTTT	236	(AT) ₈
JRHR223940	F- TCGCCAACTTCCATTAAAGAG R- GGCTATCCAGAAGAAGGGAAA	200	(TA) ₆
JRHR229532	F- CAAAACGCCTCTATGCACCTA R- TGAACCAGGACAACCCAATAA	167	(CT) ₈
JRHR229520	F- CTGAGGGAGAGACGACATGAG R- AACCAAAGAGAGCGGAATTGT	167	(TTC) ₅
JRHR229498	F- TCCAGAACAAATTCGTATCG	179	(CATC) ₄

(Çizelge 4.1. Devamı)

	R- GTGTGGAAGGTAAGCAAGTCG		
JRHR229516	F- TCTGCCTAGTTTCACCTCTGC	175	(TGCCA) ₃
	R- TGCATAACAAGCAGTCATTGG		
JRHR229452	F- ATTTCCGCTTTCTTCGCTAAC	154	(AAG) ₅
	R- ACCGTTACCGTTTGAGCAAT		
JRHR229302	F- CAGGATTCTGAAACGAAGACA	228	(TAAA) ₄
	R- TTCCCAAGAGATAGAGAAAAGC		
JRHR229301	F- CAAAGTCTTCGTCAACCTTGC	167	(TTTAT) ₃
	R- GACATGATAGATGCTAGCTCGGTA		
JRHR229271	F- AACTCCCATGATATGCGTTTG	195	(TTA) ₅
	R- ACTTTGGCTTGGTTTGGAAC		
JRHR229199a	F- CCAAAATGCTGTGGTTTCTTC	186	(AT) ₈
	R- CACTGACACACGAAAGGGTCT		
JRHR229198	F- ATATTAGTTGCTGCGCCAAGA	172	(TATAT) ₃
	R- GGGATTGGAATACCTTGTTGA		
JRHR227400	F- AACGTGGAGTTTTGCGTAATC	257	(ATTT) ₄
	R- GCAATAAGGGTGGATACTTT		
JRHR227392a	F- CCCAGTTCTTCGATCTTCTCA	220	(AGAAA) ₃
	R- TTCGATTCCCAGTCCTTTTCT		
JRHR227328b	F- CAGAGATCACAAGGTCGCATT	166	(AT) ₈
	R- TGTTGATCAGTTTCCACGTACT		
JRHR227248	F- TCACATATGGATCGGAGAAGT	116	(TA) ₈
	R- GCGGGATGCCTGTCATAA		
JRHR227231b	F- GAGGATCACTCTCCACTTCGTT	127	(TCATC) ₃
	R- GTGTGGGGATTTGAAAATGTTG		
JRHR227213	F- TTAAACTCCTAGCCTCAATTCTG	187	(AGAAA) ₃
	R- AAACGGCTCCCTCCAAAG		
JRHR227173	F- GGCGAAAGATCGAGGAAGTAT	161	(AGAGA) ₃
	R- CCAAATTAGCCGGAGTCATCT		
JRHR227105	F- TATTTCCGAATCGAAGAGCAG	171	(ATC) ₅
	R- CTGGGTCACTTTCTTCTGGTG		
JRHR227078	F- TCTGAACTGTCTCCTCACCA	134	(TTC) ₅
	R- TGACAGATTTTCCAAGGCAAG		
JRHR227056	F- GGCATGGAATTGTTGTAGTGG	186	(ATTT) ₄
	R- AGAATAGAGGCGTACGTGCAA		
JRHR227015a	F- ACCCGCATGTTTATGAAACTC	199	(AT) ₆
	R- CGTGGGACACATGAATAGACC		
JRHR227005	F- TGTAATAATCTCGTCCGGTTTG	168	(AGG) ₅

(Çizelge 4.1. Devamı)

	R- CATATGGAGGACGGAGTAGGC		
JRHR227003	F- ACAGTATTCGGGTCGGGTAAT	158	(TCGGG) ₃
	R- TGA CTCTCTCTCCTGAAGCA		
JRHR227001	F- GGTCTGTT CAGCCATTTACA	175	(ATATA) ₃
	R- TGAGTCGTGTT CATGTCATTTT		
JRHR226975	F- TGAAGCTTAGCATGAACGTGA	209	(AACAT) ₃
	R- TGGTAATCCCATGAGACAAGAA		
JRHR226911	F- AAAGTTGAGACTGTCCCTCCA	192	(TTTTT) ₃
	R- GGATTCCAGGCGATGTAGAAG		
JRHR226801a	F- TCCGATCTCGTTTGTTTTCA	220	(TTTTA) ₃
	R- GAAGGGATATTTAGGCCTGGTT		
JRHR226639	F- AGGTGATGGAAAGTGCCAAAT	179	(CTAG) ₄
	R- AAGACCTGGTGATGGAAACTG		
JRHR226573	F- TGTGTTACAGCGAGCTTACCC	152	(TA) ₈
	R- AAGTGATGTTAGATCCCCGAAT		
JRHR226564	F- TTTTAGCATCCCTATGGGACA	163	(CATG) ₄
	R- AAGGTGGGGTTACATGATTTG		
JRHR223884	F- AAGACAGGGACAAGGAACCAT	159	(CATCT) ₃
	R- CGTGGAGATTTGGAAAAGTTG		
JRHR223857	F- AAAACAAATAGGCTCGTTTGGA	213	(TAT) ₅
	R- CCTTATCTCATCTCATCTCATCG		
JRHR223807a	F- TTTGATCTCTAAGACCTCGTTGTG	125	(TA) ₇
	R- ACGTCTTCGTCAATGAACGTG		
JRHR223807b	F- TGCCACTTTGAAATGATGTGT	186	(TA) ₇
	R- GAGCCTGATCATCGTCATCATA		
JRHR223789	F- CAAGACGCAGGCAACAAATTA	193	(TATG) ₄
	R- CTCCACCTCCTTGAACATTGA		
JRHR223787	F- GTGAGGTTTCCACCCACATTA	193	(AAAGA) ₃
	R- CCATGAGAATGTATGCTTGGAC		
JRHR223752	F- GTGAGGTTTCCACCCACATTA	193	(AAAGA) ₃
	R- CCATGAGAATGTATGCTTGGAC		
JRHR223691	F- GAGCGATTCTTCAAACACTTCA	183	(TATCA) ₃
	R- TTTATGTTCTGCATGGCTTCA		
JRHR223682b	F- CCACGGGATTGTTTAGATTGA	190	(CTCAA) ₃
	R- TCTTGGTTTAAATAGTGAGTTGAGA		
JRHR223673a	F- TGTAGGTCAACAAAGCTGGCTA	246	(AT) ₈
	R- GTGAACGTAGCATCGTCCTTT		
JRHR223667	F- AGGATGTACCAATTCTACAGAT	173	(ATA) ₅

(Çizelge 4.1. Devamı)

	R- CCACCTCATAATGCTTGTTGG		
JRHR223644	F- TTCGCATCATGTTTCAGATTCA	177	(TAAGA) ₃
	R- GTGACTTGACATCCACTTTG		
JRHR223559a	F- TGGAACACTATTCATTCATCAAA	274	(ATAAA) ₃
	R- TGACTATTCACATCAAATCTCCAAA		
JRHR223557	F- GCATGCAGCTAAGTTTGTATTATTT	213	(TTTAT) ₃
	R- AGGCGTTTGTGTCTTTTCACA		
JRHR223545	F- ACGACAAAAGAGTACGCCAAT	238	(ATATA) ₃
	R- TACCTTCACGGCCAACATTTA		
JRHR223541b	F- ATGCATGATTTCGAGGTTCACT	248	(CATCT) ₃
	R- CATAGAGGGCTCGTTTGGATA		
JRHR223496	F- GCCGGATTGATTCTGAGTTTT	191	(AG) ₈
	R- TTCCTGTACTTACGGCCTGTG		
JRHR223474	F- CAGCGGCTCTTTGAATGTAAT	222	(TTTC) ₄
	R- ACGGACCTTGTCCACATGATA		
JRHR223445c	F- ATAATCAAATCCGGGCGAGT	169	(ATGC) ₄
	R- GATTAGTGCTGGCTGCTGTTT		
JRHR223365	F- TTTGCTACACATGAAAACCTCTG	175	(TACA) ₄
	R- ACCTGATCAACAACCAGATCA		
JRHR223360	F- AAGGTGAGGCTGCGTTTAGAT	274	(TAAGT) ₃
	R- TGCACATCCTTTCAAGATTCA		
JRHR223361	F- TTCCCTTTGTGACTCTGCTTC	175	(GA) _{1 2}
	R- CCTTCCATCTTTCCACTTCGT		
JRHR223311	F- GAAGGGAGCTCTGGAAATGAG	173	(AG) ₈
	R- TATAGTACCGGCCATGGGAAC		
JRHR223291	F- GAATTTGTTTAGCTGCCATCG	163	(TGGTT) ₃
	R- CTCATGTATGGCTTGTTTGGT		
JRHR223201	F- TCAACTGAGCTTTAGTCCCAGA	205	(CT) ₈
	R- ATTAGTCGGGATGCTGTTTCT		
JRHR223194	F- TTTATGCGACTCTCCCCATTA	164	(ATT) ₅
	R- TGCGCATGACTAATTTTGGTT		
JRHR223182	F- ACCTCAAGTCCCATACCCATC	158	(TTA) ₅
	R- ATTAGGCTTCCCATCCAAA		
JRHR223174	F- GCCATGGGAAAGAATAGTGGT	198	(ATG) ₅
	R- GCCAACCGAGTAGAAACAAAA		
JRHR223170	F- GGCCATTCATTCATTACATCC	182	(AT) ₈
	R- GTCACGATCAGTACGCCTTG		
JRHR223086	F- CGGCCTTCACGTAAATTAAGA	180	(TA) ₆

(Çizelge 4.1. Devamı)

	R- TGAAGATCAAGAGAGGCAAGG		
JRHR223084	F- TTTGAAGCTTGATACAAGGTGAG	212	(TA) ₆
	R- TACGTACGGATGCTTCATGCT		
JRHR223103b	F- GCTGCGAGGCTTGATCTTAT	208	(ATAAA) ₃
	R- CAACATCGACTAATCCGTTTCG		
JRHR223067a	F- CTTTGGCAAGTGTGTGGCTAT	177	(AT) ₈
	R- GGTTGTAAGGCACAGTACACA		
JRHR226531	F- ATCGAACATCGACGTCATTA	193	(TATTA) ₃
	R- AGGGCAAGATCAAACCATACC		
JRHR226530	F- TGACCTTAATTTCCCGAGT	170	(AT) ₈
	R- CATTCAAATGCAGGGTGTTTT		
JRHR226526	F- TTGCGGGATACTAATTGTTCA	174	(CATG) ₄
	R- CGAACAGGTTGGTGTAGATCG		
JRHR226409	F- GAGGATCAGTATCCACAAGCAA	288	(AAAT) ₄
	R- TGGCGCAAGCTAAAGTATGTC		
JRHR 226360	F- AAGTGCATGATCAAGAAGT	160	(AT) ₈
	R- AAATTACTCGTCATGTGTTGTGTTT		
JRHR226223	F- GCTGCATCTTTACGTTTTCT	217	(TG) ₈
	R- TCCCAACACAAGCTCATGAAT		
JRHR226105	F- GGTTGAGCTTCTAGTCATGCTG	127	(AAAC) ₄
	R- CGAACTGGTGCCCTTCTACTAC		
JRHR226081	F- TTCATCTTGTCCTCAACTCTCAA	208	(CATG) ₄
	R- TTTTCTTTTCCGTTCCCAACT		
JRHR226074	F- GATCACGCATAGCCTTGATGT	177	(AATT) ₄
	R- CTTGCTCCATTGGTGTTTTGT		
JRHR226051	F- GGAATGATGACTTGGGGTTTA	198	(TTTCT) ₃
	R- TGCAAAATGTGTGCATCAAAA		
JRHR226042	F- ATCGGTTGCAGACACGTAGAG	207	(CGAT) ₄
	R- CGACTTACTTTTCGAGGAAGC		
JRHR226021a	F- TGCATGTACGTATAAGTTTGATCT	171	(AT) ₈
	R- ATTAGGCACTTGCCACCCTAA		
JRHR225949	F- CATCCTGTACGCCTAGTTTCG	195	(TTA) ₅
	R- CGTGACGAGTGTTTCTCTACAA		
JRHR225926	F- AGCGATTTGACTGACAAGCAT	156	(AT) ₈
	R- TCGGTCCCTAGCTTTCTTAGG		
JRHR225912	F- CCCACGTACAGACCAAGTAT	192	(TATT) ₄
	R- TTGGGCTAGCATTCTCTGT		
JRHR225717	F- AATGGCGCTAACCGTTCTAAT	175	(TA) ₈

(Çizelge 4.1. Devamı)

	R- AAAC TAGCATTCTCCATCAACTCTT		
JRHR229189	F- AAAAGAATCTCGTTGGTGTC	295	(GA) ₈
	R- GTGCATTGGCATTGGTTTATC		
JRHR229180a	F- TCACATTAAGCTATGTCAGTTTG	194	(TA) ₆
	R- TGGCACATGCACATTTATAGT		
JRHR229141	F- TGAAC TTGAACCTGAGCATGA	226	(AACAT) ₃
	R- GGGGACCTGTGTAGCACCTAT		
JRHR229134	F- TGATCTAATTCCGCGTATGCT	200	(TGCA) ₄
	R- TCAAGGCTTAATTTCTTGTTCA		
JRHR229126	F- CCGGTTTAGAAGGGTAACCAG	177	(ACCGG) ₃
	R- ATTCGATTACAGGAGCTGA		
JRHR228966a	F- TGGGCTAGAACATTCTCCAAA	198	(TA) ₁₀
	R- GCAAATTTTCATGGGAAAACA		
JRHR228936a	F- ACAACGATTTACACAAACACA	146	(TA) ₇
	R- CTAGGCCTCCAACAGTCACAC		
JRHR228904	F- GGGAATCATCATCGATAGCTTTAC	180	(AT) ₈
	R- TGATGTTTTCTTTCATCCTTCTCA		

PCR ürünleri kapiller elektroforezde analiz edilerek allelleri belirlenmiştir. Polimorfizm oranı %46 (92 primer çifti) olarak belirlenmiştir. Polimorfik primer çiftlerinin verileri GenAlex (Peakall ve ark., 2006) ve PowerMarker (Liu ve Muse, 2005) programları kullanılarak analiz edilmiştir. 92 polimorfik primer çiftine ait allel sayıları (Na), efektif allel sayıları (Ne), beklenen heterozigoti değerleri (He), gözlenen heterozigoti değerleri (Ho) ve polimorfizm bilgi içerikleri Çizelge 4.2’de verilmiştir.

Polimorfik 92 SSR primer çifti 2 ile 11 arasında, toplamda 324 ve lokus başına ortalama 3.6 adet allel üretmiştir. En fazla allel sayısını JRHR223545 lokusu üretmiştir. Ortalama Na (allel sayısı) değeri 3.48, Ne (ortalama efektif allel sayısı) değeri ise 1.1- 8.7 aralığında değişmiş ve ortalaması 2.292 olmuştur.

Çizelge 4.2. SSR lokus adı, allel aralığı, allel sayısı (N_a), efektif allel sayısı (N_e), beklenen (H_e) heterozigositi, gözlenen (H_o) heterozigositi ve polimorfizm bilgi içeriği (PIC)

SSR lokusu	Allel aralığı	N_a	N_e	H_e	H_o	PIC
JRHR224153	225-251	5	3.38	0.70	0.13	0.67
JRHR224150	220-244	7	2.88	0.65	0.86	0.62
JRHR223961	210-232	4	2.34	0.57	0.31	0.49
JRHR223954	252-258	3	1.82	0.45	0.60	0.39
JRHR223940	257-259	2	1.44	0.31	0.13	0.30
JRHR229532	320-329	3	2.80	0.64	0.69	0.57
JRHR229520	167-179	2	1.36	0.26	0.31	0.23
JRHR229498	238-240	2	1.06	0.06	0.06	0.06
JRHR229516	175-188	2	1.97	0.49	0.25	0.37
JRHR229452	195-203	4	2.45	0.59	0.44	0.53
JRHR229302	189-191	2	1.28	0.22	0.13	0.19
JRHR2293011	98-106	2	1.52	0.34	0.44	0.28
JRHR229271	133-137	2	1.13	0.12	0.13	0.11
JRHR229199a	280-295	3	1.47	0.32	0.25	0.29
JRHR229198	201-207	3	2.07	0.52	0.75	0.41
JRHR227400	187-193	4	2.75	0.64	0.38	0.57
JRHR227392a	274-298	4	3.66	0.73	0.67	0.68
JRHR227328b	226-234	3	1.29	0.23	0.13	0.21
JRHR227248	212-214	2	1.99	0.50	0.56	0.37
JRHR227231b	201-203	2	1.97	0.49	0.73	0.37
JRHR227213	199-213	4	3.07	0.67	0.75	0.62
JRHR227173	232-247	3	2.10	0.52	0.64	0.44
JRHR227105	243-267	5	3.48	0.71	0.63	0.66
JRHR227078	186-200	5	2.86	0.65	0.43	0.61
JRHR227056	202-204	2	1.13	0.12	0.13	0.11
JRHR227015a	313-318	3	2.11	0.53	0.06	0.42
JRHR227005	216-222	4	3.44	0.71	0.81	0.66
JRHR227003	187-190	2	1.60	0.38	0.38	0.30
JRHR227001	242-244	2	1.36	0.26	0.06	0.23
JRHR226975	275-281	3	1.50	0.33	0.40	0.29
JRHR226911	144-187	2	1.28	0.22	0.25	0.19
JRHR226801a	225-238	7	3.32	0.70	0.50	0.67

(Çizelge 4.2. Devamı)

JRHR226639	175-188	5	4.07	0.75	0.23	0.71
JRHR226573	288-290	2	1.28	0.22	0.00	0.19
JRHR226564	169-173	3	2.11	0.53	0.31	0.42
JRHR223884	200-205	2	1.97	0.49	0.75	0.37
JRHR223857	172-190	2	1.47	0.32	0.40	0.27
JRHR23807a	196-208	5	3.35	0.70	0.64	0.66
JRHR223807b	142-144	2	1.28	0.22	0.13	0.19
JRHR223789	233-241	6	3.36	0.70	0.67	0.66
JRHR223787	208-220	3	2.13	0.53	0.42	0.43
JRHR223752	194-202	5	3.06	0.67	0.79	0.63
JRHR223691	207-214	2	1.06	0.06	0.06	0.06
JRHR223682b	200-206	2	2.00	0.50	0.63	0.38
JRHR223673a	200-206	3	2.86	0.65	0.50	0.58
JRHR223667	223-231	2	1.60	0.38	0.38	0.30
JRHR223644	179-193	3	2.11	0.53	0.94	0.42
JRHR223559	204-208	3	1.86	0.46	0.63	0.40
JRHR223557	176-184	4	1.77	0.44	0.27	0.41
JRHR223545	250-282	11	8.67	0.89	0.92	0.87
JRHR223541b	251-280	10	5.54	0.82	0.62	0.80
JRHR223496	189-199	6	3.32	0.70	0.64	0.66
JRHR223474	209-218	2	1.28	0.22	0.13	0.19
JRHR223445c	240-244	2	1.60	0.38	0.50	0.30
JRHR223365	204-208	2	1.72	0.42	0.60	0.33
JRHR223360	193-199	3	1.21	0.17	0.19	0.17
JRHR223361	290-294	3	2.02	0.51	0.19	0.45
JRHR223311	185-188	2	1.68	0.40	0.31	0.32
JRHR223291	176-199	5	3.74	0.73	0.75	0.69
JRHR223201	176-180	3	1.81	0.45	0.44	0.37
JRHR223194	175-194	6	3.12	0.68	0.56	0.63
JRHR223182	168-175	2	1.39	0.28	0.33	0.24
JRHR223174	224-285	5	2.82	0.65	0.57	0.58
JRHR223170	192-201	5	2.80	0.64	0.50	0.60
JRHR223086	203-207	2	1.60	0.38	0.07	0.30
JRHR223084	196-198	2	1.82	0.45	0.69	0.35
JRHR223103b	227-229	2	1.21	0.17	0.19	0.16
JRHR223067a	224-227	2	2.00	0.50	0.50	0.38

(Çizelge 4.1. Devamı)

JRHR226531	210-216	4	2.11	0.53	0.38	0.46
JRHR226530	184-194	3	1.40	0.29	0.20	0.26
JRHR226526	191-194	3	2.47	0.60	0.31	0.52
JRHR226409	299-303	2	1.56	0.36	0.07	0.29
JRHR226360a	174-188	7	5.06	0.80	0.73	0.77
JRHR226223	218-220	2	1.93	0.48	0.31	0.37
JRHR226105	110-129	4	2.24	0.55	0.87	0.46
JRHR226081	212-232	5	2.92	0.66	0.80	0.60
JRHR226074	182-194	3	2.41	0.58	0.60	0.49
JRHR226051	214-219	3	1.48	0.32	0.38	0.30
JRHR226042	219-222	2	1.28	0.22	0.25	0.19
JRHR226021a	188-207	7	4.51	0.78	0.79	0.74
JRHR225949	212-218	2	1.06	0.06	0.06	0.06
JRHR225926	176-190	6	3.38	0.70	0.67	0.67
JRHR225912	242-253	3	1.63	0.38	0.33	0.35
JRHR225717	191-193	2	1.06	0.06	0.06	0.06
JRHR229189	226-236	4	1.69	0.41	0.50	0.37
JRHR229180a	206-212	3	2.26	0.56	0.19	0.46
JRHR229141	243-258	2	1.97	0.49	0.87	0.37
JRHR229134	197-243	4	2.18	0.54	0.08	0.48
JRHR229126	176-195	5	3.19	0.69	0.87	0.63
JRHR228966	194-196	2	1.97	0.49	0.47	0.37
JRHR228936a	152-172	7	4.17	0.76	0.86	0.72
JRHR228904	200-210	4	2.68	0.63	0.44	0.57
Ortalama		3.49	2.29	0.48	0.44	0.46

Bu çalışmada, *J. regia*'da 200 BES-SSR primer çifti dizayn edildi ve bunlardan 190 primer (%95) çifti başarılı olarak amplifikasyon göstermiştir. Polimorfik 92 SSR primer çifti 2 ile 11 arasında allel üretmiş ve toplamda 324 allel elde edilmiştir. Locus başına ortalama allel sayısı 3.6 adet olmuştur. Polimorfik bilgi içeriği (PBI) değeri 0.06 ile 0.87 arasında değişmiş ve ortalama 0.46 olarak belirlenmiştir.

Elde edilen sonuçlara bakıldığında, en yüksek He (0.885) ve Ho (0.923) değerine JRHR223545 primeri sahiptir. En düşük He değerine JRHR229498,

JRHR223691, JRHR225949 ve JRHR225717 primerleri sahip olmuş ve hepsinin He değerleri de aynı (0.61) bulunmuştur. En düşük Ho değerine sahip olan JRHR226573 primerinde $H_o=0$ bulunmuştur. Wang ve ark. (2008) yaptıkları çalışmada beklenen heterozigotluk değeri ortalaması 0.525 bulurken, Ma ve ark. (2011) He değerini ortalamasını ise 0.44 olarak hesaplamışlardır. Bu çalışmada elde edilen değer (0.480). Wang ve ark. (2008)'na göre daha düşük, Ma ve ark. (2011)'na göre daha yüksek bulunmuştur. Bu çalışmada Na değeri 2-11 arasında değişirken ortalaması 3.49 bulunmuştur. Bu çalışmadaki Na değeri ortalaması Topçu ve ark.'nın (2015) ($N_a = 4.2$) ve Najafî ve ark. (2014)'nın ($N_a = 4.3$) yaptıkları çalışmada elde edilen Na değerinden daha düşük bulunmuştur.

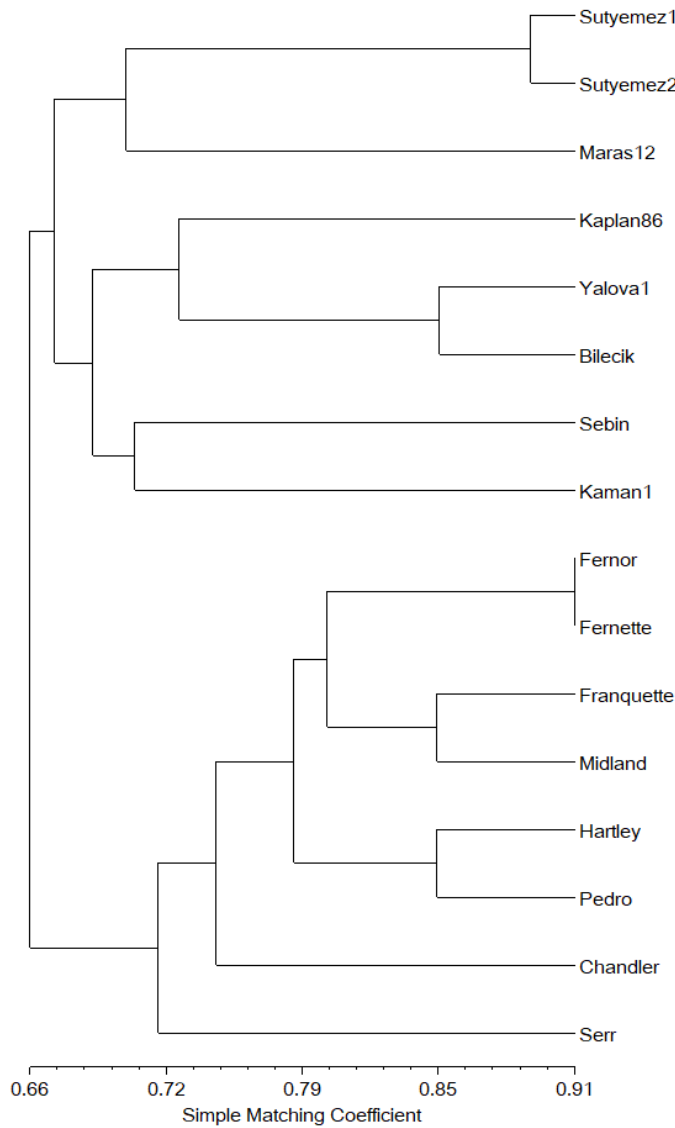
Sonuç olarak, bu çalışma kapsamında teste dilen 200 SSR primer çiftinden %46'sında polimorfizm tespit edilmiş ve ileride genetik çalışmalarda kullanılmak üzere 92 yeni polimorfik SSR markörü geliştirilmiştir.

4.2. Geliştirilen SSR Markörleri Kullanılarak 16 Ceviz Çeşidinde Genetik İlişkilerin Belirlenmesi

Toplam 92 adet polimorfik SSR primeri kullanılarak 16 adet ceviz çeşidinde Jaccard genetik benzerlik indeksi hesaplanmıştır (Çizelge 4.3). NTSYSpc paket programında, SSR primerlerinin PCR ürünleri var (1) ya da yok (0) şeklinde değerlendirilmiş ve analiz edilmiştir. Soyağacı çalışmaları UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean Algorithm) yöntemi ile yapılmıştır.

Toplam 92 adet SSR primerinin analiz edilmesi sonucunda elde edilen 324 allel kullanılarak yapılan soyağacı analiz sonucuna göre, (Şekil 4.1) yabancı orjinli (Chandler, Fernor, Fernette, Franquette, Hartley , Pedro, Midland, ve Serr) ve yerel (Maraş-12, Kaplan-86, Kaman-1, Sütyemez-1, Sütyemez-2, Yalova-1, Şebin, ve Bilecik), çeşitlerin 2 ayrı grupta toplandığı belirlenmiştir. Yabancı orjinli çeşitlerden Fernor ve Fernette'nin 0.909 benzerlik katsayısıyla çok yakın akraba oldukları tespit edilmiştir. Fernor ve Serr çeşitlerinin ise 0.690 benzerlik katsayısıyla en uzak akraba oldukları tespit edilmiştir. Yerli çeşitler arasında

benzerlik katsayısı değerlendirildiğinde, en yakın akraba bulunan çeşitlerin 0.889 benzerlik katsayısına sahip Sütyemez-1 ve Sütyemez-2 çeşitlerin olduğu belirlenmiştir. En uzak akraba çeşitler ise 0.612 benzerlik katsayısı ile Şebin ve Maraş-12 arasında tespit edilmiştir.



Şekil 4.1. Toplam 92 adet SSR primeri kullanılarak elde edilen 16 adet ceviz çeşidine ait dendrogram.

Çizelge 4.3. Toplam 92 SSR primer çifti kullanılarak 16 adet ceviz çeşidine ait genetik benzerlik indeksi

Rows/Cols	Sutyemez1	Sutyemez2	Kaplan86	Maras12	Sebin	Kaman1	Yalova1	Bilecik	Fernor	Fernette	chandler	Franquette	Midland	Hartley	Serr	Pedro
Sutyemez1	1															
Sutyemez2	0.889	1														
Kaplan86	0.644	0.652	1													
Maras12	0.692	0.72	0.662	1												
Sebin	0.691	0.667	0.661	0.614	1											
Kaman1	0.686	0.68	0.671	0.646	0.703	1										
Yalova1	0.697	0.708	0.725	0.668	0.674	0.729	1									
Bilecik	0.714	0.729	0.735	0.657	0.691	0.731	0.848	1								
Fernor	0.663	0.692	0.652	0.695	0.642	0.677	0.686	0.724	1							
Fernette	0.67	0.68	0.616	0.665	0.63	0.689	0.671	0.707	0.909	1						
chandler	0.629	0.634	0.631	0.637	0.615	0.68	0.661	0.703	0.735	0.747	1					
Franquette	0.625	0.649	0.613	0.646	0.645	0.692	0.668	0.678	0.832	0.817	0.75	1				
Midland	0.676	0.683	0.646	0.631	0.642	0.701	0.689	0.703	0.756	0.766	0.747	0.851	1			
Hartley	0.652	0.676	0.657	0.628	0.666	0.667	0.721	0.744	0.778	0.771	0.746	0.784	0.835	1		
Serr	0.617	0.623	0.627	0.636	0.31	0.637	0.65	0.68	0.698	0.704	0.73	0.707	0.72	0.738	1	
Pedro	0.671	0.669	0.635	0.632	0.661	0.662	0.733	0.728	0.763	0.756	0.756	0.776	0.793	0.846	0.747	1

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmada kullanılan 200 adet SSR primer çifti Chandler ceviz çeşidinin DNA dizileri kullanılarak dizayn edilmiştir. Dizayn edilen 200 adet SSR primer çifti 8 adet yerli 8 adet yabancı toplam 16 adet ceviz çeşidinde analiz edilmiştir. 200 adet SSR primer çiftinden 190 (%95) adet SSR primer çifti amplifiye olmuştur. Amplifikasyon gösteren primerlerden 92 (%46) tanesi polimorfik, 98 tanesi monomorfik bulunmuştur. Polimorfik olan 92 adet SSR primer çifti toplam 324 allel üretmiştir. Allel sayısı 2-11 arasında değişmiş ve lokus başına düşen ortalama allel sayısı 3.6 bulunmuştur. Polimorfik bilgi içeriği 0.11-0.88 arasında değişirken, ortalaması 0.46 olarak belirlenmiştir. Etkili allel sayısı 1.06-8.67 arasında değişmiş ve ortalama 2.29 bulunmuştur. Beklenen heterozigotluk 0.06-0.88 arasında değişirken ortalaması 0.480 bulunmuştur. Gözlenen heterozigotluk oranı 0.00-0.92 arasında değişiklik gösterirken ortalaması 0.44 bulunmuştur. Bütün bu elde edilen dataların değerlendirilmesi sonucunda veriler kullanılarak UPGMA benzerlik indeksine göre elde edilen dendrogram sonucunda 2 ana grup oluşmuş ve 8 adet yerli orjine sahip çeşitler bir grubu oluştururken, 8 adet yabancı orjinli çeşitler ikinci ana grubu oluşturmuştur. Yeni geliştirilen 92 adet polimorfik SSR primer çifti kullanılarak elde edilen benzerlik katsayıları ve dendrogram ile 16 adet ceviz çeşidin genetik olarak akrabalık ilişkileri belirlenmiştir. Sonuçta bu yeni geliştirilen 92 adet SSR primer çiftinin genetik akrabalık ilişkilerini belirleme, karakterizasyon, çeşit geliştirme ve genetik harita oluşturma çalışmalarında kullanılabileceği belirlenmiştir.



KAYNAKLAR

- Akça, Y., 2005. Determination an overview of selection breeding studies carried out in Turkey and definition of characteristics for selection breeding of walnut. *Bahçe*, 34:29-34.
- Akça, Y ve Karadağ, H., 2011. Phenological and pomological properties of promising walnut (*Juglans regia* L.) genotypes from selected native population in Amasya province. *African Journal of Biotechnology*,10:74-79.
- Beyhan, Ö., 2009. Akyazı bölgesi cevizlerinin (*Juglans regia* L.) seleksiyonu yoluyla ıslahı üzerine araştırmalar. *Bahçe Dergisi*, 38(2): 1-8.
- Chen, C. M., Han, S. J., Yuan, S. S., Wang, C. J. ve Yu, J. H., 2013. Isolation and characterization of 20 polymorphic microsatellite markers for *Juglans mandshurica* (Juglandaceae), *Bio One*, 1:1-4.
- Chen, L., Ma, Q. Chen, Y., Wang, B. ve Pei, D., 2014. Identification of major walnut cultivars grown in China based on nut phenotypes and SSR markers. *Scientia Horticulturae*.168:240-248.
- Dang, M., Liu, Z. X., Chen, X., Zhang, T., Zhou, H. J., Hu, Y. H., ve Zhao, P., 2015. Identification, development, and application of 12 polymorphic EST-SSR markers for an endemic Chinese walnut (*Juglans cathayensis* L.) using next-generation sequencing technology. *Biochemical Systematics and Ecology* 60 (2015) 74-80
- Dangl, G., Woeste, K., Aradhya, M., Koehmstedt, A., Simon, C., Potter, D., Leslie, C. A. ve Mcgranahan, G., 2005. Characterization of 14 microsatellite markers for genetic analysis and cultivar identification of walnut. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 130:348-354.
- Dırlwanger, E., Cosson, P., Tavaud, M., Aranzana, M. J., Poizat, C., Zanetto, A., Arus, P. ve Laigret, F., 2002. Development of microsatellite markers in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] and their use in genetic diversity

- analysis in peach and sweet cherry (*Prunus avium* L.). Theoretical and Applied Genetics, 105(1): 127–138.
- Doğan, Y., Kafkas, S., Sütyemez, M., Akça, Y.ve Türemiş, N., 2014. Assessment and characterization of genetic relationship of walnut (*Juglans regia* L.) genotypes by three types of molecular markers. Scientia Horticulturae, 168:81-87.
- Doyle, J. J. ve Doyle, J. L., 1987. A rapid isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical Bulletin, 19:11-15.
- Ebrahimi, A., Fatahi, R. ve Zamani, Z., 2011. Analysis of genetic diversity among some Persian walnut genotypes (*Juglans regia* L.) using morphological traits and SSRs markers. Scientia Horticulturae, 130:120-128.
- Faostat, 2017. Agriculture data [online]. Available form:<http://faostat.fao.org>.
- Fjellstrom, R. G. ve Parfitt, D. E., 1994. RFLP inheritance and linkage in walnut. Theoretical and Applied Genetics, 89:665-670.
- Fjellstrom, R. G., Parfitt, D. E. ve McGranahan, G. H., 1994. Genetic relationships and characterization of Persian walnut (*J. regia* L.) cultivars using restriction fragment length polymorphisms (RFLPs). Journal of the American Society for Horticultural Science, 119:833-839.
- Forde, H. I. ve Griggs, W. H., 1972. Pollination and blooming habits of walnuts. Agriculture Experimental Station, University of California, Leaflet 2753.
- Foroni, I., Rao, R., Woeste, K.ve Gallitelli, M., 2005. Characterisation of *Juglans regia* L. with SSR markers and evaluation of genetic relationships among cultivars and the ‘Sorrento’ landrace. Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 80:49-53.
- Foroni, I., Woeste, K., Monti, L. M. ve Rao, R., 2007. Identification of ‘Sorrento’ walnut using simple sequence repeats (SSR). Genetic Resources and Crop Evolution, 54:1081-1094.

- Hoban, S., Anderson, R.M.C., Cleary, T., Schlarbaum, S. ve Romero-Severson, I., 2008. Thirteen nuclear microsatellite loci for butternut (*Juglans cinerea* L.). Molecular Ecology Resources, 8:643–646.
- Ikhsan, A. S., Topcu, H., Sütyemez, M. ve Kafkas, S., 2016. Novel 307 Polymorphic SSR Markers From BAC-end Sequences in Walnut (*Juglans regia* L.): Effects of Motif Types and Repeat Lengths on Polymorphism and Genetic Diversity. Scientia Horticulturae, 213: 1–4.
- Kafkas, S., Ozkan, H. ve Sutyemez, M., 2005. DNA polymorphism and assessment of genetic relationships in walnut genotypes based on AFLP and SAMPL markers. Journal of the American Society for Horticultural Science, 130:585-590.
- Kafkas, S., Kaska, N., Wassimi, A.N. ve Padulosi, S., 2006. Molecular characterisation of afghan pistachio accessions by amplified fragment length polymorphisms (AFLPs) J. Hort. Sci. Biotechnol. 81(5): 864–868
- Karimi, R., Ershadi, A., Vahdati, K. ve Woeste, K., 2010. Molecular characterization of Persian walnut populations in Iran with microsatellite markers. Journal of the American Society for Horticultural Sciences, 45:1403-1406.
- Kumar, P., Gupta, V.K., Misra, A.K., Modi, D.R. ve Pandey, B.K., 2009. Potential of molecular markers in plant biotechnology. Plant Omics Journal, 2:141-162.
- Leslie, C.A. ve McGranahan, G. H., 1998. The origin of the walnut. In:ramos DE(ed) walnut orchard management. University of California, Division of Agriculture and Natural Resources, Publication, 3373:3-7.
- Liu, K. ve Muse, S.V., 2005. PowerMarker: Integrated analysis environment for genetic marker data. Bioinformatics, 21:2128-2129.
- Ma, Q., Zhang. J. ve Pei D., 2011 Genetic analysis of walnut cultivars in China using fluorescent amplified fragment length polymorphism. Journal of The American Society For Horticultural Science, 136(6): 422-428.

- Manning, W. E., 1978. The classification within the *Juglandaceae*. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 65:1058-1087.
- Nicese, F. P., Hormaza, J.I. ve McGranahan, G. H., 1998. Molecular characterization and genetic relatedness among walnut (*Juglans regia* L.) genotypes based on RAPD markers. *Euphytica*, 101:199-206.
- Najafi, F., Mardi, M., Fakheri, B., Pirseyedi, S. M., Mehdinejad, N., ve Farsi, M., 2014. Isolation and characterization of novel microsatellite markers in walnut (*Juglans regia* L.). *American Journal of Plant Sciences*, 5:409-415.
- Peakal, R. ve Smouse, P.E. 2006. GenAlEx6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6:288-295.
- Pollegioni, P., Woste, K., Major, A., Mugnozza, S., G. ve Malvolti, M. E., 2008. Characterization of *Juglans nigra* (L.), *Juglans regia* (L.) and *Juglans xintermedia* (Carr.) by SSR markers. A case study in Italy. *Silvae Genetica*, 1:68-78.
- Pollegioni, P., Woste, K., Olimpieri, I., Marandola, D., Cannata, F. ve Malvolti, M. E., 2011. Long-term human impacts on genetic structure of Italian walnut inferred by SSR markers. *Tree Genetics and Genomes*, 7:707-723.
- Potter, G., Gao, G., Aiello, C. ve McGranahan, G., 2002. Inter-simple sequence repeat markers for fingerprinting and determining genetic relationships of walnut (*J. regia*) cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 127:75-81.
- Robichaud, R. L., Glaubitz, J. C., Rhodes Jr, O. E. ve Woeste, K. 2006. A robust set of black walnut microsatellites for parentage and clonal identification. *New Forest*, 32:179-196.
- Rohlf, J. F., 2011. NTSYSpc 2.21 numerical taxonomy and multivariate analysis system. Exeter software, N. Y.
- Ruiz-Garcia, L., Lopez Ortega, G., Fuentes Denia, A. ve Frutos Tomas, D., 2011. Identification of a walnut (*Juglans regia* L.) germplasm collection and

- evaluation of their genetic variability by microsatellit emarkers. Spanish Journal of Agricultural Research, 9:179-192.
- Ross-Davis, A. ve Woeste, K., E., 2007. Microsatellite markers for *Juglans cinerea* L. and their utility in other Juglandaceae species. Conservation Genetics, 9:465-469.
- Ross-Davis, A., Ostry, M. ve Woeste, K. E., 2008. Genetic diversity of butternut (*Juglans cinerea*) and implications for conservation. Canadian Journal of Forest Research, 38:899-907.
- Schuelke, M., 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. Nature Biotechnology, 18:233-234.
- Semagn, K., Bjornstad, A. ve Ndjiondjop, M. N., 2006. An overview of molecular marker methods for plants. African Journal of Biotechnology, 5(25):2540-2568.
- Shah S., Mir, J. I., Ahmed, N. ve Fazili, K. M., 2016. Assessment of germplasm diversity and genetic relationships among walnut (*Juglans regia* L.) genotypes through microsatellite markers. Journal of the Saudi Society of Agricultural Science, DOI: 10.1016/j.jssas.2016.07.005.
- Şen, S. M., Kazankaya, A., Yarılgac, T. ve Doğan, A., 2006. Bahçeden mutfaga ceviz. Maji yayınları, 233 sayfa.
- Şen, S. M., 1986. Ceviz yetiştiriciliği. Eser Matbaası, Samsun, 229 s
- Staub, J. E., Serquen, F. C. ve Gubta, M., 1996. Genetic markers, map construction, and their application in plantbreeding. Hort Science, 31:729-740.
- Tanksley, S. D., Young, N. D., Paterson, A. H. ve Bonierbale, M. W., 1989. RFLP mapping in plant breeding: new tools for an old science. Bio /Technology, 7:257-264
- Topcu, H., 2013 Ceviz (*Juglans regia* L.) için mikrosatellit (SSR) primerlerin geliştirilmesi. Yüksek Lisans Tezi (Yayınlanmamış).

- Topçu, H., Ikhsan, A. S., Sütyemez, M., Çoban, N., Güney M. ve Kafkas, S., 2015. Development Of 185 polymorphic simple sequence repeat (SSR) markers from walnut (*Juglans regia* L.) Scientia Horticulturae 194: 160–167.
- Vahdati, K., Lotfi, M. ve Grouh, S. H., 2014. Karyotype analysis of haploid plants of walnut (*Juglans regia* L.). International Society for Horticultural Science, 1048:225-228.
- Victory, E. R., Glaubitz, J. C., Rhodes, Jr, O. E. ve Woeste, K. E., 2006. Genetic homogeneity in *Juglan nigra* (Juglandaceae) at nuclear microsatellites. American Journal of Botany, 93:118–126.
- Vinod, K. K., 2006. Genome mapping in plant population. Tamil Nadu University Press: 402-414
- Wang, H. D., Pei, D., Gu., R. S. ve Wang, B. Q., 2008. Genetic diversity and structure of walnut populations in central and southwestern China revealed by microsatellite markers. Journal of the American Society for Horticultural Science, 133:197–203.
- Wei, W., Zhang, Y., Ly, H., Li, D., Wang, L. ve Zhang, X., 2013. Association analysis for quality traits in a diverse panel of Chinese sesame (*Sesamum indicum* L.) germplasm. Journal of Integrative Plant Biology, 55:745-758.
- Woeste, K., Burns, R., Rhodes, O. ve Michler, C., 2002. Thirty polymorphic nuclear microsatellite loci from black walnut. The Journal of Heredity, 93:58-60.
- Woodworth, R.H., 1930. Meiosis of microsporogenesis in the Juglandaceae. Amer. J. Bot. 17:863–869.
- Yi, F., Zhi-Jun, Z., She-Long, Z. ve Shu-Ping, L., 2011. Development of walnut EST-SSR markers and primer design. Agricultural Science and Technology. 12:1810–1813.

Zhang, R., Zhu, A. D., Wang, X. J., Yu, J., Zhang, H. R., Gao, J. S., Cheng, Y. J.
ve Deng, X. X., 2010. Developments of *Juglans regia* SSR markers by
datamining of the EST database, Plant Molecular Biology, 28:646-653.





ÖZGEÇMİŞ

1972 yılında Adana’da doğdu ilk, orta ve lise öğrenimini Adana’da tamamladı. 1994 yılında Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri bölümünden mezun oldu. 2003 yılında Çukurova Üniversitesi Eğitim Fakültesi İngilizce Öğretmenliği bölümünden mezun oldu. 2012 yılında Çukurova Üniversitesi Bahçe Bitkileri bölümünde yüksek lisansa başladı. Şu anda Adana’da bir Anadolu Lisesinde İngilizce öğretmenliği yapmaktadır.

