



T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ORTA ANADOLU KÖKENLİ MOR HAVUÇ GENOTİPLERİNİN AFLP İLE KARAKTERİZASYONU

AKİFE DALDA ŞEKERCİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ocak –2015
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ORTA ANADOLU KÖKENLİ MOR HAVUÇ GENOTİPLERİNİN AFLP İLE KARAKTERİZASYONU

Akife DALDA ŞEKERCİ

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Önder TÜRKMEN

İkinci Danışman: Doç.Dr. Erdoğan Eşref HAKKI

2015, 47 sayfa

Jüri

Prof.Dr. Önder TÜRKMEN

Prof. Dr. Mustafa PAKSOY

Yrd.Doç. Dr. Kubilay Kurtuluş BAŞTAŞ

Bu çalışma, Türkiye kaynaklı ve farklı lokasyonlardan temin edilen 27 adet mor havuç genotipinin Amplified Fragment Length Polymorphism-Çoğaltılmış Parça Uzunluğu Farklılığı (AFLP**)** yöntemi ile karakterizasyonu yapılarak genetik çeşitliliğin boyutlarının moleküler belirteçler yardımıyla incelenmesi amacıyla yapılmıştır. Bu amaçla Türkiyeden Hatay, Konya-Merkez, Konya-Çumra, Konya-Ereğli bölgesinden temin edilen yerel mor havuç genotiplerinin moleküler karakterizasyonunu oluşturmak amacıyla yürütülmüş ve araştırmada materyal olarak 27 adet yerel havuç genotipi kullanılmıştır. PCR uygulamalarında 6 aflp primer kombinasyonundan veriler elde edilmiştir. PCR amplifikasyon sonucunda toplam 148 DNA bandının 138 i polimorfik bant olarak elde edilmiştir. Moleküler verilerin analizinde NTSYS pc 2.1 paket programı ile MINITAB 14 (temel koordinatlar analizinde (TKoA)) programı kullanılmıştır. Moleküler karakterizasyonda Jaccard (J) benzerlik katsayısı ile dendogram oluşturulup genotipler arasındaki akrabalık ilişkileri belirlenmeye çalışılmıştır. Ayrıca alt populasyonların yapıları Structure programı yardımıyla belirlenmiştir. Çalışma sonucunda dendograma göre, yerel mor havuç genotiplerinin kendi aralarındaki benzerlikleri 0.34 ile 0.93 arasında değişmiştir. Mevcut genotiplerimiz ağırlıklı olarak 0.8 civarında jacard benzerlik katsayısına sahip çıkarken, bazı genotiplerde bu oranın 0.7'nin altına düşmüş olması, tür içi varyasyondan belli ölçülerde yararlanılabileceğini göstermesi bakımından önemlidir. Structure programı ile yapılan analiz sonucunda 3 alt populasyon belirlenmiş olup, her populasyon için üyelik katsayıları belirlenmiştir.Yaptığımız bu çalışma ile yerel mor havuç genotiplerimizin genetik ilişkileri ortaya konmuştur.

Anahtar Kelimeler: Mor havuç, *Daucus carrota*, AFLP, Moleküler karakterizasyon,

ABSTRACT

MS THESIS

AFLP CHARACTERIZATION OF PURPLE CARROT (*Daucus carrota*) ORIGINATED FROM CENTRAL ANATOLIA

Akife DALDA ŞEKERCİ

THE GADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF SELÇUK UNIVERSITY THE DEGEE OF MASTER OF SCIENCE HORTICULTURAL SCIENCE

Advisor: Prof.Dr.Önder TÜRKMEN

Second Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Erdoğan Eşref HAKKI

2015, 47 Pages

Jury

Prof.Dr. Önder TÜRKMEN

Prof. Dr. Mustafa PAKSOY

Yrd.Doç. Dr. Kubilay Kurtuluş BAŞTAŞ

The study was conducted to reveal the genetic diversity of purple carrot in central Anatolia with AFLP(Amplified Fragment Length Polymorphism) method. Local purple carrot genotypes were collected from Hatay, Konya-merkez, Konya-Çumra, Konya-Ereğli Regions in Turkey was aimed to make molecular characterization and 27 local carrot genotypes were used in the study. The data was obtained from 6 aflp primer combinations in PCR application. In total, 148 DNA fragments were scored, 138 of which were polymorphic. Molecular data were analysed using NTSYS pc 2.1 and MINITAB 14 (for Principle Coordinate Analysis, PCoA) softwares. Jaccard (J) was the coefficient utilized for similarity index and dendrogram generations while determining the genetic relationships of the genotypes. Moreover, structures of sub-populations were determined with Structure Program. End of the study according to dendogram, relationship between local purple carrots was determined between 0.34 and 0.93. While our current genotypes had 0.8 jacard resemblance factor, this factor was below 0.7 in some genotypes, so that is important due to showing of utilizing of variation between species. In the result of structure program, 3 subpopulations were determined and membership factors were determined for each one. With our study, genetical characteristics of our local purple carrot genotypes were determined.

Key Words: Purple Carrot, *Daucus carrota*, AFLP, Molecular characterization

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim boyunca yanımda olan her konuda yardım ve desteğini esirgemeyen, engin bilgi ve deneyimleriyle hayatımın her alanında bana ışık tutup, yol gösteren, hocadan ziyade benim için bir 'baba' olan saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Önder TÜRKMEN' e ve araştırmanın yüksek lisans tezi olarak planlanıp yürütülmesinde ve sonuçların değerlendirilmesinde bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen danışman hocam Doç. Dr. Erdoğan Eşref HAKKI' ya sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuar çalışmalarımda yardımlarını esirgemeyen sevgili arkadaşlarım ziraat mühendisi Ünal KAL, biyolog Hasan CAN, biyolog Fatma AKIN, Dr. Anamika PANDEY , Dr. Mohd. Kamran Khan ve Hamza ULUTAŞ 'a ayrıca laboratuar dışında da her konuda yardımcı olan Arş. Gör. Servet ARAS'a ve Uz. Musa SEYMEN'e teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca maddi ve manevi olarak her zaman yanımda olan aileme, her konuda arkamda olan babam Salih DALDA' ya, sevgi ve şefkatini esirgemeyen annem Nurten DALDA'ya ve sabırla yanımda olan eşim N.Gürhan ŞEKERCİ'ye, manevi desteklerinden dolayı kardeşlerim Aydanur DALDA ve Alpenes DALDA'ya, her konuda yardım ve desteğini hissettiğim babam Enver ŞEKERCİ'ye ve tüm aileme içtenlikle teşekkür ederim.

Son olarak, bu araştırmayı bir proje ile destekleyen Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü"ne teşekkür ederim.

Akife DALDA ŞEKERCİ

KONYA-2014

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **iv**
ABSTRACT ..... **v**
ÖNSÖZ ..... **vi**
İÇİNDEKİLER ..... **vii**
SİMGELER VE KISALTMALAR ..... **viii**
1. GİRİŞ……..**1**
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI……..**4**
3. MATERYAL VE YÖNTEM..... **11**
3.1. Materyal ... ……..11
3.2. Yöntem……....12
3.2.1. DNA izolasyonu……...12
3.2.2. DNA kalite ve kantite analizi…….…13
3.2.3. DNA örneklerinin seyreltilmesi……...13
3.2.4. Genomik DNA nın restriksiyon enzimleri ile kesim işlemleri…….……...14
3.2.5. Adaptörlerin ligasyonu……14
3.2.6. Pre amplifikasyon aşaması……...14
3.2.7. PCR Reaksiyon Tamponu ve *Taq* DNA Polimeraz……..…..……....15
3.2.7.1. Enzim denemesi……....15
3.2.7.2. Pre amplifikasyon sonrası seyreltme yapılması…….……...15
3.2.8. Selektif amplifikasyon……..15
3.2.9. Poliakrilamid jel elektroforezi…...…….……..17
3.2.10. AFLP markör analizi sonuçlarının skorlanması…….…..18
3.2.11. Elde edilen sonuçların değerlendirilmesi……..……..…….....18
3.2.12. AFLP markör analizi için gerekli olan çözeltiler listesi ….…….....18
4.ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA…….…….……..... **21**
4.1.Yerel mor havuç genotiplerinde DNA izolasyonunun değerlendirilmesi…..……...21
4.2. Genotiplerin AFLP ile karakterizasyonu ve polimorfizmin değerlendirilmesi……..22
4.3. Verilerin düzenlenmesi ve NTSYS istatistik programının kullanılması…..……..…..26
4.3.1. UPGMA Dendogramlarının elde edilmesi ve değerlendirilmesi……..……26
4.3.2. Mantel Z testi sonuçlarının değerlendirilmesi…….……....28
4.3.3. Varyans- Kovaryans matriksine dayalı temel bileşenler analizinin değerlendirilmesi.....29
4.4. Verilerin Düzenlenmesi ve Structure Programının Kullanılması……...……..……32
4.4.1. Alt populasyon sayısının belirlenmesi……....32
4.4.2. Havuç genotiplerinin üyelik katsayılarının belirlenmesi...……...33
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER…….……....**35**
6.KAYNAKLAR **37**
ÖZGEÇMİŞ **40**

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

A : Adenin
Bp : Base pair-Baz çifti
C : Sitozin
cm : Santimetre
d : Dakika
ddH_2O : Distile-Deiyonize Su
g : Gram
G : Guanin
J : Jaccard
M : Molar
$MgCl_2$: Magnezyum klorür
mM : Milimolar
ng :Nanogram
^oC :Santigat derece
s: saniye
T :Timin
U :unit-ünite
µl : Mikrolitre

Kısaltmalar

AFLP : Amplified Fragment Length Polymorphism-Çoğaltılmış Parça Uzunluğu Farklılığı
ANOVA: Moleküler Varyans Analizi
CTAB : Cetil Three Metil Amonyum Bromid
ISSR : Inter Simple Sequence Repeat-İç Basit Dizi Tekrarları
DNA : Deoksiribonükleikasit dNTP : Deoksiribonükleotidtrifosfat
EDTA : Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
PCR : Polymerase Chain Reaction-Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SSR : Simple Sequence Repeat-Basit Dizi Tekrarları
rpm : Rotation Per Minute-Dakikadaki Devir Sayısı
NTSYS : Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System-Sayısal Taksonomi ve Çok Değişkenli Analiz Sistemi
UPGMA : Unweighted Pair-Goups Method Using Arithmetic Averages
RAPD : Randomly Amplified Polymorphic DNA-Rasgele Çoğaltılmış DNA Farklılığı
RFLP :Restriction Fragment Length Polymorphism-Kısıtlanmış Parça Uzunluğu Farklılığı
Taq :Thermus aquaticus
TBE : Tris-Borik asit-EDTA
TKoA :Temel Koordinatlar Analizi
Tm : Melting Temperature-Erime Sıcaklığı

1. GİRİŞ

Havuç bitkisi, *Umbelliferae* familyasından, *Daucus* cinsine aittir. *Daucus* cinsi farklı tipte türlere ait bir genetik tabana sahiptir. Bu güne kadar *Daucus* cinsine ait 60'dan fazla tür tesbit edilmiştir. Bu türler içinde yer alan kültür havuçları Doğu Asya ve Batı Avrupa olmak üzere iki farklı gruba ayrılmaktadır. Doğu Asya havuçları antosiyanin içeren kırmızımtırak mor veya sarı kök renkli, tüylü yapraklı olup erken çiçeklenmeye eğilimlidirler. Batı kökenli havuçlar ise turuncu, sarı, kırmızı veya beyaz kök renklerine sahiptir, yaprakları az tüylüdür ve uzun süreli düşük sıcaklığa maruz bırakılmadıkları takdirde çiçeklenmeye daha az eğilim göstermektedirler (Rubatzky ve ark.,1999 ; Quiros, 2003). Tarih boyunca havucun anavatanı üzerine çeşitli fikirler öne sürülmüştür. Afganistan'ın Doğu Asya havuçlarının birincil genetik çeşitlilik ve dünyaya yayılma merkezi olduğunu; Batı havuçlarının da kökeni olan ikincil genetik çeşitlilik merkezi ve yayılım merkezinin Anadolu ve Akdeniz Bölgesi olabileceği düşünülmektedir (Banga, 1963). Persler 10. yüzyılda havucu tanımışlar ve yaklaşık 13. ve 14. yüzyıllara doğru Çin'e götürmüşlerdir. 12. yüzyılda ise Araplar, İspanyanın kendilerine ait olan kısmında havuç yetiştirmişlerdir. Kültür havucunun 13. yüzyılda İtalya'da, 14. yüzyılda Fransa, Almanya, Hollanda'da, 15. yüzyılda İngiltere'de yetiştirildiği zannedilmektedir. 16. yüzyılın sonunda artık Arap ülkelerinde olduğu gibi Avrupa'da da sarı ve mor renkteki havuçlar ortaya çıkmıştır (Günay, 2001).

Günümüzde turuncu kök rengine sahip havuçlar en yaygın tarımı yapılan havuç grubunu oluştururken, geçmişte mor renkli havuçların daha ön planda olduğu bilinmektedir. Ancak mor kök rengine sahip havuçlar pişirilmesi sırasında, suda çözülebilen bu mor rengin çorba ve etli yemeklere geçmesi ve yemekleri boyaması, o dönemde tüketici algılarını olumsuz yönde etkilemiş ve bu özelliğin düzeltilmesi için yapılan ıslah çalışmaları sırasında diğer kök rengine sahip havuçlar elde edilmiştir (Günay, 2001).

Mor kök rengine sahip havuçların insan sağlığındaki öneminin daha iyi anlaşılmasıyla son dönemde taze tüketiminin yanında, meyve suyu ve doğal gıda boyası olarak dünya piyasasında önemli bir yer edinmeye başlamış, buna paralel olarak ta ülkemizde yetiştiriciliği gün geçtikçe artmış ve artmaya devam etmektedir. Bugün, Mısır ve Türkiye başta olmak üzere mor havuç tarımı Dünya'da yaygınlaşma eğilimindedir. Türkiyede, özellikle Konya'nın Ereğli bölgesinde mor havuç önemli bir ekonomik değere

sahiptir. Bu bağlamda mor havucun önemi hem dünya genelinde hem de ülkemizde giderek artmış ve artmaya devam etmektedir. Türkiye'de 2013 yılı verilerine göre 108.643 da alanda 569.855 ton havuç üretimi yapılmaktadır. Veriler tüm havuç üretimi ile ilgili olduğu unutulmamakla birlikte özellikle Ereğli bölgesi olmak üzere son dönemde mor havucun üretim oranının arttığını söylemek mümkündür. Örneğin havuç üretiminin hemen hemen tamamına yakını mor havuç olan Ereğli bölgesinde 10.000 da alanda 40.000 ton havuç üretimi gerçekleşmiştir (Anonim, 2014). Ancak özellikle mor havuçta yerel populasyonlarla üretim yapılması nedeniyle başta erken çiçeklenme olmak üzere pek çok tohumluktan kaynaklanan sorun çözüm beklemektedir. Bu problemlerin çözümü ile mor havuçta üretim alanları özellikle birim alandan elde edilecek ürünün niteliği ve niceliği artacak ve havuç daha karlı bir ürün haline gelebilecektir.

Mor kök rengine sahip havuçların giderek yaygınlaşmasının temel sebeplerinden biri de insan sağlığı açısından sahip olduğu avantajlardır. Mor havuç içerdiği karatenoidler, şeker, mineraller, antioksidan ve antitoksinler bakımından oldukça değerlidir. Özellikle de mor havuç önemli bir antosiyanin kaynağıdır. Mor havucun antioksidan kapasitesinin turuncu havucun antioksidan kapasitesinden 13-14 kat fazla olduğu bilinmektedir. Karoten miktarı havuç için çok önemlidir. Çünkü özellikle Amerika'da provitamin A'nın varlığı için tüketilmektedir. Havuç ortalama 90 ppm karatenoid içerir. Bunun yaklaşık %20'si alfa-karoten, %50'si beta-karoten, %20'si ise gama-karotenden meydana gelmektedir. Havuç köklerinde kuru maddenin %35-70'ni şekerler oluşturur. Bu şekerlerde büyük oranda sakkarozdur. Mor havuçlar yüksek oranda karatenoid ve fenolik madde içermektedirler (Kammerer ve ark., 2004).

Türkiye'de yetiştirilen mor havuçlar yerel populasyonlar şeklindedir ve hiçbir ıslah çalışması geçirmemişlerdir. Şekil, irilik, renk yoğunluğu ve verimlilik bakımından varyasyon göstermektedirler. Havuçta yüksek oranda protandri mevcuttur. Tepecik reseptif hale gelinceye kadar bütün polen tozu keseleri patlayarak tozlarını dökmüş olurlar. Erkek organların erken olgunlaşmasından dolayı bitkide yabancı tozlanma oranı yükselmekte ve kendilenme oranı yaklaşık %15 civarında olmaktadır (Thompson, 1962).

Havucun yabancı döllenen ve iki yıllık bir bitki olması seleksiyon etkinliğini kısıtlamakta, süresini uzatmaktadır. Bu zorluklar göz önüne alındığında ıslah süreci uzamaktadır. Bu bağlamda Türkiye'de yerel mor havuç populasyonları hala kullanılmakta ve bu durum da yerel gen kaynaklarının kayıt altına alınması ve mor havuç ıslah

programlarının başlatılabilmesi açısından bir avantaj olarak görülmektedir. Bu nedenle yaygın mor havuç üretimi yapılan bu bölgede mevcut olan populasyonların toplanıp özelliklerinin belirlenmesi, yerel populasyonların geleceğini garanti altına alırken, gelecekte yapılacak ıslah çalışmalarına da ışık tutacaktır. Bu çalışmada; AFLP yöntemi ile Türkiye mor havuç populasyonlarındaki varyasyonun sınırları belirlenmeye çalışılmıştır. Bu amaçla yerel mor havuç populasyonları ile üretim yapılan Hatay, Konya-Merkez, Konya-Çumra, Konya-Ereğli bölgelerinden 27 adet populasyon bu çalışmada bitkisel materyal olarak kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar ile gelecekte başlatılacak mor havuç ıslah programları için değerli bilgiler elde edildiği düşünülmektedir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Havuç tohumla üretilen, iki yıllık, açık tozlanan, diploit (2n=18) bir sebze türüdür. Havucun ilk yıl, genotip özellikleri ve çevre şartlarına bağlı olarak 60-150 gün içerisinde vegetatif organları oluşurken, ikinci yıl ise bitkinin generatif organları meydana gelir. Ancak ilk yıl çiçeklenme eğilimi de gösterebilmektedir (Günay, 2005).

Daucus carota 'nın şimdiye kadar yaklaşık 13 alt türü tanımlanmış olup, bu alt türlerden birinin kültür havucu olduğunu bildirilmektedir. Kültür havuçları Asya ve Avrupa diye iki grupta toplanmaktadır. Asya grubu havuçlar antosiyanin içeren kırmızımtırak, mor, sarı kök rengine sahip olup erken çiçeklenme eğilimleri fazladır (Simon ve Goldman, 2006; Simon ve ark., 2008).

Havuçta yüksek oranda protandri görüldüğü, bu nedenden dolayı yüksek oranda yabancı döllenme görüldüğü ve kendine döllenmenin %15 civarında olduğu bildirilmektedir (Thompson, 1962).

Sàenz Laín (1981) yaptıkları araştırmada, havuçta 9 çift kromozomun varlığından ve kromozomların uzunlukları arasında küçük farklılıklar olduğundan söz etmiştir. Tanımlanan 22 *Daucus* türünün olduğu, bu türlerin hemen hemen tamamı diploid yapıda ve temel kromozom sayıları x=9 ile x=11 arasında değiştiğini bildirilmiştir. *Daucus carota*, *Daucus capillifolus* ve bazı Güney Akdeniz türleri 2n=2x=18 kromozom sayısına sahiptirler (Sàenz Laín, 1981; Yıldız, 2009)

Havuç ıslahçıları seleksiyonda dikkat edilecek en önemli özelliğin erken çiçeklenme eğilimi (sapa kalkma) olduğunu vurgulamaktadır (Peterson ve Simon, 1986). Köklerin lifli ve değerlendirilemez olmasına yol açması sebebiyle erken çiçeklenme istenmeyen bir durumdur (Simon ve ark., 2008; Rubatzky ve ark., 1999).

Erken çiçeklenme eğilimi düşük sıcaklıklara ve/veya fotoperyodizme bir tepki olarak ortaya çıkmaktadır (Rubatzky ve ark.,1999). Alınacak ilk önlem, ıslah populasyonunun %100'ünde zamanında yeterli tohum oluşumu için soğukta muamele yapılmasıdır. Vernelizasyonun tamamlanması için 8-10 hafta 5^0C (40^0F)'nin altında tutulması gerektiği vurgulanmaktadır.

Stein ve Nothnagel (1995)'a göre havuçta ıslah amaçları arasında, üründe homojenlik, görünüş, hastalık ve zararlılara dayanıklılık, erken çiçeklenme eğiliminin azaltılması, yüksek besin içeriği ve güzel tat gibi özelliklerin temel alınması gerekmektedir

(Stein ve Nothnagel, 1995).

Peterson ve Simon (1986) tarafından yürütülen ve köke dayalı seleksiyon ile ilgili olan ıslah programlarında; ana kök üzerindeki yan kök azlığı, kökün pürüzsüzlük ve parlaklığı, kökte çatlama ve kırılmadan arilik, kökün taç ve üst yüzeyinin yeşil ve düz olmaması, içine gömükten ziyade biraz yukarı çıkık olması, homojen dış renk, homojen iç renk değerlendirmelerinin yer alması gerektiğini belirtmişlerdir (Peterson ve Simon, 1986).

Stein ve Nothnagel (1995)'e göre çatallaşma, kaliteyi ve verimi azaltan önemli bir unsurdur. Yeşil omuzluluğun da verim azalışlarına neden olmasından dolayı istenilmeyen bir durum olduğu vurgulanmıştır (Stein ve Nothnagel, 1995). Kökte çatlama kaliteyi bozan bir unsurdur. Kökte çatlak oluşumu bitkinin genetik yapısı ile alakalı olduğu kadar çevre koşulları ile özellikle toprak yapısı ve toprak nem içeriği ile yakından ilgilidir. Çatlama hassasiyeti tek bir dominant gen tarafından idare edilmektedir (Stein ve Nothnagel, 1995).

Michalik ve ark. (1988), kahverengi anter erkek kısırlığının ilk olarak soğanda 1947 yılında Tendersweet çeşidinde tesadüfen keşfedilmiş olduğunu belirtmiştir (Michalik ve ark., 1988). Hibrit havuç ıslahında tohumluk üretimini kolaylaştırmak amacıyla çoğunlukla sitoplazmik erkek kısır (CMS) hatlar kullanılmaktadır. Stoplazmik genetik erkek kısırlığı, havuçta "kahverengi anter" ve "petaloid" seklinde kendini göstermektedir. "Kahverengi anter" daha sonra birçok çeşit ve yabani havuç türlerinde de bulunmuştur.

Stein ve Nothnagel (1995), erkek kısırlık mekanizmasının, özellikle erkenci hibrit havuç çeşitlerinin geliştirilmesinde yaygın olarak kullanıldığını bildirmişlerdir. Petaloid erkek kısırlığı, 1953 yılında yabani bir havuçta kesfedilmiştir. Bu tip kısırlık, petallerde bir mutasyon sonucu meydana gelmiştir. Günümüzde petaloid erkek kısırlığı, özellikle Kuzey Amerika'da hibrit tohum üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır (Simon ve ark., 2008). Günümüzde tüm dünyada kullanılmakta olan hibrit havuç çeşitlerinin %70'i ve ABD'deki çeşitlerin %90'ı petaloid erkek kısırlığı mekanizmasından yararlanılarak üretilmektedir. Geriye kalan çeşitlerin eldesinde ise kahverengi anter erkek kısırlığı kullanılmaktadır (Havey, 2004).

Genetik kaynakların tanımlanması günümüz modern ıslah tekniklerinde vazgeçilmez uygulamaların başında gelmektedir. Morfolojik belirteçlerle yapılan karakterizasyonlarda, bitki türlerinin morfolojik karakterlerine dayalı yapılan taksonomik sınıflandırma, bitkinin yaşına, fizyolojik durumuna ve çevresel faktörlere bağlı olarak

değişiklik göstermekte ve bazen yeterli olmamaktadır (Havey, 1991). Ayrıca, morfolojik özellikleri birbirine çok yakın olarak görülen gruplar genetik olarak birbirinden çok farklı da olabilmektedirler (Sevindik ve ark., 2013). Bu olumsuzlukları gidermek için geliştirilen moleküler genetik markörler bitkilerdeki genetik çeşitliliğinin ortaya konmasında, bitki türleri arasındaki taksonomik ve filogenetik ilişkilerin doğru bir şekilde belirlenmesinde başarıyla kullanılmaktadır (Yang ve Quiros, 1993). Diğer taraftan moleküler markör teknolojisi her geçen gün hızla gelişmekte ve bitki ıslahındaki yerini almaktadır (Lee, 1995; Winter ve Kahl, 1995; Duvick, 1996).

Maliyetlerindeki düşüş ve pratik uygulanabilirliklerinin artmasıyla, markırların bitki ıslahını hızlandıracağı ve güçlendireceği, yakın gelecekte bitki ıslahının vazgeçilmez bir parçası olacağı düşünülmektedir.

Moleküler markörlerin çoğunluğu, PCR tekniğine dayalıdır. Farklı büyüklüklerdeki (polimorfik) protein ve DNA parçacıkları, jel üzerinde elektrik akımı yardımıyla farklı şekillerde hareket ederler. Jel üzerinde ebatlarına göre farklı şekilde hareket eden bu parçacıklar, boyama veya radyoaktif yöntemlerle tespit edilebilmektedir. Markörlerin bitki genetiği ve ıslahında; çeşit tanımlama, Markör Destekli Seleksiyon (Marker Assisted Selection = MAS), genom haritalama başlıca kullanım alanlarıdır. Çeşit tanımlamada cins, tür ve çeşitler arasında polimorfizm gösterecek markörlerden yararlanılmakta ve gen kaynaklarının tanımlanması, sınıflandırılması ve gen bankalarının yönetimi; ıslah hat ve çeşitlerinin parmak izlerinin çıkarılmasıyla çeşit patent haklarının elde edilmesi ve böylece ıslahçı haklarının korunması sağlanabilmektedir (Badenes ve Parfitt 1998; Ağaoğlu ve Ergül, 1999; Göçmen ve ark., 1999a; Göçmen ve ark., 1999b; Polat ve ark., 1999; Cansian ve Echeverrigaray, 2000; Li ve Quiros, 2000).

MAS ve genom haritalamada, markör kullanımının ön şartı, açılım gösteren başlangıç populasyonunun oluşturulmasıdır (Paterson ve Wing, 1993). Basit karakterler için genelde F2, BC (Geriye Melez) ve NIL (Yakın İzogenik Hatlar) populasyonları kullanılmakta; genom haritalama ve çok genle idare edilen karakterler için ise F2:3 ve RIL (Rekombinant Saf Hat) populasyonlarına başvurulmaktadır ((Meglic ve Staub, 1996; Goldman ve ark., 1995; Ekbiç ve ark., 1999; Park ve ark, 2000).

Populasyonlarda, markörlerin linkage (bağlantı) dağılımına bakılarak, genom haritaları oluşturulmaktadır (Onus, 1999a).

Yaygın olarak kullanılan moleküler DNA markörlerinden bazıları şunlardır:

-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) (Tanksley ve ark., 1989).

-RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA (Waugh ve Powell, 1992).

-AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) (Vos ve ark., 1995).

-Microsatellitler (SSR veya ISSR) (Rafalski ve Tingey 1993).

Günümüzde kullanılan birçok moleküler markör bulunmaktadır. Bu markörler oluşumlarına göre sınıflandırılarak çeşitli kültür ve yabani bitkilerin genetik tekrar dizilerini ortaya çıkarmaktadır. DNA belirleyicilerin kendi içerisinde dominant ve ko-dominat şeklinde iki grupta sınıflandırılabilir. Bu tez çalışmasında kullanılan AFLP dominant bir markör sistemidir.

Gilbert ve ark.(1999) yaptıkları çalışmada bitki gen kaynakları koleksiyonlarındaki genetik varyasyonu belirlemek amacıyla, uygun stratejiler belirlemeye çalışmışlardır. Genotip sayısının fazlalığı ve her bir genotipin içinde var olabilecek varyasyonun, moleküler biyoloji tekniklerinin kullanılmasında sınırlamalar getirebileceğini bildirmişlerdir. Moleküler biyoloji tekniklerinden hızlı, basit ve güvenilir olanlarının ve uygun stratejilerin belirlenmesinin bu sınırlamaları ortadan kaldırabileceğini açıklamışlardır. ISSR markörleriyle, acı bakla gen kaynaklarında yaptıkları çalışmada, beş bireyden alınan ve karıştırılan DNA örneklerinin, genotipi tamamen temsil edebileceğini bildirmişlerdir (Gilbert ve ark. , 1999).

ISSR yöntemi Zietkiewicz ve ark. (1994) tarafından keşfedilmiş ve kullanılmış bir yöntemdir. Günümüzde DNA tabanlı akrabalık ilişkilerini ortaya koymada en çok kullanılan markör sistemlerinden biridir. Özellikle polimeraz zincir reaksiyonunun kullanımının yaygınlaşmasıyla bu yöntemin kullanımı artmıştır. Bu belirteç sistemide dominant markörler arasındadır (Zietkiewicz ve ark.)

AFLP moleküler tekniğinde, ebeveynler ve ıslah sonucu elde edilen bireylerin DNA'ları iki restriksiyon enzimiyle (4 baz ve 6 baz) kesilmekte ve DNA'nın kesilmesi sonucu oluşan bu DNA parçacıkları adaptörlerle birleştirilmektedir. Ligasyon ürünleri birer baz ilave edilmiş primerlerle PCR yapılmakta ve elde edilen PCR ürünleri 3 baz ilave edilmiş primerlerle (primerlerin birisi radyoaktif veya floresen ile işaretlenmekte) seçici PCR'a tabi tutulmaktadır. PCR ürünleri poliakrilamid jelde yürütülerek oluşan polimorfizme göre sonuçlar değerlendirilmektedir. Tek bir reaksiyonda 30-150 fragmanın

tanımlanabilmesi, sonuçların tekrarlanabilir olması sistemin en önemli avantajını oluşturmaktadır (Vos ve ark., 1995).

Brandeen ve ark. (2002) yabani türleri de içeren 124 *Daucus carota* L. örneğini ISSR ve AFLP yöntemleriyle filogenetik benzerliklerini araştırmışlardır. Çalışmada kullanılan havuç türleri Avrupa, Kuzey Amerika ve Asya gibi kıtalardan 18 ülkenin bulunduğu ve bu ülkelerde kültürü yapılan türlerden seçilmiştir. Çalışma, 140 AFLP markörü, 23 ISSR markörü, 20 mitokondriyal markör ve daha farklı iki çeşit markör kullanılmıştır. Çalışmada, AFLP ve ISSR kayda değer bir şekilde güvenilir ve tekrar edilebilir sonuçlar göstermiştir. Elde ettikleri sonuçlara göre kültür ve yabani formdaki havuç türlerinin serbestçe çaprazlanabilmesine rağmen, her iki grup da farklı bir kümelenme göstererek birbirinden belirgin bir şekilde ayrılmışlardır.

Nakajima ve ark. 1998 yılında yapmış oldukları çalışmada *Daucus* a ait 5 tür ve *D. carota* L.'e ait alt türlerden oluşan çalışmalarında RAPD ve AFLP markörlerini kullanarak karakterizasyon çalışması yapmışlardır. Çalışmada kullanılan 17 RAPD primerinden 16'sı 139 polimorfik bant üreterek skorlanmıştır. AFLP'de ise M-CTG/E-ACA primer setlerinden 46 polimorfik bant, M-CAA/E-ACA ve M-CAT/E-AAG primer setlerinden sırasıyla 18 ve 38 polimorfik bant üretilmiştir. Toplamda 102 polimorfik bantla dendogram oluşturulmuştur. Elde edilen polimorfik bantlarla oluşturulan her iki dendogramda da 5 türe ait havucun kültürü yapılan *D. carota* L.türü bir büyük grupta toplanmış diğer yabani formları ise bu gruptan ayrışmıştır.

Havuçta yapmış olan başka bir çalışmada ise Avrupa kaynaklı farklı 21 hat kullanmışlar. Çalışmalarını AFLP markör sistemini kullanarak tamamlamışlardır. Beşer bireyden elde ettikleri DNA'lar ile bulk oluşturmuşlar ve oluşan 7 bulk grubunu analiz etmişlerdir. Çalışmaların 12 AFLP primer çifti ve 3 ISSR primeri kullanmışlardır. Kullanılan 3 AFLP primeri yeterli güvenilirlikte sonuç vermezken 9 primer çiftinden 75 polimorfik bant üreterek karakterizasyonu gerçekleştirmişlerdir. Çalışmanın sonunda amaçları olan ve bulklar halinde bulunan grupların ayrışmasını başarlı bir şekilde ortaya koyarak havuçları ayırmada genel bir strateji ortaya koymuşlardır (Clerc ve ark., 2005).

Anter kültürü yolu ile elde edilen havuç hatları arası homojenliği ortaya koymak için yaptıkları çalışmada RAPD markör sistemini kullanmışlardır. Çalışmada 4 farklı donörden üretilen 28 farklı hat kullanılmıştır. Hatlar arası homojenitenin belirlenmesinin amaçlandığı çalışmada, 40 farklı RAPD primeri test edilmiş ve içlerinden polimorfik bant

üreten 10 adet primer seçilerek çalışma tamamlanmıştır. R1 hatlarının homojenliğini belirlemek için yapılan bu çalışmada R1 hatları R02'nin kendilenmesiyle oluşturulmuştur. Aynı donörden gelen hatların benzer bant şeması oluşturması beklenmiş ve hatlar arası farklılık ve benzerlikleri donörler düzeyinde ortaya konmuştur (Mirosława Staniaszek ve Hanna Habdas, 2006).

Grzebelus ve ark., (2001, 2002 ve 2008) çalışmalarında; havuçta 4 kendilenmiş hat ve bunların 8 hibritini kullanarak AFLP tekniği yardımıyla, genetik akrabalıkları belirlenmiş ve tohum saflığı testleri için markörler üretmişlerdir. DNA örneklerinden hazırlamış oldukları bulk DNA'lar ile çalışmışlar ve 8 primer çifti kombinasyonu kullanarak, 86 polimorfik bant tanımlamışlardır. Polimorfik bantların var-yok esasına göre skorlamaları yapılarak genetik uzaklıkları tespit edilmiştir. Hatların ve hibritlerin pedigri akrabalıklarını temsil eden AFLP temelli dendogramlar çizilmiş ve hatlar ile hibritleri arasındaki akrabalıklar da belirlenmiştir.

Yine 2002 yılında yaptıkları bir başka çalışmada, 2 ebeveyn hattı ve buna karşılık gelen hibritlerin polimorfizm seviyesini değerlendirmede kullanılan 3 primer kombinasyonunda 34 markör üreterek kullanmışlar ve çok boyutlu bir skala ile çizim yaparak 3 alt küme tanımlamışlardır. 2008 yılında da 2 ebeveyn hattının bireysel bitkileri ve buna karşılık gelen hibritlerin tohum saflık testlemeleri önemsiz seviyede homojenlik göstermiştir. Hibrit tohum saflığı için AFLP markörlerinin uygulanabilirliğinin sınırlı olduğunu belirtmişlerdir (Grzebelus ve ark., 2002).

Grzebelus ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada, 5 tanesi ticari olmak üzere 26 havuç çeşidi kullanılarak RAPD tekniği ile genetik uzaklık belirlenmeye çalışılmıştır. CTAB protokolü ile izole edilen örnekler, PCR işleminden sonra %1'lik agaroz jelde yürütülmüştür. Bulklar 15 bitkiden hazırlanmıştır. 15'er bitkiden hazırlanan DNA bulkları ile çalışılmıştır. Var-yok metoduna göre skorlamalar yapılmış ve çizilen dendogramlardan akrabalık ilişkileri belirlenmiştir. Çalışmada 2-14 primerden toplamda 34 RAPD markörü tanımlanmıştır. Test edilen havuç koleksiyonu içinde 6 grubun dendogramda genetik mesafesi gözlemlenmiştir. Bu çalışmada bazı örneklerin birbiriyle yakın akraba olduğu belirtilmiştir (Grzebelus ve ark., 2002).

Daucus carrota L. kaynaklı ticari ve yabani formları içeren 18 farklı ülkeden sağlanan 124 genetik materyalin kullanıldığı diğer bir çalışmada ise AFLP ve ISSR tekniklerinden yararlanılmıştır. Çizilen dendogramlar üzerinden cografi orijin, mitekondri,

plastid, spesifik çekirdek çeşitliliği, AFLP ve ISSR datalarını dikkate alarak, havuç çeşitleri arasında genellikle zayıf bir korelasyon olduğu ileri sürülmüştür. Sonuç olarak, havuçta zengin bir genetik çeşitlilik olduğunu ve nispeten doğada düzensiz yapıda oldukları vurgulanmıştır (Bradeen ve ark., 2002).

Briard ve ark., (2004) sahip oldukları havuç koleksiyonlarında duplikasyonları tanımlamak için moleküler ve morfolojik yöntemlerle yürüttükleri çalışmada, 5 örnekte 4-8 bitki ile bulklar hazırlamışlar ve 75 AFLP markırı ile analizlerini yapmışlardır. Havuçta duplikasyonların gelişimini tanımlamak için bir strateji geliştirmişlerdir. Tüm örneklerde önemli derecede farklılık gözlemlemişlerdir (Briard ve ark., 2004)

Chang (2008) ise yaptığı çalışmasında 16 çeşit orkide ve bunların hibritleri arasında AFLP markör tekniğini kullanarak, genetik varyasyon seviyesini belirlemeyi amaçlamıştır. 10 primer kombinasyonu kullanmış, 1353 bant elde etmiş bunların 1285 tanesinin polimorfik olduğunu belirtmiştir (Chang, 2008).

Staub (1999) ise, 83'ü seçkin çeşit olan toplam 118 hıyar genotipindeki varyasyonu, değişik DNA markör teknikleriyle araştırmışlardır. Hıyarda teorik olarak minimum 25 markörün genetik ayrımlaştırma için yeterli olduğu kanısına varmışlardır. Elde edilen 71 adet RAPD markörün hıyar genotiplerinin orijin, teorik yayılım ve bazı morfolojik özellikleri ile (cinsiyet, meyve en/boy oranı) uyumlu gruplandırmalar oluşturduğunu gözlemlemişler ve RAPD sonuçlarının RFLP sonuçlarıyla %80 oranında korelasyon gösterdiği ve rahatlıkla kullanılabileceği sonucuna varmışlardır.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Bu araştırma yerel mor havuç populasyonları arasındaki varyasyonu belirlemek amacıyla yürütülmüştür. Bu amaçla, Hatay, Konya-merkez, Konya-Çumra, Konya-Ereğli bölgesinden toplanan mor havuçlar bu çalışmada bitkisel materyal olarak kullanılmıştır.

Bu genotiplere ait havuçlar adı geçen bölgelerden derlenmiş ve Kasım 2013'de Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Seraları'nda uyandırmak amacıyla her genotipten 10 havuç olacak şekilde dikimi yapılmıştır. Tohum olarak temin edilen materyallerde eş zamanlı olarak aynı koşullarda tohum ekimi yapılmış ve fide eldesi sağlanmıştır. Toplam 29 materyal içinde 2 tanesinde yeterli gelişim sağlanamamış ve 27 materyal çalışmada kullanılmıştır. Usulüne uygun bakım koşullarında 4-6 yapraklı döneme gelen havuçlardan DNA izolasyonu için yaprak örnekleri alınmıştır. Alınan örneklerin sterilizasyonu yapılmıştır. Bir kısım örnek sıvı azota daldırılıp -80 °C'deki dondurucuda saklanarak daha sonra DNA izolasyonu yapılmış, ancak taze bitki parçaları ile yapılan izolasyonlar daha iyi sonuçlar vermiştir. Bu nedenle taze yaprak parçaları poşetle buz içerisine konulup, Ziraat Fakültesi Biyoteknoloji Laboratuvarı'na getirilmiş ve ivedilikle sıvı azot ile şoklanarak CTAB metodu ile DNA izolasyonları yapılmıştır.



Şekil.3.1.1. Yerel mor havuç arazilerinden görüntüler

3.2. Yöntem

3.2.1. DNA izolasyonu

Moleküler genetik araştırmaların ilk adımı genomik DNA'nın saf bir şekilde elde edilmesidir. Genomik DNA'nın elde edilmesi hücre duvarının ve hücre zarının parçalanması, proteinlerin ortamdan uzaklaştırılması ve DNA'nın çöktürülerek saflaştırılması gibi başlıca adımları içerir (Bozkaya, 2012). Pek çok bitki türünde başarıyla uygulanan DNA izolasyon protokolleri mevcuttur. Ancak bitkiler arasında biyokimyasal açıdan oldukça farklı kompozisyonlar bulunmaktadır (Sevindik ve ark., 2013). DNA izolasyonu, yapılarında yüksek oranda fenoller, ketonlar, aldehitler, polisakkaritler gibi sekonder metabolitleri içeren bitkilerde problemli olabilir (Aydın ve Köçkar, 2008). Bizim çalışmamızda da sekonder metabolitlerin varlığı DNA izolasyonlarının süresini uzatmış ve mevcut olan protokol üzerinde değişiklikler yapmayı zorunlu kılmıştır.

Buna göre Türkiye'nin yerel mor havuç örneklerinin DNA izolasyonu modifiye edilmiş 2XCTAB yöntemi kullanılarak yapılmıştır.

CTAB DNA Protokolü ile İzolasyon

Bitkilerden genomik DNA izolasyonu için modifiye edilmiş 2XCTAB yöntemi kullanılmıştır (İncirli, 2001). 1 g bitki örnekleri sıvı azot ile havanda toz haline getirilmiş ve 2ml'lik ependorf tüplere alınmıştır. Üzerine 500 µl CTAB tampon çözelti ve 2.5 µl β-Merkaptoetanol eklenerek alt üst edilmiştir. Bir saat 55℃'de inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra örnekler üzerine 1.5 µl RNaz A eklenerek 37℃'de 15 d bekletilmiştir. Örnekler su banyosundan alındıktan sonra üzerlerine 500 µl kloroform izoamilalkol eklenmiştir. Bu aşamadan sonra santrifüj yapılmış, DNA'nın çöktürülmesi sağlanmıştır. Santrifüjden sonra tüplerde 3 farklı faz oluşur. Üst fazda DNA, ara fazda proteinler dipte ise fenol-kloroform-izoamilalkol yer alır. Üstteki faz yeni ependorf tüplere aktarılmış ve 0.08 volumde 7.5 M amonyum asetat eklenmiştir. 0.54 volumde isopropanol eklenerek örnekler alt üst edilmiştir. Daha sonra 35 d buzda inkübe edilmişlerdir. İnkübasyondan sonra santrifüj edilmişler ve dipte pellet oluşumu gözlenmiştir. Üstteki süpernatant atılmıştır. 700 µl %70'lik EtOH eklenmiş ve yıkanmıştır. Santrifüj yapılmış ve dipte pellet oluşmuştur. EtOH uzaklaştırılmıştır. Daha sonra %90'lık EtOH ile yıkama yapılmış ve tekrar santrifüj edilmiştir. Dipte pellet oluşmuş ve EtOH uzaklaştırılmıştır. Tüpler kurutma kağıtlarına yan yatırılmış ve EtOH'un iyice uçması sağlanmıştır. En son

olarak pellet üzerine 50 µl TE eklenip, pellet çözülmesi beklenmiş ve örnekler kullanıma hazır hale getirilmiştir (Sevindik ve ark., 2013).



Şekil 4.1.1. DNA izolasyonunun yapılması ve değerlendirilmesi

3.2.2. DNA Kalite ve Kantite Analizi

Tris-EDTA içinde çözünmüş halde bulunan DNA örneklerinden 2 µl alınarak 96 lık plaka içine tek tek konularak ve üzerlerine 8 µl ultra saf su ve 2 µl brom fenol mavisi ilave edilmiştir. Elde edilen DNA, ultra saf su ve boya karışımı daha önceden hazırlanmış ve 1X TBE içerisinde yaklaşık 15 d bekletimiş ve %1'lik agaroz jel kuyucuklarına yüklenmiştir. Agaroz jelde yürütülen DNA örneklerinin çalışmada kullanılabilirliği hakkında bu şekilde fikir edilmiştir. Ayrıca, DNA örneklerinin NanoDrop 1000 ile 260, 280, 230 nm dalga boylarında ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Sonuçta, ng/µl olarak miktarları ve nükleik asit/protein oranları veya nükleik asit harici komponentlerin miktarı belirlenmiştir.

3.2.3. DNA Örneklerinin Seyreltilmesi

AFLP markör analizi çalışmasında reaksiyon ortamına konulacak DNA örnek miktarının 9 µl içerisinde maksimum 100 ng olması gerektiği için üstte belirtildiği şekilde ng/µl olarak miktarları belirlenen örnekler, reaksiyon için gerekli olan oranda saf su ile seyreltilmiştir.

3.2.4. Genomik DNA'nın Restriksiyon Enzimleri ile Kesim İşlemleri

5X Reaksiyon Tamponu	2.5 µl
DNA	9 µl
EcoR1/Mse1 Enzim Karışımı	1 µl
Hacim	(su ile toplam 12.5 µl'ye tamamlanır)

Yukarıda belirtilen şekilde reaksiyon tüpleri içerisine hazırlanan karışım 37^0C de 2 saat, 70^0C 15 d reaksiyona tabi tutulmuştur.

3.2.5. Adaptörlerin Ligasyonu

Kesilmiş genomik DNA	12.5 µl
Adaptör karışımı	12 ml
T4 DNA Ligaz	0.5 µl
Hacim	25 µl

20^0C de 2 saat inkübasyon yapılmıştır. İnkübasyon sonunda bu örneklerden 10 µl alınarak üzerlerine 90 µl TE tamponu ilave edilip örneklerr 1:10 oranında seyreltilmiştir.

3.2.6. Pre-amplifikasyon Aşaması

1:10 seyreltme	2.5 µl
AFLP 1:10 preamplifikasyon karışımı	20 µl
PCR reaksiyon tamponu (10x)	2.5 µl
Taq DNA polimeraz (5 unit/ µl)	0.5 µl
	25.5 µl

Yukarıda belirtilen tüpler içine alınmış reaktanlar karıştırıldıktan sonra kısa santrifüj (short spin) yapılmıştır. Elde edilen karışım aşağıda belirtilen şekilde programlanmış thermal cycler cihazında reaksiyona tabi tutulmuştur.

94 ^{0}C	30 s	
56 ^{0}C	1 d	20 döngü
72 ^{0}C	1 d	
4 ^{0}C	∞	

3.2.7. PCR Reaksiyon Tamponu ve *Taq* DNA Polimeraz

3.2.7.1. Enzim Denemesi

Çalışmada farklı markalarda enzimler ve bu enzimlere ait tamponlarla deneme yapılmış ve sonuçta enzim ve tamponunun en uygun sonucu verdiği tespit edilen enzimler kullanılmıştır.

3.2.7.2. Pre-amplifikasyon Sonrası Seyreltme Denemesi

Seyreltme (Dilüsyon) faktörü: Ürünün çeşidine göre seyreltme faktörü değiştiği için bireylere denemeden önce stoklardan 1:10, 1:20, 1:40 seyreltmeleri denenerek uygun seyreltme oranı belirlenerek bireylere uygulanmıştır. Sonuçta en iyi sonucu veren oran (örneğin 1:40 seyreltme oranı) kullanılmıştır.

3.2.8. Selektif AFLP Amplifikasyonu

Selektif amplifikasyon aşamasında dilue edilmiş pre-amplifiye DNA ile primerler reaksiyona girer. Primerlerden EcoR1 primerleri IRD 700 ve IRD 800 floresan boyaları ile işaretlidir. Reaksiyon aşağıda belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir.

Taq DNA polimeraz çalışma karışımı	6 µl
Dilue edilmiş pre-amp DNA	2 µl
Mse1	2 µl
IRDye 700 işaretli primerleri	0.5 µl
IRDye 800 işaretli primerleri	0.5 µl
	11 µl

Yukarıdaki oranlar örnek miktarına göre hesaplanarak hazırlanmıştır.

Kullanılan Primer Kombinasyonları

1. E-AAC/E-AGG M-CAA

2. E-AAG/E-AGC M-CAC

3. E-ACC/E-ACT M-CTT

4. E-ACA/E-ACG M-CAT

5.E-ACC/E-AGG M-CTG

6.E-ACA/E-AGC MCTC

Başarılı olmayan primer kombinasyonları

1.E-AAG/E-AGG M-CTA

2.E-AAC/E-ACG M-CAG

Yukarıdaki EcoR1 (E) ve Mse1 (M) primerleri kullanılmıştır. Selektif amplifikasyon aşamasında PCR için thermal cycler cihazı aşağıdaki gibi programlanarak amlifikasyon yapılmıştır.

1. 94 ^{0}C		30 s	
2. 65 ^{0}C		30 s	
3. 72 ^{0}C		1 d	
4. 94 ^{0}C		30 s	
5. 65 ^{0}C	(-0.7 ^{0}C)	30 s	12 döngü
6. 72 ^{0}C		1 d	
7. 94 ^{0}C		30 s	
8. 56 ^{0}C		30 s	23 döng
9. 72 ^{0}C		1 d	
10. 94 ^{0}C		30 s	

65 ^{0}C lik primerlerin bağlanma sıcaklığı 56^{0}C ye düşene kadar her döngüde 0.7^{0}C düşülerek döngüler devam ettirilerek Touchdown PCR yapılmıştır. PCR tamamlandıktan sonra cihazdan alınan örneklerin üzerine 5 µl Blue Stop çözeltisi ilave edilerek 94^{0}C de 3 d denatürasyon işlemi ile reaksiyonun durdurulması sağlanmıştır. Denatürasyon sonrasında örneklerin bulunduğu tüpler buz içerisinde tutularak soğumaları sağlanmıştır.

Yukarıdaki bütün basamaklar tamamlandıktan sonra örnekler denatüre poliakrilamid jel elektroforezine hazır hale gelmiştir. Floresan boya ile işaretli örneklerin ışıktan zarar görmemeleri için yüklenene kadar karanlıkta ve buzda bekletilmiştir.

3.2.9. Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Poliakrilamid Jel Elektroforezi için Selçuk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Biyoteknolojisi laboratuarında bulunan, Li-Cor firmasının ürünü olan, LICOR/ Biosciences, NEN® Model 4300, DNA Analyzer kullanılmıştır. AFLP markör analizinde kullanılan çözeltilerin içerikleri aşağıda verilmiştir.

Cihazın Hazırlanması

Cihazın bağlı olduğu bilgisayarda Saga Software programı ve internet bağlantıları açıldı. Programa yüklenecek örnekler ve markör ile ilgili bilgiler girilerek yeni bir dosya açılmıştır (bu işlem her denemede tekrarlanmıştır).

Donmuş Poliakrilamid Jelin Bulunduğu Cam Aparatın Cihaza Yerleştirilmesi

Düzeneğin yerleştirileceği tanklar 1XTBE ile doldurulmuş ve düzenek yerleştirilip elektrik akımını sağlayacak ilgili bağlantılar yapılmıştır. Ön yürütme (pre-run) işlemi için komut verilmiştir.

Örneklerin Yüklenmesi ve Yürütme İşlemi (Run)

Ön yürütme işlemi tamamlanan jel yükleme için hazır hale gelmiştir. Yükleme için özel yükleme uçları ile yükleme işlemine geçilmiştir. Örneklerin yüklenme işlemi tamamlandıktan sonra yürütme (run) işlemi için bilgisayardan komut verilmiştir. Yürütme işlemi sırasında bantların cihazın bağlı olduğu bilgisayar ekranındaki görüntüleri görülmüştür. Yürütme işlemi süresince bantların çıkışı ekranda takip edilmiştir. Çalışmada her yürütme işlemi yaklaşık 3 saat yapılmıştır.



Şekil.3.2.9.1. Yerel mor havuç DNA larının jele yüklenmesi ve yürütme işlemi

3.2.10. AFLP Markör Analizi Sonuçlarının Skorlanması

Skorlama sonuçları Microsoft Office Excel programında girilmiş ve daha sonra NTSYS de incelenebilmek için text dosyasına dönüştürülmüştür. Skorlamalar 1, 0 var yok esasına göre elde edilmiştir. Sonuçlar dendogram ve temel koordinartalar analizi gibi farklı ilişki analizlerine tabii tutulmuştur.

3.2.11. Elde edilen sonuçların değerlendirilmesi

Elde edilen yüksek kaliteli DNA, Li-Cor cihazına spesifik AFLP kitlerindeki primer kombinasyonları ile kitin protokolüne uygun olarak PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) yapılarak preamplifikasyon ve amplifikasyon aşamaları gerçekleştirilmiştir. PCR ürünleri poliakrilamid jellerde LICOR cihazında yüksek voltajda TBE tampon çözeltisi ortamında ayrıştırılıp, cihazın yazılımı yardımı ile görüntüler elde edilmiş ve ayrıca göz ile manuel olarak ta kontrol edilmiştir. Elde edilen görüntüler var (1) - yok (0) esasına göre skorlanarak moleküler analizleri yapılmıştır.

Analizler için Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System - Sayısal Taksonomi ve Çok Değişkenli Analiz Sistemi olarak bilinen ve NTSYS-pc version 2.02 (Applied Biostatistics, Exeter Software, Setauket, New York, USA)'nin kullanılması ile oluşturulmuş olan matrislerden dendogramın üretilmesinin yanısıra MINITAB 14 programı ile Principle Coordinate Analysis – Temel Koordinatlar Ananlizi ile de gerçekleştirilmiştir. STRUCTURE programında ise alt populasyonlar belirlenmiştir.

3.2.12. AFLP Markör Analizi için Gerekli Olan Çözeltiler Listesi

1. EcoR1/Mse1 Enzim Karışımı (1.25 unit/µl)

10 mM Tris-HCl (pH 7.4)

50 mM NaCl

0.1 M EDTA

1 mM DTT

200 µg/ml BSA

%50 gliserol

%0.15 TritonX-100

2. 5X Reaksiyon Tamponu

50 mM Tris-HCl (pH 7.5)

50 mM Mg-asetat

250 mM K-asetat

3. T4 DNA Ligaz (5 unit/µl)

0.1 mM EDTA

1 mM DDT

50 mM KCl

200 µg/ml BSA

%50 gliserol

4. Adaptör Karışımı (EcoR1/Mse1 adaptörleri)

0.4 mM ATP

10 mM Tris-HCl (pH 7.5)

10 mM Mg-asetat

50 mM K-asetat

Poliakrilamid Jel Analizi için Gerekli Çözeltiler

1. Stok Bind Silane

Bind Silane 50 µl

Etanol 10 ml

Karıştırıldı ve elde edilen stok 4^0C'de, bulunduğu tüp alüminyum folyo ile kaplanarak ışıktan korunacak şekilde saklanmıştır.

2. Bind Silane Çözeltisi

25 µl stok bind silane ile 25 µl %10'luk asetik asidin ependorf tüp içerisinde karıştırılmasıyla elde edilmiştir. Her denemede taze hazırlanmıştır.

3. 1X Yürütme Tamponu (Running Buffer)

10X TBE tamponunun distile H_2O ile 10 kat seyreltilmesi ile elde edildi. 50^0C'de pH 8.3-8.7 olmalıdır.

4. % 10 APS (Amonyum persülfat)

0.1 g APS nin 1 ml ddH2O içerisinde çözülmesiyle hazırlanmıştır. Her denemede kullanılacak kadar ependorflara bölüştürülerek -20^0C de saklanmıştır.

5. % 8 Akrilamid Jel Matriks

Toplam Hacim (100 ml)

Üre 42 g

5X TBE 20 ml

%50 Akrilamid 26.7 ml distile H_2O ile 112.5 g'a tamamlanmıştır.

6. AFLP Moleküler Markörleri

IRDye 700:50-700 bp

IRDye 800:50-700 bp

-20 ^{0}C'de saklanmıştır.

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

4.1. Yerel Havuç Genotiplerinde DNA İzolasyonunun Değerlendirilmesi

Çalışmada kullanılan bitki materyalinin taze ve genç yapraklarından alınan örneklerden 2XCTAB yöntemi kullanılarak DNA izolasyonları gerçekleştirilmiştir. Çalışmada laboratuarımızda rutin olarak kullanılan CTAB DNA izolasyonu metodu mor havuç için modifiye edilerek kullanılmıştır. Bu metodun uygulanışı materyal ve metot bölümünde ayrıntılı olarak anlatılmıştır. Çalışmamızda 27 yerel havuç genotipinden 270 farklı bireye ait DNA izolasyonu yapılmış ancak her genotipten seçilen birer örnek ile çalışmalar tamamlanmıştır. Elde edilen DNA'lar %1'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülerek DNA'nın AFLP için uygun olduğu belirlenmiştir. Nükleotidlerin heterosiklik halkaları 260 nm dalga boyunda azami absorbsiyon özelliği göstermelerinden dolayı 260 nm'de ölçülen absorbsiyon değerleri (A260) oldukça saf elde edilen nükleik asitlerin miktar tayininde kullanılmıştır.

A260'daki değerler DNA ve RNA'yı birbirinden ayırt etmeye yetmez. Ancak izolasyon aşamasında RNaz uygulanarak toplam nükleik asitler içinde yer alan RNA'ların parçalanması sağlanmıştır. Örneklere karışan protein miktarının ise belli sınırlarda tutulması, örneklerin saflaştırma sonrasında kullanılacakları hassas uygulamalarda (örneğin; restriksiyon enzim kesimlerinde) sorun yaşanmamasını sağlamaktadır. Bu nedenle 260 ve 280 nm dalga boylarında okunan değerler arasındaki oran nükleik asitlerin saflığı hakkında bilgi vermektedir. A280 değeri ortamda bulunan protein moleküllerinin yoğunluğu hakkında bilgi vermektedir. Saflaştırılmış DNA'da A260/A280 oranı ideal olarak 1.8-2.0 civarında olmalıdır. Bununla birlikte saflaştırılan DNA'nın A260/A280 oranı 1.2 seviyesine düşene kadar çeşitli uygulamalarda sorunsuzca kullanılabilmektedir.

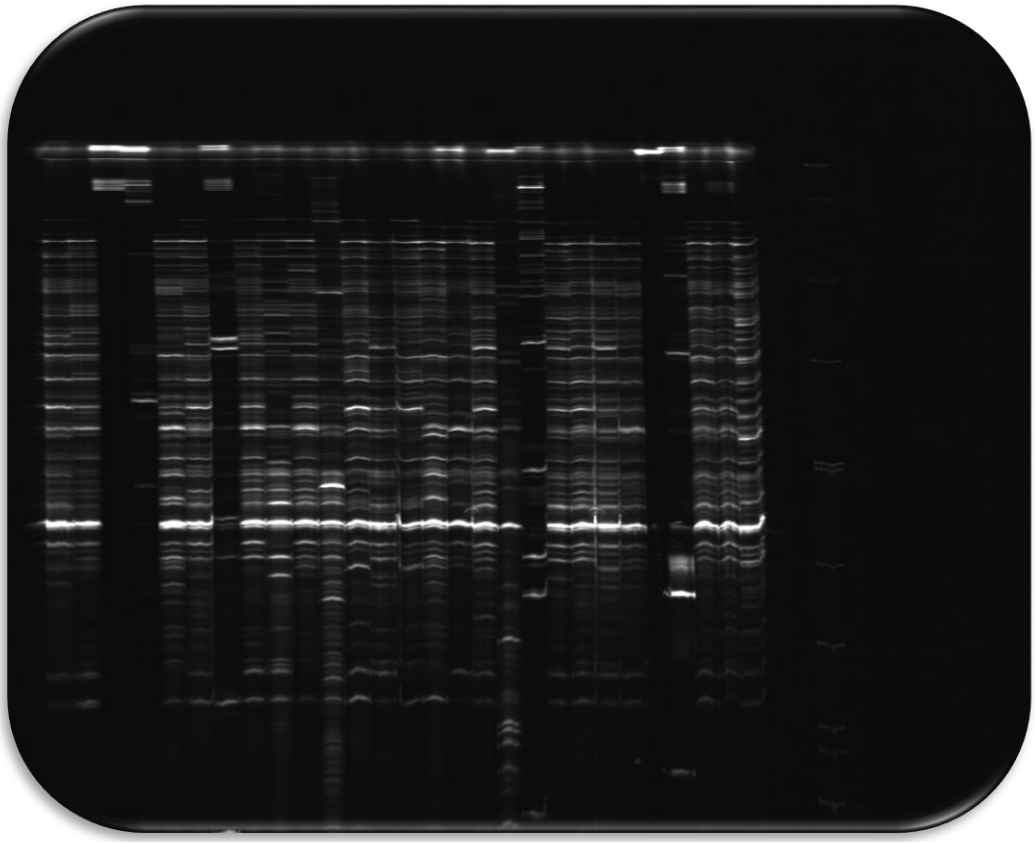
Çalışmamızda Nanodrop ND-1000 Spektrofotometre ile A260, A280 ve A260/A280 ve DNA konsantrasyon değerleri elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlar neticesinde tüm örneklerin kullanıldığı PCR uygulamalarında DNA saflığı veya konsantrasyonu ile ilgili herhangi bir sorunla karşılaşılmamıştır.

4.2. Yerel Havuç Genotiplerinin AFLP ile Karakterizasyonu ve Polimorfizmin Değerlendirilmesi

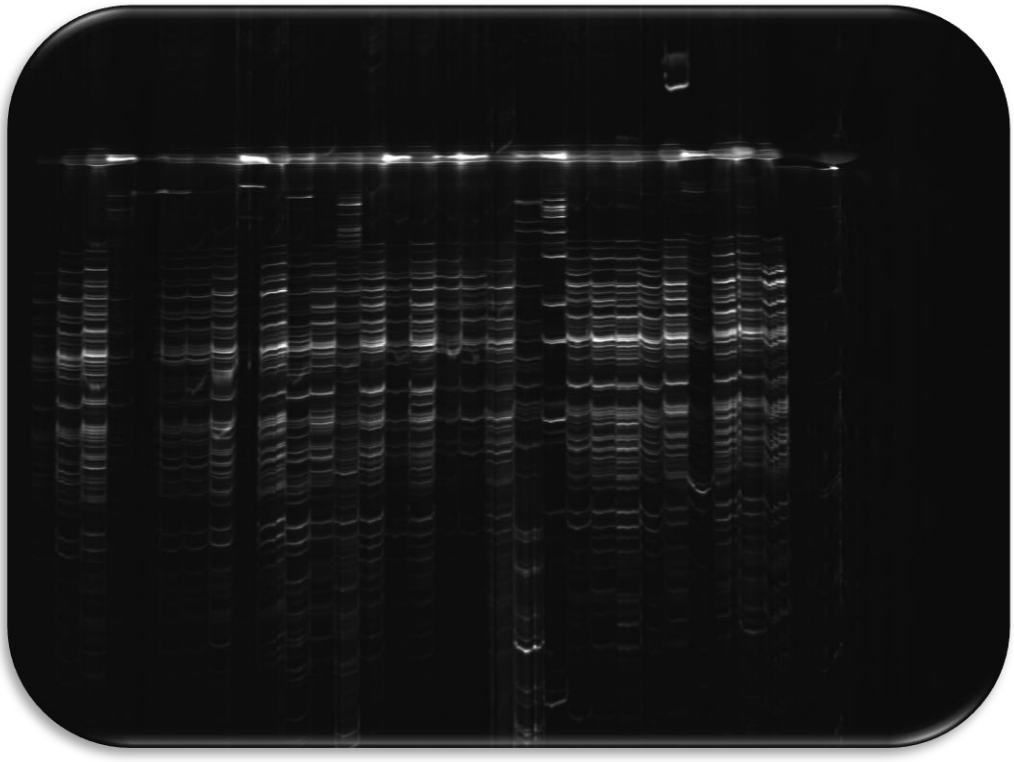
Çalışmada yer alan 27 adet havuç genotipi arasındaki genetik çeşitlilik AFLP yöntemi ile araştırılmıştır. Metot kısmında detaylı şekilde anlatılan pre-amplifikasyon, selektif amplifikasyon çalışmaları tamamlanmış ve PCR çalışmaları yapılan örneklerin poliakrilamid jel elektroforezi için Selçuk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Biyoteknolojisi laboratuarında bulunan LICOR/ Biosciences, NEN® Model 4300, DNA Analyzer kullanılmıştır. Çalışmada, primerlerin farklı kombinasyonları kullanılarak amplifikasyon sağlanan toplam 6 adet primer kombinasyonu ile veriler üretilmiştir. Skorlama sonucunda elde edilen, toplam bant sayısı, polimorfik bantsayısı, polimorfizm oranı(%) (Çizelge.4.2.1.) verilmiştir. Allellerin genel polimorfizm oranı %93 olarak hesaplanmıştır. Elde edilen toplam allel sayısı bakımından E-ACA/E-AGC MCTC kombinasyonu en fazla polimorfik bandı (48 adet) üretirken, en az sayıda bant (15 adet) E-AAC/E-AGG M-CAA primer kombinasyonu tarafından üretilmiştir.

Çizelge.4.2.1. Farklı primer kombinasyonlarının polimorfizm oranları

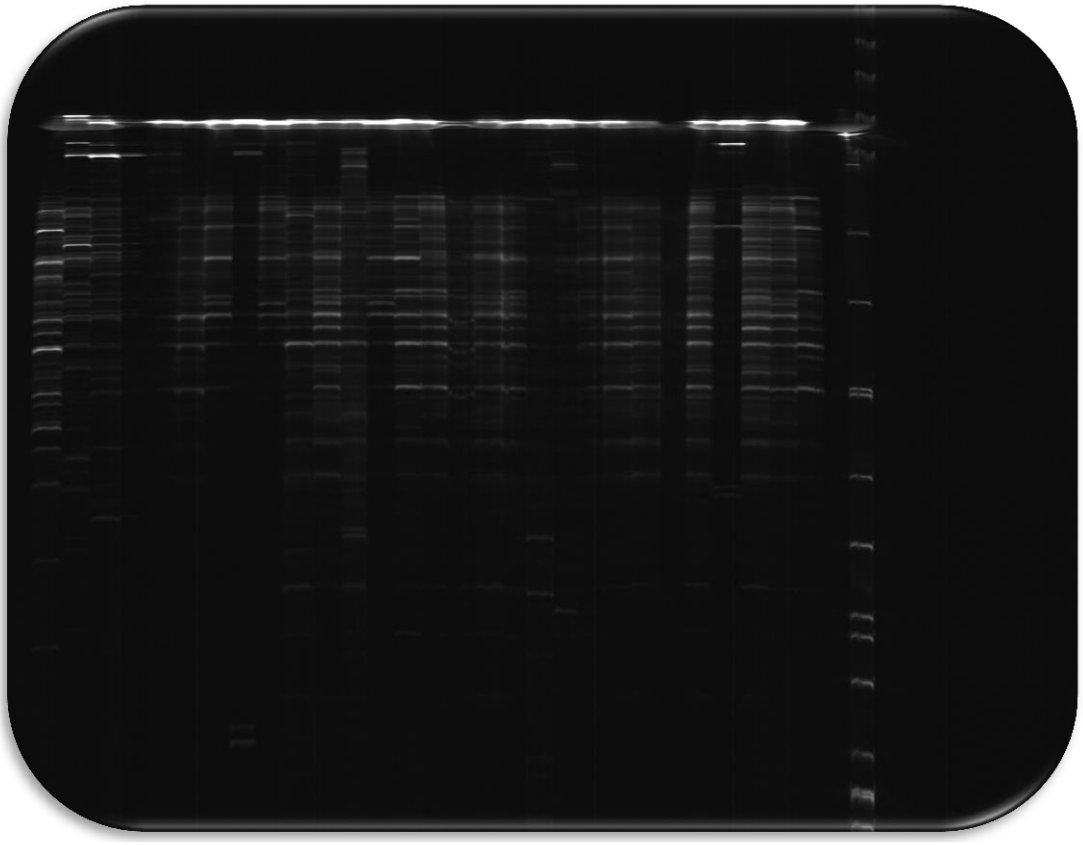
Primer Kombinasyonu	Toplam bant sayısı (adet)	Polimorfik bant sayısı (adet)	Polimorfizm oranı (%)
1.E-AAC/E-AGG M-CAA	15	13	%87
2.E-AAG/E-AGC M-CAC	23	23	%100
3.E-ACC/E-ACT M-CTT	23	18	%78
4. E. E-ACA/E-ACG M-CAT	23	20	%87
5.E-ACC/E-AGG M-CTG	16	16	%100
6.E-ACA/E-AGC MCTC	48	48	%100
Toplam	148	138	%93



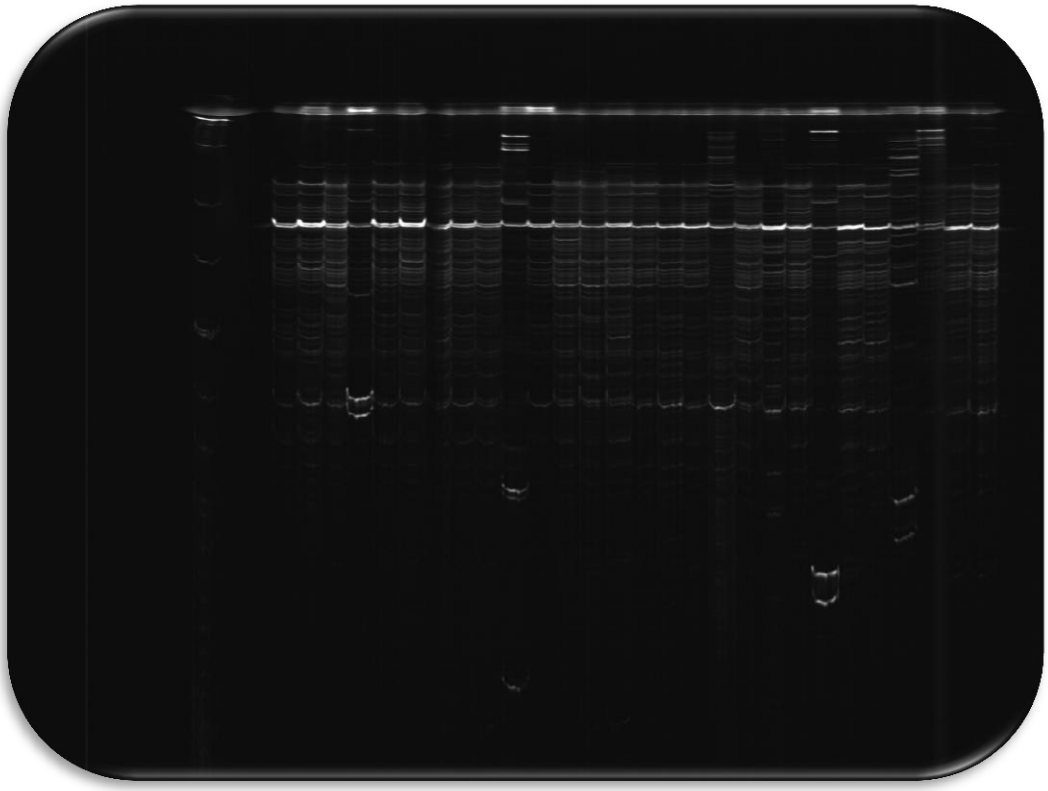
Şekil.4.2.1. AFLP primer kombinasyonu-6 kullanılarak elde edilen bant profili



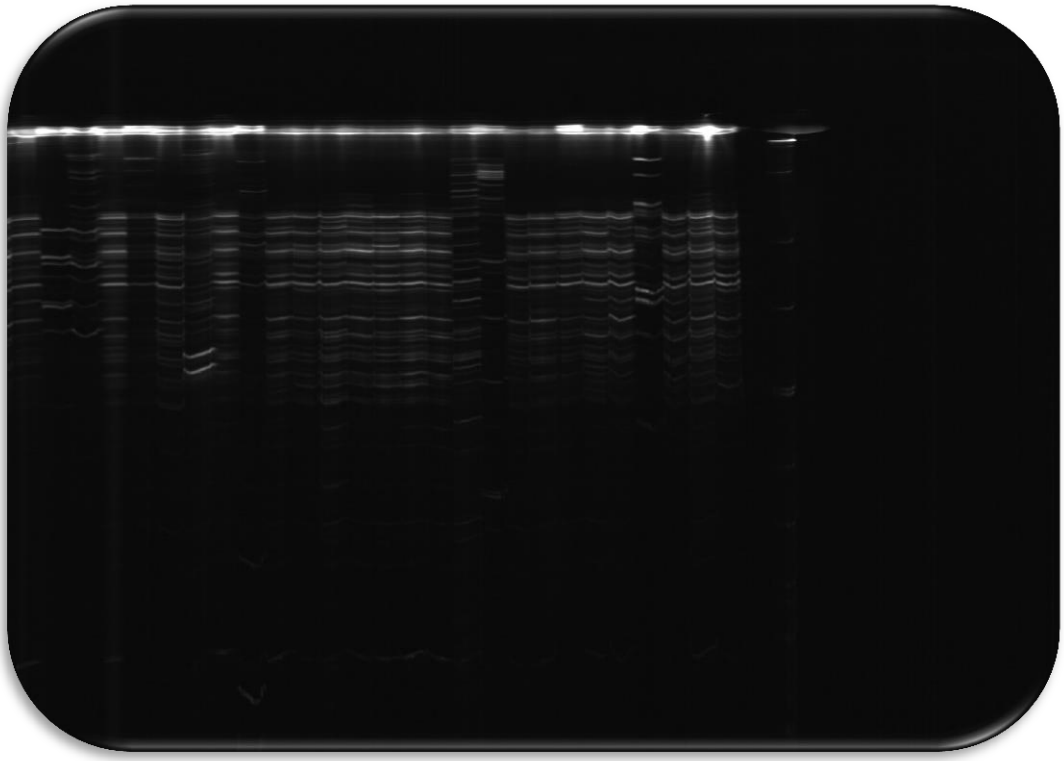
Şekil.4.2.2. AFLP primer kombinasyonu-2 kullanılarak elde edilen bant profili



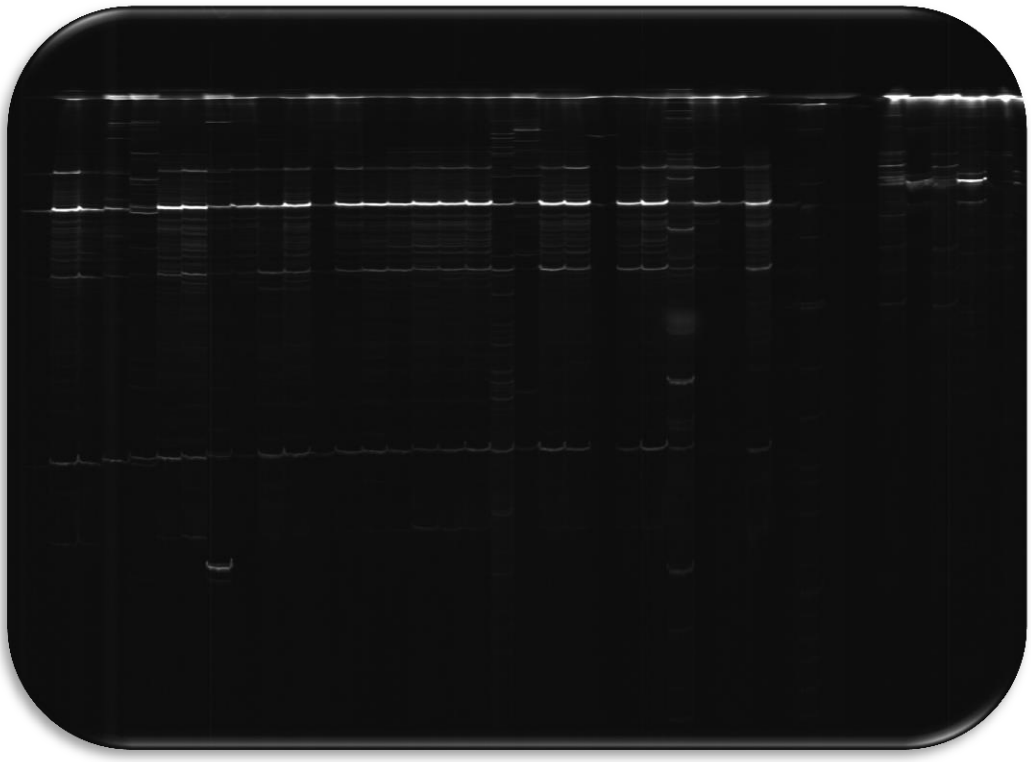
Şekil.4.2.3. AFLP primer kombinasyonu-5 kullanılarak elde edilen bant profili



Şekil.4.2.4.AFLP primer kombinasyonu-1 kullanılarak elde edilen bant profili



Şekil.4.2.5. AFLP primer kombinasyonu-3 kullanılarak elde edilen bant profili



Şekil.4.2.6. AFLP primer kombinasyonu-4 kullanılarak elde edilen bant profili

4.3. Verilerin Düzenlenmesi ve NTSYS İstatistik Programının Kullanılması

Bantların varlığı (1) ve yokluğu durumunda (0) kaydedilerek veri dosyası hazırlanmıştır. PCR başarısızlığı veya herhangi bir deneme hatası nedeniyle olmadığı düşünülen bantlar ise kayıp veri (9) olarak değerlendirilmiştir. Elde edilen veriler NTSYS (Numerical Taxonomy Multivariate Analysis System, NTSYS-pc version 2.1, Exeter Software, Setauket, N.Y., USA) paket programı kullanılarak analiz edilmiştir. Öncelikle bireyler arasındaki benzerlik indeksleri hesaplanmıştır. Benzerlik indeksinden yararlanılarak UPGMA metodu ile dendrogram oluşturulmuştur. Bu amaçla; JACARD benzerlik matriksine dayalı UPGMA dendrogramı ve varyans-kovaryans matriksine dayalı Temel Bileşenler Analizi (PCA) yapılmıştır. Temel Bileşenler Analizi için öncelikle SIMINT modülü kullanılarak korelasyon matriksi oluşturulur. Bu matrikste EIGEN modülü kullanılarak eigen vektörleri hesaplanmıştır. Eigen vektörleri PROJ modülünde kullanılarak iki boyutlu ve üç boyutlu grafikler elde edilmiştir.

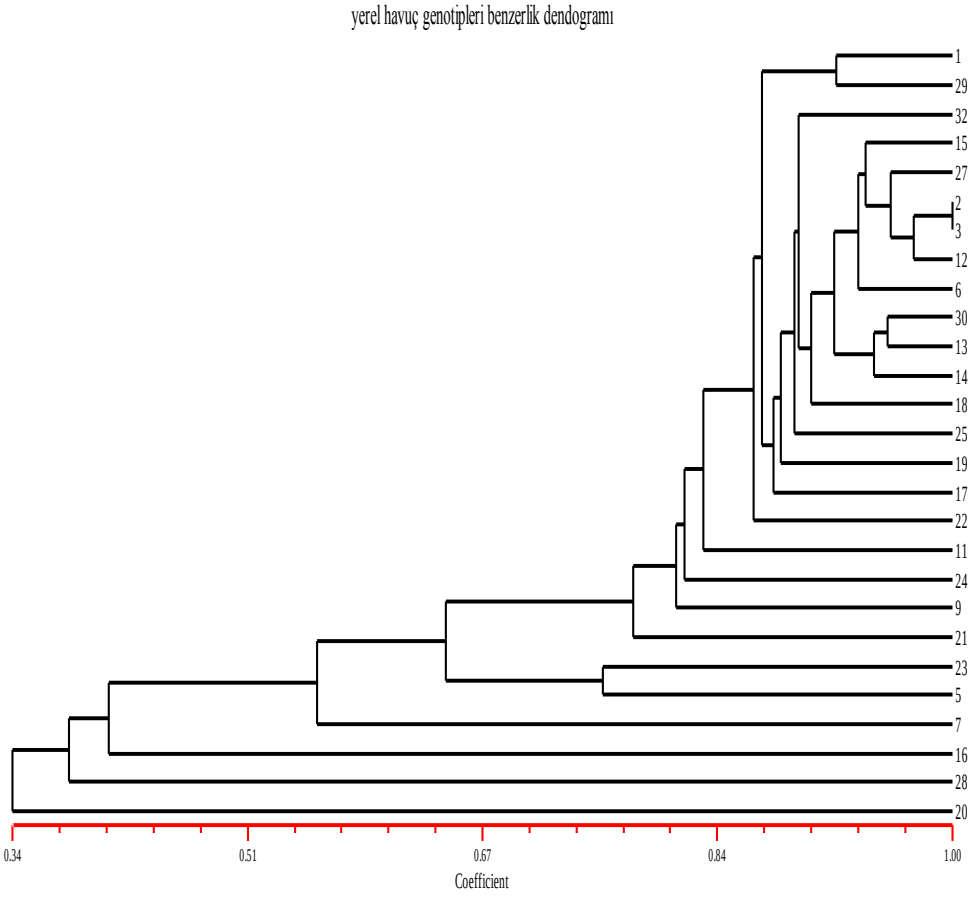
4.3.1. UPGMA Dendogramlarının Elde Edilmesi ve Değerlendirilmesi

Skorlanan bantlardan NTYSC-pc 2.0 istatistik programı ile genetik benzerlik ve uzaklık matrisi oluşturularak kümeleme analizi ile genetik ilişki dendogramı elde edilmiştir (Şekil.4.3.1.1). Jaccard benzerlik katsayısı ile oluşturulan dendograma göre yerel mor havuç genotiplerinin kendi aralarındaki benzerlik 0.34 ile 0.93 arasında değişmiştir. Dendograma göre yerel mor havuç genotiplerinde genel olarak iki ana kol oluşmuştur. Bunlardan ilki tek bir genotiple temsil edilen 20 nolu genotip örneğinin oluşturmuş olduğu koldur. 20 nolu genotip diğer tüm örneklere uzak bir noktada konumlanmıştır. Bu örneğin benzerlik katsayısı 0.34 olmuştur.

İkinci kol ise iki ana dala ayrılmıştır. Bu gruplardan birinde 28 nolu genotip yer alırken diğer grupta farklı yerel mor havuç genotiplerinin aksesyonları bulunmuştur. 28 nolu genotipin benzerlik kat sayısı 0.39 olarak belirlenmiş ve 20 nolu genotipe çok daha yakın bir genetik mesafede yer almıştır.

AFLP analizi sonucunda elde edilen dendogram sonuçları Orta Anadolu orijinli yerel mor havuç genotiplerinin, (genetik havuzun çiçek yapısı ve yabancı tozlanma gibi sebeplerle geniş olduğunu düşünülen bu bitkinin) belli sınırlar içinde bir genetik varyasyonu barındırdığı görülmüştür.

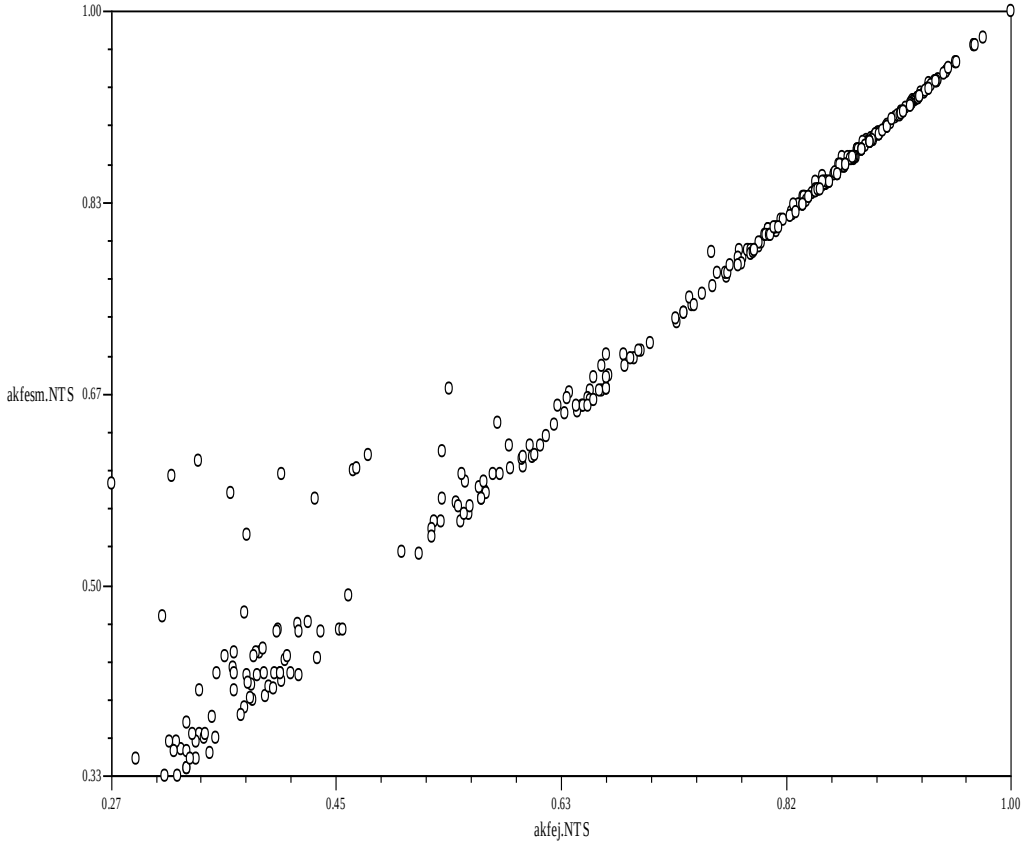
Genotipler genetik yakınlıklarına göre alt gruplar meydana getirmişlerdir. 2 ve 3 nolu genotiplerin birbirinden ayrılamadığı gözlemlenmiştir. Bununla beraber 1, 29, 32, 15, 27, 2, 3, 12, 6, 30, 13, 14, 18, 25, 19, 17 ve 22 nolu genotiplerin benzerlik katsayıları 0.85 in üzerinde bulunmuş ve bu genotiplerin bir grup oluşturduğu yorumu yapılabilmiştir. Ek olarak 5, 7, 16, 28 ve 20 nolu genotipler sırasıyla populasyona daha az benzerlik göstermişler ve 20 nolu genotip en uzakta bulunmuştur. Bu çalışmadan belli bölgelerimizden toplanan numuneler arasında genetik varyasyona dayalı olarak gen kaynağı niteliğinde kullanılabilecek mor havuç genotiplerinin varlığı belirlenmiştir. Mevcut genotiplerimiz ağırlıklı olarak 0.8 civarında Jaccard benzerlik katsayısına sahip çıkarken bazı genotiplerde bu oranın 0.50'in altına düşmüş olması, tür içi varyasyondan belli ölçülerde yararlanılabileceğini göstermesi açısından önemlidir. Tüm bu yerel mor havuç genotiplerimizin derlenmesi ve muhafaza edilmesi gelecekte yapılacak ıslah çalışmalarına katkı sağlayacaktır.



Şekil 4.3.1.1 JACARD benzerlik matriksine dayalı UPGMA dendrogramı

4.3.2. Mantel Z Testi Sonuçlarının Değerlendirilmesi

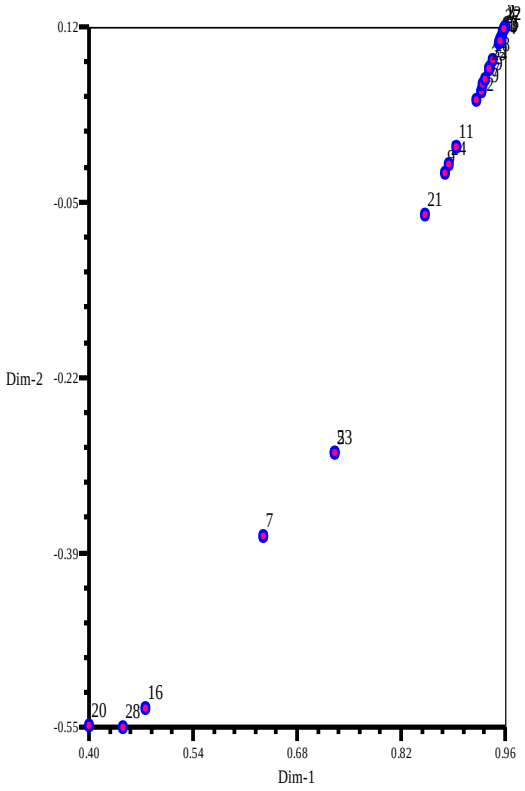
AFLP verilerinden faydalanılarak hesaplanan SM ve J katsayıları ile belirlenen benzerlik/farklılık matrisleri arasındaki birlikteliği test etmek amacıyla yapılan Mantel testi sonucu elde edilen grafik Şekil 4.3.2.1'de verilmiştir. İki matris arasında istatistikî olarak önemli bir birliktelik tespit edilmiş ve iki matris arasında kuvvetli bir koorelasyon **(r =** 0.985**)** bulunmuştur. Bu sonuç, AFLP verilerinin SM yada J katsayısı kullanılarak elde edilen benzerlik/farklılık matrislerinin PCoA ve kümeleme analizi sonuçlarında benzer sonuçlar vermesini kuvvetli bir şekilde desteklemektedir.



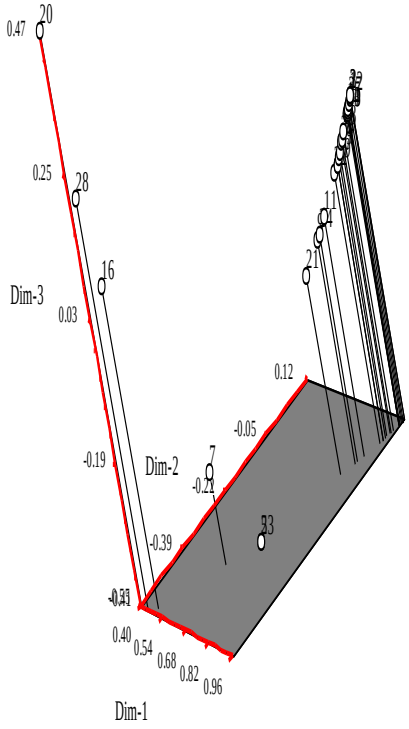
Şekil 4.3.2.1 SM ve J katsayılarına dayalı mantel testi

4.3.3. Varyans-Kovaryans Matriksine Dayalı Temel Bileşenler Analizi (PCoA)'nin Değerlendirilmesi

Hatlar arasındaki genetik farklılığı ortaya çıkarmak için temel bileşenler analizi (*Principle Co-ordinate Analysis*=PCoA) yapılmıştır. PCoA analizini yaparken Jacard benzerlik matriksinden yararlanılmıştır. İki boyutlu ve üç boyutlu grafik NTSYS programında oluşturulmuştur. Genotiplerin her bir koordinat düzleminde aynı grup ya da yakın yerlerde olmaları aralarındaki genetik farklılığın az olmasından kaynaklanmaktadır. 20, 28,16 nolu genotipler arası genetik farklılık az bulunurken, 7 ve 23 nolu genotipler onlardan biraz uzaklaşıp yeni bir küme oluşturmuştur. Ek olarak, diğer genotipler ise farklı bir küme oluşturarak kendi içlerinde genetik farklılığın az olduğunu göstermişlerdir. Buna göre, bu iki grup, 3 boyutlu ayrımda belirgin bir şekilde ayrı konumlanmıştır. Büyük kümelenmenin yer aldığı ana grup ise 3. boyut (dim-3) ile 2. boyut (dim-2) düzlemlerinde ayrışmıştır (Şekil.4.3.3.2.). Bununla birlikte bu grupların iki koordinat düzleminde de yeterli ölçüde ayrıldıkları gözlenmiştir (Şekil.4.3.3.1.).



Şekil.4.3.3.1. Yerel mor havuç genotipinin AFLP verileriyle yapılan temel bileşenler analizi sonucu elde edilen iki boyutlu grafik

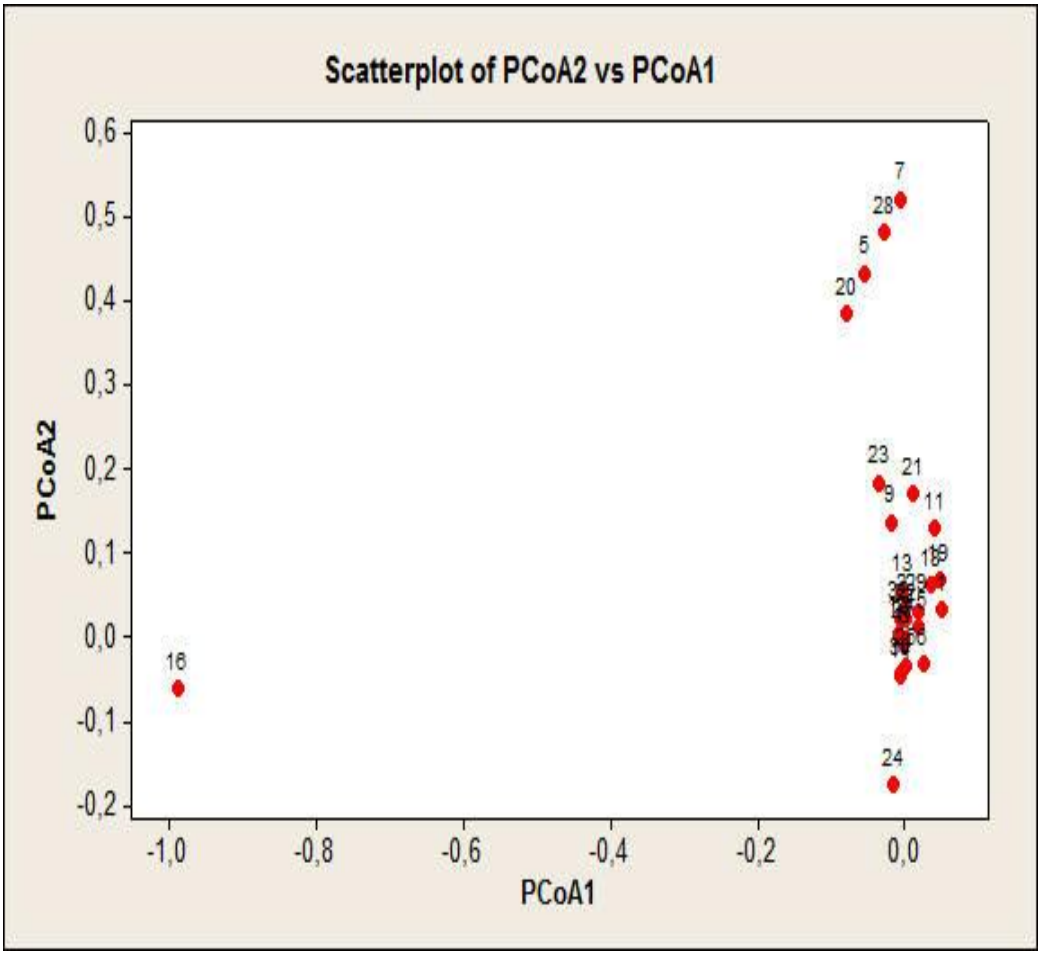


Şekil.4.3.3.2. Yerel mor havuç genotiplerinde AFLP verileriyle yapılan temel bileşenler analizi sonucu elde edilen üç boyutlu grafik.

PCoA analizi ayrıca MİNİTAB 14 programı ile de yapılmıştır. Farklı bir veri girişi kabul eden bu programda elde edilen analiz sonucu NTSYS programı sonucuna göre bazı farklılıklar göstermekle birlikte genel olarak aynı kümelemeleri meydana getirdiği gözlemlenmiştir. İki boyutlu bu analizde bilhassa 16 nolu genotip farklı konumlanması ile dikkat çekmiştir. Birinci koordinata göre uzak bir noktada konumlanan bu genotip NTSYS

pc programında aynı grup içinde yer almıştır. Buradaki farklılık MİNİTAB14 programının eksik veri girişine müsaade etmiyor olmasıyla açıklanabilir.

Sonuç olarak, AFLP analizi sonucu kümeleme analizi ile üretilen dendogramda genotipler arasındaki genetik akrabalığın görünümü, PCoA yöntemiyle de tutarlı sonuç vermiştir (Şekil.4.3.3.3). PCoA analizi ile genotipler arasındaki genetik mesafe net olarak görülmektedir. 16, 7, 28, 20 ve 5 nolu genotipler yine diğer genotiplerden uzakta yer alarak genetik farlılıklarını ortaya koymuşlardır. Onları takip eden 23, 21, 9, 11 nolu genotipler de diğerlerine oranla daha az benzerlik göstererek dendogramlarla benzer sonuçlar vermişlerdir.



Şekil.4.3.3.3. Yerel mor havuç genotiplerinin PCoA analizi

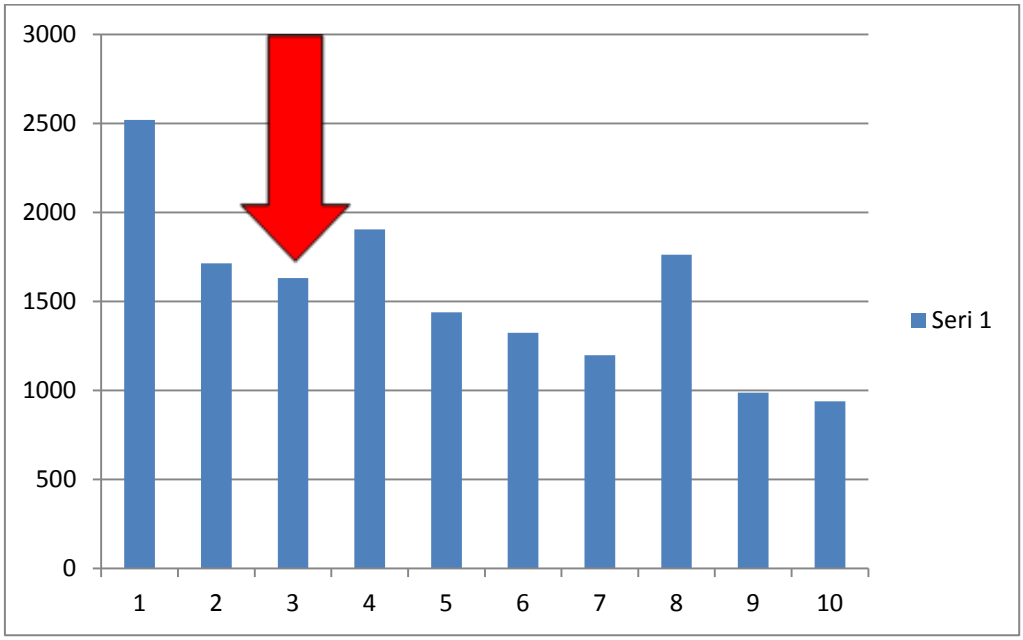
4.4. Verilerin Düzenlenmesi ve STRUCTURE Programının Kullanılması

Populasyon yapısı analiz edilerek bireyleri alt populasyonlara ayırmak için STRUCTURE programı kullanılmış (Mohammadi ve ark., 2003) ve Q matrixler oluşturulmuştur. Programda 27 birey, 148 polimorfik bant kullanılarak varsayılan alt populasyon sayısı 1'den 10'a kadar belirlenmiş, 50.000 tekrar ile 50.000 yakma periyodu uygulanmıştır.

STRUCTURE programı, populasyonun yapısını analiz ederek populasyonu oluşturan bireyleri alt populasyonlara ayırarak Q matrix oluşturur. 1-10 arasında belirlenen alt populasyon sayısı (k) 5 kez bağımsız hesaplama yapılmış ve excel programında bu değerlerin ortalaması alınarak grafik elde edilmiştir.

4.4.1. Alt Populasyon Sayısının Belirlenmesi

Alt populasyon sayısını en iyi belirlenme yöntemi grafikte en alt noktaya düşüp tekrar yükselmeye başladığı nokta olarak belirlenmiştir (Barkley ve ark**.,** 2006**).** Bizim çalışmamızda bu nokta üçüncü sütun olarak belirlenmiş yani alt populasyon sayısı üç olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.4.1. Yerel mor havuç genotiplerinin alt populasyon sayısı

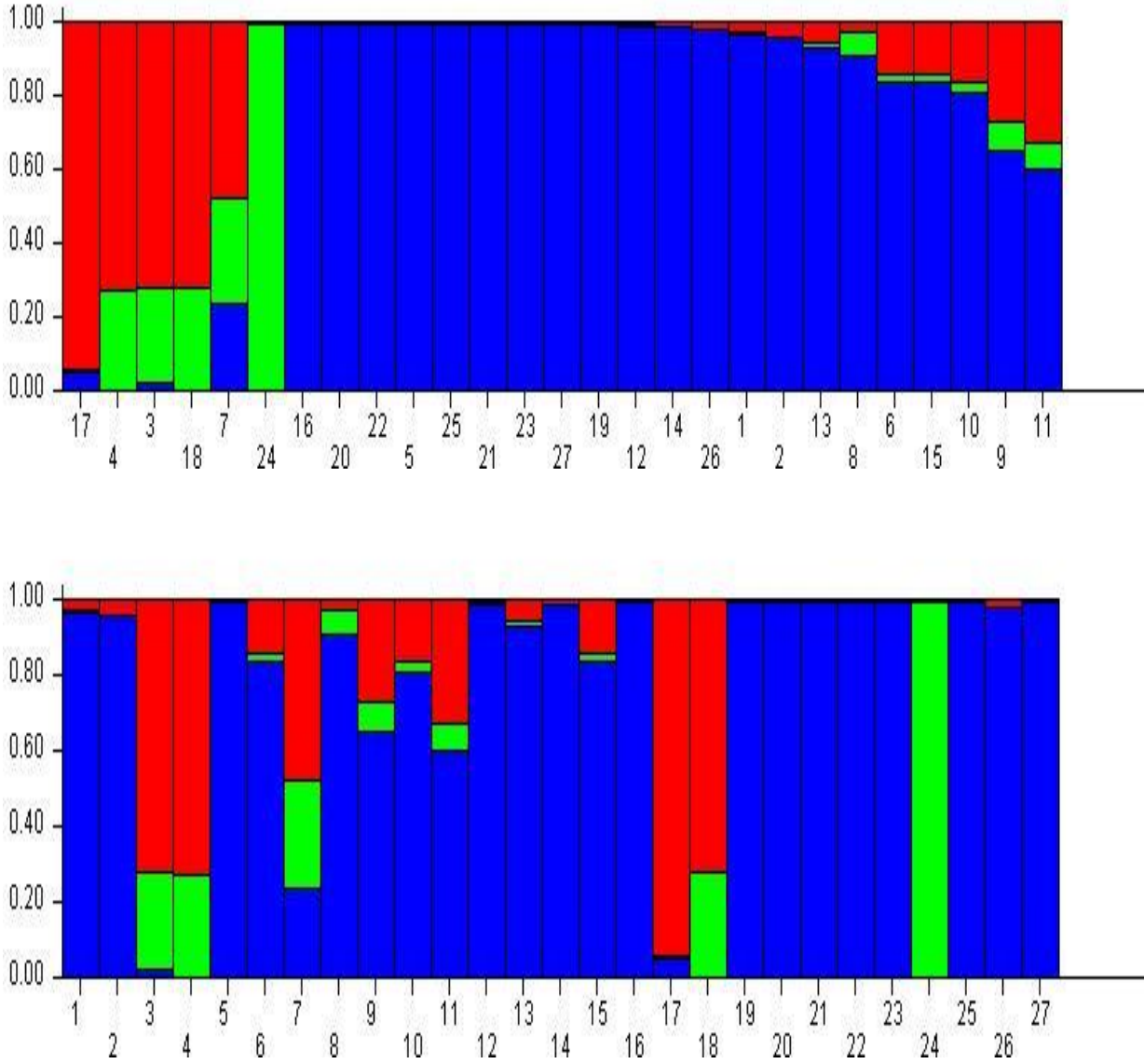
4.4.2. Her Populasyon İçin Havuç Genotiplerinin Üyelik Katsayılarının Belirlenmesi

Structure programı ile yapılan analiz sonucunda her populasyon için havuç genotiplerinin üyelik katsayıları ortaya çıkmıştır. 27 yerel mor havuç genotipinin üç populasyon varsayıldığında populasyonlara dağılımı ve üyelik katsayıları belirlenmiştir.

Tablo.4.4.2.1. Structure programında elde edilen populasyonlara katılım oranları

Genotip no	Populasyon1	Populasyon2	Populasyon3
1	0.027	0.003	0.970
32	0.040	0.002	0.958
23	0.721	0.253	0.026
20	0.722	0.277	0.001
15	0.001	0.002	0.997
29	0.141	0.023	0.836
5	0.478	0.286	0.236
22	0.026	0.065	0.909
9	0.266	0.082	0.652
24	0.158	0.034	0.807
21	0.325	0.070	0.605
17	0.006	0.003	0.990
19	0.054	0.011	0.935
18	0.011	0.002	0.987
11	0.140	0.023	0.836
6	0.001	0.001	0.998
7	0.942	0.004	0.053
28	0.716	0.283	0.001
25	0.003	0.003	0.994
27	0.001	0.001	0.998
30	0.002	0.003	0.996
2	0.001	0.001	0.998
3	0.002	0.002	0.996
16	0.002	0.996	0.003
14	0.001	0.001	0.997
13	0.015	0.003	0.982
12	0.002	0.002	0.996

Üyelik katsayısı 0.80 ve üstü olan bireyler saf olarak değerlendirilir ve melezleme çalışmalarında önemli bir materyaldir. 0.79 ve altı bireyler hibrit olarak değerlendirilmektedir.



Şekil.4.4.2.1. STRUCTURE programından elde edilen üyelik katsayılarının grafiksel gösterimi

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Mısır ve Türkiye başta olmak üzere mor havuç tarımı Dünya'da yaygınlaşma eğilimindedir. Türkiye'de, özellikle Konya Ereğli bölgesinde mor havuç önemli bir ekonomik değere sahiptir. Mor havucun önemi hem dünya genelinde hem de ülkemizde giderek artmış ve artmaya devam edecektir. Mor kök rengine sahip havuçların giderek yaygınlaşmasının temel sebeplerinden biri de insan sağlığı açısından sahip olduğu avantajlardır. Mor havuç içerdiği karotenoidler, şeker, mineraller ve antioksidan ve antitoksinler bakımından oldukça değerlidir. Ancak özellikle mor havuçta yerel populasyonlarla üretim yapılması nedeniyle başta erken çiçeklenme olmak üzere pek çok tohumluktan kaynaklanan sorun çözüm beklemektedir. Bu problemlerin çözümü ile mor havuçta üretim alanları özellikle birim alandan elde edilecek ürünün niteliği ve niceliği artacak ve havuç daha karlı bir ürün haline gelebilecektir.

Ülkemizde yetiştirilen mor havuçlar yerel populasyonlar şeklindedir ve hiçbir ıslah çalışması geçirmemiştir. Şekil, irilik, renk yoğunluğu ve verimlilik bakımından varyasyon göstermektedirler. Türkiye'de mor havuç populasyonları hala kullanılmakta ve bu durumda yerel gen kaynaklarının kayıt altına alınması ve mor havuç ıslah programlarının başlatılabilmesi açısından bir avantaj olarak görülmektedir. Bu nedenle yaygın mor havuç üretimi yapılan bu bölgede mevcut olan populasyonların toplanıp özelliklerinin belirlenmesi, yerel populasyonların geleceğini garanti altına alırken, gelecekte yapılacak ıslah çalışmalarına da ışık tutacaktır. Havucun yabancı döllenen ve iki yıllık bir bitki olması seleksiyonun etkinliğini kısıtlamakta, süresini uzatmaktadır. Bu zorluklar göz önüne alındığında ıslah süreci uzamaktadır. Eğer mor havuç ıslahında biyoteknolojik yöntemlerden faydalanılabilirse, ıslah süreci için bu bir avantaj olabilir.

Bu çalışmada AFLP yöntemi ile mor havuç populasyonlarındaki varyasyonun sınırları belirlenmeye çalışılmıştır. Bu amaçla yerel mor havuç populasyonları ile üretim yapılan Hatay, Konya-Merkez, Konya-Çumra, Konya-Ereğli bölgelerinden 27 adet populasyon bu çalışmada materyal olarak kullanılmıştır. Oluşturulan dendograma göre yerel mor havuç genotiplerinin kendi aralarındaki benzerlik 0.34 ile 0.93 arasında değişmiştir. Dendograma göre yerel mor havuç genotiplerinde genel olarak iki ana kol oluşmuştur. Bunlardan ilki tek bir genotiple temsil edilen 20 nolu genotip örneğinin oluşturmuş olduğu koldur. 20 nolu genotip kümeleme analizinde diğer tüm örneklere uzak bir akrabalık sergilemiştir. Bu örneğin benzerlik katsayısı 0.34 olmuştur. Ek olarak 5, 7,

16, 28 ve 20 nolu genotipler sırasıyla ana populasyona daha az benzerlik göstermişlerdir. Bu çalışmada belli bölgelerimizden toplanan numuneler arasında genetik varyasyona dayalı olarak gen kaynağı niteliğinde kullanılabilecek mor havuç genotiplerinin varlığı belirlenmiştir. Mevcut genotiplerimiz ağırlıklı olarak 0.8 civarında Jaccard benzerlik katsayısına sahip çıkarken bazı genotiplerde bu oranın 0.70'in altına düşmüş olması, tür içi varyasyondan belli ölçülerde yararlanılabileceğini göstermesi açısından önemlidir.

Orta Anadolu orijinli yerel mor havuç genotiplerinin, belli sınırlar içinde bir genetik varyasyonu barındırdığı görülmüştür. Gerek çiçek yapısı, gerekse yabancı tozlanma oranı göz önüne alınırsa, havuçta genetik havuzun geniş olması beklenilen bir durumdur. Bu çalışmada sınırlı sayıda örnekle çalışılmış, ancak buna rağmen genetik havuzumuzun yapısı hakkında bilgi edinilmiştir. Bu çalışmanın ışığında daha fazla bölgeden daha çok örnek toplanarak yerel mor havuç genotiplerimizin muhafaza edilmesi gelecekte yapılacak ıslah çalışmalarına katkı sağlayacaktır.

Elde edilen sonuçlarla gelecekte başlatılacak mor havuç ıslah programları için değerli bilgiler elde edilmiş olacağı düşünülmektedir. Yaptığımız bu çalışma ile yerel mor havuç genotiplerimizin genetik ilişkileri ortaya konmuştur. Elde edilen sonuçlar, tez çalışmasında yer alan yerel mor havuç genotiplerinin genetik potansiyellerinin geliştirilmesine yönelik çalışmalarda önemli bir kaynak olacaktır.

6. KAYNAKLAR

Ağaoğlu, Y.S., Ergül, A., 1999, Amasya üzüm çeşidi ekotiplerinin RAPD markörlerle genetik tanımlanmaları, *Türkiye III. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi*, 14-17 Eylül, Ankara, 369-372.

Anonim, 2014, Türkiye istatistik kurumu http://www.tuik.gov.tr [Ziyaret Tarihi: 02.12.2014]

Badenes, M.L., Parfitt, D.E., 1998, Phylogeny of the genus pistacia as determined from analysis of the chloroplast genome. *FAO-Nucis-Newsletter*, 7:25-26.

Banga,O., 1957, Origin of the European cultivated carrot, *Euphytica* 6:54-63

Bradeen James M., Bach Inga C., Briard M., Clerc Valerie L., Dariusz G., Senallik Dougles A., Simon Philipp W., 2002, Molecular diversity analysis of cultivated carrot (*Daucus carota L.*) and wild *Daucus* populations reveals a genetically nonstructured composition, *J.Amer. Soc. Hort. Sci*., 127(3):383-391.

Cansian, R.L., Echeverrigaray, S., 2000, Discrimination among cultivars of cabbage using randomly amplified polymorphic DNA markers, *HortScience*, 35(6):1155-1158.

Duvick, D.N., 1996, Plant breeding, an evolutionary concept, *Crop Sci*., 36:539-548.

Ekbiç, E., Abak, K., Büyükalaca, S., Yılmaz, M.A., 1999, Biberde patates Y Virüsü'ne (PVY) dayanıklılık özelliği için RAPD markır'ların araştırılması, *Türkiye III. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi*, 14-17 Eylül, Ankara, 449-463.

Gilbert, J.E., Lewis, R.V., Wilkinson, M.J., Caligari, P.D.S., 1999, Developing an appropriate strategy to asses genetic variability in germplasm collection, *Theor. Appl. Genet*., 98:1125-1131.

Goldman, I.L., Paran I. ve Zamir, D., 1995, Quantitative trait locus analysis of a recombinant ınbred line population derived from a *Lycopersicon esculentum* x *Lycopersicon cheesmanii* cross, *Theor. Appl. Genet*., 90:925-932.

Göçmen, M., Çakır, C., Tör, M. ve Polat, İ., 1999, Kara Limon ve İtalyan Memeli limon çeşitlerinin RAPD markörlerle genetik farklılığının tespiti, Türkiye *III. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi*, 14-17 Eylül, Ankara, 1-5.

Göçmen, M., Polat, İ., Özçelik, N., Ekiz, H., 1999, Domateslerde (*Lycopersicon esculentum* Mill.) DNA parmakizlerinin RAPD markörlerle belirlenmesi, *Türkiye III. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi*, 14-17 Eylül, Ankara, 469-473.

Günay, A., 1993, Özel Sebze Yetiştiriciliği Cilt V. Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi. Ankara, 117 s.

Kammerer, D. , Carle, R. , Schieber, A. , Characterization of phenolic acids in black carrots (Daucus carota ssp sativus var. atrorubens Alef.) by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry, 2004, *Rapid Commun. Mass Spectrom 18*: 1331–1340

Barkley NA, Roose ML, Krueger RR, Federici CT., 2006, Assessing genetic diversity and population structure in a citrus germplasm collection utilizing simple sequence repeat markers (SSR), *Theor Appl Genet*, 112:1519–1531.

Clerc V. L., Suel A., Brıard M., 2005, Identification of duplicates for the optimizationof carrot collection management, *Biodiversity and Conservation 14*: 1211–1223.

Grzebelus D., Senalık D., Jagosz B., Sımon P. W., Mıchalık B., 2008, The use of AFLP markers for the identification of carrot breeding lines and F1 hybrids, *Plant Breeding* ; 120(6):526 - 528.

Grzebelus D., Senalık D., Jagosz B., Sımon P. W., Mıchalık B., 2001, The use of AFLP markers for the identification of carrot breeding lines and F1 hybrids, *Plant Breeding*, 120 (6)

Havey, M.J. 1991, Phylogenetic relationships among cultivated allium species from restriction enzyme analysis of chloroplast genome, *Theor. Appl. Genet*. 81:752.

İncirli, A., Bilgiç, H., Akkaya, M. S. 2001, Assessment of polymorphic AFLP markers in *Triticum durum* and *Aegilopsp., Turk J. Biol*. 25: 291-299.

Lee, M., 1995, DNA markers and plant breeding programs, *Advances in Agronomy*, 55:265-344.

Li, G., Quiros, C.F., 2000, Use of amplified fragment length polymorphism markers for celery cultivar ıdentification, *HortScience*, 35(4):726-728.

Mohammadi, S. A., Prasanna, B. M., 2003, Analysis of genetic diversity in crop plants-salient statistical tools and considerations. *Crop Science*., 43: 1235-1248.

Morelock, T.E., Sımon, P.W., Peterson, C.E., 1996, Wisconsin wild: another petaloid male-sterile ctoplasm for carrot, *Hortscience*, 31:887-888.

Onus, A.N., 1999, Capsicum'da bazı marker genler arasında linkage çalışmaları. *Türkiye III. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi*, 14-17 Eylül. Ankara: 474-477.

Onus, A.N., 1999, Üç farklı capsicum türünün (*C. annum, C. chacoense, C. baccatum*) izoenzim markırları ile tanılanması. *Türkiye III. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi.* 14-17 Eylül. Ankara. 454-455.

Park, Y.H., Şensoy, S., Wye, C., Antonise, R., Peleman, J., ve Havey, M.J., 2000, A genetic map of cucumber composed of RAPDs, RFLPs, AFLPs, and loci conditioning resistance to papaya ringspot and zucchini yellow mosaic viruses, *Genome*, 43:1003-1010.

Paterson, A.H. ve Wing, R.A., 1993. Genome Mapping in Plants. *Current Opinion in Biotechnology*. 4:142-147.

Peterson, C.E., Simon, P.W., 1986, Carrot Breeding. In: Breeding Vegetable Crops, *Edit. Mark J.B*., 321-356.

Polat, İ., Göçmen, M. ve Onur, C., 1999, Trabzon hurması (*Diospyros kaki* L.) tiplerinin RAPD markörlerle belirlenmesi, *Türkiye III. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi*. 14-17 Eylül. Ankara. 22-26.

Rafalski, J.A., Tingey, S.V., 1993, Genetic diagnostics in plant breeding, RAPDs, microsatellites and machines, *TIG*. 9(8):275-280.

Rakoczy M., Bolıbok H., 2004, Characterıstıcs and a comparıson of three classes of microsatellıte-based markers and their application in plants cellular & molecular biology letters, *Volume 9*, 221 – 238

Reddy P. M., Sarla N., Siddiq E.A., 2002 Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding, *Euphytica* 128: 9–17

Rubatzky, V.E., Quıros, C.F., Sımon, P.W., 1999, Carrots and related vegetable umbelliferae, crop production science in horticulture, *CABI Publishing*, 7: 1-8

Sáenz Laín, C., 1981, Research on *Daucus L*. (Umbelliferae), *Anales Jardin Botanico, De Madrid* 37: 481-533.

Sevindik E., Coşkun F., Çetiner N.,G., Selvi,S., Şahin N., The genomic DNA isolation methods comparative analysis upon some *Sideritis (Labiateae) And Serratula (Asteraceae) Taxa, Biological Diversity and Conservation* 6/2, 16-21

Simon P.W., Boiteux L.S. ,Belter J.G., Roberts P.A., 2000, RAPD linkage map of the genomic region encompassing the root-knot nematode (*Meloidogyne Javanica*) resistance locus in carrot, *Theor Appl Genet*, 100:439–446

Simon,P.W., Goldman, I.L., 2006, Carrot ın: singh r.j. (ed) genetic resources, chromosome engineering, and crop ımprovement, *Vegetable Crops, CRS Press,* 3:497-517.

Staniaszek M., Habdas H. RAPD technique application for intraline evaluationof androgenic carrot plants, *Folia Horticulturae Ann*., 18/2, 2006, 87-97

Staub, J.E., Box, J., Meglic, V., Horejsi, T., Mc Creight, J.D., 1997, Comparison of ısozyme and random amplified polymorphic DNA data for determining ıntraspecific variation in cucumis, *Genetic Resources and Crop Evaluation*. 44:257-269.

Staub, J.E., Danin-Poleg, Y., Fazio, G., Horejsi, T., Reis, N. Ve Ktzir, N., 2000, Comparative analysis of cultivated melon groups (*Cucumis melo* L.) using random amplified polymorphic DNA and simple sequence repeat markers, *Euphytica*. 115:225-241.

Steın, M., Nothnagel, T., 1995, Some remarks on carrot breeding (*Daucus Carota Ssp. Sativus Hoffm.). Review. Plant Breed.*, 114:1-11.

Tanskley, S.D., Young, N.D., Paterson, A.H., Bonierbale, M.W., 1989, RFLP mapping in plant breeding: new tools for an old science, *Biotechnology*. 7:257-264.

Thompson, D.J., 1962, Natural cross pollination in carrots, *Proc. Am. Soc. Hort. Sci*., 81: 332:334.

Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. ve Zabeau, M., 1995, AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids. Res*., 23(21):4407-4414..

Waugh, R., Powell, W., 1992, Using RAPD markers for crop improvement, *TIBTECH*. 10:186-191.

Winter, P. ve Kahl, G., 1995, Molecular marker technologies for plant ımprovement. *World J. Microbio. & Biotech*.,11:438-448.

Yang, X., Quiros, C., 1993, Identification And classification of celery cultivars with RAPD markers, *Theor. Appl. Genet*. 86:205.

Yeun-Kyung Chang, 2008, Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis of genetic variability in phalaenopsis, Doktora Tezi, *Blacksburg, Virginia*

Yıldız, M.,2009, Havuçlarda Antosiyanin Sentezlenmesini Etkileyen Genlerin Biyosentezi İle Mor Ve Sarı Renkleri Veren P1 Ve Y2 Genlerinin Haritalanması, Doktora Tezi, *Çukurova Üniversitesi,Fen Bilimleri Enstitüsü*, Adana

Zietkiewicz, E., Rafalski, A., Labuda, D., 1994, Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification, *Genomics 20*, 176-183

ÖZGEÇMİŞ

1. KİŞİSEL BİLGİLER

DÜZENLEME TARİHİ : 07.11.2014
ADI SOYAD : Akife DALDA ŞEKERCİ
YAZIŞMA ADRESİ : Batı Hadimi Mah. Laleci Sk. Nihavend Konutları 33/1 Meram/KONYA
DOĞUM TARİHİ ve YERİ: 1990- Meram
TEL: 05064536075 **E-POSTA :** akidal_@hotmail.com

2. EĞİTİM BİLGİLERİ

ÖĞRENİM DÖNEMİ	DERECE	ÜNİVERSİTE	BÖLÜM
2012	Yüksek Lisans (devam ediyor)	Selçuk Üniversitesi	Bahçe Bitkileri Bölümü (Sebze Yetiştiriciliği ve Islahı ABD)
2008	Lisans	Selçuk Üniversitesi	Bahçe Bitkileri Bölümü

3.YABANCI DİL

İngilizce