



**T.C.**  
**Uludağ Üniversitesi**  
**Fen Bilimleri Enstitüsü**

**SNP MOLEKÜLER İŞARETLERİNE DAYALI HAVUÇ  
GENETİK HARİTASININ GELİŞTİRİLMESİ**

**Ozan SARCAN**

**Yüksek Lisans Tezi**



**SNP MOLEKÜLER İŞARETLERİNE DAYALI HAVUÇ  
GENETİK HARİTASININ GELİŞTİRİLMESİ**

**Ozan SARCAN**



T.C.  
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SNP MOLEKÜLER İŞARETLERİNE DAYALI HAVUÇ GENETİK  
HARİTASININ GELİŞTİRİLMESİ**

**Ozan SARCAN**

Prof. Dr. Ahmet İPEK  
(Danışman)

YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

BURSA - 2018

## TEZ ONAYI

Ozan SARCAN tarafından hazırlanan ‘‘SNP Moleküler İşaretlerine Dayalı Havuç Genetik Haritasının Geliştirilmesi’’ adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Bursa Uludağ Üniversitesi Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

**Danışman** : Prof. Dr. Ahmet İPEK

**Başkan** : Prof. Dr. Ahmet İPEK  
Bursa Uludağ Üniversitesi  
Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

**Üye** : Doç. Dr. Nuray AKBUDAK  
Bursa Uludağ Üniversitesi  
Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

**Üye** : Dr. Öğr. Üyesi Sergül ERGİN  
Eskişehir Osmangazi Üniversitesi  
Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

  
imza

  
imza

  
imza

Yukarıdaki sonucu onaylarım



**Prof. Dr. Ali BAYRAM**

Enstitü Müdürü

18.../9/2018

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

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

**beyan ederim.**

.../.../2018

İmza

**Ozan SARCAN**

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### SNP MOLEKÜLER İŞARETLERİNE DAYALI HAVUÇ GENETİK HARİTASININ GELİŞTİRİLMESİ

**Ozan SARCAN**

Bursa Uludağ Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

**Danışman:** Prof. Dr. Ahmet İPEK

Bu araştırmada, havuç bitkisinin Yeni Nesil Sekanslama ile DNA dizilemesi sonrası SNP moleküler işaretleyicilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Araştırmada, 2 havuç ıslah hattının melezi sonucu oluşan F1 bitkisinin kendilenmesiyle 94 adet F2 bitkisi kullanılmıştır. Wisconsin Üniversitesi Biyoteknoloji Laboratuvarı'nda Illumina HiSeq 2000 sisteminde GBS yöntemi ile *ApeKI* enzimi kullanılarak üretilen her bir F2 bitkisine ait DNA parçaları STACKS bilgisayar yazılımı ile analiz edilmiştir. Analiz sonucunda oluşan genotipler Joinmap 4.0 programına aktararak Genetik Bağlantı Haritası oluşturulmuştur. 13 adet Bağlantı Grubu (LG) oluşturulmuş, sayıları 54 ve 215 arasında değişen toplam 1 464 adet SNP moleküler işaretleyicisi harita üzerine yerleştirilmiştir. Bağlantı gruplarının toplam uzunluğu 793,4 cM olarak belirlenmiştir. Haritanın bütünü ele alındığında moleküler işaretleyiciler arası maksimum mesafe 9,5 cM, her bir moleküler işaretleyici arasındaki ortalama mesafe 0,54 cM olarak belirlenmiştir. Havuç genomunda GBS yöntemi ile SNP keşfi açısından dünyada yapılan ikinci araştırma bu tez çalışması olmuştur. Yapılan bu harita ile önemli ekonomik karakterlerin belirlenmesi amacıyla yapılacak QTL çalışmalarına katkıda bulunulacaktır.

**Anahtar Kelimeler :** Havuç, Yeni Nesil DNA Dizileme, GBS, SNP, Genetik Bağlantı, Genetik Haritalama

**2018, vii + 48 sayfa**

## ABSTRACT

MSc Thesis

### DEVELOPMENT of CARROT GENETIC MAP BASED on SNP MOLECULAR MARKERS

**Ozan SARCAN**

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

**Supervisor:** Prof. Dr. Ahmet İPEK

In the present research, we aimed SNP discovery via Next Generation DNA Sequencing Technology. In the study, 94 plants belonging to F2 were used because of the hybridization of the F1 plant, which is a cross-breeding line of the 2 carrot breeding lines. In the Illumina HiSeq 2000 system in the University of Wisconsin Biotechnology Laboratory, DNA fragments of each F2 plant produced by the GBS method using *ApeKI* enzyme were analyzed by STACKS computer software. The genotypes that result from the analysis were transferred to the Joinmap 4.0 program and Genetic Linkage Map was created. 13 Link Groups (LG) were created and a total of 1 464 SNP molecular markers ranging from 54 to 215 were placed on the map. The total length of the linking groups was determined as 793.4 cM. When the whole of the map is considered, the maximum distance between the molecular markers is 9.5 cM, and the average distance between each molecular marker is 0.54 cM. The second research on the carrot genome in the world for the discovery of SNP by the GBS method has been the work of this thesis. This map will contribute to QTL studies to determine important economic characteristics.

**Keywords :** Carrot, Next Generation DNA Sequencing, GBS, SNP, Genetic Linkage, Genetic Mapping

**2018, vii + 48 pages**

## TEŞEKKÜR

Bu tez çalıőmasının her aőamasında bilgi ve tecrubesinden yararlandığım, her konuda yardım ve desteğini esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ahmet İPEK'e teőekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Meryem İPEK hocama teőekkürlerimi sunarım.

Yaőamım boyunca bana her türlü destekte bulunan ve her zaman iyi yerlere gelmem için emek veren annem Zemzem SARCAN'a, babam őaban SARCAN'a ve kardeőim Dilek SARCAN'a çok teşekkür ederim.

1130228 numaralı proje kapsamında Tübitak Araştırma Projesi Bursu ile beni destekleyen TUBİTAK-TOVAG'a teşekkür ederim.

**Ozan SARCAN**

**.../.../2018**



## İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	ii
TEŞEKKÜR .....	iii
İÇİNDEKİLER .....	iv
SİMGE ve KISALTMALAR .....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	vii
1. GİRİŞ .....	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI .....	15
2.1. Genotyping by Sequencing Yöntemi ile Yeni Nesil Dizileme .....	15
2.2. Stacks Bilgisayar Yazılımı ile SNP tespiti .....	18
2.3. Genetik Bağlantı Haritası Oluşturma Çalışmaları .....	20
3. MATERYAL ve YÖNTEM .....	23
3.1. Materyal .....	23
3.1.1. 918-122 popülasyonunun yapısı .....	23
3.2. Yöntem .....	23
3.2.1. Yaprak örneklerinin alınması .....	23
3.2.2. DNA örneklerinin elde edilmesi .....	24
3.2.3. GBS yöntemi ile nükleotid dizilerinin belirlenmesi .....	25
3.2.4. SNP moleküler işaretleyicilerinin belirlenmesi .....	25
3.2.5. Genetik bağlantı haritasının oluşturulması .....	26
4. BULGULAR .....	27
5. TARTIŞMA ve SONUÇ .....	36
KAYNAKLAR .....	40
ÖZGEÇMİŞ .....	48

## SİMGE ve KISALTMALAR

### Simgeler

°C	Santigratderece
µl	Mikrolitre
β	Beta

### Açıklama

### Kısaltmalar

bç	Baz çifti
cM	centi-Morgans
CMS	Sitoplazmik erkek kısırlığı
DArT	Diversity Arrays Technology
DH	Dihaploid Hat
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DNaz	Deoksiribonükleaz
FAO	Food and Agriculture Organization of United Nation
g	Merkez kaç kuvveti
GBS	Genotyping by Sequencing
LG	Linkage Group
LOD	Logarithm of odds
MAS	Marker assisted selection
Mbp	Megabazçifti
mg	Miligram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
ng	Nanogram
NGS	Next Generation Sequencing
PCR	Polymerase Chain Reaction
pg	Pikogram
QAL	Queen Anne's Lace
QTL	Quantitative Trait Locus
RAD	Restriction-site associated DNA sequencing
RF	Rekombinasyon Frekansı
RNA	Ribonükleik Asit
RNaz	Ribonükleaz
RRL	Reduced Representation Libraries
SBS	Sequencing by synthesis
SNP	Single Nucleotid Polymorphism
SSR	Simple sequence repeat
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
Şekil 2.1. Stacks analiz programının basamakları .....	19
Şekil 4.1. Havuç bitkisinde SNP moleküler işaretleyicilerine dayalı 793,4 cM uzunluğundaki 13 Bağlantı Grubu (LG) .....	29



## ÇİZELGELER DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
Çizelge 1.1. Dünyadaki havuç üretim miktarı .....	3
Çizelge 1.2. Türkiye'deki havuç üretim miktarı .....	3
Çizelge 1.3. 2012-2017 yılları arasındaki havuç tohumluğu ithalat ve ihracat değerleri (TÜİK) .....	5
Çizelge 4.1. Havuç bitkisinin Bağlantı Grupları (LG) üzerindeki SNP moleküler işaretleyicileri .....	28
Çizelge 5.1. Havuç genomunda yapılmış GBS temelli genetik bağlantı haritası çalışmaları .....	37
Çizelge 5.2. Havuç genomunda yapılmış GBS temelli genetik bağlantı haritası çalışmalarında moleküler işaretleyicilerin harita üzerine yerleştirilme sayıları .....	39

## 1. GİRİŞ

Havuç (*Daucus carota L.*) iki yıllık otsu bir bitki türü olup, Apiaceae familyasında yer almaktadır. Havuç bitkisinin anavatanının Orta Asya olduğu ve Afganistan'ı da içine aldığı bildirilmiştir (Safadi 2008, Lucier ve Lin 2007). Tohumla üretilen ve açık tozlanan havuç bitkisi birinci yılda, çevre şartları ve genotip özelliklerine bağlı olarak 60-150 gün içerisinde vejetatif organlarını oluştururken, ikinci yılda ise generatif organlarını oluşturur (Günay 2005).

Serin iklim sebzesi olan havuç bitkisi, özellikle çimlenme ve sonrasındaki erken dönemde soğuklara karşı toleransının yüksek olması sebebiyle serin bölgelerimizde ilkbahar aylarında, ılıman bölgelerimizde ise kış aylarında rahatça yetiştirilebilmektedir (Kiracı ve Padem 2015). Dünyada her mevsim tüketilen havuç, ülkemizde genelde kışlık olarak tüketilmektedir. Kökleri cılız olan yabani havuçların ıslahı sonucu, bugünkü kültür havuç çeşitleri geliştirilmiştir. Kültüre alınan ilk havuçlar mor renge sahipken, ilerleyen zamanlarda sarı ve beyaz renkli havuçların üretimleri de yaygınlaşmıştır. Dünyada üretilen havuçların çoğu turuncu renkli olup, Hindistan'da kırmızı renkli havuçlar da üretilmektedir (Anonim 2009).

100 g taze havuçta; 1,1 g Protein, 9,7 g karbonhidrat, 0,2 g yağ, 30-42 Kcal enerji, 0 kolesterol, 1 g lif, 36 mg fosfor, 37 mg Ca, 0,7 mg Fe, 47 mg Na, 341 mg K, 23 mg Mg, 8.115-11.000 IU A vitamini, 0,06 mg B1 vitamini, 0,05 mg B2 vitamini, 0,6 mg B3 ve 0,6 mg E vitamini bulunduğu bildirilmektedir (Şalk ve ark. 2008, Sermenli 2012, Anonymous 2015).

A vitamininin ön maddesi olan  $\beta$ -karotenin en önemli kaynaklarından biri olan havuç, karotenin ilk izole edildiği sebzedir. Karotenoid içeriği yüksek olan havucun bazı kanser türlerine, kalp-damar hastalıklarına, katarakt ve görme bozukluğu gibi hastalıklara yakalanma olasılığını azalttığı ve bağışıklık sistemini güçlendirdiği bilinmektedir (Vaishnava ve Hooper 2011, Abdel-Aal ve ark. 2013, Shebaby ve ark. 2013). Yüksek karotenoid içeriğine sahip olan havuç, sağlıklı bir diyet için iyi bir A vitamini ve antioksidan kaynağıdır (Guerra-Vargas ve ark. 2001). Günlük olarak A-vitamini alınması yerine, A-vitamini ihtiyacının havuç tüketilerek  $\beta$ -karotenden sağlanması daha

yararlı olacaktır. Havuç üretiminin dolayısıyla daha fazla havucun tüketilmesinin teşvik edilmesi, sağlıklı ve ideal bir beslenme için önem arz etmektedir.

Dünyada yetiştirilen havuçlar genellikle  $\beta$ -karoten içeren turuncu renkli havuçlar olmasına rağmen antosiyanin içeren mor havuçlar, likopen içeren kırmızı havuçlar, lutein içeren sarı havuçlar ve pigment içermeyen beyaz havuçlar da bulunmaktadır (Makevi 1951). Ülkemizde 10-20 cm uzunluğunda uçları küt, silindirik yapıya sahip dünyada “nantes” olarak bilinen turuncu havuçlar yetiştirilmektedir. Adana ve çevresindeki illerde ise mor renkli havuçlar şalgam suyu yapımı için üretilmektedir. Ayrıca, son yıllarda Konya'nın Ereğli ilçesi ve çevresinde mor renkli havuçlar antosiyanin ekstraksiyonu için üretilmektedir. Çeşit, olgunluk, yetiştirme koşulları ve mevsim gibi faktörler havuçlarda karotenoid içeriğinin etkilenmesine neden olabilmektedir (Hart ve Scott 1995).

Bugüne kadar *Daucus carota*'nın 13 alt türü tespit edilmiş, kültür havucunun da bu alt türlerden biri olduğu kabul edilmiştir. Kültür havuçları, Asya ve Avrupa olarak iki gruba ayrılmıştır. Asya grubu havuçların erken çiçeklenme eğilimleri fazla olup, kök renkleri kırmızımtırak, mor ve sarı renge sahiptir (Simon ve Goldman 2006, Simon ve ark. 2008). Avrupa grubu havuçlar ise düşük sıcaklığa maruz bırakılmadıkları takdirde çiçeklenmeye daha az eğilim göstermekte olup, kök renkleri beyaz, kırmızı, sarı ve turuncu renge sahiptir (Rubatzky ve ark. 1999).

Havuç dünyada geniş alanlarda üretilen bir sebzedir. Birleşmiş Milletlerin alt kuruluşu olan Gıda ve Tarım Örgütü'nün (FAO / Food and Agriculture Organization) 2016 yılı istatistiklerine göre dünyada 1 168 729 hektar alanda 42 711 830 ton havuç üretimi yapılmaktadır. Dünyadaki en önemli ilk 10 üretici ülke ise sırasıyla Çin, Özbekistan, Rusya, Amerika Birleşik Devletleri, Ukrayna, Polonya, Birleşik Krallık, Almanya, Fransa ve Japonya'dır (Anonim 2016a). Türkiye ise 12. sırada yer almaktadır.

**Çizelge 1.1.** Dünyadaki havuç üretim miktarı (Anonim 2016a)

<b>Yıllar</b>	<b>Ekilen Alan (hektar)</b>	<b>Üretim (ton)</b>
<b>2007</b>	1 147 781	30 512 522
<b>2008</b>	1 154 506	33 879 552
<b>2009</b>	1 148 261	34 549 014
<b>2010</b>	1 168 725	34 956 864
<b>2011</b>	1 204 414	36 565 572
<b>2012</b>	1 192 622	37 291 861
<b>2013</b>	1 141 554	38 033 338
<b>2014</b>	1 125 674	38 699 332
<b>2015</b>	1 170 160	41 173 211
<b>2016</b>	1 168 729	42 711 830

Havuç çoğu ülkede olduğu gibi Türkiye’de de severek tüketilen ve sağlığa faydaları bilinen bir sebzedir. Türkiye İstatistik Kurumu’nun 2016 yılı istatistik verilerine göre ülkemizde havuç üretimi 101 080 dekarlık alanda yapılmış ve bu üretim faaliyetinden 554 736 ton havuç üretilmiştir. Bu havuç üretimi yoğun olarak Konya (336 463 ton) ve Ankara (124 910 ton) illerinde yapılmaktadır. 59 836 tonluk havuç üretimiyle Hatay ilimizde önemli bir havuç üreticisi il olmuştur (Anonim 2016b). Üretilen bu havuç, iç pazarda genellikle taze olarak tüketilmekte veya yemeklerde kullanılmaktadır. Ayrıca, havuç suyu üretiminde, konservelede, tatlı yapımında da kullanılmaktadır.

**Çizelge 1.2.** Türkiye’deki havuç üretim miktarı (Anonim 2016b)

<b>Yıllar</b>	<b>Ekilen Alan (dekar)</b>	<b>Üretim (ton)</b>
<b>2007</b>	143 367	641 953
<b>2008</b>	129 171	591 538
<b>2009</b>	123 403	593 628
<b>2010</b>	111 876	533 253
<b>2011</b>	122 458	602 078
<b>2012</b>	141 695	714 280
<b>2013</b>	108 643	569 855
<b>2014</b>	104 404	557 977
<b>2015</b>	101 003	534 988
<b>2016</b>	101 080	554 736

Erken çiçeklenme eğilimi (sapa kalkma), havuç ıslahçılarına göre seleksiyonda dikkat edilmesi gereken en önemli özelliktir ve düşük sıcaklıklara bir tepki olarak ortaya çıkmaktadır (Peterson ve Simon 1986). Erken çiçeklenme, köklerin lifli ve değerlendirilemez olmasına yol açması nedeniyle istenmeyen bir durumdur (Rubatzky

ve ark. 1999). Popülasyonda vernalizasyon uygulaması sonrası seleksiyon yapılarak, erken çiçeklenme göstermeyen çeşit ıslahı yapılabilmektedir. Havuç bitkisinin çiçeklenmeye geçebilmesi için, köklerinin vernalize olması gerekmektedir. Vernalizasyonu tamamlanmış kökler yaklaşık olarak üç ay sonra tohum vermektedir (Peterson ve Simon 1986).

Havucun çiçek yapısı bağlı olduğu Apiaceae familyasına uygun bir şekilde, küçük şemsiyelerin dizilerek büyük bir şemsiye şeklini almasıyla oluşmaktadır. Çiçekler 5 çanak yaprak, 5 taç yaprak, 5 erkek organ ve tek parçalı 1 dişli organdan oluşmaktadır. Toplu çiçekler çoğunlukla bir kaç erkek çiçekli andromonoik yapıdadırlar. Havuç bitkisinin yüksek oranda yabancı tozlanması, erkek organların erken olgunlaşmasından (protandri) kaynaklanır ve kendileme oranı yaklaşık %15 civarındadır (Thompson 1962). Havuçta kendileme depresyonu görülmektedir. Kendileme yapıldığı takdirde, kök ağırlığı ve tohum verimini de içine alan bazı karakterlerde %24'den %73'e varan şiddetli bir kendileme etkisi meydana gelmektedir. Havuçların "Queen Anne's Lace" olarak tanımlanan "yabani formları" ile kolayca melezlenebildiği de bilinmektedir (Simon 1993). Bu nedenle, ekonomik olarak hibrit havuç tohumu üretebilmek için sitoplazmik genetik erkek kısırlık kullanılması zorunludur.

Erkek kısırlığı, erkek organların fonksiyonel olmaması nedeniyle canlı polenlerin oluşamaması olayıdır. Kalıtsal olan erkek kısırlık oluşumu, ya kromozomlar üzerindeki bazı genler ya sitoplazma ya da sitoplazma ve hücre çekirdeğindeki genlerin etkileşimi ile kontrol edilmektedir (Budar ve Pelletier 2001). Bu erkek kısırlık tipleri sırasıyla genetik erkek kısırlığı, sitoplazmik erkek kısırlığı ve sitoplazmik genetik erkek kısırlığı olarak adlandırılmaktadır. Sitoplazma ve hücre çekirdeğinde yer alan genlerin etkileşmesi sonucu, havuçta sitoplazmik genetik erkek kısırlık ortaya çıkmaktadır. Kısırlığı kontrol eden genler ise fertil ve steril bireylerin DNA'larının karşılaştırılmasıyla moleküler düzeyde araştırılabilmektedir. Genom içinde bir DNA parçasının farklılıklarını temsil eden markörler, bu şekilde bulunabilmektedir (Schlötterer 2004).



Türkiye’de havuç üretimi çoğunlukla hibrit tohum kullanılarak yapılmaktadır. Hibrit tohumun tercih edilmesinin en büyük nedeni ise hibrit havuç çeşitlerinin verim artışı sağlaması, şekil, tat ve renk yönünden tekdüze havuçların üretilebilmesine olanak sağlamasıdır. Yüksek oranda yabancı tozlanan havuç gibi bitki türlerinde, hibrit tohumların üretilmesinde zorluklar yaşanmaktadır. Özellikle havuç gibi erselik (Hermafrodit) çiçek yapısına sahip yabancı tozlanan bitkilerde, kontrollü melezleme yapabilmek için emaskülasyon yapılmalıdır. Havuç gibi bitki türlerinde büyük alanlarda hibrit tohum üretim maliyetini arttıran en büyük faktör, çiçek yapılarının küçük ve melez başına elde edilen tohum sayılarının az olmasıdır. Bu nedenle erkek kısırılığı, bitki ıslahçıları ve hibrit tohum üreticilerinin en çok istedikleri özelliklerin başında gelmektedir (Tatlıoğlu 2008).

Havuç üretiminde kullanılan hibrit tohumların tamamına yakını yurt dışından ithal edilmektedir (Anonim 2016c). Açık tozlanan popülasyon ve yerel havuç çeşitlerimizin hibrit çeşitlere dönüştürülmesi, ülkemizin hibrit tohum üretiminde dışa bağımlılığını azaltabilecektir.

**Çizelge 1.3.** 2012-2017 yılları arasındaki havuç tohumluğu ithalat ve ihracat değerleri (Anonim 2016c)

<b>Yıllar</b>	<b>İhracat Miktarı (kg)</b>	<b>İthalat Miktarı (kg)</b>	<b>İhracat (Dolar)</b>	<b>İthalaat (Dolar)</b>
<b>2012</b>	489	29 273	25 923	4 479 523
<b>2013</b>	209	28 374	20 527	5 111 516
<b>2014</b>	4 948	21 074	745 506	3 103 065
<b>2015</b>	668	25 115	42 889	4 346 463
<b>2016</b>	2 264	26 964	112 877	3 182 167
<b>2017</b>	1949	27 069	67 417	3 793 055

Üründe homojenlik, görünüş, hastalık ve zararlılara dayanıklılık, erken çiçeklenme eğiliminin azaltılması, yüksek besin içeriği ve güzel tat gibi özellikler, havuçta ıslah amaçları arasında yer alır (Stein ve Nothnagel 1995).

Sàenz Laín (1981) yaptıkları araştırmada, havuçta 9 çift kromozomun varlığından ve kromozomların uzunlukları arasında küçük farklılıklar olduğundan söz etmektedir. *Daucus* türlerinin temel kromozom sayıları  $x=9$  ile  $x=11$  arasında değişmekte olup, tamamına yakını diploid yapıdadır. *Daucus carota*, *Daucus capillifolus* ve bazı Güney Akdeniz türleri  $2n=2x=18$  kromozom sayısına sahiptir (Sàenz Laín 1981). Havucun DNA hacmi  $0.98 \text{ pg/1C}$  içeriğinde ve her bir kromozomu 473 Mbp byklğindedir (Arumuganathan ve Earle 1991). Havuç genomu küçük olduğu için moleküler markrlerde varyasyon çok geniş olup, rejenerasyon ve genetik transformasyon kolayca sonuçlanabilmektedir. Bu yüzden havucun biyoteknolojik çalışmalar için çok uygun bir tür olduğu belirtilmiştir (Simon 2000).

Havuçta belirlenebilen basit kalıtıma sahip bazı özelliklerden sorumlu olabilecek genlerin karakterizasyonu ve tanımlaması üzerine, birçok araştırmacı uzun yıllardır çalışmaktadır. Yapılan bu araştırmalar nezdinde bugüne kadar yaprak, kök ve iek karakterlerini de içine alan fenotipik özellikler ile ilişkili yaklaşık 50 farklı lokusa ulaşılmıştır (Simon 2000, Simon ve ark. 2008). Biyoteknolojideki gelişmeler ve özellikle izoenzim uygulamaları ve DNA markörlerinin uygulamaya girmesi ile birlikte modern havuç ıslahı farklı bir boyut kazanmaya başlamıştır.

Günümüz modern ıslah tekniklerinde, genetik kaynakların tanımlanması vazgeçilmez uygulamaların başında gelmektedir. Morfolojik markörlerle yapılan karakterizasyonlarda, bitki türlerinin morfolojik karakterlerine dayalı yapılan taksonomik sınıflandırma, bitkinin yaşına, fizyolojik durumuna ve çevresel faktörlere bağlı olarak değişiklik göstermekte ve bazen yeterli olmamaktadır (Havey 1991). Ayrıca, morfolojik özellikleri birbirine çok yakın olarak görülen gruplar genetik olarak birbirinden çok farklı olabilmektedir (Sevindik ve ark. 2013). Bitkilerdeki genetik çeşitliliğinin ortaya konmasında, bitki türleri arasındaki taksonomik ve filogenetik ilişkilerin doğru bir şekilde belirlenmesinde, moleküler markörler başarıyla kullanılmaktadır (Yang ve Quiros 1993). Moleküler markör teknolojisi her geçen gün hızla gelişmekte ve modern bitki ıslahındaki yerini almaktadır (Lee 1995, Winter ve Kahl 1995, Duvick 1996).

Moleküler markörlerin büyük çoğunluğu, PCR tekniğine dayanmaktadır. Farklı büyüklüklerdeki (polimorfik) protein ve DNA parçacıkları, jel üzerinde elektrik akımı yardımıyla farklı şekillerde hareket etmektedirler. Jel üzerinde ebatlarına göre farklı şekilde hareket eden bu parçacıklar, boyama veya radyoaktif yöntemlerle tespit edilebilmektedir. Markörlerin bitki genetiği ve ıslahındaki başlıca kullanım alanları; çeşit tanımlama, Markör Destekli Seleksiyon (Marker Assisted Selection = MAS) ve genom haritalama'dır. Çeşit tanımlamada cins, tür ve çeşitler arasında polimorfizm gösterecek markörlerden yararlanılmakta ve gen kaynaklarının tanımlanması, sınıflandırılması ve gen bankalarının yönetimi; ıslah hat ve çeşitlerinin parmak izlerinin çıkarılmasıyla, çeşit patent haklarının elde edilmesi ve böylece ıslahçı haklarının korunması sağlanabilmektedir (Badenes ve Parfitt 1998, Ağaoğlu ve Ergül 1999, Göçmen ve ark. 1999a, Göçmen ve ark. 1999b, Polat ve ark. 1999, Cansian ve Echeverrigaray 2000, Li ve Quiros 2000).

İn vitro koşullarda, istenilen bir genin ya da özgün bir DNA dizisinin çok sayıda kopyasının elde edilmesi için, 1980'li yıllardan itibaren Polimeraz Zincir Reaksiyonu "Polymerase Chain Reaction" (PCR) kullanılmaya başlamıştır. PCR ile, istenilen genlerin ya da DNA dizilerinin replikasyonu, hızlandırılmış bir şekilde gerçekleştirilir. PCR, replikasyon sürecini taklit ederek aynen doğal hücre bölünmesinde olduğu gibi, yaklaşık 30 jenerasyon seçilmiş bir DNA dizisinin aşağı yukarı milyar katı kopyalanmış olur (Temizkan ve ark. 2008). Polimer zincir reaksiyonunun (PCR) bulunmasından sonra DNA markörleri kullanılarak gen etiketleme, genetik haritalama, tarımsal açıdan önemli genlerin belirlenmesi, genetik çeşitlilik çalışmaları, filogenetik analizler ve Markör Destekli Seleksiyon (MAS) çalışmaları kolaylaşmıştır (Joshi ve ark. 2000).

İdeal bir moleküler markör tekniğinin; az miktarda DNA veya doku ihtiyacı gerektirmesi, polimorfik olması ve bütün genomda kullanılması, genetik farklılıkların ortaya çıkarılmasında yeterli olması, farklı fenotiplerle bağlantı oluşturması, çok sayıda, bağımsız ve güvenilir markörler üretmesi gibi özelliklere sahip olması istenir. MAS ve genom haritalamada, markör kullanımının ön şartı, açılım gösteren, başlangıç popülasyonunun oluşturulmasıdır (Paterson ve Wing 1993). Basit karakterler için genelde F<sub>2</sub>, BC (Geriye Melez) ve NIL (Yakın İzogenik Hatlar) popülasyonları kullanılmakta; genom haritalama ve çok genle idare edilen karakterler için ise F<sub>2</sub>:3 ve

RIL (Rekombinant Saf Hat) popülasyonlarına başvurulmaktadır (Staub ve ark. 1997, Goldman ve ark. 1995, Ekbiç ve ark. 1999, Park ve ark. 2000). Popülasyonlarda, markörlerin linkage (bağlantı) dağılımına bakılarak, genom haritaları oluşturulmaktadır (Onus 1999a, Onus 1999b).

Havuçta ilk genetik harita 1989 yılında Westphal ve Wricke tarafından yapılmıştır. Bu çalışmayı sırasıyla içerisinde birkaç bin genetik markörü barındıran çeşitli havuç haritaları izlemiştir (Westphal ve Wricke 1991, Schulz ve ark. 1994, Bradeen ve ark. 1997, Niemann ve ark. 1997, Westphal ve Wricke 1997, Bradeen ve Simon 1998, Vivek ve Simon 1999, Boiteux ve ark. 2000, Boiteux ve ark. 2004, Le Clerc ve ark. 2002, Nothnagel ve Straka 2003, Santos ve Simon 2004, Nothnagel ve ark. 2005, Yau ve ark. 2005, Just ve ark. 2007, Bradeen ve Simon 2007). Bu haritaların büyük bir çoğunluğu F2 popülasyonları kullanılarak AFLP, RFLP, İzoenzim, RAPD, CAPS ve SCAR markörleri kullanılarak oluşturulmuştur. Şimdiye kadar *yel* (Nothnagel ve Straka 2003), *cola* (Yau ve ark. 2005), *MJ-1* (Boiteux ve ark. 2004), *Y2* (Bradeen ve Simon 1998) ve *PI* (Vivek ve Simon 1999) genlerinin belirlendiği monogenik özellikler haritalanmıştır. Bunlar içerisinde karoten QTL, *Mj-1*, sitoplazmik erkek kısırlığı (CMS) ve *Rs* genlerinin markör destekli seleksiyon (MAS) yöntemi için kullanılabileceği rapor edilmiştir. Just ve ark. (2007) karotenoid döngüsünde yer alan bazı yapısal genleri daha önce Santos (2001)'un oluşturmuş olduğu haritaya yerleştirmişlerdir. Yapılacak yeni haritalama çalışmalarında daha fazla kodominant markörlerin kullanımı gelecek için önemli olacaktır.

Genotipleme çalışmalarında, prosedürü belirlemedeki en önemli faktörlerden biri düşük maliyettir. Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi (AFLP), Sınırlayıcı Enzim Parça Uzunluğu Çeşitliliği (RFLP) ve Mikrosatellitler gibi moleküler işaretleyicilerin elde edilmesinde klonlama ve primer dizaynı aşamalarının uğraştırıcılığı, maliyetinin fazla olması ve moleküler işaretleyici yoğunluğunun sınırlı olması gibi nedenlerle yeni moleküler işaretleyicilere ihtiyaç duyulmaktadır. SNP (Single Nucleotid Polimorphism) moleküler işaretleyicileri bu nedenle önem kazanmıştır (Beissinger ve ark. 2013). SNP moleküler işaretleyicileri DNA molekülleri arasında en fazla bulunan mutasyonlardır ve bitkilerde yapılan araştırmalarda son dönemde yoğun olarak kullanılan moleküler işaretleyicilerdir (Ward ve ark. 2013).

Islah popülasyonlarında SSR ile araştırılması sınırlı olan ve AFLP ile yeterli cevap alınamayan genomlara, SNP markörleri uygulanmaktadır. Genom üzerinde dağılmış belirli bölgelere ait DNA parçalarının dizilenmesi ve karşılaştırılması esasına dayanmaktadır. Tekrarlanabilirliği yüksek olup, otomasyon yapılabilmektedir (Ching ve ark. 2002). SNP markörlerin son yıllarda moleküler bitki ıslah çalışmalarında yaygın olarak tercih edilmelerinin en büyük nedeni yüksek oranda polimorfik, ko-dominant, kesin, yüksek çözünürlüklü, ekonomik ve yüksek düzeyde bilgi verici olmalarından kaynaklanmaktadır (Lombardi ve ark. 2014).

Nükleik asitlerin polimerlerinde (DNA ya da RNA), nükleotidlerin diziliminin belirlenmesi olayına dizileme ya da sekanslama denir. DNA dizi analizi sayesinde bir DNA molekülündeki nükleotidlerin kesin dizilimi belirlenebilmektedir. DNA dizi analizi, bir nükleik asit dizisinin diğerine hibridizasyonuna dayanır. İlk olarak 1977'de uygulanmasından günümüze kadar genomik çalışmaların oluşmasına ve dolayısıyla bitki genom kompozisyonu ve organizasyonu hakkında sahip olunan bilginin artmasına olanak sağlamıştır (Kumar ve ark. 2012). 1977 yılında iki farklı dizileme yöntemi geliştirilmiş ve yayınlanmıştır. Bunlardan Maxam ve Gilbert'in geliştirdikleri yöntem kimyasal dizilemeye dayanmaktadır. Frederick Sanger'in geliştirdiği yöntem ise sentez ile dizileme (sequencing by synthesis - SBS) prensibine dayanmaktadır (Kumar ve ark. 2012).

Sanger dizileme temelli yeni nesil DNA dizileme teknolojilerinin geliştirilmesi (Next Generation Sequencing - NGS), son on yıl içerisinde gerçekleştirilmiştir. Tek bir PCR reaksiyonunda yüz milyonlarca bazdan yüz milyarlarca baza kadar çok büyük miktarda bazın aynı anda dizilenmesi ve görüntülenmesi, NGS teknolojileri sayesinde yapılabilmektedir. Ayrıca oldukça büyük miktardaki dizileme verileri NGS teknolojileri ile, Sanger metoduna kıyasla oldukça düşük maliyette yapılabilmektedir. Bir diğer avantaj ise; Sanger metodu ile aylarca sürebilecek olan bir dizi analizi NGS ile birkaç gün içerisinde yapılabilmektedir (Deschamps ve Campbell 2010). Günümüzde firmalar çok yüksek miktarda farklı DNA dizisinin tek bir reaksiyonda yüksek çözünürlüklü dizilemesini paralel reaksiyonlarda yapan farklı teknolojiye sahip NGS platformları üretmişlerdir. Geliştirilen tüm NGS teknolojilerinde ortak yapılan işlem; dizisel eklenen nükleotidlerin görüntülenmesi ve dizi analizi için kalıp DNA fragmentlerinin

oluşturulmasıdır. Güncel NGS teknolojileri “ikinci jenerasyon” ve “üçüncü jenerasyon” olmak üzere iki kategoriye ayrılmaktadır. Bu gruplandırma çoğunlukla dizilemenin yapılacağı kalıp DNA’nın amplifiye edilmesi ve takibinde dizi analizinin yapılması ya da kalıp DNA’nın amplifiye edilmeden tek bir DNA molekülünden dizilenmesine göre yapılmaktadır (Deschamps ve ark. 2012). Farklı firmaların üretmiş olduğu ikinci jenerasyon NGS platformları şunlardır; Solexa dizilemesi (Illumina Genome Analyzer), 454 dizilemesi (454 Genome Sequencers, Roche Applied Science; Basel) ve SOLiD dizileme platformu (Applied Biosystems; Foster City, CA, USA) (Shendure ve Ji 2008).

Tüm NGS platformlarında; kalıp DNA’nın hazırlanması, dizileme ve görüntüleme, son olarak da veri analizi olmak üzere üç temel işlem yapılmaktadır. Platformları bu üç işlem basamağındaki sahip oldukları spesifik protokolleri farklılaştırmaktadır ve ayrıca platformların ürettikleri dizileme verisinde birbirlerine göre farklılık göstermektedir (Metzker 2010). NGS verilerinden SNP tespiti (calling) ve genotipleme karakteristik olarak NGS teknolojisine özgüdür. NGS verileri, geleneksel sanger dizileme ya da SNP genotipleme metodlarına göre daha yüksek hata oranına sahiptir. Bunun nedeni, daha yüksek çözünürlükte dizileme yapmasına dayanmaktadır. NGS teknolojileri, Sanger dizilemeye göre daha kısa okumalar oluşturmakta ve dolayısıyla bu da yanlış hizalama (alignment) riskini artırmaktadır. Tüm bu sebeplerden dolayı bir popülasyonda SNP’lerin tespiti oldukça zor bir işlemdir. SNP tespiti için çeşitli algoritmalar geliştirilmiştir. MAQ, SAMtools, GATK, SOAPSnp, SNIP-Seq ve MapNext en yaygın olarak kullanılan yazılımlardandır (Deschamps ve ark. 2012).

Bitki ıslahı ve genomik çalışmalarda, Yeni Nesil Dizileme teknolojileri kullanılarak dizileme tabanlı genotipleme analizlerinde yeni yaklaşımlar geliştirilmektedir. Dizileme ile Genotipleme (Genotyping by Sequencing - GBS), bu yaklaşımlardan birisidir ve bitki genetiği çalışmalarında onbinlerce markör ile tür, popülasyon ve araştırma hedefi sınırlaması olmadan araştırmacılara esnek çalışma imkanı sunmaktadır (Kumar ve ark. 2012). NGS tabanlı platformlardan birisi olan GBS ile SNP keşfi ve genotipleme, dizileme esnasında simultane olarak yapılabilmektedir (Chen ve ark. 2013).

Genomik ve transkriptomik çalışmalar, Yeni Nesil DNA Dizileme teknolojilerinin biyoloji bilimine kazandırılmasıyla beraber boyut değiştirmiş, popülasyondaki genetik işaretleyicilerin keşfi, validasyonu ve anlamlandırılması adına büyük ilerleme sağlanmıştır (Davey ve ark. 2011). Günümüzde çok sayıda DNA dizileme tabanlı SNP genotipleme platformları ulaşılabilir durumdadırlar ki bunlar hedeflenmiş ya da tüm genom dizileme bazlı teknolojilerdir (Fan ve ark. 2006).

DNA dizileme tabanlı SNP markörü bulma metodlarına tüm genom dizileme, exom yakalama, RNA dizileme, metillenmiş DNA dizileme, restriksiyon enzimi tabanlı dizileme yöntemleri örnek olarak verilebilir (Beissinger ve ark. 2013). Restriksiyon enzimi tabanlı dizileme yöntemleri, RFLP yöntemi kullanılarak insan hastalıklarıyla genler arası ilişkileri çözme amaçlı çalışmalar yapıldığı zamandan beri moleküler işaretleyici tespiti çalışmalarının temelini oluşturmaktadır (Donis-Keller ve ark. 1987). Genomdaki hedef bölgenin karmaşık yapısı sadeleştirilip genetik markör tarama çalışması, restriksiyon enzimleri yardımıyla yapılabilmektedir.

Restriksiyon Enzimi Tabanlı metodlardan olan GBS (Elshire ve ark. 2011) ve RAD-Seq (Baird ve ark. 2008) metodları günümüzde oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır. GBS ve RAD-Seq metodları benzer enzim kesim tekniğine dayansa da GBS daha az karmaşık bir methoddur ve zaman açısından değerlendirildiğinde de RAD-Seq'e oranla daha az zamanda daha çok veri elde etmeyi sağlar (Ward ve ark. 2013).

GBS metodu temelde mısır için geliştirilmiş olsa da basitliği ve tekrarlanabilirliği nedeniyle popülasyon çalışmalarında, gen kaynaklarının karakterizasyonunda ve genetik ıslah çalışmalarında da yaygın olarak kullanılmaktadır. GBS metodunun tercih edilmesinin en büyük nedenlerinden biri de üretilmiş dataların anlamlandırılabilmesi için gerekli olan biyoinformatik yazılımların yaygın olarak geliştirilmiş olmasıdır (Donato ve ark. 2013). GBS metodunda kullanılan enzimler, metilasyon duyarlı enzimlerdir. Böylece, metillenmiş yüksek tekrarlı genomik bölgelerdeki dizi (sekans) yoğunluğu azaltılabilirken, düşük tekrarlı gen bölgelerindeki dizi (sekans) yoğunluğu ise yüksek tutulabilmektedir (Gore ve ark. 2009). Bugüne kadar yapılan çalışmalarda en yaygın kullanılan restriksiyon enzimi *ApeKI* enzimidir. *ApeKI*, retrotranspozonları seyrek sıklıkla keser ve metilasyon duyarlı bir enzimdir (Elshire ve ark. 2011).

GBS metodunun gerçekleştirildiği sistemlerden biri olan Illumina HiSeq 2000 (Illumina, San Diego, CA) sisteminde öncelikle tüm örnekleri içeren belirli sayıda DNA havuzu oluşturulur. GBS platformu tarafından üretilen DNA parçalarının analiz edilebilmesi için biyoinformatik yazılımlara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu yazılımlara Stacks (Catchen ve ark. 2011) ve Tassel (Glaubitz ve ark. 2014) örnek verilebilir. Çalışılmak istenen organizmaya ait geriye dönük hiçbir genetik bilgi olmadan yapılan popülasyon çalışmaları, Yeni Nesil Dizileme Teknolojileri sayesinde yapılabilir durumdadır (Davey ve ark. 2011). Stacks analiz programı ile SNP tespiti mümkündür (Catchen ve ark. 2011).

Genom dizilerinin kolaylıkla ve düşük maliyetle elde edilebilir olması, Yeni Nesil DNA Dizileme yöntemleriyle birlikte gerçekleşebilmiştir fakat pratikte fragmentler halinde ve tamamlanmamış taslak genomların olduğu da görülmektedir. Bağlantı haritası oluşturabilmek için, fragmentlere ayrılmış genomun bir araya getirilmesi gereklidir. Bu harita Genetik Bağlantı Haritası (Linkage Map) olarak adlandırılır (Lewin ve ark. 2009). Genetik Bağlantı Haritaları fiziksel moleküler işaretleyiciler arasındaki rekombinasyon oranlarına dayalı olarak oluşturulur ve yaklaşık 100 yıldan fazladır biyoloji bilimine hizmet etmektedir. Model organizmalar arasında rekombinasyonlar gerçekleştirip bu organizmalar arasında genetik farklılıklar elde ederek, genetik bağlantı haritası oluşturulabilir. Haritanın oluşturulması, tespit edilen moleküler işaretleyicilerin lineer bir dizi (sekans) üzerinde mesafelerine göre yerleştirilmesi esasına dayanır (Fierst 2015).

Bağlantı haritaları, yüksek çıktılı dizileme cihazlarında üretilen milyonlarca moleküler işaretleyicinin düşük ölçekteki datalara dönüştürülmesi prensibine dayanır. Milyonlarca moleküler işaretleyici yerine daha kullanılabilir yüzlerle ifade edilebilen sayıdaki moleküler işaretleyiciler bağlantı haritalarını oluşturmaktadır (Cheema ve Dicks 2009). Genetik analizler sonucu elde edilen datalar arasındaki bağlantıları göstermek ve analiz etmek amacıyla Joinmap programı geliştirilmiştir. Linkage 1 (Suiter ve ark. 1983), MAPMAKER (Lander ve ark. 1987), GMEDEL (Echt ve ark. 1992) gibi uygulamalar günümüze kadar yaygın olarak kullanılan uygulamalardan bazılarıdır. Günümüzde birçok canlı üzerindeki moleküler işaretleyicilerin tespiti oldukça kolaylaşmış, ucuzlaşmış ve kısa zamanda elde edilebilir duruma ulaşmıştır. Mısır bitkisinde (Coe ve



ark. 1990) ve *Arabidopsis thaliana*'da (Chang ve ark. 1988, Nam ve ark. 1989) yapılan çalışmalar sonucu elde edilen genetik haritalar ile genetik haritalama çalışmaları popülerlik kazanmıştır ve günümüzde birçok canlıda genetik haritalama oluşturma çalışmaları oldukça yaygınlaşmıştır (Lobo ve Shaw 2008). Bu durum, genetik dataların anlamlandırılabilirlikleri açısından bilgisayar yazılımlarına ihtiyaç duyulduğunu göstermektedir.

Bütün data seti içerisinde ulaşılabilir olan baz çiftlerinin (bç) rekombinasyon frekansları LOD (logarithm of odds) skorlarına göre hesaplanır. Markörlar odds oranı kullanılarak bağlantı grupları üzerine yerleştirilmektedir. Odds değeri bir rekombinasyon değeri için iki lokusun bağlantılı olma olasılığının bağlantılı olmama olasılığına oranı olarak tanımlanmakta ve bu oran LOD (logarithm of odds) skor olarak bilinmektedir (Risch 1992). Bitki, insan ve hayvan popülasyonlarında bağlantı analizi yapmak için LOD skor istatistik testi kullanılır. Bu test Newton E. Morton tarafından geliştirilmiştir. Bilgisayarlı LOD skor analizi, Mendeliyen özellikler arasında bağlantının belirlenmesi için karmaşık soyağaçlarının analizini kolaylaştırır (Griffiths ve ark. 1993).

Joinmap programında bağlantı haritası oluşturmak için öncelikle, veri programa aktarılır. Bağlantı grupları belirlenir; eğer data birkaç bağlantı grubunu aynı anda içeriyorsa data dosyası bağlantı gruplarına göre ayrı dosyalara bölünür. Moleküler işaretleyiciler genetik harita üzerinde sıralanır. Moleküler işaretleyicilerin ilk çifti seçilip harita mesafesi hesaplanır. Haritaya hangi moleküler işaretleyicinin ekleneceğine karar verilir. Bu durum, bütün moleküler işaretleyiciler için en başta belirlenmiş olan LOD skorlarına göre yapılır. Haritada hangi moleküler işaretleyicinin hangi pozisyona ekleneceğine karar verilir. "Reshuffling" adı verilen bir tekrar karıştırma aşamasından geçirilir ve böylelikle deneme yanılma yöntemiyle mesafeyi belirlediği aşamadan itibaren aşamaları tekrar ederek moleküler işaretleyicilerin en iyi pozisyonu belirlenmeye çalışılır.

Bu araştırmada, havuç bitkisine ait 94 adet F2 bitkisi için Yeni Nesil DNA Dizileme yöntemlerinden biri olan “Genotyping by Sequencing” (GBS) metodunun Illumina HiSeq 2000 (Illumina, San Diego, CA) cihazında uygulanmasıyla elde edilen DNA fragmentlerinin Stacks (Catchen ve ark. 2011) programında analiz edilmesiyle tespit edilen SNP moleküler işaretleyicilerine dayalı Genetik Bağlantı Haritası’nın, JoinMap 4.0 (Van Ooijen ve Voorrips 2001) analiz programı kullanılarak oluşturulması amaçlanmıştır.



## 2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

### 2.1. Genotyping by Sequencing Yöntemi ile Yeni Nesil Dizileme

Genotyping by Sequencing (GBS) yöntemi ilk olarak mısır bitkisi için geliştirilmiştir. Basitliği ve tekrarlanabilirliği nedeniyle popülasyon çalışmalarında, gen kaynaklarının karakterizasyonlarında ve ıslah çalışmalarında da yaygın olarak kullanılmaktadır. Tercih edilmesinin en önemli nedeni, GBS metoduyla üretilmiş verilerin anlamlandırılabilmesi için gerekli olan biyoinformatik yazılımların yaygın olarak geliştirilmiş olmasıdır (Donato ve ark. 2013).

Next Generation Sequencing (NGS) protokollerinin çeşitli bitki ve popülasyonlarda SNP keşfi ve genotiplemesini amaçlayan en son uygulaması, Dizileme ile Genotipleme (Genotyping by Sequencing - GBS) yöntemidir (Spindel ve ark. 2013). Bitki ıslahı çalışmalarında genomik seleksiyon uygulamaları, genellikle referans örnekler kullanılarak keşfedilen markörlerle yapılmaktadır. Ancak NGS ile DNA dizileme teknolojilerindeki hızlı gelişmeler ki bu gelişmeler kısa DNA fragmentlerinin dizilenmesine dayanmaktadır, büyük ve farklı germplazm koleksiyonlarında, doğrudan ve ekonomik SNP keşfine olanak sağlamaktadır (Crossa ve ark. 2013).

GBS, bitki genetiği çalışmaları yapan araştırmacıların beklentilerini, eş zamanlı markör keşfi yapması, genotiplemeyi basit ve düşük maliyette moleküler biyoloji çalışma akışında sağlaması dolayısıyla en yüksek düzeyde karşılamaktadır. Kesim için kullanılan enzim ise tanımlanan markör sayısını ve gerekli dizi (sekans) miktarını etkilemektedir. Genomu daha sık aralıklarla kesen bir enzim daha fazla sayıda DNA fragmentinin oluşmasına ve markör sayısının artmasına sebep olmaktadır (Kumar ve ark. 2012).

GBS her bir bireyden eş zamanlı olarak milyonlarca veya milyarlarca kısa okumaları toplayan ve genom kompleksliğini restriksiyon enzimleri ile azaltarak her bir lokusta dizi (sekans) kapsamını geliştiren NGS tabanlı bir platformdur (Chen ve ark. 2013). GBS, yüksek SNP kapsamı sunarak SNP analizlerinin etkinliğini artırmıştır (Sonah ve ark. 2013). Illumina NGS platformu için geliştirilen GBS, yüksek düzeyde multipleks bir sistemdir (Elshire ve ark. 2011). Genetik analizler ve genotipleme için oldukça çok

sayıda SNP geliştirebilen GBS; ekonomik, daha az PCR ve pürifikasyon basamaklarına sahip, boyut ayırlamasına ve referans genoma ihtiyaç duymayan, ilaveten etkin barkodlamaya sahip ve artırma (scale up) işleminin kolay olduğu bir yöntemdir. Bu yüzden, bitkilerde genomik tabanlı ıslah çalışmalarında giderek önemli bir yer edinmektedir (He ve ark. 2014). Son yıllarda, GBS protokolü mısırdaki Elshire ve ark. (2011) tarafından çalışılmıştır. Bu alışmada RIL popölasyonu kullanılmış, mısırdaki 200 000 ve arpada 25 000 dizi etiketi (sequence tags) haritalanmıştır (Sonah ve ark. 2013).

You ve ark. (2013) yaptıkları çalışmada Illumina HiSeq 2000 (Illumina, San Diego, CA) cihazında Multiplexed Shotgun (Andolfatto ve ark. 2011) yöntemiyle edilen datalar ile cinsiyet temelli bağlantı haritası oluşturmuşlardır. *Epinephelus coioides* türüne ait 142 melezden elde edilen DNA ile 594 142 945 90-b büyüklüğündeki ham data ile 18 256 Mendel Segregasyonu'na sahip SNP moleküler işaretleyicisi elde edilmiştir. 24 Bağlantı grubu üzerine 4 608 SNP yerleştirilmiştir. Toplam Bağlantı Haritası 1 581 cM olarak belirlenmiştir.

Gardner ve ark. (2014) yaptıkları çalışmada “*Golden delicious x Scarlet spur*” elma çeşitlerinin çaprazlanmasıyla elde edilen 89 melezden 500 ng DNA *HindIII-HF* enzimi kullanılarak kesilmiş ve Illumina HiSeq 2000 cihazında GBS yöntemiyle analiz edilmiştir. 96 kuyucuklu PCR plate'inde gerçekleştirilen analiz sonucunda toplam 85 129 960 100-b DNA dizi (sekans) okuması elde etmişlerdir. Fakat üretilen bu data içerisinde çok fazla kayıp ve genetik haritalamada kullanılamayacak veri elde ettiklerini belirtmişlerdir. Bu data içerisinde genotip kalitesine bağlı olarak kayıp dataların temizlenmesi sonucunda 273 835 SNP moleküler işaretleyicisi tespit etmişlerdir. Elde edilen moleküler işaretleyicilerden 3 967 SNP genetik bağlantı haritasına aktarılabilmektedir. Yapılan alışma sonucunda SNP moleküler işaretleyicilerinin yüksek yoğunluklu genetik bağlantı haritaları oluşurmada ilk sırada tercih edilmesi gereken moleküler işaretleyiciler oldukları vurgulanmıştır.

Pootakham ve ark. (2015) yaptıkları çalışmada, iki kauçuk ağacı haritalama popölasyonu kullanmışlardır. P popölasyonu, BPM24 x RRIM600 ebeveynlerinin melezlenmesiyle elde edilen 118 melezden, C popölasyonu ise BPM24 x RRIC110

ebeveynlerinin melezlenmesiyle elde edilen 79 melezden oluşmuştur. 197 bireyin genomik DNA'sı *PstI/MspI* enzimi kullanılarak kesilmiş ve Ion Torrent Proton dizilim platformunda analiz edilmiştir. Her iki popülasyondan toplam 1 003 904 519 DNA dizi (sekans) okuması elde edilmiştir. Fakat üretilen bu data içerisinde çok fazla kayıp ve genetik haritalamada kullanılamayacak veri elde ettiklerini belirtmişlerdir. Bu data içerisinde genotip kalitesine bağlı olarak kayıp dataların temizlenmesi sonucunda 21 353 Mendel Segregasyonu'na sahip SNP moleküler işaretleyicisi tespit etmişlerdir. Elde edilen moleküler işaretleyicilerden 2 321 SNP (P popülasyonundan 1 639 SNP, C popülasyonundan ise 1 710 SNP), entegre genetik bağlantı haritasına aktarılmıştır. Toplam Bağlantı Haritası 2 052 cM olarak belirlenmiştir.

Guajardo ve ark. (2015) yaptıkları çalışmada, "Rainier x Rivedel" (Ra x Ri) kiraz çeşitlerinin melezlenmesiyle elde edilen 166 melezden 100 ng DNA, *EcoRI* enzimi kullanılarak kesilmiştir. Illumina HiSeq 2000 cihazında, GBS yöntemiyle analiz edilen, ortalama 2 333 869 DNA dizi (sekans) okuması elde etmişlerdir. Bu veri içerisinde genotip kalitesine bağlı olarak kayıp verilerin analizden çıkarılması sonucunda 8 476 SNP moleküler işaretleyicisi tespit etmişlerdir. 8 Bağlantı grubu üzerine 964 SNP ve 21 SSR yerleştirilmiştir. Toplam Bağlantı Haritası 731,3 cM olarak belirlenmiştir.

Crawford ve ark. (2016) yaptıkları çalışmada, buğdaygiller familyasına ait *Spartina pectinata* türünü kullanmışlardır. 17-109 ve 20-102 ebeveynlerinin melezlenmesiyle elde edilen 63 melezden 250 ng genomik DNA *PstI-HF* ve *Bfal-HinPII* enzim kombinasyonu ile kesilmiştir. Illumina HiSeq 2000 cihazında GBS (Elshire ve ark. 2011, Poland ve ark. 2012) yöntemiyle analiz edilen ~ 218 000 000 100-bç DNA dizi (sekans) okuması elde etmişlerdir. Bu veri içerisinde genotip kalitesine bağlı olarak kayıp verilerin analizden çıkarılması sonucunda 26 418 SNP moleküler işaretleyicisi tespit etmişlerdir. 20 Bağlantı grubu üzerine 2 538 SNP yerleştirilmiştir. Toplam Bağlantı Haritası 1 838 cM olarak belirlenmiştir.

Zhang ve ark. (2016) yaptıkları çalışmada, "Dongzao × Zhongningyuanzao" hünnap çeşitlerinin melezlenmesiyle elde edilen 145 melezden elde edilen genomik DNA *MseI*, T4 DNA ligase ve *MseI* Y adapter enzim kombinasyonu ile kesilmiştir. Illumina HiSeq 4000 cihazında, GBS yöntemiyle analiz edilen, 256 708 177 50-bç DNA dizi (sekans)

okuması elde etmişlerdir. Bu veri içerisinde genotip kalitesine bağlı olarak kayıp verilerin analizden çıkarılması sonucunda 40 372 SNP moleküler işaretleyicisi tespit etmişlerdir. 12 Bağlantı grubu üzerine 2 540 SNP yerleştirilmiştir. Toplam Bağlantı Haritası 1456,53 cM olarak belirlenmiştir.

Wang ve ark. (2016) yaptıkları çalışmada “*Crassostrea gigas* x *Crassostrea angulata*” çaprazlanmasıyla elde edilen 106 melezden 200 ng DNA *EcoRI* ve *HinfI* enzim kombinasyonu ile kesilmiştir. Illumina HiSeq 2500 (Illumina, San Diego, CA) cihazında GBS yöntemiyle analiz edilen 6 840 000 90-bç DNA dizi (sekans) okuması elde etmişlerdir. Referans genom varlığında yapılan çalışmada okumalar referans genom ile karşılaştırılmış intron, exon, genic ve intergenic bölgeler üzerindeki yerleşimlerine göre oranlar belirlenmiştir. Stacks yazılımı kullanılarak SNP tespiti yapılmış 65 031 RAD loci oluşturulmuş 40 445 SNP tespit edilmiştir. Tespit edilen SNP moleküler işaretleyicilerinden 8 743 SNP genetik bağlantı haritasına yerleştirilmiştir.

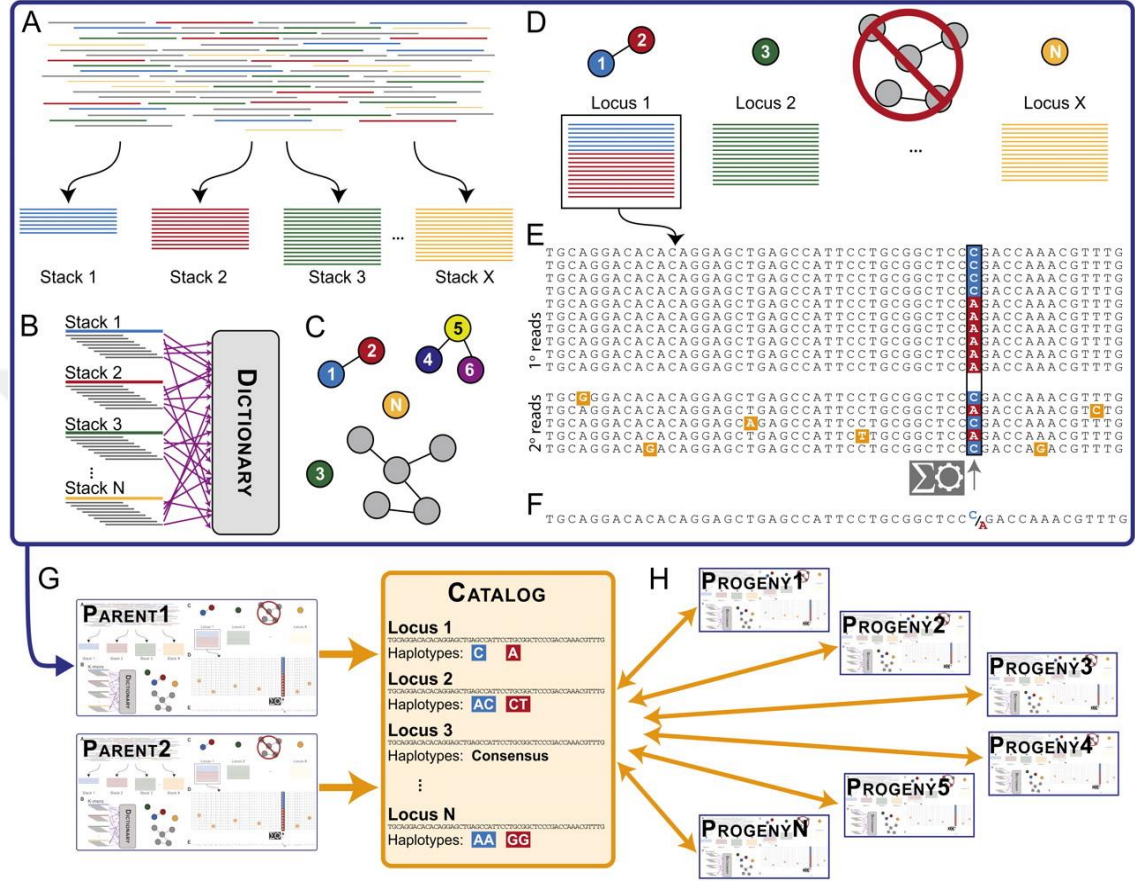
## **2.2. Stacks Bilgisayar Yazılımı ile SNP tespiti**

Illumina cihazı tarafından üretilen kısa okumalı dizileme verilerini kullanarak, bireylerin bir set içerisindeki lokuslarının üzerinde tanıma ve genotipleme amacıyla Stacks bilgisayar yazılımı kullanılmaktadır. Stacks yazılımı referans genom varlığında karşılaştırmalı olarak da çalışabilmektedir. Illumina HiSeq 2000 (Illumina, San Diego, CA) cihazı tarafından “reduced representation” prensibiyle üretilen dizilerde, program yardımıyla tekrarlı bölgeler filtreden geçirilmekte ve indirgenmiş, basitleştirilmiş bir şekilde karşımıza getirilmektedir.

Stacks programı binlerce SNP moleküler işaretleyicisini, popülasyonların ya da melezlemelerin genetik analizi için kullanılabilir forma getirmektedir. “Maximum likelihood” istatistik modelini kullanan program, Illumina cihazlarında birkaç gün içerisinde üretilebilen yaklaşık 100 GB büyüklüğündeki dataları otomatikleştirilmiş bir sistemle analiz etmeye olanak sağlamaktadır.

Stacks bilgisayar yazılımı kullanılarak, SNP moleküler işaretleyicileri tespit edilmiştir. Stacks analizinde kullanılacak verinin fastq formatına dönüştürülmesi ve temizlenmesi, `process_radtags.pl` aracı kullanılarak gerçekleştirilir. `process_radtags.pl` ile dizileme

sırasında belirlenmiş olan barkodlara göre diziler gruplandırılır. Diziler, her birey için ayrı dosyalar içerisinde barkodlara verilen isimlere göre oluşturulur. Komut girildikten sonra haritalama işlemi otomatik olarak ilerler. İlerleyiş Şekil 2.1’de gösterilmiştir.



**Şekil 2.1.** Stacks analiz programının basamakları

(A) *ustacks* programı ile her bir bireyden gelen kısa okumalı kümeleri tam eşleşmiş halde diziler, ayırır ve biçimlendirir. (B) Her bir kümedeki dizileri ayırarak k-mer haline dönüştürür ve oluşan k-mer’leri bir sözlüğe yükler. Potansiyel eşleşecek kümeleri sözlükten sorgulayarak, nükleotidler arasındaki mesafe ile bağlı olan bir grafik ile sunulabilir bir liste oluşturur. (C) Eşleşen kümelere varsayılan lokuslar oluşturur. (D) SNP olabileceği varsayımıyla, her bir lokustaki her bir nükleotid kontrol edilir. (E) SNP ve haplotip dataları, bir konsensus dizi (benzer ya da aynı haldeki diziler) içerisinden kaydedilir. (F) *cstacks* çaprazlamadaki bütün potansiyel lokusları bir set haline getirmek amacıyla, çaprazlanan ebeveynlerin datalarını bir katalog haline dönüştürür. (G) *sstacks* popülasyondaki her bir birey içerisinde hangi lokus / haplotip kombinasyonlarının

olduğunu belirlemek amacıyla, her bir melezi ebeveynlerin oluşturduğu katalogla karşılaştırır. Eşleşmeleri kaydeder (Catchen ve ark. 2011).

Markörler, *markers.pl* aracı ile belirlenir. *index\_radtags.pl* aracı ile veritabanı indekslenir. Popülasyondaki genotipler, dizileme işlemi bittikten sonra *genotypes.pl* aracı kullanılarak belirlenir ve Joinmap 4.0 gibi programlarda kullanılabilir dosyalara dönüştürülür.

Stacks bilgisayar yazılımı kullanılarak yapılan çalışmalardan Pan ve ark. (2015), *Conifers* türlerinden elde edilen 99 bireyden 14 751 SNP tespit etmişlerdir. You ve ark. (2013) *Epinephelus coioides* türünden elde edilen 142 yavrudan 18 256 SNP tespit etmişlerdir. Degner (2014), *Quercus garryana* türünden elde edilen 92 yavrudan 20 751 SNP tespit etmiştir. Wang ve ark. (2016) “*Crassostrea gigas* x *Crassostrea angulata*” melezlenmesiyle elde edilen 106 melezen 65 031 RAD loci oluşturmuş 40 445 SNP tespit etmişlerdir.

### **2.3. Genetik Bağlantı Haritası Oluşturma Çalışmaları**

Birçok bilim adamı elde edilen dataları yorumlama ve anlamlandırma çabasına, Mendel’in çalışmaları sonucunda girişmiştir. Mendel, yaptığı çalışmalarda bağlantı olasılığını belirleyememiştir. Genetik bağlantı konusunun keşfedilmesi, Thomas Hunt Morgan tarafından Columbia Üniversitesi’nde “fly room” adı verilen laboratuvarında, *Drosophila melanogaster* modeli üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda gerçekleşmiştir. Günümüzde birçok canlının genetik bağlantı haritası oluşturulmuştur ve bu yöndeki çalışmalar devam etmektedir (Lobo ve Shaw 2008).

Genetik haritalama, genlerin ve markörlerin kromozomlar üzerinde bulunduğu yerlerin birbirlerine olan uzaklıklarının tespit edilmesidir (Özşensoy ve Kurar 2013). Mayoz bölünme sırasında, aynı kromozom üzerinde ve fiziksel olarak birbirine yakın olan genler, kutuplara birlikte giderler. Aynı kromozom üzerinde bulunan bu genlere “bağlı gen (linked gen)”; bu genlerin oluşturmuş olduğu gruba “bağlantı grubu (linkage grup)”, bu olaya da “bağlantı (linkage)” denilmektedir (Erensayın 2000, Özşensoy ve Kurar 2013). Crossing-over olayından yararlanarak, bağlı genlerin dizilişi ve



aralarındaki uzaklıkların bulunması sonucu genetik bağlantı haritaları oluşturulmaktadır.

Kromozomlar arasında bir crossing-over olayı gerçekleşmiş ise ebeveyne benzeyen ve benzemeyen yeni gametler oluşacaktır. Oluşan yeni gametlerden ebeveyne benzeyenlere “parental”, ebeveyne benzemeyenlere “rekombinant” ve bu olaya “rekombinasyon” denilmektedir. Rekombinant bireylerin ilgili jenerasyonda oluşan toplam birey sayısına oranı crossing-over oranını (Rekombinasyon frekansı, RF) vermektedir ve ‘ $\theta$ ’ ile tanımlanmaktadır (Sturtevant 1913, Özşensoy ve Kurar 2013). Rekombinasyon frekansının % 0-50 arasında olması iki genin aynı kromozom üzerinde olduğunu ifade etmektedir (Sturtevant 1913, Beckmann 1994, Griffiths ve ark. 2005). Crossing-over sonucu iki gen arasında bulunan mesafe harita birimi, Thomas Hunt Morgan’a ithafen, 1 centimorgan (1 cM) olarak ifade edilmiştir (Fiziksel olarak 1 cM yaklaşık 1 milyon baz çiftine eşittir) (Kappes 1999, Liu 1998, Özşensoy ve Kurar 2013).

Bitkilerde bağlantı haritası oluşturmak için uygulanan GBS prosedürü şu şekildedir:

1. Haritalama popülasyonunun oluşturulması,
2. NGS platformu kullanılarak yüksek çözünürlükte dizileme yapılması,
3. SNP’lerin belirlenmesi ve genotiplenmesi,
4. Genetik bağlantı haritasının yapılması işlem basamaklarından oluşmaktadır (Deschamps ve ark. 2012).

Bir veya daha fazla özellik bakımından birbirinden genetik olarak farklı iki ebeveynin seçilmesiyle haritalama popülasyonları için ilk adım atılmış olur. Kendine tozlanabilen türlerde popülasyonlar yüksek oranda homozigot olan ebeveynlerden elde edilmektedir. Yabancı tozlanan türlerde ise kendileme depresyonundan dolayı homozigot hatlar oluşturma ve ebeveynler arası melezleme yapmak çok zordur (Yıldız 2009). Ayrıca, genetik olarak birbirine yakın ebeveynlerin melezlemede kullanılması, daha düşük rekombinasyon oranıyla ve dolayısıyla çözünürlüğü daha düşük harita ile sonuçlanmaktadır (Tadmor ve ark. 1987).

Haritalama için F<sub>2</sub>, RIL (rekombinant saf hatlar), BC (geriye melezleme), DH (dihaploid hatlar) ve NIL (yakın izogenik hatlar) popülasyonları kullanılmaktadır. Kısa sürede oluşturuldukları için haritalama programlarında çoğunlukla, F<sub>2</sub> ve BC

popülasyonları kullanılmaktadır. Bununla birlikte bu popülasyonlar yüksek oranda heterozigot oldukları için değişkendirler ve tohumla çoğaltılamazlar. RIL, NIL ve DH popülasyonlarının oluşturulması çok uzun zaman almakla birlikte bu popülasyonlar homozigotturlar; gerçek ıslah hatlarıdır ve herhangi bir genetik değişim olmaksızın kolaylıkla çoğaltılabilmektedirler. Yapılan birçok genetik haritalama çalışmalarında F2, BC, RIL ve DH popülasyonlarındaki birey sayısı 50 ile 1000 arasında değişmektedir (Paterson 1996, He ve ark. 2001, Semagn ve ark. 2006a).

Her bir haritalama popülasyonunun avantaj ve dezavantajları vardır. Bağlantı grupları için uygun popülasyonların seçimi, imkan, zaman ve kullanılacak moleküler markörlere göre değişmektedir. Kodominant markör kullanmak, F2 popülasyonundan maksimum genetik bilgi elde etmek için daha avantajlı olmaktadır. RIL, NIL ve DH popülasyonlarında tüm lokuslar homozigot olduğu için dominant markörlar kodominant markörlar kadar etkili kullanılmaktadır. Homozigot oranı yüksek olan BC popülasyonlarında da dominant markörlar sıklıkla kullanılabilir. Genetik haritalama için popülasyon oluşturulduktan sonra kullanılacak moleküler markör tekniği veya teknikleri seçilmektedir. Birçok farklı bitki türünde RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms), SSR (Simple Sequence Repeats), EST (Expressed Sequence Tags), CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphisms), ISSR (Inter Simple Sequence Repeat), DArT (Diversity Arrays Technology) ve SNP (Single Nucleotide Polymorphism) moleküler markör teknikleri kullanılarak harita oluşturulmuştur (Semagn ve ark. 2006b).

Bitki genetik yapısının geliştirilmesini hedefleyen moleküler ıslah çalışmalarını için genetik haritalar çok önemli araçlardır. Çünkü genetik haritalar QTL'lerin saptanması, haritaya dayalı klonlama ve gen lokalizasyonlarının belirlenmesinde gereklidirler. Genetik haritaların oluşturulmasında bir araç olan markörlerden SNP'lerin ise daha yüksek çözünürlükte harita elde edilmesinde önceki markör sistemlerine göre üstünlükleri vardır (Kumar ve ark. 2012).

### **3. MATERYAL ve YÖNTEM**

Bu araştırma 2015-2018 yıllarında Bursa Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümüne ait Biyoteknoloji ve Moleküler Biyoloji Laboratuvarlarında yürütülmüştür. GBS analizi için Wisconsin Üniversitesi Biyoteknoloji Bölümü Laboratuvarlarından hizmet alınmıştır. Genotipleme için GBS (Genotyping By Sequencing) analizi kullanılmıştır.

#### **3.1. Materyal**

Bitki materyali olarak bir F2 havuç popülasyonu kullanılmıştır. Öncelikle iki havuç ıslah hattının melezlenmesiyle F1 bitkiler elde edilmiştir. Daha sonra fertil çiçeklere sahip bir F1 bitkisi kendilenerek F2 olan ve çiçek yapıları yönünden açılım gösteren 918-122 genetik haritalama popülasyonu oluşturulmuştur.

##### **3.1.1. 918-122 popülasyonunun yapısı**

Melezleme, erkek kısır olan ıslah hattının çiçeklerinin üzerine fertil olan hattın çiçek tozlarının getirilip izole edilmesi ile yapılmıştır. 2 havuç ıslah hattının melezi sonucu oluşan bir F1 bitkisinin kendilenmesiyle 117 adet F2 bitkisi oluşturulmuştur. Toplamda 94 adet F2 bitkisinden DNA izolasyonu için yaprak örneği alınmıştır.

#### **3.2. Yöntem**

##### **3.2.1. Yaprak örneklerinin alınması**

918-122 genetik haritalama popülasyonuna ait 94 adet F2 bitkisinden, DNA izolasyonu yapmak üzere yaprak örnekleri alınmıştır. Yaprak örnekleri, sabahın erken saatlerinde toplanmıştır. Yaprak örnekleri toplanırken en genç yapraklar tercih edilmiştir. Yapraklar alındıktan sonra laboratuvara ulaştırılincaya kadar buz üzerinde saklanmış ve laboratuvara ulaştırılan örnekler liyofilizatörde kurutulmuştur. Liyofilizatörde kurutma işlemi 3 gün sürmüştür. Kurutulan yaprak örnekleri DNA izolasyonu için kullanılıncaya kadar plastik torbalar içerisinde -80°C'da saklanmıştır.

### 3.2.2. DNA örneklerinin elde edilmesi

DNA örneklerinin çıkarılması için Genoks bitki DNA ekstraksiyon kiti kullanılmıştır.

1. Liyofilizatörde kurutulup  $-80^{\circ}\text{C}$ 'ye kaldırılan örnekler oda sıcaklığına getirildikten sonra 25 mg tartılıp RNaz ve DNaz'dan arı steril mikrosantrifüj tüplerine aktarılmıştır.
2. Yaprak örneklerinin parçalanması amacıyla santrifüj tüplerine 2 adet 6 mm çapında ve 5 adet 3 mm çapındaki cam boncuklar konularak öğütücü yardımıyla örnekler öğütülmüştür.
3. Genoks Kiti içerisindeki PCL solüsyonundan 200  $\mu\text{L}$  ve Rnase A'dan 3  $\mu\text{L}$  her örneğe tek tek eklenmiş ve homojen görünüme ulaşınca kadar vortekslenmiştir.
4. Tüp içerisindeki örnekler 20 dk boyunca sıcaklığı  $65^{\circ}\text{C}$  olan su banyosunda bekletilmiştir. Bekleme süresi boyunca tüpler 3-5 kez ters düz edilerek karıştırılmıştır.
5. Sıcak su banyosundan alınan tüplerin her birine 25  $\mu\text{L}$  PP solüsyonu eklenmiştir. Tüpler 2-3 saniye kadar dik bir şekilde vortekslenildikten sonra buz üzerinde 15 dakika inkübe edilmiştir.
6. 2 ml mikrosantrifüj tüpü içerisinde konumlanmış Genoks spin column üzerine 300  $\mu\text{L}$  PB buffer eklenmiştir.
7. Tüpler 5 dakika 8 000 g'de santrifüj edilmiş, örneklerin üzerinde oluşan sulu üst faz, içerisinde PB buffer olan spin column tüplere dikkatlice aktarılmış ve pellete zarar vermeden pipetlenerek karıştırma sağlanmıştır.
8. Spin column tüpler 3 dakika boyunca bekletilmiştir.
9. Spin column tüpler  $+4^{\circ}\text{C}$ 'ta 8 000 g'de 2 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Column tüplerin altındaki sıvı kısım döküldükten sonra, column tüpler tekrar 2 ml'lik steril mikrosantrifüj tüplerine yerleştirilmiştir.
10. Tüplere 500  $\mu\text{L}$  Wash solüsyon eklendikten sonra 8 000 g'de 2 dakika boyunca santrifüj yapılmıştır. Column tüplerin altındaki sıvı kısım döküldükten sonra, column tüpler tekrar 2 ml'lik steril mikrosantrifüj tüplerine yerleştirilmiştir.
11. 10. adım bir kez daha tekrar edilmiştir.

12. Spin column tüpler 8 000 g'de 1 dakika boyunca santrifüj edilmiş ve spin column, sıvı üst faza temas ettirilmeden 1.5 ml'lik steril mikrosantrifüj tüplerine aktarılmıştır.
13. Spin column tüpler, yıkama solüsyonu sonucunda oluşan etanolün uçması için 3 dakika boyunca bekletilmiştir.
14. Tüplerin üzerine 50 µL Elution Buffer eklenmiş, 3 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
15. Tüpler, 50°C'a ayarlanmış ısıtıcı blokta 3 dakika boyunca bekletilmiştir.
16. 2 dk 8 000 g'de santrifüj edildikten sonra spin column tüplerden ayrılmış, DNA içeren tüpler -80°C'de saklanmıştır.

### **3.2.3. GBS yöntemi ile nükleotid dizilerinin belirlenmesi**

İki havuç ıslah hattının melezi olan bir F1 bitkisinin kendilemesinden elde edilen 94 adet F2 havuç bitkisine ait DNA *ApeKI* enzimi ile kesilmiştir. DNA'nın kesim yerine uygun Illumina DNA dizi primer bölgelerini içeren adaptörler, *ApeKI* enzimi ile kesilen DNA parçalarına eklenmiş ve her bir DNA örneği için adaptörlere barkod nükleotid dizisi, bitkilere ait DNA dizilerini birbirinden ayırmak için eklenmiştir. Adaptör eklenen DNA parçaları PCR'la çoğaltıldıktan sonra tüm DNA örnekleri bir araya getirilerek 1 adet DNA örneği havuzu oluşturulmuştur. Bu havuzda yer alan DNA parçaları, adaptör dizilerinde yer alan primerler ve Illumina HiSeq 2000 (Illumina, San Diego, CA) DNA dizileme platformu kullanılarak, DNA parçalarının nükleotid dizileri belirlenmiştir.

### **3.2.4. SNP moleküler işaretleyicilerinin belirlenmesi**

Stacks programı kullanılarak, 94 genotipe ait DNA dizisi analiz edilmiştir. SNP moleküler işaretleyicileri, Stacks bilgisayar yazılımı kullanılarak tespit edilmiştir. Stacks analiz programında, kullanılacak verinin fastq formatına dönüştürülmesi ve temizlenmesi *process\_radtags.pl* aracı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. *process\_radtags.pl* tek parça GBS datasındaki her bir ham dataya ayrı ayrı uygulanmıştır. Dizileme sırasında belirlenmiş olan barkodlara göre dizilerin gruplandırılması *process\_radtags.pl* ile yapılmıştır. Diziler, her birey için ayrı dosyalar içerisinde barkodlara verilen isimlere göre oluşturulmuştur. Stacks yazılımının aşamalarında *ustacks* programı ile her bir bireyden gelen kısa okumalı haldeki kümeleri

tam eşleşmiş halde dizilenmiş, ayrılmış ve biçimlendirilmiştir. Her bir kümedeki diziler ayrılmış ve k-mer haline dönüştürülmüştür. Oluşan k-mer'ler bir referansa yüklenmiştir. Potansiyel eşleşecek kümeler referanstan sorgulanarak nükleotidler arasındaki mesafe ile bağlı olan ve bir grafik ile sunulabilen bir liste oluşturulmuştur. Eşleşen kümelere varsayılan lokuslar oluşturulmuştur. SNP olabileceği varsayımıyla, her bir lokustaki her bir nükleotid kontrol edilmiştir. SNP ve haplotip dataları, bir konsensus dizi (benzer ya da aynı haldeki diziler) içerisinden kaydedilmiştir. *cstacks* aracı F2 popülasyonundaki bütün potansiyel lokusları bir set haline getirmek amacıyla F2 bitkilerinin verilerini bir katalog haline dönüştürmüştür. *sstacks* aracı popülasyondaki her bir birey içerisinde hangi lokus/haplotip kombinasyonlarının olduğunu belirlemek amacıyla her bir F2 bitkisini katalogla karşılaştırmıştır. SNP moleküler işaretleyicileri *markers.pl* aracı ile belirlenmiş ve *index\_radtags.pl* aracı ile veritabanı indekslenmiştir. *genotypes.pl* ile F2 popülasyonundaki genotipler tespit edilmiş ve JoinMap 4.0 (Van Ooijen ve Voorrips 2001) analiz programında kullanılmak üzere .loc dosyası olarak kaydedilmiştir.

### **3.2.5. Genetik bağlantı haritasının oluşturulması**

Genetik Bağlantı Haritası, elde edilen genotip verilerinin JoinMap 4.0 (Van Ooijen ve Voorrips 2001) analiz programına aktarılmasıyla oluşturulmuştur. F2 popülasyonundaki SNP moleküler işaretleyicileri kullanılarak, genetik bağlantı haritası oluşturulmuştur. Haritanın oluşturulmasında Kosambi Haritalama Fonksiyonu kullanılmıştır.

#### 4. BULGULAR

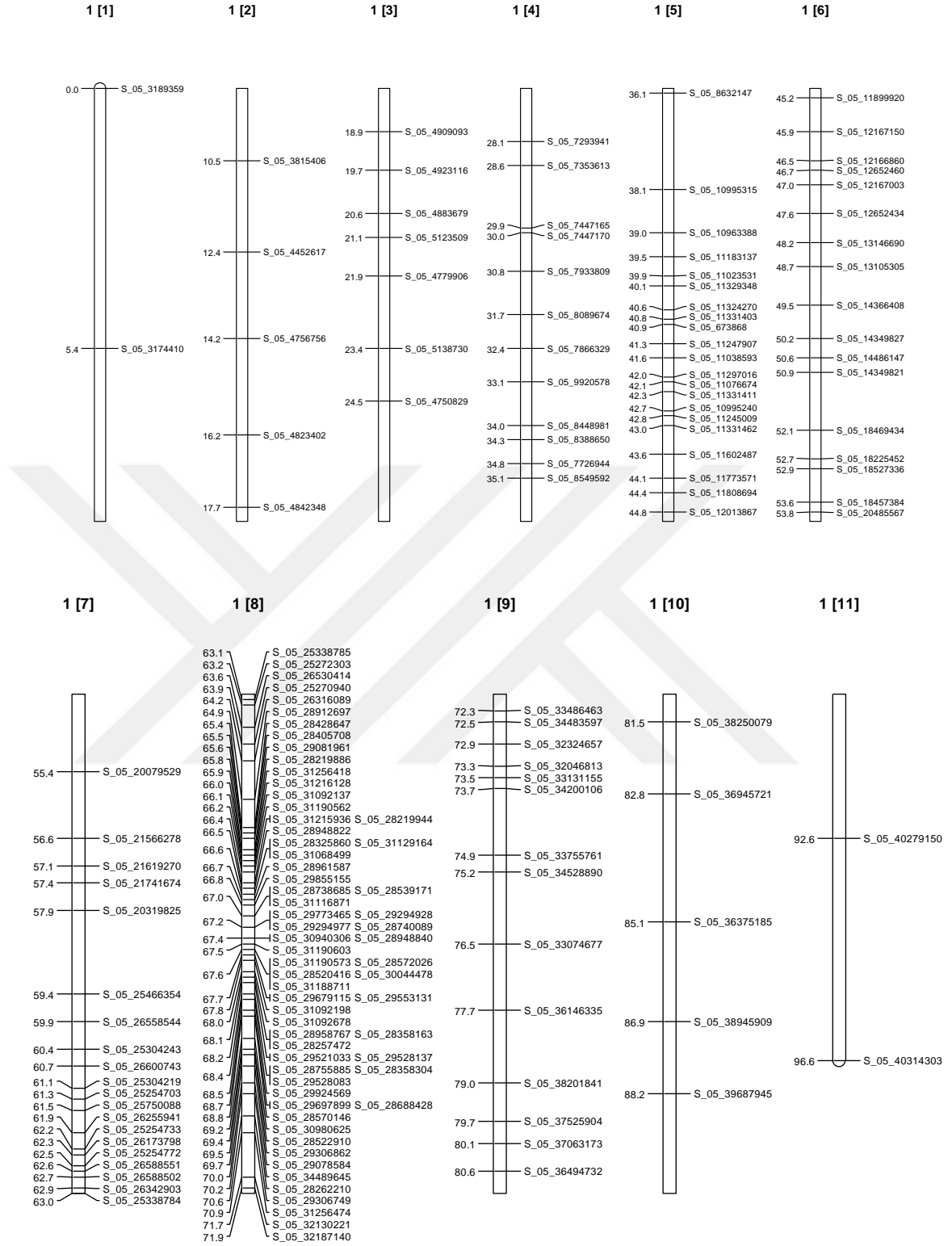
Genotyping by Sequencing yöntemiyle Illumina HiSeq 2000 (Illumina, San Diego, CA) cihazında üretilen F2 popülasyonuna ait tüm bitkilerde minimum DNA parçası sayısı 155 531 236 olarak belirlenmiştir. Bu DNA parçalarının Stacks programında temizlenmesi sonucunda SNP tespiti yapılmıştır. Her bir SNP moleküler işaretleyicisinde en fazla 2 allel olacak şekilde ve data üzerindeki verilerde en fazla %10 hata/okunmama oranı olacak şekilde analiz gerçekleştirilmiştir. Analiz sonucunda 3 801 SNP moleküler işaretleyicisi belirlenmiştir.

Joinmap 4.0 programında F2 popülasyonunun Bağlantı Grupları (LG), en düşük LOD 7.0 değeri kullanılarak oluşturulmuştur. Oluşturulan Bağlantı Grupları'na (LG) ait veriler Çizelge 4.1'de detaylı olarak verilmiştir. 13 adet Bağlantı Grubu (LG) oluşturulmuş, sayıları 54 ve 215 arasında değişen ve toplam 1 464 adet SNP moleküler işaretleyicisi harita üzerine yerleştirilmiştir. Bağlantı gruplarının toplam uzunluğu 793,4 cM olarak belirlenmiştir. Bir bağlantı grubu üzerindeki SNP moleküler işaretleyicilerinin arasındaki en uzun mesafeler ve ortalama mesafeler belirlenmiştir. Haritanın bütünü ele alındığında moleküler işaretleyiciler arası maksimum mesafe 9,5 cM, her bir moleküler işaretleyici arasındaki ortalama mesafe 0,54 cM olarak belirlenmiştir.

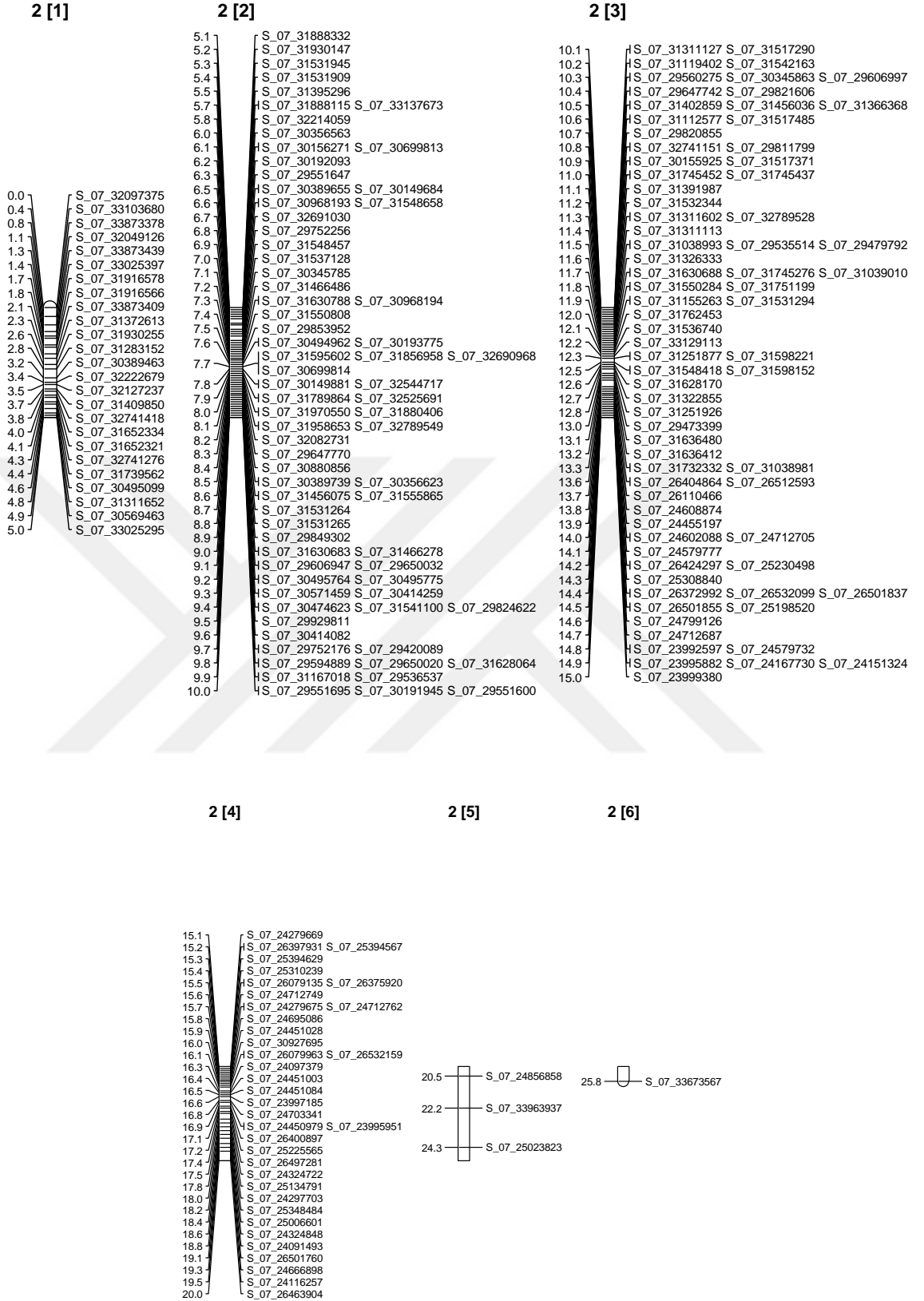
**Çizelge 4.1.** Havuç bitkisinin Bağlantı Grupları (LG) üzerindeki SNP moleküler işaretleyicileri

Bağlantı Grupları (LG)	Haritalanan Moleküler İşaretleyici Sayısı		LG Uzunluğu (cM)	Maksimum Mesafe (cM)	Ortalama Mesafe (cM)
	SNP				
LG1	168		96,6	5,4	0,57
LG2	215		25,8	2,1	0,12
LG3	135		92,1	9,5	0,68
LG4	169		102,1	4,9	0,60
LG5	104		112,6	8,6	1,08
LG6	144		44,4	0,9	0,30
LG7	104		71,9	7,8	0,69
LG8	59		75,1	5,0	1,27
LG9	106		44,3	2,0	0,41
LG10	84		43,0	3,4	0,51
LG11	66		18,8	1,2	0,28
LG12	56		37,3	2,2	0,66
LG13	54		29,4	8,5	0,54
Toplam	1464		793,4	-	0,54

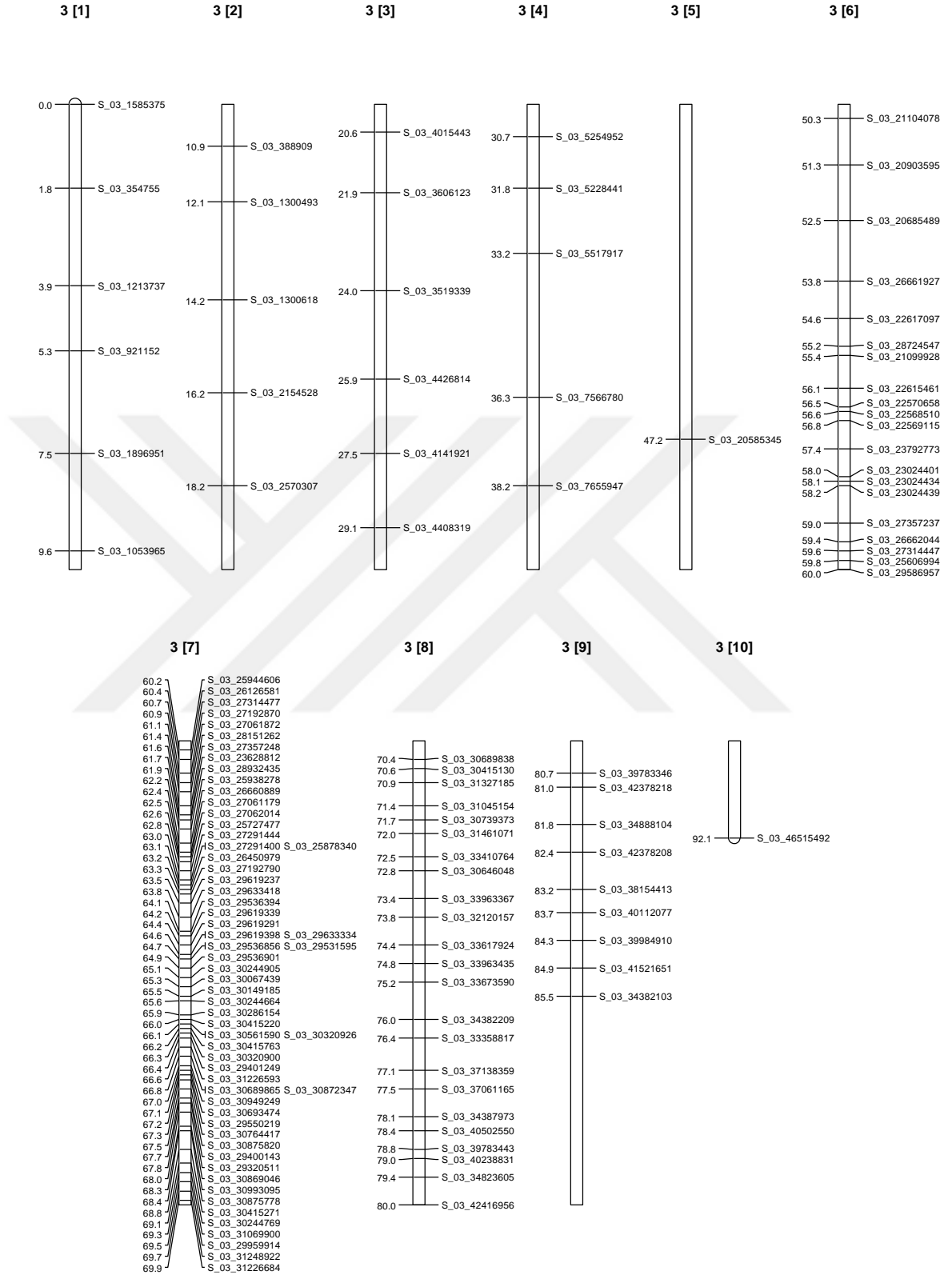




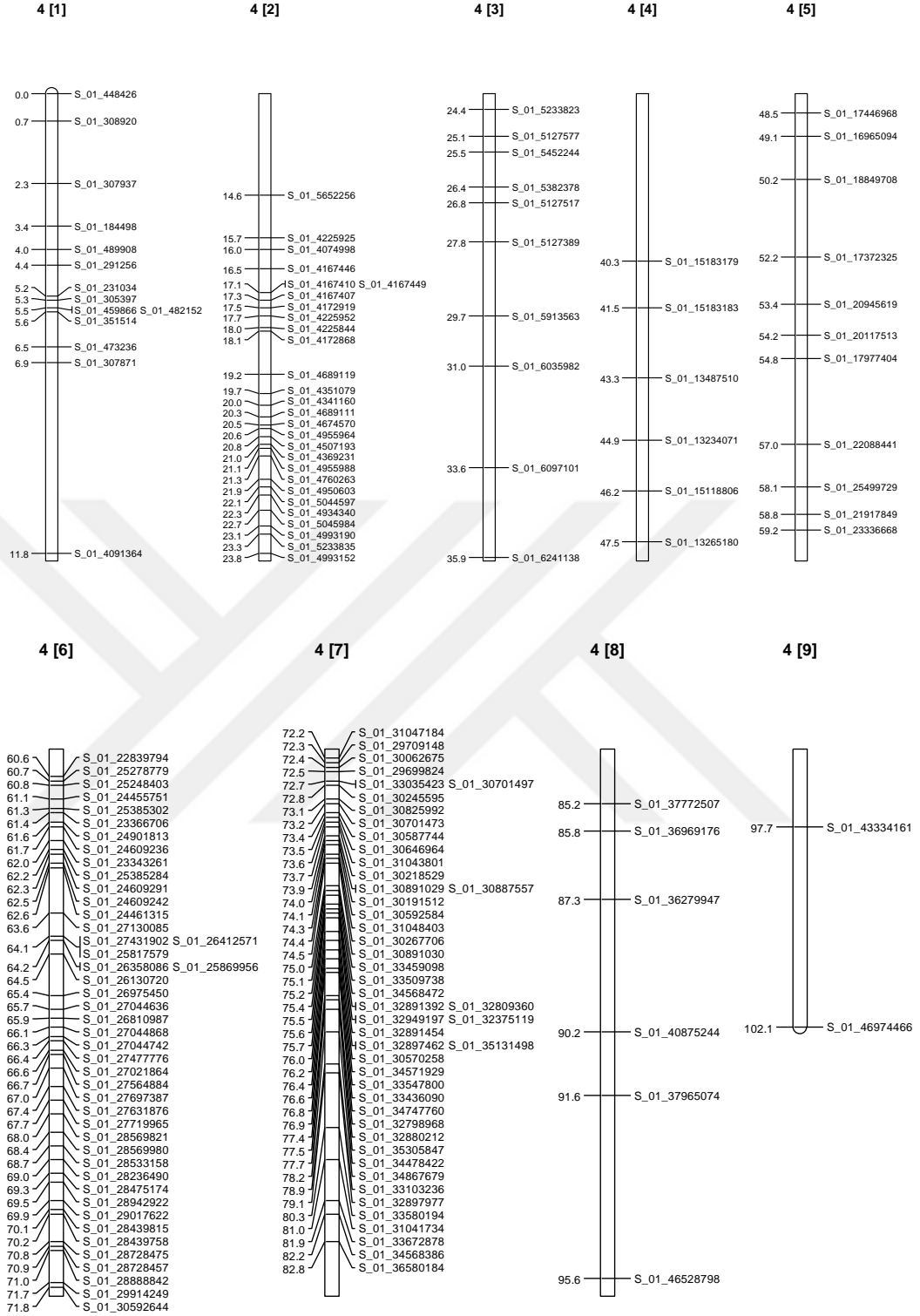
Şekil 4.1. Havuç bitkisinde SNP moleküler işaretleyicilerine dayalı 793,4 cM uzunluğundaki 13 Bağlantı Grubu (LG)



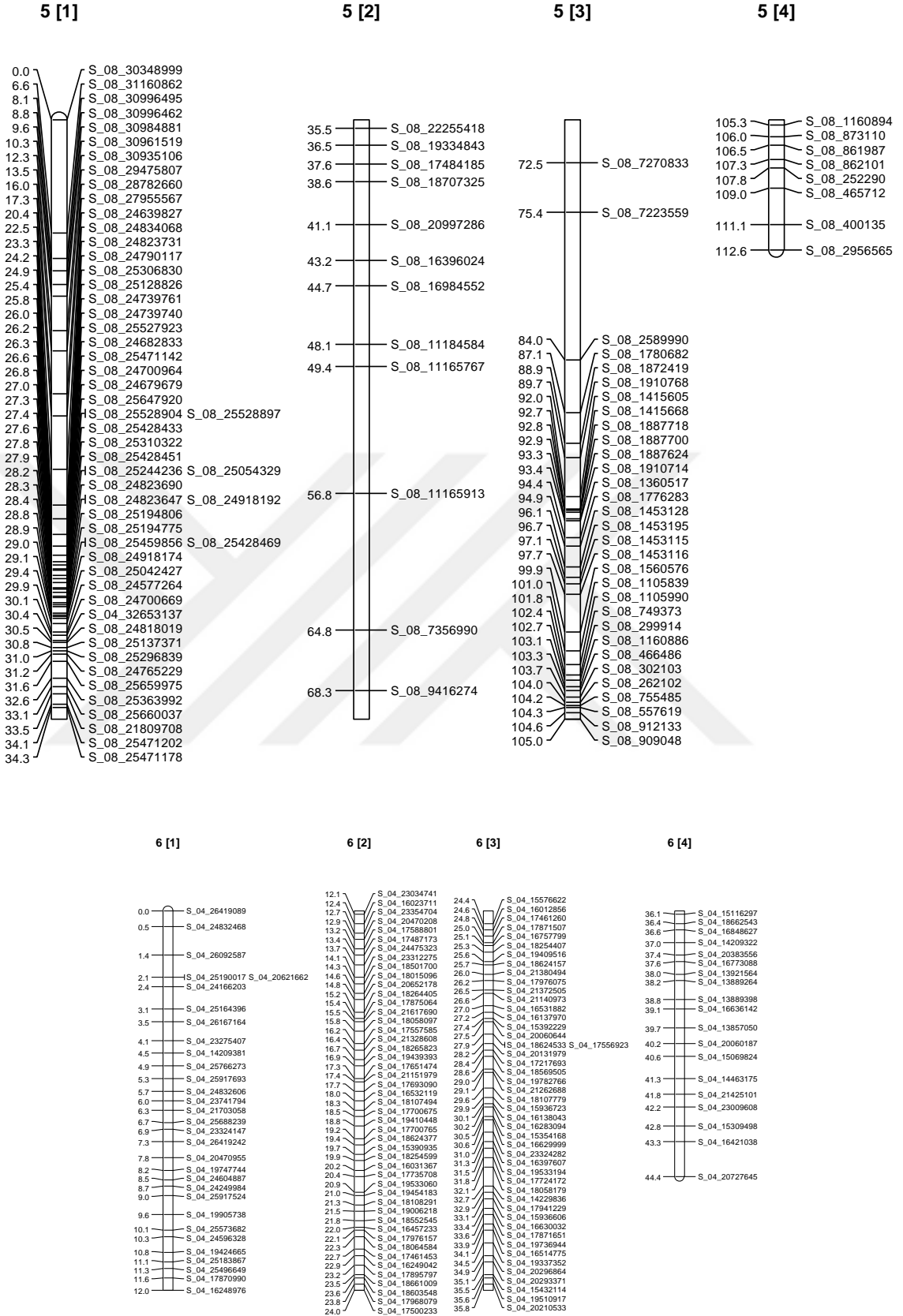
Şekil 4.1. Havuç bitkisinde SNP moleküler işaretleyicilerine dayalı 793,4 cM uzunluğundaki 13 Bağlantı Grubu (LG) (devam)



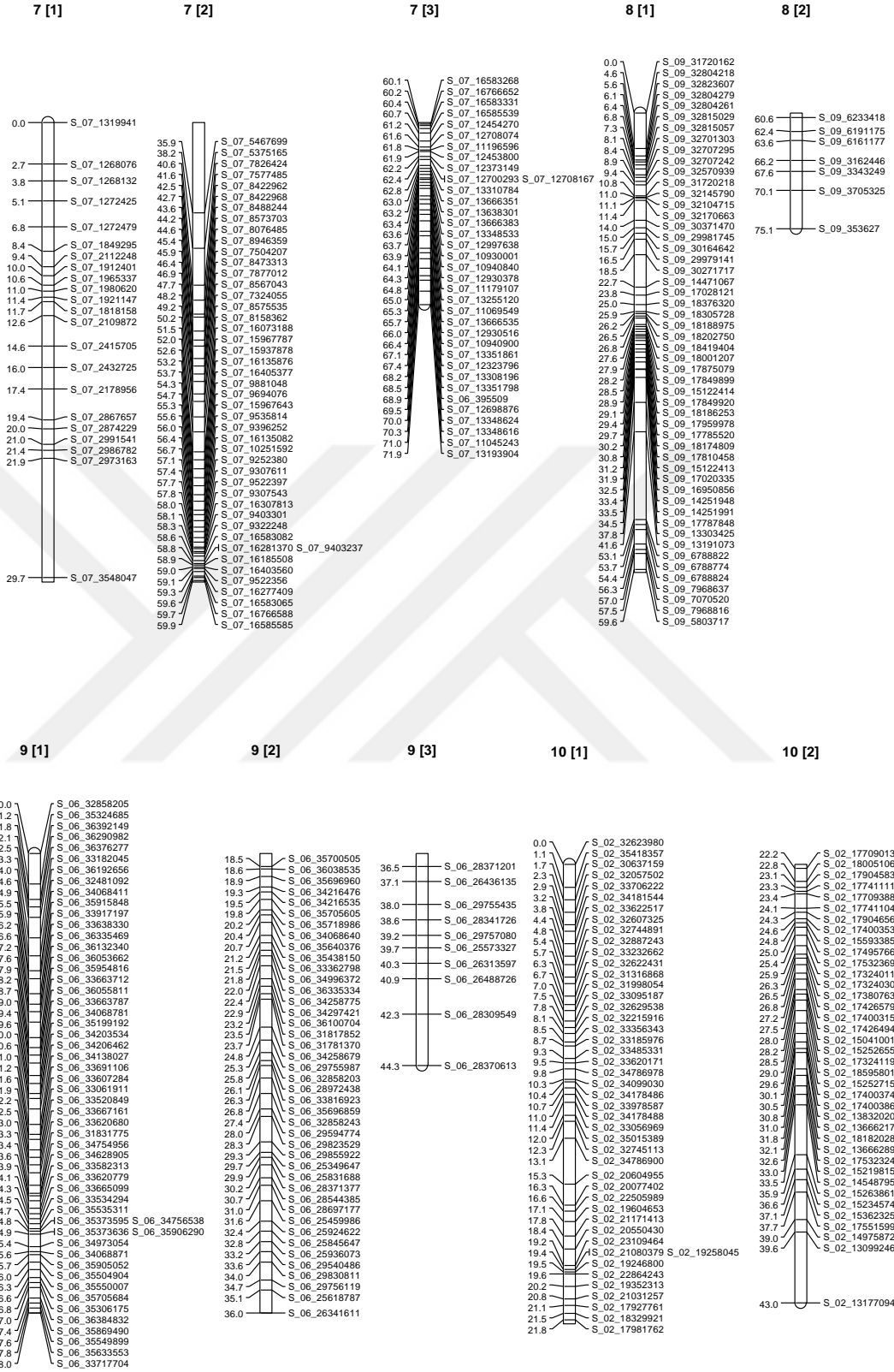
**Şekil 4.1.** Havuç bitkisinde SNP moleküler işaretleyicilerine dayalı 793,4 cM uzunluğundaki 13 Bağlantı Grubu (LG) (devam)



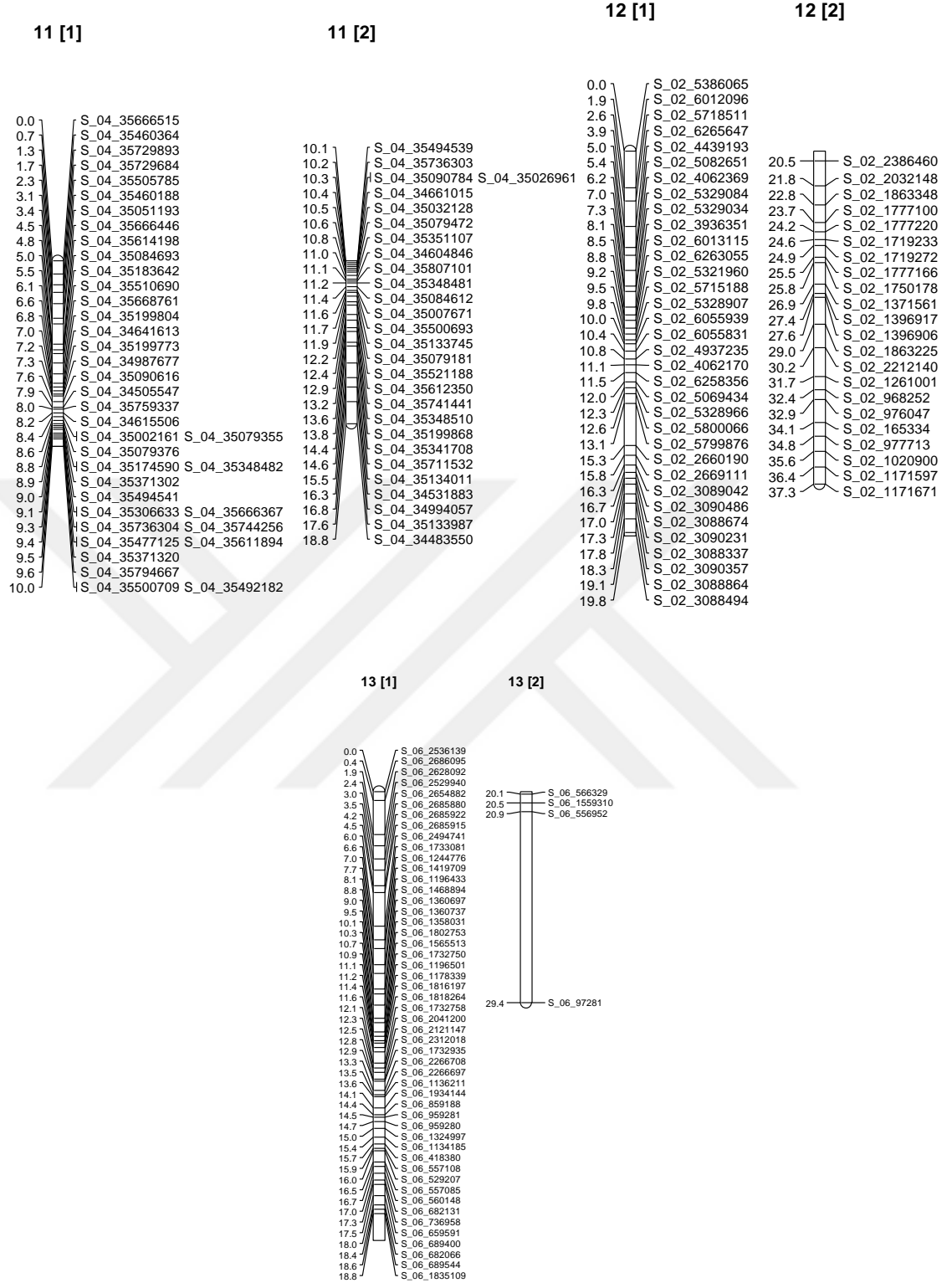
**Şekil 4.1.** Havuç bitkisinde SNP moleküler işaretleyicilerine dayalı 793,4 cM uzunluğundaki 13 Bağlantı Grubu (LG) (devam)



Şekil 4.1. Havaç bitkisinde SNP moleküler işaretleyicilerine dayalı 793,4 cM uzunluğundaki 13 Bağlantı Grubu (LG) (devam)



Şekil 4.1. Havuç bitkisinde SNP moleküler işaretleyicilerine dayalı 793,4 cM uzunluğundaki 13 Bağlantı Grubu (LG) (devam)



**Şekil 4.1.** Havuç bitkisinde SNP moleküler işaretleyicilerine dayalı 793,4 cM uzunluğundaki 13 Bağlantı Grubu (LG) (devam)

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Günümüze kadarki süreçte bitki ıslahçıları rekombinant bireyleri seçmek ve istenilen karakterlere sahip çeşitleri geliştirebilmek için klasik bitki ıslahı tekniklerini kullanmışlardır. Bu teknikler tek gen ile kontrol edilen karakterlerin seçiminde avantaj sağlarken, çoklu gen bölgeleri tarafından kontrol edilen karakterlerin seçiminde ise dezavantaj sağlamaktadır. Ekonomik önemi olan karakterlerin büyük bir kısmı çoklu gen bölgeleri (QTL) tarafından kontrol edilmekte ve aynı zamanda çevresel faktörlerden de etkilenmektedir. Dolayısıyla bu karakterlerin seçiminde klasik bitki ıslahı teknikleri eksik kalmakta ve markör'e dayalı seleksiyon (MAS) tekniklerine ihtiyaç her geçen gün artmaktadır.

SNP keşfi ve keşfedilen bu SNP'lerin valide edilmesi ayrıca valide edilen bu SNP'lerin genotiplerde tekrar amplifikasyon ile taranması, fazla iş gücü isteyen ve zaman alıcı bir metoddur. Ancak NGS ile birlikte bu çalışmaların maliyetleri düşürülmüş ve çok kısa bir sürede tüm genomun analizi hızlı bir şekilde gerçekleştirilebilmektedir. Yeni nesil dizileme teknikleri (NGS) sayesinde Genotyping by Sequencing (GBS) yöntemi, yüksek yoğunluklu markörler elde edebilen, hızlı sonuç alabilen ve düşük maliyetli bir sistem olmuştur. GBS yönteminde, genom öncelikle restriksiyon enzimleri ile kesilmekte ve ardından barkod adaptörlerle ligasyon yapılarak kesim bölgelerinden dizileme yapılmaktadır. GBS ile genotiplendirilmiş popülasyonlardan elde edilen veriler hiçbir işlem yapılmadan analizlerde kullanılabilir.

Dizilemeye dayalı genotipleme teknikleri (GBS, RAD ve RRL), bitki ıslahı ve genetiği çalışmalarında son yıllarda artarak kullanılmaktadır (Poland ve Rife 2012, Sonah ve ark. 2013). GBS, her bireyden eş zamanlı olarak milyonlarca kısa okumaları toplayan ve genom kompleksliğini restriksiyon enzimleri ile azaltarak her bir lokusta dizi (sekans) kapsamını geliştiren NGS tabanlı bir platformdur (Chen ve ark. 2013). GBS, yüksek yoğunluklu SNP keşfi ile SNP analizlerinin etkinliğini arttırmıştır (Sonah ve ark. 2013). GBS ile genetik analiz ve genotipleme çalışmaları için oldukça çok sayıda SNP geliştirilebilmektedir. Aynı zamanda daha az PCR ve pürifikasyon basamaklarına sahip, referans genoma ihtiyaç duymayan ve etkin barkodlama yapılabilen bir yöntemdir. Bu



yüzden bitki ıslahı ve genetiği çalışmalarında giderek önem kazanmaktadır (He ve ark. 2014).

Havuç genomunda GBS yöntemi ile SNP keşfi açısından dünyada yapılan ikinci araştırma bu tez çalışması olmuştur. Toplamda 1 464 adet SNP markörü keşfedilmiştir. Havuç bitkisinde günümüze kadar yapılmış SNP çalışmalarında sınırlı sayıda markör tespit edilmiştir. Yıldız (2009) yapmış olduğu çalışmada 8 adet SNP saptamıştır. Cavagnaro ve ark. (2014) yapmış oldukları çalışmada 300'den fazla SNP tespit etmişlerdir. Grzebelus ve ark. (2014) ise yaptıkları çalışmada 431 adet SNP tespit etmiştir. SNP'ler sıklıkla genomda görüldükleri için 1/1000 baz – 1/100-300 baz nokta mutasyonundan ayrılır ve buna bağlı olarak genotipler arasında polimorfizmi ortaya çıkarır. Bu nedenle SNP'lerin moleküler markör olarak kullanılmaları avantajlıdır (Oraguzie ve ark. 2007). SNP markörleri genom üzerinde göreceli olarak eşit dağılım gösterirken aynı zamanda genotipe özgü DNA bantları sağlar (Chagne ve ark. 2007). Bu nedenlerden dolayı genetik çeşitlilik çalışmalarında SNP markörleri büyük önem arz eder.

Ellison ve ark. (2017) havuç bitkisine ait GBS temelli ilk genetik haritayı yapmışlardır. Bu harita ve bizim yaptığımız çalışmaya ait moleküler markör sayıları ve veriler Çizelge 5.1'de verilmiştir.

**Çizelge 5.1.** Havuç genomunda yapılmış GBS temelli genetik bağlantı haritası çalışmaları

Çaprazlamalar	Pop. Sayısı	Harita Uzunlg. (cM)	Moleküler İşrt. Arası Ort. Uzaklık (cM)	Moleküler İşrt. Arası Maks. Uzaklık (cM)	Ort. Bağlantı Grubu Uzun. (cM)
'Queen Anne's Lace (QAL)' × 'B493'*	213	761,9	1,3	15,9	84,6
2 havuç ıslah hattı**	94	793,4	0,54	9,5	61,0

\* Ellison ve ark. (2017)

\*\* Yaptığımız çalışma (2018)

Yaptığımız çalışmada 13 adet Bağlantı Grubu (LG) oluşturulmuş, sayıları 54 ve 215 arasında değişen toplamda 1 464 adet SNP moleküler işaretleyicisi harita üzerine yerleştirilmiştir. Bağlantı gruplarının toplam uzunluğu 793,4 cM olarak belirlenmiştir. Bir bağlantı grubu üzerindeki SNP moleküler işaretleyicileri arasındaki maksimum ve ortalama mesafeler belirlenmiştir. Çok sayıda rekombinasyon olayından kaynaklanacak hatalar oluşmaması adına, özellikler arasında büyük aralıklar olmamasına özen gösterilmiştir.

Haritanın bütünü ele alındığında moleküler işaretleyiciler arası maksimum mesafe 9,5 cM, her bir moleküler işaretleyici arasındaki ortalama mesafe 0,54 cM olarak belirlenmiştir. Ellison ve ark. (2017) tarafından oluşturulan havuca ait genetik bağlantı haritasıyla kıyaslandığında moleküler işaretleyici mesafeleri birbirlerine daha yakındır. Ortalama bağlantı grubu uzunluğuna bakıldığında ise daha kısa gruplar elde edilmiştir (Çizelge 5.1).

Yaptığımız çalışmada 94 adet F2 bitkisinden elde ettiğimiz verilerle 1 464 adet SNP moleküler işaretleyicisi 13 Bağlantı Grubu (LG) üzerine yerleştirilmiştir. Ellison ve ark. (2017) tarafından oluşturulan haritada ise 213 adet F4 bitkisinden elde edilen verilerle 569 adet SNP moleküler işaretleyicisi haritalanabilmiştir (Çizelge 5.2). Ward ve ark. (2013) tarafından bildirildiği üzere SNP moleküler işaretleyicileri, DNA üzerinde en fazla bulunan mutasyonlar olduğundan, SNP tabanlı bağlantı haritalarının daha yoğunluklu haritalar oldukları söylenebilir.

**Çizelge 5.2.** Havuç genomunda yapılmış GBS temelli genetik bağlantı haritası çalışmalarında moleküler işaretleyicilerin harita üzerine yerleştirilme sayıları

Çaprazlamalar	Popülasyon Sayısı	Haritalanan Moleküler İşaretleyici Sayısı (SNP)	Bağlantı Grubu Sayısı (LG)
'Queen Anne's Lace (QAL)' × 'B493'*	213	569	9
2 havuç ıslah hattı **	94	1464	13

\* Ellison ve ark. (2017)

\*\* Yaptığımız çalışma (2018)

Bu çalışmada, havuç genomunda GBS yöntemi ile çok sayıda yüksek yoğunlukta SNP moleküler işaretleyicisi belirlenmiştir. 94 adet F2 bitkisi ile havuç genetik haritası oluşturulmuştur. Çalışma sonucunda tespit edilen SNP markörlerinden oluşan genetik harita, havuç ıslahında MAS çalışmalarında kullanılabilir niteliktedir. Ayrıca elde edilen haritanın yoğunluğu arttıkça önemli ticari karakterlere ait markörleri tespit etmek amacıyla yapılacak QTL çalışmaları kolaylaşacaktır.

## KAYNAKLAR

- Abdel-Aal, E.S.M., Akhtar, H., Zaheer, K., Ali, R. 2013.** Dietary sources of lutein and zeaxanthin carotenoids and their role in eye health. *Nutrients*, 5(4): 1169-1185.
- Ağaoğlu, Y.S., Ergül, A. 1999.** Amasya üzüm çeşidi ekotiplerinin RAPD markörlerle genetik tanımlanmaları. Türkiye III. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi, 14-17 Eylül, Ankara, 369-372.
- Andolfatto, P., Davison, D., Erezylmaz, D., Hu, T.T., Mast, J., Sunayama-Morita, T., Stern, D.L. 2011.** Multiplexed shotgun genotyping for rapid and efficient genetic mapping. *Genome Res.*, 21(4): 610-617.
- Anonim, 2009.** Havuç Yetiştiriciliği. Mesleki Eğitim ve Öğretim Sisteminin Güçlendirilmesi Projesi Yayınları, [http://hbogm.meb.gov.tr/modulerprogramlar/kursprogramlari/bahcecilik/moduller/havuc\\_yetistiriciligi.pdf](http://hbogm.meb.gov.tr/modulerprogramlar/kursprogramlari/bahcecilik/moduller/havuc_yetistiriciligi.pdf) - (Erişim Tarihi: 10.05.2018).
- Anonim, 2016a.** FAO, Dünya havuç üretimi, Food and Agriculture Organization of the United Nations, <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize> - (Erişim Tarihi: 10.05.2018).
- Anonim, 2016b.** TÜİK, Türkiye havuç üretimi, Türkiye İstatistik Kurumu, <https://biruni.tuik.gov.tr/bitkiselapp/bitkisel.zul> - (Erişim Tarihi: 10.05.2018).
- Anonim, 2016c.** TÜİK, 2012-2017 yılları arasındaki havuç tohumluğu ithalat ve ihracat değerleri, Türkiye İstatistik Kurumu, <https://biruni.tuik.gov.tr/disticaretapp/menu.zul> - (Erişim Tarihi: 10.05.2018).
- Anonymous, 2015.** Carrot museum, “carrot yield”, <http://www.carrotmuseum.co.uk> (Erişim Tarihi: 10.01.2015).
- Arumuganathan, K., Earle, E.D. 1991.** Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Molecular Biology Reporter*, 9: 208-218.
- Badenes, M.L., Parfitt, D.E. 1998.** Phylogeny of the genus Pistacia as determined from analysis of the chloroplast genome. *FAO-Nucis-Newsletter*, 7: 25-26.
- Baird, N.A., Etter, P.D., Atwood, T.S., Currey, M.C., Shiver, A.L., Lewis, Z.A., Selker, E.U., Cresko, W.A., Johnson, E.A. 2008.** Rapid SNP Discovery and Genetic Mapping Using Sequenced RAD Markers. *PLoS ONE*, 3(10): e3376.
- Beckmann, J.S. 1994.** Genetic mapping, an overview, 75-84 pp. Suhai, S. (Ed.), Computational Methods In Genome Research, Plenum Press, New York.
- Beissinger, T.M., Hirsch, C.N., Sekhon, R.S., Foerster, J.M., Johnson, J.M., Muttoni, G., Vaillancourt, B., Buell, C.R., Kaeppler, S.M., de Leon, N. 2013.** Marker density and read depth for genotyping populations using genotyping-by-sequencing. *Genetics*, 193(4): 1073-1081.
- Boiteux, L.S., Belter, J.G., Roberts, P.A., Simon, P.W. 2000.** RAPD linkage map of the genomic region encompassing the root-knot nematode (*Meloidogyne javanica*) resistance locus in carrot. *Theoretical and Applied Genetics*, 100 (3-4): 439-446.
- Boiteux, L.S., Hyman, J.R., Bach, I.C., Fonseca, M.E.N., Matthews, W.C., Roberts, P.A., Simon, P.W. 2004.** Employment of flanking codominant STS markers to estimate allelic substitution effects of a nematode resistance locus in carrot. *Euphytica*, 136: 37-44.
- Bradeen, J.M., Simon, P.W. 2007.** Carrot, In: C. Kole (ed.) Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants. Berlin: Springer-Verlag, 161-184.

- Bradeen, J.M., Simon, P.W. 1998.** Conversion of an AFLP fragment linked to the carrot Y2 locus to a simple, codominant, PCR-based marker form. *Theor Appl Genet.*, 97: 960-967.
- Bradeen, J.M., Vivek, B.S., Simon, P.W. 1997.** Detailed genetic mapping of the Y2 carotenoid locus in carrot. *Journal of Applied Genetics*, 38A: 28-32.
- Budar, F., Pelletier, G. 2001.** Male sterility in plants: occurrence, determinism, significance and use. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III - Sciences de la Vie*, 324(6): 543-550.
- Cansian, R.L., Echeverrigaray, S. 2000.** Discrimination among Cultivars of Cabbage Using Randomly Amplified Polymorphic DNA Markers. *HortScience*, 35(6): 1155-1158.
- Catchen, J.M., Amores, A., Hohenlohe, P., Cresko, W., Postlethwait, J.H. 2011.** Stacks: Building and Genotyping Loci De Novo From Short-Read Sequences. *G3: Genes/Genomes/Genetics*, 1(3): 171-182.
- Cavagnaro, P.F., Iorizzo, M., Yildiz, M., Senalik, D., Parsons, J., Ellison, S., Simon, P.W. 2014.** A gene-derived SNP-based high resolution linkage map of carrot including the location of QTL conditioning root and leaf anthocyanin pigmentation. *BMC Genomics*, 15(1): 1118.
- Chagné, D., Batley, J., Edwards, D., Forster, J.W. 2007.** Single nucleotide polymorphism genotyping in plants. In *Association mapping in plants* (pp. 77-94). Springer, New York, NY.
- Chang, C., Bowman, J.L., DeJohn, A.W., Lander, E.S., Meyerowitz, E.M. 1988.** Restriction fragment length polymorphism linkage map for *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 85(18):6856-6860.
- Cheema, J., Dicks, J. 2009.** Computational approaches and software tools for genetic linkage map estimation in plants. *Brief Bioinform.*, 10(6): 595-608.
- Chen, Q., Ma, Y., Yang, Y., Chen, Z., Liao, R., Xie, X., Wang, Z., He, P., Tu, Y., Zhang, X., Yang, C., Yang, H., Yu, F., Zheng, Y., Zhang, Z., Wang, Q., Pan, Y. 2013.** Genotyping by Genome Reducing and Sequencing for Outbred Animals. *PLoS ONE*, 8(7): e67500.
- Ching, A., Caldwell, C.S., Jung, M., Dolan, M., Smith, O.S.(Howie), Tingey, S., Morgante, M., Rafalski, A.J. 2002.** SNP frequency, haplotype structure and linkage disequilibrium in elite maize inbred lines. *BMC Genet.*, 3:19.
- Coe, E., Hoisington, D.A., Neuffer, M.G. 1990.** Linkage map of corn (maize) (*Zea mays L.*) (2N=10). In *Genetic Maps*, 5th Edn. (O'Brien, S.J., ed.). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, p. 6.39.
- Crawford, J., Brown, P.J., Voigt, T., Lee, D.K. 2016.** Linkage mapping in prairie cordgrass (*Spartina pectinata* Link) using genotyping-by-sequencing. *Molecular Breeding*, 36:62.
- Crossa, J., Beyene, Y., Kassa, S., Pérez, P., Hickey, J.M., Chen, C., de los Campos, G., Burgueño, J., Windhausen, V.S., Buckler, E., Jannink, J.L., Lopez Cruz, M.A., Babu, R. 2013.** Genomic prediction in maize breeding populations with genotyping-by-sequencing. *G3: Genes/Genomes/Genetics*, 3(11): 1903-1926.
- Davey, J.W., Hohenlohe, P.A., Etter, P.D., Boone, J.Q., Catchen, J.M., Blaxter, M.L. 2011.** Genome-wide genetic marker discovery and genotyping using next-generation sequencing. *Nature Reviews Genetics*, 12(7): 499-510.

- Degner, J.C. 2014.** Using a genotyping-by-sequencing (GBS) approach to elucidate population structure in Garry Oak (*Quercus garryana*) [G]. doi: <http://dx.doi.org/10.14288/1.0075637>.
- Deschamps, S., Campbell, M.A. 2010.** Utilization of next-generation sequencing platforms in plant genomics and genetic variant discovery. *Molecular Breeding*, 25: 553-570.
- Deschamps, S., Liaca, V., May, G.D. 2012.** Genotyping-by-Sequencing in Plants. *Biology*, 1(3): 460-483.
- Donato, M., Peters, S.O., Mitchell, S.E., Hussain, T., Imumorin, I.G. 2013.** Genotyping-by-Sequencing (GBS): A Novel, Efficient and Cost-Effective Genotyping Method for Cattle Using Next-Generation Sequencing. *PLoS ONE*, 8(5): e62137.
- Donis-Keller, H., Green, P., Helms, C., Cartinhour, S., Weiffenbach, B., Stephens, K., Keith, T.P., Bowden, D.W., Smith, D.R., Lander, E.S. 1987.** A genetic linkage map of the human genome. *Cell*, 51(2): 319-337.
- Duvick, D.N. 1996.** Plant Breeding, an Evolutionary Concept. *Crop Science*, 36: 539-548.
- Echt, C., Knapp, S., Liu, B.H. 1992.** Genome mapping with non-inbred crosses using GMendel 2.0. *Maize Genet. Coop. Newsl*, 66: 27-29.
- Ekbiç, E., Abak, K., Büyükalaca, S., Yılmaz, M.A. 1999.** Biberde Patates Y Virüsü'ne (PVY) dayanıklılık özelliği için RAPD markır'ların araştırılması. Türkiye III. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi, 14-17 Eylül, Ankara, 449-463.
- Ellison, S., Iorizzo, M., Senalik, D., Simon, P.W. 2017.** The next generation of carotenoid studies in carrot (*Daucus carota* L.). *Acta Horti*, 1153: 93-100. doi: 10.17660/ActaHortic.2017.1153.14.
- Elshire, R.J., Glaubitz, J.C., Sun, Q., Poland, J.A., Kawamoto, K., Buckler, E.S., Mitchell, S.E. 2011.** A Robust, Simple Genotyping-by-Sequencing (GBS) Approach for High Diversity Species. *PLoS ONE*, 6(5): e19379.
- Erensayın, C. 2000.** Genetik. 119-134 s, 2.Baskı, Nobel Yayın Dağıtım, Ankara.
- Fan, J.B., Chee, M.S., Gunderson, K.L. 2006.** Highly parallel genomic assays. *Nat Rev Genet.*, 7(8): 632-644.
- Fierst, J.L. 2015.** Using linkage maps to correct and scaffold de novo genome assemblies: methods, challenges, and computational tools. *Front Genet.*, 6: 220.
- Gardner, K.M., Brown, P., Cooke, T.F., Cann, S., Costa, F., Bustamante, C., Velasco, R., Troglio, M., Myles, S. 2014.** Fast and cost-effective genetic mapping in apple using next-generation sequencing. *G3: Genes/Genomes/Genetics*, 4(9): 1681-1687.
- Glaubitz, J.C., Casstevens, T.M., Lu, F., Harriman, J., Elshire, R.J., Sun, Q., Buckler, E.S. 2014.** TASSEL-GBS: A High Capacity Genotyping by Sequencing Analysis Pipeline. *PLoS ONE*, 9(2): e90346.
- Goldman, I.L., Paran, I., Zamir, D. 1995.** Quantitative trait locus analysis of a recombinant inbred line population derived from a *Lycopersicon esculentum* x *Lycopersicon cheesmanii* cross. *Theor Appl Genet.*, 90(7-8): 925-932.
- Gore, M.A., Chia, J.M., Elshire, R.J., Sun, Q., Ersoz, E.S., Hurwitz, B.L., Peiffer, J.A., McMullen, M.D., Grills, G.S., Ross-Ibarra, J., Ware, D.H., Buckler, E.S. 2009.** A First-Generation Haplotype Map of Maize. *Science*, 326(5956): 1115-1117.

- Göçmen, M., Çakır, C., Tör, M., Polat, İ. 1999a.** Kara Limon ve İtalyan Memeli limon çeşitlerinin RAPD markörlerle genetik farklılığının tespiti. Türkiye III. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi, 14-17 Eylül, Ankara, 1-5.
- Göçmen, M., Polat, İ., Özçelik, N., Ekiz, H. 1999b.** Domateslerde (*Lycopersicon esculentum* Mill.) DNA parmak izlerinin RAPD markörlerle belirlenmesi, Türkiye III. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi, 14-17 Eylül, Ankara, 469-473.
- Griffiths, A.J.F., Miller, J.H., Suzuki, D.T., Lewontin, R.C., Gelbart, W.M. 1993.** An Introduction to Genetic Analysis (5th eds.). Chapter 5, New York: W.H. Freeman and Company.
- Griffiths, A.J.F., Wessler, S.R., Lewontin, R.C., Gelbart, W.M., Suzuki, D.T., Miller, J.H. 2005.** Introduction to Genetic Analysis (8th eds.). Chapter 8, New York: W.H. Freeman and Company.
- Grzebelus, D., Iorizzo, M., Senalik, D., Ellison, S., Cavagnaro, P., Macko-Podgorni, A., Heller-Uszynska, K., Kilian, A., Nothnagel, T., Allender, C., Simon, P.W., Baranski, R. 2014.** Diversity, genetic mapping, and signatures of domestication in the carrot (*Daucus carota* L.) genome, as revealed by Diversity Arrays Technology (DArT) markers. *Molecular Breeding*, 33(3): 625-637.
- Guajardo, V., Solís, S., Sagredo, B., Gainza, F., Muñoz, C., Gasic, K., Hinrichsen, P. 2015.** Construction of High Density Sweet Cherry (*Prunus avium* L.) Linkage Maps Using Microsatellite Markers and SNPs Detected by Genotyping-by-Sequencing (GBS). *PLoS ONE*, 10(5): e0127750.
- Guerra-Vargas, M., Jaramilla-Flores, M.E., Dorantes-Alvarez, L., Hernandez-Sanchez, H. 2001.** Carotenoid Retention in Canned Pickled Jalapeño Peppers and Carrots As Affected by Sodium Chloride, Acetic Acid, and Pasteurization. *Journal of Food Science*, 66: 620-626.
- Günay, A. 2005.** Sebze Yetiştiriciliği. 88-113 s, İzmir.
- Hart, D.J., Scott, K.J. 1995.** Development and evaluation of an HPLC method for the analysis of carotenoids in foods, and the measurement of the carotenoid content of vegetables and fruits commonly consumed in the UK. *Food Chemistry*, 54(1): 101-111.
- Havey, M.J. 1991.** Phylogenetic relationships among cultivated *Allium* species from restriction enzyme analysis of the chloroplast genome. *Theor Appl Genet.*, 81(6): 752-757.
- He, J., Zhao, X., Laroche, A., Lu, Z.X., Liu, H., Li, Z. 2014.** Genotyping-by-sequencing (GBS), an ultimate marker-assisted selection (MAS) tool to accelerate plant breeding. *Front Plant Sci.*, 5: 484.
- He, P., Li, J.Z., Zheng, X.W., Shen, L.S., Lu, C.F., Chen, Y., Zhu, L.H. 2001.** Comparison of Molecular Linkage Maps and Agronomic Trait Loci between DH and RIL Populations Derived from the Same Rice Cross. *Crop Science*, 41: 1240-1246.
- Joshi, S.P., Gupta, V.S., Aggarwal, R.K., Ranjekar, P.K., Brar, D.S. 2000.** Genetic diversity and phylogenetic relationship as revealed by inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism in the genus *Oryza*. *Theoretical and Applied Genetics*, 100: 1311-1320.
- Just, B.J., Santos, C.A., Fonseca, M.E., Boiteux, L.S., Oloizia, B.B., Simon P.W. 2007.** Carotenoid biosynthesis structural genes in carrot (*Daucus carota*): isolation, sequence-characterization, single nucleotide polymorphism (SNP) markers and genome mapping. *Theor Appl Genet.*, 114(4): 693-704.

- Kappes, S.M. 1999.** Utilization of gene mapping information in livestock animals. *Theriogenology*, 51(1): 135-147.
- Kiracı, S., Padem, H. 2015.** Havuç Yetiştiriciliğinde Bitki Aktivatörü ve Mikrobiyal Gübre Uygulamalarının Verim ve Bazı Fizikokimyasal Parametreler Üzerine Etkisi. *SDÜ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 10(1): 66-72.
- Kumar, S., Stecher, G., Peterson, D., Tamura, K. 2012.** MEGA-CC: computing core of molecular evolutionary genetics analysis program for automated and iterative data analysis. *Bioinformatics*, 28(20): 2685-2686.
- Lander, E.S., Green, P., Abrahamson, J., Barlow, A., Daly, M.J., Lincoln, S.E., Newberg, L.A. 1987.** MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics*, 1(2): 174-181.
- Le Clerc, V., Briard, M., Revollon, P. 2002.** Influence of number and map distribution of AFLP markers on similarity estimates in carrot. *Theor Appl Genet.*, 106(1): 157-162.
- Lee, M. 1995.** DNA Markers and Plant Breeding Programs. *Advances in Agronomy*, 55: 265-344.
- Lewin, H.A., Larkin, D.M., Pontius, J., O'Brien, S.J. 2009.** Every genome sequence needs a good map. *Genome Res.*, 19(11): 1925-1928.
- Liu, B.H. 1998.** Statistical Genomics: Linkage, Mapping, and QTL Analysis. *CRC Press*, Boca Raton, New York.
- Li, G., Quiros, C.F. 2000.** Use of Amplified Fragment Length Polymorphism Markers for Celery Cultivar Identification. *HortScience*, 35(4): 726-728.
- Lobo, I., Shaw, K. 2008.** Discovery and Types of Genetic Linkage. *Nature Education*, 1(1): 139.
- Lombardi, M., Materne, M., Cogan, N.O., Rodda, M., Daetwyler, H.D., Slater, A.T., Forster, J.W., Kaur, S. 2014.** Assessment of genetic variation within a global collection of lentil (*Lens culinaris Medik.*) cultivars and landraces using SNP markers. *BMC Genet.*, 15: 150.
- Lucier, G., Lin, B.H. 2007.** Factors Affecting Carrot Consumption in the United States. Economic Research Service, [https://www.ers.usda.gov/webdocs/publications/39511/11719\\_vgs31901\\_1\\_.pdf?v=41056](https://www.ers.usda.gov/webdocs/publications/39511/11719_vgs31901_1_.pdf?v=41056) -(10.05.2018).
- Maçkeviç, P.F. 1951.** Anadolu Havuçları. Türkiye'nin Zirai Bünyesi (Anadolu), Türkiye Şeker Fabrikaları A.Ş. Neşriyatı, No:20.
- Metzker, M.L. 2010.** Sequencing technologies – the next generation. *Nat Rev Genet.*, 11(1): 31-46.
- Nam, H.G., Giraudat, J., Den Boer, B., Moonan, F., Loos, W., Hauge, B.M., Goodman, H.M. 1989.** Restriction Fragment Length Polymorphism Linkage Map of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 1(7): 699-705.
- Niemann, M., Westphal, L., Wricke, G. 1997.** Analysis of microsatellite markers in carrot (*Daucus carota L. sativus*). *Journal of Applied Geneics*, 38A: 20-27.
- Nothnagel, T., Ahne, R., Straka, P. 2005.** Morphology, inheritance and mapping of a compressed lamina mutant of carrot. *Plant Breeding*, 124(5): 481-486.
- Nothnagel, T., Straka, P. 2003.** Inheritance and mapping of a yellow leaf mutant of carrot (*Daucus carota*). *Plant Breeding*, 122(4): 339-342.
- Onus, A.N. 1999a.** Capsicum'da bazı marker genler arasında linkage çalışmaları. Türkiye III. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi, 14-17 Eylül, Ankara, 474-477.



- Onus, A.N. 1999b.** Üçfarklı Capsicum türünün (*C. annum*, *C. chacoense*, *C. baccatum*) izo enzim markırları ile tanılanması. Türkiye III. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi, 14-17 Eylül, Ankara, 454-455.
- Oraguzie, N.C., Rikkerink, E.H.A., Gardiner, S.E., De Silva, H.N. 2007.** Association Mapping in Plants. *Springer*, New York, doi: 10.1007/978-0-387-36011-9-1.
- Özşensoy, Y., Kurar, E. 2013.** Genetik bağlantı analizi ve uygulama alanları. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 10(1): 53-62.
- Pan, J., Wang, B., Pei, Z.Y., Zhao, W., Gao, J., Mao, J.F., Wang, X.R. 2015.** Optimization of the genotyping-by-sequencing strategy for population genomic analysis in conifers. *Mol Ecol Resour.*, 15(4): 711-722.
- Park, Y.H., Sensoy, S., Wye, C., Antonise, R., Peleman, J., Havey, M.J. 2000.** A genetic map of cucumber composed of RAPDs, RFLPs, AFLPs, and loci conditioning resistance to papaya ringspot and zucchini yellow mosaic viruses. *Genome*, 43(6): 1003-1010.
- Paterson, A.H., Wing, R.A. 1993.** Genome mapping in plants. *Current Opinion in Biotechnology*, 4(2): 142-147.
- Paterson, A.H. 1996.** Making genetic maps. In: Paterson A.H. (ed.) Genome mapping in plants, San Diego, California: Academic Press, Austin, Texas, 23-29.
- Peterson, C.E., Simon, P.W. 1986.** Carrot Breeding. In: Breeding Vegetable Crops (Edit. Mark J.B.), 321-356.
- Poland, J.A., Rife, T.W. 2012.** Genotyping-by-Sequencing for Plant Breeding and Genetics. *The Plant Genome*, 5: 92-102.
- Polat, İ., Göçmen, M., Onur, C. 1999.** Trabzon hurması (*Diospyros Kaki L.*) Tiplerinin RAPD Markörlerle Belirlenmesi. Türkiye III. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi, 14-17 Eylül, Ankara, 22-26.
- Pootakham, W., Ruang-Areerate, P., Jomchai, N., Sonthirod, C., Sangrakru, D., Yoocha, T., Theerawattanasuk, K., Nirapathpongporn, K., Romruensukharom, P., Tragoonrung, S., Tangphatsornruang, S. 2015.** Construction of a high-density integrated genetic linkage map of rubber tree (*Hevea brasiliensis*) using genotyping-by-sequencing (GBS). *Front Plant Sci.*, 6: 367.
- Risch, N. 1992.** Genetic Linkage: Interpreting Lod Scores. *Science*, 255: 803-804.
- Rubatzky, V.E., Quiros, C.F., Simon, P.W. 1999.** Carrots and Related Vegetable Umbelliferae. Crop Production Science in Horticulture, *CABI Publishing*, 7: 1-8.
- Sáenz Lain, C. 1981.** Research on *Daucus L.* (Umbelliferae). *Anales del Jardín Botánico de Madrid*, 37: 481-533.
- Safadi, B. 2008.** Characterization and distribution of *Daucus* species in Syria. *Biologia*, 63(2): 177-182.
- Santos, C.A.F. 2001.** Biometrical Studies and Quantitative Trait Loci Associated with Major Products of the Carotenoid Pathway of Carrot (*Daucus carota L.*). *PhD Thesis*, University of Wisconsin-Madison, USA.
- Santos, C.A.F., Simon, P.W. 2004.** Merging Carrot Linkage Groups based on Conserved Dominant AFLP Markers in F2 Populations. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 129(2): 211-217.
- Schlötterer, C. 2004.** The evolution of molecular markers-just a matter of fashion. *Nat Rev Genet.*, 5(1): 63-69.
- Schulz, B., Westphal, L., Wricke, G. 1994.** Linkage groups of isozymes, RFLP and RAPD markers in carrot (*Daucus carota L. sativus*). *Euphytica*, 74: 67-76.

- Semagn, K., Bjørnstad, Å., Ndjiondjop, M.N. 2006a.** Principles, requirements and prospects of genetic mapping in plants. *African Journal of Biotechnology*, 5(25): 2569-2587.
- Semagn, K., Bjørnstad, Å., Ndjiondjop, M.N. 2006b.** An Overview of Molecular Marker Methods for Plant. *African Journal of Biotechnology*, 5(25): 2540-2568.
- Sermenli, T. 2012.** Önemli bir üretim bölgesi olan Hatay Kırıkhan'da havuç (*Daucus carota* L.) yetiştiriciliği. 9. Sebze Tarımı Sempozyumu, 12-14 Eylül 2012, Konya, 266-271.
- Sevindik, E., Coşkun, F., Çetiner, N.G., Selvi, S., Şahin, N. 2013.** The genomic DNA isolation methods comparative analysis upon some Sideritis (Labiatae) and Serratula (Asteraceae) taxa. *Biological Diversity and Conservation*, 6(2): 16-21.
- Shebaby, W.N., El-Sibai, M., Smith, K.B., Karam, M.C., Mroueh, M., Daher, C.F. 2013.** The antioxidant and anticancer effects of wild carrot oil extract. *Phytother Res.*, 27(5): 737-744.
- Shendure, J., Ji, H. 2008.** Next-generation DNA sequencing. *Nature Biotechnology*, 26: 1135-1145.
- Simon, P.W. 1993.** Carrot, *Daucus carota* L. In: Genetic Improvement of Vegetable Crops, Kalloo G. and BO Bergh (Eds), Pergamon Press, Oxford, pp. 479-484.
- Simon, P.W. 2000.** Domestication, Historical Development and Modern Breeding of Carrot. *Plant Breeding Reviews*, 19: 157-190.
- Simon, P.W., Freeman, R.E., Vieira, J.V., Boiteux, L.S., Briard, M., Nothnagel, T., Michalik, B., Kwon, Y.S. 2008.** Carrot. In Phoens, J., Nuez, F. (Ed.), Vegetable II. 327-358, *Springer Berlin Heidelberg*, New York, USA.
- Simon, P.W., Goldman, I.L. 2006.** Carrot. In: Singh R.J. (ed) Genetic resources, chromosome engineering, and crop improvement, Vegetable Crops, *CRC Press*, 3: 497-517.
- Sonah, H., Bastien, M., Iquiria, E., Tardivel, A., Légaré, G., Boyle, B., Normandeau, E., Laroche, J., Larose, S., Jean, M., Belzile, F. 2013.** An Improved Genotyping by Sequencing (GBS) Approach Offering Increased Versatility and Efficiency of SNP Discovery and Genotyping. *PLoS ONE*, 8(1): e54603.
- Spindel, J., Wright, M., Chen, C., Cobb, J., Gage, J., Harrington, S., Lorieux, M., Ahmadi, N., McCouch, S. 2013.** Bridging the genotyping gap: using genotyping by sequencing (GBS) to add high-density SNP markers and new value to traditional biparental mapping and breeding populations. *Theor Appl Genet.*, 126(11): 2699-2716.
- Staub, J.E., Box, J., Meglic, V., Horejsi, T.F., McCreight, J.D. 1997.** Comparison of isozyme and random amplified polymorphic DNA data for determining intraspecific variation in Cucumis. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 44(3): 257-269.
- Stein, M., Nothnagel, T. 1995.** Some remarks on carrot breeding (*Daucus carota sativus* Hoffm.). *Plant Breeding*, 114(1): 1-11.
- Sturtevant, A.H. 1913.** The linear arrangement of six - linked factors in *Drosophila*, as shown by their mode of association. *Journal of Experimental Zoology*, 14(1): 43-59.
- Suiter, K.A., Wendel, J.F., Case, J.S. 1983.** LINKAGE-1: a PASCAL computer for the detection and analysis of genetic linkage. *Journal of Heredity*, 74(3): 203-204.
- Şalk, A., Arın, L., Deveci, M., Polat, S. 2008.** Özel Sebzecilik. Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, Tekirdağ, ISBN 978-9944-0786-0-3.
- Tadmor, Y., Zamir, D., Ladizinsky, G. 1987.** Genetic mapping of an ancient translocation in the genus *Lens*. *Theor Appl Genet.*, 73(6): 883-892.

- Tathoğlu, T. 2008.** Hibrit çeşit ıslahı ve hibrit çeşit ıslahında kullanılan genetik mekanizmalar. VII. Sebze Tarım Sempozyumu, 26-29 Ağustos 2008, Yalova.
- Temizkan, G., Yilmazer, S., Öztürk, M., Arı, Ş., Ertan, H., Sarıkaya, A.T., Arda, N. 2008.** Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler.
- Thompson, D.J. 1962.** Natural Cross - Pollination in Carrots. *Proc Am Soc Hort Sci.*, 81: 332-334.
- Vaishnava, S., Hooper, L.V. 2011.** Eat Your Carrots! T Cells Are RARing to Go. *Immunity*, 34(3): 290-292.
- Van Ooijen, J.W., Voorrips, R.E. 2001.** JoinMap 3.0, Software for the calculation of genetic linkage maps. *Plant Research International*, Wageningen, The Netherlands, 1-51.
- Vivek, B.S., Simon, P.W. 1999.** Linkage relationships among molecular markers and storage root traits of carrot (*Daucus carota* L. ssp. *sativus*). *Theoretical Applied Genetics*, 99(1-2): 58-64.
- Wang, J., Li, L., Zhang, G. 2016.** A High - Density SNP Genetic Linkage Map and QTL Analysis of Growth - Related Traits in a Hybrid Family of Oysters (*Crassostrea gigas* x *Crassostrea angulata*) Using Genotyping-by-Sequencing. *G3: Genes/Genomes/Genetics*, 6(5): 1417-1426.
- Ward, J.A., Bhangoo, J., Fernández - Fernández, F., Moore, P., Swanson, J.D., Viola, R., Velasco, R., Bassil, N., Weber, C.A., Sargent, D.J. 2013.** Saturated linkage map construction in *Rubus idaeus* using genotyping by sequencing and genome - independent imputation. *BMC Genomics*, 14:2.
- Westphal, L., Wricke, G. 1997.** Construction of a linkage map of *Daucus carota* L. *sativus* and its application for the mapping of disease resistance and restorer genes. *J Appl Genet.*, 38A: 13-19.
- Westphal, L., Wricke, G. 1989.** Genetic Analysis of DIA, GOT and PGI Isozyme Loci in *Daucus carota* L. ssp. *sativas*. *Plant breeding*, 102(1): 51-57.
- Westphal, L., Wricke, G. 1991.** Genetic and linkage analysis of isozyme loci in *Daucus carota* L. *Euphytica*, 56(3): 259-267.
- Winter, P., Kahl, G. 1995.** Molecular marker technologies for plant improvement. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 11(4): 438-448.
- Yang, X., Quiros, C. 1993.** Identification and classification of celery cultivars with RAPD markers. *Theor Appl Genet.*, 86(2-3): 205-212.
- Yau, Y.Y., Santos, K., Simon, P. 2005.** Molecular Tagging and Selection for Sugar Type in Carrot Roots Using Co-dominant, PCR-based Markers. *Molecular Breeding*, 16(1): 1-10.
- Yıldız, M. 2009.** Havuçlarda antosiyanin sentezlenmesini etkileyen genlerin biyosentezi ile mor ve sarı renkleri veren P1 ve Y2 genlerinin haritalanması. *Doktora Tezi*, ÇÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Adana.
- You, X., Shu, L., Li, S., Chen, J., Luo, J., Lu, J., Mu, Q., Bai, J., Xia, Q., Chen, Q., Cai, Y., Zhang, H., Chen, G., Lin, H., Zhang, Y., Shi, Q. 2013.** Construction of high - density genetic linkage maps for orange - spotted grouper *Epinephelus coioides* using multiplexed shotgun genotyping. *BMC Genetics*, 14: 113.
- Zhang, Z., Wei, T., Zhong, Y., Li, X., Huang, J. 2016.** Construction of a high - density genetic map of *Ziziphus jujuba* Mill. using genotyping by sequencing technology. *Tree Genetics & Genomes*, 12: 76.

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Ozan SARCAN  
Doğum Yeri ve Tarihi : Bursa / 1992  
Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)  
Lise : Bursa Görükle Çok Programlı Lisesi / 2010  
Lisans : Bursa Uludağ Üniversitesi-Bahçe Bitkileri / 2015  
Yüksek Lisans : Bursa Uludağ Üniversitesi-Bahçe Bitkileri / 2018

İletişim (e-posta) : ozansarcan@gmail.com

