

**HAVUÇ (*Daucus carota* L.) BİTKİSİNDE *Rf* LOKUSU İLE
BAĞLANTILI SNP MOLEKÜLERİŞARETLEYİCİLERİN
GBS YÖNTEMİ KULLANILARAK BELİRLENMESİ VE
DOĞRULANMASI**

Sevin TEOMAN DURAN



T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HAVUÇ (*Daucus carota* L.) BİTKİSİNDE
Rf LOKUSU İLE BAĞLANTILI SNP MOLEKÜLER İŞARETLEYİCİLERİN
GBS YÖNTEMİ KULLANILARAK BELİRLENMESİ VE DOĞRULANMASI**

Sevin TEOMAN DURAN
<https://orcid.org/0000-0003-1469-6777>

Prof.Dr. Ahmet İPEK
<https://orcid.org/0000-0001-5821-2426>
(Danışman)

DOKTORA TEZİ
BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

BURSA-2019

TEZ ONAYI

Sevin TEOMAN DURAN tarafından hazırlanan “Havuç (*Daucus carota* L.) Bitkisinde Rf Lokusu ile Bağlantılı SNP Moleküler İşaretleyicilerin GBS Yöntemi Kullanılarak Belirlenmesi ve Doğrulanması” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Bursa Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı’nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof.Dr. Ahmet İPEK

- Başkan** : Prof.Dr. Ahmet İPEK
<https://orcid.org/0000-0001-5821-2426>
Bursa Uludağ Üniversitesi, Ziraat Fakültesi,
Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı
- Üye** : Prof.Dr. Erdoğan BARUT
<https://orcid.org/0000-0002-6422-1190>
Bursa Uludağ Üniversitesi, Ziraat Fakültesi,
Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı
- Üye** : Prof.Dr. Köksal YAĞDI
<https://orcid.org/0000-0003-1567-9397>
Bursa Uludağ Üniversitesi, Ziraat Fakültesi,
Tarla Bitkileri Anabilim Dalı
- Üye** : Prof.Dr. Murat ŞEKER
<https://orcid.org/0000-0002-6886-0547>
Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi,
Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı
- Üye** : Dr. Öğr. Üyesi Kenan SÖNMEZ
<https://orcid.org/0000-0003-4990-832X>
Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Ziraat Fakültesi,
Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Hüseyin Aksel EREN
Enstitü Müdürü

.././.....

U.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

16/09/2019

Sevin TEOMAN DURAN

ÖZET

Doktora Tezi

HAVUÇ (*Daucus carota* L.) BİTKİSİNDE *Rf* LOKUSU İLE BAĞLANTILI SNP MOLEKÜLER İŞARETLEYİCİLERİN GBS YÖNTEMİ KULLANILARAK BELİRLENMESİ VE DOĞRULANMASI

Sevin TEOMAN DURAN

Bursa Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman: Prof.Dr. Ahmet İPEK

Bu çalışmada, havuç bitkisinde erkek kısırlığı kontrol eden *Rf* (Restorers of fertility) lokusu ile bağlantılı SNP moleküler işaretleyicilerin GBS (Genotyping by sequencing) yöntemi kullanılarak tespit edilmesi ve eş zamanlı PZR simple probe yöntemi ile doğrulanması amaçlanmıştır. Bu amaca yönelik olarak erkek kısırlık karakterinin 3:1 oranında açılım gösterdiği 96 adet bitkiden oluşan F2 haritalama popülasyonu oluşturulmuştur. 96 adet bitkiden elde edilen DNA örnekleri ile GBS analizi yapılmış ve 10 425 adet SNP moleküler işaretleyicisi tespit edilmiştir. Bu SNP moleküler işaretleyicileri kullanılarak oluşturulan ilişkilendirme haritalaması ile *Rfl* geninin havucun 9. kromozomu üzerinde bulunduğu tespit edilmiştir. Havucun 9. Kromozom üzerinde yer alan SNP moleküler işaretleyiciler kullanılarak oluşturulan genetik bağlantı haritası *Rfl* geninin yerini doğrulamıştır. Buna göre; *Rfl* genine yakın olduğu tespit edilen üç adet SNP moleküler işaretleyicisi (DcSNP_3342931, DcSNP_4822988 ve DcSNP_6233708) belirlenmiştir.

Tespit edilen SNP moleküler işaretleyicilerinin (DcSNP_3342931, DcSNP_4822988 ve DcSNP_6233708) doğrulanmasında, eş zamanlı PZR simple probe yöntemi sonucunda oluşturulan erime eğrisi (melting curve) analizleri kullanılmıştır. Erime eğrisi analizleri ile; popülasyondaki tüm bireylerin homozigot fertil (*RfIRfl*), heterozigot fertil (*Rflrf1*) ve erkek kısır (*rf1rf1*) olma durumları ayrı ayrı tespit edilmiştir. Fenotipik gözlem verileri ve GBS analizi sonuçları, erime eğrisi analizi sonuçları ile karşılaştırılmış; simple probe yönteminin fenotipik gözlem verilerini %97,9 oranında doğruladığı tespit edilmiştir.

Sonuç olarak; havuç bitkisinde erkek kısırlık karakterini kontrol eden *Rfl* geninin havuç genomundaki yerinin tespit edilmesi ve *Rfl* geni ile bağlantılı olduğu belirlenen DcSNP_3342931, DcSNP_4822988 ve DcSNP_6233708 SNP moleküler işaretleyicilerinin belirlenmesi hibrit havuç çeşitlerinin geliştirilmesini hızlandıracaktır. Ülkemizdeki yerel standart havuç çeşitlerinin hibrit çeşitlere dönüştürülmesine yardımcı olacaktır. Yerel hibrit havuç çeşitlerinin geliştirilmesi yurtdışına ödenen döviz kaybının önüne geçerek ülkemiz ekonomisine katkıda bulunacaktır.

Anahtar Kelimeler: Havuç, erkek kısırlık, *Rf* genleri, hibrit tohum üretimi, GBS, SNP, simple probe

2019, viii + 66 sayfa.

ABSTRACT

PhD Thesis

IDENTIFICATION AND VALIDATION OF SNP MARKERS LINKED TO *Rf* LOCUS IN CARROT (*Daucus Carota* L.) USING GBS

Sevin TEOMAN DURAN

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

Supervisor: Prof.Dr. Ahmet İPEK

In this PhD thesis, it was aimed to identify SNP (Single nucleotide polymorphism) markers linked to *Rf* locus using GBS (genotyping by sequencing) and validate SNPs using A SimpleProbe® real-time PCR assay. For this purpose, a F2 carrot population composed of 96 plants and segregating for male sterility (male fertile (3): male sterile (1)) was produced.

In this population, 10 425 segregating SNP markers were discovered by GBS analysis. Association mapping analysis demonstrated that *Rf1* is located on chromosome 9 of the carrot genome. A genetic linkage map of carrot chromosome 9 was developed using GBS generated SNP markers and confirmed the location of *Rf1* on chromosome 9 of the carrot genome. Using the results from association mapping and genetic mapping analyses, three SNP markers (DcSNP_3342931, DcSNP_4822988 and DcSNP_6233708) were selected for SimpleProbe® real-time PCR assay.

Melting curve analysis of SimpleProbe® real-time PCR assay was performed for SNP markers (DcSNP_3342931, DcSNP_4822988 ve DcSNP_6233708) and genotypes of all plants in this F2 population were determine as homozygous male fertil (*Rf1Rf1*), heterozygous male fertile (*Rf1rf1*) and male sterile (*rf1rf1*). When the phenotypic observation data and GBS analysis results were compared with melt curve analysis results, simpleProbe® real-time PCR assay confirmed the phenotypic observation data by 97,9 %.

Consequently, determination of the *Rf1* located on chromosome 9 of the carrot genome and identification of SNP molecular markers (DcSNP_3342931, DcSNP_4822988 ve DcSNP_6233708) linked to *Rf1* gene would accelerate the development of new hybrid carrot varieties. Furthermore, the results of this research would help to convert open-pollinated carrot varieties to hybrid varieties in our country. Thus, development of local hybrid varieties will contribute to economy of our country by preventing foreign exchange losses.

Key words: Carrot, male sterility, *Rf* genes, hybrid seed production, GBS, SNP, simple probe

2019, viii+ 66 pages.

TEŞEKKÜR

“Havuç (*Daucus carota* L.) bitkisinde *Rf* Lokusu ile Bağlantılı SNP Moleküler İşaretleyicilerin GBS Yöntemi Kullanılarak Belirlenmesi ve Doğrulanması” başlıklı bu doktora tez çalışması, Bursa Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından DDP(Z)-2019/5 proje numarası ile desteklenmektedir.

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde, değerli bilgilerimi benimle paylaşan, zamanını ayırıp sabırla ve büyük bir ilgiyle bana yardım eden, güler yüzünü benden esirgemeyen, Sayın Hocam Prof. Dr. Ahmet İPEK’e teşekkürü bir borç biliyor ve şükranlarımı sunuyorum.

Yine bu çalışmam boyunca bana sürekli yol gösterici olan ve meslek yaşamımda başarılı olmam konusunda desteğini sürdüren değerli büyüğüm ve Hocam Prof. Dr. Erdoğan BARUT’a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu günlere gelmemde bana sağladıkları olanaklar bir yana, kendilerinden edindiğim bilgi ve birikimler nedeniyle değerli Hocalarım, Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Ümran ERTÜRK’e, Prof. Dr. Meryem İPEK’e ve Doç.Dr. Nuray AKBUDAK’a teşekkürlerimi sunuyorum.

Tez çalışmam süresince benden yardımlarını esirgemeyen, Tez İzleme Komitesi Üyesi Sayın Hocam Prof.Dr. Köksal YAĞDI’ya; Tez Savunma Sınavı Jüri Üyesi Hocalarım Sayın Prof.Dr. Murat ŞEKER’e ve Sayın Dr. Öğr. Üyesi Kenan SÖNMEZ’e teşekkürlerimi sunuyorum.

Ayrıca, akademik çalışmamda laboratuvar deneyiminden yararlandığım May Tohum AR-GE Laboratuvar Müdürü Dr. Hasan ÖZGÜR ŞİĞVA’ya teşekkür ediyorum.

Yaşamımın her anında varlığına gereksinim duyduğum ve duyacağım değerli ablam Sevi ALAT’a, eşi Erdem ALAT’a, yeğenim Ayça ALAT’a ve babaannem Emine TEOMAN’a binlerce kez teşekkür ediyorum ve sevgilerimi sunuyorum.

Sonsuz sevgi ve hoşgörü içerisinde her zaman yanımda olan, desteklerini benden esirgmeden bugünlere ulaşmamı sağlayan, başarılı bir akademisyen olabilmem için beni her zaman yüreklendiren sevgili annem Suna TEOMAN ve sevgili babam Hasan TEOMAN’a minnettarım.

Beni daima sevgi ile kucaklayan ve her durumda destekleyen, parçası olmaktan mutluluk duyduğum Muğla’daki ailem annem Hayriye DURAN’a ve babam Tacettin DURAN’a çok teşekkür ediyorum.

Son olarak; doktora eğitimim boyunca sonsuz özveri ve sabır göstererek en büyük destekçim olan, yanımda yer alan, her konuda bilgisine ve düşüncelerine güven duyduğum meslektaşım, hayat arkadaşım, eşim Ufuk Tan DURAN’a sonsuz teşekkür ediyor ve bu çalışmayı ona ithaf ediyorum.

Sevin TEOMAN DURAN
16/09/2019

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	6
2.1. Havuçta Sitoplazmik Genetik Erkek Kısırlığı.....	6
2.2. Sitoplazmik Genetik Erkek Kısırlık Mekanizması ile İlgili Yapılan Moleküler Çalışmalar.....	10
2.3. SNP Moleküler İşaretleyicilerin Kullanımı.....	11
2.4. GBS Analizi.....	12
2.5. Genetik Bağlantı Haritası Oluşturma Çalışmaları.....	15
2.6. Eş Zamanlı PZR.....	18
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	20
3.1. Materyal.....	20
3.2. Yöntem.....	20
3.2.1. Yaprak örneklerinin alınması.....	20
3.2.2. DNA örneklerinin elde edilmesi.....	20
3.2.3. DNA örneklerinin kalitesinin ve konsantrasyonunun belirlenmesi.....	22
3.2.4. DNA örneklerinin DNA restriksiyon enzimi (<i>EcoRI</i>) ile kesilmesi.....	22
3.2.5. GBS analizi.....	23
3.2.6. Veri analizi.....	24
3.2.7. Simple probe yöntemi kullanarak eş zamanlı PZR reaksiyonunun yapılması.....	25
3.2.8. Erkek kısırlık geni ilişkili SNP moleküler işaretleyicilerin eş zamanlı PZR simple probe yöntemi ile doğrulanması.....	26
3.2.9. Genetik bağlantı haritasının oluşturulması.....	26
4. BULGULAR.....	28
4.1. Çiçeklerin Erkek Kısır Olup Olmadığının Belirlenmesi.....	28
4.2. DNA İzolasyonu.....	30
4.3. GBS Analizi Sonuçları.....	34
4.4. SNP Moleküler İşaretleyicilerinin Belirlenmesi ve İlişkilendirme Haritalaması Sonuçları.....	35
4.5. Genetik Bağlantı Haritasının Oluşturulması.....	38
4.6. Erkek Kısırlık Geni ile İlişkili SNP Moleküler İşaretleyicilerin Seçilmesi....	40
4.7. Erime Eğrisi Analizi Sonuçları.....	40
4.8. Erkek Kısırlık Geni ile İlişkilendirilen SNP Moleküler İşaretleyicilerin Doğrulanması.....	43

	Sayfa
4.9. Genetik Bağlantı Haritasının Oluşturulması.....	49
5. TARTIRŞMA VE SONUÇ.....	51
KAYNAKLAR.....	55
ÖZGEÇMİŞ.....	66

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

Açıklama

°C	Santigratderece
β	Beta
α	Alfa

Kısaltmalar

Açıklama

AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
CAPS	Cleaved Amplified Polymorphic Sequence
cm	Santimetre
cM	centiMorgan
CTAB	Cetyl trimethylammonium bromide
DarT	Diversity Arrays Technology
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
EST	Expressed Sequence Tags
GBS	Genotyping by sequencing
ISSR	Inter Simple Sequence Repeat
kg	Kilogram
LOD	Logarithm of odds
M	Molar
mg	Miligram
mL	Mililitre
μL	Mikrolitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
ng	Nanogram
PCR	Polymerase Chain Reaction
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
QTL	Quantitative Trait Locus
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RNA	Ribonükleik asit
SCAR	Sequence Characterized Amplified Region
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SSR	Simple Sequence Repeats
STS	Sequence-Tagged Sites
TAIL	Thermal Asymmetric Interlaced
U	Unit

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. A) Erkek fertil ve B) Petaloid tipi erkek kısır havuç çiçeklerinin fotoğrafı.....	9
Şekil 2.2. A) Erkek fertil B) Erkek kısır havuç çiçeklerin mikroskop altındaki görüntüsü.....	9
Şekil 2.3. Sitoplazmik genetik erkek kısırlık kullanılarak yapılan hibrit tohum üretimi.....	10
Şekil 4.1. Rastgele seçilmiş 10 adet DNA örneğinin agaroz jel görüntüsü.....	33
Şekil 4.2. <i>EcoRI</i> enzimi ile kesilen DNA örneklerinin sonraki agaroz jel görüntüsü.....	33
Şekil 4.3. GBS analizi sırasında genotiplerin referans havuç genomu ile eşleşme durumu.....	34
Şekil 4.4. GBS analizi tarafından her bir örnek için nükleotid dizi analizi yapılan DNA parçası sayısı.....	35
Şekil 4.5. <i>Rfl</i> geni ile ilişkilendirilen SNP moleküler işaretleyicilere ait Manhattan grafiği.....	37
Şekil 4.6. SNP moleküler işaretleyicilere dayalı havucun 9. kromozomunun genetik haritası.....	39
Şekil 4.7. DcSNP_3342931 ile yapılan eş zamanlı PZR çoğaltımına ait erime eğrileri.....	41
Şekil 4.8. DcSNP_4822988 ile yapılan eş zamanlı PZR çoğaltımına ait erime eğrileri.....	41
Şekil 4.9. DcSNP_6233708 ile yapılan eş zamanlı PZR çoğaltımına ait erime eğrileri.....	41
Şekil 4.10. Popülasyondaki tüm genotiplerin homozigot fertil (<i>RfIRfI</i>), heterozigot fertil (<i>RfIrfI</i>) ve erkek kısır (<i>rflrfI</i>) olma durumlarını gösteren erime eğrileri.....	43
Şekil 4.11. <i>Rfl</i> geni ile bağlantılı SNP moleküler işaretleyiciler ile oluşturulan genetik bağlantı haritası.....	50

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 3.1. <i>EcoRI</i> enzimi ile kesim reaksiyonunun bileşenleri.....	23
Çizelge 3.2. Eş zamanlı PZR reaksiyonunun bileşenleri.....	25
Çizelge 3.3. Eş zamanlı PZR sıcaklık döngüsü.....	26
Çizelge 4.1. F2 popülasyonuna ait 96 adet bitkinin çiçek yapılarının fenotipik gözlem sonuçları.....	28
Çizelge 4.2. DNA örneklerinin konsantrasyonu.....	31
Çizelge 4.3. Belirlenen SNP moleküler işaretleyicilerin havucun kromozomları üzerindeki dağılımı.....	37
Çizelge 4.4. Eş zamanlı PZR reaksiyonunda kullanılan SNP moleküler işaretleyiciler ve nükleotid polimorfizmi.....	40
Çizelge 4.5. Fenotipik gözlem verileri ile GBS analizi ve erime eğrisi analizi sonuçlarının karşılaştırılması.....	45
Çizelge 4.6. F2 açılım popülasyonuna ait fenotipik gözlem, GBS analizi ve erime eğrisi analizi verileri ile yapılan ki-kare testi sonuçları.....	49

1. GİRİŞ

Havuç (*Daucus carota* L.) *Apiaceae* familyasında yer alan iki yıllık otsu bir sebze türüdür. Serin iklim sebzesi olan havuç, kökleri tüketilen sebzeler grubunda yer almaktadır. Dünya’da yetiştirilen havuçlar içerdikleri pigmentlere göre sınıflandırılmaktadırlar. β -karoten içeren havuçlar turuncu; antosiyanin içeren havuçlar mor; likopen içeren havuçlar kırmızı; ksantofil içeren havuçlar sarı ve pigment içermeyen havuçlar beyaz renktedir (Lafferriere ve Gabelman 1968, Umiel ve Gabelman 1972, Buishand ve Gabelman 1980).

Dünya’da yetiştiriciliği yapılan tüm havuçların anavatanının Orta Asya olduğu bilinmektedir (Iorizzo ve ark. 2013). Doğu kökenli olduğu kabul edilen sarı ve mor renkli olan havuçların anavatanının özellikle Afganistan ve Özbekistan’ı içerisine alan bölge olduğu kabul edilmektedir (Brothwell ve Borthwell 1969, Heywood 1983). Turuncu, kırmızı ve beyaz renkli havuçların ise Anadolu (Türkiye) ve çevresinden tüm dünyaya yayıldığı bilinmektedir (Stolarczyk ve Janick 2011).

Havuç kültür sebzeleri arasında insan sağlığı ve beslenmesinde önemli rol oynayan fitokimyasalları içeren bir türdür. A vitaminin ön maddesi olan α ve β -karoten içeren turuncu renkli havuçlar; antosiyanin içeren mor renkli havuçlar; lutein içeren sarı renkli havuçlar, likopen içeren kırmızı renkli havuçlar içerdikleri bu pigmentler sayesinde önemli bir antioksidan kaynağıdır (Silva Dias 2014). Havuçların rengine bağlı olarak içerdikleri antioksidan miktarlarının da değişkenlik gösterdiği bilinmektedir (Sun ve ark. 2009). Havuç ayrıca fenolik ve biyoaktif bileşikler, flavanoidler ve vitaminler açısından da oldukça zengin bir sebze türüdür. Havuç besleyicilik özelliği bakımından farklı 39 adet kültür sebze ve meyveleri ile kıyaslandığında 10. Sırada gelmektedir (Acharya ve ark. 2008). Karotenoidlerce zengin olan havucun bazı kanser türlerinin, kalp-damar hastalıklarının, katarakt ve görme bozukluğu gibi hastalıkların görülme sıklığını azalttığı ve bağışıklık sistemini güçlendirdiği bilinmektedir (Shebaby ve ark. 2013).

Havuç Dünya’da ve Türkiye’de geniş alanlarda üretimi yapılan, ekonomik öneme sahip bir sebzedir. Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) 2017 yılı verilerine göre; Dünya’da 1 147 155 ha alanda 42 831 958 ton havuç üretimi yapılmaktadır. Dünya’daki en önemli havuç üreticisi olan ilk beş ülke sırasıyla Çin (20 274 393 ton), Özbekistan (2 249 733 ton), Rusya (1 805 787 ton), Amerika Birleşik Devletleri (1 540 280 ton) ve Birleşik Krallık (957 036 ton)’tır. Türkiye dünyada havuç üretimi yapan ülkeler arasında 9. sırada yer almaktadır (Anonim 2017a).

Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) 2018 yılı verilerine göre; ülkemizde 123 478 dekarlık alanda 642.837 ton havuç üretimi yapılmaktadır. Ülkemiz havuç üretiminde ön planda olan illerimiz Konya (424 636 ton), Ankara (132 890 ton) ve Hatay (58 190 ton)’dır. Konya ili, ülkemizde üretilen havucun %66,2’sini karşılayarak havuç üretiminde ön plana çıkan ilimiz olmuştur (Anonim 2018).

Dünya’da ve ülkemizde en çok üretilen havuçların çoğu turuncu renklidir. Ülkemizde genellikle 10-20 cm uzunluğunda uçları küt ve silindirik yapıya sahip dünyada ‘Nantes’ olarak bilinen turuncu havuçlar yetiştirilmektedir (Rubatzky ve ark. 1999). Üretilen turuncu renkli havuçlar taze olarak tüketilmek veya yemeklerde kullanılmak üzere iç pazarda satılmaktadır. Ayrıca, konservelerde, tatlı yapımında da kullanılmaktadır. Bunun yanısıra, ülkemizde mor havuç yetiştiriciliği de giderek artmaya başlamıştır. Özellikle Konya ilinin Ereğli ilçesi başta olmak üzere, üretim Anadolu’nun başka bölgelerinde de yaygın hale gelmektedir. Ereğli ilçesinde yetiştirilen mor renkli havuçlar “Ereğli siyah havucu” olarak patentlenmiştir ve antosiyanin ekstraksiyonunda kullanılmaktadır. Mor havuçlardan elde edilen antosiyanin gıda ve kozmetik sanayisinde renklendirici olarak değerlendirilmektedir ve buradan Avrupa ve Uzak Doğu ülkelerine ihracat edilmektedir. Üretilen mor havuçların %80’inden fazlası şalgam suyu ve meyve konsantresi yapımında kullanılmaktadır ve ürünlerin ihracat potansiyeli yüksek olmaktadır (Anonim 2019).

Havuç Dünya’da ve ülkemizde hibrit çeşitler kullanılarak üretilmektedir. Ancak, ülkemizde yerli hibrit havuç tohumluğu bulunmamaktadır. Türkiye İstatistik Kurumu 2017 verilerine göre 27 069 kg ton havuç tohumu ithal edilmiş olup, 3 793 055 ABD

Doları ödenmiştir. Havuç tohumluğu için ödediğimiz döviz serin iklim sebze türleri için ilk sırada yer almaktadır (Anonim 2017b).

Havuç üretiminde hibrit çeşit kullanılmasının amacı; renk, şekil, büyüklük ve tat bakımından homojen üretimin yapılabilmesine olanak vermesidir. Yüksek oranda yabancı tozlanma gösteren havuç gibi sebze türlerinde hibrit tohumların üretilmesinde zorluklar yaşanmaktadır. Bu nedenle, hibrit havuç tohumu üretiminde erkek kısırlıktan faydalanılmaktadır (Welch ve Grimbald 1947, Banga ve ark. 1964). Kalıtsal olan erkek kısırlık oluşumu, ya kromozomlar üzerindeki bazı genler ya da sitoplazmanın kalıtsal mekanizması tarafından kontrol edilmektedir (Budar ve Pelletier 2001). Erkek kısırlık, genetik erkek kısırlığı, sitoplazmik erkek kısırlığı ve sitoplazmik genetik erkek üç farklı gruba ayrılmaktadır. Havuçta bulunan erkek kısırlık tipi sitoplazmik genetik erkek kısırlıktır. Bu sistemde, hem hücre çekirdeği hem de sitoplazmada bulunan genler erkek kısırlığı kontrol etmektedir. Sitoplazmik genetik erkek kısırlık, sitoplazmada bulunan genlerin çekinik (*rfrf*), sitoplazmanın ise S tipi olması durumunda oluşmaktadır (Gulyas ve ark. 2006). Sitoplazmik genetik erkek kısırlık sisteminin hibrit tohum üretiminde uygulanabilmesi için ana hat, idameci hat ve baba hat olmak üzere üç farklı hattın geliştirilmesi gerekmektedir. Havuçta erkek kısır olan ana hatların çoğaltılması için idameci hatların geliştirilmesi zorunludur (Shigyo ve Kik 2008).

Geleneksel ıslah yöntemleri kullanarak bir havuç populasyonunda hücre çekirdeğinde erkek kısırlığı kontrol eden “Restorer of fertility” geninin çekinik allelinin (*rf*) var olup olmadığını tespit etmek, en az iki yıl sürmektedir. Ancak havuçta baskın (*Rf*) ile çekinik (*rf*) allelinin birbirinden ayırabilecek moleküler işaretleyicilerin geliştirilmesi ile bu süre yarı yarıya kısaltılabilmektedir. Son yıllarda, sitoplazmik genetik erkek kısırlık ile ilgili yapılmış moleküler çalışmalarda Nakajima ve ark. (1999) petaloid sitoplazmayı fertil sitoplazmadan ayıran 6 adet mitokondrial STS (Sequence tagged site) markırı; Bach ve ark. (2002) kısır petaloid stoplazmayı fertil sitoplazmadan ayırmak için PZR’a dayalı 14 adet markır geliştirmişlerdir. Çelik (2014) tarafından gerçekleştirilen yüksek lisans tez projesi kapsamında, *Rf* lokusu ile bağlantılı 2 adet AFLP (amplified fragment length polymorphism; çoğaltılmış parça uzunluğu polimorfizmi) moleküler işaretleyicisi tespit edilmiş ve AFLP moleküler işaretleyicilerinin nükleotid dizileri belirlenmiştir.

Son yıllarda, yeni nesil moleküler işaretleyicilerden SNP (Single Nucleotide Polymorphism; tek nükleotid polimorfizmi) moleküler işaretleyicilerinin devreye girmesi ile diğer moleküler işaretleyiciler ile araştırılması sınırlı olan genomlar üzerinde çalışılabilmektedir (Lombardi ve ark. 2014).

Bugüne kadar erkek kısırlığın bitki türlerinde tanımlanması ve erkek kısır ile erkek fertil bitkilerin birbirinden ayrılmasında SNP moleküler işaretleyicilerin kullanılmasına yönelik, çeltikte (Song ve ark. 2016) pamukta (Feng ve ark. 2015); soğanda (Cho ve ark. 2006) ve sorgumda (Ongom ve ark. 2016) yapılmış çalışmalar bulunmaktadır (Akter ve ark. 2016). Havuç genomunda SNP moleküler işaretleyicilerinin tespit edilmesine yönelik olarak yapılan sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır (Oraguzie ve ark. 2007, Yıldız 2009, Cavagnaro ve ark. 2014).

Yeni nesil DNA dizileme teknolojileri kullanılarak yapılan tek bir PZR reaksiyonu ile yüz milyarlarca bazın aynı anda dizilenmesi birkaç gün içerisinde gerçekleştirilmektedir (Deschamps ve Campbell 2010, Deschamps ve ark. 2012). Yeni nesil DNA dizileme teknolojilerine dayalı genotipleme yöntemlerinden biri olana genotyping by sequencing (GBS) yöntemi kullanılarak bitkilerde genotipleme çalışmaları çok daha hızlı bir şekilde yapılabilmektedir (Elshire 2011, Chung ve ark. 2017, Scheben ve ark. 2017). Bugüne kadar havuçta F2 populasyonları kullanılarak AFLP, RFLP (restriction fragment length polymorphism; sınırlı parça uzunlukları polimorfizmi), izoenzim, RAPD (random amplified polymorphic DNA; rastgele çoğaltılmış DNA polimorfizmi), CAPS (cleaved amplified polymorphic sequences; bölünerek çoğaltılmış polimorfik diziler) ve SCAR (sequence characterized amplified region; sekansı belirlenmiş çoğaltılmış bölgeler) moleküler işaretleyicileri kullanılarak genetik haritalar oluşturulmuştur (Westpal ve Wricke 1991, Schulz ve ark. 1994, Bradeen ve ark. 1997, Santos ve Simon 2004, Bradeen ve Simon 2007, Alessandro ve ark. 2013). Ancak, SNP moleküler işaretleyicileri kullanılarak havuçta yapılan genetik haritalama çalışmaları sınırlı sayıdadır (Ellison ve ark 2017, Sarcan 2018).

Eş zamanlı PZR (Real Time PCR) nükleik asit çoğaltılmasıyla eş zamanlı olarak artış gösteren floresan sinyalin ölçülmesine dayalı kısa sürede kantitatif sonuç veren bir PZR yöntemidir (Günel 2007). Günümüzde moleküler biyolojinin farklı alanlarında, GBS

yöntemi ile belirlenen SNP moleküler işaretleyicilerin doğruluk tespitleri eş zamanlı PZR simple probe yöntemi kullanılarak yapılabilmektedir (Nie ve ark. 2011, Liu ve ark. 2016, Kwonga ve ark. 2018).

Bu tez çalışmasında, havuç bitkisinde erkek kısırlığı kontrol eden *Rf* lokusu ile bağlantılı olan SNP moleküler işaretleyicilerin GBS yöntemi kullanılarak tespit edilmesi ve belirlenen SNP moleküler işaretleyicilerinin Simple Probe yöntemi ile doğrulanması amaçlanmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI

Bu bölümde, havuçta sitoplazmik genetik erkek kısırlığı, SNP moleküler işaretleyicilerinin kullanımı, GBS yöntemi, genetik haritalama çalışmaları ve eş zamanlı PZR konuları ile ilgili açıklamalar ile yerli ve yabancı kaynaklarda yer alan çalışmalara yer verilmiştir.

2.1. Havuçta Sitoplazmik Genetik Erkek Kısırlığı

Havuç, birinci yıl vegetatif organları ikinci yıl generatif organları oluşan iki yıllık kökleri tüketilen otsu bir sebze türüdür (Günay 2005). *Apiaceae* familyasında yer alan havucun çiçek yapısı, küçük şemsiyelerin dizilerek büyük bir şemsiye şeklini almasıyla oluşmaktadır. Havuç çiçekleri erselik yapıda olup; 5 adet çanak yaprak, 5 adet taç yaprak, 5 adet erkek organ ve iki karpelli 1 adet dişi organdan oluşmaktadır. Çiçekleri erselik yapıdadırlar. Havuç çiçekleri protandri göstermektedir ve bu nedenle havuçta yüksek oranda yabancı tozlanma görülmektedir. Ayrıca, çiçek kümesi içindeki çiçeklerin hepsi aynı anda olgunlaşmadığı için aynı çiçek kümesi içinde yer alan farklı çiçekler veya farklı çiçek kümelerinde bulunan çiçekler birbirini tozlayabildiği için kendileme olmaktadır (Borthwick ve ark. 1931, Welch ve Grimbald 1947).

Günümüzde sebze yetiştiriciliğinde hibrit tohum kullanımı yaygınlaşmakta ve ülkemizde %90'lara varan oranlarda hibrit çeşitler kullanılarak havuç üretimi yapılmaktadır. Havuç gibi yüksek oranda yabancı tozlanma gösteren sebze türlerinde hibrit tohumların üretilmesinde zorluklar yaşanmaktadır. Çiçek yapılarının küçük olması ve çok sayıda çiçeğin şemsiye şeklinde bir arada bulunması ile oluşan çiçeklerde emaskülasyon yaparak hibrit tohum üretmek pratik ya da ekonomik olarak mümkün olmamaktadır. Aynı zamanda bu türlerde melezleme başına elde edilen tohum sayıları az olmakta ve büyük alanlarda hibrit tohum üretiminin maliyeti artmaktadır (Tatlıoğlu 2008, Karaağaç ve Balkaya 2009). Bu nedenle, erkek kısırlık özelliği, hibrit tohum üreticilerinin ve bitki ıslahçıların en çok aradığı özelliklerdendir (Hussain ve ark. 2018).

Bitkilerde erkek kısırlığı, erkek organların hiç oluşmaması, veya erkek organların fonksiyonel olmaması sonucunda canlı polenlerin oluşmamasından kaynaklanabilmektedir (Kumar 2013). Bitkilerde erkek kısırlık oluşumu ya

kromozomlar üzerindeki bazı genler ya da sitoplazmanın kalıtsal mekanizması tarafından kontrol edilmektedir (Budar ve Pelletier 2001). Bitkilerde görülen erkek kısırlık tipleri, genetik erkek kısırlığı, sitoplazmik erkek kısırlığı ve sitoplazmik genetik erkek kısırlığı olarak sınıflandırılmaktadır. Genetik erkek kısırlığı, resesif bir gen çifti tarafından kontrol edilmektedir ve bu kısırlık tipinde sitoplazmanın etkisi yoktur. Biber, soğan, domates gibi sebze türlerinde tespit edilmiştir. Sitoplazmik erkek kısırlığında ise erkek kısırlık sitoplazma tarafından kontrol edilmektedir ve normal stoplazma (N), kısırlığı meydana getiren sitoplazma ise (S) ile gösterilmektedir. Bu kısırlık tipinde ise hücre çekirdeğindeki genlerin erkek kısırlık üzerine etkisi yoktur. Yani sitoplazmik erkek kısırlığın kalıtımı sadece ana bitkinin sitoplazmasındaki genler tarafından kontrol edilmektedir ve erkek fertil bitkilerle melezlendiğinde sitoplazma baba olarak ebeveynden aktarılmadığından oluşan melez bitkilerde erkek kısır olmaktadır. Günümüzde sitoplazmik erkek kısırlık baş lahana, brokoli, çin lahanası, turp ve soğan gibi vejetatif organları tüketilen sebzelerin hibrit tohumlarının üretiminde kullanılmaktadır (Kumar 2000).

Sitoplazmik genetik erkek kısırlığı sisteminde, hem çekirdek hem de sitoplazmada bulunan genlerin etkileşimi sonucunda erkek kısırlığı oluşmaktadır. Stoplazmik genetik erkek kısırlığı 150'nin üzerinde bitki türünde tespit edilmiştir (Sofi ve ark. 2007). Sebze türleri arasında, biber, domates, soğan, havuç ve kırmızı pancarda tanımlanmıştır. Wolyn ve Chahal (1998) 'Wisconsin', 'Cornell' ve 'Guelph' petaloid sitoplazmalarını kullanarak yaptıkları çalışmada çekirdekte yer alan ve genetik kısırlığı kontrol eden iki adet '*Rf*' (restorers of fertility) geni belirlemişlerdir. Bu genlerden sadece birinin dominant allelinin polen üretimi (normal çiçekler) için yeterli olduğunu tespit etmişlerdir.

Hibrit havuç tohumu üretimi sitoplazmik genetik erkek kısırlığı üzerine kurulmuştur. Havuçta 'kahverengi anter' (brown anther) ve 'petaloid' tipi olmak üzere iki farklı sitoplazmik genetik erkek kısırlık tanımlanmıştır. Kahverengi anter' sitoplazmik genetik erkek kısırlık tipinde, anterler gelişmemekte ve büzülmüş kahverengi bir şekil almaktadır. Bu tip erkek kısırlıkta anterler normal oluşmakta fakat polen gelişimi belli bir aşamada durmaktadır (Welch ve Grimbal 1947, Banga ve ark. 1964). Bu

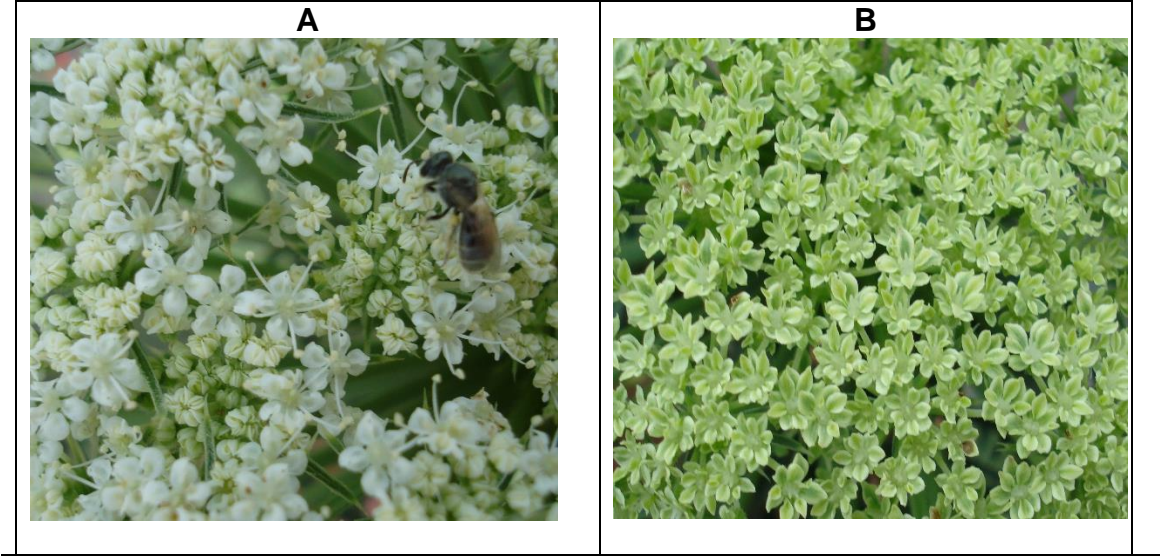
sitoplazmik genetik erkek kısırlık tipi kültürü yapılan birçok havuç çeşidinde ve yabani havuç popülasyonlarında görülmüştür (Ronfort ve ark. 1995).

Diğer sitoplazmik genetik erkek kısırlık tipinde ise erkek organlar taç yapraklara (petale) benzeyen yapılara dönüştüğü için 'petaloid' ismi verilmiştir (Şekil 2.1; Şekil 2.2) (Struckmeyer ve Simon 1986). Bu sitoplazmik genetik erkek kısırlık tipinde anterler hiç oluşmamaktadır ve dolayısıyla polen üretimi olmamaktadır. Günümüzde 'Wisconsin', 'Cornell' ve 'Guelph' olmak üzere 3 farklı kaynaktan petaloid sitoplazma tanımlanmıştır (Morelock ve ark. 1996, Wolyn ve Chahal 1998, Nothnagel ve ark. 2000). Bu sitoplazmik genetik erkek kısırlığı tipinde erkek kısır havuç çiçekleri normal çiçeklerden daha kolay ayırt edilebildiği için günümüzde hibrit havuç tohumlarının çoğu petaloid tipi sitoplazmik genetik erkek kısırlık kullanılarak üretilmektedir. Günümüzde dünyadaki hibrit havuç çeşitlerinin %70'i ve Amerika Birleşik Devletleri'ndeki havuç çeşitlerinin %90'ı petaloid erkek kısırlık sistemi kullanılarak üretilmektedir. Geriye kalan çeşitlerin üretiminde ise kahverengi anter erkek kısırlığı kullanılmaktadır (Havey 2004).

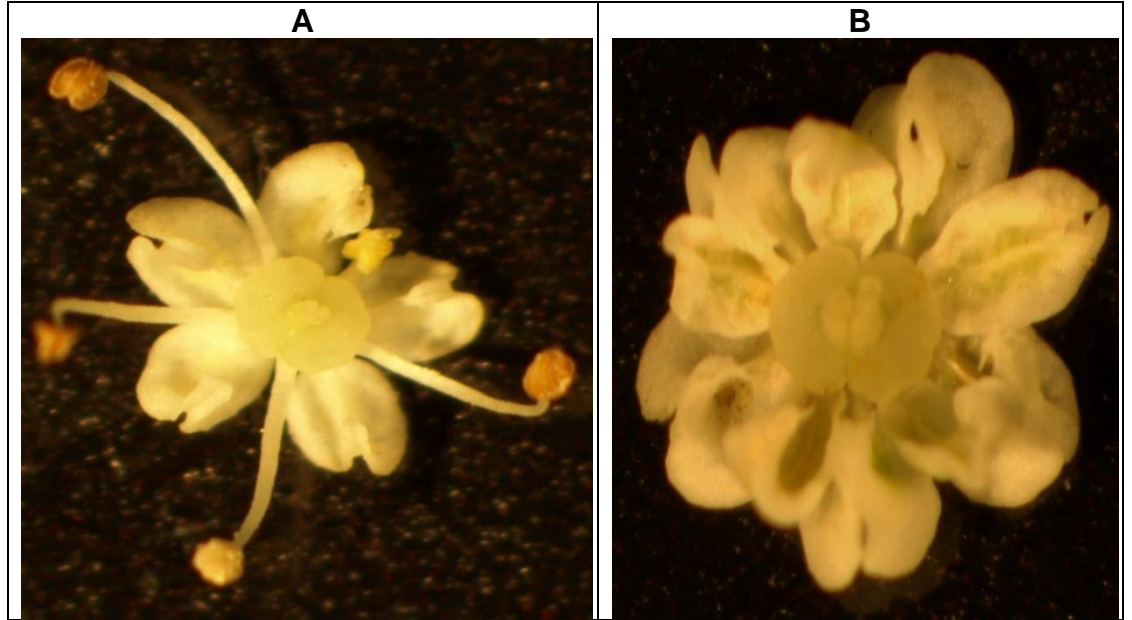
Petaloid tipi sitoplazmik genetik erkek kısırlık sistemine göre; havuç bitkilerinin erkek kısır olması için sitoplazmasının kısır olması (S sitoplazma) ve hücre çekirdeğindeki *Rf* genlerinin her ikisinin de homozigot çekinik olması gerekmektedir. Buna göre erkek kısır hatların genotipi *S-rf1rf1rf2rf2* olmalıdır. Buna karşın sitoplazması normal olan havuçlar (N sitoplazma) hücre çekirdeğindeki genler ne olursa olsun erkek fertil olmaktadır. Kısır sitoplazmaya sahip olan (S sitoplazma) havuç bitkilerinin erkek fertil olması için hücre çekirdeğinde bulunan sitoplazmik genetik erkek kısırlığı kontrol eden '*Rf*' genlerinden en az birinin allelinin dominant olması gerekmektedir. Buna göre; *S-Rf1rf1rf2rf2* veya *S-rf1rf1Rf2rf2* genotipine sahip havuç bitkileri erkek fertil olacaktır (Wolyn ve Chahal 1998).

Hibrit havuç tohumu erkek kısır ana hatlar ile normal çiçeklere sahip fertil baba hatların izole edilmiş bir alanda melezlenmesi ile elde edilmektedir. Hibrit havuç tohumu üretiminde sitoplazmik-genetik erkek kısırlığı mekanizmasının uygulanması için ıslah programında üç ana hattın bulunması gerekmektedir. Hibrit tohum üretimi yapabilmek için erkek kısır olan ana hatların (dişi ebeveyn) (S, *rf1rf*) büyük miktarlarda çoğaltılması

zorunludur. Tohumluk üretiminde sadece bu bitkilerden tohum elde edilebilmektedir. İkinci hat idameci (N, *rfrf*) hattır. İdameci hatlar genetik olarak erkek kısır olan ana hatların aynısıdır fakat sitoplazması kısır sitoplazma değil, normal sitoplazmadır.

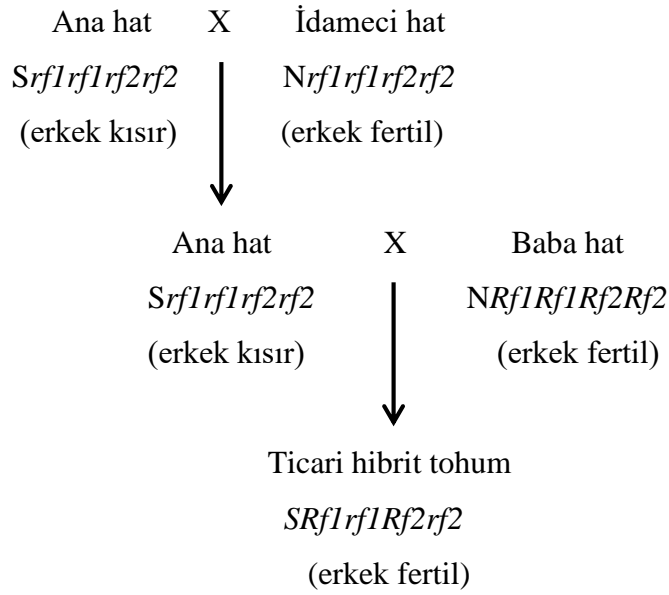


Şekil 2.1. A) erkek fertil ve B) Petaloid tipi erkek kısır havuç çiçeklerinin fotoğrafı



Şekil 2.2. A) Erkek fertil B) erkek kısır havuç çiçeklerin mikroskop altındaki görüntüsü

Buna göre genelde erkek kısır ana hatlar ‘S-*rf1rf1rf2rf2*’ iken idameci hatlar ‘N-*rf1rf1rf2rf2*’ genotipine sahip olmaktadır. Erkek kısır olan ana hatlar çoğaltılırken idameci hatlar ile melezlenmekte ve böylece erkek kısır ana hatların genotipi değiştirilmeden çoğaltılmış olmaktadır. Üçüncü hat (baba hat) ise erkek fertil olan hattır ve ‘NR*f1Rf1Rf2Rf2*’ genotipine sahiptir (Şekil 2.3) (Gulyas ve ark. 2006, Shigyo ve Kik 2008).



Şekil 2.3. Sitoplazmik genetik erkek kısırlık kullanılarak yapılan hibrit tohum üretimi

2.2. Sitoplazmik Genetik Erkek Kısırlık Mekanizması ile İlgili Yapılan Moleküler Çalışmalar

Hibrit tohum üretebilmek için bir havuç popülasyonunda geleneksel ıslah yöntemleri kullanılarak *rf* allelinin var olup olmadığını belirlemek en az iki yıl sürmektedir. Havuçta baskın *Rf* ile çekinik *rf* birbirinden ayırabilecek moleküler işaretleyicilerin geliştirilmesi, havuç popülasyonlarının *Rf* lokusuna bağlantılı moleküler işaretleyiciler ile hızlı bir şekilde taranması ile çekinik *rf* allelinin var olup olmadığına var ise hangi bitkide olduğuna ıslahın ilk ayında bakılabilecektir. Bu nedenle, moleküler işaretleyiciler kullanılarak yapılacak seleksiyon ile bu sürenin hızlandırılmasına yönelik çalışmalar önem kazanmıştır.

Havuçta sitoplazmik genetik erkek kısırlık üzerine yapılan moleküler çalışmalar genellikle kısır (S) sitoplazmalar üzerine yoğunlaşmıştır. Nakajima ve ark. (1999) yaptıkları bir çalışmada, petaloid kısır sitoplazmayı fertil normal sitoplazmadan ayıran 6 adet mitokondrial STS markırı geliştirdiklerini belirtmişlerdir. Bach ve ark. (2002) kısır petaloid sitoplazmayı fertil normal sitoplazmadan ayırmak için havuç mitokondrisinin genomunda yer alan genlerin nükleotid sekansları üzerinde çalışmışlardır. Bu iki farklı çalışmanın sonucunda araştırmacılar, *atp1*, *atp6*, *atp9*, *atp8*, *nad6*, ya da *cob* genlerinin nükleotid dizilerinden petaloid sitoplazmayı normal sitoplazmadan ayıran PZR'a dayalı 14 adet moleküler işaretleyici geliştirmişlerdir. Buna karşın; Robison ve Wolyn (2006) *atp8* genin ifadesinin petaloid sitoplazmik genetik erkek kısırlığıyla ilişkisinin olmadığını tespit etmişlerdir. Tan ve ark. (2018), havuçta çiçeklenmenin farklı aşamalarında *atp6* geninin erkek kısır ve erkek fertil özelliklere sahip farklı hatlarda ifadesini incelemişlerdir. Erkek kısır özelliğe sahip olan hatlarda *atp6* geninin kopya sayısının 1 adet; erkek fertil hatlarda 2 adet olduğunu tespit etmişlerdir ve *atp6* geninin erkek fertil ve erkek kısır bitkilerde farklı ifadelendiği belirlemişlerdir. Kalia ve ark. (2019); petaloid erkek kısır özelliği gösteren Asya kökenli havuçlarda petaloid sitoplazmadan erkek kısır sitoplazmayı ayırmak amacıyla *atp9* geninin bitkinin morfolojik özellikleri ile ilişkisini incelemişlerdir. Havuç çiçeklerinde renk ve şekil gibi çiçek yapısı ile ilgili özelliklerin sitoplazmik erkek kısırlık özellik gösteren hatların ayırt edilmesinde kullanıldığını belirlemişler; *atp9* geni ile ilişkili olan PZR'a dayalı 5 adet moleküler işaretleyici geliştirmişlerdir.

Çelik (2014) tarafından gerçekleştirilen yüksek lisans tez projesinde; havuçta iki farklı haritalama popülasyonu kullanılarak *Rf* lokusu ile bağlantılı 2 adet AFLP moleküler işaretleyicisi tespit edilmiştir.

Fuji ve Shiroto (2019); havuçta petaloid tipi erkek kısırlığın fenotipik ifadesinde kullanılmak üzere 4. kromozomda '*DcMADS2*' QTL lokusunu tespit etmişlerdir.

2.3. SNP Moleküler İşaretleyicilerin Kullanımı

Bitki ıslahında kullanılan moleküler işaretleyiciler, hibridizasyona dayalı (RFLP), PZR yöntemine dayalı (RAPD, AFLP, SSR) ve DNA dizi analizine dayalı (SNP) olmak üzere üç gruba ayrılmaktadır (Varshney et al. 2007). DNA moleküler işaretleyicilerinin

analizleri genetik bağlantı haritası oluşturma, karşılaştırmalı haritalama analizleri, gen kaynaklarını tanımlamada, ekonomik öneme sahip genlerin işaretlenmesinde, moleküler işaretleyicilere dayalı seleksiyon ve haritalamaya dayalı klonlama gibi uygulama alanlarına sahiptir (Kumar 1999).

Günümüzde modern moleküler ıslah çalışmalarında, SNP moleküler işaretleyicileri yüksek polimorfizme sahip olmaları, eş baskın olmaları, yüksek düzeyde bilgi verici olmaları nedeniyle önem kazanmıştır (Beisinger ve ark. 2013). Diğer moleküler işaretleyiciler ile araştırılması sınırlı olan genomlara SNP moleküler işaretleyicileri uygulanmaktadır (Lombardi ve ark. 2014).

Brookes (1999), SNP moleküler işaretleyicileri, bazı popülasyonlarda normal bireylerde, farklı dizi allellerinin olduğu genomik DNA'da tek baz çifti pozisyonları olarak tanımlamıştır. Bu tanımda bu allellerin popülasyonda rastlanma sıklığı %1 ya da daha fazla olması gerekmektedir. SNP'ler, pürin-pürin (A ↔ G) yada pirimidin-pirimidin (C ↔ T) baz değişimleri ile olabildiği gibi, pürin-pirimidin yada pürimidin-pürin baz değişimleri (A ↔ C, A ↔ T, G ↔ C, G ↔ T) ile de olabilmektedir (Vignal et al. 2002).

SNP moleküler işaretleyicileri bilinen genom ya da gen dizisi üzerinde belirlenmesi ve haritalanması, genom dizisinin belirlenen (bilinen) SNP'ler için taranması ve genomda SNP'lerin belirli fenotipik karakterleri kodlayan bölgelerle bağlantısının tespiti olmak üzere üç basamaktan oluşmaktadır (Liao ve Lee 2010).

2.4. GBS Analizi

Dizileme ya da sekanslama nükleik asitlerin polimerlerinde (DNA ya da RNA), nükleotidlerin diziliminin belirlenmesidir. Böylece DNA dizi analizi ile bir DNA molekülündeki nükleotidlerin kesin dizilimi belirlenebilmektedir (Kumar ve ark. 2012).

Yeni nesil DNA dizileme teknolojileri bitki genomlarının DNA dizilerini belirlenmesinde, bitkilerde ifade olan genlerin belirlenmesinde ve genotipleme çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Elshire ve ark. 2011, Rowe ve ark. 2011).

Tüm sekanslama metodlarında, kalıp DNA'nın hazırlanması, sekanslama ve görüntüleme, son olarak veri analizi olmak üzere üç basamak uygulanmaktadır; ancak spesifik protokolleri farklılaştırmaktadır. Yeni nesil DNA teknolojilerinden "Roche GS FLX" ve "ABI SOLID" cihazları "pyrosequencing" yeni nesil DNA dizileme teknolojisini kullanırken; "Illumina Genome Analyzer" cihazı ise "Solexa" nükleotid dizileme teknolojisini kullanmaktadır. Bu cihazlar, DNA dizisini okuma uzunluğu, ürettiği veri büyüklüğü (milyar baz çifti), çalışma süresi ve maliyet olarak farklılıklar göstermektedir (Metzker 2010). Yeni nesil DNA dizileme teknolojileri ile tek bir PZR reaksiyonu ile yüz milyarlarca bazın aynı anda dizilenmesi ve görüntülenmesi bir kaç gün içerisinde yapılabilmektedir (Deschamps ve Campbell 2010). Ayrıca oldukça büyük miktardaki sekanslama oldukça düşük maliyette yapılabilmektedir. Bir diğer avantaj ise; aylarca sürebilecek olan bir dizi analizi nin birkaç gün içerisinde yapılabilmesidir.

Yeni nesil DNA teknolojileri kullanılarak bitkilerde yapılan genotipleme çalışmalarında RAD (restriction site associated DNA) sekanslama (Rowe ve ark. 2011), GBS (Elshire ve ark. 2011) ve SBG (sequence based genotyping) (Truong ve ark. 2012) olmak üzere üç farklı yöntem ön plana çıkmaktadır.

GBS yöntemi yeni nesil DNA dizileme protokollerinin çeşitli bitki ve popülasyonlarda SNP keşfi ve genotiplemesini amaçlayan en son uygulamasıdır (Spindel ve ark. 2013). Bitkilerde yapılan moleküler ıslah çalışmalarında seleksiyon uygulamaları genellikle referans örnekler kullanılarak keşfedilen moleküler işaretleyiciler ile yapılmaktaydı. Ancak; yeni nesil DNA dizileme metodları ile DNA sekanslama teknolojilerindeki hızlı gelişmeler, büyük ve farklı popülasyonlarda, doğrudan ve ekonomik olarak SNP moleküler işaretleyicilerin keşfine olanak sağlamaktadır. GBS analizi kolay ve düşük maliyetli olup; eş zamanlı moleküler keşfi yapması; on binlerce moleküler işaretleyicileri ile tür ve popülasyonların araştırılmasını sağladığı için araştırmacılara büyük kolaylıklar sağlamaktadır (Kumar ve ark. 2012). GBS yöntemi bitki ıslahında ilişkilendirme haritalamalarının, genetik ve fiziksel haritaların oluşturulmasında, QTL haritalama ve genetik çeşitlilik çalışmalarında yoğun olarak kullanılmaktadır (Chung ve ark. 2017). Elshire, ve ark. (2011) tarafından geliştirilen GBS yöntemi ile her bir birey için milyonlarca kısa okuma dizileri oluşturulmakta ve eş zamanlı olarak SNP

genotipleme yapılabilmektedir (Chen ve ark. 2014). Bitkilerde bağlantı haritası oluşturmak için uygulanan GBS yöntemi; haritalama popülasyonunun oluşturulması, NGS dizileme kullanılarak yüksek çözünürlükte sekanslanma yapılması, SNP'lerin belirlenmesi ve genotiplenmesi ve genetik bağlantı haritasının oluşturulması basamaklarından oluşmaktadır (Deschamps ve ark. 2012).

Kısaca, GBS yönteminde bitki DNA'sı üzerinde çalışılan bitkinin genom büyüklüğüne uygun bir restriksiyon enzimi (*EcoRI*, *PstI*, *ApeKI*) ile kesilmektedir. Daha sonra bitki genomunda restriksiyon enzimlerinin kesim bölgesine bitişik DNA dizileri yeni nesil DNA teknolojileri kullanılarak belirlenmektedir. Belirlenen DNA dizilerindeki SNP moleküler işaretleyicileri bir bilgisayar programı yardımı ile tespit edilmektedir (Elshire ve ark. 2011). Bu yöntemle belirlenen SNP moleküler işaretleyiciler genetik haritalama çalışmalarında kullanılmaktadır.

GBS metodunun gerçekleştirildiği sistemlerden biri olan Illumina HiSeq 2000-2500 (Illumina, San Diego, CA) sisteminde, öncelikle tüm örnekleri içeren belirli sayıda DNA havuzu oluşturulur. Analiz bu havuz içerisindeki DNA parçalarının barkodlarına göre ayrı ayrı okunmasına dayanır. GBS metodunda kullanılan enzimler metilasyon duyarlı enzimlerdir. Böylece metillenmiş yüksek tekrarlı genomik bölgelerdeki sekans yoğunluğunu azaltırken düşük tekrarlı gen bölgelerindeki sekans yoğunluğunu yüksek tutabilmektedir (Gore ve ark. 2009). Bugüne kadar yapılan çalışmalarda en yaygın kullanılan restriksiyon enzimi *ApeKI* enzimidir. *ApeKI* metilasyon duyarlı bir enzimdir (Elshire ve ark. 2011). DNA'nın kesilmesinde kullanılan enzimler moleküler işaretleyicisi sayısını ve gerekli sekans miktarını etkilemektedir. Genomu daha sık aralıklarla kesen bir enzim daha fazla sayıda DNA parçasının oluşmasına ve moleküler işaretleyici sayısının artmasına neden olur (Kumar ve ark. 2012). GBS platformu tarafından üretilen DNA parçalarının analiz edilebilmesi için TASSEL (Bradburry ve ark. 2007) ve Stacks (Catchen ve ark. 2013) gibi paket bilgisayar programları kullanılmaktadır.

Havucun 9 kromozomlu diploid genoma sahip oluşu ($2n=2x=18$), 473 mega baz çiftinden oluşması ve tüm genomunun yayınlanmış olması (Iorizzo ve ark. 2016) nedeniyle havuç bitkisi GBS analizi için uygun bir türdür.

2.5. Genetik Bağlantı Haritası Oluşturma Çalışmaları

Genetik haritalama, genlerin ve moleküler işaretleyicilerin kromozomlar üzerinde bulunduğu yerleri ve birbirlerine olan uzaklıkların tespit edilmesidir. Crossing-over olayından yararlanılarak, bağlı genlerin dizilişi ve aralarındaki uzaklıkların bulunması sonucu genetik bağlantı haritaları oluşturulmaktadır. Bir kromozom üzerinde bulunan genler birbirlerine ne kadar yakın ise aralarında crossing-over olma olasılığı o kadar azalmaktadır. İki gen arasındaki mesafe arttıkça iki gen arasında crossing-over olma olasılığı da artmaktadır. Genetik haritalamada popülasyonunun seçimi, kullanılan moleküler işaretleyicinin çalışma sistemine bağlıdır. En fazla genetik bilgi tamamen sınıflandırılmış F2 popülasyonu ve eş baskın moleküler işaretleyiciler kullanılarak elde edilir (Semagn ve ark. 2006).

Aynı kromozom üzerinde bulunan genlerin oluşturduğu gruba ise bağlantı grubu (linkage group) denilmektedir. Genetik bağlantıların oluşturulmasında ideal olan bir türün haploid kromozom sayısı kadar bağlantı grubu oluşturulmasıdır (Özşensoy ve Kurar 2013). Harita birimi olarak Morgan (M) kullanılmaktadır. Fiziksel olarak 1 cM yaklaşık 1 milyon baz çiftine karşılık gelmektedir (Liu 1998).

Günümüzde genetik haritalama çalışmalarında, genetik analizler sonucunda elde edilen veriler arasındaki genetik bağlantıları tespit etmek amacıyla JoinMap (Van Ooijen ve Voorrips 2001); Linkage1 (Suiter ve ark. 1983), GMENDEL (Echt ve ark. 1992), MAPMAKER (Lander ve ark. 1987) gibi farklı bilgisayar programları kullanılmaktadır.

Bitkilerde genetik haritalama çalışmalarında farklı moleküler işaretleyiciler kullanılabilir. RFLP, SSR (simple sequence repeats; basit dizi tekrarları), EST (Expressed Sequence Tags), CAPS, RAPD, AFLP, ISSR (Inter Simple Sequence Repeats; basit tekrarlı diziler arası polimorfizm), DarT (Diversity Arrays Technology) ve SNP moleküler işaretleyicilerinin biri veya birkaçı birlikte kullanılarak genetik haritalar oluşturulabilmektedir (Semagn ve ark. 2006).

Bitki ıslahında genetik haritalar QTL'lerin saptanması, haritaya dayalı klonlama ve gen haritalanması amacıyla kullanılmaktadırlar. SNP moleküler işaretleyiciler DNA

üzerinde en fazla bulunan mutasyonlardır (Ward ve ark. 2013). Bu nedenle SNP moleküler işaretleyicileri kullanılarak oluşturulan genetik haritalar diğer moleküler işaretleyiciler kullanılarak oluşturulan haritalara göre daha yüksek çözünürlükte olmaktadır (Kumar ve ark. 2012).

Bitkilerde SNP moleküler işaretleyicilere dayalı genetik haritaların oluşturulması için, öncelikle bir veya birkaç özellik bakımından birbirinden farklı iki ebeveyn seçilmektedir. İkinci olarak; yeni nesil DNA dizileme platformları kullanılarak nükleotid dizileri belirlenmektedir. Üçüncü aşama ise SNP moleküler işaretleyicilerinin belirlenmesidir. Daha sonra uygun bilgisayar programı kullanılarak genetik bağlantı haritası oluşturulmaktadır (Deschams ve ark. 2012).

Son yıllarda erkek kısırlık özelliği ile ilişkili genlerinin haritalanması üzerine farklı bitki türlerini kapsayan çalışmalar bulunmaktadır. Özellikle, büyük oranda hibrit tohum kullanılarak üretimi yapılan soğanda (Gökçe ve ark. 2002, Bang ve ark. 2011), ayçiçeğinde (Yue ve ark. 2010) ve sorgumda (Jordan ve ark. 2010) *Rf* genlerinin genetik haritası moleküler işaretleyiciler kullanılarak çıkartılmıştır.

Hücre çekirdeğinde yer alan ve sitoplazmik genetik erkek kısırlığı kontrol eden *Rf* genleri, genetik haritalamaya dayalı gen klonlama yöntemi kullanılarak petunya (Bentolila ve ark. 2002), turp (Koizuka ve ark. 2003, Brown et al. 2003), çeltik (Kazama ve Toriyama 2003, Komori ve ark. 2004, Akagi ve ark. 2004), ve şeker pancarı (Hagihara ve ark. 2005), sorgum (Jordan ve ark. 2010); mısır (Yongming ve ark. 2016) gibi birçok bitki türünde klonlanmıştır. Bu çalışmalar, *Rf* genlerinin PPR (pentatricopeptide repeat protein) proteinlerini kodladığını ortaya çıkarmıştır (Geddy ve Brown 2007).

Havuçta farklı moleküler işaretleyiciler kullanılarak genetik haritalama çalışmaları yapılmıştır. Karoten birikimine neden olan *Y2* lokusunun haritalanmasında (Bradeen ve ark. 1997), karoten ve likopen içeriğini etkileyen QTL lokuslarının haritalanmasında (Santos ve Simon, 2002; Just ve ark. 2007, 2009); karoten birikimine neden olan *Y2*, kökte şeker birikimine neden olan *Rs1* ve kökte sarı/mor renk pigmentasyonunun oluşumunu etkileyen *PI* lokuslarının haritalanmasında (Vivek ve Simon 1999); sarı yaprak lokusunun haritalanmasında (Nothnagel ve Straka 2003); kompakt yaprak

lokusunun haritalanmasında (Nothnagel ve ark 2005); kök uru nematoduna dayanıklılık lokusunun haritalanmasında (Boiteux ve ark. 2000) kullanılmıştır.

Havuçta Schulz ve ark. (1994) izoenzim, RFLP ve RAPD; Westphal ve Wricke (1997) RFLP, RAPD, AFLP, SSR moleküler işaretleyicileri kullanarak; Vivek ve Simon (1999); AFLP moleküler işaretleyicileri ile Santos ve Simon (2004); AFLP, RFLP, izoenzim RAPD, CAPS ve SCAR moleküler işaretleyicileri kullanarak çeşitli genetik haritalar oluşturmuşlardır. SNP moleküler işaretleyicisi kullanılarak yapılan genetik haritalama çalışmasında Yıldız (2009) 8 adet SNP moleküler işaretleyicisi keşfetmişlerdir. Cavagnaro ve ark. (2014); mor havuçta kök ve yapraklarda antosiyanin birikimine neden olan *FLS*, *F3H*, *PSY2* genleri ile ilişkili QTL lokuslarının haritalanmasında SNP moleküler işaretleyicileri tespit etmişlerdir. Bu çalışmanın sonuçları, bu genlerin havucun 3. kromozomda bulunduğunu ortaya koyan SSR moleküler işaretleyicileri kullanılarak yapılan çalışmaları (Cavagnaro ve ark. 2011, Yıldız 2013) doğrulamıştır.

GBS genetik haritalama çalışmalarında başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. GBS temelli genetik haritalar daha kolay, hızlı ve etkili bir şekilde üretilebilmesi ve genomun bölgelerinin tanımlayabilmesi açısından faydalı olmaktadır (He ve ark. 2014). Ellison ve ark. (2017) ilk GBS temelli genetik haritayı yapmışlardır. F4 bitkilerinden oluşan bir popülasyonda karoten birikimine neden olan *Y2* lokusunun ve QTL lokuslarının haritalanmasında SNP ve CASP moleküler işaretleyicilerini kullanarak 761,9 cM uzunluğunda genetik bağlantı haritası oluşturmuşlardır ve 569 adet SNP moleküler işaretleyicisi tespit etmişlerdir. Sarcan (2018) yüksek lisans tez çalışmasında, havuçta 94 adet F2 bitkisinden elde ettiği veriler ile 1 464 adet SNP moleküler işaretleyicisi tespit etmiş ve 13 bağlantı grubu oluşturmuştur.

Alessandro ve ark. (2013), havuçta soğuklama ihtiyacının erkek kısırlık özelliği ile ilişkisinin belirlenmesi ile ilgili olarak yaptıkları bir çalışmada; SSR, RAPD, AFLP ve SCAR moleküler işaretleyicileri kullanarak genetik haritalama yapmışlardır. Bunun sonucunda, dokuz adet bağlantı grubu oluşmuş ve 669 cM uzunluğunda genetik harita oluşturmuşlardır. Buna göre; 355 adet moleküler işaretleyici tespit etmişlerdir. *Rf1*

geninin 9. bağlantı grubunda; *Vrn1* geninin ise havucun 2. Bağlantı grubunda yer aldığını tespit etmişlerdir.

2.6. Eş Zamanlı PZR

Eş Zamanlı PZR, nükleik asit çoğalmasıyla eş zamanlı olarak artış gösteren floresan sinyalin ölçülmesiyle kısa sürede kantitatif sonuç veren bir PZR yöntemidir (Klein 2002). Eş zamanlı PZR, konvansiyonel PZR ile kıyaslandığında oldukça hızlı ve daha güvenilir bir tanı yöntemidir. Eş zamanlı PZR'ı konvansiyonel PZR'dan ayıran temel özellik, termal döngü cihazı ile birleştirilmiş bir optik okuma sisteminin olmasıdır. Eş zamanlı PZR ile analizden sonraki elektroforez ve görüntüleme işlemlerine ihtiyaç duyulmamakta ve jel elektroforez aşamasındaki olası bulaşma riski ve pipetleme hataları da ortadan kalkmaktadır. Aynı cihaz içerisinde hem çoğaltma işlemi, hem de çoğaltılan ürünlerin saptama işlemi yapılabilmektedir. Konvansiyonel PZR'ın sonuçlanması yaklaşık 4,5-5 saat gibi bir süre alırken, eş zamanlı PZR yöntemiyle 1,5-2 saat kadar bir sürede sonuçlar elde edilebilmektedir (Önder ve ark. 2016).

Eş zamanlı PZR sonuçlarının yorumlanmasında, floresan boyaların kullanıldığı analizlerde erime eğrisi analizleri (melting curve) kullanılmaktadır. Eş zamanlı PZR ile ürünleri agaroz jelde görüntülemeyen, erime sıcaklığı grafiklerinden faydalanarak spesifik olmayan bağlanmaları saptamak mümkündür. Erime eğrisi analizleri, çoğaltılan DNA'nın hedef bölge olduğunu kesinleştirmek amacıyla kullanılır. Gerçekleştirilen erime eğrisi analizi ile çoğaltılan DNA örneğinin sıcaklığını yavaş yavaş artırılırken floresan sinyalin sıcaklığa bağlı değişimini gösteren bir grafik elde edilmiş ve floresan sinyalin ani düşüşünden kaynaklanan pikler aracılığıyla, DNA iplikçiklerinin birbirlerinden ayrıldıkları sıcaklık değerleri tespit edilmektedir. Analiz sonucunda eş zamanlı PZR işlemi sonucunda çoğaltılan DNA'nın hedef bölge olup olmadığı belirlenmektedir (Akey ve ark. 2002, Zipper ve ark. 2004).

Günümüzde, eş zamanlı PZR çoğaltımı sonrasında elde edilen ürün varlığının saptanmasında temel olarak iki sistem bulunmaktadır. Birincisi özgül olmayan yöntem olan çift zincirli DNA boyalarının kullanılmasıdır. Buradaki boyalar prob görevi görürler. En çok kullanılan yöntem SYBR Green I'dir. Bu yöntemde, primerlerin bağlanması ile birlikte DNA çift sarmal haline gelir ve DNA'ya bağlanan boya miktarı

artar. Buna bağlı olarak floresan miktarı da artış gösterir. Özgöl belirleme sistemleri ise FRET (fluorescens resonance energy transfer) , Taqman (Thermo Fisher Scientific), KASP (Kompetitive Allele Specific PCR) (LGC Genomics, Hoddesdon, UK) ve Simple Probe (Hybprobe) (Roche) sistemleridir.

Eş zamanlı PZR kapsamında özgöl belirleme sistemlerinden biri olan hibridizasyon prob yöntemleri ile DNA parçasının çoğaltılmak istenilen özel bir bölgesinin saptanmasında floresan işaretli proplar kullanılır. Bu sistemde, çoğaltımı bilgisayara yansıtacak prob veya propların bulunması gerekmektedir. Böylece, proplarla testin özgüllüğü arttırılmaktadır. Proplar, çoğaltımın bilgisayar ekranında görünmesini sağlayan, belli dalga boyundaki floresan ışığı yayma kapasitesine sahip oligonükleotidlerdir (Schaad ve Frederick 2002). Hibridizasyon Prob Yöntemi Roche tarafından “LightCycler®” PZR cihazında kullanılmak üzere geliştirilmiştir. Hibridizasyon Prob yöntemlerinden biri olan Simple Probe Yöntemi ile bugüne kadar moleküler biyolojinin farklı alanlarında SNP moleküler işaretleyicilerin doğruluk tespitleri yapılabilmektedir (Günel 2007, Nie ve ark. 2011, Liu ve ark. 2016).

Günümüzde eş zamanlı PZR ile soya fasulyesinde (Ha ve Boerma 2008), buğdayda (Matsuda ve ark. 2012), yoncada (Han ve ark. 2011) ve şekerpancarı (Broccanello ve ark. 2018) gibi farklı bitki türlerinde SNP analizleri gerçekleştirilmiştir. Wang ve ark. (2016) havuçta kök ve yapraklarda vegetatif gelişmenin farklı safhalarında ifade olan genlerin belirlenmesinde eş zamanlı PZR yöntemini kullanmışlardır.

Havuçta SNP moleküler işaretleyiciler kullanılarak yapılan genetik çeşitlilik çalışmasında, Rong ve ark (2014), eş zamanlı PZR KASP yöntemi kullanarak, tespit ettikleri SNP moleküler işaretleyicilerin doğrulamasını yapmışlardır ve genetik çeşitlilikte kullanılabilir genlerin ifadelenmesine bakmışlardır. Çalışmanın sonucunda; 11 369 adet SNP moleküler işaretleyicisi tespit edilmiş ve bu SNP moleküler işaretleyicilerin arasından 622 adetinin doğrulanması ile birlikte, Avrupa kökenli havuçların genetik çeşitlilik çalışmalarında kullanılabileceğini belirlemişlerdir.

Villano ve ark. (2018) soğanda 73 adet farklı genotipin genetik çeşitliliklerinin SNP moleküler işaretleyiciler ile belirlenmesini sağlamışlardır ve eş zamanlı PZR KASP yöntemi ile SNP moleküler işaretleyicilerin doğrulamasını yapmışlardır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu araştırma 2016-2019 yılları arasında Bursa Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Laboratuvarları'nda yürütülmüştür. GBS analizi için Wisconsin Üniversitesi Biyoteknoloji Merkezi Laboratuvarları'ndan hizmet alımı yapılmıştır.

3.1. Materyal

Bu çalışmada, bitkisel materyal olarak erkek kısırılık yönünden açılım gösteren F2 havuç popülasyonu kullanılmıştır. Bu popülasyonun elde edilmesi için, erkek kısır olan bir bitki, normal çiçeklere sahip başka bir fertil bitki ile melezlenmiş ve hepsi normal çiçeklere sahip F1 popülasyonu oluşturulmuştur. Daha sonra F1 bitkiler içerisinde seçilen fertil bir bitkinin kendilenmesiyle F2 haritalama popülasyonu oluşturulmuştur. Bu çalışmada kullanılan F2 haritalama popülasyonu 918 olarak kodlanmış ve bu popülasyona ait bitkilerin, hücre çekirdeğinde bulunan havuçta sitoplazmik genetik erkek kısırılığı kontrol eden *Rf* genleri bakımından 3 fertil:1 kısır olarak açılım gösterdiği tespit edilmiştir.

3.2. Yöntem

3.2.1. Yaprak örneklerinin alınması

F2 popülasyonu içerisinde seçilen 96 adet bitkiden DNA izolasyonunda kullanılmak üzere yaprak örnekleri alınmıştır. DNA izolasyonunda kullanılacak yaprak örneği olarak bitkinin en genç yaprakları tercih edilmiştir. Sabahın erken saatlerinde alınan yaprak örnekleri laboratuvara getirilene kadar buz içerisinde saklanmıştır. Laboratuvara ulaştırılan örnekler liyofilizatörde (Christ Alpha 1-4 LD plus markalı) 3 gün süre ile kurutulmuştur. Kurutulan yaprak örnekleri analizlerde kullanılmaya kadar plastik poşetler içerisinde -80°C sıcaklıkta saklanmıştır.

3.2.2. DNA örneklerinin elde edilmesi

DNA örneklerinin elde edilmesinde Futterer ve ark. (1995)'nin belirlediği yöntem kullanılmıştır:

1. Liyofilizatörde kurutulup -80°C 'ye kaldırılan örnekler oda sıcaklığına getirildikten sonra 25 mg olarak tartılıp ardından 2 mL'lik steril mikrosantrifüj tüplerine aktarılmıştır.
2. Yaprak örneklerinin öğütülürken parçalanabilmesi amacıyla mikrosantrifüj tüplerinin içerisine 3'er adet 6 mm çapındaki ve 5'er adet 3 mm çapındaki cam boncuklardan konulmuştur. Mikrosantrifüj tüplerinin kapakları sıkıca kapatıldıktan sonra, öğütücü yardımıyla örnekler yaklaşık 10 dk süre ile öğütülmüştür.
3. Öğütülen örneklerin üzerine 1 mL ekstraksiyon tamponu [50 mM Tris-HCl pH 8.0, %1 (w/v) CTAB, 50 mM Na_2EDTA , 0.7 M NaCl] eklenerek vorteksle karıştırılmıştır.
4. Örnekler 65°C 'deki su banyosunda 30 dk boyunca inkübe edilmiştir ve inkübasyon esnasında örnekler 10 dk aralıklar ile elle karıştırılmıştır.
5. Su banyosundan çıkarılan örnekler oda sıcaklığına geldikten sonra üzerine 800 μL kloroform:izoamil alkol (24:1) eklenmiş ve örnekler el ile karıştırılmıştır. Daha sonra 16 000 g hızda 5 dk santrifüj edilmiştir. Tüplerde meydana gelen dört fazdan en üstteki sulu faz yeni hazırlanan 2 mL hacimli mikrosantrifüj tüplerine aktarılmıştır.
6. Yeni tüplerdeki fazın üzerine 100 μL %10'luk CTAB tamponu ve 800 μL kloroform:izoamil alkol (24:1) eklenip karıştırıldıktan sonra, 16 000 g hızda 5 dk santrifüj edilmiştir. Tüplerde oluşan üç fazdan en üstteki sulu faz alınarak yeni hazırlanan 2 ml hacimli mikrosantrifüj tüplerine aktarılmıştır.
7. Tüplere aktarılan fazın üzerine, DNA'nın çökmesi için -20°C 'de soğutulmuş 800 μL izopropanol eklenmiştir ve elle hafifçe çalkalandıktan sonra -80°C 'de 30 dk süre ile bekletilmiştir.
8. -80°C 'den çıkarılan örnekler 16 000 g hızda 10 dk santrifüj edilerek DNA'nın çökeltmesi sağlanmıştır.
9. Tüplerdeki sıvı döküldükten sonra çökelmiş DNA'ların üzerine 400 μL 1 M'luk NaCl çözeltisi eklenmiştir.

10. DNA'ların NaCl çözeltisi içerisinde çözündürülmesi için örnekler 65°C sıcaklığındaki su banyosunda 15 dk süre ile inkübe edilmiştir. Daha sonra 16 000 g hızda 5 dk santrifüj edilmiştir.

11. Çözünmüş DNA örneklerinin üzerine 1 mL %96'lık etanol eklenmiştir ve örnekler -20°C'de bir gece bekletilmiştir.

12. Ertesi gün DNA örnekleri 16 000 g hızda 10 dk santrifüj edilerek DNA'ların tekrar çökmesi sağlanmıştır.

13. Tüplerdeki NaCl ve etanol karışımı dökülüp, çökeltiye tekrar 500 µL %70'lik etanol eklenmiş ve 16 000 g hızda 5 dakika santrifüj edilerek DNA'ların temizlenmesi sağlanmıştır. Tüplerin içerisindeki etanol dökülmüştür.

14. Tüpler kağıt havlular üzerine ters çevrilip konularak tüplerde kalan etanol uzaklaştırılmıştır.

15. Tüpler kurduktan sonra DNA'lar 100 µL ultra saf su içerisinde tekrar çözülmüştür.

16. Hazırlanan DNA örnekleri analizlerde kullanılmaya kadar -80°C'de saklanmıştır.

3.2.3. DNA örneklerinin kalitesinin ve konsantrasyonunun belirlenmesi

DNA örneklerinin konsantrasyonu Qubit flourometre (Invitrogen) cihazı ile belirlendikten sonra, DNA konsantrasyonları 20-50 ng/µl olacak şekilde ultra saf su ile sulandırılmıştır.

DNA'ların kalitesini ve bütünlüğünü tespit edebilmek amacıyla, rastgele seçilen 10 adet DNA örneği etidium bromit ile boyandıktan sonra %1.0'lık agaroz jelde görüntülenmiştir.

3.2.4 DNA örneklerinin DNA restriksiyon enzimi (*EcoRI*) ile kesilmesi

DNA örneklerinin restriksiyon enzimleri ile kesilip kesilmediğinin belirlenmesi amacıyla, rastgele seçilmiş 10 adet DNA örneği *EcoRI* (Thermo Fisher Scientific) enzimi ile üretici firmanın önerdiği aşağıdaki yönteme göre kesilmiştir:

Çizelge 3.1. *EcoRI* enzimi ile kesim reaksiyonunun bileşenleri

Reaksiyon Bileşenleri	Miktar (µL)
DNA (20-40 ng/µL)	5
H ₂ O	12
10X Tampon çözeltisi	2
Restriksiyon enzimi (10 U/ µL)	1
TOPLAM	20

Reaksiyonun çalışması için örnekler PZR cihazı (Applied Biosystems Veriti markalı) içerisinde 37°C sıcaklıkta 3 saat süre ile bekletilmiştir. Bu süre sonunda örnekler *EcoRI* enziminin inaktif hale gelmesi için cihaz içerisinde 65°C sıcaklıkta 20 dk daha bekletilmiştir. Kesilen DNA örnekleri %1.5'luk agaroz jelde yürütülmüş ve fotoğrafı çekilmiştir. *EcoRI* enzimi ile kesilebildiği tespit edilen DNA örnekleri DNA dizileme analizinde kullanılabilecek kadar -80°C'de saklanmıştır.

3.2.5 GBS analizi

GBS analizi, Elshire ve ark. (2011)'nin geliştirdiği yönteme göre Illumina firmasının HiSeq2500 (Illumina, San Diego, CA) cihazı kullanılarak yapılmıştır. Bu cihaz üniversitemizde bulunmadığı için DNA dizileme analizleri Amerika Birleşik Devletleri'ndeki Wisconsin Üniversitesi'nin Biyoteknoloji Merkezi Laboratuvarları'ndan hizmet alımı şeklinde yaptırılmıştır.

GBS analizi kapsamında F2 popülasyonundaki 96 adet bitkiye ait DNA örneği *ApeKI* enzimi ile kesilmiştir. Her DNA örneğinin kesim yerine uygun ve her bitki örneğine özgü barkodları içeren Illumina nükleotid dizileme adaptörleri eklenmiştir. Adaptör eklenen DNA parçaları PZR ile çoğaltıldıktan sonra 96 bitkinin DNA örneği birleştirilerek bir DNA havuzu oluşturulmuştur. Havuzda yer alan DNA'lar, adaptör dizilerinde yer alan primerler ve Illumina firmasının HiSeq2500 cihazı kullanılarak DNA örneklerinin nükleotid dizileri belirlenmiştir. Her bir bitkiden en az 500 000 DNA parçasının nükleotid bilgisinin belirlenmiş olmasına dikkat edilmiştir.

3.2.6 Veri analizi

SNP moleküler işaretleyicilerinin belirlenmesi

GBS analizinden elde edilen verilerin analizi ile SNP moleküler işaretleyicilerin belirlenmesi TASSEL 5.0 paket programı (Bradbury ve ark. 2007) kullanılarak yapılmıştır. Kısaca, GBS yönteminde havuç genomunda hangi DNA parçalarının nükleotid dizilerinin belirlendiği TASSEL paket programı içinde yer alan “GBSSeqToTagDBPlugin” alt programı kullanılarak tespit edilmiştir. Bu DNA parçalarının havucun hangi kromozomlarında yer aldığı “Bowtie2” programı kullanılarak belirlenmiştir. Nükleotid dizileri belirlenen DNA parçalarında SNP bulunup bulunmadığı TASSEL programı içindeki “DiscoverySNPCallerPluginV2” alt programı kullanılarak tespit edilmiştir. GBS analizinde kullanılan bitki örneklerinin SNP genotipleme TASSEL programında yer alan “ProductionSNPCallerPluginV2” alt programı kullanılarak yapılmıştır.

İlişkilendirme haritalaması (association mapping)

İlişkilendirme haritalaması (association mapping) erkek kısıklık geni ile ilişkili SNP moleküler işaretleyicilerin belirlenmesi için Tassel 5.0 programı kullanılarak yapılmıştır. İlişkilendirme haritalaması oluşturulurken GLM (Genel Linear model) yöntemi kullanılmıştır.

Genetik bağlantı haritasının oluşturulması

Genetik bağlantı haritası Joinmap 4.0 (Van Ooijen 2006) bilgisayar programına kullanılarak oluşturulmuştur. SNP verileri Joinmap 4.0 programının eş baskın moleküler işaretleyiciler için kullandığı “a, b, h” şeklinde kodlanmıştır. Harita oluştururken, LOD değeri 7 alınarak gruplar belirlenmiştir. Maksimum rekombinasyon sıklığı ise 0,30 olarak kabul edilmiştir. Eksik veri oranı %10 olacak şekilde analizler gerçekleştirilmiştir. Harita oluştururken, skoru olarak belirlenmiştir. Analiz sonucunda bağlantı grupları ile bu gruplar üzerindeki SNP moleküler işaretleyicilerinin birbirlerine olan uzaklıkları Kosambi Haritalama Fonksiyonu (Kosambi 1944) kullanılarak tespit edilmiştir. Bu uzaklıklar centiMorgan (cM) olarak belirlenmiştir.

3.2.7. Simple probe yöntemi kullanarak eş zamanlı PZR reaksiyonun yapılması

F2 popülasyonu içinden seçilen 96 adet DNA örneğinden tespit edilen ve genotiplemesi yapılan SNP moleküler işaretleyicilerin doğrulanması için eş zamanlı PZR yönteminin özgül belirleme sistemlerinden biri olan hibridizasyon temelli Simple Probe yöntemi kullanılmıştır. Reaksiyon öncesinde, SNP moleküler işaretleyicilere uygun olan prob ve primerlerin tasarlanması, Roche LightCycler Probe Design 2.0 (Roche Applied Science, Indianapolis, ABD 2004) programı kullanılarak hizmet alımı şeklinde Roche firmasına yaptırılmıştır.

Eş zamanlı PZR, Roche LightCycler 480 Real Time PZR cihazı ve Roche LightCycler FastStart DNA Master HybProbe karışımı kullanılarak yapılmıştır. Eş zamanlı PZR reaksiyonunun bileşenleri aşağıdaki gibidir:

Çizelge 3.2. Eş zamanlı PZR reaksiyonunun bileşenleri PZR reaksiyonu bileşenleri

PZR Bileşenleri	Miktar (µL)
DNA örneği (20-40 ng/µL)	5.0
İleri primeri (F) (5nmol/µL)	0.5
Geri primeri (R) (5nmol/µL)	0.1
Simple Prob (1nmol/ µL)	0.2
MgCl ₂ (25 mM)	1.6
H ₂ O	10.6
Enzim	2.0
TOPLAM	15.0

Roche (Applied Science, Indianapolis, IN, ABD) firması tarafından belirlenen eş zamanlı PZR Simple Probe yöntemi reaksiyonunun sıcaklık döngüsü aşağıdaki gibidir:

Cizelge 3.3. Eş zamanlı PZR sıcaklık döngüsü

Basamak No.	Sıcaklık (°C)	Süre (dk)
1	95	5:00
2	95	0:10
3	55	0:15
4	72	0:20
5	95	2:00
6	40	2:00

2 ile 4 arasındaki basamaklar 45 döngü olarak gerçekleştirilmiştir. 6. basamaktan sonra floresan boyalarının çalışması için sıcaklık 85°C 'ye yükseltilmiş ve daha sonra tekrar 40°C'ye düşürülerek reaksiyon sonlandırılmıştır.

3.2.8. Erkek kısılık geni ilişkili SNP moleküler işaretleyicilerin eş zamanlı PZR simple probe yöntemi ile doğrulanması

Eş zamanlı PZR reaksiyonu sonucunda LightCycler Data Analysis (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, ABD) programı ile 96 adet genotipe ait DNA'ların erime noktaları (T_m) tespit edilerek, erime eğrisi analizleri çıkarılmıştır. Eş zamanlı PZR sonuçlarının yorumlanması erime eğrisi analizlerine göre yapılmıştır. Sitoplazmik genetik erkek kısırlığı kontrol eden *Rf* genleri ile bağlantılı olup olmadığı doğrulanmıştır. Buna göre, tespit edilen SNP moleküler işaretleyicilerin genotiplemesi yapılarak, bireylerin homozigot fertil (*Rf1Rf1*), heterozigot fertil (*Rf1rf1*) ve erkek kısır (*rf1rf1*) olma durumları incelenmiştir.

3.2.9. Genetik bağlantı haritasının oluşturulması

Erime eğrisi analizleri sonucunda erkek kısılık geni ile ilişkili olduğu doğrulanan SNP moleküler işaretleyicilere ait genotipik verilerin JoinMap 4.0 (Van Ooijen 2006) bilgisayar programına aktarılmasıyla genetik bağlantı haritası oluşturulmuştur. Harita oluştururken, LOD değeri 7 alınarak gruplar belirlenmiştir. Maksimum rekombinasyon sıklığı ise 0.30 olarak kabul edilmiştir. Eksik veri oranı %10 olacak şekilde analizler

gerçekleştirilmiştir. Analiz sonucunda bağlantı grupları ile bu gruplar üzerindeki SNP moleküler işaretleyicilerinin birbirlerine olan uzaklıkları Kosambi Haritalama Fonksiyonu (Kosambi 1944) kullanılarak tespit edilmiştir. Bu uzaklıklar centiMorgan (cM) olarak belirlenmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Çiçeklerin Erkek Kısır Olup Olmadığının Belirlenmesi

918 no'lu F2 haritalama popülasyonuna ait 96 adet bitkinin çiçek yapıları incelenmiş ve sonuçlar Çizelge 4.1'de verilmiştir. Buna göre; 77 adet bitkinin erkek fertil ve 19 adet bitkinin erkek kısır olduğu gözlenmiştir. Bu popülasyonda yapılan ki-kare testi sonuçlarına göre, hücre çekirdeğinde bulunan erkek kısırlık karakterinin açılım oranı 3:1 olarak tespit edilmiştir. Ki-kare testi p değeri 0.24 olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.1. F2 popülasyonuna ait 96 adet bitkinin çiçek yapılarının fenotipik gözlem sonuçları

Örnek Sıra No.	Bitki No.	Çiçek Durumu	Örnek Sıra No.	Bitki No	Çiçek Durumu
1	918-01	Fertil	16	918-16	Fertil
2	918-02	Fertil	17	918-17	Fertil
3	918-03	Fertil	18	918-18	Kısır
4	918-04	Kısır	19	918-19	Fertil
5	918-05	Fertil	20	918-20	Fertil
6	918-06	Kısır	21	918-21	Fertil
7	918-07	Fertil	22	918-22	Kısır
8	918-08	Fertil	23	918-23	Kısır
9	918-09	Fertil	24	918-24	Fertil
10	918-10	Fertil	25	918-25	Fertil
11	918-11	Kısır	26	918-26	Kısır
12	918-12	Fertil	27	918-27	Fertil
13	918-13	Fertil	28	918-28	Kısır
14	918-14	Fertil	29	918-29	Fertil
15	918-15	Fertil	30	918-30	Fertil

Çizelge 4.1. F2 popülasyonuna ait 96 adet bitkinin çiçek yapılarının fenotipik gözlem sonuçları (devam)

Örnek Sıra No.	Bitki No.	Çiçek Durumu	Örnek Sıra No.	Bitki No	Çiçek Durumu
31	918-31	Fertil	55	918-55	Kısır
32	918-32	Fertil	56	918-56	Fertil
33	918-33	Fertil	57	918-57	Fertil
34	918-34	Fertil	58	918-59	Fertil
35	918-35	Fertil	59	918-60	Fertil
36	918-36	Kısır	60	918-61	Fertil
37	918-37	Fertil	61	918-62	Fertil
38	918-38	Fertil	62	918-63	Fertil
39	918-39	Fertil	63	918-64	Fertil
40	918-40	Fertil	64	918-65	Fertil
41	918-41	Fertil	65	918-66	Kısır
42	918-42	Fertil	66	918-67	Fertil
43	918-43	Fertil	67	918-68	Fertil
44	918-44	Fertil	68	918-69	Fertil
45	918-45	Kısır	69	918-71	Fertil
46	918-46	Kısır	70	918-72	Fertil
47	918-47	Fertil	71	918-73	Fertil
48	918-48	Kısır	72	918-74	Kısır
49	918-49	Fertil	73	918-75	Fertil
50	918-50	Kısır	74	918-76	Fertil
51	918-51	Fertil	75	918-77	Fertil
52	918-52	Kısır	76	918-78	Fertil
53	918-53	Fertil	77	918-79	Fertil
54	918-54	Fertil	78	918-80	Kısır

Çizelge 4.1. F2 popülasyonuna ait 96 adet bitkinin çiçek yapılarının fenotipik gözlem sonuçları (devam)

Örnek Sıra No.	Bitki No.	Çiçek Durumu	Örnek Sıra No.	Bitki No.	Çiçek Durumu
79	918-81	Fertil	88	918-90	Fertil
80	918-82	Fertil	89	918-91	Fertil
81	918-83	Fertil	90	918-92	Fertil
82	918-84	Fertil	91	918-93	Fertil
83	918-85	Fertil	92	918-94	Fertil
84	918-86	Fertil	93	918-95	Fertil
85	918-87	Fertil	94	918-96	Fertil
86	918-88	Fertil	95	918-97	Kısır
87	918-89	Fertil	96	918-98	Fertil

4.2. DNA İzolasyonu

F2 popülasyonuna ait 96 adet genotipin DNA konsantrasyonlarının 20,0 ng/ μ L ile 97,6 ng/ μ L arasında değiştiği tespit edilmiştir (Çizelge 4.2). DNA örneklerinin konsantrasyonu 20,0-50,0 ng/ μ L olacak şekilde ultra saf su ile sulandırılmıştır.

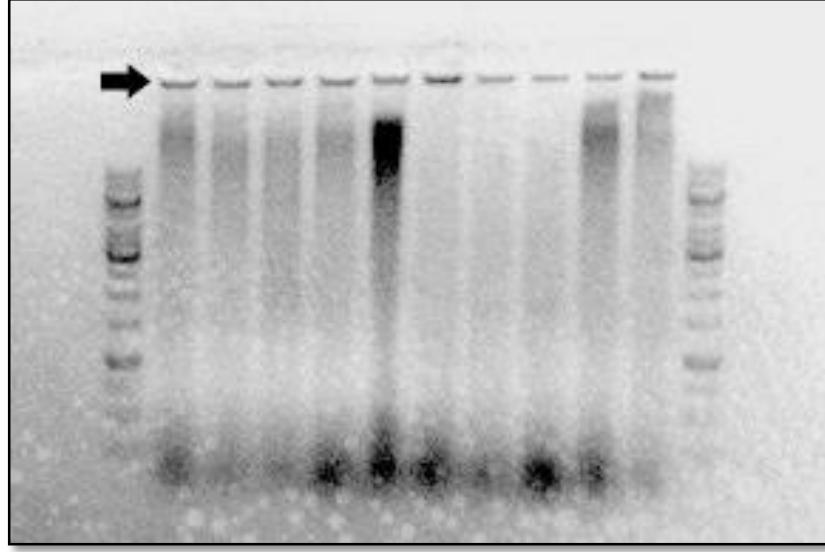
GBS analizlerinde kullanılacak DNA örneklerinin yüksek kalitede ve DNA'ların parçalanmamış olması çok önemlidir. Bu amaçla; konsantrasyonu belirlenen DNA örneklerinden rastgele seçilen 10 adet örneğin %1,0'luk agaroz jelde 2 saat 70 voltta koşulduktan sonra elde edilen görüntüsü Şekil 4.1'de verilmiştir. Şekilde ok ile işaret edilen kısım, parçalanmamış yapıdaki DNA örneklerinin agaroz jelde oluşturduğu bantı göstermektedir. Agaroz jelde bu bantın oluşması, DNA'ların parçalanmamış yapıda olduğunu ve DNA kalitesinin yüksek olduğunu ifade etmektedir.

Çizelge 4.2. DNA örneklerinin konsantrasyonu

Örnek Sıra No.	Bitki No.	DNA Konsantrasyonu (ng/µL)	Örnek Sıra No	Bitki No	DNA Konsantrasyonu (ng/µL)
1	918-01	26,6	25	918-25	23,4
2	918-02	28,8	26	918-26	41,8
3	918-03	60,5	27	918-27	20,7
4	918-04	29,0	28	918-28	22,3
5	918-05	81,3	29	918-29	27,4
6	918-06	38,0	30	918-30	22,5
7	918-07	20,0	31	918-31	25,7
8	918-08	20,6	32	918-32	35,2
9	918-09	22,1	33	918-33	30,3
10	918-10	32,6	34	918-34	22,9
11	918-11	33,3	35	918-35	60,9
12	918-12	42,8	36	918-36	21,7
13	918-13	25,6	37	918-37	46,1
14	918-14	47,6	38	918-38	63,3
15	918-15	31,0	39	918-39	34,5
16	918-16	32,6	40	918-40	25,5
17	918-17	36,0	41	918-41	23,2
18	918-18	35,6	42	918-42	30,6
19	918-19	30,2	43	918-43	35,8
20	918-20	39,7	44	918-44	35,7
21	918-21	40,0	45	918-45	43,3
22	918-22	54,7	46	918-46	25,9
23	918-23	42,2	47	918-47	28,4
24	918-24	51,7	48	918-48	49,4

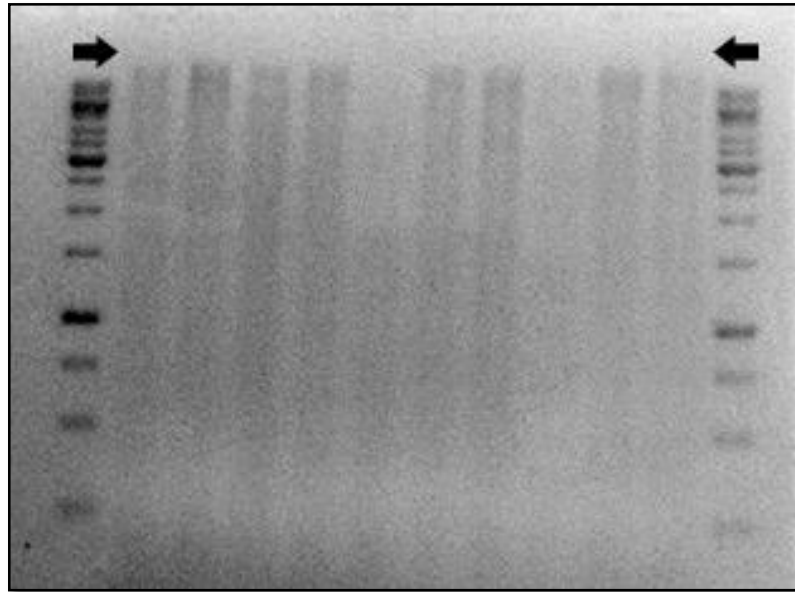
Çizelge 4.2. Yaprak örneklerinden elde edilen DNA örneklerinin konsantrasyonu (devam)

Örnek Sıra No.	Bitki No.	DNA Konsantrasyonu (ng/µL)	Örnek Sıra No	Bitki No	DNA Konsantrasyonu (ng/µL)
49	918-49	31,3	73	918-75	33,3
50	918-50	40,1	74	918-76	26,9
51	918-51	31,4	75	918-77	22,3
52	918-52	22,8	76	918-78	32,7
53	918-53	75,1	77	918-79	21,9
54	918-54	30,3	78	918-80	42,3
55	918-55	66,6	79	918-81	25,4
56	918-56	41,9	80	918-82	30,7
57	918-57	80,6	81	918-83	38,0
58	918-59	28,7	82	918-84	22,4
59	918-60	21,3	83	918-85	33,4
60	918-61	39,9	84	918-86	89,2
61	918-62	35,6	85	918-87	35,2
61	918-63	21,4	86	918-88	21,3
63	918-64	20,9	87	918-89	26,4
64	918-65	22,9	88	918-90	27,9
65	918-66	26,0	89	918-91	23,2
66	918-67	37,0	90	918-92	41,6
67	918-68	37,8	91	918-93	30,8
68	918-69	24,5	92	918-94	97,6
69	918-71	46,3	93	918-95	39,3
70	918-72	62,3	94	918-96	45,0
71	918-73	25,9	95	918-97	26,4
72	918-74	33,8	96	918-98	48,8



Şekil 4.1. Rastgele seçilmiş 10 adet DNA örneğinin agaroz jel görüntüsü

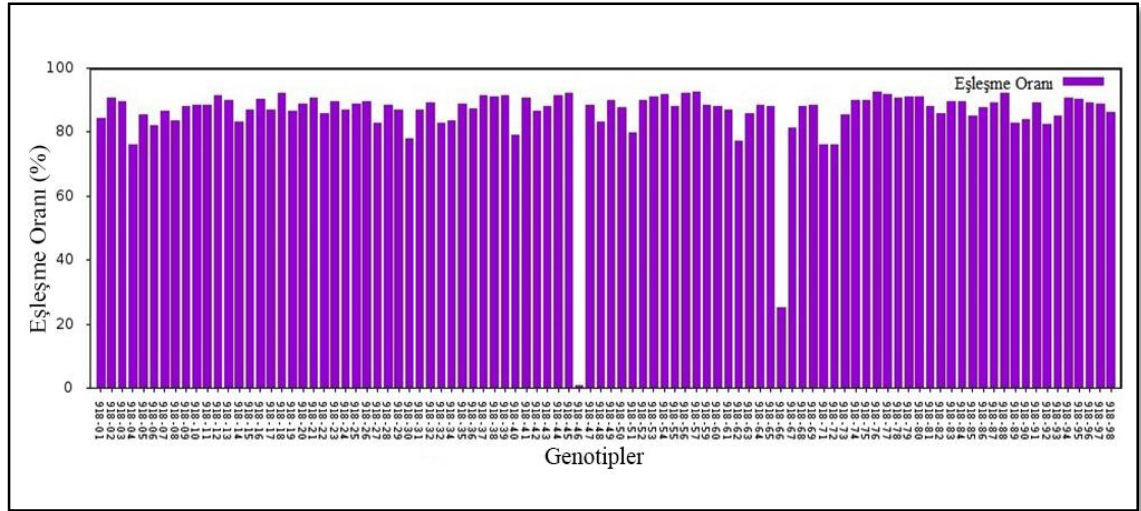
GBS analizi DNA örneklerinin restriksiyon enzimi ile kesilmesi işlemini içerdiğinden, öncesinde DNA örneklerinin DNA restriksiyon enzimleri ile kesilebildiğinin tespit edilmesi oldukça önemlidir. *EcoRI* enzimi ile kesilen DNA örneklerinin görüntüsü Şekil 4.2’de verilmiştir. Şeki 4.2’de görüldüğü gibi, Şekil 4.1’de ok ile gösterilen DNA bandı *EcoRI* enzimi ile kesildikten sonra kaybolmuştur. Bu da DNA örneklerinin *EcoRI* enzimi tarafından kesildiğini göstermektedir.



Şekil 4.2. *EcoRI* enzimi ile kesilen DNA örneklerinin agaroz jel görüntüsü

4.3. GBS Analizi Sonuçları

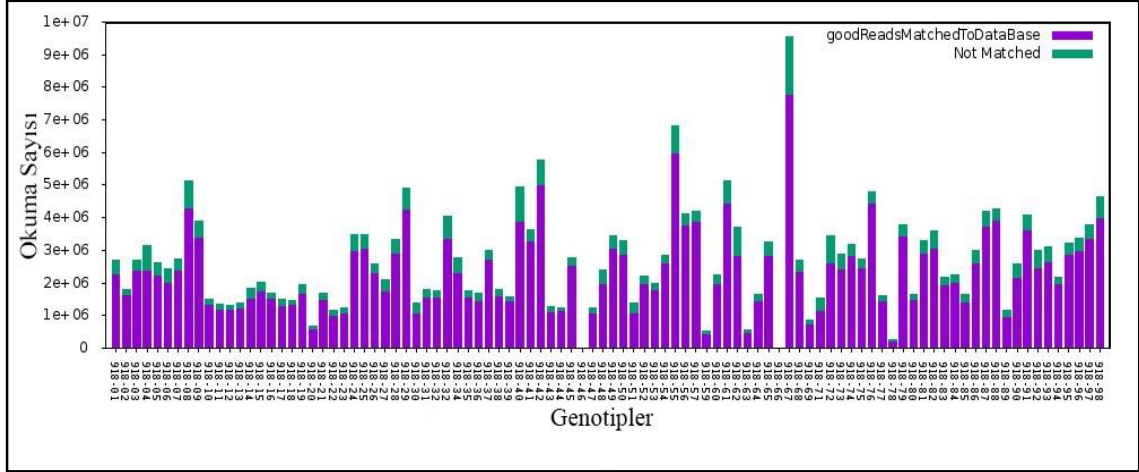
GBS analizleri sonucunda 96 genotipten elde edilen nükleotid dizileri TASSEL 5.0 programı kullanılarak referans havuç genomu ile eşleştirilmiştir. Tüm genotiplerden elde edilen nükleotid dizlerinin ne kadarının referans havuç genomu ile eşleştiği yüzde (%) olarak Şekil 4.3'teki grafikte verilmiştir. Bu şekile göre; 918-46 no'lu örneğin havuç genomu ile eşleşme yapmadığı ve 918-66 no'lu örneğin ise yaklaşık %20 oranında eşleştiği belirlenmiştir. Bu nedenle, bu örnekler için GBS analizinin çalışmadığı öngörülmüş ve GBS analizi sırasında bu genotipler veri analizinden çıkartılmıştır. Diğer genotiplerin eşleşme oranlarının ise %70 ile %90 oranında değiştiği görülmektedir. Havucun referans genomu ile eşleşmeyen nükleotid dizileri daha sonraki analizlere dahil edilmemiştir.



Şekil 4.3. GBS analizi sırasında genotiplerin referans havuç genomu ile eşleşme durumu

GBS analizi tarafından her bir örnek için nükleotid dizisi yapılan DNA parçası sayıları Şekil 4.4'te gösterilmektedir. Grafik üzerindeki sütunların mor renk ile ifade edilen kısımları başarılı olarak yapılan okuma sayılarını; yeşil renk ile gösterilen kısımları ise nükleotid dizisi havucun referans genomu ile eşleşmeyen DNA parçası sayılarına karşılık gelmektedir. Buna göre; GBS analizi sırasında nükleotid dizi analizi yapılan parça sayıları toplamı 1-10 000 000 arasında değiştiği görülmektedir. Nükleotid dizi analizi yapılan parça sayısı en fazla olan genotipin yaklaşık 8 000 000 okuma ile 918-67 no'lu genotip olduğu tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra, 918-59, 918-63 ve 918-74

no'lu genotiplerin nükleotid dizileri belirlenen parça sayılarının 1 000 000'dan az olduğu gözlenmiştir. Ayrıca, 918-46 ve 918-66 no'lu genotiplerin okuma yapılan parça sayıları bulunmadığı için nükleotid dizilerinin GBS analizleri kapsamında belirlenemediği görülmüş ve sonraki veri analizlerinden çıkartılmıştır.



Şekil 4.4. GBS analizi tarafından her bir örnek için nükleotid dizi analizi yapılan DNA parçası sayısı

4.4. SNP Moleküler İşaretleyicilerinin Belirlenmesi ve İlişkilendirme Haritalaması Sonuçları

GBS analizi ile nükleotid dizi analizi sonuçları TASSEL 5.0 programına aktarılmıştır. Bunun sonucunda, TASSEL programında 21 216 adet SNP moleküler işaretleyicisi belirlenmiştir. Analiz sırasında SNP moleküler işaretleyicilere göre yapılan filtreleme uygulaması ile, en düşük allel frekansı 0,3; en yüksek allel frekansı 0,7 ve eksik veri oranı %20 olacak şekilde analiz gerçekleştirilmiştir. Böylece, eksik veri oranı yüksek olan ve monomorfik olan SNP moleküler işaretleyicileri analiz dışında bırakılması sağlanmıştır. Genotiplere göre yapılan filtreleme işlemi sonucunda ise, en düşük heterozigotluk oranı 0,2; en yüksek heterozigotluk oranı ise 0,8 olarak sınırlandırılmıştır. Buna ek olarak eksik veri oranı %10'nun üzerinde olan genotipler analizlerden çıkartılmıştır. Sonuç olarak, SNP moleküler işaretleyicilerinin ve genotiplerin filtrenmesi sonucunda sadece 90 adet bireye ait verilerin haritalama analizlerinde kullanılabileceği tespit edilmiştir. Buna ek olarak başlangıçta 21 216 adet olarak belirlenen SNP moleküler işaretleyicisi sayısı filtreleme sonucunda 10 425'e

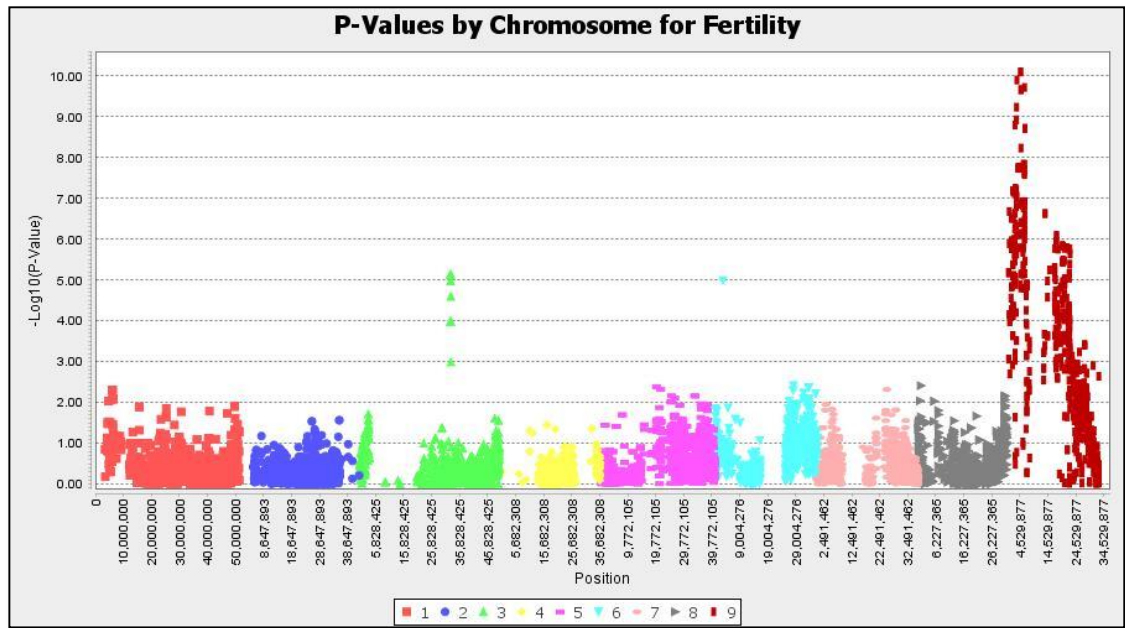
düşmüştür. Belirlenen bu SNP moleküler işaretleyicilerinin sayısının kromozomlara göre dağılımı ve buldukları bölgeler Çizelge 4.3.'de verilmiştir. Kromozom başına düşen SNP moleküler işaretleyicilerinin sayısının 874 (9. Kromozom) ile 1 679 (1. Kromozom) arasında değiştiği görülmektedir.

Erkek kısırlıkla ilişkili SNP moleküler işaretleyicileri belirleyebilmek için 10 425 adet SNP moleküler işaretleyicilerine ait veriler ile bireylere ait fenotipik veriler TASSEL 5.0 programına yüklenmiştir. TASSEL 5.0 paket programında bulunan GLM alt programı kullanılarak ilişkilendirme haritalaması yapılmış ve Manhattan grafikleri oluşturulmuştur (Şekil 4.5). Belirlenen SNP moleküler işaretleyicilerin referans havuç genomunun kromozomları üzerindeki dağılımı Manhattan grafiğinde gösterilmektedir. Bu grafiğe göre; *Rfl* geni ile ilişkili SNP moleküler işaretleyicilerinin dağılımının en fazla 9. kromozom üzerinde olduğu ve bu moleküler işaretleyicilerin havucun 9. kromozomun başında yer aldığı tespit edilmiştir. Ayrıca, 9. Kromozom üzerinde -Log₁₀p değeri 9,0-10,5 arasında olan SNP moleküler işaretleyicisi sayısının 5 adet olduğu tespit edilmiştir. Bu SNP moleküler işaretleyiciler arasından en yüksek -Log₁₀p değerinin 10,25 ile DcSNP_4822988'e ait olduğu görülmektedir Diğer kromozomlardaki SNP moleküler işaretleyicilerinin yoğunluğuna bakıldığında; moleküler işaretleyicilerin -Log₁₀p değerinin ortalama olarak 2,00 sınırına kadar dağılım gösterdikleri Şekil 4.5'de görülmektedir.

İlişkilendirme haritalaması sonucunda, havuçta erkek kısırlık geninin havucun 9. kromozomu üzerinde bulunduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.3. Belirlenen SNP moleküler işaretleyicilerin havucun kromozomları üzerindeki dağılımı (bç: baz çifti)

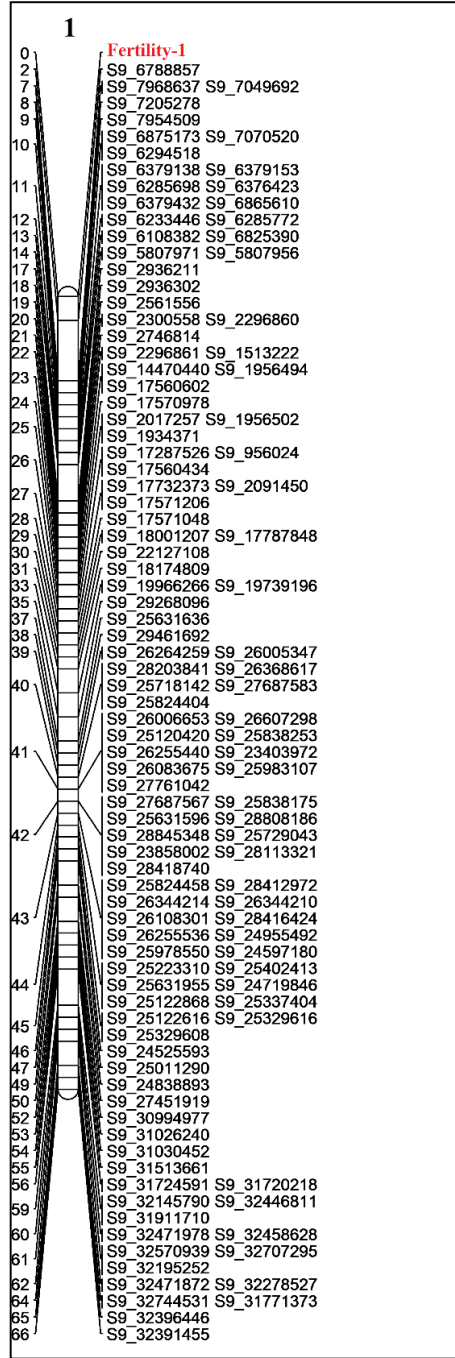
Kromozom Sayısı	SNP moleküler işaretleyicilerin sayısı (adet)	SNP Sayı No.	Kromozom üzerinde bulunduğu bölge (bç)
1	1 679	0-1 678	3 515 146-51 352 107
2	1 206	1 679-2.884	4 937 223-42 819 468
3	1 260	2 885-4 144	77 431-50 146 117
4	908	4 145-5 052	823 834-35 910 203
5	1 243	5 053-6 295	386 020-40 767.829
6	992	6 296-7 287	114 523-36 512 814
7	1 099	7 288-8 386	65 856-36 264 097
8	1 164	8 387-9 550	103 954-31 697 488
9	874	9 551-10 424	579 378-32 894 779



Şekil 4.5. *Rfl* geni ile ilişkilendirilen SNP moleküler işaretleyicilere ait Manhattan grafiği

4.5. Genetik Bağlantı Haritasının Oluşturulması

İlişkilendirme haritalaması sonucunda, *Rfl* geninin havuç genomunun 9. kromozomunda olduğu tespit edilmiştir (şekil 4.5). Dolayısıyla, genetik bağlantı haritası için 9. Kromozom üzerinde yer alan SNP moleküler işaretleyiciler kullanılmıştır. 9. kromozom üzerinde yer alan SNP moleküler işaretleyiciler ile oluşturulan genetik bağlantı analizi sonucunda havucun 9. kromozomu için 66 cM uzunluğunda 1 adet bağlantı grubu oluşmuştur (şekil 4.6). Bu genetik haritanın üzerinde 119 adet SNP moleküler işaretleyicisinin yer aldığı ve ortalama moleküler işaretleyici yoğunluğunun ise 0.55 cM/SNP olduğu tespit edilmiştir. Genetik bağlantı haritasında da erkek kısırlık geninin havucun 9. kromozomunun hemen başında yer aldığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.6. SNP moleküler işaretleyicilere dayalı havucun 9. kromozomunun genetik haritası. (Barın solundaki rakamlar cM olarak genetik mesafeyi göstermektedir; SNP moleküler işaretleyicilerinin isimleri barın sağında yer almıştır).

4.6. Erkek Kısırlık Geni ile İlişkili SNP Moleküler İşaretleyicilerin Seçilmesi

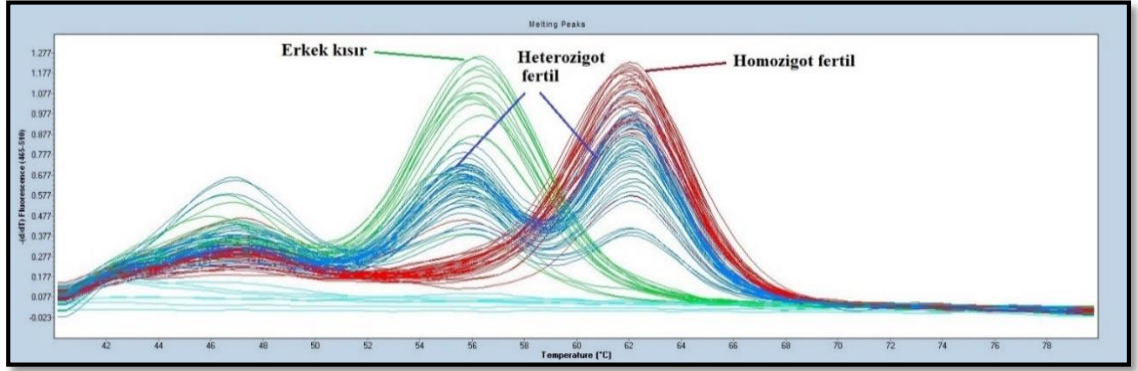
Hem ilişkilendirme ile haritalama hem de genetik bağlantı haritalaması sonuçları, erkek kısırlık (Fertility) genin havuç genomunun 9. kromozomunda olduğunu göstermiştir. Hem ilişkilendirme ile haritalama hem de genetik bağlantı haritalaması sonuçları kullanılarak erkek kısırlık genine en yakın olan 5 adet SNP moleküler işaretleyicisi seçilmiştir. Daha sonra eş zamanlı PZR simple probe analizinde kullanılmak üzere, seçilen her bir SNP için prob geliştirilmiştir. Eş zamanlı PZR Reaksiyonunda kullanılan SNP moleküler işaretleyicileri ve özellikleri Çizelge 4.4’de verilmiştir.

Çizelge 4.4. Eş zamanlı PZR reaksiyonunda kullanılan SNP moleküler işaretleyiciler ve nükleotid polimorfizmi

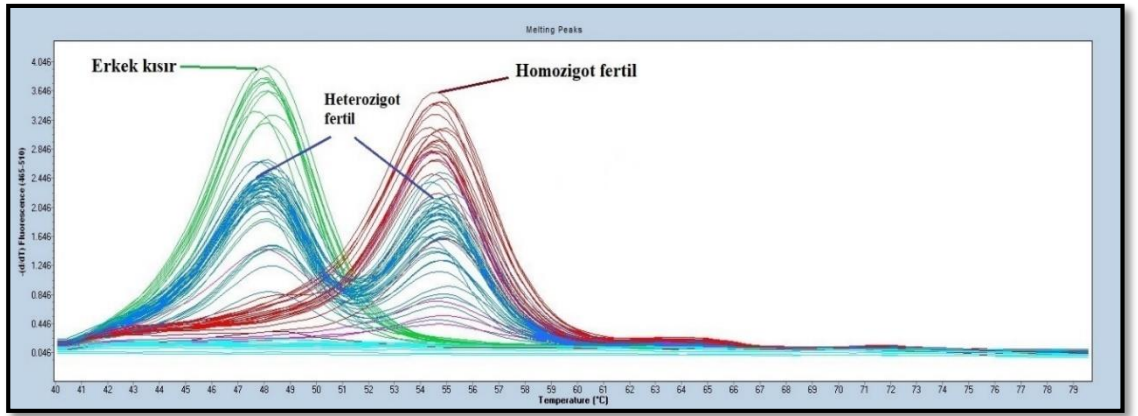
SNP No	SNP Adı	Nükleotid Polimorfizmi
1	DcSNP_3342931	A/G
2	DcSNP_3992596	A/G
3	DcSNP_4822988	A/C
4	DcSNP_6233708	A/G
5	DcSNP_6379153	C/G

4.7. Erime Eğrisi Analizi Sonuçları

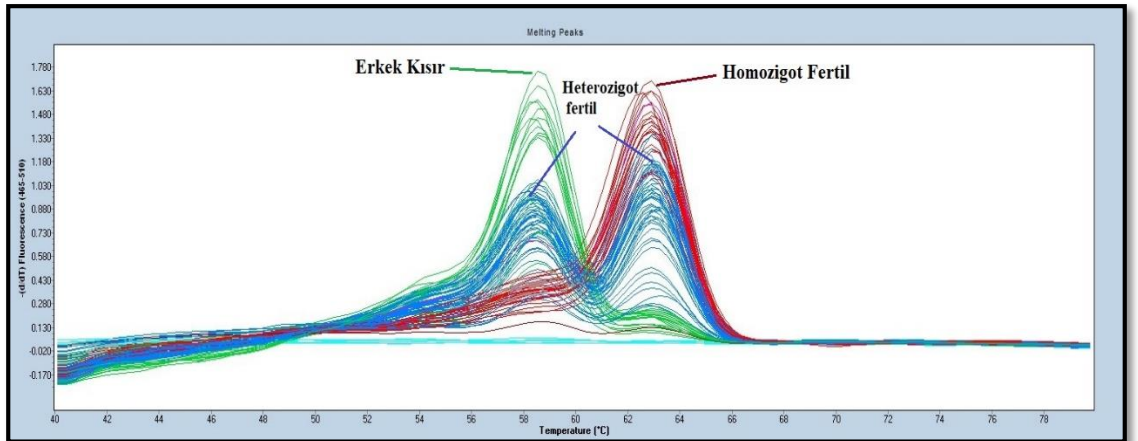
SNP moleküler işaretleyiciler ile yapılan eş zamanlı PZR reaksiyonu sonucunda erime eğrisi analizleri yapılmıştır. Buna göre, DcSNP_3992596 ve DcSNP_6379153 moleküler işaretleyicileri için DNA çoğaltımının gerçekleşmediği tespit edilmiştir. Bu nedenle, bu moleküler işaretleyiciler analizlere dahil edilmemiştir. Bunun yanı sıra, tespit edilen diğer üç SNP moleküler işaretleyicileri (DcSNP_3342931, DcSNP_4822988 ve DcSNP_6233708) kullanılarak yapılan reaksiyonlar sonucunda, F2 popülasyonuna ait tüm genotipler için ayrı ayrı erime eğrileri oluşturulmuş ve popülasyondaki tüm bitkilerin erkek kısırlık karakteri bakımından genotipleme yapılmıştır. Tüm genotiplerin homozigot fertil (*Rf1Rf1*), heterozigot fertil (*Rf1rf1*) ve erkek kısır (*rf1rf1*) olma durumları erime sıcaklıklarına (T_m değerleri) bakılarak değerlendirilmiştir. Erime eğrisi analizi sonuçları Şekil 4.7, Şekil 4.8, Şekil 4.9 ve Şekil 4.10’da verilmiştir.



Şekil 4.7. DcSNP_3342931 ile yapılan eş zamanlı PZR çoğaltımına ait erime eğrileri



Şekil 4.8. DcSNP_4822988 ile yapılan eş zamanlı PZR çoğaltımına ait erime eğrileri



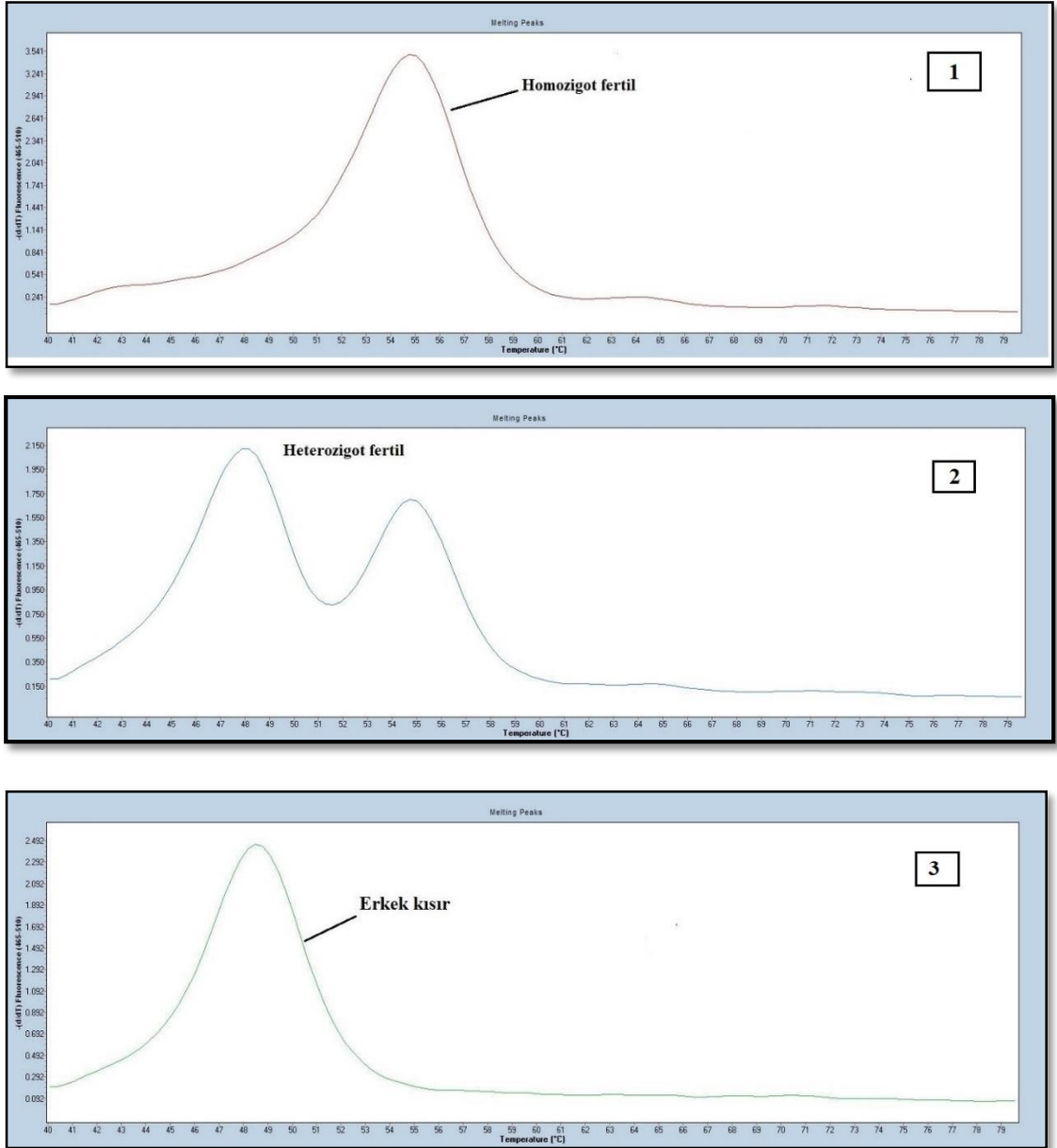
Şekil 4.9. DcSNP_6233708 ile yapılan eş zamanlı PZR çoğaltımına ait erime eğrileri

DcSNP_3342931 primeri ile yapılan çoğaltım sonucunda; erkek kısır olan genotiplerin DNA sarmallarının 55°C'de, homozigot fertil olan genotiplerin 62°C'de denatüre olduğu ve heterozigot fertil olan bireylerin ise hem 55°C hem de 62°C sıcaklıklarda birbirinden ayrıldığı tespit edilmiştir. Buna göre, grafik üzerinde erime eğrileri kırmızı renk olan bireylerin homozigot fertil; mavi renkli olan bireylerin heterozigot fertil ve yeşil renk ile ifade edilen bireylerin ise erkek kısır oldukları tespit edilmiştir (Şekil 4.7). Erkek kısır bitkiler *rf1rf1* genotipini taşıırken, fertil bitkiler *Rf1Rf1* veya *Rf1rf1* genotiplerini taşımaktadır.

DcSNP_4822988 primeri ile yapılan çoğaltım sonucunda; erkek kısır olan genotiplerin erime sıcaklıklarının 48°C; homozigot fertil olan bireylerin 55°C; heterozigot fertil olan bireylerin erime sıcaklıklarının ise 48 ve 55°C'lerde olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.8).

DC-SNP_6233708 primeri ile yapılan çoğaltım sonucunda ise, erkek kısır olan genotiplerin erime sıcaklığının 58°C; homozigot fertil olan bireylerin 62°C; heterozigot fertil olan bireylerinin ise hem 58°C ve hem de 63°C olduğu saptanmıştır (Şekil 4.9).

Şekil 4.10'a ait 1, 2 ve 3 no'lu grafikler; F2 popülasyonu içerisinde seçilen homozigot ve heterozigot erkek fertil genotiplere (*Rf1Rf1*, *Rf1rf1*); 3 no'lu grafik ise erkek kısır olan genotipe (*rf1rf1*) ait erime eğrilerini göstermektedir.



Şekil 4.10. Popülasyondaki tüm genotiplerin homozigot fertil (*Rf1Rf1*), heterozigot fertil (*Rf1rf1*) ve erkek kısır (*rf1rf1*) olma durumlarını gösteren erime eğrileri

4.8. Erkek kısırlık geni ile ilişkilendirilen SNP moleküler işaretleyicilerin doğrulanması

Hücre çekirdeğinde bulunan *Rf1* geni ile ilişkili SNP moleküler işaretleyicilerin GBS analizleri ile belirlenmesinin ardından, TASSEL 5.0 programından elde edilen genotipik verilerin doğrulanması amacıyla erime eğrisi analizleri gerçekleştirilmiştir. Popülasyondaki 96 adet bitkinin çiçek yapıları üzerinde yapılan fenotipik gözlem

sonuçları, GBS analizi ve erime eğrisi analizleri sonuçları ile karşılaştırılarak Çizelge 4.5’de sunulmuştur.

96 adet bitkinin çiçeklerinin erkek kısır olup olmadığı ile ilgili yapılan fenotipik gözlem sonuçları, bu popülasyona ait GBS analizi sonuçları ile karşılaştırıldığında; fenotipik ve genotipik veriler arasında farklılıklar bulunduğu ortaya çıkmıştır. 918-27 ve 918-47 no’lu örnekler fenotipik gözlem sonucunda fertil bitki olarak değerlendirilmiş ancak, DcSNP_6233708 moleküler işaretleyicisine ait GBS analizi ile bu bitkiler erkek kısır olarak genotiplenmiştir. Bunun tam tersi olarak; 918-74 ve 918-80 no’lu bitkiler arazide yapılan fenotipik gözlemlerde kısır olarak değerlendirilmelerine rağmen; GBS analizinde nükleotid dizilerinin belirlenmesi ile bu bitkilerin fertil olarak genotiplendiği görülmüştür. Ayrıca, 918-46, 918-63, 918-66 ve 918-78 no’lu örneklerin genotiplenmelerinin ise GBS analizi ile yapılamadığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlardan yola çıkarak; çiçek yapılarının fenotipik olarak gözlenmesi ile elde edilen veriler ile GBS analizi sonuçlarının %89,6 oranında birbiri ile uyumlu olduğu ortaya çıkmıştır. Aralarında %6,3 oranında genotipleme farklılığı bulunduğu ve eksik veri oranının ise %4,1 olduğu tespit edilmiştir.

Erime eğrisi analizleri sonuçlarına bakıldığında, elde edilen sonuçların, %97,9 oranında fenotipik verileri doğruladığı görülmektedir. Geriye kalan %2,1’lik oran ise; 918-22 ve 918-98 no’lu bitkilere ait genotipleme sonuçlarının elde edilememiş olması nedeni ile eksik veri oranı olarak kayıt edilmiştir.

GBS analizi sonucunda yapılan genotiplenmeler ve eş zamanlı PZR simple probe yöntemi sonuçları karşılaştırıldığında; genotiplerin homozigot ve heterozigot fertil olma durumlarında farklılıklar bulunduğu görülmektedir. Ancak bu durum fenotipi değiştirmemektedir. Buna ek olarak; 918-74 ve 918-80 genotipleri GBS analizleri ile fertil bitkiler olarak tespit edilmişti; fakat erime eğrisi analizleri ile bu bitkilerin erkek kısır olduğu ortaya çıkmış ve böylece fenotipik gözlem sonuçları doğrulanmıştır.

Çizelge 4.5. Fenotipik gözlem verileri ile GBS analizi ve erime eğrisi analizi sonuçlarının karşılaştırılması (HeF: Heterozigot fertil; HoF: Homozigot fertil; S: Erkek kısır; -: Çalışmayan reaksiyon)

Bitki Sıra No.	Örnek Adı	Fenotipik Gözlem Sonuçları	GBS Analizi Sonuçları			Erime Eğrisi Analizi Sonuçları		
			DcSNP_3342931	DcSNP_4822988	DcSNP_6233708	DcSNP_3342931	DcSNP_4822988	DcSNP_6233708
1	918-01	Fertil	HeF	HeF	HeF	HeF	HeF	HeF
2	918-02	Fertil	HeF	HeF	HeF	HeF	HeF	HeF
3	918-03	Fertil	HoF	HeF	HeF	HoF	HeF	HeF
4	918-04	Kısır	S	S	S	S	S	S
5	918-05	Fertil	HeF	HeF	HeF	HeF	HeF	HeF
6	918-06	Kısır	S	S	S	S	S	S
7	918-07	Fertil	HeF	HeF	HoF	HeF	HeF	HeF
8	918-08	Fertil	HoF	HoF	HoF	HoF	-	-
9	918-09	Fertil	HeF	HeF	HeF	HeF	HeF	HeF
10	918-10	Fertil	HoF	HoF	HoF	HoF	HoF	HoF
11	918-11	Kısır	S	S	S	S	S	S
12	918-12	Fertil	HoF	HoF	HoF	HeF	HoF	HoF
13	918-13	Fertil	HeF	HeF	HeF	HoF	HeF	HeF
14	918-14	Fertil	HeF	HeF	HeF	HeF	HeF	HeF
15	918-15	Fertil	HeF	HeF	HeF	HeF	HeF	HeF
16	918-16	Fertil	HoF	HoF	HoF	HoF	HoF	HoF
17	918-17	Fertil	HeF	HeF	HeF	HeF	HeF	HeF
18	918-18	Kısır	S	S	S	S	S	S
19	918-19	Fertil	HoF	HoF	HoF	HoF	HoF	HoF
20	918-20	Fertil	HoF	HoF	HoF	HoF	HoF	HoF
21	918-21	Fertil	HeF	HeF	HeF	-	HeF	-
22	918-22	Kısır	S	S	S	-	-	-
23	918-23	Kısır	S	S	S	S	S	S
24	918-24	Fertil	HeF	HeF	HeF	HeF	HeF	HeF

Çizelge 4.5. Fenotipik gözlem verileri ile GBS analizi ve erime eğrisi analizi sonuçlarının karşılaştırılması (Hef: Heterozigot fertil; Hof: Homozigot fertil; S: Erkek kısır; -: Çalışmayan reaksiyon) (devam)

Bitki Sıra No.	Örnek Adı	Fenotipik Gözlem Sonuçları	GBS Analizi Sonuçları			Erime Eğrisi Analizi Sonuçları		
			DcSNP_3342931	DcSNP_4822988	DcSNP_6233708	DcSNP_3342931	DcSNP_4822988	DcSNP_6233708
25	918-25	Fertil	HoF	HoF	HoF	HoF	HoF	HoF
26	918-26	Kısır	S	S	S	S	S	S
27	918-27	Fertil	HoF	HoF	S	HoF	HoF	HoF
28	918-28	Kısır	S	S	S	S	S	S
29	918-29	Fertil	HeF	HeF	HeF	HeF	HeF	HeF
30	918-30	Fertil	HeF	HeF	HeF	HeF	HeF	HeF
31	918-31	Fertil	HeF	HeF	HeF	HeF	HeF	HeF
32	918-32	Fertil	HeF	HeF	HeF	HeF	HeF	HeF
33	918-33	Fertil	HoF	HoF	HoF	HoF	HoF	HoF
34	918-34	Fertil	HoF	HoF	HoF	HoF	HoF	HoF
35	918-35	Fertil	HeF	HeF	HeF	HeF	HeF	HeF
36	918-36	Kısır	S	S	S	S	S	S
37	918-37	Fertil	HeF	HeF	HeF	HeF	HeF	HeF
38	918-38	Fertil	HeF	HeF	HeF	HeF	HeF	HeF
39	918-39	Fertil	HoF	HoF	HoF	HoF	HoF	HoF
40	918-40	Fertil	HeF	HeF	HeF	HeF	HeF	HeF
41	918-41	Fertil	HeF	HeF	HeF	HeF	HeF	HeF
42	918-42	Fertil	HeF	HeF	HoF	HeF	HeF	HeF
43	918-43	Fertil	HoF	HeF	HeF	HoF	HeF	HeF
44	918-44	Fertil	HeF	HeF	HeF	HeF	HeF	HeF
45	918-45	Kısır	S	S	S	S	S	S
46	918-46	Kısır	-	-	-	S	S	S
47	918-47	Fertil	HeF	HeF	S	HoF	HoF	HoF
48	918-48	Kısır	S	S	S	S	S	S

Çizelge 4.5. Fenotipik gözlem verileri ile GBS analizi ve erime eğrisi analizi sonuçlarının karşılaştırılması (Hef: Heterozigot fertil; Hof: Homozigot fertil; S: Erkek kısır; -: Çalışmayan reaksiyon) (devam)

Bitki Sıra No.	Örnek Adı	Fenotipik Gözlem Sonuçları	GBS Analizi Sonuçları			Erime Eğrisi Analizi Sonuçları		
			DcSNP_3342931	DcSNP_4822988	DcSNP_6233708	DcSNP_3342931	DcSNP_4822988	DcSNP_6233708
49	918-49	Fertil	Hof	Hof	Hof	Hof	Hof	Hof
50	918-50	Kısır	S	S	S	S	S	S
51	918-51	Fertil	Hof	Hof	Hof	Hof	HeF	HeF
52	918-52	Kısır	S	S	S	S	S	S
53	918-53	Fertil	HeF	HeF	HeF	HeF	HeF	HeF
54	918-54	Fertil	HeF	HeF	HeF	HeF	HeF	HeF
55	918-55	Kısır	S	S	S	S	S	S
56	918-56	Fertil	HeF	HeF	HeF	Hof	Hof	HeF
57	918-57	Fertil	HeF	HeF	HeF	HeF	HeF	HeF
58	918-59	Fertil	HeF	HeF	HeF	HeF	HeF	HeF
59	918-60	Fertil	HeF	HeF	Hof	HeF	HeF	Hof
60	918-61	Fertil	Hof	Hof	Hof	Hof	Hof	Hof
61	918-62	Fertil	HeF	HeF	HeF	HeF	HeF	HeF
62	918-63	Fertil	-	-	-	-	Hof	-
63	918-64	Fertil	HeF	HeF	HeF	HeF	HeF	HeF
64	918-65	Fertil	HeF	HeF	HeF	HeF	HeF	HeF
65	918-66	Kısır	-	-	-	S	S	S
66	918-67	Fertil	Hof	Hof	Hof	Hof	Hof	Hof
67	918-68	Fertil	HeF	HeF	HeF	HeF	HeF	HeF
68	918-69	Fertil	Hof	Hof	Hof	Hof	Hof	Hof
69	918-71	Fertil	HeF	HeF	HeF	HeF	HeF	HeF
70	918-72	Fertil	HeF	S	HeF	HeF	HeF	HeF
71	918-73	Fertil	HeF	HeF	HeF	Hof	Hof	Hof
72	918-74	Kısır	Hof	Hof	Hof	S	S	S

Çizelge 4.5. Fenotipik gözlem verileri ile GBS analizi ve erime eğrisi analizi sonuçlarının karşılaştırılması (Hef: Heterozigot fertil; Hof: Homozigot fertil; S: Erkek kısır; -: Çalışmayan reaksiyon) (devam)

Bitki Sıra No.	Örnek Adı	Fenotipik Gözlem Sonuçları	GBS Analizi Sonuçları			Erime Eğrisi Analizi Sonuçları		
			DcSNP_3342931	DcSNP_4822988	DcSNP_6233708	DcSNP_3342931	DcSNP_4822988	DcSNP_6233708
73	918-75	Fertil	S	S	S	HeF	HeF	HeF
74	918-76	Fertil	HeF	HeF	HeF	Hof	Hof	Hof
75	918-77	Fertil	Hof	Hof	Hof	Hof	Hof	Hof
76	918-78	Fertil	-	-	-	Hof	Hof	Hof
77	918-79	Fertil	Hof	Hof	Hof	HeF	HeF	Hof
78	918-80	Kısır	HeF	HeF	HeF	-	S	S
79	918-81	Fertil	S	HeF	HeF	HeF	HeF	Hof
80	918-82	Fertil	HeF	HeF	HeF	Hof	Hof	Hof
81	918-83	Fertil	Hof	Hof	Hof	HeF	HeF	HeF
82	918-84	Fertil	HeF	HeF	HeF	HeF	HeF	HeF
83	918-85	Fertil	Hof	HeF	HeF	Hof	Hof	HeF
84	918-86	Fertil	Hof	Hof	HeF	HeF	HeF	HeF
85	918-87	Fertil	HeF	HeF	HeF	HeF	HeF	HeF
86	918-88	Fertil	HeF	HeF	HeF	Hof	Hof	Hof
87	918-89	Fertil	Hof	Hof	Hof	Hof	Hof	Hof
88	918-90	Fertil	HeF	HeF	HeF	Hof	HeF	HeF
89	918-91	Fertil	Hof	Hof	Hof	Hof	Hof	Hof
90	918-92	Fertil	HeF	HeF	HeF	HeF	HeF	HeF
91	918-93	Fertil	HeF	HeF	HeF	HeF	HeF	HeF
92	918-94	Fertil	Hof	Hof	HeF	Hof	Hof	HeF
93	918-95	Fertil	HeF	HeF	HeF	HeF	HeF	HeF
94	918-96	Fertil	HeF	HeF	HeF	HeF	HeF	HeF
95	918-97	Kısır	S	S	S	S	S	S
96	918-98	Fertil	HeF	Hof	Hof	-	-	-

Erkek kısırılık karakterinin açılım gösterdiği F2 popülasyonuna ait fenotipik gözlemler, GBS analizi ve erime eğrisi analizlerinden elde edilen veriler ile yapılan ki-kare testi sonuçları Çizelge 4.6’da verilmiştir.

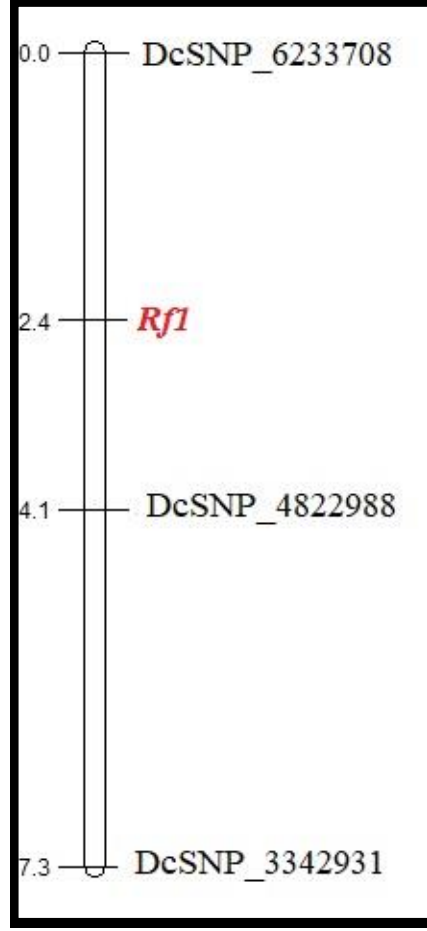
GBS analizi ve erime eğrisi analizleri sonucunda SNP moleküler işaretleyicilerinin fenotipik olarak 3:1 oranında açılım gösterdiği görülmektedir. Bunun yanı sıra, SNP moleküler işaretleyicilerin genotipik olarak 1:2:1 oranında açılım gösterdikleri ve bu açılım oranına ait ki-kare testi p değerlerinin 0,10-0,88 arasında değiştiği tespit edilmiştir.

Çizelge 4.6. F2 açılım popülasyonuna ait fenotipik gözlem, GBS analizi ve erime eğrisi verileri ile yapılan ki-kare testi sonuçları

Analizler	SNP moleküler işaretleyicileri	Heterozigot Fertil Bitki Sayısı	Homozigot Fertil Bitki Sayısı	Toplam Fertil Bitki Sayısı	Erkek Kısır Bitki Sayısı	X ² testi p-değeri (3:1)	X ² testi p-değeri (1:2:1)
Fenotipik Gözlem	-	-	-	77	19	0,24	-
GBS Analizi	DcSNP_3342931	27	48	75	17	-	0,30
	DcSNP_4822988	25	50	75	17	-	0,39
	DcSNP_6233708	25	49	74	18	-	0,47
Erime Eğrisi Analizleri	DcSNP_3342931	31	43	74	17	-	0,31
	DcSNP_4822988	27	48	75	18	-	0,88
	DcSNP_6233708	26	47	73	18	-	0,88

4.9. Genetik Bağlantı Haritasının Oluşturulması

Eş zamanlı PZR simple probe analizi sonucunda elde edilen erime eğrileri kullanılarak yeniden genetik bağlantı haritası oluşturulmuştur (Şekil 4.11). İlişkilendirme haritalaması sonucunda *Rfl* geni ile ilişkili olduğu tespit edilen 3 adet SNP moleküler işaretleyicisi (DcSNP_3342931, DcSNP_4822988, DcSNP_6233708) kullanılarak oluşturulan genetik haritanın uzunluğu 7,3 cM'dır. Ortalama moleküler işaretleyici yoğunluğu ise 2,43 cM/SNP olarak hesaplanmıştır. *Rfl* geni ile DcSNP_6233708 SNP moleküler işaretleyicisi arasındaki uzaklık 2,4 cM olarak belirlenmiştir. Diğer 2 SNP moleküler işaretleyicisi, DcSNP_3342931, DcSNP_4822988, *Rfl* genin diğer tarafında yer almaktadır ve DcSNP_4822988 ve DcSNP_3342931 SNP moleküler işaretleyicilerinin *Rfl* genine olan uzaklıkları sırasıyla 1,7 cM ve 4,9 cM; olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.11. *Rfl* geni ile bağlantılı SNP moleküler işaretleyiciler ile oluşturulan genetik bağlantı haritası. (Barın solundaki rakamlar cM olarak genetik mesafeyi göstermektedir; SNP moleküler işaretleyicilerinin isimleri barın sağında yer almıştır.)

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Geleneksel ıslah yöntemleri ile yapılan seleksiyon uzun yıllar sürmekte ve yüksek iş gücü ve maliyet gerektirmektedir. Moleküler işaretleyiciler kullanılarak yapılan seleksiyon, geleneksel ıslah çalışmalarına hız kazandırmaktadır. Günümüz modern moleküler ıslah çalışmalarında kullanılabilir çok sayıda moleküler işaretleyiciye ihtiyaç duyulmaktadır. Son yıllarda SNP moleküler işaretleyicileri yüksek polimorfizme sahip, eş baskın ve yüksek düzeyde bilgi verici olmaları nedeniyle önem kazanmıştır (Beissinger ve ark. 2013).

Bitki ıslahı ve genetiği çalışmalarında, yeni nesil DNA dizileme tekniklerinden biri olan GBS (Genotyping by sequencing) yönteminin kullanımı ile onbinlerce SNP moleküler işaretleyicisi çok kısa bir sürede belirlenebilmektedir (Sonah ve ark. 2013). GBS yöntemi düşük maliyetli bir sistem olarak kullanılabilir hale gelmiştir ve moleküler ıslah çalışmalarındaki önemi de giderek artmaktadır.

Ülkemiz tarımında kışlık sebzeler içerisinde önemli bir yere sahip olan havuç, hibrit çeşitler kullanılarak üretimi yapılan bir sebze türüdür. Hibrit havuç tohumluğu üretiminde erkek kısırlıktan faydalanılmaktadır. Havuç bitkisinde erkek kısırlığa neden olan genin moleküler işaretleyiciler kullanılarak belirlenmesi, hibrit havuç tohumu üretiminde ihtiyaç duyulan erkek kısır ıslah hatların belirlenmesini önemli ölçüde hızlandıracak, ihtiyaç duyulan işgücünü azaltacak ve maliyetleri düşürecektir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, büyük oranda hibrit tohum kullanılarak üretimi yapılan türlerde daha çok *Rf* genlerinin haritalanması üzerine çalışılmıştır. Özellikle soğanda (Gökçe ve ark. 2002, Bang ve ark. 2011) ve ayçiçeğinde (Yue ve ark. 2010) *Rf* genlerinin genetik haritası moleküler işaretleyiciler kullanılarak çıkartılmıştır.

Havuçta bugüne kadar izoenzimler, RAPD, AFLP ve SSR gibi farklı moleküler işaretleyiciler kullanılarak çeşitli genetik haritalama çalışmaları yapılmıştır (Schulz ve ark. 1994, Westphal ve Wricke 1997, Cavagnaro ve ark. 2011, Santos ve Simon 2004). Ancak; Ellison ve ark. (2017) havuç bitkisine ait GBS temelli ilk genetik haritayı yapmışlardır. Bundan sonra Sarcan (2018) tarafından gerçekleştirilen yüksek lisans tez

çalışmasında; 94 adet F2 bitkisinden elde edilen veriler ile, 1 464 adet SNP moleküler işaretleyicisi tespit edilmiş ve 13 adet bağlantı grubu bulunmuştur.

Havucun diploid genoma sahip oluşu ($2n=2x=18$) ve 473 mega baz çiftinden oluşması nedeniyle havuç bitkisi GBS analizi için uygun bir tür olduğu belirtilmiştir (Iorizzo ve ark. 2011). Havuç genomunda SNP moleküler işaretleyicilerinin tespit edilmesine yönelik olarak yapılan sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır (Oraguzie ve ark. 2007, Yıldız 2009, Cavagnaro ve ark. 2014).

Yapılan bu tez çalışması kapsamında, erkek kısırılık karakterinin 3:1 oranında açılım gösterdiği tespit edilen 96 adet bitkiden oluşan F2 popülasyonunda, GBS yöntemi kullanılarak 10 425 adet SNP moleküler işaretleyicisi belirlenmiştir. Havuçta erkek kısırılık özelliği ile bağlantılı olduğu belirlenen bu SNP moleküler işaretleyicilerin havucun kromozomları üzerindeki dağılımı ilişkilendirme haritalaması sonucunda ortaya konulmuştur. Buna göre; erkek kısırılık özelliği ile ilişkili *Rfl* geninin havucun 9. kromozomu üzerinde yer aldığı tespit edilmiştir. Havucun 9. Kromozomu üzerinde bulunan SNP moleküler işaretleyiciler kullanılarak genetik bağlantı haritası oluşturulmuştur. Genetik haritalama analizi de *Rfl* geninin havucun 9. Kromozomun başında yer aldığını göstermiştir. Hem ilişkilendirme haritalaması hem de genetik bağlantı haritası sonuçları kullanılarak erkek kısırılık özelliğini kontrol eden *Rfl* lokusuna en yakın olan 5 adet SNP moleküler işaretleyicisi (DcSNP_3342931, DcSNP_3992596, DcSNP_4822988, DcSNP_6233708, DcSNP_6379153) seçilmiştir. Tespit edilen SNP'lerinin doğrulama analizleri, eş zamanlı PZR reaksiyonunun hibridizasyon temelli özgül belirleme yöntemlerinden biri olan simple probe tekniği kullanılarak yapılmıştır. Eş zamanlı PZR simple probe reaksiyonunun sonucunda erime eğrisi analizleri yapılarak, başarılı olarak çalıştığı tespit edilen DcSNP_3342931, DcSNP_4822988, DcSNP_6233708 SNP moleküler işaretleyicileri ile popülasyondaki bireylerin ayrı ayrı genotiplenmeleri yapılmıştır. Böylece, tüm genotiplerin homozigot fertil (*RflRfl*), heterozigot fertil (*Rflrfl*) ve erkek kısır (*rflrfl*) olma durumları tespit edilmiştir.

GBS analizleri ve eş zamanlı PZR simple probe yöntemi ile elde edilen genotipik veriler, F2 popülasyonun çiçek yapılarının gözlenmesi ile elde edilen fenotipik veriler

ile karşılaştırılmıştır. Fenotipik gözlem sonuçları ile GBS yöntemi sonuçlarının uyumunun yaklaşık %90 olması, GBS yönteminin havuç genomundaki SNP moleküler işaretleyicilerin keşfinde verimli bir şekilde kullanılabileceğini vurgulamıştır.

GBS yöntemi ile eş zamanlı PZR simple probe yöntemi sonuçları karşılaştırıldığında; bitkilere ait genotipik farklılıklar olabildiği görülmüştür. Bu çalışma kapsamında, eş zamanlı PZR simple probe yöntemi sonuçları fenotipik gözlem sonuçlarını %97,9 oranında doğrulamıştır. GBS yönteminin amacı, yüksek yoğunlukta çok sayıda moleküler işaretleyiciyi aynı anda ve hızlı bir şekilde tespit etmektir. Bu çalışmanın sonucunda, elde edilen %90 oranındaki uyum GBS analizlerinin başarısını ortaya koymuştur. Ancak, aynı anda yapılan yüksek yoğunlukta hassas okumalar ile bazen genotiplemelerde hatalar ortaya çıkabilmektedir. Bu nedenle, GBS yöntemi ile kaynaklanabilen genotipleme temelli hataları ortadan kaldırmak amacıyla, eş zamanlı PZR simple probe yöntemi ile doğrulama yapılması gerektiği ortaya çıkmıştır. Bu çalışma ile eş zamanlı PZR simple probe analizlerinin GBS yöntemi ile elde edilen genotipik verilerin doğrulanmasında güvenilir bir şekilde kullanılabileceği ortaya konmuştur. Ayrıca, bu çalışma ile havuçta erkek kısırılık karakteri ile bağlantılı SNP moleküler işaretleyicilerin keşfi başarılı bir şekilde yapılmıştır.

Son olarak, GBS yöntemi ile belirlenen SNP'lerin, eş zamanlı PZR simple probe yöntemi ile doğrulanmasının ardından, elde edilen veriler ile genetik bağlantı haritası oluşturulmuştur. Havucun 9. kromozomu üzerinde bulunan DcSNP_3342931, DcSNP_4822988, DcSNP_6233708 SNP moleküler işaretleyicilerinin *Rfl* genine olan uzaklıkları incelendiğinde; *Rfl* genine en yakın uzaklıkta olan SNP moleküler işaretleyicisinin DcSNP_4822988 olduğu tespit edilmiştir. Çalışma sonucunda tespit edilen bu genetik harita, erkek kısırılık özelliği kullanılarak yapılacak bundan sonraki moleküler seleksiyon çalışmalarında kullanılabilir niteliktedir. Belirlenen bu SNP moleküler işaretleyicileri havuç ıslahında kullanılacak niteliktedir.

Bu doktora tez çalışması, havuç bitkisinde GBS temelli SNP moleküler işaretleyicilerin eş zamanlı PZR simple probe yöntemi ile doğrulanması açısından tespit edilebilen ilk çalışma olması nedeniyle önem taşımaktadır.

Yapılan bu tez alımasından elde edilen sonuçlar kullanılarak, henüz fide aşamasında alınan yaprak örnekleri ile erkek kısırlık genini taşıyan bitkiler bu çalışma kapsamında belirlenen moleküler işaretleyiciler kullanılarak tespit edilebilecek, hibrit havuç ıslahı çalışmalarında zaman ve işgücü kaybı en aza indirilecektir. Çünkü geleneksel ıslah yöntemleri kullanılarak hibrit havuç tohum üretiminde kullanılan erkek kısır hatların belirlenebilmesi iki yıl sürerken; bu süreç, SNP moleküler işaretleyiciler yardımı ile yapılan seleksiyon ile (MAS) bir ay gibi kısa bir süre içerisinde tamamlanabilecektir. Böylece, lkemizdeki yerel eşitlerimizden hibrit çeşitlere dönüştürülmesi teşvik edilecek ve süreç hızlanacaktır. Bu araştırma, ülkemizin hibrit havuç tohumu tedarikinde yurtdışına bağımlılığı ile ilgili probleme nitelikli çözüm getirebilecek zgn değerde sonuçlar ortaya koymuştur.

Havuç bitkisinde erkek kısırlık karakterini kontrol eden *Rfl* geninin havuç genomundaki yerinin tesit edilmesi, hibrit havuç tohumu üretiminde ihtiyaç duyulan popülasyonların elde edilmesinde kullanılabilir. Bu araştırma ile ilgili bundan sonraki yapılacak çalışmaların başında, erkek kısırlık karakterinin açılım gösterdiği yeni popülasyonların oluşturulması ve bu çalışmadan elde edilen moleküler işaretleyicilerin bu popülasyonlarda da denenmesi gelmektedir. Ayrıca, bağımsız olarak geliştirilen başka havuç popülasyonlarında da çalışmalar yapılmalıdır. Buna ek olarak, havuç genomunda 9. kromozomda olduğu belirlenen *Rfl* geninin klonlanması ile ilgili alışamalar da yapılabilir. Havuç genomunda erkek kısırlığa neden olan başka gen veya genlerin var olup olmadığı da araştırılabilir konular arasındadır.

KAYNAKLAR

- Acharya, U.R., Mishra, M., Patro, J., Panda, M.K. 2008.** Effect of vitamins C and E on spermatogenesis in mice exposed to cadmium. *Reproductive Toxicology*, 25(1):84-88.
- Akagi, H., Nakamura, A., Yokozeki-Misono, Y., Inagaki, A., Takahashi, H., Mori, K., Fujimura, T. 2004.** Positional cloning of the rice *Rfl* gene, a restorer of BT-type cytoplasmic male sterility that encodes a mitochondria-targeting PPR protein. *Theor Appl Genet.*, 108:1449-1457.
- Akey, J.M., Zhang, K., Xiong, M., Doris, P., Jin, L. 2001.** The effect that genotyping errors have on the robustness of common linkage-disequilibrium measures. *Am. J. Hum. Genet.*, 68: 1447-1456.
- Akter, S., Hug, M.A., Jung, Y.J., C, Y.G., K, K.K. 2016.** Application of Single Nucleotide Polymorphism Markers for Selection of Male Sterility in Crop Plants. *Plant Breed. Biotech.*, 4(4):379-386.
- Alessandro, M.S., Galmarini, C.r., Iorizzo M., Simon, P.W. 2013.** Molecular mapping of vernalization requirement and fertility restoration genes in carrot. *Theor Appl Genet*, 126:415-423.
- Anonim, 2017a.** Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü, Dünya havuç üretim istatistikleri, <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> - (Erişim Tarihi: 20.08.2019).
- Anonim, 2017b.** Türkiye İstatistik Kurumu, 2012-2017 yılları arasındaki havuç tohumluğu ithalat verileri. <https://biruni.tuik.gov.tr/disticaretapp/menu.zul> -(Erişim Tarihi: 01.08.2019).
- Anonim, 2018.** Türkiye İstatistik Kurumu, Türkiye’de havuç üretim istatistikleri, , <https://biruni.tuik.gov.tr/medas/?kn=92&locale=tr> -(Erişim Tarihi: 20.08.2019).
- Anonim, 2019.** Siyah Havuç. <http://www.eregli.bel.tr/tr-407946456-a407210489/Siyah-Havuc-Salgam> (Erişim Tarihi: 22.08.2019).
- Bach, I. C., Olesen, A., Simon, P.W. 2002.** PCR-based markers to differentiate the mitochondrial genomes of petaloid and male fertile carrot (*Daucus carota* L.). *Euphytica*, 127(3): 353-365.
- Bang, H., Cho, D.Y., Yoo, K.S., Yoon, M. K., Patil, B. S. Kim, S. 2011.** Development of simple PCR-based markers linked to the Ms locus, a restorer-of-fertility gene in onion (*Allium cepa* L.). *Euphytica*, 179: 439-449.
- Banga, O., Petiet, J., Bennekom, J.L. 1964.** Genetic analysis of male-sterility in carrot. *Euphytica*, 13(1): 75-93.

- Beissinger, T.M., Hirsch, C.N., Sekhon, R.S., Foerster, J.M., Johnson, J.M., Muttoni, G., et al. 2013.** Marker density and read depth for genotyping populations using genotyping-by-sequencing. *Genetics*, 193(4):1073-1081.
- Bentolila, S. Alfonso, A.A., Hanson, M.R., 2002.** A pentatricopeptide repeat containing gene restores fertility to cytoplasmic malesterile plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 9:10887-10892.
- Boiteux, L., Belter, J.G., Roberts, P., Simon, P.W. 2000.** RAPD linkage map of the genomic region encompassing the root-knot nematode (*Meloidogyne javanica*) resistance locus in carrot. *Theoretical and Applied Genetics*, 100(3):439-446.
- Borthwick, H.A., Philipps, M., Robbins, W.W. 1931.** Floral development in *Daucus carota*. *American Journal of Botany*, 18: 784-796.
- Bradbury, P.J., Zhang, Z., Kroon, D.E., Casstevens, T.M., Ramdoss, Y., Buckler, E.S. 2007.** TASSEL: software for association mapping of complex traits in diverse samples. *Bioinformatics*, 23(19): 2633-5.
- Bradeen, J.M., Simon, P.W. 2007.** Carrot, In: c. Kole (ed.) *Genome mapping and molecular breeding in Plants*. Berlin: Springer-Verlag, 161-184.
- Bradeen, J.M., Vivek, B.S., Simon, P.W. 1997.** Detailed genetic mapping of the Y2 carotenoid locus in carrot. *Journal of Applied Genetics*, 38:28-32.
- Broccanello, C., Chiodi, C., Funk, A., McGrath, J.M., Panella, L., Stevanato, P. 2018.** Comparison of three PCR-based assays for SNP genotyping in plants. *Plant Methods*, 14:28.
- Brookes, A. J. 1999.** The Essence of SNPs. *Gene*. 234(2):177-86.
- Brothwell, D. R., Brothwell, P. 1969.** *Food In Antiquity*. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, 111-112.
- Brown, G.G., Formanova, N., Jin, H., Wargachuk, R., Dendy, C., Patil, P., Laforest, M., Zhang, J., Cheung, W.Y., Landry, B.S. 2003.** The radish *Rf* restorer gene of *Ogura* cytoplasmic male sterility encodes a protein with multiple pentatricopeptide repeats. *The Plant Journal*, 35:262-272.
- Budar, F., Pelletier, G. 2001.** Male sterility in plants: occurrence, determinism, significance and use. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences – Series III - Sciences de la Vie*, 324(6): 543-550.
- Buishand, J.G. Gabelman, W.H. 1980.** Studies on the inheritance of root color and carotenoid content in red × yellow and red × white crosses of carrot (*Daucus carota* L.). *Euphytica*, 29(2): 241-260.

Catchen, J., Paul, A., Hohenlohe, P.A., Bassham, S., Amores, A., Cresko, W.A. 2013. Stacks: an analysis tool set for population genomics. *Molecular Ecology*, 22(11):3124-3140.

Cavagnaro, P.F., Iorizzo, M., Yıldız, M., Senalik, D., Parsons, J., Ellison, S., Simon, P.W. 2014. A gene derived SNP-based high resolution linkage map of carrot including the location QTL conditioning root and leaf anthocyanin pigmentation. *BMC Genomics*, 15(1) :1118.

Cavagnaro, P.F., Chung, S. M., Manin, S., Yıldız, M., Ali, A., Alessandro, M.S., Iorizzo, M., Senalik, D.A., Simon, P.W. 2011. Microsatellite isolation and marker development in carrot - genomic distribution, linkage mapping, genetic diversity analysis and marker transferability across *Apiaceae*. *BMC Genomics*, 12: 386.

Chen, H.1. , Xie, W., He, H., Yu, H., Chen, W., Li, J. et al. 2014. A high-density SNP genotyping array for rice biology and molecular breeding. *Mol Plant.*, 7(3): 541-53.

Cho, K.S., Yang, T.J., Hong, S.Y., Kwon, Y.S., Woo, J.G., Park, H.G. 2006. Determination of cytoplasmic male sterile factors in onion plants (*Allium cepa* L.) using PZR-RFLP and SNP markers. *Molecules and Cells*, 21: 411-417

Chung, Y.S., Choi, S.C., Jun, T.H., Kim, C. 2017. Genotyping-by-sequencing: a promising tool for plant genetics research and breeding. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*,58(5):425-431.

Çelik, D. 2014. Havuç bitkisinde sitoplazmik genetik erkek kısırlığı kontrol eden hücre çekirdeğinde yer alan genlerin genetik haritasının AFLP markırları kullanılarak belirlenmesi. *Yüksek Lisans Tezi*, UÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Bursa.

Deschamps, S., Campbell, M.A. 2010. Utilization of next generation sequencing platforms in plant genomics and genetic variant discovery. *Mol Breed*, 25:553-570.

Deschamps, S., Llaca, V., 2012. Genotyping-by-Sequencing in Plants., *Biology1*, 460-483.

Echt, C.S., Knapp, S., Liu, B.H. 1992. Genome mapping with non-inbred crosses using GMendel 2.0. *Maize Genetics COOP. Nwsl.*, 66: 27-29.

Ellison, S., Iorizzo, M., Senalik, D., Simon, P.W. 2017. The next generation of carotenoid studies in carrot. *Acta Horticulturae*, 1153: 93-100.

Elshire, R.J., Glaubitz, J.C., Sun, Q., Poland, J.A., Kawamoto, K., Buckler, E.S., et al. 2011. A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. *PLoS ONE*, 6(5):e19379.

- Feng, X., Keim, D., Wanjugi, H., Coulibaly, I., Fu, Y., Schwarz, J., Huesgen, S., Cho, S. 2015.** Development of molecular markers for genetic male sterility in *Gossypium hirsutum*. *Molecular Breeding*, 35(6):141.
- Fuiji, S., Shiroto, Y. 2019.** Molecular identification of the causal locus for the petaloid phenotype in *Daucus carota*. *Breed Sci.*, 69(1): 186-188.
- Futterer, J., Gisel, V., A., Iglesias, A., et al. 1995.** Standard Molecular Techniques for the Analysis of Transgenic Plants. *Gene Transfer to Plants*, 215-263.
- Geddy, R., Brown, G.G. 2007.** Genes encoding pentatricopeptide repeat (PPR) proteins are not conserved in location in plant genomes and may be subject to diversifying selection. *BMC Genomics*, 8: 130.
- Gore, M., Bradbury, P., Hogers, R., Kirst, M., Verstege, E., van Oeveren, J., et al. 2009.** Evaluation of target preparation methods for single-feature polymorphism detection in large complex plant genomes. *Crop Science.*, 47: 135-148.
- Gökçe, A.F., McCallum, J., Sato, Y., Havey, M.J., 2002.** Molecular tagging of the *Ms* locus in onion. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 127: 576-582.
- Gulyas, G., Pakozdi, K.J., Lee, S., Hirata, Y. 2006.** Analysis of fertility restoration by using cytoplasmic male-sterile red pepper (*Capsicum annuum* L.) lines. *Breeding Science*, 56: 331-334.
- Günay, A. 2005.** Sebze Yetiştiriciliği Cilt II. Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, İzmir, 531 s.
- Günel, T. 2007.** Gen Anlatımının Kantitatif Analizi "Real-Time PCR". *Turkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 27(5): 763-767.
- Ha, B.K., Boerma, H.R. 2008.** High-throughput SNP Genotyping by Melting Curve Analysis for Resistance to Southern Root-knot Nematode and Frogeye Leaf Spot in Soybean. *Journal of Crop Science and Biotechnology*, 11(2): 91-100.
- Hagihara, E., Itchoda, N., Habu, Y., Iida, S. 2005.** Molecular mapping of a fertility restorer gene for Owen cytoplasmic male sterility in sugar beet. *Theoretical and Applied Genetics*, 111(2): 250-5.
- Han, Y., Kang, Y., Torres-Jerez, I., Cheung, F., Town, C.D., Zhao, P.X., Udvardi, M.K., Monteros, M.J. 2011.** Genome-wide SNP discovery in tetraploid alfalfa using 454 sequencing and high resolution melting analysis. *BMC Genomics*, 12:350.
- Havey, M.J. 2004.** The use of cytoplasmic male sterility for hybrid seed production. Chapter 23. *Molecular Biology and Biotechnology of Plant Organelles*. p. 623-634.

He, J., Zhao, X., Laroche, A., Lu, Z.X., Liu, H., Li, Z. 2014. Genotyping-by-sequencing (GBS), an ultimate marker-assisted selection (MAS) tool to accelerate plant breeding. . *eCollection*, 5:484.

Heywood, V.H. 1983. Relationship and evolution in the *Daucus carota* complex. *Israel Journal of Botany*, 32: 51-65.

Hussain, S.M., Hussain, K., Farwah, S, Rizvi, Seerat, Rashid, Majid, Sana Saleem, Andrabi N., Rashid H. 2018. Male sterility in vegetable crops. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 7(3): 3390-3393.

Iorizzo, M., Senalik, D.A., Grzebelus, D., Bowman, M., Cavagnaro, P.F., Matvienko, M., Ashrafi, H., Van Deynze, A., Simon, P.W. 2011. De novo assembly and characterization of the carrot transcriptome reveals novel genes, new markers, and genetic diversity. *BMC Genomics*, 12: 389.

Iorizzo, M., Senalik, D., Ellison, S., Grzebelus, D., Cavagnaro, P.F., Allender, C., Brunet, J., Spooner, D., Van Deynze, A., Simon, P.W. 2013. Genetic structure and domestication of carrot (*Daucus carota* subsp. *sativus*) (*Apiaceae*). *American Journal of Botany*, 100(5): 930-938.

Iorizzo, M., Ellison, S., Senalik, D., Zeng, P., Satapoomin, P. et. al. 2016. A high-quality carrot genome assembly. provides new insights into carotenoid accumulation and asterid genome evolution. *Nat Genet.*, 48(6): 657-66.

Jordan, D.R., Mace, E.S., Henzell, R.G., Klein, P.E., Klein, R.R. 2010. Molecular mapping and candidate gene identification of the Rf2 gene for pollen fertility restoration in sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. *Theor Appl Genet.*, 120(7): 1279-87.

Just, B. J., Santos, C.A., Yandell, B. S., Simon, P.W. 2009. Major QTL for carrot color are positionally associated with carotenoid biosynthetic genes and interact epistatically in a domesticated × wild carrot cross. *Theoretical and Applied Genetics*, 119(7): 1155-69.

Just, B.J., Santos, C.A., Fonseca, M.E., Boiteux, L.S., Oloizia, B.B., Simon, P.W. 2007. Carotenoid biosynthesis structural genes in carrot (*Daucus carota*): isolation, sequence-characterization, single nucleotide polymorphism (SNP) markers and genome mapping.

Kalia, P., Mangal, M., Singh, S., Chugh, C., Mishra, S., Chaudhary, S. 2019. Morphological and molecular changes on cytoplasmic male sterility (CMS) introgression in Asiatic carrot (*Daucus carota* L.). *Planta*, 250(2) :507-518.

Karaağaç, O., Balkaya, A. 2009. Sebzelelerde erkek kısırılığı mekanizmasından yararlanılarak F1 hibrit tohum üretimi. *Anadolu Tarım Bilim. Derg.*, 24(2): 114-123.

Kazama, T., Toriyama, K., 2003. A pentatricopeptide repeat-containing gene that promotes the processing of aberrant atp6 RNA of cytoplasmic male-sterile rice. *FEBS Letters*. 544: 99-102.

Klein, D., 2002. Quantification using real-time PZR technology: Applications and limitations. *Trends in Molecular Medicine*, 8: 257-260.

Koizuka, N., Imai, R., Fujimoto, H., Hayakawa, T., Kimura, Y., Kohno-Murase, J., Sakai, T., Kawasaki, S., Imamura, J. 2003. Genetic characterization of a pentatricopeptide repeat protein gene, orf687, that restores fertility in the cytoplasmic male-sterile Kosena radish. *Plant J.*, 34:407-415.

Komori, T., Ohta, S., Murai, N., Takakura, Y., Kuraya, Y., Suzuki, S., Hiei, Y., Imaseki, H., Nitta, N. 2004. Map-based cloning of a fertility restorer gene, *Rf-1*, in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant J.*, 37(3):315-25.

Kosambi, D.D. 1944. The Estimation of Map Distances from Recombination Values. *Annals of Eugenics*, 12: 172-175.

Kumar, L.S. 1999. DNA markers in plant improvement: An overview. *Biotechnology Advances*, 17: 143-182.

Kumar, L.S. 2000. Male sterility: mechanisms and current status on identification, characterization and utilization in vegetables. *Veg. Sci.* 27(1): 1-23.

Kumar, L.S. 2013. Male Sterility in Vegetables. Olericulture-I: Fundamentals of Vegetable Production. Editörler: Nair, B., Singh, K.P., Chand, P. Scientific Publishers, India.431-439.

Kumar, S., Banks, T.W., Cloutier, S. 2012. SNP discovery through next-generation sequencing and its applications. *International Journal of Plant Genomics*

Kwonga, K.M., Tamb, C.C., Chanc, R., Stephen, W.L. Leed, P. Ipe, Clinica Chimica. 2018. Comparison of single nucleotide polymorphism genotyping of CYP2C19 by loop-mediated isothermal amplification and real-time PCR melting curve analysis. *Acta*, 478: 45-50.

Laferriere, L., Gabelman, W.H. 1968. Inheritance of color, total carotenoids, alpha-carotene, and beta-carotene in carrots, *Daucus carota* L. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science*, 93: 408-418.

Lander, E.S., Green, P., Abrahamson, J., Barlow, A., Daly, M.J., Lincoln, S.E., Newberg, L.A. 1987. MAPMAKER, An interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics*, 1: 174-181.

- Liao, P.Y., Lee, K. H. 2010.** From SNPs to functional polymorphism: The insight into biotechnology applications *Biochemical Engineering Journal*, 49(2): 149-158.
- Liu, B. 1998.** Statistical Genomics: Linkage, Mapping, and QTL Analysis. CRC Press; New York:
- Liu, P.C., Lin, Y.L. Lin, C.N. Su, B.L. 2016.** A SimpleProbe® real-time PCR assay for differentiating the cytochrome b M121I mutation in clinical specimens from dogs infected with *Babesia gibsoni*. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 7:639-643.
- Lombardi, M., Materne, M., Cogan, N. O., Rodda, M., Daetwyler, H. D., Slater, A. T., et al. 2014.** Assessment of genetic variation within a global collection of lentil (*Lens culinaris* Medik) cultivars and landraces using SNP markers. *BMC Genet.*, 15: 150.
- Matsuda, R., Iehisa, J.C., Takumi, S. 2012.** Application of real-time PCR-based SNP detection for mapping of *Net2*, a causal D-genome gene for hybrid necrosis in interspecific crosses between tetraploid wheat and *Aegilops tauschii*. *Genes Genet. Syst.*, 87:137-143.
- Metzker, M.L. 2010.** Sequencing technologies — the next generation. *Nature Reviews Genetics*, 11: 31–46.
- Morelock, T.E., Simon P.W., Peterson C.E. 1996.** Wisconsin Wild: Another petaloid Molecular mapping of vernalization requirement and fertility restoration genes in carrot *Theor Appl Genet.*, 126: 415–42.
- Nakajima, Y., Yamamoto, T., Muranaka, T., Oeda, K. 1999.** Genetic variation of petaloid male-sterile cytoplasm of carrot revealed by sequence tagged sites (STSs). *Theor. Appl. Genet.*, 99: 837-843.
- Nie, H., Evans, A.A., London, W.T., Block, T.M., Ren, X.T. 2011.** Quantification of complex precore mutations of hepatitis B virus by Simple Probe real time PCR and dual melting analysis. *Journal of Clinical Virology* 51:230-236.
- Nothnagel, T., Straka, P. 2003.** Inheritance and mapping of a yellow leaf mutant of carrot (*Daucus carota*). *Plant Breeding*, 122(4):339-342.
- Nothnagel, T., Straka, P., Linke, B., 2000.** Male sterility in populations of *Daucus* and the development of alloplasmic male-sterile lines of carrot. *Plant Breeding* 119: 145-152.
- Nothnagel, T., Ahne, R., Straka, P. 2005.** Morphology, inheritance and mapping of a compressed lamina mutant of carrot. *Plant Breeding*, 124(5): 481-486.
- Ongom, P.O., Adeyanju, A., Gobena, D., Rich, P., Ejeta, G. 2016.** Sorghum MAGIC population: structure and potential for genetics research and breeding. Proc. of the: Plant

and Animal Genome Conference, International Plant & Animal Genome, San Diego, CA. P0859.

Oraguzie, N.C., Rikkerink, E.H.A, Gardiner, S.E., De Silva, H.N. 2007. Association mapping in Plants. Springer Science Business Media, New York, 95.

Önder, S., Paylan, İ.C., Gümüş, M. 2016. Comparison of Conventional RT-PCR and Real-time RT-PCR Assays for Diagnosis of Grapevine fanleaf nepovirus (GFLV). *J. Turk. Phytopath.*, 45(2-3), 53-62.

Özsensoy, Y., Kurar, E. 2013. Genetik Bağlantı Analizi ve Uygulama Alanları. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 10(1): 53-62.

Robison, M.M., Wolyn, D.J. 2006. Petaloid-type cms in carrot is not associated with expression of atp8 (orfB). *Theor Appl Genet.*, 112(8): 1496-502.

Ronfort, J., P. Saumitou-Laprade & J. Cuguen, 1995. Mitochondrial DNA diversity and male sterility in natural populations of *Daucus carota* ssp *carota*. *Theor Appl Genet*, 91: 150–159

Rong, J., Lammers, Y., Strasburg, J.L., Schidlo, N.S., Ariyurek, Y., Jong, T.J., Smulders, M.J.M., Vrieling, K. 2014. New insights into domestication of carrot from root transcriptome analyses. *BMC Genomics*, 15,895.

Rowe, H.C., Renaut, S., Guggisberg, A. 2011. RAD in the realm of next-generation sequencing technologies. *Mol Ecol*, 20 (1): 3499-3502.

Rubatzky, V.E., Quiros, C.F, Simon, P.W. 1999. Carrots and Related Vegetable Umbelliferae. Wallingford, CT: CAB International, 2-9.

Santos, C., Simon, P.W. 2002. QTL analyses reveal clustered loci for accumulation of major provitamin A carotenes and lycopene in carrot roots. *Molecular Genetics and Genomics* 268(1):122-9.

Santos, C., Simon, P.W. 2004. Merging carrot linkage groups based on conserved dominant AFLP markers in F2 populations. *J. Amer. Soc. Hortic. Sci.nal of applied genetics*, 38: 28-32.

Sarcan, O. 2018. SNP moleküler işaretlerine dayalı havuç genetik haritasının geliştirilmesi. *Yüksek Lisans Tezi*. UÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Bursa.

Schaad, N.W., Frederick, R.D. 2002. Real-time PZR and its application for rapid plant disease diagnostics. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 24(3): 250-258.

Scheben, A., Batley, J., Edwards, D. 2017. Genotyping by sequencing approaches to characterise crop genomes: choosing the right tool for the right application. *Plant Biotechnology Journal*, 15: 149-161.

Schulz, B. Westphal, L., Wricke, G. 1994. Linkage groups of isozymes, RFLP and RAPD markers in carrot (*Daucus carota* L. sativus). *Euphytica*, 74: 67-76.

Semagn, K., Bjørnstad, Å., Ndjiondjop, M.N. 2006. Principles, requirements and prospects of genetic mapping in plants. *African Journal of Biotechnology*, 5(25): 2569-2587.

Shebaby, W.N., El-Sibai, M., Smith, K.B., Karam, M.C., Mroueh, M., Daher, C.F. 2013. The antioxidant and anticancer effects of wild carrot oil extract. *Phytotherapy Research*, 27(5): 737-744.

Shigyo, M., Kik, C., 2008. Onion. Handbook of Plant Breeding. Vegetables II Fabaceae, Liliaceae, Solanaceae, and Umbelliferae. 121-162.

Silva Dias, J.C. 2014. Nutritional and health benefits of carrots and their seed extracts. *Food and Nutrition Sciences*, 5: 2147-2156.

Sofi, P.A., Rather, A.G., Wani, S.A. 2007. Genetic and molecular basis of cytoplasmic male sterility in maize. *Communications in Biometry and Crop Science*, 2(1):49-60.

Sonah, H., Bastien, M., Iquira, E., Tardivel, A., Légaré, G., Boyle, B., Normandeau, É., Laroche, J., Larose, S., Jean, M., Belzile, F. 2013. An improved genotyping by sequencing (GBS) approach offering increased versatility and efficiency of SNP discovery and genotyping. *PLoS One*. 8(1): e54603.

Song, F.S., Ni, J.L., Qian, Y.L., Li, L., Ni, D.H., Yang, J.B. 2016. Development of SNP-based dCAPS markers for identifying male sterile gene *tms5* in two-line hybrid rice. *Genet Mol Res.*, 15(3). doi: 10.4238/gmr.15038512.

Spindel, J., Wright, M., Chen, C. 2013. Bridging the genotyping gap: Using genotyping by sequencing (GBS) to add high-density SNP markers and new value to traditional bi-parental mapping and breeding populations. *Theoretical and Applied Genetics*, 126(11): 1537:1544.

Stolarczyk, J., Janick, J. 2011. Carrot: History and iconography. *Chronica Horticulturae*, 51(2):13-18.

Struckmeyer, B.E., Simon, P.W. 1986. Anatomy of fertile and male-sterile carrot flowers from different genetic sources. *J. Amer.Soc.Hort.Sci.*, 111: 965-968.

Suiter, K.A., Wendel, J.F., Case, J.S. 1983. Linkage-1, A pascal computer program for the detection and analysis of genetic linkage. *J. Hered.*, 74: 203- 204.

Sun, T., Simon, P.W., Tanumihardjo, S.A. 2009. Antioxidant phytochemicals and antioxidant capacity of biofortified carrots (*Daucus carota* L.) of various colors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(10): 4142-4147.

Tan, G.F., Wang, F., Zhang X.Yue., Xiong A. S. 2018. Different lengths, copies and expression levels of the mitochondrial atp6 gene in male sterile and fertile lines of carrot (*Daucus carota* L.), *Mitochondrial DNA Part A*, 29(3): 446-454.

Tathoğlu, T. 2008. Hibrid çeşit ıslahı ve hibrid çeşit ıslahında kullanılan genetik mekanizmalar. VII. Sebze Tarım Sempozyumu, 2008, Yalova.

Truong, H.T., Ramos, A.M., Yalcin, F., Ruiter, M. et al. 2012. Sequence-based genotyping for marker discovery and co-dominant scoring in germplasm and populations. *Plos One*, 7(5): e37565.

Umiel, N., Gabelman, W.H. 1972. Inheritance of root color and carotenoid synthesis in carrot, *Daucus carota* L.: Orange vs. red. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 97: 453-460.

Van Ooijen, J.W., Voorrips, R.E. 2001. “JoinMap 3.0, Software for the Calculation of Genetic Linkage Maps,” Plant Research International, Wageningen

Van Ooijen, J.W., Voorrips, R.E. 2006. JoinMap 4.0, Software for the Calculation of Genetic Linkage Maps. *Plant Research International*, Wageningen

Varshney, R.K., Nayak, S., Jayashree, B., Eshwar, K., Upadhyaya, H.D., Hoisington, D.A. 2007. Development of cost-effective SNP assays for chickpea genome analysis and breeding. *SAT eJournal*, 3: 1–3.

Vignal A., Milan, D., Cristobal, M.S., Eggen, A. 2002. Review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genetics Selection Evolution*, 34(3):275-305.

Villano, C., Esposito, S., Carucci, F. Iorizzo, M. 2018. High-throughput genotyping in onion reveals structure of genetic diversity and informative SNPs useful for molecular breeding. *Molecular Breeding*, 39(1).

Vivek, B.S., Simon, P.W. 1999. Linkage relationships among molecular markers and storage root traits of carrot (*Daucus carota* L. ssp. sativus). *Theoretical and Applied Genetics*, 99(1):58–64.

Wang, G. L, Chang, T., Zhi-Sheng, Wang, Feng, Xiong, Ai-Sheng. 2016. Comparison of nine reference genes for real-time quantitative PZR in roots and leaves during five developmental stages in carrot (*Daucus carota* L.). *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology Journal*, 91(3): 264-270.

Ward, J. A., Bhangoo, J., Fernandez-F., Moore, F., Swanson, P. et al. 2013. Saturated linkage map construction in *Rubus idaeus* using genotyping by sequencing and genome-independent imputation. *BMC Genomics*, 14: 2.

Welch, J.E., Grimball, E.L. 1947. Male sterility in carrot. *Science*, 106(2763): 594.

Westphal, L., Wricke, G. 1991. Genetic and linkage analysis of isozyme loci in *Daucus carota* L. *Euphytica*, 56: 259–267.

Westphal, L., Wricke G. 1997. Construction of a linkage map of *Daucus carota* L. sativus and its application for the mapping of disease resistance and restorer genes. *J. Appl. Genet.* 38A: 13-19.

Wolyn, DJ, Chahal, A. 1998. Nuclear and cytoplasmic interactions for petaloid male-sterile accessions of wild carrot (*Daucus carota* L.). *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 123: 849-853.

Yıldız, M. 2009. Havuçlarda antosiyanin sentezlenmesini etkileyen genlerin biyosentezi ile mor ve sarı renkleri veren *p1* ve *y2* genlerinin haritalanması. *Doktora Tezi*, ÇÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Adana.

Yıldız, M., Willis, D.K., Cavagnaro, P.F., Iorizzo, M., Abak K., Simon P.W. 2013. Expression and mapping of anthocyanin biosynthesis genes in carrot. *Theor Appl Genet.*, 126: 1689–1702.

Yongming, L., Zhuofan, Z., Yanli, L., Chuan, L. Jing, W., Boxiao, D., Bing, L., Tao, Q., Wenbing, Z., Moju, C. 2016. A preliminary identification of Rf-A619, a novel restorer gene for CMS-C in maize (*Zea mays* L.). *PeerJ*, 4(4):e2719.

Yue, B., Vick, B.A., Cai, X., Hu, J. 2010. Genetic mapping for the Rf1 (fertility restoration) gene in sunflower (*Helianthus annuus* L.) by SSR and TRAP markers. *Plant Breeding*, 129: 24–28.

Zipper, H., Brunner, H., Bernhagen, J., Vitzthum, F. 2004. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Res.*, Jul 12;32(12):e103

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Sevin TEOMAN DURAN
Doğum Yeri ve Tarihi : İstanbul- 07.11.1985
Yabancı Dil : İngilizce

Eğitim Durumu

Lise : Fenerbahçe Süper Lisesi, İstanbul- 2004
Lisans : Bursa Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe
Bitkileri Bölümü- 2010
Yüksek Lisans : Bursa Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü- 2013
Doktora : Bursa Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü,
2013-

Çalıştığı Kurum/Kurumlar : Bursa Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü,
2011-

İletişim (e-posta) : sevinteoman@uludag.edu.tr

Yayınları

:

Sivritepe H.Ö., Şentürk B., Teoman S. 2015. Biber tohumlarında yapılan organik priming ve kurutma uygulamaları fide kalitesi ve performansını iyileştirmektedir. *Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 29(2):83-94.

Sivritepe H.Ö., Şentürk B., Teoman S. 2015. Electrical conductivity tests in maize seeds. *Advances in Plants & Agriculture Research*, 2(7): 1-2.

Teoman S., İpek M., Ertürk Ü.,Tangu NA.,Durgut E., Barut E.,Ercişli S., İpek A. 2017. Assessment of genetic relationship among male and female fig genotypes using simple sequence repeat (SSR) markers. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*. 45(1):172-178.

BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
TEZ ÇOĞALTMA VE ELEKTRONİK YAYIMLAMA İZİN FORMU

Yazar Adı Soyadı	Sevin TEOMAN DURAN
Tez Adı	Havuç (<i>Daucus carota</i> L.) Bitkisinde <i>Rf</i> lokusu ile Bağlantılı SNP Moleküler İşaretleyicilerin GBS Yöntemi Kullanılarak Belirlenmesi ve Doğrulanması
Enstitü	Fen Bilimleri
Anabilim Dalı	Bahçe Bitkileri
Tez Türü	Doktora
Tez Danışman(lar)ı	Prof.Dr. Ahmet İPEK
Çoğaltma (Fotokopi Çekim) izni	<input type="checkbox"/> Tezimden fotokopi çekilmesine izin veriyorum <input type="checkbox"/> Tezimin sadece içindekiler, özet, kaynakça ve içeriğinin % 10 bölümünün fotokopi çekilmesine izin veriyorum <input checked="" type="checkbox"/> Tezimden fotokopi çekilmesine izin vermiyorum
Yayımlama izni	<input type="checkbox"/> Tezimin elektronik ortamda yayımlanmasına izin veriyorum

Hazırlamış olduğum tezimin belirttiğim hususlar dikkate alınarak, fikri mülkiyet haklarım saklı kalmak üzere Bursa Uludağ Üniversitesi Kütüphane ve Dokümantasyon Daire Başkanlığı tarafından hizmete sunulmasına izin verdiğimi beyan ederim.

Tarih : 17.09.2019

İmza :

