

**ISLAH EDİLMİŞ BAZI SOĞAN GENOTİPLERİNDE MİLDİYÖ
(*Peronospora destructor*) HASTALIĞINA KARŞI
DAYANIKLILIK GENİNİN VARLIĞININ İNCELENMESİ**

Reyhan UÇAR



T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ISLAH EDİLMİŞ BAZI SOĞAN GENOTİPLERİNDE MİLDİYÖ (*Peronospora destructor*) HASTALIĞINA KARŞI DAYANIKLILIK GENİNİN VARLIĞININ İNCELENMESİ

Reyhan Uçar
0000-0002-0766-3566

Prof. Dr. Ahmet İPEK
(Danışman)

YÜKSEK LİSANS
BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

BURSA – 2023
Her Hakkı Saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans

ISLAH EDİLMİŞ BAZI SOĞAN GENOTİPLERİNDE MİLDİYÖ (*Peronospora destructor*)
HASTALIĞINA KARŞI DAYANIKLILIK GENİNİN VARLIĞININ İNCELENMESİ

Reyhan UÇAR

Bursa Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ahmet İPEK

Soğan (*Allium cepa* L.) eski zamanlardan itibaren insanlar için değerli bir sebze olmuştur. Fungal, bakteriyel ve viral hastalıklar soğan yetiştiriciliğinde önemli verim kayıplarına neden olmaktadır. Bu hastalıklar arasında *Peronospora destructor*'un neden olduğu soğan mildiyö hastalığı dünyadaki soğan üretim bölgelerinin çoğunda yaygın olarak görülen, soğan yetiştiriciliğinin yapıldığı nemli ve serin hava koşullarında soğana zarar veren, verimin düşmesine ve tohumluk üretiminde önemli kayıplara neden olan bir fungal hastalıktır. Hastalık ile mücadelede en etkili yöntemlerden biri dayanıklı çeşit kullanımıdır. Dayanıklı çeşitler verim ve kaliteyi arttırmakla birlikte üretimde pestisit kullanımını azaltmakta ve ürünün sağlık değerinin de yükselmesini sağlamaktadır. Bu çalışma, bazı soğan genotiplerinde soğan mildiyösüne karşı dayanıklılık geninin varlığını incelemek amacıyla yapılmıştır. Çalışmada 111 soğan genotipinin yaprak örnekleri alınarak DNA örnekleri elde edilmiştir. DMR1 ve DMR2 olmak üzere iki moleküler işaretleyici ile genotipler analiz edilmiştir. Laboratuvar analiz sonuçlarına göre analiz edilen 111 soğan genototipinden DMR1 moleküler işaretleyici analizinde 25 genotip, DMR2 moleküler işaretleyici analizinde ise 8 genotipin soğan mildiyösüne dayanıklılık geni taşıdığı belirlenmiştir. Moleküler işaretleyici analizleri bitki ıslah sürecinde dayanıklı soğan çeşitlerinin geliştirilebilmesi, dayanıklı bir bitkinin genotip özelliklerine bakılarak analiz edilebilmesi ve dayanıklı soğan hatlarının seleksiyonunu kolaylaştırması bakımından fayda sağlamayabilmektedir.

Anahtar Kelimeler: Soğan (*Allium cepa* L.), mildiyö hastalığı, dayanıklılık, moleküler işaretleyici

2023, xii + 39 sayfa.

ABSTRACT

MSc Thesis

INVESTIGATION OF THE PRESENCE OF A RESISTANCE GENE AGAINST (*Peronospora destructor*) DISEASE IN SOME ONION GENOTYPES

Reyhan UÇAR

Bursa Uludağ University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Horticulture

Supervisor: Prof. Dr. Ahmet İPEK

Onion (*Allium cepa* L.) has been a valuable vegetable for humans since ancient times. Fungal, bacterial and viral diseases cause significant yield losses in onion cultivation. Among these diseases, onion mildy mildew disease caused by *Peronospora destructor* is a fungal disease that is widespread in most of the onion production regions in the world, damaging onions in humid and cool weather conditions where onion cultivation is carried out, causing a decrease in yield and significant losses in seed production. One of the most effective methods to combat the disease is the use of resistant varieties. Resistant varieties increase yield and quality, reduce the use of pesticides in production and increase the health value of the product. This study was carried out to investigate the presence of resistance gene against onion downy mildew in some onion genotypes. In the study, leaf samples of 111 onion genotypes were taken and DNA samples were obtained. Genotypes were tested with two molecular markers, DMR1 and DMR2. According to the results of the laboratory analysis, it was determined that 25 genotypes in the DMR1 molecular marker analysis and 8 genotypes in the DMR2 molecular marker analysis among the 111 onion genotypes analyzed carried onion mildew resistance genes. Molecular marker analyses may not be beneficial in terms of developing resistant onion varieties in the plant breeding process, analyzing a resistant plant by looking at its genotype characteristics and facilitating the selection of resistant onion lines.

Key words: Onion (*Allium cepa* L.), downy mildew, resistance, molecular marker
2023, xii + 39 pages.

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim süresince bana anlattığı ve öğrettiği bilgiler ile ıssık tutan, kendisine ulaşmak istediğim her zaman ulaşır aklıma takılan soruları sorabildiğim ve hiçbir sorumu cevapsız bırakmayan Sayın Danışman Hocam Prof. Dr. Ahmet İPEK'e saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Bana katmış olduğu ve kendisinden öğrendiğim bilgiler ile tezimi düzenleme kontrollerinde bana destek olan Sayın Hocam Dr. Öğr. Üyesi Sevin TEOMAN DURAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamda bana destek olan arkadaşım Zir. Müh. Kevser ÇORAK'a teşekkür ederim.

Bana eğitimim konusunda her zaman destek veren, her konuda benim yanımda olan ve benim bugünlere gelmemde en büyük emekleri olan aileme en içten sevgi ve teşekkürlerimi sunarım. Yüksek lisans tezimi annem ve babama ithaf ediyorum.

Reyhan UÇAR
15/06/2023

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vii
TEŞEKKÜR.....	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI	3
2.1. Soğan Üretim Miktarları ve Gen Kaynakları	3
2.2. Soğan Genomu, Bitkisel Özellikleri ve Yetiştiriciliği Hakkında Bilgiler	6
2.3. Soğan Mildiyözü, Hastalık Döngüsü ve Soğan Mildiyözü Dayanıklılık Geni Hakkında Bilgiler.....	8
2.4. Soğan Mildiyözü İle İlgili Yapılan Çalışmalar	10
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	15
3.1. Materyal	15
3.1.1. Tezin yürütüldüğü laboratuvar alanı	15
3.2.2. Kullanılan bitki örnekleri	15
3.2.3. Tez çalışmasında kullanılan cihazlar	17
3.2. Yöntem.....	18
3.2.1. Bitki yaprak örneklerinin alınması.....	18
3.2.2. Yaprak örneklerinin liyofilizatörde kurutulması.....	18
3.2.3. Yapraklardan DNA örneği elde edilmesi.....	20
3.2.4. SSR moleküler işaretleyicileri yardımıyla PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) döngüsü.....	23
3.2.5. PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezinde görüntülenmesi.....	25
4. BULGULAR.....	26
4.1. DNA Konsantrasyon Miktarları.....	26
4.2. DMR1 Moleküler İşaretleyicisi Agaroz Jel Görüntüsü Analizleri	27
4.3. DMR2 Moleküler İşaretleyicisi Agaroz Jel Görüntüsü Analizleri	31
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	33
KAYNAKLAR	36
ÖZGEÇMİŞ	39

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
dk	Dakika
da	Dekar
°C	Derece
gr	Gram
g	Grafit (Santrifüj)
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre
µM	Mikromolar
mg	Miligram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
ng	Nanogram
pg	Pikogram
cm	Santimetre
volt	Voltaj
%	Yüzde

Kısaltmalar	Açıklama
bp	Base Pair
CTAB	Cetyl trimethylammonium bromide
CAPS	Cleaved Amplified Polymorphic Sequence
dNTP	Deoksi Nükleotid Tri Fosfat
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
dH ₂ O	Distile Su
DMR	Downy Mildew Resistance
FAO	Food and Agriculture Organization
GISH	Genomik in situ Hybridization
MAB	Marker Assisted Backcrossing
MgCl ₂	Magnezyum Klorür
PCR	Polimeraz Chain Reaction
SCAR	Sequence Characterized Amplified Region
SSR	Simple Sequence Repeat
NACl	Sodyum Klorür
sdH ₂ O	Steril Distile Su
Taq	Termo Stabil Polimeraz Enzimi
TBE	Tris/Borate/EDTA
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu
UV	Ultraviyole Işık

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Kıtalarla göre 2021 yılı kuru soğan üretim miktarları (FAO 2021)..	3
Şekil 2.2. Dünya’da ülkelere göre 2021 yılı kuru soğan üretim miktarlar (FAO 2021).....	4
Şekil 2.3. Türkiye’de yıllara göre kuru soğan üretim ve ekim alanı miktarları (TÜİK 2022).....	4
Şekil 2.4. Türkiye illere göre 2022 yılı kuru soğan üretim miktarları (TÜİK 2022).....	5
Şekil 2.5. A) Soğan bitkisinin kök yapısı, B) Soğan bitkisinde yaprak görünümü	7
Şekil 2.6. A) Soğan mildiyösünün soğan yapraklarındaki miselyum tabakası, B) Hastalık ile enfekte olmuş soğan bitkisinin görüntüsü (Fotoğraf:Schwartz2004).....	9
Şekil 3.1. Bahçe Bitkileri Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarı.....	15
Şekil 3.2. A) Applied Biosystems PCR cihazı, B) VWR santrifüj cihazı, C) GFL Su banyosu, D) Elektroforez Sistemi.....	18
Şekil 3.3. Yaprak örneklerinin kurutulması A) Liyofilizatör cihazı (Christ Alpha 1-4 LD Plus) B) Örneklerin cihaza yerleştirilmesi C-D) Kurutulan yaprak örneklerinin görünümü.....	19
Şekil 3.4. A) Örneklerin hassas terazide tartılması B) Örneklerin parçalanabilmesi için kullanılan 6 mm ve 3 mm çapındaki boncuklar.....	20
Şekil 3.5. A) Örneklerin santrifüj işlemi için cihaza yerleştirilmesi B) Santrifüjden sonra oluşan 3 fazın görünümü ve temiz faz kısmının pipet yardımıyla çekilmesi.....	21
Şekil 3.6. A) Oluşan 2 fazın görünümü B) İzopropanol eklendikten sonra DNA’nın çözünmesi.....	22
Şekil 3.7. Moleküler işaretleyicilerin sulandırılması ve ara stok oluşturulması....	23
Şekil 3.8. Agaroz jel görüntüleme kabini ve görüntülerin aktarıldığı bilgisayar sistemi.....	25
Şekil 4.1. DMR1 moleküler işaretleyicisi ile çalışılan 1-46. DNA örneklerinin agaroz jel görüntüsü.....	28
Şekil 4.2. DMR1 moleküler işaretleyicisi ile çalışılan 47-92. DNA örneklerinin agaroz jel görüntüsü.....	29
Şekil 4.3. DMR1 moleküler işaretleyicisi ile çalışılan 93-111. DNA örneklerinin agaroz jel görüntüsü.....	29
Şekil 4.4. 25 soğan genotip için DMR2 moleküler işaretleyicisi agaroz jel görüntüsü.....	32

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 3.1.	Çalışmada kullanılan soğan genotipleri ve örnek sıra numaraları..	16
Çizelge 3.1.	Çalışmada kullanılan soğan genotipleri ve örnek sıra numaraları (devam).....	17
Çizelge 3.2.	DMR1 ve DMR2 moleküler işaretleyicilerine ait sekans bilgileri (Kim ve diğerleri, 2016).....	23
Çizelge 3.3.	PCR reaksiyonu bileşenleri.....	24
Çizelge 3.4.	DMR1 ve DMR2 primerleri için PCR reaksiyon koşulları (Kim ve diğerleri, 2016).....	24
Çizelge 3.5.	Msp I restriksiyon enzimi ile DNA kesme protokolü.....	25
Çizelge 4.1.	DNA örneklerinin konsantrasyon miktarları.....	26
Çizelge 4.1.	DNA örneklerinin konsantrasyon miktarları (devam).....	27
Çizelge 4.2.	DMR1 moleküler işaretleyici analizine göre 111 soğan genotipinin soğan mildiyösüne karşı dayanıklı-hassas gen taşıma durumları...	30
Çizelge 4.3.	DMR1 moleküler işaretleyici analizine göre 111 soğan genotipinin soğan mildiyösüne karşı dayanıklı-hassas gen taşıma durumları (devam).....	31
Çizelge 4.3.	DMR1 moleküler işaretleyicisine göre dayanıklı gen taşıdığı tespit edilen 25 soğan genotipinin DMR2 moleküler işaretleyici analizine göre soğan mildiyösüne karşı dayanıklı-hassas gen taşıma durumları	32

1. GİRİŞ

Soğan Alliaceae familyası, Allium cinsine ait önemli bir tür olup çok eski çağlardan beri dünya çapında yetiştiriciliği yapılan ve insanlar tarafından tüketilen bir sebzedir. Serin iklim sebzesi olan soğan beyaz, sarı ve mor baş renklerine sahiptir. Taze olarak yeşil yaprakları, kuru olarak baş soğan şeklinde salatalarda veya pişirilerek yemeklerde kullanılabildiği gibi kurutularak toz baharat halinde ve dondurulmuş olarak farklı kullanım şekilleri bulunmaktadır (Gökçe ve diğerleri 2022). Eski zamanlardan beri insanlar için önemli bir sebze olan soğan Antik çağlarda Eski Mısırlılara ait duvar resimlerinde tasvir edilmiş ve yuvarlak baş yapısından dolayı evreninin sembolü olarak görülmüştür. Kelimenin aslı Latince’de “büyük inci” anlamına gelmektedir (Shigyo ve Kik 2008).

Soğan vitamin, mineral ve fenolik bileşikler sayesinde insan sağlığı ve beslenmesi açısından pek çok yararı bulunmakta ve ilaçların yapımında hammadde olarak kullanılmaktadır. Soğan A ve C vitamini bakımından zengindir. İçerdiği flavonoidler antioksidan etkiye sahip olduğu gibi antimikrobiyal, antifungal, antibakteriyel ve antidiyabetik etkisi de bulunmaktadır. Kalp-damar hastalıkları, kansere karşı koruma ve tedavisinde ayrıca enfeksiyon ve bağışıklık sisteminin korunmasında sağlık açısından faydaları bulunmaktadır (Esengül ve Yünlü 2016; Şelem ve diğerleri 2020; İrkin, 2008; Yiğit ve Yiğit 2021).

Soğanın birincil gen merkezi Batı Asya, ikincil gen merkezi ise Orta Asya’dır. Türkiye birincil gen merkezi içerisinde yer almaktadır. Allium cinsi yaklaşık 750 türden oluşmaktadır. İran ve Moğolistan’ın bulunduğu bölgede hala soğanın yabani akrabaları bulunabilmektedir. (Shigyo ve Kik 2008; Kibar 2022) 150 tür Türkiye coğrafyasında doğal olarak yetişmektedir (Gökçe ve Tekeli 2015). 1984 yılında “Kantartopu 3” ve “Akgün 12” çeşitleri ülkemizde Atatürk Bahçe Kültürleri Merkez Araştırma Enstitüsü tarafından kayıt edilen ilk soğan çeşitleridir (Bağcı ve diğerleri 2021).

Fungal, bakteriyel ve viral hastalık etmenleri, zararlılar, yabancı otlar yetiştiricilikte ürünlere zarar verebilmektedir. Soğanda *Perenospora dectructor* (Berk.) Casp. hastalık etmeninin neden olduğu soğan mildiyösü soğan yetiştiriciliği yapılan alanlarda tahrip edici olabilen fungal bir hastalıktır. Bu fungal hastalık nemli ve serin hava koşullarında

ortaya çıkmakta ve soğanda büyük zararlara neden olabilmektedir. Hastalık semptomları ilk olarak yapraklarda klorotik lekeler halinde görülmektedir. İlerleyen zamanlarda bu lekelerde beyaz bir küf tabakası oluşmaktadır. Hastalık sonucunda soğan başları istenen büyüklüklere ulaşamamakta ve verim kayıpları meydana gelmektedir (Ullah ve diğerleri 2020; Canpolat ve Saraçoğlu 2018; Arias ve diğerleri 2020).

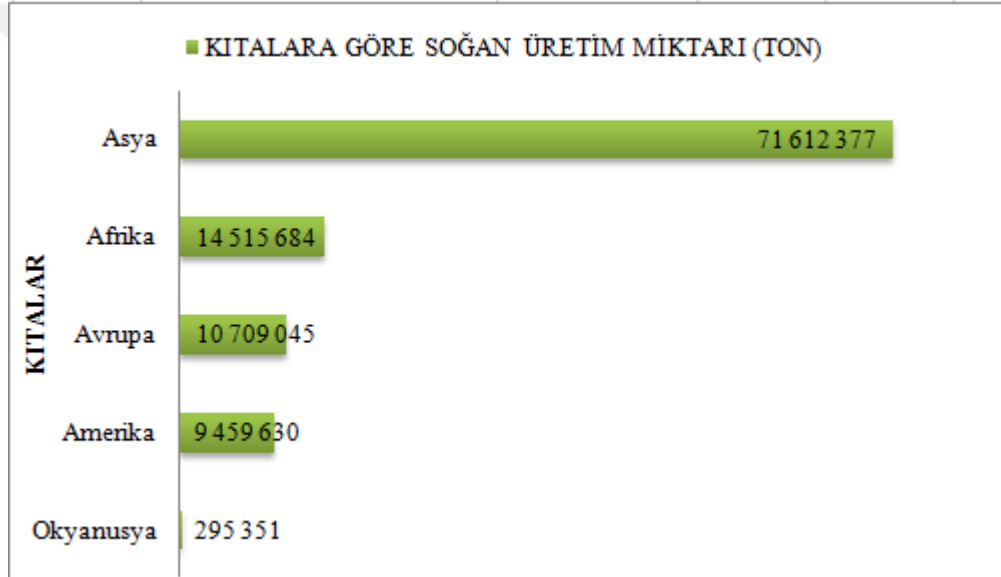
Hastalık ve zararlılara dayanıklılık, kalite ve yüksek verimli çeşitlerin geliştirilebilmesinde bitki ıslahı önem taşımaktadır. Dayanıklı çeşitlerin kullanımı hastalıklar ile mücadelede en etki yöntemlerdendir. Moleküler işaretleyicilerin bitki ıslahı süreçlerinde kullanımı seleksiyonun hızlandırılması ve yeni dayanıklı çeşitlerin geliştirilebilmesinde zaman kazandırmaktadır (Yorgancılar ve diğerleri 2015; Filiz ve Koç 2011).

Bu tez çalışması, soğan bitkisinde soğan mildiyö hastalığına karşı dayanım aktarımı amacıyla ıslah sürecinde olan ıslah hatlarındaki bazı soğan genotiplerinde dayanıklılık geninin varlığının moleküler işaretleyiciler kullanılarak belirlenmesi amacıyla yapılmıştır. Bu çalışmanın sonuçları soğan mildiyösüne dayanıklı çeşitlerin geliştirilebilmesi için ıslah çalışmalarında moleküler işaretleyici kullanımına bir bakış açısı sunmasına yardımcı olabilecektir.

2. KURAMSAL TEMELLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI

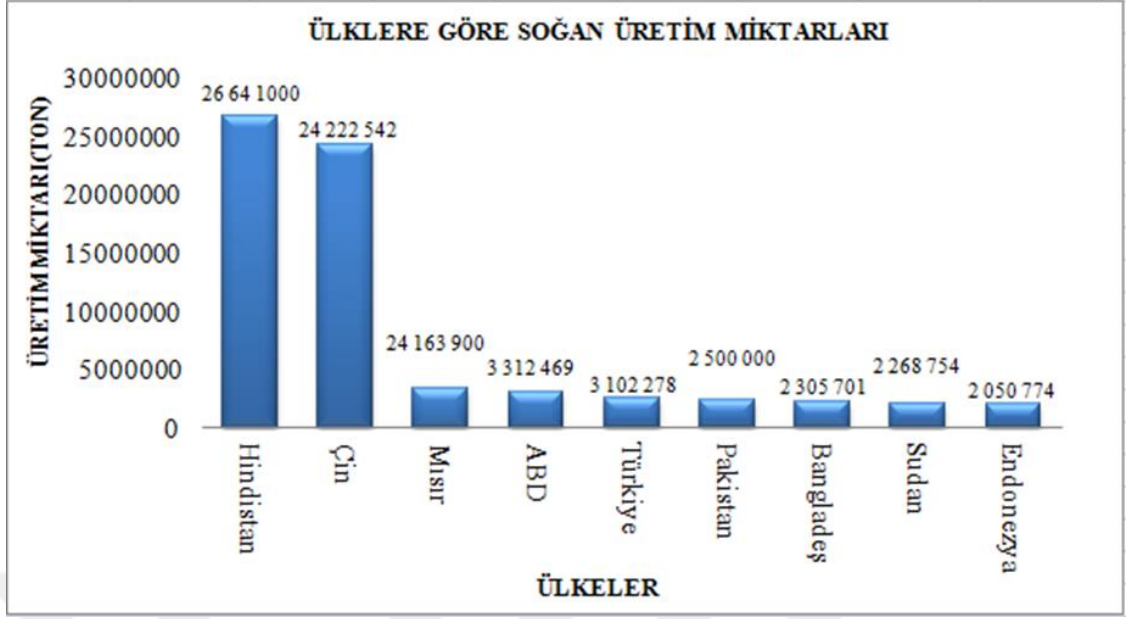
2.1. Soğan Üretim Miktarları ve Gen Kaynakları

Soğanın tüketimi belirli bir mevsimle sınırlı olmaması, farklı kültürlerde kullanımı ve farklı kullanım alanlarına sahip olması (çiğ, kuru, baharat olarak vb.) soğan yetiştiriciliğini önemli kılmaktadır. 2021 yılı kıtalara göre kuru soğan üretimine bakıldığında Asya kıtası 71 612 377 ton ile en fazla üretim yapılan kıtadır. İkinci sırada Afrika kıtası 14 515 684 ton üretim, üçüncü sırada Avrupa kıtası 10 709 045 dördüncü sırada 9 459 630 ton üretim ile Amerika kıtası yer almaktadır. Okyanusya ise 295 351 ton üretim ile sonuncu sırada yer almaktadır (Şekil 2.1).



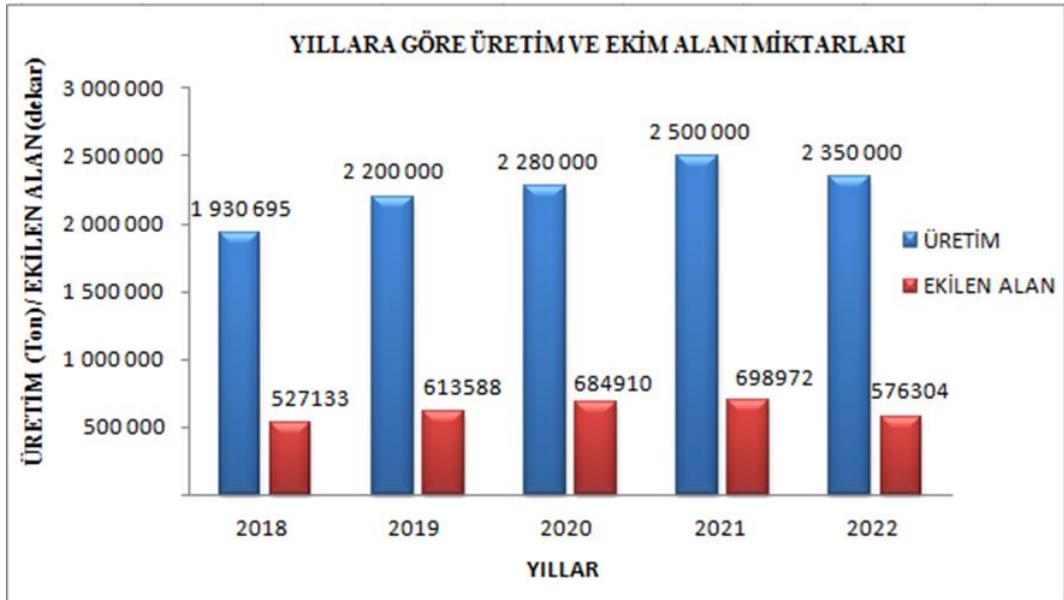
Şekil 2.1. Kıtalarla göre 2021 yılı kuru soğan üretim miktarları (FAO 2021)

2021 yılı FAO verilerine göre Dünya’da 130 814 631 ton kuru soğan üretimi yapılmıştır. Dünya kuru soğan üretiminde 26 641 000 ton üretim ile Hindistan 1. sırada yer almaktadır. Türkiye ise 2 500 000 ton üretim ile 6. sırada yer almaktadır (Şekil 2.2).



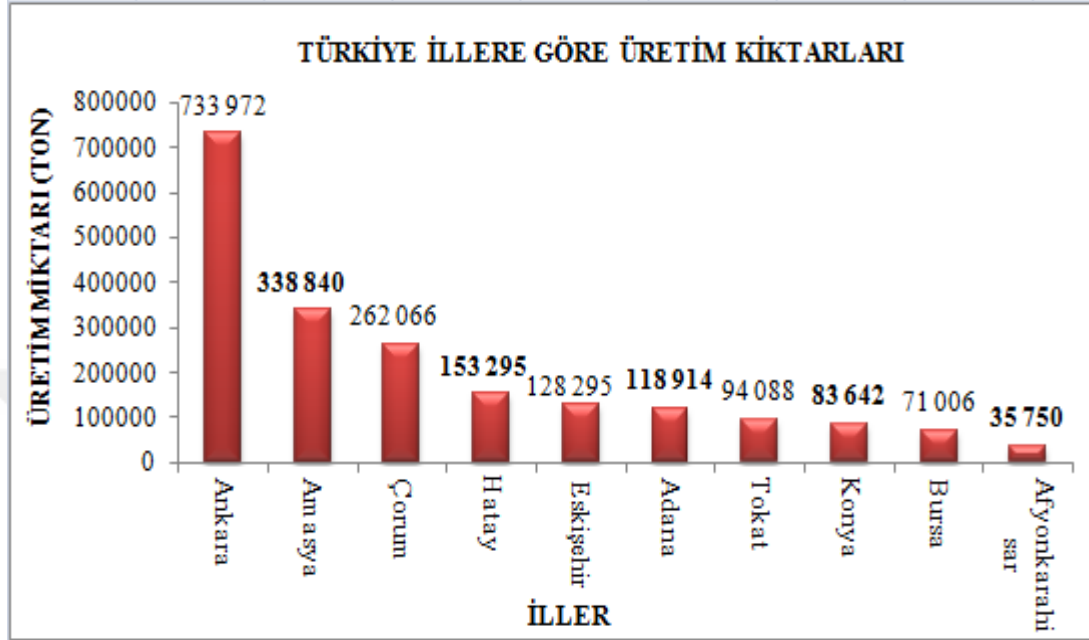
Şekil 2.2. Dünya’da ülkelere göre 2021 yılı kuru soğan üretim miktarları (FAO 2021)

Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) verilerine göre; 2022 yılında Türkiye’de 576 304 da alanda 2 350 000 ton üretim yapılmıştır. 2021 yılında ise 698 972 da alanda 2 500 000 ton üretimle yüksek düzeyde kuru soğan üretimi yapılmıştır. Ülkemizde neredeyse her bölgemizde kuru soğan yetiştiriciliği mevcuttur. Kuru soğan üretiminin en fazla yapıldığı bölge İç Anadolu Bölgesi’dir (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Türkiye’de yıllara göre kuru soğan üretim ve ekim alanı miktarları (TÜİK 2022)

Türkiye’de illere göre üretim miktarlarına bakıldığında, 2022 yılında en fazla üretim yapılan il 733 972 ton ile Ankara’dır. Ankara ilini sırası ile Amasya, Çorum, Hatay, Eskişehir, Adana, Tokat, Konya, Bursa ve Afyonkarahisar takip etmektedir (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Türkiye illere göre 2022 yılı kuru soğan üretim miktarları (TÜİK 2022)

Soğanın birincil gen merkezi içerisinde yer alan Türkiye farklı ülkelerden göç alması (Azerbaycan, Türkmenistan, Gürcistan, Kırgızistan, Afganistan vs.) göçmenlerin tohumlarını getirmesi ve konumu itibari ile ticaret yollarında bulunması sebebiyle soğan tohumlarında çeşitli popülasyonlar gözlenmektedir (Beşirli ve Azımı 2018). Türkiye’de soğana ait gen kaynakları Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Ulusal Tohum Gen Bankasında muhafaza edilmektedir. Ayrıca ABD Tohum Gen Bankası, Almanya Tohum Gen Bankası (IPK), Rusya Vavilov Tohum Gen Bankası (VIR), İngiltere Warwick Tohum Gen Bankası ve Çekya Tohum Gen Bankasında ülkemizden toplanan soğan gen kaynakları buradaki ulusal gen bankalarında da muhafaza edilmektedir. Ülkemizdeki yerel soğan popülasyonları kullanılarak Kantar topu 3, Akgün 12, İmrallı kırmısı, Beşirli 77 Atatürk Bahçe Kùltürleri Merkez Araştırma Enstitüsü tarafından; Valenciana, Tuncay Geçit Kuşığı Tarımsal Araştırma Enstitüsü tarafından geliştirilen açıkta tozlanan çeşitlerdir (Karaağaç ve Balkaya 2017).

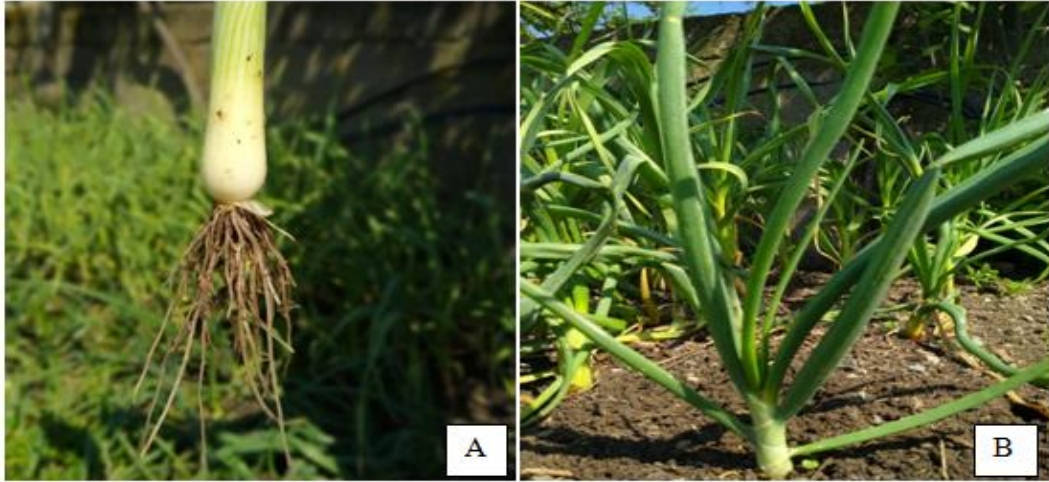
2.2. Soğan Genomu, Bitkisel Özellikleri ve Yetiştiriciliği Hakkında Bilgiler

Allium cepa L. %100 yabancı tozlanma görülen güçlü bir akrabalı yetiştirme depresyonu olan iki yıllık bir bitkidir. $2n=2x=16$ kromozom sayısı olan diploid bir sebzedir (Shigyo ve Kik 2008). Soğan genomunu sırasıyla %41'i yüksek, %36'sı orta ve %6'sı tek kopya DNA'dan oluşmakta ve genom büyüklüğü 17 pg olup kültürü yapılan sebzeler arasında en büyüklerindendir. Büyük genomundan dolayı soğanın genomik kaynakları diğer sebzelere göre sınırlı kalmaktadır (McCallum 2007).

Soğan %75'i toprağın ilk 25 cm derinliğine kadar ulaşabilen uzun-ince beyaz renkli saçak kök yapısına sahiptir. Etli bir yapıda olup kazık kök oluşturmaz. Kökler gövdeden tek tek çıkarak sık ve yüzeye yakın olarak gelişirler. Toprakta kökler dik ve dar bir açıyla gelişmesi sayesinde sık ekim yapılabilenkte ayrıca soğan kökleri aracılığı ile baş oluşmaya başladığı zamanda ihtiyacı olan organik madde ve besin maddelerinin alımını sağlamaktadır (Vural ve diğerleri 2000; Şekil 2.5).

Soğanda gerçek gövde köklerin çıkış yaptığı tabla ile yalancı gövde arasında bulunmakla birlikte dışarıdan bakıldığında görünmemektedir. Dışarıdan bakıldığında görünen 10-15 cm boyunda ve yaprak kınlarının iç içe geçmesiyle oluşan beyaz renkli ayırım kısmı aslında yalancı gövde olarak adlandırılmaktadır. Gerçek gövdenin orta kısmında yer alan büyüme ucu bitki vejetatif gelişme fazında iken yaprakları, generatif gelişme fazında çiçek sapını oluşturmaktadır (Eşiyok 2012; Güvenç 2016).

Soğanda yapraklar içi boş çapı dar şekilde ilk olarak dış yapraklar sonra iç kısımdaki yapraklar iç içe girmiş boru şeklinde gelişmektedir. Gelişim devam ettikçe yapraklar etli bir hal alır bu sayede yaprağın dik durmasını ve bitki için besin deposu görevi yapmaktadır. (Vural ve diğerleri 2000; Şekil 2.5). Yaprak rengi mum tabakası ince ve kalın olmasına göre değişmektedir. İnce mum tabakasının sahip olanlar koyu yeşil bu tabaka kalınlaştıkça gri yaprak rengi oluşmaktadır. Yaprığın antosiyanin içeriğine bağlı olarak yaprak yeşil renkten mor renge değişen renk alabilmektedir (Vural ve diğerleri 2000; Günay 2005).



Şekil 2.5. A) Soğan bitkisinin kök yapısı, **B)** Soğan bitkisinde yaprak görünümü

Erselik yapıya sahip olan soğan çiçeği 6 adet çanak yaprak, 6 adet taç yaprak, 6 adet erkek organ ve her karpelde 2 tohum taslağı bulunan 3 karpelli dişi organı bulunmaktadır. Fakat bu 6 karpelden 2-3 tanesi tohum gelişmektedir. Çiçek sürgünü uzun bir boru şeklinde üzerinde yaprak bulunmayan ve borunun uç kısmında yuvarlak- top şeklinde 2-4 parçalı kın ile sarılmış kapalı çiçek tablası bulunmaktadır. Soğanlarda çiçek oluşumu tohum ile üretim yapılıyorsa iki sene, arpacık soğan ile üretim yapılıyorsa üç senede çiçeklenme gerçekleşmektedir (Günay 2005).

Soğan yetiştiriciliğinde sıcaklık ve gün uzunluğu iki önemli iklim faktörüdür. Çeşitlere göre değişmekle beraber baş oluşturmak için 10 saat gün uzunluğu ihtiyacı olan soğanlar kısa gün, 12 saat gün uzunluğu ihtiyacı olan soğanlar orta gün ve 15 saat gün uzunluğu ihtiyacı olan soğanlar ise uzun gün soğanları olarak adlandırılmaktadır (Beşirli ve diğerleri 2021). En iyi adaptasyon 13-26°C arasında olmaktadır. Baş bağlama sürecinde ise daha yüksek sıcaklık ve düşük neme ihtiyaç duymaktadır. 10-15°C sıcaklıklarda soğanlar istenilen baş büyüklüğüne ulaşamamaktadır (Eşiyok 2012). 450-500mm yağış alan yetiştiricilik yapılan alanlarda sulama yapılmasına ihtiyaç duyulmadan yetiştiricilik yapılabilirken, daha az yağış alan alanlarda sulamaya ihtiyaç vardır (Beşirli ve diğerleri 2021).

Soğanlar besin maddesi bakımından yeterli, tınlı, kumlu ve hafif killi topraklarda yetiştiricilik yapılabilir. Ağır-sıkı yapıdaki topraklarda soğan başları normal olarak gelişimlerini sürdürememektedir (Günay 2005). Soğan yetiştiriciliğinde tohum

(karaca) ile baş soğan üretimi, arpacık (kıska) ile baş soğan üretimi ve fide ile baş soğan üretimi olmak üzere ticari amaçlı üretimlerde üç farklı yetiştirme tekniği bulunmaktadır (Beşirli ve diğerleri 2021).

2.3. Soğan Mildiyö, Hastalık Döngüsü ve Soğan Mildiyö Dayanıklılık Geni Hakkında Bilgiler

Soğanda mildiyö hastalığı Peronosporaceae familyasında yer alan *P. destructor* etmeninin sebep olduğu ve soğan yetiştiriciliğinde %70'e ulaşabilen verim kayıplarının yaşanmasına neden olan fungal bir hastalıktır. Uygun iklim koşullarında enfeksiyon sonucunda soğan tohum üretiminde olumsuzluklara yol açmaktadır (De Vries ve diğerleri 1992). Oomycete bir patojen olan *P. destructor* ılıman ve nemli hava koşullarında enfeksiyona sebep olmaktadır. Bunun sonucunda soğan başlarının gelişimi yavaşlamasıyla istenen büyüklüklere ulaşamamaktadır (Scholten ve diğerleri 2007).

Konukçuları soğan, sarımsak ve pırasadır. Konukçular arasında enfeksiyondan en çok etkilenen konukçu *A. cepa*'dır (Koike ve diğerleri 2007). Bu patojen kışları oospor ve miselyum olarak soğanların içinde geçirmektedir. Toprakta ve bitki artıklarında oospor olarak yaşayabilmektedir (Kurt 2020; Şekil 2.6).

Enfeksiyon belirtileri yapraklarda düzensiz ve küçük klorotik lekeler ile başlamaktadır. Enfeksiyon ilerledikçe klorotik lekeler büyüyerek 10-15 cm uzunluğa ulaşabilmektedir. Hastalıklı bölgeler daha sonra kahverengi renk alır. Lezyonlar birleşerek tüm yaprağı sarması durumunda bitkinin çökmesine sebep olmaktadır (Koike ve diğerleri 2007). Enfeksiyon çiçek saplarını ve başlarını etkileyerek soğan başlarının yumuşayıp çürümesine neden olmaktadır (Van Der Heyden 2021; Şekil 2.6).



Şekil 2.6. A) Soğan mildiyösünün soğan yapraklarındaki miselyum tabakası, **B)** Hastalık ile enfekte olmuş soğan bitkisinin görüntüsü (Fotoğraflar: Schwartz 2004)

Oomycete patojenlerin yaşam döngüsü eşeyli ve eşeysiz olmak üzere iki döngüden oluşmaktadır. Eşeysiz döngüde sporogonia içerisinde zoospor oluşumu gerçekleşirken, dinlenme evresi olan eşeyli döngüde ise oosporlar üretilmektedir (Van Der Heyden 2021). Hastalık oluşumunda 22°C az serin sıcaklıklar ve yaprakta en az 3 saat nem bulunması gerekmektedir. Patojen 40-72 x 18-29 µm boyutları arasında ince duvarlı sporangia üretir. Sporangialar 10-12°C optimum sıcaklıkta çimlenmektedir. 4-25°C sıcaklıkta ise sporangioforlar stomalardan çıkmaktadır. Sporlar gece üretilmektedir. Rüzgâr ile gün içinde etrafa yayılmaktadır. Sporlar yaprak yüzeyinde 3 güne kadar hayatta kalabilmektedir (Koike ve diğerleri 2007).

Yetiştiricilikte hastalıklar ile mücadele kapsamında kimyasal uygulamalara başvurulmaktadır. Fakat kimyasal uygulamalar çevre ve insan sağlığı açısından olumsuzluklara sebebiyet vermektedir. Bu durumda en etkili mücadele yöntemlerden biri dayanıklı çeşit kullanımı olmaktadır. Hastalıklara karşı dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesinde yabani akrabalar ilgili genlerin aktarılmasında donör olarak kullanılabilmektedir (Khrustaleva ve diğerleri 2019).

Soğan mildiyösüne karşı yabani akraba donörleri araştırılmış ve *Allium roylei* Stearn'de soğan mildiyösüne karşı dayanıklılık geninin varlığı tespit edilmiştir. *A. roylei* soğan mildiyösüne karşı tam bir dayanıklılık sağlamak ve tek bir baskın gen ile kontrol edilmektedir (Scholten ve diğerleri 2007). Baskın gen “Pd lokusu” olarak

adlandırılmaktadır. *A. roylei*'nin genetik haritasında 3. kromozomun sonunda bulunmaktadır (Cho ve diğerleri 2021).

2.4. Soğan Mildiyösü ile İlgili Yapılan Çalışmalar

Abd-Elrazik ve Lorbeer (1980) *P. destructor* inokulasyon canlılığı, enfeksiyon ve sporlanma düzeyini etkileyen faktörleri incelemek, yüksek miktarda sporlanma ve patojenin muhafazasını sağlamak için bir çalışma yürütmüşlerdir. *P. destructor*'ın sporangia'sı ile aşılama için kullanılan soğanları serada büyütmüşlerdir. *P. destructor*'ın sporangia'sı ticari tarlalardaki soğan bitkilerinin yapraklarından toplamışlardır. İnkübasyon süresi ve sıcaklığın *P. destructor* enfeksiyonu üzerindeki etkisini incelemek için yetiştirilen 21 günlük soğan bitkileri, dört kez yıkanmış bir sporangia süspansiyonu bulaştırma yapmışlardır. İnokulasyon yapılan bitkiler 24 saat boyunca karanlıkta 14°C'de nemli bir odada inkübasyona bırakılmıştır. 4 gün boyunca 14°C'de iklim odasında (21,500 lux=2,000 ft-c) ve daha sonra 8 gün boyunca 18°C'de flüoresan ışığı (16 saat) olan bir seraya yerleştirilmiştir. Enfekte olmuş bitkilerin 1600-1700 saatte başlayarak karanlıkta 14°C'de nemli bir odaya yerleştirilmesiyle gece boyunca sporlanma devam etmiştir. Patojenin muhafazasını sağlamak için her 3 haftada bir patojen izole edildikten sonra 1-2 günlük yıkanmamış sporangia sağlıklı bitkilere bulaştırılarak ve pamuklu silme tekniği, inokulasyon ve inkübasyon prosedürlerini kullanmışlardır. Sonuç olarak inokulasyon yapılan tüm bitkiler enfekte olmuş ve yüksek miktarda sporlanma elde etmişlerdir.

Kofoet ve diğerleri (1990) *A. cepa* ve *A. roylei* ile *A. cepa*'nın türler arası melezi *P. destructor* karşı doğal ve yapay inokulasyonlar sonucu *A. cepa* duyarlıyken *A. roylei* ve *A. cepa* melezi belirti göstermemiştir. $A. cepa \times (A. roylei \times A. cepa)$ geri çaprazlanmasında elde edilen bitkiler yapay inokulasyondan sonra dayanıklı ve duyarlı şekilde 1:1 oranında ayrılması *A. roylei*'deki bu direncin tek bir lokus (Pd1) ile kontrol edildiğini ve baskın olarak kalıtım göstermiştir. Arazideki bir salgında aynı geri çaprazlamada elde edilen bitkiler duyarlı ve dayanıklı şekilde 3:1 oranında segregasyon gözlemlemişlerdir. Bu durum Pd1'den bağımsız olarak açılım yapan ikinci bir dayanıklılık lokusunun varlığını göstermekte, *P. destructor* popülasyonları arasında virülans açısından olası farklılıklar olduğunu göstermektedir. Sonuç olarak *A. cepa*'ya

benzer morfolojiye sahip geri çapraz döllerinde *P. destructor*'a belirti göstermemesi soğan mildiyösüne karşı dayanıklı soğan çeşitleri ıslahı için yeni bakış açıları sunacağını belirtmişlerdir.

Scholten ve diğerleri (2007) *A. roylei*'den kaynaklanan soğan mildiyösü direnci soğanda tam bir direnç sağlar ve tek bir baskın gene dayanır. *A. roylei* soğan (*A. cepa*) ile başarılı bir şekilde melezlenebildiğinden, bu genin aktarılmasını amaçlayan bir ıslah programı yaklaşık 20 yıl önce başlatılmıştır. Bu programda bazı aksiliklerle karşılaşmış, ilk olarak soğan mildiyö direnci lokusuna bağlı tanımlanan moleküler markörün kullanımı giderek zorlaşmış ve sonunda ayırt edici gücünü kaybetmiş, ikinci olarak da homozigot introdüksiyon hatları (ILs) oluşturmak gibi son adımın umulandan daha zor olduğu ortaya çıkmıştır. GISH analizi, direnç lokusunu barındıran kromozomal bölgenin soğanın nükleer arka planında kalan tek *A. roylei* parçası olduğunu göstermiş ve ayrıca bu bölgenin kromozom 3'ün distal ucunda yer aldığını doğrulanmıştır. Kalan *A. roylei* bölgesinde bulunan bazı faktörlerin soğan genetik arka planında homozigot olarak bulunduğu öldürücü olduğu varsayılmıştır. Daha küçük ve daha uzakta bulunan bir introgression parçasına sahip bir bitkinin ve onun dölünde homozigot ILs tanımlanması bu hipotezi doğrulamıştır. Bu neredeyse izogenik hatların yardımıyla, direnç geniyle yakından bağlantılı dört AFLP markörü tanımlanmış ve bunlar markör destekli seleksiyonda için kullanılabileceği belirtilmiştir. *P. destructor*'un neden olduğu soğan mildiyösü direncinin soğana kazandırılması, çevre dostu soğan çeşitlerinin geliştirilmesinde önemli bir adımdır.

Buloviene ve Surviliene (2009) inokulum konsantrasyonu, inkübasyon süresi, bağıl nem (RH) ve sıcaklığın soğan yapraklarında *P. destructor*'un sporlanması üzerindeki etkisi bir serada kontrollü çevre koşulları altında analiz etmişlerdir. Soğan yapraklarının yüzeylerinden toplanan sporlar distile su ile 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 spor/ml konsantrasyonlarda süspansiyon hazırlanmış ve bitkilere inokule edilmiştir. İnokule edilen bitkilerde 10^6 spor/ml konsantrasyonunda 4 günde spor çimlenmesi ve sporlanma en kısa süre olduğunu belirlemişlerdir. Enfeksiyonun yoğunluğu ve enfekte olmuş bitkilerin sporlanması, inkübasyon süresi ve sıcaklığından büyük ölçüde etkilendiği görülmüştür. İnokule edilen bitkilerin 8 gün boyunca 15°C 'de ve ardından 5 gün boyunca 22°C 'de maruz bırakılması, enfeksiyon yüzdesi ve yüksek miktarda sporlanma ile

sonuçlanmıştır. Bu çalışma sonucunda *P. destructor* için sporlanmanın 4-8 günlük bir periyotta ve 15°C’de 8 gün ve 22 °C’de 5 gün inkübasyonda %43 enfeksiyon yüzdesi ile en fazla sporlanmanın olduğunu göstermişlerdir.

Kim ve diğerleri (2016) Soğan mildiyösüne karşı dayanıklılık geni daha önce türler arası melezleme kullanılarak yabancı tür *A. roylei*’den aktarılmış ve direnç geninin kromozom 3’ün sonunda bulunduğu bildirmişlerdir. Bu dayanıklılık geninin soğanda yerli ıslah hatlarına aktarımının sağlanabilmesi için markör destekli geri melezlemeyi (MAB) destekleyen bir moleküler işaretleyiciyi geliştirmişlerdir. İki bağlantı haritasında kromozom 3’ün sonundaki sekiz lokusun cDNA dizilerini transkriptom veri tabanından elde etmişlerdir. Sekiz lokusun ekzon dizileri kullanılarak primer çiftlerini tasarlamışlardır. Bunlar arasından i25255 lokusunun PCR ürünleri soğan ve *A. roylei* arasında uzunluk polimorfizmi göstermiş ve dizi analizinde intron dizileri 67bp’lik bir indelin var olduğunu göstermiş, bu indel polimorfizmine bağlı olarak basit PCR moleküler işaretleyicisi DMR1’i geliştirmişlerdir. Farklı çeşit soğanlar ile yapılan analizin sonucunda dayanıklı olan çeşit dışında diğer çeşitlerin hiçbirisi *A. roylei*’ye özgü markör genotipi içermediğini göstermişlerdir. Bu sonuçlar, DMR1 moleküler işaretleyicisinin soğan mildiyösünün dayanıklılık genini içeren *A. roylei* parçasını başarılı bir şekilde etiketlediğini göstermektedir.

Khrustaleva ve diğerleri (2019) Yapılan çalışmada, soğan mildiyösü hastalığına dayanıklı soğanın (*A. cepa*) türler arası ıslahında basit ve sağlam bir moleküler işaretleyici kullanılarak kromozom düzeyinde introgresyon sürecini izlemek için genomik in situ hibridizasyonun (GISH) avantajlarından yararlanmışlardır. Genomik in situ hibridizasyon (GISH) ve daha önce geliştirilen DMR1 moleküler işaretleyicisinin ıslah sürecini takip etmek ve hedefli seçim yapmak için kullanılmış olması soğan mildiyösüne dayanıklı homozigot introdüksiyon hatları oldukça kısa bir ıslah süresinde başarılı bir şekilde üretmişlerdir. Soğanın iki yıllık bir bitki olmasından dolayı F1 hibrit üretiminden soğan mildiyösüne dayanıklı S2BC2 homozigot hatlarının oluşturulmasına kadar yedi yıl geçmiştir. GISH kullanılarak, S2BC2’nin üç döl bitkisinin *A. cepa* genetik arka planında kromozom 3’ün uzun kolunun distal bölgesinde bir *A. roylei* homozigot DNA parçasına sahip olduğu gösterilmiştir. Daha önce, öldürücü bir genin (genlerin) soğan mildiyösüne dayanıklılık geniyle bağlantılı olduğu varsayılmıştı. Moleküler sitogenetik yaklaşımla,

kromozom 3 üzerindeki *A. roylei* parçalarının boyutunda farklılık gösteren homozigot introgresyon hatlarını kullanarak ölümcül gen(ler)i fiziksel olarak daha kesin bir şekilde haritalama yapmışlardır.

Arias ve diğerleri (2020) Bu araştırmada, ulusal çeşitler ile kısmi bir dayanım kaynağı olan ‘Regia’ çeşidi arasındaki çaprazlamalardan elde edilen altı dölde soğan mildiyösu dayanım ayrımı analiz edilmiştir. F₁S₂ hatları ‘Regia’ x ‘Pantanoso del Sauce’nin soğan mildiyösu hastalık şiddeti, soğan mildiyösünün histolojik kantitatif farklılıkları ve agronomik özellikleri açısından tepkileri iki kez (Ağustos ve Kasım 2017) değerlendirilmiştir. Daha erken bir seleksiyon sürecinden geçen F₁S₂ hatları, ebeveynler arasında orta düzeyde bir soğan mildiyösu şiddeti göstermiştir. Hastalık şiddeti, enfekte stoma oranındaki histolojik farklılıklarla pozitif korelasyon göstermiştir. ‘Regia’ en düşük soğan mildiyösu şiddetini ve en yüksek sağlıklı stoma yüzdesini sunmuştur. En dirençli F₁S₂ hatları soğan verimi, soğan kalite özellikleri ve hasat sonrası davranış açısından kontrol çeşitlerinden farklı olmadığı ve şu anda yetiştirilen çeşitlere kıyasla soğan mildiyösüne dayanıklı bir çeşit geliştirmek için temel oluşturabileceğini belirtmişlerdir.

Watanabe ve Syobu (2022) Bu çalışmada, *P. destructor*’un neden olduğu soğan mildiyösünün birincil kaynağı topraktaki oosporların olası rolü araştırılmıştır. Oosporlar ilkbaharda hastalıklı yaprakların döküntülerinden toplanmış ve yaz boyunca açık havada depolanmıştır. Elde edilen oospor süspansiyonları, laboratuvar da çimlenme deneyleri ve inokulasyon deneyleri için kullanılmıştır. Bardaklarda toprağa gömülen oosporların çimlenmesi yaklaşık %0,3-%1,3 oranında gerçekleşmiştir. Oospor süspansiyonları, soğan tohumları ekilirken veya fide aşamasında kaplardaki yapay kültür toprağına enjekte edilmiştir. Bu bitkiler 40 günden fazla bir süre boyunca bir iklim odasında yetiştirildikten sonra, bitkilerin yaklaşık %20-%30’u ticari tarlalarda gözlemlenen soğan tüylü mildiyösünün birincil enfeksiyon semptomlarını üretmiştir. Semptomatik bitkilerde *P. destructor*’un varlığı histolojik gözlemler ve türe özgü PCR ile doğrulanmıştır. Sonuç olarak, laboratuvar deneyleri ilk kez açık havada fazla miktarda bulunan *P. destructor* oosporlarının toprakta çimlendiğini ve çimlenebilir oosporları içeren toprak altı inokulumunun birincil enfeksiyona neden olduğunu, konukçusuz dönemlerde oospor

olarak hayatta kaldığını ve bir sonraki büyüme sezonunda soğan mildiyösü için birincil inokulum kaynağı olabileceğini göstermişlerdir.



3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Tezin yürütüldüğü laboratuvar alanı

Bu tez çalışması bazı soğan genotiplerinde soğan mildiyösüne karşı dayanıklılık geninin varlığını belirlemek amacıyla Bursa Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarı'nda yürütülmüştür (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Bahçe Bitkileri Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarı

3.2.2. Kullanılan bitki örnekleri

Tez çalışmasında 111 genotipten alınan soğan yaprak örnekleri kullanılmıştır. Kullanılan örnekler soğan mildiyö dayanım aktarımında kullanılan ıslah materyalleridir. Yaprak örneklerinin listesi Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan soğan genotipleri ve örnek sıra numaraları

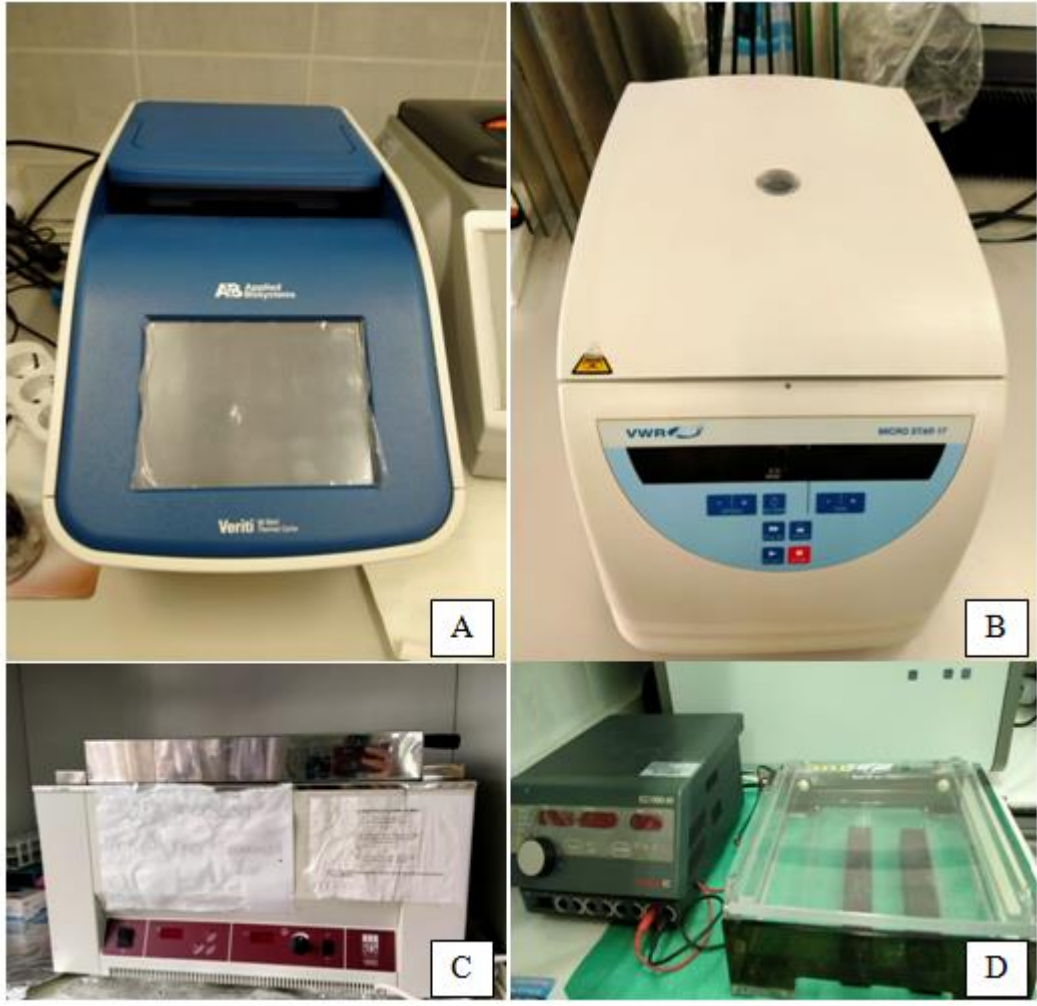
Örnek Sıra No.	Genotip Adı	Örnek Sıra No.	Genotip Adı
1	SKT-1	39	14-5-1S
2	SKT-2	40	14-5-2S
3	SKT-3	41	14-5-3S
4	SKT-4	42	14-5-4S
5	SKT-5	43	14-5-5S
6	SKT-6	44	14-5-6S
7	SKT-7	45	14-5-7S
8	SKT-8	46	14-5-8S
9	SKT-9	47	14-5-9S
10	SKT-10	48	14-5-10S
11	SKT-11	49	14-5-11S
12	USA- 1-1	50	14-5-12S
13	USA 1-2	51	14-5-13S
14	USA- 1-3	52	14-5- 1F
15	USA-1-4	53	14-5-2F
16	USA-2-1	54	14-5-3F
17	USA-2-2	55	14-5-4F
18	USA-2-3	56	14-5-5F
19	USA-4	57	14-5-6F
20	15-7-1	58	14-5-7F
21	15-6-1	59	14-5-8F
22	14-3-1	60	14-5-9F
23	14-3-2	61	14-5-10F
24	14-3-3	62	14-5-11F
25	14-3-4	63	14-5-12F
26	14-3-5	64	14-5-13F
27	14-3-6	65	14-5-14F
28	14-3-7	66	14-6-1S
29	14-3-8	67	14-6-2S
30	14-3-9	68	14-6-3S
31	14-3-10	69	14-6-4S
32	14-4-1	70	14-6-5S
33	14-4-2	71	14-6-6S
34	14-4-3	72	14-6-7S
35	14-4-4	73	14-6-8S
36	14-4-5	74	14-6-9S
37	14-4-6	75	14-6-10S
38	14-4-7	76	14-6-1F

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan soğan genotipleri ve örnek sıra numaraları(devam)

Örnek Sıra No.	Genotip Adı	Örnek Sıra No.	Genotip Adı
77	14-6-2F	95	16-5-12F
78	14-6-3F	96	16-5-13F
79	14-6-4F	97	15-9-1F
80	14-6-5F	98	15-9-2F
81	14-6-6F	99	15-9-3F
82	14-6-7F	100	15-9-4F
83	13-7-1	101	15-9-5F
84	13-9-2	102	15-9-6F
85	16-5-2F	103	15-9-7F
86	16-5-3F	104	15-9-8F
87	16-5-4F	105	15-9-9F
88	16-5-5F	106	15-9-10F
89	16-5-6F	107	15-9-11F
90	16-5-7F	108	19-8-1F
91	16-5-8F	109	19-8-2F
92	16-5-9F	110	19-3-1
93	16-5-10F	111	14-9-1
94	16-5-11F		

3.2.3. Tez çalışmasında kullanılan cihazlar

Santrifüj cihazı (VWR Micro Star 17) Su banyosu (GFL 1902), Vortex, PCR cihazı (Applied Biosystems Veriti 96 well Thermal Cycler), Elektroforez güç kaynağı (Thermo EC- EC 1000-90), Elektroforez sistemi (USA Scientific DNA Plus). Kullanılan cihazlar Şekil 3.2’de verilmiştir.



Şekil 3.2. A) Applied Biosystems PCR cihazı, B) VWR santrifüj cihazı, C) GFL Su banyosu, D) Elektroforez Sistemi

3.2. Yöntem

3.2.1. Bitki yaprak örneklerinin alınması

Bitki örnekleri alınırken kotiledon yapraklardan sonra gelişen gerçek ve genç yapraklardan örneklerin alınmasına dikkat edilmiştir. Bitkiler örnek poşetlerine konulmuş ve araziden laboratuvara getirilene kadar buz üzerinde muhafaza edilmiştir.

3.2.2. Yaprak örneklerinin liyafilizatörde kurutulması

Liyafilizatör cihazı yaprak örneklerindeki suyun uzaklaştırılması yöntemiyle dondurularak kurutulmasını sağladığı için yaprak örneklerinin moleküler ve fiziksel yapısına zarar vermeden saklanmasını sağlamaktadır. Yaprak örnekleri araziden

getirildikten sonra liyafilizatör cihazına konularak 3 gün süre ile kurutulmuştur. Kurutma işlemi tamamlandıktan sonra örnekler -20°C’de analizler yapılınca kadar saklanmıştır.



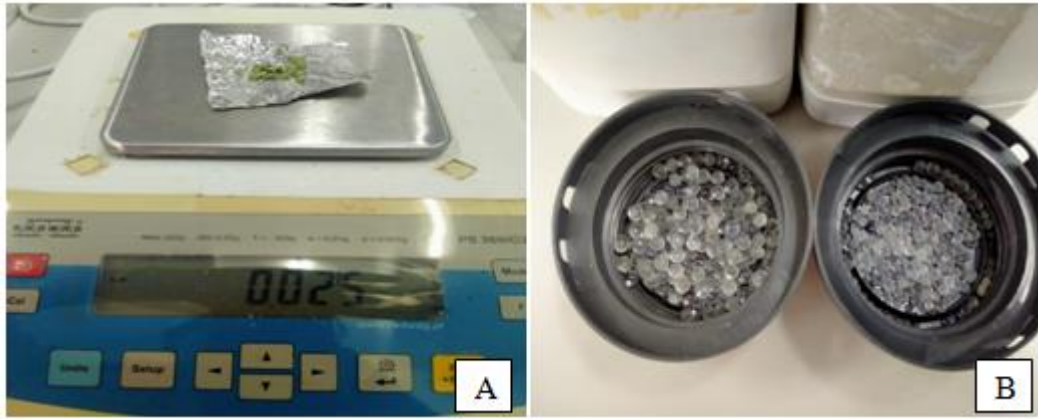
Şekil 3.3. Yaprak örneklerinin kurutulması **A)** Liyafilizatör cihazı (Christ Alpha 1-4 LD Plus) **B)** Örneklerin cihaza yerleştirilmesi **C-D)** Kurutulan yaprak örneklerinin görünümü.

3.2.3. Yapraklardan DNA örneği elde edilmesi

Tez çalışması için kurutulup -20°C 'de saklanan yaprak örnekleri moleküler işaretleyici analizlerinde kullanılabilmesi için ilk aşama olarak örneklerden DNA izole edilmiştir. İzolasyon sürecinde hücre duvarının parçalanması, hücresel proteinlerin uzaklaştırılması sağlanarak DNA'nın çözündürülmesi, DNA'nın çöktürülmesi ve son olarak DNA'nın saflaştırılması adımları izlenerek DNA izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen DNA örneklerinin konsantrasyonlarını ölçülerek analizlere hazır edilmiştir.

DNA örneklerinin elde edilmesinde CTAB yöntemi kullanılmış (Fütterer ve diğerleri 1995) ve aşağıdaki adımlar izlenmiştir:

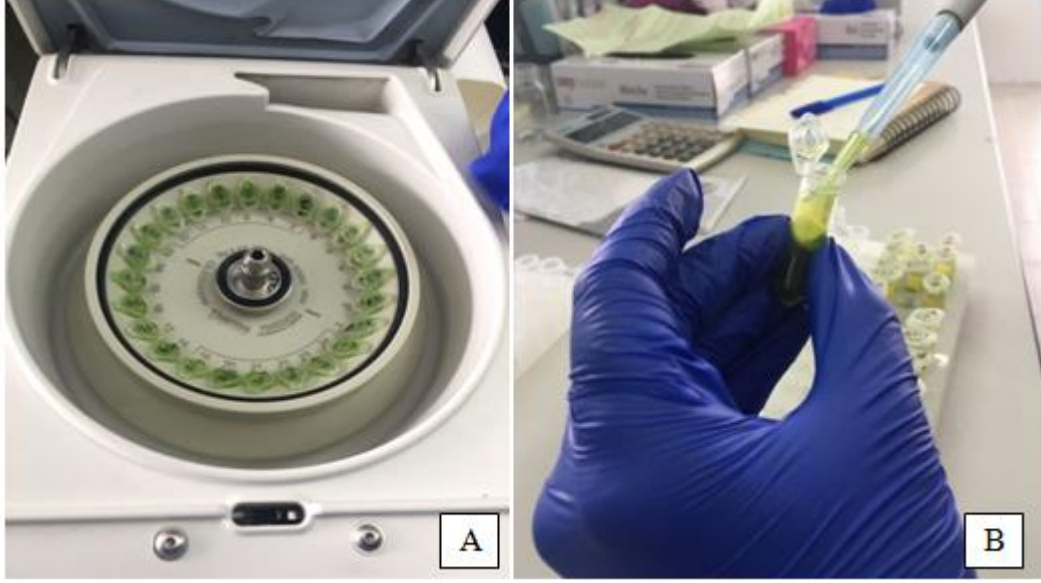
1. -20°C 'de saklanan yaprak örnekleri çıkarıldıktan sonra oda sıcaklığına gelmesi beklenmiştir. Her yaprak örneğinden 25 mg olacak şekilde hassas terazide tartılmıştır. Tartılan örnekler hazırlanan 2 mL ependorf tüplere aktarılmıştır (Şekil.3.4).
2. Örneklerin parçalanıp toz haline gelebilmesi için ependorf tüpler içerisine 5 adet 3mm çapındaki ve 1 adet 6mm çapındaki boncuklardan konmuştur. 12 dk boyunca öğütücüde parçalanmaya bırakılmıştır (Şekil.3.4).



Şekil 3.4. A) Örneklerin hassas terazide tartılması B) Örneklerin parçalanabilmesi için kullanılan 6 mm ve 3 mm çapındaki boncuklar

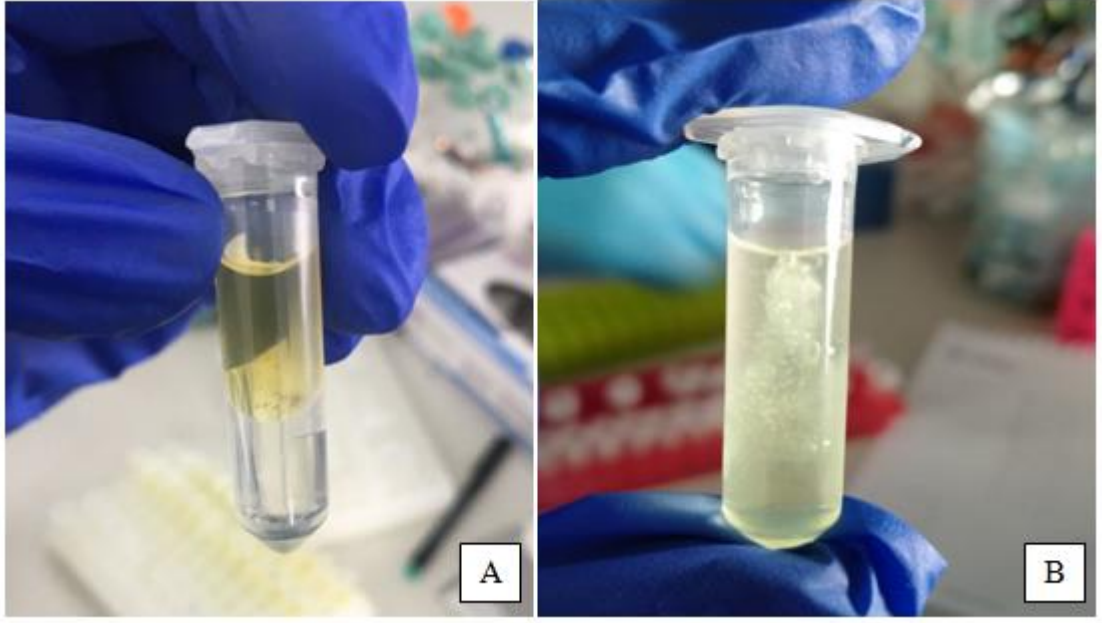
3. Toz haline gelen örneklerin üzerine 1000 μL extraction buffer eklenmiştir. Vorteks yardımıyla tüp içerisindeki örnekler homojen olana kadar karıştırılmıştır
4. 65°C 'ye ayarlanan su banyosunda örnekler 30 dk inkübasyona bırakılmıştır. Bu esnada tüpler 10 dakikada bir hafif şekilde çalkalanmıştır.

5. Sıcak su banyosundan çıkarılan örnekler oda sıcaklığına gelene kadar bekletildikten sonra üzerlerine 800 μ l CO eklenmiştir ve rack ile ters düz edilmiştir.
6. 16 000 g'de 5 dk süre ile santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası oluşan 3 fazdan en üstteki faz dikkatli şekilde çekilerek yeni 2 mL tüplere aktarılmıştır. Üzerlerine 100 μ l CTAB tamponu ve 800 μ l CO eklenip, karıştırılmıştır (Şekil.3.5).



Şekil 3.5. A) Örneklerin santrifüj işlemi için cihaza yerleştirilmesi **B)** Santrifüjden sonra oluşan 3 fazın görünümü ve temiz faz kısmının pipet yardımıyla çekilmesi

7. 16 000 g'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası oluşan 2 fazdan en üstteki faz yeni hazırlanan 2 mL'lik tüplere aktarılmıştır (Şekil 3.5).
8. Yeni tüpe aktarılan sıvının üzerine DNA'nın çözünmesini sağlamak amacıyla -20°C 'de saklanan izopropanolden 800 μ l eklenip hafif şekilde çalkalanmış ve 1 saat -80°C 'de bekletilmiştir (Şekil 3.6).
9. 1 saat süre dolduktan sonra örnekler çıkarılıp oda sıcaklığına gelmesi beklenmiştir. DNA'nın çökmesi amacıyla 16 000 g' de 5 dk santrifüj edilmiştir. DNA çökmesi ile tüplerin dip kısmında beyaz renkli pellet yapısı oluşmuştur.



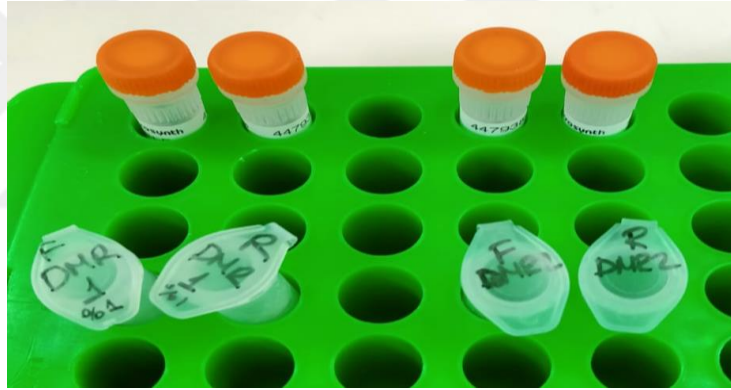
Şekil 3.6. A) Oluşan 2 fazın görünümü **B)** İzopropanol eklendikten sonra DNA'nın çözünmesi

10. Ependorf tüplerin içerisindeki sıvı tüplerin dip kısmında DNA'nın çökmesi ile oluşan pellet yapısı düşürülmeden dökülmüştür. Üzerlerine 400 µl NACI çözeltisinden eklenmiştir.
11. 65°C ayarlı su banyosunda 20 dk süre ile NACI çözeltisinin içerisinde DNA'ların çözünmesi için inkübasyona bırakılmıştır.
12. İnkübasyondan çıkarılan örnekler 16 000 g' de 5 dk santrifüj edilmiştir. Sonrasında sıvı kısım 1.5 mL ependorf tüplere aktarılmıştır.
13. Üzerlerine 1000 µl %100 Etil alkol eklenerek bir gece -20°C'de bekletilmiştir.
14. Diğer gün -20°C den çıkarılan örneklerin oda sıcaklığına gelmesi beklenmiştir. 16 000 g'de 10 dk santrifüj edilmiştir.
15. Santrifüjden çıkan tüplerin dip kısmındaki pellete dikkat ederek üzerindeki sıvı dökülmüştür. Üzerlerine tekrar 500 µl %70 etil alkol eklenmiştir. 16 000 g'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Etil alkol ile yıkama işlemi yapılmış ve saf DNA elde edilmiştir.
16. Örneklerin üzerindeki sıvı tekrar dökülmüş ve etil alkolün kuruması için kâğıt havlu üzerinde 1 saat kurumaya bırakılmıştır.
17. Tüpler kuruduktan sonra 50 µl TE buffer DNA örneklerinin üzerine eklenmiştir. DNA'lar bu sıvı içerisinde -20°C'de saklanmıştır.

3.2.4. SSR moleküler işaretleyicileri yardımıyla PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) döngüsü

Polimeraz zincir reaksiyonu moleküler işaretleyicilerin istenilen gen bölgesine bağlanması ile o bölgenin çoğaltılmasını sağlamaktadır. Bu tez çalışmasında DMR1 ve DMR2 SSR markörleri kullanılarak soğan mildiyösüne karşı dayanıklılık geni taşıyan genotipler belirlenmiştir. SSR primerler kullanılmadan önce datasheet'te yer alan F ve R primerleri için belirtilen miktarlara uygun olarak steril distile su (sdH₂O) ile sulandırılmış ve ara stok oluşturulmuştur. Kullanılan moleküler işaretleyicilerine ait sekans bilgileri Çizelge 3.2' de verilmiştir.

Ara stok oluşturmak için: DMR1 ve DMR2 moleküler işaretleyicilerinin F ve R primerleri için ayrı ayrı ependorf tüplere 10 µl primer ve 990 µl distile saf su eklenerek %1'lik ara stoklar oluşturulmuştur. Analizler yapılincaya kadar -20°C'de saklanmıştır (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. Moleküler işaretleyicilerin sulandırılması ve ara stok oluşturulması

Çizelge 3.2. DMR1 ve DMR2 moleküler işaretleyicilerine ait sekans bilgileri (Kim ve diğerleri 2016).

Markör	Primer Türü	Primer Adı	Primer Sekans Bilgileri (5'-3')	Restriksiyon Enzim
DMR1	SCAR	DMR1-F	TGAGGCTCAAGTTGACATGC	Basit PCR işaretleyici
		DMR1-R	TTCGTAGCAGCATCAAGGTG	
DMR2	CAPS	DMR2-F	GGAAGGTTCCGATGCAGTAA	Msp I
		DMR2-R	GCATTTCCGGCTGCAGCTATTT	

PCR döngüsü için 111 soğan genotipinden elde edilen DNA örnekleri kullanılmıştır. PCR reaksiyonunda Çizelge 3.3'te verilen bileşenler kullanılarak karışım hazırlanmış ve Çizelge 3.4'te verilen sıcaklık ve döngüler ayrı ayrı DMR1 ve DMR2 moleküler işaretleyicileri için ayarlanarak PCR cihazında 3 saat reaksiyona bırakılmıştır.

Çizelge 3.3. PCR reaksiyonu bileşenleri

PCR Bileşenleri	Miktar (µl)
dH ₂ O	14,75
Taq buffer (10X)	2,5
dNTP (5mM)	2,5
MgCl ₂ (25mM)	1,6
Primer F +R (5µM)	1,5
DNA	2
Taq DNA polimeraz	0,15
TOPLAM	25

Çizelge 3.4. DMR1 ve DMR2 primerleri için PCR reaksiyon koşulları (Kim ve diğerleri 2016).

Basamak	Sıcaklık (°C)	Süre(dk)	Döngü
1	95	4:00	1
2	95	0:30	10
	65	0:30	
	72	1:00	
3	94	0:30	35
	57	0:30	
	72	1:00	
4	72	10:00	1
5	4	∞	

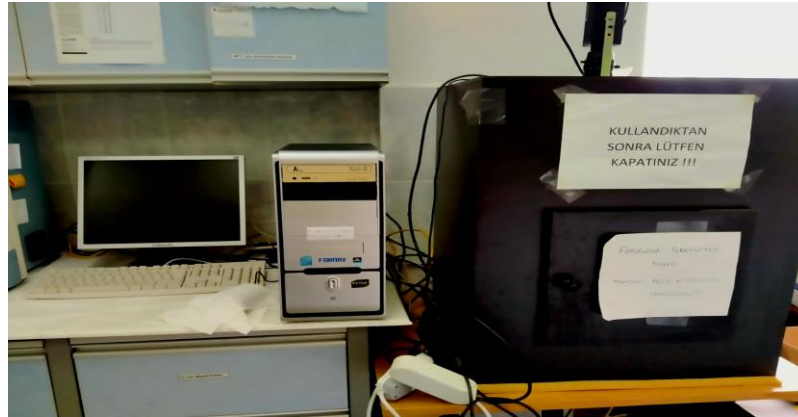
Çalışmada kullanılan DMR2 moleküler işaretleyicisi CAPS primeri olduğu için PCR döngüsü tamamlanan DNA örnekleri Msp I restriksiyon enzimi ile kesilmiştir. Çizelge 3.5'te verilen bileşenler kullanılarak karışım hazırlanmıştır. Restriksiyon enzimi eklenen örnekler 37°C'de 15 dakika inkübasyona bırakılmıştır.

Çizelge 3.5. Msp I restriksiyon enzimi ile DNA kesme protokolü

Bileşenler	Miktar (µl)
dH ₂ O	18
Taq buffer (10X)	2
Restriksiyon enzim	1
DNA	10
TOPLAM	31

3.2.5. PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezinde görüntülenmesi

PCR ürünlerini görüntüleyebilmek için %1,5 agaroz jel hazırlanmıştır. %1,5'luk agaroz jel hazırlamak için 200 ml tank için; 3 gr agaroz tartılmış ve 200 ml 1x TBE (Tris/Borat/EDTA) buffer ölçülerek erlen içerisinde 3 dakika mikrodalgada kaynatılarak agarozun TBE buffer içerisinde çözündürülmesi sağlanmıştır. Hazırlanan jel 200 ml'lik tank içerisine dökülüp, DNA örneklerinin yüklenebilmesi için elektroforez tarakları tanka yerleştirilmiştir. Jelin kuruması için 1 saat beklenmiştir. PCR'dan çıkan örnekler jeldeki kuyucuklara sırasıyla yüklenerek elektroforezde 120 volt ayarlanarak 2 saat boyunca yürütülmüştür. 2 saat süre dolduktan sonra jel UV ışık altında görüntülenmiştir (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. Agaroz jel görüntüleme kabini ve görüntülerin aktarıldığı bilgisayar sistemi

4. BULGULAR

4.1. DNA Konsantrasyon Miktarları

Soğan genotiplerine ait 111 adet bitkinin DNA örneklerinin konsantrasyonları 9,793 ng/ μ l-96,813 ng/ μ l arasında değiştiği belirlenmiştir. DNA örneklerinin konsantrasyon miktarları Çizelge 4.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.1. DNA örneklerinin konsantrasyon miktarları

Örnek Sıra no.	Genotip Adı	DNA Konsantrasyonu (ng/ μ l)	Örnek Sıra no.	Genotip Adı	DNA Konsantrasyonu (ng/ μ l)
1	SKT-1	53,766	31	14-3-10	60,524
2	SKT-2	57,538	32	14-4-1	27,292
3	SKT-3	43,192	33	14-4-2	50,976
4	SKT-4	61,796	34	14-4-3	37,302
5	SKT-5	15,065	35	14-4-4	44,182
6	SKT-6	14,646	36	14-4-5	53,253
7	SKT-7	54,874	37	14-4-6	22,039
8	SKT-8	33,411	38	14-4-7	25,212
9	SKT-9	52,448	39	14-5-1S	30,682
10	SKT-10	10,346	40	14-5-2S	31,013
11	SKT-11	13,797	41	14-5-3S	72,077
12	USA 1-1	18,672	42	14-5-4S	52,562
13	USA 1-2	65,789	43	14-5-5S	42,08
14	USA 1-3	47,081	44	14-5-6S	51,828
15	USA 1-4	37,881	45	14-5-7S	18,578
16	USA 2-1	15,751	46	14-5-8S	27,562
17	USA 2-2	16,353	47	14-5-9S	22,847
18	USA 2-3	24,727	48	14-5-10S	30,476
19	USA-4	25,102	49	14-5-11S	42,051
20	15-7-1	44,809	50	14-5-12S	96,813
21	15-6-1	52,828	51	14-5-13S	50,635
22	14-3-1	34,417	52	14-5- 1F	63,104
23	14-3-2	13,289	53	14-5-2F	29,111
24	14-3-3	20,091	54	14-5-3F	52,098
25	14-3-4	15,841	55	14-5-4F	32,197
26	14-3-5	18,497	56	14-5-5F	43,235
27	14-3-6	46,939	57	14-5-6F	37,316
28	14-3-7	49,310	58	14-5-7F	48,732
29	14-3-8	11,261	59	14-5-8F	47,779
30	14-3-9	40,316	60	14-5-9F	51,832

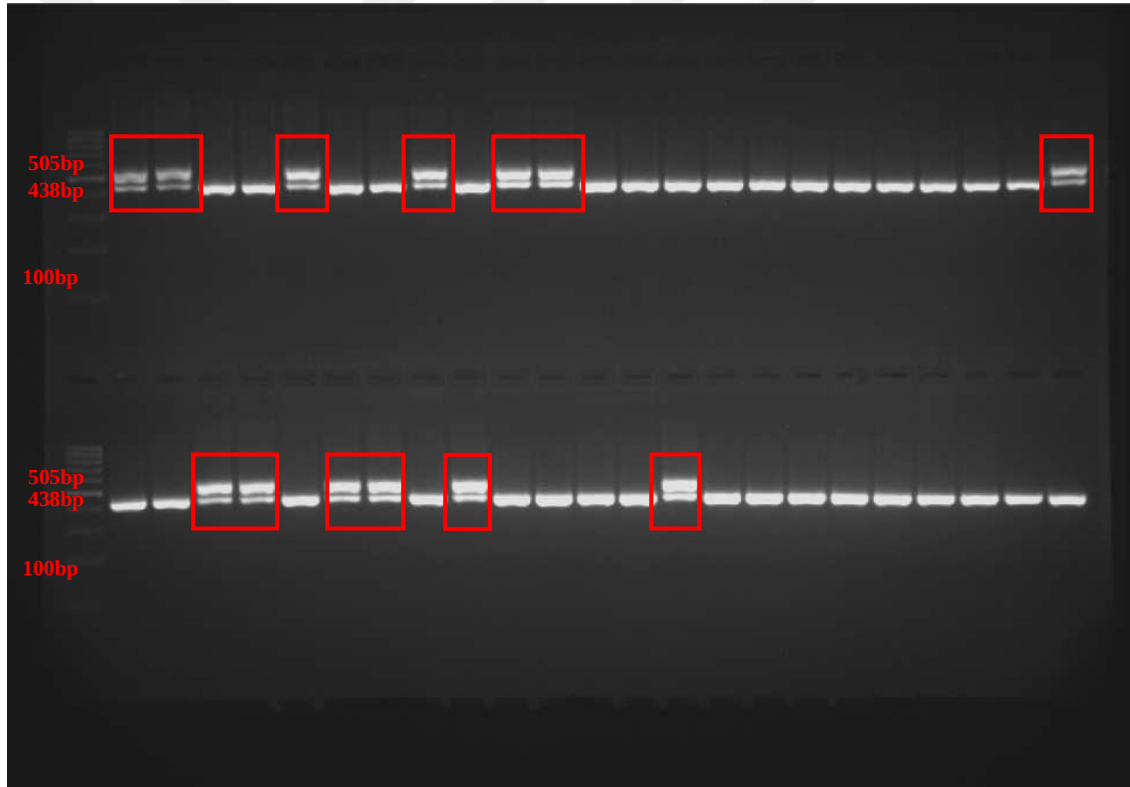
Çizelge 4.1. DNA örneklerinin konsantrasyon miktarları (devam)

Örnek Sıra No.	Genotip Adı	DNA Konsantrasyonu (ng/µl)	Örnek Sıra No.	Genotip Adı	DNA Konsantrasyonu (ng/µl)
61	14-5-10F	38,947	87	16-5-4F	83,763
62	14-5-11F	68,99	88	16-5-5F	65,2
63	14-5-12F	67,858	89	16-5-6F	41,112
64	14-5-13F	51,634	90	16-5-7F	70,471
65	14-5-14F	38,007	91	16-5-8F	74,345
66	14-6-1S	43,229	92	16-5-9F	92,454
67	14-6-2S	32,863	93	16-5-10F	69,227
68	14-6-3S	43,889	94	16-5-11F	90,874
69	14-6-4S	58,333	95	16-5-12F	39,042
70	14-6-5S	58,427	96	16-5-13F	93,606
71	14-6-6S	57,869	97	15-9-1F	18,614
72	14-6-7S	68,024	98	15-9-2F	70,127
73	14-6-8S	77,093	99	15-9-3F	19,232
74	14-6-9S	51,764	100	15-9-4F	43,558
75	14-6-10S	56,541	101	15-9-5F	26,604
76	14-6-1F	39,476	102	15-9-6F	57,386
77	14-6-2F	59,265	103	15-9-7F	37,579
78	14-6-3F	38,9	104	15-9-8F	45,379
79	14-6-4F	58,329	105	15-9-9F	23,095
80	14-6-5F	66,926	106	15-9-10F	34,116
81	14-6-6F	77,47	107	15-9-11F	19,437
82	14-6-7F	56,748	108	19-8-1F	27,074
83	13-7-1	47,582	109	19-8-2F	9,793
84	13-9-2	86,49	110	19-3-1	41,012
85	16-5-2F	48,194	111	14-9-1	45,066
86	16-5-3F	21,042			

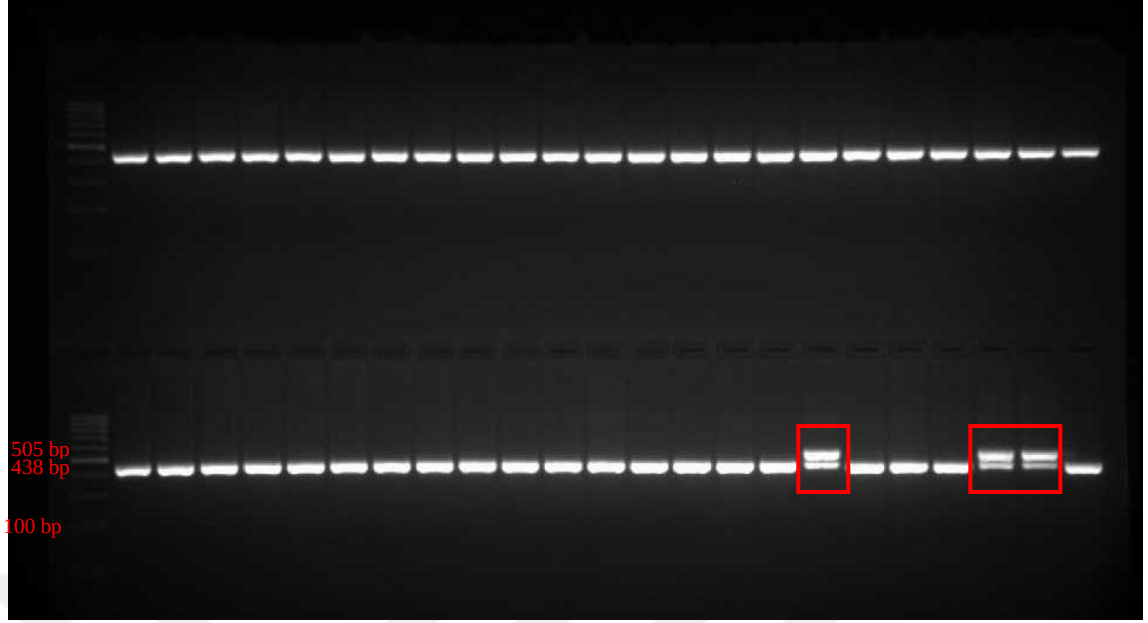
4.2. DMR1 Moleküler İşaretleyicisi Agaroz Jel Görüntüsü Analizleri

DMR1 moleküler işaretleyicisi Kik ve diğerlerinin (2016) yapmış olduğu çalışmaya göre soğan mildiyösüne karşı dayanıklılık gösteren genin DMR1 moleküler işaretleyicisi için 505 bp uzunluğunda bir DNA bandında heterozigot açılım gösterdiği ve hassas genin ise 438 bp uzunluğunda bir DNA bandında bulunduğunu göstermiştir. DNA bantlarındaki açılmayı görüntüleyebilmek için Thermo Scientific GeneRuler 100 bp DNA Ladder kullanılmıştır. Bu kapsamda DMR1 moleküler işaretleyici agaroz jel analizlerine göre

SKT-1, SKT-2, SKT-5, SKT-8, SKT10, SKT-11, 14-3-2, 14-3-5, 14-3-6, 14-3-8, 14-3-9, 14-4-1, 14-4-6, 16-5-3F, 16-5-7F, 16-5-8F, 16-5-10F, 16-5-11F, 15-9-1F, 15-9-3F, 15-9-4F, 15-9-5F, 15-9-7F, 15-9-9F, 19-8-1F genotiplerinin 505bp uzunluğunda bir bantta açılım gösterdiği için soğan mildiyösüne karşı dayanıklılık geni taşıdıkları tespit edilmiştir. Yukarıda sıralanan örnekler dışındaki örneklerin 438 bp uzunluğunda bir band gösterdiği için soğan mildiyösüne karşı dayanıklılık geni taşımayıp hassas oldukları belirlenmiştir. DMR1 moleküler işaretleyici analiz sonuçlarına göre çalışılan 111 genotipten 25 tanesinin soğan mildiyösüne karşı dayanıklılık geni taşıdığı, 86 tanesinin soğan mildiyösü için hassas gen taşıdığı belirlenmiştir (Çizelge 4.2). Dayanıklılık geni taşıyan genotipler agaroz jel görüntüleri Şekil 4.1., Şekil 4.2., Şekil 4.3'te üzeri kırmızı ile işaretlenerek gösterilmiştir.



Şekil 4.1. DMR1 moleküler işaretleyicisi ile çalışılan 1-46. DNA örneklerinin agaroz jel görüntüsü



Şekil 4.2. DMR1 moleküler işaretleyicisi ile çalışılan 47-92. DNA örneklerinin agaroz jel görüntüsü



Şekil 4.3. DMR1 moleküler işaretleyicisi ile çalışılan 93-111. DNA örneklerinin agaroz jel görüntüsü

Çizelge 4.2. DMR1 moleküler işaretleyici analizine göre 111 soğan genotipinin soğan mildiyösüne karşı dayanıklı-hassas gen taşıma durumları

Örnek Sıra No	Genotip Adı	DMR1 Sonuç	Örnek Sıra No	Genotip Adı	DMR1 Sonuç
1	SKT-1	DAYANIKLI	39	14-5-1S	HASSAS
2	SKT-2	DAYANIKLI	40	14-5-2S	HASSAS
3	SKT-3	HASSAS	41	14-5-3S	HASSAS
4	SKT-4	HASSAS	42	14-5-4S	HASSAS
5	SKT-5	DAYANIKLI	43	14-5-5S	HASSAS
6	SKT-6	HASSAS	44	14-5-6S	HASSAS
7	SKT-7	HASSAS	45	14-5-7S	HASSAS
8	SKT-8	DAYANIKLI	46	14-5-8S	HASSAS
9	SKT-9	HASSAS	47	14-5-9S	HASSAS
10	SKT-10	DAYANIKLI	48	14-5-10S	HASSAS
11	SKT-11	DAYANIKLI	49	14-5-11S	HASSAS
12	USA- 1-1	HASSAS	50	14-5-12S	HASSAS
13	USA 1-2	HASSAS	51	14-5-13S	HASSAS
14	USA- 1-3	HASSAS	52	14-5- 1F	HASSAS
15	USA-1-4	HASSAS	53	14-5-2F	HASSAS
16	USA-2-1	HASSAS	54	14-5-3F	HASSAS
17	USA-2-2	HASSAS	55	14-5-4F	HASSAS
18	USA-2-3	HASSAS	56	14-5-5F	HASSAS
19	USA-4	HASSAS	57	14-5-6F	HASSAS
20	15-7-1	HASSAS	58	14-5-7F	HASSAS
21	15-6-1	HASSAS	59	14-5-8F	HASSAS
22	14-3-1	HASSAS	60	14-5-9F	HASSAS
23	14-3-2	DAYANIKLI	61	14-5-10F	HASSAS
24	14-3-3	HASSAS	62	14-5-11F	HASSAS
25	14-3-4	HASSAS	63	14-5-12F	HASSAS
26	14-3-5	DAYANIKLI	64	14-5-13F	HASSAS
27	14-3-6	DAYANIKLI	65	14-5-14F	HASSAS
28	14-3-7	HASSAS	66	14-6-1S	HASSAS
29	14-3-8	DAYANIKLI	67	14-6-2S	HASSAS
30	14-3-9	DAYANIKLI	68	14-6-3S	HASSAS
31	14-3-10	HASSAS	69	14-6-4S	HASSAS
32	14-4-1	DAYANIKLI	70	14-6-5S	HASSAS
33	14-4-2	HASSAS	71	14-6-6S	HASSAS
34	14-4-3	HASSAS	72	14-6-7S	HASSAS
35	14-4-4	HASSAS	73	14-6-8S	HASSAS
36	14-4-5	HASSAS	74	14-6-9S	HASSAS
37	14-4-6	DAYANIKLI	75	14-6-10S	HASSAS
38	14-4-7	HASSAS	76	14-6-1F	HASSAS

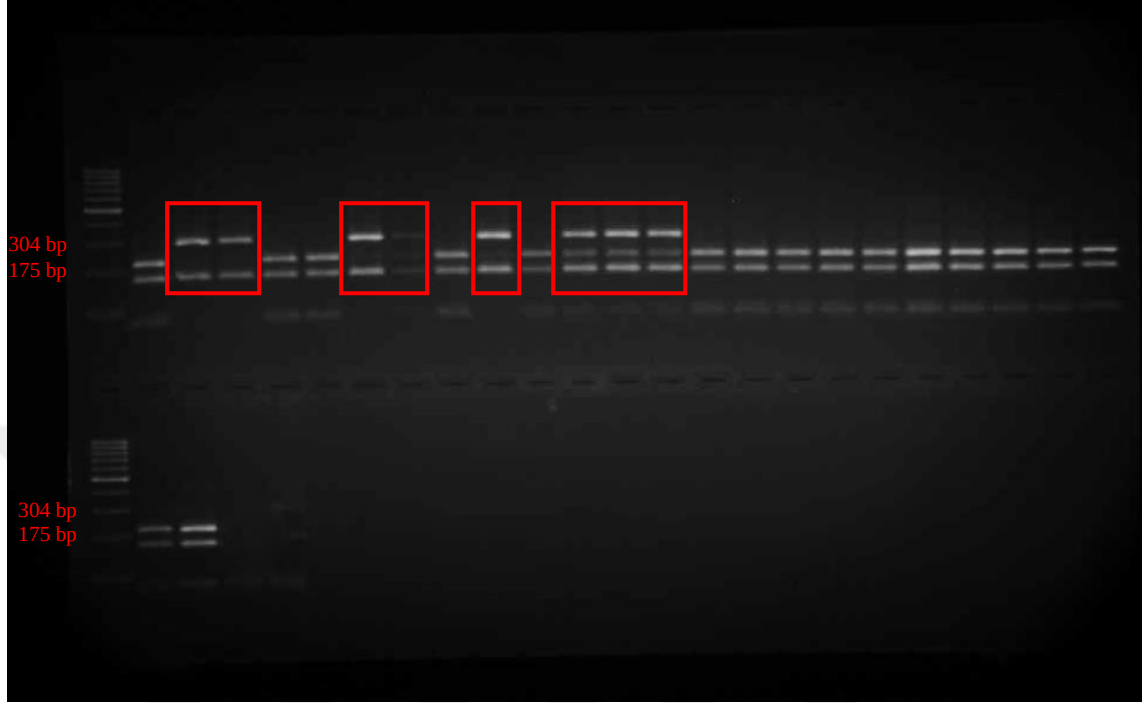
Çizelge 4.2. DMR1 moleküler işaretleyici analizine göre 111 soğan genotipinin soğan mildiyösüne karşı dayanıklı-hassas gen taşıma durumları (devam)

Örnek Sıra No	Genotip Adı	DMR1 Sonuç	Örnek Sıra No	Genotip Adı	DMR1 Sonuç
77	14-6-2F	HASSAS	95	16-5-12F	HASSAS
78	14-6-3F	HASSAS	96	16-5-13F	HASSAS
79	14-6-4F	HASSAS	97	15-9-1F	DAYANIKLI
80	14-6-5F	HASSAS	98	15-9-2F	HASSAS
81	14-6-6F	HASSAS	99	15-9-3F	DAYANIKLI
82	14-6-7F	HASSAS	100	15-9-4F	DAYANIKLI
83	13-7-1	HASSAS	101	15-9-5F	DAYANIKLI
84	13-9-2	HASSAS	102	15-9-6F	HASSAS
85	16-5-2F	HASSAS	103	15-9-7F	DAYANIKLI
86	16-5-3F	DAYANIKLI	104	15-9-8F	HASSAS
87	16-5-4F	HASSAS	105	15-9-9F	DAYANIKLI
88	16-5-5F	HASSAS	106	15-9-10F	HASSAS
89	16-5-6F	HASSAS	107	15-9-11F	HASSAS
90	16-5-7F	DAYANIKLI	108	19-8-1F	DAYANIKLI
91	16-5-8F	DAYANIKLI	109	19-8-2F	HASSAS
92	16-5-9F	HASSAS	110	19-3-1	HASSAS
93	16-5-10F	DAYANIKLI	111	14-9-1	HASSAS
94	16-5-11F	DAYANIKLI			

4.3. DMR2 Moleküler İşaretleyicisi Agaroz Jel Görüntüsü Analizleri

DMR2 moleküler işaretleyicisi analizlerinde DMR1 moleküler işaretleyicisi analiz sonuçlarına göre dayanıklılık gen taşıdığı belirlenen 25 genotip kullanılarak analizler yapılmıştır. Kullanılan diğer moleküler işaretleyici DMR2 moleküler işaretleyicisi Kik ve diğerlerinin (2016) yapmış olduğu çalışmaya göre soğan mildiyösüne karşı dayanıklılık gösteren genin 304 bp uzunluğunda bir DNA bandında açılım gösterdiği ve hassas genin ise 175 bp uzunluğunda bir DNA bandında bulunduğunu göstermiştir. DNA bantlarındaki açılmayı görüntüleyebilmek için Thermo Scientific GeneRuler 100 bp DNA Ladder kullanılmıştır. DMR2 moleküler işaretleyicisi analiz sonuçlarına göre 25 genotipten 8 tanesinin dayanıklılık geni taşıdığı belirlenmiştir (Çizelge 4.3). SKT-2, SKT-5, SKT-11, 14-3-2, 14-3-6, 14-3-9, 14-4-1, 14-4-6 genotipleri 304 bp uzunluğunda bir bantta açılım göstermesinden dolayı dayanıklılık geni taşıdığı belirlenmiştir. Bu örnekler dışındaki 17 genotip 175 bp uzunluğunda bir bantta açılım gösterdiği için soğan

mildiyösüne karşı hassas gen taşıdığı belirlenmiştir. Şekil 4.4'te dayanıklı geni taşıdıkları belirlenen genotipler agaroz jel görüntüsü üzerinde kırmızı ile işaretlenerek gösterilmiştir.



Şekil 4.4. 25 soğan genotip için DMR2 moleküler işaretleyicisi agaroz jel görüntüsü

Çizelge 4.3. DMR1 moleküler işaretleyicisine göre dayanıklı gen taşıdığı tespit edilen 25 soğan genotipinin DMR2 moleküler işaretleyici analizine göre soğan mildiyösüne karşı dayanıklı-hassas gen taşıma durumları

Örnek Sıra No	Genotip Adı	DMR2 Sonuç	Örnek Sıra No	Genotip Adı	DMR2 Sonuç
1	SKT-1	HASSAS	14	16-5-3F	HASSAS
2	SKT-2	DAYANIKLI	15	16-5-7F	HASSAS
3	SKT-5	DAYANIKLI	16	16-5-8F	HASSAS
4	SKT-8	HASSAS	17	16-5-10F	HASSAS
5	SKT-10	HASSAS	18	16-5-11F	HASSAS
6	SKT-11	DAYANIKLI	19	15-9-1F	HASSAS
7	14-3-2	DAYANIKLI	20	15-9-3F	HASSAS
8	14-3-5	HASSAS	21	15-9-4F	HASSAS
9	14-3-6	DAYANIKLI	22	15-9-5F	HASSAS
10	14-3-8	HASSAS	23	15-9-7F	HASSAS
11	14-3-9	DAYANIKLI	24	15-9-9F	HASSAS
12	14-4-1	DAYANIKLI	25	19-8-1F	HASSAS
13	14-4-6	DAYANIKLI			

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Soğan bitkisi eski çağlardan beri insanlar tarafından yetiştiriciliği yapılarak taze yaprakları ve kuru soğan olarak farklı tüketim şekillerine sahip olmasından dolayı insanlar için önemli bir besin kaynağı olmuştur. İçerdiği vitamin ve mineraller açısından zengin olması insan sağlığı ve ilaçlardaki hammaddenin sağlanmasında önemlidir. Bitkisel hastalıklar yetiştiricilikte bitki üzerinde hasarlar meydana getirebilmekte ve bitkisel üretimde verim kayıplarına, tohum üretimi için yapılan yetiştiricilikte tohum kayıplarına neden olarak ekonomik yönden yetiştiriciliği etkilemektedir. Soğanda fungal bir hastalık olan *P. destructor* etmeninin sebep olduğu soğan mildiyösü soğanda yetiştiricilik yapılan bölgelerde tahribatlara yol açmakta verim kayıplarına neden olmaktadır. Hastalık ile mücadelede uygulanabilecek en etkili yöntemlerden birisi soğan mildiyösüne karşı dayanıklı çeşitlerin kullanımınıdır.

Bu tez çalışmasında, soğan ıslah hatlarından seçilen 111 genotip soğan mildiyösüne karşı dayanıklılık geninin varlığı iki adet (DMR1 ve DMR2) moleküler işaretleyici analizleri ile test edilmiştir. DMR1 moleküler işaretleyici sonuçlarına göre 111 genotipten 25 tanesi dayanıklılık genini taşıdığı belirlenmiş ve soğan genotiplerinden %22,5'u dayanıklı %77,5'i hassas bulunmuştur. Dayanıklılık geni taşıdığı belirlenen genotipler soğan mildiyösünün soğan bitkilerine aktarımında donör bitki olarak kullanılabilir. DMR1 moleküler işaretleyici sonuçlarına göre dayanıklılık geni taşıdığı belirlenen 25 genotip DMR2 markeri ile testlendiğinde 8 tanesinin dayanıklılık geni taşıdığını göstermiştir. Bu sonuca göre ise %7,2'si dayanıklı %92,8'i hassas bulunmuştur. Fakat DMR2 moleküler işaretleyici analizinde beklenen sonuç 25 genotipin hepsinin DMR1 moleküler işaretleyicisinde olduğu gibi dayanıklı çıkmasıydı. Çünkü soğanda mildiyö için dayanıklılık geni baskın tek bir gen tarafından kontrol edilmektedir. Bu sonucun PCR sıcaklık ve döngülerinde veya restriksiyon enzimi ile kesme aşamalarında DNA'nın ilgili gen bölgesine bağlanma durumundan kaynaklandığı düşünülmektedir.

Kim ve diğerleri (2016) Soğan mildiyösüne karşı dayanıklılık geni daha önce türler arası melezleme kullanılarak yabani tür *A. roylei*'den aktarılmış ve direnç geninin kromozom 3'ün sonunda bulunduğu bilinmektedir. Bu dayanıklılık geninin soğanda (*A. cepa*) yerli ıslah hatlarına aktarımının sağlanabilmesi için markör destekli geri çaprazlamayı (MAB)

destekleyen bir moleküler işaretleyiciyi geliştirmişlerdir. İki bağlantı haritasında kromozom 3'ün sonundaki sekiz lokusun cDNA dizilerini transkriptom veri tabanından elde etmişlerdir. Sekiz lokusun ekzon dizileri kullanılarak primer çiftlerini tasarlamışlardır. Bunlar arasından i25255 lokusunun PCR ürünleri soğan ve *A. roylei* arasında uzunluk polimorfizmi göstermiş ve dizi analizinde intron dizileri 67 bp'lik bir indelin var olduğunu göstermiş, bu indel polimorfizmine bağılı olarak basit PCR moleküler işaretleyicisi DMR1'i geliştirmişlerdir. Farklı çeşit soğanlar ile yapılan analizin sonucunda dayanıklı olan çeşit dışında diğeri çeşitlerin hiçbirisi *A. roylei*'ye özgü markör genotipi içermediğini göstermişlerdir. Bu sonuçlar, DMR1 moleküler işaretleyicisinin soğan mildiyösünün dayanıklılık genini içeren *A. roylei* parçasını başarılı bir şekilde etiketlediğini göstermektedir.

Khrustaleva ve diğeri (2019) Yapılan çalışmada, soğan mildiyösü hastalığına dayanıklı soğanın (*A. cepa*) türler arası ıslahında basit ve sağlam bir moleküler işaretleyici kullanılarak kromozom düzeyinde introgresyon sürecini izlemek için genomik in situ hibridizasyonun (GISH) avantajlarından yararlanmışlardır. Genomik in situ hibridizasyon (GISH) ve daha önce geliştirilen DMR1 moleküler işaretleyicisinin ıslah sürecini takip etmek ve hedefli seçim yapmak için kullanılmış olması soğan mildiyösüne dayanıklı homozigot introdüksiyon hatları oldukça kısa bir ıslah süresinde başarılı bir şekilde üretmişlerdir. Soğanın iki yıllık bir bitki olmasından dolayı F1 hibrit üretiminden soğan mildiyösüne dayanıklı S2BC2 homozigot hatlarının oluşturulmasına kadar yedi yıl geçmiştir. GISH kullanılarak, S2BC2'nin üç döl bitkisinin *A. cepa* genetik arka planında kromozom 3'ün uzun kolunun distal bölgesinde bir *A. roylei* homozigot fragmanına sahip olduğu gösterilmiştir. Daha önce, öldürücü bir genin (genlerin) soğan mildiyösüne dayanıklılık geniyle bağlantılı olduğu varsayılmıştı. Moleküler sitogenetik yaklaşımla, kromozom 3 üzerindeki *A. roylei* parçalarının boyutunda farklılık gösteren homozigot introgresyon hatlarını kullanarak ölümcül gen(ler)i fiziksel olarak daha kesin bir şekilde haritalama yapmışlardır.

Tarımsal üretimde dayanıklı çeşitlerin kullanılması hastalıklar ile mücadelede daha etkili yöntemlerden biri olup soğan mildiyösüne karşı dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesi önemlidir. Bu tez çalışmasında soğan mildiyösüne karşı aktarım amacıyla kullanılan soğan genotipleri moleküler işaretleyiciler ile testlenmiş ve dayanıklı genotipler

belirlenmiştir. Soğan iki yıllık bir sebze olmasından dolayı ıslah süreci daha uzun olmaktadır. Moleküler işaretleyicilerin ıslah süreçlerinde kullanılması ıslahta zamanın azalmasını sağlayarak daha hızlı sonuca ulaşılmasını sağlamaktadır. Soğan mildiyösüne karşı moleküler işaretleyiciler kullanılarak dayanıklılık genlerinin analizi konusunda çalışmalar literatürde sınırlı kalmaktadır.

Bu çalışmanın sonuçları soğan mildiyösüne dayanıklı çeşitlerin geliştirilebilmesi için ıslah çalışmalarında moleküler işaretleyici kullanımına bir bakış açısı sunmasında fayda sağlayabilecektir.



KAYNAKLAR

- Abd-Elrazik, A. A., & Lorbeer, J. W. (1980). A procedure for isolation and maintenance of *Peronospora destructor* on onion. *Phytopathology*, 70(8), 780-782.
- Arias, M., Curbelo, N., Rabelino, P. G., Vicente, E., Giménez, G., & Galván, G. A. (2020). Inheritance of resistance against '*Peronospora destructor*' un onion cv.'Regia'. *Australian Journal of Crop Science*, 14(12), 1999-2009.
- Bağcı, A., Karaağaç, O., & Balkaya, A. (2021). Soğan Islahında Generasyon İlerlemesi ve Tohum Üretim Sürecini Hızlandırma Teknikleri. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 11(özel sayı), 3438-3446. <https://doi.org/10.21597/jist.1028688>
- Beşirli, G., & Azımı, M. H. (2018) Soğan (*Allium cepa* L.) gen kaynakları popülasyonlarında tohum çoğaltım çalışmaları ve kalite özelliklerinin belirlenmesi.
- Beşirli, G., Sönmez, İ., Albayrak, B., & Polat, Z. (2021). Organik Soğan Yetiştiriciliği. *Yalova: TAGEM*, 24, 2022.
- Buloviene, V., & Survilienė, E. (2009). Effect of environmental conditions and inoculum concentration on sporulation of *Peronospora destructor*. *Agronomy Research*, 4, 147-150.
- Canpolat, S., Saraçoğlu, M. (2018). Soğanda Görülen Önemli Fungal ve Bakteriyel Hastalıklar. *Türkiye Tohumcular Birliği Dergisi*, 28, 36-41
- Cho, Y., Kim, B., Lee, J., & Kim, S. (2021). Construction of a high-resolution linkage map and chromosomal localization of the loci determining major qualitative traits in onion (*Allium cepa* L.). *Euphytica*, 217, 1-12.
- De Vries, J. N., Wietsma, W. A., & Jongerius, M. C. (1992). Linkage of downy mildew resistance genes Pd 1 and Pd 2 from *Allium roylei* Stearn in progeny of its interspecific hybrid with onion (*A. cepa* L.). *Euphytica*, 64, 131-137.
- Esengül, K. I. R., & Yünlü, S. (2016). Soğan (*Allium cepa*) ve sarımsaktaki (*Allium sativum*) bazı fenolik bileşiklerin HPLC yöntemiyle tayin edilmesi. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 20(3), 566-574. <https://doi.org/10.19113/sdufbed.27403>
- Eşiyok, D. (2012). Kışlık ve yazlık sebze yetiştiriciliği. Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü, (ss.14-32). İzmir, Türkiye.
- FAO, 2023. Food and Agriculture Organization of the United Nations. <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QI> (Erişim tarihi: 22.03.2023).
- Filiz, E., & İbrahim, K. O. Ç. (2011). Bitki biyoteknolojisinde moleküler markörler. *Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 2011(2).

Fütterer, J., Gisel, A., Iglesias, V., Klöti, A., Kost, B., Scheid, O. M., ... & Wang, Z. Y. (1995). Standard molecular techniques for the analysis of transgenic plants. *Gene transfer to plants*, 215-263.

Gökçe, Z. N. Ö., Hafsanur, A. T. İ. K., Vural, M., & Gökçe, A. F. (2022). Bazı Soğan (*Allium cepa* L.) Islah Hatlarına ait Tohumların Farklı Tuz Konsantrasyonlarında Çimlenme Özelliklerinin in vitro Koşullarda Belirlenmesi. *Alatarım*,1.

Gökçe, A. F., & Tekeli, F.Ö. (2015). Yemeklik Soğan ve Türkiye’de Islah Süreci. *Türkiye Tohumcular Birliği Dergisi*, 13, 41-45.

Günay, A. (2005). Sebze Yetiştiriciliği, Cilt I (ss.403-416). İzmir.

Güvenç, İ. (2016). Sebzecilik. Temel Bilgiler ve Yetiştiricilik. (ss.270-280).

İrkin, R. (2008). Bazı Allium Sebzelerinin Antifungal Etkileri. *Engineering Sciences*, 3(3), 455-464.

Karaağaç, O., & Balkaya, A. (2017). Türkiye’de Yerel Sebze Çeşitlerinin Mevcut Durumu ve Islah Programlarında Değerlendirilmesi. *Türktob Dergisi*, 23, 8-15.

Khrustaleva, L., Mardini, M., Kudryavtseva, N., Alizhanova, R., Romanov, D., Sokolov, P., & Monakhos, G. (2019). The power of genomic in situ hybridization (GISH) in interspecific breeding of bulb onion (*Allium cepa* L.) resistant to downy mildew (*Peronospora destructor* [Berk.] Casp.). *Plants*, 8(2), 36. <https://doi.org/10.3390/plants8020036>

Kibar, B. (2022). Farklı Dozlarda Hüyük Asit Uygulamalarının Taze Soğan ve Marulda Bitki Gelişimi ve Kalite Üzerine Etkileri. *Uluslararası Tarım ve Yaban Hayatı Bilimleri Dergisi*, 8(1), 12-24. <https://doi.org/10.24180/ijaws.1020237>

Kim, S., Kim, C. W., Choi, M. S., & Kim, S. (2016). Development of a simple PCR marker tagging the *Allium roylei* fragment harboring resistance to downy mildew (*Peronospora destructor*) in onion (*Allium cepa* L.). *Euphytica*, 208, 561-569.

Kofoet, A., Kik, C., Wietsma, W. A., & De Vries, J. N. (1990). Inheritance of resistance to downy mildew (*Peronospora destructor* [Berk.] Casp.) from *Allium roylei* Stearn in the backcross *Allium cepa* L.×(*A. roylei*×*A. cepa*). *Plant Breeding*, 105(2), 144-149. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.1990.tb00467.x>

Koike, S.T., Gladders, P. & Paulus, A.O. (2007). Vegetable Diseases. (ss.67-68). Boston-San Diego.

Kurt, Ş. (2020). Bitki Fungal Hastalıkları. Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü ve Bitki Sağlığı Kliniği Uygulama ve Araştırma Merkezi. (ss.178).

McCallum, J. (2007). Onion. Vegetables, 331-347.

Scholten, O. E., Van Heusden, A. W., Khrustaleva, L. I., Burger-Meijer, K., Mank, R. A., Antonise, R. G. C., ... & Kik, C. (2007). The long and winding road leading to the successful introgression of downy mildew resistance into onion. *Euphytica*, 156, 345-353. DOI 10.1007/s10681-007-9383-9

Schwartz, H. F. (2004). Botrytis, downy mildew, and purple blotch of onion. *Crop series. Diseases; no. 2.941*.

Shigyo, M., & Kik, C. (2008). Onion. Vegetables II: Fabaceae, Liliaceae, Solanaceae, and Umbelliferae, 121-159. DOI: 10.1007/978-0-387-74110-9_4

Şelem, E., Nohutçu, L., Tunçtürk, R., & Tunçtürk, M. (2020). Bazı Allium Türlerinin Morfolojik Ölçümleri, Stoma ve Polen Özellikleri ile Polen Canlılığının Belirlenmesi. Yüzüncü Yıl University *Journal of Agricultural Sciences*, 30(Ek sayı (Additional issue)), 882-889. <https://doi.org/10.29133/yyutbd.791621>

TÜİK, 2023. Türkiye İstatistik Kurumu.
<https://biruni.tuik.gov.tr/medas/?kn=92&locale=tr> (Erişim tarihi: 07.03.2023).

Ullah, S., Atiq, M., Younas, M., Rajput, N. A., Sahi, S. T., Sharif, A., ... & Raza, H. (2020). Monitoring of epidemiological factors promotive for the expansion of downy mildew of onion and its chemotherapeutic management under field conditions. *Intl J Biosci*, 16, 173-182.

Van Der Heyden, H. (2021). Polyetic development of the obligate biotrophic plant pathogen *Peronospora destructor*. McGill University (Canada).

Vural, H., Eşiyok, D. & Duman, İ. (2000). Kültür Sebzeleri (Sebze Yetiştirme). Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, (ss.31-48). İzmir, Türkiye.

Yiğit, Y., & Yiğit, E. A. (2021). Türk Mutfağında Soğan. Turan: Stratejik Araştırmalar Merkezi, 13(52), 316-321.

Yorgancılar, M., Yakışır, E., & Erkoyuncu, M. T. (2015). Moleküler Markörlerin Bitki Islahında Kullanımı. *Bahri Dağdaş Bitkisel Araştırma Dergisi*, 4(2), 1-12.

Watanabe, S., & Syobu, S. I. (2022). Primary infection of onion downy mildew on onion seedlings caused by belowground *Peronospora destructor* inoculum containing germinable oospores. *Journal of Phytopathology*, 170(10), 711-723.
<https://doi.org/10.1111/jph.13135>