T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Orta Anadolu Kökenli Mor Havuç Genotiplerinin Moleküler Karakterizasyonu

Hilmiye ERİŞDİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

Haziran-2015
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

TEZ BİLDİRİMİ

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

DECLARATION PAGE

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

Hilmiye ERİŞDİ

Tarih: 21.07.2015

ÖZET

YÜKSEK LİSANS

Orta Anadolu Kökenli Mor Havuç Genotiplerinin Moleküler Karakterizasyonu

Hilmiye Erişdi

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman: Prof.Dr. Önder Türkmen
2015, 31 Sayfa

Jüri
Danışmanın: Prof.Dr. Önder TÜRKMEN
Üye: Prof. Dr. Mustafa PAKSOY
Üye: Prof. Dr. Suat ŞENSOY

Mor havucun meyve suyu ve doğal gıda boyası olarak kullanımının artması ile dünya endüstriyel pazarındaki önemi artmaktadır. Ülkemizde de yetiştiriciliği gün geçtikçe artmakta olan mor havuç başta Konya ili Ereğli ilçesi olmak üzere son dönemde özellikle İç Anadolu'da yaygınlaşan bir sebze türüdür. Ülkemizde mor havuç üzerinde bu güne kadar önemli bir ıslah çalışması gerçekleşmemiştir. Bu kapsamda Hatay, Konya-Merkez, Konya-Çumra, Konya-Ereğli bölgelerinden temin edilen mor havuç genotipleri ISSR (Inter-Simple Sequence Repeats) yöntemiyle tanımlanmaya çalışılmıştır. Bu çalışmadan elde edilen çıktılar, mor havuç populasyonlarının kendi aralarındaki zenginliğini göstermek için ve ileride yürütülecek kapsamlı ıslah çalışmalarında yol gösterici olacaktır.

Çalışmada 23 adet mor havuç genotipi kullanılmıştır. Bu genotiplerin oluşturduğu havuzun moleküler karakterizasyonunu gerçekleştirmek için PCR temelli bir markör sistemi olan ISSR yöntemine başvurulmuştur. Bu kapsamda 24 adet ISSR primeri test edilmiş ve polimorfik band sonucu veren 12 ISSR primeri ile polimorfizm oranına bakılmıştır. Moleküler karakterizasyon için mor havuç genotiplerinin her birinden rastgele seçilen (bir birey) aynı bireyinde içinde yer aldığı bir bulk grubu oluşturulup çalışma ayrı ayrı gerçekleştirilmiştir. Bulk gruplarında 7 farklı bireyin DNA örnekleri eşit miktarda karıştırılmıştır. ISSR markörleri ile yapılan tarama sonucunda elde edilen polimorfik bantlar var-yok esasına göre skorlanmış ve bu skorlardan basit eşleştirme (simple matching coefficient) katsayısına göre elde edilen matriksten NTSYS PC 2.1 paket programı ile dendogram üretilmiştir. Buna göre, bireysel gruplar arasında toplam polimorfizm oranı %92.00 bulk grupları arasında toplam polimorfizm oranı ise %73.88 olmuştur.

Anahtar Kelimeler:*Daucus carato L.*, , Mor havuç, Genetik çeşitlilik, Moleküler karakterizasyon.

ABSTRACT

MSc THESIS

Molecular Characterization of Purple Carrot Originated from Central Anatolia

Hilmiye ERİŞDİ

The Graduate School of Natural and Applied Science of Selçuk University
The Degree of Master of Science
In Horticultural Department

Advisor: Prof.Dr. Önder TÜRKMEN

2015, 31Pages

Jury
Advisor: Prof. Dr. Önder TÜRKMEN
Jury: Prof. Dr. Mustafa PAKSOY
Jury: Prof.Dr. Suat ŞENSOY

Due to the increase in the usage of purple carrot in the juice industry and in food coloring area, demand of World food industry on this material keeps increasing. In Turkey, the purple carrot and the cultivation of this vegetable keeps gaining ground especially in Ereğli town of Konya region in Central Anatolia, up to date, no important breeding study is available. In this respect, the current study focused on molecular characterization of genotypes collected from the regions of intensive cultivation of the crop, including Hatay, Konya-Center, Konya-Çumra and Konya-Ereğli. Results of this study will shed light on the genetic diversity between populations guiding comprehensive future breeding processes.

Twenty three purple carrot genotypes were utilized in the molecular characterization of the pool using a PCR based marker system, namely ISSR (Inter-Simple Sequence Repeats). In total, 24 ISSR primers were tested, 12 of which were found polymorphic. One random individual from each population (Individual Group) and a set of 7 individuals, including the random sample of the Individual Group, comprising another group with equal DNA contribution from every sample (Bulk Group) were arranged for molecular characterization. The polymorphic bands were scored according to the presence and absence of a specific size fragment and simple matching coefficient was used for the matrix to dendrogram using NTSYS PC 2.1 software. According to the result obtained, the total polymorphism of the Individual group was 92%, while that of the Bulk group was found to be 73.88%.

Keywords: *Daucus carato***,** Purple carrot, Genetic diversity, Molecular characterisation.

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim boyunca yanımda olan her konuda yardım ve desteğini esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Önder TÜRKMEN'e ve araştırmanın yüksek lisans tezi olarak planlanıp yürütülmesinde ve sonuçların değerlendirilmesinde bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen Prof. Dr. Erdoğan Eşref HAKKI' ya sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım**.**

Laboratuar çalışmalarımda yardımlarını esirgemeyen sevgili arkadaşlarım biyolog Fatma AKIN, biyolog Hasan CAN'a teşekkür ederim.

Her konuda yanımda olan ve desteğini esirgemeyen değerli aileme sonsuz teşekkür ederim.

Hilmiye ERİŞDİ
KONYA-2015

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **iv**

ABSTRACT ..... **v**

ÖNSÖZ ..... **vi**

İÇİNDEKİLER ..... **vii**

SİMGELER VE KISALTMALAR ..... **viii**

1. GİRİŞ **1**

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI **3**

3. MATERYAL VE YÖNTEM **9**

3.1. Materyal 9
3.2. Yöntem 9
3.2.1. DNA İzolasyonu 9
3.2.2. Bulkların oluşturulması 10
3.3. Spektral yöntem 10
3.4. PCR uygulamaları 11
3.5. Elektroforetik Yöntemler 14
3.6. Skorlama ve İstatistik Analizleri 14
3.6.1. Verilerin Üretilmesi 14
3.6.2. Verilerin Değerlendirilmesi 14

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA **15**

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER **27**

5.1. Sonuçlar 27
5.2. Öneriler 28

6.KAYNAKLAR **29**

ÖZGEÇMİŞ **29**

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

$MgCl_2$: Magnezyum klorür

mM : Milimolar

ng : Nanogram

°C : Santigrat derece

sn : saniye

T :Timin

U : unit-ünite

µl : Mikrolitre

Kısaltmalar

AFLP : (Amplified Fragment Length Polymorphism)-Çoğaltılmış Parça Uzunluğu Farklılığı

CTAB : Cetil Three Metil Amonyum Bromid

ISSR : (nter Simple Sequence Repeat)-İç Basit Dizi Tekrarları

DNA : Deoksiribonükleikasit dNTP - Deoksiribonükleotidtrifosfat

EDTA : Etilen Diamin Tetra Asetik Asit

PCR : (Polymerase Chain Reaction)-Polimeraz Zincir Reaksiyonu

ISSR : (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)-Aritmetik Ortalama kullanılarak Ağırlıksız Gruplama Yöntemi

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

MAS : (Moleküler destekli seleksiyon)

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).

Kültürü yapılan havuçlar genel olarak turuncu renkli havuçlardır. Mor havucun İran ve Afganistan'da yerel çeşit olarak yaklaşık 5000 yıldır yetiştirildiği bilinmektedir. Türkiye'ye yaklaşık 1000 yıl önce ulaştığı düşünülmektedir. Türkiye için önemli olan mor havuç üretiminde halen yerel popülasyonlar kullanılmaktadır. Son dönemde taze tüketiminin yanında, meyve suyu ve doğal gıda boyası olarak mor kök rengine sahip havuçlar dünya piyasasında önemli bir yer edinmeye başlamıştır. Özellikle ülkemizde yetiştiriciliği gün geçtikçe artmaktadır. Türkiye'de 2013 yılı verilerine göre 108.643 da alanda 569.855 ton havuç üretimi yapılmıştır. Örneğin, havuç üretiminin hemen hemen tamamına yakını mor havuç olan ve havuç üretiminde önemli bir bölgeyi temsil eden Konya Ereğli bölgesinde 10.000 da alanda 40.000 ton havuç üretimi gerçekleşmiştir (Anonim, 2015).

Mor havucun yararlı bileşenleri açısından büyük bir yelpazesinin olduğu bilinmektedir. Mor havuç, turuncu havuçtan 12 kez, sarı havuçdan 28 kez daha fazla antioksidan içerir ve önemli bir antosiyanin kaynağıdır. A, B ve C vitaminleri açısından zengin olduğu bilinmektedir. Mor havuç 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 şekerler büyük oranda sakkarozdur (Günay, 1993).

Ülkemizde yetiştiricilikte kullanılan mor havuçlar yerel populasyonlardan elde edilmektedir. Yerel populasyonların üreticiler açısında en büyük sıkıntısı meyve şeklinin, iriliğinin, rengin ve verimin üniform olmamasıdır. Bir sonraki nesile mor havuç tohumu üretimi sağlamak için yüksek konsantrasyonda mor renk içeren bitkiler özensizce seçilerek tohumluk üretimine alınırlar. Havucun yabancı döllenen ve iki yıllık

bir bitki olması seleksiyon etkinliğini kısıtlamakta ve 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.

Ülkemizde turuncu havuç üretiminde hibrit tohum kullanımı oldukça yagındır. Ama mor havuçta henüz hibrit tohumhemen hemen hiç kullanılmamaktadır. Özellikle Anadolu mor havuç yerel populasyonları açısından zengin bir genetik çeşitliliğe sahiptir. Bu nedenle yaygın mor havuç üretimi yapılan bu bölgede mevcut olan populasyonların toplanıp özelliklerinin belirlenmesi ve kayıt altına alınması ile yerel populasyonlar korumaya alınırken, gelecekte yapılacak ıslah çalışmalarına da katkı sağlanabilecektir. Bu çalışmada; ISSR yöntemi ile Türkiye'de mor havuç populasyonlarındaki varyasyonun sınırları belirlenmeye çalışılmıştır. Bu amaçla yerel mor havuç populasyonları ile üretim yapılan Hatay, Konya-Merkez, Konya-Çumra, Konya-Ereğli bölgelerinden 23 adet populasyon bu çalışmada bitkisel materyal olarak kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar ile gelecekte başlatılacak mor havuç ıslah programları için değerli bilgilerin üretildiği düşünülmektedir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Havuç bir serin iklim sebzesidir. Özellikle çimlenme ve sonrasındaki erken dönemde soğuklara karşı toleransının yüksek olması nedeniyle serin bölgelerimizde erken ilkbahar aylarında ılıman bölgelerimizde ise kış aylarında rahatça yetiştirilebilmektedir (Kiracı ve Padem, 2015).

Havuç bir uzun gün bitkisi olup optimum sıcaklık isteği 16-18°C' dir, minimum sıcaklık isteği 9°C, maximum sıcaklık isteği ise 28°C olup, -5°C ile -7°C'leri arasında donma başlar. Sıcaklık havuçta renk oluşumuna olumlu etki yapar. Soğuk ve yağışlı geçen üretim sezonlarında açık renk havuç elde edilir. 10-15 °C'lik sıcaklıklarda oluşan renk tatmin edici bir havuç rengi olmaz. Sıcaklık kök oluşumuna doğrudan etkili olup yüksek sıcaklıklarda havuç boyu kısa kalır. Düşük sıcaklıklarda ise havuç boyu çeşit özelliğini gösterse de bu defa renk ve havucun çapı kötü yönde gelişir. Daha uzun ve açık renkli havuçlar meydana gelir. Fazla yağış havuç da olumsuz etki yapar. Fakat nemin olumlu bir etkisi vardır. Toprak rutubeti de havuç gelişmesine etki ederse de etkisi sıcaklığın etkisi kadar olmaz. Özellikle kuraklıkta yüksek sıcaklık ve rutubet düşük sıcaklık ile birleşirse havuç üretimini olumsuz yönde etkiler. En iyi gelişme 20°C civarındaki sıcaklıklar da olur. Sıcak bölgelerde yapılan ilkbahar üretiminde bitkilerin önemli bir bölümünün yeterli büyüklükte havuç oluşturmadan generatif faza geçerek çiçeklendiği görülür (Lu ve ak., 1995).

Stein ve Nothnagel (1995)'a göre havuçta ıslah amaçları arasında, üründe homojenlik ve kalite, hastalık ve zararlılara dayanıklılık ile erken çiçeklenme eğiliminin azaltılması gibi kriterlerin yanında yüksek besin içeriği, yüksek lezzet ve aroma gibi özelliklerin de ıslah çalışmasında temel alınması gerekmektedir.

Havuç köklerinde çatallaşma, kaliteyi ve verimi azaltan önemli bir unsurdur. Yeşil omuzluluğun da verim ve kalite azalışlarına neden olmasından dolayı istenilmeyen bir durum olduğu vurgulanmıştır. 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).

Havuçta, çiçekler erselik yapıda olmakla birlikte aynı şemsiye üzerinde iç kısımlarda yer alan çiçeklerden önemli bir bölümünün sadece erkek organları gelişmiştir. Şemsiye de dıştan içe doğru sadece erkek organı gelişen çiçeklerin yüzde

oranı artmaktadır. Bir bitki üzerinde sadece dişi organlı, sadece erkek organlı veya erselik çiçeklere rastlanabilmektedir. Döllenme pek çok böceğin ve sineklerin yardımı ile olur. Çiçeklerde yüksek oranda protandri görülür. Tepecik reseptif hale gelinceye kadar bütün polen tozu keseleri patlayarak tozlarını dökmüş olurlar. Havuçta kendine kısırlık tespit edilmemiştir. Bir bitkinin farklı çiçekleri birbirini kolayca döller ve tohum elde edilebilir. Tohum üretiminde yabancı döllenmeyi engellemek için izolasyon mesafesi en az 500 m olarak verilmelidir. *Umbelliferae* familyasının çiçek yapısı gereği çiçeklenme şemsiyenin dış kısmından başlar önce en dıştaki çiçekler açar ve içe doğru devam eder. Çiçeklenmeye paralel olarak devam eden kademeli tohum olgunluğu nedeniyle bazı tohumlar tam olgunlaşmadan hasat edilir. Özellikle tohumları geç çimlenen türler içinde yer alan havuç tohumlarındaki bu kademeli olgunlaşma ve bazen dış şartlar altında tohumlarda görülen sekonder tohum dinlenmesi nedeniyle çimlenme/çıkış geç ve düzensiz olmaktadır (Duman ve ark, 1995).

Havuç tohumla üretilen, iki yıllık, açık tozlanan, diploid bir sebze türüdür. Tanımlanan 22 *Daucus* türünün olduğu, bu türlerin hemen hemen tamamı diploid yapıda ve temel kromozom sayıları x=9 ile x=11 arasında değiştiğini bildirilmektedir. *Daucus carota*, *Daucus capillifolus* ve bazı Güney Akdeniz türleri 2n=2x=18 kromozom sayısına sahiptirler . 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, 1993). Havuçta yüksek oranda protandri görüldüğünden dolayı yüksek oranda yabancı döllenme görülür. Kendine döllenme %15 civarındadır (Stein ve ark., 1995).

Havuç ıslahçıları seleksiyonda dikkat edilecek en önemli özelliğin erken çiçeklenme eğilimi (sapa kalkma) olduğunu vurgulamaktadır (Peterson ve Simon, 1986). Düşük sıcaklıklara bir tepki olarak erken çiçeklenme eğilimi ortaya çıkmaktadır (Rubatzky ve ark., 1999). Erken çiçeklenme göstermeyen çeşit ıslahı için populasyonda vernalizasyon uygulaması sonrası seleksiyon yapılabilir.

Havuçta (*D. carot*a L.);erkek kısırlığı sistemi ile F1 hibrit tohumluk üretimi stoplazmik genetik erkek kısırlığı, havuçta “kahverengi anter” ve “petaloid”şeklinde kendini göstermektedir. Soğanda kahverengi anter erkek kısırlığı ilk olarak 1947 yılında Tendersweet çeşidinde tesadüfen keşfedilmiştir (Michalik ve ark., 1988).“Kahverengi “anter” daha sonra birçok çesit ve yabani havuç türlerinde de bulunmuştur. Bu tip erkek kısırlıkta anterler normal oluşmakta fakat polen gelişimi belli bir aşamada durmakta ve anterler daha koyu renk almaktadır. Kahverengi anter kısırlığı, günümüzde özellikle

erkenci hibrit havuç çesitlerinin geliştirilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Stein ve Nothnagel, 1995). Fakat bu kısırlık kaynağında sık sık stabilite sorunu yaşanmaktadır. Son yıllarda Kore'de yapılan çalışmalarla stabil olan kahverengi anter kısırlığı elde edilmiş ve petaloid tipi erkek kısırlıktan daha fazla tohum verimi alınmıştır. Petaloid erkek kısırlığı, 1953 yılında yabani bir havuçta keşfedilmiştir. Bu tip kısırlık, petallerde meydana gelen bir mutasyon sonucu meydana gelmiştir. Günümüzde petaloid erkek kısırlığı, özellikle Kuzey Amerika'da hibrit tohum üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır. Gerek çiçeklenme aşamasında ve gerekse tohum üretiminde, farklı ekolojik koşullarda oldukça stabil özellikte olduğu belirlenmiştir. Ancak, petaloid kısırlık, özelikle geç dönemde yapılan üretimlerde kırılabilmektedir (Simon ve ark., 2006). Günümüzde tüm dünyada kullanılmakta olan hibrit havuç çesitlerinin %70'i ve ABD'deki çesitlerin %90'ı petaloid erkek kısırlığı mekanizmasından yararlanılarak üretilmektedir. Geriye kalan çesitlerin eldesinde ise kahverengi anter erkek kısırlığı kullanılmaktadır (Havey, 2004). 1992 ve 1996 yıllarıarasında havuçta 3 yeni kısırlık kaynağı daha belirlenmistir. Yeni kısırlık sistemleri, *D. carota ssp. gummifer*, *D. carota ssp. maritimus ve D. carota ssp. gadecaei* alt türlerinin stoplazmaları kullanılarak geliştirilmiştir (Nothnagel ve ark., 2008). Kendilenmiş havuç hatlarına kısırlığın aktarılması ve bu sistemle hibrit tohum üretimi, diğer türlere benzer aşamalarla gerçekleştirilmektedir. Bu süreç F2 yada F3 generasyonunda başlamakta ve seçilen fertilgenotiplerle kısırlık kaynağı melezlenmektedir. Daha sonraki generasyonda oluşan erkek fertil hatların idame hat olarak kullanılabilme durumu, test melezlemeleri yapılarak ortaya konulmaktadır (Morelock ve ark, 1996; Simon ve ark, 2000).

Daucus türleri üzerinde yapılan bir araştırmada deneme yapılan bir araziden 14 farklı genetik özelliğe sahip türlerden 81 tip selekte edilerek, yapılan bu seleksiyonlar 40 farklı morfolojik karakter yönünden incelemeye alınmıştır (Arbizu ve ark 2014). Yapılan bu araştırmada çoğu karakterler morfolojik yönden birçok tür arasında muazzam farklılıklar göstermiştir. Çok değişkenli analizler yapılaraktan dış gruplar *Daucus* cinsi içinde kolayca ayrılmıştır. Yaptıkları fenotipic gözlemler ile moleküler veriler benzerlik göstermiştir. Moleküler analizlerde en problemli çıkan gruplar ile morfolojik gözlemlerde problemli çıkan gruplar aynı bulunmuştur (Arbizu ve ark, 2014).

Günümüz modern ıslah tekniklerinde genetik kaynakların tanımlanması vazgeçilmez uygulamaların başında gelmektedir. Bitkinin yaşı, fizyolojik durumu ve çevresel faktörler morfolojik belirteçlerle yapılan karakterizasyonlarda, bitki türlerinin morfolojik karakterlerine dayalı yapılan taksonomik sınıflandırma üzerinde etkili

olmaktadır (Havey, 1991). Bitkilerdeki genetik çeşitliliğinin ortaya konmasında, bitki türleri arasındaki taksonomik ve filogenetik ilişkilerin doğru bir şekilde belirlenmesinde genetik moleküler markörler başarıyla kullanılmaktadır (Yang ve Quiros, 1993). Moleküler markör teknolojisi genetik çeşitliliği ortaya koyduğu için ıslah programını hızlandırma ve doğru yönlendirmesi özelliğinden dolayı her geçen gün hızla gelişmekte ve bitki ıslahındaki yerini almaktadır (Lee, 1995; Winter ve Kahl, 1995; Duvick, 1996).

Morfolojik özellikleri birbirine çok yakın olarak görülen grupları genetik olarak birbirinden çok farklı da olabilmektedirler (Sevindik ve ark, 2013). Bitki ıslahında moleküler belirteçler önem kazanmaktadır ve ıslahcılar açısından vazgeçilmez hale gelmektedir.

Moleküler markörlerin çoğunluğu, PCR tekniğine dayalıdır. 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 F_2, 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 (Staub ve ark 1997, Goldman ve ark., 1995; Ekbiç ve ark., 1999; Park ve ark., 2000). Populasyonlarda, markörlerin linkage (bağlantı) dağılımına bakılarak, genom haritaları oluşturulmaktadır (Onus, 1999a; Onus, 1999b).

Günümüzde kullanılan birçok moleküler markör bulunmaktadır. DNA markörlerini kendi içerisinde dominant ve kodominat şeklinde iki grupta sınıflandırılabilir. Bu tez çalışmasın da kullanılan ISSR dominant bir markör sistemidir. RAPD ve ISSR gibi spesifiklik derecesi düşük olan markörlerin gücü, bu yöntemlerle elde edilen bantların jel üzerinden çıkarılarak, sonlarındaki DNA zincirlerinin tespiti ve bunların daha uzun, dolayısıyla da daha spesifik primerler olarak PCR reaksiyonlarında kullanılması ile arttırılabilir. Tekrarlanabilirliği diğer markörlere nazaran çok daha yüksektir. Dominant ve kodominant markörler oluşturabilirler. Dominant olanlar

restriksiyon enzimleriyle kodominant markörlere dönüştürülebilir. ISSR, dominant markördür ve dizi bilgisi gerekmeden primer dizaynı yapılabilmesi avantajlarından biridir (Joshi ve ark., 2000).

Bitki gen kaynakları koleksiyonundaki genetik varyasyonun belirlenmesinde, her genotip içinde var olan varyasyonun ve genotip sayısının fazlalığı, moleküler biyoloji tekniklerinin kullanılmasını zorlaştıracağı bilinmektedir. Bu zorlukları ortadan kaldırabilmek için hızlı, basit ve güvenilir olanlarının kullanılması gerekmektedir (Gilbert ve ark.,1999).

ISSR yöntemi günümüzde DNA tabanlı akrabalık ilişkilerini ortaya koymada en çok kullanılan markör sistemlerinden biridir. Zietkiewicz ve ark., (1994) tarafından keşfedilmiş ve kullanılmıştır. Özellikle polimeraz zincir reaksiyonunun kullanımının yaygınlaşmasıyla bu yöntemin kullanımı artmıştır.

Özgün bir DNA parçasının bol miktarda elde edilmesi, moleküler analizinin yapılması ve genetik mühendisliği amaçları doğrultusunda rekombinant organizmalar elde etmek üzere gen aktarımı için *In vitro* koşullarda DNA çoğaltılmasının yapılmaktadır. DNA çift sarmalında birbirinden ayrılan ipliklerin tamamlayıcıları sentezlenerek bir DNA molekülünden onunla aynı olan iki yavru molekül meydana gelir. Tüm genler hücre bölünmesiyle yeni oluşan hücrelere aynen geçer.Her yeni hücre jenerasyonunda DNA miktarı başlangıca göre üssel olarak artar. Örneğin 30 jenerasyon sonra hücre ve gen sayısında milyarlarca kez artış olur. İstenilen bir genin ya da özgün bir DNA dizisinin çok sayıda kopyasının elde edilmesi için, in vitro koşullarda 1980 li yıllardan itibaren Polimeraz Zincir Reaksiyonu "Polymerase Chain Reaction'' (PCR) da kullanılmaya başlamıştır (Temizkan ve ark, 2008).

İstenilen genlerin ya da DNA dizilerinin jenerasyonlara bağlı replikasyonunu PCR ile hızlandırılmış bir şekilde gerçekleştirilir. PCR replikasyon sürecini taklit ederek aynen doğal hücre bölünmesinde olduğu gibi, yaklaşık 30 jenerasyon seçilmiş bir DNA dizisinin aşağı yukarı milyar katı kopyalanmış olur (Temizkan ve ark., 2008).

ISSR markörleriyle, acı bakla gen kaynaklarında yaptıkları çalışmada, beş bireyden alınan ve karıştırılan DNA örneklerinin, genotipi tamamen temsil edebileceğini bildirmişlerdir (Gilbert ve ark., 1999).

Bradeen ve ark. (2002), çalışmalarında 140 AFLP, markörü, 23 ISSR markörü, 20 mitokondriyal markör ve daha farklı iki çeşit markör kullanmışlardır. 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.

Beş tanesi ticari olmak üzere *D. carrota L.* kaynaklı ticari ve yabani formları içeren 18 farklı ülkedensağlanan 124 genetik materyalin kullanıldığı bir çalışmada, AFLP ve ISSR tekniklerinden yararlanılmıştır. Çizilen dendogramlar üzerinden coğrafi 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 yapıdaoldukları vurgulanmıştır (Bradeen ve ark, 2002).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Bu çalışma, Türkiye'de mor havuç tarımının yaygın olarak yapıldığı bölgelerden derlenen mor havuç populasyonları arasındaki varyasyonu belirlemek amacıyla yürütülmüştür. Bu amaçla, Hatay, Konya-Merkez, Konya-Çumra, Konya-Ereğli bölgesinden toplanan 23 yerel mor havuçlar bu çalışmada bitkisel materyal olarak kullanılmıştır.

Genotiplere ait havuçlar adı geçen bölgelerden derlenmiş ve Kasım ayında Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Seraları'nda uyandırmak amacıyla her genotipten 10 havuç olacak şekilde dikimi yapılmıştır. Ancak 3 genotipte havuç derlemesi yapılmamış elde edilen tohumlar eş zamanlı olarak aynı koşullarda tohum ekimi yapılarak fide eldesi sağlanmıştır.Toplam 23 populasyon çalışmada kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

Usulüne uygun bakım koşullarında 4-6 yapraklı döneme gelen havuç bitkilerinden DNA izolasyonu için yaprak örnekleri alınmıştır. Bir kısım örnek sıvı azota daldırılıp -80 ^{o}C'deki dondurucuda saklanarak daha sonra bu örneklerden DNA izolasyonu yapılmıştır. Ancak serada dikili bitkilerden elde edilen taze örneklerden 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.

3.2.1. DNA İzolasyonu

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 (Metin ve ark., 2012). Pek çok bitki türünde başarıyla uygulanan DNA izolasyon protokolleri mevcuttur. Ancak bitkiler arasında biyokimyasal açıdan oldukça farklı kompozisyonlara sahip olduğu bilindiğinden (Sevindik ve ark, 2013), DNA izolasyonu, yapılarında yüksek oranda fenoller, ketonlar, aldehitler, polisakkaritler gibi sekonder metabolitleri içeren bitkilerde problemli olabileceği ön görülmüştür. Bu bağlamda her çalışma için DNA izolasyon protokolleri

farklılıklar gösterebilir. Buna göre çalışmamızda mor havuç örneklerinin DNA izolasyonu modifiye edilmiş 2XCTAB yöntemi kullanılarak yapılmıştır.

CTAB DNA Protokolü ile İzolasyon

Bitkilerden genomik DNA izolasyonu için modifiye edilen 2XCTAB yöntemikullanılmıştır (İncirli ve ark. 2001). Bunun için, 0.1g olacak şekilde genç bitki yapraklarına ait örnekler sıvı azot ile havanda toz haline getirilmiş ve 2 ml'lik ependorf tüplere alınarak, üzerine 500 µl CTAB tampon çözelti ve 2.5µl β-Merkaptoetanol eklenerek alt üst edilmiştir. Bu örnekler 1 saat boyunca 55℃'de inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra örnekler üzerine 1.5µl RNaz A eklenerek numuneler 37℃'de 15 dakikabekletilmiştir. Örnekler su banyosundan alındıktan sonra üzerlerine 500 µl kloroform-izoamilalkol eklenmiştir. Bu aşamadan sonra santrifüj yapılarak, DNA'nın çöktürülmesisağlanmıştır. Santrifüjden sonra tüplerde 3 farklı faz oluşturulmuş, üst fazda DNA, ara fazda proteinler dipte ise fenol-kloroform-izoamilalkol yer almıştır. Üstteki faz yeni ependorf tüplereaktarılmış ve üzerine 0.08 hacimde 7.5 M amonyum asetat eklenmiştir. Bu aşamada, 0.54 hacimisopropanol eklenerek örnekler yavaşça alt üst edilmiştir. Daha sonra 35 dk buzda inkübe edilmişler, inkübasyondan sonra santrifüj edilerek dipte pellet oluşumu gözlenmiştir. Üstteki süpernatant atılmış, üzerine 700 µl %70'lik EtOH eklenmiş ve DNA yıkanmıştır. Santrifüj yapılmış ve dipte pellet oluşmuştur. EtOH uzaklaştırılmıştır. Daha sonra % 90'lık EtOH ile yıkama yapılmış ve örnekler 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 100 µl TE (pH 8.0) eklenip, pellet çözülmesi beklenmiş ve örnekler kullanıma hazır hale getirilmiştir (Sevindik ve ark, 2013).

3.2.2. Bulkların oluşturulması

Bu analizde kullanılan bireyler rastgele seçilmiş ve genotipi temsil eden tek bireyden oluşan bireysel gruplar oluşturulmuştur. Bulk grupları ise bireysel gruplardaki bireyleride içerecek şekilde her popülasyonu temsil eden yedişer farklı bireyin eşit miktarda temsil edildiği DNA kombinasyonlarından elde edilmiştir. Bireyler seçilirken rastgele seçilmiştir. Bulklar oluşturulurken her bireyden 20µl alınmıştır.

3.3. Spektral yöntem

DNA örneklerinin 260 nm dalga boyunda spektrofotometrik okumalar yapılarak miktarları NanoDrop1000 cihazı kullanılarak belirlenmiştir. Ayrıca DNA kalitesi ile

ilgili olarak da, 260, 280 ve 230 nm dalga boylarında okunan, sırasıyla nükleik asitler, proteinler ve fenolik bileşikler, değerler arasındaki oranlar nükleik asitlerin saflığı ve çalışma için yeterli kalitede olduğu hakkında bilgi vermiştir.

3.4. PCR uygulamaları

Bu çalışmada genomda hedeflenen DNA tekrar dizilerine yönelik tasarlanmış toplam 24 ISSR primeri test edilmiş olup bunlar arasında tekrarlanabilirliği yüksek, güvenilir amplifikasyon ürünleri veren toplam 12 primer (Çizelge 3.4) ile PCR analizleri gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.4. Polimorfizm elde edilen primerler

	Primer ismi	Primer Dizini(5'-3')	% GC	Tm (°C)
1	F2	5'-CTCGTGTGTGTGTGTGTGT	52.6	56.7
2	M1	5'-AGCAGCAGCAGCAGCAGCG-3'	68.4	63.1
3	M3	5'-AGCAGCAGCAGCAGCAGCC -3'	68.4	63.1
4	M7	5'-AGAGAGAGAGAGAGAGAGC -3'	52.6	56.7
5	M8	5'-ACACACACACACACACACG -3'	52.6	56.7
6	M9	5'-ACACACACACACACACCG-3'	55.6	56.0
7	M10	5'-ACACACACACACACACCY-Wobbles-3'	52.8	54.8
8	F8	5'-GCCGCCGCCGCCGCC -3'	100.0	67.0
9	M15	5'-CACACACACACACACAAG -3'	50.0	53.7
10	M16	5'-CACACACACACACACAGC -3'	55.6	56.0
11	M17	5'-CAGCACACACACACACACA -3'	55.6	56.7
12	M18	5'-CGTCACACACACACACACA -3'	55.6	56.7

GC: guanin citozin, Tm: Erime Sıcaklığı

Tezde kullanılan primerlerin PCR protokolleri çizelge 3.5.de verilmiştir. PCR uygulaması her primer için testlemeler sonucunda uygun bulunan protokoller doğrultusunda karışımlar hazırlanıp sonrasında örnekler PCR'a yerleştirilmiştir. Primerler hem bulk grupları hemde rastgele seçilen bireysel gruplar için ayrı ayrı yürütülmüştür. Seçilen primerlerin çalışıp çalışmadığını anlamak ve uygun protokolü hazırlamak için bulk'lardan rastgele seçilen 5 örnek ile PCR cihazında gradient yöntemi ile ön testlemeler yapılmıştır.

Çizelge 3.5: Tezde kullanılmış olan primerler için oluşturulan optimal protokoller.

Primer İsmi	Protokol	PCR için thermal cycler cihazı Programı		
F2	1.Taq buffer(NH2SO4) 10x :2.5µl 2.$MgCl_2$(25mm) :2.3 µl 3.dNTP miksi (1mm) :5.0 µl 4.Primer(50pmol) :0.5µl 5. *Taq*DNA Pol. :0.3µl 6.DNA(50ng) :2.0µl 7. Distile deionize su :11.1µl	1. 94 °C 2. 94 °C 3. 57.9°C -51.7°C 4. 72°C 5. 94 °C 6. 51.9°C 7. 72 °C	4 dk 30sn 40sn 1dk 30sn 40 sn 1dk	1 döngü 12 döngü 35 döngü
M1	1.Taq buffer(NH2SO4) 10x :2.5µl 2. $MgCl_2$ (25mm) :2,5µl 3.dNTP miksi(1mm) :0.6µl 4.Primer(50pmol) :0.5µl 5.*Taq*DNAPol.:0.3µl 6.DNA(50ng) :2.0µl 7. Distile deionize su :16.6µl	1. 94°C 2. 94°C 3. 65°C - 55°C 4. 72°C 5. 94 °C 6. 60°C 7. 72 °C	4 dk 30sn 40sn 1dk 30sn 40 sn 1 dk	1 döngü 15 döngü 36 döngü
M2	1.Taq buffer(NH2SO4) 10x :2.5µl 2. $MgCl_2$ (25mm) :2,6µl 3.dNTP miksi(1mm) :6.0µl 4.Primer(50pmol) :0.5µl 5.*Taq*DNA Pol. :0.35µl 6.DNA(50ng) :2.2µl 7.Distile deionize su :10.8µl	1. 94 °C 2. 94 °C 3. 70°C - 60°C 4. 72°C 5. 94 °C 6. 60°C 7. 72 °C	4 dk 30sn 40sn 1dk 30sn 40 sn 1 dk	1 döngü 12 döngü 36 döngü
M3	1.Taq buffer(NH2SO4) 10x :2.5µl 2. $MgCl_2$ (25mm) :2,0µl 3.dNTP miksi(1mm) :0.6µl 4.Primer(50pmol) :0.5µl 5.*Taq*DNA Pol. :0.2µl 6.DNA(100ng) :2.0µl 7.Distile deionize su :12.2µl	1. 94 °C 2. 94 °C 3. 60°C - 54°C 4. 72°C 5. 94 °C 6. 54 °C 7. 72 °C	5 dk 30sn 40sn 45sn 30sn 40 sn 45 sn	1 döngü 12 döngü 37 döngü
M5	1.Taq buffer(NH2SO4) 10x :2,5µl 2. $MgCl_2$ (25mm) :2,3µl 3.dNTP miksi(1mm) :5.0µl 4.Primer(50pmol) :0.5µl 5.*Taq*DNA Pol. :0.3µl 6.DNA(100ng) :2.0µl 7.Distile deionize su :11.5µl	1. 94 °C 2. 94 °C 3. 65°C - 55°C 4. 72°C 5. 94 °C 6. 55.5 °C 7. 72 °C	5 dk 30sn 40sn 1dk 30sn 40 sn 1 dk	1 döngü 12 döngü 36 döngü
M7	1.Taq buffer(NH2SO4) 10x :2.5µl 2 $MgCl_2$ (25mm) :2,7µl 3.dNTP miksi(1mm) :4.0µl 4.Primer(50pmol) :0.5µl 5.*Taq*DNA Pol. :0.25µl 6.DNA(50ng) :2.5µl 7.Distile deionize su :12.5µl	1. 94 °C 2. 94 °C 3. 56°C - 50°C 4. 72°C 5. 94 °C 6. 51°C 7. 72 °C	4 dk 30sn 40sn 1dk 30sn 40 sn 1 dk	1 döngü 12 döngü 36 döngü
M8	1.Taq buffer(NH2SO4) 10x :2.5µl 2. $MgCl_2$(25mm) :2.0µl	1. 94 °C 2. 94 °C	4 dk 30sn	1 döngü 12 döngü

	3.dNTP miksi(1mm) :3.0µl	3. 57°C - 51°C	40sn
	4.Primer(50pmol) :0.5µl	4. 72°C	1dk
	5.*Taq*DNA Pol. :0.2µl	5. 94 °C	30sn — 35 döngü
	6.DNA(100ng) :1.5µl	6. 51 °C	40 sn
	7.Distile deionize su :15.0µl	7. 72 0C	1 dk
M9	1.Taq buffer(NH_2SO_4) 10x :2.5µl	1. 94 °C	4 dk → 1 döngü
	2. $MgCl_2$ (25mm) :2,7µl	2. 94°C	30sn — 12 döngü
	3.dNTP miksi(1mm) :0,6µl	3. 56°C - 51°C	40sn
	4.Primer(50pmol) :0.5µl	4. 72°C	1dk
	5.*Taq*DNA Pol. :0.25µl	5. 94 °C	30sn — 35 döngü
	6.DNA(50ng) :2.5µl	6. 52.6 °C	40 sn
	7.Distile deionize su :15.9µl	7. 72 °C	1 dk
M10	1.Taq buffer(NH_2SO_4) 10x :2.5µl	1. 94 °C	4 dk → 1 döngü
	2. $MgCl_2$ (25mm) :3µl	2. 94 °C	30sn — 12 döngü
	3.dNTP miksi(1mm) :3µl	3. 56°C - 50°C	40sn
	4.Primer(50pmol) :0.5µl	4. 72°C	1dk
	5.*Taq*DNA Pol. :0.2µl	5. 94 °C	30sn — 35 döngü
	6.DNA(100ng) :1.5µl	6. 50 °C	40 sn
	7.Distile deionize su :14.3µl	7. 72 °C	1 dk
F8	1.Taq buffer(NH_2SO_4) 10x :2.5µl	1. 94 °C	5 dk → 1 döngü
	2. $MgCl_2$ (25mm) :2.0µl	2. 94 °C	30sn — 12 döngü
	3.dNTP miksi(1mm) :0.6µl	3. 70°C - 62°C	40sn
	4.Primer(50pmol) :0.5µl	4. 72°C	1dk
	5.*Taq*DNA Pol. :0.2µl	5. 94 °C	30sn — 35 döngü
	6.DNA(100ng) :2.0µl	6.62,5 °C	40 sn
	7.Distile deionize su :12.2µl	7. 72°C	1 dk
M15	1.Taq buffer(NH_2SO_4) 10x :2.5µl	1. 94 °C	5 dk → 1 döngü
	2. $MgCl_2$ (25mm) :2,8µl	2. 94 °C	30sn — 12 döngü
	3.dNTP miksi(1mm) :4.0µl	3. 56°C - 50°C	40sn
	4.Primer(50pmol) :0.5µl	4. 72°C	1dk
	5.*Taq*DNA Pol. :0.25µl	5. 94 °C	30sn — 35 döngü
	6.DNA(50ng) :2.5µl	6. 50 °C	40 sn
	7.Distile deionize su :12.4µl	7. 72°C	1 dk
M16	1.Taq buffer(NH_2SO_4) 10x :2.5µl	1. 94 °C	4 dk → 1 döngü
	2. $MgCl_2$ (25mm) :1,7µl	2. 94°C	30sn — 12 döngü
	3.dNTP miksi(1mm) :3.0µl	3. 57°C - 50°C	40sn
	4.Primer(50pmol) :0.5µl	4. 72°C	1dk
	5.*Taq*DNA Pol.:0.2µl	5. 94 °C	30sn — 36 döngü
	6.DNA(50ng) :2.0µl	6. 50 °C	40 sn
	7.Distile deionize su :15.1µl	7. 72 °C	1 dk
M17	1.Taq buffer(NH_2SO_4) 10x :2.5µl	1. 94 °C	4 dk → 1 döngü
	2. $MgCl_2$ (25mm) :3.0µl	2. 94 °C	30sn — 12 döngü
	3.dNTP miksi(1mm) :4.0µl	3. 58°C - 51°C	40sn
	4.Primer(50pmol) :0.5µl	4. 72°C	1dk
	5.*Taq*DNA Pol. :0.3µl	5. 94 °C	30sn — 35 döngü
	6.DNA(100ng) :2.5µl	6. 52 °C	40 sn
	7.Distile deionize su :12.2µl	7. 72 °C	1 dk
M18	1.Taq buffer(NH_2SO_4) 10x :2.5µl	1. 94 °C	4 dk → 1döngü
	2. $MgCl_2$ (25mm) :2.0µl	2. 94 °C	30sn — 12 döngü

	3.dNTP miksi(1mm) :3.0µl 4.Primer(50pmol) :0.5µl 5.*Taq*DNA Pol.:0.2µl 6.DNA(100ng) :1.5µl 7.Distile deionize su :15.2µl	3. 58°C - 51°C 4. 72°C 5. 94 °C 6. 52 °C 7. 72 °C	40sn 1dk 30sn 40 sn 1 dk	38 döngü

3.5. Elektroforetik Yöntemler

DNA izolasyonlarından elde edilen numunelerin kalite analizlerinde ayrıca elektroforetik yöntem kullanılmıştır. Buna göre, hazırlanan %1 lik agaroz jellerde yürütülen numuneler transilüminatör kullanılarak Etidyum Bromür floresan boyadan yararlanılarak UV ışımasından DNA görüntülerielde edilmiştir. Aynı şekilde, PCR ürünleride elektroforetik yöntemle %2 lik agaroz jel ortamında yürütülerek genotipler arasında farkları oluşturan fragmanlar skorlanmıştır.

3.6. Skorlama ve İstatistik Analizleri

3.6.1. Verilerin Üretilmesi

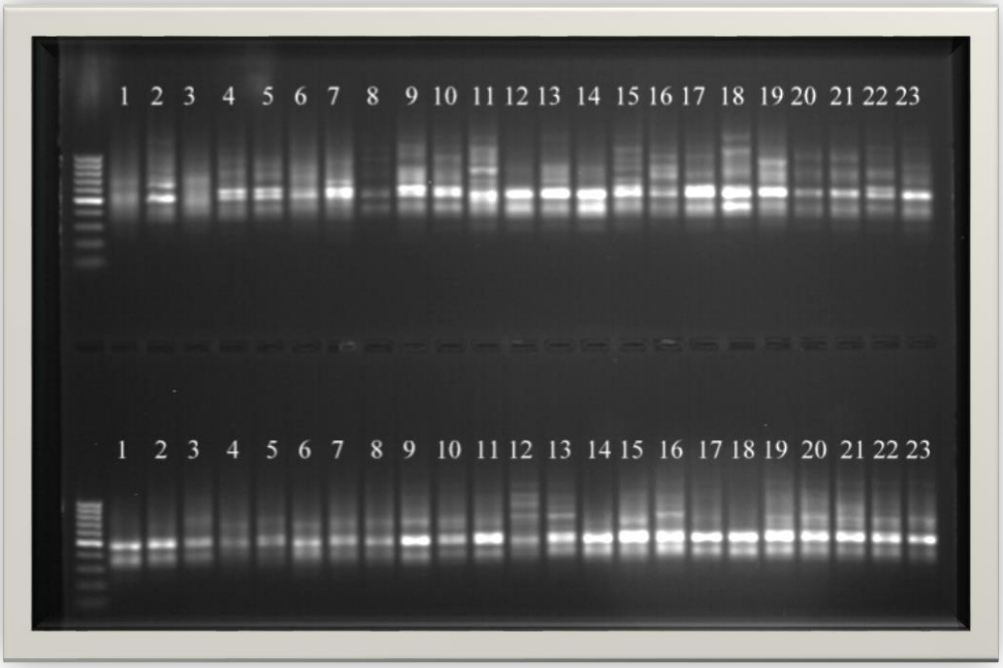
Dominant özellikte markörler olan ISSR uygulamalarından tekrarlı olarak elde edilen bantlar her bir jelde, 1,0 ve 9 olarak kayıt edilmiş olup, ‘1’ bandın varlığını ‘0’ bandın yokluğunu ‘9’ ise PCR'ın ilgili kuyucukta çalışmadığını göstermektedir. Elde edilen verilerin analizi NTSYSpc-2.10d (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System (Sayısal Taksonomi ve Çok Değişkenli Analiz Sistemi) paket programında yapılmıştır.

3.6.2. Verilerin Değerlendirilmesi

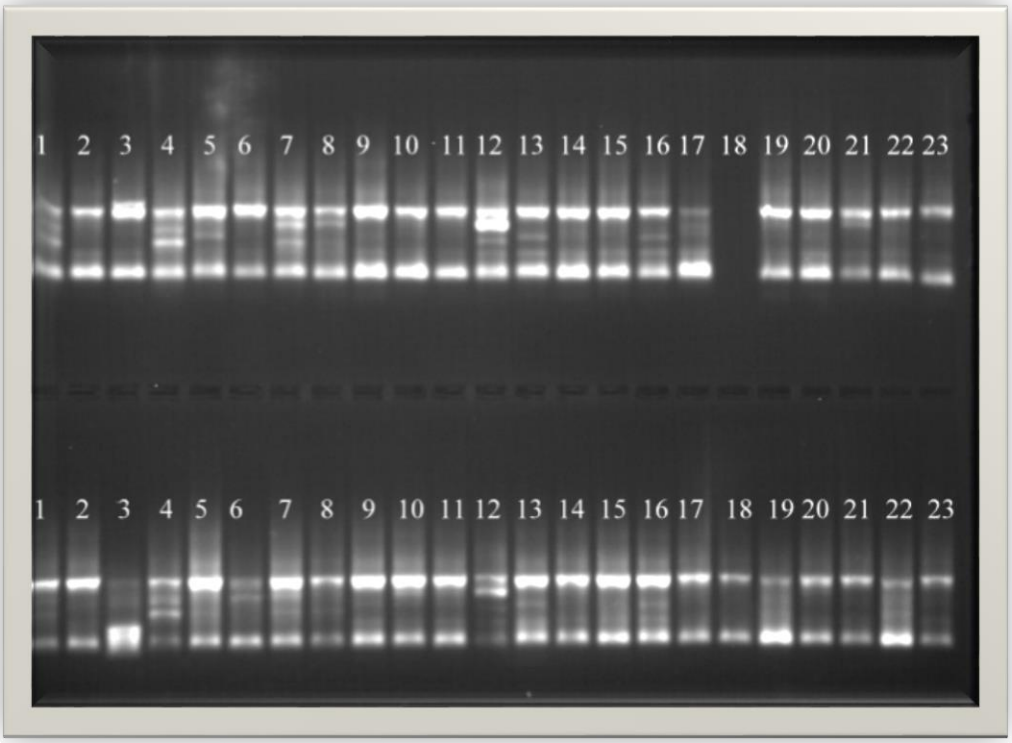
Bulklar ve bireyler arasındaki uzaklığın belirlenmesinde, Basit Eşleştirme (Simple Matching) benzerlik indeksi kullanılmış ve benzerlik matrisleri oluşturulmuştur. Benzerlik matrisleri kullanılarak, NTSYSpc-2.10d (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System (Sayısal Taksonomi ve Çok Değişkenli Analiz Sistemi) paket programında ağırlıklı olmayan aritmetik ortalama eş grup metoduna (UPGMA: *Unweighted Pair Group Method using ArithmeticAverage*) göre kümeleme (cluster) analizi yapılarakgenotiplere ait dendrogram oluşturulup, iki boyutlu ölçekleme ve Temel koordinatlar analizi (Principal Coordinate Analysis) yapılmıştır.

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

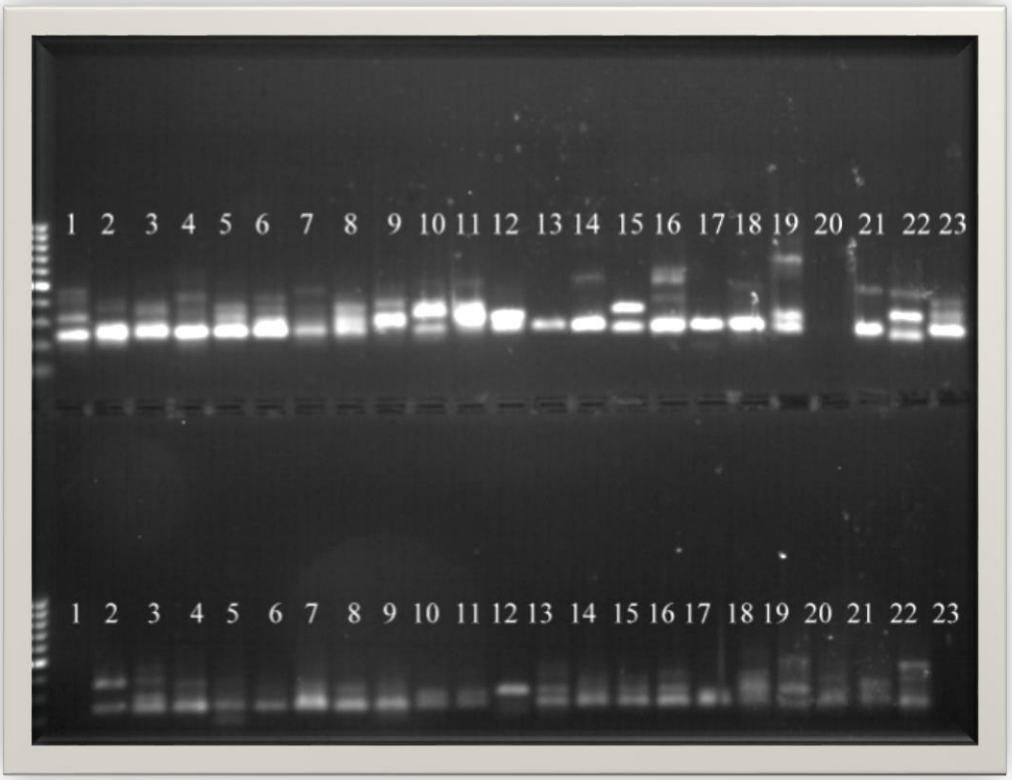
PCR ürünlerinin agaroz jellerde yürütülmesi ile elde edilen görüntüler Şekil 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 4.10 da verilmiştir. Bu jel görüntülerinde üstteki görüntü bireyleri, alttaki görüntü bulkları temsil etmektedir. Bu jel görüntüleri incelendiğinde elde edilen fragmanların 300 ile 1500 baz çifti uzunluklarında yoğunlaştıkları görülmektedir.



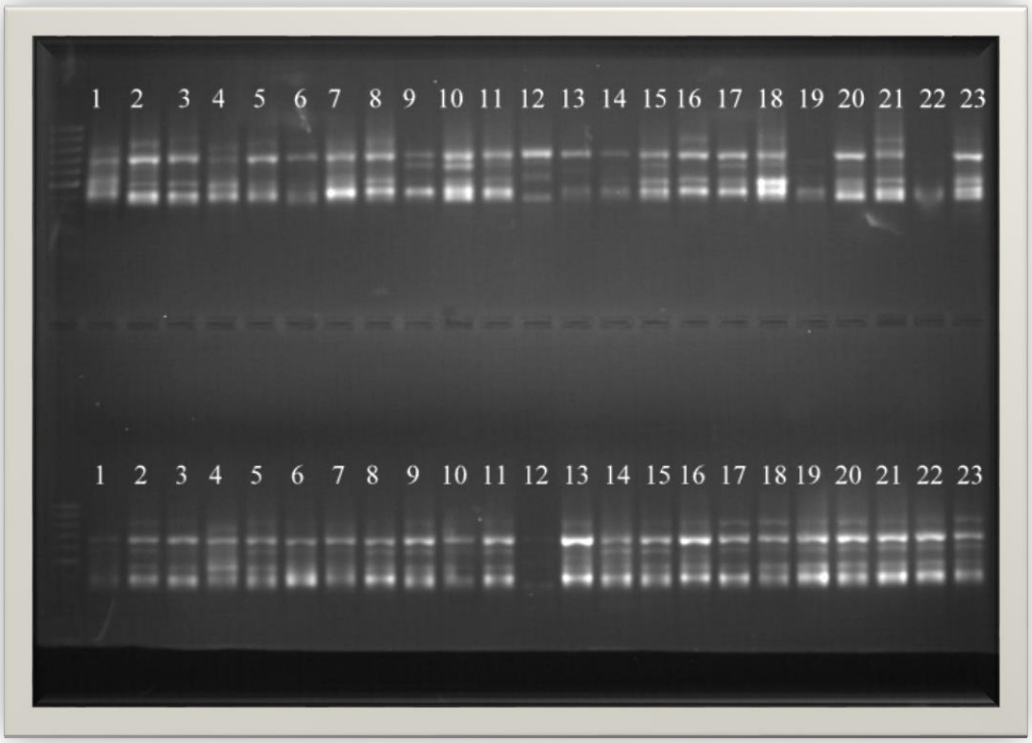
Şekil 4.1.ISSR primer kombinasyonu yöntemi ile F2 primerinin jeldeki görüntüsü.



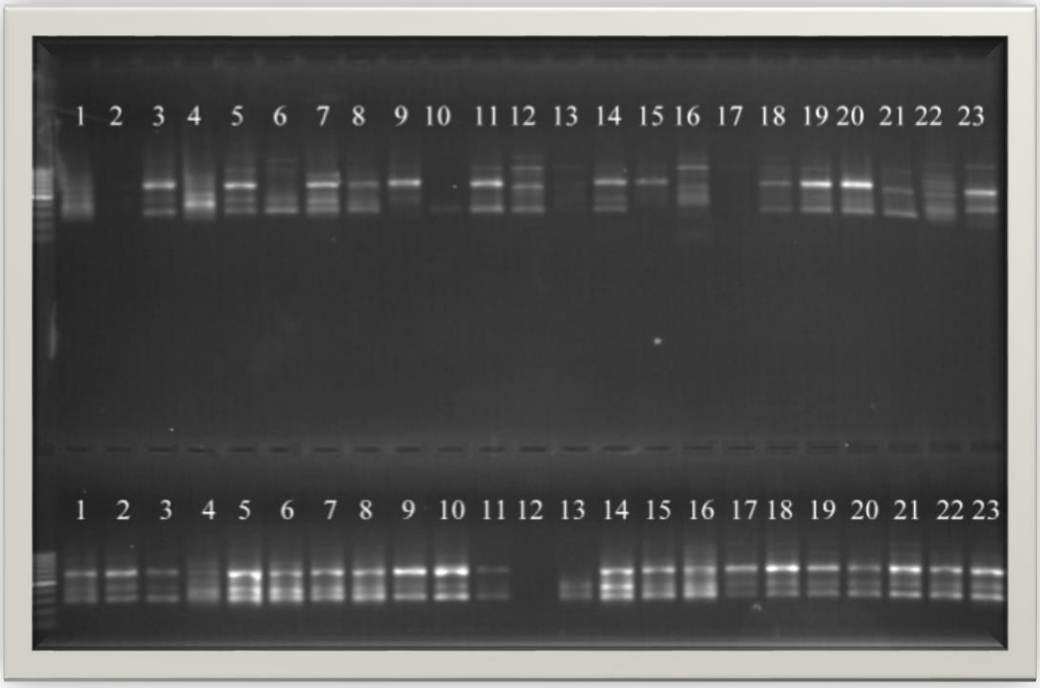
Şekil 4.2.ISSR primer kombinasyonu yöntemi ile M1 primerinin jeldeki görüntüsü.



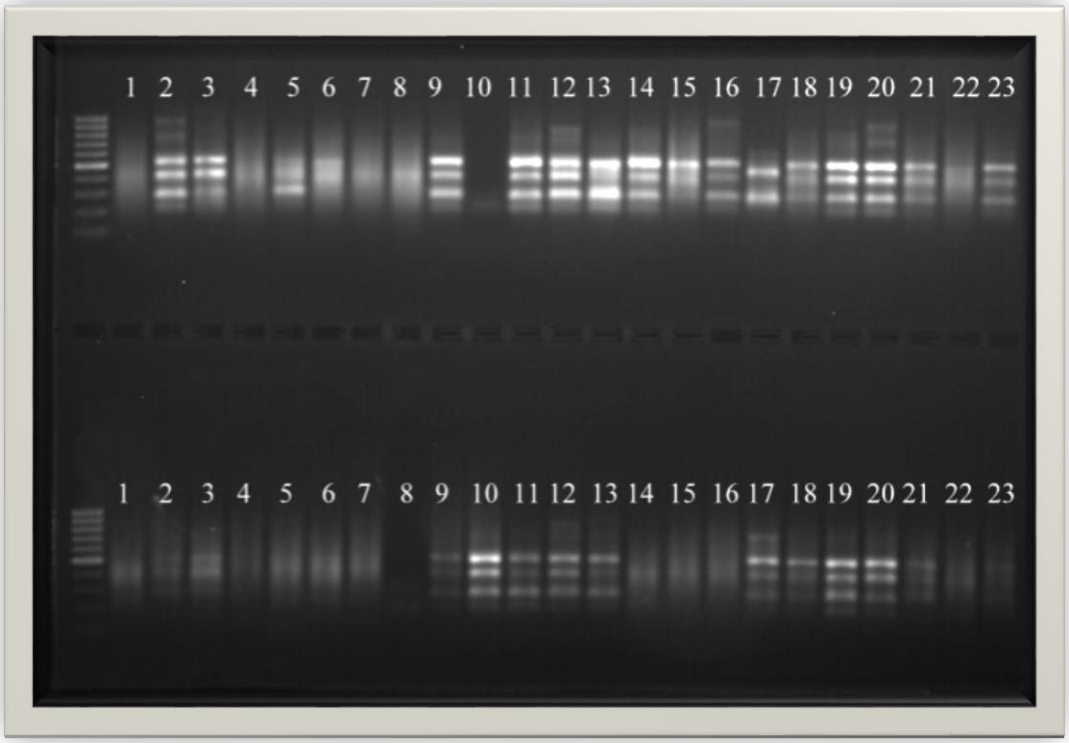
Şekil 4.3.ISSR primer kombinasyonu yöntemi ile M3 primerinin jeldeki görüntüsü.



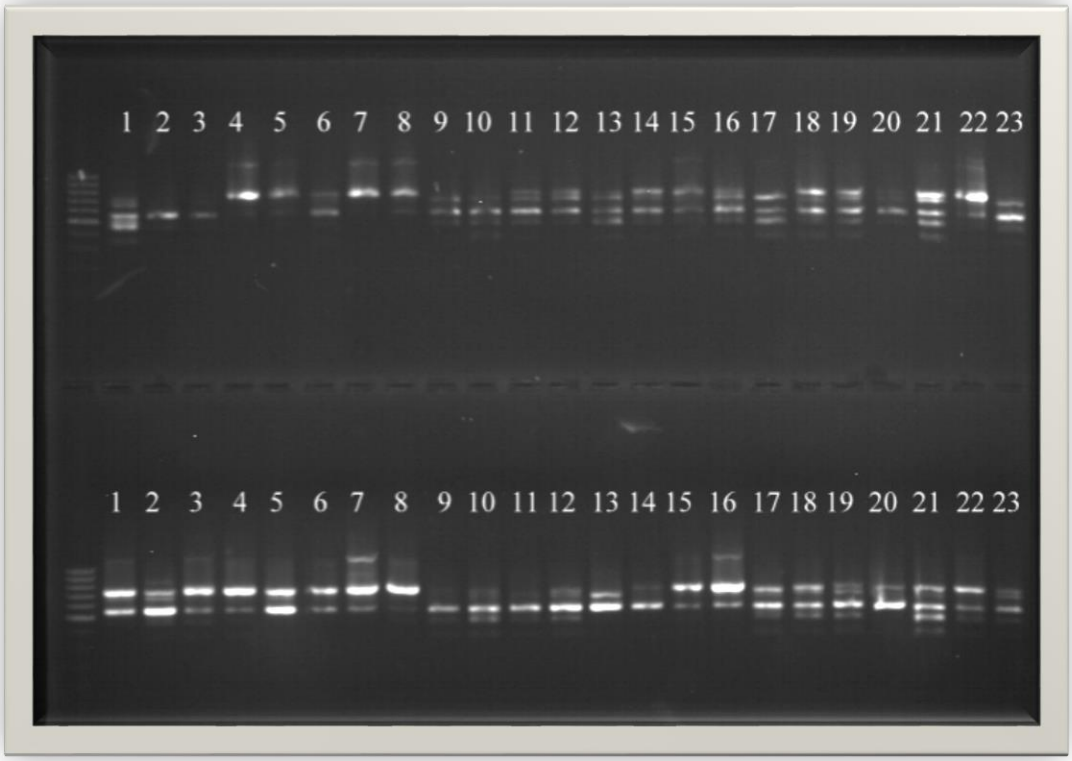
Şekil 4.4.ISSR primer kombinasyonu yöntemi ile M7 primerinin jeldeki görüntüsü.



Şekil 4.5. ISSR primer kombinasyonu yöntemi ile M9 primerinin jeldeki görüntüsü.

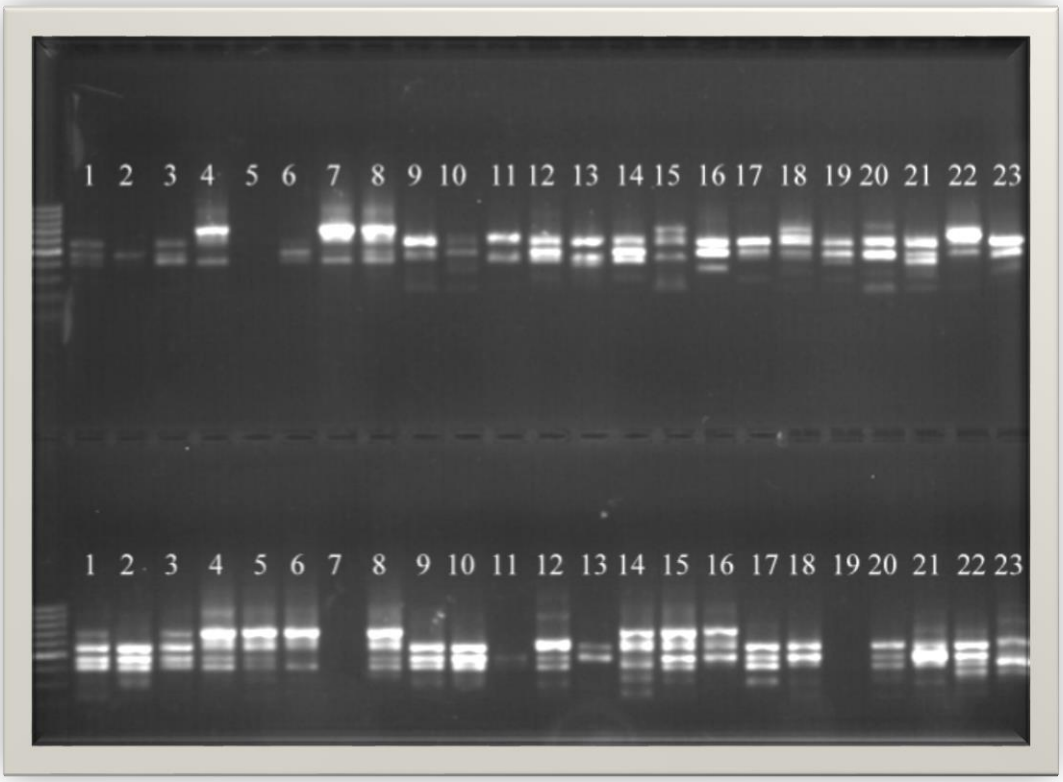


Şekil 4.6.ISSR primer kombinasyonu yöntemi ile F8 primerinin jeldeki görüntüsü

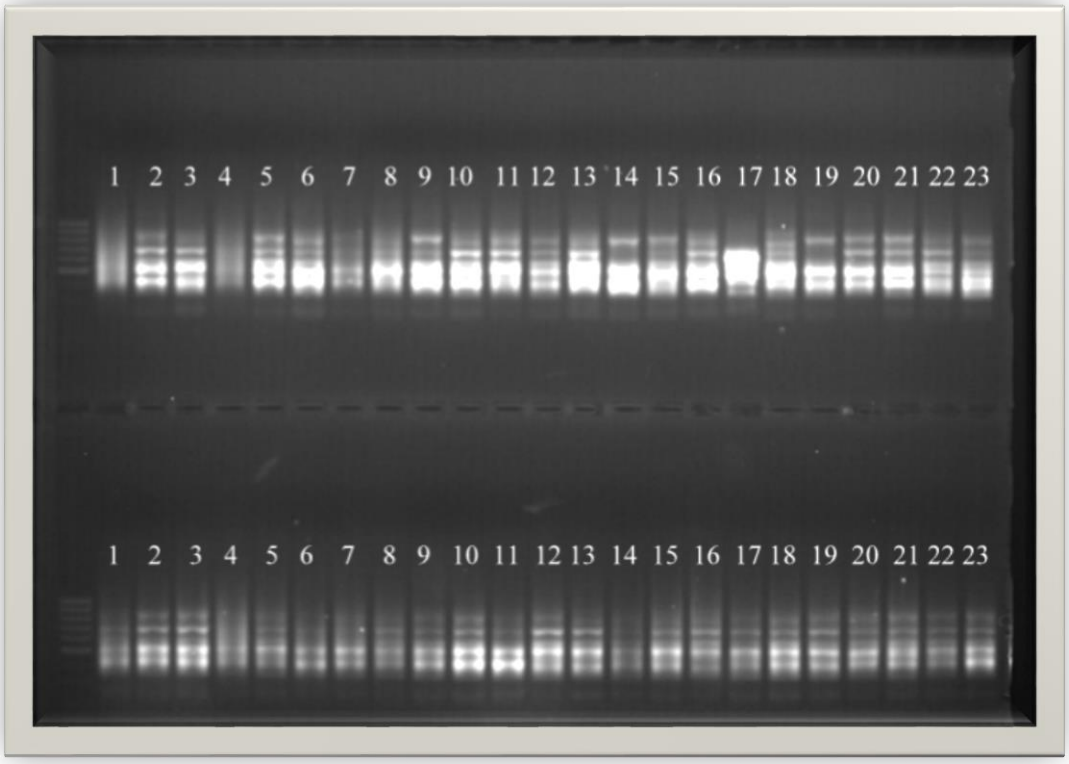


Şekil 4.7. ISSR primer kombinasyonu yöntemi ile M15 primerinin jeldeki görüntüsü.

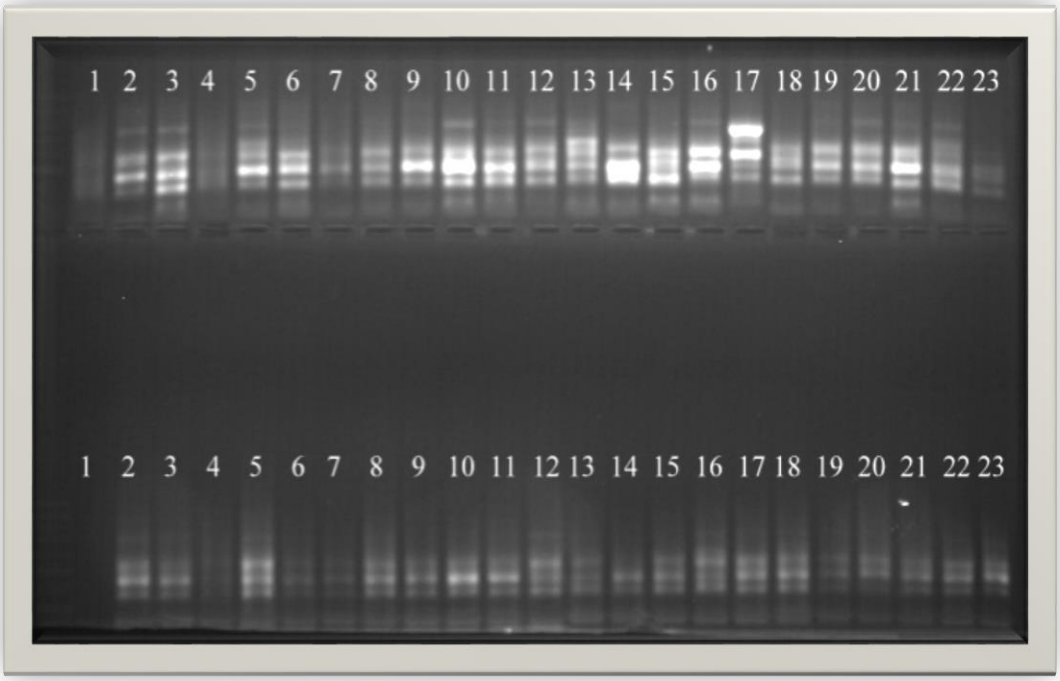
.



Şekil 4.8. ISSR primer kombinasyonu yöntemi ile M16 primerinin jeldeki görüntüsü..



Şekil 4.9. ISSR primer kombinasyonu yöntemi ile M17 primerinin jeldeki görüntüsü.



Şekil 4.10. ISSR primer kombinasyonu yöntemi ile M18 primerinin jeldeki görüntüsü.

Jel görüntülerinin skorlanıp kaydedilerek her bir primer kullanıldığında bireysel ve bulk gruplarında ayrı ayrı elde edilen veriler tablo haline getirilip primerden üretilen toplam bant sayıları, polimorfik bant sayıları ve % polimorfizm oranları ayrı ayrı ve toplamda Çizelge 4.1 ve 4.2'de sunulmuştur. Bu veriler NTSYSpc-2.10d (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System (Sayısal Taksonomi ve Çok Değişkenli Analiz Sistemi) paket program ile değerlendirildiğinde Simple Matching benzerlik indeksine göre hatlar arasındaki ilişkiler ortaya konmuştur.

Çizelge 4.1. Bireysel gruplarından elde edilen polimorfizm yüzdesi

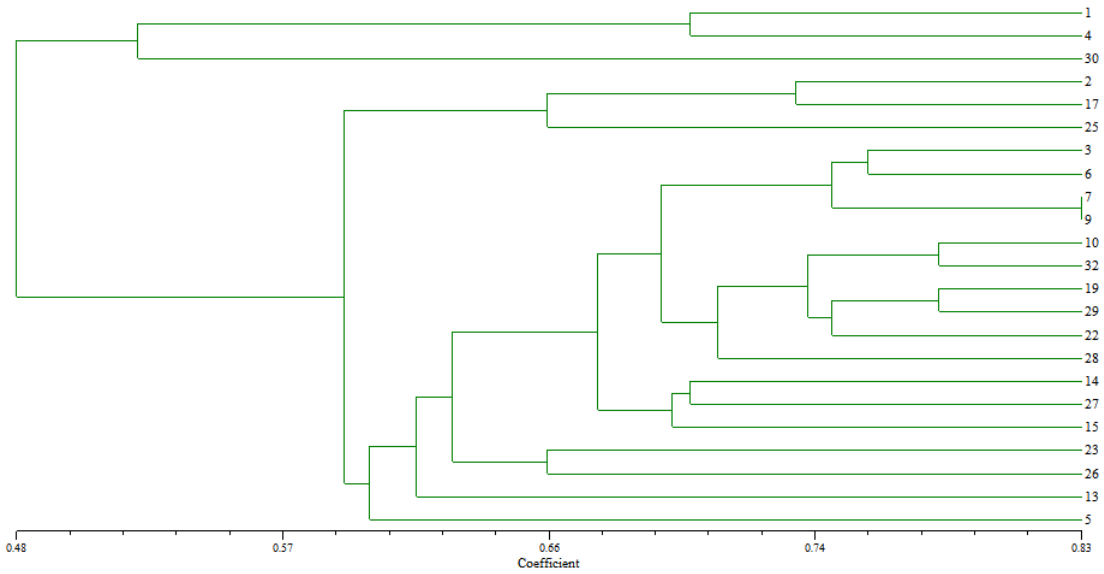
Kullanılan Primerler	Skorlanan Fragman	PolimorfikFragman	Polimorfizm Yüzdesi
F2	8	8	% 100.0
M1	7	5	% 71.4
M3	9	9	% 100.0
M7	8	7	% 87.5
M8	7	6	% 85.7
M9	10	10	% 100.0
M10	3	3	% 100.0
F8	9	9	% 100.0
M15	7	6	% 85.7
M16	9	9	% 100.0
M17	7	7	% 100.0
M18	7	5	% 71.4
Toplam	**91**	**84**	**% 92.0**

Çizelge 4.1 incelendiğinde polimorfizm oranlarının primerlere göre % 71.4 ile % 100.0 arasında gerçekleştiği görülmektedir. Primerlerde toplam polimorfizm oranı ise % 92.0 olarak gerçekleşmiştir. Bu da çalışmanın ilk aşamasında yapılan ön testlemelerde dar bir havuzdan primerlerin seçilmesi esnasında yapılan çalışmaların bu aşama için başarılı bir şekilde yürütüldüğünü göstermektedir. Nitekim bu seçim kriterlerini oluştururken kullanılan gradient PCR testlemelerinde her bir primer belli sayıda örnek ile optimizasyon amaçlı ön testlemelere tabi tutulmuştur. Elde edilen sonuçlarımızın literatür bildirişleri ile (Bradeen ve ark, 2002; Clerc ve ark, 2005) örtüştüğü gözlenmektedir.

Çizelge 4.2. Bulk gruplarından elde edilen polimorfizm yüzdesi

Kullanılan Primerler	**Skorlanan Fragman**	**Polimorfik Fragman**	**Polimorfizm Yüzdesi**
F2	8	7	% 87.5
M1	6	4	% 66.6
M3	5	4	% 80.0
M7	5	3	% 60.0
M8	4	3	% 75.0
M9	6	4	% 66.7
M10	2	2	% 100.0
F8	5	4	% 80.0
M15	8	7	% 87.5
M16	9	9	% 100.0
M17	4	2	% 50.0
M18	3	1	% 33.3
Toplam	**65**	**50**	**% 73.9**

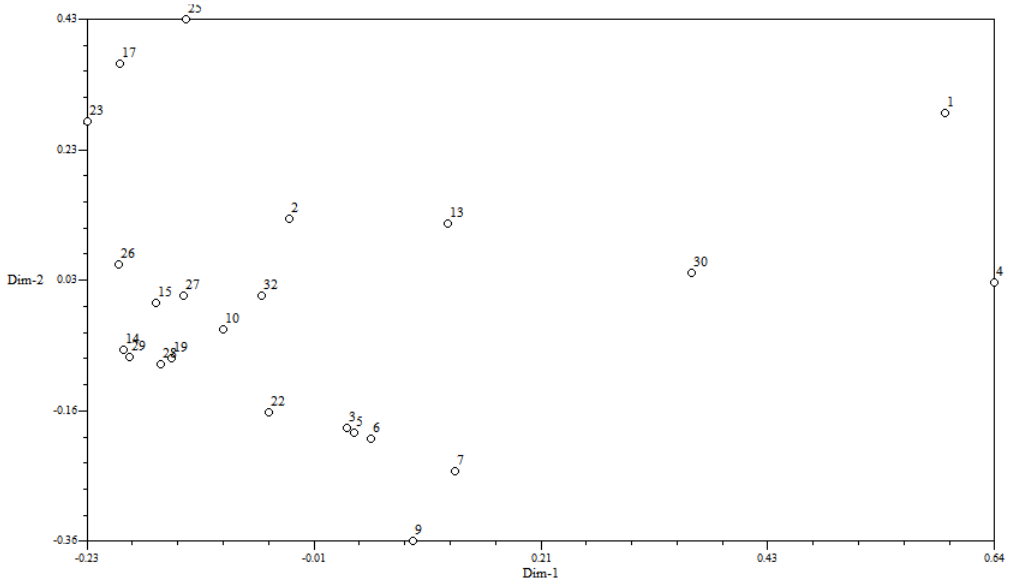
Bulk gruplarında polimorfizm oranlarının primerlere göre % 33.3 ile % 100.0 arasında, toplam polimorfizm oranı ise % 73.9 olarak gerçekleşmiştir (Çizelge 4.2). Bulk grubunda polimorfizm oranının daha düşük olması normaldir. Nitekim Bradeen ve ark, 2002' nın çalışmalarıda bu sonuçları desteklemektedir. M18 gibi oldukça düşük polimorfizm oranına sahip bir primerin yer alması, aynı primerin bireysel grupta %71.4 gibi oldukça yüksek bir polimorfizme sahip olmasından dolayı anlam kazanmaktadır. Bulk gruplarında 1/7 oranında temsil edilen her bir bireye ait DNA örneklerinin bu grupta dilüsyon etkisine bağlı olarak polimorfizm oranını aşağı çekmiştir.



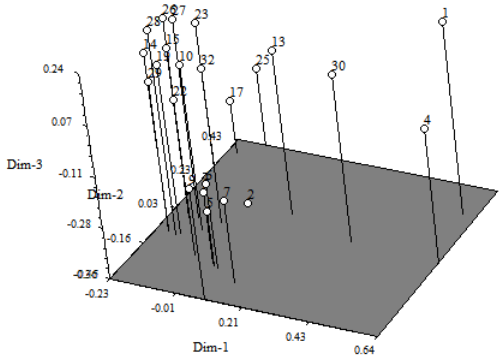
Şekil 4.11. Simple Matching benzerlik katsayısı indeksine göre bireysel gruplarının akrabalık ilişkileri dendogramı.

Şekil 4.11'de görüldüğü üzere her bireyin ait olduğu popülasyonun temsil ettiği bireysel grupların analizinde geniş bir varyasyon göze çarpmaktadır. Detaylı incelendiğinde iki temel grubun oluştuğu bu iki gruptan küçük olanında 1 ve 4 numaralı bireylerin 0.70 civarında benzerlik katsayısına sahip olduğu 30 numaralı bireyin ise diğerlerinden tamamen ayrılarak 0.50 civarında farklı bir konumlanmaya sahip olduğu görülmektedir.

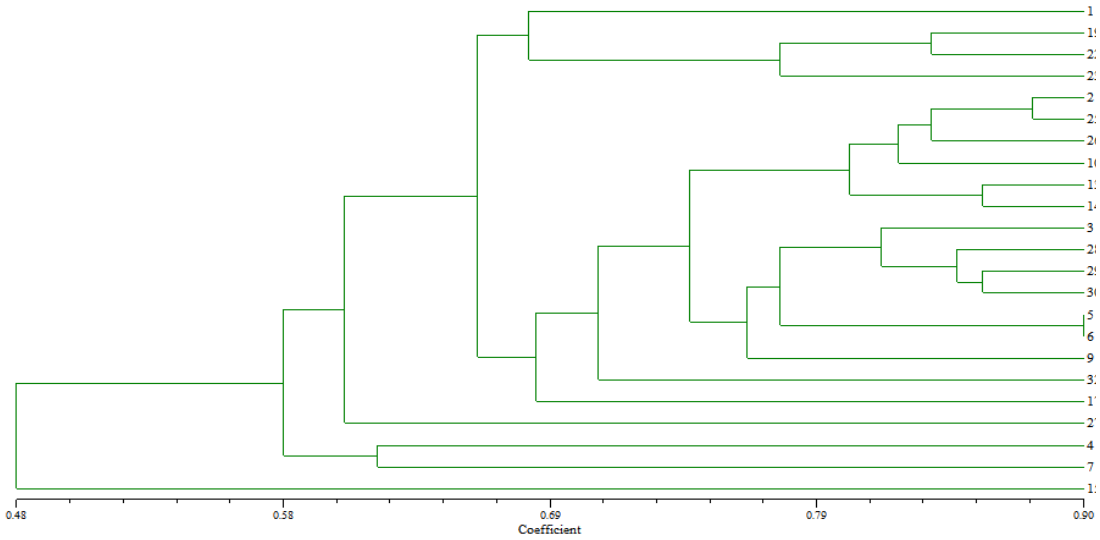
Dendogramdaki ilişkiler verileri en iyi açıklayan ilk iki koordinatın kullanımıyla üretilen temel koordinatlar analizi grafiğinde de teyit edilmektedir. Buradan 4 ve 1 numaralı örnekler birinci eksenden oldukça birbirine yakın iken farklılıkları iki numaralı eksende belirginleşmektedir. Aynı şekilde 30 numaralı genotip ikinci eksende 4 numaralı genotip ile oldukça yakın konumlanırken bu analiz yönteminin gücüne bağlı olarak, bir numaralı eksende net bir şekilde hem 1 hem de 4 numaralı örnekten ayrılmaktadır. Görüleceği üzere dendogramın oluşturulmasındaki programdan kaynaklı zafiyetler bu şekilde aşılmıştır. Nitekim temel koordinata üçüncü bir boyut eklendiğinde bu örneklerin 3 boyutlu uzayda dağılımları ve genetik ilişkileri çok daha anlamlı bir şekilde açıklığa kavuşmaktadır. Diğer genotiplerin ilişkileride gruplanmaların dendoğram ile büyük ölçüde örtüştüğü ancak çok daha net bir şekilde ilişkilerin ortaya konulduğu bu temel koordinatlar analizinde görülmektedir (Şekil 4.11., Şekil 4.12., Şekil 4.13.).



Şekil 4.12.: Bireylerin Temel Matching benzerlik indeksi ile oluşturulmuş Temel Koordinat Analizi (2 boyutlu)



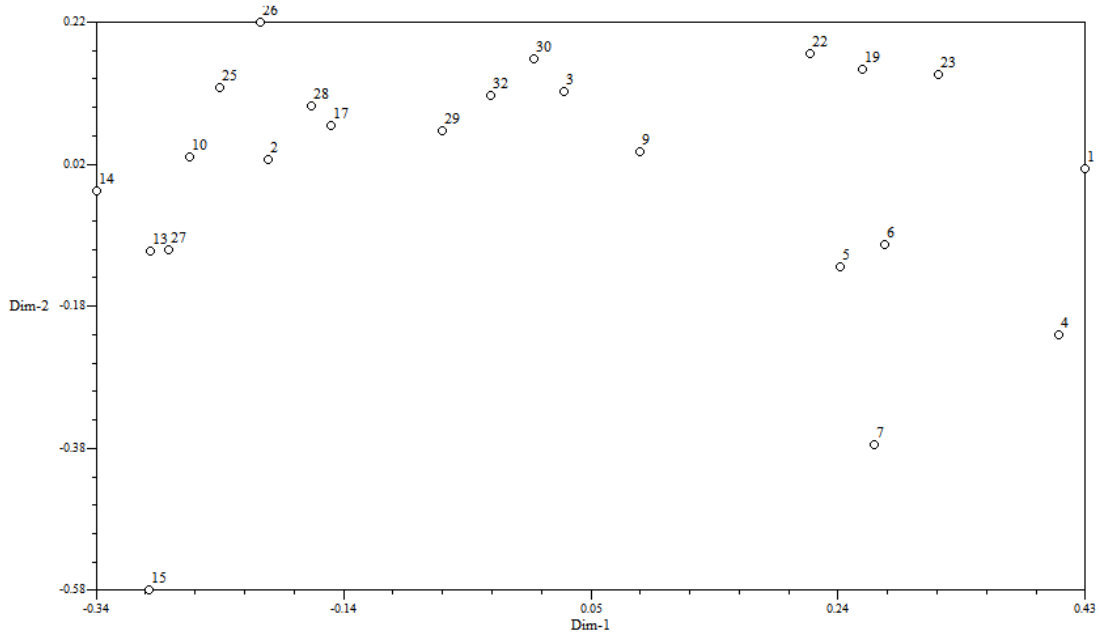
Şekil 4.13: Bireylerin Temel Matching benzerlik indeksi ile oluşturulmuş Temel Koordinat Analizi (3 boyutlu)



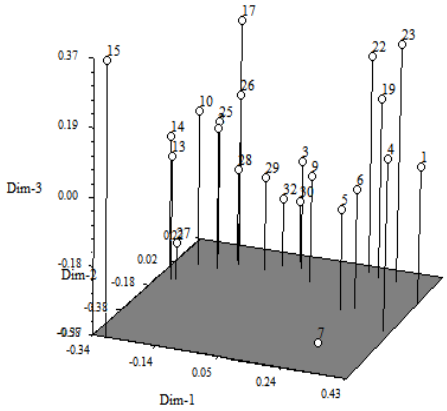
Şekil 4.14. Temel Matching benzerlik katsayısı indeksine göre bulk gruplarının akrabalık ilişkileri dendogramı.

Her bir popülasyonun yedi ayrı bireye ait eşit miktarda karıştırılmış DNA örnekleri ile elde edilen Bulkların ISSR analizleri sonucu üretilen dendogram (Şekil 4.14.) incelendiğinde ise bireysel örneklemeye göre oldukça farklı bir sonuç ile karşılaşılmıştır. Bunun en önemli sebebi kullanılan popülasyonların yüksek düzeyde kendi içlerindeki heterojenliğidir. Nitekim dendogramda 15 numaralı popülasyon tek bir bireyle temsil ettiğindeki konumlanmasının çok uzağında yer almış ve hatta diğer tüm popülasyonların dışında bir dış grup görünümü arz etmiştir. Popülasyonlar arasında görünen farklılığın popülasyon içinde de var olduğu gerçeğini ortaya koymaktadır. Benzer bir şekilde 27 numaralı popülasyon ile bireysel gruptan farklı olarak tek başına konumlanmış hatta bu iki popülasyon (15 ve 27 numaralı popülasyonlar) bireysel grupların analizinde birbirine çok yakın yer almaktayken (temel koordinatlar analizinde de aynı şekilde) bulkların analizinde bu bireyler hem ayrım gücü daha zayıf olan dendogramdan (Şekil 4.14) hem de temel koordinatlar analizinde birbirlerinden net bir şekilde ayrılmaktadırlar. Temel koordinatlar analizinde bu ayrım ikinci koordinat ekseninde gerçekleşmektedir. Diğer ilişkiler dikkatealındığında dendogramdaki büyük kümelenmeye bağlı küçük dallanmada yer alan 1, 19, 22, 23 numaralı popülasyonlar incelendiğinde bu popülasyonların Temel koordinatlar analizi sisteminde birinci eksende herbirinin birbirinden ayrıldığını, ikinci eksende ise bu grubu oluşturan popülasyonlardan bir numaralı popülasyonun bu grup üyelerinden ikinci eksende ayrıldığını ancak grafik üzerindeki konumlanmaları itibarıyla ayrı bir grup oluşturdukları açıkca izlenmektedir. Görüldüğü üzere makul sayıdaki bireyler ile temsil

edildiğinde ilişkiler daha sağlıklı bir şekilde oluşmaktadır. Öyleki dendoğramın kendisinden kaynaklanan zafiyetlerinde bulk analizinde büyük ölçüde tolere edildiği görülmektedir. Dolayısıyla bu tez çalışmasında olduğu gibi yüksek düzeyde heterojenliğe sahib genetik materyalin analizinde bu popülasyonların ilişkilerini güçlü bir şekilde belirlemek için popülasyonun yeterli örnek sayısı ile temsil edilmesi önemlidir. Diğer yandan dendogramdaki 5 ve 6 numaralı popülasyonlar 0.90 benzerlik katsayısı ile konumlanırken aynı verilerin temel koordinatlar analiz sisteminde ilk iki boyutta birbirlerinden kolaylık ile ayrılabildiklerini görmekteyiz. Bu da bu tür analizlerin temel koordinatlar sisteminin kullanılabildiği durumlarda çok daha sağlıklı yapılabildiğini gösterebilmektedir.



Şekil 4.15.: Bulkların Temel Matching benzerlik indeksi ile oluşturulmuş Temel koordinat Analizi (2 boyutlu)



Şekil 4.16.: Bulkların Bireylerin Temel Matching benzerlik indeksi ile oluşturulmuş Temel Koordinat Analizi (3 boyutlu)

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışma; 23 yerel mor havuç populasyonları arasındaki varyasyonu belirlemek amacıyla bulk grupları ve rastgele seçilen bireysel gruplar arasında yürütülmüştür. Bu projede kullanılan materyalin ISSR yöntemi ile moleküler karakterizasyonu yapılarak bulk grupları ve bireysel gruplar arasında ayrı ayrı genetik akrabalık dereceleri ortaya konulmaya çalışılmıştır.

5.1. Sonuçlar

ISSR PCR çalışması sonucu bireysel gruplarda toplam 91 fragman skorlanmıştır bu fragmanların 84'ü polimorfiktir, 7'si ise monomorfiktir. Bulk gruplarında toplam 65 fragman skorlanmış, bu fragmanların 50'si polimorfiktir, 15'i ise monomorfik bulunmuştur. Görüleceği üzere bulk grubundan elde edilen toplam fragman da, üretilen polimorfizm oranı da bireysel gruba göre daha düşük düzeyde kalmıştır. Bu da bulk gruptaki örneklere ait temsili DNA içeriğinin mukayeseli olarak daha az olması ile açıklanmaktadır. Bununla birlikte sonuçlar arasındaki farklar incelenerek materyalin ne ölçüde, hangi saflıkta olduğu ile ilgili bilgi vermesi açısından tercih edilen bu analiz yöntemi bireysel olarak olduğu kadar bulk örneklerinde de gruplar arasındaki genetik ilişkileri göstermesi bakımından son derece değerli veriler üretmiştir. Bireysel gruplarda en fazla polimorfik fragman üreten primerler %100 oranda polimorfizm gösteren F2, M9, M10, F8 ve M16 primerleri olmuştur. Bulk gruplarında en fazla polimorfik fragman üretenlerin ise %100 oranda polimorfizm gösteren M10 ve M16 primerlerinin olduğu belirlenmiştir. Elde edilen toplam polimorfizm oranı ise bulk gruplarında %73.9, bireysel gruplarda ise %92.0 oranında tespit edilmiştir. ISSR PCR analizi sonuçlarına göre; dendogram UPGMA (Unweighted pair-group method with arithmetic average) yöntemi ile NTSYS 2.1 pc programı yardımı ile dendogram oluşturulmuştur. Temel bileşenler analizi (PCoA) de aynı programın bir diğer modülü kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Dendogramdan elde edilen sonuca göre yerel populasyonlar birbirlerine yakın lokasyonlarda yetiştirilmelerine rağmen çeşitlilik göstermektedir. Farklı birey gruplarının biraraya getirilip oluşturulan bulk gruplarında polimorfizm oranı bireysel gruplara göre daha düşük oranda olduğu tespit edilmiştir. Bulk gruplarının ve bireysel gruplarının dendogramları karşılaştırıldığında birbirleriyle örtüşmeyen bir sonuç çizmiştir. Bu durum sadece bireysel gruplara bakılarak yapılacak bir ıslah çalışması için yanıltıcı bir sonuç verebileceğini göstermektedir. Tüm popülasyonu daha sağlıklı temsil eden bulk grupları için oluşturulan dendogramda 15

no'lu genotip dış grup gibi hareket ederek, diğer genotiplerden ayrı bir kolda dallanmıştır, ama bireysel gruplarda ise daha içeride bir kolda gruplanmıştır. Hem bireysel hem de bulk gruplarının dendogramları iki ana kolda dallanmıştır. Bulk gruplarının dendogramında 5 ve 6 no'lu genotipler birbirlerine en yakın oranda benzerlik göstermişlerdir. Bireysel gruplarının dendogramlarında 7 ve 9 numaralı genotipler en yakın oranda benzerlik göstermişlerdir. Bulk grupları arasındaki benzerlik 0.48 ile 0.90 arasında değişmekteyken, bireysel gruplarda 0.48 ile 0.83 arasında değişmektedir.

5.2. Öneriler

Bu çalışma mor havuç ıslahında özellikle yerel mor havuç genetik tabanının genişletilmesi çalışmalarında önemli bilgiler taşımaktadır. Yerel mor havuçlarının genotiplerinin geliştirilmesinde bu tez çalışmasının çıktılarının yol gösterici olacağı düşünülmektedir.

Anadolu'da mor havuç olarak isimlendirilen ve tek bir materyal olarak algılanan mor havuç genetik kaynaklarının geniş bir varyasyon gösterdiği, dolayısı ile mor havuç ıslahı ile ilgili çalışmalara yerel mor havuç genetik kaynaklarından yararlanabileceği ortaya çıkmıştır. Bu bağlamda, dış kaynaklı üstün nitelikli F_1 hibrit mor havuç çeşitleri yaygınlaşmadan ülkesel mor havuç ıslah proğramlarının başlatılması zorunluluk olarak görülmektedir. Nitekim otsu bitkilerde genetik erezyon üstün nitelikli çeşitlerin bir bölgede yaygınlaşması ile aşırı boyutlara ulaşabilmektedir.

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, 2015, Türkiye İstatistik Kurumu http://www.tuik.gov.tr. Erişim tarihi 20. 06.2015

Arbizu T, Joan Santamaria, Jose Manuel Gomez, Angel Quilez, Jaume Peres Serra 2014 *Journal of the Neurological Sciences Volume 59, Issue 3*

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.

Metin,.A., Tavil, B., Azık, F., Azkur, D., Bozkaya, I. Kocabas, C., Tunc B, Uckan, D 2012, Successful bone marrow transplantation for DOCK8 deficient hyper IgE syndrome Volume 16, Issue 4, pages 398-399

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 non structured 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.

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

Duman, İ ve Eşiyok D, 1995, Effects of Pre-Sowing PEG and KH_2PO_4 Treatments on Germination Emergence and Yield Carrot.Turkish Journal of Agriculture and Forestry 22, (5): 445-450

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., Zamir, D., 1995, Quantitative trait locus analysis of are combinant ınbred line population derived from a *Lycopersicon esculentum x Lycopersicon cheesmanii* cross, Theor. Appl. Genet., 90:925-932.

Göçmen, M., Çakır, C., Tör, M. Polat, İ., 1999,a., 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,b., Domateslerde (Lycopersicon esculentum Mill.) DNA parmak izlerinin 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.

Havey Michael J. 2004, The Use of Cytoplasmic Male Sterility for Hybrid Seed Production.

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

Joshi.S.P., V.S. Gupta, R.K. Aggarwal, P.K. Ranjekar, D.S. Brar, 2000. Genetic diversity and phylogenetic relationship as revealed by inter simple sequence Rep eat (ISSR) polymorphism in the genus Oryza. Theor. Appl. Genet., 100, 1311-1320

Kiracı S., Padem H., 2015. Havuç Yetiştirciliğinde Bitki Aktivitöelerü ve Mikrobiyal Gübre Uygulamalarının Verim ve Bazı Fizikokimyasal Parametreler Üzerine Etkisi. *SDÜ Ziraat Fakültesi Dergisi*, Cilt 10, Sayı 1 S: 66-72

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.

Lu H., Pope C.N., Sezgin E., Stelle K.S., 1995, Stainless super p-branes, Nuclear Physich B., V: 456 I: 3, P: 669-698

Kallo D ., 1988 Vegetable Breeding Volume III. CRC Press. Inc. ISBN P: 58

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

Nothnagel T., Straka P., Linke B., 2008, Male Sterility in Populations of *Daucus* and the Development of alloplasmic male sterile lines of carrot.Plant Breeding. V:119 (2):145-152

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

Onus, A.N., 1999,b., Üçfarklı Capsicum türünün (*C. annum, C. chacoense, C. baccatum*) izo enzim 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., Havey, M.J., 2000, A genetic map of cucumber composed of RAPDs, RFLPs, AFLPs, and loci conditioning resistance to papaya ring spot and zucchini yellow mosaic viruses,Genome, 43:1003-1010.

Paterson, A.H. 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. 14-17Eylül. Ankara.* 22-26.

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

Sevindik E., Coşkun F., Çetiner N.,G., Selvi, S., Şahin N., 2013., 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 (Meloidogynejavanica) resistance locus in carrot, TheorAppl Genet, 100:439–446

Simon,P.W.ve ark., 2006, Carrot in: Singh R.J. (ed) Genetic resources, chromosome engineering, and crop improvement, Vegetable Crops, CRS Press, 3:497-517.

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

Stein, M., Nothnagel, T., 1995, Some remarks on carrot breeding (*Daucus carota ssp. sativus Hoffm.*). Review. Plant Breed., 114:1-11.

Temizkan G.,Yılmazer S.,Öztürk M.,Arı Ş., Ertan H., Topal Sarıkaya A., Arda N., 2008, Moleküler Biyolojide KullanılanYöntemler.

Winter, P. ve Kahl, G., 1995, Molecular marker technologies for plant improvement. 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.

Zietkiewicz, E., Rafalski, A., Labuda, D., 1994, Genome finger printing by simple sequence repeat (SSR)- Anchored Polymerase Chain Reaction Amplification. Genomics. V:20(2):176-183

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı	**:**	Hilmiye Erişdi
Uyruğu	**:**	T.C
Doğum Yeri ve Tarihi	**:**	Serik/Antalya 1978
Telefon	**:**	05333964077
Faks	**:**	
e-mail	**:**	hilmiye.erisdi@bayer.com

EĞİTİM

Derece		**Adı, İlçe, İl**	**Bitirme Yılı**
Lise	:	Gazi Lisesi/ Muratpaşa/Antalya	1994
Üniversite	:	Akdeniz Üniversitesi/Antalya	2000
Yüksek Lisans	:	Selçuk Üniversitesi/Konya	2015
Doktora	:		

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	**Kurum**	**Görevi**
1999-2000	Özaltın A.Ş	Ziraat mühendisi
2000-2002	Rito Tohumculuk Ltd. Şti	Ziraat mühendisi
2002-2015	Bayer Vegatable Seeds	Biber Islahı

UZMANLIK ALANI Sebze ıslahı

YABANCI DİLLER İngilizce

BELİRTMEK İSTEĞİNİZ DİĞER ÖZELLİKLER

YAYINLAR