

**HAVUÇ BİTKİSİNDE SİTOPLAZMİK GENETİK
ERKEK KISIRLIĞI KONTROL EDEN HÜCRE
ÇEKİRDEĞİNDE YER ALAN GENLERİN GENETİK
HARİTASININ AFLP MARKIRLARI
KULLANILARAK BELİRLENMESİ**



T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HAVUÇ BİTKİSİNDE SİTOPLAZMİK GENETİK ERKEK KISIRLIĞI
KONTROL EDEN HÜCRE ÇEKİRDEĞİNDE YER ALAN GENLERİN
GENETİK HARİTASININ AFLP MARKIRLARI KULLANILARAK
BELİRLENMESİ**

Destan ÇELİK

Doç. Dr. Ahmet İPEK
(Danışman)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

Bursa-2014

Her Hakkı Saklıdır

TEZ ONAYI

Destan Çelik tarafından hazırlanan “Havuç bitkisinde sitoplazmik genetik erkek kısırlılığı kontrol eden hücre çekirdeğinde yer alan genlerin genetik haritasının AFLP markırları kullanılarak belirlenmesi ” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Doç. Dr. Ahmet İPEK

Başkan: Doç. Dr. Ahmet İPEK
Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi,
Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

İmza

Üye: Prof. Dr. Hatice GÜLEN
Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi,
Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

İmza

Üye: Prof. Dr. F. Sezai TÜRKEK
Uludağ Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi,
Moleküler Genetik Anabilim Dalı

İmza

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Ali Osman DEMİR
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.

27/08/2014

İmza

Destan Çelik

ÖZET
Yüksek Lisans Tezi

**HAVUÇ BİTKİSİNDE SİTOPLAZMİK GENETİK ERKEK KISIRLIĞI
KONTROL EDEN HÜCRE ÇEKİRDEĞİNDE YER ALAN GENLERİN
GENETİK HARİTASININ AFLP MARKIRLARI KULLANILARAK
BELİRLENMESİ**

Destan ÇELİK
Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı
Danışman: Doç. Dr. Ahmet İPEK

Bu araştırmada hücre çekirdeğinde bulunan ve havuçta sitoplazmik genetik erkek kısırlığı kontrol eden Restorers of fertility (*Rf*) genlerinin genetik haritasının AFLP (amplified fragment length polymorphism - çoğaltılmış parça uzunluğu farklılığı) markırları kullanılarak çıkarılması amaçlanmıştır. Araştırma kapsamında iki haritalama popülasyonu kullanılmıştır. Popülasyonların çiçek yapıları incelenmiş ve taze yaprak örneklerinden DNA izolasyonu yapılmıştır.

Birinci haritalama popülasyonundan 96 havuç bitkisinin çiçek yapısı incelenmiş ve bunlardan 37 bitkinin erkek kısır 59 bitkinin ise erkek fertil olduğu belirlenmiştir. Bu verilerle yapılan Ki-kare testine göre hücre çekirdeğinde bulunan erkek kısırlık genlerinin açılım oranının 9:7 olduğu tespit edilmiştir ($p = 0,30$). F2 popülasyonundaki bu açılım oranı, havuçta petalioid tipi sitoplazmik genetik erkek kısırlığının iki genle kontrol edildiğini göstermektedir. İkinci haritalama popülasyonundan 160 havuç bitkisinin çiçek yapısı incelenmiştir. 124 bitkinin erkek fertil ve 36 bitkinin ise erkek kısır olduğu tespit edilmiştir. Ki-Kare testine göre hücre çekirdeğinde bulunan erkek kısırlık geni 3:1 oranında açılım göstermektedir ($p = 0,47$). Bu sonuca göre HP2 popülasyonunda hücre çekirdeğinde bulunan erkek kısırlık genlerinden sadece birinin açılım gösterdiği belirlenmiştir.

Yapılan AFLP analizlerinde HP1 popülasyonundan 8 adet erkek kısır ile 8 adet erkek fertil bitki ve HP2 popülasyonundan ise yine 8 adet erkek kısır ile 8 adet erkek fertil bitki seçilmiştir. 16 adet erkek kısır ve 16 adet erkek fertil bitki kullanılarak 225 AFLP primer kombinasyonun analizi tamamlanmıştır. Her iki popülasyonda da sadece erkek fertil bitkilerde çoğalan 2 AFLP bandı 2 primer kombinasyonu belirlenmiştir. Bunlardan birincisi Markır-1 olarak adlandırılmış ve EACT-MCAT primer kombinasyonunda tespit edilmiştir. Markır-1 erkek kısır bitkilerin sadece birinde çoğalmış ve erkek fertil bitkilerin ikisinde çoğalmamıştır. Diğer AFLP markırı ise Markır-2 olarak adlandırılmış ve EATA-MCTG primer kombinasyonunda belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Havuç, erkek kısırlık, *Rf* genleri, hibrit tohum üretimi, AFLP markırları, genetik haritalama

2014, vii, 64 sayfa.

ABSTRACT
MSc Thesis

**MAPPING NUCLEAR GENES CONTROLLING CYTOPLASMIC GENETIC
MALE STERILITY IN CARROT USING AFLP MARKERS.**

Destan Çelik

Uludağ University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Horticulture

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ahmet İPEK

The purpose of this research was to map carrot nuclear *Rf* genes using AFLP (amplified fragment length polymorphism) markers. In this study, two segregating carrot populations were used. Their flower structure was determined and the DNA samples were isolated from fresh leaves of each plant. In the first F₂ carrot population segregating for male sterility was composed of 96 plants and 37 of those plants were male sterile while 59 plants were male fertile. According to chi-square test results fit to 9:7 Mendelian segregation ratio (p value=0,30) (male fertile: male sterile) indicated that two genes were segregating and male fertility is dominant.

In second population, 160 carrot plants were segregating for male sterility. 124 plants were male fertile while 36 plants were male sterile. According to chi-square test, this result fits 3:1 Mendelian segregation ratio (p value=0,47) (male fertile: male sterile) suggesting that only single gene was segregating and male fertility is dominant.

Eight male sterile and eight male fertile plants from first population and eight male sterile and eight male fertile plans from second population were chosen for the AFLP analysis. 225 AFLP primer combination were analyzed by using 16 male sterile and 16 male fertile plants.

In two primer combination, two AFLP bands amplified only in male fertile plants but were not amplified in male sterile plants indicating possible association with male sterility in carrot. First AFLP amplified DNA fragment was called Markır-1 and it was amplified with EACT-MCAT primer combination. While these AFLP amplified DNA fragment was present only in one male sterile plant, it did not amplified in two of male fertile plants. Other AFLP amplified DNA fragment was called Markır-2 and it was amplified by primer combination of EATA-MCTG.

Keywords: Carrot, male sterility, *Rf* genes, hybrid seed production, AFLP markers, genetic mapping

2014, vii, 64 pages.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın her aşamasında bilgi ve tecrübesinden yararlandığım, her konuda yardım ve desteğini esirgemeyen danışman hocam Sayın Doç. Dr. Ahmet İPEK'e ve Doç. Dr. Meryem İPEK'e teşekkürlerimi sunarım.

Tez İzleme Komitesi üyesi değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Hatice GÜLEN'e, Sayın Prof. Dr. F. Sezai TÜRKEL'e, Sayın Prof. Dr. Köksal YAĞDI'ya ve Doç. Dr. Mehmet ÖZGÜR'e teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim süresince başta tez çalışmam olmak üzere bana her konuda destek olan Sayın Zeynep ALPAY'a ve Pelin SIKICI'ya teşekkür ederim.

Eğitim hayatım boyunca her zaman beni destekleyen annem Türkan ÇELİK'e ve babam Hasan ÇELİK'e sonsuz teşekkür ederim.

111O119 No'lu proje olarak bu çalışmayı destekleyen TÜBİTAK-TOVAG'a teşekkür ederim.

Destan Çelik

27/08/2014

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
KISALTMALAR DİZİNİ.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	7
2.1. Havuçta Sitoplazmik Genetik Erkek Kısırlık Tipleri	7
2.2. Havuçta Yapılan Moleküler Çalışmalar.....	9
2.3. Yapılan Diğer Moleküler Çalışmalar.....	9
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	11
3.1. Materyal.....	11
3.2. Yöntem.....	13
3.2.1. Haritalama popülasyonlarının elde edilmesi.....	13
3.2.1.1. Tohum ekimi.....	13
3.2.1.2. Havuç köklerinin hasat edilmesi.....	13
3.2.1.3. Vernalizasyon ihtiyacının karşılanması.....	14
3.2.1.4. Havuç köklerinin tekrar araziye dikimi.....	14
3.2.1.5. Yaprak örneklerinin alınması.....	17
3.2.1.6. Tohumların hasat edilmesi.....	17
3.2.2. Moleküler çalışmalar.....	18
3.2.2.1. DNA örneklerinin elde edilmesi.....	18
3.2.2.2. AFLP analizi.....	19
3.2.2.3. DNA'ların restriksiyon enzimleri (MseI ve Eco R I) ile kesilmesi.....	19
3.2.2.4. Adaptörlerin bağlanması.....	20
3.2.2.5. Ön seçici çoğaltma	20
3.2.2.6. Seçici çoğaltma	21
3.2.2.7. Gümüş nitrat boyama	25
3.2.2.8. AFLP bantlarının poliakrilamid jelden kesilmesi ve izole edilmesi	27
3.2.2.9. DNA-AFLP bantlarının tekrar çoğaltılması	27
3.2.2.10. Bantların agaroz jelden izole edilmesi	28
3.2.2.11. TAIL PCR	29
4. BULGULAR.....	33
4.1. Çiçek Yapılarının Belirlenmesi	33
4.2. DNA İzolasyonu	38
4.3. AFLP Markırlarının Belirlenmesi	46
4.3.1. AFLP markırlarının karakterizasyonu	48
4.3.1.1. Markır-1'in karakterizasyonu	48
4.3.1.2. Markır-2'nin karakterizasyonu	52
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	55
KAYNAKLAR	58
ÖZGEÇMİŞ.....	64

SİMGE ve KISALTMALAR

Simgeler

°C

μl

β

Açıklama

Santigratderece

Mikrolitre

Beta

Kısaltmalar

AFLP

bç

cm

cM

DNA

EDTA

FAO

HP1

HP2

kb

ml

ng

PCR

QTL

STS

TAIL

Açıklama

Amplified Fragment Length Polymorphism

Baz çifti

Santimetre

Centimorgan

Deoksiribo Nükleik Asit

Etilen daimin tetraasetik asit

Food and Agriculture Organization of United Nation

Haritalama popülasyonu 1

Haritalama popülasyonu 2

Kilo baz

Mililitre

Nanogram

Polymerase Chain Reaction

Quantitative Trait Locus

Sequence Tagged Sites

Thermal Asymmetric Interlaced

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. A) erkek fertile (normal) ve B) Petaloid tipi erkek kısır havuç çiçeklerinin fotoğrafı.....	8
Şekil 3.1. A) Havuç tohumlarını ekmek üzere toprağın hazırlanması, B) Ekim sonrası toprağın sulanması.....	13
Şekil 3.2. Hasat edilen havuç bitkileri.....	14
Şekil 3.3. Araziye dikilen havuç köklerinden büyüyen bitkilerinin arazideki gelişimi A) Köklerin araziye dikiminden sonra büyüyen havuç bitkileri B) çiçek sürgünü gelişmeye başlamış bitki, C) primer şemsiyesi gelişmiş bitki D) primer şemsiyesi tam çiçeklenme döneminde olan bitki.....	15
Şekil 3.4. Havuç bitkilerinden bir görüntü A) Delnet izolasyon torbaları ile izole edilmiş havuç bitkileri, B) Melezleme yapılan havuç bitkileri.....	16
Şekil 3.5. Kendileme yapılarak Delnet izolasyon torbası ile izole edilmiş havuç bitkisi.....	17
Şekil 4.1. Erkek kısır ve erkek fertil çiçekler. A) Erkek fertil B) Erkek kısır havuç bitkilerinin çiçek şemsiyeleri C) Erkek fertil D) Erkek kısır çiçeklerin mikroskop altındaki görüntüsü.....	37
Şekil 4.2. HP1 popülasyonlarından elde edilen DNA örneklerinin agaroz jelde görünümü.....	44
Şekil 4.3. HP2 popülasyonlarından elde edilen DNA örneklerinin Agaroz jelde görünümü.....	45
Şekil 4.4. EACT-MCAT primer kombinasyonunda belirlenen Markır-1.....	47
Şekil 4.5. EATA-MCTG primer kombinasyonunda belirlenen Markır-2.....	47
Şekil 4.6 A) Gümüş boyama ile görüntülenmiş Markır-1'in Poliakrilamit jel fotoğrafı. B) Markırın DNA bantları jelden kesildikten sonra çekilmiş fotoğrafı.....	48
Şekil 4.7. Poliakrilamit jelden kesildikten sonra tekrar çoğaltılan Markır-1'in agaroz jel fotoğrafı.....	49
Şekil 4.8. Markır-1'in DNA dizisinin havuç genomuna ait DNA dizileri ile karşılaştırılması.....	50
Şekil 4.9 TAIL-PCR ile çoğaltılan Markır-1'in EcoRI kesim ucuna bitişik DNA parçalarının agaroz jeldeki görünümü (P3/D5 primerlerine reaksiyon sonuçları).....	51
Şekil 4.10 TAIL-PCR ile çoğaltılan Markır-1'in havuç genomuna ait DNA dizileri ile karşılaştırılması.....	51
Şekil 4.11 Markır-2'nin tekrar çoğaltıldıktan sonra agaroz jeldeki görünümü.....	52
Şekil 4.12 Havuç genomunun 1. Kromozomunda Markır-2'nin bulunduğu bölge.....	53
Şekil 4.13 Markır-2'nin DNA dizisinin havuç genomundaki DNA dizileri ile eşleşmesi.....	54

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 3.1 Seçici çoğaltmada kullanılan MseI primerleri.....	22
Çizelge 3.2 Seçici çoğaltmada kullanılan EcoRI primerleri.....	23
Çizelge 3.3. AD (Arbitrary Degenerate) Primer sekansları.....	29
Çizelge 4.1. Çiçek yapıları incelenen HP1 popülasyonuna ait bitkilerin listesi.....	33
Çizelge 4.2. Çiçek yapıları incelenen HP2 popülasyonuna ait bitkilerin listesi.....	35
Çizelge 4.3. HP1 ve HP2 popülasyonlarına ait ki-kare testi sonuçları.....	38
Çizelge 4.4. Yaprak örneklerinden elde edilen DNA örneklerinin konsantrasyonu.....	39

1. GİRİŞ

Havuç (*Daucus carota* L.) *Apiaceae* familyasında yer alan iki yıllık otsu bir sebze türüdür. Anavatanının Afganistan'ında içinde yer aldığı Orta Asya olduğu ve buradan dünyaya yayıldığı kabul edilmektedir (Safadi 2008, Lucier ve Biing 2007).

Havuç dünyada geniş alanlarda üretilen bir sebzedir. Birleşmiş Milletlerin alt kuruluşu olan Gıda ve Tarım Örgütünün (FAO / Food and Agriculture Organization) 2009 yılı istatistiklerine göre dünyada 28 milyon tondan fazla havuç üretilmektedir. Dünyadaki en önemli üretici ülkeler ise sırasıyla Çin, Rusya, Amerika Birleşik Devletleri, Özbekistan ve Polonya'dır. Türkiye ise dünyada 11. sırada yer almaktadır.

Havuç birçok ülkede olduğu gibi Türkiye'de de severek tüketilen ve sağlığa faydaları tüketiciler tarafından bilinen bir sebzedir. Türkiye istatistik Kurumu'nun 2013 yılı istatistik verilerine göre ülkemizde havuç üretimi 108 000 dekarlık alanda yapılmış ve bu üretim faaliyetinden 568 000 ton havuç üretilmiştir. Bu havuç üretimi yoğun olarak Konya (344 000 ton) ve Ankara (131 000 ton) illerinde yapılmaktadır. 60 000 tonluk havuç üretimiyle Hatay ilimizde önemli bir havuç üreticisi il olmuştur. Üretilen bu havuç, iç pazarda daha çok taze olarak tüketilmekte ya da yemeklerde kullanılmaktadır. Buna ek olarak, konservelerde, havuç suyu üretiminde, tatlı yapımında da kullanılmaktadır.

Havuç, karotenin ilk izole edildiği sebze olup A vitamininin ön maddesi olan β -karotenin en önemli kaynaklarından biridir. Karotenoidlerce zengin olan havucun bazı kanser türlerinin, kalp-damar hastalıklarının, katarakt ve görme bozukluğu gibi hastalıkların görülme sıklığını azalttığı ve bağışıklık sistemini güçlendirdiği bilinmektedir (Abdel-Aal ve ark. , 2013; Shebaby ve ark. , 2013; Shipra ve Hooper, 2011). Günümüzde birçok kişi günlük olarak düzenli vitamin desteği almaktadır. Yüksek dozlarda alınan A vitamini insanlar için toksiktir ve öldürücü olabilmektedir (Grune ve ark. 2010). Ancak havuç tüketimiyle birlikte vücuda alınan β -karoten insanlar için toksik değildir. Çünkü vücuda alınan β -karoten vücutta enzimler yardımı ile kesilerek 2 molekül A-vitaminine dönüştürülmektedir (Tee 1992)

Vücut A-vitaminine ihtiyaç duymadığı zamanlarda enzimlerini bloke etmekte ve β -karotenin A-vitaminine dönüşmesini engelleyerek kendisini korumaktadır. Bu nedenle, insanların A vitaminini β -karoten olarak alması kendileri için toksik olmayacaktır. Günlük olarak A-vitaminin alınması yerine A-vitamiini ihtiyacının havuç tüketilerek β -karotenden sağlanması daha sağlıklı olacaktır (<http://lokman-hekim.net/vitamin/avitamini.asp>). Havuç üretiminin dolayısıyla daha fazla havucun tüketilmesinin teşvik edilmesi sağlıklı bir beslenme için önemlidir.

Dünyada yetiştirilen havuçlar genellikle β -karoten içeren turuncu renkli havuçlar olmasına rağmen antosiyanin içeren mor havuçlar, likopen içeren kırmızı havuçlar, ksantofil içeren sarı havuçlar ve pigment içermeyen beyaz havuçlar da bulunmaktadır (Maçkeviç 1951). Ülkemizde 10-20 cm uzunluğunda uçları küt, silindirik yapıya sahip dünyada ‘nantes’ olarak bilinen turuncu havuçlar yetiştirilmektedir. Adana ve çevresindeki illerde ise mor renkli havuçlar şalgam suyu yapımı için üretilmektedir. Buna ek olarak, son yıllarda Konya’nın Ereğli ilçesi ve çevresinde mor renkli havuçlar antosiyanin ekstraksiyonu için üretilmektedir.

Ülkemizde havuç üretimi büyük oranda hibrit tohum kullanılarak yapılmaktadır. Havuç üretiminde hibrit tohumun tercih edilmesinin en büyük nedeni ise hibrit havuç çeşitlerin verim artışı sağlaması, şekil, tat ve renk yönünden tekdüze havuçların üretilmesine izin vermesidir. Yüksek oranda yabancı tozlanma gösteren havuç gibi sebze türlerinde hibrit tohumların üretilmesinde zorluklar yaşanmaktadır. Özellikle havuç gibi erselik çiçek yapısına sahip yabancı tozlanan bitkilerde kontrollü melezleme yapabilmek için emaskülasyon yapmaya ihtiyaç vardır. Çiçek yapılarının küçük ve melez başına elde edilen tohum sayılarının az olması havuç gibi bitki türlerinde büyük alanlarda hibrit tohum üretimi maliyetini artırmaktadır. Bu nedenle erkek kısırlığı, bitki ıslahçıları ve hibrit tohum üreticilerinin en çok arzuladığı özelliklerin başında gelmektedir (Tathoğlu 2008).

Havuç çiçeklerinin küçük olması her çiçekte en fazla iki tohum elde edilmesi ve çok sayıda çiçeğin şemsiye şeklinde bir arada olması nedeniyle emaskülasyon yaparak hibrit

havuç tohumu üretmek pratik ya da ekonomik olarak mümkün olmamaktadır. Bu nedenle hibrit havuç tohumu üretiminde erkek kısırlıktan faydalanma yoluna gidilmiştir.

Havuç iekleri erselik iek yapısına sahiptir ve her çiçekte 5 çanak yaprak, 5 taç yaprak, 5 erkek organ vardır. Yumurtalık iki gözlü olup her gözde birer tohum bulunur. Havuç iekleri protandri gösterdiği için yüksek oranda yabancı tozlanmaktadır fakat iek kümesi içindeki çiçeklerin hepsi aynı anda olgunlaşmadığı için aynı iek kümesi içinde yer alan farklı çiçekler veya farklı iek kümelerinde bulunan çiçekler birbirini tozlayabildiği için kendileme olmaktadır. Bu nedenle ekonomik olarak hibrit havuç tohumu üretebilmek için sitoplazmik genetik erkek kısırlık kullanılmak zorunludur (Welch ve Grimal 1947; Banga ve ark. 1964).

Erkek kısırlığı, erkek organların fonksiyonel olmaması sonucunda canlı polenlerin oluşmamasıdır. Kalıtsal olan erkek kısırlık oluşumu, ya kromozomlar üzerindeki bazı genler ya sitoplazma ya da sitoplazma ve hücre çekirdeğindeki genlerin etkileşimi ile kontrol edilmektedir (Budar ve Pelletier 2001). Bu erkek kısırlık tipleri sırasıyla genetik erkek kısırlığı, stoplazmik erkek kısırlığı ve sitoplazmik genetik erkek kısırlığı olarak adlandırılmaktadır.

Genetik erkek kısırlığı, genellikle resesif bir gen çifti tarafından idare edilmekte ve “msms” şeklinde sembolize edilmektedir. Bu tip erkek kısırlığı, biber, soğan ve domates gibi sebze türlerinde tespit edilmiştir (Virmani ve Ahmed 2001). Bu sistemde “msms” genetik yapısına sahip kısır bitkilerin kendini dlleyememesi sonucu saf yapıda olan erkek kısır popülasyon retilenmemektedir. Kısır bitkilerin yeniden retilbilmesi için “Msms” genotipindeki bitkilerle tozlanmakta ve elde edilen bitkiler teker teker kontrol edildikten sonra fertil olan erkek bitkiler araziden uzaklaştırılmaktadır. Geriye kalan kısır bitkiler ise hibrit tohum üretiminde ana ebeveyn olarak kullanılmaktadır. Fertil bitkilerin uzaklaştırma zorluğu nedeniyle, bu kısırlık sisteminin sebze ıslahında kullanımı yaygın değildir (Ying ve ark. 2003).

Stoplazmik erkek kısırlığı, doğrudan doğruya stoplazma tarafından meydana getirilmektedir. Normal stoplazma (N), kısırlığı meydana getiren stoplazma ise (S) ile gösterilmektedir. “S” stoplazmayı taşıyan bitkiler, “erkek kısır” olup yabancı tozlama

olduğu takdirde tohum oluşumu sağlanabilmektedir. Kısır stoplazma, fertil olan stoplazmaya dominant durumda olması nedeniyle oluşan melez tohumların stoplazmaları her zaman kısır olmaktadır. Yani stoplazmik erkek kısırlığın kalıtımı sadece ana bitki tarafından sağlanmaktadır. Sebzelerde F1 hibrit tohumluk üretiminde sadece vejetatif organları tüketilen türlerde uygulanmakta olan bir sistemdir. Özellikle baş lahana, brokkoli, turp, Çin lahanası ve karnabahar sebzelerinde günümüzde en çok kullanılan polinasyon kontrol yöntemi stoplazmik erkek kısırlığı sistemidir (Fang ve ark. 2004).

Üçüncü tip erkek kısırlık ise havuç bitkisinde de görülen sitoplazmik genetik erkek kısırlıktır. Bu sistemde ise hem çekirdek hem de sitoplazmada bulunan genlerin interaksiyonu sonucunda erkek kısırlığı oluşmaktadır. Sitoplazma, genlerin homozigot resesif olduğu durumda etkisini göstermektedir. Sitoplazma tipi “S” ve çekirdekte bulunan genler “*rfrf*” yapıda bulundukları durumda “erkek kısırlığı” oluşmaktadır (Gulyas ve ark. 2006). Stoplazmik-genetik erkek kısırlığı sisteminin uygulanması için ıslah programında A, B, ve C olarak adlandırılan 3 hattın mevcut olması gerekmektedir. A hattı (S, *rfrf*), dişi ebeyen olarak kullanılan erkek kısır olan bitkilerdir. Tohumluk üretiminde sadece bu bitkilerden tohum eldesi mümkündür. B hattı (N, *rfrf*) ise genetik ve morfolojik yönden A hattına benzemekle birlikte aralarındaki fark, B hattının fertil çiçeklere sahip olmasıdır. B hattı, “maintainer”, “sürdürücü” veya “idame hat” olarak da tanımlanmaktadır. C hattı, tohumluk üretiminde “baba” olarak kullanılmakta ve “restorer hat” olarak da adlandırılmaktadır (Shigyo ve Kik 2008). *Rf* genlerine bağlantılı DNA moleküler markırlarının belirlenmesi ise hibrit havuç tohumu üretimi için gerekli olan erkek kısır ana hatların ve bu hatların çoğaltılmasını sağlayan idameci hatların geliştirilmesini hem kolaylaştıracak hem de hızlandıracaktır.

Polimer zincir reaksiyonun (PCR) bulunmasından sonra DNA markırları kullanılarak gen etiketleme, genetik haritalama, harita temelli tarımsal açıdan önemli genlerin belirlenmesi, genetik çeşitlilik çalışmaları, filogenetik analizler, markırlar yardımıyla seleksiyon çalışmaları kolaylaşmıştır (Joshi ve ark. 2000).

İdeal bir moleküler markır tekniğinin;

1. Polimorfik olması ve bütün genomda kullanılması,
2. Genetik farklılıkların ortaya çıkarılmasında yeterli olması,
3. Çok sayıda, bağımsız ve güvenilir markırlar üretmesi,
4. Basit, hızlı ve ucuz olması,
5. Az miktar DNA veya doku ihtiyacı gerektirmesi,
6. Farklı fenotiplerle bağlantı oluşturmaya gibi özelliklere sahip olması istenir.

Havuçta genetik haritalama çalışmalarında en yaygın ve etkili olarak kullanılan moleküler markır sistemlerinden birinin AFLP markırları olduğu gösterilmiştir. AFLP markırları kullanılarak havuç genleri başarı ile haritalanmıştır (Bradeen ve Simom, 1998; Santos ve Simon, 2002; Nothnagel ve Straka 2003; Nothnagel ve ark. 2005).

AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), RFLP tekniğinin etkinliği ile PCR temelli teknikleri birleştiren bir yöntemdir ve restriksiyon enzimleriyle parçalanan ve 80–500 bp büyüklüğünde elde edilen DNA parçacıkları adaptörlerle ligasyona maruz bırakılıp en son basamakta PCR ile seçici çoğaltım uygulanır (Vos ve ark. 1995). Bu teknikte genomik DNA önce birisi altı, diğeri dört bazı tanıyan iki kesim enzimi tarafından kesilir. Kesilen parçaların ucuna nükleotid dizisi bilinen sentetik adaptör DNA'lar eklenir. Eklenen sentetik adaptörün nükleotid dizisini de taşıyan primer DNA'lar kullanımıyla spesifik DNA çoğaltımı yapılır. Bu çoğaltım iki aşamada gerçekleştirilir. İlk aşamada her iki uçtan DNA kesim enzimlerinin tanıdığı diziden sonraki ilk nükleotide göre seçici çoğaltım yapıldığı ön çoğaltım yapılır. Asıl çoğaltımda ön çoğaltımda elde edilen parçaların kullanımıyla kesim enzimi tanıma yerinden sonraki ikinci ve üçüncü nükleotidler için seçici çoğaltım yapılır. Bütün başlatıcılar sentetik uçların nükleotid dizilişini de taşıdığı için üretim çoğaltım spesifik şartlarda yapılmış olur (Zabeau 1993)

AFLP gibi yaygın olarak kullanılan DNA markırlarının birçok avantajı vardır. Bunlar;

1. Çevre faktörlerinden etkilenmezler,
2. Çekirdek ve farklı kalıtım şekline sahip kloroplast ve mitokondri gibi organel genomlar ayrı ayrı çalışılabilir,
3. Genetik değişiklikleri daha fazla yansıttıkları için daha az pleiotrofikdir (bir genin birden fazla karakteri kontrol etmesi),
4. Her bir ebeveynden gelen farklı karakterler tespit edilebildiği için bitkilerin genetik orijini tespit edilebilir,
5. Çok sayıda moleküler primer elde edilebilir. Bu primerlerin kullanılmasındaki amaç, bireyler (tür, çeşit, hat, vb.) arasındaki DNA seviyesindeki farklılığın ortaya çıkarılmasıdır.

Bu araştırmada, havuçta hibrit tohum üretiminde kullanılan sitoplazmik genetik erkek kısırlığı kontrol eden çekirdek genlerine bağlantılı DNA markırlarının geliştirilmesi amaçlanmıştır. Havuçta sitoplazmik genetik erkek kısırlığı kontrol eden *Rf* genlerine bağlantılı DNA markırlarının geliştirilmesi ülkemizin açık tozlanan popülasyon ve yerel çeşitlerinin bu markırlarla taranmasını sağlayacaktır. Açık tozlanan popülasyon ve yerel çeşitlerimizde sitoplazmik genetik erkek kısırlığı kontrol eden *Rf* genlerinin çekinik allellerinin varlığının belirlenmesi bu çeşitlerin hibrit çeşitlere dönüştürülmesini kolaylaştıracaktır. Havuç üretiminde kullanılan hibrit tohumların tamamı yurt dışından ithal edilmektedir (<http://www.atonet.org.tr/yeni/index.php?p=1720&l=1>). Açık tozlanan popülasyon ve yerel havuç çeşitlerimizin hibrit çeşitlere dönüştürülmesi ülkemizin hibrit tohum üretiminde dışa bağımlılığını azaltabilecektir.

Buna ek olarak, bu DNA markırları sitoplazmik genetik erkek kısırlığı sağlayan çekirdek genlerinin yeni ıslah hatlarına aktarılması bu genlerin çekinik gen olmasından dolayı çok zor olmaktadır. Sitoplazmik genetik erkek kısırlığı kontrol eden çekirdek genlerine bağlantılı DNA markırlarının geliştirilmesi, bu genlerin markır yardımıyla seleksiyon yöntemi ile yeni ıslah hatlarına aktarılmasını hem kolaylaştıracak hem de gerekli zamanı kısıltacaktır.

Sonuç olarak sitoplazmik genetik erkek kısırlığı kontrol eden *Rf* genlerine bağlantılı DNA markırların geliştirilmesi hem dünya literatürüne önemli bir katkı sağlayacak hem de yerel ve açık tozlanan çeşitlerimizin hibrit çeşitlere dönüştürülmesine yardımcı olacaktır. Ülkemizin hibrit havuç tohumunda dışa bağımlılığını azaltarak ülkemizin ekonomisine önemli katkılar yapacaktır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

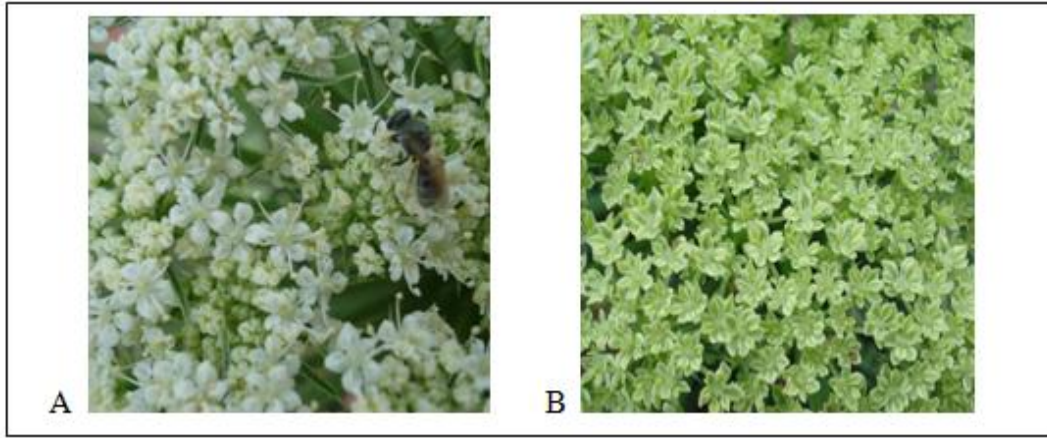
2.1. Havuçta Sitoplazmik Genetik Erkek Kısırlık Tipleri

Ülkemizde havuç üretimi büyük oranda hibrit tohum kullanılarak yapılmaktadır. Havuç üretiminde hibrit tohumun tercih edilmesinin en büyük nedeni verim artışı sağlaması ve şekil, tat ve renk yönünden tekdüze havuçların üretilmesidir. Ülkemizde havuç üretimi için yaklaşık 20 ton tohum kullanılmakta ve bu kullanılan havuç tohumu miktarının 2 tonu açık tozlanan popülasyon çeşitlerden oluşurken kalan 18 tonu hibrit çeşitlerin tohumudur.

Hibrit havuç tohumu üretiminde kullanılan metotlar sitoplazmik genetik erkek kısırlığı üzerine kurulmuştur. Havuçta iki farklı sitoplazmik genetik erkek kısırlık tanımlanmıştır. Bunlardan biri ‘brown anther’ (kahverengi anter) diğeri ise ‘petaloid’ tipi sitoplazmik genetik erkek kısırlıktır. Her iki sitoplazmik genetik erkek kısırlık tipi de hibrit havuç tohumu üretiminde kullanılmaktadır. ‘Brown anther’ sitoplazmik genetik erkek kısırlık tipinde mayoz bölünmenin son aşamasında bloke edildiğinden anterler gelişmemekte ve büzülmüş kahverengi bir şekil almaktadır (Welch ve Grimbald 1947; Banga ve ark. 1964). Mayoz bölünme tamamlanamadığından polen üretilmemektedir. Bu sitoplazmik genetik erkek kısırlık tipi birçok kültürü yapılan havuç çeşitlerinde ve yabani havuç popülasyonlarında görülmüştür (Ronfort ve ark. 1995).

Diğer sitoplazmik genetik erkek kısırlık tipinde ise stamenler (erkek organlar) petala (taç yaprak) benzeyen yapılara dönüştüğü için ‘petaloid’ ismi verilmiştir (Struckmeyer ve Simon, 1986) (Şekil 2.1 A,B). Bu sitoplazmik genetik erkek kısırlık tipinde anterler

hiç oluşmadığı için polen üretilmemektedir. Petaloid çiçeklere sahip havuç bitkileri ilk olarak Thomsom (1961) ve daha sonra McCollum (1966) tarafından yabancı havuç popülasyonlarında görülmüştür. Günümüzde ‘Wisconsin’, ‘Cornell’ ve ‘Guelph’ olmak üzere 3 farklı petaloid sitoplazma tanımlanmıştır (Morelock ve ark. 1996; Wolyn ve Chahal 1998; Nothnagel ve ark. 2000). Bu sitoplazmik genetik erkek kısırlık geriye melezleme yöntemi ile birçok kültürü yapılan havuç çeşitlerine hibrit tohum üretimi için aktarılmıştır. 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. Yapılan araştırmalar ‘brown anther’ ve ‘petaloid’ havuçların sitoplazmasının birbirinden farklı olduğunu ortaya koymuştur (Pingitore ve ark 1989; Ronfort ve ark. 1995). Ancak havuçta tanımlanan ‘Wisconsin’, ‘Cornell’ ve ‘Guelph’ petaloid tipi sitoplazmaların ya birbirine çok yakın olduğu ya da genetik olarak birbirinin aynı olduğu belirlenmiştir (Morelock ve ark. 1996; Wolyn ve Chahal 1998).



Şekil 2.1. A) Erkek fertile (normal) ve B) Petaloid tipi erkek kısır havuç çiçeklerinin fotoğrafı

Yapılan araştırmalar, brown anter sitoplazmaya sahip bitkilerde erkek kısırlığın ortaya çıkmasına çekirdekte bulunan ya homozigot çekinik *Ms5* allellerinin ya da *Ms4* genin bir dominant allelinin neden olduğunu ortaya çıkarmıştır (Hansche ve Gabelman 1963; Banga 1964).

Wolyn ve Chahal (1998) ‘Wisconsin’, ‘Cornell’ ve ‘Guelph’ petaloid sitoplazmalarını kullanarak yaptıkları çalışmada çekirdekte yer alan ve genetik kısırlığı kontrol eden iki

adet *Rf* geni belirlemişlerdir. Yazarlar, bu genlerden sadece birinin dominant allelinin polen üretimi (normal çiçekler) için yeterli olduğunu tespit etmişlerdir. Brown anther ve petaloid sitoplazmalar birbirinden farklı olduğu için bu sitoplazmaların *Rf* gen ya da genlerinin farklı olduğu belirtilmiştir.

2.2. Havuçta Yapılan Moleküler Çalışmalar

Son yıllarda havuçta sitoplazmik genetik erkek kısırlık üzerine yapılan moleküler çalışmalar kısır (S) sitoplazmalar üzerine yoğunlaşmıştır. Petaloid tipi kısır sitoplazma, çiçek yapısından daha kolay belirlenebildiği için ve son yıllarda hibrit havuç tohumu üretiminde daha çok kullanıldığı için petaloid sitoplazmayı (steril) normal (fertil) sitoplazmadan ayıran mitokondrial DNA markırları geliştirilmiştir (Nakajima ve ark. 1999; Bach ve ark. 2002). Nakajima ve ark. (1999) petaloid steril sitoplazmayı fertil normal sitoplazmadan ayıran 6 adet mitokondrial STS (Sequence Tagged Sites) markırı geliştirdiklerini belirtmişlerdir. Bach ve ark. (2002) steril petaloid sitoplazmayı fertil normal sitoplazmadan ayırmak için havuç mitokondrisinin genomunda yer alan genlerin nükleotid sekansları üzerinde çalışmışlardır. Yazarlar, *atp1*, *atp6*, *atp9*, *atp8*, *nad6*, ya da *cob* genlerinin nükleotid dizilerinden petaloid sitoplazmayı normal sitoplazmadan ayıran PCR'a dayalı 14 adet markır geliştirmişlerdir. Ancak Robinson ve Wolyn (2006) *atp8* genin ifadesinin petaloid sitoplazmik genetik erkek kısırlığıyla ilişkisinin olmadığını belirlemişlerdir.

2.3. Yapılan Diğer Moleküler Çalışmalar

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 et al. 2003; Brown et al. 2003; Desloire et al. 2003), çeltik (Kazama ve Toriyama 2003; Komori ark. 2004; Akagi ve ark. 2004), ve şeker pancarı (Hagihara ve ark. 2005) gibi birçok bitki türünde klonlanmıştır. Bu çalışmalar, *Rf* genlerinin 'pentatricopeptide repeat; PPR' proteinini kodladığını ortaya çıkarmıştır. PPR proteinlerinin hücrede RNA'nın işlenmesi ve transkripsiyonun başlaması üzerine etkili olduğu belirlenmiştir. Bu proteinler hem protein hem de RNA

moleküllerine spesifik olarak bağlandığı literatürde belirtilmektedir (Geddy ve Brown 2007). PPR proteinlerinin bu özelliğinden dolayı erkek kısırlığa neden olan mitokondrial proteinlerin birikimini engellediği düşünülmektedir. Ancak son yıllarda yapılan çalışmalar ise daha çok *Rf* genlerinin haritalanması üzerine yoğunlaşmıştır. Islah çalışmalarını kolaylaştırması nedeniyle 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 markırlar kullanılarak çıkartılmıştır.

Amplified fragment length polymorphisms (AFLP) markır sistemi Vos ve ark. (1995) tarafından geliştirilmiş ve günümüzde bitkilerde genetik haritalama çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Bitkilerde polimorfik AFLP markırı sayısının çok olması, çalışılan bitki türü üzerinde daha önceden yapılan bir moleküler çalışmaya gerek duyulmaması, her bitki türünde uygulanabilir olması, tekrarlanabilir olması nedeniyle güvenilir bir markır türü olması, bir reaksiyonda 50-100 adet markırın kolaylıkla analizinin yapılabilmesi nedeniyle markır başına maliyetin düşük olması ve bitki genomunda eşit olarak dağılması AFLP markırlarının en büyük avantajlarıdır. Bu markır türünün en büyük dezavantajı ise dominant markır olmasıdır. AFLP markırları bu özelliklerinden dolayı havuç bitkisinde yapılan genetik haritalama çalışmalarında en çok tercih edilen markırlardan biri olmuştur. AFLP markırları havuçta karoten birikimine neden olan Y2 lokusunun haritalanmasında (Bradeen ve Simon 1998), karoten ve likopen içeriğini etkileyen QTL lokuslarının haritalanmasında (Santos ve Simon, 2002), sarı yaprak lokusunun haritalanmasında (Nothnagel ve Straka 2003) ve kompak yaprak lokusunun haritalanmasında (Nothnagel ve ark 2005) kullanılmıştır.

AFLP markır sistemi genetik haritalama çalışmalarında en çok tercih edilen markır sistemlerinden biri olmasına rağmen markır yardımı ile seleksiyon çalışmalarında çok tercih edilen bir markır sistemi değildir. AFLP markır sistemi, DNA'nın restriksiyon enzimleri ile kesimini, adaptörlerin bağlanmasını ve DNA'nın seçici olarak iki defa çoğaltıldıktan sonra poliakrilamit jelde analizinin yapılmasını gerektirdiğinden, AFLP markırları markır yardımı ile seleksiyon gibi kısa zamanda çok sayıda bitki genotipinin belirlenmesini gerektiren çalışmalarda tercih edilmemektedir. STS markırlarının

geliştirilmesi fikri ilk defa Olson ve ark. (1989) tarafından ortaya konulmuştur. Daha sonra AFLP markırlarının da kullanımı daha kolay olan STS markırlarına dönüştürülmesi tercih edilmiştir (Bradeen ve Simom, 1998; Meksem ve ark. 2001; Tezuka ve ark. 2009; Juergens ve ark. 2010; Kang ve ark. 2010; Kubo ve ark. 2010). AFLP markırlarından STS markırlarının geliştirilmesi için öncelikle AFLP markırının bulunduğu DNA bölgesinin nükleotid dizileri belirlenmektedir. Belirlenen nükleotid dizileri kullanılarak 200-500bp bir DNA parçasını çoğaltan primerler tasarlanmaktadır. Bu primerler kullanılarak PCR'la çoğaltılan DNA agaroz jelde büyüklüğüne göre ayrıştırılarak STS markırlarının analizleri yapılmaktadır. Böylece AFLP markırının belirlediği DNA bölgesi kullanımı kolay polimorfik STS markırı ile işaretlenmiş olmaktadır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu araştırma 2012–2014 yıllarında Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümüne ait Biyoteknoloji ve Moleküler Biyoloji Laboratuvarlarında yürütülmüştür. Bu tez ‘Havuç bitkisinde sitoplazmik genetik erkek kısırlığı kontrol eden hücre çekirdeğinde yer alan genlerin genetik haritasının AFLP markırları kullanılarak belirlenmesi’ adlı TÜBİTAK projesinin bir bölümüdür (Proje no:1110119).

3.1. Materyal

Bitki materyali olarak iki havuç popülasyonu kullanılmıştır. Bu popülasyonlardan birincisi haritalama popülasyonu bir (HP1) diğeri ise haritalama popülasyonu iki (HP2) olarak adlandırılmıştır. Bu popülasyonlarda kullanılan bitkiler hibrit havuç tohumu üretiminde yaygın olarak kullanılan petaloid sitoplazmaya sahiptirler. Popülasyonlarda hücre çekirdeğinde bulunan havuçta sitoplazmik genetik erkek kısırlığı etkileyen *Rf* genleri açılım göstermektedir.

Haritalama popülasyonu 1 (HP1)

Bu popülasyonun elde edilmesi için önce erkek kısır olan bir bitki normal çiçeklere sahip başka bir fertil bitki ile melezlenerek F1 bitkiler elde edilmiştir. Daha sonra fertil

çiçeklere sahip bir F1 bitkisi kendilenerek F2 olan çiçek yapıları yönünden açılım gösteren HP1 elde edilmiştir. HP1 popülasyonu F2 popülasyonudur ve HP1 popülasyonun nasıl oluşturulduğu aşağıdaki şekilde verilmiştir.

Erkek kısır ana hat X Normal çiçeklere sahip fertil baba hat



Hepsi normal çiçeklere sahip F1 popülasyonu
(Bir tane F1 bitkisinin kendilenmesi)



F2 (*Rf* genlerinin açılım gösterdiği HP1)

Haritalama popülasyonu 2 (HP2)

F1 bitkilerinden normal çiçeklere sahip bir bitkinin kendilenmesi ile elde edilmiştir. Bu popülasyonun nasıl geliştirildiği aşağıdaki diyagramda gösterilmektedir.

Erkek kısır ana hat X Normal çiçeklere sahip baba hat



Hepsi normal çiçeklere sahip F1 popülasyonu
(Bir tane F1 bitkisinin kendilenmesi)



Açılım gösteren F2 popülasyonu

3.2. Yöntem

3.2.1. Haritalama popülasyonlarının elde edilmesi

3.2.1.1. Tohum ekimi

HP1 ve HP2 popülasyonlarına ait tohumlar araziye ekilerek kök gelişimi sağlanmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. A) Havuç tohumlarını ekmek üzere toprağın hazırlanması, B) Ekim sonrası toprağın sulanması

3.2.1.2. Havuç köklerinin hasat edilmesi

Hasat edilen havuçların yaprakları Şekil 3.2’de görüldüğü gibi kesilmiştir. Köklerin üzerinde bulunan toprak kalıntıları ve ölü yaprak dokuları temizlenip kök uçları kesildikten sonra 10-12 havuç kökü kağıt torbalara konulmuş ve üzerlerine bir avuç odun talaşı eklenmiştir. Kağıt torbalar katlanıp plastik torbalar için konulmuş ve plastik torbaların ağızları nem kaybını önlemek için sıkıca kapatılmıştır.



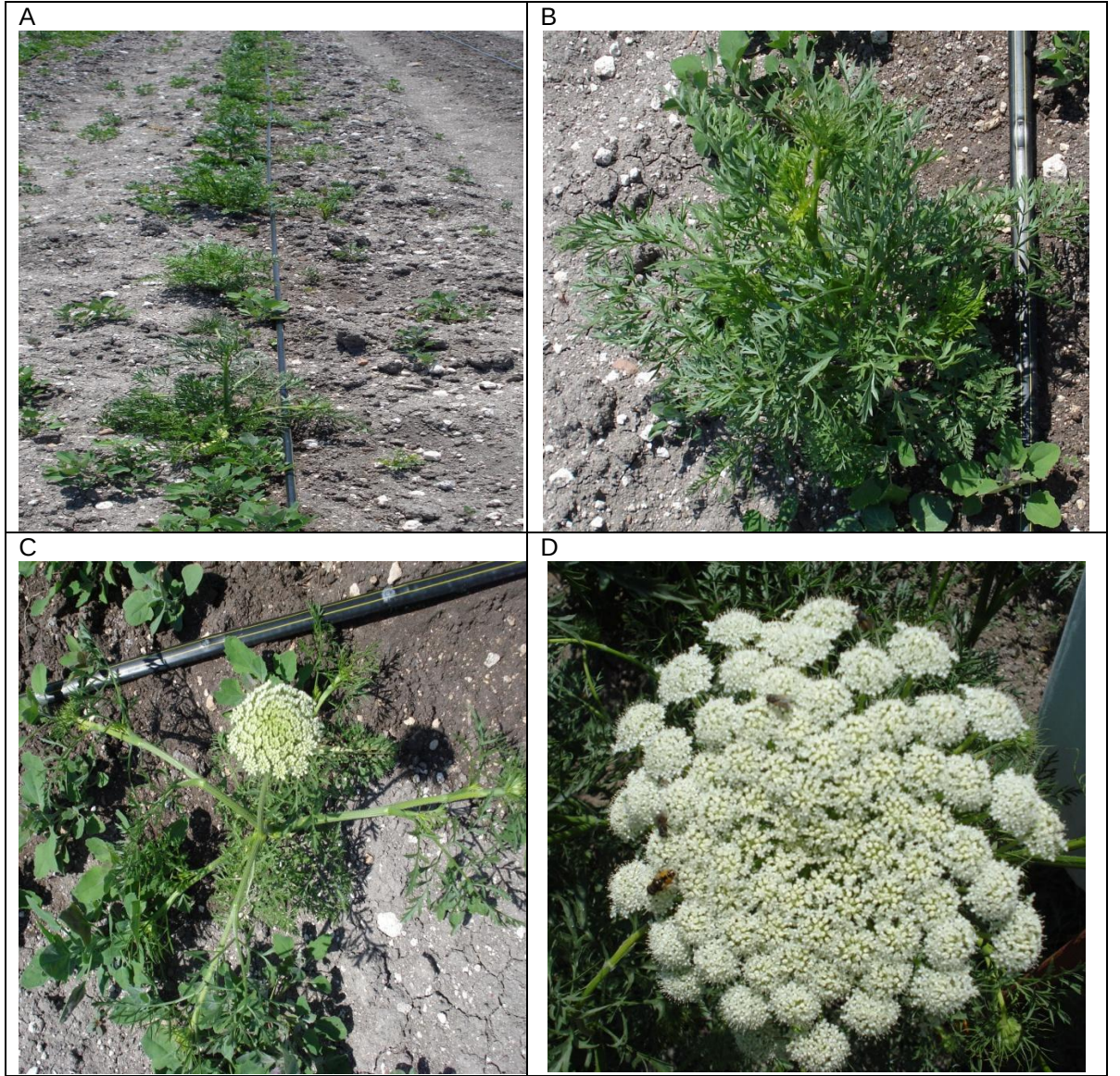
Şekil 3.2. Hasat edilen havuç bitkileri

3.2.1.3. Vernalizasyon ihtiyacının karşılanması

Hasat edilen havuç köklerinin vernalizasyon ihtiyacını karşılaması için $+4^{\circ}\text{C}$ sıcaklıktaki soğuk hava deposuna konulmuşlardır. Depodaki havuçlar haftada bir kez bazı torbalar açılarak durumları kontrol edilmiştir. Havuçlar $+4^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta 6-8 haftalık bir vernalizasyona ihtiyaç duymaktadır. Vernalizasyon işleminden sonra havuç kökleri tekrar araziye dikilerek popülasyonun geliştirilmesine devam edilmiştir.

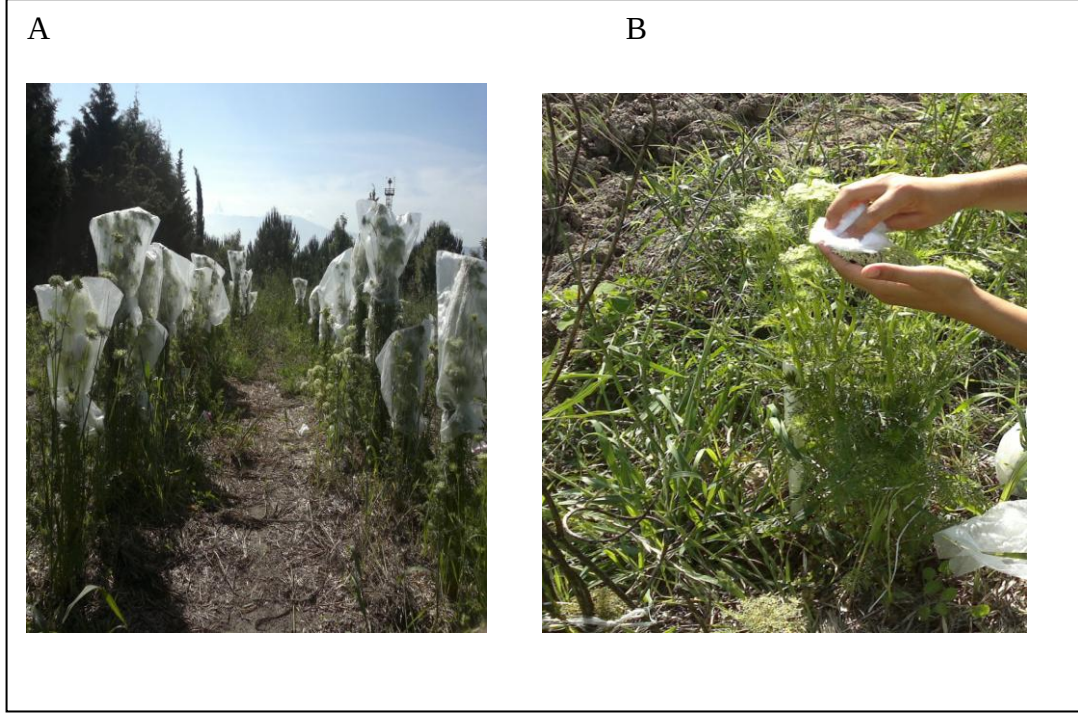
3.2.1.4. Havuç köklerinin tekrar araziye dikimi

Havuç kökleri Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi'nin araştırma uygulama arazisine dikilmişlerdir. Köklerin dikiminde herhangi bir seleksiyon yapılmamıştır. Dikilen havuç köklerinden gelişen bitkiler düzenli olarak damla sulama ile sulanmıştır. Dikimden 2 hafta sonra 15:15:15 (kompoze gübre; EGE Gübre, İzmir) tipi gübre ile beslenmiştir (Şekil 3.3. A,B,C,D).



Şekil 3.3. Araziye dikilen havuç köklerinden büyüyen bitkilerinin arazideki gelişimi. A) Köklerin araziye dikiminden sonra büyüyen havuç bitkileri, B) Çiçek sürgünü gelişmeye başlamış bir bitki, C) Primer şemsiyesi gelişmiş bir bitki ve D) Primer şemsiyesi tam çiçeklenme döneminde olan bir bitki

Yetiştirilen bu bitkiler tek tek Delnet (DelStar International, Ltd., Bristol, İngiltere) izolasyon torbaları ile izole edilmiş ve çiçeklenme dönemi boyunca pamuk kullanılarak her gün sabah elle tozlama yapılmıştır (Şekil 3.4. A,B).



Şekil 3.4. Havuç bitkilerinden bir görüntü A) Delnet izolasyon torbaları ile izole edilmiş havuç bitkileri, B) Melezleme yapılan havuç bitkileri

Kapatılan bitkilerin çiçek yapısı büyüteçle incelenerek çaprazlama yapılmıştır. Bunlara ek olarak HP1 ve HP2 popülasyonun her birinden normal çiçeklere sahip 32 bitki kendilenmiştir. Kendileme için çaprazlamada olduğu gibi bitkiler tek tek Delnet (DelStar International, Ltd., Bristol, İngiltere) izolasyon torbaları ile izole edilmiş ve çiçeklenme dönemi boyunca pamuk kullanılarak her gün sabah elle tozlama yapılmıştır (Şekil 3.5). Çiçek yapıları belirlenen bitkilerde aynı zamanda DNA izolasyonu için yaprak örnekleri toplanmıştır.



Şekil 3.5. Kendileme yapılarak Delnet izolasyon torbası ile izole edilmiş havuç bitkisi

3.2.1.5. Yaprak örneklerinin alınması

HP1 ve HP2 popülasyonlarına ait bütün bitkilerden DNA izolasyonu yapmak üzere yaprak örnekleri alınmıştır. Yaprak örnekleri sabahın erken saatlerinde alınmıştır. Yaprak örneği olarak en genç yapraklar tercih edilmiştir. Yapraklar alındıktan sonra laboratuvara götürülünceye kadar buz üzerinde saklanmıştır. Laboratuvara ulaştırılan örnekler liyofilizatöre konularak kurutulmuştur. Liyofilizatörde kurutma işlemi 5 gün sürmüştür. Kurutulan yaprak örnekleri DNA izolasyonu için kullanılıncaya kadar saklanmak için plastik torbalara konulmuş ve plastik torbalar sıkıca kapatıldıktan sonra -80°C saklanmıştır.

3.2.1.6. Tohumların hasat edilmesi

HP1 ve HP2 popülasyonuna ait bitki tohumlarının olgunlaşan çiçekleri kademeli olarak hasat edilmiş ve kağıt torbalara konulmuştur. Kağıt torbalar içindeki çiçekler laboratuvara getirilmiş ve laboratuvarında 2 hafta daha kurutulmuştur. Kağıt torbalar içinde kuruyan çiçekler üzerindeki tohumlar elle çiçek şemsiyelerinden ayrılmış ve elekler yardımı ile temizlendikten sonra tohum zarflarına konularak etiketlenmiştir.

3.2.2. Moleküler Çalışmalar

3.2.2.1. DNA örneklerinin elde edilmesi

DNA örneklerinin çıkarılması Fütterer ve ark. (1995) tanımladığı yönteme göre yapılmıştır.

Bu yöntem havuçta daha önce yapılan çalışmalarda da başarı ile kullanılmıştır (İpek ve ark. 2006). DNA izolasyonunda kullanılan protokol aşağıdaki gibidir:

1. Liyofilizatörde kurutulup -80°C 'ye kaldırılan örnekler oda sıcaklığına getirildikten sonra 75 mg tartılıp ardından RNaz ve DNaz'dan ari steril mikrosantrifüj tüplerine aktarılmıştır.
2. Yaprak örneklerinin parçalanması amacıyla santrifüj tüplerine 3 adet 6mm çapındaki cam boncuk ve 5 adet 3mm çapındaki cam boncuklardan konularak öğütücü yardımıyla örnekler öğütülmüştür.
3. Öğütülen örneklerin üzerine 1ml ekstraksiyon tamponu [50 mM Tris-HCl pH 8.0, 1% (w/v) CTAB, 50 mM Na₂EDTA, 0.7 M NaCl] eklenerek vorteksle karıştırılmıştır.
4. Örnekler 65°C 'deki su banyosunda 30 dakika inkübe edilmiştir, inkübasyon esnasında 10dk aralıklarla örnekler elle karıştırılmıştır.
5. Su banyosundan çıkarılan örneklerin üzerine 800 µl kloroform izoamilalkol (24:1) eklenip 5 dakika 16 000 g hızda santrifüj edilmiştir. Daha sonra tüpte meydana gelen sulu üst faz yeni 2 ml mikrosantrifüj tüplerine aktarılmıştır.
6. Fazın üzerine 80µl %10'luk CTAB tamponu ve 800µl CO tamponu eklenip karıştırılmıştır. Örnekler tekrar 16 000 g hızda 5 dakika santrifüj edildikten sonra sulu üst faz yeni 2 ml mikrosantrifüj tüplerine aktarılmıştır.
7. Tüplere aktarılan fazın üzerine 800µl çökeltme tamponu (PB) eklenip karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 30 dakika tutulmuştur.
8. Daha sonra 10 dakika 16 000 g hızda santrifüj edilerek DNA çökeltiştir.
9. Tüpteki sıvı döküldükten sonra çökelmiş DNA'lar 400µl 1M NaCl çözeltisi içerisinde tekrar çözülmüştür.
10. 400µl 1M NaCl içindeki DNA örnekleri üzerine 1 ml %96'lık etanol eklenip 20°C 'de bir gece tutulmuştur.

11. Ertesi gün DNA örnekleri 16 000 g hızda 10 dakika santrifüj edilerek DNA'lar tekrar çöktürülmüştür.
12. Tüplerdeki NaCl ve etanol karışımı dökülüp çökeltiye tekrar %70'lik etanol eklenerek DNA yıkanmıştır.
13. 16 000 g'de 5 dakika santrifüj yapıldıktan sonra etanol tüplerden dökülmüştür.
14. Tüpler kağıt havlular üzerine ters çevrilip konularak tüplerde yapışık kalan etanol uzaklaştırılmıştır. Daha sonra DNA'lar 100µl TE tamponu içinde tekrar çözölmüştür. DNA kalitesini ve konsantrasyonu Qubit flourometre (İnvitrogen) ile belirlendikten sonra DNA konsantrasyonları 50 ng/µl olacak şekilde TE tamponu ile ayarlanmıştır. DNA örnekleri kullanılıncaya kadar -80°C'de saklanmıştır.

3.2.2.2. AFLP analizi

Havuçta genetik haritalama çalışmalarında en yaygın ve etkili olarak kullanılan moleküler markır sistemlerinden birinin AFLP markırları olduğu gösterilmiştir. AFLP markırları kullanılarak havuç genleri başarı ile haritalanmıştır (Bradeen ve Simom, 1998; Santos ve Simon, 2002; Nothnagel ve Straka 2003; Nothnagel ve ark. 2005). Bu nedenle bu araştırmada da hücre çekirdeğinde sitoplazmik genetik erkek kısırlığa neden olan Rf genlerinin haritalanması için AFLP markırlarının kullanılması tercih edilmiştir. Bu analiz için AFLP Sistem 1 kiti (İnvitrogen) kullanılmıştır. AFLP analizi **enzim kesimi, adaptör bağlanması, ön çoğaltım ve seçici çoğaltım aşamaları** dikkate alınarak dört basamakta gerçekleştirilmiştir.

3.2.2.3. DNA'ların restriksiyon enzimleri (MseI ve Eco RI) ile kesilmesi

DNA (250ng) örneği, EcoRI ve MseI restriksiyon endonükleazları ile üretici firmanın aşağıda verilen yöntemine göre kesilmiştir. DNA üzerinde; MseI enzimi "TTAA", EcoRI enzimi ise "GAATTC" nükleotid dizisinden kesim yapmaktadır.

5X Reaksiyon tampon çözeltisi	2,5 µl
Eco R I+Mse I enzimi	1 µl
H ₂ O	3 µl
<u>DNA (250 ng/1 rxn)</u>	<u>6 µl</u>
Toplam	12,5 µl

Reaksiyonlar, DNA'ların kesilmesi için 37°C'de 3 saat süre ile bekletilmişlerdir. Daha sonra 70°C'de 15 dk tutularak restriksiyon enzimleri inaktif edilmiştir.

3.2.2.4. Adaptörlerin bağlanması

Restriksiyon endonükleazları ile kesilmiş olan çift iplikli DNA molekülüne adaptörlerin bağlanması ligasyon reaksiyonu ile gerçekleşmektedir. Adaptörler iki sarmal olarak hazırlanan ve nükleotid dizileri bilinen yapay oligonükleotidler olup *EcoRI* ve *MseI* enzimlerin kesim sekanslarını içermektedir. Kesilen DNA parçacıklarına adaptörler 20 °C'de 3 saat sürede tutularak bağlanmışlardır.

Adaptörleri bağlanması için kullanılan reaksiyonun bileşenleri aşağıdaki gibidir:

Adaptör bağlama solüsyonu	12 µl
(0.5 µM <i>EcoR</i> ve 5 µM <i>MseI</i> adaptör)	
T4 DNA ligase (10 u/ µl)	0,5 µl
<u>Kesilmiş DNA parçaları</u>	<u>12,5 µl</u>
Toplam	25 µl

3.2.2.5 Ön seçici çoğaltma

Ligasyon reaksiyonunun ardından, ön seçici çoğaltım (pre-amplification) işlemi PCR ile gerçekleştirilmiştir. Ön seçici çoğaltım reaksiyonunda kullanılan PCR reaksiyonun bileşenleri aşağıdaki gibidir.

<u>Ön seçici çoğaltma primer karışımı</u>	<u>(1ml)</u>
<i>EcoRI</i> preamp pri. (100 µM)	4 µl
<i>MseI</i> preamp pri. (100 µM)	4 µl
dNPT mix (25mM)	50 µl
<u>H₂O</u>	<u>942 µl</u>
Toplam	1000 µl

Ön seçici çoğaltım reaksiyonu 1/2 reaksiyon

Pre-amp primer karışımı	20 µl
Kesilmiş ve adaptörler eklenmiş DNA (10 kez seyreltilmiş)	0,25µl
10X PCR tamponu	2,7 µl
MgCl ₂ (25mM)	1,6 µl
Taq DNA polimerase (5U/µl)	0,5 µl
H ₂ O	1,05 µl
Toplam	27,1 µl

3.2.2.6. Seçici çoğaltma

Ön seçici çoğaltmada elde edilen PCR ürünleri 1/50 oranında TE (Tris-EDTA) tamponu içerisinde seyreltildikten sonra tekrar PCR cihazında seçici çoğaltma işlemlerine tabi tutulmuştur. Bu aşamada MseI primerlerine (Çizelge 3.1.). 3 seçici nükleotid (*EcoR*+3) ve EcoRI primerlerine (Çizelge 3.2.) 3 seçici nükleotid (*MseI*+3) eklenmiştir. EcoRI primerleri LiCor cihazında görüntüleme yapabilmek için 700 veya 800 infrared boyalarla işaretlenmiştir.

Çizelge 3.1. Seçici çoğaltmada kullanılan MseI primerleri

No	Seçici Çoğaltım Primerleri	Sekans
1	M-CAG	GATGAGTCCTGAGTAACAG
2	M-CAC	GATGAGTCCTGAGTAACAC
3	M-CAT	GATGAGTCCTGAGTAACAT
4	M-CAA	GATGAGTCCTGAGTAACAA
5	M-CTA	GATGAGTCCTGAGTAACTA
6	M-CTT	GATGAGTCCTGAGTAACTT
7	M-CTC	GATGAGTCCTGAGTAACTC
8	M-CTG	GATGAGTCCTGAGTAACTG
9	M-CCA	GATGAGTCCTGAGTAACCA
10	M-CCT	GATGAGTCCTGAGTAACCT
11	M-CCG	GATGAGTCCTGAGTAACCG
12	M-CGA	GATGAGTCCTGAGTAACGA
13	M-CGT	GATGAGTCCTGAGTAACGT
14	M-CGC	GATGAGTCCTGAGTAACGC
15	M-CGG	GATGAGTCCTGAGTAACGG

Çizelge 3.2 Seçici çoğaltmada kullanılan EcoRI primerleri

No	Seçici Çoğaltım Primerleri	Sekans
1	E-AAG-700	GACTGCGTACCAATTCAAG
2	E-AAC-800	GACTGCGTACCAATTCAAC
3	E-AAT-700	GACTGCGTACCAATTCAAT
4	E-ACC-800	GACTGCGTACCAATTCACC
5	E-ACG-700	GACTGCGTACCAATTCACG
6	E-ACT-800	GACTGCGTACCAATTCACT
7	E-ACA-700	GACTGCGTACCAATTCACA
8	E-AGC-800	GACTGCGTACCAATTCAGC
9	E-AGG-700	GACTGCGTACCAATTCAGG
10	E-AGA-800	GACTGCGTACCAATTCAGA
11	E-AGT-700	GACTGCGTACCAATTCAGT
12	E-ATT-800	GACTGCGTACCAATTCATT
13	E-ATA-700	GACTGCGTACCAATTCATA
14	E-ATG-800	GACTGCGTACCAATTCATG
15	E-ATC-700	GACTGCGTACCAATTCATC

Seçici çoğaltım PCR reaksiyonu

DNA (50X seyreltilmiş)	2 µl
10X PCR tamponu	1.25 µl
MgCl ₂ (25mM)	0.8 5µl
dNTPs (2mM)	1.25 µl
EcoRI-sel primeri-700	0.5 µl
EcoRI-sel primeri-800	0.5 µl
Mse-sel primeri	1.5 µl
Taq DNA polymerase (5U/µl)	0,15 µl
<u>H2O</u>	<u>4.5 µl</u>
Toplam	12.5 µl

Seçici çoğaltmada kullanılan PCR reaksiyonun sıcaklık döngüsü

- 1- 94°C 5 dk
 - 2- 94°C 40 sn
 - 3- 65°C 1 dk (Her döngüde sıcaklık 0,7 °C düşürülmektedir)
 - 4- 72°C 1.40 dk
- 2 ile 4 arasındaki basamaklar 13 döngü.
- 5- 94°C 40 sn
 - 6- 56 °C 1 dk
 - 7- 2 °C 1.40 dk
- 5 ile 7 arasındaki basamaklar 23 döngü.

Seçici olarak çoğaltılan reaksiyonlar aşağıdaki şekilde seyreltilmiştir,

H2O	4 µl
Yükleme tamponu	5 µl
(10 ml Formamid, 10 mg bromfenol mavisi, 200 µl 0,5 M EDTA)	
<u>Seçici olarak çoğaltılan reaksiyonlar</u>	<u>1 µl</u>
Toplam	10 µl

Seyreltilmiş reaksiyonlar 90°C’de 5 dk tutularak DNA parçacıkları denatüre edilmiş ve hemen buz üzerinde soğutulmuşlardır. Denatüre edilen ve soğutulan reaksiyonlardan 0.03 µl alınıp, 30 dk pre-run yapılan Li-Cor 4300 DNA analiz cihazı (Li-Cor, Biosciences, USA) içindeki %6’lık poliakrilamid jele yükleme yapılmıştır. Cihazda büyüklüğüne göre ayrıştırılan DNA’lara ait bantların görüntülenmesi anlık olarak bilgisayar ekranından takip edilmiştir.

3.2.2.7. Gümüş nitrat boyama

LiCor DNA analyser 4300 cihazı ile yapılan analizler sonucunda fertil ve steril bitkiler arasında farklılık gösteren bantlar belirlenmiş ve aynı primer kombinasyonlarıyla seçici çoğaltma PCR koşulları kullanılarak tekrar çoğaltılmıştır. Seçici olarak çoğaltılan AFLP ile çoğaltılan DNA parçaları, % 6’lık poliakrilamid jel içerisinde büyüklüğüne göre ayrılmıştır.

% 6 konsantrasyonda poliakrilamid jel hazırlamak için;

100 ml TBE (5X) buffer, (Tris-Base, Boric asit, EDTA(Na2.EDTA.H2O))

75 ml % 40’lık Acrylamide (19:1Acrylamide,N,N’ methylene bis-acrylamide)

210 g üre

Solüsyondan 60 ml alınarak üzerine 300 µl APS (Amonium persulfate (% 10)) ve 30 µl TEMED (Tetramethylethylenediamine) eklenerek elektroforez camlarına dökülmüştür. Jelin polimerize olması için 2 saat beklenmiştir.

Reaksiyonların üzerine eşit miktarda yükleme tamponu (10 ml Formamid, 10 mg bromfenol mavisi, 200 µl 0,5 M EDTA) eklenmiştir. Reaksiyonlar 94°C’de 5 dk tutularak DNA parçacıkları denatüre edilmiş ve hemen buz üzerinde soğutulmuşlardır. Denatüre edilen ve soğutulan reaksiyonlardan 5 µl alınarak, 30 dk ön ısıtma yapılan % 6’lık poliakrilamid jel içerisinde Aluminum-Backed Sequencers (Thermo Scientific, EC 160 DNA Sequencing System) cihazı kullanılarak 60 W güçle 2 saat 30 dakika süre ile ayrıştırılmıştır.

Gümüş nitrat boyama için gerekli solüsyonlar aşağıdaki gibidir;

1. Fiksatif solüsyon: % 10'luk glacial asetik asit
2. Jel boyama solüsyonu: 2 g AgNO_3 + 3ml %37'lik Formaldehite'in 2L saf suda çözünmesiyle elde edilir.
3. Developing solüsyonu: 60 g Na_2CO_3 2L saf suda çözünür ve 10 °C' ye soğutulduktan sonra üzerine 3 ml Formaldehite ve 400 µl Sodyum Thiosülfate (%10'luk) eklenerek elde edilir.

Gümüş nitrat boyama için aşağıda verilen protokol takip edilmiştir.

1. Elektroforezden sonra camlar plastik bir aparat yardımıyla dikkatlice ayrılmıştır. Jelin uzun camda kalması amaçlanmıştır.
2. Jel öncelikle fiksatif solüsyon içerisine koyularak 20 dakika boyunca hafif şekilde çalkalanmıştır.
3. Solüsyondan çıkarılan jel 3 kez ddH₂O ile çalkalanmıştır.
4. Jel boyama solüsyonuna transfer edilerek 30 dakika boyunca bu solüsyonda bekletilmiştir.
5. Daha sonra jel developing solüsyonuna aktararak PCR ürünleri jel içerisinde görünene kadar çalkalanmıştır.
6. Bantlar görülmeye başlayınca bu solüsyon üzerine fiksatif solüsyonu direkt olarak eklenerek bantların daha iyi görünmesi ve kalıcı olması sağlanmıştır.
7. Son olarak jel 2 kez ddH₂O ile çalkalanarak kurumaya bırakılmış ve jelin fotoğrafı çekilmiştir.

3.2.2.8. AFLP bantlarının poliakrilamid jelden kesilmesi ve izole edilmesi

DNA bantlarının gümüş boyama yöntemi ile görüntülenmesinin ardından, fertil ve steril bitkiler arasında farklı ifade olan bantlar poliakrilamid jel üzerinde belirlenmiştir. Steril bitkilerde olmayıp fertil bitkilerde olan bantlardan 5 tanesi dizi analizleri için poliakrilamid jelden keskin bir bisturi yardımıyla kesilmiştir. Kesme işlemi beyaz ışık veren negateskop cihazı üzerinde gerçekleştirilmiştir.

Kesilen bant, içinde 75 µl TE (Tris-EDTA) çözeltisi bulunan 1,5 ml tüp içinde bir gece buzdolabında 4°C’de bekletilmiştir. Bekleme işleminden sonra, kesilen AFLP bantı pipet ucu ile iyice parçalanmıştır. Daha sonra bu tüp mikrosantrifüj cihazında 1 dk kadar santrifüz yapılarak jel parçalarının tüp dibinde çökmesi ve DNA’nın ise çözelti içinde kalması sağlanmıştır. Elde edilen örnek daha sonraki aşamalar için –20°C’de muhafaza edilmiştir.

3.2.2.9. DNA-AFLP bantlarının tekrar çoğaltılması

Poliakrilamid jelinden izole edilen AFLP bantları PCR ile tekrar çoğaltılmış ve tekrar agaroz jelden izole edilmiştir. AFLP bantlarının çoğaltılması için kullanılan PCR reaksiyonu ve PCR döngüsü aşağıdaki gibidir.

PCR reaksiyonunun bileşenleri

Akrilamid Jelden İzole Edilen DNA	2 µl
10X PCR tamponu	2 µl
dNTPs (2,5mM)	2 µl
EcoR-sel primeri (5 µM/µl) önseçici çoğaltma	0,8 µl
MseI-sel primeri (5 µM/µl) önseçici çoğaltma	0,8 µl
Taq DNA polymerase (5U/µl)	0,16 µl
<u>H2O</u>	<u>12,24 µl</u>
Toplam	20 µl

Sıcaklık döngüsü

1- 94°C	2 dk
2- 94°C	45 sn
3- 56°C	1 dk
4- 72°C	1 dk
Basamak 2 ile 4 arası 35 döngü	
5- 72°C	5 dk
6- 4 °C	∞

3.2.2.10. Bantların agaroz jelden izole edilmesi

PCR cihazında tekrar çoğaltılan AFLP bantları, % 2'lik agaroz jelde ayrıştırılmıştır. Bant, agaroz jelden özel bir pipet ucu ile kesilmiştir. Kesilen AFLP bantları izole edilerek dizi analizleri için saflaştırılmıştır. Kesilen bantların agaroz jelden izolasyonunda “EZ-10 Spin Column DNA Gel Extraction kiti (BioBasic, Kanada)” kullanılmıştır.

Bantların jelden izole edilmesi aşağıdaki gibi yapılmıştır:

1. Jelden kesilen parçalar tartılarak 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine konulmuştur, daha sonra örneklerin üzerine ağırlığın 3 katı kadar Binding Solution eklenmiştir.
2. Solüsyon eklenen tüpler 55°C'de inkübe edilerek jel parçalarının erimesi sağlanmıştır.
3. Jel parçaları eridikten sonra ağırlığı kadar izopropanol eklenmiştir.
4. Karışım filtreli mikrosantrifüj tüplerine aktararak 16 000 g'de 1dk santrifüj yapılmıştır.
5. Tüplerin alt kısmında kalan sıvı döküldükten sonra filtreli kısma 500 µl Wash Solution eklenerek 16 000 g'de 2dk santrifüj yapılmıştır.
6. Filtreler yeni tüplere aktararak üzerine 30 µl Elution Buffer eklenmiştir.
7. Örnekler oda sıcaklığında 1 dk inkübe edildikten sonra 16 000 g'de 2dk santrifüj yapılmıştır.

Elde edilen AFLP DNA parçaları sekanslama yapılmak üzere özel bir firmaya gönderilmiştir.

3.2.2.11. TAIL PCR

Markır-1'in EcoRI ucuna bitişik olan DNA parçasının çoğaltılması için TAIL-PCR yöntemi kullanılmıştır.

Markır-1'in nükleotid dizisinden üç spesifik primer (SP) dizayn edilmiştir. SP1 en dıştaki primer, SP2 ortadaki primer, SP3 ise dizilimini bildiğimiz sekansın en sonundaki primerdir. Her primer için bir arbitrary degenerate (AD) primer kullanılmak üzere TAIL PCR üç aşamada gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.3. AD (Arbitrary Degenerate) Primer sekansları

İsim	Sekans(5'-3')	Uzunluk	Sıcaklık	Degeneracy
TAIL-AD1:	NGT CGA SWG ANA WGAA	16-mer	46 °C	128X
TAIL-AD2:	STT GNT AST NCT NTGC	16-mer	46 °C	256X
TAIL-AD3:	WGT GNA GWA NCA NAGA	16-mer	46 °C	256X
TAIL-AD4:	GTN CGA SWC ANA WGTT	16-mer	46 °C	128X
TAIL-AD5:	WCA GNT GWT NGT NCTG	16-mer	46 °C	256X

S= C veya G

W= A veya T

1.TAIL-PCR Reaksiyonu

Genomik DNA (50X seyreltilmiş)	1 µl
10X PCR tamponu	2 µl
MgCl ₂ (25mM)	1.2µl
dNTPs (2mM)	2.5 µl
AD Primer*(10pmol/µl)	8 µl
SP1 Primer (10pmol/µl)	1 µl
Taq DNA polymerase (5U/µl)	0,2 µl
H ₂ O	4.1 µl
Toplam	20 µl

*AD1, AD2, AD3, AD4 veya AD5 primerlerinden sadece bir tanesi kullanılır.

1.TAIL-PCR reaksiyonun sıcaklık döngüsü

1- 94°C 2 dk

2- 94°C 30 sn

3- 60°C 1 dk

4- 72°C 2 dk

2 ile 4 arasındaki basamaklar 5 döngü.

5- 94°C 30 sn

6- 25°C 1 dk

7*- 72 °C 2dk

5 ile 7 arasındaki basamaklar 1 döngü.

8- 94°C 30 sn

9- 44°C 1 dk

10- 72°C 2 dk

8 ile 10 arasındaki basamaklar 10 döngü.

11- 94°C 30 sn

12- 60°C 1 dk

13- 72°C 2 dk

14- 94°C 30 sn

15- 60°C 1 dk

16- 72°C 2dk

17- 94°C 30 sn

18- 44°C 1 dk

19- 72°C 2dk

11 ile 19 arasındaki basamaklar 15 döngü.

20- 72°C 5dk

*25°C'den 72°C'ye saniyede 0.25°C artarak çıkmıştır. Diğer sıcaklık artışları saniyede 1°C ile sınırlıdır.

2.TAIL-PCR Reaksiyonu

1.PCR ürünü	1 µl
10X PCR tamponu	2 µl
MgCl ₂ (25mM)	1.2 µl
dNTPs (2mM)	2.5 µl
AD Primer*(10pmol/µl)	6 µl
SP2 Primer (10pmol/µl)	1 µl
Taq DNA polymerase (5U/µl)	0,2 µl
<u>H₂O</u>	<u>6.1 µl</u>
Toplam	20 µl

*1. Reaksiyonda kullanılan AD primeri kullanılır

2.TAIL-PCR reaksiyonun sıcaklık döngüsü

1-	94°C	2 dk
2-	94°C	30 sn
3-	60°C	1 dk
4-	72°C	2 dk
5-	94°C	30 sn
6-	60°C	1 dk
7*-	72 °C	2dk
8-	94°C	30 sn
9-	44°C	1 dk
10-	72°C	2 dk
2 ile 10 arasındaki basamaklar 15 döngü.		
11-	72°C	5 dk

3.TAIL-PCR Reaksiyonu

2.PCR ürünü	1 µl
10X PCR tamponu	2 µl
MgCl ₂ (25mM)	1,2µl
dNTPs (2mM)	2,5 µl
AD Primer*(10pmol/µl)	4 µl
SP3 Primer (10pmol/µl)	1 µl
Taq DNA polymerase (5U/µl)	0,2 µl
H ₂ O	8,1 µl
Toplam	20 µl

*1. ve 2. reaksiyonda kullanılan AD primeri kullanılır.

3.TAIL-PCR reaksiyonun sıcaklık döngüsü

1-	94°C	2 dk
2-	94°C	30 sn
3-	60°C	1 dk
4-	72°C	2 dk
5-	94°C	30 sn
6-	60°C	1 dk
7*-	72 °C	2dk
8-	94°C	30 sn
9-	44°C	1 dk
10-	72°C	2 dk
2 ile 10 arasındaki basamaklar 15 döngü.		
11-	72°C	5 dk

Çoğaltılan DNA parçaları AFLP DNA parçalarında olduğu gibi agaroz jelde yürütülmüştür. Elde edilen bantlar kesilip yine aynı şekilde ekstrakte edilmiştir. Bantların nükleotid dizlerinin belirlenmesi özel bir firmaya yaptırılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Çiçek Yapılarının Belirlenmesi

HP1 popülasyonunda toplam 96 bitkinin ve HP2 popülasyonunda ise toplam 160 bitkinin çiçek yapısı incelenmiştir.

Çizelge 4.1. Çiçek yapıları incelenen HP1 popülasyonuna ait bitkilerin listesi

HP1 Popülasyonu		HP1 Popülasyonu	
HP1-01	Fertil	HP1-19	Kısır
HP1-02	Fertil	HP1-20	Kısır
HP1-03	Kısır	HP1-21	Kısır
HP1-04	Fertil	HP1-22	Fertil
HP1-05	Fertil	HP1-23	Fertil
HP1-06	Fertil	HP1-24	Kısır
HP1-07	Fertil	HP1-25	Kısır
HP1-08	Fertil	HP1-26	Kısır
HP1-09	Fertil	HP1-27	Fertil
HP1-10	Fertil	HP1-28	Kısır
HP1-11	Fertil	HP1-29	Kısır
HP1-12	Fertil	HP1-30	Kısır
HP1-13	Fertil	HP1-31	Kısır
HP1-14	Fertil	HP1-32	Fertil
HP1-15	Fertil	HP1-33	Fertil
HP1-16	Kısır	HP1-34	Kısır
HP1-17	Fertil	HP1-35	Fertil
HP1-18	Fertil	HP1-36	Kısır

Çizelge 4.1. Çiçek yapıları incelenen HP1 popülasyonuna ait bitkilerin listesi (devam)

HP1 Popülasyonu		HP1 Popülasyonu	
HP1-37	Fertil	HP1-55	Fertil
HP1-38	Fertil	HP1-56	Fertil
HP1-39	Fertil	HP1-101	Fertil
HP1-40	Fertil	HP1-102	Fertil
HP1-41	Kısır	HP1-103	Kısır
HP1-42	Kısır	HP1-104	Fertil
HP1-43	Kısır	HP1-105	Fertil
HP1-44	Kısır	HP1-106	Fertil
HP1-45	Kısır	HP1-107	Kısır
HP1-46	Kısır	HP1-108	Fertil
HP1-47	Kısır	HP1-109	Fertil
HP1-48	Fertil	HP1-110	Fertil
HP1-49	Kısır	HP1-111	Fertil
HP1-50	Kısır	HP1-112	Fertil
HP1-51	Kısır	HP1-113	Fertil
HP1-52	Fertil	HP1-114	Kısır
HP1-53	Kısır	HP1-115	Kısır
HP1-54	Kısır	HP1-116	Fertil

Çizelge 4.2. Çiçek yapıları incelenen HP2 popülasyonuna ait bitkilerin listesi

HP2 Popülasyonu		HP2 Popülasyonu	
HP2-01	Fertil	HP2-19	Fertil
HP2-02	Fertil	HP2-20	Fertil
HP2-03	Fertil	HP2-21	Fertil
HP2-04	Kısır	HP2-22	Kısır
HP2-05	Fertil	HP2-23	Fertil
HP2-06	Kısır	HP2-24	Fertil
HP2-07	Fertil	HP2-25	Fertil
HP2-08	Fertil	HP2-26	Kısır
HP2-09	Fertil	HP2-27	Fertil
HP2-10	Fertil	HP2-28	Fertil
HP2-11	Kısır	HP2-29	Fertil
HP2-12	Fertil	HP2-30	Fertil
HP2-13	Fertil	HP2-31	Fertil
HP2-14	Fertil	HP2-32	Fertil
HP2-15	Fertil	HP2-33	Fertil
HP2-16	Fertil	HP2-34	Fertil
HP2-17	Fertil	HP2-35	Fertil
HP2-18	Kısır	HP2-36	Kısır

Çizelge 4.2. Çiçek yapıları incelenen HP2 popülasyonuna ait bitkilerin listesi (devam)

HP2 Popülasyonu		HP2 popülasyonu	
HP2-100	Fertil	HP2-131	Fertil
HP2-101	Fertil	HP2-132	Kısır
HP2-102	Fertil	HP2-133	Fertil
HP2-103	Fertil	HP2-134	Fertil
HP2-104	Kısır	HP2-135	Kısır
HP2-105	Kısır	HP2-136	Fertil
HP2-106	Kısır	HP2-137	Fertil
HP2-107	Fertil	HP2-18	Kısır
HP2-108	Fertil	HP2-139	Fertil
HP2-109	Fertil	HP2-140	Fertil
HP2-110	Kısır	HP2-141	Fertil
HP2-111	Fertil	HP2-142	Fertil
HP2-112	Fertil	HP2-143	Fertil
HP2-13	Fertil	HP2-144	Fertil
HP2-114	Kısır	HP2-145	Fertil
HP2-115	Kısır	HP2-146	Fertil
HP2-116	Fertil	HP2-147	Fertil
HP2-118	Fertil	HP2-148	Fertil
HP2-119	Fertil	HP2-149	Fertil
HP2-120	Fertil	HP2-150	Fertil
HP2-121	Fertil	HP2-151	Fertil
HP2-122	Fertil	HP2-152	Fertil
HP2-123	Kısır	HP2-153	Fertil
HP2-124	Fertil	HP2-154	Fertil
HP2-125	Fertil	HP2-155	Fertil
HP2-126	Fertil	HP2-156	Kısır
HP2-127	Kısır	HP2-157	Fertil
HP2-128	Fertil	HP2-158	Kısır
HP2-129	Fertil	HP2-159	Fertil
HP2-130	Fertil	HP2-160	Fertil

HP1 popülasyonundan ve HP2 popülasyonundan çiçek yapılarına bakıldığında erkek kısır bitkiler ve erkek fertil bitkiler çiçek yapılarından kolayca birbirinden ayrılabilmişlerdir. Erkek kısır bitkilerde anterler taç yapraklara dönüşmüştür ve bu nedenle erkek kısır bitkilerde 5 değil 10 adet taç yaprak sayılmıştır. Erkek fertil ve erkek kısır bitkilerin çiçek şemsiyeleri incelenmiş (Şekil 4.1 A,B), çiçeklerin mikroskop altındaki görüntüleri fotoğraflanmıştır (Şekil 4.1 C,D).



Şekil 4.1. Erkek kısır ve erkek fertil çiçekler. A) Erkek fertil ve B) Erkek kısır havuç bitkilerinin çiçek şemsiyeleri. C) Erkek fertil ve D) Erkek kısır çiçeklerin mikroskop altındaki görüntüsü

Toplam olarak HP1 popülasyonundan 96 bitkinin çiçek yapısı incelenmiştir. Bu 96 bitkiden 37'si erkek kısır olurken 59 bitkinin ise erkek fertil olduğu belirlenmiştir. Bu verilerle yapılan Ki-kare testine göre hücre çekirdeğinde bulunan erkek kısırlık genlerinin açılım oranına 9:7 olduğu tespit edilmiştir ($P = 0,30$) (Çizelge 4.3). F2 popülasyonundaki bu açılım oranı, havuçta petaliod tipi sitoplazmik genetik erkek kısırlığının iki genle kontrol edildiğini göstermektedir. Havuç bitkilerinin petaloid sitoplazmada fertil olabilmesi için her iki genin en az bir dominant allelinin bulunması gerekmektedir (Rf1_Rf2_). Ancak Rf genlerinden birinin ya da her ikisinin homozigot çekinik olması durumunda petaloid sitoplazmaya sahip bitkiler kısır olmaktadır (rf1rf1Rf2_; Rf1_rf2rf2; rf1rf1rf2rf2).

HP2 popülasyonunda toplam olarak 160 bitkinin çiçek yapısı incelenmiştir ve bunlardan 124 bitkinin erkek fertil ve 36 bitkinin ise erkek kısır olduğu tespit edilmiştir. Ki-Kare testine göre hücre çekirdeğinde bulunan erkek kısırlık geni 3:1 oranında açılım göstermektedir ($P = 0.47$) (Çizelge 4.3.) . Bu sonuca göre HP2 popülasyonunda hücre çekirdeğinde bulunan erkek kısırlık genlerinden sadece birinin açılım gösterdiği belirlenmiştir.

Çizelge 4.3. HP1 ve HP2 popülasyonlarına ait ki-kare testi sonuçları

Popülasyonlar	Erkek kısır	Erkek fertil	Açılım oranı	p-değeri
HP1 (F2)	37	59	9:7	0.30
HP2 (F2)	36	124	3:1	0.47

4.2. DNA İzolasyonu

HP1 popülasyonundan 96 bitkinin ve HP2 popülasyonundan ise 160 bitkinin yaprak örneklerinden DNA izolasyonu yapılarak konsantrasyonları Qubit fluorometer ile ölçülmüştür. DNA konsantrasyonlarının 188 ng/ul ile 20 ng/ul arasında değiştiği görülmüştür (Çizelge 4.4.).

Çizelge 4.4. Yaprak örneklerinden elde edilen DNA örneklerinin konsantrasyonu

Bitki No	DNA Miktarı (ng/ul)	Bitki No	DNA Miktarı (ng/ul)
HP1-001	90,81	HP1-026	102,98
HP1-002	87,57	HP1-027	96,48
HP1-003	80,54	HP1-028	88,89
HP1-004	100	HP1-029	89,43
HP1-005	88,65	HP1-030	99,19
HP1-006	84,86	HP1-031	49,38
HP1-007	86,49	HP1-032	86,72
HP1-008	89,19	HP1-033	44,98
HP1-009	78,38	HP1-034	91,06
HP1-010	95,68	HP1-035	63,96
HP1-011	73,51	HP1-036	87,26
HP1-012	98,92	HP1-037	98,1
HP1-013	67,57	HP1-038	93,77
HP1-014	41,3	HP1-039	91,06
HP1-015	89,19	HP1-040	77,51
HP1-016	88,65	HP1-041	88,35
HP1-017	80,54	HP1-042	81,3
HP1-018	88,65	HP1-043	74,8
HP1-019	86,49	HP1-044	76,42
HP1-020	71,89	HP1-045	75,34
HP1-021	103,78	HP1-046	70,46
HP1-022	77,3	HP1-047	70,84
HP1-023	117,07	HP1-048	61,04
HP1-024	81,3	HP1-049	70,84
HP1-025	90,51	HP1-050	80,65

Çizelge 4.4. Yaprak örneklerinden elde edilen DNA örneklerinin konsantrasyonu (devam)

Bitki No	DNA Miktarı (ng/ul)	Bitki No	DNA Miktarı (ng/ul)
HP1-051	95,37	HP1-076	87,53
HP1-052	85,56	HP1-077	88,06
HP1-053	80,11	HP1-078	76,39
HP1-054	48,45	HP1-079	90,19
HP1-055	53,79	HP1-101	34,04
HP1-056	69,75	HP1-102	101,75
HP1-057	74,11	HP1-103	33,92
HP1-058	62,67	HP1-104	107,6
HP1-059	100,82	HP1-105	123,39
HP1-060	168,94	HP1-106	66,67
HP1-061	81,74	HP1-107	66,08
HP1-062	81,74	HP1-108	76,02
HP1-063	96,46	HP1-109	170,18
HP1-064	73,02	HP1-110	57,26
HP1-065	69,75	HP1-111	123,39
HP1-066	70,3	HP1-112	148,54
HP1-067	69,75	HP1-113	96,49
HP1-068	57,22	HP1-114	84,21
HP1-069	58,31	HP1-115	74,27
HP1-070	62,67	HP1-116	43,02
HP1-071	83,29	HP1-117	109,36
HP1-072	75,86		
HP1-073	82,23		
HP1-074	68,44		
HP1-075	79,05		

Çizelge 4.4. Yaprak örneklerinden elde edilen DNA örneklerinin konsantrasyonu (devam)

Bitki No	DNA Miktarı (ng/ul)	Bitki No	DNA Miktarı (ng/ul)
HP2-001	102,75	HP2-026	99,71
HP2-002	117,03	HP2-027	89,91
HP2-003	112,64	HP2-028	84,15
HP2-004	127,47	HP2-029	86,46
HP2-005	120,33	HP2-030	78,96
HP2-006	123,08	HP2-031	80,69
HP2-007	112,64	HP2-032-1	40,56
HP2-008	94,51	HP2-032-2	37,82
HP2-009	117,03	HP2-034	89,34
HP2-010	131,32	HP2-035	93,95
HP2-011	115,38	HP2-036	78,39
HP2-012	125,27	HP2-037	91,07
HP2-013	110,99	HP2-038	91,07
HP2-014	116,48	HP2-039	95,68
HP2-015	112,09	HP2-040	80,69
HP2-016	123,08	HP2-041	96,83
HP2-017	127,47	HP2-042	121,61
HP2-018	37,47	HP2-043	93,95
HP2-019	109,34	HP2-044	97,98
HP2-020	119,23	HP2-045	102,02
HP2-021	117,03	HP2-046	95,1
HP2-022	134,07	HP2-047	85,3
HP2-023	125,27	HP2-048	38,67
HP2-024	119,78	HP2-049	88,18
HP2-025	82,42	HP2-050	89,91

Çizelge 4.4. Yaprak örneklerinden elde edilen DNA örneklerinin konsantrasyonu (devam)

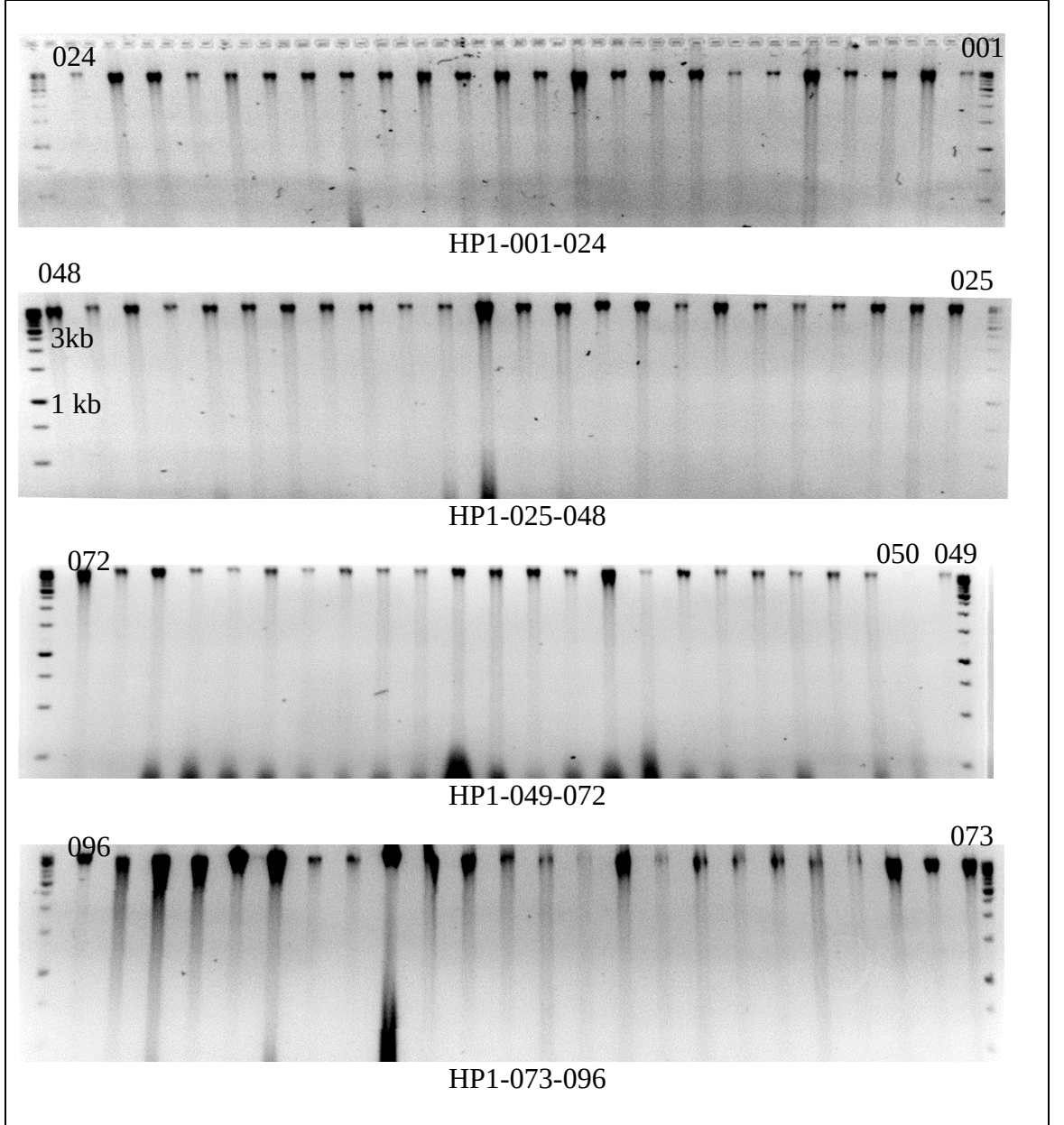
Bitki No	DNA Miktarı (ng/ul)	Bitki No	DNA Miktarı (ng/ul)
HP2-051	140,57	HP2-076	86,15
HP2-052	129,14	HP2-077	81,85
HP2-053	127,43	HP2-078	89,23
HP2-054	140	HP2-079	78,15
HP2-055	118,29	HP2-080	75,69
HP2-056	117,71	HP2-081	86,15
HP2-057	121,71	HP2-082	84,92
HP2-058	92	HP2-083	145,23
HP2-059	48,49	HP2-084	88,62
HP2-060	119,43	HP2-085	113,23
HP2-061	109,14	HP2-086	96,62
HP2-062	111,43	HP2-087	75,69
HP2-063	110,29	HP2-088	79,38
HP2-064	120	HP2-089	77,54
HP2-065	114,86	HP2-090	72
HP2-066	112,57	HP2-091	84,92
HP2-067	126,29	HP2-092	75,08
HP2-068	123,43	HP2-093	77,54
HP2-069	115,43	HP2-094	81,85
HP2-070	41,05	HP2-095	73,23
HP2-071	100,57	HP2-096	72,62
HP2-072	120	HP2-097	62,15
HP2-073	108,57	HP2-098	75,69
HP2-074	114,29	HP2-099	153,51
HP2-075	72	HP2-100	176,22

Çizelge 4.4. Yaprak örneklerinden elde edilen DNA örneklerinin konsantrasyonu (devam)

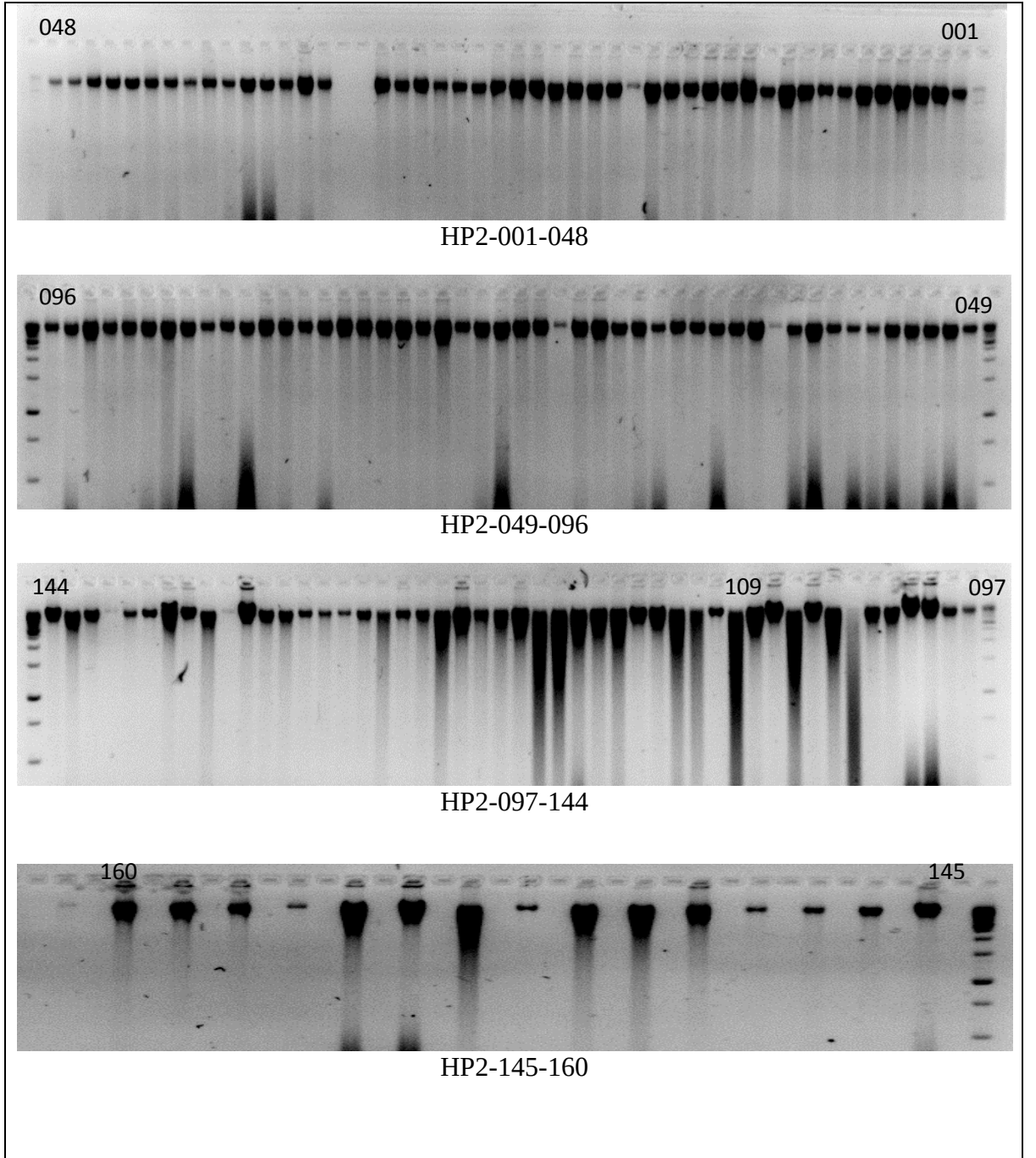
Bitki No	DNA Miktarı (ng/ul)	Bitki No	DNA Miktarı (ng/ul)
HP2-101	87,79	HP2-140	52,81
HP2-102	75,91	HP2-141	42,6
HP2-103	60,63	HP2-142	75,25
HP2-104	162,38	HP2-143	93,73
HP2-105	111,11	HP2-144	87,13
HP2-106	176,24	HP2-145	125,41
HP2-107	129,24	HP2-146	36,3
HP2-108	148,51	HP2-147	54,13
HP2-109	188,12	HP2-148	40,26
HP2-110	60,73	HP2-149	93,07
HP2-111	153,14	HP2-150	152,48
HP2-112	163,04	HP2-151	132,67
HP2-113	102,31	HP2-152	48,54
HP2-114	58,75	HP2-153	130,03
HP2-115	148,51	HP2-154	128,71
HP2-116	145,87	HP2-155	125,41
HP2-117	148,51	HP2-156	28,36
HP2-118	172,94	HP2-157	71,95
HP2-119	161,06	HP2-158	87,79
HP2-120	158,42	HP2-159	96,37
HP2-137	20,46	HP2-160	48,42
HP2-138	38,94	HP2-161	6,25
HP2-139	24,42	HP2-162	97,66

Konsantrasyonu belirlenen örnekler, DNA kalitesini görmek için %1'lik agaroz jele yüklenerek etidium bromitle boyandıktan sonra fotoğrafları çekilmiştir. DNA kalitesi iyi olmayan örneklerin DNA'ları HP1 popülasyonuna ait 50 numaralı örnekte olduğu gibi agaroz

jelde gözükmemiştir (Şekil 4.2). DNA izolasyonu sırasında parçalanmış olan DNA örnekleri ise HP2 popülasyona ait 109 numaralı örnekte olduğu gibi dağınık bir yapıda olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.3). Bunun gibi DNA örnekleri tekrar çıkartıldıktan sonra DNA konsantrasyonları belirlenmiş ve DNA kaliteleri tespit edilmiştir.



Şekil 4.2. HP1 popülasyonlarından elde edilen DNA örneklerinin Agaroz jelde görünümü

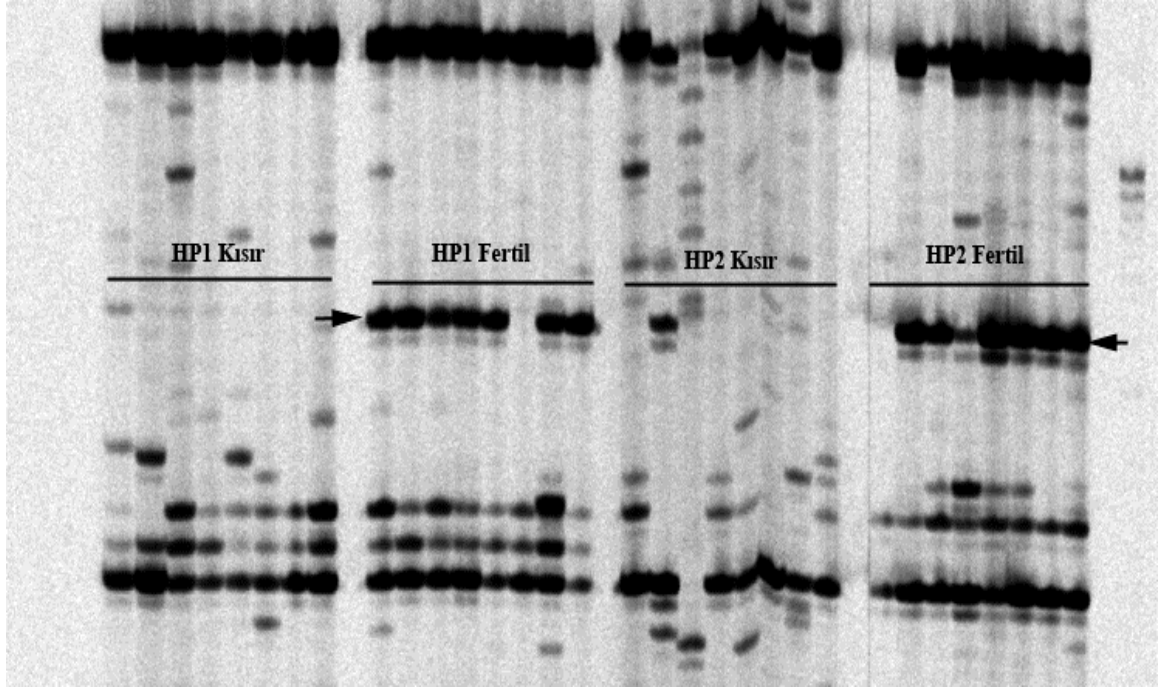


Şekil 4.3. HP2 popülasyonlarından elde edilen DNA örneklerinin Agaroz jelde görünümü

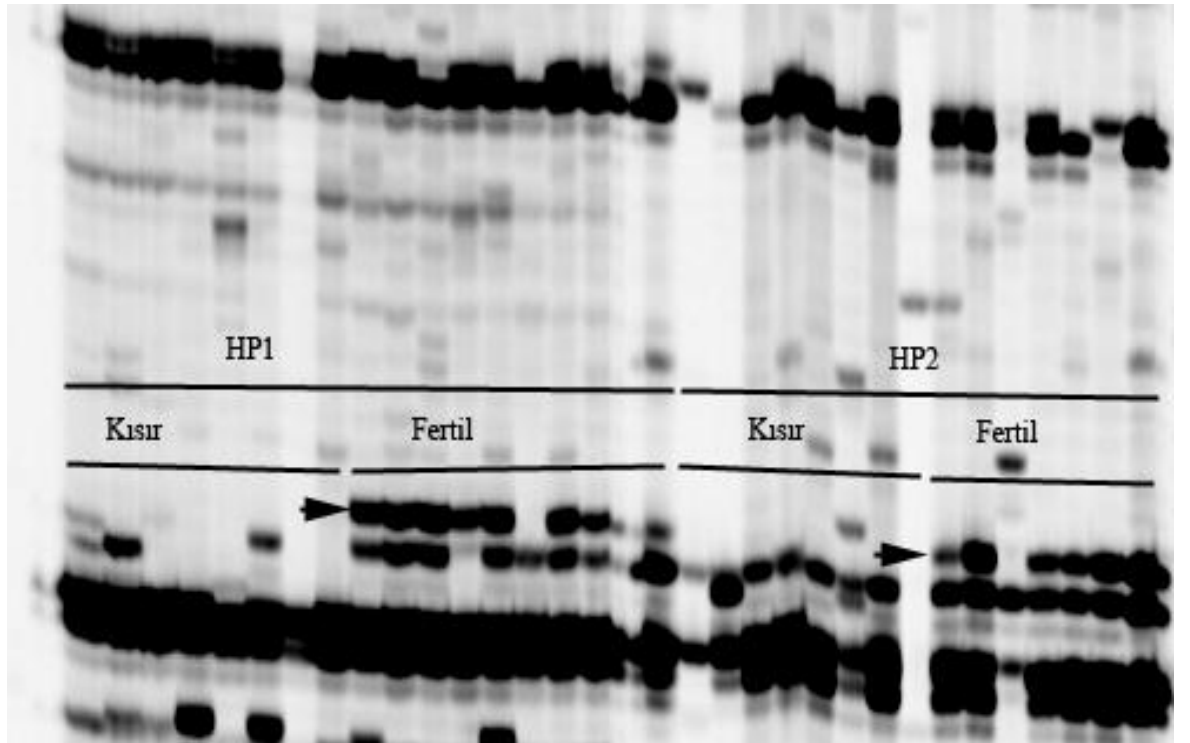
4.3. AFLP Markırlarının Belirlenmesi

Yapılan AFLP analizlerinde HP1 popülasyonundan 8 adet erkek kısır ile 8 adet erkek fertil bitki ve HP2 popülasyonundan ise yine 8 adet erkek kısır ile 8 adet erkek fertil bitki seçilmiştir. 16 adet erkek kısır ve 16 adet erkek fertil bitki kullanılarak 225 AFLP primer kombinasyonun analizi tamamlanmıştır. Bu analizler sonucunda erkek kısır bitkilerde çoğalan fakat erkek fertil bitkilerde çoğalmayan ya da erkek kısır bitkilerde çoğalmayıp erkek fertil bitkilerde çoğalan AFLP markırları belirlenmeye çalışılmıştır.

Her iki popülasyona ait erkek kısır bitkilerde çoğalmayan fakat erkek fertil bitkilerde çoğalan AFLP markırının varlığı iki primer kombinasyonunda belirlenmiştir. Bunlardan birincisi Markır-1 olarak adlandırılmış ve EACT-MCAT primer kombinasyonunda tespit edilmiştir (Şekil 4.4). Markır-1 erkek kısır bitkilerin sadece birinde çoğalmış ve erkek fertil bitkilerin ikisinde çoğalmamıştır. Diğer AFLP markırı ise ve Markır-2 olarak adlandırılmış ve EATA-MCTG primer kombinasyonunda belirlenmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.4. EACT-MCAT primer kombinasyonunda belirlenen Markır-1. Markır-1 ok işareti ile gösterilmiştir

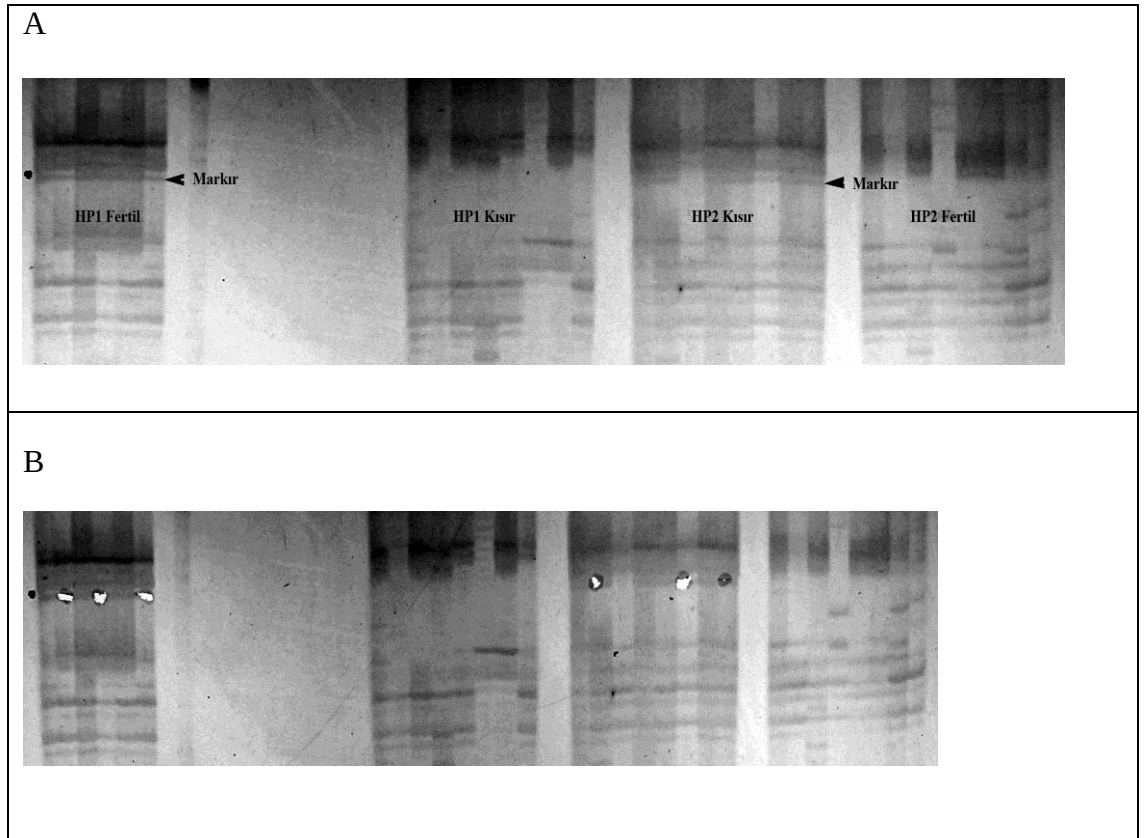


Şekil 4.5. EATA-MCTG primer kombinasyonunda belirlenen Markır-2. Markır-2 ok işareti ile gösterilmiştir

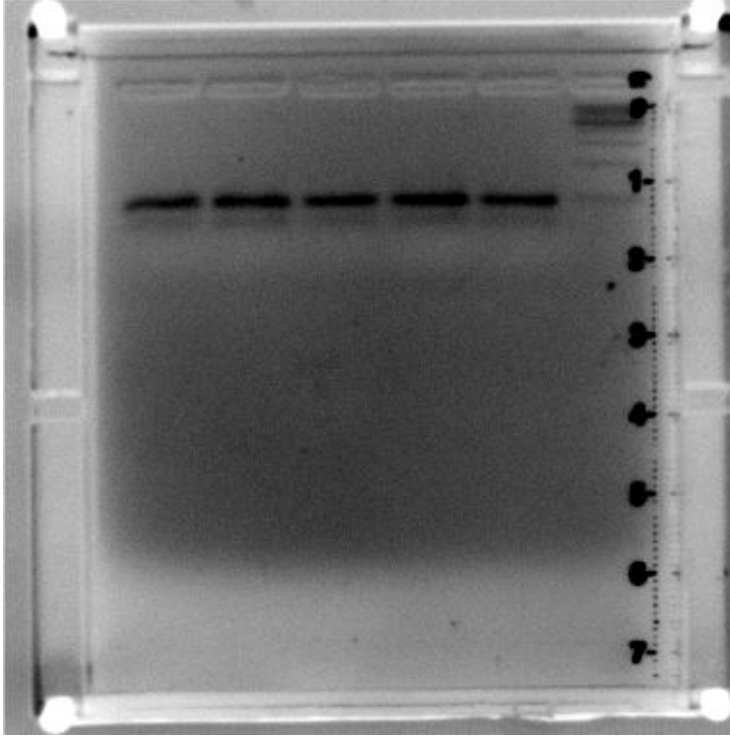
4.3.1. AFLP markırlarının karakterizasyonu

4.3.1.1. Markır-1'in karakterizasyonu

AFLP markırları analizi daha kolay olan STS markırlarına dönüştürebilmek için Markır-1 içeren AFLP primer kombinasyonun reaksiyonu tekrar yapılmıştır. AFLP markırları poliakrilamit jelde büyüklüğüne göre ayrılmıştır. Markır-1'i gözlemlemek için gümüş nitrat boyaması yapılmıştır (Şekil 4.6 A,B). Gümüş nitrat boyama ile gözlemlenen erkek kısırlıkla birlikte hareket eden Markır-1'in DNA bandı jelden kesilmiştir. Kesilen poliakrilamit jeli içindeki Markır-1 EACT ve MCAT primerleri kullanılarak tekrar çoğaltılmış ve agaroz jelinde görüntülenmiştir (Şekil 4.7). Jelde tek DNA bandının gözükmesi DNA dizisini belirleyebilmek için önemlidir. Görüntülenen AFLP markırı agaroz jelinden izole edilmiş ve DNA dizisi belirlenmiştir.



Şekil 4.6. A) Gümüş boyama ile görüntülenmiş Makır-1'in poliakrilamit jel fotoğrafı
B) Markırın DNA bantları jelden kesildikten sonra çekilmiş fotoğrafı



Şekil 4.7. Poliakrilamit jelden kesildikten sonra tekrar çoğaltılan Markır-1'in agaroz jel fotoğrafı

DNA dizisi belirlenen Markır-1'in uzunluğunun 91 baz çiftinden (bç) oluştuğu tespit edilmiştir. Havuç genomunun tüm DNA dizilerini belirleme çalışmaları Amerika Birleşik Devletleri'nin Wisconsin Üniversitesi'nde devam etmektedir. Elde ettiğimiz Markır-1'e ait DNA dizisinin havuç genomunun DNA dizileriyle karşılaştırılması için Wisconsin Üniversitesine gönderilmiştir. Yapılan karşılaştırmada Markır-1'in DNA dizisinin havuç genomunda birçok DNA dizisi ile eşleştiği görülmüştür. Şekil 4.8'de de görüldüğü gibi AFLP markırının MseI enziminin kestiği ucunda bulunan DNA bölgesinin havuç genomunda birçok kopyası bulunmaktadır. Ancak AFLP markırının EcoRI enziminin kestiği DNA bölgesinden sonra DNA dizilerinin farklılaştığı görülmektedir. Bu nedenle AFLP markırının EcoRI enzimin kestiği DNA dizisinde farklılıklar olduğu gözlemlenmiştir. Fakat EcoRI enziminin kestiği DNA dizisi olan "GAATTC" Wisconsin Üniversitesi'nden gönderilen havuç genomuna ait DNA dizilerinin hiçbirinde rastlanmamıştır (Şekil 4.8).

deg7180001 : ACATCAGTTGCAATAAATAACGATGCTAAAGTACTTTAAACACATCAGTTTAAAGTCAAAATGATGTTCAAAATATCTTTAACATCAGAGA : 126
scf7180001 : ACATCAGTTGCAATAAATAACGATGCTAAAGTACTTTAAACACATCAGTTTAAAGTCAAAATGATGTTCAAAATATCTTTAACATCAGAGA : 2191
deg7180000 : ACATCAGTTGCAATAAATAACGATGCTAAAGTACTTTAAACACATCAGTTTAAAGTCAAAATGATGTTCAAAATATCTTTAACATCAGAGA : 202
deg7180000 : ACATCAGTTGCAATAAATAACGATGCTAAAGTACTTTAAACACATCAGTTTAAAGTCAAAATGATGTTCAAAATATCTTTAACATCAGAGA : 195
lcl|deg718 : ACATCAGTTGCAATAAATAACGATGCTAAAGTACTTTAAACACATCAGTTTAAAGTCAAAATGATGTTCAAAATATCTTTAACATCAGAGA : 226
Markir-1-A : -----TTAACATCAGAGA : 12
lcl|deg718 : CATCGTTTGATTGGCAAGGATGTAAGAACACACAGAGCATCGTAAATTAAAGGCGCATGTAATAAGGCTTTTAAACATCGGCCG : 104
t t aa t tgt t aa c a acatc t a aa a gatgt g aa t ttTaACATCaGaga

2260 * 2280 * 2300 * 2320 * 2340
deg7180001 : CATTTCTAACTGATGCTCTGAAGGTGATGCTCTATTCACATTTTCTAGTAGTGCATGCTAGTTGATTAGATAAGAGCGTGTAGTCTTTA : 216
scf7180001 : CATTTCTAACTGATGCTCTGAAGGTGATGCTCTATTCACATTTTCTAGTAGTGCATGCTAGTTGATTAGATAAGAGCGTGTAGTCTTTA : 2281
deg7180000 : CATTTCTAACTGATGCTCTGAAGGTGATGCTCTATTCACATTTTCTAGTAGTGCATGCTAGTTGATTAGATAAGAGCGTGTAGTCTTTA : 292
deg7180000 : CATTTCTAACTGATGCTCTGAAGGTGATGCTCTATTCACATTTTCTAGTAGTGCATGCTAGTTGATTAGATAAGAGCGTGTAGTCTTTA : 285
lcl|deg718 : CATTTCTAACTGATGCTCTGAAGGTGATGCTCTATTCACATTTTCTAGTAGTGCATGCTAGTTGATTAGATAAGAGCGTGTAGTCTTTA : 316
Markir-1-A : CATTTCTAACTGATGCTCTGAAGGTGATGCTCTATTCACATTTTCTAGTAGTGCATGCTAGTTGATTAGATAAGAGCGTGTAGTCTTTA : 65
lcl|deg718 : CATCAGGGACATGTTTATAAGGTGATGCTCTATTCACATTTTCTAGTAGTGCATGCTAGTTGATTAGATAAGAGCGTGTAGTCTTTA : 194
ATttctaActgATgTctgAAGtGTGATGCTCTATTCACATTTTCTAGTAGTGCATGCTAGTTGATTAGATAAGAGCGTGTAGTCTTTA

2360 * 2380 * 2400 * 2420 *
deg7180001 : GTAGTTTTGTTTATTTCTTTTATTTCTTTTATTTGCTTTTGCATATTCATGAAAGTATATCATACCAAGTTAAATTTCTTGTGAT : 305
scf7180001 : ATGGCACCCCTCT-TGCCACAAATAAGATTATAGTTTTTAT-TA--ATACCTTATGTAGATATGAGAATCATGATTTTAAAGCTTGA- : 2366
deg7180000 : TTGATCAGGTTGATATTGTTGCTGCTGAATAGGCT-CA--GGAAGTGGAGTGGT-TGAAGGGGACATTAAGTGTCCAGCATGTAGG : 378
deg7180000 : CAAAGGGGTGCAAGCGAAGCGCTTTTCAAACTTTAGGGTGCAATATGCCAAAAAAATTTGTTGAGACCAATCGAAAAAGCACTTAA : 375
lcl|deg718 : GAAATTGTAAAGGGAAGGTAAAGACAATGTAAGATAAGGCAAGACAACCTTAACCAAGACAAGACATGTAAGGGGAAGGTAAAGACAATGT : 406
Markir-1-A : ----- : -
lcl|deg718 : TGAATTGAAAACAACCTGGTAGCTTCGTTTGGTTGTTTGAAATGGAATGAACCTGTAGTATATTTTGAAGCTTTGAGCTTGTAAAC : 284

2440 * 2460 * 2480 * 2500 * 2520
deg7180001 : GAGCTTATTTGCATTAATTTATGGCTAGTAGCTTTGATCATAGGTGATGCTCTTGCATGCTTAGAAATTTGCTTGTGCG--GAAATTTCTAA : 393
scf7180001 : AAGAAGGAACGACTAATTACTTGTAGTTTGTATTATAGTGGTAGTGGT-TATTACAGGCT---GTTTCTTTTACT--CCTCTTTCTGG : 2450
deg7180000 : GAGTCACACAAGAGGCACATT--CTCATGCTTCTCTGAT---TAGAAGCCTTGATTAACTCTGGTG--CAAGTCCTTAGATTAGGC : 461
deg7180000 : CATAAGGGGTGCAAGGTGACAATTACTCTTTGAAAATTCATAAAATAAGAAATAATAAATACTAATGGATTAAAATAATGAATGGCCAAG : 465
lcl|deg718 : TAGGGGAAGTAAGCAATCCCTTGGATTGCTTTCCCGTGTGTTGCAAGGGTGATTACATGGTAAGACAGTCCCTTGGATTGCTTACCT : 496
Markir-1-A : ----- : -
lcl|deg718 : CCTTAGAGCTTCATTATTAACTACATTGAAGTTGGAAACAACCTTGACGCTTAATCCAGACTCATTGGAAGTTGAAAACAACCTTGTAGT : 374
a

Şekil 4.8. Markir-1’in DNA dizisinin havuç genomuna ait DNA dizileri ile karşılaştırılması

DNA dizilerinde EcoRI enziminin kestiği DNA dizisine (GAATTC) rastlanmadığı için Markir-1’in EcoRI ucuna bitişik olan DNA parçasının çoğaltılması için TAIL-PCR yöntemi kullanılmıştır. TAIL-PCR spesifik primerleri aşağıdaki gibi dizayn edilmiştir.

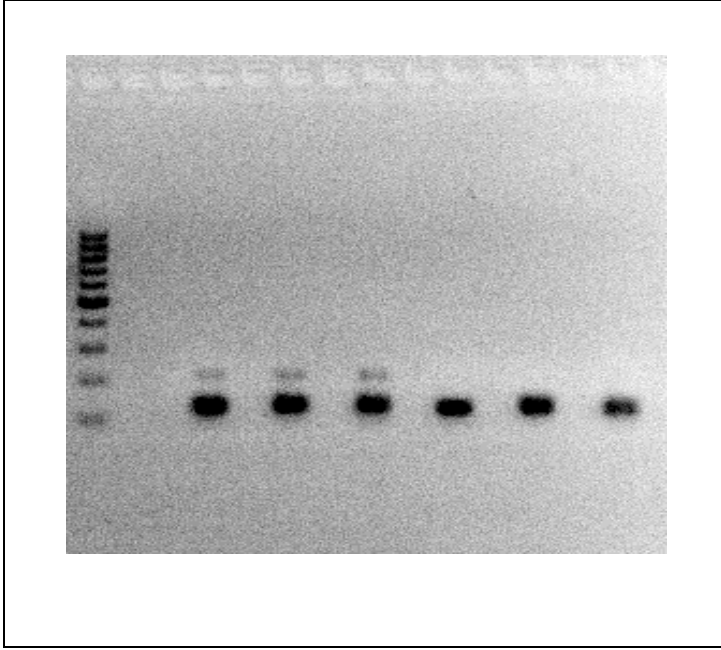
P1 P2 P3

5’ –
TAACATCAGAGACATTTCTAACTGATGTCTAAGACTGATGTCTGAAGTGTGATGTCTATTCCACGATGTC
TATTCCACTTTTTCTAGTAGTGAATTC–3

3’ –
ATTGTAGTCTCTGTAAAGATTGACTACAGATTC**TGACTACAGACTTCACACTACAGATAAGGTGCTACAG**
ATAAGGTGAAAAAGATCATCACTTAAG–5

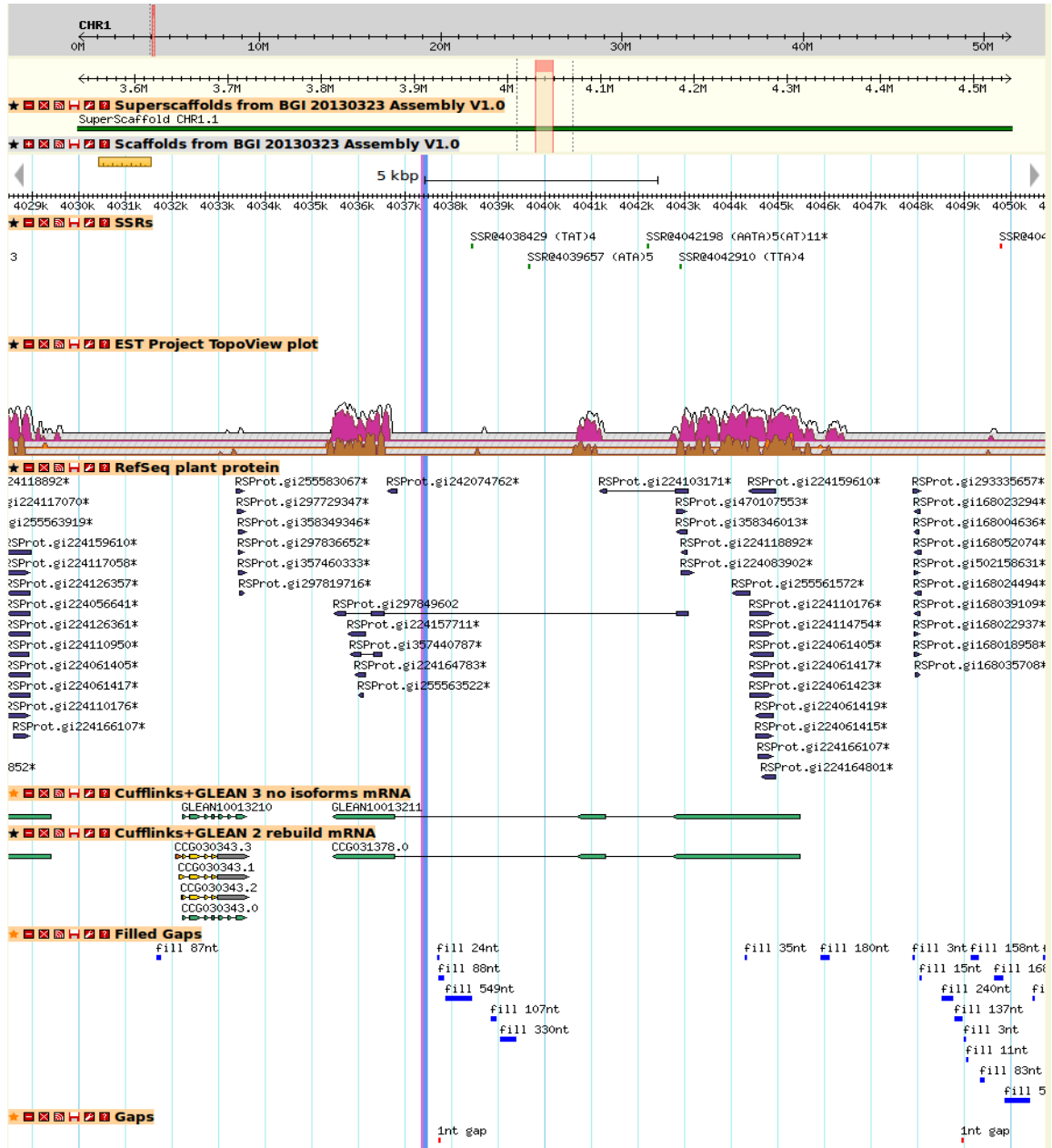
4.3.1.2. Markır-2'nin karakterizasyonu

EATA-MCTG primer kombinasyonunda belirlenen Markır-2'nin karakterizasyonu için AFLP reaksiyonları tekrar yapılmış ve Markır-1'de olduğu gibi poliakrilamit jelde yürütülmüştür. AFLP markırları gümüş boyama yöntemi ile görüntülenmiş ve jel üzerinde Markır-2 tespit edilmiştir. Poliakrilamit jeli üzerinde Markır-2'nin DNA bantları kesilip EATA ve MCTG AFLP primerleri kullanılarak tekrar çoğaltılmıştır. Çoğaltılan AFLP markırı bu kez agaroz jelde yürütülmüş ve markıra ait DNA'lar agaroz jelden izole edilmiştir (Şekil 4.11).



Şekil 4.11 Markır-2'nin tekrar çoğaltıldıktan sonra agaroz jeldeki görünümü

Agaroz jelden izole edilen AFLP markırının DNA dizisi belirlenmiştir. Markır-2'nin uzunluğunun 102 bp olduğu görülmüştür. Bu markırın DNA dizisi ABD'deki havuç genomuna ait DNA dizileri ile karşılaştırılmıştır. Havuç genomunun birinci kromozomu üzerindeki DNA dizileri ile eşleştiği tespit edilmiş ve havuç genomunda sadece bir kopyasının bulunduğu görülmüştür (Şekil 4.12).



Şekil 4.12 Havuç genomunun 1. Kromozomunda Markır-2'nin bulunduğu bölge

Markır-2'nin analizi kolayca STS markırına dönüştürülmesi Markır-2'ye bitişik DNA bölgelerinin çoğaltılıp bu DNA bölgelerinde uygun polimorfizmin belirlenmesi ile mümkün olacaktır. Bu nedenle Markır-2'ye bitişik DNA dizileri Wisconsin Üniversitesinden elde edilmiştir (Şekil 4.13).


```

      7840      *      7860      *      7880      *      7900      *      7920
CHR1 40290 : TCCAAGATCATCATACTGGGTACATAAATATATAATAAATAATTCAATTTCTAGTAATTAGGTAAATAGAACTTCAAC : 7921
Markir-2 : ----- : -

      *      7940      *      7960      *      7980      *      8000      *
CHR1 40290 : GATTATATTTATTTGTGTCCCTAACATTATTATAATATTAAATGGAAATCTATTAATAAGAAATAATGTATAAGAGATGGTAAGCAT : 8010
Markir-2 : ----- : -

      8020      *      8040      *      8060      *      8080      *      810
CHR1 40290 : TAATATGGAAAAAGTAAATATATGATTATTAGATATATAAATAAGAACCTATCTTATAATTTAGTTTAGAACCTATCTAGCTAA : 8099
Markir-2 : ----- : -

      0      *      8120      *      8140      *      8160      *      8180
CHR1 40290 : TCCCTGAGAGTTACACTTGGAGCAAGGTCTTAATAAGCAAGTACTGCAATATATAGTCATGGTCCGAGAGAGCGGCATAAATGATCAT : 8188
Markir-2 : ----- : -

      *      8200      *      8220      *      8240      *      8260      *      8
CHR1 40290 : TGAAGTCTAGTTCTTATTTCCAATCTAGTCATTTTACTTTAAATATTTTTTTTAATGGTCATTAAACTTAACTTACTTAATTTTGTGGT : 8277
Markir-2 : ----- : -

      280      *      8300      *      8320      *      8340      *      8360
CHR1 40290 : CACTCCGTTTTCCTAACACATCCACTCTAGCAGTTTCGATAGATGAAGAACTCCGCAAGAAATTACAGATTTCAGAGCTTCATATG : 8366
Markir-2 : ----- : 10
                        A TTCATATG

      *      8380      *      8400      *      8420      *      8440      *
CHR1 40290 : GTCTATGTAACGAATGAAACAGCATTATCTAATAGAAATAAAAAATGATGCAAGTGATATCATTTGTTTTGGCTTTATTGTACCAG : 8452
Markir-2 : GTCTATGTAACGAATGAAACAGCATTATCTAATAGAAATAAAAAATGATGCAAGTGATATCATCAGTTATGTTGGCTTTATTGTACCAG : 99
      GTCTATGTAACGAATGAAACAGCATTATCTAATAGAAATAAAAAATGATGCAAGTGATATCAT GTT TTGGCTTTATTGTACCAG

      8460      *      8480      *      8500      *      8520      *      8540
CHR1 40290 : TTAAGTAATAAATCAATAACAAGCAATAAGAAATGTAGTCTCTGACTTAACTTTGGGTATTTCTTTTCCCTACCTGATTTTAAAA : 8541
Markir-2 : TTA----- : 102
      TTA

```

Şekil 4.13. Markir-2'nin DNA dizisinin havuç genomundaki DNA dizileri ile eşleşmesi

Şekil 4.13 incelendiğinde açılım popülasyonundaki havuç genotipi ile genomun nükleotid dizisi belirlenen havuç genotipi arasında küçük farklılıkların olduğu tespit edilmiştir.

TARTIşMA VE SONUÇ

Havuç gibi erselik iek yapısına sahip bitkilerde melezleme yapabilmek için emaskülasyon işleminin yapılması gerekmektedir. Emasklasyon işlemi havuç bitkisi çiçeklerinin küçük ve bir çiçekten en fazla iki tohum alınabilmesinden dolayı oldukça uzun süren ve masraflı bir işlemdir. Bu sebeplerden dolayı havuç bitkisinde hibrit tohum üretiminde kısır bitkilerin kullanımı ıslahçılar açısından daha pratik olmaktadır. Dolayısıyla, havuç bitkisinde hibrit tohum üretimi için erkek kısır bitkilere ihtiyaç duyulmaktadır.

Hibrit tohum üretiminde  ıslah hattına ihtiyaç duyulmaktadır. Bunlardan birincisi kısır sitoplazmaya sahip genetik olarak da kısır olan ana hattır. Hibrit tohum her zaman ana hattan elde edilmektedir. Ana hat kısır olduğu için devam ettirilebilmesi için genetik yönden aynı fakat sitoplazmik yönden fertil olan idameci hatta ihtiyaç duyulmaktadır. Ana hattın devamlılığı idameci hat ile çaprazlanması ile olmaktadır. Son olarak hibrit tohum elde edilebilmesi için normal sitoplazmaya sahip genetik yönden fertil olan baba hatta ihtiyaç duyulmaktadır. Ana ve baba hattın çaprazlanması sonucu ile hibrit tohum elde edilebilmektedir.

Havuç bitkisinde sitoplazmik genetik erkek kısırlığa sebep olan genlerin belirlenmesi kısır bitkilerin belirlenmesini ve bu bitkilerin hibrit tohum üretiminde ihtiyaç duyulan hatların elde edilmesinde kullanımını sağlayacaktır. Bu araştırmada havuç bitkisinde sitoplazmik genetik erkek kısırlığa neden olan genler moleküler yöntemlerden AFLP tekniği ile karakterize edilmiştir. 96 ve 160 bitkiden oluşan iki popülasyon kullanılmıştır. DNA izolasyonu Fütterer ve ark. (1995) tanımladığı yönteme göre yapılmıştır. DNA konsantrasyonları qubit cihazı ile ölçüldükten sonra AFLP analizleri yapılmıştır. AFLP analizlerinde 225 primer kullanılmıştır. AFLP analizleri sonucunda EACT-MCAT ve EATA-CTG primer kombinasyonlarına ait iki adet markır tespit edilmiştir. Markır-1'in genomda bulunduğu blde TAIL PCR sonuçlarına göre belirlenecektir. Markır-2'nin havucun 1. kromozomunda olduğu tespit edilmiştir. Markırların her iki popülasyonda da erkek fertil bitkilerde çoğaldığı grlmştir. Bu bir beklenen sonuçtur. Çünkü havuç bitkisinin erkek fertil olması baskın bir karakterdir.

Dolayısıyla erkek fertil olan bitkilerde erkek kısırlık genleri (*Rf*) heterozigot durumda olursa hem çekinik hem de baskın alleli bulunduracaktır. Çekinik allele bağlantılı bir markır hem erkek kısır bitkilerde hem de heterozigot erkek fertil bitkilerde çoğalacaktır. Dolayısıyla heterozigotlardan dolayı sadece erkek kısır bitkilerde çoğalan fakat erkek fertil bitkilerde çoğalmayan bir AFLP markırına rastlamak mümkün olmayacaktır.

Yapılan araştırmalarda havuç bitkisinde görülen CMS (sitoplazmik genetik erkek kısırlık) kısırlık kalıtımının birden fazla gen tarafından kontrol edildiği ifade edilmiştir (Thompson 1961; Hansche ve ark. 1963; Wolyn ve ark. 1998). Alessandro ve ark. (2012), tarafından yapılan en son araştırmada havucun hücre çekirdeğinde yer alan ve sitoplazmik genetik erkek kısırlığı kontrol eden *Rf* genlerin haritalanmasına yöneliktir. Yapılan çalışmada havuç bitkisinde sitoplazmik genetik erkek kısırlığı kontrol eden *Rf* genine bağlantılı iki markır tespit etmişlerdir. *Rf* genlerine komşu bu markırların havucun 9. kromozomunda olduğu gösterilmiştir. EAAC-MCAC ve EACA-MCAT primer kombinasyonlarına ait markırlar 4.38cM ve 1.12 cM’da haritalanmışlardır. Yapılan araştırmalarda markırların bulundukları kromozomların farklı olduğu görülmüştür. Bu farklılığın sebebi kullanılan popülasyonların farklı olmasından kaynaklı olabileceği gibi bulunan sitoplazmik genetik erkek kısırlığa sebep olan *Rf* geninin farklı olmasından da kaynaklı olabilmektedir.

Sitoplazmik genetik erkek kısırlığı sisteminin görüldüğü soğan bitkisinde ise ilk kısır materyal, 1943 yılında Kaliforniya’ da yetiştirilen İtalyan kırmızı soğan çeşidinde keşfedilmiştir (Budar ve Pelletier, 2001). Havuç bitkisinde *Rf* harfleriyle ifade edilen kısırlık geni soğan bitkisinde *Ms* şeklinde sembolize edilmektedir. Havuç bitkisinde olduğu gibi S stoplazma ve homozigot resesif *ms* geni içeren hat ana olarak, N stoplazma ve *msms* geni ise restorer olarak kullanılmaktadır. Klasik melezleme çalışmaları ile bir soğan popülasyonu veya karakterize edilmemiş açılım materyallerinden idame hatların izolasyonu için en az 4 yıl kadar bir süre gerekmektedir. Yapılan moleküler çalışmalar sonucunda markırlar yardımıyla normal ve kısır sitoplazmalar ayırt edilebilmiştir (Havey 1995). Moleküler markır kullanılarak *ms* lokusunun klonlanması çalışmaları da yapılmış ve daha sonraki yıllarda konuyla ilgili yapılacak çalışmalara temel oluşturmuştur. *Ms* lokusu RFLP tekniği kullanılarak

1.9 – 8,6 cM uzunlukta klonlanabilmiştir (Gökce ve ark., 2002; Gokce ve Havey 2002). Islahçılar; *Ms* lokusunun, daha yakın klonlanması halinde, test melezlemelerine gereksinim duymadan sitoplazmik erkek kısırlık idamesini sağlayacak genotipleri kısa zamanda belirleyebileceklerdir. Domates bitkisinde bulunan stoplazmik genetik erkek kısırlığı kaynağı ise henüz moleküler olarak incelenip haritalanması yapılmamıştır. Fakat çalışmaların devam ettiği belirtilmiştir (Stoeva-Popova ve ark. 2007).

Yapılan bu araştırmanın sonucunda havuç bitkisinde sitoplazmik genetik erkek kısırlığa neden olan *Rf* genleri ile bağlantılı 2 AFLP markırı belirlenmiş ve STS markırlarına dönüştürülebilmesi için bu markırlara ait DNA dizileri tespit edilmiştir. Markır-1'e bitişik DNA parçaları TAIL-PCR yöntemi ile çoğaltılmış ve Markır-1'e bitişik DNA parçasının nükleotid dizleri belirlenmiştir. Markır-2'ye bitişik DNA parçalarının nükleotid dizleri ise Wiconsin Üniversitesinden elde edilmiştir. Bundan sonra yapılacak olan çalışmalarda bu DNA dizileri kullanılarak, bu çalışmada belirlenen havuçta *Rf* lokusuna bağlı AFLP markırlarının PCR'a dayalı STS markırlarına dönüştürülmesi gerçekleştirilmelidir. Buna ek olarak, havuç genomunda bu markırların bulunduğu DNA bölgesindeki potansiyel genlerin analizi yapılarak havuç genomunda erkek kısırlığa neden olan gen ya da genler tespit edilebilecektir.

KAYNAKLAR

- Abdel-Aal, E.M., Akhtar, H., Zaheer, K., Ali, R. 2013.** Dietary sources of lutein and zeaxanthin carotenoids and their role in eye health. *Nutrients*, 5: 1169-1185.
- Akagi, H., Nakamura, A., Yokozeki-Misono, Y., Inagaki, A., Takahashi, H., Mori, K., Fujimura, T. 2004.** Positional cloning of the rice *Rf*-1 gene, a restorer of BT-type cytoplasmic male sterility that encodes a mitochondria-targeting PPR protein. *Theor Appl Genet*, 108: 1449-1457.
- Allesandro, M.S., Galmarini, C.R., Iorizzo, M., Simon, P.W. 2012.** Molecular mapping of vernalization requirement and fertility restoration genes in carrot. *Theor Appl Genet*, 112: 122-132.
- 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: 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*, DOI 10.1007/s10681-010-0342-5.
- Banga, O., Petiet, J., Bennekom, J.L., 1964.** Genetic analysis of male-sterility in carrot. *Euphytica*, 13: 75–93.
- Bentolila, S. Alfonso, A.A., Hanson, M.R., 2002.** A pentatricopeptide repeat containing gene restores fertility to cytoplasmic malesterile plants. *Proc Natl Acad Sci.*, 9: 10887-10892.
- Bouvier, F., Suire, C., Mutterer, J., Camara, B., 2003.** Oxidative remodeling of chromoplast carotenoids: identification of the carotenoid dioxygenase CsCCD and CsZCD genes involved in crocus secondary metabolite biogenesis. *Plant Cell* 15: 47-62
- Bradeen, J.M., Simon, P.W., 1998.** Conversion of an AFLP fragment linked to the carrot Y2 locus to a simple, codominant, PCR-based marker form. *Theor Appl Genet*, 97:960-967.
- 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 *Rfo* restorer gene of Ogura cytoplasmic male sterility encodes a protein with multiple pentatricopeptide repeats. *Plant J.*, 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.
- Close, D. C., Beadle, C. L., 2003.** The ecophysiology of foliar anthocyanin. *The Botanical Review*, 69(2):149-161.

Demmig, B., Adams, W.W., 2002. Antioxidants in photosynthesis and human nutrition. *Science*, 298: 2149-2153

Desloire, S., Gherbi, H., Laloui, W., Marhadour, S., Clouet, V., Cattolico, L., Falentin, C., Giancola, S., Renard, M., Budar, F., Small, I., Caboche, M., Delourme, R., Bendahmane, A., 2003. Identification of the fertility restoration locus, Rfo, in radish, as a member of the pentatricopeptide repeat protein family, *Embo Rep.*, 4: 588-594.

Fang, Z., Liu, Y., Lou, P., Liu, G., 2004. Current trends in cabbage breeding. *Journal of New Seeds*, 6: 75-107.

Fester, T., Hause, B., Schmidt, D., Halfmann, K., Schmidt, J., Wray, V., Hause, G., Strack, D., 2002. Occurrence and localization of apocarotenoids in arbuscular mycorrhizal plant roots. *Plant Cell Physiol*, 43: 256-265

Fütter, J., Gisel, A., Iglesias, V., Kloti, A., Kost, B., Mittelsten-Scheid, O., Neuhaus, G., Neuhaus-Url, G., Schrott, M., Shillito, R., Spangenberg, G. And Wang, Z.Y., 1995. Standard molecular techniques for the analysis of transgenic plants, *Gene Transfer to Plants*, Ed: Potrykus, I., Spangenberg, G., Springer-Verlag, New York, NY, USA. Pp: 215–218.

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.

Ghosh, D., Konishi, T., 2007. Anthocyanins and anthocyanin rich extracts: role in diabetes and eye function. *Asia Pac J. Clin Nutr.*, 16(2): 200-208.

Giuliano, G., Al-Babili, S., von Lintig, J., 2003. Carotenoid oxygenases: cleave it or leave it. *Trends Plant Sci.*, 8:145-149

Gökçe, A.F., Havey, M.J., 2002. Linkage equilibrium among tightly linked RFLPs and the Ms locus in openpollinated onion populations. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 127:944-946.

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.

Grune, T., Lietz, G., Palou, A., Ross, A.C., Stahl, W., Tang, G., 2010. Beta-carotene is an important vitamin A source for human. *The journal of Nutrition*, 140: 85-86

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., 1984. Sebze Yetiştiriciliği Cilt III. Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Ankara, 183 s.

Günay A., 2005. Sebze Yetiştiriciliği Cilt II. Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, İzmir, 531 s.

Hahihara E., Itchoda, N., Habu, Y., Iida, S., Mikami, T., Kubo, T., 2005. Molecular mapping of a fertility restorer gene for owen cytoplasmic male sterility in sugar beet. *Theor Appl Genet.*, 111: 250-255.

Hansche, P.E., Gabelman W.H., 1963. Digenic control of male sterility in carrots (*Daucus carota* L.). *Crop Sci.*, 3: 383-386.

Havey, M.J., 1995. Identification of cytoplasm using the polymerase chain reaction to aid in the extraction of maintainer lines from open-pollinated populations of onion. *Theor. Appl. Genet.*, 90:263-268.

Havey, M.J., 2004. The use of cytoplasmic male sterility for hybrid seed production. *Molecular Biology and Biotechnology of Plant Organelles*, 23:623-634.

İpek A., İpek M., Simon P.W., 2006. Association of reversible inactivation of the maize transposable element Ds with tissue-specific processing of the 35S:TPase transcript in carrot (*Daucus carota* L.), *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 81:819-826.

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. *Theor. Appl. Genet.* 120: 1279–1287.

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

Juergens, M., Paetsch, C., Kramer, I., Zahn, M., Rabenstein, F., Schondelmaier, J., Schliephake, E., Snowdon, R., Friedt, W., Ordon, F., 2010. Genetic analyses of the host-pathogen system Turnip yellows virus (TuYV)—rapeseed (*Brassica napus* L.) and development of molecular markers for TuYV-resistance. *Theor. Appl. Genet.*, 120:735-744

Kan, S.Y., Lee, K.J., Lee, G.J., Kim, J.B., Chung, S.J., Song, J.Y., Lee, B.M., Kim, D.S., 2010. Development of AFLP and STS markers linked to a waterlogging tolerance in Korean soybean landraces. *Biologia Plantarum*, 54:61-68.

Karadeniz, G., 2006. Domates ve havuçta karotenoid madde dağılımı ve antioksidan aktivitenin belirlenmesi. Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri.

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

Kjellenberg, L., 2007. Horticulture and agricultural science II. Swedish University of Agricultural Sciences, Swedish, 46 pp.

Koizuka, N., Imai, R., Fujimoto, H., Hayakawa, T., Kimura, Y., Kohno-Murase, J., Sakai, T., Kawasaki, S., Imamura, J., 2003. Genetic characterization of pentatricopeptide repeat protein gene, orf687, that restores fertility in the cytoplasmic male-sterile Kosen 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.* 37:315-325.

Kubo, N., Saito, M., Tsukazaki, H., Kondo, T., Matsumoto, S., Hirai, M., 2010. Detection of quantitative trait loci controlling morphological traits in *Brassica rapa* L. *Breeding Science.*, 60:164–171.

Lucier, G., Biing H.L., 2007. Factors Affecting Carrot Consumption in the United States.

Maçkeviç, P.F., 1951. Anadolu havuçları. Türkiye'nin zirai bünyesi. Türkiye şeker fabrikaları A.Ş. neşriyatı No:20

Mazza, G., 2007. Anthocyanins and heart health. *Ann. Ist. Super. Sanita*, 43(4):369-374.

Mccollum, G.D., 1966. Occurrence of petaloid stamens in wild carrot (*Daucus carota*) from Sweden. *Economic Botany*, 20:361-367.

Millborrow, B.V., 2001. The pathway of biosynthesis of abscisic acid in vascular plants: a review of the present state of knowledge of ABA biosynthesis. *J. Exper Bot* 52:1145–1164.

Morelock, T.E., Simon P.W., Peterson C.E., 1966. Wisconsin Wild: Another petaloid male-sterile cytoplasm for carrot, *HortSci.*, 31:887-888.

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.

Nothnagel, T., Ahne, R., Straka, P., 2005. Morphology, inheritance and mapping of a compressed lamina mutant of carrot. *Plant Breeding*, 124:481-486.

Nothnagel, T., Straka, P., 2003. Inheritance and mapping of a yellow leaf mutant of carrot (*Daucus carota* L.). *Plant Breeding* 122:339-342.

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.

Olson, M., Hood, L., Cantor, C., Botstein, D., 1989. A common language for physical mapping of the human genome. *Science*, 245:1434-1435.

Peters, S. 2006. Carrots: Enjoyed by kids of all ages. *Newsletter*, 59: 1-2.

Peterson, C.E., Simon, P.W, 1986. Carrot breeding : breeding vegetable crops, Ed.: Baset , M.J., USA, Pp: 321-355.

Pingitore, M., Matthews, B., Bottino, J.P., 1989. Analysis of the mitochondrial genome of *Daucus carota* with male sterile and male fertile cytoplasm. *J. Heredity*, 80:143-145.

Robison, M.M., Wolyn, D.J., 2006. Petaloid-type cms in carrot is not associated with expression of atp8 (orfB). *Theor. Appl. Genet.*, 112: 1496-1502.

Rodriguez, D.B, Raymundo, L.C, Lee, T., Simpson, K.L., Chichester, C.O., 1976. Carotenoid pigment changes in ripening *Momordica charantia* fruits *Annals of Botany*, pp. 615–624.

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

Safadi, B. 2008. Characterization and distribution of *daucus* species in Syria. *Biologia*, 63 (2): 177-182.

Santos, C.A.F., Simon, P.W., 2002. QTL analyses reveal clustered loci for accumulation of major provitamin A carotenes and lycopene in carrot roots. *Mol Genet Genomics*, 268:122-129.

Schlotterer, C., 2004. The evolution of molecular markers-just a matter of fashion. *Nat. Rev. Genet.*, 5:63-69.

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. *Phytother Res.* 27: 737-744.

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

Shipra, V., Hooper, L.V. 2011. Eat your carrots T cells are raring to go. *Immunity* 34: 290-292.

Simon, P.W. 2000. Domestication, historical development, and modern breeding of carrot. *Plant Breed Rev.*, 19:157-190.

- Stoeva-Popova, P.K., Dimaculangan, D., Radkova, M., Vulkova, Z., 2007.** Towards cytoplasmic male sterility in cultivated tomato. *Journal of Agricultural, Food and Environmental Sciences*. from <http://www.scientificjournals.org/journals2007/articles/>
- 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.
- Tanumihardjo, S.A., Yang, Z. 2005.** Carotenoids: Epidemiology of health effects. In: Caballero B, Allen L, Prentice A (eds) *Encyclopedia of human nutrition*, Elsevier Ltd., Oxford, pp 339–345.
- Tathoğlu, T., 2008.** Hibrid çeşit ıslahı ve hibrid çeşit ıslahında kullanılan genetik mekanizmalar. VII. Sebze Tarım Sempozyumu, Yalova.
- Tee, E. S. 1992.** Carotenoids and Retinoids in Human Nutrition. *Food Science and Nutrition*, 31:103-163.
- Tezuka, T., Waki, K., Yashiro, K., Kuzuya, M., Ishikawa, T., Takatsu, Y., Miyagi, M., 2009.** Construction of a linkage map and identification of DNA markers linked to *Fom-1*, a gene conferring resistance to *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* race 2 in melon. *Euphytica*, 168:177–188.
- Thompson D.J., 1961.** Studies on the inheritance of male-sterility in the carrot, *Daucus carota* L. var. *Sativa*. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 78:332-338.
- Virmani, S.S., Ahmed, M.I., 2001.** Environment-sensitive genic male sterility in crops. *Advances in Agronomy*, 139-202.
- Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, 1995.** AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.*, 23: 4407-4414.
- Welch J.E., Grimball, E.L., 1947.** Male sterility in carrot. *Science*, 106:594.
- Wolyn, D.J., 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.
- Ying, M., Dreyer F., Cai, A., Jung, C., 2003.** Molecular markers for genic male sterility in Chinese cabbage. *Euphytica*, 132: 227-234.
- 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
- Zabeau, M., 1993.** Amplified fragment length polymorphism (AFLP) . European Patent Application. 92402629.7

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı	: Destan Çelik
Doğum Yeri ve Tarihi	: Oltu/1988
Yabancı Dili	: İngilizce
Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)	
Lise	: Çan İbrahim Bodur Anadolu Lisesi/ 2007
Lisans	: Uludağ Üniversitesi /2012
Yüksek Lisans	: Uludağ Üniversitesi / 2014
İletişim (e-posta)	: celik.destan@gmail.com