T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BAZI ÜMİTVAR TAZE FASULYE (*Phaseolus vulgaris* L.) ÇEŞİT ADAYLARININ ISSR YÖNTEMİ İLE KAREKTERİZASYONU

Hamza ULUTAŞ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

Ocak-2016
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bazı Ümitvar Taze Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) Çeşit Adaylarının Morfolojik ve Moleküler Karekterizasyonu

Hamza ULUTAŞ

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Önder Türkmen
2016, 45 Sayfa

Jüri
Prof. Dr. Ruhsar YANMAZ
Prof. Dr. Önder TÜRKMEN
Doç. Dr. Aydın AKIN

Bu çalışmada; Türkiye'nin çeşitli yörelerinden toplanıp teksel seleksiyon yöntemi ile seçilmiş ümitvar çeşit adayları olarak belirlenen 34 taze fasulye genotipi ile üç ticari çeşit (Sarıkız, Bulduk ve İspir) ISSR tekniği kullanılarak aralarındaki akrabalık ilişkileri ortaya konmuştur. Kullanılan genotiplerin her birinden 12 örnek izole edilmiş ve toplamda 444 izolasyon yapılıp konsantrasyonları eşitlendikten sonra iki adet Bulk grup elde edilmiştir. PCR uygulamalarında toplam 27 primer denenmiş, polimorfizm oranı en yüksek 21 adet ISSR primeri kullanılmıştır. Elde edilen bantlar var yok prensibine göre skorlanmış ve Bulk-1 grubu için 104, Bulk-2 grubu için 108 adet polimorfik fragman bulunmuştur. Veri analizinde NTSYS pc2.1 paket programı kullanılmıştır. Moleküler karakterizasyonda Simple Matching benzerlik katsayısı ile dendrogram oluşturulup genotipler arasındaki akrabalık ilişkileri belirlenmiştir. Bulk-1 grubu içerisinde genetik mesafenin 0.58-0.86 arasında, Bulk-2 grubunda 0.58 ile 0.88 arasında olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen her iki dendrogramda da iki ayrı dal oluşmuş sırık ve oturak hatlar birbirlerinden ayrılmıştır.

Bulk-1 ve Bulk-2 gruplarına ait skorlama verilerinde oluşturulan matrislerin karşılaştırılması için verilere Mantel Testi yapılmıştır. NTSYS paket programı kullanılarak gerçekleştirilen Mantel Testi'nden elde edilen grafik sonucunda iki grubun birbirleri ile yüksek düzeyde benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. İki grubun arasındaki benzerliğin bir ölçüsü olarak test sonucu "r" değeri 0.87916 olarak bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Taze Fasulye, *Phaseolus vulgaris* L., ISSR, Moleküler Karakterizasyon, Islah

ABSTRACT

MS THESIS

MOLECULAR CHARACTERIZATION ON SOME FRESH BEANS (*Phaseolus vulgaris* L.) CULTIVAR CANDIDATES VIA ISSR METHOD

Hamza ULUTAŞ

THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF SELCUK UNIVERSITY
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
IN HORTICULTURAL DEPARTMENT

Advisor: Prof. Dr. Önder TÜRKMEN
2016, 45 Pages

Jury
Prof. Dr. Ruhsar YANMAZ
Prof. Dr. Önder TÜRKMEN
Doç. Dr. Aydın AKIN

34 Genetic materials of the present research are promising genotypes which were collected from different regions of Turkey according to the single selection method were selected and three cultivar (Sarıkız, Bulduk, İspir) determined genetic relationship between them. 12 individual DNA were extracted from each genotype and two Bulk group were made from equally diluted each individuals after totally 444 extraction were performed. In this context, 27 primers were tested in PCR reactions and highly polymorphic 21 ISSR used for differentiate all genotypes. Bands were scored according to presence or absence, 104 polymorphic were obtained for Bulk-1 and 108 polymorphic fragments were obtained for Bulk-2 group. Analysis of data was made by using NTSYS pc2.1 computer based program. For molecular characterization, Simple Matching similarity coefficient was used to create dendrogram and were used to define genetic relatedness within genotypes. For Bulk-1, genetic distance was ranged between 0.58-0.86 values while it was ranged from 0.58 to 0.88 for Bulk-2 group. Both of the dendrograms showed two main groups while the pole and dwarf genotypes were separated.

Comparing of matrix which was constructed from Bulk-1 and Bulk-2 scored data, Mantel Test was performed by NTSYS software. The graphic of Mantel Test that was drawn by NTSYS software showed high similarity between both of the groups. The "r" value was found 0.87916 as a result of similarity rate of the two groups.

Keywords: Fresh beans, *Phaseolus vulgaris* L., ISSR, Molecular Characterization, Breeding.

ÖNSÖZ

Dünya nüfusundaki hızlı artış beraberinde bazı sorunları da getirmektedir. Bunlar arasında en önemlisi gıda sorunudur. İhtiyaç duyulan gıda üretiminin yeterli seviyeye ulaşabilmesi ancak ve ancak bilim ve teknolojideki gelişmeyle mümkün olacaktır. Bu doğrultuda yaptığımız çalışmamız ile nitelikli yerel kaynakların değerlendirilmesi ülkesel çeşit listelerine kazandırılmaları hedeflenmiştir. Bu çalışmada tarımsal üretimde kullanılabileceği düşünülen taze fasulye genotiplerinin ISSR moleküler markır tekniği kullanılarak karakterizasyonu yapılmış ve akrabalık düzeyleri belirlenmiştir.

Böyle bir konuda çalışma imkanı sunan, çalışma süreci boyunca yardım ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen kıymetli danışman hocam Prof. Dr. Önder TÜRKMEN'e teşekkür ederim. Yaptığım çalışmamın baş mimarlarından olan, bizatihi bilgi ve deneyimleri ile çalışmama yön veren değerli hocam Prof. Dr. Erdoğan Eşref HAKKI'ya teşekkür ederim.

Uzun süren laboratuvar çalışmalarında her daim yardımcı olan çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Ayrıca tüm hayatım boyunca namütenahi minnettar olacağım kıymetli aileme teşekkür ederim.

Hamza ULUTAŞ
KONYA-2016

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **iv**

ABSTRACT ..... **v**

ÖNSÖZ ..... **vi**

İÇİNDEKİLER ..... **vii**

SİMGELER VE KISALTMALAR ..... **ix**

1. GİRİŞ **1**

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI **3**

3. MATERYAL VE YÖNTEM **9**

3.1.Materyal 9
3.2. Yöntem 9
3.2.1. Tohumların çimlendirilmesi ve yaprak örneklerinin alınması 9
3.2.2. Moleküler Genetik Çalışmalar 9
3.2.2.1. Sterilizasyon 10
3.2.2.2. DNA İzolasyonu 10
3.2.2.3. Spektrofotometre ile DNA Konsantrasyonu ve Saflıklarının Belirlenmesi 12
3.2.2.4.Elektroforez uygulamaları 12
3.2.2.4.1.Tris-borik asit-EDTA (TBE) Elektrolit Çözeltisinin Hazırlanması 13
3.2.2.4.2.Agaroz Jelin Hazırlanması ve Jel Tepsisine Dökülmesi 13
3.2.2.5. Kullanılan ISSR Primerleri 14
3.2.2.6. PCR'nin Temel Bileşenleri 15
3.2.2.6.1. dNTP Konsantrasyonu 15
3.2.2.6.2. Magnezyum ($MgCl_2$) Konsantrasyonu 15
3.2.2.6.3. Taq DNA Polimeraz 16
3.2.2.6.4. 10X *Taq* DNA polimeraz tamponu 16
3.2.2.7. PCR Koşullarının Optimizasyonu 16
3.2.2.8. İstatistiki analizlerde kullanılacak verilerin elde edilmesi 20

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA **22**

4.1. ISSR Amplifikasyon Sonuçları 22
4.2. Verilerin Değerlendirilmesi 23

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER **29**

5.1. Sonuçlar 29
5.2. Öneriler 30

KAYNAKLAR **31**

EKLER **35**

EK-1 35

ÖZGEÇMİŞ 45

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
°C	: Santigat derece
S	: Saniye
T	:Timin
U	:unit-ünite
µl	: Mikrolitre

Kısaltmalar

AFLP	:Amplified Fragment Length Polymorphism-Çoğaltılmış Parça Uzunluğu
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 Polimorfik DNA
RFLP	:Restriction Fragment Length Polymorphism-Kısıtlanmış Parça Uzunluğu Farklılığı
Taq	:Thermus aquaticus
TTSM	:Tohumluk Tescil ve Sertifikasyon Merkez Müdürlüğü
TBE	:Tris-Borik asit-EDTA
TKoA	:Temel Koordinatlar Analizi
Tm	:Melting Temperature-Erime Sıcaklığı

1. GİRİŞ

Leguminosae familyasına dahil bir baklagil bitkisi olan fasulyenin (*Phaseolus vulgaris* L.) anavatanını bazı araştırıcılar Hindistan, bazı araştırıcılar ise Avustralya ve Afrika olarak bildirmişlerdir. Ancak son olarak anavatanının Amerika Kıtası olduğu savı ileri sürülmüş ve kabul edilmiştir. Bu bitkinin Orta Amerika (Mezo Amerika) ve Güney Amerika (Andean) bölgeleri olmak üzere iki gen havuzu bulunmaktadır (Gepts 2001, Günay 2005). Avrupa'ya 17. yüzyılda giriş yapan fasulyenin bu yüzyıldan sonra tarımı artmış ve dünya genelinde yetiştirilmeye başlanmıştır.

Türkiye'de fasulye üretimi yaklaşık 250 yıl önce başlamış olup, özellikle Karadeniz bölgesinde adaptasyon sağlamış ve geniş varyasyonlar göstermiştir (Sözen ve ark 2012). Dünya'da 50 adet *Phaseolus'*un 5 adedi (*Phaseolus vulgaris, Phaseolus lunatus, Phaseolus coccineus, Phaseolus acutifolius,* ve *Phaseolus poliantus*) insan beslenmesi için yetiştirilmektedir (Singh 1999, Broughton ve ark 2003). Ekonomik ve bilimsel amaçlı üretimde sıkça tercih edilen fasulyenin en önemli üyesi olan *Phaseolus vulgaris* türüdür ve kültürü yapılan fasulyelerin %90'nını bu tür oluşturmaktadır(Gepts 2001).

İnsan beslenmesinde oldukça önemli olan fasulye, besin değeri yüksek olan bir türdür. Farklı şekillerde değerlendirilen, besin değeri çok yüksek olan ve neredeyse tüm dünyada bol miktarda tüketilen önemli bir kültür bitkisidir. İnsan beslenmesi için önemli bir protein kaynağı olan fasulye aynı zamanda önemli bir vitamin kaynağıdır (Karakuş ve ark 2005). Taze fasulye A, B1, B2 ve C vitaminlerince zengindir (Duke 1983).

Ülkemizin bütün bölgelerinde kolayca yetiştirilebilmesi üretimin yayılmasını da kolaylaştırmıştır. Ülkemizde son yıllarda kuru fasulye tüketimin yanında taze fasulye tüketiminde de artış görülmektedir. Bunun nedenleri arasında hem toplumum tüketim alışkanlıklarının değişmesi hem de taze fasulyenin konserve sanayinde kullanımının etkileri olduğu muhakkaktır. Farklı şekillerde değerlendirilen fasulye genel olarak ülkemizin her yöresinde yetiştirilmekte halkın yaş sebze ihtiyacını karşılamada önemli yer tutmaktadır.

Fasulye bitkisi toprağın yapısını düzeltmesi, organik maddesini arttırması, azot biriktirmesi ve çapa bitkisi olması sebebiyle kendisinden sonraki bitkilere temiz ve verimli bir tarla bırakmaktadır. Çevrecilik ve sürdürülebilir tarım uygulamalarının yaygınlaştığı günümüzde bütün bu özelliklerinden dolayı fasulye tarımı, önemini daha da arttırmaktadır. Ülkemizde taze ve kuru fasulye elde etmek üzere iki grup fasulye üretimi yapılmaktadır (Yanar ve Düzdemir 2012).

Dünya'da taze fasulye üretimi yapılan alanlara bakıldığında ülkemizdeki verim kg/da düşük düzeydedir. Bunun nedeni ise kültürel işlemlerin gerekli hassasiyetle uygulanamaması ve sertifikalı çeşitlerin üretimde yeterince yer bulamamasıdır. Sertifikalı çeşitlerin yetersizliği üreticileri orijini tam belli olmayan çeşitlere yönlendirmiştir. Bu nedenle de ürün ve verim kayıplarında en önemli sorun olan sertifikalı çeşitlerin yetersizliği gündeme gelmiştir.

Taze fasulye gibi yüksek oranda kendine döllenen türlerde ıslah programlarının yeterli ve istenilen seviyede olmadığından yabancı kaynaklı birçok çeşit üretim için kullanılmaktadır. Özel teşebbüslerle tohum ithal etmek hem yerel sermayenin dış kaynaklara harcanması hem de yerel popülasyonların kıymetini yitirip erozyona uğraması anlamına gelmektedir. Bu nedenle oluşturulacak olan ıslah programlarında gen havuzunun iyi tanımlanması zorunluluk durumundadır.

Ülkemizde sebze ıslahı konusunda kendi başına klasik ıslah yöntemlerinin dışında biyoteknolojik ve moleküler ıslah programlarıyla beraber sistemli, daha modern ve yenilikçi programlar oluşturulup ihtiyaca uygun pazar taleplerini karşılayabilecek düzeyde çeşitler modern sebze tarımına kazandırılmaktadır (Çebi ve Özkoç 2008, Ekincialp 2012)

Bu gaye ile yapılan çalışmada memleketimizin çeşitli yörelerinden toplanmış agronomik özellikleri bilenen ve belli bir seviyeye kadar saflaştırılmış 34 çeşit adayı ve Bulduk, İspir, Sarıkız olarak bilinen 3 adet ticari çeşit kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışma sonucunda, ISSR markır sistemi ile moleküler karakterizasyonu yapılan çeşit adaylarının akrabalık düzeyini belirleyip yeni çeşitlerin pazara kazandırılmasını hedeflemektedir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Romalılar, kabuk içinde saklı bulunan beslenme maksadıyla kullanılabilen tanelerin tümüne toplayıcılık anlamında Lego'dan gelen "legume" ismini vermişlerdir (Öztürk 2011). *Leguminosae* familyasının *Papilionoideae* alt familyasında bulunan fasulye, *Phaseoleae* takımının *Phaseolinae* alt takımına ait olan *Phaseolus* cinsine ait olan baklagil bitkisidir. Fasulye, Amerika orijinli bir bitkidir ve coğrafik alanlarına göre iki ana gruba ayırmak mümkündür. Bunlar ise Mezo Amerikan (Orta Amerika) ve Andean (Güney Amerika) gruplarıdır. Mezo Amerikan grubu, Durango, Jalisco ve Meksika; Andean grubu ise Nueva Granada, Peru ve Şili olmak üzere üç alt gruba ayrılmaktadırlar (Singh ve ark 1991, Beebe ve ark 2000). Geniş varyasyonlara sahip olan bu türün sadece Amerika'da yetişen 50 yabani formu bulunmaktadır. Bu türler ise vejetasyon süresi (tek yıllıktan çok yıllığa), büyüme şekli (sarılıcıdan oturağa), üreme sistemleri ve adaptasyonları (sıcaktan soğuğa ve nemliden kurağa) bakımından geniş varyasyonlar göstermektedir (Gepts 2001). Her ne kadar anavatanı Amerika olsa da fasulye Anadolu'da birçok yörede doğal seçilimler ve yetiştiricilerin yaptığı seleksiyonlarla yerini almış ve zaman içerisinde bölgesel çeşitler meydana gelmiştir (Ergün 2005).

Türkiye, dünya taze fasulye üretiminde Çin ve Endonezya'dan sonra üçüncü sırada gelmektedir (Anonim 2015 a). Taze fasulyede birim alandan elde edilen verim karşılaştırmasında ise dekara 2 ton/da üretim ile Tacikistan dünyada ilk sırada yer alırken TÜİK 2012 verilerine göre Türkiye'de 528.000 dekar alandan 621.036 ton ürün alınmaktadır (Anonim 2015 b). Bu da yaklaşık olarak dekardan 1,1 ton ürüne tekabül etmektedir. Tüm bu veriler incelendiğinde ise fasulye üretiminin de bir artış gözlenmektedir. Bu nedenle ürününün ileriki yıllarda ekonomik değerinin yükseleceği ve daha nitelikli çeşitlere ihtiyaç duyulacağı bildirilmektedir (Amin ve ark 2014).

Bu veriler ışığında fasulyenin önemli tarım potansiyeline sahip bir bitki olduğu ortadadır. Bu önemini ise içerdiği zengin besin elementlerinden ve taze tüketim, konserve sanayi gibi farklı tüketim şekillerinden almaktadır. Fasulye, kalsiyum, demir, fosfor gibi elementlerle B1 ve B2 gibi vitaminler bakımından da çok zengin olup, üstün bir besleme özelliğine sahiptir. Yüksek oranda diyetsel lif içeren fasulyede kolesterol seviyesi de oldukça düşüktür. Yemeklik tane baklagillerin genellikle yağ oranları düşük olup kolesterol içermezler. Bu bakımdan sağlık açısından birçok diyet programında yer alırlar. Günlük diyetle almamız gereken birçok vitamin (A, B, E) ve mineral (kalsiyum ve demir)

bakımından zengindir. Taze meyveleri C vitaminince zengin kuru taneleri ise fakirdir (Pekşen ve Artık 2005).

Taze fasulyenin vücutta biriken asidi nötralize edebilecek baz fazlalığı mevcuttur. Fasulyenin insan vücudunda sindirilmesi hem kolay hem de sindirilme oranı % 84,1'dir. Şeker hastalığında kullanılan insülin karakterindeki phasol ve phaseolin maddelerinin fasulye baklalarında bulunduğu ve bunların kandaki şeker miktarının düşürülmesinde kullanıldığı bildirilmektedir (Şalk ve ark 2008).

Bünyesinde bulundurduğu antioksidan bileşiklerden dolayı kalp hastalıkları, Parkinson, alzheimer, felç ve karaciğer hastalıkları ve hatta kanseri önlemede etkili olduğu bildirilmiştir. Çölyak hastalarının beslenmesi için hazırlanan diyetlerde, gluten ve gluten benzeri proteinleri içeren tahılların (buğday, çavdar, arpa ve yulaf) tüketilmesi sakıncalı bulunurken, fasulye, nohut, soya, mercimek ve lüpen gibi gluten içermeyen baklagiller güvenli bir şekilde tüketilebilmektedir (Ertaş 2013). Fasulye tek başına insanların ihtiyaç duyduğu proteinin %33'ünü karşılamaktadır. İnsan beslenmesi dışında hayvan beslenmesinde de kullanılabildiği gibi, kozmetik ve boya yapımı gibi bazı kimyasal uygulamalarda da yararlanılmaktadır.

Dünya genelinde önemli bir besin kaynağı olan fasulye içeriği bakımından anahtar özelliğe sahip bir baklagil bitkisidir. Bu özelliğini ise bünyesinde bulundurduğu A ve B vitaminleri, taze meyvelerinde ise C vitamini sağlamaktadır. Ayrıca tanelerindeki protein miktarı (% 22,6) ve karbonhidrat içeriği (% 56) ile mineral madde, demir ve çinko zenginliği nedeniyle fasulye, önemli bir tarım ürünü haline gelmiştir. Yeşil ve kuru iken tohumları alınan bitki artıkları ise hayvan beslenmesinde protein oranı yüksek kaliteli kaba yem olarak kullanılmaktadır (Akçin 1988).

Çarşamba ovasında bodur taze fasulye popülasyonları toplanmış ve ön verim denemesi aşamasına gelindiğinde UPOV kriterleri göz önünde tutularak karakterizasyon analizi yapılmıştır. Elde edilen değerlerle hatlar arasındaki genetik uzaklığı göstermek için yapılan analiz sonucunda en çok benzeyen iki hattın ise TK55(r) Karaayşe(z) olduğu tespit edilmiştir. Ön verim denemesinden itibaren "p" değişkeni kullanılarak yapılan ayırma analizinin kullanılmasıyla benzer olan hatların erken dönemde birbirinden ayırt edilerek kaynak israfının önüne geçilebileceği ortaya konulmuştur (Madakbaş ve ark 2006).

Değişik bölgelerden toplanan 125 adet fasulye genotipinde yapılan bir çalışmada ise fasulye genotiplerinin bitkisel özellikleri değerlendirilerek genotipler arasındaki benzerlik saptanmaya çalışılmıştır. Çalışmada incelenen genotipler morfolojik özellikler

yönünden geniş bir varyasyon göstermiş, özellikle yüz tohum ağırlığına göre genotipler çarpıcı şekilde Güney Amerika ve Orta Amerika orjinli olarak tespit edilmiştir (Türkmen ve ark 2013).

Doksan altı adet fasulye genotipinin fenotipik ve moleküler karakterizasyonu için ülke genelinde yetiştirilen bazı fasulye genotipleri arasından derlenen 71 adet morfolojik özelliğin incelendiği ve sonuç olarak genotipler arasında belirgin fenotipik ve moleküler genetik farklılıkların olduğu bulunmuştur. Moleküler karakterizasyonu yapılan ve net okunabilir bantlar veren 21 ISSR ile 8 RAPD primerine ait veriler kullanılmış ve Jaccard katsayısına göre 3 ve 2 boyutlu ölçeklendirilmeleri yapılmış ve akrabalık ilişkileri belirlenmeye çalışılmıştır. ISSR yönteminde 358 ve RAPD yönteminde ise 116 polimorfik bant elde edilmiştir. Özellikle genotiplerin tohum özelliklerinde gösterdiği farklılıklara göre % 52 Güney Amerika (Andean) ve % 48 Orta Amerika (Meso American) gruplarını temsil ettiği belirlenmiş ve genotipler arasında yüksek genetik çeşitliliğin olduğu bildirilmiştir (Erdinç 2012).

Konya koşullarında yapılan bir çalışmada bazı bodur taze fasulye çeşitlerinin verim ve bazı kalite unsurlarının belirlenmesi maksadıyla, Nadide, Romano Massay, Sarıkız, Nova, Bourgondia, Gina ve Goffora olmak üzere toplamda 8 ticari çeşit kullanılmıştır. Çeşitler arasında verim ve verim unsurları önemli düzeyde farklılık göstermiş, en yüksek verim Sarıkız (1551 kg/da) çeşidinden, en düşük verim ise Bourgondia (605 kg/da) çeşidinden alınmıştır. Bitki başına verim ve bitki başına bakla sayısında Sarıkız'ın ilk sırada yer almıştır. (Seymen ve ark 2010).

Burdur sınırları içerisinde yapılan bir çalışmada ise biri açıkta tozlanan çeşit olmak üzere toplam 12 fasulye genotipinin kalite özellikleri ve morfolojik karakterizasyonu yapılmıştır. Büyüme tipi, bitki boyu, çiçek rengi, bakla uzunluğu, baklada pürüzlülük, baklada kılçıklılık, baklada pigment oluşumu, 1000 tohum ağırlığı, tohum rengi, baklada tohum sayısı, bitki başına bakla sayısı ve ortalama bakla ağırlığı yönünden genotipler arası çeşitlilik olduğu açıklanmıştır (Akbulut 2011).

Yirminci yüzyıl başlarında Gregor Mendel'in ortaya koyduğu genetik yasaların yeniden keşfinden sonra, genetik başlı başına bir bilim dalı haline gelmeye başlamıştır. Böylece, binlerce yıldır çiftçiler tarafından seleksiyon biçiminde yapılan bitki ıslahında, genetik bilgilerin de katkısıyla büyük başarılar hızla elde edilmeye başlanmıştır. Bitki ıslahının gelişmesinde değişik seleksiyon, mutasyon, poliploidi vb. tekniklerinin yanında mekanizasyon, bilgisayar, ulaşım, iletişim gibi diğer alanlardaki gelişmelerin de çok büyük katkısı olmuştur. Bu gelişmelerin en yenisi Mendel Yasalarına uygun kalıtımları

olan moleküler belirteçleri de içine alan biyoteknolojik gelişmelerdir (Hakki ve ark 2001, Khan ve ark 2014).

Portekiz'de 88 adet yetiştirme alanından toplanan ticari fasulye çeşitleri arasından taze fasulye koleksiyonu üzerine 17 kantitatif, kalitatif ve biyomoleküler özellikler üzerine incelemeler yapılmış ve sonuçta, Portekiz'e ait olan taze fasulyelerde orijin, yetiştirme ve genetik varyabilite ortaya konulmuştur (Rodino ve ark 2001).

Genetik tanımlamalar, morfolojik ve moleküler olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Morfolojik belirteçlerin hem dominant karakterli olmaları hem de çevre koşullarından etkilenmeleri sebebiyle kullanımları kısıtlıdır. Protein belirteçleri ise sayılarının az olması, depo enzim ve proteinlerinin az olması nedeniyle kullanımları sınırlıdır. (Kumar 1999, Yıldırım ve Kandemir 2001, Svetleva ve ark 2003)

Moleküler yöntemler ıslah programlarının daha iyi planlanmasını ve yönetilmesinde ve de ayrıca daha az maliyetle yapılmasını sağlamaktadır. Ayrıca analizi uzun ve pahalı olan karakterler için zaman ve ekonomik kazanç da sağlamaktadır. Erken seleksiyon sonucu deneme alanından ve işgücünden kazanç, daha fazla bitkiyle çalışabilme olanağı ve daha kısa sürede ana hedefe ulaşma imkanı da sunmaktadır Morfolojik ve kimyasal markırlar kolaylıkla elde edilebilmesine rağmen moleküler markırlarla kıyaslandığında daha az sayıda markır üretmektedir (Akbulut ve ark 2013).

Genel olarak iki tip moleküler markır bulunmaktadır;

Biri RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism: Kesilmiş Parça Uzunluklarındaki Farklılıklar) tipi moleküler markırlar, DNA-DNA hibridizasyonuyla gerçekleştirilmektedir ve genellikle radyoaktif maddelerle tespit edilmektedir.

Diğer sınıf markırlar ise ISSR (Inter Simple Sequence Repeats: Basit Tekrar Dizileri Arasında Çoğalan Kısımlar), SSR (Simple Sequence Repeats: Basit Dizi Tekrarları), RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA: Rastgele Çoğaltılmış Farklı DNA, AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism: Çoğaltılmış Parça uzunluklarındaki Farklılıklar) ve SRAP (Sequence Characterized Amplified Region: Karakterize Edilmiş DNA Parçaları) CAP (Cleavage Amplified Polymorphism Sequences: Çoğaltılan Parça Mesafeleri) SCAR (Sequence Characterized Amplified Region: Karakterize Edilmiş DNA Parçaları) gibi PCR temelli markırlardır (Rafalski ve Tingey 1993, Gülşen ve Mutlu 2005).

Moleküler markırlar bitki genetiği ve ıslahında yaygın kullanım alanına sahiptirler. Sıklıkla; çeşitlerin tanımlanması ve karşılaştırılması cins, tür ve çeşitler arasında farklılıkları (polimorfizm) gösterecek markırlardan yararlanılarak 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).

Tüm moleküler belirteçlerin kendi içinde bazı avantaj ve dezavantajları bulunmakla birlikte, bunların içerisinden dominant karakterli ISSR tekniği yüksek düzeyde polimorfizm sağlaması sebebiyle ön plana çıkmaktadır. DNA tabanlı akrabalık ilişkilerini ortaya koymada sıklıkla kullanılan ISSR yöntemi Zietkiewicz tarafından keşfedilmiş ve kullanılmıştır. ISSR dominant markır sistemine dayalı bir uygulamadır. Özellikle polimeraz zincir reaksiyonunun kullanımının yaygınlaşmasıyla bu yöntemin kullanımı artmıştır (Zietkiewicz ve ark 1994).

ISSR yönteminin avantajlarından biri de az miktarda DNA'nın yeterli olmasıdır. Bunun yanında, primer için ön dizilim bilgisi gerektirmemesi, uygulamasının kolay olması, maliyetinin düşük olması, iyi derecede polimorfizme ve yüksek tekrarlanabilirliğe sahip olması diğer avantajlarındandır. Bir başka özelliği ise reaksiyonda çoklu bantlara sahip olması, radyoaktif madde kullanımı gerektirmemesi, otomasyona uygunluğu gibi nedenlerle birçok araştırıcı tarafından kullanılmıştır (Tar'an ve ark 2002, Blair ve ark 2009, Yorgancılar ve ark 2009). Tekniğin olumsuz yönleri ise dominant bir markır olmasının gerekliliği her primer için ayrı ayrı sıcaklıkların belirlenmesi gerekir. ISSR, genetik kaynakların karakterizasyonu, varyasyonun belirlenmesi, genotiplerin birbirleri arasındaki akrabalık ilişkilerin ortaya konması ve çeşit tanımlamaları için oldukça elverişli bir yöntemdir (Ertuğrul ve İbrahim 2011).

ISSR markırları ile yapılan bir çalışmada ise acı bakla gen kaynakları araştırılmış ve çalışmada, beş bireyden alınan ve karıştırılan DNA örneklerinin, genotipi tamamen temsil edebileceğini bildirmişlerdir (Gilbert ve ark 1999).

Fasulye için ISSR primeri kullanılarak yapılan bir çalışmada 27 primerden 169 DNA bandının 129'u polimorfik bant olarak elde edilmiş ve yapılan kümeleme analizi sonucunda SK-222 ile SK-131 genotipleri arasında Jaccard katsayısına göre %70 benzerlik tespit edilmiştir (Işık 2012).

Dört adet ticari fasulye çeşidi ve 16 adet İtalyan yerli fasulye çeşidi ile yapılan bir çalışmada genetik akrabalık ilişkilerinin belirlenmesi için RAPD, ISSR ve semi random tekniğini kullanmışlardır. Çalışma için 8 ISSR, 6 RAPD ve 7 semi random primeri polimorfik ve tekrarlanabilir DNA parçacıkları üretilmiştir. Çalışmada, ISSR ile % 85, semi-random PCR ile % 90 ve RAPD ile % 69 oranında polimorfik bantlar elde edilmiştir.

İtalya'dan toplanan 16 çeşidin 3 tanesinin Orta Amerika gen havuzu kökenleri olduğu, 13'ünün ise And gen havuzundan geldiği belirlenmiştir (Marotti ve ark 2007).

Antraknoz hastalığına dayanıklılığın araştırıldığı bir çalışmada, Van Gölü havzasından fenotipik karakterizasyon için toplanan 71 adet morfolojik özellik incelenmiş ve bunlar arasında yüksek korelasyon gösterenler değerlendirme dışı bırakılarak toplam 61 adet özellik kullanılmıştır. Moleküler karakterizasyonda ise 21 ISSR ile 8 RAPD primerine ait veriler kullanılmış; ISSR yönteminde 358 ve RAPD yönteminde ise 116 polimorfik bant elde edilmiştir. Elde edilen veriler ışığında incelenen genotipler arasında belirgin fenotipik ve moleküler genetik farklılıkların olduğu; genotiplerin özellikle tohum özelliklerinde gösterdiği farklılıklara göre % 52 Güney Amerika (Andean) ve % 48 Orta Amerika (Mesoamerican) gruplarını temsil ettiği belirlenmiştir (Ekincialp 2012).

Galicia'daki yerel fasulye çeşitleri arasındaki genetik farklılığın tespiti amacıyla yapılan bir çalışmada 66 adet yerel çeşitte protein band desenlerinin dağılımları tespit edilmiş ve araştırma sonucunda yerel çeşitler, 14 kantitatif ve 5 kalitatif özellik yönünden kümeleme analizi yöntemine göre, 11 grup oluşturmuşlardır (Escribano ve ark 1998).

10 adet ISSR primeri kullanılarak yapılan bir araştırmada elde edilen 92 bandın 82 tanesi polimorfik olarak bulunmuş ve üç farklı coğrafyadan toplanan materyaller arasında Jaccard katsayısı kullanılarak dört ana grup elde edilmiş ve genotipler arasında ortak kan taşıyan bireyler belirlenmiştir. Bu genetik çeşitlilik ise fasulye genotiplerinin doğal olarak kendilenmesi ile ilişkilendirilmiştir (Ortega 2014).

Türkiye'nin Doğu Anadolu Bölgesi'nden derlenen taze fasulye genotipleri 12 SSR markırı ile karakterize edilmiş, 10 adet başarılı amplifikasyon ve DNA polimorfizmi saptanmıştır. Genotipler arasında %98 oranında uzaklık belirlenmiştir (Sarıkamış ve ark 2009).

ISSR markırlarının genetik çeşitliliğin belirlenmesi ve genom haritalarının oluşturulmasında, filogenetik çalışmalarda, evrim biyolojisinde birçok tarla bitkisinde uygulanabilecek yararlı bir teknik olduğunu bildirilmektedir (Reddy ve ark 2002).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1.Materyal

Araştırma Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü iklim odası, sera ve laboratuvarlarında yapılmıştır. Çalışmada bitki materyali olarak ülkemizin çeşitli yörelerinden toplanmış teksel seleksiyona tabii tutulmuş agronomik özellikleri bilinen 34 adet fasulye çeşit adayı ile Sarıkız, Bulduk ve İspir fasulye çeşitleri kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Tohumların çimlendirilmesi ve yaprak örneklerinin alınması

Ekim için hazırlanan tohumlar Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü iklim odasına 2 Şubat 2015 tarihinde ekilmiştir. Her saksıda 20 bitki olacak şekilde saksılar hazırlanmış ve saksılara, 1/3 perlit, 2/3 torf olacak şekilde harç hazırlanıp ekim yapılmıştır. Ekimi takip eden bir haftalık süre içerisinde bitkiler tedrici olarak çıkış göstermiş ve takip eden haftada ise bitkiler yapılacak moleküler çalışma için yeterli büyüklüğe erişmişlerdir. Her genotipten ayrı ayrı olarak steril bisturi yardımıyla bitkinin sağlıklı ve genç yapraklarından (0,20 - 0,25 g) DNA izolasyonu için yaprak örneği alınmıştır.

Çalışmada Bulk Setler (aynı genotipten 12 farklı bireye ait eşit miktarda DNA karışımı ile oluşturulan set) kullanılmıştır. Çalışmanın ilerleyen kısımlarında herhangi bir aksilikten dolayı örnek kaybının yaşanmaması için örnek alınan bitkilerden yedek olarak da yapraklar alınmış ve örnekler sıvı azotta ani şoklama ile dondurularak -86°C'deki derin dondurucuda DNA izolasyonu yapılıncaya kadar muhafaza edilmiştir (Bozkurt ve ark 2007, Pınarkara 2007).

Her bir genotip için 12 bireyden alınan örneklerin dilüsyonları hazırlandıktan sonra genotip olarak bu örnekler kendi içinde bölünerek 6'şarlı olarak iki grup hazırlanmıştır. Dilüsyon tüplerinden steril pipet yardımıyla 25 µl çekilip yeni tüplere aktarılmış ve tüm genotipleri kapsayacak şekilde iki Bulk Set oluşturulmuştur. Böylece hem genotipleri kendi içinde hem de popülasyonun genel olarak incelenmesinde daha kesin bilgilere ulaşılmıştır.

3.2.2. Moleküler Genetik Çalışmalar

Moleküler genetik çalışmalar; Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Moleküler Genetik ve Biyoteknoloji Laboratuvarı'nda yürütülmüştür. Bu çalışmalarla ilgili kapsamlı bilgiler ise aşağıda açıklanmıştır.

3.2.2.1. Sterilizasyon

DNA izolasyonu sırasında kullanılan santrifüjler, homojenizatör (Tissuelyser II), parçalamada kullanılan 4 mm çapındaki çelik bilyeler, ve otomatik pipetler, çalışma sırasında herhangi bir kontaminasyona mahal vermemek için usulüne uygun olarak sterilize edilmiştir.

3.2.2.2. DNA İzolasyonu

ISSR yöntemi kullanılarak yapılacak olan moleküler karakterizasyon için kullanılacak olan genotiplerde DNA izolasyonunun yapılabilmesi için her genotipten 12 bitki örneği kullanılmıştır. İzolasyon işleminde CTAB (cetil three metil amonyum bromid) DNA izolasyon metodu referans alınıp (Doyle ve Doyle 1987), fasulye için modifiye edilerek kullanılmıştır (Hakkı ve ark 2007, Işık 2012).

CTAB metodu ile DNA izolasyonu prosedüründe her örnek için 850 µl CTAB çözeltisi kullanılmıştır. Bu nedenle izolasyon işleminde günlük izolasyon sayısı belirlenip karışım her gün taze olarak hazırlanmıştır. Böylece karışımın çökelmesi, diğer kimyasallarla veya pipet kullanımından kaynaklanan bir kontaminasyona mahal verilmemiştir. Karışım steril bir pipet yardımıyla steril falkon tüplerine boşaltılmıştır. Stok çözeltiden bölünen CTAB çözeltinin içerisine % 1 oranında β-mercaptoethanol ilave edilip karıştırılmıştır. Daha sonra CTAB ile DNA izolasyonu prosedürüne devam edilerek izolasyona başlanmıştır.

CTAB ile DNA izolasyon aşamaları ise aşağıdaki şekil ve sırada uygulanmıştır;

- İzolasyona kadar DNA içeriğinin zarar görmemesi için -86 °C'de muhafaza edilen yaprak örnekleri ultra derin dondurucudan çıkarılarak erimemeleri için sıvı azot içerisine alınmıştır.
- DNA izolasyonunda ezme işlemi için kullanılan Tissuelyser II marka homojenizatörün rakları DNA izolasyonuna başlamadan yarım saat öncesinde -20 °C'de bekletilmiştir.
- 2ml'lik eppendorf tüplerinin içerisine 4 mm çapında çelik bilyeler konulup ardından taze olarak hazırlanmış CTAB çözeltisinden her tüpe 850 µl CTAB + β-mercaptoethanol ilave edilmiştir.
- Yaprak örnekleri 2ml'lik eppendorf tüplerine alınmıştır.
- Örnekler Tissuelyser II'nin raklarına yerleştirilmiş ve parçalamanın daha homojen olması için toplam 20 dakika parçalama yapılmış, bunlarda 10 dakikalık iki periyot olmak üzere parçalayıcının rakları ters çevrilerek yapılmıştır.

- Fiziksel parçalama işleminin ardından tüpler santrifüjde hafifçe çöktürülmüştür.
- Tüplere 4 µl *RNase* A ilave edilerek örnekler 65 °C'de çalışan blok ısıtıcıda (Lab-Line 2001-ICE) 35 dakika süreyle bekletilmiştir. (Beşer dakikalık periyotlarda enzimin homojen olarak etki etmesi ve aktivitesini artırmak için hafifçe karıştırılmıştır.)
- Isıtıcıdan alınan tüplere önce 850 µl Fenol kloroform: izoamilalkol (25:24:1) eklenip daha sonra 200 µl 3 molarlık NaCl eklenen tüpler hafifçe çalkalanıp buz üzerinde 20-25 dakika arasında bekletilmiştir.
- Tüpler santrifüj cihazına alınarak 25 °C'de 7000 rpm'de 5 dakika süreyle santrifüj işlemi gerçekleştirilmiş ve santrifüj edilen tüplerin üzerinde oluşan şeffaf sıvı fazdan otomatik pipetman yardımıyla dikkatlice (alt ve orta fazlardaki örneklerle karıştırılmadan) 700 µl alınarak steril 1,5 ml'lik eppendorf santrifüj tüplerine aktarılmıştır.
- Yeni santrifüj tüplerindeki örneklere 0.6X hacminde izopropil alkol ilave edilmiştir (Örneğin 700 µl şeffaf faz için 420 µl izopropil alkol eklenmiştir).
- Tüpler hafifçe ters-düz edilip (DNA zincirlerinin zarar görmemesi için), pellet oluşumu gözlenmiştir.
- Hafifçe karıştırılan tüpler 25 °C'de, 15000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir.
- Santrifüj edilen örneklerde tüpün dip kısmında DNA pelleti oluşumu gözlenerek tüplerdeki pellet düşürülmeden tüpteki izopropil alkol dökülmüştür.
- Tüpün dip kısmında oluşan genomik DNA pelletleri bulunan tüplere 1000 µl % 70'lik etil alkol ilave edilmiştir.
- Otomatik pipetman yardımıyla 1000 µl etil alkol ilave edilen örnekler 5 dk süreyle 15000 rpm'de santrifüj edilmiştir.
- Santrifüjün ardından etil alkol ile yıkanmış pelletlerin düşmemesine dikkat edilerek tüp içindeki etil alkol tamamen dökülmüştür.
- 6-8 dakika arasında oda sıcaklığında kurumaya bırakılan pelletlerin üzerine daha sonra 100 µl ddH_2O ilave edilmiş ve DNA'nın çözünmesi sağlanmıştır.
- DNA örnekleri çalışma yapılıncaya kadar -20°C'de derin dondurucuya kaldırılmıştır.

Bu çalışmada toplamda 444 bitkiden DNA izole edilmiştir. İzole edilen DNA'lar 100 µl ddH2O içerisinde çözülerek, % 0,8'lik agaroz jelde yürütülmüş ve görüntüleme cihazında DNA'nın varlığı ve parçalanmamış halde bulunduğu belirlenmiştir.

3.2.2.3. Spektrofotometre ile DNA Konsantrasyonu ve Saflıklarının Belirlenmesi

PCR'a dayalı DNA moleküler markır tekniklerinde konsantrasyonun belirlenmesi önem teşkil etmektedir. Bu çalışmada fasulye genotiplerinin konsantrasyonunun belirlenmesi için Thermo Scientific NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer cihazı kullanılmıştır. Her bir örnek için 1 µl izole edilmiş DNA örneklerinden alınarak konsantrasyonları belirlenmiştir.

DNA, RNA, oligonükleotidler ve mononükleotidler seyreltilmiş veya seyreltilmemiş sıvı solüsyonlar içinde, ultraviyole ışığı altında (aynı zamanda görünür dalga boylarında) sahip oldukları absorpsiyon üzerinden direkt olarak ölçülebilmektedir. Örnek saf olduğunda (örneğin proteinler, fenol veya agaroz gibi kontaminantlar düşük miktarlarda mevcut ya da hiç yoksa) nükleotid bazları tarafından absorbe olan ultraviyole radyasyonun miktarı spektrofotometrik olarak basit ve doğru biçimde ölçülebilir. Çift zincirli DNA molekülü için, 1 optik dansitenin (OD) 50µg/ml'ye karşılık gelmektedir. Nükleik asitlerle yapılan çalışmalarda, DNA örneklerinin bulunduğu sıvının OD260/OD280 oranının 1,8 ile 2,0 arasında olması istenmektedir. Nükleik asit süspansiyonunda protein artıklarının bulunması durumunda bu oran önemli ölçüde azalmakta ve nükleik asit miktarının kesin olarak hesaplanması güçleşmektedir (Temizkan ve Arda 1999).

Proteinler 280 nm'de absorbladığı için A260/A280 oranı nükleik asidin saflığını hesaplamak için kullanılır. Saf DNA yaklaşık 1,8-2,0 arasında, saf RNA ise yaklaşık 2,0-2,2 değerleri arasında okuma vermelidir. 230 nm'de görülen absorpsiyon, örneğin karbonhidratlar, fenoller, peptitler, veya aromatik bileşenler gibi maddelerle kontaminasyonu gösterir.

DNA izolasyonu yapılan tüm bireylerin (444 bitki) okunan değerlerine göre DNA konsantrasyonları 40 ng/µl olacak şekilde dilüsyon hesaplamaları yapılmıştır. Tüm örnekler için hesaplanan DNA miktarları yeni tüplere (1 ml lik eppendorf tüp) aktarılmış, hacim steril saf su ile 100 µl'ye tamamlanarak DNA konsantrasyonları eşitlenmiştir.

3.2.2.4.Elektroforez uygulamaları

İzolasyon sonucu elde edilen ve dilüsyonları hazırlanan ardından Bulk Setleri oluşturulan DNA örnekleri hem tek tek birey bazında hem dilüsyon hazırlandıktan sonra ve son olarak da Buklar için TBE (Tris-borik asit-EDTA) çözeltisi kullanılarak elektroforetik görüntüleri alınmıştır.

3.2.2.4.1.Tris-borik asit-EDTA (TBE) Elektrolit Çözeltisinin Hazırlanması

Tampon çözelti olarak Tris-Borik asit-EDTA (TBE) çözeltisi kullanılmıştır. Çözeltide kullanılan EDTA (Etilen Diamin Tetra Asetik Asit) 0,5 Molar (M) ve pH 8.0 olacak şekilde hazırlanmıştır. Stok olarak kullanılmak üzere 10X yoğunlukta çözelti hazırlanmaya başlanmıştır. Borik asit diğer kimyasallara nazaran daha geç çözünen bir maddedir, bu nedenle manyetik karıştırıcı yardımıyla önce 350-400 ml saf suda borik asit çözünmüş, ardından Tris, son olarak ise EDTA ilave edilmiştir.

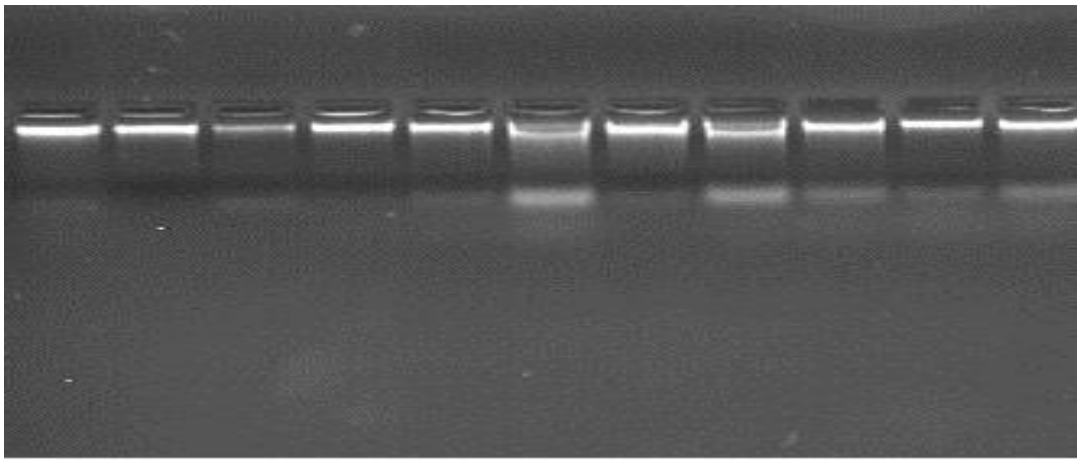
Kimyasallar tamamen çözündükten sonra çözeltinin son hacmi 1 litreye tamamlanmıştır. Bu stok çözeltiden 100 ml alınıp üzeri saf su ile 1 litreye tamamlanarak 1X yoğunlukta TBE elde edilmiştir. Bu çözelti hem elektroforez tanklarına konulmuş hem de agarozu eritmek için jel hazırlarken kullanılmıştır (Çizelge 3.2.2.4.1.1).

Çizelge 3.2.2.4.1.1. 10X TBE (1litre için) stok çözeltisinin hazırlanmasında kullanılan kimyasal maddeler ve miktarları

10X stok TBE tampon çözeltisi (0,5 litre için)	**Miktar**
Tris	54 g
Borik asit	27,5 g
EDTA (0,5 M, pH8.0)	20 ml

3.2.2.4.2.Agaroz Jelin Hazırlanması ve Jel Tepsisine Dökülmesi

DNA ürünlerinin elektroforezde belirlenmesi için agaroz jel kullanılmıştır. Jel hazırlarken, 1X yoğunluktaki TBE tampon çözelti kullanılmıştır. TBE tampon çözeltisinin içerisine izolasyonu yapılan örnekler için % 0,8, PCR ürünleri için ise % 1,2'lik Thermo marka agaroz ilave edilmiştir. Daha sonra yüksek sıcaklıkta (350–450 °C'de) çalışan bir mikro dalga fırın içinde 3-5 dakika kaynatılarak eritilmiştir. Şeffaf bir görünüm kazanınca jel mikrodalga fırından çıkarılarak elle tutulacak seviyeye gelinceye kadar soğumaya bırakılmıştır. Soğumakta olan jelin içine görüntüleme cihazında ultra viyole (UV) ışığında görüntülenebilmeleri için 1,5 µl etidyum bromür ilave edilmiştir. Yeterince soğuması beklenen jel Thermo Scientific A2 marka jel kasetlerine dökülmüştür.



Şekil 3.2.2.4.2.1. 14-O isimli genotipin genomik DNA Jel görüntüsü

3.2.2.5. Kullanılan ISSR Primerleri

Sentetik olarak hazırlanabilen tek iplikçikli spesifik DNA segmentleri olan primerler, kullanılma amaçları doğrultusunda, 6-25 oligonükleotidden oluşmaktadır. Bunlar hedef DNA üzerinde kendine komplementer olan baz sıralarını bularak onlara bağlanır ve buradan DNA sentezinin ilerlemesine basamak teşkil ederler. Primerlerin yapısında % 50-60 kadar G+C (Guanin+Sitozin) bazlarının bulunması, hedef DNA ile daha kuvvetli bağların kurulmasına yardımcı olur. Bu birleşmeler, yüksek ısıda oluşturulan amplifikasyonda nonspesifik bağlanmaları da azaltarak yapılan çalışman sonucunda elde edilecek verilerin güvenilirliğini artırmaktadır (Mukherjee ve ark 2013).

Bu çalışmada toplam 27 adet ISSR primeri denenmiş ancak bunlardan olumlu sonuç veren 21 adet ISSR primeri kullanılmıştır (Çizelge 3.2.2.5.1). Bu primerlerden her bir reaksiyonda toplam 50 pmol/µl kullanılmıştır. Primerlerin yapışma sıcaklıklarının optimizasyonu ve tüm PCR işlemleri Techne ve VWR marka PCR cihazları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Seçilen primerlerden 9 tanesi daha önceki bir çalışmada fasulye için kullanılmış ve polimorfik bulunmuş primerlerden oluşmuştur (Galvan ve ark 2003, Hakkı ve ark 2007).

Çizelge 3.2.2.5.1. Kullanılan primerler, primer sekansları, G+C (%) oranları ile Tm ve yapışma sıcaklıkları

Primer Kodları(ISSR)	Primer sekansı	%GC oranları	Tm (°C)
M1	5‟-AGCAGCAGCAGCAGCG-3‟	68.4	63.1
M2	5‟-ACCACCACCACCACCG-3‟	68.4	63.1
M3	5‟-AGCAGCAGCAGCAGCC-3‟	68.4	63.1
M4	5‟-CACACACACACACACACAC-3‟	52.4	59.8
M5	5‟-GAGAGAGAGAGAGAGAC-3‟	52.6	56.7
M7	5‟-AGAGAGAGAGAGAGAGC-3‟	52.6	56.7
M8	5‟-ACACACACACACACACG-3‟	52.6	56.7
M9	5‟ACACACACACACACCG-3‟	55,5	55.5
M10	5‟-ACACACACACACACCCT-3‟	52.8	54.8
M11	5‟-CACCACCACCACCAC-3‟	66.7	53.3
M12	5‟-GACACGACACGACACGACAC-3‟	61.4	60.0
M13	5‟-CACACACACACA A/GG-3‟	55.5	42,5
M14	5‟-CACACACACACA-3‟	50.0	43.4
M15	5‟-CACACACACACACACAAG-3‟	53.7	50.0
M16	5‟-CACACACACACACACAGC-3‟	55.6	56.0
M17	5‟-CAGCACACACACACACACA-3‟	52.6	56.7
M18	5‟-CGTCACACACACACACACA-3	52,6	57.0
F1	5‟-GAGCAACAACAACAACAA-3‟	49.1	38.9
F2	5‟-CTCGTGTGTGTGTGTGTGT-3‟	56.7	52.6
F3	5‟-AGAGAGAGAGAGAGAGCG-3‟	56.0	55.6
F4	5‟-AGAGAGAGAGAGAGAGTG-3‟	53.7	50.0
F5	5‟-AGAGAGAGAGAGAGAG-3‟	49.2	50.0
F6	5‟-CCAC CAC CACCACCA-3‟	53.3	66.7
F7	5‟-ACACACACACACACAC-3‟	49.2	50.0
F8	5‟-GCC GCCGCCGCCGCC-3‟	67.0	100
F9	5‟-GAAGAAGAAGAAGAA-3‟	39.6	33.3

3.2.2.6. PCR'nin Temel Bileşenleri

3.2.2.6.1. dNTP Konsantrasyonu

Deoksiribonükleozid trifosfatlar (dATP, dGTP, dTTP, dCTP) polimerizasyon basamağında görev alırlar. *Taq* DNA polimeraz, düşük dNTP konsantrasyonlarında (10-100 mM) kalıba uygun doğru bazları seçmede daha başarılı sonuçlar göstermektedir. Ayrıca optimal dNTP konsantrasyonu; $MgCl_2$ konsantrasyonuna, reaksiyon koşullarına, primer konsantrasyonuna, çoğaltılmış ürünün büyüklüğüne ve PCR döngü sayısına bağlıdır. Uygulanacak PCR için en uygun dNTP konsantrasyonu deneysel olarak belirlenmelidir (Temizkan ve Arda 1999). Yapılan denemeler sonucunda Fermantas marka pH 7,0 olan 100mM'lık her bir nükleotidden (dATP, dGTP, dTTP, dCTP) eşit miktarlarda bir karışım hazırlanarak reaksiyon başına 0,4 µl dNTP kullanılmıştır.

3.2.2.6.2. Magnezyum ($MgCl_2$) Konsantrasyonu

Taq DNA polimeraz enziminin iyi bir şekilde çalışabilmesi için; kalıp DNA, primerler üzerinde serbest Mg iyonlarının bulunması gerekir. Ayrıca Mg^{+2} iyonları

dNTP'ler ile çözünebilir kompleksler oluşturur, polimeraz aktivitesini ve çift iplikli DNA'nın Tm değerini arttırırlar. Ayrıca primer ve kalıp DNA arasında etkileşimi sağlarlar. Bu nedenle $MgCl_2$'un PCR'ın özgünlüğü ve amplifikasyonun verimi üzerinde çok önemli etkisi vardır. Genellikle optimum $MgCl_2$ olarak 0.5-3.0 mM'lık değerler tercih edilir. Düşük Mg^{+2} konsantrasyonu, ürün oluşumunda azalmaya, yüksek Mg+2 konsantrasyonu ise spesifik olmayan PCR ürünlerinin oluşmasına yol açar (Arıkoğlu ve ark 2014). Optimizasyon denemeleri sonucunda ticari olarak satılan Fermantas Marka 25 mM'lık $MgCl_2$ stok çözeltesinden reaksiyon başına 2.5 µl kullanılmıştır.

3.2.2.6.3. Taq DNA Polimeraz

*Thermus aquatiqus'*dan elde edilen ısıya dayanıklı bir enzimdir. Enzim 5'-3' ekzonükleaz aktivitesine sahiptir. 3'-5' ekzonükleaz aktivitesi yoktur. Dolayısıyla sentezin yönü 5' uçtan 3' uca olup, primerin serbest 3' hidroksil ucuna ortamda bulunan dNTP'lerin nükleofilik etkileri nedeniyle, fosfodiester bağlarının katalizi ve yeni DNA ipliğinin polimerizasyonu sağlanır. Bu enzim grubu, amplifikasyonu başlatmak için kalıp moleküldeki tamamlayıcı diziye bağlanan kısa DNA parçalarına (primerlere) gerek duyarlar. Yüksek konsantrasyonlarda enzim kullanımı spesifik olmayan ürünlerin oluş-masına, düşük konsantrasyonlarda ise yetersiz ürün oluşmasına sebep olabilir (Temizkan ve ark 2008). Çalışmada Fermantas marka *Taq* DNA polimerazdan reaksiyon başına 0.2 µl (5 ünite/µl) enzim kullanılmıştır

3.2.2.6.4. 10X *Taq* DNA polimeraz tamponu

PCR çalışmaları sırasında en çok tampon olarak kullanılan *Taq*/Ampli*taq* enzimlerine özgü olan tampondur. Tampon çözelti içeriği; 160 mM (NH4)2SO4, 670 mM Tris HCl pH 8,8, 0,1 % Tween-20 şeklindedir. Bu çalışmada kullanılan 10X reaksiyon tamponu Fermantas marka MgCl2 ve *Taq* DNA polimeraz enzimi ile birlikte gelmiş olup, reaksiyon başına 2,5 µl kullanılmıştır.

3.2.2.7. PCR Koşullarının Optimizasyonu

Polimeraz zincir reaksiyonu, çift iplikli bir DNA molekülünde, hedef dizilere iki oligonükleotid primerin bağlanması ve uzaması esasına dayanır. Amplimer olarak da anılan oligonükleotid primerler, kalıp DNA molekülü yüksek sıcaklık derecelerinde denatüre edildikten sonra, tek iplikli DNA molekülleri üzerinde kendilerine tamamlayıcı olan bölgelerle eşlenir.

Primerlerin, spesifik olan hedef dizilere bağlanması düşük sıcaklık derecelerinde gerçekleşir. DNA polimeraz enzimi, uygun tampon ve dört çeşit dNTP (dATP, dGTP,

dTTP, dCTP) varlığında primerin 3' hidroksil ucundan uzamasını sağlar. Böylece kalıp DNA ipliğine tamamlayıcı olan yeni DNA molekülünün sentezlenmesi sağlanmış olur.

Bir PCR döngüsü denaturasyon, primerin bağlanması (annealing) ve uzama (extension) olarak adlandırılan üç aşamadan oluşur. Ard arda tekrarlanan denaturasyon, primerin bağlanması ve uzaması evreleriyle DNA fragmentleri üssel olarak artar. Bu üssel artışın nedeni, bir döngü sonucu sentezlenen ürünün, ardışık döngüde, diğer primer için kalıp görevi yapmasıdır. Böylece her PCR döngüsü, DNA molekülü üzerinde istenen bölgenin iki katına çıkması ile neticelenir (Şahin ve ark 2000, Özcan ve ark 2001).

- **Çift sarmal yapıda bulunan DNA'nın birbirinden ayrılması (Denatürasyon):**

Denaturasyon, çift zincirli DNA moleküllerinin sıcaklıkla açılmasıdır. G – C oranı bakımından zengin dizilerde denaturasyon ısısı artabilir. Denaturasyonun tam olmaması halinde PCR veriminde düşüşler meydane gelmektedir. DNA' nın uzun süre yüksek sıcaklıkta bekletilmesi ise DNA polimeraz aktivitesini düşürüp yine PCR verimini olumsuz etkiler.

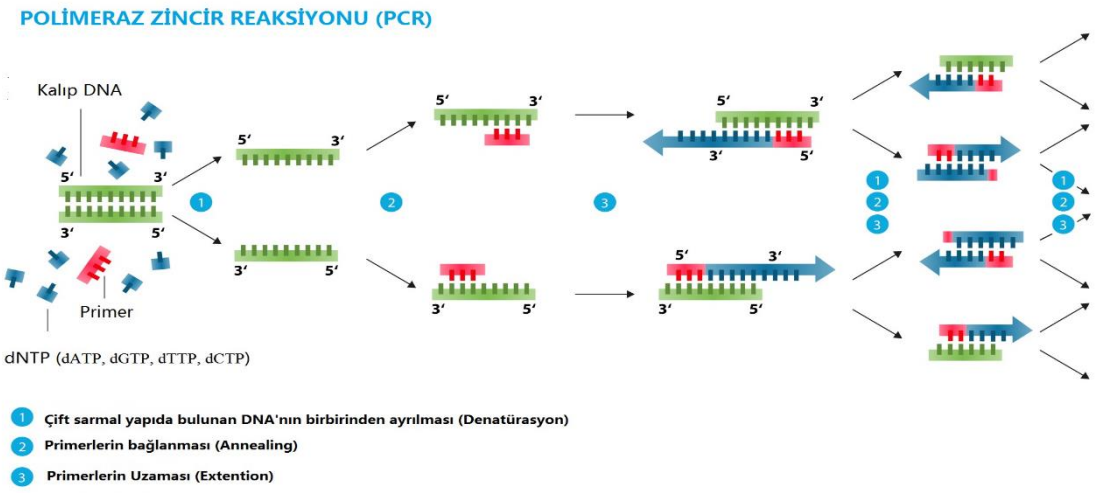
- **Primerlerin bağlanması (Annealing):**

Sıcaklık 38 - 70 °C'de arasında bir değere düşürülür ve önceden tasarlanan primerlerin tek zincirli hale getirilmiş DNA'ya bağlanması sağlanır. Bu primerler çoğaltılacak DNA kısmının uçlarındaki tamamlayıcı dizilere karşılıklı olarak birbirlerine bakacak şekilde özgül olarak bağlanırlar.

Primer bağlanması için gerekli zamanın uzunluğu ve uygulanacak ısı amplifikasyon primerlerinin baz içeriğine uzunluğuna ve konsantrastonuna bağlıdır.

- **Primerlerin uzaması (Extention):**

Zincir uzaması daima 5' - 3' yönünde olup, uzama hızı 35-100 nükleotid/saniyedir. Uzama zamanı; hedef dizinin derişimine, uzunluğuna ve ısıya bağlıdır. En uygun sıcaklık 72 °C' de 1 dakikadır.



Şekil 3.2.2.7.1 Polimeraz zincir reaksiyonu aşamaları (Bartlett ve Stirling 2003)

PCR reaksiyonu ile hangi dizilişin üzerinde DNA üretimi yapılacağını belirleyen iki faktör vardır. Bunlar arasında en önemlisi primerin kendi dizilişidir. Yeterli uzunlukta spesifik dizilişlerin kullanılması durumunda genomun çok spesifik bir bölgesine ait DNA üretilebilir. Kısa ve rasgele dizilişe sahip primerlerin kullanılması durumunda rastgele bölgelere ait DNA üretimi gerçekleşir.

DNA üretiminin yapılacağı yeri belirleyen ikinci faktör ise primerin yapışmasının gerçekleştirildiği sıcaklık derecesidir. 30-40 °C gibi düşük sıcaklıklara inildiğinde primer pek çok yere kolayca yapışacağı için pek çok yere ait spesifik olmayan yanıltıcı amplifikasyonlar yapılır. Yapışma sıcaklığının yüksek tutulmasıyla (55-60 °C'de) ise primer daha spesifik bölgelere yapışır ve buradan üretim yapar (Özcan ve ark 2001).

PCR'da kullanılacak olan kimyasalların optimizasyonu tamamlandıktan sonra PCR çalışmalarına başlanmıştır. Reaksiyonlar steril, ince çeperli, düz kapaklı, *RNase* ve *DNase-free* 0.2 ml'lik PCR tüplerinde ve 2.5 µl DNA+22.5 µl karışım (*reaction mix*) olacak şekilde 25 µl hacimde gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.2.2.7.1).

Çizelge 3.2.2.7.1. PCR reaksiyonlarında kullanılan kimyasalların miktarı

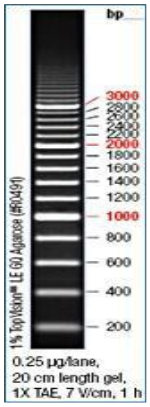
Reaksiyon Karışımı	**Kullanılan Miktar**
DNA miktarı (40g/µl)	2.5 µl
10X *Taq* tampon çözeltisi	2.5 µl
25 mM $MgCl_2$	2.5 µl
25 mM dNTP (A, T, G, C)	0.4 µl
Primer (50 pmol/µl)	0.5 µl
5 u/µl *Taq* DNA polimeraz	0.2 µl
TOPLAM	**25 µl**

Çalışmada kullanılan DNA ve kimyasallar -20°C'de derin dondurucuda muhafaza edilmiş ve PCR çalışmaları örneklerin ve kimyasalların bozulmaması adına buz üzerinde gerçekleştirilmiştir. Herhangi bir bulaşma (kontaminasyon) oluşmasını önlemek amacıyla çalışma yapılırken kullanılacak olan tezgah ve otomatik pipetmanlar %70'lik teknik alkolle temizlenmiştir. Örnek sayısına göre 0,2 ml'lik PCR tüpleri hazırlanmış ve -20°C'deki DNA tüpleri çıkarılmış ve oda sıcaklığında çözünmesi sağlanmıştır.

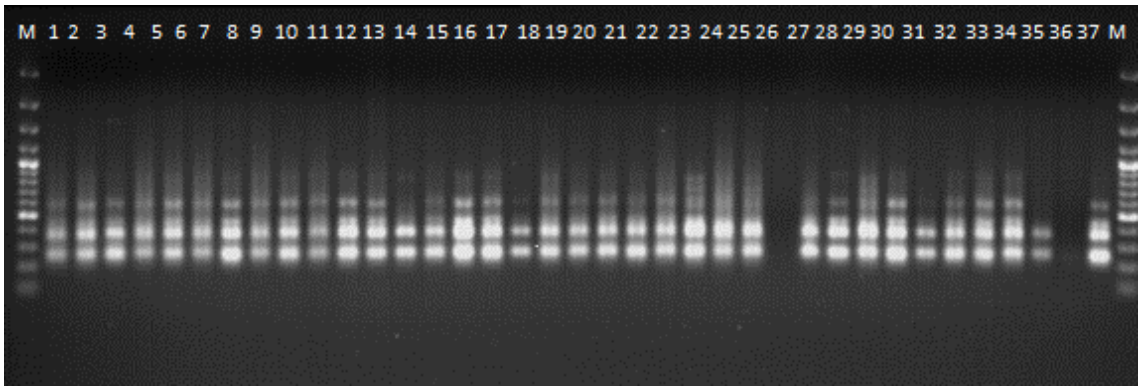
Her bir PCR tüpüne ilk olarak 2,5 µl DNA (toplam 100 ng) ilave edilmiştir. Karışım tüpüne en son olarak *Taq* DNA polimeraz enzimi ilave edilmiş ve *Taq* DNA polimerazın çökelmesini engellemek için vorteks yardımı ile homojen bir şekilde karıştırılmıştır. Daha sonra PCR tüplerine 22,5 µl karışım dağıtılmıştır. Böylece tüplerdeki toplam hacim 25 µl (2,5µl DNA+22,5 µl reaksiyon karışımı) olmuştur. Hazırlanan PCR tüpleri kullanılan ISSR primerine göre uygun program ayarlanarak örnekler PCR cihazına yerleştirilmiştir.

PCR sırasında reaksiyon karışımının tüplerden buharlaşmasını engellemek amacıyla cihazın kapak sıcaklığı 105 °C ve blok sıcaklığı 94 °C'ye ayarlanmıştır. PCR çalışmaları her iki Bulk grubuna aynı şartlarda uygulanmıştır. Yalnızca amplifikasyon sıcaklık ve süreleri kullanılan primerlerin Tm sıcaklıklarına bağlı olarak her PCR için ayrı ayrı optimize edilmiştir.

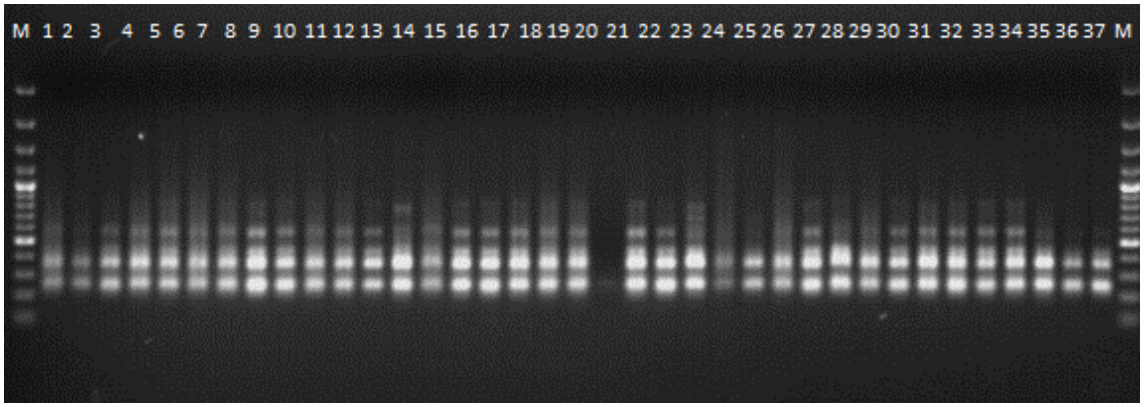
PCR ürünleri %1'lik agaroz jele yüklenerek, 3-4 saat elektrik akımına (80-90 Volt) tabi tutulmuştur. Birinci yuvalara çoğaltılan DNA parçalarının boyunun tespit edilmesi amacı ile uzunluk markırı olarak Fermentas marka O'Range Ruler™ 200 bp DNA Ladder (Şekil 3.2.2.4.2.2) yüklenmiş ve sonuncu yuvalara ise negatif kontrol yüklenmiştir. DNA'ların jele yükleme sıraları ise tüm primerler için Şekil 3.2.2.7.2 ve Şekil 3.2.2.7.3.'deki gibidir.



Şekil 3.2.2.4.2.2. Çalışmada kullanılan Fermentas marka O'Range Ruler™ 200 bp DNA Ladder



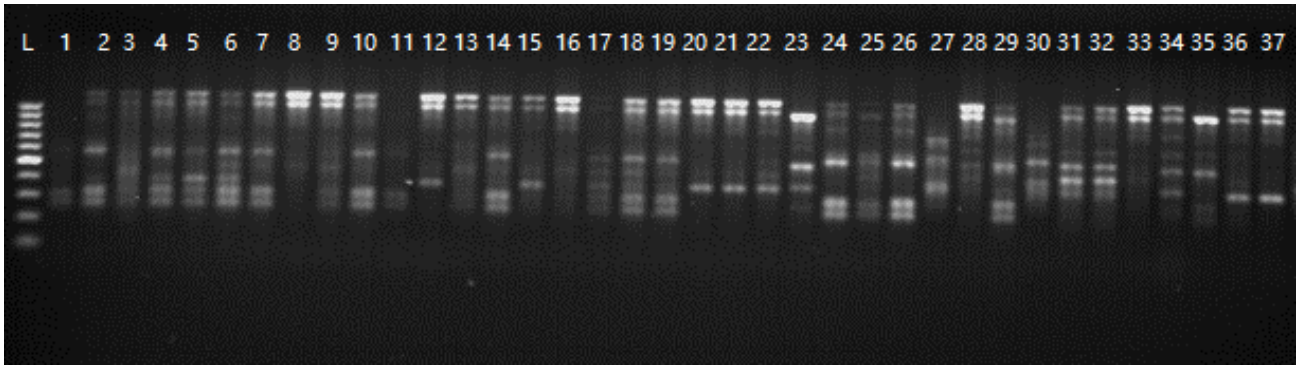
Şekil 3.2.2.7.2. F5 Primerinin Bulk-1 için DNA jel görüntüsü



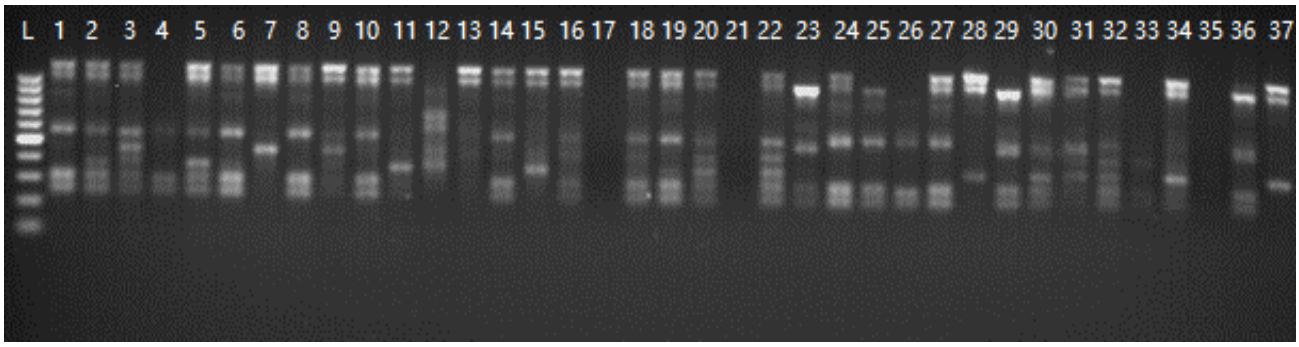
Şekil 3.2.2.7.3. F5 Primerinin Bulk-2 için DNA jel görüntüsü

3.2.2.8. İstatistiki analizlerde kullanılacak verilerin elde edilmesi

Dominant karaktere sahip markırlar arasında 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 ve '9' ise çalışmayan örneği temsil etmektedir. Üzerinde çalışılan her bireyde benzerlik ya da farklılıkları belirlemek amacıyla, aynı satırdaki bu bantlara bakılarak elde edilen sonuçlar skorlanmış ve kayıt edilmiştir (Şekil 3.2.2.8.1(Bulk-1), Şekil 3.2.2.8.2(Bulk-2)).



Şekil 3.2.2.8.1. F2 primerinin Bulk-1 için alınan jel görüntüsü



Şekil 3.2.2.8.2. F2 primerinin Bulk-1 için alınan jel görüntüsü

Bulk setler 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 Arithmetic Average*) göre kümeleme (cluster) analizi yapılarak genotiplere ait dendrogram oluşturulmuştur. Minitab14 programı kullanılarak iki boyutlu ölçekleme ve temel koordinatlar analizi (Principal Coordinate Analysis) yapılmıştır.

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

Çalışmada 34 adet fasulye çeşit adayı, Sarıkız, Bulduk ve İspir adlı ticari çeşitler kullanılmış ve toplamda 444 adet bireyden DNA izolasyonu ayrı ayrı yapılmıştır. Elde edilen genomik DNA'ların spektrofotometre ile okumaları gerçekleştirip A260, A280, A320, A260/A280, A260/A320 konsantrasyonları EK-1'de verilmiştir. Okumaların ardından DNA'lar % 0,8'lik agaroz jelde yürütülmüş ve bu veriler ışığında DNA'ların yapılacak olan ISSR - PCR çalışmaları için yeterli kalitede olduğu saptanmıştır. ISSR çalışmasına başlamadan önce her genotip için izole edilen ve çalışma konsantrasyonları için eşitlenip dilüsyonları yapılan 12 örnek ikiye bölünüp iki adet Bulk grubu oluşturulmuş ve çalışma bu Bulk grupları arasında gerçekleştirilmiştir.

4.1. ISSR Amplifikasyon Sonuçları

Çalışmada dominant bir markır sistemi olan ISSR için 27 adet primer denenmiş bunların arasından tekrarlanabilir net bant veren 21 adet primer ile çalışma tamamlanmıştır. Bantların skorlamaları ise Bulk-1 ve Bulk-2 için ayrı ayrı yapılmıştır. Skorlanan bu bantların polimorfizm oranları belirlendikten sonra her primer için polimorfizm yüzdesi tüm genotipler için elde edilmiştir. Oluşturulan Bulk-1 grubunda kullanılan 21 primerden; F2, M1, M3, M5, M7, M8, M10, M12, M17, M18 primerleri %100 polimorfik olarak bulunmuştur. Bu grup içerisinde 119 bant skorlanıp bunların 104 tanesi polimorfik olup Bulk-1'in polimorfizm oranı %87,3 olarak saptanmıştır.

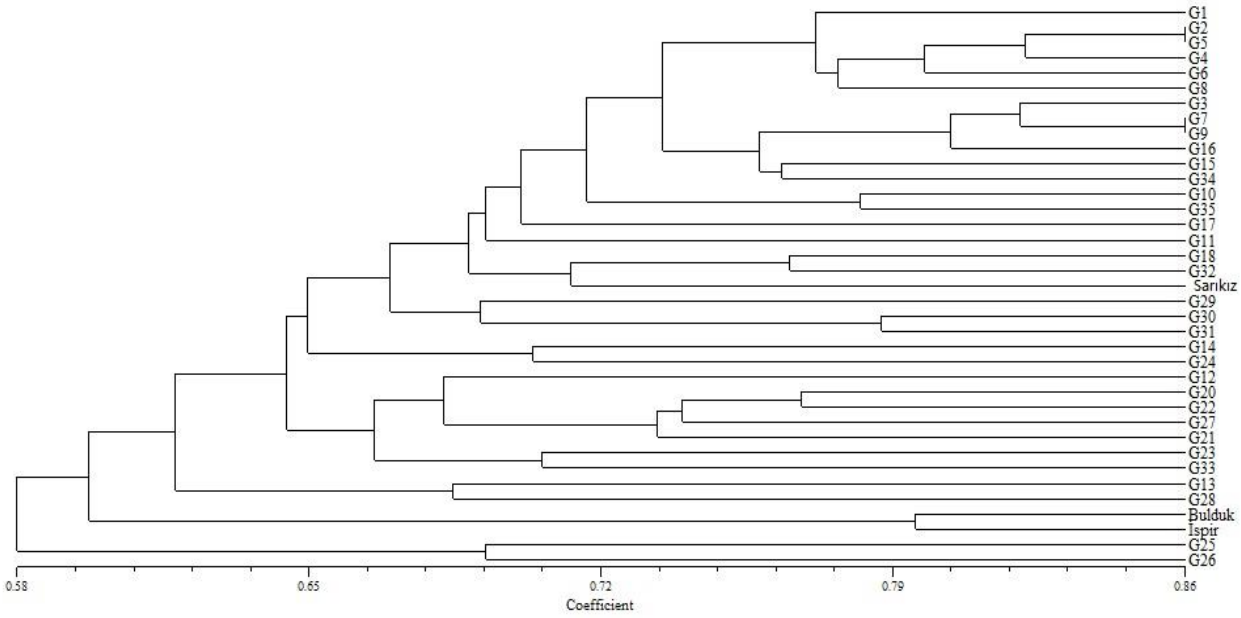
Bulk-2 için yapılan 21 ISSR primeri için sonuçlarda ise %100 polimorfizm gösteren primerler F2, F3, M1, M3, M5, M7,M8, M10, M12, M17, M18 olarak belirlenmiştir. Toplam skorlanan 121 bandın 108 tanesi polimorfiktir. Grubun genel polimorfizmi ise %89.25 olarak bulunmuştur. Bulk-1 için 104 (%87.3) polimorfik fragman skorlanmış, Bulk-2 için ise 108 (%89.25) polimorfik fragman skorlanmış ve elde edilen bu polimorfizm ile çeşitlerin birbirleri ile akrabalık ilişkileri ortaya konulmuştur (Çizelge 4.1.1.).

Çizelge 4.1.1. Bulk-1 ve Bulk-2 için elde edilen polimorfizim yüzdeleri

	BULK-1			BULK 2		
Kullanılan Primerler	Skorlanan Fragman	Polimorfik Fragman	Polimorfizm Yüzdesi	Skorlanan Fragman	Polimorfik Fragman	Polimorfizm Yüzdesi
F1	4	2	50	4	2	50
F2	9	9	100	10	10	100
F3	3	2	66.6	3	3	100
F4	3	2	66.6	3	2	66.6
F5	5	3	60	4	3	75
F7	4	3	75	4	3	75
F8	3	2	66.6	3	2	66.6
F9	2	1	50	2	1	50
M1	5	5	100	5	5	100
M2	6	5	83.3	7	6	85.7
M3	8	8	100	8	8	100
M4	4	3	75	4	3	75
M5	11	11	100	11	11	100
M7	4	4	100	4	4	100
M8	5	5	100	5	5	100
M10	6	6	100	7	7	100
M12	6	6	100	6	6	100
M13	4	3	75	4	3	75
M15	9	8	88.8	9	8	88.8
M17	9	9	100	9	9	100
M18	7	7	100	7	7	100
TOPLAM	119	104	87.3	121	108	89.25

4.2. Verilerin Değerlendirilmesi

Genotipler arasındaki akrabalığın belirlenmesinde Simple Matching benzerlik indeksi kullanılmış ve benzerlik matrisleri oluşturulmuştur. Benzerlik matrisleri kullanılarak, NTSYSpc-2.10d paket programında ağırlıklı olmayan aritmetik ortalama eş grup metoduna (UPGMA) göre kümeleme (cluster) analizi yapılarak genotiplere ait dendrogram oluşturulup, iki boyutlu ölçekleme ve temel koordinatlar analizi (Principal Coordinate Analysis) yapılmıştır.

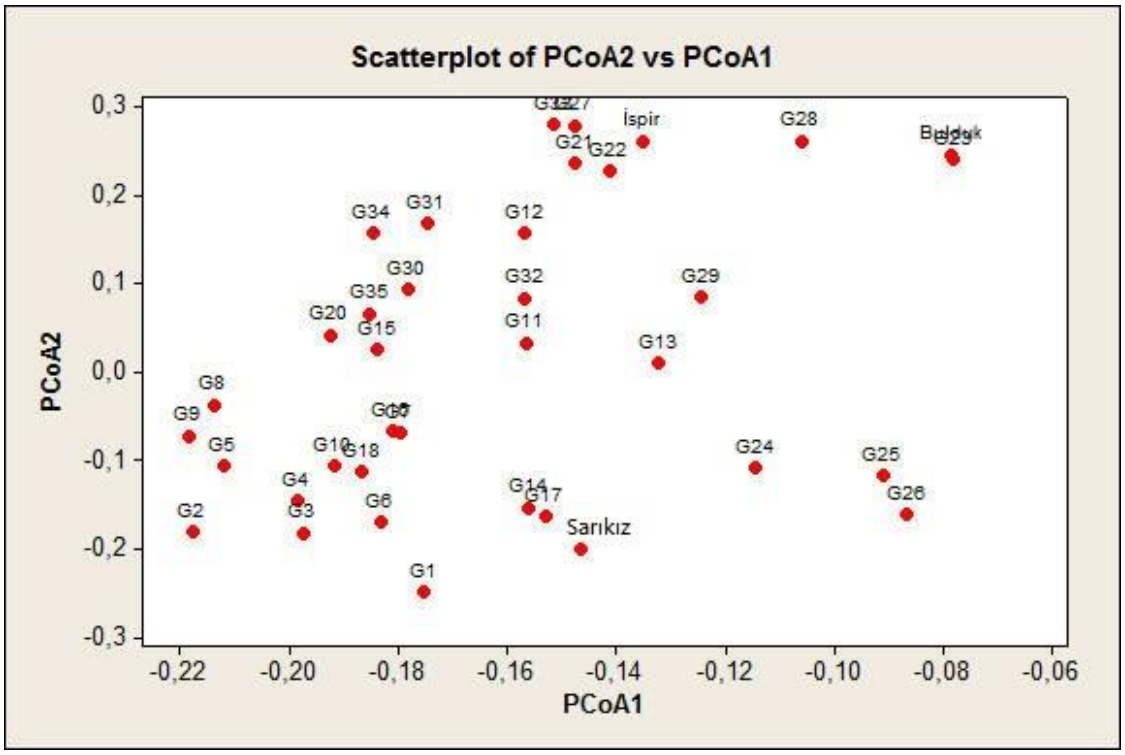


Şekil 4.1.1. Bulk-1 için Simple Matching benzerlik indeksi kullanılarak çizilmiş dendrogram

Bulk-1 grubuna ait dendrogram göz önüne alındığında genotipler arasındaki genetik uzaklığın 0.58-086 arasında olduğu tespit edilmiştir. Oluşturulan dendrogramda geniş bir gruplanma görülmüştür. Yakın gruplanmalar arasında, 0.75 civarındaki alt gruplanmada büyük grup içerisinde ayrışmayan 4 genotipin bulunduğu görülmektedir (G2-G5 ve G7-G9). Büyük ana gruplar arasındaki diğer bir genetik ayrışmanın 0.65 civarında olduğu görülmektedir. Diğer küçük alt grupların ana gruplara olan genetik uzaklığı ise 0.58-0.68 arasında değişmektedir. Bu alt gruplanmaların her birinde birbirine daha yakın alt grupların yanında bu alt gruplardan nispeten ayrı düşen örneklerin de yer aldığı bilhassa göze çarpmaktadır. Çalışmada kullanılan benzerlik katsayısına göre genel hatlarıyla oturak ve sırık tipteki genotipler birbirinden ayrıştırılmıştır.

Yapılan çalışma kapsamında değerlendirilen genetik materyal ve ticari çeşitler göz önüne alındığında ileri düzeyde saflaşmış olan hatlar Sarıkız çeşidi ile benzerlik göstermiştir. Bu benzerlik daha özelde değerlendirildiğinde oturak tipinde olan genotiplere genetik olarak birbirlerine daha yakındır. Diğer ticari çeşitler olan Bulduk ve İspirin ise değerlendirilen bazı genotiplerle birlikte iki ana gruptan farklılık göstererek ayrıştığı ve bu çeşitlerin birbirlerine genetik olarak kayda değer bir yakınlık gösterdiği belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan genetik materyal arasından G32 ve G18 genotipleri Sarıkız genotipi ile oldukça benzerlik göstererek oturak genotiplerin bir arada kümelendiği büyük ana grup içerisinde yer almıştır. Bu da hatlardaki genetik altyapının Sarıkız genotipinden oldukça etkilendiğini göstermesi açısından önemlidir. Çalışmada

değerlendirilen diğer ticari çeşitler olan Bulduk ve İspir genotiplerinin G13, G28 ve G25, G26 Genotipleri ile yakın ilişki göstererek değerlendirme sonucunda ortaya çıkan büyük ana gruplara olan genetik uzaklığının 0.60 dolaylarında olduğu tespit edilmiştir. Bulduk ve İspir çeşitleri kendi aralarında yakın ilişkide olup hatların genelinden daha farklı genetik içerikte oldukları ve sadece belirli bazı hatlarla genetik benzerlik taşıdıkları görülmektedir (Şekil 4.1.1.).

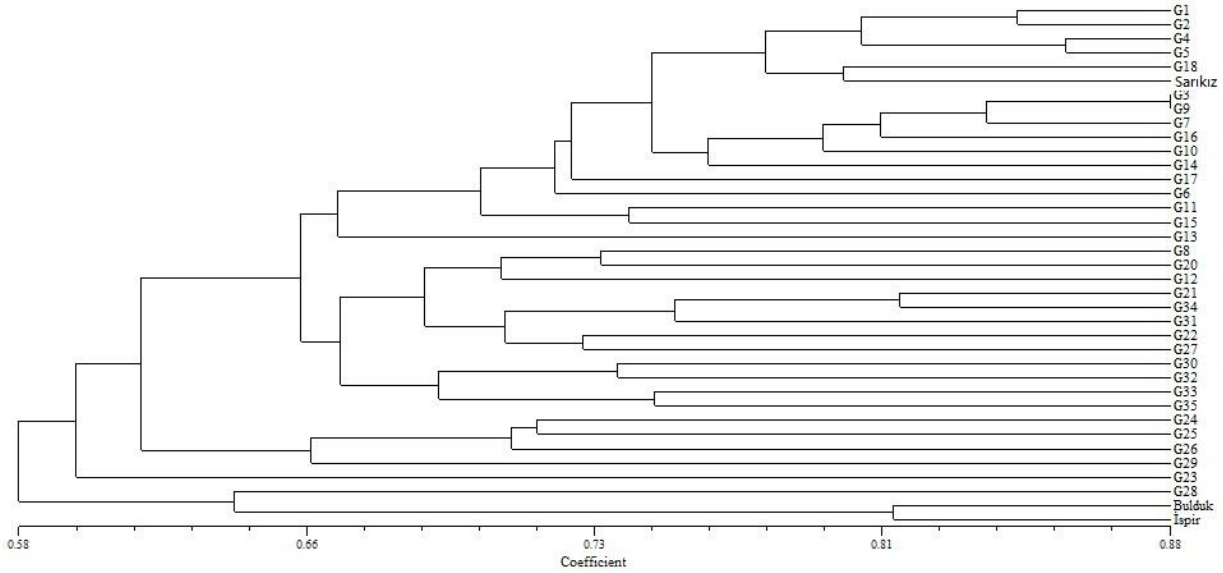


Şekil 4.1.2. Fasulye çeşit adayları arsındaki ilişkiyi gösteren, Minitab14 programı kullanılarak çizilen temel koordinatlar analizi

Aynı skorlama verileri kullanılarak temel bileşenler analizine göre dendrogram verilerinde aynı büyük alt grup da yer alan G12, G20, G22, G27, G21, G23 ve G33 gibi genotiplerin temel bileşenler analizi ile sınırları geniş bir kümelenme gösterdiği görülmektedir. Bu temel bileşenler analizine göre, dendrogramda belirtilen gruptan ayrı profil gösteren ticari olarak kullanılan İspir çeşidi, yukarıda belirtilen genotiplerin yer aldığı gruba uzak konumlanmıştır. Dendrogram ve temel bileşenler analizi arasında ana hatlarda benzerlik görülmekle birlikte gözlemlenen farklılıklar temel bileşenler analizinin genotipler arasındaki ayrışımın iki boyutlu ölçümde serbest yerleşiminden kaynaklanmaktadır.

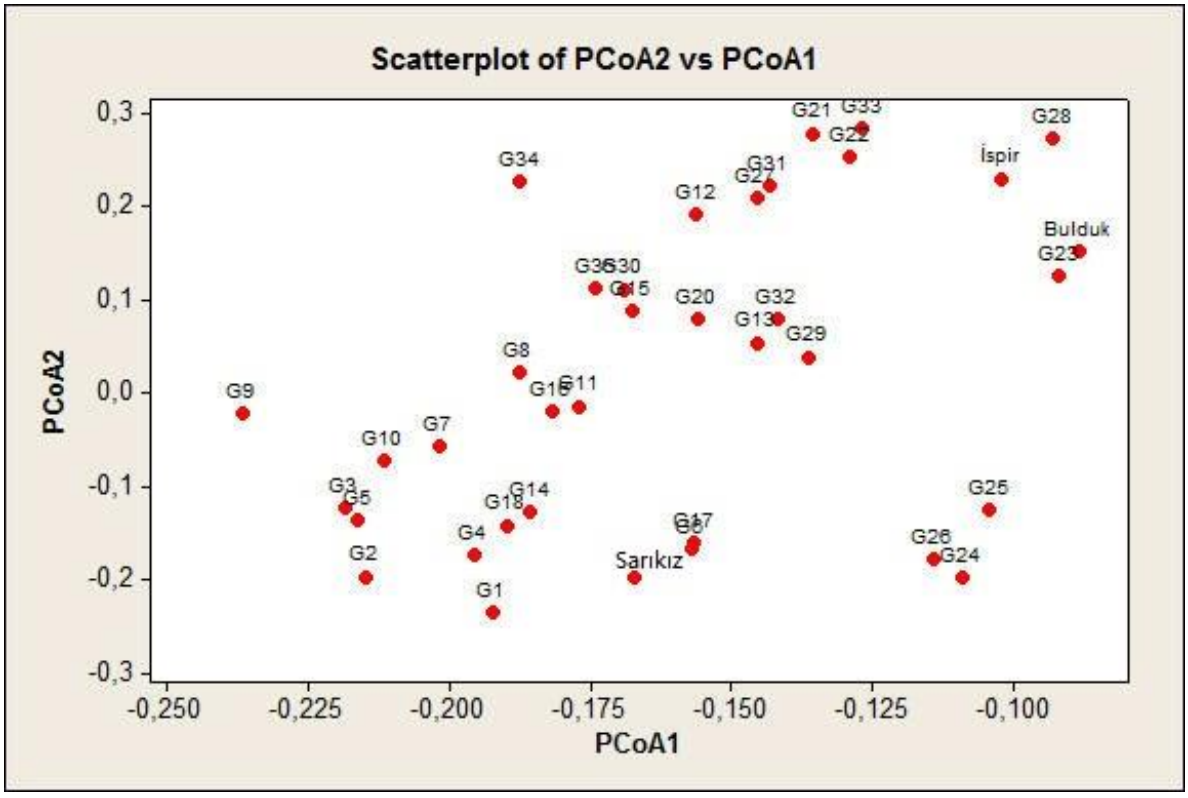
Dendrograma göre diğer büyük alt grubu oluşturan oturak genotipler ise bu analize göre birbirlerine benzemekle birlikte dağınık bir profil göstermiştir. Ayrıca

dendrogramda en uzak genotipler konumunda olan G25 ve G26 genotipleri temel bileşenler analizi ile de en uzak konumda olduğu doğrulanmıştır. Dendrogramdan farklı olarak sırık genotipler arasında yer olan G23'ün Bulduk ticari çeşidi ile oldukça yakın ilişki içinde olduğu görülmektedir. Sonuç olarak dendrogram ile elde edilen bulgular farklı bir analiz metodu olan temel bileşenler analizi yöntemi ile belli oranda örtüştüğü görülmektedir (Şekil 4.1.2.).



Şekil 4.1.3. Bulk-2 için Simple Matching benzerlik indeksi kullanılarak çizilmiş olan dendrogram

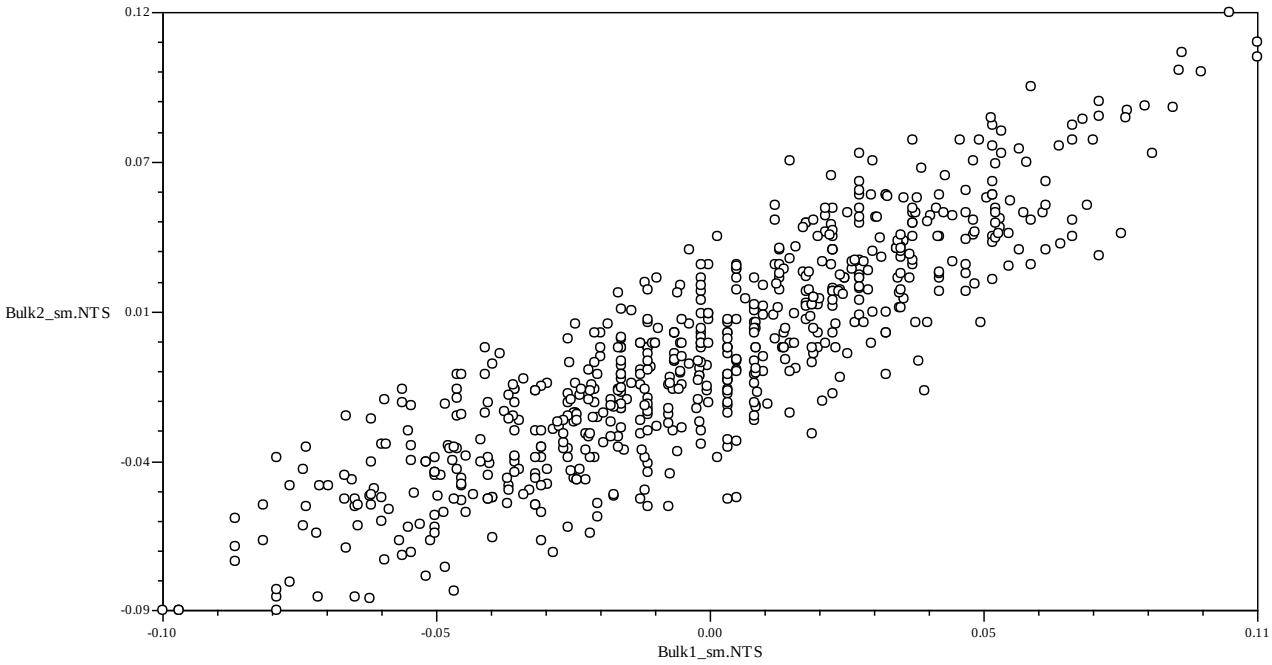
Çalışma sonucunda elde edilen verileri değerlendirilen genotiplere daha nitelikli bir yorum yapılabilmesi için ikinci bir Bulk grubu daha oluşturulmuştur. Böylece aynı genotipe ait iki adet Bulk analiz edilerek o genotipe ait popülasyon düzeyinde yapılan çıkarımların doğruluğu artacaktır. Bulk-2 grubu incelendiğinde genotipler arasındaki genetik ayrışmanın 0.88 ile 0.58 arsında değiştiği görülmektedir. Dendrogramda Bulk-1'de olduğu gibi nispeten daha belirgin ana grup ve buna bağlı alt gruplanmalar bulunmaktadır. Kullanılan benzerlik indeksine göre oluşturulan dendrogramda G3 genotipi ile G9 genotipi büyük oranda benzerlik göstermektedir. G18 genotipi ticari olarak kullanılan Sarıkız ile yakınlık göstermektedir. Bulduk ve İspir ticari çeşitleri ise dendrograma dışardan bağlanmış ve sırık çeşitler arasında bulunan G28 ile yakın oldukları belirlenmiştir. Çalışma kapsamında kullanılan genetik materyallerden oluşturulan Bulk-2 ve Bulk-1 DNA karışımları büyük oranda benzerlik göstermiştir. Bu benzerlik kullanılan genotiplerin oturak ve sırık çeşit adayları dendrogramlar arasında aynı profili göstermesiyle kendini göstermiştir (Şekil 4.1.3.).



Şekil 4.1.4. Bulk-2 için fasulye çeşit adayları arsındaki ilişkiyi gösteren, Minitab14 programı kullanılarak çizilmiş temel koordinatlar analizi.

Bulk-2 grubuna ait aynı verilerin Minitab14 ile analiz edilmesi sonucu elde edilen Temel Koordinatlar Analizinde dendrogramdaki bir ana grubun içinde yer alan G1, G2, G3, G4, G5, G10, G7, G18, G14 genotipleri belirli bir alanda kümelenmiştir. Ticari çeşit olarak çalışmaya katılan Sarıkız ise G1, G6, G17, G4, G18, G14 genotipleri ile alt kümelenme göstermiştir. Dendrograma dışarıdan bağlanan Bulduk ve İspir çeşitleri G28 ve G23 genotipleri Temel Koordinatlar Analizi ile de doğrulanmış ve kendi aralarında kümelenme göstermişlerdir. Bulduk, İspir çeşitleri ile G28 ve G23 genotipleri dendrogramda da olduğu bu analizde de daha belirgin ayrışma görülmekle birlikte bu genotiplerin dışında kalanlar arasında bu genotiplerde olduğu gibi belirgin bir ayrışma da görülmemiştir. Bu durum dendrogramda birbirlerine oldukça yakın olmaları açısında kendi içerisinde bir tutarlılık göstermektedir (Şekil 4.1.4.).

Bulk-1 ve Bulk-2 arasındaki gruplar arası ilişki Mantel Grafiği ile belirlenmiştir (Şekil 4.1.5).



Şekil 4.1.5. Bulk-1 ve Bulk-2 için oluşturulmuş Mantel Grafiği (Bulk1_sm.NTS; Bulk-1, Bulk2_sm.NTS; Bulk-2)

Bulk-1 ve Bulk-2 genotiplerine ait skorlama verilerinde oluşturulan matrislerin karşılaştırılması için verilere Mantel Testi yapılmıştır. NTSYS paket programı kullanılarak gerçekleştirilen Mantel Testi'nden elde edilen grafik sonucunda iki grubun birbirleri ile yüksek düzeyde benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. İki grubun arasındaki benzerliğin bir ölçüsü olarak test sonucu "r" değeri 0,87916 olarak bulunmuştur. Bu da oluşturulan bu matrislerin birbirleri ile yüksek düzeyde benzerlik göstermesinin bir başka ölçütüdür (Şekil 4.1.5).

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

Çalışma, aralarında sırık ve oturak tiplerin bulunduğu agronomik özellikleri bilinen, S6 kademesine kadar getirilmiş 34 çeşit adayı ve 3 adet ticari çeşidin (Sarıkız, Bulduk, İspir) yer aldığı toplam 37 genotiple gerçekleştirilmiştir. Her bir genotipten ayrı ayrı olmak üzere ve genotip başına 12 bitkiden oluşan toplam 444 adet bitki örneinden DNA izolasyon yapılmıştır.

Elde edilen genomik DNA'lar spektrofotometre ile okunmuş ve agaroz jelde degredasyona uğramadıkları ve yeter kalitede oldukları tespit edilmiştir. ISSR-PCR çalışmasına başlamadan önce çalışma konsantrasyonlarına getirilen bireyler genotip bazında ikiye bölünüp Bulk setler oluşturulmuş ve veriler bu Bulk'lar üzerinden elde edilmiştir. ISSR çalışmalarında toplam 27 primer denenmiş, bunlar arasından en iyi sonuç veren 21 primer ile çalışma tamamlanmıştır.

Bulk-1 grubunda %100 polimorfizm gösteren; F2, M1, M3, M5, M7, M8, M10, M12, M17, M18 primerleri olup diğer primerler ise yüksek düzeyde polimorfizm göstermiştir. Bu grup içerisinde skorlanan 119 bandın 104 tanesi polimorfik olup toplam polimorfizm yüzdesi 87,3 olarak bulunmuştur.

Bulk-2 için yapılan değerlendirme sonucunda F2, F3, M1, M3, M5, M7,M8, M10, M12, M17, M18 primerleri %100 polimorfizm göstermiştir. Toplam 121 bant skorlanıp bunların 108 tanesi polimorfiktir. Grubun genel polimorfizmi ise %89.25 olarak bulunmuştur.

Yapılan çalışmada çeşit adaylarının birbirleri ile olan akrabalık düzeyleri araştırılmış ve her iki Bulk grubu da çeşit adaylarının yeterince saflaştıklarını, oturak ve tırmanıcı çeşitlerin birbirinden ayrıldığını göstermiştir. Ticari olarak pazarda yer edinen Sarıkız çeşidi G18, G32 genotipleri ile oldukça benzerlik göstermiştir. Bulduk ve İspir ticari çeşitleri ise her iki dendrograma dışardan bağlanmıştır.

5.2. Öneriler

Ülkemizde tarımsal üretimde çeşitli sorunlar bulunmaktadır. Bunların arasındaki ana sorunlardan biri ise nitelikli ve süreklilik arz eden çeşitlerin pazarda bulunmayışıdır. Bu tez çalışmasında kullanılan çeşit adaylarının verim denemelerine başlanabilecek kadar saflaşmış olduğu ve elde edilen çeşitlerin üreticilerin hizmetine sunulabilecek seviyeye yaklaştığı görülmüştür. Hat içi varyasyonun düşük seviyede (Mantel testi r değerinin yaklaşık 0,9 civarında olması) olması dolayısıyla kendi aralarında belirgin derecede benzerlik gösteren hatlarda yakın zamanda çeşit adayı olabileceklerini destekler bulgulara ulaşılmış olmasının önemli bulunmasının yanında, genotipler arasında ise önemli derecede genetik uzaklıkların yer alıyor olması çalışmada yer alan hatlardan farklı çeşit adaylarının ortaya çıkacağını da ayrıca göstermekte olması dolayısıyla sonuçların ülke ekonomisine kısa sürede kayda değer katma değer yaratma potansiyeline sahip olması dolayısıyla tez çalışmasından başarılı sonuçların türetileceğine olan inancımızı güçlendirmiştir.

KAYNAKLAR

Ağaoğlu YS, Ergül A, 1999. Amasya üzüm çeşidi ekotiplerinin rapd markırlerle genetik tanımlanmaları. Türkiye III. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi, 14-17 Eylül. Ankara, 369-72.

Akbulut B, 2011. Burdur ilinde yetiştirilen fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) genotiplerinin morfolojik ve moleküler karakterizasyonu. Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek lisans tezi Süleyman Demirel Üniversitesi, Isparta.

Akbulut B, Karakurt Y, Tonguç M, 2013. Molecular characterization of common bean (*Phaseolus vulgaris* l.) genotypes. Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakultesi Dergisi, 26, 105-8.

Akçin A, 1988. Yemeklik tane baklagiller. Ziraat Fakültesi Yayınları, 8, Konya, 377.

Amin M, Fitsum S, Selvaraj T, Mulugeta N, 2014. Field management of anthracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*) in common bean through fungicides and bioagents. Adv Crop Sci Tech, 2-6.

Anonim, 2015 a. FAO http://www.fao.org. Erişim Tarihi 22.01.2015.

Anonim, 2015 b. TUİK http://www.tuik.gov.tr. Erişim Tarihi:, 15.11.2015.

Arıkoğlu H, Kaya D, Köksoy E, 2014. Tıbbi Laboratuvar Kılavuzu.

Badenes ML, Parfitt DE, 1998. Phylogeny of the genus pistacia as determined from analysis of the chloroplast genome. FAO-Nucis-Newsletter, 7, 25-6.

Bartlett JMS, Stirling D, 2003. A short history of the polymerase chain reaction pcr protocols. Methods in Molecular Biology, 2nd ed, 226, 3-6.

Beebe S, Skroch PW, Tohme J, Duque MC, Pedraza F, Nienhuis J, 2000. Structure of genetic diversity among common bean landraces of middle American origin based on correspondence analysis of RAPD. Crop Sci, 40:264, 273.

Blair MW, Diaz LM, Buendia HF, Duque MC, 2009. Genetic diversity, seed size associations and population structure of a core collection of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). Theor. Appl. Genet, 119, 955-72.

Bozkurt O, Hakki EE, Akkaya MS, 2007. Isolation and sequence analysis of wheat NBS-LRR type disease resistance gene analogs using degenerate PCR primers. Biochem Genet, 45, 5-6, 469-86.

Broughton WJ, Hernández G, Blair M, Beebe S, Gepts P, Vanderleyden J, 2003. Beans (Phaseolus spp.) - model food legumes. Plant Soil, 252: 55-128.

Çebi KM, Özkoç İ, 2008. Fungal sistematikdeki moleküler gelişmeler. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 23 (1), 65-72.

Doyle JJ, Doyle JL, 1987. A rapid DNA isolationprocedure from small quantities of fresh leaf tissues. Phytochem Bull, 19: 11-15.

Duke JA, 1983. Handbook of legumes of world economic importance. Plenum Press, New York, 978-0-387-74110-9.

Ekincialp A, 2012. Van gölü havzası fasulye genotipleri arasındaki akrabalık ilişkilerinin ve antraknoz (*Colletotrichu lindemuthianum*) (Sacc. & Magnus) lambs. scrib.) hastalığına dayanıklılığın fenotipik ve moleküler yöntemlerle belirlenmesi. Doktora tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü Van.

Erdinç Ç, 2012. Türkiye'deki bazı fasulye genotipleri arasındaki genetik çeşitliliğin ve antraknoz hastalığına (*Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn.) Lambs. Scrib.) dayanıklılığın fenotipik ve moleküler yöntemlerle belirlenmesi. Doktora tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Van.

Ergün A, 2005. Samsun ilindeki barbunya fasulye gen kaynaklarının karakterizasyonu ve morfolojik varyabilitesinin belirlenmesi üzerine bir araştırma. Fen Bilimleri Enstitüsü,, OMÜ Yüksek Lisans Tezi.

Ertaş N, 2013. Baklagil ve baklagil ürünlerinin gıda endüstrisinde kullanımı. Ulusal Kop Bölgesel Kalkınma Sempozyumu, 14-16 Kasım 2013, Konya.

Ertuğrul F, İbrahim K, 2011. Bitki biyoteknolojisinde moleküler markörler. GOÜ, Ziraat Fakültesi Dergisi, 28(2), 207-14.

Escribano MR, Santalla M, Casquero PA, Ron ADE, 1998. Patterns of genetic diversity in landraces of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) from Galicia. Plant Breeding, 117, 49-56.

Galvan MZ, Bornet B, Balatti PA, Branchard M, 2003. Inter simple sequence repeat (ISSR) markers as a tool for the assessmentof both genetic diversity and gene pool origin in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Euphytica, 132, 297-301.

Gepts P, 2001. Origins of plant agriculture and major crop plants, in: Our fragile world, forerunner volumes to the encyclopedia of life-supporting systems. MK Tolba (ed.) EOLSS Publishers, 1:629- 637 Oxford, UK.

Gilbert JR, Lewis MW, Caligari P, 1999. Developing anmappropriate strategy to assess genetic variability in plant germplasm collections. Theor. Appl. Genet, 98, 1125-31.

Gülşen O, Mutlu N, 2005. Bitki biliminde kullanılan genetik markırlar ve kullanım alanları. Alatarım, 4 (2): 27-3.

Günay A, 2005. Sebze yetiştiriciliği. İzmir, CİLT 2, 345.

Hakki EE, Savaskan C, Akkaya MS, 2001. Genotyping of Anatolian doubled-haploid durum lines with SSR markers. Euphytica, 122, 2, 257-62.

Hakkı EE, Yorgancılar M, Atalay E, Uyar S, Babaoğlu M, 2007. Basit tekrarlı diziler arası polimorfizm (BTDAP=ISSR) tekniği ile yerli lüpen genotiplerinde (*Lupinus albus* L.) genetik varyasyonun belirlenmesi. Bitkisel Araştırma Dergisi,, 2: 1-5.

Işık R, 2012. Bazı taze fasulye (*Phaseolus vulgaris* l.) genotiplerinin morfolojik ve moleküler karakterizasyonu. Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü., (Yüksek Lisans Tezi). Konya.

Karakuş M, Çiftçi V, Toğay Y, Toğay N, 2005. Van-Gevaş koşullarında farklı sıra aralıklarının fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) de verim ve bazı verim öğelerine etkisi. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi., 15 (1), 57-62.

Khan MK, Pandey A, Choudhary S, Hakki EE, Akkaya MS, Thomas G, 2014. From RFLP to DArT: molecular tools for wheat (Triticum spp.) diversity analysis. Genet Resour Crop Ev, 61, 5, 1001-32.

Kumar LS, 1999. DNA markers in plant improvement: An overview. Biotechnology Advances, 17, 143-82.

Madakbaş SY, Ergin M, Özçelik H, 2006. Çarşamba ovasında bodur taze fasulye populasyonlarından belirlenmiş olan hatlar arasındaki farklılıkların belirlenmesi. Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 10(3/4), 71-7.

Marotti I, Bonetti A, Minelli M, Catizone P, Dinelli G, 2007. Characterization of some Italian common bean (*Phaseolus vulgaris* L.)landraces by rapd, semi-random and ISSR molecular markers. Springer. Genet Resour Crop Ev, 54, 175-88.

Mukherjee A, Sıkdar B, Ghosh B, Banerjee A, Ghosh E, Bhattacharya M, Roy SC, 2013. RAPD and ISSR analysis of some economically important species, varieties, and cultivars of the genus Allium (Alliaceae). Turkish Journal of Botany, 37, 605-18.

Ortega MGP, 2014. Exploration of genetic variability of bean (*Phaseolus vulgaris* l.) landraces through issr markers. Athens Journal Of Natural & Formal Sciences, Covarrubias, Sept. 2014.

Özcan S, Gürel E, Babaoğlu M, 2001. Bitki biyoteknolojisi II. Genetik mühendisliği ve uygulamaları. Selçuk Üniv. Vakıf Yayınları, 975-6652-05-5, 334- 63.

Öztürk M, 2011. Türkiye *Cicer* L. (nohut) cinsinin morfolojik, palinolojik, sitotaksonomik, moleküler filogenetik kapsamda revizyonu ile tohum proteini ve element analizleri yönünden incelenmesi. Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi.

Pekşen E, Artık C, 2005. Antibesinsel maddeler ve yemeklik tane baklagillerin besleyici değerleri. OMÜ Ziraat Fakultesi Dergisi, Samsun 20(2), 110-20.

Pınarkara E, 2007. Uyuşturucu tipi kenevir genotiplerinin RAPD-PCR metodu ile karakterizasyonu ve kullanılan istatistiki yöntemlerin değerlendirilmesi. Yüksek lisans tezi, Fen Bilimleri Enstütüsü, Konya.

Rafalski JA, Tingey SV, 1993. Genetic diagnostics in plant breeding: Rapds, microsatellites and machines. TIG, 9(8), 275-80.

Reddy MP, Sarla N, Siddiq A, 2002. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding Euphytica, 128, 9-17.

Rodino AP, Santalla M, Montero I, Casquero PA, De Ron AM, 2001. Diversity of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) germplasm from Portugal. Genet Resour Crop Ev, 48, 409-17.

Sarıkamış G, Yaşar F, Bakır M, Kazan K, Ergül A, 2009. Genetic characterization of green bean (*Phaseolus vulgaris*) genotypes from eastern Turkey. Genetics and Molecular Research, 8 (3), 880-7.

Seymen M, Türkmen Ö, Paksoy M, 2010. Bazi bodur taze fasulye (*Phaseolus vulgaris* l.) çeşitlerinin konya koşullarinda verim ve bazi kalite unsurlarinin belirlenmesi. Selçuk Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi, 24 (3), 37-40.

Singh SP, 1999. Integrated Genetic Improvement. In: Common Bean Improvement In The Twenty-First Century. The Netherlands, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht 133-65.

Singh SP, Gepts P, Debouck DG, 1991. Races of common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae). Economic Botany, 45:379, 396.

Sözen Ö, Özçelik H, Bozoğlu H, 2012. Batı Karadeniz bölgesi'nden toplanan fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) populasyonlarındaki biyoçeşitliliğin belirlenmesi. Tarım Bilimleri Araştırma Dergisi, 1308-3945, 5 (1): 59-63.

Svetleva D, Velcheva M, Bhowmik G, 2003. Biotechnology as a useful tool in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) improvement. Euphytica, 131, 189-200.

Şahin F, Çiftçi M, Pirim İ, 2000. Polimeraz zincir reaksiyonu (pcr). Ii. Uygulamalı moleküler biyoloji teknikleri kurs notları. AÜ Biyoteknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi.

Şalk A, Arın L, Deveci M, Polat S, 2008. Özel sebzecilik. Namık Kemal Üniversitesi Bahçe Bitkileri Bölümü Yayınları Ders Kitabı, 185 Tekirdağ.

Tar'an B, Thomas EM, Pauls KP, 2002. Genetic mapping of agronomic traits in common bean. Crop Science 42, 544-56.

Temizkan G, Arda N, 1999. Moleküler biyolojide kullanılan yöntemler. BİYOGEM Yayınları No:1 Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 57-66.

Temizkan G, Yılmazer S, Öztürk M, Arı Ş, Ertan H, Topal Sarıkaya A, Arda N, 2008. Moleküler biyolojide kullanılan yöntemler.

Türkmen Ö, Erdinç Ç, Şensoy S, 2013. Türkiye'nin bazı fasulye genotiplerinin çeşitli bitkisel özelliklerinin belirlenmesi. YYÜ TAR BİL DERG, 23(2), 112-25.

Yanar D, Düzdemir O, 2012. Bazı bitki ekstraktlarının ve bitkisel preparatların fasulye tohum böceğine (A*canthoscelides obtectus* (say.)) olan etkisi. Tarım Bilimleri Araştırma Dergisi, 6 (1), 1308-3945, 36-40,.

Yıldırım A, Kandemir N, 2001. Genetik markırlar ve analiz metotları. S.Ü. Vakfı Yayınları, Bitki Biyoteknolojisi-Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları, 334-63.

Yorgancılar M, Babaoğlu M, Hakkı EE, Atalay E, 2009. Determination of the relationship among Old World Lup in (*Lupinus* sp.) species using RAPD and ISSR markers. Afr J Biotechnol, 8 (15), 4 August, 3524-30.

Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D, 1994. Genome fingerprinting by simplesequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. Genomics, 20, 176-83.

EKLER

EK-1

Genotip İsmi	ng/ul	A260	A280	260/280	260/230
G-1-1	278,23	5,565	2,958	1,88	2,01
G-1-2	399,42	7,988	4,392	1,82	1,65
G-1-3	353,87	7,077	3,931	1,8	1,97
G-1-4	188,51	3,77	2,001	1,88	2,14
G-1-5	188,85	3,777	2,068	1,83	1,83
G-1-6	266,66	5,333	3,056	1,75	1,61
G-1-7	247,04	4,941	2,815	1,76	1,71
G-1-8	746,92	14,938	8,701	1,72	1,61
G-1-9	192,25	3,845	2,128	1,81	1,18
G-1-10	232,56	4,651	2,493	1,87	1,83
G-1-11	157,84	3,157	1,666	1,89	2,23
G-1-12	335,71	6,714	3,59	1,87	1,89
G-2-1	103	2,06	1,114	1,85	1,94
G-2-2	225,52	4,51	2,458	1,83	2,07
G-2-3	770,69	15,414	7,208	2,14	2,26
G-2-4	268,85	5,377	2,857	1,88	2,18
G-2-5	193,33	3,867	2,1	1,84	1,72
G-2-6	817,18	16,344	8,976	1,82	1,83
G-2-7	370,57	7,411	3,948	1,88	2,12
G-2-8	448,08	8,962	4,542	1,97	2,02
G-2-9	237,01	4,74	2,578	1,84	1,92
G-2-10	218,59	4,372	2,37	1,84	2,1
G-2-11	391,11	7,822	4,152	1,88	1,65
G-2-12	1226,14	24,523	11,982	2,05	1,9
G-3-1	133,66	2,673	1,387	1,93	1,85
G-3-2	205,55	4,111	2,073	1,98	2,19
G-3-3	259,21	5,184	2,794	1,86	1,34
G-3-4	230,01	4,6	2,332	1,97	2,13
G-3-5	415,02	8,3	4,528	1,83	1,45
G-3-6	177,84	3,557	1,838	1,93	1,67
G-3-7	252,95	5,059	2,785	1,82	1,06
G-3-8	214,18	4,284	2,266	1,89	1,55
G-3-9	323,29	6,466	3,392	1,91	1,66
G-3-10	257,91	5,158	2,771	1,86	1,69
G-3-11	474,05	9,481	5,324	1,78	1,61
G-3-12	344,72	6,894	4,009	1,72	1,64
G-4-1	198,87	3,977	2,119	1,88	1,84
G-4-2	186,93	3,739	2,148	1,74	1,55
G-4-3	272,62	5,452	2,874	1,9	1,95
G-4-4	282,56	5,651	3,079	1,84	1,79

G-4-5	287,1	5,742	3,159	1,82	1,78
G-4-6	252,15	5,043	2,712	1,86	1,81
G-4-7	343,56	6,871	3,625	1,9	1,74
G-4-8	423,39	8,468	4,482	1,89	1,93
G-4-9	397,82	7,956	4,245	1,87	1,82
G-4-10	207,52	4,15	2,35	1,77	1,95
G-4-11	552,31	11,046	5,568	1,98	1,72
G-4-12	108,31	2,166	1,288	1,68	1,82
G-5-1	161,45	3,229	1,608	2,01	1,46
G-5-2	238,36	4,767	2,367	2,01	1,17
G-5-3	169,5	3,39	1,923	1,76	1,44
G-5-4	203,47	4,069	2,085	1,95	1,31
G-5-5	167,78	3,356	1,718	1,95	1,86
G-5-6	146,59	2,932	1,516	1,93	1,5
G-5-7	235,86	4,717	2,581	1,83	1,63
G-5-8	79,3	1,586	0,913	1,74	1,91
G-5-9	177,87	3,557	1,771	2,01	1,15
G-5-10	194,26	3,885	2,097	1,85	1,41
G-5-11	216,06	4,321	2,185	1,98	1,39
G-5-12	115,45	2,309	1,312	1,76	1,88
G-6-1	157,63	3,153	1,825	1,73	1,62
G-6-2	199,48	3,99	2,2	1,81	1,87
G-6-3	208,42	4,168	2,267	1,84	1,36
G-6-4	163,17	3,263	1,754	1,86	1,47
G-6-5	228,78	4,576	2,559	1,79	1,47
G-6-6	98,4	1,968	1,128	1,74	1,56
G-6-7	239,5	4,79	2,575	1,86	1,63
G-6-8	485,54	9,711	4,964	1,96	1,62
G-6-9	769,86	15,397	7,686	2	1,95
G-6-10	134,64	2,693	1,557	1,73	1,46
G-6-11	255,68	5,114	3,125	1,64	1,31
G-6-12	141,3	2,826	1,459	1,94	2,19
G-7-1	103,74	2,075	1,201	1,73	1,94
G-7-2	158,32	3,166	1,692	1,87	2,28
G-7-3	163,09	3,262	1,629	2	2,56
G-7-4	124,69	2,494	1,338	1,86	2,33
G-7-5	192,82	3,856	2,079	1,86	2,23
G-7-6	233,98	4,68	2,284	2,05	1,28
G-7-7	232,3	4,646	2,422	1,92	1,53
G-7-8	159,05	3,181	1,823	1,75	1,49
G-7-9	284,31	5,686	2,977	1,91	1,65
G-7-10	389,15	7,783	4,195	1,86	1,73
G-7-11	198,29	3,966	2,146	1,85	1,92
G-7-12	257,2	5,144	2,843	1,81	1,55
G-8-1	121,61	2,432	1,302	1,87	1,47

G-8-2	100,57	2,011	1,106	1,82	1,7
G-8-3	168,78	3,376	1,88	1,8	1,47
G-8-4	244,59	4,892	2,71	1,81	1,37
G-8-5	271,11	5,422	2,943	1,84	1,36
G-8-6	241,2	4,824	2,686	1,8	1,22
G-8-7	457,91	9,158	4,631	1,98	1,99
G-8-8	703,92	14,078	7,066	1,99	2
G-8-9	1393	27,86	14,934	1,87	1,8
G-8-10	1049,69	20,994	11,656	1,8	1,72
G-8-11	1216,88	24,338	12,282	1,98	2,05
G-8-12	910,41	18,208	9,956	1,83	1,78
G-9-1	180,91	3,618	1,83	1,98	2,01
G-9-2	331,07	6,621	3,512	1,89	1,84
G-9-3	197,6	3,952	2,154	1,83	1,74
G-9-4	286,45	5,729	2,938	1,95	1,31
G-9-5	326,24	6,525	3,365	1,94	2,02
G-9-6	136,6	2,732	1,431	1,91	1,92
G-9-7	171,45	3,429	1,848	1,86	1,84
G-9-8	210,76	4,215	2,032	2,07	1,46
G-9-9	158,65	3,173	1,834	1,73	1,51
G-9-10	203,73	4,075	2,197	1,85	1,74
G-9-11	286,77	5,735	3,127	1,83	1,1
G-9-12	211,82	4,236	2,204	1,92	1,22
G-10-1	195,83	3,917	2,165	1,81	1,39
G-10-2	152,8	3,056	1,804	1,69	1,24
G-10-3	257,3	5,146	2,732	1,88	1,14
G-10-4	257,35	5,147	2,544	2,02	1,17
G-10-5	251,23	5,025	2,733	1,84	1,18
G-10-6	238,26	4,765	2,592	1,84	1,18
G-10-7	222,38	4,448	2,415	1,84	1,41
G-10-8	361,08	7,222	3,827	1,89	1,57
G-10-9	156,65	3,133	1,665	1,88	1,99
G-10-10	153,27	3,065	1,65	1,86	1,65
G-10-11	276,52	5,53	3,293	1,68	1,64
G-10-12	289,67	5,793	3,446	1,68	1,57
G-11-1	169,43	3,389	1,794	1,89	1,52
G-11-2	191,72	3,834	2,01	1,91	1,54
G-11-3	159,27	3,185	1,742	1,83	1,59
G-11-4	256,81	5,136	2,71	1,9	1,56
G-11-5	256,5	5,13	2,56	2	1,58
G-11-6	205,85	4,117	2,103	1,96	1,72
G-11-7	271,26	5,425	2,743	1,98	1,57
G-11-8	256,86	5,137	2,674	1,92	1,63
G-11-9	235,55	4,711	2,485	1,9	1,66
G-11-10	281,27	5,625	2,915	1,93	1,6

G-11-11	179,38	3,588	1,928	1,86	1,48
G-11-12	257,55	5,151	2,744	1,88	1,53
G-12-1	71,72	1,434	0,911	1,57	1,49
G-12-2	53,45	1,069	0,673	1,59	1,13
G-12-3	37,23	0,745	0,519	1,43	1,44
G-12-4	156,79	3,136	1,776	1,77	1,66
G-12-5	89,52	1,79	0,909	1,97	1,55
G-12-6	249,35	4,987	2,657	1,88	1,75
G-12-7	842,74	16,855	8,692	1,94	2,09
G-12-8	416,44	8,329	4,353	1,91	1,91
G-12-9	1225,47	24,509	12,414	1,97	2,21
G-12-10	287,75	5,755	3,078	1,87	2,01
G-12-11	361,05	7,221	3,636	1,99	2,07
G-12-12	1271,67	25,433	12,44	2,04	2,22
G-13-1	153,95	3,079	1,611	1,91	2,23
G-13-2	313,84	6,277	3,164	1,98	1,28
G-13-3	133,8	2,676	1,504	1,78	1,72
G-13-4	118,8	2,376	1,259	1,89	2,07
G-13-5	139,5	2,79	1,566	1,78	1,7
G-13-6	132,99	2,66	1,432	1,86	1,68
G-13-7	262,83	5,257	2,774	1,89	1,65
G-13-8	195,63	3,913	2,237	1,75	1,68
G-13-9	233,27	4,665	2,445	1,91	1,94
G-13-10	210,62	4,212	2,295	1,84	1,7
G-13-11	153,91	3,078	1,7	1,81	1,55
G-13-12	207,86	4,157	2,339	1,78	1,49
G-14-1	239,29	4,786	2,489	1,92	1,63
G-14-2	228,4	4,568	2,461	1,86	1,91
G-14-3	287,65	5,753	3,13	1,84	1,25
G-14-4	228,24	4,565	2,323	1,96	1,54
G-14-5	202,7	4,054	2,194	1,85	1,36
G-14-6	362,76	7,255	3,525	2,06	1,51
G-14-7	237,06	4,741	2,538	1,87	2,16
G-14-8	333,4	6,668	3,307	2,02	1,56
G-14-9	223,4	4,468	2,382	1,88	1,66
G-14-10	226,81	4,536	2,466	1,84	1,57
G-14-11	178,85	3,577	1,975	1,81	1,73
G-14-12	202,53	4,051	2,133	1,9	1,7
G-15-1	196,6	3,932	2,05	1,92	1,61
G-15-2	117,99	2,36	1,317	1,79	1,62
G-15-3	219,42	4,388	2,304	1,91	1,58
G-15-4	168,96	3,379	1,781	1,9	1,59
G-15-5	150,54	3,011	1,612	1,87	1,52
G-15-6	117,59	2,352	1,249	1,88	1,42
G-15-7	89,3	1,786	0,966	1,85	1,59

G-15-8	241,99	4,84	2,584	1,87	1,37
G-15-9	248,6	4,972	2,5	1,99	1,64
G-15-10	234,6	4,692	2,451	1,91	1,7
G-15-11	161,2	3,224	1,703	1,89	1,69
G-15-12	467,14	9,343	4,574	2,04	1,7
G-16-1	179,68	3,594	1,932	1,86	2,04
G-16-2	241,04	4,821	2,636	1,83	1,25
G-16-3	346,43	6,929	3,632	1,91	1,47
G-16-4	224,93	4,499	2,316	1,94	1,81
G-16-5	234,67	4,693	2,375	1,98	1,77
G-16-6	407,28	8,146	3,965	2,05	1,47
G-16-7	355,56	7,111	3,572	1,99	1,51
G-16-8	197,76	3,955	2,3	1,72	1,47
G-16-9	572,18	11,444	5,843	1,96	1,8
G-16-10	508,06	10,161	5,138	1,98	1,83
G-16-11	443,67	8,873	4,736	1,87	1,71
G-16-12	786,84	15,737	8,837	1,78	1,76
G-17-1	200,22	4,004	2,185	1,83	1,47
G-17-2	192,22	3,844	2,148	1,79	1,77
G-17-3	233,46	4,669	2,474	1,89	1,62
G-17-4	204,4	4,088	2,241	1,82	1,43
G-17-5	191,96	3,839	2,184	1,76	1,43
G-17-6	212,54	4,251	2,085	2,04	1,97
G-17-7	205,55	4,111	2,196	1,87	1,42
G-17-8	143,93	2,879	1,601	1,8	1,38
G-17-9	208,63	4,173	2,268	1,84	1,63
G-17-10	287,75	5,755	3,078	1,87	2,01
G-17-11	361,05	7,221	3,636	1,99	2,07
G-17-12	1114,67	25,433	12,44	2,04	2,22
G-18-1	262,31	5,246	2,772	1,89	1,54
G-18-2	412,56	8,251	4,393	1,88	1,59
G-18-3	298,23	5,965	3,077	1,94	1,68
G-18-4	152,24	4,402	2,245	1,96	1,46
G-18-5	196,64	3,933	2,111	1,86	1,6
G-18-6	271,95	5,439	2,794	1,95	1,72
G-18-7	253,29	5,066	2,726	1,86	1,53
G-18-8	273,14	5,463	2,828	1,93	1,4
G-18-9	323,56	6,471	3,37	1,92	1,67
G-18-10	160,13	3,203	1,79	1,79	1,97
G-18-11	385,99	7,72	4,223	1,83	1,7
G-18-12	310,31	6,206	3,426	1,81	1,71
G-19-1	303,38	6,068	3,178	1,91	1,76
G-19-2	683,44	13,669	7,211	1,9	2
G-19-3	402,89	8,058	4,197	1,92	1,86
G-19-4	539,87	10,798	5,747	1,88	1,93

G-19-5	491,41	9,828	5,086	1,93	1,95
G-19-6	339,95	6,799	3,445	1,97	2,16
G-19-7	311,2	6,224	3,375	1,84	1,86
G-19-8	348,33	6,967	3,733	1,87	1,77
G-19-9	294,5	5,89	3,179	1,85	1,88
G-19-10	369,95	7,399	3,841	1,93	2,18
G-19-11	565,25	11,305	6,193	1,83	1,69
G-19-12	312,25	6,245	3,341	1,87	2,06
G-20-1	313,09	6,262	3,311	1,89	1,53
G-20-2	242,55	4,851	2,639	1,84	1,49
G-20-3	143,77	2,875	1,39	2,07	1,72
G-20-4	284,26	5,685	3,06	1,86	1,52
G-20-5	202,79	4,056	2,194	1,85	1,49
G-20-6	158,41	3,168	1,706	1,86	1,48
G-20-7	477,44	9,549	5,084	1,88	1,79
G-20-8	441,12	8,822	4,655	1,9	1,79
G-20-9	943,3	18,866	9,506	1,98	2,16
G-20-10	540,88	10,818	5,529	1,96	1,89
G-20-11	1257,57	25,151	12,207	2,06	2,2
G-20-12	343,94	6,879	3,718	1,85	1,87
G-21-1	277,49	5,55	3,014	1,84	1,67
G-21-2	298,82	5,976	3,177	1,88	1,91
G-21-3	297,06	5,941	3,348	1,77	1,62
G-21-4	324,62	6,492	3,522	1,84	1,52
G-21-5	244,29	4,886	2,693	1,81	1,48
G-21-6	331,28	6,626	3,455	1,92	1,65
G-21-7	359,49	7,19	3,877	1,85	1,85
G-21-8	341,74	6,835	3,647	1,87	1,78
G-21-9	413,36	8,267	4,415	1,87	1,75
G-21-10	394,05	7,881	4,202	1,88	1,79
G-21-11	386,29	7,726	4,154	1,86	1,8
G-21-12	346,45	6,929	3,74	1,85	1,76
G-21-13	347,35	6,947	3,798	1,83	1,75
G-22-1	161,66	3,233	1,663	1,94	2,21
G-22-2	237,25	4,745	2,414	1,97	1,55
G-22-3	495,08	9,902	5,27	1,88	1,97
G-22-4	138,15	2,763	1,492	1,85	1,72
G-22-5	299,94	5,999	3,204	1,87	1,69
G-22-6	271,59	5,432	2,878	1,89	1,81
G-22-7	349,63	6,993	3,761	1,86	1,86
G-22-8	139,96	2,799	1,619	1,73	2,08
G-22-9	385,74	7,715	3,873	1,99	1,91
G-22-10	277,45	5,549	2,908	1,91	1,82
G-22-11	100,68	2,014	1,203	1,67	1,78
G-22-12	261,31	5,226	2,814	1,86	1,81

G-23-1	1350,63	27,013	14,22	1,9	1,81
G-23-2	1034,98	20,7	10,86	1,91	1,95
G-23-3	940,81	18,816	9,617	1,96	2,02
G-23-4	500,14	10,003	5,243	1,91	2,18
G-23-5	348,76	6,975	3,484	2	2,11
G-23-6	461,32	9,226	4,77	1,93	2,03
G-23-7	299,68	5,994	3,105	1,93	2,14
G-23-8	338,95	6,779	3,571	1,9	1,98
G-23-9	708,03	14,161	7,388	1,92	2,13
G-23-10	326,59	6,532	3,316	1,97	2,06
G-23-11	73,29	1,466	0,833	1,76	1,86
G-23-12	77,05	1,541	0,834	1,85	2,11
G-24-1	376,43	7,529	4,091	1,84	1,65
G-24-2	217,4	4,348	2,363	1,84	1,44
G-24-3	242,35	4,847	2,665	1,82	1,91
G-24-4	408,49	8,17	4,404	1,86	1,93
G-24-5	218,06	4,361	2,342	1,86	1,61
G-24-6	284,97	5,699	3,144	1,81	1,8
G-24-7	426,69	8,534	4,443	1,92	1,7
G-24-8	264,89	5,298	2,857	1,85	1,67
G-24-9	230,04	4,601	2,479	1,86	1,57
G-24-10	190,31	3,806	2,054	1,85	1,72
G-24-11	240,27	4,805	2,481	1,94	1,43
G-24-12	279,43	5,589	2,815	1,99	1,52
G-25-1	411,8	8,236	4,212	1,96	1,53
G-25-2	857,83	17,157	8,741	1,96	1,74
G-25-3	683,91	13,678	7,138	1,92	1,78
G-25-4	433,91	8,678	4,661	1,86	1,73
G-25-5	857,3	17,146	8,895	1,93	1,82
G-25-6	538,85	10,777	5,642	1,91	1,72
G-25-7	344,13	6,883	3,566	1,93	1,42
G-25-8	343,75	6,875	3,484	1,97	2,07
G-25-9	725,09	14,502	7,861	1,84	1,78
G-25-10	285,5	5,71	3,008	1,9	2,07
G-25-11	296,67	5,933	3,466	1,71	1,64
G-25-12	459,5	9,19	5,134	1,79	1,58
G-26-1	457,3	9,146	4,425	2,07	2,14
G-26-2	539,14	10,783	7,018	1,54	1,27
G-26-3	400,33	8,007	4,894	1,64	1,21
G-26-4	428,1	8,562	4,323	1,98	2,05
G-26-5	301,28	6,026	3,341	1,8	1,72
G-26-6	246,2	4,924	2,549	1,93	2,08
G-26-7	531,2	10,624	7,553	1,41	1,13
G-26-8	267,71	5,354	2,839	1,89	1,79
G-26-9	378,01	7,56	3,796	1,99	1,84

G-26-10	382,2	7,644	3,859	1,98	1,91
G-26-11	347,39	6,948	3,58	1,94	1,76
G-26-12	365,85	7,317	4,145	1,77	1,55
G-27-1	363,6	7,272	3,656	1,99	1,56
G-27-2	459,6	9,192	4,729	1,94	1,86
G-27-3	299,46	5,989	3,13	1,91	1,76
G-27-4	283,55	5,671	3,031	1,87	1,98
G-27-5	385,05	7,701	4,156	1,85	1,81
G-27-6	318,55	6,371	3,057	2,08	1,64
G-27-7	891,96	17,839	10,003	1,78	1,73
G-27-8	751,36	15,027	8,231	1,83	1,81
G-27-9	763,43	15,269	8,651	1,76	1,7
G-27-10	930,11	18,602	10,352	1,8	1,77
G-27-11	702,39	14,048	7,461	1,88	1,74
G-27-12	707,54	14,151	8,078	1,75	1,72
G-28-1	161,16	3,223	1,851	1,74	1,56
G-28-2	137,72	2,754	1,514	1,82	1,39
G-28-3	277,99	5,56	3,395	1,64	1,21
G-28-4	284,86	5,697	3,077	1,85	2,04
G-28-5	333,48	6,67	3,351	1,99	2,4
G-28-6	348,65	6,973	3,62	1,93	1,98
G-28-7	234,98	4,7	2,636	1,78	1,66
G-28-8	128,73	2,575	1,564	1,65	1,84
G-28-9	401,56	8,031	4,262	1,88	1,83
G-28-10	220,02	4,4	2,329	1,89	1,91
G-28-11	105,75	2,115	1,239	1,71	1,9
G-28-12	221,84	4,437	2,384	1,86	1,83
G-29-1	164,82	3,296	1,578	2,09	2,65
G-29-2	597,62	11,952	5,527	2,16	2,74
G-29-3	341,14	6,823	3,359	2,03	2,59
G-29-4	1100,88	22,018	10,626	2,07	1,94
G-29-5	584,53	11,691	6,082	1,92	2,59
G-29-6	416,03	8,321	4,073	2,04	2,09
G-29-7	426,56	8,531	4,41	1,93	2,13
G-29-8	392,71	7,854	3,974	1,98	1,92
G-29-9	515,75	10,315	5,239	1,97	2,12
G-29-10	284,26	5,685	2,895	1,96	1,87
G-29-11	355,97	7,119	3,604	1,98	2,13
G-29-12	321,25	6,425	3,335	1,93	2,01
G-30-1	384,94	7,699	3,932	1,96	1,93
G-30-2	326,34	6,527	3,396	1,92	1,73
G-30-3	371,52	7,43	3,336	2,23	1,5
G-30-4	356,13	7,123	3,653	1,95	1,92
G-30-5	333,84	6,677	3,438	1,94	2,11
G-30-6	324,6	6,492	3,15	2,06	2,2

G-30-7	350,3	7,006	3,469	2,02	1,72
G-30-8	370,49	7,41	3,88	1,91	1,72
G-30-9	378,24	7,565	3,921	1,93	1,77
G-30-10	240,49	4,81	2,629	1,83	1,89
G-30-11	768,23	15,365	7,435	2,07	2,29
G-30-12	425,89	8,518	4,38	1,94	1,81
G-31-1	870,51	17,41	8,812	1,98	1,89
G-31-2	549,8	10,996	5,759	1,91	2,09
G-31-3	301,31	6,026	3,343	1,8	1,65
G-31-4	460,89	9,218	4,844	1,9	1,77
G-31-5	302,46	6,049	3,352	1,8	1,68
G-31-6	327,98	6,56	3,586	1,83	1,74
G-31-7	171,67	3,433	1,936	1,77	1,83
G-31-8	245,03	4,901	2,746	1,78	1,76
G-31-9	100,68	2,014	1,081	1,86	2,14
G-31-10	94,27	1,885	1,097	1,72	1,93
G-31-11	313,58	6,272	3,487	1,8	1,74
G-31-12	190,81	3,816	2,1	1,82	1,87
G-32-1	321,31	6,426	3,357	1,91	1,64
G-32-2	42,01	0,84	0,609	1,38	1,04
G-32-3	217,2	4,344	2,407	1,8	1,97
G-32-4	328,49	6,57	3,282	2	2,33
G-32-5	183,91	3,678	2,242	1,64	1,12
G-32-6	454,37	9,087	5,187	1,75	1,28
G-32-7	326,63	6,533	3,557	1,84	1,81
G-32-8	195,07	3,901	2,209	1,77	1,49
G-32-9	229,77	4,595	2,438	1,89	2,17
G-32-10	240,58	4,812	2,773	1,73	1,49
G-32-11	300,29	6,006	3,633	1,65	1,59
G-32-12	401,89	8,038	4,455	1,8	1,77
G-33-1	408,99	8,18	4,409	1,86	1,88
G-33-2	403,12	8,062	4,055	1,99	2,13
G-33-3	299,14	5,983	3,21	1,86	2
G-33-4	558,67	11,173	5,532	2,02	2,02
G-33-5	526,42	10,528	5,135	2,05	2,04
G-33-6	444,55	8,891	4,317	2,06	2,04
G-33-7	426,97	8,539	4,485	1,9	1,75
G-33-8	432,89	8,658	4,507	1,92	1,79
G-33-9	533,08	10,662	5,442	1,96	1,82
G-33-10	576,41	11,528	5,766	2	1,87
G-33-11	428,68	8,574	4,296	2	1,86
G-33-12	1162,71	23,254	11,072	2,1	2,2
G-34-1	246,72	4,934	2,69	1,83	1,84
G-34-2	214	4,28	2,297	1,86	1,63
G-34-3	303,09	6,062	3,094	1,96	1,75

G-34-4	171,13	3,423	1,853	1,85	1,65
G-34-5	202,28	4,046	2,196	1,84	2,05
G-34-6	191,98	3,84	2,113	1,82	1,37
G-34-7	175,43	3,509	1,856	1,89	1,62
G-34-8	157,94	3,159	1,72	1,84	1,67
G-34-9	173,16	3,463	1,868	1,85	1,61
G-34-10	203,48	4,07	2,116	1,92	1,47
G-34-11	216,94	4,339	2,343	1,85	1,78
G-34-12	106,89	2,138	1,108	1,93	1,18
G-35-1	451,23	9,025	4,641	1,94	1,72
G-35-2	509,31	10,186	5,065	2,01	2,05
G-35-3	442,41	8,848	4,472	1,98	1,99
G-35-4	295,96	5,919	3,234	1,83	1,73
G-35-5	477,72	9,554	4,855	1,97	1,84
G-35-6	873,31	17,466	9,071	1,93	2,05
G-35-7	757,62	15,152	8,771	1,73	1,36
G-35-8	821,73	16,435	8,666	1,9	1,62
G-35-9	827,54	16,551	8,681	1,91	2,3
G-35-10	399,39	7,988	4,244	1,88	1,8
G-35-11	274,97	5,499	2,938	1,87	1,92
G-35-12	467,71	9,354	4,869	1,92	1,92
Bulduk-1	341,11	6,822	3,693	1,85	1,77
Bulduk-2	110,03	2,201	1,288	1,71	1,18
Bulduk-3	135,45	2,709	1,539	1,76	1,34
Bulduk-4	184,75	3,695	2,247	1,64	1,25
Bulduk-5	102,01	2,04	1,21	1,69	1,61
Bulduk-6	159,65	3,193	1,748	1,83	1,07
Bulduk-7	225,73	4,515	2,721	1,66	1,2
Bulduk-8	380,24	7,605	3,907	1,95	2,1
Bulduk-9	151,44	3,029	1,725	1,76	1,08
Bulduk-10	140,87	2,817	1,725	1,63	1,45
Bulduk-11	203,62	4,072	2,393	1,7	1,66
Bulduk-12	77,68	1,554	0,942	1,65	1,74
İspir-1	111,85	2,237	1,259	1,78	1,23
İspir-2	123,06	2,461	1,495	1,65	1,47
İspir-3	423,69	8,474	4,337	1,95	2,07
İspir-4	390,82	7,816	3,94	1,98	1,96
İspir-5	113,78	2,276	1,331	1,71	1,7
İspir-6	153,79	3,076	1,744	1,76	1,84
İspir-7	156,73	3,135	1,955	1,6	1,51
İspir-8	111,56	2,231	1,322	1,69	1,66
İspir-9	110,31	2,206	1,277	1,73	1,78
İspir-10	498,56	9,971	4,992	2	2,02
İspir-11	359,9	7,198	4,354	1,65	1,38
İspir-12	162,4	3,248	2,005	1,62	1,37

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı	**:**	Hamza ULUTAŞ
Uyruğu	**:**	T.C.
Doğum Yeri ve Tarihi	**:**	KONYA – 1990
Telefon	**:**	
Faks	**:**	
e-mail	**:**	ulutashamza@yahoo.com

EĞİTİM

Derece		**Adı, İlçe, İl**	**Bitirme Yılı**
Lise	:		
Üniversite	:	**Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakultesi Selçuklu/KONYA**	**2013**
Yüksek Lisans	:		
Doktora	:		

İŞ DENEYİMLERİ

KWS SAAT AG	**2014-2014**
SELKO AR-GE ve BİYOTEKNOLOJİ LTD. ŞTİ	**2015-**

UZMANLIK ALANI

Sebze Yetiştiriciliği ve Islahı