ESKİŞEHİR
ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

BİLECİK
ŞEYH EDEBALİ ÜNİVERSİTESİ

Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı

DNA TABANLI MOLEKÜLER YÖNTEMLER KULLANILARAK TÜRKİYE'DE YETİŞTİRİLEN FARKLI FASULYE (*Phaseolus vulgaris*) GENOTİPLERİNİN GENETİK ÇEŞİTLİLİK ANALİZİ

Berru ŞAHİN HÜNDÜREL
Yüksek Lisans

Tez Danışmanı
Doç. Dr. İsmail POYRAZ

BİLECİK, 2019
Ref.No: 10295481

ESKİŞEHİR
ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

BİLECİK
ŞEYH EDEBALİ ÜNİVERSİTESİ

Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı

DNA TABANLI MOLEKÜLER YÖNTEMLER KULLANILARAK TÜRKİYE'DE YETİŞTİRİLEN FARKLI FASULYE (*Phaseolus vulgaris*) GENOTİPLERİNİN GENETİK ÇEŞİTLİLİK ANALİZİ

Berru ŞAHİN HÜNDÜREL
Yüksek Lisans

Tez Danışmanı
Doç. Dr. İsmail POYRAZ

BİLECİK, 2019

ESKISEHIR
ANADOLU UNIVERSITY

BILECIK
SEYH EDEBALI UNIVERSITY

Graduate School of Sciences
Department of Molecular Biology and Genetics

THE GENETIC DIVERSITY ANALYSIS OF DIFFERENT BEAN (*Phaseolus vulgaris*) CULTIVATED GENOTYPES IN TURKEY USING DNA-BASED MOLECULER METHODS

Berru ŞAHİN HÜNDÜREL
Master's Thesis

Thesis Advisor
Assoc. Prof. Dr. İsmail POYRAZ

BILECIK, 2019

BİLECİK ŞEYH EDEBALİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS
JÜRİ ONAY FORMU

Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun 09/08/2019 tarih ve 45/01 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 09.09.2019 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Berru ŞAHİN HÜNDÜREL'in"DNA Tabanlı Moleküler Yöntemler Kullanılarak Türkiye'de Yetiştirilen Farklı Fasulye (*Phaseolus vulgaris*) Genotiplerinin Genetik Çeşitlilik Analizi." başlıklı tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak oy birliği/ oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE(TEZ DANIŞMANI): Doç.Dr. İsmail POYRAZ

ÜYE : Prof.Dr. Emel SÖZEN

ÜYE : Doç.Dr. Yasemin EVRENOSOĞLU

ONAY

Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun …./…./…..... tarih ve ……./…… sayılı kararı.

İMZA/ MÜHÜR

TEŞEKKÜR

Lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca benden desteğini esirgemeyen sabrına ahlakına hayran olduğum sevgili danışmanım Doç. Dr. İsmail POYRAZ'a teşekkürlerimi sunarım.

Her zaman en büyük desteği hissettiğim anne babama ve sevgili eşim Süleyman HÜNDÜREL'e teşekkürlerimi sunarım.

Tez yazım sürecinde ve her zaman yanımda hissettiğim güzel dostlarıma teşekkür ederim.

BEYANNAME

Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kılavuzu'na uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında, tez içindeki tüm verileri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uygun olarak sunulduğunu, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezde yer alan verilerin bu Üniversite veya başka bir üniversitede herhangi bir tez çalışmasında kullanılmadığını beyan ederim.

…../…./ 2019

Berru ŞAHİN HÜNDÜREL

DNA TABANLI MOLEKÜLER YÖNTEMLER KULLANILARAK TÜRKİYE'DE YETİŞTİRİLEN FARKLI FASULYE (*Phaseolus vulgaris*) GENOTİPLERİNİN GENETİK ÇEŞİTLİLİK ANALİZİ

ÖZET

Dünyada fasulyenin 230 civarında türünün var olduğu, bunların 20 adedinin insan beslenmesinde yoğun olarak kullanıldığı ve en fazla üretimi yapılan türün ise *P. vulgaris* olduğu bilinmektedir. Bu çalışmada, Eskişehir Tarımsal Araştırma enstitüsünden temin edilen 38 fasulye genotipinde, ISSR (Basit Tekrarlı Diziler Arası Polimorfizmi), RAPD (Rastgele Çoğaltılmış DNA Polimorfizmi) ve ITS (Transkripsiyon İçindeki Ara Parça) DNA tabanlı moleküler belirteçleri kullanılarak genetik çeşitlilik analizi gerçekleştirilmiştir. Analizlerde dış grup olarak farklı fasulye türüne ait Ph.Corh çeşidi kullanılmıştır.

PCR ürünü bantlar Phoretix1DPro programıyla analiz edilmiş, elde edilen var (1) yok (0) (binary yöntemi) verileri kullanılarak UPGMA metoduyla Jaccard Benzerlik/Mesafe Matriksi oluşturulmuştur. Matriks verilerinden elde edilen Newick formatıyla Mega 6.0 programında her bir yöntem için filogenetik ağaç oluşturulmuştur. ISSR yöntemiyle elde edilen filogenetik ağaca ait mesafe matriksi verilerine göre UI1140 ve Novanbey (mesafe verisi: 0.946) genotiplerinin birbirine en uzak bireyler olduğu görülmüştür. RAPD yöntemiyle elde edilen filogenetik ağaç sonucuna göre ise, Cardinal Yozgat Barbunyası ve 17SBVD20 (mesafe verisi: 0.805) genotiplerinin en uzak bireyler olduğu belirlenmiştir. ITS yöntemiyle elde edilen filogenetik ağaç, dış grup ayrımı net olmadığı için değerlendirilmemiştir.

Genetik yakınlıkları daha önce analiz edilmemiş genotipler kullanılarak gerçekleştirilen bu çalışmadan elde edilen veriler, gelecekte yapılacak ıslah çalışmalarında hastalıklara daha dayanıklı ve verimi yüksek yeni çeşitlerin geliştirilmesi için önemli bir veri tabanı niteliğindedir.

Anahtar Kelimeler: Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.), ISSR, RAPD, ITS, Filogenetik Ağaç

THE GENETIC DIVERSITY ANALYSIS OF DIFFERENT BEAN (*PHASEOLUS VULGARIS*) CULTIVATED GENOTYPES IN TURKEY USING DNA-BASED MOLECULER METHODS

ABSTRACT

It is known that there are around 230 species of beans in the world and 20 of them are used extensively in human nutrition and P. vulgaris is the most produced species.

In this study, the DNA-based molecular markers of 38 beans genotypes obtained from Eskişehir Agricultural Research Institute an important database has been created for rapid recovery of new varıetıes which are both resistant to determined diseases and with high efficiency in the future improvement studies with ISSR (Inter Simple Sequence Repeat Polymorphism), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) and ITS (Internal Transcribed Spacer) markers. Ph.Corh cultivars belonging to different bean species were used as external groups in the analyzes.

The band analysis of the PCR products of the selected markers was performed by Phoretix1DPro program. By using the data obtained by the binary method, Jaccard similarity matrix was obtained by UPGMA method. With the Newick format obtained from matrix data, phylogenetic tree was created for each method in Mega 6.0 program.

As a result of distance matrix data obtained by tree obtained by ISSR primer, UI1140 and Novanbey (distance matrix: 0.946) genotypes were found to be the most distant individuals and the drawn tree with RAPD primers, Cardinal Yozgat Barbunyası and 17SBVD20 (distance matrix: 0.805) genotypes were identified as the most distant individuals. The phylogenetic tree obtained by the ITS method was not evaluated because the distinction of the out-group was not clear.

Data obtained from this study performed using genotypes that genetic relationship wasn't analyzed have got important data qualification to develop new more resistant and fruitful varieties in future breeding studies.

Keywords: Bean (*Phaseolus vulgaris* L.), ISSR, RAPD, ITS, Phylogenetic Tree

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEŞEKKÜR.....
BEYANNAME .....
ÖZET ..... **I**
ABSTRACT.....**II**
ŞEKİLLER DİZİNİ..... **V**
ÇİZELGELER DİZİNİ..... **VIII**
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....**VIIIX**
1.GİRİŞ **1**
1.1. Fasulye (*Phaseolus vulgaris L.*) Bitkisinin Kökeni ve Tarihçesi..... **4**
1.2.Fasulye (*Phaseolus vulgaris L.*) Bitkisinin Önemi **5**
1.3.Bitki Islahının Anlamı ve Önemi **7**
1.4. Moleküler Markörler ve Bitki Islahında Kullanımı **9**
1.4.1.Moleküler Markörler 10
2. MATERYAL VE YÖNTEM..... **16**
2.1. Materyal..... **16**
2.2. Yöntem **17**
2.2.1. Tohumların Çimlendirilmesi ve Yaprak Örneklerinin Alınması..... 17
2.2.2. DNA İzolasyonu 17
2.2.3. Spektrofotometre ile DNA Konsantrasyonu, Saflık ve Kalite Tayini 19
2.2.4. ISSR-RAPD-ITS-PCR için kalıp DNA hazırlığı..... 19
2.3.2. Agaroz jel elektroforezi ile ISSR-PCR ürünlerinin yürütülmesi..... 21
2.3.3. ISSR-PCR ürünlerinin görüntülenmesi ve değerlendirilmesi..... 22
2.3.4. ISSR-PCR Sonuçlarının Biyoinformatik Analizi 22
2.4. RAPD-PCR Analizleri **23**
2.4.2. Agaroz jel elektroforezi ile RAPD-PCR ürünlerinin yürütülmesi..... 24
2.4.3. RAPD-PCR ürünlerinin görüntülenmesi ve değerlendirilmesi 25
2.4.4. RAPD-PCR sonuçlarının biyoinformatik analizi 25
2.5. ITS-PCR Analizleri **25**
2.5.1. ITS-PCR Hazırlığı ve Koşulları 25
2.5.2. Agaroz jel elektroforezi ile ITS-PCR ürünlerinin yürütülmesi 26
2.5.3. ITS-PCR ürünlerinin görüntülenmesi ve değerlendirilmesi..... 27
2.5.4 ITS-PCR Kesim Sonuçlarının Biyoinformatik Analizi 29
3. BULGULAR..... **30**
3.1. Fasulye *(Phaseolus vulgaris* L.*)* Genomik DNA İzolasyonu **30**

3.2. Genomik DNA'nın Spektrofotometre'de Ölçümü, Miktar ve Saflık Tayini.....**30**
3.3. ISSR-RAPD-ITS-PCR için Kalıp DNA Hazırlığı.....**31**
3.4. ISSR-PCR Sonuçları ve Polimorfizm Bilgi İçeriğinin Hesaplanması **32**
3.5. RAPD-PCR Sonuçları ve Polimorfizm Bilgi İçeriğinin Hesaplanması **44**
3.6. ITS-PCR Sonuçları ve Polimorfizm Bilgi İçeriğinin Hesaplanması.....**56**
4. TARTIŞMA-SONUÇ.....**60**
KAYNAKLAR **65**
EKLER.....**72**
ÖZ GEÇMİŞ.....

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1.1. Fasulye Bitkisi Yaprak, Dal, Bakla ve Danesi 8
Şekil 1.2. PCR'ın çalışma prensibi 14
Şekil 2.1. A) Fermantas gene ruler 100 bç DNA ladder plus. B) Fermentas gene ruler 1 kb DNA ladder 23
Şekil 3.1. ISSR-01 numaralı primer ile kurulan PCR deneyinin jel görüntüsü M: Markör 34
Şekil 3.2. ISSR-01 numaralı primer ile oluşan bant profilleri. M: Markör 35
Şekil 3.3. ISSR-02 numaralı primer ile kurulan PCR deneyinin jel görüntüsü. M :Markör 35
Şekil 3.4. ISSR-02 numaralı primer ile oluşan bant profilleri. M: Markör 35
Şekil 3.5. ISSR-05 numaralı primer ile kurulan PCR deneyinin jel görüntüsü. M :Markör 36
Şekil 3.6. ISSR-05 numaralı primer ile oluşan bant profilleri. M: Markör 36
Şekil 3.7. ISSR-06 numaralı primer ile kurulan PCR deneyinin jel görüntüsü. M :Markör 36
Şekil 3.8. ISSR-6 numaralı primer ile oluşan bant profilleri. M: Markör 37
Şekil 3.9. ISSR-09 numaralı primer ile kurulan PCR deneyinin jel görüntüsü. M :Markör 37
Şekil 3.10. ISSR-09 numaralı primer ile oluşan bant profilleri. M: Markör 37
Şekil 3.11. ISSR11 numaralı primer ile kurulan PCR deneyinin jel görüntüsü. M:Markör 38
Şekil 3.12. ISSR-11 numaralı primer ile oluşan bant profilleri. M: Markör 38
Şekil 3.13: ISSR12 numaralı primer ile kurulan PCR deneyinin jel görüntüsü. M:Markör 39
Şekil 3.14. ISSR-12 numaralı primer ile oluşan bant profilleri. M: Markör 39
Şekil 3.15. ISSR13 numaralı primer ile kurulan PCR deneyinin jel görüntüsü.M:Markör 40
Şekil 3.16. ISSR-13 numaralı primer ile oluşan bant profilleri. M: Markör 40
Şekil 3.17. ISSR14 numaralı primer ile kurulan PCR deneyinin jel görüntüsü.M:Markör 40

Şekil 3.18. ISSR14 numaralı primer ile oluşan bant profilleri. M: Markör 41
Şekil 3.19. ISSR15 numaralı primer ile kurulan PCR deneyinin jel görüntüsü. M:Markör 41
Şekil 3.20. ISSR-15 numaralı primer ile oluşan bant profilleri. M: Markör..... 41
Şekil 3.21. ISSR-847 numaralı primer ile kurulan PCR deneyinin jel görüntüsü. M:Markör 42
Şekil 3.22. ISSR-847 numaralı primer ile oluşan bant profilleri. M: Markör..... 42
Şekil 3.23. Fasulye çeşit ve hatlarında ISSR primerleri kullanılarak oluşturulan dendrogram 44
Şekil 3.24. RAPD-OPD-01 numaralı primer ile elde edilen jel görüntüsü. M: Markör44
Şekil 3.25. RAPD-OPD-01 numaralı primer ile oluşan bant profilleri. M: Markör 45
Şekil 3.26. RAPD-OPB-17 numaralı primer ile elde edilen jel görümtüsü. M: Markör46
Şekil 3.27. RAPD-OPB-17 numaralı primer ile oluşan bant profilleri. M: Markör 46
Şekil 3.28. RAPD-OPD-07 numaralı primer ile elde edilen jel görüntüsü. M: Markör46
Şekil 3.29. RAPD-OPD-07 numaralı primer ile oluşan bant profilleri. M: Markör 47
Şekil 3.30. RAPD-P5 numaralı primer ile elde edilen jel görüntüsü. M: Markör 47
Şekil 3.31. RAPD-P5 numaralı primer ile oluşan bant profilleri. M: Markör 47
Şekil 3.32. RAPD-P11 numaralı primer ile elde edilen jel görüntüsü. M: Markör 48
Şekil 3.33. RAPD-P11 numaralı primer ile oluşan bant profilleri. M: Markör 48
Şekil 3.34. RAPD-P13 numaralı primer ile elde edilen jel görüntüsü. M: Markör 48
Şekil 3.35. RAPD-P13 numaralı primer ile oluşan bant profilleri. M: Markör 49
Şekil 3.36. RAPD-P14 numaralı primer ile elde edilen jel görüntüsü. M: Markör 49
Şekil 3.37. RAPD-P14 numaralı primer ile oluşan bant profilleri. M: Markör 49
Şekil 3.38. RAPD-P16 numaralı primer ile elde edilen jel görüntüsü. M: Markör 50
Şekil 3.39. RAPD-P16 numaralı primer ile oluşan bant profilleri. M: Markör 50
Şekil 3.40. RAPD-P17 numaralı primer ile elde edilen jel görüntüsü. M: Markör 51
Şekil 3.41. RAPD-P17 numaralı primer ile oluşan bant profilleri. M: Markör 51
Şekil 3.42. RAPD-P21 numaralı primer ile elde edilen jel görüntüsü. M: Markör 51
Şekil 3.43. RAPD-P21 numaralı primer ile oluşan bant profilleri. M: Markör 52
Şekil 3.44. RAPD-P23 numaralı primer ile elde edilen jel görüntüsü. M: Markör 52
Şekil 3.45. RAPD-P213 numaralı primer ile oluşan bant profilleri. M: Markör 53
Şekil 3.46. RAPD-P24 numaralı primer ile elde edilen jel görüntüsü. M: Markör 53

Şekil 3.47. RAPD-P24 numaralı primer ile oluşan bant profilleri. M: Markör 54
Şekil 3.48. Fasulye çeşit ve hatlarında RAPD primerleri kullanılarak oluşturulan dendrogram 56
Şekil 3.49. ITS primleri ile yapılan PCR deneyi jel görüntüsü. M: Markör 56
Şekil 3.50. ITS primerleri ile yapılan PCR deneyinden elde edilen bant profilleri.M: Markör 57
Şekil 3.51. ITS PCR ürünlerinin Hınd*III* Restriksiyon kesim enzimi ile kesim deneyinin jel görüntüsü. M: Markör 58
Şekil 3.52. ITS PCR ürünlerinin Hınd*III* Restriksiyon kesim enzimi ile kesim deneyi sonucunda oluşan bant profilleri. M: Markör 58
Şekil 3.53. ITS PCR ürünlerinin Eco*RI* Restriksiyon kesim enzimi ile kesim deneyinin jel görüntüsü. M: Markör 58
Şekil 3.54. ITS PCR ürünlerinin Eco*RI* Restriksiyon kesim enzimi ile kesim deneyi sonucunda oluşan bant profilleri. M: Markör 59
Şekil 3.55. ITS PCR ürünlerinin Alu*I* Restriksiyon kesim enzimi ile kesim deneyinin jel görüntüsü. M: Markör 59
Şekil 3.56. ITS PCR ürünlerinin Alu*I* Restriksiyon kesim enzimi ile kesim deneyi sonucunda oluşan bant profilleri. M: Markör 59
Şekil 3.57. ITS-PCR ürünlerinin çeşitli Restriksiyon enzim ile kesimi sonucunda elde edilen bant profilleri ile oluşturulan dendrogram 60

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 2.1. Çalışmada kullanılan fasulye çeşit ve hat bilgisi 17
Çizelge 2.2. Kullanılan ISSR primerleri ile ilgili bilgiler 21
Çizelge 2.3. Kullanılan ISSR-PCR bileşenleri ve miktarları 22
Çizelge 2.4. ISSR-PCR uygulama protokolü 22
Çizelge 2.5. Kullanılan RAPD primerleri ile ilgili bilgiler 24
Çizelge 2.6. RAPD-PCR bileşenleri ve miktarları 25
Çizelge 2.7. RAPD-PCR uygulama protokolü 25
Çizelge 2.8. Kullanılan ITS-PCR bileşenleri ve miktarları 27
Çizelge 2.9. RAPD-PCR uygulama protokolü 28
Çizelge 2.10. ITS-PCR ürünlerinin Hınd*III* Restriksiyon Enzimi ile Kesim Protokolü 29
Çizelge 2.11. ITS-PCR ürünlerinin Bam*HI* Restriksiyon Enzimi ile Kesim Protokolü 29
Çizelge 2.12. ITS-PCR ürünlerinin Alu*I* Restriksiyon Enzimi ile Kesim Protokolü .. 29
Çizelge 2.13. ITS-PCR ürünlerinin Sma*I* Restriksiyon Enzimi ile Kesim Protokolü. 30
Çizelge 2.14. ITS-PCR ürünlerinin Eco*RI* Restriksiyon Enzimi ile Kesim Protokolü 30
Çizelge 3.1. Fasulye örneklerinden izole edilmiş genomik DNA'ların miktar ve saflık ölçüm sonuçları 32
Çizelge 3.2. Kullanılan ISSR primerleri sonucu Fasulye çeşit ve hatlarında elde edilen bantlaşma sonuçları ve polimorfizm oranları 40
Çizelge 3.3. Kullanılan RAPD primerleri sonucu Fasulye çeşit ve hatlarında elde edilen bantlaşma sonuçları ve polimorfizm oranları 55

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

A : Adenin

AFLP : Amplified Fragment Length Polymorphism (Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi)

bç (bç) : Baz çifti

C : Sitozin

CTAB : Etil Three Metil Amonyum Bromid

DNA : Deoksiribonükleik Asit

dNTP : Deoksinükleotid Tri Fosfat

EDTA : Etilendiamin-Tetra Asetik Asit Di Sodyum Tuzu

G : Guanin

ISSR : Inter Simple Sequence Repeats (Basit tekrarlı diziler arası polimorfizm)

M : Molar

mg. : Miligram

Mg^{+2} : Magnezyum

$MgCl_2$: Magnezyum Klorur

ml : Mililitre

mm : Milimetre

mM : Milimolar

NaOH : Sodyum Hidroksit

ng : Nanogram

nm : Nanometre

PCR : Polymerase Chain Reaction (Polimeraz zincir reaksiyonu)

RAPD : Randomly Amplified Polymorphic DNA (Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA)

RE : Restriksiyon Endonükleaz

RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism (Kesilmiş Parça Uzunluk Polimorfizmi)

SRAP :Sequence Related Amplified Polymorphism (Dizi-İlişkili Amplifiye Polimorfizm)

ISSR :Inter Simple Sequence Repeats (Basit Tekrarlı Diziler Arası Polimorfizm)

ITS	: Internal Transcribed Spacer/Transkripsiyon İçindeki Ara Parça
T	: Timin
Taq	: Taq polimeraz enzimi
TBE	: Tris- Borik asit- EDTA
TAE	: Tris-asetik asit-EDTA
UPGMA	: Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Means
UV	: Ultraviyole
V	: Volt
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
µM	:Mikromolar

1.GİRİŞ

Dünyadaki hızlı nüfus artışı bazı sorunları beraberinde getirmektedir. Bunlardan en önemlisi gıda problemidir ve bu problemin çözümü ancak bilimsel ve teknolojik çalışmaların yardımı ile olacaktır (Uysal, F., 2002).

Dünyada fasulyenin 230 civarında türünün var olduğu ve bunların 20 adedinin insan beslenmesinde yoğun olarak kullanıldığı, en fazla üretimi yapılan türün ise *P. vulgaris* olduğu bilinmektedir (Uysal, F., 2002). Ekonomik ve bilimsel amaçlı üretimde oldukça sık tercih edilen fasulyenin en önemli üyesi olan *Phaseolus vulgaris* türüdür ayrıca kültürü yapılan fasulyelerin %90'nını bu tür oluşturmaktadır (Gepts, 2001).

Fasulye, dünyada taze bakla üretimi 1.557.233 ha alanda 23.595.714 ton; kuru tane üretimi olarak ise 29.392.817 ha alanda 26.833.394 ton (Anonim, 2016) olarak en fazla ekim ile üretimi yapılmakta olan yemeklik tane baklagil bitkisidir (Blair ve ark., 2007; Galvan ve ark., 2006; Benchimol ve ark., 2007). Kuru fasulyeler, rehidrasyonun ardından olgun kuru tohum şeklinde tüketilen, taze fasulyeler ise kabuğu olgunlaşmadan önce taze olarak tüketilen fasulyelerdir (Myers ve ark., 1999).

Fasulye insan beslenmesinin dışında hayvan beslenmesi, kozmetik sanayi ve boya yapımı gibi alanlarda da kullanılmaktadır (Singh ve ark., 2007). Diğer yandan çapa bitkisi olması, ekim nöbetine girmesi, derin kök yapısına sahip olması sebebi ile alt tabakalardaki besin maddelerini toprağın üstüne taşıması, toprağı gevşetmesi, köklerinde *Rhizobium* bakterisinin oluşturduğu nodüller sayesinde toprağa azot bağlaması nedeni ile çevrecilik ve sürdürülebilir tarım açısında da önemini günümüzde arttıran baklagil bitkisidir (Akçin ve ark.,1998).

Tarımsal üretimde oldukça önemli olan fasulye, sağlıklı bir yaşam için gerekli olan protein, vitamin ve mineralleri içermesi sayesinde öne çıkmaktadır (Kaçar ve ark., 2004; Marotti ve ark., 2006; Ekincialp ve Şensoy, 2018).

Fasulyenin hazım edilebilirlik oranı %84,1'dir. Üstelik fasulye baklalarında bulunan phasol ve phaseolin maddeleri kandaki şeker miktarının düşürülmesine şeker hastalığında kullanılan insülin karekterinde olması nedeniyle kullanıldığı bildirilmektedir (Şalk ve ark 2008).

Orta Amerika kökenli bir bitki türü olan fasulyenin iki gen havuzu tespit edilmiştir. Bunlar Orta Amerika (Mesoamerica) ve Güney Amerika (Andean) bölgeleridir (Gepts 2001).

Son yapılan dizileme çalışmaları fasulyenin kökeninin Orta Amerika(Mesoamerica) olduğunu destekler niteliktedir (Rossi ve ark.,2009.;Bitocchi ve ark., 2012). Fasulye Amerika'da keşfinden sonra muhtemelen İber yarımasından Avrupa'ya ulaşmıştır (Ortwin-Sauer.,1996). *P. vulgaris*, kendine döllenen bir bitki olması, basit diploid yapıda olması (2n=22) ve nispeten küçük genomu olması ve iyi geliştirilmiş moleküler yapı haritasının bulunması gibi özellikleri nedeniyle genomik çalışmalar için oldukça uygun bir türdür (Murray ve ark 2002; Torres ve ark 2004).

Türkiye'de kuru fasulye, ekim alanı ve üretim yönünden nohut ve mercimekten sonra üçüncü sırada yer almaktadır (Şalk ve ark 2008). Günümüzde fasulye kuru tane üretimi 225 000 ton civarındadır (Ghafoor ve ark., 2000). Ekim alanı olarak en fazla Karadeniz bölgesinde yaygın olup, bunu orta güney (Kayseri, Konya, Niğde, Nevşehir) ve orta kuzey (Eskişehir, Kütahya, Uşak, Yozgat) bölgeleri izlemektedir (Ghafoor ve ark., 2000).

Bitki ıslahı, bitkilerin biyolojik ve genetik açıdan düzenlenmesi ve var olan genetik farklılıklardan yararlanarak, onları istenilen amaçlar doğrultusunda geliştirmektir (Sözen, Ö., 2006). Bitki ıslah teknikleri sayesinde kültürü yapılmakta olan bitkilerin verimini arttırmak, ürün kalitesini düzeltmek ile mümkün olacaktır (Sözen, Ö., 2006).

Ancak tüketici çeşitliliğine bağlı olarak artan farklı talepler, yaşam kültürünün de artmasıyla daha dengeli ve sağlıklı beslenme istekleri, ülkenin ekolojik farklılıklarının fazla olması, tarımdaki gelişmeye bağlı olarak oluşan hastalık zararlıların yoğunlukları gibi nedenler, mevcutlarla yetinmeyip sürekli yeni çeşitlerin geliştirilmesini gerektiğini göstermektedir (Sözen, Ö., 2006).

Bitki çeşitleri arasındaki genetik çeşitlilik tahılların genetik ıslahı için çok önemlidir. Entelektüel özelliklerin korunması ve mevcut elit çeşitlerin yaşaması için olumsuzluklar oluşturacak çevresel sorunlara karşı bir temel oluşturmaktadır (Akçin ve ark.,1998).

Genetik çeşitlilik bilgisi genetik ıslah programlarında geri melezleme tekniği ile yeni çeşitler üretmek amacıyla kullanılmakta ve farklı kurumlar tarafından yıllarca kullanılan kültür örneklerinin stabilitesi hakkında bilgi vermektedir (J.S. Veloso ve ark., 2015).

Kültür çeşitliliği bilgisi gelecekteki yetiştirme programlarındaki çeşitliliğini değiştirme veya çeşit çeşit bakım prosedürlerini önerme ihtiyacını işaret edebilir (J.S. Veloso ve ark., 2015).

Bir bitkiyi ve ya bitki grubunun morfolojik olarak diğerlerinden farklı olduğunu gösteren özellikler morfolojik belirteç (markör, markör, markör, işaretleyici vb.) olarak adlandırılabilir (Gülşen ve Mutlu, 2005). Meyve kabuğu, çiçeğin şekli, yaprağın şekli, bitki, meyve ve tohum gibi özellikler bu grup belirteçleri oluşturmaktadır (Gülşen ve Mutlu, 2005).

Protein belirteçleri ile analiz yapılması, morfolojik karakterlerin kullanılmasını tamamlayıcı niteliktedir (Karaca ve ark., 2002). Protein belirteçleriyle analiz, popülasyonlardaki farklılaşmayı morfolojik markörlere oranla daha güvenilir bir şekilde göstermektedir (Şehirali ve ark., 2005). Fakat bu belirteçlerin sayıca az olmaları, çevre koşullarından etkilenmeleri gibi sebeplerden dolayı geniş ölçüde kullanılmamaktadırlar (Onus, 1999; Akashi ve ark., 2002).

Gen kaynağının kullanılabilmesi için kültüre alınmış türlerin ve bunların yabani akrabalarının genetik çeşitliliğin dağılımı ve yayılımının ayrıntılı bir şekilde anlaşılması gereklidir (Furan ve Gebeloğlu 2017). Bu ise DNA polimorfizmine dayanan teknolojilerin kullanılmasını barındıran bazı yöntemler ile birlikte daha etkin başarılabilmektedir (Madakbaş ve ark., 2016) DNA moleküler markörleri (DNA işaretleyicileri), çeşitler arasındaki farklılık ve benzerliklerin belirlenmesi veya çeşitlerle ebeveynleri arasındaki benzerliklerin ve farklılıkların belirlenmesinde yaygın ve etkin olarak kullanılmaktadır (Karaca ve ark., 2002).

DNA markör teknolojisindeki ilerleme olağanüstü boyutlara ulaşmıştır. DNA markörleri, filogenetik analizlerden genlerin klonlanmasına kadar çeşitli analizlerde çok değerli araçlar sağlamışlardır (Erdinc ve ark., 2013). PCR bazlı belirteçler tarafından kolaylaştırılan yüksek yoğunluklu moleküler haritaların gelişimi, hemen hemen tüm karakterlerin haritalanması ve etiketlenmesini mümkün kılmıştır (Kumar, 1999; Furan ve Gebeloğlu 2017). Ayrıca DNA markörleri sayı olarak fazla ve çevre şartlarından etkilenmemekle birlikte RAPD ve ISSR markörleri fasulyelerde genetik çeşitliliğin belirlenmesinde sıkça kullanılmaktadır (Erdinc ve ark., 2013).

Fasulyede de moleküler belirteçlerin kullanılmasıyla yapılan genetik ve haritalama çalışmalarının da sayısı gün geçtikçe artmaktadır (Duran ve ark., 2005; Cruz ve ark., 2005; Sicard ve ark., 2005; Angioi ve ark., 2010; Khaidizar ve ark., 2012; Ceylan ve ark., 2014; Madakbaş ve ark., 2016).

Bu çalışmada, Eskişehir Tarımsal Araştırma enstitüsünden temin edilen 38 fasulye genotipinde, ISSR, RAPD ve ITS DNA tabanlı moleküler belirteçleri kullanılarak genetik çeşitlilik analizinin yapılması amaçlanmıştır.

Elde edilecek veriler gelecekte yapılacak ıslah çalışmalarında hem belirlenen hastalıklara dayanıklı hem de verimi yüksek yeni çeşitlerin hızlı bir şekilde elde edilmesi için önemli bir veri tabanı oluşturacaktır.

1.1. Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) Bitkisinin Kökeni ve Tarihçesi

Kültür fasulyesinin (*P. vulgaris* L.) kökeni uzun süre tartışma konusu olmuştur. 18. yy ortalarına kadar botanikçiler fasulyeyi Hindistan kökenli kabul etmişlerdir. Öncelikle coğrafi ve morfolojik olarak farklı yabani fasulye popülasyonlarının varlığı 2 yabani fasulyenin evcilleştirilmesinin nerede meydana geldiğini sorgulanmıştır. Gentry'ye (1965) göre, yabani fasulye muhtemelen Güney Amerika'ya taşındığı yer olan Meksika'da evcilleştirildi. Berglund-Briicher ve Briicher (1976) Güney Amerika'da yabani fasulyenin evcilleştirilebileceğini önerdi, ama Orta Amerika'da ayrı bir evcilleştirmeyi dışlamadı. Arkeolojik kayıtlar fasulyenin benzer yaşlardaki orta Amerika'daki bulguları içerir (Kaplan, 1967.; Kaplan ve ark, 1965). Bu 2 bulgu Orta ve Güney Amerika arasındaki ilk belgelenen temastan daha eskidir (Harlan, 1971). Bazı yazarlar ise bağımsız olma olasılığını ileri sürmüşlerdir (Heiser, 1965; Evans, 1976).

Tohum proteinlerinin elektroforetik modellerinde varyasyon analizinin yararlı olduğu anlaşılmıştır (Anonim 2013). Bir tür içinde bitki girişimleri arasında ilişkiyi kurmak için Fazeolin, ana tohum depolama proteininin elektroforetik modelinde varyasyon belirleme yöntemi yabani fasulyenin, ekili formları için iyi bir belge niteliği taşımaktadır (Kaplan ve ark, 1965). Bodur formda yabani fasulye bulunmadığı ve bu formların mutasyon sonucu meydana geldiği belirtilmektedir (Anonim 2013).

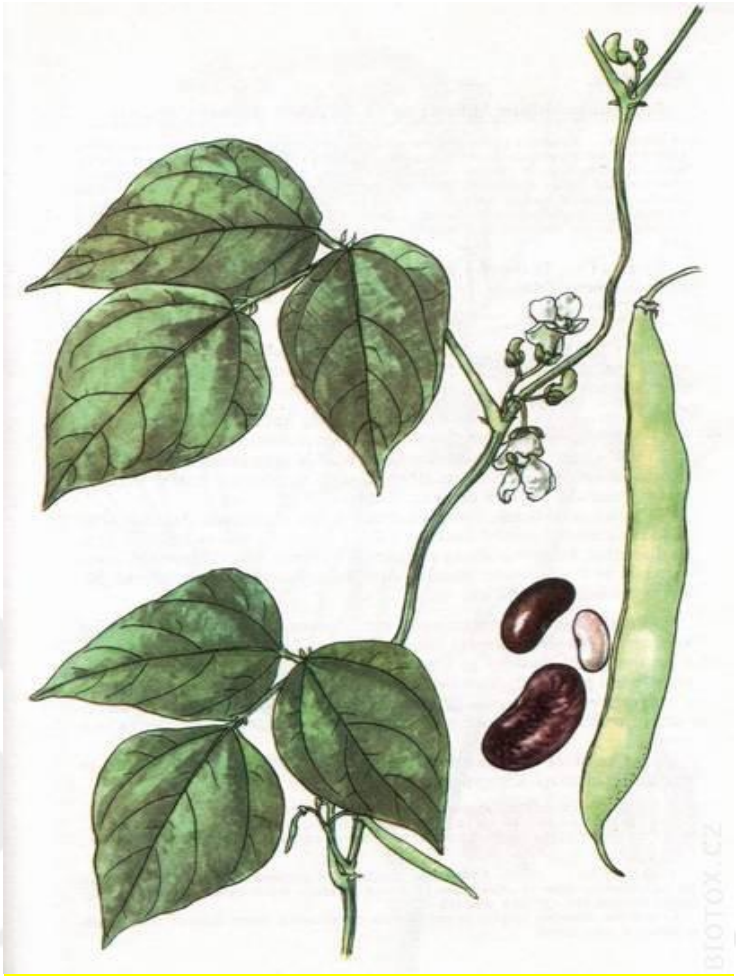
Ülkemizde fasulye tarımının diğer yemeklik baklagillerden sonra başladığı ve yaklaşık olarak 200 seneden beri kültürünün yapıldığı düşünülmektedir vermektedir (J.S. Veloso ve ark., 2015). Fasulye ülkemize 17. yy 'da ulaşmış ve Türkiye'nin her yerinde yetiştirilebilecek kadar iyi adapte olmuş bir bitkidir (Sözen Ö.,2006).

Gen merkezi olmadığı halde, Güney-Doğu Anadolu ve Samsun-Tokat-Amasya mikro gen merkezlerinin fasulye için genetik çeşitlilik merkezi olduğu söylenebilmektedir (Şehirali ve ark., 2005).

Ülkemiz anavatanları olmadığı halde birçok sebze türü için önemli bir çeşitlilik alanıdır ve yetişmeleri için uykun çevresel faktörlere ve toprak isteğine sahiptir (Şehirali ve ark., 2005). Türkiye, üzerinde bulunduğu verimli Anadolu topraklarının pek çok medeniyete ev sahipliği yapmış olması ve sahip olduğu ekolojik çeşitlilik hemen hemen bütün bitki türlerinde olduğu gibi fasulyede de uzun yıllar içerisinde varyasyonun ortaya çıkmasına sebep olmuş, değişik kaynaklardan ülkeye gelmiş olan materyallerin de bulundukları bölgelerde uzun yıllar boyunca yetiştirilmesiyle özellikleri birbirinden değişik yöresel fasulye çeşitleri meydana gelmiştir (Anonim 2013).

1.2.Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) Bitkisinin Önemi

Fasulye bitkisinin, dik çalı (yüksekliği 30–75 cm) şeklinde ya da sarılıcı (yüksekliği 1.2–2 m) özellikte iki ayrı formda bulunur (Çevrim, 2007). Her iki tipte de gövde boğumlu olmakla birlikte, sarılıcı fasulyelerde boğum sayısı daha fazladır ve gövde üstünde sülükler bulunmaktadır (Çevrim, 2007). Yassı, yuvarlak, düz ya da kıvrık olabilen meyvelerinin uzunluğu 5–25 cm arasında değişir; genellikle yeşil renkte, bazen de mor ya da kırmızı lekelidir. Tohumları ise, fasulye çeşidine göre yeşil, sarı, pembe, kırmızı, kahverengi, mor ya da siyah renkte küreye benzer şekilde, yassı, silindirimsi ya da böbrek şeklinde olabilir (Çevrim, 2007).



Şekil 1.1: Fasulye Bitkisi Yaprak, Dal, Bakla ve Danesi (Anonim 2013).

Kazık köklere sahiptirler. Topraktaki Rhizobium bakterileri ile birlikte havadaki serbest azotunu bağlarlar (Çevrim, 2007).

Fasulye özellikle sıcak ülkelerde ve ülkemizde geniş bir şekilde tarımı yapılan tek yıllık bir yemeklik baklagil bitkisidir. Gelişmekte olan ülkelerde baklagiller çok kritik bir protein kaynağıdır (Akhavan ve ark. 2013). Ortalama % 22–25 bitkisel protein içeren fosfor, demir, kalsiyum, potasyum, vitaminler (A, B, D vitaminleri) bakımından zengin olan yemeklik dane baklagiller gelişmekte olan ülkelerin beslenmesinde önemli yer alır (Anonim 2013). Bitkisel protein kaynağı olan fasulye tanesi % 18-30 oranında protein içermektedir (Akashi ve ark., 2002). Fasulye, C vitamini ve betakaroten gibi kalp hastalığı ve kanseri önleyen antioksidanlar açısından zengindir (Akhavan ve ark. 2013). Sinirleri kuvvetlendirir, bedeni ve zihni yorgunlukları giderir, vücudun kuvvetlenmesini sağlar (Akhavan ve ark. 2013).

Pankreas bezinin gereği gibi çalışmasına yardımcı olur. Şeker hastalığını önlenmesinde etkilidir ve kandaki şeker miktarını düşürür (Akhavan ve ark. 2013).

Ayrıca baklagillerin havanın serbest azotunu fikse edebilme özellikleri, çevrecilik ve sürdürülebilir tarımın halkça tutulmasının arttığı günümüzde önemini daha da artırmaktadır (Anonim 2013).

Türkiye'de tarla bitkileri üretiminin toplam alanının yaklaşık %74'ünü oluşturan tahıllar arasında birinci sırada, %8,3'ünden meydana gelen yemeklik tane baklagiller içerisinde ikinci sırada bulunurlar (Şehirali ve ark., 2005). Kurak ve yarı kurak alanlarda nohut ve mercimeğin, sulu alanlarda ise fasulyenin ekim nöbetine girmesi, gerek birim alanda elde edilen verimin artırılması, gerekse nadas alanlarının azaltılması açısından önemlidir. Türkiye, verimli hilal olarak adlandırılan ve baklagillerin gen merkezi kabul edilen ülkelerden birisidir (Şehirali ve ark., 2005). Bunun dışında tüketim oranları açısından dünyada önemli bir yeri olduğu gibi tarihsel olarak net ihracatçı konumunda olmuştur (Anonim 2016).

Ülkemizde kişi başına yıllık ortalama 3-4 kg fasulye, 4-5 kg mercimek ve 5-6 kg nohutun tüketildiği bilinerek açıklanacak olursa, yemeklik tane baklagillerin ülkemiz insanları açısından önemi büyüktür (TÜİK, 2009).

1.3.Bitki Islahının Anlamı ve Önemi

Darwin ve Mendel 'in 20. yüzyıldaki temel keşifleri bitki ıslahı ve genetik için bilimsel temeli oluşturmuştur (Şehirali ve ark., 2005). Benzer şekilde biyoteknoloji genomik araştırma ve moleküler markör uygulamalarındaki gelişmelerin geleneksel bitki ıslahı uygulamalarıyla bütünleştirilmesi 21. Yüzyılda mahsulün iyileşmesinde devrim yaratan disiplinlerarası bir bilim olan moleküler bitki ıslahının temelini oluşturmuştur (Anonim 2016). Üreme sistemleri, organizmaların doğal biyolojisinin, homozigotluğu etkileyen ve böylece genetik çeşitlilik ve genom evrimi seviyeleri ve kalıpları dahil olmak üzere biyolojisinin birçok yönü bakımından önemli ve sıklıkla ihmal edilen bir bölümüdür (Akashi ve ark., 2002). Enerji ihtiyacı yanı sıra hammadde sınırlılığı bugün uygarlıkların yüzleştiği ekolojik sorunlar bu sorunları çözme zorunluluğunun itici güçleridir, böyle hızlı gelişme için fırsatlar son zamanlarda ekonominin yönü biyolojik bilimlerin etkileyici evrimini ortaya çıkarmıştır (Galvan ve ark., 2006).

Küresel ısınma ve iklim değişikliği şeklinde kendini gösteren küresel sorunlar, genetik kaynakların önemini ve değerinin bir kez daha anlaşılmasına neden olmuştur (Galvan ve ark., 2006).

Artan dünya nüfusunun gıda gereksinimi günümüze dek bir ölçüde girdi kullanımı ve yüksek verimli çeşitler geliştirmek yoluyla karşılanmıştır (Liu ve ark. 2014). Bu tür değişikliklerin nedenini anlamak birleşik genetik ve ekolojik yaklaşımları gerektirir (Galvan ve ark., 2006).

Geçtiğimiz yüzyılda, çevre sorunlarının sınırları aşan niteliğinin tüm dünyada ciddi şekilde hissedilmesine paralel olarak, uluslararası oranda çözümlerin geliştirilmesine yönelik çalışmalara ve araştırmalara yoğunlaşılan bir dönem olmuştur (J.S. Veloso ve ark., 2015).

Biyolojik çeşitlilik, başta gıda olmak üzere insanların temel ihtiyaçlarını karşılamasında vazgeçilmez bir yere ve öneme sahiptir. Biyolojik çeşitlikte meydana gelen kayıplar, bunların sağladığı ekolojik hizmetlerde de kayıp olmasına neden olmaktadır. Bitkisel biyolojik çeşitlilik bakımından dünyanın en zengin ülkelerinden biri olan Türkiye, farklı olumsuz durumlar nedeniyle biyolojik çeşitlilik kaybıyla karşı karşıyadır (Angioi ve ark., 2010).

Sonuç olarak ortaya çıkacak olumsuz etkiler dikkatlice incelendiğinde, yaşam formlarının bileşimindeki sürekli ve hızlı değişimin beklenen etkileri, haklı olarak uluslararası kuruluşların kaygı duymalarına sebep olmuştur. 1992 de imzaya açılan Birleşmiş Milletler Biyolojik Çeşitlilik Sözleşmesi doğal kaynakların korunmasına yönelik küresel taahhütlerden birisidir (Sivalop M., 2013).

Tarımsal faaliyetlerden olan, ormancılık, yapılaşma, sanayileşme, iklim değişikliği, ekosistemin ayrışması gibi biyolojik çeşitlilik üzerine olumsuz etkilere neden olan etmenlerin gelecekte biyoçeşitliliğin durumunu ne ölçüde etkileyeceği sorusunun yanıtını almak için hazırlanan bir takım senaryolarda 2000 yılında % 45 düzeyinde olan potansiyelin 2030 yılında % 34–42 arasındaki bir düzeylere kadar düşeceği hesaplanmıştır (Alkemade ve ark., 2009).

Bitki ıslahı, insanların ihtiyacını karşılamak amacıyla bitkilerin kalıtımının değiştirilmesi veya iyileştirilmesi bilim ve sanatıdır. Bitki ıslahının temelleri kalıtımın birimi olarak gen, gen manipülasyonları metotları, sonuçları doğru olarak tahmin etmeye yarayan genetik davranış kurallarıdır (Bilgin ve Korkut, 2005).

Bitki ıslahının amaçları bir ya da birden fazla karakteri geliştirilmiş bir çeşit, hibrit çeşit üretimine yönelik ebeveyn elde edilmesidir (Bilgin ve Korkut, 2005).

Ayrıca bunlar dışında bitki ıslahı verimin arttırılması, kalitenin yükseltilmesi, olumsuz çevre şartlarına dayanıklı ve hastalık ve zararlılara dayanıklı çeşit elde edebilmektir (Alkemade ve ark., 2009).

Çiftçiler tarafından kaynak yetersizliği ile üretilen fasulye düşük toprak verimliliği, abiyotik stresler, böcek saldırıları, kuralık dâhil pek çok sorun ile karşı karşıyadır (Alkemade ve ark., 2009).

Yüksek bütçeli çiftçiler pestisitler, gübreler, sulama yoluyla daha fazla mücadele kaynaklarına sahiptirler. Ancak bunların kullanımı çevreyi tehdit eder, karlılığı azaltır ve zararlı böceklerde etkili değillerdir, böylece tarım genelince biyotik ve abiyotik stresler fasulyenin ekonomik verimini kısıtlamaktadır (Angioi ve ark., 2010).

1.4. Moleküler Markörler ve Bitki Islahında Kullanımı

Bitki ıslah çalışmalarında melezlemeler yoluyla genetik işlemlerin ve seleksiyonun etkinliği arttırılmaya çalışılır. Bunlar da çok uzun zaman alan ıslahı yapılacak olan bitkinin tipine göre değişim gösterir, zahmetli ve yüksek maliyetli işlemlerdir (Sivalop M., 2013). Belirteçler sayesinde bir gende gerekli kombinasyonlarının erken tanımlanmasına yardımcı olunur ve genotip çeşitlerinin yaratılma dönemleri azaltılır. İstenilen bir genotipin bitki çiçeklenmesinden önce tespiti tam olgunlaşmayı beklemeden veya hibriyolojik bir tespit analiz yapmadan bir yıla yakın üreme sürecinde bitkileri melezleyebilmeye olanak sağlar (Sivalop M., 2013).

Thomas Morgan özelliklerin kalıtımının ve genetik rekombinasyon özelliklerinin bağlantısını keşfetmiştir. Bu keşif kalıtımsal kromozom teosinin temelini oluşturmuştur ve Nobel ödülü kazanmıştır. Teorinin gelişimi ve bağlantı gruplarının açığa çıkması genetik belirteçlerle ilgili bir konsept oluşturulması ile bitki ıslahı bir markör uygulama alanı olmuştur (Zietkiewicz ve ark., 1994). Geleneksel ıslah süreci çok maliyetlidir ve kullanılan maddi kaynaklar zaman ilişkisi sonucunda çeşitliliğin oluşturulması 12-15 yıl ya da daha uzun sürer (Bilgin ve Korkut, 2005).

Moleküler markörlerden genel olarak kalitatif ve kantitatif özelliklerin ıslahında, seleksiyonda, genetik ve linkage haritalamalarında, çeşit tanımlaması ve korunması işlemlerinde, genotipler arası genetik akrabalık derecelerinin tanımlanmasında fayda sağlanmaktadır (Bilgin ve Korkut, 2005).

Ayrıca çeşit tescil ve sertifikasyonunda sabit, yüksek verimli ve kaliteli çeşitleri belirlenmesinde tarla denemeleri ve laboratuvar testleri yanında moleküler markörlerin kullanılması oldukça önem kazanmaktadır. Kullanılan moleküler yöntemlerle bitki ıslahı klasik bitki ıslahına kıyasla çok daha hızlı ve güvenilir şekilde melezleme işlemlerinin gerçekleşmesine olanak sağlamaktadır (Bilgin ve Korkut, 2005).

1.4.1. Moleküler markörler

Moleküler markörler, genomda herhangi bir gen bölgesi ya da gen bölgesi ile ilişkili içindeki DNA parçasıdır. Moleküler markörler, hayvan bitki mikrobiyal türlerin genomik yapılarını anlamamızda yapısal ve fonksiyonel olarak önemli bir rol oynamaktadır (Liu ve ark., 2014). Moleküler markörler; genetik markörlerin, DNA tabanlı tipini meydana getirdiklerinden dolayı, DNA markörleri olarak da bilinirler. DNA markörleri farklı genotiplere ait DNA diziliş farklılığını çeşitli şekillerde ortaya çıkaran markörlerdir (Botstein ve ark., 1980). Nükleik asit temeline dayalı genetik markörlerin genom analizlerinde kullanımı ıslahçılar için gereksinim duyulan bir alandır. Bu markörler kullanılarak birbirine morfolojik olarak çok yakın olan kültür çeşitleri ayırt edilebilir ve tanımlanabilir (Gupta ve ark., 1994). Moleküler markör teknikleri DNA molekülündeki polimorfik bölgelerin saptanması prensibine dayanır. Popülasyonda her hangi bir genin veya özelliğin birden fazla formu bulunuyorsa o gen ya da fenotipik özellik polimorfik olarak kabul edilmektedir. Polimorfizm, DNA dizisi, amino asit dizisi, kromozomal yapı ya da fenotipik özellik varyasyonları gibi birkaç şekilde görülebilir (Gupta ve ark., 1994).

Bütün bir genomun analiz edilebileceği DNA'yı elde etmek için, herhangi bir kısımdan alınan az miktarda doku parçası yeterli olmaktadır (Botstein ve ark., 1980).

Ek olarak, DNA markörleri stabil olup, tüm dokularda ortaya çıkabilirler, çevre koşullardan etkilenmezler, kodominant ya da dominant özellikte olanları bulunur ve kalıtımsal basit ilkelere sahiptirler (Williams ve ark., 1990).

Kullanılan yöntemler bakımından moleküler markörler, Hibridizasyona Dayalı Markörler ve Polimeraz Zincir Reaksiyonuna (PCR) Dayalı Markörler olarak iki ana gruba ayrılabilir (Botstein ve ark., 1980).

Hibridizasyona dayalı markörlere örnek olarak; RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism/Sınırlı Parça Uzunlukları Polimorfizmi), PCR tabanlı markörlere örnek olarak; SSR (Simple Sequence Repeat/Basit Tekrarlı Diziler veya

Mikrosatelitler), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA/Rastgele Çoğaltılmış DNA Polimorfizmi),

AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism/Çoğaltılmış Parça Uzunluğu Polimorfizmi), ISSR (Inter Simple Sequence Repeat/Basit Tekrarlı Diziler Arası Polimorfizm) verilebilir (Botstein ve ark., 1980).

1.4.1.1. Hibridizasyona dayalı moleküler markörler

Rflp (restriksiyon fragment length polymorphism/sınırlı parça uzunlukları polimorfizmi)

DNA tabanlı parmak izi teknolojilerinin genetik benzerlik çalışmalarında faydalı olduğu kanıtlanmıştır, RFLP hala bitki türlerinde çeşitlilik tahmininde yaygın kullanılmaktadır ancak son zamanlarda geliştirilen PCR tabanlı markör teknikleri de mevcuttur (Gupta ve ark., 1994).

Hücrelerden izole edilen genomik DNA'nın, belli bir noktadan nükleik asit dizilişlerini tanıyan DNA kesim enzimleri tarafından spesifik olarak kesilmesi ve prob DNA'nın melezlendiği DNA etrafındaki değişik kesim yapılarının belirlenmesi temeline dayanır (Botstein ve ark., 1980).

RFLP, PCR esaslı olmayan geliştirilmiş ilk markör sistemidir. RFLP markörleri kodominant (eşbaskın) özelliktedir (Bark ve Havey, 1995). Bu özellik sayesinde heterozigot bireylerin de karakterize edilmesi mümkün olabilmektedir.

PCR temelli tekniklerin ortaya çıkışına kadar geçen sürede oldukça yaygın olarak kullanılan RFLP, sahip olduğu dezavantajları ve PCR temelli tekniklerin getirdiği avantajlar sebebiyle kullanımı özel çalışmalarla sınırlı olarak kullanılan bir teknik olarak kalmıştır (Bark ve Havey, 1995).

1.4.1.2. Polimeraz zincir reaksiyonuna (pcr) dayalı markörler

PCR teknolojisinin geliştirilmesiyle hibridizasyon temeline dayalı RFLP yöntemine alternatif sunan bir dizi moleküler tahlilin geliştirilmesini ve DNA düzeyinde polimorfizmi tespit eden sistemler geliştirilmiştir (Liu ve ark., 2014).

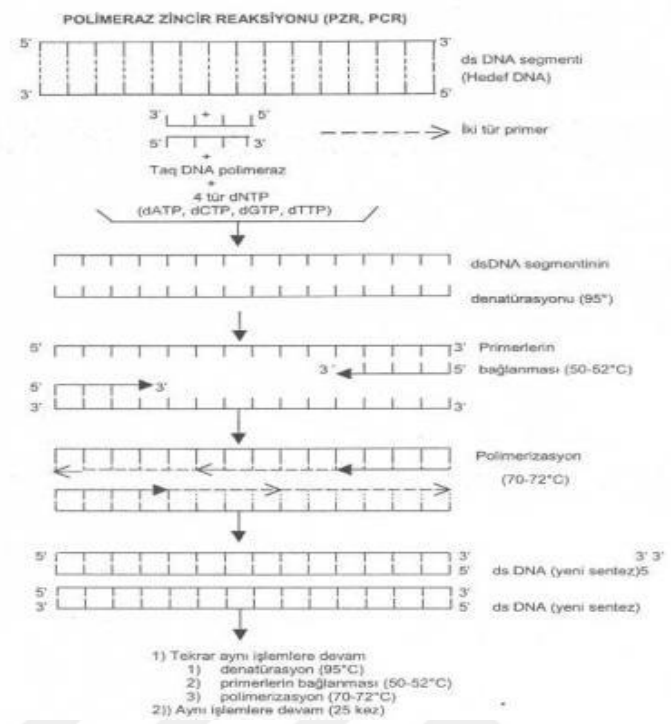
Polimeraz zincir reaksiyonuna (PCR) dayalı moleküler markörler 1980'li yılların ortalarında Cetus firması araştırmacılarının çalışmaları ile geliştirilen klonlama tekniği, dizi analizi ve DNA haritalaması gibi temel moleküler biyoloji analiz ve deneylerinde kullanılmaya başlanmıştır.

PCR, DNA'nın in vitro şartlarda enzimatik olarak sentezletilmesidir (Zietkiewicz ve ark., 1994). PCR tekniğinin geliştirilmesinde anahtar rolü *Thermus aquaticus*'dan izole edilen yüksek sıcaklığa dayanıklı polimeraz enziminin (Taq DNA polymerase) keşfedilmesi büyük rol almıştır (Bornet ve Branchard, 2001). Bu enzim sayesinde hücrede normal şartlar altında gerçekleşebilen doğal DNA replikasyonu laboratuvar koşullarında 'termocycler' adı verilen özel cihazların sayesinde gerçekleştirilmiştir (Bornet ve Branchard, 2001).

Yöntem, küçük miktarda izole edilmiş spesifik bir DNA parçasının, bir dizi enzimatik işlem sonucunda milyonlarca kez çoğaltılması temeline dayanmaktadır. Ancak çoğaltılabilen unsurlar DNA'nın tamamı değil, DNA'nın hedeflenen veya rastgele sentezlenen belirli bölgeleridir (Gupta ve ark., 1994).

PCR, çift sarmal bir DNA molekülünün tek zincire ayrılması, hedeflenen dizilere oligonükleotid primerin bağlanması ve uzaması esasından meydana gelir (Gupta ve ark., 1994). Primerler, kalıp DNA molekülleri yüksek sıcaklıkta denatüre olduktan sonra, tek iplikli DNA molekülleri üzerinde kendilerine tamamlayıcı olan belirli bölgelere bağlanırlar (Gupta ve ark., 1994).

Primerlerin hedef bölgelere bağlanması, düşük sıcaklık derecelerinde gerçekleşir. Ayrıca reaksiyon ortamında pH'yı ve tuz konsantrasyonunu optimum hale getiren tampon çözelti, polimeraz enzimi, polimeraz enziminin ihtiyaç duyduğu $MgCl_2$ ve DNA üretiminde kullanılacak Adenin (A), Timin (T), Guanin (G), Sitozin (C) nükleotidlerinden her biri yeterli miktarda bulunur (Zietkiewicz ve ark., 1994). Polimeraz enzimi sayesinde başlatıcı DNA, bir kalıp DNA üzerine bağlandıktan sonra, onu 3' ucundan 5' yönünde uzatmaya başlar ve kalıp DNA'nın aynısını üretir (Zietkiewicz ve ark., 1994).



Şekil 1.2: PCR'ın çalışma prensibi (Bornet ve Branchard, 2001).

ISSR (Inter simple sequence repeat/Basit tekrarlı diziler arası polimorfizm)

ISSR tekniği, ökaryotik genomlarda 2, 3, 4, 5 kez tekrar eden nükleotid boyunca lokustan bağımsız bir şekilde genomda rastgele dağılımlarını esas alan hassas ve tekrarlanabilirliği yüksek olan bir yöntem olarak öne çıkmaktadır (Zietkiewicz ve ark., 1994; Gupta ve ark., 1994).

ISSR markörleri genetik çeşitliliğin belirlenmesinde, filogenetik çalışmalarda, genom haritalarının meydana getirilmesinde ve evrimsel biyolojide pek çok tarla bitkisinde uygulanabilen etkin bir tekniktir (Reddy ve ark., 2002). ISSR markörlerinin kullanımı hızlı, uygulanabilirliği kolay ve primerleri daha uzun olduklarından güvenilirlik durumları fazladır (Bornet ve Branchard, 2001).

Yeterli bilgi sunan ISSR primerlerini kullanmak düşük bütçe, zaman tasarrufu ve genetik analizlerde kolaylık sağlamaktadır. ISSR markörleri sayesinde Mendel kalıtımına uygun şekilde dominant belirteçler elde edilmektedir (Wang ve ark., 1998).

Bununla beraber ayrıca bazı durumlarda homozigot ve heterozigotluğun tanımlanmasında kodominant belirteçlerde elde edilebilmektedir (Wang ve ark., 1998). Basit diziler arası tekrarlar (ISSR-Inter Simple Sequence Repeat) birbirine çok yakın ve karşılıklı biçimde konumlanmış tekrar bölgeleri arasında yer alan yaklaşık 100-3000 bç

uzunluğundaki DNA parçalarıdır. Bu teknik Zietkiewicz ve ark. (1994) tarafından geliştirilmiştir. Bu teknik, mikrosatellitler arasında tekrarlanan DNA dizilerinin PCR ile çoğaltılması temeline dayanmaktadır. ISSR markörleri genetik yapı, genetik çeşitlilik, filogenetik araştırmalar, gen tespiti, genom haritalama çalışmalarında ve evrimsel biyolojide kullanılabilmektedir (Zietkiewicz ve ark., 1994).

RAPD (Random amplified polymorphic DNA/Rastgele çoğaltılmış DNA polimorfizmi)

RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), PCR tekniği kullanarak sentetik olarak sentezlenmiş primerlerin vasıtasıyla (genelde 10 baz uzunluğunda) yapılan tesadüfi DNA parçalarının çoğaltımına dayanan bir tekniktir (Williams ve ark., 1990). Kullanılan primerler hem ileri hem geri primer görevi görür ve çoğaltılan DNA parçalarının büyüklüğü genelde 0.5–5 kb arasında değişmektedir (Kress ve ark. 2005). Polimorfizm, primerlerin bağlanma bölgelerinin çeşitlilik durumu ve buna bağlı olarak oluşan farklı uzunluktaki DNA parçacıklarının analizi ile belirlenmektedir (Williams ve ark., 1990).

RAPD markör sisteminin avantajları arasında az miktarda DNA'ya ihtiyaç duyması, zaman tasarrufunun yüksek olması, primerlerin tasarımının kolay olması, RAPD markörlerinin bütün genoma bol bir şekilde dağılmış olması sayılabilir (Chen ve ark. 2015). Fakat RAPD markör sisteminin dezavantajı ise tekrarlanabilirlik durumunun az olmasıdır (Kesawat ve Das, 2009).

RAPD markörleri lokus spesifik olmadıklarından bant verileri lokus veya allellerin yorumlanması açısından uygun değildir ve aynı büyüklükteki DNA parçaları homolog olmayabilirler (Kesawat ve Das, 2009).

ITS (Internal Transcribed Spacer/Transkripsiyon İçindeki Ara Parça)

Transkripsiyon İçindeki Ara Parça (ITS) nükleer ribozamal DNA'nın bitki filogenetiği ve DNA barkod analizlerinde en yaygın kullanılan DNA markörlerinden birisi olması nedeniyle bitki çekirdek DNA barkodu olarak önerilmiştir (Xu ve ark. 2015). ITS bölgesinin, bitkilerin moleküler tanımlanması için etkili ve evrensel bölge olduğu bulunmuştur (Yuan ve ark. 2015).

Nükleer ITS bölgeleri, göreceli olarak yüksek değişkenlikleri ve amplifikasyon olanaklarından dolayı geniş bir şekilde sıralanmıştır (Williams ve ark. 1990)

ITS bölgeleri (ITS1 veya bunun bir kısmı, ITS2), potansiyel ve yüksek oranda interrespesifik ilişki çözünürlüğü nedeniyle, tanıtımlık ve tür seviyelerinde bitki moleküler sistematiğinde en yaygın kullanılan DNA fragmanlarından biridir (Hebert ve ark. 2003; Kress ve ark. 2005; Valentini ve ark. 2009; Liu ve ark. 2014; Chen ve ark. 2015; Xu ve ark. 2015; Yuan ve ark. 2015). ITS ilk olarak çiçekli bitkiler için bir barkod olarak önerildi, ancak çok sayıda kopya ve anne-babadan farklı aleller, farklı türlerin (örneğin simbiyoz yoluyla) DNA kontaminasyonu gibi tamamlanmamış eşzamanlı evrimi endişeleri nedeniyle bir süre sonra popülerliğini kaybetmiştir (Schoch ve ark. 2012). Tohumlu bitkiler için bu kusurların büyük sorunlara neden olmadığı bir temel barkod olarak çoğaltıldığı gösterilmiştir (Hollingsworth 2011; Li ve ark. 2011; Song ve ark. 2012).

Metodolojik çalışmalar, hem biparental kalıtsal nükleer genomdan hem de türdeş olmayan kalıtsal plastid genomdan türlerin doğru tanımlanması için bir barkod kombinasyonunun kullanılmasının daha etkili veya gerekli olduğunu ve ITS'nin nükleer genomdan türlerin tanımlanması için en umut verici aday olduğunu göstermektedir (Chase ve Fay 2009; Fazekas ve ark. 2009; Roy ve ark. 2010).

Klasik bitki ıslah çalışmaları, uzun zaman alan, yüksek emek ve maliyet gerektiren çalışmalar olup, melezlemede uygun ebeveynlerin seçilme (seleksiyon) aşaması en kritik aşamadır. Islah çalışmalarında kullanılacak ebeveynlerin moleküler yöntemlerle genetik benzerlik/farklılıklarının belirlenmesi, uygun ebeveynlerin seçiminde büyük avantaj sağlamaktadır. Bu çalışmadan elde edilen veriler, fasulye ıslah çalışmalarında kullanılacak ebeveynlerin daha kısa sürede belirlenmesini sağlayacaktır. Islah için uygun ebeveynlerin moleküler seleksiyonla belirlenmesi, zaman avantajı dışında emek ve maliyet bakımında da tasarruf sağlamaktadır. Ayrıca yeni çeşit geliştirme aşamalarında varyasyon oluşturmak hedeflenmektedir.

2. MATERYAL ve YÖNTEM

2.1. Materyal

Fasulye, maksimum gelişme için ortalama sıcaklığın 16-24 °C olmasını isteyen bir sıcak iklim bitkisidir. En uygun çimlenme sıcaklığı 18- 20°C olup dona karşı çok hassas olduğu bilindiğinden çalışmada kullanılacak olan tohumların ekimi ve yetiştirilmesi Eskişehir Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nde yapılmıştır.

Çalışmada kullanılan bitki materyalleri Türkiye'de birçok yörede ekimi yapılan 29 adet tescilli yerel fasulye çeşidi ve 8 adet çeşit adayı ileri hattır.

38. Örnek dış grup olarak belirlenen *Phaseolus coccineus* dane özelliği bombay tipi olan yarı sarılıcı olan çalı fasulyesidir.

Çizelge 2.1. Çalışmada kullanılan fasulye çeşit ve hat bilgisi.

Fasulye Çeşitleri ve Hatları
1. Akman-98
2. Bulduk
3. Cihan
4. Gina
5. Güngör
6. Karacaşehir-90
7. Zülbiye
8. Noyanbey-98
9. Sururbey
10. 4F-2409
11. Akın
12. Batallı
13. Muzaffer
14. Topçu
15. Karaman
16. Göynük-98
17. İstanbul
18. Aslan/Konya Dermasonu

Çizelge 2.1. (Devam Ediyor) Çalışmada kullanılan fasulye çeşit ve hat bilgisi.

19. Aslan/Akman-98
20. Emerson
21. Konya Dermasonu/Batallı
22. Cardinal/Yozgat Barbunyası
23. CB-929 Cranberry
24. Ul-1140
25. Balıkesir Barbunyası
26. Yalancı Dermason(Erzincan)
27. (ES-855/4F-2834)-39
28. Erzurum Şekeri/4F-2813
29. Aslan/Akman-98//Aslan
30. 17 SBarBVD-11
31. 17 SBarBVD-12
32. 17 SBVD-10
33. 17 SBVD -14
34. 17 SBVD-15
35. 17 SBVD-18
36. 17 SBVD-19
37. 17 SBVD-20
38. Ph-Corh(*Phaseolus coccineus*)

2.2. Yöntem

2.2.1. Tohumların çimlendirilmesi ve yaprak örneklerinin alınması

Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsü tarafından ekimi yapılıp yetiştirilecek olan fasulye çeşitlerinin yaprakları izolasyonu yapılmak üzere her genotipten ayrı ayrı olarak steril bisturi yardımıyla bitkinin sağlıklı ve genç yapraklarından (0,20 - 0,25 g) DNA izolasyonu için yaprak örneği alınmıştır.

2.2.2. DNA izolasyonu

Klasik DNA izolasyonu yöntemi ile fasulye örneklerinden genomik DNA izole etmek için CTAB tamponu kullanılmıştır.

CTAB Litik tampon hazırlığı:

1 gr CTAB

14 ml 1.4 M NaCl veya 4.095 g toz NaCl

5 ml 1 M Tris

2 ml 0.5 M EDTA (EtilenDiamin TetraAsetikasit)

0.5 g PVP (polyvynil pyrodine)

Solüsyonun son hali steril distile su 50 ml'ye ile tamamlanmış ve 120 ºC'de 20 dakika otoklavlanmıştır. Steril edildikten sonra tampona 200 µl β-merkaptoetanol eklenmiştir. CTAB ile DNA izolasyon aşamaları ise aşağıdaki şekil ve sırada uygulanmıştır; İzolasyona kadar DNA içeriğinin zarar görmemesi için -86 °C'de muhafaza edilen yaprak örnekleri derin dondurucudan çıkarılarak sıvı azotta öğütülme işlemleri gerçekleştirilmiştir.

❖ Çalışmadan önce CTAB (Hexadecyltrimthylammonium bromid) tamponu 65°C'de ısıtılır ve hazır hale getirilir.

❖ Sıvı azotta öğütülmüş 100 mg bitki dokusu 1.5 ml'lik ependorf tüplerine alınarak üzerine 1000 µl CTAB tamponu eklenerek homojen hale gelene kadar yavaşça pipetlenir. Karışım tüpü 62oC'de 30 dakika inkübe edilir ve belli aralıklarla tüpler alt üst edilir. Karışım tüpüne eşit hacimde kloroform: isoamil alkol eklenir ve 10 dakika boyunca alt üst edilerek karıştırılır.

❖ Karışım 7500 rpm'de 10 dakika santrifüjlenir ve üstte kalan sıvı kısım yeni 1.5 ml'lik tüpe aktarılır. Aktarılan miktar µl cinsinden kayıt edilir.

❖ Aktarılan miktarın 2/3'ü kadar -20°C'de bekletilen isopropanol karışıma eklenir, birkaç kez alt üst edildikten sonra -20°C'de 2 saat inkübe edilir.

❖ İnkübasyon sonunda karışım tüpü 10 000 rpm'de 10 dk. santrifüjlenir.

❖ DNA peleti 300 µl % 70'lik etil alkol ile yıkanır ve çeker ocakta veya açık havada kuruyana kadar bekletilir. Kuruyan DNA peleti istenilen DNA konsantrasyonuna göre steril deiyonize suda veya TE buffer da çözündürülür (Doyle, J. J. ve Doyle J. L. 1987).

İzole edilen DNA örneklerinin Nanodrop özellikli Spektrofotometre'de miktar ve kalite tayinleri gerçekleştirilmiştir. DNA örneklerinden PCR deneyleri için kalıp olarak kullanılmak üzere çalışma solüsyonları hazırlanmıştır.

Bu çalışmada toplamda 38 bitkiden DNA izole edilmiştir. Öncelikle izole edilen total DNA örneklerinden 5 µl alınarak % 0.8'lik 80 ml agaroz jelde 90 volt'ta 35 dk. yürütülmüş ve ilerleyen çalışmalar için DNA elde edilip edilmediği kontrol edilmiştir.

2.2.3. Spektrofotometre ile DNA konsantrasyonu, saflık ve kalite tayini

İzole edilen genomik DNA'ların sonraki basamaklarda kullanımına geçmeden önce saflık derecelerinin ve kalite miktarlarının kontrol edilmesi gerekir. Bu amaçla genomik DNA'ların Nanodrop Spektrofotometre cihazında 260 ve 280 nm dalga boylarında okuması yapılmış, nanogram veya mikrogram cinsinden saflık ve miktarları tespit edilmiştir. Bu ölçümlerde izolatların DNA peletleri hangi tampon ile çözülmüş ise o tampon kör olarak kullanılmıştır. Ölçümlerde 260 ve 280 dalga boyundaki 1.8' den büyük ölçüm sonuçları çalışma için uygun görülmüştür. Spektrofotometre'de okunan değerler ile aşağıdaki formüller kullanılarak DNA miktarı saptanmıştır.

- DNA miktarı= OD260 x dilüsyon katsayısı x 50 µl/ml (2.1)

2.2.4. ISSR-RAPD-ITS-PCR için kalıp DNA hazırlığı

Genomik DNA'lardan ISSR-RAPD-ITS-PCR'da kullanmak amacıyla %2'lik çalışma solüsyonu hazırlanmıştır. Bundan sonrasında µl'sinde 2ng DNA olacak şekilde genomik DNA'lar steril distile su ile seyreltilmiştir.

2.3. ISSR-PCR Analizleri

2.3.1. ISSR-PCR hazırlığı ve koşulları

ISSR-PCR analizi ile Fasulyelerdeki polimorfizmi belirlemek için DNA dizileri British Colombia Üniversitesi Biyoteknoloji Laboratuvarından (Kanada) temin edilen 17 farklı ISSR primeri, Sentromer (İstanbul, Türkiye) firmasına ürettirilmiş ve çalışmada kullanılmıştır (Çizelge 2.2).

Çizelge 2.2. Kullanılan ISSR primerleri ile ilgili bilgiler.

	Primer kodu	Primerin dizisi (5'…3')	T_A ºC	Sonuç
1	ISSR-01	AGAGAGAGAGAGAGAGG	52.8	Polimorfik
2	ISSR-02	GAG AGA GAG AGA GAG AT	50.4	Polimorfik
3	ISSR-03	GTG TGT GTG TGT GTG TC	52.8	Çalışmadı
4	ISSR-04	ACA CAC ACA CAC ACA CC	52.8	Çalışmadı
5	ISSR-05	GGG TGG GTT GGG GTG	58.8	Polimorfik
6	ISSR-06	TCT CTC TCT CTC TCT CG	52.8	Polimorfik
7	ISSR-07	CTC TCT CTC TCT CTC TA	50.4	Çalışmadı
8	ISSR-08	CAC ACA CAC ACA CAC AG	50.4	Çalışmadı
9	ISSR-09	GGA TGG ATG GAT GGA T	49.2	Polimorfik
10	ISSR-10	GGG TGG GTT GGG GTG	52.8	Çalışmadı
11	ISSR-11	TGT GTG TGT GTG TGT GA	50.4	Monomorfik
12	ISSR-12	GTG CGT GCG TGC GTG C	59.4	Polimorfik
13	ISSR-13	CGA TGG ATG GAT GGA T	49.2	Polimorfik
14	ISSR-14	GAG AGA GAG AGA GAG AC	52.8	Polimorfik
15	ISSR-15	CTC TCT CTC TCT CTC TG	52.8	Polimorfik
16	ISSR-847	CAC ACA CAC ACA CAC ARC	53.7	Polimorfik
17	ISSR-829	TCT CTC TCT CTC TCT CG	52.8	Çalışmadı

(Y= (C,T) B= (C,G,T) D= (A,G,T) V= (A,G,C))

ISSR-PCR deneylerinin gerçekleştirilebilmesi için primerlerin bağlanma sıcaklıklarının hesaplanması gerekir. Bu sebeple çalışmalarda kullanılan ISSR primerlerin bağlanma sıcaklıkları aşağıdaki formülle hesaplanmıştır:

(A+T baz sayıları) x 2 ºC + (G+C baz sayıları) x 4 ºC = T_A ºC (2.2)

ISSR-PCR reaksiyonları 25 µl'lik hacimde 1X Taq Buffer, 2 µM $MgCl_2$, 2.5 µM dNTP, 2.5 µM primer, 4 ng kalıp DNA ve 1U Taq polimeraz enzimi (Fermantas, Amerika) kullanılarak hazırlanmıştır. Bu reaksiyonlarda kullanılan PCR bileşen ve miktarları Çizelge 2.3'te verilmiştir.

Çizelge 2.3. Kullanılan ISSR-PCR bileşenleri ve miktarları.

Bileşen	**Miktar**
dH_2O	14.8 µl
10X Taq Buffer	2.5 µl (1x)
25mM $MgCl_2$	1.5 µl (2.5 µM)
2.5mM dNTP	2 µl (2.5 µM)
2.5mM Primer	2 µl (2.5 µM)
Kalıp DNA	2 µl (4 ng)
Taq Polimeraz	0.2 µl
Toplam	25 µl

PCR reaksiyonları Çizelge 2.4'te verilen koşullarda 96-Well Thermal Cycler cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 2.4. ISSR-PCR uygulama protokolü.

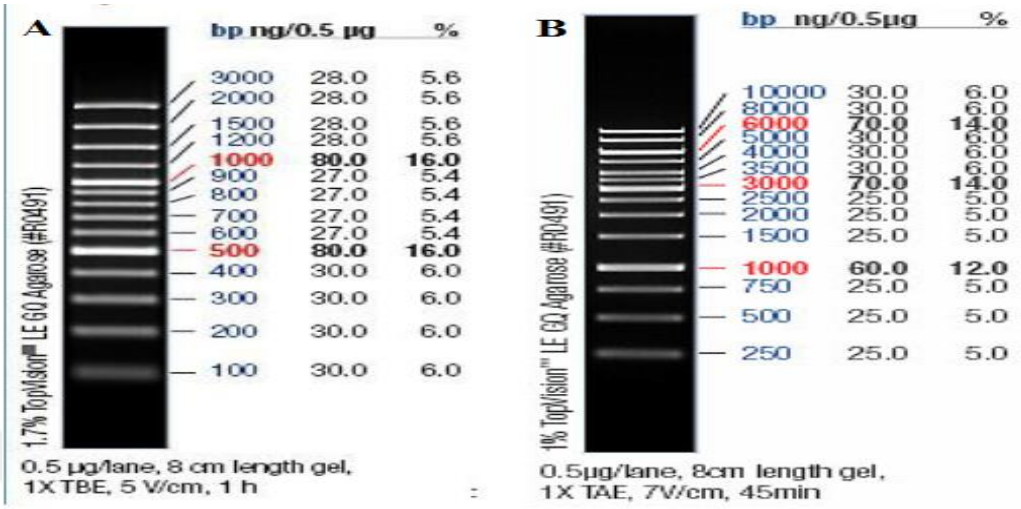
	Döngü Sayısı	Sıcaklık (˚C)	Süre
Başlangıç Denatürasyonu	1	95	4 dk.
Denatürasyon		94	45 sn.
Bağlanma	45	49.2-60.5	45 sn.
Uzama		72	90 sn.
Final Uzaması	1	72	7 dk.

2.3.2. Agaroz jel elektroforezi ile ISSR-PCR ürünlerinin yürütülmesi

Oluşan ISSR-PCR ürünleri yatay jel elektroforezi (Thermo, Midicell Promo) ile % 1.2'lik agaroz jel üzerinde ayrılmıştır. Agaroz jeller 5X TBE stok tamponunun seyreltilmesi ile elde edilen 0.5X TBE tamponu ile hazırlanmıştır. Uygun bir erlen içinde 0.5X TBE tampon ile birlikte kaynatılan % 1.2'lik agaroz katılaşmadan önce 10X'lik 7 µl etidyum bromid ilave edilerek karıştırılmış ve jel tablasına dökülmüştür.

PCR ürünleri her bir kuyucuğa 9 µl örnek 1 µl yükleme tamponu olmak üzere 10 µl yüklenmiş ve 90 V'ta 70 dk. yürütülmüştür.

Bant büyüklüklerinin belirlenmesi amacıyla her jelde ilk ve son kuyucuklara 100 bç'lik DNA ladder (Fermentas) yüklenmiştir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. A) Fermantas gene ruler 100 bç DNA ladder plus. B) Fermentas gene ruler 1 kb DNA ladder

2.3.3. ISSR-PCR ürünlerinin görüntülenmesi ve değerlendirilmesi

Agaroz jel elektroforezinde yürütme işleminden sonra oluşan bant profilleri UV translimünatörü altında gözlemlenmiş ve Uvitec marka jel dökümantasyon sistemi kullanılarak fotoğraflanmıştır. Bant büyüklükleri şekil 2.1'deki 100 bç'lik DNA ladder (Fermentas) markör ile kıyaslanarak değerlendirilmiştir.

2.3.4. ISSR-PCR sonuçlarının biyoinformatik analizi

Jel fotoğrafları üzerindeki her bir ISSR bandı için Phoretix1DPro Software (Non-linearDynamics) programı yardımıyla, var (1) ya da yok (0) ikili matrisleri oluşturulmuştur.

Bu veriler kullanılarak çeşitler arasındaki genetik benzerlik değerleri Jaccard indeksi belirlenmiş ve UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) programıyla çeşitler arasındaki genetik ilişkileri gösteren dendrogram elde edilmiştir.

Phoretix1DPro programı kullanılarak elde edilen binary data, UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) yöntemi (http://genomes.urv.cat/UPGMA/) kullanılarak Jaccard benzerlik ve mesafe verileri elde edilmiştir. Bu verilerle oluşturulan Newick formatındaki bilgi, MEGA 6.0 programı yardımıyla filogenetik ağaçlar oluşturulmuştur.

2.4. RAPD-PCR Analizleri

2.4.1. RAPD PCR hazırlığı ve koşulları

RAPP-PCR analizi ile fasulyelerdeki polimorfizmi belirlemek için DNA dizileri British Colombia Üniversitesi Biyoteknoloji Laboratuvarından (Kanada) temin edilen 15 farklı RAPD primeri, Sentromer (İstanbul, Türkiye) firmasına ürettirilmiş ve çalışmada kullanılmıştır (Çizelge 2.5).

Çizelge 2.5. Kullanılan RAPD primerleri ile ilgili bilgiler.

	Primer kodu	**Primerin dizisi (5'…3')**	**T_A ºC**	**Sonuç**
1	OPD-01	ACCGCGAAGG	32	Polimorfik
2	OPC-04	CCGCATCTAC	32	Çalışmadı
3	P21	ACGGTGCCTG	34	Polimorfik
4	P5	AACGCGCAAC	32	Polimorfik
5	P17	GTAGCACTCC	32	Polimorfik
6	P23	CGC CCA AGC C	32	Polimorfik
7	P24	CGC CCT GGT C	34	Polimorfik
8	P11	GGCCGATGAT	32	Polimorfik
9	P13	ACCGCCTTGT	32	Polimorfik
10	P16	TGGTGGCCTT	32	Polimorfik
11	P14	CAGCACTGAC	32	Polimorfik
12	OPB-17	AGGGAACGAG	33	Polimorfik
13	OPD-07	TTGGCACGGG	38	Polimorfik
14	OPB-20	GGA CCC TTA C	32	Çalışmadı
15	P9	GGGAAGAGAG	32	Çalışmadı

(Y= (C,T) B= (C,G,T) D= (A,G,T) V= (A,G,C)

Çizelge 2.6. RAPD-PCR bileşenleri ve miktarları.

Bileşen	**Miktar**
dH_2O	11.8 µl
10X Taq Buffer	2.5 µl (1x)
25mM $MgCl_2$	1.5 µl (1.5 mM)
2.5mM DNTP	2 µl (0.5 mM)
2.5mM Primer	4 µl (0.4 µM)
Kalıp DNA	3 µl (6 ng)
Taq Polimeraz	0.2 µl
Toplam	25 µl

PCR reaksiyonları Çizelge 2.6'da verilen koşullarda 96-Well Thermal Cycler cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 2.7. RAPD-PCR uygulama protokolü.

	Döngü Sayısı	Sıcaklık (˚C)	Süre
Başlangıç Denatürasyonu	1	95	4 dk.
Denatürasyon		94	55 sn.
Bağlanma	45	30-34	60 sn.
Uzama		72	90 sn.
Final Uzaması	1	72	7 dk.

2.4.2. Agaroz jel elektroforezi ile RAPD-PCR ürünlerinin yürütülmesi

Oluşan RAPD-PCR ürünleri yatay jel elektroforezi (Thermo, Midicell Promo) ile % 1.2'lik agaroz jel üzerinde ayrılmıştır. Agaroz jeller 5X TBE stok tamponunun seyreltilmesi ile elde edilen 0.5X TBE tamponu ile hazırlanmıştır. Uygun bir erlen içinde 0.5X TBE tampon ile birlikte kaynatılan % 1.2'lik agaroz katılaşmadan önce 10X'lik 2 µl etidyum bromid ilave edilerek karıştırılmış ve jel tablasına dökülmüştür.

PCR ürünleri her bir kuyucuğa 6 µl örnek 1 µl yükleme tamponu olmak üzere 7µl yüklenmiş ve 85 Volt'ta 75 dk. yürütülmüştür.

Bant büyüklüklerinin belirlenmesi amacıyla her jelde ilk ve son kuyucuklara 100 bç'lik DNA ladder (Fermentas) yüklenmiştir (Şekil 2.1).

2.4.3. RAPD-PCR ürünlerinin görüntülenmesi ve değerlendirilmesi

Agaroz jel elektroforezinde yürütme işleminden sonra oluşan bant profilleri UV translimünatörü altında gözlemlenmiş ve Uvitec marka jel dökümantasyon sistemi kullanılarak fotoğraflanmıştır. Bant büyüklükleri şekil 2.1'deki 100 bç'lik DNA ladder (Fermentas) markör ile kıyaslanarak değerlendirilmiştir.

2.4.4. RAPD-PCR sonuçlarının biyoinformatik analizi

Jel fotoğrafları üzerindeki her bir RAPD bandı için Phoretix1DPro Software (Non-linearDynamics) programı yardımıyla, var (1) ya da yok (0) ikili matrisleri oluşturulmuştur. Bu veriler kullanılarak çeşitler arasındaki genetik benzerlik değerleri Jaccard indeksi belirlenmiş ve UPGMA yöntemi (http://genomes.urv.cat/UPGMA/) kullanılarak Jaccard benzerlik ve mesafe verileri elde edilmiştir. Bu verilerle oluşturulan Newick formatındaki bilgi, MEGA 6.0 programı yardımıyla filogenetik ağaçlar oluşturulmuştur.

2.5. ITS-PCR Analizleri

2.5.1. ITS-PCR Hazırlığı ve Koşulları

ITS bölgesinin tamamı için bitki spesifik ve üniversal primerler olan ITS-u1 (ileri) 5'GGAAGKARAAGTCGTAACAAGG-3' ve ITS-u4 (geri) 5'-RGTTTCTTTTCCTCCGCTTA-3' primerleri kullanılmıştır (TAO C. ve ark., 2006). Primerler Investment Management (Colombia) firması tarafından temin edilmiştir.

ITS-PCR uygulamalarının gerçekleştirilebilmesi için primerlerin bağlanma sıcaklıklarının belirlenmesi gerekir. Bu amaçla çalışmalarda kullanılan ITS primerlerin bağlanma sıcaklıkları aşağıdaki formülle hesaplanmıştır ve belirlenen primerler için bağlanma sıcaklığı 55 ˚C olarak belirlenmiştir.

ITS-PCR reaksiyonları 25 µl ve 12.5 µl'lik hacimlerde 1X Taq Buffer, 2 µM $MgCl_2$, 2.5 µM dNTP, 2.5 µM primer, 20 ng kalıp DNA ve 1U Taq polimeraz enzimi (Fermantas, Amerika) kullanılarak hazırlanmıştır. Her bir primer için hazırlanan negatif kontrol reaksiyonlara eklenmiştir. Bu reaksiyonlarda kullanılan PCR bileşen ve miktarları Çizelge 2.8'te verilmiştir.

Çizelge 2.8. Kullanılan ITS-PCR bileşenleri ve miktarları.

Bileşen	Miktar
dH_2O	11.8 µl
10X Taq Buffer	2.5 µl (1x)
25mM $MgCl_2$	1.5 µl (2.5 µM)
2.5mM DNTP	2 µl (2.5 µM)
2.5mM Primer	2.5 µl (2.5 µM)
2.5mM Primer	2.5 µl (2.5 µM)
Kalıp DNA	2 µl (20 ng)
Taq Polimeraz	0.2 µl
Toplam	25 µl

PCR reaksiyonları Çizelge 2.6'da verilen koşullarda 96-Well Thermal Cycler cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 2.9. ITS-PCR uygulama protokolü.

	Döngü Sayısı	Sıcaklık (˚C)	Süre
Başlangıç Denatürasyonu	1	95	4 dk.
Denatürasyon		94	30 sn.
Bağlanma	34	55	40 sn.
Uzama		72	55 sn.
Final Uzaması	1	72	10 dk.

2.5.2. Agaroz jel elektroforezi ile ITS-PCR ürünlerinin yürütülmesi

Oluşan ITS-PCR ürünleri yatay jel elektroforezi (Thermo, Midicell Promo) ile % 1.2'lik agaroz jel üzerinde ayrılmıştır. Agaroz jeller 5X TBE stok tamponunun seyreltilmesi ile elde edilen 0.5X TBE tamponu ile hazırlanmıştır. Uygun bir erlen içinde 0.5X TBE tampon ile birlikte kaynatılan % 1.2'lik agaroz katılaşmadan önce 10X'lik 7 µl etidyum bromid ilave edilerek karıştırılmış ve jel tablasına dökülmüştür.

PCR ürünleri her bir kuyucuğa 6 µl örnek 1 µl yükleme tamponu olmak üzere 7 µl yüklenmiş ve 90 V'ta 75 dk. yürütülmüştür. Bant büyüklüklerinin belirlenmesi amacıyla her jelde ilk ve son kuyucuklara 100 bç'lik DNA ladder (Fermentas) yüklenmiştir (Şekil 2.1).

2.5.3. ITS-PCR ürünlerinin görüntülenmesi ve değerlendirilmesi

Agaroz jel elektroforezinde yürütme işleminden sonra oluşan bant profilleri UV translimünatörü altında gözlemlenmiş ve 212 Pro Gel logic marka jel dökümantasyon sistemi kullanılarak fotoğraflanmıştır. Bant büyüklükleri şekil 2.1'deki 100 bç'lik DNA ladder (Fermentas) markör ile kıyaslanarak değerlendirilmiştir.

ITS PCR'ı sonucu elde edilen ürünler kesim enzimleriyle kesilmek üzere kalıp olarak kullanılmak üzere -20 ˚C'de saklanmıştır.

Çizelge 2.10. ITS-PCR ürünlerinin Hind*III* Restriksiyon Enzimi ile Kesim Protokolü.

Bileşen	**Miktar**
dH_2O	14.5 µl
10X Buffer	5 µl
PCR ürünü	10 µl
HINDIII kesim enzimi	0.5 µl
Toplam	30 µl

60 dk 37 ˚C'ye ayarlanan PCR cihazı yardımıyla kesim gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 2.11. ITS-PCR ürünlerinin Bam*HI* Restriksiyon Enzimi ile Kesim Protokolü.

Bileşen	**Miktar**
dH_2O	14 µl
10X Buffer	5 µl
PCR ürünü	10 µl
BamHI kesim enzimi	1 µl
Toplam	30 µl

30 dk 37 ˚C'ye ayarlanan PCR cihazı yardımıyla kesim gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 2.12. ITS-PCR ürünlerinin Alu*I* Restriksiyon Enzimi ile Kesim Protokolü.

Bileşen	Miktar
dH_2O	14 µl
10X Buffer	5 µl
PCR ürünü	10 µl
AluI kesim enzimi	1 µl
Toplam	30 µl

30 dk 37 ˚C'ye ayarlanan PCR cihazı yardımıyla kesim gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 2.13. ITS-PCR ürünlerinin Sma*I* Restriksiyon Enzimi ile Kesim Protokolü.

Bileşen	Miktar
dH_2O	14.5 µl
10X Buffer	5 µl
PCR ürünü	10 µl
SmaI kesim enzimi	0.5 µl
Toplam	30 µl

30 dk 25 ˚C'ye ayarlanan PCR cihazı yardımıyla kesim gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 2.14. ITS-PCR ürünlerinin Eco*RI* Restriksiyon Enzimi ile Kesim Protokolü

Bileşen	Miktar
dH_2O	14 µl
10X Buffer	5 µl
PCR ürünü	10 µl
Eco*RI* kesim enzimi	1 µl
Toplam	30 µl

30 dk 37 ˚C'ye ayarlanan PCR cihazı yardımıyla kesim gerçekleştirilmiştir.

2.5.4 ITS-PCR Kesim Sonuçlarının Biyoinformatik Analizi

Jel fotoğrafları üzerindeki her bir ITS-PCR kesim bandı için Phoretix1DPro Software (Non-linearDynamics) programı yardımıyla, var (1) ya da yok (0) ikili matrisleri oluşturulmuştur. Phoretix1DPro programı kullanılarak elde edilen binary data, UPGMA yöntemi (http://genomes.urv.cat/UPGMA/) kullanılarak Jaccard benzerlik ve mesafe verileri elde edilmiştir. Bu verilerle oluşturulan Newick formatındaki bilgi, MEGA 6.0 programı yardımıyla filogenetik ağaçlar oluşturulmuştur.

3. BULGULAR

3.1. Fasulye *(Phaseolus vulgaris L.)* Genomik DNA İzolasyonu

Çalışmamızda moleküler biyoloji tekniklerinin uygulanabilmesi için öncelikle yüksek molekül ağırlıklı DNA molekülünün saf bir şekilde elde edilmesi gerekmektedir. Bu amaçla çalışmamızın genelinde kullanmak için 38 adet fasulye çeşit ve hatlarının özenli bir şekilde sıvı azotta öğütülmüşlerdir. Öğütülen fasulye yapraklarından 100-200 mg alınarak CTAB yöntemi ile genomik DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir (Doyle ve Doyle, 1987). İzolasyon sonunda elde ettiğimiz genomik DNA'lardan 5 µl alınarak % 0.8'lik 100 ml agaroz jelde 90 V'ta 35 dk. yürütülüp ilerleyen çalışmalar için DNA elde edilip edilmediği kontrol edilmiştir

3.2. Genomik DNA'nın Spektrofotometre'de Ölçümü, Miktar ve Saflık Tayini

Çalışmamızda bir sonraki aşamaya geçmeden önce jelde parlak tek bir bant olarak görülen fasulye ‘ye ait DNA'ların Shimadzu marka Bio-Spec-nano Micro-Volume Spektrofotometre'de saflık ve miktar tayinleri yapılmıştır (Çizelge 3.1).

Nükleik asitler ışığı en iyi 260-280 nm boyunda absorbe ettiklerinden, ölçümler bu dalga boyunda yapılmıştır. Bu dalga boydaki ölçümler DNA'nın saflığını yani kalitesini göstermektedir. Ölçüm sonucunda 1.8-2.0 arasındaki değerler saf olarak kabul edilmiştir. Çalışmada DNA örneklerinin saflık değerleri 1.8-2.0 arasında ölçülmüştür oldukça saf DNA örnekleri elde edilmiştir.

Çizelge 3.1. Fasulye örneklerinden izole edilmiş genomik DNA'ların miktar ve saflık ölçüm sonuçları.

Fasulye örnekleri	Saflık (260/280 nm)	DNA miktarı (Ng/µl)
Akman-98	1.8	1046
Bulduk	1.9	1094,2
Cihan	1.8	2058,3
Gina	1.8	2052.7
Güngür	1.9	1985.6
Karacaşehir-90	2.0	1073,5
Zülbiye	2,0	2335
Novanbey-98	1.8	1574
Sururbey	1.8	1652.5
4F-2409	1.9	1542.4
Akın	1.9	1542.5
Batallı	1.9	1540.2
Muzaffer	2.0	1487
Topçu	1.9	1250
Karaman	2.0	1258.5
Göynük-98	2.0	1548.7
İstanbul	1.8	1995.2
Aslan/Konya Dermasonu	1.8	2004.7
Aslan/Akman-98	1.8	1987.5
Emerson	1.8	1874.9
Konya dermasonu/Batallı	2.0	1756.5
Cardinal Yozgat barbunyası	2.0	1750.1
CB-929 Cranberry	1.8	1038,8
UI-1140	2.0	1051,1
Balıkesir Barbunyası	2.0	1304
Yalancı Dermason(Erzincan)	1.8	1564.7
Es-855/4F2834-39	1.8	1525
Erzurum Şekeri/4F-2813	2.0	1374,9
Aslan/Akman-98/aslan	2.0	1341,4
17SBarBVD-11	1.9	60
17-SBarBVD-12	2.0	50
17-SBVD-10	1.9	45
17-SBVD-14	1.9	87
17-SBVD-15	2.0	32
17-SBVD-18	2.0	51
17-SBVD-19	1.9	131
17-SBVD-20	1.9	45
Ph. Corh	1.9	136

3.3. ISSR-RAPD-ITS-PCR için Kalıp DNA Hazırlığı

İstenilen saflık ve miktarda genomik DNA'lar elde edildikten sonra, polimeraz zincir reaksiyonlarında kullanılabilmesi için seyreltme işlemi gerçekleştirilmelidir.

Çünkü hazırlayacağımız kalıp solüsyonda total DNA miktarının yoğun olması ISSR ve RAPD-PCR'da kullanılan primerlerin hedef DNA'ya bağlanamamasına neden olur ve dolayısıyla ürün oluşumu engellenmiş olur.. Hazırlanacak kalıp solüsyondaki genomik DNA miktarının az olması ise yetersiz miktarda ürün oluşması ile sonuçlanır. Bundan yüzden izole ettiğimiz DNA'lardan µl'de 2 ng olacak şekilde kalıp DNA çalışma solüsyonları hazırlanmıştır. Ayrıca reaksiyon içindeki kalıp DNA'nın azlığı ya da fazlalığı da elde edilen PCR ürün sayısını ve netliğini etkilemektedir. Bu çalışmada en iyi PCR sonucu çalışma solüsyonundan; 25 µl'lik kurulan reaksiyonlara 2 µl (4ng) kalıp DNA kullanılarak elde edilmiştir.

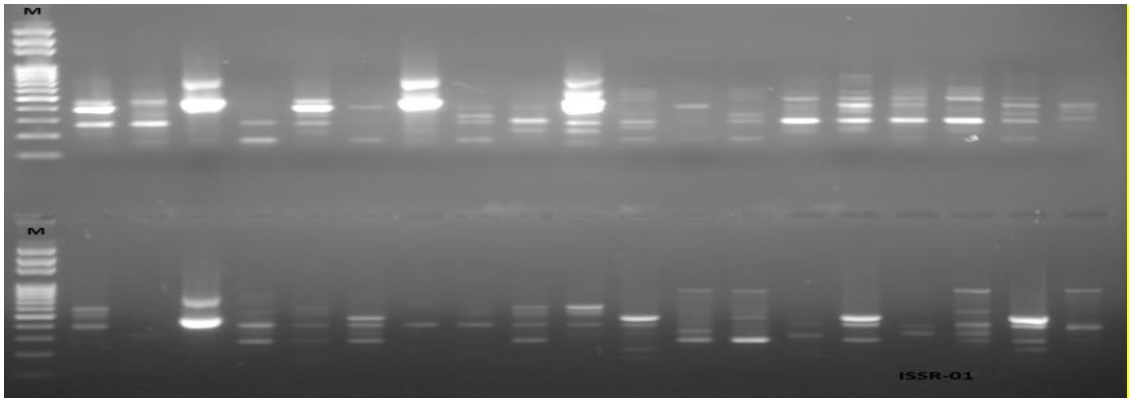
ITS-PCR'da kullanılan primerlerin hedef DNA'ya bağlanabilmesi için µl'de 10 ng DNA olacak şekilde kalıp DNA çalışma solüsyonları hazırlanmıştır.

Bu çalışmada en iyi PCR sonucu çalışma solüsyonlarından; 25 µl'lik kurulan reaksiyonlara 2 µl (20ng) kalıp DNA kullanılarak elde edilmiştir.

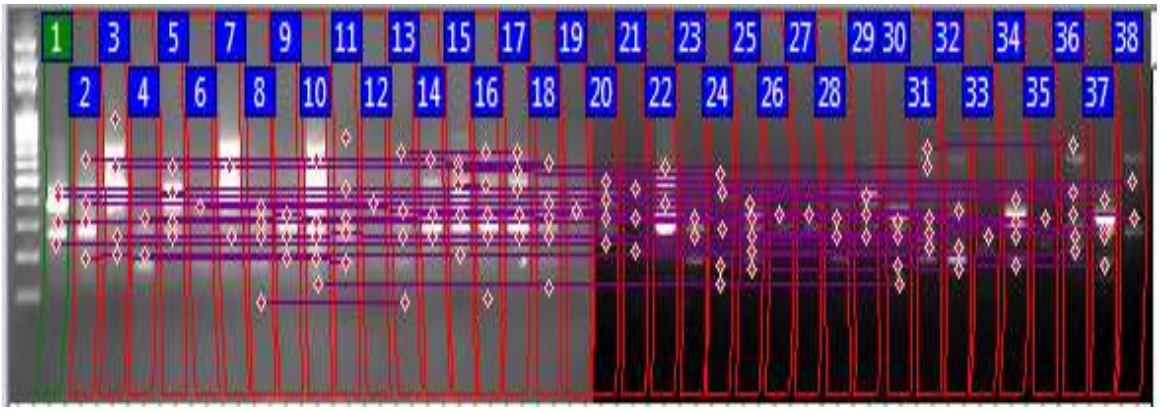
3.4. ISSR-PCR Sonuçları ve Polimorfizm Bilgi İçeriğinin Hesaplanması

Aşağıdaki şekillerde fasulye 'de oluşan çeşitliliği görebilmek adına yapılan ISSR-PCR deneylerinin jel görüntüleri görülmektedir, bu şekillerde M: markör (Fermantas Gene Ruler 100 bç DNA ladder Plus), olarak 100-3000 bç arasında bant veren DNA ladder kullanıldığı görülmektedir (Şekil 3.1).

ISSR primerileri kullanılarak oluşan bant profilleri büyüklüklerinin belirlenmesi ve çeşitliliği tanımlayabilmek adına tanımlayıcı bir markörle karşılaştırılmıştır.

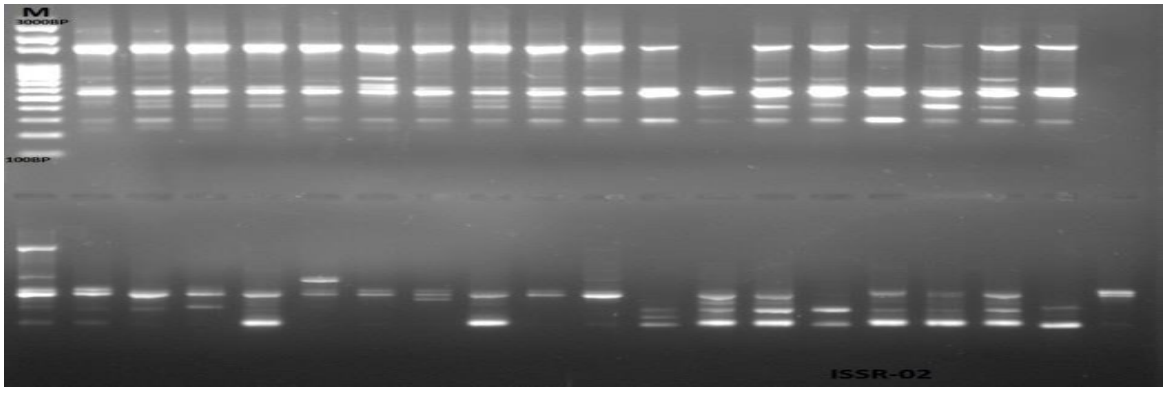


Şekil 3.1: ISSR-01 numaralı primer ile kurulan PCR deneyinin jel görüntüsü. M: Markör.

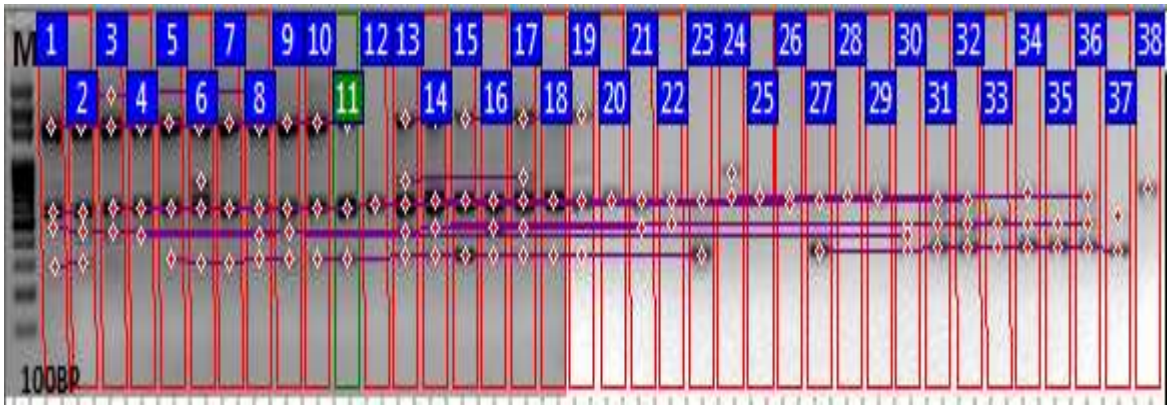


Şekil 3.2: ISSR-01 numaralı primer ile oluşan bant profilleri. M: Markör

ISSR-01 primeri ile yapılan PCR sonucunda elde edilen 26 adet bantın tamamı polimorfik olarak elde edilmiş ve polimorfizm oranı % 100 bulunmuştur.

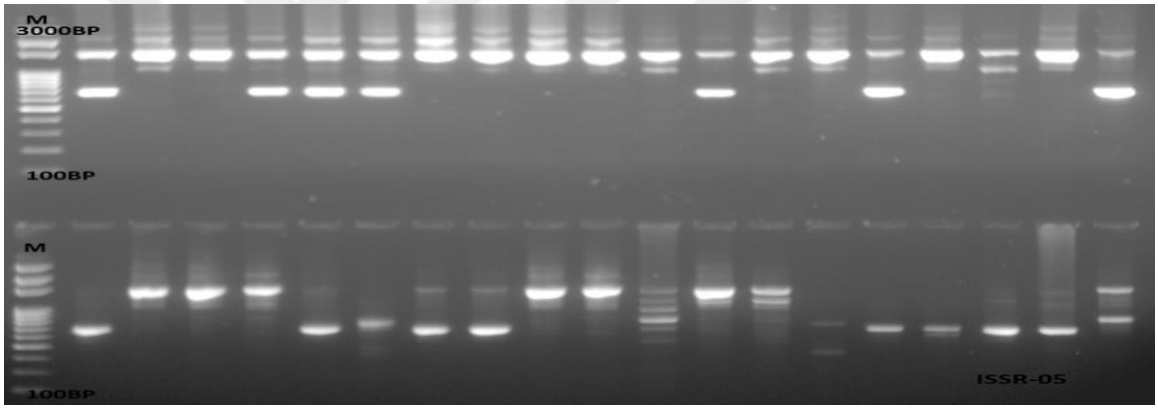


Şekil 3.3: ISSR-02 numaralı primer ile kurulan PCR deneyinin jel görüntüsü. M :Markör.

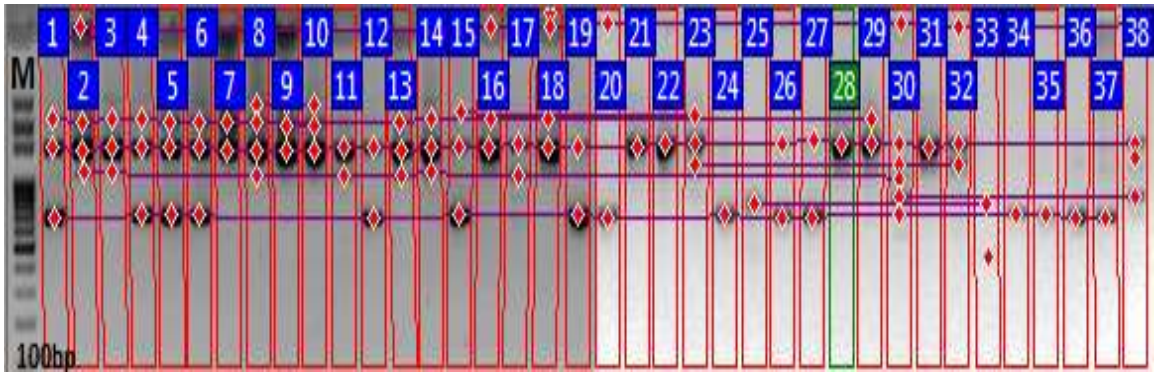


Şekil 3.4: ISSR-02 numaralı primer ile oluşan bant profilleri. M: Markör.

ISSR-02 primeri ile yapılan PCR sonucunda elde edilen 21 adet bantın tamamı polimorfik olarak elde edilmiş ve polimorfizm oranı % 100 bulunmuştur.

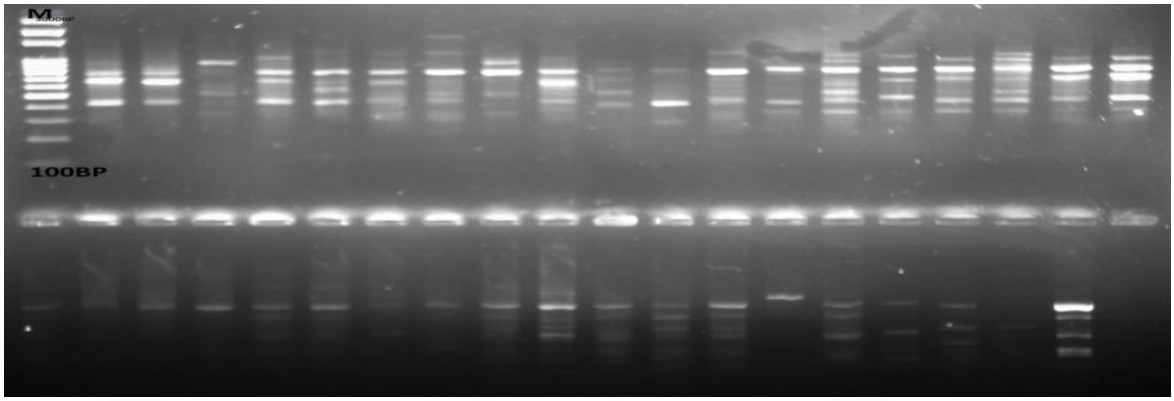


Şekil 3.5: ISSR-05 numaralı primer ile kurulan PCR deneyinin jel görüntüsü. M :Markör.

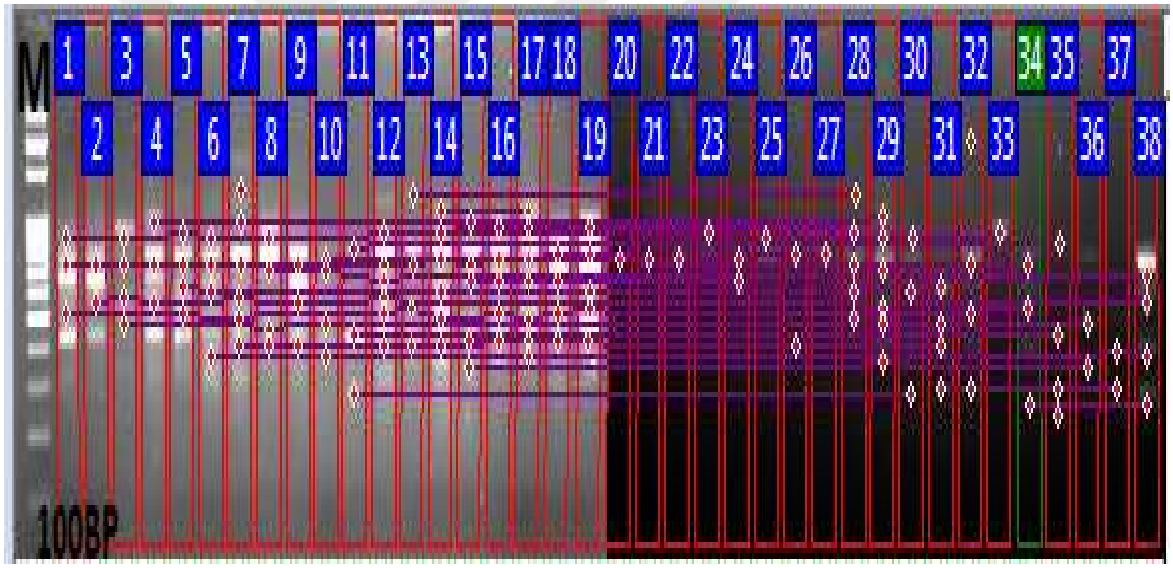


Şekil 3.6: ISSR-05 numaralı primer ile oluşan bant profilleri. M: Markör.

ISSR-05 primeri ile yapılan PCR sonucunda elde edilen 16 adet bantın tamamı polimorfik olarak elde edilmiş ve polimorfizm oranı % 100 bulunmuştur.

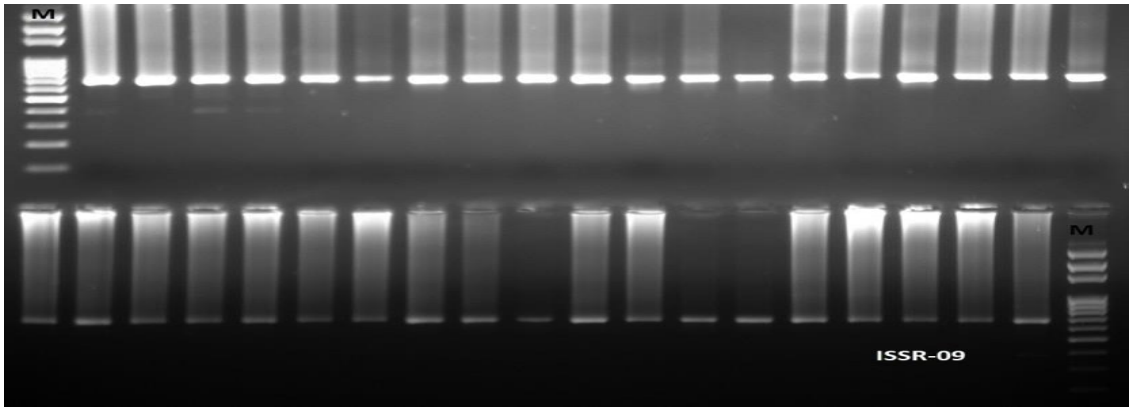


Şekil 3.7: ISSR-06 numaralı primer ile kurulan PCR deneyinin jel görüntüsü. M :Markör.

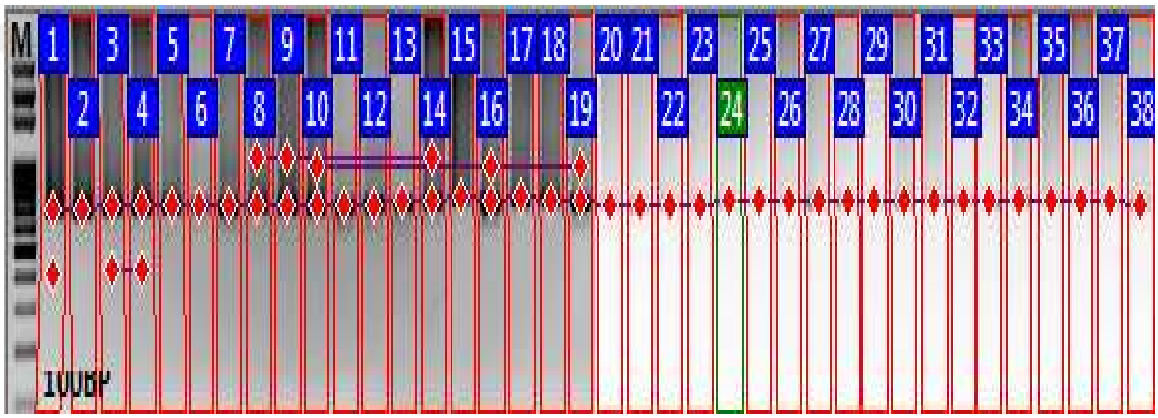


Şekil 3.8: ISSR-6 numaralı primer ile oluşan bant profilleri. M: Markör.

ISSR-06 primeri ile yapılan PCR sonucunda elde edilen 25 adet bantın tamamı polimorfik olarak elde edilmiş ve polimorfizm oranı % 100 bulunmuştur.

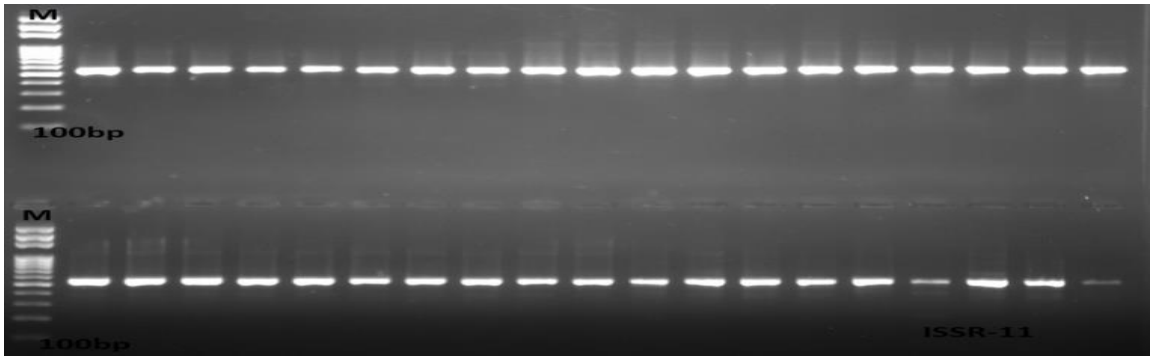


Şekil 3.9: ISSR-09 numaralı primer ile kurulan PCR deneyinin jel görüntüsü. M :Markör.

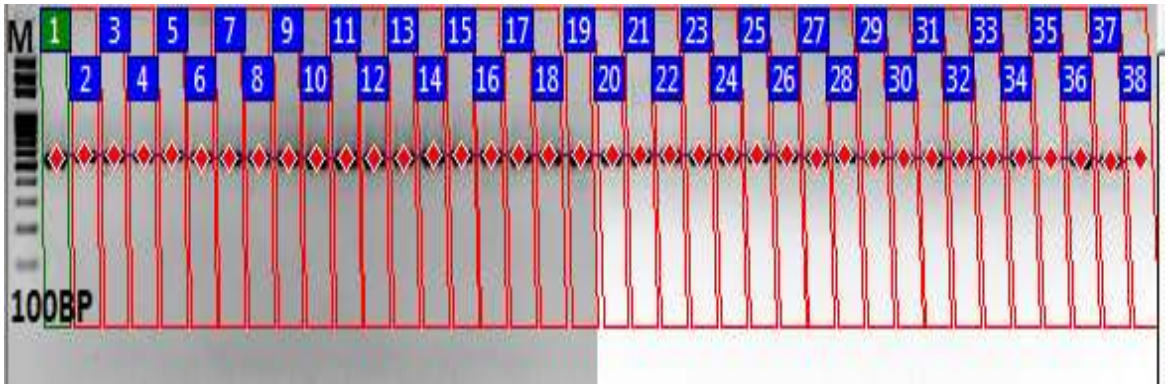


Şekil 3.10: ISSR-09 numaralı primer ile oluşan bant profilleri. M: Markör

ISSR-09 primeri ile yapılan PCR sonucunda elde edilen 5 adet bantın 4 tanesi polimorfik 1 tanesi monomorfik olarak elde edilmiş ve polimorfizm oranı % 80 bulunmuştur.

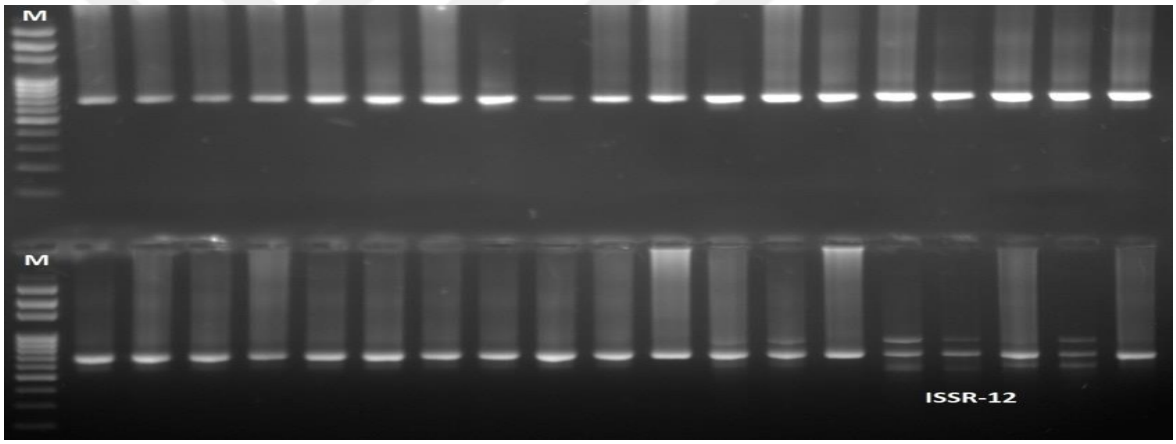


Şekil 3.11: ISSR11 numaralı primer ile kurulan PCR deneyinin jel görüntüsü. M:Markör.

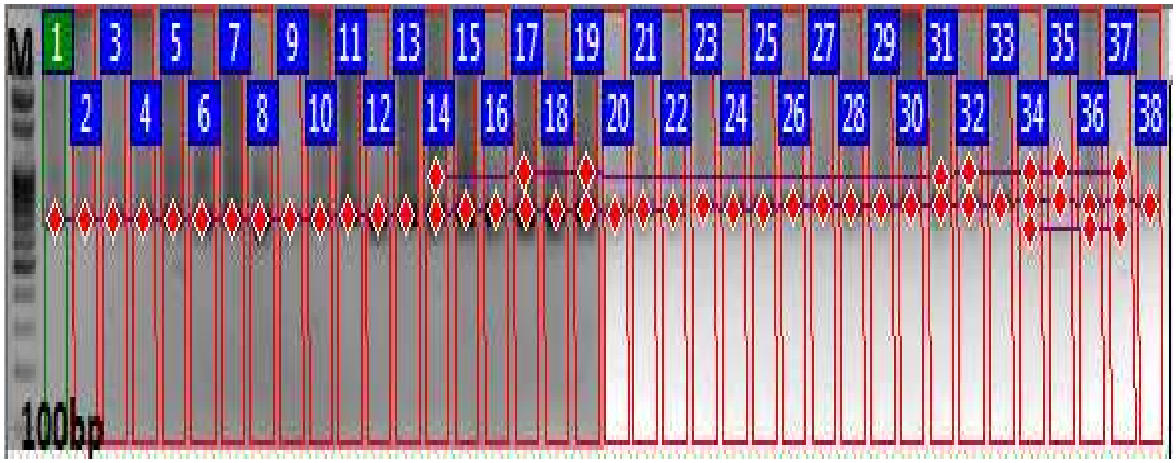


Şekil 3.12: ISSR-11 numaralı primer ile oluşan bant profilleri. M: Markör.

ISSR-11 primeri ile yapılan PCR sonucunda elde edilen 1 adet bantın tamamı monomorfik olarak elde edilmiş ve polimorfizm oranı % 0 bulunmuştur.

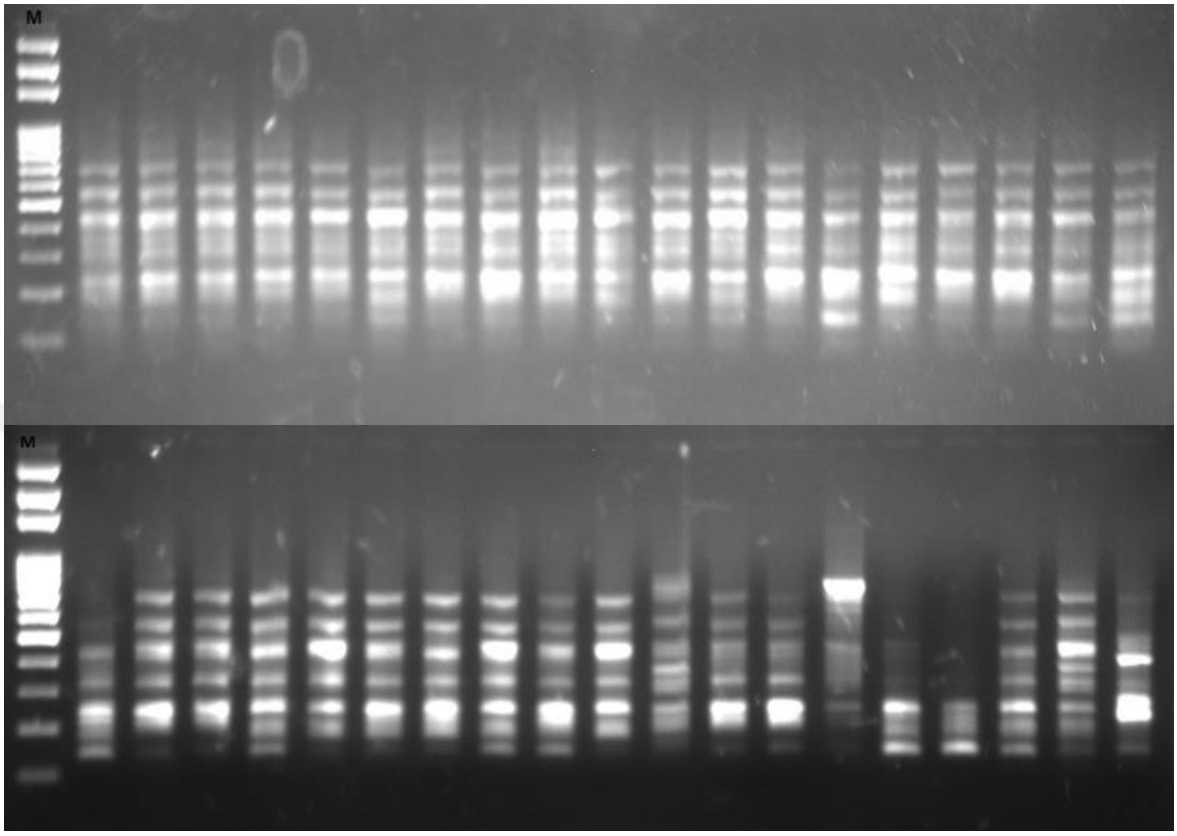


Şekil 3.13: ISSR12 numaralı primer ile kurulan PCR deneyinin jel görüntüsü. M:Markör.

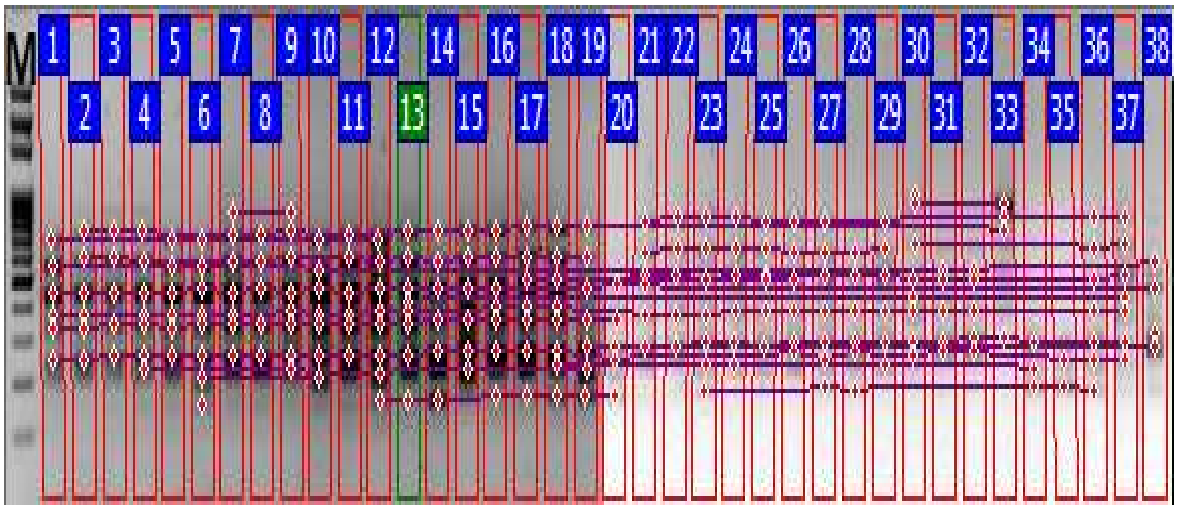


Şekil 3.14: ISSR-12 numaralı primer ile oluşan bant profilleri. M: Markör.

ISSR-12 primeri ile yapılan PCR sonucunda elde edilen 5 adet bant polimorfik 1 bant monomorfik olarak bulunmuş ve polimorfizm oranı % 16.66 bulunmuştur.

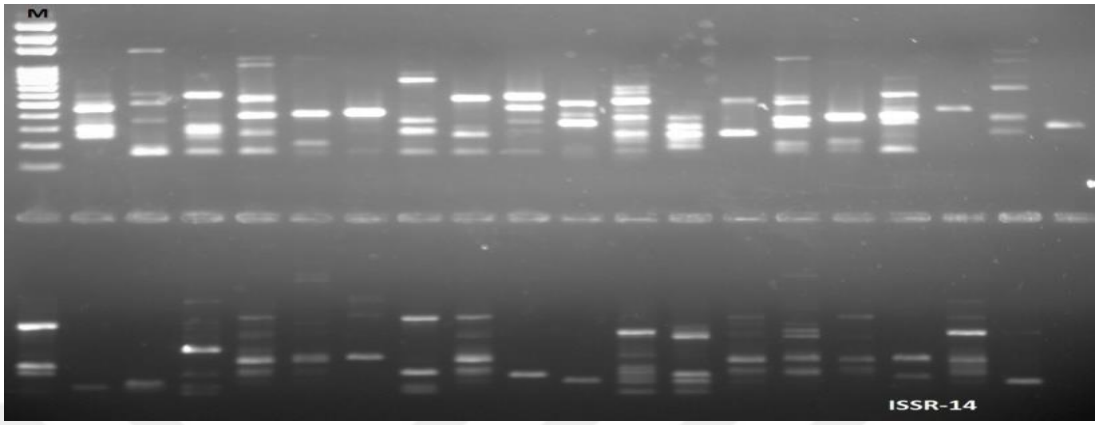


Şekil 3.15: ISSR13 numaralı primer ile kurulan PCR deneyinin jel görüntüsü. M:Markör.

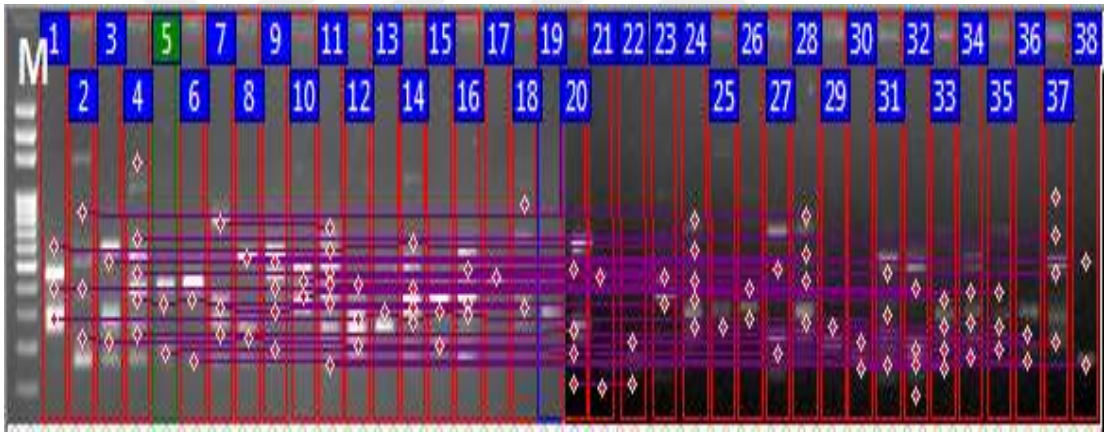


Şekil 3.16: ISSR-13 numaralı primer ile oluşan bant profilleri. M: Markör

ISSR-13 primeri ile yapılan PCR sonucunda elde edilen 26 adet bantın tamamı polimorfik olarak elde edilmiş ve polimorfizm oranı % 100 bulunmuştur.

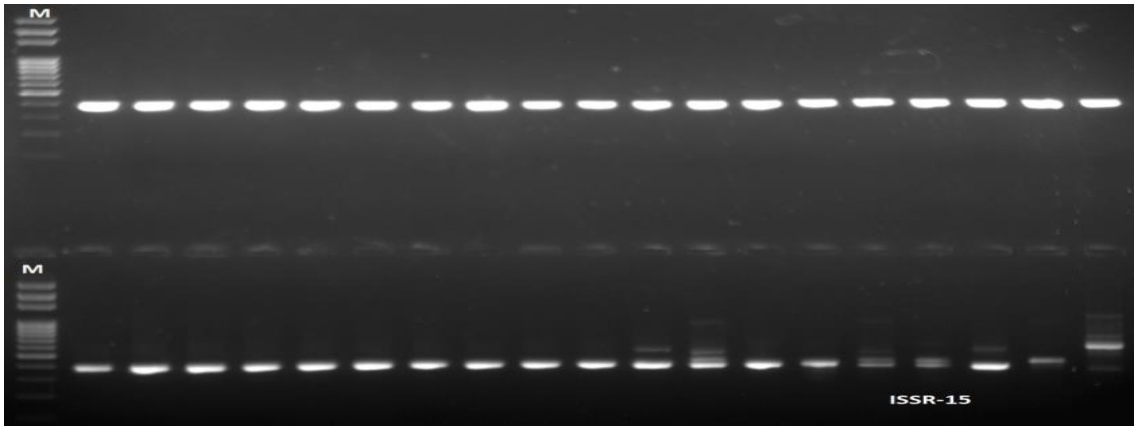


Şekil 3.17: ISSR14 numaralı primer ile kurulan PCR deneyinin jel görüntüsü. M:Markör.

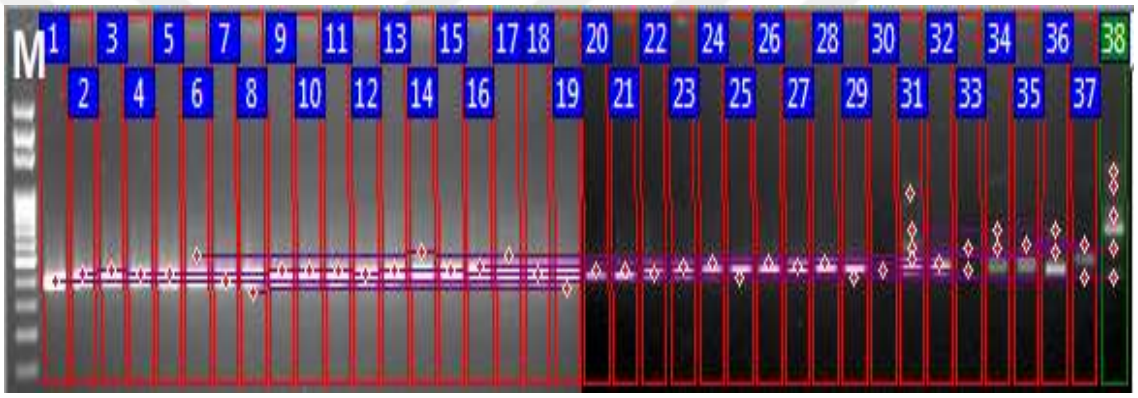


Şekil 3.18: ISSR14 numaralı primer ile oluşan bant profilleri. M: Markör

ISSR-14 primeri ile yapılan PCR sonucunda elde edilen 30 adet bantın tamamı polimorfik olarak elde edilmiş ve polimorfizm oranı % 100 bulunmuştur.

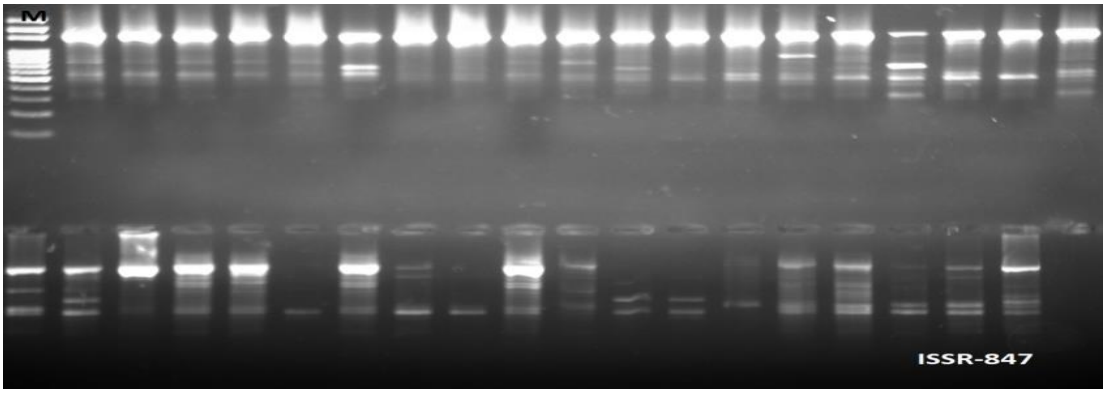


Şekil 3.19: ISSR15 numaralı primer ile kurulan PCR deneyinin jel görüntüsü. M:Markör

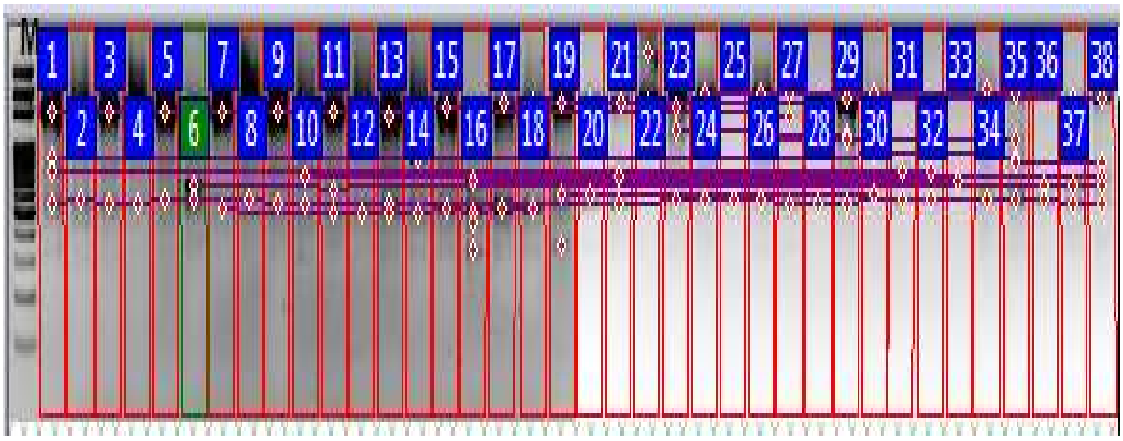


Şekil 3.20: ISSR-15 numaralı primer ile oluşan bant profilleri. M: Markör.

ISSR-15 primeri ile yapılan PCR sonucunda elde edilen 13 adet bantın tamamı polimorfik olarak elde edilmiş ve polimorfizm oranı % 100 bulunmuştur.



Şekil 3.21: ISSR-847 numaralı primer ile kurulan PCR deneyinin jel görüntüsü. M:Markör



Şekil 3.22: ISSR-847 numaralı primer ile oluşan bant profilleri. M: Markör.

ISSR-847 primeri ile yapılan PCR sonucunda elde edilen 24 adet bantın 23 tanesi polimorfik 1 tanesi monomorfik olarak elde edilmiş ve polimorfizm oranı % 95,83 bulunmuştur.

Polimorfizm Bilgi İçeriği:

Fasulye örneklerinden evrimsel genetik çeşitliliğinin belirlenmesi ve tanımlanması için 17 ISSR primeri taranmış (Çizelge 2.2) ve bu primerlerden 11'i ISSR-PCR yönteminde kullanılmış ve sonuç elde edilmiştir.

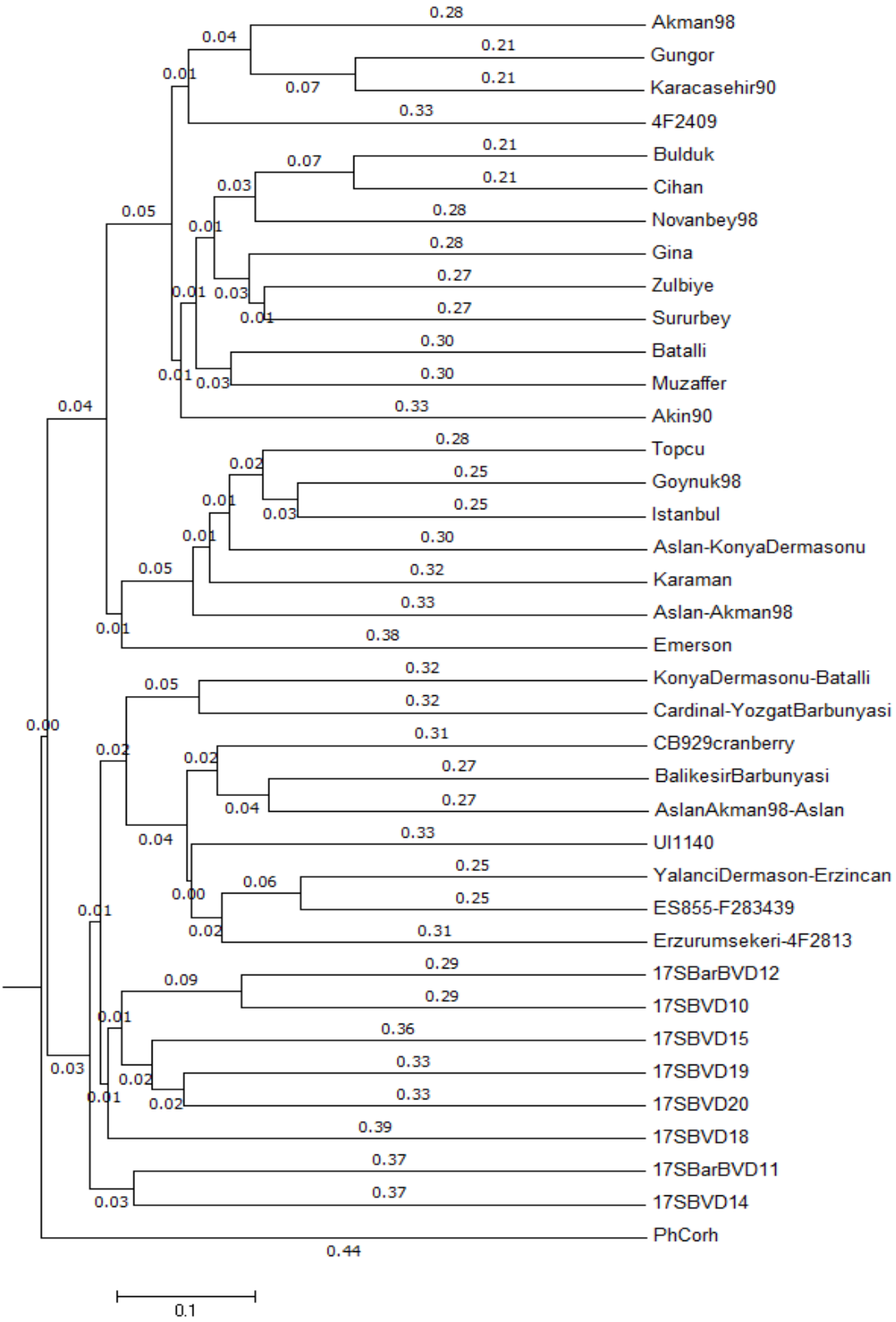
PCR sonuçlarına göre toplamda 193 bant elde edilmiş olup bu bantlardan 190 tanesi polimorfik, 3 tanesi ise monomorfik yapıda görüntülenmiştir (Çizelge 3.2). Kullanılan primerlerden en fazla bantlaşma oranı 30 bant ile ISSR-14 no.'lu primerde görülürken, en düşük bantlaşma ise ISSR 11 numaralı primerde 1 bant olarak belirlenmiştir

Oluşan bant profilleri Phoretix1DPro programına göre var (1) ya da yok (0) şeklinde değerlendirildikten sonra genetik benzerlik indeksi Jaccard eşitliği hesaplanmıştır (ek 1).

Jaccard benzerlik değerlerinden yola çıkarak bir dendrogram elde edilmiştir. Soyağacının (filogenetik Ağaç) elde edilmesinde UPGMA analizi kullanılmıştır (Şekil 3.23)

Çizelge 3.2. Kullanılan ISSR primerleri sonucu Fasulye çeşit ve hatlarında elde edilen bantlaşma sonuçları ve polimorfizm oranları.

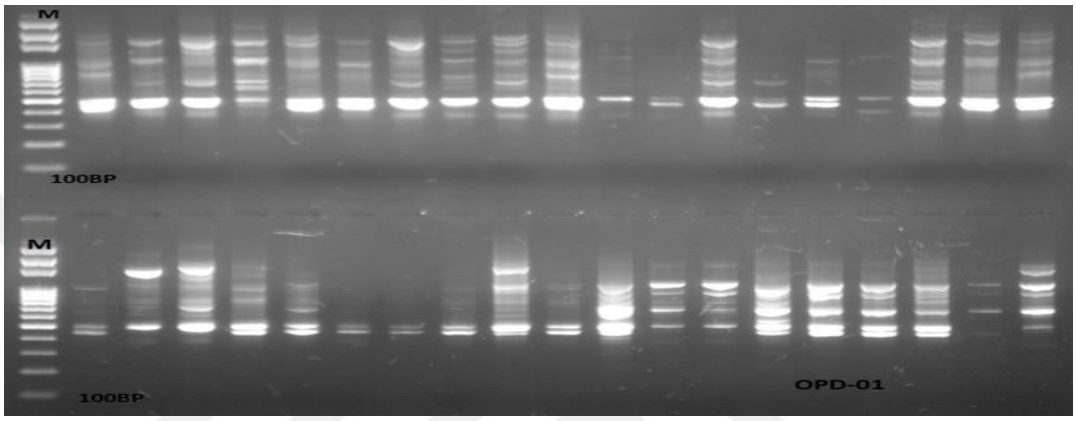
Primer no	Toplam bant sayısı	Polimorfik bant sayısı	Monomorfik bant sayısı	Polimorfizm oranı (%)
ISSR-01	26	26	-	100
ISSR-02	21	21	-	100
ISSR-05	16	16	-	100
ISSR-06	13	13	-	100
ISSR-09	5	4	1	80
ISSR-11	1	0	1	0
ISSR-12	6	6	-	100
ISSR-13	26	26	-	100
ISSR-14	30	30	-	100
ISSR-15	25	25	-	100
ISSR-847	24	23	1	95,83
Toplam	193	190	3	98,444



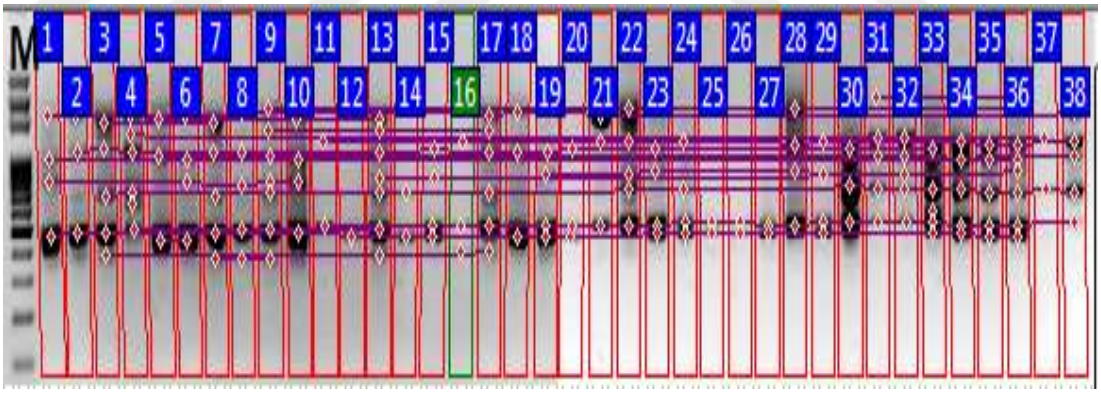
Şekil 3.23. Fasulye çeşit ve hatlarında ISSR primerleri kullanılarak oluşan bant profilleri ile elde edilen dendrogram.

3.5. RAPD-PCR Sonuçları ve Polimorfizm Bilgi İçeriğinin Hesaplanması

Aşağıdaki şekillerde Fasulye ‘de oluşan çeşitliliği görebilmek adına yapılan RAPD-PCR deneylerinin jel görüntüleri görülmektedir, bu şekillerde M: markörü (Fermantas Gene Ruler 100 bç DNA ladder Plus), (Çizelge 2.1). RAPD primerileri kullanılarak oluşan bant profilleri büyüklüklerinin belirlenmesi ve çeşitliliği tanımlayabilmek adına tanımlayıcı bir markörle karşılaştırılmıştır.

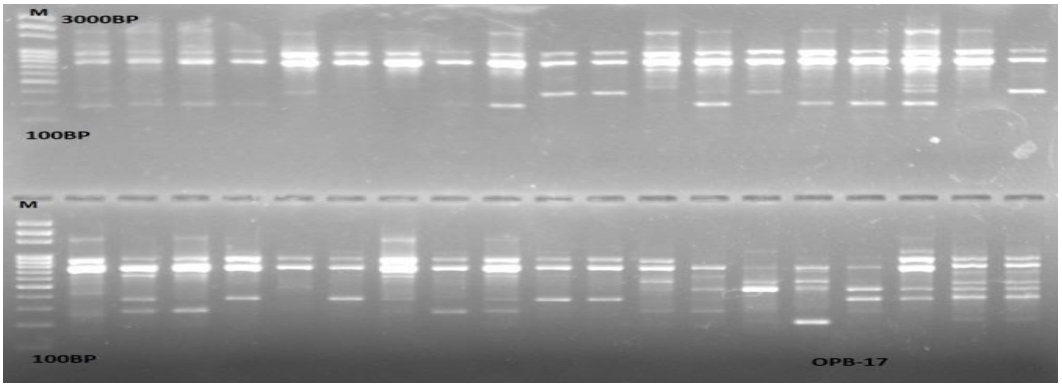


Şekil 3.24. RAPD-OPD-01 numaralı primer ile elde edilen jel görüntüsü. M: Markör

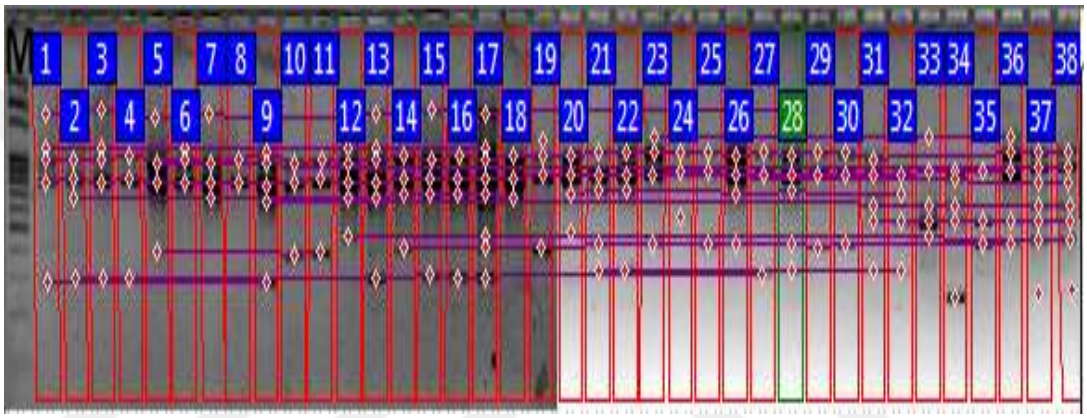


Şekil 3.25. RAPD-OPD-01 numaralı primer ile oluşan bant profilleri. M: Markör

OPD-01 primeri ile yapılan PCR sonucunda elde edilen 26 adet bantın tamamı polimorfik olarak elde edilmiş ve polimorfizm oranı % 100 bulunmuştur.

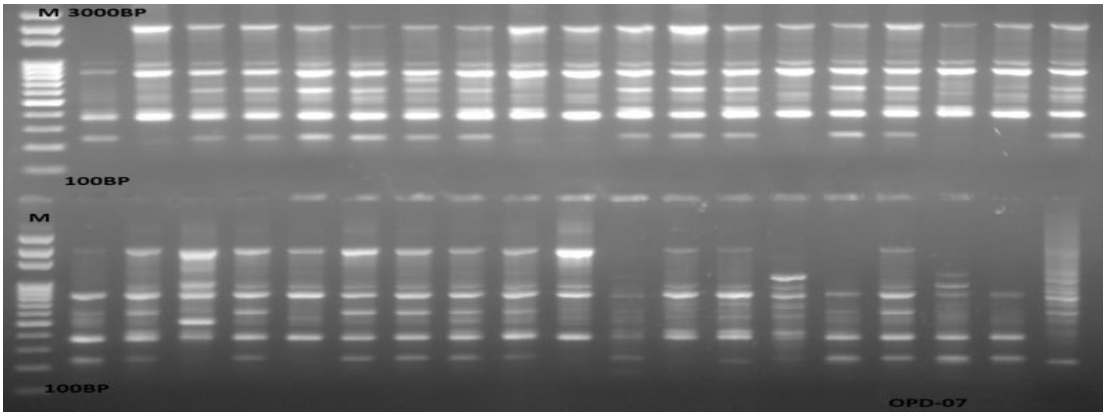


Şekil 3.26: RAPD-OPB-17 numaralı primer ile elde edilen jel görüntüsü. M: Markör.

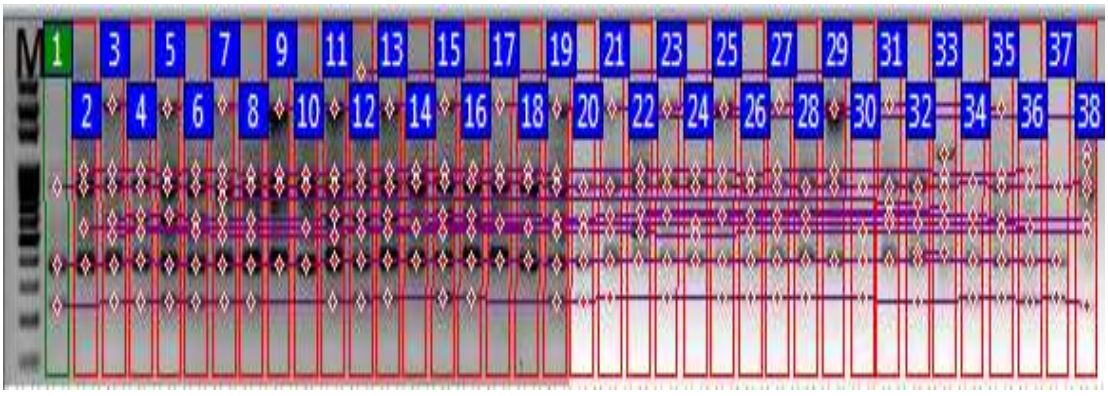


Şekil 3.27: RAPD-OPB-17 numaralı primer ile oluşan bant profilleri. M: Markör.

OPB-17 primeri ile yapılan PCR sonucunda elde edilen 28 adet bantın tamamı polimorfik olarak elde edilmiş ve polimorfizm oranı % 100 bulunmuştur.

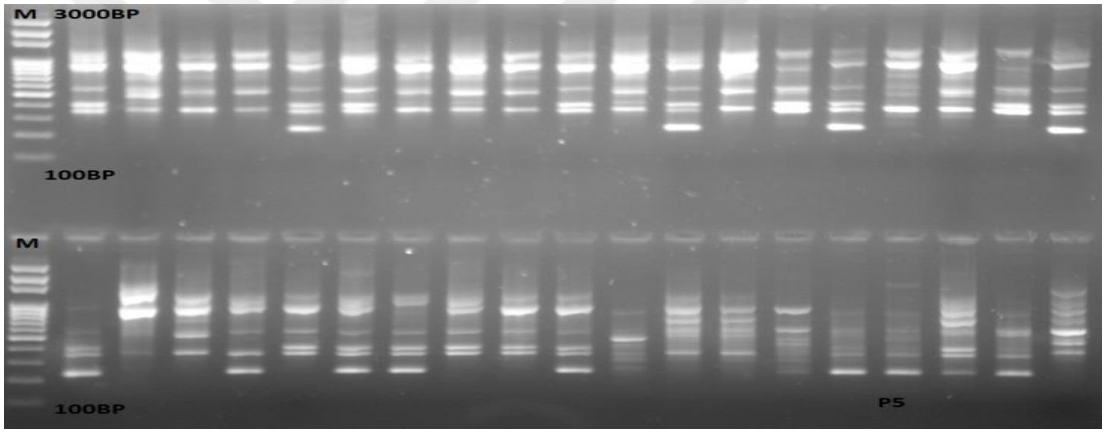


Şekil 3.28: RAPD-OPD-07 numaralı primer ile elde edilen jel görüntüsü. M: Markör

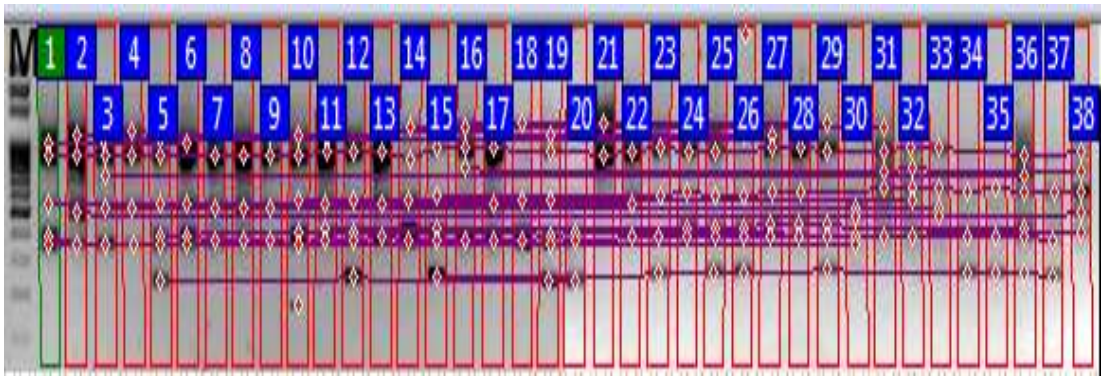


Şekil 3.29: RAPD-OPD-07 numaralı primer ile oluşan bant profilleri. M: Markör

OPD-07 primeri ile yapılan PCR sonucunda elde edilen 18 adet bantın 17'si polimorfik 1'monomorfik olarak elde edilmiş ve polimorfizm oranı % 97,55 bulunmuştur.

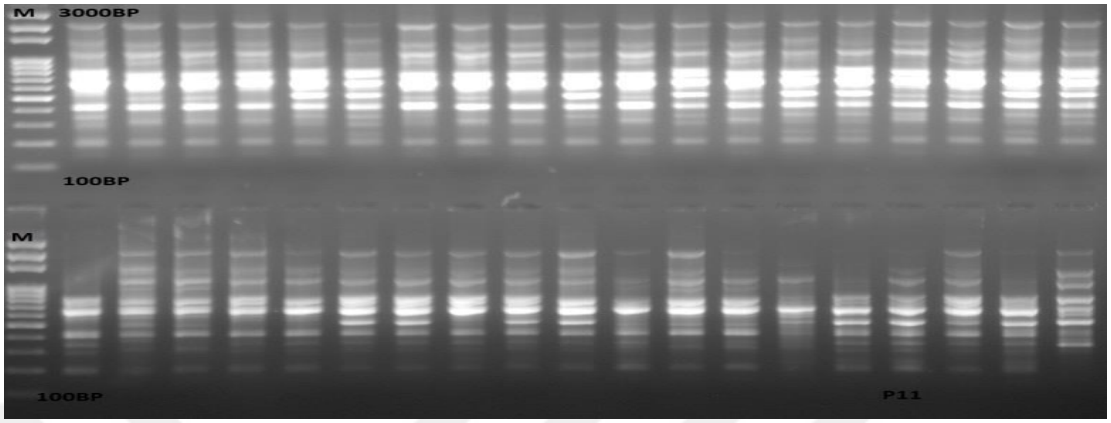


Şekil 3.30: RAPD-P5 numaralı primer ile elde edilen jel görüntüsü. M: Markör

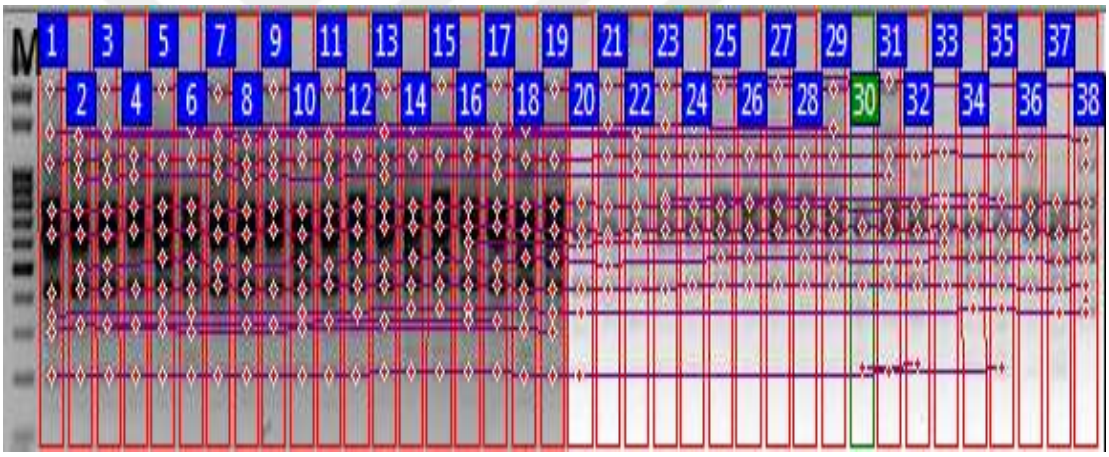


Şekil 3.31: RAPD-P5 numaralı primer ile oluşan bant profilleri. M: Markör

P5 primeri ile yapılan PCR sonucunda elde edilen 22 adet bantın tamamı polimorfik olarak elde edilmiş ve polimorfizm oranı % 100 bulunmuştur.

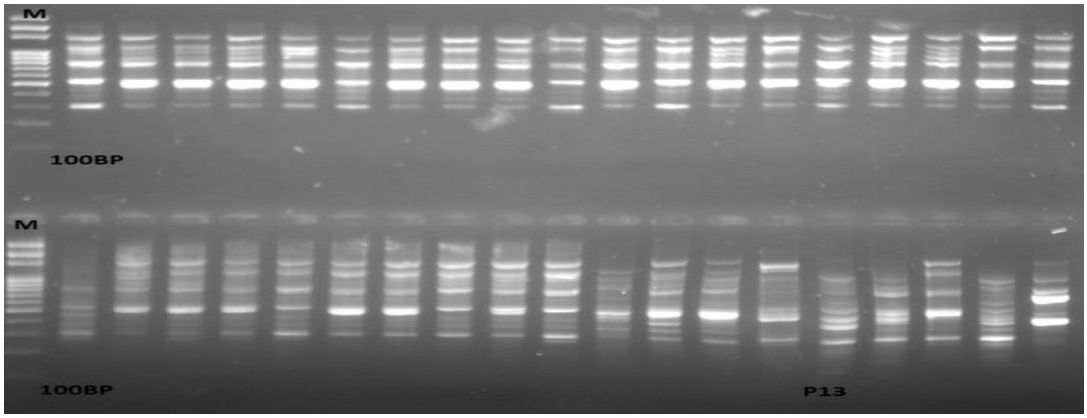


Şekil 3.32: RAPD-P11 numaralı primer ile elde edilen jel görüntüsü. M: Markör

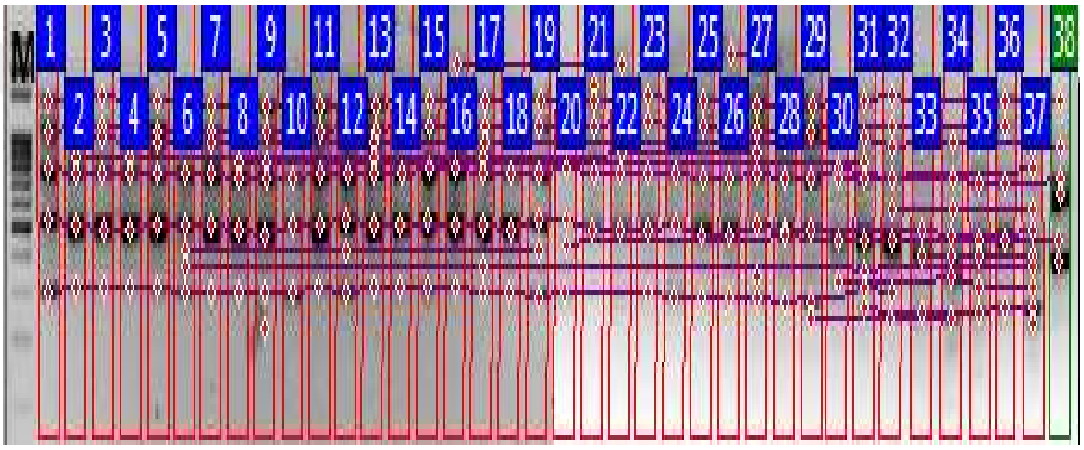


Şekil 3.33: RAPD-P11 numaralı primer ile oluşan bant profilleri. M: Markör

P11 primeri ile yapılan PCR sonucunda elde edilen 12 adet bantın 10 tanesi polimorfik 2'monomorfik olarak elde edilmiş ve polimorfizm oranı % 83,33 bulunmuştur.

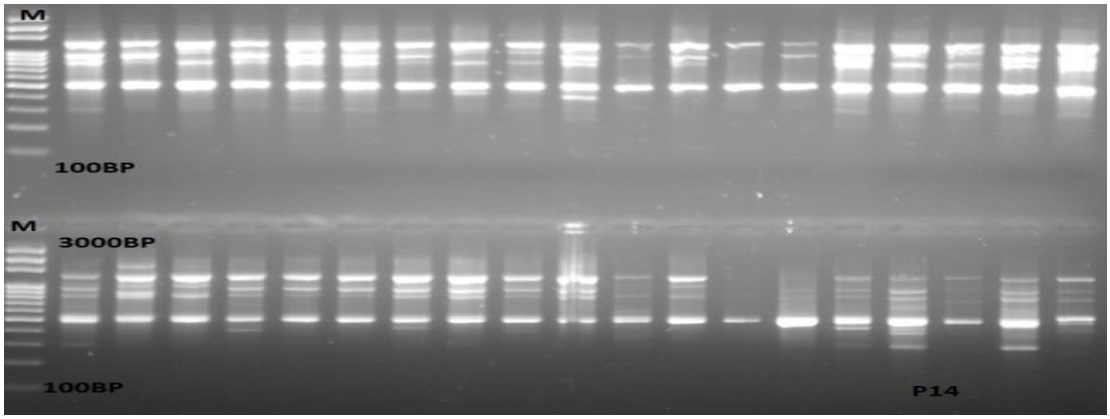


Şekil 3.34: RAPD-P13 numaralı primer ile elde edilen jel görüntüsü. M: Markör

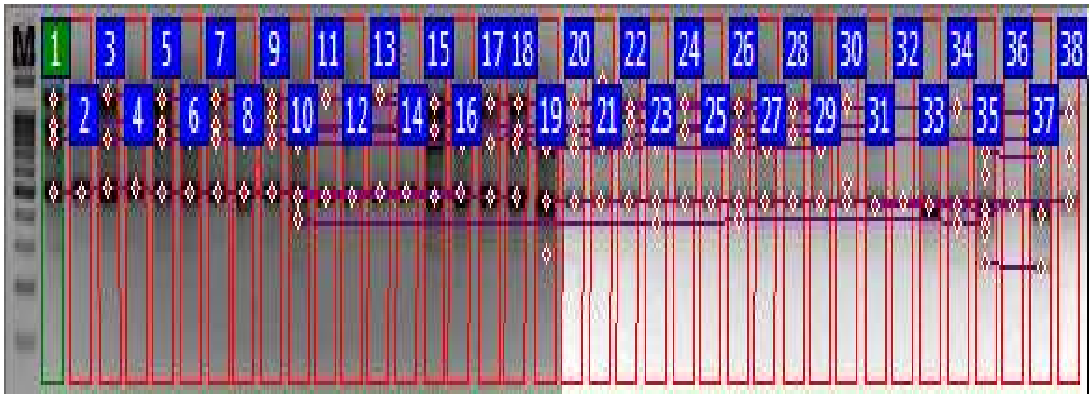


Şekil 3.35: RAPD-P13 numaralı primer ile oluşan bant profilleri. M: Markör

P13 primeri ile yapılan PCR sonucunda elde edilen 30 adet bantın tamamı polimorfik olarak elde edilmiş ve polimorfizm oranı % 100 bulunmuştur.

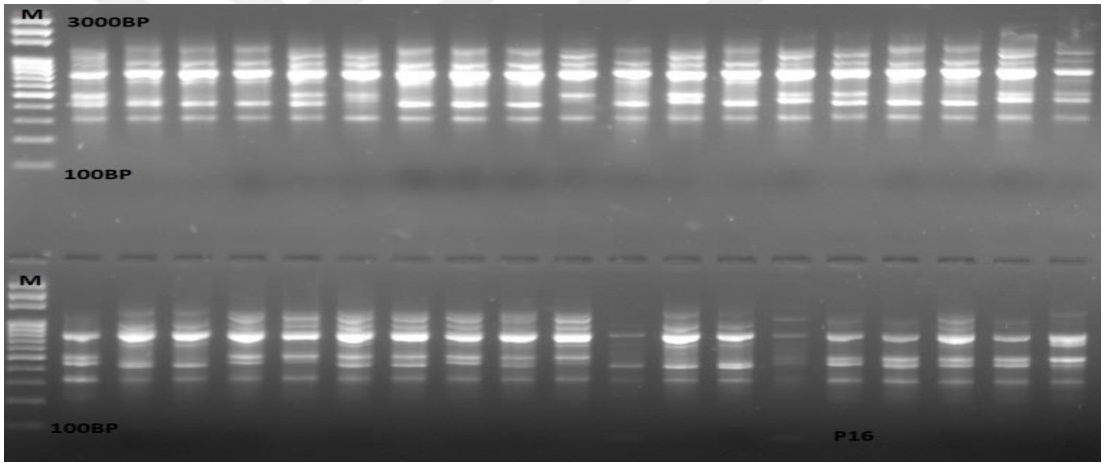


Şekil 3.36: RAPD-P14 numaralı primer ile elde edilen jel görüntüsü. M: Markör

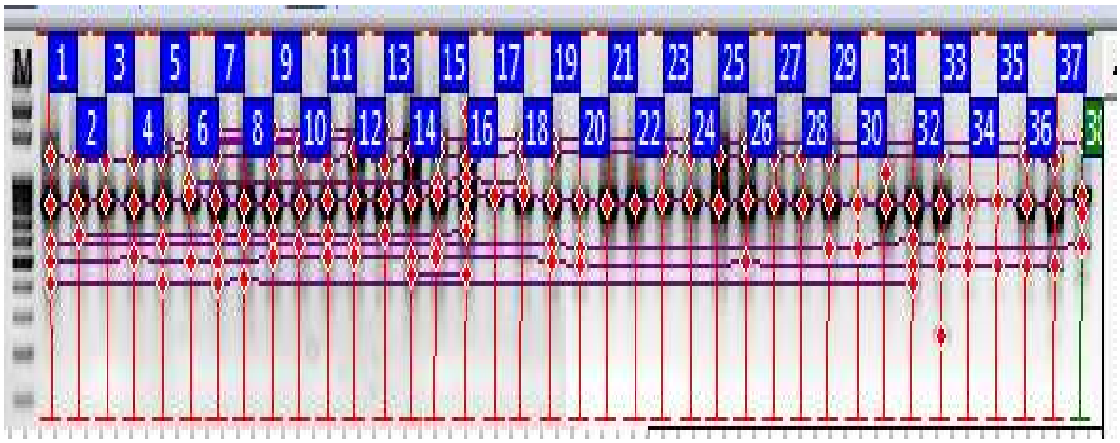


Şekil 3.37: RAPD-P14 numaralı primer ile oluşan bant profilleri. M: Markör

P14 primeri ile yapılan PCR sonucunda elde edilen 22 adet bantın tamamı polimorfik olarak elde edilmiş ve polimorfizm oranı % 100 bulunmuştur.

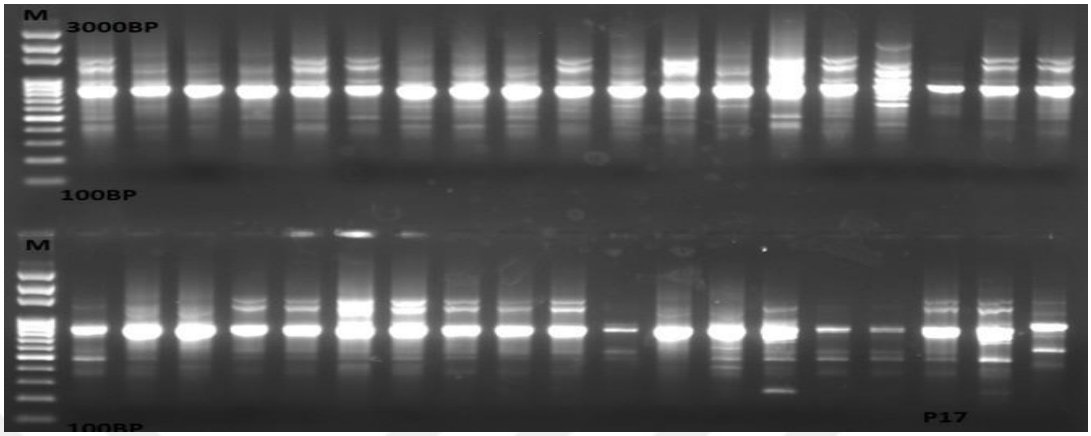


Şekil 3.40: RAPD-P16 numaralı primer ile elde edilen jel görüntüsü. M: Markör

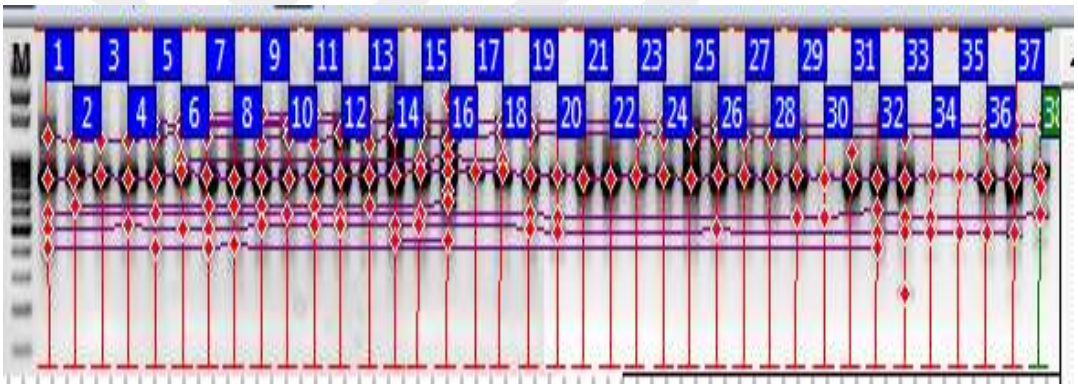


Şekil 3.41: RAPD-P16 numaralı primer ile oluşan bant profilleri. M: Markör

P16 primeri ile yapılan PCR sonucunda elde edilen 15 adet bantın 14 tanesi polimorfik 1 tanesi monomorfik olarak elde edilmiş ve polimorfizm oranı % 93,33 bulunmuştur.

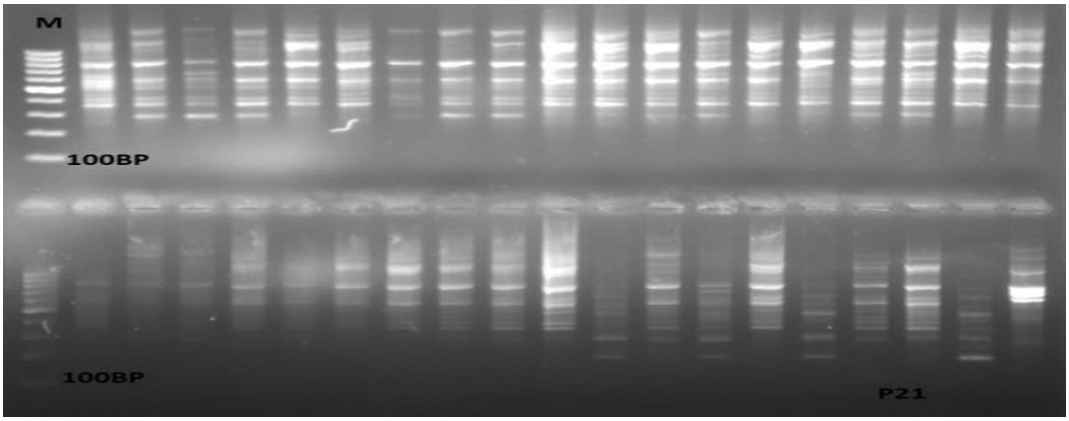


Şekil 3.42: RAPD-P17 numaralı primer ile elde edilen jel görüntüsü. M: Markör

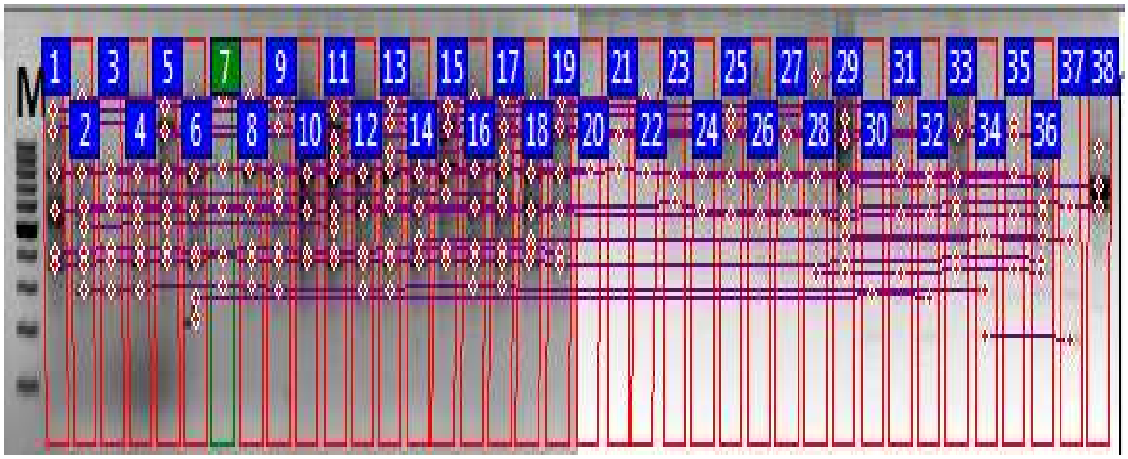


Şekil 3.43. RAPD-P17 numaralı primer ile oluşan bant profilleri. M: Markör

P17 primeri ile yapılan PCR sonucunda elde edilen 17 adet bantın 16 tanesi polimorfik 1 tanesi monomorfik olarak elde edilmiş ve polimorfizm oranı % 94,11 bulunmuştur.

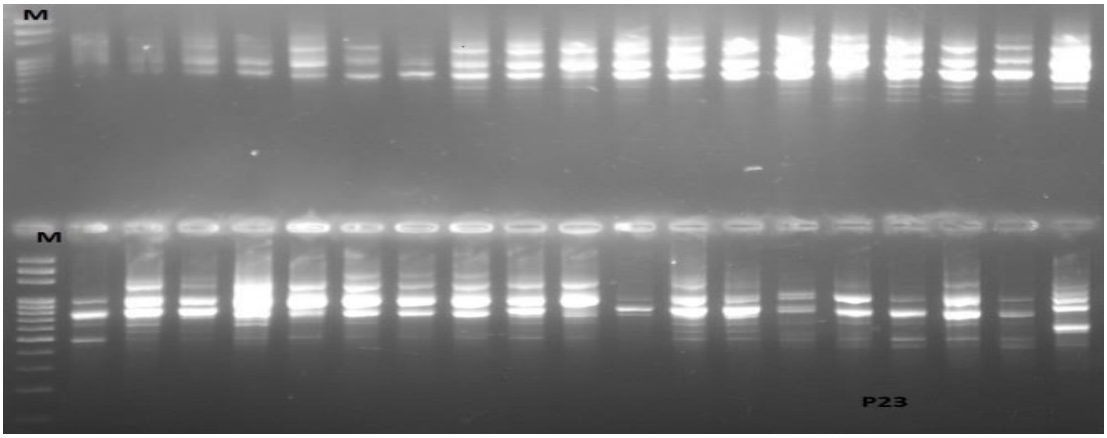


Şekil 3.44: RAPD-P21 numaralı primer ile elde edilen jel görüntüsü. M: Markör

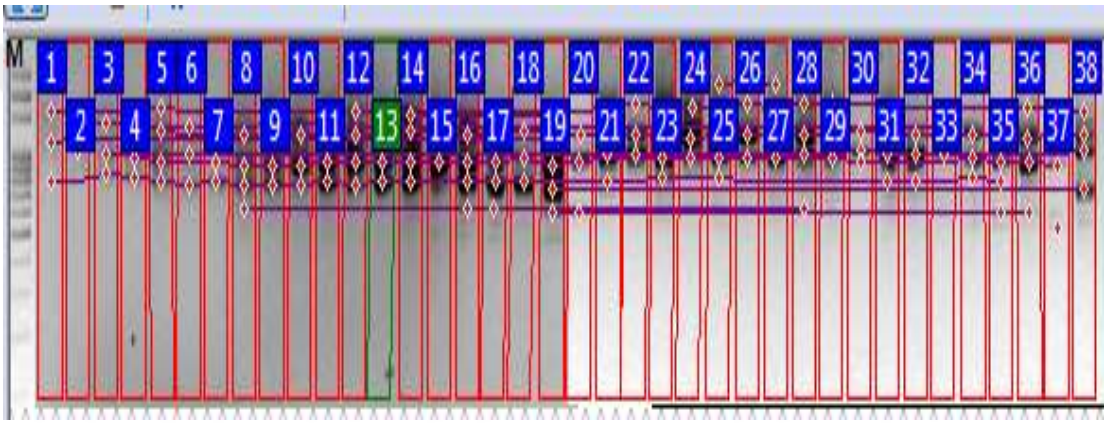


Şekil 3.45: RAPD-P21 numaralı primer ile oluşan bant profilleri. M: Markör

P21 primeri ile yapılan PCR sonucunda elde edilen 29 adet bantın 28 tanesi polimorfik 1 tanesi monomorfik olarak elde edilmiş ve polimorfizm oranı % 96,55 bulunmuştur.

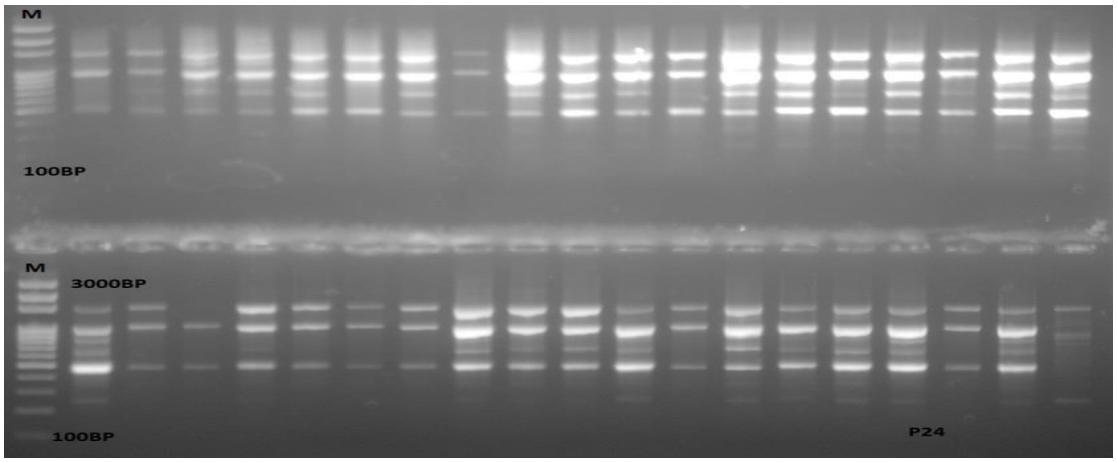


Şekil 3.38. RAPD-P23 numaralı primer ile elde edilen jel görüntüsü. M: Markör

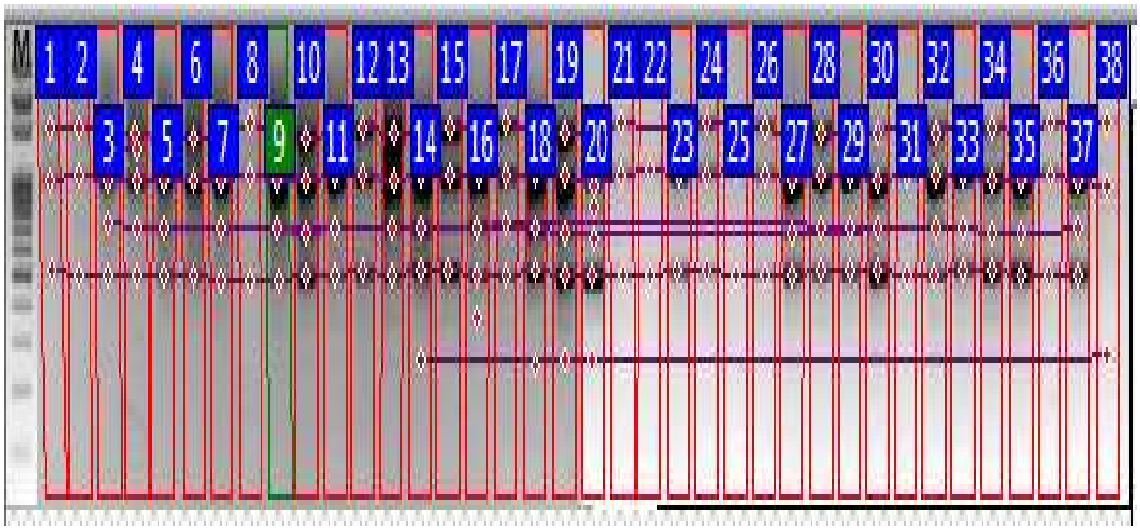


Şekil 3.39: RAPD-P23 numaralı primer ile oluşan bant profilleri. M: Markör

P23 primeri ile yapılan PCR sonucunda elde edilen 16 adet bantın tamamı polimorfik olarak elde edilmiş ve polimorfizm oranı % 100 bulunmuştur.



Şekil 3.46: RAPD-P24 numaralı primer ile elde edilen jel görüntüsü. M: Markör



Şekil 3.47: RAPD-P24 numaralı primer ile oluşan bant profilleri. M: Markör

P24 primeri ile yapılan PCR sonucunda elde edilen 12 adet bantın 11 tanesi polimorfik 1 tanesi monomorfik olarak elde edilmiş ve polimorfizm oranı % 91,66 bulunmuştur.

Polimorfizm Bilgi İçeriği:

Fasulye örneklerinden evrimsel genetik çeşitliliğinin belirlenmesi ve tanımlanması için 15 RAPD primeri taranmış (Çizelge 2.2) ve bu primerlerden 12 tanesinde RAPD-PCR yönteminde kullanılmış ve sonuç elde edilmiştir.

PCR sonuçlarına göre toplamda 247 bant elde edilmiş olup bu bantlardan 240 tanesi polimorfik, 7 tanesi ise monomorfik yapıda görüntülenmiştir (Çizelge 3.3).

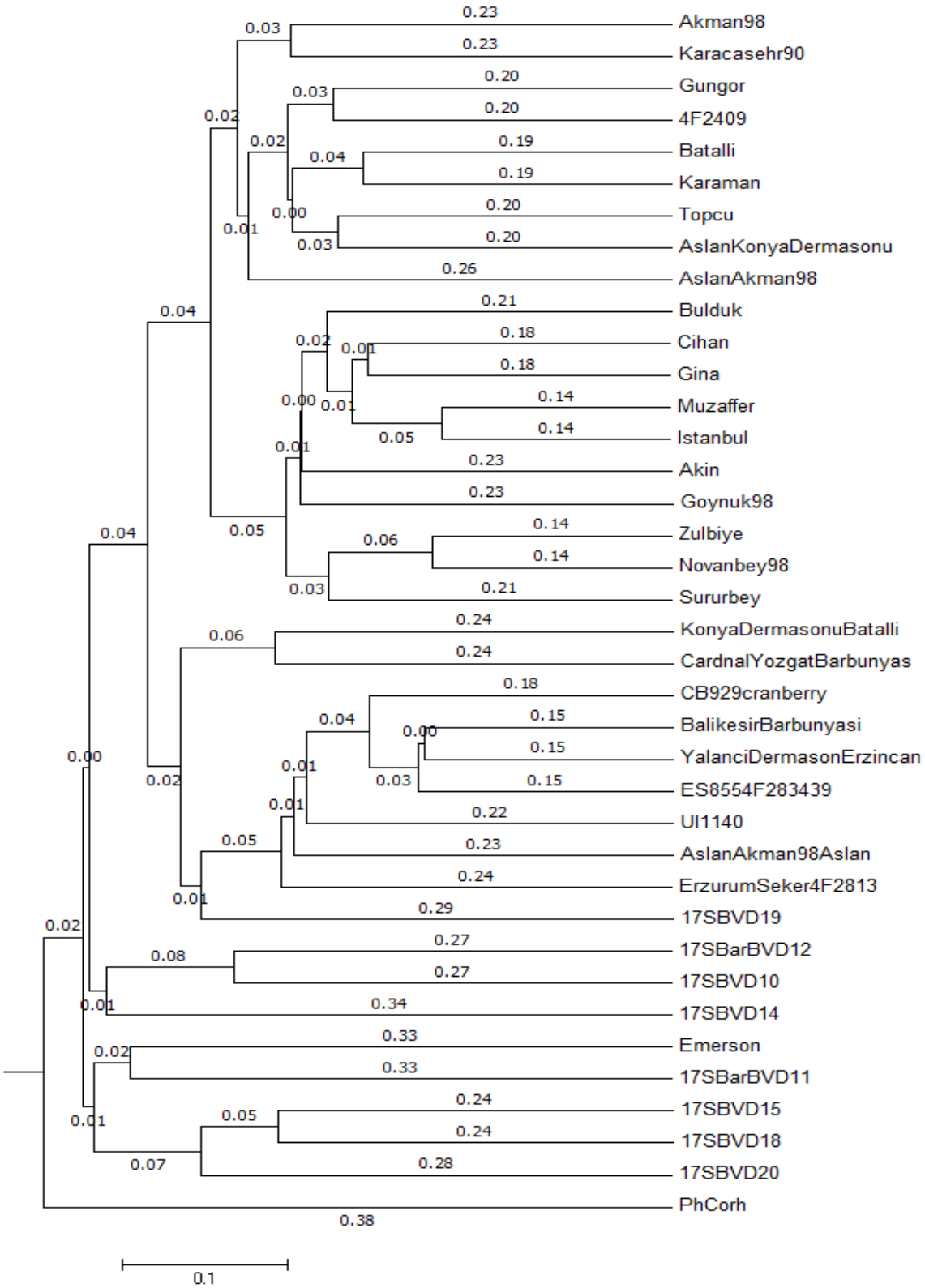
Kullanılan primerlerden en fazla bantlaşma oranı 30 bant ile P13 no.'lu primerde görülürken, en düşük bantlaşma ise P11 ve P24 numaralı primerlerde 12 bant olarak belirlenmiştir.

Oluşan bant profilleri Phoretix1DPro programına göre var (1) ya da yok (0) şeklinde değerlendirildikten sonra genetik benzerlik indeksi Jaccard eşitliği hesaplanmıştır (ek 2).

Jaccard benzerlik değerlerinden yola çıkarak bir dendrogram elde edilmiştir. Soyağacının (filogenetik Ağaç) elde edilmesinde UPGMA yöntemi kullanılmıştır (Şekil 3.48). Bu verilerle oluşturulan Newick formatındaki bilgi, MEGA 6.0 programı yardımıyla filogenetik ağaçlar oluşturulmuştur.

Çizelge 3.3. Kullanılan RAPD primerleri sonucu fasulye çeşit ve hatlarında elde edilen bantlaşma sonuçları ve polimorfizm oranları.

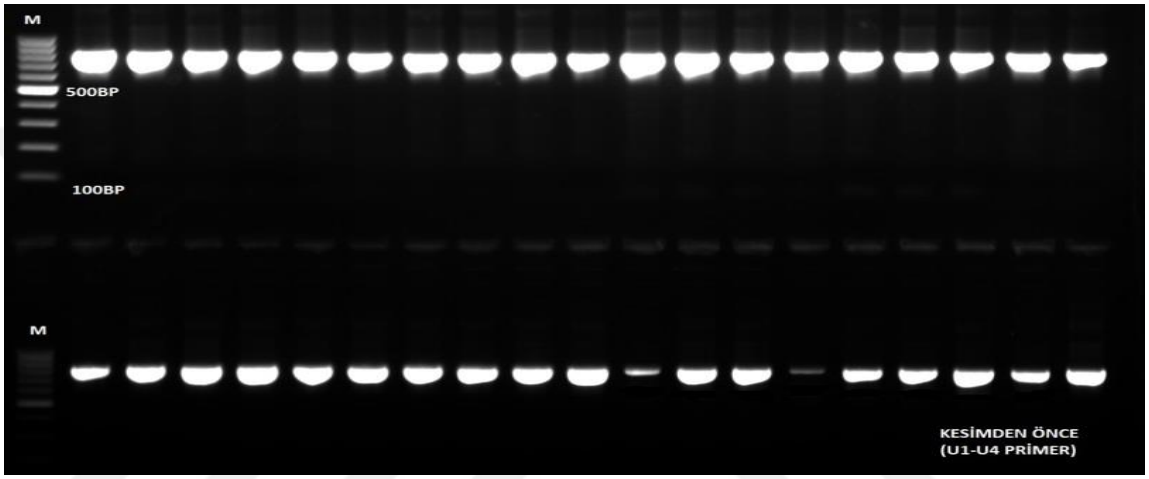
Primer no	Toplam bant sayısı	Polimorfik bant sayısı	Monomorfik bant sayısı	Polimorfizm oranı (%)
OPB-17	28	28	-	100
OPD-01	26	26	-	100
OPD-07	18	17	1	97,55
P5	22	22	-	100
P11	12	10	2	83,33
P13	30	30	-	100
P14	22	22	-	100
P16	15	14	1	93,33
P17	17	16	1	94,11
P21	29	28	1	96,55
P23	16	16	-	100
P24	12	11	1	91,66
Toplam	247	240	7	97,16



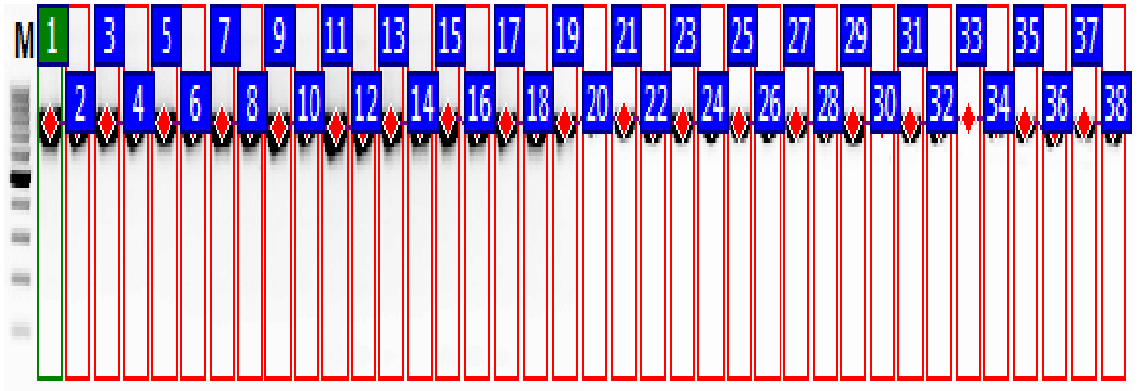
Şekil 3.48: Fasulye çeşit ve hatlarında RAPD primerleri kullanılarak oluşan bant profilleri ile elde edilen dendrogram.

3.6. ITS-PCR Sonuçları ve Polimorfizm Bilgi İçeriğinin Hesaplanması

Aşağıdaki şekillerde Fasulye ‘de oluşan çeşitliliği görebilmek adına yapılan ITS-PCR deneylerinin jel görüntüleri görülmektedir, bu şekillerde M: markör (Fermantas Gene Ruler 100 bç DNA ladder Plus), (Çizelge 2.1). ITS primeri ile kurulan PCR sonrasında oluşan ürünün çeşitli restriksiyon enzimleri ile kesilmesi sonucunda elde edilen bant profilleri büyüklüklerinin belirlenmesi ve çeşitliliği tanımlayabilmek adına tanımlayıcı bir markörle karşılaştırılmıştır.

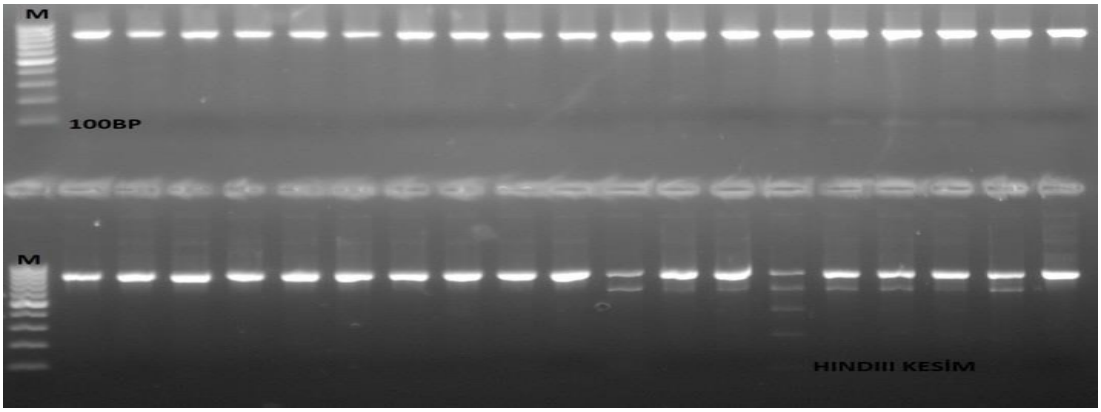


Şekil 3.49: ITS primleri ile yapılan PCR deneyi jel görüntüsü. M: Markör

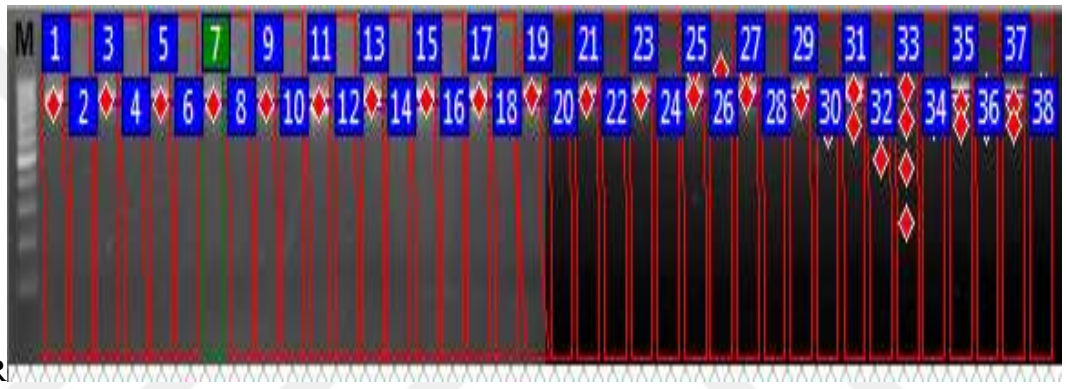


Şekil 3.50: ITS primerleri ile yapılan PCR deneyinden elde edilen bant profilleri. M: Markör

Seçilen ITS primerinin referansına göre angiospermlilerde (Kapalı tohumlular) 745bç±128 bç veri beklenmektedir. Fasulye cinsi de angiosperm üyesi olduğundan deney sonucunda elde edilen bant boyutu 745+128 bç dir.

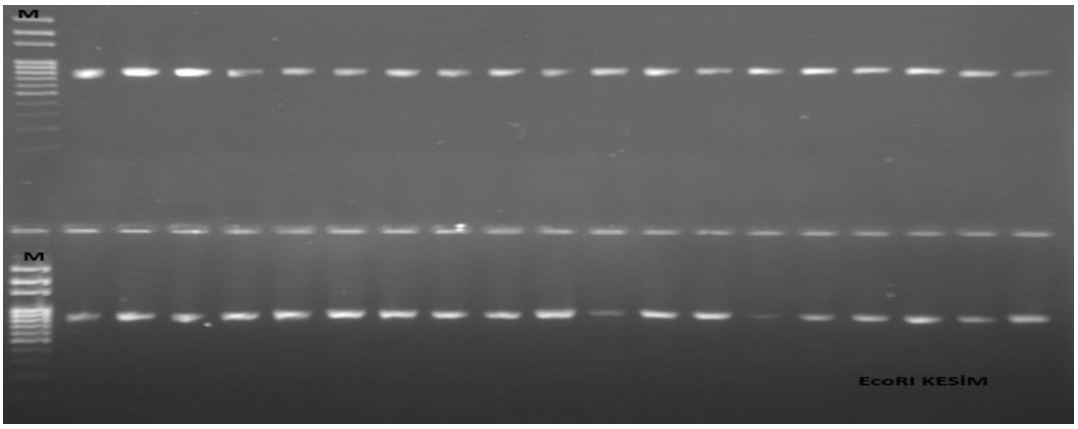


Şekil 3.51: ITS PCR ürünlerinin Hınd*III* Restriksiyon kesim enzimi ile kesim deneyinin jel görüntüsü. M: Markör

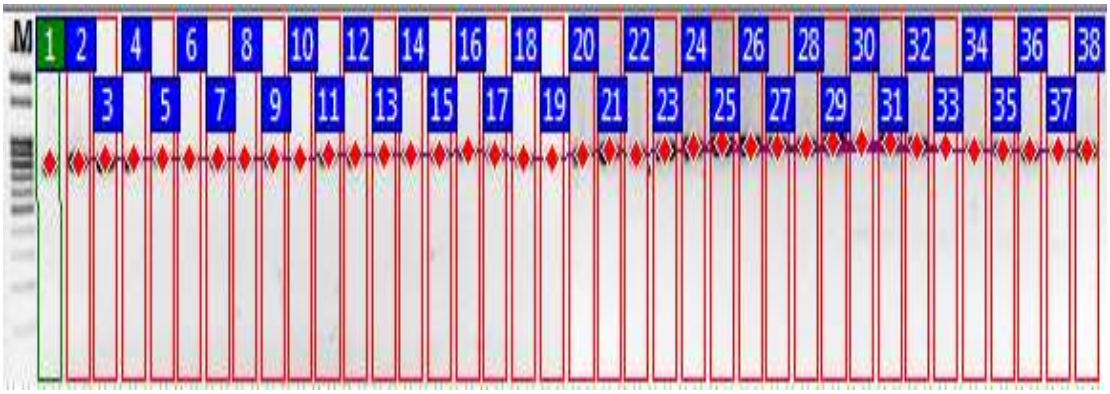


R

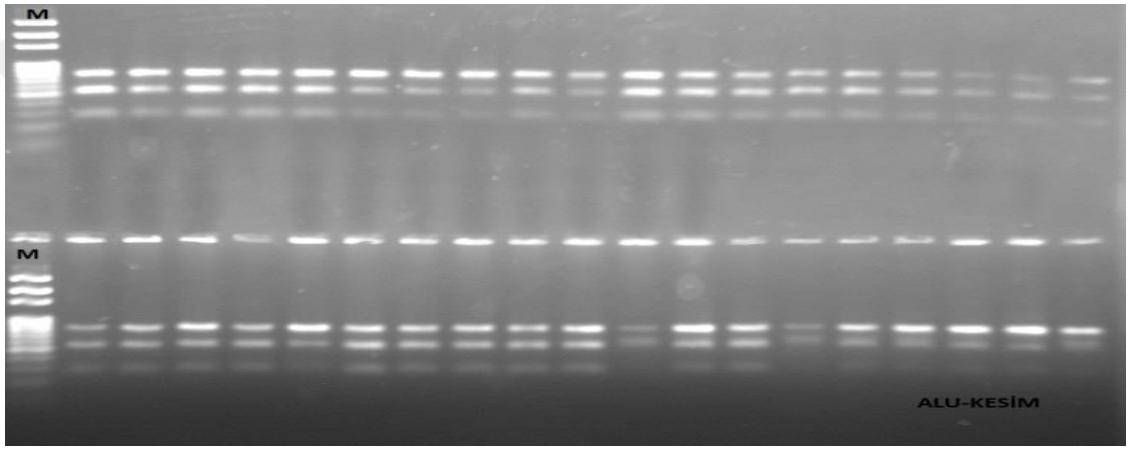
Şekil 3.52: ITS PCR ürünlerinin Hınd*III* Restriksiyon kesim enzimi ile kesim deneyi sonucunda oluşan bant profilleri. M: Markör



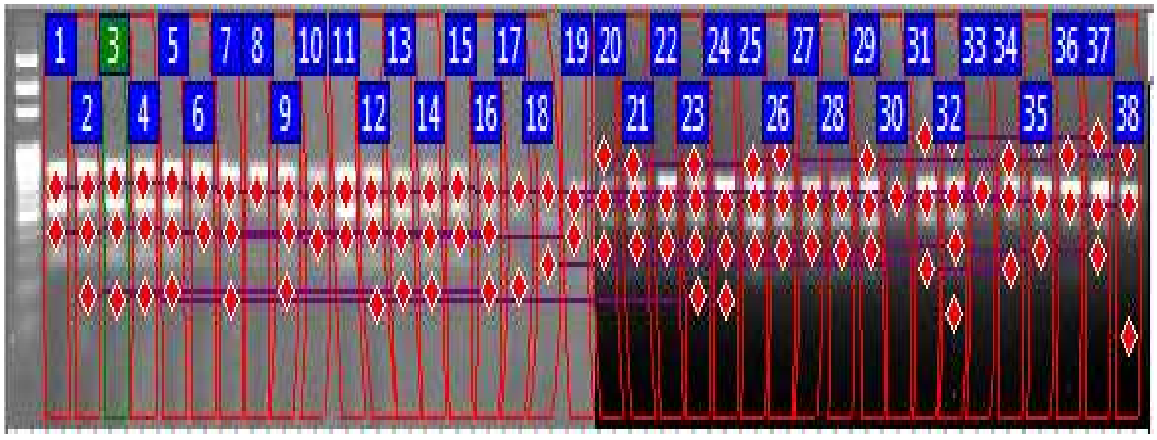
Şekil 3.53: ITS PCR ürünlerinin Eco*RI* Restriksiyon kesim enzimi ile kesim deneyinin jel görüntüsü. M: Markör



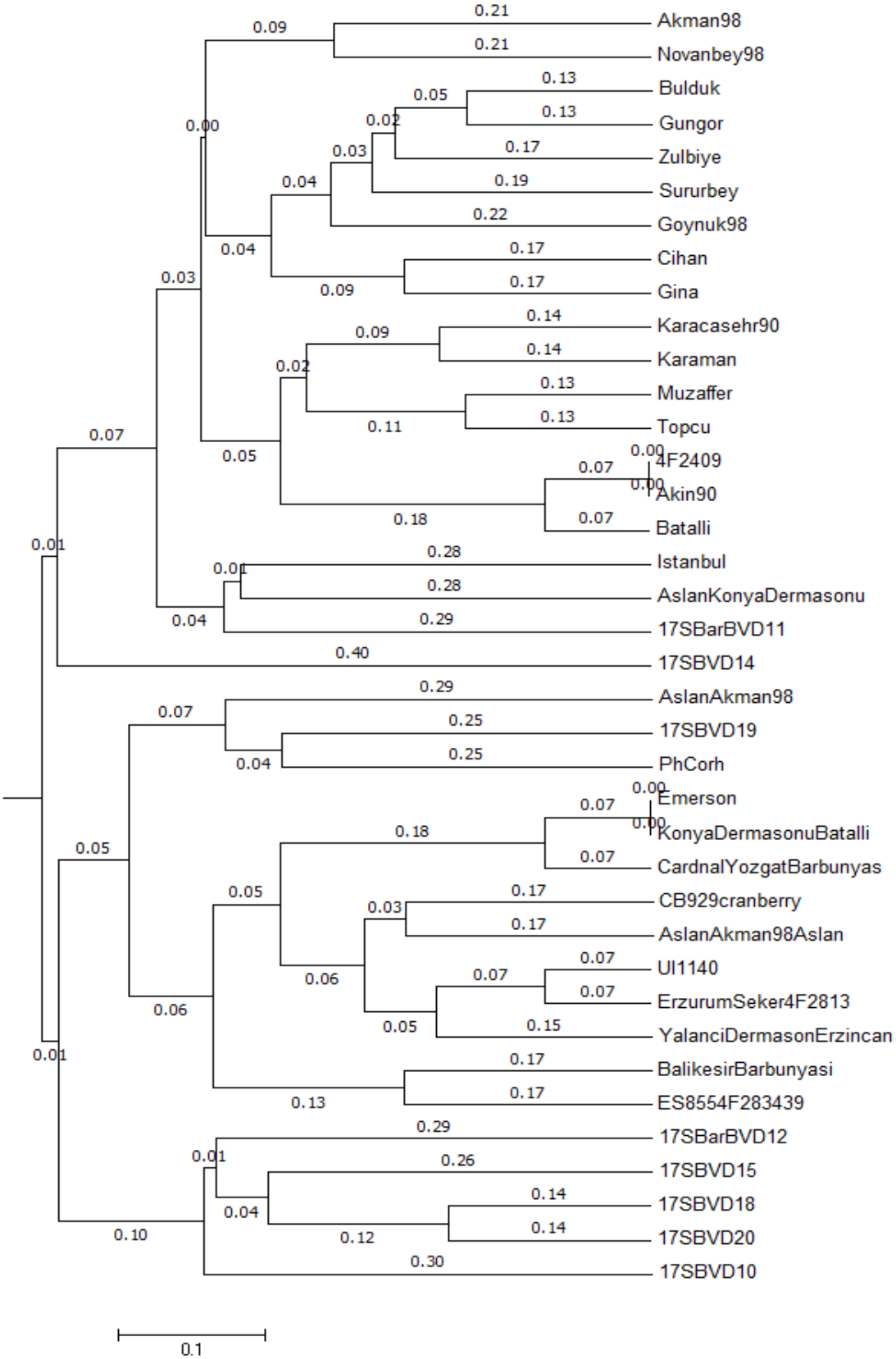
Şekil 3.54. ITS PCR ürünlerinin Eco*RI* Restriksiyon kesim enzimi ile kesim deneyi sonucunda oluşan bant profilleri. M: Markör



Şekil 3.55. ITS PCR ürünlerinin Alu*I* Restriksiyon kesim enzimi ile kesim deneyinin jel görüntüsü. M: Markör



Şekil 3.56: ITS PCR ürünlerinin Alu*I* Restriksiyon kesim enzimi ile kesim deneyi sonucunda oluşan bant profilleri. M: Markör



Şekil 3.57. ITS-PCR ürünlerinin çeşitli Restriksiyon enzim ile kesimi sonucunda elde edilen bant profilleri ile oluşturulan dendrogram.

4. TARTIŞMA-SONUÇ

Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) insan diyetinde en fazla tüketilen baklagillerdendir. 2014 yılındaki 30 milyon hektar hasadı 25 milyon ton küresel üretimi hesaplanmıştır. Bunun sonrasında tüketilen baklagillerden olan nohut ve bezelyenin neredeyse iki katıdır (FASOSTAT,2014). Geleneksel arazi koşullarına ev sahipliği yapan bitki gen kaynakları, biyolojik çeşitliliğin korunmasında genetik çalışmaların geliştirilmesinde ve bitki ıslahındaki ilerlemede önemli bir değere sahiptir. Ayrıca bu bitki kaynakları morfolojik kalite, agronomik özellikler ve genetik çeşitlilikleri etkili bir şekilde korunmaları ve ıslah için kullanılmaları ile karakterize edilmelidir (Susana ve ark., 2017).

Türkiye'de kuru fasulye üretiminde ekim alanlarının azalmasına bağlı olarak azalma hesaplanırken verim açısından incelendiğinde kaliteli ve sertifikalı tohumluk kullanımı ve üreticilerin bilinçlenmesi ile artış göstermiştir (Susana ve ark., 2017). Bu durumun gelecek yıllarda daha da artması gerekmektedir. Hem verimin hem ekim alanlarının artışının desteklenmesi bölgeye uyum sağlamış güçlü çeşitlilikte sertifikalı tohum tescili ile olacaktır. Ticari açıdan gerekli durumları gözeterek yeni çeşitlerin geliştirilmesi üreticilerin önemli taleplerindendir (Myers ve ark., 1999).

Klasik ıslah metotlarıyla çok uzun zaman ve emek gerektiren yeni çeşit geliştirilmesi durumu, moleküler teknikler yardımıyla çok daha hızlı ve güvenilir bir şekilde olacaktır. Klasik bitki ıslahında işlemler sadece gözlem ve seçim ile yürütülürken moleküler ıslah tekniğiyle birlikte bitkilere ait genetik yapının belirlenmesi özelliklerinin tespiti ile daha güvenilir ve bilinçli melezleme işlemleri yapılarak yeni çeşitlerin geliştirilmesi (Liu ve ark., 2014).

Çeşit geliştirilmesindeki önemli kriterlerden olan hastalık dayanımı, verim gibi arttırılması gibi etkenlerin arttırılabilmesi için birbirine yakın akraba bireylerin çaprazlanması işlemi ile istenilen sonucun elde edilmesi zorlaşacaktır (Gupta ve ark., 1994). Yani aynı gen havuzu içerisinde melezlemeler yeni çeşit elde edilmesinde istenmemektedir (Çevrim, 2007). Ancak bu çalışmanın verileri ile uzak akraba bitkilerin belirlenmiş olması sonucunda bu çeşitlerin çaprazlanması sonucunda çok daha iyi ve istenilen özelliklere sahip çeşit elde etme olasılığı artmış olacaktır (Marotti ve ark., 2006).

Bu çalışmada *Phaseolus vulgaris* L. türüne ait 37 genotip ve *Phaseolus coccineus* (yarı sarılıcı) türüne ait ateş ya da İspanyol fasulyesi olarak bilinen 1 genotip kullanılmıştır.

Her bir örnekten ayrı ayrı olmak üzere 38 adet bitki örneğinden DNA izolasyon yapılmıştır. Elde edilen genomik DNA miktar ve saflıkları spektrofotometre ile okunmuş ve agaroz jelde degredasyona uğramadıkları ve yeterli kalitede oldukları tespit edilmiştir. ISSR çalışmasında toplam 17 primer denenmiş bunlardan en iyi sonuç veren 11 primer ile çalışma tamamlanmıştır. ISSR primerlerinden 193 bant skorlanmış ve 190 tanesi polimorfik olarak belirlenmiştir. Toplam polimorfizm oranı %98,44 olarak hesaplanmıştır. RAPD çalışmasında toplam 15 primer denenmiş ve bunlardan en iyi sonuç veren 12 tanesi ile çalışma tamamlanmıştır. RAPD primerlerinden toplam 247 bant skorlanmış ve 240 tane polimorfik bant elde edilmiştir. Polimorfizm oranı %97,16 olarak hesaplanmıştır. Farklı yöntemlerle gerçekleştirilen filogenetik analiz çalışmasında, 38 numaralı örnek olarak tanımlanan *P. coccineus* türüne ait bir genotipin (Ph.Crorh) dış grup olarak dallanması beklenmektedir.

Çalışmada deneyi gerçekleştirilen ISSR-PCR ve RAPD-PCR ürün sonuçları ile ITS-PCR RE kesim sonuçlarını gösteren agaroz jel görüntülerinden Phoretix1DPro (Non-linear Dynamics, Total LAB, İngiltere) yazılım programı kullanılarak var (1) ya da yok (0) ikili matris bilgisi (binary data) elde edilmiştir. Elde edilen binary data, UPGMA yöntemi kullanılarak filogenetik ağaçlar oluşturulmuştur.

Filogenetik analizlerde mesafe temelli yöntemlerden olan kümelenme temelli algoritmalar en benzer dizi çiftlerinden başlayan bir mesafe matrisine dayanarak filogenetik ağacı hesap eder. Bu algoritmalar aritmetik ortalamayı kullanarak olmayan çift grup yöntemini (UPGMA) ve komşu birleştirme yöntemini içerir. Kümelenme temelli algoritmada taksonların kökten eşit uzaklıkta olduğu varsayılır. UPGMA metodunun avantajları; endirekt ölçümlü uzaklıklarda kullanılabilir, en hızlı metotlardan biri olması, çok geniş data setlerinin hızlı analiz edilebilmesi ve bazı orantı analizlerinde kullanılabilmesidir (Gepts, 2001). Bu nedenle çalışmadaki filogenetik analizler için mesafe temelli yöntemlerden UPGMA metodu kullanılmıştır.

ISSR-PCR yöntemiyle oluşturulan filogenetik ağaçta her fasulye genotipinin farklı dallanma topolojisine sahip olduğu, *P. coccineus* türüne ait genotipin dış grup

olarak net bir şekilde ayrıldığı görülmektedir. Bu durum yapılan PCR deneylerinden elde edilen bant verilerinin 38 genotipin ayrımı için yeterli olduğunu göstermektedir.

ISSR-PCR tekniği kullanılarak 12 ISSR primerinin PCR sonuçlarından elde edilen bant profilleri analiz edildiğinde oluşan filogenetik ağaç incelendiğinde; iki ana gruba ayrıldığı ve her bir ana grubun kendi içinde gruplar halinde dallanma gösterdiği tespit edilmiştir. Tane tipi horoz olan Cihan, Zülbiye, Noyanbey-98, Akın, Muzaffer, Göynük-98 isimli çeşitlerin ağaç üzerinde aynı grubun ortak al grubunda dallanma gösterdikleri görülmektedir. Aslan/Konya dermasonu ve Aslan-Akman-98 isimli ileri hatların Eskişehir tarımsal araştırma enstitüsünün verilerine göre yakın akraba olması beklenmektedir. ISSR-PCR verileri ile oluşturulan filogenetik ağaç incelendiğinde de bu durumu desteklediği gözlenmiştir. Öte yandan CB929 Cranbery ve 17-SBVD11 isimli fasulye genotiplerinin de, tarımsal araştırma enstitüsünün verilerine göre yakın akraba olarak düşünülmektedir. Ancak ağaç üzerindeki sonuç değerlendirildiğinde aynı ana grupta dallanmalarına rağmen, ana gruba bağlı farklı alt grupta dallanmaya sahip oldukları görülmüştür. ISSR-PCR yöntemiyle elde edilen filogenetik ağaç genel olarak incelendiğinde ve Eskişehir geçit kuşağı TAGEM verileriyle birlikte değerlendirildiğinde; gen havuzu genişletebilmek adına en iyi sonucun alınacağı bir melezleme çalışmasında, genetik olarak en uzak bireylerin arasında çaprazlamanın yapılması gerektiği düşünülürse, çalışmada kullanılan aynı türe ait 37 farklı fasulye genotipi arasında en iyi adayların Novanbey-98 ve UI1140 (mesafe verisi: 0.946) olabileceği öngörülmektedir (Ek-1). Çünkü Novanbey-98 genotipinin dane yapısı horoz ve bakteriyel hastalıklara orta toleranslı özelliklerine sahip iken, UI1140 genotipinin de dermason ve bakteritel hastalıklara dayanıklı özelliklerini taşıdığı ve farklı fenotipik karakterlere sahip birbirinden genotipik olarak daha uzak bireyler oldukları anlaşılmaktadır.

RAPD-PCR tekniği kullanılarak elde edilen bant profilleri sonucunda elde edilen filogenetik ağaç incelendiğinde; net bir şekilde ayrılan Ph.Corh dış grup genotipinin haricinde, ISSR-PCR yönteminden elde edilen ağaca benzer şekilde iki ana gruba ayrıldığı görülmektedir. Bu durum bize kullanılan primer sayısının ve elde edilen polimorfik bantların yeterli seviyede ayrım gücü olduğunu göstermiştir.

Öncelikle tane tipi horoz olan; Cihan, Zülbiye, noyanbey-98, Akın, muzaffer Göynük-98 genotiplerinin tamamının aynı ana gruba bağlı aynı alt gruplar içinde dallanma gösterdikleri tespit edilmiştir. Filogenetik ağaç verileri Eskişehir Geçit Kuşağı TAGEM verileri ile karşılaştırıldığında, beklenildiği gibi Aslan/Konya dermasonu ile Aslan/Akman98'in aynı alt grupta dallanma gösterdikleri, Aslan/Akman98-Aslan ve 17-SBVD19 genotiplerinin birbirine yakın daha küçük alt gruplarda dallanma gösterdikleri görülmüş ve bu iki verinin birbirini destekler nitelikte olduğu görülmüştür. RAPD-PCR tekniği kullanılarak elde edilen bant profilleri sonucunda elde edilen filogenetik ağaç genel olarak incelendiğinde; birbirine genetik olarak en uzak bitkilerin Cardinal Yozgat Barbunyası ve 17SBVD20 (mesafe verisi: 0.805) belirlenmiştir (Ek-2). Çünkü Cardinal Yozgat Barbunyası genotipinin dane yapısı barbunya ve bakteriyel hastalıklara orta toleranslı özelliklerine sahip iken, 17SBVD20 genotipinin de dermason ve bakteritel hastalıklara orta toleranslı özelliklerini taşıdığı ve farklı fenotipik karakterlere sahip birbirinden genotipik olarak daha uzak bireyler oldukları anlaşılmaktadır.

ITS-PCR ürünlerinin çeşitli restriksiyon enzimleri ile kesiminden elde edilen bant profilleri ile oluşturulan filogenetik ağaç incelendiğinde; *P. coccineus* türüne ait genotipin dış grup olarak ayrılmadığı ve *P. vulgariss* türüne ait diğer 37 genotip içinde karışık dallanma gösterdiği tespit edilmiştir. Ağaç topolojisi genel olarak incelendiğinde 38 genotip içinde bazı genotiplerin %100 benzerlik durumuna sahip olduğu görülmüştür. Bu durum bize restriksiyon enzimleriyle gerçekleştirilen deneylerin yeterli seviye olmadığını, daha fazla kesim enziminin ayrım için kullanılması ya da bu bölgelerin maliyeti daha fazla olan DNA dizileme yöntemi ile karşılaştırılması gerektiğini göstermiştir. ITS bölge analizinin ıslah çalışmalarındaki ebeveyn seçiminde çok kullanışlı bir yöntem olmadığını da göstermiştir.

Gelişen teknoloji ve artan imkânlar sayesinde moleküler teknikler kullanılarak daha az maliyet ve daha kısa sürelerde canlılar arasında genetik benzerlik ve farklılık analizleri gerçekleştirilebilmektedir. Islah çalışmalarında ebeveynlerin seçiminde moleküler tekniklerin daha yaygın kullanılması, ülkemiz tarım ve ekonomisinin daha iyi noktalara gelmesine önemli katkı sağlayacaktır. Günümüz dünyasında genetik akrabalık analizleri için farklı moleküler teknikler bulunmaktadır. Islah çalışmalarda daha iyi ve verimli sonuçlar elde etmek için, bu tekniklerin aynı anda birden fazlasının uygulanması ve verilerinin karşılaştırılarak kullanılmasının uygun olacağı öngörülmüştür.

Üniversiteler ve araştırma enstitülerinde gerçekleştirilecek benzer çalışmaların, ıslah çalışmaları yapan diğer enstitü, kurum veya özel kuruluşlarla birlikte işbirliği içinde yürütülmesi; elde edilen verilerin daha hızlı bir şekilde kullanılmasıyla ticari değeri olan daha fazla sayıda yeni ürünlerin elde edilmesini sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

Akhavan A, Bahar M, Askarian H, Reza Lak M, Nazemi A, Zamani Z (2013) ‘’Bean common bacterial blight: pathogen epiphytic life and effect of irrigation practices.’’ ***SpringerPlus,*** 2:41

Alkamade, R., M. van Oorschot, L. Miles, C. Nellemann, M. Bakkenes, B. Brink., 2009. GLOBIO3.‘’A framework to investigate options for reducing global terrestrialbiodiversityloss.Ecosystems.’’ ***Seed Testing International,*** 128: 8-10

Akashi Y, Fukuda N, Wako T, Masuda M, Kato K. 2002.’’ Genetic variation and phylogenetic relationships in East and South Asian melons, *Cucumis melo* L., based on the analysis of five isozymes.’’ ***Journal of Crop Protection***, Euphytica, 125: 385-396.

Akçin, A. 1998. Yemeklik Dane Baklagiller. Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, No: 8, 377 sayfa

Anonim, 2016. FAOSTAT. Statistic Database, http://faostat.fao.org, (12.08.2018).

Anonim 2013, Tarım Teknolojileri,Yemeklik Dane Baklagiller Yetiştiriciği (Fasulye ve Börülce), ***Tarım ve hayvancılık Bakanlığı***,Ankara, 2013.

Anlarsal AE. 2013. Yemeklik tane baklagiller ders notları. ***Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü***, http://www.gencziraat.com/Tarla-Bitkileri/FasulyeYetistiriciligi-5.html, [Erişim: 02.09.2014].

Angioi SA, Rau D, Attene G, Nanni L, Bellucci E, Logozzo G, Negri V, Spagnoletti Zeuli PL, Papa R. 2010. Beans in Europe: origin and structure of the European landraces of Phaseolus vulgaris L. Theor. Appl. Genet., 121: 829-843

Bilgin, O. ve Korkut, K. Z. 2005. Bazı Ekmeklik Buğday Çeşit ve Hatlarının Tane Verimi ve Bazı Fenolojik Özelliklerinin Belirlenmesi. Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi, 2(1), 5765.

Bark, O. H., and Havey, M.J., (1995). ‘’Similarities and relationship among population of the bulb onion as estimated by RFLPs.’’ ***Theor. Appl. Genetics*** 90:407-414.

Blair MW, Diaz JM, Hidalgo R, Diaz LM, Duque MC. 2007. ‘’Microsatellite characterization of andean races of common bean (*Phaseolus vulgaris L.*).’’ ***Theor. Appl. Genet***., 116: 2943.

Benchimol LL, Campos T, Carbonell SAM, Colombo CA, Chioratto AF, Formighieri EF, Gouvea LRL, Souza AP. 2007. ‘’Structure of genetic diversity among common bean (*Phaseolus vulgaris L.*) VARIETIES of Mesoamerican and Andean origins using new developed microsatellite markörs.’’ ***Genet. Resour. Crop Evol***., 54: 1747-1762.

Berglund-Briicher, O., and H. Briicher. 1976. ‘’ The South American wild bean (Phaseolus aborigineus Burk.) as ancestor of the common bean.’’ ***Econ. Bot.*** 30: 257-272.

KAYNAKLAR (Devam Ediyor)

Bitocchi, E.; Nanni, L.; Belluci, E.; Rossi, M.; Giardini, A.; Zeuli, P.S.; Logozzo, G.; Stougaard, J.; McClean, P.; Attene, G.; et al. ‘’Mesoamerican origin of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is revealed by sequence data.’’ ***Proc. Natl. Acad. Sci USA*** **2012**, *109*, 788–796

Bornet, B. & Branchard, M., (2001). ‘’Nonanchored inter-simple sequence repeat (ISSR) markörs: Reproducible and specific tools for genome fingerprinting.’’ ***Plant Mol Biol Reporter*** 19: 209–215.

Botstein, D., White, R., Skolnick, M. and Davis, R.W. (1980). ‘’Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragmenth length polymorphisms.***’’Am. J. Of Human Genetic***, 32; 314-331.

Ceylan A, Ocal N, Akbulut M. 2014. ‘’Genetic diversity among the Turkish common bean cultivars (*Phaseolus vulgaris* L.) as assessed by SRAP, POGP and cpSSR markörs.’’ ***Biochemical Systematics and Ecology***, 54: 219–229.

Chen J, Zhao JT, Erickson DL, Xia NH, Kress WJ (2015) ‘’Testing DNA barcodes in closely related species of Curcuma (Zingiberaceae) from Myanmar and China.’’ ***Molecular Ecology Resources***, 15, 337–348.

Cruz PE, Gepts P, Garcia-Marin PC, Villareal DZ. 2005. Spatial distribution of genetic diversity in wild populations of Phaseolus vulgaris L. Guanajuato and Michoacan, Mexico. Genetic Resources and Crop Evolution, 52: 589-599

Çevrim, M., 2007, ‘’Fasulye bitkisinde (Phaseolus vulgaris L.) partikül bombardımanı (biyolistik) yöntemiyle gen aktarımının optimizasyonu.’’ Erciyes Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi, ***Fen Bilimleri Enstitüsü***, Kayseri.

Ekincialp A, Şensoy S. 2018. ‘’Phenotypic and molecular determination of anthracnose disease resistance in Lake Van Basin’s bean genotypes (*Phaseolus vulgaris* L.).’’ ***Legume Research***, 41(1): 135-142.

Erdinç, Ö. TÜRKMEN, S. ŞENSOY 2013.‘’Türkiye'nin Bazı Fasulye Genotiplerinin Çeşitli Bitkisel Özelliklerinin Belirlenmesi’’ Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi, Cilt 23, Sayı 2, Sayfalar 112 – 125.

Erdinc C, Turkmen O, Dasgan HY, Sensoy S. 2017. ‘’Phenotypic and molecular genetic diversity among some Turkish bean genotypes.*’’* ***JAPS, Journal of Animal and Plant Sciences,*** 27(6): 1963-1973.

Evans, A.M. 1976. ‘’Beans. In N. W. Simmonds, ed, Evolution of Crop Plants.’’ p. 168-172. ***Longman***, London, England.

FAO(Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü) ‘’2014. Bitkisel üretim istatistikleri.’’ http://www.fao.org [Erişim: 22.09.2014]

Fazekas AJ, Kesanakurti PR, Burgess KS et al. (2009). ‘’Are plant species inherently harder to discriminate than animal species using DNA barcoding markörs?’’***Molecular Ecology Resources***, 9, 130–139.

KAYNAKLAR (Devam Ediyor)

Galvan MZ, Menendez-Sevillano MC, De Ron AM, Santalla M, Balatti PA. 2006. ''Genetic diversity among wild common beans from Northwestern Argentina based on morphoagronomic and RAPD data.'' ***Genetic Resources and Crop Evolution***, 53: 891-900.

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

Gentry, H.S. 1969. ''Origin of the common bean, Phaseolus vulgaris.'' ***Econ. Bot***. 23: 55-69.

Ghafoor, A, Ahmad, Z, Qureshi, A.S, Bashir, M. ''Genetic relationship in *Vigna mungo* (L.) Hepper and *V. radiata* (L.) R. Wilczek based on morphological traits and SDS-PAGE.'' ***Euphytica*****,** 123:367-378, (2000).

Gepts P (2008). '' Tropical Environments, Biodiversity, and the Origin of Crops. In: P Moore & R Ming (Eds.), *Genomics of Tropical Crop Plants*,'' ***Springer,*** pp. 1-20

Gupta, M., Chyi, Y.S., Romero-Severson, J. ve Owen, J.L., (1994). ''Amplification of DNA markörs from evAlutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats.'' ***Theor. Appl. Genetics***, 89: 998-1006.

Gülşen O, Mutlu N. 2005. Bitki biliminde kullanılan genetik markırlar ve kullanım alanları. Alatarım, 4 (2): 27-37.

Harlan, J.R. 1976. ''Agricultural origins: Centers and noncenters. ''Science 174: 468-474. 1976. Crops and Man. ***American Society of Agronomy***, Madison, WI.

Heiser, C.B. 1965. ''Cultivated plants and cultural diffusion in nuclear America.'' ***Amer. Anthropol***. 67: 930-949.

Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL (2003) ''Biological identifications through DNA barcodes.'' ***Proceedings of the Royal Society of London***. Series B: Biological Sciences, 270, 313–321

Hollingsworth PM (2011). ''Refining the DNA barcode for land plants.'' ***Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America***, 108, 19451–19452

Jose FC, Sudheer Mohammed MM, Thomas G, Varghese G, Selvaraj N, Dorai M. 2009. ''Genetic diversity and conservation of common bean (*Phaseolus vulgaris* L., Fabaceae) landraces in Nilgiris.'' ***Current Science***, 97 (2): 227-235.

Kaçar O, Çakmak F, Çöplü N, Azkan N. 2004. ''Bursa koşullarında bazı kuru fasulye çeşitlerinde (*Phaseolus vulgaris* L.) bakteri aşılama ve değişik azot dozlarının verim ve verim unsurları üzerine etkisinin belirlenmesi.'' ***Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi,*** 18 (1): 207-218.

KAYNAKLAR (Devam Ediyor)

Kaplan, L. 1967. ‘’Archaeology and domestication in American Phaseolus (beans). Econ. Bot. 19: 358-368. 1967. Archaeological Phaseolus from Tehuacan.’’ In D. E. Beyers, ed, The Prehistory of the TehuacStn Valley. Vol. 1, ***Environment and subsistence,*** p. 201-211. Univ. Texas Press, Austin, TX.

Kaplan, L., T. F. Lynch, and C. E. Smith. 1973. ‘’Early cultivated beans (Phaseolus vulgaris) from an intermontane Peruvian valley.’’ ***Science*** 179: 76-77.

Karaca M, Saha Ss, Zipf A, Jenkins JN & Lang DJ (2002). ‘’Genetic diversity among forage bermudagrass *(Cynodon spp.)*: Evidence from chloroplast and nuclear DNA fingerprinting.’’ ***Crop Science*** **42**: 2118- 2127.

Kesawat, M.S. ve B.K Das, 2009. ‘’Molecular Markörs: It's Application in Crop Improvement.’’ ***J. Crop Sci. Biotech***., 12 (4),169 -181.

Khaidizar I.,H. Haliloğlu., Elkoca E.2012.’’ Genetic diversity of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) landraces grown in northeast anatolia of turkey assessed with simple sequence repeat markörs’’ Turkish Journal of Field Crops 17(2):145-150

Kress WJ, Wurdack KJ, Zimmer EA, Weigt LA, Janzen DH (2005) ‘’Use of DNA barcodes to identify flowering plants.’’ ***Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America***, 102, 8369–8374.

Kumar, R. (1999) Research Methodology: A Step-by-Step Guide for Beginners. Sage Publications, London, Thousand Oaks, New Delhi.

Li, Y., Hoxha, V., Lama, C., Dinh, B.H., Vo, C.N., Dauwalder, B. (2011). The hector G-Protein Coupled Receptor Is Required in a Subset of fruitless Neurons for Male Courtship Behavior. PLoS ONE 6(11): e28269.

Liu JX, Shi LC, Han JP et al. (2014) ‘’Identification of species in the angiosperm family Apiaceae using DNA barcodes.’’ ***Molecular Ecology Resources***, 14, 1231–1238.

Marotti I, Bonetti A, Minelli M, Catizone P, Dinelli G. 2006. ‘’Characterization of some Italian common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) landraces by RAPD, semi-random and ISSR molecular markörs.’’ ***Genetic Resources and Crop Evolution***, 54 (1): 175-188.

Madakbas SY, Hız MC, Gültekin Y, Sayar MT. 2016.,‘’Genetic characterization of green bean (*Phaseolus vulgaris* L.) accessions from Turkey with SCAR and SSR markörs.’’ Biochem. Genet., 54: 495-505.

Myers, J. R., Baggett, J. R., 1999. ‘’Improvement of snap beans. pp: 289-330, In: S. P. Singh (ed.) Common Bean Improvement in the Twenty-First Century.’’ ***Kluwer Academic Publishers***, Dordrecht, The Netherlands.

KAYNAKLAR (Devam Ediyor)

Murray J, Larsen J, Michaels T E, Schaafsma A, Vallejos C E & Pauls K P (2002). ‘’Identification of putative genes in bean (*Phaseolus vulgaris*) genomic (Bng) RFLP clones and their conversion to STSs.’’ ***Genome 45*:** 1013-1024

Ortwin-Sauer, C. ‘’*The Early Spanish Man*; University of California Press: Berkeley/Los Angeles, CA, USA,’’ 1966; ***Kluwer Academic Publishers,*** pp. 51–298, ISBN 978-0521088480.

Onus AN. 1999. ‘’*Capsicum*'da bazı markör genler arasında linkage çalışmaları.’’ ***Türkiye III. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi***, 14-17 Eylül, Ankara, 474-477.

Reddy, P., Shetty, V.T., Dutt, D., York, A., Dar, S., Mundle, S.D., Allampallam, K., Alvi, S., Galili, N., Saberwal, G.S., Anthwal, S., Shaikh, M., Suleman, S., Kamal, S.Y. & Raza, A. (2002) Increased incidence of mitochondrial C oxidase gene mutations in patients with myelodysplastic syndromes. *British Journal of Haematology*, **116**, 564– 575

Rossi, M.; Bitocchi, E.; Bellucci, E.; Nanni, L.; Rau, D.; Attene, G.; Papa, R. ‘’Linkage disequilibrium and population structure in wild and domesticated populations of *Phaseolus vulgaris* L.***’’Evol. Appl.*** 2009, *2*, 504–522.

Sicard D, Nanni L, Porfiri O, Bulfon D, Papa R. 2005. Genetic diversity of Phaseolus vulgaris L. and P. coccineus L. Landraces in central Italy. Plant Breeding, 124: 464-472.

Singh, R. J., Chung, G. H., Nelson, R. L., 2007. ‘’Landmark research in Legumes.’’ ***Genome***, 50: 525-537.

Sözen, Ö., 2006. Artvin İli Yerel Fasulye (Phaseolus vulgaris L.) ‘’Populasyonlarının Toplanması, Tanımlanması ve Morfolojik Varyabilitesinin Belirlenmesi.’’ ***Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü***, Samsun. 469s.

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

Şehirali, S., M. Özgen, A. Karagöz, M. Sürek, S. Adak, İ. Güvenç, A. Tan, M. Burak, H. Ç. Kaymak, D. Kenar. 2005. ‘’Bitki genetik kaynaklarının korunma ve kullanımı.’’ TMMOB Ziraat Mühendisleri Odası VI. Teknik Kongresi. Cilt 1. Kozan Ofset, Ankara. s: 253-273.

Sözen, Ö. ‘’Artvin ili yerel fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) populasyonlarının toplanması, tanımlanması ve morfolojik varyabilitesinin belirlenmesi.’’ Yüksek lisans tezi, ***Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü,*** Samsun, sayfa 1, (2006).

Sicard D, Nanni L, Porfiri O, Bulfon D, Papa R. 2005. ‘’Genetic diversity of *Phaseolus vulgaris* L. and *P. coccineus* L. Landraces in central Italy.’’ ***Plant Breeding,*** 124: 464-472.

KAYNAKLAR (Devam Ediyor)

Yu. M. Sivolap, 2013. ‘’Molecular Markörs and Plant Breeding.’’ South Biotecnology Center, National Academy of Agricultural Sciences of Ukraine, Odessa, ISSN 00954527, ***Cytology and Genetics***, 2013, Vol. 47, No. 3, pp. 188–195. © Allerton Press, Inc., 2013.

Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S et al. (2012). ‘’Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode markör for Fungi.’’ ***Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America***, 109, 6241–6246.

Susana T. Leitão, Marco Dinis, Maria M. Veloso, Zlatko Šatović, and Maria C. Vaz Patto1. ‘’Establishing the Bases for Introducing the Unexplored Portuguese Common Bean Germplasm into the Breeding World.’’ ***Front Plant Sci.*** 2017; 8: 1296.Published online 2017 Jul 26. doi: 10.3389/fpls.2017.01296

Song J, Shi L, Li D et al. (2012) ‘’Extensive pyrosequencing reveals frequent intra-genomic variations of internal transcribed spacer regions of nuclear ribosomal DNA.’’ ***PLoS ONE***, 7, e43971.

TAO CHENG, CHAO XU, LI LEI, CHANGHAO LI, YU ZHANG, SHILIANG ZHOU, ‘’Barcoding the kingdom Plantae: new PCR primers for ITS regions of plants with improved universality and specificity’’. ***Molecular Ecology Resources*** (2016) 16, 138–149

TUİK, 2009. Bitkisel Üretim İstatistikleri, http://www.tuik.gov.tr, (10.12.2018).

Torres R I G, Villalobos R A, Gaitan-Solis E & Debouck D G (2004). Wild common bean in Central Valley of Costa Rica: ‘’Ecological distribution and molecular characterization.’’ ***Agronomía Mesoamericana*** **15**(2): 145-153

UBK. Ulusal Baklagil Konseyi, ‘’2010 Baklagil raporu’’ http://www.ubk.org.tr [Erişim: 22.12.2013]

Uysal, F., 2002. ‘’Kalite Fonksiyonunun Türkiye’de Baklagil Dis Satimina Etkileri.’’ ***Akdeniz Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü*** Yüksek Lisans Tezi, 114.

Veloso, W. Silva, L.R. Pinheiro, J.B. dos Santos, N.S. Fonseca Jr. and M.P. Euzebio.; et al. ‘’Genetic divergence of common bean cultivars is revealed by sequence data.’’ ***Genet. Mol. Res.*** 14 (3): 11281-11291 (2015).

Valentini A, Pompanon F, Taberlet P (2009) ‘’DNA barcoding for ecologists.’’ ***Trends in Ecology & Evolution***, 24, 110–117.

Wang, Mahalingan, G., R. & Knap, H.T., (1998). ‘’(C-A) and (GA) anchored simple sequence repeats (ASSRs) generated polymorphism in soybean,’’ Glycine max (L.) Merr. ***Theor Appl Genet*** 96: 1086–1096.

Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V., (1990). ‘’DNA Polimorphisms Amplified by Arbitrary Primers are Useful as Genetic Markörs.’’ ***Nucl. Acids Res***., 18, 6531-6535.

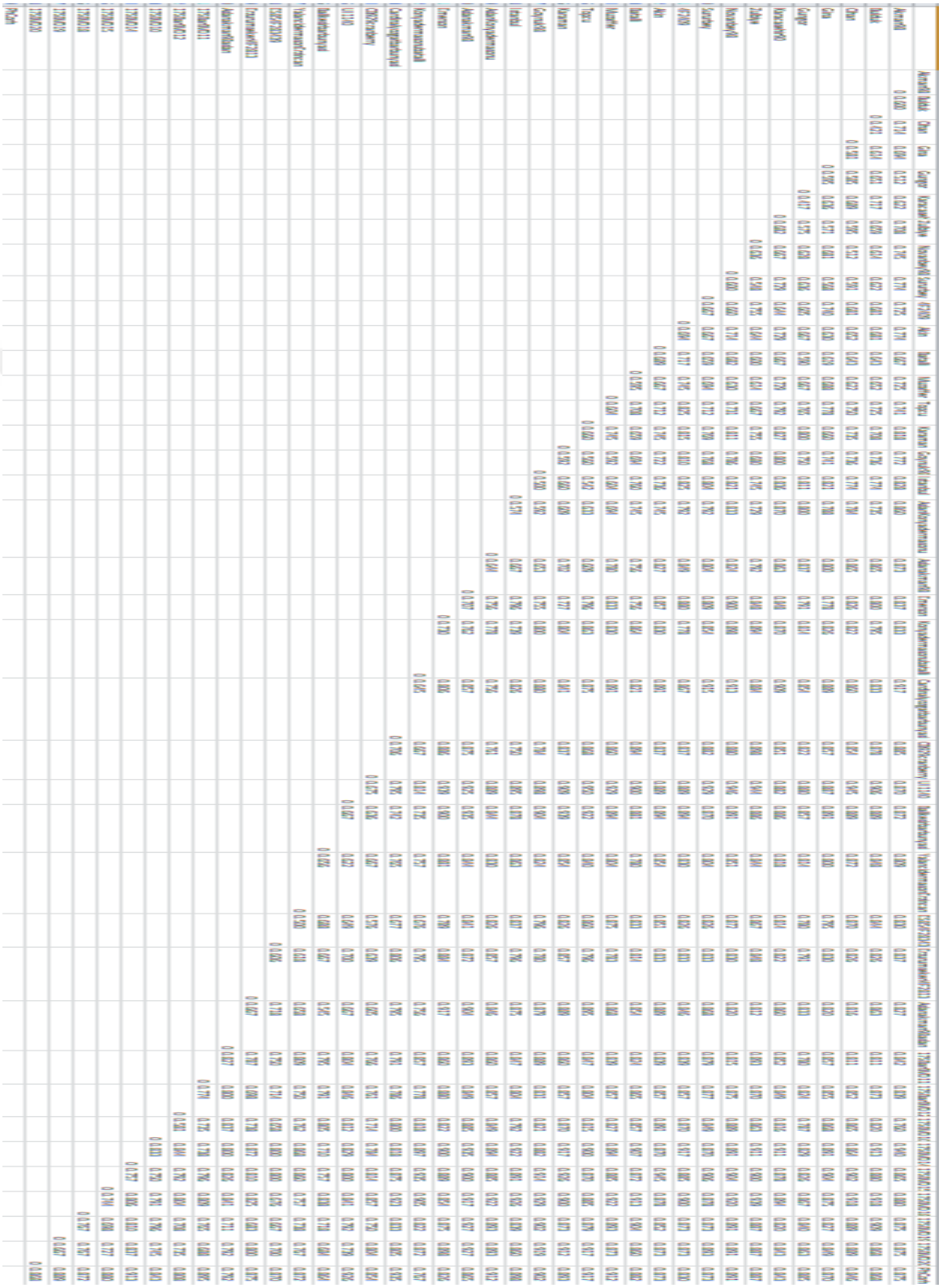
KAYNAKLAR (Devam Ediyor)

Xu SZ, Li DZ, Li JW et al. (2015) ‘’EvAluation of the DNA Barcodes in Dendrobium (Orchidaceae) from Mainland Asia.’’ ***PLoS ONE***, 10, e0115168.

Yuan QJ, Zhang B, Jiang D et al. (2015) ‘’Identification of species and materia medica within Angelica L. (Umbelliferae) based on phylogeny inferred from DNA barcodes.’’ ***Molecular Ecology Resources***, 15, 358– 371.

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

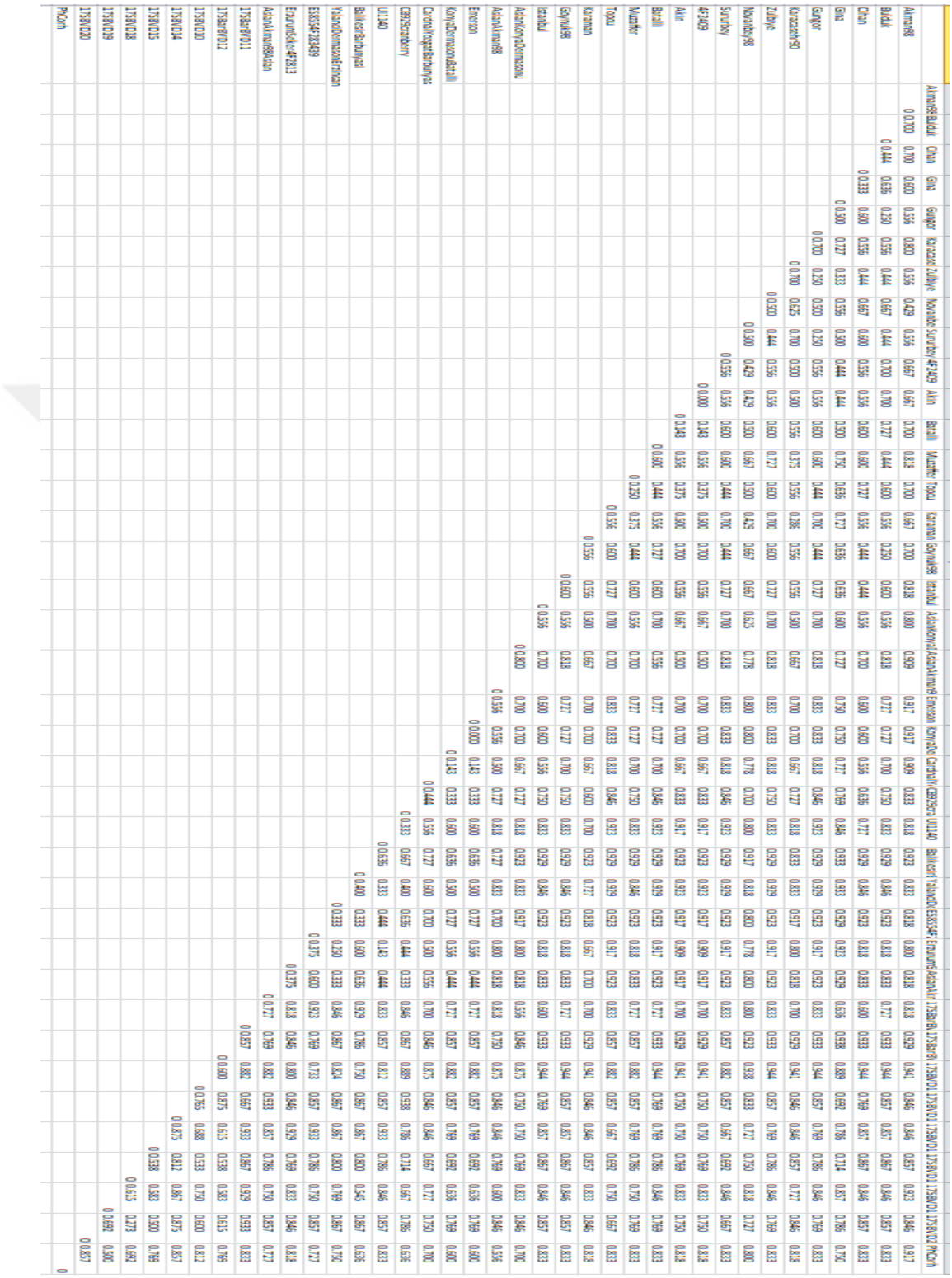
EK1: ISSR-PCR Deneyleri Sonucunda Elde Edilen 38 Fasulye Çeşit ve Hattının Jaccard Mesafe Matrix'i



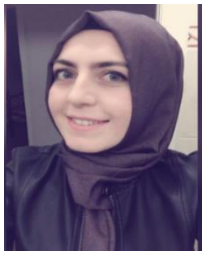
EK2: RAPD-PCR Deneyleri Sonucunda Elde Edilen 38 Fasulye Çeşit ve Hattının Jaccard Mesafe Matrix'i

	Akmın98 Bulduk	Chıtın	Gırnıa	Gurıgtor	Karıazan Zulbiye	Novatnbr Sururbey	4F2429	Akkın	Batıalli	Muatfkr	Toppu	Karanmn	Gıyrnuk	Istanbul	AslanKonya	Asla Aki	Emeryon	KonyaDorm	CardnalN	CBR2Sn	U11140	BalkesriY	tanınDorm	asar E	Etnarumß	Asla Aki	17SBnRk	17SBnRk	17SBrV01	17SBrV01	17SBrD01	17SBrD01	17SBrD01	17SBrD01	PkCnrh
Akmın98 Bulduk	0	0.380	0.338	0.578	0.429	0.462	0.561	0.593	0.633	0.519	0.607	0.519	0.580	0.557	0.566	0.620	0.626	0.595	0.589	0.684	0.691	0.714	0.650	0.675	0.592	0.627	0.659	0.678	0.800	0.753	0.733	0.769	0.775	0.753	0.717	0.764	0.827
Bulduk	0.449	0	0.392	0.512	0.560	0.392	0.446	0.504	0.543	0.407	0.543	0.385	0.526	0.571	0.506	0.444	0.494	0.593	0.750	0.679	0.671	0.671	0.662	0.650	0.647	0.663	0.711	0.682	0.787	0.728	0.750	0.716	0.804	0.794	0.747	0.793	0.794
Chıtın	0.368	0.540	0.535	0.410	0.442	0.551	0.618	0.463	0.536	0.342	0.571	0.547	0.447	0.440	0.607	0.629	0.690	0.651	0.705	0.627	0.651	0.622	0.621	0.612	0.619	0.636	0.670	0.741	0.702	0.710	0.717	0.750	0.755	0.722	0.766	0.781
Gırnıa	0.494	0.541	0.416	0.405	0.926	0.576	0.408	0.534	0.303	0.926	0.570	0.488	0.464	0.614	0.591	0.714	0.642	0.667	0.634	0.642	0.630	0.612	0.610	0.692	0.678	0.734	0.696	0.689	0.739	0.744	0.723	0.716	0.747	0.800
Gurıgtor	0.451	0.494	0.324	0.587	0.410	0.469	0.420	0.500	0.926	0.518	0.538	0.565	0.512	0.543	0.663	0.655	0.722	0.598	0.605	0.557	0.576	0.629	0.629	0.774	0.691	0.670	0.747	0.711	0.705	0.711	0.700	0.735
Karıazan Zulbiye	0.538	0.337	0.656	0.318	0.300	0.481	0.576	0.319	0.563	0.396	0.606	0.506	0.385	0.690	0.617	0.733	0.627	0.634	0.639	0.605	0.635	0.670	0.656	0.800	0.729	0.723	0.771	0.763	0.729	0.735	0.739	0.792
Novatnbr Sururbey	0.382	0.536	0.419	0.337	0.397	0.575	0.600	0.463	0.476	0.561	0.389	0.684	0.587	0.683	0.397	0.641	0.592	0.627	0.642	0.595	0.595	0.627	0.678	0.678	0.734	0.681	0.703	0.725	0.716	0.710	0.702	0.733	0.788
4F2429	0.600	0.333	0.680	0.460	0.618	0.680	0.594	0.527	0.634	0.653	0.772	0.722	0.685	0.700	0.693	0.682	0.705	0.720	0.747	0.735	0.793	0.711	0.738	0.765	0.784	0.775	0.743	0.760	0.820
Akkın	0.537	0.378	0.578	0.461	0.512	0.502	0.529	0.408	0.488	0.662	0.702	0.739	0.538	0.527	0.553	0.573	0.605	0.659	0.595	0.778	0.747	0.700	0.722	0.727	0.707	0.685	0.716	0.786
Batıalli	0.500	0.400	0.319	0.512	0.464	0.494	0.576	0.602	0.695	0.584	0.663	0.613	0.584	0.571	0.556	0.570	0.644	0.595	0.762	0.692	0.665	0.763	0.727	0.707	0.656	0.744	0.762
Muatfkr	0.494	0.419	0.373	0.500	0.494	0.408	0.452	0.554	0.654	0.724	0.520	0.547	0.533	0.537	0.551	0.595	0.578	0.762	0.734	0.665	0.708	0.667	0.707	0.685	0.716	0.750
Toppu	0.512	0.523	0.388	0.278	0.551	0.606	0.722	0.670	0.648	0.648	0.655	0.628	0.626	0.640	0.674	0.674	0.756	0.717	0.711	0.674	0.698	0.702	0.711	0.659	0.706	0.804
Karanmn	0.549	0.518	0.312	0.405	0.540	0.667	0.658	0.714	0.541	0.507	0.554	0.593	0.608	0.631	0.562	0.765	0.711	0.674	0.698	0.702	0.711	0.659	0.706	0.804
Gıyrnuk98	0.494	0.339	0.463	0.549	0.584	0.663	0.730	0.532	0.538	0.486	0.474	0.526	0.605	0.554	0.722	0.713	0.707	0.728	0.680	0.685	0.633	0.722	0.755
Istanbul	0.425	0.523	0.396	0.651	0.628	0.667	0.621	0.612	0.600	0.613	0.626	0.629	0.604	0.649	0.739	0.707	0.714	0.772	0.726	0.720	0.725	0.733	0.739
AslanKonyaDormazonu	0.482	0.392	0.708	0.655	0.648	0.616	0.607	0.612	0.626	0.656	0.660	0.645	0.741	0.691	0.698	0.745	0.763	0.730	0.710	0.740	0.780
AslanAkiMan98	0.511	0.633	0.675	0.742	0.526	0.571	0.595	0.595	0.593	0.678	0.583	0.760	0.788	0.758	0.739	0.730	0.737	0.742	0.719	0.833
Emeryan	0.519	0.653	0.670	0.542	0.616	0.571	0.540	0.570	0.593	0.624	0.733	0.750	0.691	0.724	0.716	0.684	0.663	0.745	0.750
KonyaDormazonuBatıalli	0.485	0.727	0.580	0.648	0.653	0.575	0.611	0.636	0.704	0.656	0.782	0.732	0.786	0.644	0.707	0.759	0.718	0.756
CardnalToggatiBahçeliyaka	0.531	0.580	0.500	0.548	0.563	0.493	0.554	0.687	0.615	0.623	0.776	0.722	0.683	0.690	0.771	0.705
CBR2Sincibeyry	0.640	0.611	0.635	0.633	0.613	0.603	0.654	0.714	0.690	0.683	0.638	0.645	0.659	0.564	0.716	0.779
U11140	0.413	0.317	0.412	0.375	0.486	0.465	0.676	0.690	0.683	0.638	0.700	0.705	0.699	0.590	0.709	0.761
BalkesriBahçeliyaka	0.453	0.486	0.431	0.534	0.471	0.667	0.699	0.638	0.700	0.705	0.699	0.590	0.709	0.761
YalınovDormazonEtrangan	0.302	0.311	0.388	0.435	0.691	0.620	0.646	0.688	0.638	0.603	0.339	0.679	0.750
ESSESAF2E2439	0.308	0.407	0.467	0.720	0.697	0.674	0.742	0.654	0.619	0.561	0.659	0.742
EtnarumSshrAF2813	0.438	0.438	0.704	0.682	0.690	0.699	0.671	0.667	0.610	0.723	0.771
AslanAkiman98Adıyan	0.513	0.707	0.573	0.580	0.686	0.706	0.670	0.600	0.767	0.705
17SBnRV011	0.740	0.728	0.678	0.701	0.706	0.685	0.549	0.739	0.770
17SBnRV012	0.739	0.667	0.763	0.681	0.693	0.734	0.737	0.762
17SBnRV010	0.332	0.674	0.694	0.659	0.605	0.726	0.667
17SBnRV014	0.698	0.687	0.711	0.674	0.764	0.716
17SBnRV015	0.662	0.690	0.635	0.744	0.776
17SBnRV018	0.479	0.671	0.542	0.700
17SBnRV019	0.519	0.600	0.747
17SBnRV020	0.659	0.714
PkCnrh	0.717	0

EK3: ITS-PCR Deneyleri Sonucunda Elde Edilen 38 Fasulye Çeşit ve Hattının Jaccard Mesafe Matrix'i



ÖZ GEÇMİŞ



KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı **:** Berru Şahin Hündürel

Doğum Yeri ve Tarihi **:** Karabük / 04.01.1993

Medeni Durum **:** Evli

Ev Adresi **:** Çırçır mah. saray sk. Eyüp/İst.

Mail **:** berrushn@gmail.com

EĞİTİM

- LİSANS: Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü
- Yüksek Lisans: Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi-Anadolu Üniversitesi Ortak Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü

İŞ VE STAJ TECRÜBESİ

İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim dalında gönüllü staj, 2013 İstanbul

İYTE Frary ve Doğanlar Bitki Biyoteknolojisi laboratuvarı zorunlu yaz stajı, 2015

DİKMEN TARIM ÜRÜNLERİ LTD. ŞTİ. MOLEKÜLER ARGE LABORATUVARI SORUMLUSU- 01.10.2017-30.11.2018

KURS VE SERTİFİKAR

GLP (İyi Laboratuar Uygulamaları)

ISO/IEC 17025: 2005 (Deney ve Kalibrasyon Laboratuarların Yeterliliği)

Mersin ALATA Bahçe Kültürleri Tarımsal Biyoteknoloji Eğitimi

YABANCI DİL VE DÜZEYİ

İNGİLİZCE (UPPER) Okuma(iyi) Yazma(iyi) Konuşma(iyi)

AKADEMEİK ÇALIŞMALAR

İsmail POYRAZ, Berru ŞAHİN, Evren ATMACA Detection of Ten Resistance Genes Against *P. syringae* pv. *phaseolicola* and *X. axonopodis* pv. *phaseoli* in Twelve Local Bean VARIETIES Using SCAR Markörs, Iğdır Üni. Fen Bilimleri Enst. Der. / *Iğdır Univ. J. Inst. Sci. & Tech.* 7(2): 241-248, 2017

e-mail: ismail.poyraz@bilecik.edu.tr

Tarih: 09.09.2019