



EGE ÜNİVERSİTESİ

DOKTORA TEZİ

**FASULYE (*Phaseolus vulgaris* L.)’DE
EKONOMİK ÖNEME SAHİP BAZI
AGRONOMİK KARAKTERLERİ KONTROL
EDEN DNA MARKIRLARININ İLİŞKİ
HARİTALAMASI İLE SAPTANMASI**

Seda NEMLİ

Tez Danışmanı : Prof. Dr. M. Bahattin TANYOLAÇ

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu : 614.02.07

Sunuş Tarihi : 04.06.2013

Bornova-İZMİR

2013

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

**FASULYE (*Phaseolus vulgaris* L.)’DE EKONOMİK
ÖNEME SAHİP BAZI AGRONOMİK KARAKTERLERİ
KONTROL EDEN DNA MARKIRLARININ İLİŞKİ
HARİTALAMASI İLE SAPTANMASI**

Seda NEMLİ

Tez Danışmanı : Prof. Dr. M. Bahattin TANYOLAÇ

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu : 614.02.07

Sunuş Tarihi : 04.06.2013

Bornova-İZMİR

2013

Seda NEMLİ tarafından Doktora tezi olarak sunulan “Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.)’ de Ekonomik Öneme Sahip Bazı Agronomik Karakterleri Kontrol Eden DNA Markırlarının İlişki Haritalaması İle Saptanması” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisanüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 04.06.2013 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

Jüri Başkanı : Prof. Dr. M. Bahattin TANYOLAÇ

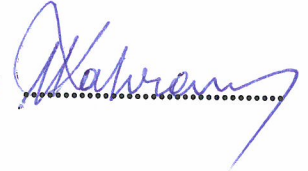
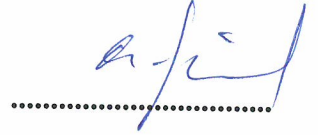
İmza

Raportör Üye : Prof. Dr. Muzaffer TOSUN

Üye : Prof. Dr. Aynur GÜREL

Üye : Prof. Dr. Dursun EŞİYOK

Üye : Yrd. Doç. Dr. Abdullah KAHRAMAN



ÖZET**FASULYE (*Phaseolus vulgaris* L.)’DE EKONOMİK ÖNEME SAHİP
BAZI AGRONOMİK KARAKTERLERİ KONTROL EDEN DNA
MARKIRLARININ İLİŞKİ HARİTALAMASI İLE SAPTANMASI**

NEMLİ, Seda

Doktora Tezi, Biyoteknoloji Anabilim Dalı
Tez Danışmanı: Prof. Dr. M. Bahattin TANYOLAÇ
Haziran 2013, 109 sayfa

Bağlantı dengesizliğine (Linkage Disequilibrium, LD) dayanan ilişki haritaları, kantitatif özellik lokusu (Quantitative Trait Locus, QTL) haritalarına alternatif ve önemli özellikleri kontrol eden genlerin belirlenmesinde etkili bir metottur. Bu çalışmada 66 fasulye genotipi kullanılmış ve 233 Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP), 105 Single Nucleotide Polymorphism (SNP) ve 80 Simple Sequence Repeat (SSR) markırı analiz edilmiştir. Bu populasyonda LD ve populasyon yapısı belirlenmiştir. Tüm genomu kapsayacak şekilde yüksek LD değeri saptanmıştır ($r^2 \geq 0.1$, $p < 0.01$). STRUCTURE programında populasyon yapısı belirlenmiştir ve 66 fasulye genotipi kendi arasında 7 (K=7) ana gruba ayrılmıştır. TASSEL (Trait Analysis by aSSociation, Evolution and Linkage) programında Genel Lineer Model (General Linear Model, GLM) metodu kullanılarak markır ve 5 fenotipik özellik (liflilik özelliği, tohum taslağı sayısı, bitki tipi, bitki büyüme şekli ve çiçeklenme zamanı) arasında ilişki saptanmıştır. Beş fenotipik özellik ile ilişkili toplamda 62 markır önemli olarak belirlenmiştir ($r^2 \geq 0.1$, $p < 0.01$). Bu çalışma ile ilk kez 66 fasulye genotipi arasında ilişki haritası yapılmıştır. Fasulyede yapılan bu ilişki haritalama çalışması QTL haritalama metodlarına alternatif olacaktır.

Anahtar sözcükler: fasulye, ilişki haritalama, populasyon yapısı, bağlantı dengesizliği

ABSTRACT**DETECTION OF DNA MARKERS CONTROLLING SOME
ECONOMICALLY IMPORTANT AGRONOMIC CHARACTERS
BY ASSOCIATION MAPPING IN COMMON BEAN
(*Phaseolus vulgaris* L.)**

NEMLİ, Seda

PhD Thesis, Department of Biotechnology

Supervisor: Prof. Dr. M. Bahattin TANYOLAC

June 2013, 109 pages

Association mapping (AM), based on linkage disequilibrium (LD), is an alternative method for quantitative trait locus (QTL) mapping and is a powerful tool for detection of genes controlling important traits. In this study, 66 common bean accessions were used and genotyped using 233 Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP), 105 Single Nucleotide Polymorphism (SNP) and 80 Simple Sequence Repeat (SSR) markers. LD of pairwise loci and population structure were analyzed. High level of LD ($r^2 \geq 0.1$, $p < 0.01$) was found in the accessions at the whole genome level. Population structure was determined using STRUCTURE software and mainly seven groups ($K=7$) were identified among 66 common bean genotypes. The association analysis between markers and five agronomical traits (pod fiber, seed per pod, plant type, growth habit and days to flowering) was performed using a General Linear Model (GLM) in TASSEL (Trait Analysis by aSSociation, Evolution and Linkage). Marker and quantitative trait associations were identified and 62 markers were found to be associated with five traits ($r^2 \geq 0.1$, $p < 0.01$). The results of this study were determined first time of the significant potential and of association mapping of quantitative traits in 66 common bean accessions. Also, these results suggest that association mapping in common bean could be a useful alternative to QTL mapping.

Keywords: common bean, association mapping, population structure, linkage disequilibrium

TEŞEKKÜR

Doktora tez konumun belirlenmesinde ve bu araştırmanın her aşamasında yardım ve desteğini esirgemeyen, akademik çalışmalarım boyunca beni yönlendiren ve her zaman daha iyiye ulaşmam için motive eden, zorluklar karşısında çözümcü, bilgisini ve deneyimlerini tüm sevgisiyle paylaşmaktan kaçınmayan değerli bilim insanı Danışman Hocam Sayın Prof. Dr. M. Bahattin TANYOLAÇ’a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Bu araştırmanın başlangıç aşamasında bitki materyalimin sağlanmasında ve fenotipik analizlerin ölçümlenmesinde yardımcı olan Sayın Hocam Prof. Dr. Dursun EŞİYOK ve Araş. Gör. Tansel Kaygısız Aşçıoğlu’na teşekkür ederim.

Son olarak, sabır ve hoşgörü ile her daim desteğini benden esirgemeyen, içten sevgisiyle her zaman moral veren sevgili eşim Dr. Egemen Nemli’ye, hep desteklerini yakından hissettiğim canım aileme göstermiş oldukları emek, sevgi, sabır ve ilgilerinden dolayı sonsuz şükranlarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	v
ABSTRACT	vii
TEŞEKKÜR	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xv
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xvii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xxi
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	4
2.1 Fenotipik Çeşitlilik	4
2.2 Moleküler Çeşitlilik ve Populasyon Yapısı	5
2.3 Genetik Haritalama Çalışmaları	16
2.4 İlişki Haritalama	18
3. MATERYAL-METOD.....	25
3.1 Materyal	25
3.2 Metod.....	26
3.2.1 Fasulye genotiplerine ait tohumların ekilmesi, yetiştirilmesi ve hasadı.....	26
3.2.2 Fenotipik analizler	26

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3.2.3 DNA izolasyonu	27
3.2.4 AFLP markır analizi	29
3.2.5 SSR markır analizi.....	33
3.2.6 SNP markır analizi.....	36
3.2.7 Poliakrilamid jel elektroforezi	40
3.2.8 Markır analiz sonuçlarının skorlanması.....	40
3.2.9 PIC değerlerinin hesaplanması	40
3.2.10 Genetik yakınlığın belirlenmesi.....	41
3.2.11 Populasyon yapısının belirlenmesi	41
3.2.12 İlişki haritalaması.....	41
4. BULGULAR.....	43
4.1 Fenotipik Analiz Sonuçları	43
4.2 DNA Saflık Analizi Sonuçları	44
4.3 AFLP Markır Analizi Sonuçları	45
4.4 SSR Markır Analizi Sonuçları	48
4.5 SNP Markır Analizi Sonuçları.....	51
4.6 PIC Değerleri	55

İÇİNDEKİLER (devam)Sayfa

4.7 Genetik Yakınlığın Belirlenmesi	56
4.8 Populasyon Yapısı	59
4.9 İlişki Haritalama	64
5. TARTIŞMA.....	71
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	83
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	85
ÖZGEÇMİŞ	109
EKLER	

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.1 DNA örneklerinin saflıklarının belirlendiği agaroz jel elektroforezi görüntüsü	45
4.2 M-CAA/E-AAG (700) primer kombinasyonu denemesi sonucu 1- 66 numaralı örneklerin poliakrilamid jel elektroforezi görüntüsü	45
4.3 M-CAA/E-AGG (800) primer kombinasyonu denemesi sonucu 1-66 numaralı örneklerin poliakrilamid jel elektroforezi görüntüsü	46
4.4 M-GAT/E-ACT (800) primer kombinasyonu denemesi sonucu 1-66 numaralı örneklerin poliakrilamid jel elektroforezi görüntüsü	47
4.5 BMd45 primer denemesi sonucu 1-66 numaralı örneklerin poliakrilamid jel elektroforezi görüntüsü	48
4.6 BM151 primer denemesi sonucu 1-66 numaralı örneklerin poliakrilamid jel elektroforezi görüntüsü	49
4.7 BM157 primer denemesi sonucu 1-66 numaralı örneklerin poliakrilamid jel elektroforezi görüntüsü	49
4.8 BM170 primer denemesi sonucu 1-66 numaralı örneklerin poliakrilamid jel elektroforezi görüntüsü	49
4.9 BM183 primer denemesi sonucu 1-66 numaralı örneklerin poliakrilamid jel elektroforezi görüntüsü	49
4.10 GATS11 primer denemesi sonucu 1-66 numaralı örneklerin poliakrilamid jel elektroforezi görüntüsü	50
4.11 SNP4 primer denemesi sonucu 1-66 numaralı örneklerin poliakrilamid jel elektroforezi görüntüsü	51

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.12 SNP6 primer denemesi sonucu 1-66 numaralı örneklerin poliakrilamid jel elektroforezi görüntüsü	51
4.13 SNP21 primer denemesi sonucu 1-66 numaralı örneklerin poliakrilamid jel elektroforezi görüntüsü	52
4.14 SNP24 primer denemesi sonucu 1-66 numaralı örneklerin poliakrilamid jel elektroforezi görüntüsü	52
4.15 SNP31 primer denemesi sonucu 1-66 numaralı örneklerin poliakrilamid jel elektroforezi görüntüsü	52
4.16 SNP45 primer denemesi sonucu 1-66 numaralı örneklerin poliakrilamid jel elektroforezi görüntüsü	53
4.17 SNP50 primer denemesi sonucu 1-66 numaralı örneklerin poliakrilamid jel elektroforezi görüntüsü	53
4.18 Fasulye genotipleri arasındaki aralarındaki benzerliklere göre elde edilen dendrogram	59
4.19 K değerleri ve ΔK değeri	60
4.20 STRUCTURE programından elde edilen verilere göre fasulye genotiplerinin aralarındaki benzerliklere göre dağılımı (Her bir grup farklı renk ile gösterilmiştir; pembe, yeşil, mavi, açık mavi, kırmızı, sarı, kahverengi).....	61
4.21 Fenotipik özellikler için histogramlar (a) liflilik özelliği, (b) bitki tipi, (c) bitki büyüme şekli, (d) tohum taslağı sayısı, (e) çiçeklenme zamanı.	64
4.22 Markır analizleri sonucu elde edilen LD blokları grafiği	66

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 İlişki haritalama ve QTL haritaların karşılaştırılması.....	19
3.1 Çalışmada kullanılan fasulye genotipleri ve lokasyonları	25
3.2 Genomik DNA'nın restriksiyon enzimleri ile kesilmesi işleminde bir örnek için kullanılan kokteyl içeriği ve miktarları.....	29
3.3 Adaptörlerin ligasyonu işleminde bir örnek için kullanılan karışım içeriği ve miktarları.....	30
3.4 Pre- Amplifikasyon işleminde bir örnek için kullanılan karışım içeriği ve miktarları.....	30
3.5 Pre- Amplifikasyon işleminde uygulanan PCR işlemi için reaksiyon basamakları, süresi ve sıcaklıkları	31
3.6 Selektif amplifikasyon işleminde bir örnek için kullanılan karışım içeriği ve miktarları.....	31
3.7 AFLP analizlerinde kullanılan primer kombinasyonları (700:700 nm, 800:800 nm dalga boylarının absorbe edildiğini belirtmektedir.)	32
3.8 Selektif amplifikasyon işleminde uygulanan PCR işlemi için reaksiyon basamakları, süresi ve sıcaklıkları.....	33
3.9 SSR analizlerinde kullanılan primer isimleri ve sekansları	34
3.10 SSR PCR işleminde bir örnek için kullanılan karışım içeriği ve miktarları.....	35
3.11 SSR işleminde uygulanan PCR işlemi için reaksiyon basamakları, süresi ve sıcaklıkları.....	36

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
3.12 SNP analizlerinde kullanılan primer isimleri ve sekansları.....	37
3.13 SNP PCR işleminde bir örnek için kullanılan karışım içeriği ve miktarları.....	39
3.14 SNP işleminde uygulanan PCR işlemi için reaksiyon basamakları, süresi ve sıcaklıkları.....	39
4.1 Fasulye genotiplerine ait fenotipik ölçüm sonuçları.....	43
4.2 AFLP markır analizinde kullanılan primer kombinasyonları ve elde edilmiş polimorfik bant sayıları.....	48
4.3 SSR markır analizinde kullanılan primer kombinasyonları ve elde edilmiş polimorfik bant sayıları.....	50
4.4 SNP markır analizinde kullanılan primer kombinasyonları ve elde edilmiş polimorfik bant sayıları.....	54
4.5 AFLP primer kombinasyonlarına ait PIC değerleri.....	55
4.6 SSR primerlerine ait PIC değerleri.....	55
4.7 SNP primerlerine ait PIC değerleri.....	56
4.8 Fasulye genotiplerinin genetik yakınlık değerleri	57
4.9 STRUCTURE programından elde edilen Q matrix verileri	62
4.10 İlişki haritalama sonucu, liflilik özelliği ile ilişkili markırlar	67
4.11 İlişki haritalama sonucu, bitki tipi ile ilişkili markırlar	67

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.12 İlişki haritalama sonucu, bitki büyüme şekli ile ilişkili markırlar	68
4.13 İlişki haritalama sonucu, tohum taslağı sayısı ile ilişkili markırlar	68
4.14 İlişki haritalama sonucu, çiçeklenme zamanı ile ilişkili markırlar	69

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
Bp	Base pair
Mbp	Mega basepair
kb	kilo base
kbp	kilo basepair
DNA	Deoksiribonükleik asit
RNA	Ribonükleik asit
cM	centiMorgan
mM	miliMolar
µl	mikrolitre
EDTA	EtilenEdiamineTetraAsetik asit
mA	miliAmper
nm	nanomol
ng	nanogram
sn	saniye
dk	dakika
pmol	pikomol

1. GİRİŞ

Fasulye Leguminosae (Baklagiller) familyasının Papilionoideae alt familyasından, Phaseolea oymağının Phaseolus cinsine bağlı bir türdür. Baklagiller familyası 400 cins ve 10.000 dolayında tür içerir. Fasulye, bakla, nohut, soya, mercimek, bezelye gibi ekonomik öneme sahip türler bu familyadandır. Phaseolus cinsi 5 adet ıslahı gerçekleştirilebilmiş tür içermektedir ve bunlar; *P. vulgaris* L. (common bean), *P. lunatus* L. (lima bean), *P. coccineus* L. (runner bean), *P. acutifolius* (teparıy bean) ve *P. polyanthus* (year bean)'dır. Ekonomik ve bilimsel amaçlı en çok tercih edilen fasulye türü ise *Phaseolus vulgaris* L.'dir. Fasulye bitkisinin anavatanı Güney Amerika'dır. 16'ncı yüzyılda Avrupa'ya getirilen fasulyenin tarımı yavaş yavaş çoğalmış ve dünyanın her tarafında yetiştirilmeye başlanmıştır. Ülkemizde fasulye yetiştiriciliği ise yaklaşık 250 yıldan beri yapılmaktadır.

Phaseolus vulgaris L., diploid bir baklagildir ($2n=2x=22$) ve göreceli olarak küçük bir genoma sahiptir [633 Mbp (0.66 pg)/1C] (Vallejos et al., 1992). Baklagiller familyası içerisinde ise en küçük genoma sahiptir. Fasulye, insan gıda maddesi olarak kullanılan en önemli bitkilerden biridir. Tohumlarındaki protein içeriğinin, kuru ağırlıklarının % 22'si olması, insan diyetinin önemli bir parçası haline gelmesini sağlamıştır (Alzate-Marin et al., 2003). Ayrıca fasulyenin kuru taneleri yanında, sebze olarak olgunlaşmamış meyve ve taneleri kullanılmaktadır. Taze meyve ve tanelerinde %90 dolaylarında su ve ayrıca A vitamini (karoten) ve C vitamini içermektedir.

Coğrafik alanlarına göre; Mesoamerikan ve Andean olmak üzere iki ana gruba ayrılan fasulye çeşitleri, kültürü yapıldıktan sonra bu grupların içerisinde bağımsız olarak oluşmaya başlamıştır (Piergiovanni and Lioi, 2010). Kültür bitkisi olarak yetiştirilen fasulyelerin atalarına göre çok daha az genetik çeşitliliğe sahip oldukları bulunmuştur. Aynı gen havuzundan seçilen ebeveynlerin genetik farklılıklarının çok az olması sebebi ile fasulye yetiştiriciliğindeki gelişim de daha yavaştır. *Phaseolus vulgaris* L. türüne ait fasulyeler, aynı tür ismini taşımakla beraber, bitki şekli, çiçek, meyve ve tohum bakımından farklılıklar bulunmaktadır. Dünya da en fazla yetiştirilen ve halkın en fazla kullandığı başlıca formları iki büyük grup altında toplamak mümkündür. *Phaseolus vulgaris* var. Comminus: Sırık fasulyeleri, *Phaseolus vulgaris* var. Nanus: Yer (bodur) fasulyeleri. Her iki grubun taze, kuru ve hem taze hemde kuru olarak tüketilen çeşitleri vardır. Ayrıca kültüre alınmış olan fasulyelerin yenilebilir bölümleri iki

kısmı ayrılmaktadır. Bunlar; kuru yenilebilir fasulyeler (rehidrasyon sonrası olgun kuru tohum olarak tüketilen) ve taze fasulyeler (kabuğu olgunlaşmadan taze olarak tüketilen; çıtçıt fasulye, yeşil, Fransız ve Haricot fasulye)'dir. Talep gören kuru fasulye çeşitleri Pinto, Great Northern, Pembe, Küçük kırmızı, Siyah, Donanma, Küçük beyaz, Açık böbrek kırmızısı, Koyu böbrek kırmızısı, Sarıgöz, Anasazi, Kızılcık, Lima, Mung ve Azuki, taze fasulye çeşitleri arasında Yeşil balmumu ve Romano vardır. Her iki sınıfta oldukça yaygın olarak tüketilmektedir (Myers and Baggett, 1999).

Fasulye bitkisinin genetik çeşitliliğini ifade eden bilgiler, bitkiye daha etkili bir koruma, kullanım ve genetik ilerleme sağlar. Morfolojik, agronomik, izozim ve moleküler markırlar fasulye çeşitliliğinin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Fasulye bitkisinin evrimini ve genetik çeşitliliğin durumunu incelemek amacıyla çevre koşullarından etkilenmedikleri için moleküler markırlar, morfolojik markırların tamamlayıcısı olarak kullanılmaktadır (Rosales-Serna et al., 2005). Fasulye gen kaynaklarının çeşitliliğinin belirlenmesinde RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) (Nodari et al., 1993), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) (Beebe et al., 2000), AFLP (Kumar et al., 2008), SSR (Blair et al., 2007) ve SNP (Galeano et al., 2009a) markırları kullanılmaktadır.

Son yıllarda QTL haritalama metoduna alternatif olarak ilişki haritalama analizleri sayesinde melez popülasyona gerek kalmadan doğal popülasyonlarda DNA markırları ile morfolojik ve agronomik karakterler arasında korelasyonlar saptanabilmektedir (Gupta et al., 2005). Ayrıca bu haritalama metodu ile, klasik haritalarda yaygın olarak kullanılan bağlantı analizlerine göre daha az zamanda; daha fazla harita ayırım gücü ve daha fazla sayıda markır elde edilmesi ile kalıcı QTL'ler belirlenmektedir (Zhu et al., 2008). İlişki haritaları yaygın olarak insan genetiğinde kullanılmaktadır. Son zamanlarda bitkilerde de genetik haritalama çalışmalarında kullanılmaya başlanmıştır (Thornberry et al., 2001). Bugüne kadar Arabidopsis (Olsen et al., 2004), mısır (Wilson et al., 2004), arpa (Kraakman et al., 2006), şeker pancarı (Wei et al., 2006), buğday (Brescaghello and Sorrells, 2006), patates (Malosetti et al., 2007), soya fasulyesi (Hyten et al., 2007) ve marul (Simko et al., 2009) gibi birçok bitkide ve hatta ökaliptus (Thumma et al., 2005) ve çam (Gonzalez-Martinez et al., 2006) gibi bazı ağaç türlerinde de bu haritalama metodu kullanılmıştır.

Bu alışma ile dünya ve Türkiye'nin farklı bölgelerinden elde edilmiş fasulye türüne ait genotiplerde AFLP, SSR ve SNP markır sistemlerini kullanarak genetik eşitliliğın belirlenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca ilişki haritalama metodu ile elde edilen DNA markırları ile fenotipik veriler arasında yüksek korelasyona sahip ilişkinin saptanması sonucu kalıcı QTL'lerin belirlenmesi hedeflenmiştir.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1 Fenotipik Çeşitlilik

Baklagiller içerisinde fasulye, ekolojik koşullar bakımından en seçici türdür. Bir bölgedeki fasulye yetiştiriciliğini, verim ve kalitesini; ekolojik (yağış, sıcaklık, gün uzunluğu, topoğrafya, toprak tipi vs.), biyolojik (hastalık ve zararlılar) ve sosyo-ekonomik faktörler etkilemektedir (Woolley et al., 1991).

Fasulyenin dünyada Mezoamerikan ve Andean olmak üzere iki ana grubu bulunmaktadır. Mezoamerikan grubu Durango, Jalisco ve Mezoamerika olmak üzere kendi içerisinde 3 alt gruba ayrılmaktadır. Andean grubu da 3 alt gruba ayrılır: Nueva Granada, Peruvian ve Chilean. Her gruba ait fasulye çeşitlerinin kendilerine ait morfolojik özellikleri, ekolojik istekleri ve karakteristik özellikleri vardır (Beebe et al., 2000). Mezoamerikan gen havuzunda bulunan fasulyeler; pembe, siyah ve beyaz renkli orta ve küçük tohumlu iken, Andean gen havuzunda bulunan fasulyeler böbrek şeklinde büyük tohumludur (Beebe et al., 2000). Islah uygulamalarında genelde büyük tohumlar, küçük tohumlara göre daha çok tercih edilmektedir. Botanik, arkeolojik, biyokimyasal ve moleküler bulgular; diğer fasulye türlerinin merkezi olan bu iki grubun birbirinden ayrıldığını kanıtlamaktadır (Becerra et al., 2010).

Fasulyelerde en belirgin farklılaşma, morfolojik düzeyde görülmüştür. Fasulye gen kaynaklarını ayırt etmede en etkin morfolojik özellik olarak tohum boyu kullanılmaktadır (Gepts et al., 1986). Tohum boyutundaki gelişmelerde bitki beslenme durumu ve bitkideki organların sağlıklı gelişimi oldukça etkilidir. Kalın kabuğa sahip tohumlarda, beslenme eksikliğine bağlı olarak kotiledonlarda büyüme görülür (Debouck, 1986). Yaprak büyüklüğü ve şekli, çiçek rengi, bakla pozisyonu (Singh et al., 1991a) ve iklim istekleri (Debouck et al., 1993) gibi özellikler de çeşitlilik çalışmalarında kullanılan diğer ayırt edici morfolojik özelliklerdir. The Centro International de Agricultura Tropical (CIAT) (1984); fasulye çeşitlerini dokuz renk sınıfı, tohum boyu ve şekline göre sınıflandırmıştır (Hidalgo, 1991). Pedigri analizleri ve soy ağacı çalışmaları da fasulye çeşitlerinin ayırımında kullanılmaktadır (Voysset et al., 1994). Ancak genotip farklılıklarını ayırt ve tespit eden bu çalışmalar, yeteri kadar duyarlı değildir.

Fasulyeler bodur tip, sırtık tip ve tırmanıcı tip olmak üzere büyüme şekillerine göre geniş varyasyon gösterirler (Van Schoonhoven and Pastor-Corrales, 1987). En yaygın büyüme şekli bodur tipidir. 60 gün gibi kısa sürede olgunlaşan kısa iklim bitkisidir. Tırmanıcı tipler 100-120 gün arası olgunlaşan orta süreli bitkilerdir, ancak bu tip fasulyelerden yüksek verim elde edilebilir. Bu özellikler fasulye ıslah programları için önemlidir. Bodur tip fasulyelerden yılda 3 kere verim alınabilir hatta sera koşullarında bu sayı 4'e yükselmektedir. Buna karşılık tırmanıcı tiplerden yılda sadece 2 kez verim alınabilir ve sera koşullarında yetiştirilmesi zordur.

Fasulyelerin gelişmesinde birkaç önemli faktör söz konusudur. Bunlar arasında dallanma sayısı, boğum yapısı, boğum sayısı ve döllenme kabiliyeti sayılabilmektedir. Kültür çalışmalarında yapılan seleksiyon çalışmaları ile daha erken ürün elde edilmesi, daha senkronize olgunlaşma ve dallanmanın azalması, daha az boğuma sahip uzayan dallarla daha verimli büyüme karakterizasyonu şekillenebilecektir. Bodur bitkilerin seleksiyonu sonucu daha iri gövde, daha az boğum ve daha kısa boğum aralığına sahip bitkiler şekillenebilecektir (Smartt, 1988).

2.2 Moleküler Çeşitlilik ve Populasyon Yapısı

Genetiğin önemli temelleri kurulurken yapılan çalışmalarda fasulye türleri de bilgilendirici tür olarak kullanılmıştır. Mendel, bezelye ile yaptığı çalışmaları doğrulamak için fasulye bitkisini kullanmıştır. Johannsen tohum ağırlığı kalıtımı kesin olan özellikler ile yaptığı kantitatif çalışmalarda fasulyeyi kullanmıştır. Sax, Mendel markırlarını (tohum rengi ve şekli) kullanarak yaptığı QTL (tohum ağırlığı) analiz temelini oluşturan çalışmada yine fasulye bitkisini kullanmıştır (Gepts, 2001).

1980'lerden bu yana bitki ıslahı ve bitki genetiği çalışmalarında moleküler markırlar kullanılmaya başlanmıştır. Parmak izi analizlerinde, bağlantı haritalarında, markır destekli seleksiyonlarda, populasyon yapılarının belirlenmesinde birçok moleküler markır çeşidi kullanılmıştır. Moleküler markırların temel olarak iki çeşidi bulunmaktadır; morfolojik markırlar ve DNA markırları (Young, 1994). Hem morfolojik (Singh et al., 1991a) hem de DNA markırları (Beebe et al., 2000; Metais et al., 2000) fasulye türlerinde genetik çeşitliliğin araştırılmasında başarılı bir şekilde kullanılmaktadır.

Tek lokus ile idare edilen morfolojik özellikler, farklı çevre koşullarında ifade edilebildiği sürece moleküler markır olarak kullanılabilirler. Morfolojik markırlar kolay izlenebilirler, ancak çevre koşullarından etkilenmektedirler. İzlenebilen morfolojik markır sayısı oldukça sınırlıdır. Çiçek rengi gibi bitki gelişiminde zaman alan bazı özelliklerin skorlanması ise imkansızdır. Ayrıca pleotropik genlerden dolayı, ıslah çalışmalarında bir morfolojik markır diğer bir morfolojik markıra ya da ilgili özelliğe etki edebilir. Bu yüzden morfolojik markırların kullanımı sınırlı kalmıştır (Poehlman and Sleper, 1995).

Fasulyede izozim çalışmaları da çeşitlilik analizlerinde kullanılmaktadır (Singh et al., 1991b). Fasulye tohumunda depo proteini olan phaseolin ve alloenzimler de biyokimyasal markırlar olarak sınıflandırılmada kullanılmıştır (Alzate-Marin et al., 2003). Fasulye depo proteini olan phaseolin ile yapılan çeşitlilik çalışmaları ile fasulye çeşitlerinin Mezoamerikan ve Andean olmak üzere iki ana gruba ayrıldığı teorisi desteklenmektedir (Gepts et al., 1986; Singh et al., 1991a, 1991b). Mezoamerikan grubu içerisinde S phaseolini yaygın olarak bulunurken, Sb, Sd ve B phaseolin tipleri daha az bulunmaktadır. Andean gen havuzuna ait bireylerde ise T, C ve H phaseolin tipleri bulunmaktadır. Sadece phaseolin izozimleri kullanılarak değil aynı zamanda tohum boyu izozimleri kullanılarak yapılan çalışmalar da bu iki grubu birbirinden ayırmaktadır. Mezoamerikan grubuna ait bireyler Andean gen havuzunda bulunanlara göre daha küçük tohumludurlar (Gepts, 1986). Ayrıca biyokimyasal markırlar kullanılarak yapılan fasulye genetik çalışmaları sonucunda kültürü yapılan fasulyelerin atalarına göre daha az genetik varyasyon gösterdiği saptanmıştır (Gepts, 1986). Muhtemelen genetik çeşitliliği sınırlı olan aynı gen havuzundan seçilen ebeveynler kullanıldığı için dünyada fasulye yetiştiriciliğindeki ilerleme yavaş olmaktadır (Alzate-Marin et al., 2003), ancak 1500'lü yıllardan sonra daha fazla ilerleme kaydedilmiştir. Bu iki gen havuzunda gen transferleri olmasına rağmen, bugün hala her iki gen havuzunda büyük oranda sistematik grupların bulunduğu bitki ıslahı programları tarafından belirlenmiştir (Pallottini et al., 2004). Ancak izozim lokuslarının azlığı ve translasyon sonrası değişimlere açık olmaları kullanım olanaklarını sınırlamaktadır (Bernatzky and Tanksley, 1989).

Morfolojik ve biyokimyasal markırların aksine, çevre koşullarından etkilenmedikleri ve sınırsız sayıda oldukları için DNA markırları, genetik ilişkileri belirlemede en güvenilir sonucu verirler (Maciel et al., 2003). Moleküler markır sistemlerini kullanmanın fenotipik karakterler yoluyla ıslah çalışmalarına bir diğer avantajı da bu sistemlerin biyotik ve abiyotik stres koşullarından bağımsız

olmalarıdır. Ayrıca büyüme, gelişme ve farklılaşma sürecince değişmeden saptanabilirler. Bu yüzden DNA markırları ıslah çalışmalarında yeni çeşitlerin geliştirilmesinde önemli rol oynamaktadır (Kumar et al., 2008). DNA markırları, genetik haritalama çalışmalarında (Grisi et al., 2007), markır destekli seleksiyonlarda (Ender et al., 2008), populasyon içi ve populasyonlar arası genetik çeşitliliğin belirlenmesinde (Papa and Gepts, 2003) de başarıyla kullanılmaktadır. DNA markırları, polimeraz zincir reaksiyonuna (PCR) bağlı olmayanlar (RFLP) ve polimeraz zincir reaksiyonuna bağlı olanlar (RAPD, AFLP, SSR, SNP) olarak iki gruba ayrılmaktadır (Ridout and Donini, 1999).

Avrupa'daki snap fasulyelerinde (Métais et al., 2002), Meksika'da bulunan yabani fasulye formlarında (Payró de la Cruz et al., 2005), İtalya'daki kuru fasulye (Marotti et al., 2007), Bulgaristan (Svetleva et al., 2006) ve Slovenya (Maras et al., 2006) fasulye genotipleri gibi birçok fasulye genetik çeşitlilik çalışmasında DNA markırları kullanılmaktadır.

İlk keşfedilen moleküler markır sistemi RFLP, DNA'nın çeşitli restriksiyon enzimleri ile kesilmesi temeline dayanır. Yabani fasulyelerdeki evrimleşme sürecini incelerken Khairallah et al. (1992), mitokondrial RFLP tekniği kullanmışlardır. Ayrıca Becerra ve Gepts (1994), Mezoamerikan gen havuzunda bulunan fasulye genotipleri arasındaki çeşitliliği belirlemede genomik RFLP'leri kullanmışlardır. Markırın tanımlanıp haritalanması, klonların elde edilmesi, kütüphaneden parçaların izole edilmesi ve hibridizasyon aşaması gibi birçok basamaktan oluşan RFLP tekniği oldukça pahalı olmakta ve yüksek iş gücü gerektirmektedir (Malyshev and Kartel, 1997). Bu yüzden RFLP metodundaki bu zorlukları aşmak ve PCR tekniğinin getirdiği avantajlardan yararlanmak amacıyla RAPD tekniği geliştirilmiştir (Williams et al., 1990). Ancak RAPD'nin tekrarlanabilirliğinin olmaması, bu markır sisteminin kullanımını da kısıtlamaktadır (Penner et al., 1993).

AFLP tekniği, PCR ile RFLP tekniklerinin bir kombinasyonudur. Restriksiyon enzimleri ile kesim yapılmış genomik DNA'dan elde edilen fragmentlerin selektif PCR amplifikasyonu ile çoğaltılması prensibine dayanmaktadır. İlk olarak restriksiyon enzimleri ile DNA kesilir ve sonucunda DNA fragmentleri oluşur. Daha sonra, kullanılan restiriksiyon enzimlerine uygun olarak seçilen, nükleotid dizilimi belli oligonükleotid adaptörler DNA fragmentlerine bağlanır. Son olarak adaptör bağlı restiriksiyon fragmentlerine

bağlanarak uzayabilen ve sadece bu fragmentleri çoğaltabilen primerlerin kullanılmasıyla selektif amplifikasyon gerçekleşir (Vos et al., 1995).

PCR tabanlı moleküler markırlardan AFLP ile; RAPD ve SSR markır analizlerine göre tek bir reaksiyonda daha fazla polimorfik markır tespit edilmektedir (Powell et al., 1996). AFLP markırları yüksek derecede polimorfik olup, laboratuvarıdan laboratuvara uygulanabilir. Tek bir reaksiyonda 30-150 bölge tanımlanabilmesi, sonuçların tekrarlanabilir olması en önemli avantajını oluşturmaktadır. AFLP markırlarının güvenilir ve etkili olması çeşitlilik çalışmalarında, filogeni analizlerinde ve haritalamalarda sık sık kullanımına yol açmıştır (Tohme et al., 1996; Papa and Gepts, 2003; Rosales-Serna et al., 2005). En basit AFLP çalışması ilk olarak patlıcanda yapılmıştır (Kardolus et al., 1998). Kakao (Saunders et al., 2001) ve sarı fasulye (Pallottini et al., 2004) türleri gibi birbirine oldukça yakın genotipleri ayırt etmede AFLP markır analizi kullanarak başarılı sonuçlar elde edilmiştir.

İtalya ve İspanya'dan toplanan 24 makarnalık buğday çeşidinin genetik benzerliklerinin üç farklı zaman aralığında karşılaştırmalı olarak genetik analizinin yapılmasında AFLP tekniği kullanılmıştır (Martos et al., 2005). Çalışmada 14 primer kombinasyonu kullanıldığında toplam 186 polimorfik bant elde etmişlerdir. Unweighted Paired Group Method using Arithmetic averages (UPGMA) sonucu yaptıkları filogeni analizine göre; İspanya'dan elde edilen 12 genotip ile kıyaslandığında İtalyan buğdayların daha benzer olduğu bulunmuştur.

Rosales-Serna et al. (2005), Meksika'dan toplanan 112 fasulye genotipinde AFLP yöntemini kullanarak genetik çeşitliliği belirlemişlerdir. Kullanılan genotiplerden 25'i Mezoamerikan, 39'u Jalisco, 28'i Durango ve 19'i Nueva Granada bölgelerinde yaygın olarak bulunan çeşitlerdir. Ayrıca karşılaştırma amaçlı olarak 1 adet *P. coccineus*'a ait özel çeşit kullanmışlardır. Çalışmada 4 AFLP primeri ile yapılan analiz sonucunda 344 polimorfik bant elde etmişlerdir. En fazla polimorfizimin elde edildiği primer kombinasyonu olan E-ACA/M-AGA kombinasyonunun polimorfizm yüzdesini % 76.2 olarak saptamışlardır. Dendrogram sonucuna göre, Andean (Nueva Granada) ve Mezoamerikan (Jalisco, Durango ve Mezoamerika) gen havuzlarına ait genotipler arasında genetik çeşitliliğin yüksek seviyede olduğunu fakat bu çalışmada orijinlere göre sınıflanmanın çok net olmadığını, bu durumun biyotik ve abiyotik strese kaynaklanabileceğini ifade etmişlerdir. Ayrıca *P. coccineus* diğer fasulye genotiplerden tamamen ayrı bir grup oluşturmuştur.

Bulgaristan'ın farklı alanlarından toplanan 78 fasulye çeşidinin, birbirleri ve oluşturdukları populasyonda genetik çeşitliliğinin tespiti amacıyla Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) ve AFLP markır yöntemleri uygulanmıştır (Svetleva et al., 2006). Çalışmada, 13 ISSR primeri ile yapılan analiz sonucunda 55 polimorfik bant elde edilmiş, elde edilen toplam bantların ise % 36.7'sinin polimorfik olduğu belirtilmiştir. Genetik benzerlik değerini ise 0.92 olarak hesaplamışlardır. Aynı populasyon üzerinde AFLP markır tekniğini uyguladıklarında ise 3 primer kombinasyonu ile 54 polimorfik bant elde etmişler ve toplam elde edilen bantların % 32.9'unun polimorfik olduğunu tespit etmişlerdir. AFLP yönteminde en yüksek polimorfizmi 0.913 genetik benzerlik katsayısı ile E-AAC/M-CAA primer kombinasyonunda belirlemişlerdir. Her iki yöneme ait verilerden elde edilen ortalama genetik benzerlik katsayısını ise 0.915 olarak hesaplamışlardır. Araştırmacılar, populasyon içerisinde genetik çeşitliliğin düşük seviyelerde bulunduğunu saptamışlardır. AFLP ve ISSR markır tekniklerinin her birinin etkili yöntemler olduğunu ancak analizin gerektirdiği zaman ve uygulanabilirlik açısından AFLP yönteminin daha etkin olduğunu bildirmişlerdir.

Hindistan'ın farklı bölgelerinden elde edilen 44 çeşit fasulye genotipleri arasındaki genetik varyasyonu tespit etmek amacıyla Kumar et al. (2008), AFLP moleküler markır yöntemini kullanmışlardır. 8 AFLP primer kombinasyonu ile 820 adet bant elde etmişler ve bu bantların 698 adedin polimorfik olduğunu tespit etmişlerdir. Polimorfik bant sayısının elde edilen toplam bant sayısının % 85'i olduğunu ve tüm primer kombinasyonlarını temsil eden ortalama polimorfizm bilgi içeriği (Polymorphism Information Content, PIC) değerini 0.255 olarak belirlemişlerdir. Genetik çeşitlilik değerinin 0.184 – 0.762 aralığında değiştiğini ve ortalama değerin 0.524 olduğunu tespit etmişlerdir. Elde ettikleri bu değerler sonucunda yüksek seviyede genetik çeşitliliğin gözlemlendiği ve AFLP yönteminin polimorfizmi tespit etmede oldukça etkili bir metod olduğunu bildirmişlerdir.

Tayland'da yetiştirilen tütünlerin yerli ve ithal olarak sınıflandırılmasını belirlemede AFLP yöntemi kullanılmıştır (Denduangboripant et al., 2010). İthal olarak Burley, Türk ve Virginia tipi tütünleri içeren 19 ayrı tütün bitkisindeki genetik polimorfizmin belirlenmesi amacıyla, 32 AFLP primer kombinasyonu denenmiş ve seçilen 3 primer kombinasyonu ile (E-AAG/M-CAA, E-AAG/M-CGC, E-ACT/M-CAG) yapılan çalışma sonucunda 139 AFLP markırı elde etmişler ve bunların 103 (% 74.1) tanesinin polimorfik olduğunu belirlemişlerdir. UPGMA kümeleme analizi ile çoğu yerel çeşidin ithal gruptaki Burley ve Türk

tipleriyle yakınlık gösterdiği, Virginia tipinden ise oldukça uzak olduğunu belirlemişlerdir. Böylece AFLP yönteminin yerli tütün ile ithal tütünün sınıflandırılmasına kullanılabilir olduğunu göstermişlerdir.

SSR ya da diğer adıyla mikrosatellitler; tüm ökaryotiklerin genomlarında bulunan DNA dizisinde rastgele tekrarlı motifler içeren 6 ya da daha az sayıda kısa nükleotid markırlarıdır (Rafalski et al., 1996). Bu diziler DNA replikasyonunda hatalar sonucu oluşurlar. Kodominant, multiallelik SSR markırları genom boyunca genlerin kodlanan ve kodlanmayan bölgelerinde lokalize olmuşlardır. SSR sayısı bitkiden bitkiye değişiklik göstermekle birlikte sıklıkları dikotiledonlara göre monikotiledonlarda daha düşüktür. SSR'lar yüksek oranda polimorfizm göstermektedirler (Chin et al., 1996). Mikrosatellit terimi 1989 yılında Litt ve Luty adlı araştırmacılar tarafından kullanılmış ve SSR lokuslarının polimorfizm özellikleri ilk kez insanda gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda AC/TG tekrarlarının hayvan genomlarında en fazla bulunan motifler olduğu tespit edilmiştir. Diğer yandan bu markırlar bitki genomlarındaki dayanıklılık genlerinin organizasyonunda ve genetik çeşitlilik çalışmalarında bize önemli bilgiler sunmaktadır.

SSR markırları genetik çalışmalarda, çeşitli türlerin pedigrî ve filogeni analizlerinde başarılı bir şekilde uygulanmaktadır (McCouch et al., 2001). Son zamanlarda fasulyede genetik çeşitliliğin belirlenmesinde de SSR'ların etkili olduğu belirtilmiştir (Métais et al., 2002; Gaitan-Solis et al., 2002; Cabral et al., 2011). Fasulyede bugüne kadar yaklaşık 390 SSR markırı tanımlanmıştır (Yu et al., 1999; Métails et al., 2002; Gaitan-Solis et al., 2002; Blair et al., 2003; Buso et al., 2006; Grisi et al., 2007; Benchimol et al., 2007). Bunlardan en az 170 SSR markırı haritalanmıştır (Yu et al., 2000; Blair et al., 2003; Grisi et al., 2007).

SSR'lar kodinant olmaları, yüksek polimorfizm göstermeleri ve genomda genellikle tek kopya halinde bulunmalarından dolayı fasulye genetik haritalama çalışmalarında etkin bir şekilde kullanılmaktadır (Blair et al., 2003). SSR'da polimorfizm oranı; uzunluklarına, içerdikleri tekrar motifi sayısına, genomun kodlanan ve kodlanmayan bölgelerinde bulunmalarına bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Thoquet et al., 2002).

SSR markırları Mezoamerikan ve Andean gen havuzlarına ait fasulye çeşitlerini birbirinden ayırmada da başarılı bir şekilde kullanılmıştır (Blair et al., 2006; Benchimol et al., 2007). Bu iki gen havuzu arasında büyük oranda

varyasyon olduğu tespit edilmiştir (Gepts et al., 2008). Ancak, kendi arasında değerlendirildiğinde; Andean gen havuzunda bulunan genotipler arasındaki genetik çeşitlilik Mezoamerikan gen havuzunda bulunan genotiplere göre daha dar varyasyon göstermektedir (Beebe et al., 2001).

Amerika kıtasının farklı bölgelerinden elde edilen 43 adet *P. vulgaris* genotipi ile 1 adet *P. acutifolius* türüne ait genotip arasında ve oluşturdukları populasyonun genelinde allelik çeşitliliği ve heterozigotluk değerini belirlemek amacı ile SSR markır analizi yapılmıştır (Blair et al., 2006). Bu amaçla genomik ve intergenik (Expressed Sequence Tags, EST) olan toplamda 129 adet SSR markırı kullanmışlardır. Genomik mikrosatellitler ile elde edilen polimorfizm oranının (0.446), EST mikrosatellitler ile elde edilen polimorfizm oranından (0.594) daha küçük olduğunu tespit etmişlerdir. EST mikrosatellitler ile belirlenen allel sayısının mikrosatellit başına 6 allel olduğunu, genomik mikrosatellitler ile belirlenen allel sayısının ise mikrosatellit başına 9.2 allel olduğunu hesaplamışlardır. Kümeleme analizi sonucunda Andean ve Mezoamerikan genotiplerine ait iki ana grubun oluştuğunu saptamışlardır. Andean grubunun genetik çeşitliliğinin (0.356) ve polimorfizm oranının (% 53), Mezoamerikan grubunun genetik çeşitliliğinden (0.302) ve polimorfizm oranından (% 33.4) daha büyük olduğunu tespit etmişlerdir. SSR analizinin fasulye çeşitlerinde genetik polimorfizmi tespit etmede etkili bir yöntem olduğunu saptamışlardır.

Zhang et al. (2008), yaptıkları çalışmada *P. vulgaris* türüne ait Çin'den elde ettikleri çeşitlerin genetik varyasyon seviyesini belirlemeyi, gen havuzunu tanımlamayı ve gruplar arası - grup içi ilişkileri belirlemeyi amaçlamışlardır. Bu amaçla 229 genotipde SSR markır yöntemini kullanmışlardır. Kullanılan 30 SSR markırı ile 116 allel tespit etmişler ve tüm SSR'lar için ortalama PIC değerini 0.541 olarak hesaplamışlardır. Yapılan kümeleme analizi sonucunda bireylerin Mezoamerikan ve Andean olarak 2 gruba ayrıldığını ve her bir grubun 2 adet alt gruba ayrıldığını saptamışlardır. Andean bireyleri temsil eden birinci gruptaki genetik çeşitlilik seviyesinin (0.288–0.676), Mezoamerikan bireyleri temsil eden ikinci gruptaki genetik çeşitlilik seviyesinden (0.426–0.754) daha büyük olduğunu belirlemişlerdir. Andean ve Mezoamerikan bireyler tarafından oluşturulan grup I ve grup II'ye ait genetik farklılaşma değerlerini ise sırasıyla 0.331 ve 1.112'dir. Çalışmalarının sonucunda, Çin'deki *P. vulgaris* populasyonunun Mezoamerikan ve Andean bireyleri içerdiğini, fakat Mezoamerikan bireylerin görülme oranının daha yüksek olduğunu saptamışlardır. Çalışmalarının sonucunda yüksek genetik

çeşitlilik gözlemlediklerini ve bu değerlerin Çin'in Amerika kıtasından sonra ikinci bir çeşitlilik merkezi olmaya aday olabileceğini ifade etmişlerdir.

Yüz adet yabani, 249 adet kültürü yapılmış olmak üzere dünyanın farklı coğrafik bölgelerden (Amerika, Avrupa, Afrika, Asya, Cali, Kolombiya) elde edilen *P. vulgaris* türüne ait toplam 349 genotipin genetik varyasyonlarının incelenmesi ve Mezoamerikan - Andean gruplarının çeşitlilik değerlerinin kültüre alınmadan önce nasıl etkilendiğini belirlenmesi amacıyla SSR markırları kullanılmıştır (Kwak et al., 2009). Bu amaçla 26 SSR primerinin kullanılması sonucunda genel genetik çeşitliliği 0.66, her bir mikrosatellit için ortalama allel sayısını ise 16 olarak hesaplamışlardır. Tüm primerleri temsil eden PIC değerini 0.62 olarak, heterozigotluk değerini ise % 1-3 aralığında tespit etmişlerdir. Kümeleme analizi sonucu elde ettikleri iki gruptan birinde Mezoamerikan çeşitlerin, diğerinde ise Andean çeşitlerin bulunduğunu saptamışlardır. Mezoamerikan çeşitlerin bulunduğu grubun çeşitliliğinin (0.60), Andean çeşitlerin bulunduğu grubun çeşitliliğine (0.52) göre daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Yabani çeşitlerde görülen genetik çeşitliliğinin, kültürü yapılmış çeşitlere göre çok daha yüksek olduğunu ve bunlardaki genetik çeşitliliğinin % 10 azaldığını belirlemişlerdir.

Burle et al. (2010), yaptıkları çalışmada *P. vulgaris* türüne ait Brezilya'nın farklı bölgelerinden elde ettikleri 279 çeşidin genetik çeşitliliğini ve popülasyonun yapısını belirlemeyi amaçlamışlardır. Bu amaçla SSR ve SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions) primerlerini, phaseolin tiplerini, PvTFL/y ve APA genlerini markır olarak kullanmışlardır. SSR markırları olarak, literatürden elde edilmiş, fasulye genomunun 11 bağlantı grubunu temsil eden 67 markır kullanılmıştır (Yu et al., 2000; Gaitan-Solis et al., 2002; Grisi et al., 2007). EST markırlar kullandıklarında genetik çeşitliliği 0.49 olarak, genomik markırlar kullandıklarında ise genetik çeşitliliği 0.46 olarak tespit etmişlerdir. Analiz sonucunda ortalama genetik çeşitliliği 0.48 olarak hesaplamışlardır. EST markırları kullanıldığında açığa çıkarılan allel sayısını markır başına 6.7 değerinde, genomik markırlar kullanıldığında ise 6.3 değerinde tespit etmişlerdir. Phaseolin tipine bağlı olarak yapılan analizde ise sadece S ve T phaseolin tipinin bulunduğunu, S tip phaseolin proteininin Mezoamerikan gen havuzunun karakteristik özelliği, T tip phaseolin proteininin ise Andean grubunun karakteristik özelliği olduğunu ifade etmişlerdir. PvTFL/y lokusu için iki adet allel tespit etmişler ve bu allellerin 1.3 kbp ve 4.1 kbp uzunluğunda olduğunu hesaplamışlardır. 1.3 kbp uzunluğundaki allelin 237 çeşitte, 4.1 kbp

uzunluğundaki allelin ise 37 çeşitte bulunduğunu, 2 çeşitte ise iki allele de rastlanmadığını belirlemişlerdir. APA lokusu için iki adet allelin olduğunu ve bu allellerin tek bantlı ve çift bantlı olduklarını tespit etmişlerdir. Tek bantlı allelin 48 çeşitte, çift bantlı allelin ise 206 çeşitte bulunduğunu, 27 çeşitte ise iki allele de rastlanmadığını göstermişlerdir. SCAR markırı olarak 4 adet primer kullanmışlar ve Brezilya'daki fasulye genotiplerinin yüksek oranda hastalıklara dirençlilik genlerini taşıdığını tespit etmişlerdir. Tüm analizler sonucunda ortalama genetik çeşitliliği 0.46 olarak, heterozigotluk değerini ise 0.0052 olarak tespit etmişlerdir. Kümeleme analizi sonucunda tüm çeşitlerin iki ana grup oluşturduğunu, 59 çeşidin Andean grubunda yer alıp, diğer 221 çeşidin ise Mezoamerikan grubunda yer aldığını tespit etmişlerdir. Brezilya'daki fasulye populasyonunda beklediklerinin aksine Mezoamerikan çeşitlerin daha yaygın olduğunu, bu durumun Orta Amerika ve Brezilya'nın toprak yapılarının ve sıcaklığının benzer olmasından kaynaklanabileceğini ifade etmişlerdir.

Cabral et al. (2011), Brezilya'dan topladıkları 57 kuru fasulye genotipinde genetik çeşitliliği belirlemek amacıyla 16 SSR markırı kullanmışlardır. Çalışmada 16 SSR primerinden 13 primer polimorfik bulunmuştur. Bu polimorfik primerlerden elde edilen polimorfik bant sayısı 29 ve ortalama polimorfik bant sayısı 2.2'dir. Çalışmalarında BM141 SSR primeri en çok bant veren ve en yüksek PIC değerine sahiptir. Ortalama PIC değeri 0.27'dir. SSR markır analizi sonucunda genotiplerin lokasyonlarına göre ayrımlandığı gözlemlenmiştir.

SNP'ler, iki genotip arasında aynı lokusta ve aynı dizi üzerinde tek nükleotid farklılığına dayanmaktadır. Nükleotidlerde ekleme ve silmeleri içeren bilgilendirici DNA markırlarıdır. Genomda genellikle kodlanmayan bölgelerde yaygın olarak bulunmaktadır. Kodlanan bölgelerde ise SNP'lerin sinonimi yoksa aminoasit dizilerinde değişim gözlenir ve bunun sonucu fenotipte değişikliğe yansır, ancak sinonimi varsa değişime yol açmaz (Sunyaev et al., 1999). Teorik olarak SNP'lerin herhangi bir yerde 4 farklı nükleotidde (A,T,G,C) de farklılık göstermesi beklense de pratikte çoğunlukla bi allelik markırlardır. SNP'ler; SSR markırları gibi mutliallelik markırlara göre daha az polimorfizm gösterir. Ancak SNP'lerin genomda çok bol bulunmasından dolayı bu dezavantaj avantaja dönüşmektedir (Oraguzie et al., 2007). SNP markırları birçok genetik çeşitlilik ve haritalama analizlerinde kullanılmaktadır (Rafalski, 2002).

SNP'ler önce insan genomunda kullanılmıştır, ancak şimdiler de bitkilerde de kullanılmaya başlanmıştır. İnsanda 3.1 milyon SNP bulunurken tek nükleotid farklılığı frekansı 1SNP/100 bp'dir (Salisbury et al., 2003). Benzer şekilde bitki genomlarında da yüksek oranda SNP bulunmaktadır, ancak keşfedilmeleri daha yavaş olmaktadır. Örneğin (yabancı döllenenler) asmada her 78 bp de 1 SNP bulunurken (Salmaso et al., 2004) mısırdaki (mısır genomu 1.088 bp) bu oran 1SNP/43 bp'dir (Jones et al., 2009). Fasulye gibi kendine döllenen bir bitki olan soya fasulyesinin kodlanmayan bölgelerinde her 191 bp de 1 SNP bulunurken, kodlanan bölgelerinde bu oran 1/2000'dir (Van et al., 2005). Genom haritalama açısından bu rakamlar çok önemli bir sonuçtur.

Diğer yandan fasulyede de SNP geliştirme çalışmaları başlamıştır (Galeano et al., 2009a). Fasulyede SNP'ler bugüne kadar genellikle çeşitlilik analizlerinde değil, çoğunlukla bağlantı haritalarında ve genomlar arasında benzerlik (synteny) analizlerinde kullanıldılar (Galeano et al., 2009a; 2009b; McConnell et al., 2010). Ayrıca yüksek yoğunluktaki ilişki haritaları gibi haritalarda kullanılması son derece uygundur (Wang et al., 1998). İlk olarak Ramirez et al. (2005) tarafından Andean genotipi G19833 yapraklarındaki, Mezoamerikan genotipi Negro Jamapa 81 yapraklarındaki, gelişmekte olan baklalardaki, fosforu eksik köklerdeki ve kök nodüllerindeki bilgilere dayanarak EST'lerde yüksek sayıda SNP belirlenmiştir. EST'ler genomun kodlanan bölgelerinde bulunduğu ve fenotipik özelliklerle ilişkili olduğundan son derece önemli markırlardır. Ayrıca çeşitler arasında korunmuş bölgelerdir. EST'ler SNP sıklığını da göstermektedir. Mezoamerikan genotipi DOR364 ve Andean genotipi G19833'den elde edilen dizi bilgileri ile sınırlı sayıda (25 adet) SNP belirlenmiştir (Gaitan et al., 2008). Galeano et al. (2009b), bu EST'leri kullanarak Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP) markırı geliştirdiler ve markırları BSNP (bean SNP) olarak isimlendirdiler. Cleaved Amplified Polymorphic Sequences (CAPs) ve derived CAPS (dCAPs) kullanarak, McConnell et al. (2010) Andean genotipi JaloEEP558 ve Mezoamerikan genotipi BAT93'den genomik SNP markırları oluşturdular. Son olarak 454 pyrosequencing ve Solexa teknolojileri kullanılarak aynı genotiplerde bulunan SNP'lerin doğruluğu kanıtlanmıştır (Hyten et al., 2010).

Gaitan-Solis et al. (2008), yaptıkları çalışmada ABD'nin farklı bölgelerinden toplanan 10 fasulye genotipinde kodlanan ve kodlanmayan bölgelerdeki tek nükleotid polimorfizmini belirlemek ve fasulye genotiplerinin genetik çeşitliliğinin analiz edilmesi için SNP markırı oluşturmayı amaçlamışlardır. 47 fasulye geninin sekansını GenBank veri tabanından

belirledikten sonra primer olarak kullanarak analizlerini gerçekleştirmişlerdir. Analizler sonucunda 239 adet tek nükleotid polimorfizmi tespit etmişler ve polimorfizm frekansını 88 bp için 1 tek nükleotid polimorfizmi olarak belirlemişlerdir. Genoma olan eklenmeler ve genomdan silinmeler sonucu oluşan polimorfizmi ise toplam 133 adet olarak belirlemişler ve polimorfizm frekansını 157 bp için 1 polimorfizm olarak hesaplamışlardır. Genomda nükleotid dönüşüm (C/T ya da A/G) ve değişimleri (C/G, A/T, A/C, G/T) sonucu oluşan polimorfizm sayısını toplam 117 adet olarak tespit etmişlerdir. Toplam 10 çeşidin genomlarından 20.7 kbp sekansı analiz etmeleri sonucunda nükleotid çeşitliliğini $\theta = 6,27.10^{-3}$ olarak tespit etmişlerdir. Bu değerin, analiz edilen diğer tahılların çeşitlilik değerleri ile karşılaştırıldığında yüksek bir değer olduğunu ve SNP markır yönteminin genetik çeşitliliği belirlemede çok etkin bir metod olduğunu belirlemişlerdir.

Corte's et al. (2011), Mesoamerikan ve Andean gen havuzlarına ait 70 fasulye genotipi kullanarak SNP markırı geliştirmeyi amaçlamışlardır. KASPar teknolojisini kullanarak 84 genomik ve 10 EST- SNP markırı bulmuşlar ve bu primerler kullanarak Andean ve Mezoamerikan gen havuzlarının başarılı bir şekilde ayrıldığını bildirmişlerdir. Mezoamerikan gen havuzu ile karşılaştırıldığında Andean gen havuzuna ait bireylerde daha fazla çeşitlilik gözlemlenmiştir. Elde ettikleri SNP markırlarının ortalama PIC değeri 0.47'dir. Ayrıca SSR ve SNP markırlarının fasulyede çeşitlilik çalışmalarında birlikte kullanıldıklarında ideal markır olduğunu göstermişlerdir.

Blair et al. (2013), Andean ve Mezoamerikan gen havuzuna ait Amerika kıtasının farklı bölgelerinden toplanmış fasulye genotiplerindeki çeşitliliği belirlemek ve bazı fasulye ebeveynlerinde polimorfizmin taranması için GoldenGate analizi ile SNP markırları saptamışlardır. 768 SNP'den 736 tanesini uygulanabilir bulmuşlardır. Bütün SNP'lerin ortalama PIC değeri ise 0.42 olarak hesaplanmıştır. Kullanılan markırlar doğrultusunda genotipler net bir şekilde iki gruba ayrılmıştır. Yabani formlarda ise yüksek derecede heterozigotluk gözlenmiştir.

Genetik çeşitlilik çalışmalarında farklı DNA markırları kullanılmaktadır ve bu sistemlerinin kullanılabilirliğinin karşılaştırılması bitki ıslahı analizleri için önemlidir. Çünkü, kullanılan sistemlerin laboratuvarından laboratuvara transfer edilmesi ve tekrarlanabilir sonuçlar için standart hale getirilmesi, elde edilen verilerin karşılaştırılmasına yardımcı olacaktır. Böylece yapılan çalışmaların

masrafları da azalır ve zamandan tasarruf sağlanır. Garcia et al. (2004), tropikal mısır türlerinde çeşitliliği belirlemek amacıyla farklı markır sistemlerini (AFLP, RAPD, RFLP ve SSR) kullanmışlardır. Yüksek oranda doğru sonuç verdiği için AFLP markır sistemini mısır genotipleri arasında genetik çeşitliliği belirlemede en kullanışlı olarak bulmuşlardır. Geleta et al. (2005), ise sorghum genotipleri arasında yaptıkları çeşitlilik çalışmasında AFLP ve SSR tekniklerinin her ikisinin de etkili olduğunu bildirmişlerdir. SNP markıları ile düşük maliyette yüksek verim elde edilebilmektedir. Böylece daha çok markır elde edilerek daha güvenilir sonuçlara ulaşılır. Yapılan genetik çeşitlilik analizlerinde her bir markır kullanımının avantajı ve dezavantajları bulunmaktadır. Bu yüzden analizi yapılacak materyalin özellikleri dikkate alınarak en uygun markır sisteminin seçilmesi gerekir (Maras et al., 2008; Masi et al., 2009). Ayrıca bir türde kullanılan markır sistemi diğer bir türde aynı etkinliği göstermeyebilir. İdeal markır sistemi; yüksek derecede polimorfizm göstermeli, genoma eşit şekilde dağılmış ve ko-dominant olmalı, uygun maliyet ile yüksek verim elde edilebilen doğru ve tekrarlanabilir sonuç vermelidir (Yan et al., 2010). Ancak tek bir markır sistemi ile bütün bu özelliklerin her zaman bir arada olması mümkün olmayabilir. Dolayısıyla aynı anda birkaç markır çeşidinin bir arada kullanılması ile ideal markıra ulaşılabilir.

2.3 Genetik Haritalama Çalışmaları

Genetik haritaların ana hedefi kantitatif özellikleri kontrol eden genlerin bulunduğu bölgeyi belirlemek ve kromozomlar üzerinde markırların yerini tespit etmektir. 1913'de Alfred H. Sturtevant, 6 morfolojik özellik kullanarak ilk genetik haritalama çalışmasını *Drosophila melanogaster*'de yapmıştır. Daha sonra 1923 yılında ilk QTL ve bağlantı harita çalışması Karl Sax tarafından fasulyede yapılmıştır.

Bağlantı haritaları ile kromozom üzerinde bulunan gen ya da markırların yeri tespit edilir. Dolayısıyla bu haritalar genomdaki rekombinasyon oranları ve tür içi ya da türler arası kromozomlardaki dizilişleri hakkında bilgi vermektedir (Dawson et al., 2007). Fasulyede yapılan ilk bağlantı haritası, Mezoamerikan (BAT93) ve Andean (Jalo EEP558) havuzlarından elde edilen rekombinant kendilenmiş hatlarda (Recombinant Inbred Line, RIL), 194 RFLP markırı kullanılarak yapılmıştır (Freyre et al., 1998). Günümüze kadar fasulyede yapılan bağlantı haritaları 1258.8 cM genetik uzaklığı kapsamaktadır. Toplamda 11

bağlantı grubunda 413 lokus belirlenmiştir. Komşu lokusların birbirlerine olan ortalama uzaklıkları ise 3.0 cM olarak hesaplanmıştır (Hanai et al., 2010).

Bağlantı haritalarında birçok populasyon çeşidi kullanılmaktadır. Populasyon yapısına bakıldığında fasulyede F_2 populasyonu kullanılarak ilk genetik haritalama yapılmıştır (Vallejos et al., 1992; Nodari et al., 1993). F_2 populasyonunu geliştirmek kolay olmakla birlikte tohum temin etmek sınırlayıcı faktör olmuştur. Kendilenmiş hatlar kullanılarak bu problemin üstesinden gelinmiştir (Freyre et al., 1998; Yu et al., 1998). The BAT93 x Jalo EEP558 en yaygın kullanılan kendilenmiş hatlardır, çünkü bu hatlarla yapılan diğer bağlantı haritaları birbiriyle örtüşmüştür (Freyre et al., 1998; Blair et al., 2003). Son yıllarda fasulyede QTL analizlerinde de geriye melez populasyonları başarı bir şekilde kullanılmaktadır (Blair et al., 2006). Ancak bu populasyonları oluşturmak zaman almaktadır.

Üretim, verim, kalite, strese karşı tolerans ve bazı hastalıklara karşı dirençlilik gibi tarımsal öneme sahip olan birçok özellik birden fazla gen tarafından kontrol edilir ve bu özellikler kantitatif özellik olarak isimlendirilir. Genomda kantitatif özellikler ile ilgili genlerin bulunduğu bölgelere QTL denir. QTL analizi, bir yada daha fazla kantitatif karakter açısından farklı ebeveynlerin seçilmesi ve melezlenmesi ile açılım gösteren populasyonların analiz edilip, DNA markırları ile kantitatif karakter lokusu arasında bir bağlantının kurulmasıyla gerçekleşir. Agronomik öneme sahip bu QTL'lerin belirlenmesi ve bunların kullanımı için moleküler markırlar kullanarak bitki genomlarında haritalanmaları gerekir. Ancak bağlantı haritaları ile birden çok genle kontrol edilen bu kompleks özelliklerin yerini belirlemek mümkün değildir. Bu sorunun üstesinden gelebilmek için QTL haritalar geliştirilmiştir.

Bugüne kadar fasulyede birçok karakterle ilişkili QTL analizi yapılmıştır; hastalık direnci (Kelly and Miklas, 1998), konserve kalitesi (Posa-Macalincag et al., 2000), tohum boyu (Park et al., 2000), N-fiksasyon (Nodari et al., 1993), kuraklık (Schneider et al., 1997), adi yanıklık (Park et al., 1999) ve beyaz çürüklülüktür (Miklas et al., 2001; Park et al., 2001). Bitkilerde birçok kantitatif kalıtılan bu gibi özellikler populasyonun bireyleri arasında sürekli değişim göstermektedir. Bu da QTL'lerin kullanımında dezavantaj sağlamaktadır. Fasulyedeki mineral içeriği gibi özellikleri belirlemek zor olduğundan bitki ıslah programları bu tür özellikleri geliştirmek için çalışmaktadır.

2.4 İlişki Haritalama

Bugüne kadar çeşitli bitki genomlarında yüzlerce bağlantı haritası yapılmıştır ancak gen düzeyinde sınırlı sayıda QTL belirlenmiştir (Price, 2006). QTL'lerin saptanması, kesin fenotipik açılımların olmayışı ve kompleks bir karakter ile ilgili her bir genin fenotipik etkisinin nispeten küçük oluşu nedeniyle zordur. QTL haritalarda genellikle rekombinant kendilenmiş hatlar gibi iki ebeveynin melezlenmesi sonucunda elde edilen melez populasyonlar kullanılmaktadır. Bu geniş populasyonların oluşturulması pahalı olduğu gibi aynı zamanda populasyonlar oluşturulurken elde edilen rekombinantların sayısı da sınırlı kalmaktadır. Bu nedenle QTL haritalar ile 10-20 cM aralığında göreceli olarak birbirinden uzak bölgeler belirlenebilmektedir (Holland, 2007). Halbuki QTL, markıra ne kadar yakın ise QTL'in etkisi o kadar sağlıklı saptanabilir. Ayrıca bu haritalarda popülasyondaki ilgili özelliği ayırt etmek için farklı çevre koşullarında deneme yapılması gerekir. QTL haritaların bir diğer dezavantajı da kullanılan popülasyona göre, ebeveyn genotiplerini ve haritalama popülasyonunu ayırt etmede fazla sayıda polimorfik markıra ihtiyaç duymasıdır. Çünkü, öncelikle ebeveyn genotipleri taranmakta, ebeveynler arasında polimorfik markır bulunursa daha sonra bu markırlar ile tüm popülasyon taranmaktadır (Abdurakhmonov and Abdurakhmonov, 2008). Sonuçta elde edilen QTL'ler popülasyondan popülasyona değişiklik gösterdiğinden kalıcı olmamaktadır.

Karmaşık özelliğe sahip karakterlerdeki varyasyonları genom düzeyinde belirlemede çıkan bu gibi sorunları ortadan kaldırmak amacıyla QTL haritalara alternatif bir yöntem olarak LD'ye dayanan ilişki haritalama metodu geliştirilmiştir. İlişki haritalarda ise bu zaman alıcı popülasyonlara gerek kalmadan daha kısa sürede kalıcı sonuç veren doğal popülasyonlar kullanılmaktadır. Genetik bağlantılar genellikle kromozom üzerinde farklı lokuslar arasındaki genetik uzaklığın kalıtımını ifade eder. Popülasyon genetiğinde kromozomların farklı lokuslarında bulunan alleller arasındaki bu ilişkiyi ifade etmede iki terim kullanılır; bağlantı eşitliği (LE) ve bağlantı dengesizliği (LD). LE; farklı lokuslardaki rasgele allel ilişkisini ve haplotiplerdeki allel frekansını ifade ederken, LD ise farklı lokuslardaki tesadüfi olmayan allel ilişkisini ifade etmektedir. İlk defa LD terimi 1917'de Jennings tarafından tanımlanmıştır (Abdurakhmonov and Abdurakhmonov, 2008). Tozlaşma tipine, rekombinasyona, mutasyona, göç oranına ve ebeveyn seçimi ve popülasyon yapısına bağlı olarak değişim gösterir (Slatkin et al., 2008). Breseghello et al. (2006), buğdayda 95 genotip ile yaptıkları analizde 36 SSR markırı kullanmışlar

ve çalışmada 5A ve 2D kromozom bölgelerinde ortalama <1 ve ~ 5 cM mesafede güçlü LD değeri saptamışlardır. Garris et al. (2003), kendine döllen 114 çeltik genotipinde 21 SSR markırı kullanarak 100 kb mesafede LD belirlemişlerdir. Kendine döllen türlerde rekombinasyon oranı düşük olduğundan yabancı döllen türler göre daha yavaş oranda LD gözlemlenir. Bazı genetik faktörlerden dolayı genellikle farklı kromozomların uzak bölgelerinde bulunan LD'ler önemli bulunur (Stich et al., 2006). Bu nedenle çok sayıda rekombinasyon saptanabilmektedir ve birbirine daha yakın bulunan markırlar belirlenebilir. Ayrıca bulunan bu markırlar kalıcı oldukları için daha sonra farklı populasyonlara da aktarılabilirler. Böylelikle QTL haritalara göre ilişki haritalar kullanılarak daha fazla çözünürlüğe sahip haritalar ile daha fazla sayıda allel elde edilir (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1 İlişki haritalama ile QTL haritaların karşılaştırılması (Oraguzie et al., 2007)

	QTL harita	İlişki Harita
Amaç	Kantitatif özellik lokusu; geniş bir bölgede bulunan QTL'leri belirlemek	Kantitatif özellik nükleotidi; fiziksel olarak mümkün olduğunca yakın etkin dizileri belirlemek
Polimorfizm oranı	Düşük -orta yoğunluktaki linkage haritalarda kullanılabilir	Geniş ve dar bölgelerdeki birçok markırı ayırt edebilir.
Populasyon yapısı	Melez populasyonlar; geri çapraz, F_2 , RIL, katlanmış hatlar (Double haploid, DH), yakın izogenik hatlar (Near Isogenic Line, NIL)	Doğal populasyonlar
Maliyet	Orta	Az sayıda özellik için orta, daha fazla sayıdaki özellik için pahalı
Genomda kapsadığı markır sayısı	10^2-10^3	Küçük genomlarda 10^5 Büyük genomlarda 10^9

Stich et al. (2005) Avrupa ve Amerika'dan elde edilen 147 mısır genotipinde genetik çeşitliliği ve LD değerini belirlemek amacıyla 100 SSR markırı kullanmışlardır. LD değerini orta derecede önemli bulmuşlardır ($P < 0.05$). Mısırdaki bulunan 10 kromozom üzerinde rasgele dağılım gösteren sert mısır grubunda 26 cM ve at dişi mısır grubunda 41 cM büyüklüğünde LD belirlemişlerdir.

İlişki haritalamanın amacı, fenotipik farklılıklarla ilişkili varyasyonları ve bu fenotipik özelliklerle yakından ilişkili gen bölgelerinde bulunan DNA dizilerinde polimorfizime neden olan özellikleri ve lokuslar arasındaki ilişkiyi belirlemektir. İlişki haritalama; LD, ilişki çalışmaları gibi farklı isimlerle de isimlendirilmiştir (Kruglyak, 1999).

İlişki haritalama oluşturmada 6 ana adım bulunmaktadır:

1. Aralarında geniş genetik varyasyon bulunan bireylerin seçimi ile doğal populasyonun oluşturulması
2. Seçilen populasyonda fenotipik karakterlerin ölçümü
3. Uygun moleküler markırlar kullanılarak populasyondaki bireylerin genotiplerinin taranması
4. Moleküler markır verileri kullanılarak populasyon bireylerinin genomlarındaki LD'lerin ölçülmesi
5. Populasyon yapısının belirlenmesi (bireyler arasında oluşan grupların ve genetik çeşitlilik seviyesinin belirlenmesi)
6. Populasyon yapısının ve LD'lerin ölçülmesinden elde edilen sonuçlar doğrultusunda uygun istatistiksel programlar kullanılarak fenotipik ve genotipik verilerin beraber analiz edilmesi

Bitkilerde yapılan ilk ilişki harita çalışmaları mısırdaki (Bar-Hen and Charcosset, 1995), pirinçte (Virk et al., 1996) ve yulafta (Beer et al., 1997) yapılmıştır. Bar-Hen et al. (1995) mısırdaki RAPD, Virk et al. (1996) pirinçte izozim markırlarını kullanarak haritalama yapmışlardır. Beer et al. (1997), 64 yulaf çeşidinde RFLP markırlarını kullanarak 13 QTL bölgesi belirlemişlerdir. Bu çalışmalarda populasyon yapısı göz önünde bulundurulmaksızın düşük sayıda markır kullanılmıştır. Doğru populasyon seçiminde moleküler markırları da dikkate alarak yapılan ilk ilişki çalışması mısırdaki (Pritchard and Donnelly, 2001) yapılmıştır. Mısırdaki çiçeklenme zamanı ile D8 lokusu ilişkili bulunmuştur. Arabidopsis'te de bu kavramın doğrulanmasında birçok ilişki haritalama çalışması yapılmıştır. Aranzana et al. (2005), çiçeklenme zamanı ve patojene direnç genleri ile ilişkili olarak geniş anlamda ilk haritalama çalışmasını

Arabidopsis'de gerçekleştirmişlerdir. Böylelikle tüm genomu kapsayan fonksiyonel varyasyonları belirlemek amacıyla çok sayıda markır kullanılmaya başlanmıştır. Daha sonra günümüze kadar birçok bitkide çeşitli morfolojik özellikler kullanılarak ilişki haritaları yapılmaya başlanmıştır (Agrama et al., 2007).

Son yıllarda ise sekans teknolojilerinin sağladığı yararlarından faydalanarak ilişki haritalama çalışmaları geliştirilmiştir. Bu teknolojiler sayesinde daha az maliyet ile daha çok sayıda markır kullanımına olanak sağlanmıştır. *Arabidopsis*'de çeşitli adaptasyonların anlaşılması, iklime hassas QTL'lerin belirlenmesi ve külleme direnç genlerinin incelenmesi son ilişki haritalama çalışmalarıdır (Li et al., 2010, Nemri et al., 2010). Mısır genomunda yaklaşık 1.6 milyon SNP kullanılarak kuzey ve güney yaprak yanıklığı ve yaprağın özellikleri haritalanmıştır (Kump et al., 2011, Poland et al., 2011, Tian et al., 2011). Poland et al. (2011), mısırdaki reseptör kinaz genlerini de içeren bitki savunması ile ilişkili aday genlerin küçük etkileri ile ilişkili birçok lokus belirlemişlerdir. Kump et al. (2011) ise güney yaprak yanıklığı ile ilişkili 32 QTL saptamışlardır. Tüm genomu temsil edecek sayıda çok markır kullanılarak yapılan çalışmalar mısır ve *Arabidopsis*'in yanında çeltik ve arpa gibi diğer türlerde de başlamıştır. Huang et al. (2010), çeltikte yaklaşık 3.6 milyon SNP kullanarak 14 morfolojik özellik ile ilişkili genetik temelleri ortaya koymuşlardır. Bu çalışma ile ortalama fenotipik varyansın yaklaşık % 36'sını açıklayan lokuslar belirlenmiştir. Arpada antosiyanin yolu geni, *HvbHLH1*, ile ilişkili 15 morfolojik özellik tanımlanmıştır (Cockram et al., 2010). Buğdayda adaptasyon ile ilişkili genlerin anlaşılmasına yönelik çalışmalar yapılmıştır. Raman et al. (2010), dünyada asitli topraklarda abiyotik stresi en fazla kısıtlayan faktör olan alüminyum dirençliliği ile ilişkili genetik faktörleri belirlemeyi amaçlamışlardır. Daha sonra Rousset et al. (2011), buğdayda çiçeklenme zamanı ile ilişkili genlerin etkilerini araştırmışlardır. *Vrn-3* geni yüksek oranda korelasyon bulunurken, *Vrn-1*, *Hd-1* ve *Gigantea* genleri daha az korelasyon bulunmuştur. Kolza (*Brassica napus*)'da tohum yağı ile ilişkili birçok lokus belirlenmiştir (Zou et al., 2010). Tetraploid yonca bitkisinde farklı çevre koşullarında değerlendirilen verim ile ilişkili 15 SSR markırı saptanmıştır (Li et al., 2011). İlişki haritalama bitkilerdeki kompleks özellikleri ayırt etmede başarılı bir şekilde kullanılmaktadır.

Birbirinden bağımsız iki popülasyona ait soya fasulyesinde (*Glycine max* L. Merr.) demir eksikliğinin markırlarla ilişki haritası tek faktör analizi ve Karışık Lineer Model (Multiple Linear Model, MLM) analizi kullanılarak yapılmıştır.

MLM modeline göre demir eksikliği ile ilişkili üç markır tespit edilmiştir. Bunlardan *Satt* 114 ve *Satt* 239 markırları aynı zamanda ikinci popülasyonda da bu hastalık ile ilişkili bulunmuştur (Wang et al., 2008).

Asya ve Afrika kıtasındaki 27 farklı ülkeden elde edilen 107 sorghum genotipleri arasında 98 SSR markırı kullanarak ilişki haritalama çalışması yapılmıştır (Shehzad et al., 2009). Çalışmada 26 morfolojik özellik gözlemlenmiştir. Bu özellikler ile ilgili QTL'leri belirlemede farklı analiz metodları kullanılmıştır (GLM, MLM ve çoklu QTL). Her 3 metodun kullanımında ortak sonuç; 14 SSR lokusu, 12 farklı morfolojik özellik ile ilişkili bulunmuştur (başaklanma tarihi, çiçeklenme tarihi, sap uzunluğu, sürgün sayısı, salkım sayısı ve uzunluğu gibi). İlişkilerin belirlenmesinde farklı modeller kullanarak sonuçların doğruluğunun desteklendiğini bildirmişlerdir.

Fasulyede ise bugüne kadar yapılmış sadece birkaç ilişki haritalama çalışması bulunmaktadır. Shi et al. (2011), 469 kuru fasulye örneğinde yaprak yanıklığı ile ilişkili SNP markırlarını belirlemişlerdir. 132 SNP markırından 75'ini ilişki haritalama analizinde kullanmaya uygun bulmuşlardır. Hastalığı 14 ve 21. günlerde sırasıyla 18 ve 22 SNP markırı ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir. Bunlardan 14 markır her iki günde de ilişkili bulunmuştur. UBC420, SU91, g321, g471 ve g796 markırları yüksek derecede önemli saptanmıştır ($p \leq 0.001$). İlişkili bulunan 12 SNP markırının, daha önce yapılan adi yaprak yanıklılığı ile ilgili QTL çalışmaları ile örtüştüğünü bildirmişlerdir.

Galeano et al. (2012), 93 fasulye (80'i Andean, 6'sı Mezoamerikan gen havuzuna ait) genotipinde SNP ve SSR markırları kullanarak farklı çevre koşullarında (sulak ve kurak) fenotipik karakterler (çiçeklenme zamanı, olgunlaşma günü, bitkideki bakla, bakladaki tohum, bitkideki tohum, % boş bakla sayısı, ortalama bakla uzunluğu ve 100 dane ağırlığı) ile ilişkili MLM ve GLM analizine dayalı harita yapmışlardır. LD analizi sonucu 110 SNP ($r^2=0.18$) ve 24 SSR ($r^2=0.025$) markırını önemli bulmuşlardır. SSR markırları arasındaki LD; SNP markırları arasında saptanan LD değerine göre daha düşük belirlenmiştir. Bunun nedeni SNP markır sayısının daha fazla olmasına bağlı bulmuşlardır. Sonuç olarak haploid blokları 2 ile 4, 1 ile 2 ve 2 ile 8 bağlantı grupları arasında SNP markırları belirlenmiştir. GLM metodu sonucuna göre, 16 markır ile 53 özellik bölgesi ilişkili bulunmuştur. Bunlardan 30'u her iki ortam koşulunda da ilişkili bulunurken 8'i sulak ortamda, 15 ise sadece kurak ortamda ilişkili bulunmuştur. 12 SSR lokusundan 10'u her iki ortam koşulunda da ilişkili

bulunmuştur. Ayrıca, bazı markırlar birden fazla morfolojik özellik ile ilişkili bulunmuştur. Örneğin; 2. bağlantı grubunda yer alan BM143 markırı çiçeklenme zamanı, olgunlaşma günü, % boş bakla, bitkideki bakla ve bitkideki tohum sayısı ile ilişkili bulunmuştur. MLM metodu sonucuna göre; 28 markırı ile 66 özellik bölgesi ilişkili bulunmuştur. Bunlardan 28'i her iki ortam koşulunda da ilişkili bulunurken 22'i sulak ortamda, 16 ise sadece kurak ortamda ilişkili bulunmuştur. Ayrıca, bazı markırlar birden fazla morfolojik özellik ile ilişkili bulunmuştur. Örneğin; 2. bağlantı grubunda yer alan BSn66_SNP 2 markırı, olgunlaşma günü, % boş bakla, bitkideki bakla, bakladaki tohum ve bitkideki tohum sayısı ile ilişkili bulunmuştur. GLM ve MLM sonuçları karşılaştırıldığında; BM143 ve BSn244_2 her iki analizde de önemli saptanmıştır. Sonuçta birbirine yakın lokasyonda bulunan örnekler kullanılmasına rağmen ilişki haritalama metodu sayesinde önemli bulgular saptanmıştır.

Haritalamada genetik bilginin analizinde kullanılmak üzere bilgisayar paket programları geliştirilmiştir. Genetik benzerliklerine göre bireyleri gruplandırmada (bireyler arasında alt populasyonları belirlemede) çok değişkenli analizlerin farklı çeşitleri kullanılabilir. Bu amaçla kullanılan iki ana kümeleme metodu vardır; bireyler arasında bulunan genetik uzaklık esasına dayanan metodlar (genellikle bir ağaç ya da dendogram şeklinde belirtilir) ve model tabanlı metodlar. UPGMA, genetik uzaklık esasına dayanan metodlar arasında en yaygın olarak kullanılan metoddur (Mohammadi and Prasanna, 2003). Genetik uzaklık esasına dayanan metodlar arasında bulunan bir diğer metod da 1987'de Saitou ve Nei tarafından bulunmuştur. Bireylerin komşu ilişkilerine göre değerlendiren metod (the neighbour-joining method) evrimsel ağaçlar oluşturmak için kullanılır. Evrimsel olarak; UPGMA metodu ile karşılaştırıldığında en önemli avantajı; bu metodda bireylerin aynı oranda geliştiği kabul edilemez. Ayrıca bu metod istatistiksel olarak daha fazla tutarlılık göstermektedir.

Model tabanlı kümeleme metodları; her kümenin bazı parametrik modeller tarafından rastgele yapıldığını varsaymaktadır. Bu birey ve kümelerin parametreleri maksimum olasılık ve Bayesian metodları gibi standart istatistiksel yöntemler kullanılarak belirlenir. Pritchard et al. (2000a), model tabanlı kümeleme analizi yapan STRUCTURE programını geliştirdiler. Bu programda populasyon yapısının belirlenmesi ve bireylerin alt gruplara ayrılması için genotipik verileri kullanılmıştır. STRUCTURE programı, farklı populasyonlardan kökenlenen bireylerin genomlarındaki oranını hesapladığı için karışım (admixture) analizi gerçekleştirmektedir. STRUCTURE; Bayesian yaklaşımını

kullanır ve kısmi olarak gerçekleşen mutasyonları kullanmamaktadır. Pritchard et al. (2010), STRUCTURE programında elde edilen populasyon sayısının (programda K olarak belirtilmektedir) önemli olduğunu ve bu populasyonların biyolojik öneminin dikkate alınması gerektiğini vurgulamışlardır. Daha sonra 2005 yılında Evanno et al. doğru populasyon sayısını (K) belirlemeye yardım etmek için *ad hoc* statistic (ΔK) formülünü bulmuşlardır.

$$\Delta K = m(|L(K + 1) \Delta^2 L(K) + L(K \Delta 1)|) / s[L(K)]$$

Bu formüle göre, $L(K)$; belirli bir K değeri için $\ln P(D)$ 'nin tahmini olasılığı $s[L(K)]$; $L(K)$ 'nin standart sapma değerini göstermektedir. m ise ortalama değeri belirtmektedir. Sonuçta (ΔK) değeri doğru K değerinde maksimum pik gösterir (Cho et al., 2008). Fasulye ile yapılan birçok genetik çeşitlilik çalışmasında da STRUCTURE programı kullanılarak populasyonlar başarılı bir şekilde gruplara ayrılmaktadır (Blair et al., 2012; Hegay et al., 2012).

Genotip açısından populasyon yapısı belirlenmiş analizlerin fenotipik karakterlerle ilişkilerinin değerlendirilmesinde TASSEL programı kullanılmaktadır (Pritchard et al., 2000b; Thornsberry et al., 2001). Kompleks özellikler birden fazla QTL ile kontrol edildiğinden, QTL haritalarının amacı; her bir QTL ile ilişkili markırları belirlemektir. Bu amaç doğrultusunda markırlarla ilişkili kalıcı olacak şekilde lineer modeller geliştirilmiştir. Bu programda GLM ve MLM modellerine göre analizler yapılmaktadır. GLM modeline göre; öncelikle STRUCTURE programı tarafından populasyon yapısı belirlenir ve Q matrix elde edilir. GLM; her bir markır-özellik kombinasyonu için ana etkileri, birbirleriyle olan etkileşimleri, iç içe etkileşimleri ve kovaryeterleri de dikkate alarak en küçük kareleri hesaplar (Bradbury et al., 2007). TASSEL ayrıca LD hesaplamada ve grafiksel olarak yorumlamada da kullanılmaktadır.

3. MATERYAL-METOD

3.1 Materyal

Çalışmada dünya ve Türkiye'nin farklı bölgelerinden elde edilmiş fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) türüne ait 66 genotip kullanılmıştır. Kullanılan genotipler Çizelge 3.1'de belirtilmiştir.

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan fasulye genotipleri ve lokasyonları

Genotip Numarası (#)	Lokasyon	Genotip Numarası (#)	Lokasyon
1	Gölcük/Türkiye	34	Karadeniz/Türkiye
2	Bozdağ/Türkiye	35	Tekirdağ/Türkiye
3	Gölcük/Türkiye	36	Isparta/Türkiye
4	Gölcük/Türkiye	37	Karadeniz/Türkiye
5	Gölcük/Türkiye	38	Alman Ayse/Türkiye
6	Gölcük/Türkiye	39	Sarımsız/Türkiye
7	Bozdağ/Türkiye	40	Türkiye
8	Gölcük/Türkiye	41	Türkiye
9	Bozdağ/Türkiye	42	Türkiye
10	Kırklareli/Türkiye	43	Bulgaristan
11	Kırklareli/Türkiye	44	Türkiye
12	Bandırma/Türkiye	45	Almanya
13	Bandırma/Türkiye	46	Almanya
14	Bandırma/Türkiye	47	Türkiye
15	Bandırma/Türkiye	48	Türkiye
16	Bandırma/Türkiye	49	Türkiye
17	Gölcük/Türkiye	50	Hollanda
18	Gölcük/Türkiye	51	Hindistan
19	Kırklareli/Türkiye	52	Hindistan
20	Kırklareli/Türkiye	53	ABD
21	Bandırma/Türkiye	54	İngiltere
22	Bandırma/Türkiye	55	İngiltere
23	Bandırma/Türkiye	56	İngiltere
24	Kırklareli/Türkiye	57	Türkiye
25	Yalova/Türkiye	58	Bursa/Türkiye
26	Yalova/Türkiye	59	Hollanda
27	Gino/Türkiye	60	Hollanda
28	Sarımsız/Türkiye	61	ABD
29	Selçuk/Türkiye	62	ABD
30	Tokat/Türkiye	63	ABD
31	Özayşe/Türkiye	64	ABD
32	Tire/Türkiye	65	Türkiye
33	Antalya/Türkiye	66	Türkiye

3.2 Metod

3.2.1 Fasulye genotiplerine ait tohumların ekilmesi, yetiştirilmesi ve hasadı

Genotipler, 7 Ağustos 2011 tarihinde yaz mevsiminde Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkilerinin arazisinde tesadüf blokları deneme desenine göre ekilmiştir. Ekimler, 60 x 10 normlarında yapılmıştır. Deneme, iki tekerrürlü olarak ekilmiştir. Gerekli bakım işleri yapıldıktan sonra 12 Kasım 2011 tarihinde hasat edilmiştir.

3.2.2 Fenotipik analizler

Bitkilerde agronomik gözlemler The International Board for Plant Genetic Resources (IBPGR) kriterlerine göre yapılmıştır. Buna göre;

3.2.2.1 Meyve liflilik özelliği: Lifli/Lifsiz olarak değerlendirilmiştir. Lifsiz (1) ve Lifli olanlar (2) olarak kaydedilmiştir.

3.2.2.2 Bitki büyüme şekli: Aşağıdaki kriterler göz önünde bulundurularak değerlendirme yapılmıştır.

1- Bodur tipi

2- Sırık tipi

3- Yarı tırmanıcı sırık tip

4- Tırmanıcı sırık tip

3.2.2.3 Bitki tipi: Aşağıdaki kriterler göz önünde bulundurularak değerlendirme yapılmıştır. Temel olarak bodur ve sırık olarak değerlendirilmiştir. Bodur tipde; çiçeklenme başlayınca yeni sürgün oluşumu durmaktadır. Sırık tiplerde ise; çiçeklenme boyunca yeni büyüme yerleri gelişmeye devam etmektedir.

1- Bodur tipi

- 2- Dalları yere doğru eğilen sırık tip
- 3- Dik dalları olan sırık tip
- 4- Ana kök ve dalları yarı tırmanıcı sırık tip
- 5- Baklaları eşit dağılmış ve ılımlı tırmanma yeteneği olan sırık tip
- 6- Baklaları boğumların üstünde bulunan ve tırmanma yeteneğine sahip sırık tip
- 7- Diğer

3.2.2.4 Tohum taslağı sayısı: Bitkilerin her birinden en az 5 bakla seçilerek tohum sayıları sayılmış ve ortalamaları alınmıştır.

3.2.2.5 Çiçeklenme zamanı: Bitkilerde ilk çiçeklenmenin başladığı tarihten itibaren geçen gün sayısı olarak kaydedilmiştir.

3.2.3 DNA izolasyonu

DNA izolasyonu için genotiplerin yeni açmakta olan genç yaprakları kullanılmıştır. Yaprak örnekleri sıvı azot (-196°C) içerisine konulmuş daha sonra DNA izolasyonuna kadar -80°C’de saklanmıştır. DNA izolasyonu; Saghai-Marroof et al.’un (1984) CTAB (Cetyl trimethylammonium bromide) protokolü modifiye edilerek yapılmıştır. Uygulanan DNA izolasyon protokolü aşağıda maddeler halinde verilmiştir.

- 0.1 g yaprak örneği eppendorf tüp içerisinde sıvı azot kullanılarak doku parçalayıcı cihazı aracılığıyla ezilmiştir.
- 900 µl CTAB buffer ilave edilip, karışması için 1-3 dk vortekslenmiştir.
- 4 µl RNase solusyonu ve 4 µl ProteinazK solusyonu ilave edilerek yavaşça karıştırılmış ve 37°C’de 15 dk inkubasyona bırakılmıştır.
- Daha sonra 65°C’de 1 saat su banyosunda bekletilmiştir. Bu esnada eppendorf tüpler her 10 dakikada bir karıştırılmıştır.
- Örnekler, inkübasyondan sonra oda sıcaklığında 5 dk bekletildikten sonra üzerlerine 900 µl fenol: kloroform: izoamilalkol (25:24:1) karışımından

eklenmiş ve DNA'nın zarar görmemesi için çok yavaş bir şekilde karıştırma işlemi gerçekleştirilmiştir.

- 14.000 rpm'de 15 dk santrifuj edilmiştir.
- Süpernatant kısım temiz bir ependorfa alınmıştır.
- Süpernatantın üzerine hacminin 2/3'ü kadar 600 µl soğuk isopropanol ilave edilmiştir. Pellet oluşumu gözlenene kadar yavaşca karıştırma yapılmıştır.
- Örnekler 5000 rpm'de 30 sn santrifüjlenerek üst faz dibe çöken pellet dibe düşmeyecek şekilde uzaklaştırılmıştır.
- Pellet üzerine 10 mM amonyum asetat içeren % 76'lık etanol ilave edilmiş ve 2000 rpm'de 30 sn santrifüjlenerek yıkama işlemi yapılmıştır.
- Süpernatant dikkatli bir şekilde uzaklaştırılmıştır ve alkolün tamamen uzaklaştırılması için 1 gece boyunca oda sıcaklığında bekletilmiştir.
- Alkol tamamen uçtuktan sonra 100 µl TE (Tris-EDTA) tampon çözeltisi ilave edilerek 65°C'de 1 saat DNA'nın çözülmesi beklenmiştir.
- İzolasyonu tamamlanan örnekler yapılan analizler boyunca +4°C'de saklanmıştır. Stok DNA'lar ise -80°C'de muhafaza edilmektedir.

DNA izolasyonunda kullanılan çözeltilerin içerikleri EK 1.1'de yer almaktadır.

3.2.3.1 DNA saflığının belirlenmesi

Elde edilen DNA'nın saflığının belirlenmesi için TE tampon çözeltisi içerisinde çözdüğümüz örneklerden 2 µl alınmış, üzerine 8 µl Up su (Ultra pure su) ve 2 µl brom fenol blue boyası eklenerek, 1X TAE (Tris-Asetat-EDTA) tamponu içerisinde yer alan % 1'lik agaroz jele yükleme yapılmıştır. Elektroforez işlemi sırasında 60 Volt gerilim ve 400 mA akım uygulanmıştır.

3.2.3.2 Agaroz jellerin boyanması ve görüntülenmesi

Agaroz jeller 5 µl EtBr (Etidyum Bromid) / 100 ml saf su içinde 20 dakika süreyle karıştırıcı üzerinde boyanmıştır. Boyama işleminin ardından saf su ile durulanan jeller G-box SYNGENE görüntüleme sistemi ile UltraViyole (UV) ışık altında görüntülenmiştir.

Agaroz jel elektroforezinde kullanılan çözeltilerin içerikleri EK 1.2’de yer almaktadır.

3.2.3.3 DNA miktarının belirlenmesi ve DNA konsantrasyonun PCR reaksiyonları için ayarlanması

İzolasyonu ve agaroz jel elektroforezde saflıkları belirlenen örneklerin DNA/RNA oranları ve DNA’larının miktarları spektrofotometre ile (NanoDrop ND 1000) 260 ve 280 nm dalga boylarında ölçümler yapılarak belirlenmiştir. PCR reaksiyonlarında kullanılmak amacıyla stok DNA’lardan AFLP analizlerinde kullanmak üzere 40 ng/μl, SSR ve SNP analizlerinde kullanmak üzere 20 ng/μl, konsantrasyonlarda hazırlanmıştır.

3.2.4 AFLP markır analizi

AFLP analizleri için, LI-COR 4300 DNA Analyser cihazı kullanılmıştır. AFLP markır analizinde kullanılan çözeltilerin içerikleri EK 1.3’de verilmiştir.

3.2.4.1 Genomik DNA’nın restriksiyon enzimleri ile kesilmesi

Genomik DNA EcoRI (6 bp lık tanıma bölgesi) ve MseI (4 bp’lık tanıma bölgesi) restriksiyon enzimleri ile kesilmiştir. EcoRI her 2 – 2.5 kb’de bir kesim yaparken MseI 300- 400 bp’de bir kesim yapmıştır. Her bir örneğe ait reaksiyon tüpleri içerisine Çizelge 3.2’de yer alan karışım ilave edilmiş ve daha sonra PTC–225 Peltier Thermal Cycler cihazında 37°C’de 2 saat, 70°C’de 15 dakika reaksiyona tabi tutulmuştur.

Çizelge 3.2 Genomik DNA’nın restriksiyon enzimleri ile kesilmesi işleminde bir örnek için kullanılan kokteyl içeriği ve miktarları

Bileşen	Miktar
5X Reaksiyon Tamponu	2.5 μl
EcoRI/MseI Enzim Karışımı	1 μl
Up su	4 μl
DNA (40 ng/ μl)	5 μl
Toplam Hacim	12.5 μl

3.2.4.2 Adaptörlerin ligasyonu

Adaptörlerin ligasyonu işleminde her bir örnek için kullanılan karışım içeriği ve miktarları Çizelge 3.3’de verilmiştir. Reaksiyon ürünleri 20°C’de 2 saat reaksiyona tabi tutulmuştur.

Çizelge 3.3 Adaptörlerin ligasyonu işleminde bir örnek için kullanılan karışım içeriği ve miktarları

Bileşen	Miktar
Restriksiyon enzimi ile kesilmiş genomik DNA	12.5 µl
Adaptör Karışımı	12 µl
T4 DNA Ligaz	0.5 µl
Toplam Hacim	25 µl

PCR işlemi sonrasında bu örneklerden 10 µl alınıp, 90 µl TE tampon çözeltisi ilave edilerek 1:10 oranında seyreltme işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.2.4.3 Pre-amplifikasyon

Pre- amplifikasyon işleminde her bir örnek için kullanılan karışım içeriği ve miktarları Çizelge 3.4’de verilmiştir. Daha sonra PTC–225 Peltier Thermal Cycler cihazında Çizelge 3.5’de belirtildiği şekilde reaksiyona tabi tutulmuştur.

Çizelge 3.4 Pre- amplifikasyon işleminde bir örnek için kullanılan karışım içeriği ve miktarları

Bileşen	Miktar
1:10 seyreltilmiş Ligasyon ürünleri	2.5 µl
AFLP 10X Pre-amplifikasyon Primer karışımı	20 µl
PCR Reaksiyon tamponu	2.5 µl
Taq DNA polimeraz (5 unit/µl)	0.5 µl
Toplam Hacim	25.5 µl

Çizelge 3.5 Pre-amplifikasyon işleminde uygulanan PCR işlemi için reaksiyon basamakları, süresi ve sıcaklıkları

Reaksiyon basamağı	Reaksiyon sıcaklığı	Reaksiyon süresi
1	94°C	30 sn
2	56°C	1 dk
3	72°C	1 dk
4	1.2. ve 3. aşamalar	20 kez tekrarlanır
5	4°C	∞

3.2.4.4 Pre-amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforezi

Pre-amplifikasyon işleminde elde edilen ürünler selektif amplifikasyon boyunca stok görevi göreceğinden bu aşamada bir sorun olup olmadığının tespiti için pre-amplifikasyon ürünleri % 1.2'lik agaroz jelde yürütülerek kontrol edilmiştir.

3.2.4.5 Selektif amplifikasyon

Selektif amplifikasyon aşamasında pre-amplifikasyon ürünleri 1:40 oranında seyreltilerek kullanılmıştır. Seyreltilmiş pre-amplifiye ürünleri farklı kombinasyonlarda primerlerle reaksiyona tabi tutulmuştur. Kullanılan EcoRI primerleri IRD'ye 700 ve IRD'ye 800 floresan boyaları ile işaretlenmiştir. Selektif amplifikasyon işleminde her bir örnek için kullanılan karışım içeriği ve miktarları Çizelge 3.6'da verilmiştir.

Çizelge3.6 Selektif amplifikasyon işleminde bir örnek için kullanılan karışım içeriği ve miktarları

Taq DNA polimeraz karışımı

Bileşen	Miktar
Ultra saf su	158 µl
10X Amplifikasyon Tamponu	40 µl
Taq DNA polimeraz (Roche) (0.5unit/µl)	2 µl
Toplam Hacim	200 µl

1X Kokteyl için

Bileşen	Miktar
Taq DNA polimeraz karışımı	6 µl
1:40 Seyreltme işlemi yapılmış pre-amplifiye DNA	2 µl
MseI (1pmol)	2 µl
EcoRI (IRD'ye 700) (2 pmol)	1 µl
EcoRI (IRD'ye 800) (2 pmol)	1 µl
Toplam hacim	12 µl

Çalışmada 50 adet primer kombinasyonu denenerek aralarından polimorfik olan 9 primer kombinasyonu seçilmiş ve bu seçilen primerler 66 adet fasulye genotipi için uygulanmıştır. Çizelge 3.7'de kullanılan primer kombinasyonları yer almaktadır.

Çizelge 3.7 AFLP analizlerinde kullanılan primer kombinasyonları (700:700 nm, 800:800 nm dalga boylarının absorbe edildiğini belirtmektedir.)

Primer Kombinasyonu
M-CAA/E-AAC (700)
M-CAA/E-AGC (800)
M-CAA/E-AAG (700)
M-CAA/E-AGG (800)
M-GAT/E-ACA (700)
M-GAT/E-ACT (800)
M-GAT/E-AAG (700)
M-GAT/E-AGT (800)
M-ACG/E-ACA (700)

Selektif amplifikasyon aşamasında PCR için PTC-225 Peltier Thermal Cycler cihazı Çizelge 3.8'de belirtildiği gibi programlanmıştır.

Çizelge 3.8 Selektif amplifikasyon işleminde uygulanan PCR işlemi için reaksiyon basamakları, süresi ve sıcaklıkları

Reaksiyon Basamağı	Reaksiyon Sıcaklığı	Reaksiyon Süresi
1	94°C	30 sn
2	65°C	30 sn
3	72°C	1 dk
4	94°C	30 sn
5	65°C	30 sn
6	72°C	1 dk
7	94°C	30 sn
8- 42	65°C'den 56°C'ye kadar her bir basamakta, 7°C'lik sıcaklık düşüşü ile 5, 6 ve 7. basamaklar tekrarlanır.	
43	40 numaralı basamak 23 kez tekrarlanır.	
44	4°C	∞

3.2.5 SSR markır analizi

SSR analizleri için, LI-COR 4300 DNA Analyser cihazı kullanılmıştır. Çalışmamızda daha önce literatürde yayınlamış fasulye genotiplerine ait SSR primerleri kullanılmıştır (Yu et al., 2000; Gaita'n-Solı's et al., 2002; Blair et al., 2003). Literatürden elde edilen toplamda 30 SSR primeri deneme amaçlı olarak 4 genotip DNA'sında polimorfizmin belirlenmesi için kullanılmıştır. Sonuçta bu primerler arasından 22 SSR primerlerinin polimorfik olduğu belirlenmiş ve tüm örneklerle uygulanmıştır. SSR Forward primerlerinin 5' ucuna M13 forward (CACGACGTTGTAAAACGAC) sekansı eklenmiştir. Kullanılan primerlerin isimleri ve sekans bilgileri Çizelge 3.9'da yer almaktadır.

Çizelge 3.9 SSR analizlerinde kullanılan primer isimleri ve sekansları

Primer Adı	M13 İşaretli Primer Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
BMd45	CACGACGTTGTAAAACGACGGTTGGGAAGCCTCATACAG	ATCTTCGACCCACCTTGCT
BMd1	CACGACGTTGTAAAACGACCAAATCGCAACACCTCACAA	GTCGGAGCCATCATCTGTTT
BM181	CACGACGTTGTAAAACGACATGCTGCGAGTTAATGATCG	TGAGGAGCAAACAGATGAGG
BMd50	CACGACGTTGTAAAACGACTGGTGAGAGAAGGACAATAGCA	GCCGCTTGTGACGTTTATTT
BMd37	CACGACGTTGTAAAACGACGGCAGGACGAGCAACAATCCTT	CCATCATAGAGGGCAACCAC
BM170	CACGACGTTGTAAAACGACAGCCAGGTGCAAGACCTTAG	AGATAGGGAGCTGGTGGTAGC
BM160	CACGACGTTGTAAAACGACCGTGCTTGGCGAATAGCTTTG	CGCGGTTCTGATCGTGACTTC
BM210	CACGACGTTGTAAAACGACACCACTGCAATCCTCATCTTTG	CCCTCATCCTCCATTCTTATCG
BM183	CACGACGTTGTAAAACGACCTCAAATCTATTCACTGGTCAGC	TCTTACAGCCTTGCAGACATC
BM151	CACGACGTTGTAAAACGACCACAACAAGAAAGACCTCCT	TTATGTATTAGACCACATTACTTCC
BMd46	CACGACGTTGTAAAACGACGGCTGACAACAACCTCTGCAC	CTGGCATAGGTTGCTCCTTC
BM114	CACGACGTTGTAAAACGACAGCCTGGTGAAATGCTCATAG	CATGCTTGTTGCCTAACTCTCT
BM157	CACGACGTTGTAAAACGACACTTAACAAGGAATAGCCACACA	GTAAATTGTTTCCAATATCAACCTG
BMd42	CACGACGTTGTAAAACGACTCATAGAAGATTTGTGGAAGCA	TGAGACACGTACGAGGCTGTAT
BMd22	CACGACGTTGTAAAACGACGGTCACTTCCGGAGCATT	CGGGAAATGGAAGTCACAGT
BM184	CACGACGTTGTAAAACGACAGTGCTCTATCAAGATGTGTG	ACATAATCAATGGGTCCTG
BMd27	CACGACGTTGTAAAACGACGGACCCACCATCACCATAAC	TGGTGGAGGTGGAGATTTGT
BMd33	CACGACGTTGTAAAACGACTACGCTGTGATGCATGGTTT	CCTGAAAGTGCAGAGTGGTG
BMd36	CACGACGTTGTAAAACGACCATAACATCGAAGCCTCACAGT	ACGTGCGTACGAATACTCAGTC
BMd38	CACGACGTTGTAAAACGACGCGTTTCCATGAATCAATCC	AAATTCGGAACCCGTGAAC
BMd39	CACGACGTTGTAAAACGACACCGAGGAGTTTCTGTGAA	TTAAGTCCTTGCAGCCCTTC

*koyu renkle gösterilen M13 forward (CACGACGTTGTAAAACGAC) sekansıdır.

SSR PCR işleminde her bir örnek için kullanılan karışım içeriği ve miktarları Çizelge 3.10'da verilmiştir. M13 kuyruk sekansı ile işaretlenmiş primerlerin uygun ortamda çoğalabilmesi için reaksiyon ortamına 700 ya da 800 nm dalga boyunda etiketlenmiş M13 primeri (5'-CACGACGTTGTAAAACGAC-3') eklenmiştir, böylelikle PCR ürünleri Li-Cor jel sistemine transfer edilebilir.

Çizelge 3.10 SSR PCR işleminde bir örnek için kullanılan karışım içeriği ve miktarları

Bileşen	Miktar
DNA (20 ng/μl)	5 μl
GoTaq polimeraz	0.04μl
5X GoTaq Flexi Buffer	4 μl
dNTPs (10mM)	0.4 μl
MgCl ₂ (20mM)	1.6 μl
Forward Primer	0.2 μl
Reverse Primer	0.8 μl
M13 (IRD'ye 700 veya 800)	0.8 μl
Up su	7.16 μl
Toplam hacim	20 μl

PCR reaksiyon bileşenleri hazırlanırken kullandığımız M13 primerinin ışığa duyarlılığı nedeniyle karanlık bir ortamda çalışılmıştır. Daha sonra PTC–225 Peltier Thermal Cyler cihazında Çizelge 3.11'de belirtildiği şekilde reaksiyona tabi tutulmuştur.

Çizelge 3.11 SSR işleminde uygulanan PCR işlemi için reaksiyon basamakları, süresi ve sıcaklıkları

Reaksiyon basamağı	Reaksiyon sıcaklığı	Reaksiyon süresi
1	94°C	5 dk
2	94°C	45 sn
3	65°C	1 sn
4	0.5°/s to 51	65°C'den 51°C'ye kadar sn'de 0.5°C'lik sıcaklık düşüşü gerçekleşir
5	72°C	1 dk
6	2. 3. 4. ve 5. aşamalar	40 kez tekrarlanır
7	94°C	45 sn
8	60°C	45 sn
9	72°C	1 dk
10	7. ve 8. aşamalar	24 kez tekrarlanır
11	72°C	10 dk
12	4°C	∞

3.2.6 SNP markır analizi

SNP analizleri için, LI-COR 4300 DNA Analyser cihazı kullanılmıştır. SNP analizi için daha önce literatürde yayınlamış fasulye genotiplerine ait SNP primerleri kullanılmıştır (Galeano et al., 2009a; Galeano et al., 2009b). Literatürden elde edilen toplamda 50 SNP primeri, fasulye genotiplerine ait 4 DNA'da polimorfizmin belirlenmesi için kullanılmıştır. Sonuçta bu primerler arasından 48 SNP primerlerinin polimorfik olduğuna karar verilmiş ve tüm örneklerle uygulanmıştır. SNP Forward primerlerinin 5' ucuna M13 forward (CACGACGTTGTAAAACGAC) sekansı eklenmiştir. SNP analizi için kullanılan primerlerin isimleri ve sekans bilgileri Çizelge 3.12'de yer almaktadır.

Çizelge 3.12 SNP analizlerinde kullanılan primer isimleri ve sekansları

SNP primer adı	M13 işaretli Primer Forward (5'-3')	Primer reverse
SNP1	CACGACGTTGTAAAACGACCGTCAAACGATGCTGGATGAAC	CCACCAACTTCAGGAATACGTCA
SNP2	CACGACGTTGTAAAACGACGTGTTGAAGTTGCAGGGAGAA	TGAATCCGTGTCTTCCATAGC
SNP3	CACGACGTTGTAAAACGACTGCGAGTATTTGGGACCTTTGC	GGTGAGGTTGCATGGCTGAAG
SNP4	CACGACGTTGTAAAACGACGACCGTGGAGAACACGCTGAAC	CAACACAGGGGCAGATCCATT
SNP5	CACGACGTTGTAAAACGACCTGTGAGGTACGGCAATTCTGG	GGGTTATACGGCGAGTGTGAGA
SNP6	CACGACGTTGTAAAACGACCTGTGTTGGTGGATTTCCCTTGT	GATGTTCCGCCAGGTTCCATAGAG
SNP7	CACGACGTTGTAAAACGACCAAAAACAACCGCCGAAAAG	TGGTGTGTGTAAGCCAACTGC
SNP8	CACGACGTTGTAAAACGACCCGGAGAACGCTGTTTATGA	CTTCACCTGCTTGGCGTATG
SNP9	CACGACGTTGTAAAACGACTCTCTTCTTTCCATGTTCTC	CACAATGACTGGTGGCTTAACA
SNP10	CACGACGTTGTAAAACGACGACTGGAGCTTTGCTTCTTG	GAGTTGGAACCTCTCAGC
SNP11	CACGACGTTGTAAAACGACCACTCCCTGGAATCTATGACC	ACAACCACCTTGTCCACTTTG
SNP12	CACGACGTTGTAAAACGACCAGATGCAGCCTATGGTGAAG	CGACATTGCTGGTTGTATCG
SNP13	CACGACGTTGTAAAACGACGTGACTCCATGCCTGAGCTA	GTGGTAGTGAAGCTGCGTTT
SNP14	CACGACGTTGTAAAACGACTTCCGTTACTTCCTGCTGTTTC	CTTGAGTTCTGGTGGCTCTGAT
SNP15	CACGACGTTGTAAAACGACCCTTTCCCTCTTTCTCGATCTC	CAGAACAGGTTGGGTTTCTCAC
SNP16	CACGACGTTGTAAAACGACCTTTGCTGTGTCTCTTTGCTG	TTGGTTATGTTCCACCCATC
SNP17	CACGACGTTGTAAAACGACTTTGAAGCAGGAGAAGATGGAC	CCCAATCACTTTCCACAACATC
SNP18	CACGACGTTGTAAAACGACCTCCACATCCAACTTCCTA	GGGGGTGAACCATATCTTGTC
SNP19	CACGACGTTGTAAAACGACCGCAGTCAGCCCACTACTCA	CGAAATGCCTCCGAAGAAGA
SNP20	CACGACGTTGTAAAACGACTTTTGGGGTTAGTTCAAGACTG	GATTTTCTTAGCTTCAGGAGTGC
SNP21	CACGACGTTGTAAAACGACGGATTTGGCTCTGCAAGAATG	GATGGCAACAAAACCTGGGAGA
SNP22	CACGACGTTGTAAAACGACTGACGAGAGTGAAGACGAGAAG	GAACAGCAAGAGAACCAAATCC
SNP23	CACGACGTTGTAAAACGACCATGCAATGGAGGCTACAAAAG	TCTGCAAAACAAAACCGCTACAC
SNP26	CACGACGTTGTAAAACGACGACCTGGCATTGCTTTTTTC	CCTTGTGTCCTCAGCAGTCAG

Çizelge 3.12 (devam)

SNP primer adı	M13 işaretli Primer Forward (5'-3')	Primer reverse
SNP27	CACGACGTTGTAAAACGACGAAGATGGAGGCTTTGAGGTAA	TGTAAGGAAAGTGCGAGAGC
SNP28	CACGACGTTGTAAAACGACGCCTGGATAGAGAGAAAGCAC	CAACAAAACCACCCATTCC
SNP29	CACGACGTTGTAAAACGACGAGATGAAGGTGGCAAGCAC	CAAGAGAGGAGGGCAAGTCC
SNP30	CACGACGTTGTAAAACGACCACGAGCACCAACCTCACTC	AACACCAAAGAGCCGTCACC
SNP31	CACGACGTTGTAAAACGACCCTCTCGTTTGCTCTTCC	GCGAAAAGGTTGAGATGC
SNP32	CACGACGTTGTAAAACGACGGGCTGTGACTCTACTTGGTCTG	GACAAACACATTCAACGAAGACG
SNP33	CACGACGTTGTAAAACGACTCTCTCACTCACACTCACACTCA	TAGATTTGGCATCAGCAAGAACAG
SNP34	CACGACGTTGTAAAACGACGTCAACCAAGACCCCATCT	GAAGGACACAGGCTTATCATC
SNP35	CACGACGTTGTAAAACGACGTGATCTTGATGGGTGCAGT	GGACTAAATAGAGAGGCGTGT
SNP36	CACGACGTTGTAAAACGACACAACTTCATCCAGGTGGTC	GAGGGCAGGCTCTACAAATG
SNP37	CACGACGTTGTAAAACGACGATTGTTGGAAGCAAAGGAAAG	CAGACAAAACCTCAGAAGCCAAA
SNP38	CACGACGTTGTAAAACGACCAAATCCCAAACGGAACAAACC	TAGTGATTTTCTCCGGCGCTTC
SNP39	CACGACGTTGTAAAACGACGCGCCGGAGAAAATCACTAAGC	CAGGCTCGTCAACGCTCTTACA
SNP40	CACGACGTTGTAAAACGACGATCTGAACACTCTTGGAAGTAAA	CGAGACCACCTTCATCCATA
SNP41	CACGACGTTGTAAAACGACCACTTTTCTTGATGGCTTGAA	GACTGGTATATGCAAAGAGGCAAT
SNP42	CACGACGTTGTAAAACGACCATGGAAACTGGCATAGCAT	CCTGAAGCCAAAAGATGGAG
SNP43	CACGACGTTGTAAAACGACCATCTCTCCATCTTTTGGCTTC	AGTGAAGTACCCTTTGCCTTTG
SNP44	CACGACGTTGTAAAACGACCCTCACAAAAGCAACACCAGAT	CTCGTCCCCAAAAGAATTAACG
SNP45	CACGACGTTGTAAAACGACCCCTCTCTCTCATCAACCAGTA	GTGGCTCACTTCTCTTACATACAC
SNP46	CACGACGTTGTAAAACGACCGTTCTCTTCTCTGCTCTCACG	GGGGTAATGAGGGTGAACAT
SNP47	CACGACGTTGTAAAACGACCCAAAAGGCACCGTCAGATATT	GTTCACTCCATCACACCCAATC
SNP48	CACGACGTTGTAAAACGACGGCCTCTTTTACTGGGAGACAT	GGAATAGCACCAGCTCGAATAC
SNP49	CACGACGTTGTAAAACGACGCTATGAAGAAATGGTGGATGC	CTTTATCCGCTTCACACTCACA
SNP50	CACGACGTTGTAAAACGACGAAAGGGTGTGAGAGGTTTTGT	GTGGCTCCTTGAGTCCTTGTC

*koyu renkle gösterilen M13 forward (CACGACGTTGTAAAACGAC) sekansıdır.

SNP PCR işleminde her bir örnek için kullanılan karışım içeriği ve miktarları Çizelge 3.13’de verilmiştir. M13 kuyruk sekansı ile işaretlenmiş primerlerin uygun ortamda çoğalabilmesi için reaksiyon ortamına 700 ya da 800 nm dalga boyunda etiketlenmiş M13 primeri (5'-CACGACGTTGTAAAACGAC-3') eklenmiştir, böylelikle PCR ürünleri Li-Cor jel sistemine transfer edilebilir.

Çizelge 3.13 SNP PCR işleminde bir örnek için kullanılan karışım içeriği ve miktarları

Bileşen	Miktar
DNA (20 ng/μl)	5 μl
GoTaq polimeraz	0.04 μl
5X GoTaq Flexi Buffer	4 μl
dNTPs (10mM)	0.4 μl
MgCl ₂ (20mM)	1.6 μl
Forward Primer	0.2 μl
Reverse Primer	0.8 μl
M13 (IRD’ye 700 veya 800)	0.8 μl
Up su	7.16 μl
Toplam hacim	20 μl

PCR reaksiyon bileşenleri hazırlanırken kullandığımız M13 primerinin ışığa duyarlılığı nedeniyle karanlık bir ortamda çalışılmıştır. Daha sonra PTC–225 Peltier Thermal Cycler cihazında Çizelge 3.14’de belirtildiği şekilde reaksiyona tabi tutulmuştur.

Çizelge 3.14 SNP işleminde uygulanan PCR işlemi için reaksiyon basamakları, süresi ve sıcaklıkları

Reaksiyon basamağı	Reaksiyon sıcaklığı	Reaksiyon süresi
1	94°C	5 dk
2	94°C	45 sn
3	65°C	1 sn
4	0.5°/s to 51	65°C’den 51°C’ye kadar sn’de 0.5°C’lik sıcaklık düşüşü gerçekleşir
5	72°C	1 dk
6	2. 3. 4. ve 5.aşamalar	40 kez tekrarlanır
7	94°C	45 sn
8	60°C	45 sn
9	72°C	1 dk
10	7. ve 8. aşamalar	24 kez tekrarlanır
11	72°C	10 dk
12	4°C	∞

3.2.7 Poliakrilamid jel elektroforezi

Elektroforez için, LICOR/Biosciences, NEN Model 4300, DNA Analyzer cihazı kullanılmıştır (EK 1.4 bölümünde, Poliakrilamid Jelin İçeriğindeki Maddeler ve Hazırlanışı başlığında kullanılan çözeltilerin içerikleri yer almaktadır). Tüm markır (AFLP, SSR ve SNP) sonuçlarının görüntülenmesi için % 8'lik poliakrilamid jel kullanılmıştır. Jel polimerizasyonu tamamlandıktan sonra 1X TBE (Tris-Borik asit-EDTA) tamponu ile doldurulmuş tank içine yerleştirilmiştir. Ön ısıtma (pre-run) işlemi için 1200V, 35 mA, 25 W 45°C'de 15 dk'ya programlanmıştır. Jelin ön ısıtılması tamamlandıktan sonra selektif PCR ürünlerine 5 µl Blue Stop Çözeltisi ilave edilmiş ve sonra 94°C'de 3 dk denatürasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Işığın floresan boya ile işaretli örneklerle olan zararlı etkilerini önlemek için, örnekler yükleme bitene kadar karanlıkta ve buz üzerinde bekletilmişlerdir. Daha sonra elektroforeze 1µl sırasıyla 700 ve 800 IRD'ye ile işaretli markır (50-350 bp) ve örnekler yüklenmiştir. 1200V, 35 mA, 25 W 45°C elektroforez koşullarında 300 dk yürütme işlemi, programa komut verilerek gerçekleştirilmiştir.

3.2.8 Markır analiz sonuçlarının skorlanması

Poliakrilamid jel elektroforez işlemi sonucunda elde edilen görüntüler, çalışmada kullanılan tüm markır tekniklerindeki primerlerin göstermiş olduğu polimorfik bantlar açısından değerlendirilerek, her bir örnek için bant bulunduranlar (1) ve bant bulundurmayanlar (0) olarak skorlanarak, elde edilen veriler Microsoft Office Excel dosyasında kayıt edilmiştir.

3.2.9 PIC değerlerinin hesaplanması

PIC değeri, genetik çalışmalarda polimorfizmin bir ölçüsü olarak kullanılmaktadır (Shete et al., 2000). Her bir markırın polimorfizm oranı ile ilgili ayırt etme gücünü ifade etmektedir. PIC değeri allelerin sayısına ve allelerin frekanslarının dağılımına bağlıdır. Değeri 0 ve 1 arasında değişmektedir (Blair et al., 2006).

PIC değerleri çalışmada kullanılan her bir primer kombinasyonu için ayrı ayrı literatürde belirtildiği şekilde hesaplanmıştır (Anderson et al., 1993; Satyavathi et al., 2006). Hesapların yapıldığı formül aşağıdaki gibidir.

$$PIC_i = 1 - \sum_{j=1}^n p_{ij}^2$$

n: belirli bir markır için allel sayısı

p_{ij}: allel frekansı

3.2.10 Genetik yakınlığın belirlenmesi

AFLP, SSR ve SNP markırlarının skorlanması sonucu elde edilen veriler text dosyasına dönüştürülmüştür. NTSYS 2.2 paket programı kullanılarak analizi yapılmış ve genotipler arasındaki genetik benzerlik değerleri elde edilmiştir. İki genotip kıyaslandığında bu değer 0'a yaklaşması benzerliklerinin az olduğunu; 1'e yaklaşması ise genetik olarak yakın olduklarını göstermektedir.

3.2.11 Populasyon yapısının belirlenmesi

AFLP, SSR ve SNP markır analizlerden elde edilen toplam 418 markır; 66 fasulye genotipinin populasyon yapısının belirlenmesinde kullanılmıştır. NTSYS 2.2 paket programı kullanılarak dendrogram elde edilmiştir. Populasyonun yapısının belirlenmesi için STURCTURE (Pritchard et al., 2000a) programı kullanılmıştır. STRUCTURE programı ayırt edici allel frekansları ile populasyondaki grupları belirlemektedir. Her lokustaki allel frekansları ile tanımlanan sayı; populasyondaki grup sayısı olarak kabul edilir. Bu sayı K değeri ile ifade edilmektedir. En uygun K değeri için 1-10 arasında hesaplama yapılmıştır. Burn-in period and burn-in lenght için 100.000 Markov Chain Monte Carlo tekrarı ve her bir K değeri için 10 tekrar yapılmıştır. Her bir K değeri için, en yüksek olasılık gösteren değer kabul edildi ve ΔK hesaplanarak grup sayısı belirlenmiştir.

3.2.12 İlişki haritalaması

LD; iki gen/QTL ya da iki markır arasındaki rasgele ilişki olarak tanımlanır ve populasyondaki alleller arasındaki korelasyonu temsil eder. Birbirinden uzak lokuslar arasındaki ya da farklı kromozomlarda bulunan lokuslar arasında saptanan LD önemli kabul edilir. LD, bitkilerde r^2 değerlerinin hesaplanması ile belirlenmektedir. r^2 değeri iki lokusun allelleri arasındaki ilişkiyi temsil etmektedir ve çözünürlüğün değerlendirilmesinde bilgi verir. Bu değer 0 ile 1

arasında değişmektedir. Genellikle, 0.1 veya 0.2 r^2 değerleri lokusların çiftleri arasında anlamlı bir ilişki için minimum eşik olarak kabul edilir. Bu amaçla TASSEL programı kullanılmıştır. Elde edilen LD'nin önemli olduğunu belirlemek için p değeri belirlenmiştir. p değeri ise 1000 tekrarlı permütasyon testi ile hesaplanmaktadır. p değeri 0.01'den küçük olan değerler önemli kabul edilecektir.

İlişki haritalama için fenotipik özelliklerin analizinden ve genotipik markırlardan elde edilen dosyalar kullanılmıştır. Ayrıca STRUCTURE programından elde edilen populasyon dosyaları (Q matrix); genotipik veriler ile fenotipik veriler arasında ilişki kurmak için kullanılacak olan TASSEL programına baz oluşturmuştur. TASSEL programında bu üç data birlikte kullanılarak ilişkinin önem seviyeleri hesaplanmıştır. p değeri 0.01'den küçük ve ayrıca bu p değerleri de markır F değerinden küçük olanlar önemli kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1 Fenotipik Analiz Sonuçları

Fasulye genotiplerinin fenotipik özellikleri, analiz sonucunda elde edilen tanımlayıcı sözcükler uluslararası tanımlama listelerinde belirtilen rakamsal bilgiye dönüştürülmüştür. 0 ile 9 arasında değişen rakamlardan oluşan bu bilgi istatistik paket programında kullanılmak üzere Excel dosyasında düzenlenmiştir. Fasulye genotiplerine ait ölçümlenen fenotipik özelliklerin sonuçları rakamsal olarak Çizelge 4.1’de gösterilmektedir.

Çizelge 4.1 Fasulye genotiplerine ait fenotipik ölçüm sonuçları

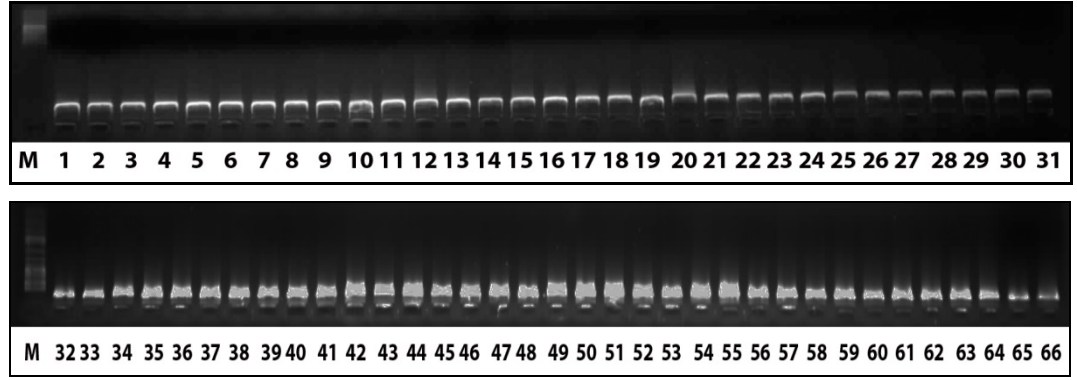
Genotip no	Liflilik özelligi	Bitki Büyüme Şekli	Bitki Tipi	Tohum taslağı sayısı	Çiçeklenme Zamanı
1	2	3	4	5	34
2	2	4	5	4	34
3	2	3	4	5	32
4	1	4	5	8	32
5	2	1	1	6	34
6	2	4	5	5	34
7	2	4	5	2	33
8	2	1	1	3	31
9	1	4	5	4	33
10	2	4	4	8	32
11	2	3	4	7	35
12	2	4	6	6	34
13	1	1	1	5	31
14	1	1	1	4	34
15	2	4	5	3	29
16	1	4	5	5	34
17	1	3	4	5	34
18	1	1	1	4	39
19	1	1	1	4	33
20	2	3	4	4	34
21	2	4	6	5	27
22	2	1	1	4	32
23	1	1	1	5	34
24	1	1	1	5	30
25	2	1	1	5	32
26	1	1	1	5	34
27	1	1	1	4	31
28	1	1	1	6	34
29	2	3	4	8	31
30	2	1	1	5	32
31	2	3	4	6	33
32	2	4	6	6	84
33	2	4	6	6	33
34	1	4	5	4	34
35	2	4	6	5	33

Çizelge 4.1 (devam)

Genotip no	Liflilik özelliliği	Bitki Büyüme Şekli	Bitki Tipi	Tohum taslağı sayısı	Çiçeklenme Zamanı
36	2	4	6	4	29
37	1	4	6	4	25
38	1	4	6	7	34
39	1	1	1	4	34
40	1	1	1	6	27
41	2	1	1	4	35
42	1	1	1	7	30
43	1	1	1	5	34
44	1	4	6	5	35
45	1	4	6	6	34
46	2	1	1	6	34
47	1	1	1	4	33
48	1	1	1	7	35
49	1	1	1	7	35
50	2	1	1	7	32
51	2	3	5	4	35
52	2	3	5	5	33
53	1	1	1	3	36
54	1	1	1	4	36
55	1	4	5	6	33
56	1	4	6	7	38
57	1	1	1	5	35
58	1	3	4	5	32
59	1	4	6	8	34
60	2	4	6	5	35
61	1	1	1	6	32
62	2	1	1	5	35
63	1	1	1	6	35
64	1	4	6	7	35
65	1	1	1	5	33
66	1	1	1	4	32

4. 2 DNA Saflık Analizi Sonuçları

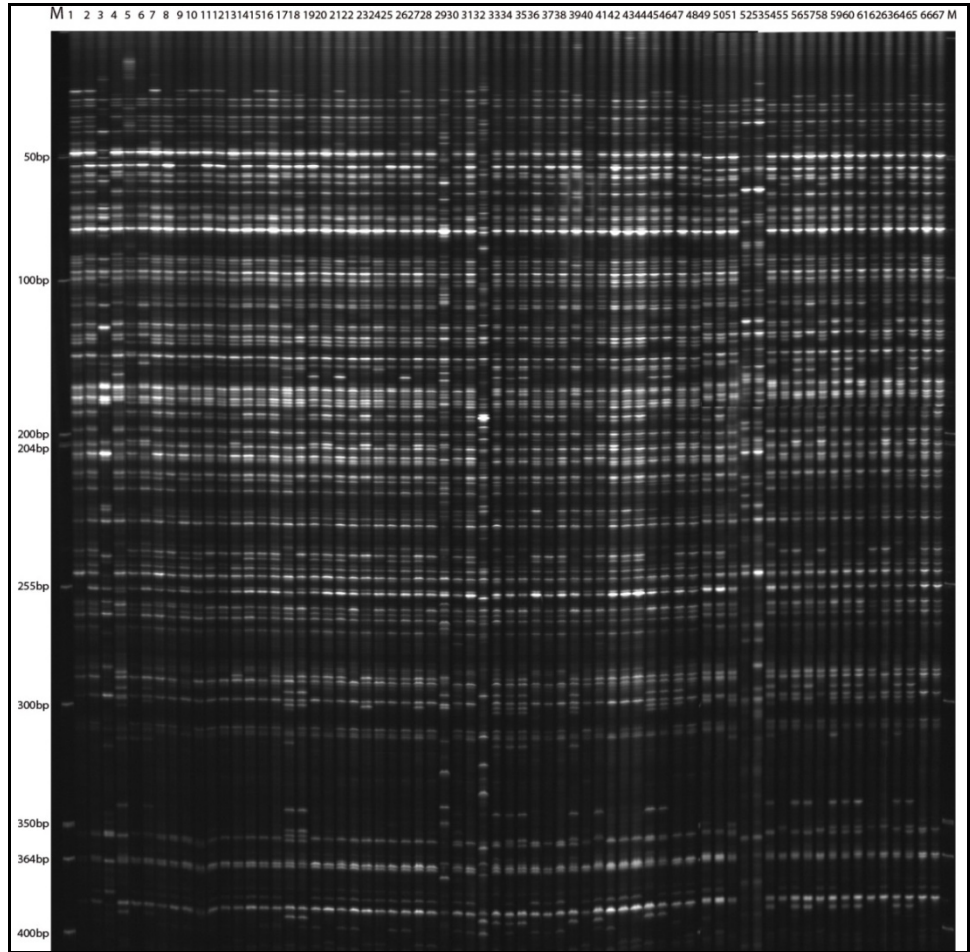
DNA izolasyonundan sonra 66 DNA örneği saflık analizi için agaroz jel elektroforezinde yürütülmüş ve DNA kalitesi belirlenmiştir. Görüntüleme sonucunda protein ve RNA tespit edilen bazı örnekler ProteinaseK ve RNase eklenmesine karar verilmiştir. DNA kalitesinin düşük olduğu örneklerin izolasyonları yinelenmiştir. Agaroz jel elektroforezi ile belirlenmiş DNA'lara ait saflık görüntüsü Şekil 4.1'de gösterilmektedir.



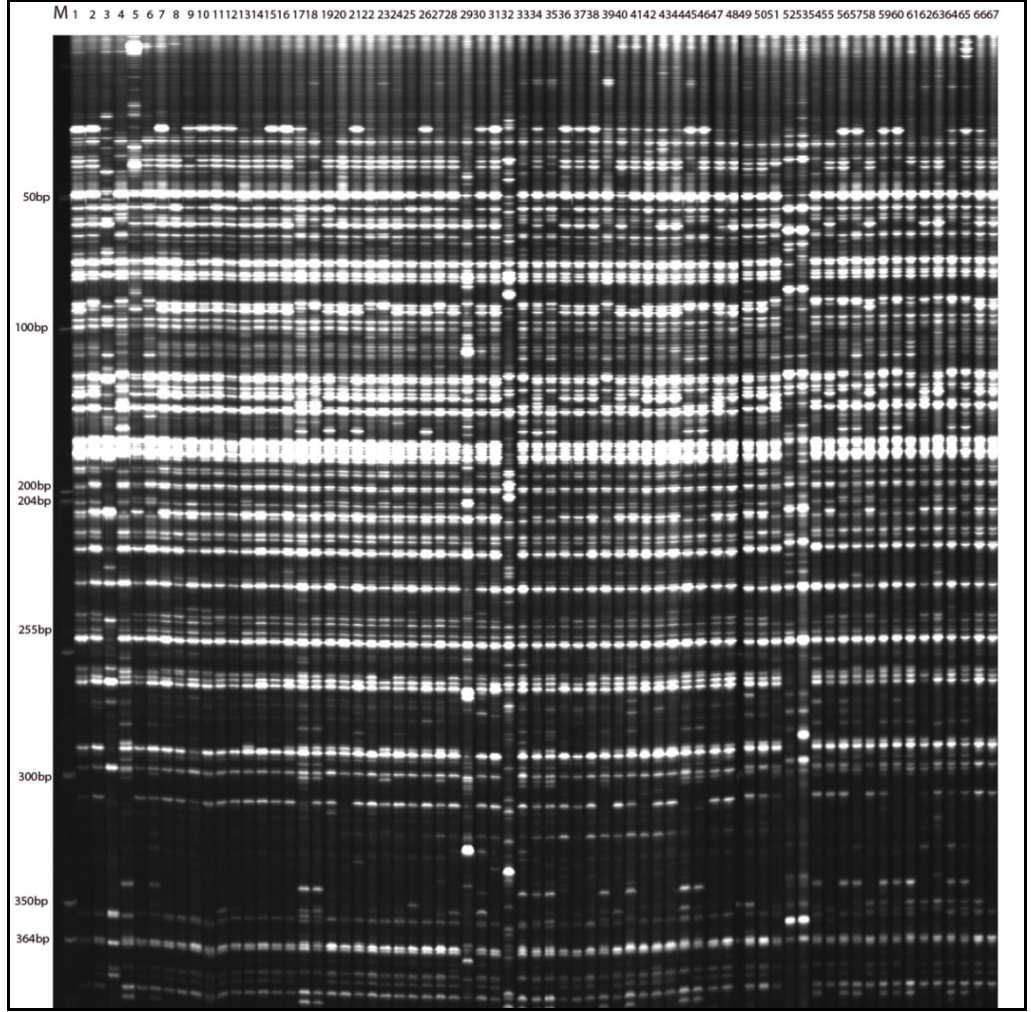
Şekil 4.1 DNA örneklerinin saflıklarının belirlendiği agaroz jel elektroforezi görüntüsü

4.3 AFLP Markır Analizi Sonuçları

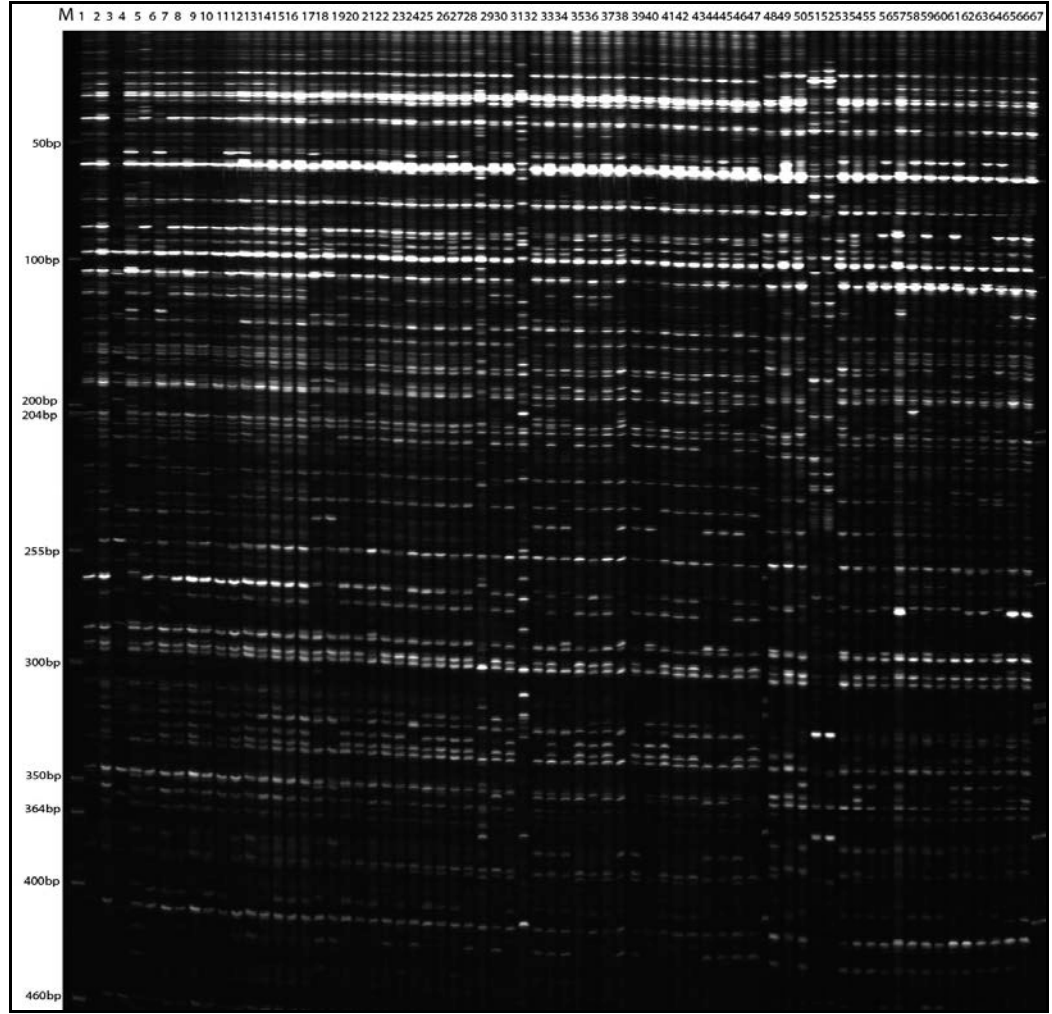
Yapılan AFLP markır analizi sonucunda 66 fasulye genotipine uygulanmış 9 primere bağlı olarak elde edilen jel görüntülerinin bazıları aşağıda görülmektedir (Şekil 4.2, Şekil 4.3, Şekil 4.4).



Şekil 4.2 M-CAA/E-AAG (700) primer kombinasyonu denemesi sonucu 1-66 numaralı örneklerin poliakrilamid jel elektroforezi görüntüsü



Şekil 4.3 M-CAA/E-AGG (800) primer kombinasyonu denemesi sonucu 1-66 numaralı örneklerin poliakrilamid jel elektroforezi görüntüsü



Şekil 4.4 M-GAT/E-ACT (800) primer kombinasyonu denemesi sonucu 1-66 numaralı örneklerin poliakrilamid jel elektroforezi görüntüsü

Kullanılan 9 primerin amplifikasyonu sonucunda elde edilmiş polimorfik bant sayıları Çizelge 4.2’de gösterildiği şekildedir.

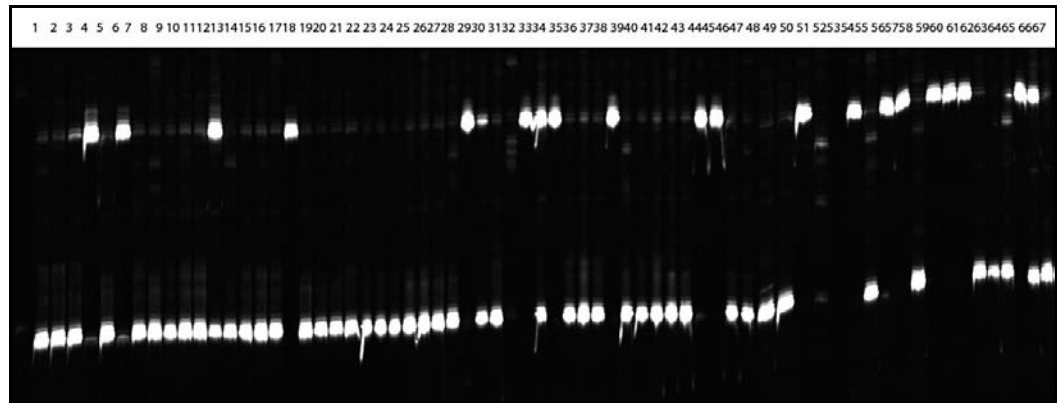
Çizelge 4.2 AFLP markır analizinde kullanılan primer kombinasyonları ve elde edilmiş polimorfik bant sayıları

Primer Kombinasyonu	Polimorfik bant sayısı
M-CAA/E-AAC	57
M-CAA/E-AGC	39
M-CAA/E-AAG	34
M-CAA/E-AGG	46
M-GAT/E-ACA	5
M-GAT/E-ACT	27
M-GAT/E-AAG	5
M-GAT/E-AGT	17
M-ACG/E-ACA	3
Toplam	233
Ortalama	25.9

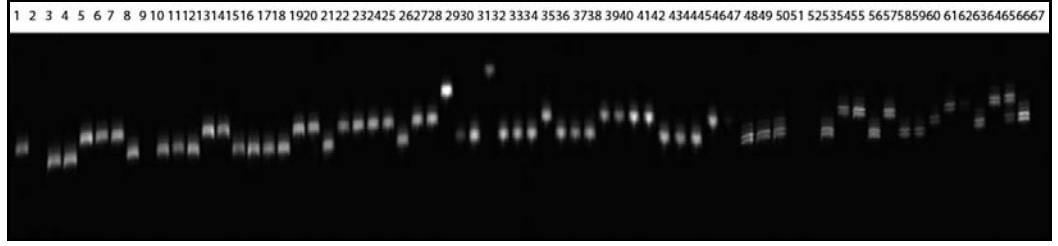
Çizelge 4.2'ye göre, AFLP markır analizi sonucunda 233 adet polimorfik bant elde edilmiş, ortalama bant sayısı primer başına 25.9 polimorfik bant olarak bulunmuştur. En yüksek polimorfizm değeri M-CAA/E-AAC primer kombinasyonu kullanıldığında 57 bant olarak, en düşük polimorfizm değeri ise M-ACG/E-ACA kombinasyonu kullanıldığında 3 bant olarak tespit edilmiştir.

4.4 SSR Markır Analizi Sonuçları

Yapılan SSR markır analizi sonucunda 66 fasulye genotipine uygulanmış 22 primere bağlı olarak elde edilen jel görüntülerinin bazıları aşağıda görülmektedir (Şekil 4.5, Şekil 4.6, Şekil 4.7, Şekil 4.8, Şekil 4.9, Şekil 4.10).



Şekil 4.5 BMd45 primer denemesi sonucu 1-66 numaralı örneklerin poliakrilamid jel elektroforezi görüntüsü



Şekil 4.6 BM151 primer denemesi sonucu 1-66 numaralı örneklerin poliakrilamid jel elektroforezi görüntüsü



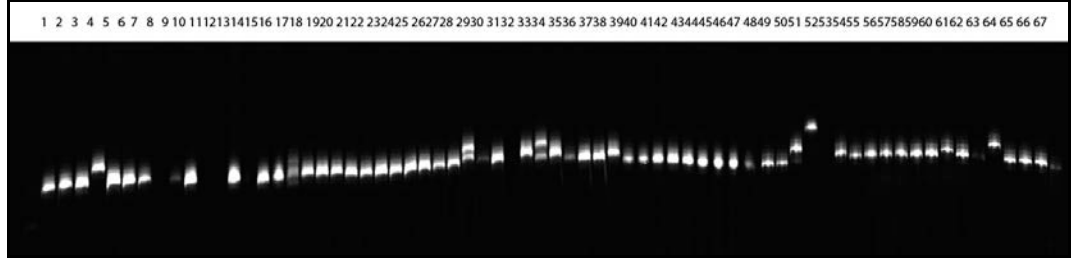
Şekil 4.7 BM157 primer denemesi sonucu 1-66 numaralı örneklerin poliakrilamid jel elektroforezi görüntüsü



Şekil 4.8 BM170 primer denemesi sonucu 1-66 numaralı örneklerin poliakrilamid jel elektroforezi görüntüsü



Şekil 4.9 BM183 primer denemesi sonucu 1-66 numaralı örneklerin poliakrilamid jel elektroforezi görüntüsü



Şekil 4.10 GATS11 primer denemesi sonucu 1-66 numaralı örneklerin poliakrilamid jel elektroforezi görüntüsü

Kullanılan 22 primerin amplifikasyonu sonucunda elde edilmiş polimorfik bant sayıları Çizelge 4.3’de gösterildiği şekildedir.

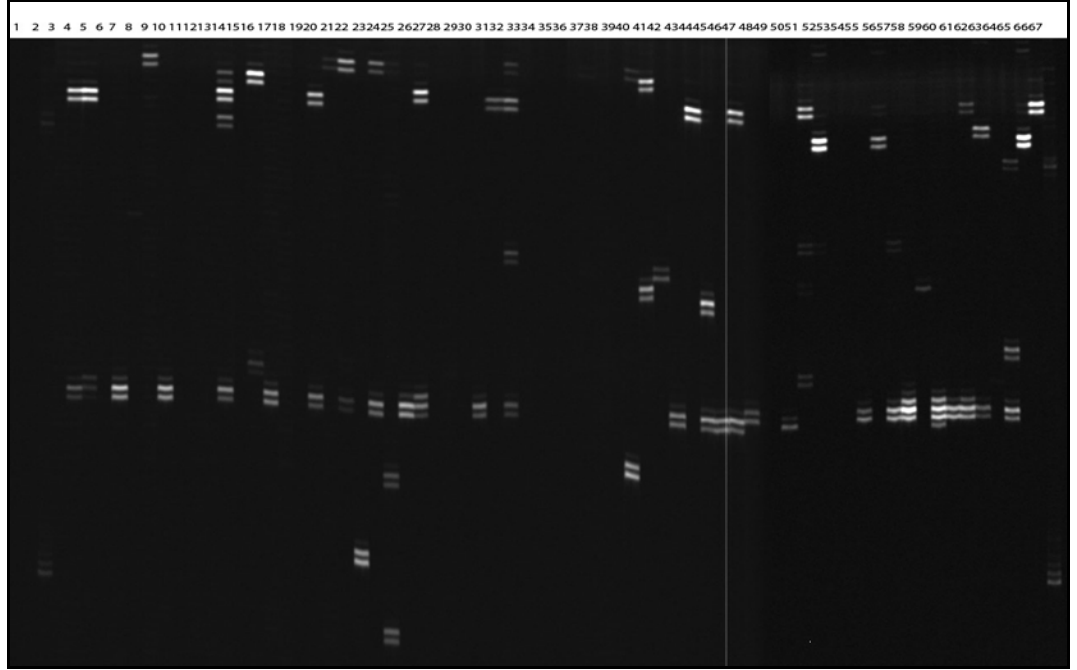
Çizelge 4.3 SSR markır analizinde kullanılan primer kombinasyonları ve elde edilmiş polimorfik bant sayıları

Primer Adı	Polimorfik Bant Sayıları	Primer Adı	Polimorfik Bant Sayıları
BMd45	2	BMd27	1
BMd1	1	BMd42	5
BMd50	2	BM22	2
BMd37	2	BM157	6
BM170	5	BM184	6
BM181	7	BMd36	4
BM160	4	BMd38	2
BM210	7	BMd39	2
BM183	4	GATS11	2
BM151	4	BMd46	3
BMd33	4	BM114	5
		Toplam	80
		Ortalama	4

Çizelge 4.3’e göre, SSR markır analizi sonucunda 80 adet polimorfik bant elde edilmiş, ortalama bant sayısı primer başına 4 polimorfik bant olarak bulunmuştur. En yüksek polimorfizm değeri BM181 ve BM210 primerleri kullanıldığında 7 bant olarak, en düşük polimorfizm değeri ise BMd1 ve BMd27 primerleri kullanıldığında 1 bant olarak tespit edilmiştir.

4.5 SNP Markır Analizi Sonuçları

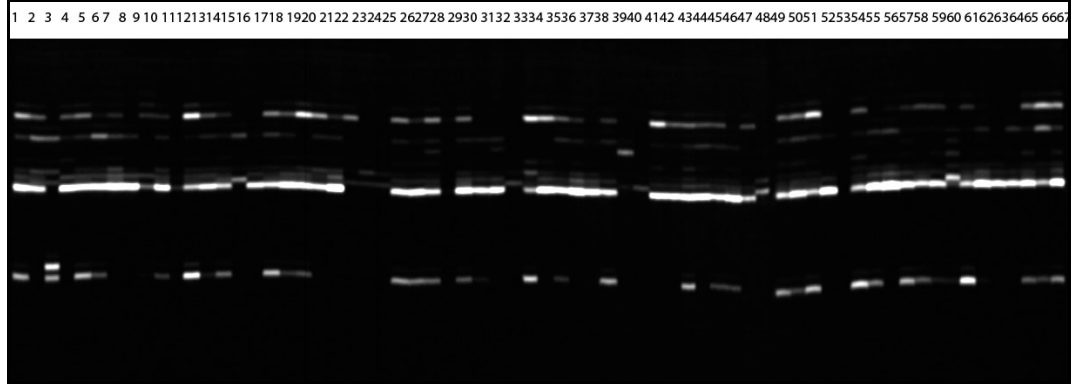
Yapılan SNP markır analizi sonucunda 66 fasulye genotipine uygulanmış 48 primere bağlı olarak elde edilen jel görüntülerinin bazıları aşağıda görülmektedir (Şekil 4.11, Şekil 4.12, Şekil 4.13, Şekil 4.14, Şekil 4.15, Şekil 4.16, Şekil 4.17).



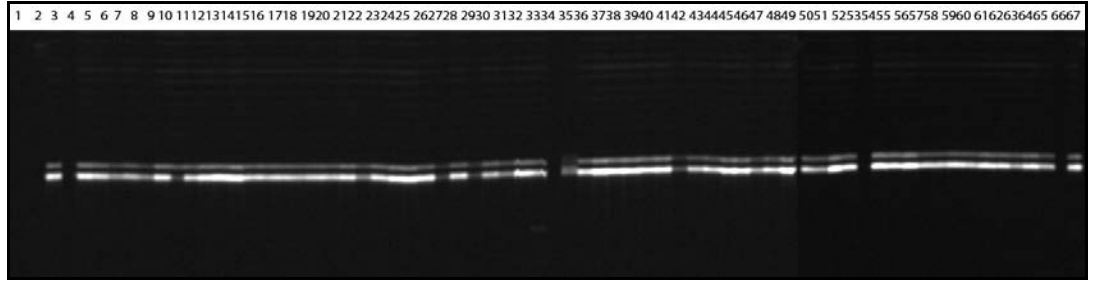
Şekil 4.11 SNP4 primer denemesi sonucu 1-66 numaralı örneklerin poliakrilamid jel elektroforezi görüntüsü



Şekil 4.12 SNP6 primer denemesi sonucu 1-66 numaralı örneklerin poliakrilamid jel elektroforezi görüntüsü



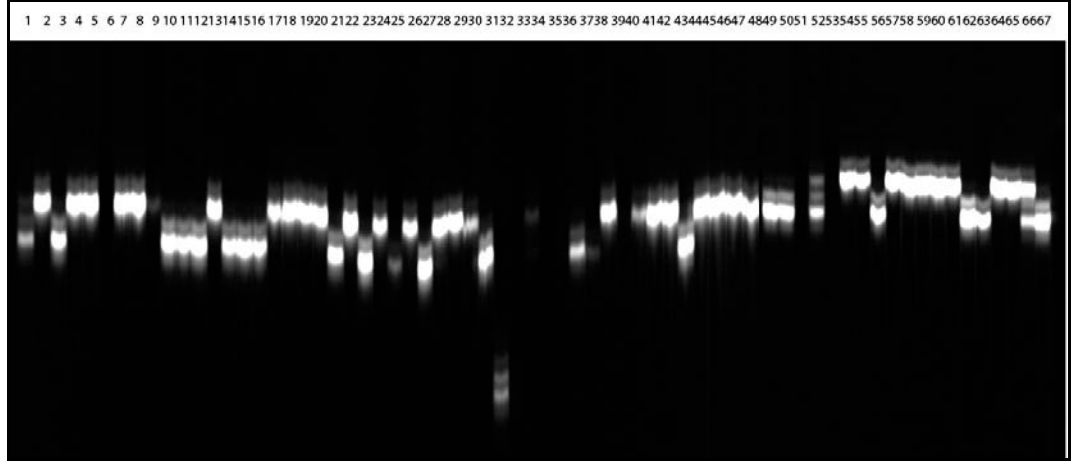
Şekil 4.13 SNP21 primer denemesi sonucu 1-66 numaralı örneklerin poliakrilamid jel elektroforezi görüntüsü



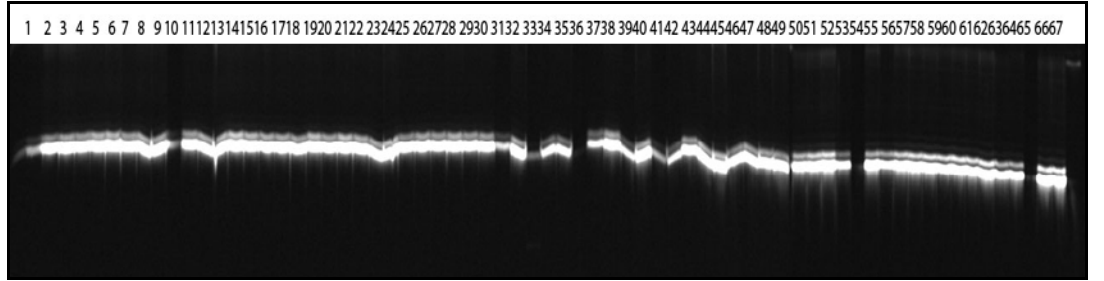
Şekil 4.14 SNP24 primer denemesi sonucu 1-66 numaralı örneklerin poliakrilamid jel elektroforezi görüntüsü



Şekil 4.15 SNP31 primer denemesi sonucu 1-66 numaralı örneklerin poliakrilamid jel elektroforezi görüntüsü



Şekil 4.16 SNP45 primer denemesi sonucu 1-66 numaralı örneklerin poliakrilamid jel elektroforezi görüntüsü



Şekil 4.17 SNP50 primer denemesi sonucu 1-66 numaralı örneklerin poliakrilamid jel elektroforezi görüntüsü

Kullanılan 48 primerin amplifikasyonu sonucunda elde edilmiş polimorfik bant sayıları Çizelge 4.4’de gösterildiği şekildedir.

Çizelge 4.4 SNP markır analizinde kullanılan primer kombinasyonları ve elde edilmiş polimorfik bant sayıları

Primer Adı	Polimorfik bant sayıları	Primer Adı	Polimorfik bant sayıları
SNP1	7	SNP27	1
SNP2	2	SNP28	1
SNP3	1	SNP29	1
SNP4	12	SNP30	1
SNP5	1	SNP31	3
SNP6	5	SNP32	2
SNP7	1	SNP33	3
SNP8	1	SNP34	3
SNP9	1	SNP35	2
SNP10	2	SNP36	2
SNP11	1	SNP37	3
SNP13	2	SNP38	1
SNP15	2	SNP39	1
SNP16	1	SNP40	2
SNP17	2	SNP41	2
SNP18	1	SNP42	1
SNP19	2	SNP43	3
SNP20	1	SNP44	1
SNP21	4	SNP45	3
SNP22	1	SNP46	3
SNP23	2	SNP47	6
SNP24	1	SNP48	1
SNP25	3	SNP49	1
SNP26	1	SNP50	1
		Toplam	105
		Ortalama	2

Çizelge 4.4'e göre, SNP markır analizi sonucunda 105 adet polimorfik bant elde edilmiş, ortalama bant sayısı primer başına 2 polimorfik bant olarak bulunmuştur. En yüksek polimorfizm değeri SNP4 primeri kullanıldığında 12 bant olarak, en düşük polimorfizm değeri ise SNP3, SNP5, SNP7, SNP8, SNP9, SNP11, SNP16, SNP18, SNP20, SNP22, SNP24, SNP26, SNP27, SNP28, SNP29, SNP30, SNP38, SNP39, SNP42, SNP44, SNP48, SNP49 ve SNP50 primerleri kullanıldığında 1 bant olarak tespit edilmiştir.

4.6 PIC Değerleri

AFLP, SSR ve SNP markır analizlerinin her birinde kullanılan primerlerin PIC değerleri hesaplanmıştır. PIC değerleri sırasıyla, Çizelge 4.5, 4.6 ve 4.7’de gösterilmektedir.

Çizelge 4.5 AFLP primer kombinasyonlarına ait PIC değerleri

Primer Kombinasyonu	PIC değeri
M-CAA/E-AAC	0.58
M-CAA/E-AGC	0.37
M-CAA/E-AAG	0.63
M-CAA/E-AGG	0.49
M-GAT/E-ACA	0.43
M-GAT/E-ACT	0.61
M-GAT/E-AAG	0.47
M-GAT/E-AGT	0.45
M-ACG/E-ACA	0.62
Ortalama PIC değeri	0.51

Çizelge 4.5’e göre, en yüksek PIC değeri M-CAA/E-AAG primer kombinasyonu kullanıldığında 0.63 olarak, en düşük PIC değeri ise 0.37 olarak M-CAA/E-AGC primer kombinasyonu kullanıldığında elde edilmiştir. Tüm primerleri temsil eden ortalama PIC değeri ise 0.51 olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 4.6 SSR primerlerine ait PIC değerleri

Primer Adı	PIC Değeri	Primer Adı	PIC Değeri
BMd45	0.51	BMd27	0.76
BMd1	0.89	BMd42	0.18
BMd50	0.47	BM22	0.50
BMd37	0.40	BM157	0.16
BM170	0.18	BM184	0.29
BM181	0.13	BMd36	0.25
BM160	0.06	BMd38	0.48
BM210	0.19	BMd39	0.94
BM183	0.25	GATS11	0.08
BM151	0.23	BMd46	0.26
BMd33	0.26	BM114	0.14
Ortalama PIC değeri			0.34

Çizelge 4.6'ya göre, en yüksek PIC değeri BMd39 primeri kullanıldığında 0.94 olarak, en düşük PIC değeri ise 0.06 olarak BM160 primeri kullanıldığında elde edilmiştir. Tüm primerleri temsil eden ortalama PIC değeri ise 0.34 olarak hesaplanmıştır.

Çizelge 4.7 SNP primerlerine ait PIC değerleri

Primer Adı	PIC Değeri	Primer Adı	PIC Değeri
SNP1	0.40	SNP27	0.92
SNP2	0.03	SNP28	0.93
SNP3	0.93	SNP29	0.92
SNP4	0.06	SNP30	0.89
SNP5	0.96	SNP31	0.31
SNP6	0.33	SNP32	0.47
SNP7	0.96	SNP33	0.28
SNP8	0.93	SNP34	0.29
SNP9	0.84	SNP35	0.43
SNP10	0.53	SNP36	0.46
SNP11	0.92	SNP37	0.31
SNP13	0.96	SNP38	0.93
SNP15	0.97	SNP39	0.92
SNP16	0.93	SNP40	0.45
SNP17	0.47	SNP41	0.47
SNP18	0.93	SNP42	0.74
SNP19	0.46	SNP43	0.31
SNP20	0.87	SNP44	0.95
SNP21	0.33	SNP45	0.29
SNP22	0.89	SNP46	0.30
SNP23	0.84	SNP47	0.41
SNP24	0.93	SNP48	0.96
SNP25	0.32	SNP49	0.93
SNP26	0.95	SNP50	0.92
Ortalama PIC değeri			0.65

Çizelge 4.7'ye göre, en yüksek PIC değeri SNP 15 primeri kullanıldığında 0.97 olarak, en düşük PIC değeri ise 0.03 olarak SNP2 primeri kullanıldığında elde edilmiştir. Tüm primerleri temsil eden ortalama PIC değeri ise 0.65 olarak hesaplanmıştır.

4.7 Genetik Yakınlığın Belirlenmesi

NTSYS programında yapılan analize göre fasulye genotiplerinin aralarındaki genetik yakınlık değerleri Çizelge 4.8'de belirtilmiştir.

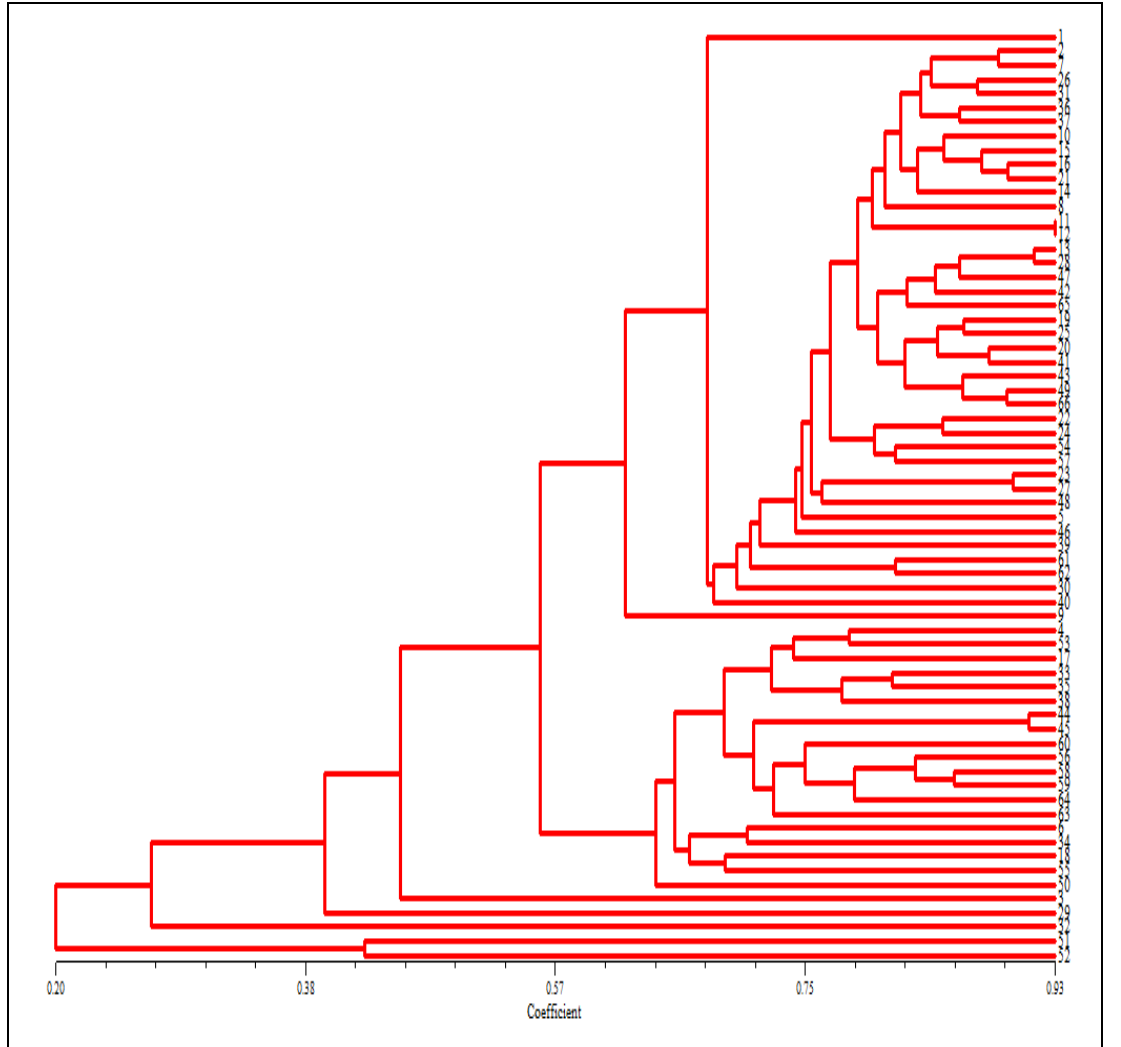
Çizelge 4.8 Fasulye genotiplerinin genetik yakınlık değerleri

[illegible]

Çizelge 4.8'deki NTSYS programıyla elde edilen benzerlik değerleri incelendiğinde; populasyonda birbirine en yakın genotiplerin #11 (Kırklareli/Türkiye) ile #12 (Bandırma/Türkiye) olduğu belirlenmiştir ve aralarındaki benzerlik değerinin 0.93 olduğu görülmektedir. Populasyonda en uzak genotiplerin #52 (Hindistan) ile #32 (Tire/Türkiye) olduğu ve aralarındaki benzerlik değerlerinin 0.09 olduğu görülmektedir.

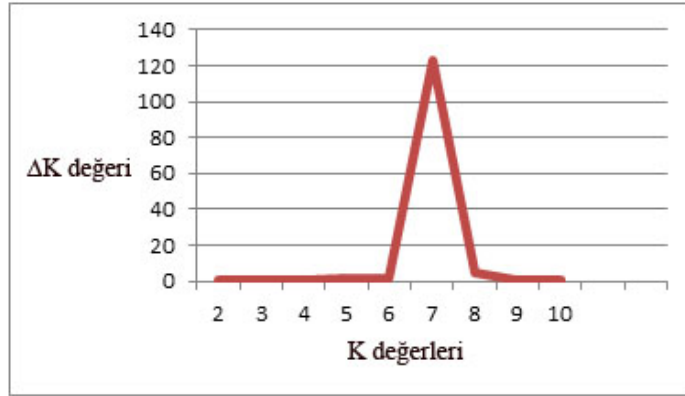
4.8 Populasyon Yapısı

NTSYS programında yapılan analize göre fasulye genotipleri arasındaki benzerlikleri gösteren dendrogram Çizelge 4.18'de belirtilmiştir.



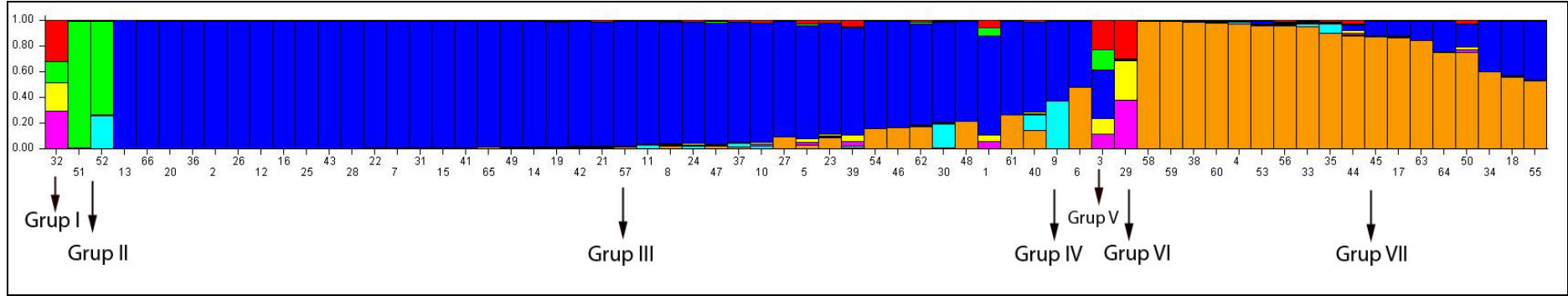
Şekil 4.18 Fasulye genotipleri arasındaki aralarındaki benzerliklere göre elde edilen dendrogram

Populasyonun yapısının belirlenmesi için STRUCTURE (Pritchard et al., 2000) programında kullanılan 66 fasulye genotipinde SSR, SNP ve AFLP markırlarından elde edilen toplam 418 bant sonucu aşağıda verilmektedir. Her bir K değeri için, en yüksek olasılık gösteren değer ΔK değeri olarak kabul edildi (Şekil 4.19).



Şekil 4.19 K değerleri ve ΔK değeri

Şekil 4.19'a göre; ΔK değeri 7 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuca göre; 66 fasulye genotipi kendi arasında 7 ana gruba ayrılmıştır. Elde edilen gruplarda genotiplerin dağılımı Şekil 4.20'de gösterilmektedir. Grup I (#32:Tire/Türkiye), Grup IV (#9:Bozdağ/Türkiye), Grup V (#3:Gölcük/Türkiye) ve Grup VI (#29:Selçuk/Türkiye) her biri birer genotipten oluşmaktadır. Grup II Hindistan'a ait iki genotipi içermektedir. (#51 ve 52). Grup III; lokasyonu Türkiye ağırlıklı olmak üzere 42 genotip içermektedir. Bu genotiplerden 5 adedi, yurtdışını temsil eden örneklerdir; #43:Bulgaristan, #46:Almanya, #54:İngiltere, #61 ve 62:ABD. Geriye kalan 37 genotip Türkiye'den elde edilen genotiplerdir (#1-2, 5-8, 10-15, 19-28, 30-31, 36-37, 39-43, 46-49, 54, 57, 61- 62, 65-66). Son grup VII de ise, 18 genotip bulunmaktadır. Bu genotiplerden 9'u yurtdışını temsil eden örneklerdir (#50, 59 ve 60:Hollanda; #53, 63 ve 64:ABD; #55 ve 56:İngiltere; #45:Almanya). Kalan 9 örnek ise Türkiye'den elde edilen genotiplerdir (#4, 17, 18, 33, 34, 35, 44, 38 ve 58) (Şekil 4.20).



Şekil 4.20 STRUCTURE programından elde edilen verilere göre fasulye genotiplerinin aralarındaki benzerliklere göre dağılımı (Her bir grup farklı renk ile gösterilmiştir; pembe, yeşil, mavi, açık mavi, kırmızı, sarı, kahverengi)

İlişki haritalaması için; elde edilen sonuçlar doğrultusunda ΔK değeri 7'ye karşılık gelen Q matrix elde edilmiştir (Çizelge 4.9).

Çizelge 4.9 STRUCTURE programından elde edilen Q matrix verileri

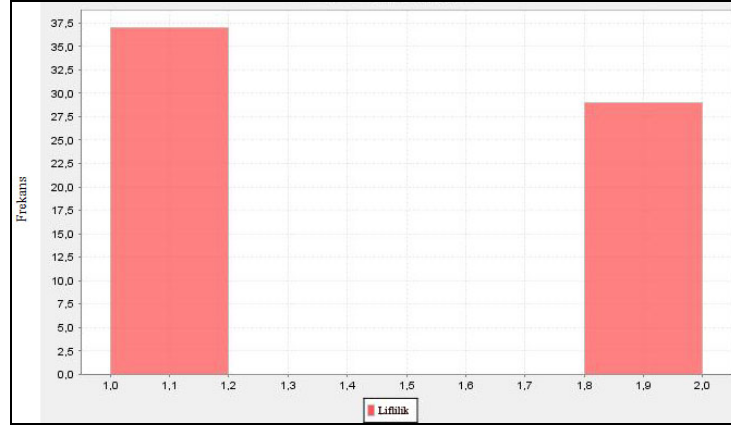
Genotip No	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5	Grup 6	Grup 7
1	0.052	0.067	0.773	0.048	0.054	0.003	0.003
2	0.001	0.000	0.995	0.001	0.001	0.001	0.001
3	0.226	0.158	0.374	0.126	0.113	0.002	0.001
4	0.005	0.001	0.001	0.003	0.003	0.010	0.977
5	0.026	0.010	0.885	0.024	0.022	0.002	0.031
6	0.001	0.001	0.514	0.001	0.001	0.001	0.480
7	0.003	0.001	0.986	0.003	0.002	0.001	0.003
8	0.007	0.001	0.947	0.007	0.007	0.004	0.027
9	0.002	0.001	0.621	0.001	0.001	0.373	0.001
10	0.015	0.001	0.932	0.011	0.014	0.025	0.002
11	0.004	0.001	0.956	0.003	0.004	0.029	0.003
12	0.001	0.001	0.994	0.001	0.001	0.001	0.002
13	0.000	0.000	0.997	0.000	0.000	0.000	0.001
14	0.005	0.001	0.976	0.004	0.004	0.010	0.001
15	0.002	0.001	0.984	0.002	0.002	0.009	0.000
16	0.002	0.001	0.993	0.001	0.001	0.001	0.001
17	0.004	0.001	0.113	0.003	0.003	0.007	0.870
18	0.005	0.002	0.415	0.004	0.004	0.007	0.563
19	0.007	0.001	0.974	0.006	0.006	0.004	0.002
20	0.001	0.001	0.996	0.001	0.001	0.000	0.001
21	0.009	0.000	0.967	0.007	0.006	0.009	0.002
22	0.002	0.000	0.988	0.001	0.001	0.001	0.007
23	0.016	0.001	0.865	0.013	0.012	0.002	0.091
24	0.012	0.002	0.943	0.009	0.008	0.022	0.004
25	0.002	0.001	0.991	0.001	0.001	0.004	0.000
26	0.001	0.000	0.995	0.001	0.001	0.001	0.001
27	0.001	0.001	0.899	0.001	0.001	0.001	0.096
28	0.003	0.001	0.989	0.002	0.002	0.003	0.001
29	0.298	0.006	0.004	0.311	0.378	0.001	0.002
30	0.007	0.001	0.782	0.006	0.004	0.188	0.012
31	0.003	0.001	0.986	0.002	0.002	0.005	0.001
32	0.317	0.166	0.001	0.222	0.290	0.004	0.001
33	0.006	0.004	0.005	0.006	0.004	0.018	0.957
34	0.002	0.000	0.392	0.002	0.002	0.002	0.600

Çizelge 4.9 (devam)

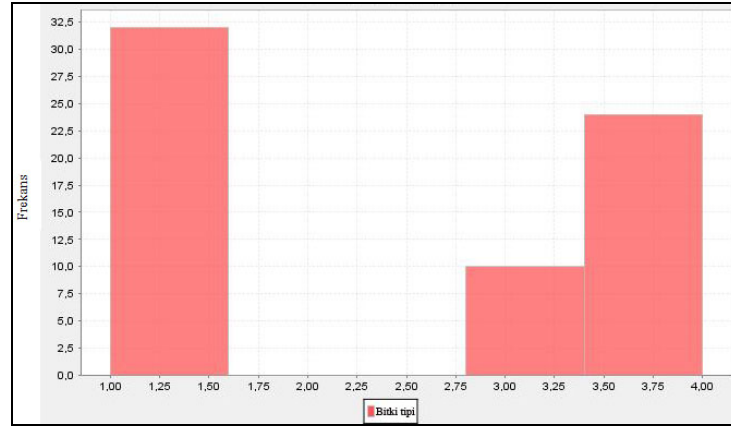
Genotip No	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5	Grup 6	Grup 7
35	0.010	0.001	0.002	0.008	0.007	0.067	0.905
36	0.001	0.000	0.996	0.001	0.001	0.001	0.001
37	0.008	0.001	0.937	0.006	0.005	0.022	0.021
38	0.003	0.002	0.001	0.003	0.003	0.002	0.986
39	0.047	0.005	0.839	0.045	0.039	0.017	0.008
40	0.012	0.001	0.701	0.012	0.009	0.116	0.149
41	0.003	0.002	0.982	0.003	0.003	0.006	0.001
42	0.005	0.001	0.971	0.004	0.004	0.005	0.010
43	0.002	0.001	0.991	0.001	0.001	0.002	0.001
44	0.028	0.003	0.045	0.018	0.019	0.005	0.882
45	0.001	0.001	0.117	0.001	0.001	0.001	0.878
46	0.002	0.001	0.827	0.001	0.002	0.001	0.167
47	0.006	0.010	0.943	0.005	0.005	0.004	0.027
48	0.002	0.001	0.779	0.001	0.001	0.001	0.215
49	0.004	0.001	0.978	0.003	0.003	0.006	0.005
50	0.024	0.004	0.176	0.021	0.019	0.002	0.752
51	0.003	0.986	0.001	0.004	0.004	0.001	0.001
52	0.003	0.727	0.000	0.003	0.003	0.264	0.000
53	0.005	0.001	0.018	0.004	0.004	0.006	0.963
54	0.002	0.001	0.834	0.001	0.001	0.001	0.159
55	0.001	0.001	0.460	0.001	0.001	0.001	0.535
56	0.012	0.001	0.002	0.011	0.008	0.004	0.961
57	0.006	0.001	0.966	0.005	0.005	0.002	0.015
58	0.001	0.000	0.002	0.001	0.001	0.001	0.996
59	0.001	0.000	0.001	0.001	0.001	0.001	0.994
60	0.005	0.001	0.001	0.004	0.004	0.002	0.982
61	0.002	0.002	0.725	0.001	0.002	0.001	0.267
62	0.009	0.015	0.785	0.006	0.006	0.003	0.175
63	0.002	0.002	0.147	0.002	0.002	0.001	0.844
64	0.004	0.000	0.233	0.003	0.003	0.002	0.755
65	0.001	0.000	0.981	0.001	0.001	0.001	0.015
66	0.001	0.000	0.997	0.000	0.000	0.000	0.001

4.9 İlişki Haritalama

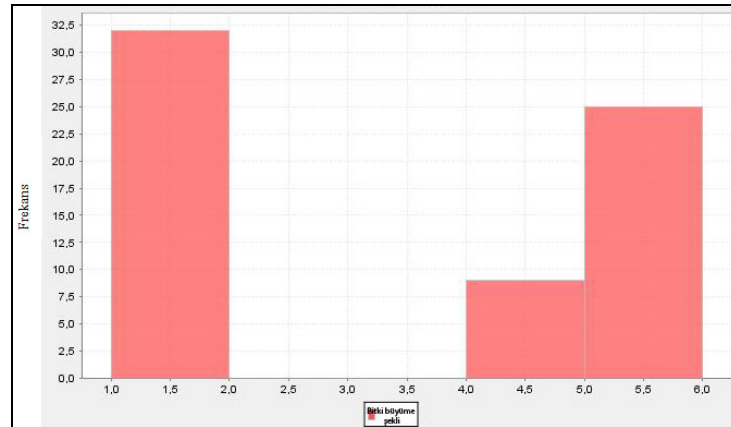
Elde edilen fenotipik ve genotipik özellikler arasında ilişkinin belirlenmesi için TASSEL programı kullanılmıştır. Histogramlar; fenotipik özelliklerin genotiplerde dağılımını göstermektedir. Bu yüzden ilk olarak her bir fenotipik özelliğin histogramına bakılmıştır (Şekil 4.21).



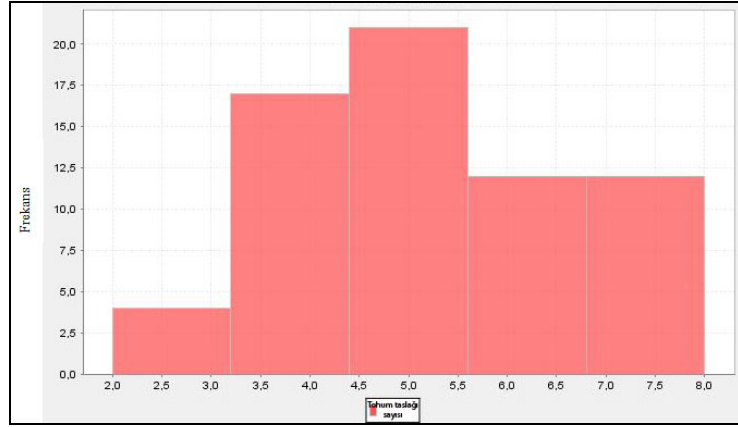
(a)



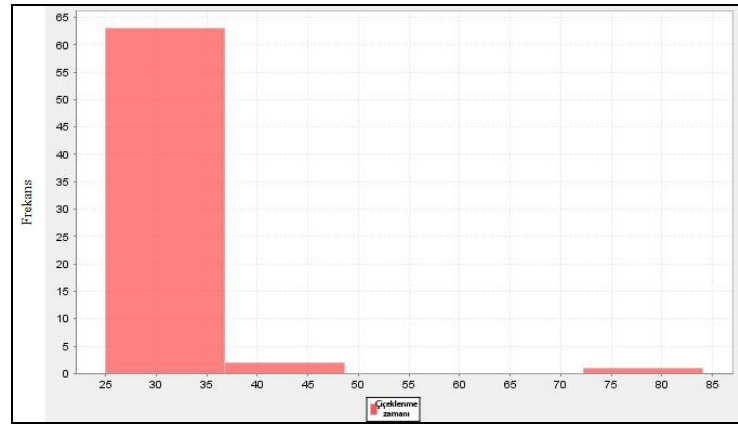
(b)



(c)



(d)



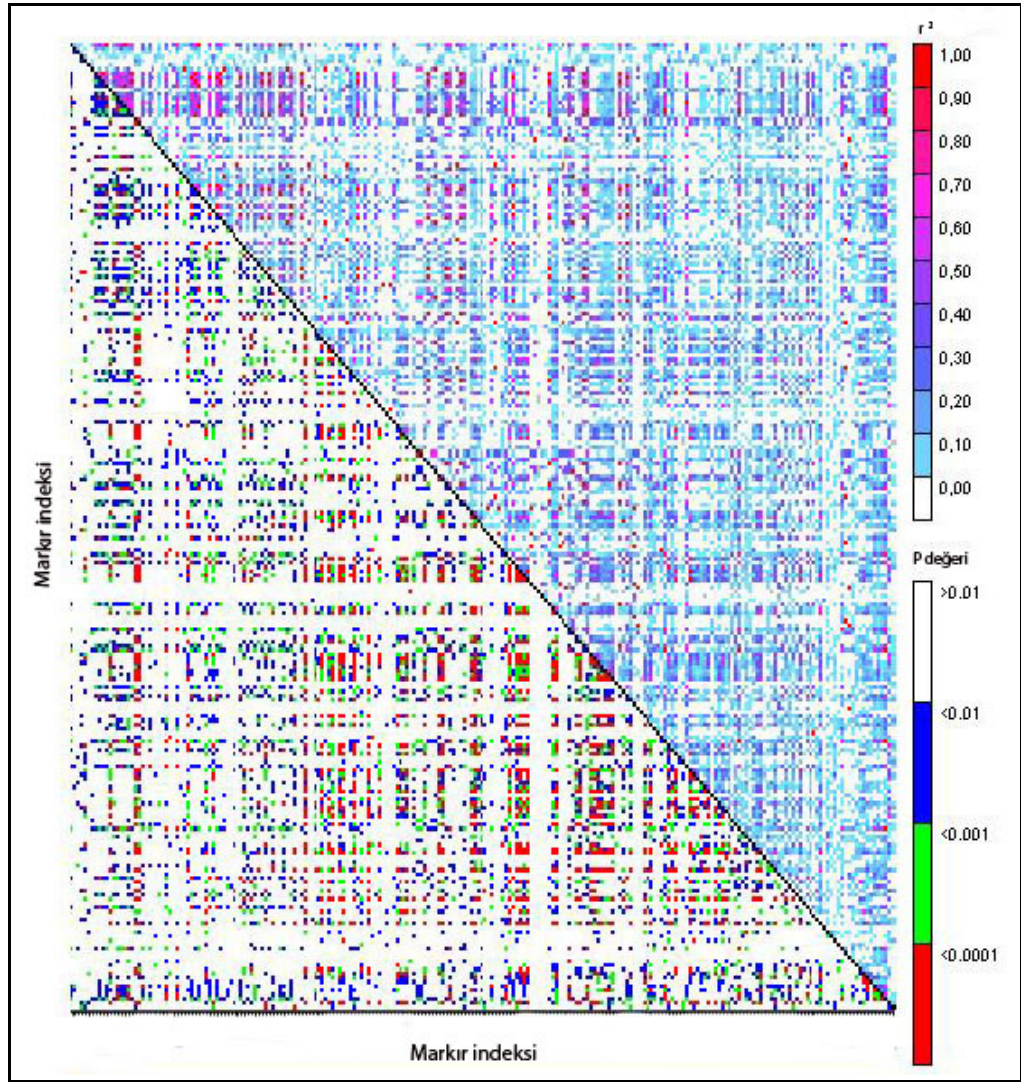
(e)

Şekil 4.21 Fenotipik özellikler için histogramlar **(a)** liflilik özelliği, **(b)** bitki tipi, **(c)** bitki büyüme şekli, **(d)** tohum taslağı sayısı, **(e)** çiçeklenme zamanı.

Şekil 4.21'deki histogram sonuçlarına göre; 36 genotipte (% 55) liflilik gözlenmezken, 30 genotip (% 45) lifli tespit edilmiştir. Bitki tipi ve bitki büyüme şekli özellikleri incelendiğinde yakın sonuçlar elde edilmiştir. Genel olarak genotiplerin % 49'u bodur, % 51'i sırk tip olarak kaydedilmiştir. Tohum taslağı sayısı; 2 ve 9 tohum sayısı aralığında değişen normal dağılım göstermektedir. Bir genotip dışında tüm genotipler 25-35 gün arasında erken çiçeklenmektedir. Sadece #33 nolu genotip (Antalya/Türkiye) 84. günde çiçeklenmiştir.

Markırların önem seviyesi TASSEL programı kullanılarak belirlenmiştir. 66 fasulye örneğinde toplam 418 markır ile yapılan analiz sonucunda geniş oranda LD belirlenmiştir. Elde edilen LD üçgeni Şekil 4.22'de gösterilmektedir. Üçgende X ve Y eksenlerinin her ikisi de markırların LD değerlerini göstermektedir, sağ üst tarafta r^2 değeri, altında ise 1000 tekrarlı permütasyon testi sonucu elde edilen p değeri yer almaktadır. Üçgendeki her bir hücre iki markır arasındaki ilişkiyi ifade etmektedir ve her renk LD değerinin önemini temsil etmektedir (kırmızı,

yeşil, lacivert). p değeri 0.01'den küçük olan değerlere karşılık gelen iki markır arasında önemli derece ilişki var olarak kabul edilmiştir ve kırmızı renk ile gösterilmiştir. r^2 değeri ise moleküler markılar ile açıklanan fenotipik varyasyonun oranını ifade eder (Şekil 4.22).



Şekil 4.22 Markır analizleri sonucu elde edilen LD blokları grafiği

Şekil 4.22'deki LD analizi sonucuna göre, toplam 418 markırdan 267 (%64) markır önemli bulunmuştur. Bu markırlardan 160'ı AFLP markır (% 39), 55'i SSR markır (% 13) ve 52'si SNP markır (% 12).

İlişki haritalaması; TASSEL programında GLM metoduna göre yapılmıştır. STRUCTURE programından elde edilen Q matrix, 267 markır ve 5 fenotipik özellikten elde edilen sonuçlar kullanılmıştır. p değeri 0.01'den küçük ve ayrıca bu p değerleri de markır F değerinden küçük olanlar önemli kabul edilmiştir.

Önemli sayılan her değer için ilgili fenotipik özellik ve markır ilişkisi var demektir. İlişki haritalama sonucu Çizelge 4.10, Çizelge 4.11, Çizelge 4.12, Çizelge 4.13 ve Çizelge 4.14’de gösterilmektedir.

Çizelge 4.10 İlişki haritalama sonucu, liflilik özelliği ile ilişkili markırlar

	Fenotipik özellik	Markır	LG (bağlantı grubu)	Lokus pozisyonu (cM)*	markır F	Markır p	markır r ²
1	Liflilik özelliği	SSR Bmd1	3	261	**	0.00564	0.13
2	Liflilik özelliği	SSR Bmd39	Haritalanmamış	-	**	0.00263	0.15
3	Liflilik özelliği	SSR Bmd42	10	1	**	0.00534	0.13
4	Liflilik özelliği	SSR Bmd46	9	160	**	0.00867	0.12
5	Liflilik özelliği	SSR BM181	3	99	**	0.00564	0.13
6	Liflilik özelliği	SNP1	1	69	**	0.00921	0.12
7	Liflilik özelliği	SNP16	Haritalanmamış	-	**	0.00828	0.12
8	Liflilik özelliği	SNP32	Haritalanmamış	-	**	0.00904	0.12
9	Liflilik özelliği	M-CAA/E-AAC	Haritalanmamış	-	**	0.00621	0.13
10	Liflilik özelliği	M-CAA/E-AAG	Haritalanmamış	-	**	0.00828	0.12
11	Liflilik özelliği	M-GAT/E-ACT	Haritalanmamış	-	**	0.00828	0.12
12	Liflilik özelliği	M-GAT/E-AGT	Haritalanmamış	-	**	0.00564	0.13
13	Liflilik özelliği	M-ACG/E-ACA	Haritalanmamış	-	**	0.00828	0.12

*Bağlantı (Linkage) grupları ve Lokus pozisyonu cM cinsinden Galeano et al.’a (2012) göre belirlenmiştir.

Çizelge 4.11 İlişki haritalama sonucu, bitki tipi ile ilişkili markırlar

	Fenotipik özellik	Markır	LG (bağlantı grubu)	Lokus pozisyonu (cM)*	markır F	Markır p	markır r ²
1	Bitki tipi	SSR BM160	7	9	**	0.00314	0.15
2	Bitki tipi	SSR BM170	6	119	**	0.00675	0.13
3	Bitki tipi	SSR BM183	7	18	**	0.00964	0.12
4	Bitki tipi	SSR BM210	7	127	**	0.00345	0.15
5	Bitki tipi	SNP1	1	69	**	0.00666	0.13
6	Bitki tipi	M-CAA/E-AAC	Haritalanmamış	-	**	0.00160	0.17
7	Bitki tipi	M-CAA/E-ACG	Haritalanmamış	-	**	0.00110	0.18
8	Bitki tipi	M-CAA/E-AAG	Haritalanmamış	-	**	0.00138	0.17
9	Bitki tipi	M-CAA/E-AGG	Haritalanmamış	-	**	0.00136	0.17
10	Bitki tipi	M-GAT/E-ACT	Haritalanmamış	-	**	0.00110	0.18
11	Bitki tipi	M-GAT/E-AGT	Haritalanmamış	-	**	0.00992	0.11

*Bağlantı (Linkage) grupları ve Lokus pozisyonu cM cinsinden Galeano et al.’a (2012) göre belirlenmiştir.

Çizelge 4.12 İlişki haritalama sonucu, bitki büyüme şekli ile ilişkili markırlar

	Fenotipik özellik	Markır	LG (bağlantı grubu)	Lokus pozisyonu (cM)*	markır F	Markır p	markır r ²
1	Bitki Büyüme Şekli	SSR BM157	10	46	**	0.00145	0.17
2	Bitki Büyüme Şekli	SSR BM160	7	9	**	0.00261	0.15
3	Bitki Büyüme Şekli	SSR BM170	6	119	**	0.00521	0.13
4	Bitki Büyüme Şekli	SSR BM183	7	18	**	0.00208	0.16
5	Bitki Büyüme Şekli	SSR BM210	7	127	**	0.00287	0.15
6	Bitki Büyüme Şekli	SNP1	1	69	**	0.00546	0.13
7	Bitki Büyüme Şekli	SNP6	2	202	**	0.00898	0.12
8	Bitki Büyüme Şekli	SNP50	Haritalanmamış	-	**	0.00954	0.12
9	Bitki Büyüme Şekli	M-CAA/E-AAC	Haritalanmamış	-	**	0.00175	0.16
10	Bitki Büyüme Şekli	M-CAA/E-ACG	Haritalanmamış	-	**	0.00144	0.17
11	Bitki Büyüme Şekli	M-CAA/E-AAG	Haritalanmamış	-	**	0.00114	0.18
12	Bitki Büyüme Şekli	M-CAA/E-AGG	Haritalanmamış	-	**	0.00133	0.17
13	Bitki Büyüme Şekli	M-GAT/E-ACT	Haritalanmamış	-	**	0.00112	0.18
14	Bitki Büyüme Şekli	M-GAT/E-AGT	Haritalanmamış	-	**	0.00236	0.16

*Bağlantı (Linkage) grupları ve Lokus pozisyonu cM cinsinden Galeano et al.'a (2012) göre belirlenmiştir.

Çizelge 4.13 İlişki haritalama sonucu, tohum taslağı sayısı ile ilişkili markırlar

	Fenotipik özellik	Markır	LG (bağlantı grubu)	Lokus pozisyonu (cM)*	markır F	markır p	markır r ²
1	Tohum taslağı sayısı	SSR Bmd45	1	69	**	0.00976	0.12
2	Tohum taslağı sayısı	M-CAA/E-ACG	Haritalanmamış	-	**	0.00195	0.16

*Bağlantı (Linkage) grupları ve Lokus pozisyonu cM cinsinden Galeano et al.'a (2012) göre belirlenmiştir.

Çizelge 4.14 İlişki haritalama sonucu, çiçeklenme zamanı ile ilişkili markırlar

	Fenotipik özellik	Markır	LG (bağlantı grubu)	Lokus pozisyonu (cM)*	markır F	markır p	markır r ²
1	Çiçeklenme zamanı	SSR BM38	Haritalanmamış	-	**	0.00133	0.17
2	Çiçeklenme zamanı	SSR BM151	8	124	**	4x10 ⁻¹²	0.88
3	Çiçeklenme zamanı	SSR BM157	10	46	**	4x10 ⁻¹²	0.88
4	Çiçeklenme zamanı	SSR BM210	7	127	**	4x10 ⁻¹²	0.88
5	Çiçeklenme zamanı	SNP1	1	146	**	4x10 ⁻¹²	0.88
6	Çiçeklenme zamanı	SNP24	Haritalanmamış	-	**	4x10 ⁻¹²	0.88
7	Çiçeklenme zamanı	SNP30	Haritalanmamış	-	**	0.00196	0.16
8	Çiçeklenme zamanı	SNP31	Haritalanmamış	-	**	4x10 ⁻¹²	0.88
9	Çiçeklenme zamanı	SNP32	Haritalanmamış	-	**	4x10 ⁻¹²	0.88
10	Çiçeklenme zamanı	SNP33	Haritalanmamış	-	**	4x10 ⁻¹²	0.88
11	Çiçeklenme zamanı	SNP34	Haritalanmamış	-	**	4x10 ⁻¹²	0.88
12	Çiçeklenme zamanı	SNP39	11	15	**	0.00177	0.16
13	Çiçeklenme zamanı	SNP41	2	5	**	4x10 ⁻¹²	0.88
14	Çiçeklenme zamanı	SNP43	Haritalanmamış	-	**	4x10 ⁻¹²	0.88
15	Çiçeklenme zamanı	SNP45	Haritalanmamış	-	**	4x10 ⁻¹²	0.88
16	Çiçeklenme zamanı	SNP46	Haritalanmamış	-	**	4x10 ⁻¹²	0.88
17	Çiçeklenme zamanı	M-CAA/E-AAC	Haritalanmamış	-	**	4x10 ⁻¹²	0.88
18	Çiçeklenme zamanı	M-CAA/E-AAG	Haritalanmamış	-	**	4x10 ⁻¹²	0.88
19	Çiçeklenme zamanı	M-CAA/E-AGG	Haritalanmamış	-	**	4x10 ⁻¹²	0.88
20	Çiçeklenme zamanı	M-GAT/E-ACT	Haritalanmamış	-	**	4x10 ⁻¹²	0.88
21	Çiçeklenme zamanı	M-GAT/E-AGT	Haritalanmamış	-	**	4x10 ⁻¹²	0.88
22	Çiçeklenme zamanı	M-ACG/E-ACA	Haritalanmamış	-	**	0.00588	0.13

*Bağlantı (Linkage) grupları ve Lokus pozisyonu cM cinsinden Galeano et al.'a (2012) göre belirlenmiştir.

Yukarıdaki Çizelge 4.10, Çizelge 4.11, Çizelge 4.12, Çizelge 4.13 ve Çizelge 4.14'e göre; 5 fenotipik özellik ile ilişkili toplamda 62 markır önemli olarak belirlenmiştir.

- **Liflilik özelliği:** 13 markır liflilik özelliği ile ilişkili bulunmuştur. Bunlardan 5'i SSR markır, 3'ü SNP markır ve 5'i AFLP markır. 5 SSR markırından 4'ü ve SNP markırından 1'i daha önce literatürde haritalanmıştır (Çizelge 4.10).

- **Bitki tipi:** 11 markır bitki tipi ile ilişkili bulunmuştur. Bunlardan 4'ü SSR markır, 1'i SNP markır ve 6'sı AFLP markır. SSR markırları ve SNP markır daha önce literatürde haritalanmıştır (Çizelge 4.11).

- **Bitki Büyüme Şekli:** 14 markır bitki büyüme şekli ile ilişkili bulunmuştur. Bunlardan 5'i SSR markırı, 3'ü SNP markırı ve 6'sı AFLP markırırır. SSR markırlarının tümü ve SNP markırından 2'si daha önce literatürde haritalanmıştır (Çizelge 4.12).

- **Tohum taslağı sayısı:** 2 markır tohum taslağı sayısı ile ilişkili bulunmuştur. Bunlardan 1'i SSR markırı, 1'i AFLP markırırır. SSR markırı daha önce literatürde haritalanmıştır (Çizelge 4.13).

- **Çiçeklenme zamanı:** 22 markır çiçeklenme zamanı ile ilişkili bulunmuştur. Bunlardan 4'ü SSR markırı, 12'si SNP markırı ve 6'sı AFLP markırırır. 4 SSR markırından 3'ü ve SNP markırından 3'ü daha önce literatürde haritalanmıştır (Çizelge 4.14).

5. TARTIŞMA

İnsan diyeti için en önemli baklagillerden birisi fasulyedir. Uluslararası ticarete de ana ürün olarak yerini almıştır. Ayrıca yoksul ülkelerde fasulyenin üretim ve tüketim oranı oldukça yüksektir. Bugüne kadar birçok fasulye ıslah programı geliştirilmiş ve verimli ürün elde etmek için markır seleksiyon programları uygulamaya konmuştur (Kelly and Miklas, 1998). Liflilik özelliği, bitki tipi, bitki büyüme şekli, tohum taslağı taslağı ve çiçeklenme zamanı gibi fenotipik karakterlerle ilişkili DNA markırlarının saptanması, fasulye ıslahı programlarında geliştirilmesi işlevlerinin daha iyi anlaşılması açısından oldukça önemlidir (Kwak et al., 2008). Fenotipik özellikler kendi arasında da birbirleriyle ilişkilidir, bir karakter diğer bir karaktere etki etmektedir (Garcia et al., 1997). Fasulyede bitki büyüme şekli, yabani ve kültürü yapılmış türleri ayırt etmede önemli rol oynamaktadır (Smartt, 1976). Ayrıca bitki büyüme şeklinin çiçeklenme zamanı ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. Örneğin, yabani fasulye formları erken çiçeklenirken, kültüre alınmış fasulye türleri, yabani fasulye türlerine göre daha uzun sürede çiçeklenmektedir (Garcia et al., 1997). Durán et al. (2005), ise çalışmalarında bitki büyüme şeklinin tohum taslağı sayısı ile ilişkili olduğunu ve Mezoamerikan ve Andean olmak üzere iki gen havuzuna ait bireyleri ayırt etmede kullanıldığını bildirmişlerdir. Diğer bir fenotipik özellik olan liflilik, ekonomik kalite bakımından oldukça önemlidir. Çünkü taze konserve sanayide liflilik istenmeyen bir özelliktir ve ürünün kalitesini belirlemektedir. Bu nedenle ıslah programlarında düşük lif özelliğine sahip bireyleri seçmek önemlidir. Geleneksel fasulye genetik çalışmaları ile agronomik özellikleri içeren genetik haritalar yapılmıştır (Blair et al., 2003). Islah programlarının temelinde genetik çeşitlilik yatmaktadır. Genetik çeşitliliğin belirlenmesinde son 20 yıldır DNA markırları etkin bir şekilde kullanılmaktadır (Gao, 2003).

AFLP yöntemi ile yapılan birçok çalışma sonucunda, AFLP'nin *Phaseolus vulgaris* genotiplerinde çeşitliliği belirlemede etkin bir yöntem olduğu belirtilmiştir (Rosales-Serna et al., 2005; Svetleva et al., 2006; Kumar et al., 2008; Maras et al., 2008; Masi et al., 2009). Yaptığımız bu çalışmada, AFLP tekniği kullanarak 233 polimorfik bant elde edilmiş ve ortalama bant sayısı 25.9 olarak belirlenmiştir. Svetleva et al. (2006), Bulgaristan'da yetişen 78 fasulye genotipinde 3 AFLP primer kombinasyonu kullanarak 54 polimorfik bant tespit etmişler, ortalama bant sayısını ise 18 olarak hesaplamışlardır. Maras et al. (2008), Andean ve Mezoamerikan gen havuzlarına ait 29 fasulye genotipinde 10 AFLP primer kombinasyonu kullandıklarında 112 polimorfik bant belirlemişlerdir ve

ortalama polimorfik bant sayısı 11'dir. Yaptığımız çalışmada en yüksek polimorfik bant sayısı M-CAA/E-AAC primer kombinasyonu kullanıldığında 57 bant olarak elde edilmiştir. Svetleva et al. (2006), çalışmalarında en yüksek polimorfizmi yine aynı primer kombinasyonunu kullanarak 22 polimorfik bant elde etmişlerdir. Maras et al. (2008) ve Svetleva et al.'un (2006) çalışmalarında elde edilen ortalama polimorfik bant sayısı bizim elde ettiğimiz değerden düşüktür. Bu durum, araştırmacıların çalışmalarında kullanmış olduğu genotiplerin genetik varyabilitesinin düşük olmasından kaynaklanmış olabilir. Rosales-Serna et al. (2005), fasulyenin gen merkezlerinden biri olan Meksika'nın farklı bölgelerinden elde edilen 112 genotipte 4 AFLP primer kombinasyonu kullandıklarında toplam 344 polimorfik bant elde etmişler ve kombinasyon başına ortalama 86 polimorfik bant bulmuşlardır. Araştırmacıların elde ettiği ortalama bant sayısı bu çalışmada elde edilen değerden büyüktür. Bunun nedeni Meksika bölgesinin fasulyenin gen merkezi olması ve bu nedenle genetik çeşitliliğin bu coğrafyada en yüksek olmasından kaynaklanmaktadır.

PIC değeri bir markırın polimorfizmi ayırt etme gücünü belirlemektedir. Bu çalışmada kullanılan AFLP primerlerin ortalama PIC değeri 0.51 bulunmuştur. Bu değer AFLP yöntemi ile elde edilmiş Kumar et al.'un (2008) bulduğu PIC değerlerinden yüksektir. Bu sonuç çalışmamızda kullanılan markırların ayırt etme gücünün yüksek olduğunu göstermektedir. AFLP markır yöntemi kullanılarak kısa zamanda çok sayıda polimorfik bant tespit edilebilmiştir ve tespit edilen polimorfizmler tekrarlanabilir özelliktedir (Powell et al., 1996).

AFLP analizi sonucu elde edilen görüntülerde skorlanan bant büyüklüğü değerleri 50–500 bp değerleri arasındadır. Elde ettiğimiz bu değerler Masi et al. (2009), Svetleva et al. (2006) ve Kumar et al.'un (2008) değerleri ile benzerlik göstermektedir.

SSR markırları yüksek polimorfizm göstermeleri, genomda tekrar eden bölgeler halinde bulunmaları ve bu tekrar bölgelerinin genotiplere özgü sayıda olması nedeniyle bitki türleri arasında genetik varyasyonun belirlenmesi ve akrabalık ilişkilerinin incelenmesi çalışmalarında başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (Sa'nchez-Pe'rez et al., 2005). Bu çalışmada kullanılan SSR markırları literatürden fasulye genomunun her bir kromozomunu temsil edecek şekilde seçilmiştir (Yu et al., 2000; Gaitá'n-Solí's et al., 2002; Blair et al., 2003). Çalışmada kullanılan SSR markırları daha önce farklı fasulye genotiplerinin çeşitlilik analizlerinde de kullanılmıştır. Bu çalışmalarda da bulduğumuz

sonuçlara benzer sonuçlar elde edilmiştir (Yu et al., 1999; Gaitan-Solis et al., 2002; Metais et al., 2002; Maras et al., 2008). Bu sonuçlar farklı fasulye çeşitlerinde aynı SSR markırları kullanıldığında benzer sonuçlar elde edildiğini ve SSR markırlarının güvenilir sonuçlar verdiğini göstermektedir (Blair et al., 2003). Polimorfik bant sayısı, popülasyondaki genetik çeşitliliğin analizinde kullanılan temel parametrelerden biridir ve genotipler arasındaki çeşitliliği belirleyici kriter oluşturmaktadır (Li and Ge, 2001). Bu çalışmada 22 SSR primeri kullanarak 80 polimorfik bant elde edilmiştir. Primer başına düşen ortalama polimorfik bant sayısı ise 4'tür. Kwak et al. (2009), farklı coğrafik bölgelerden topladıkları fasulye genotiplerinde 26 SSR primeri kullandıklarında ortalama polimorfik bant sayısını 16 olarak belirlemişlerdir. Burle et al. (2010), Brezilya'dan topladıkları 279 fasulye genotipinde 67 SSR markırı ortalama polimorfik bant sayısını 6 olarak hesaplamışlardır. Araştırmacıların elde ettiği ortalama polimorfik bant sayısı bizim elde ettiğimiz değerden yüksektir. Brezilya fasulyenin gen merkezlerinden biri olduğu için buradaki genotipler arasında yüksek genetik varyabilite görülmektedir. Cabral et al. (2011), Brezilya bölgesinden toplanan 57 fasulye genotipinde 13 SSR markırını polimorfik bulmuşlar ve bu markırlardan elde edilen ortalama polimorfik sayısını 2.2 olarak hesaplamışlardır.

Ayrıca çalışmamızda kullanılan SSR markırları EST ve genomik markırlardan oluşmaktadır. EST markırlardan elde edilen ortalama polimorfik bant sayısı (3.5); Bmd33, Bmd36, Bmd38, Bmd39 and Bmd42 olmak üzere 5 genomik markırdan elde edilen ortalama polimorfik bant sayısından (4) düşüktür. Blair et al. (2006), farklı SSR primerlerini kullanarak yaptıkları çalışmalarında, benzer şekilde genomik SSR markırlarında (9.2) EST-SSR markırlarına (6) göre daha yüksek polimorfik bant gözlemlemişlerdir. Bunun nedeni EST markırlarının daha korunmuş olmasından ve genomik SSR markırlarının genomda tekrarlı bölgeler halinde bulunmasından kaynaklanabilir (Scott et al., 2000).

Bu çalışmada kullanılan SSR primerlerin ortalama PIC değeri 0.34 bulunmuştur. Kwak et al. (2009), fasulyede SSR primeri kullanarak yaptıkları genetik çeşitlilik çalışmasında ortalama PIC değerini 0.62 olarak belirlemişlerdir. Burle et al. (2010), genomik primerlerini kullandıklarında ortalama PIC değerini 0.49 ve EST-SSR primerlerini kullandıklarında ise bu değeri 0.46 bulmuşlardır. Bunun nedeni araştırmacıların çalışmalarında kullandıkları genomik markırların EST-SSR markırlarından daha fazla çeşitlilik göstermesidir (Blair et al., 2006). Cabral et al.'un (2011) çalışmasında ise PIC değeri 0.27'dir. Bu çalışmada PIC değerinin düşük olmasının nedeni, kullanılan primerlerin fasulye genotipleri

arasında benzer bant profili oluşturarak genotiplere özgü bant geliştirmemiş olmasından kaynaklanabilir.

SNP'lerin genomda görülme oranları ortalama 1/1000 nükleotittir. Hatta bu rakam insanda 1/100'e kadar düşmektedir (Salisbury et al., 2003). SNP markırları kullanıldığında genotipe özgü DNA bantlarının elde edilme şansı yüksektir, bu nedenle genetik çeşitlilik ve haritalama çalışmalarında kullanılmak üzere diğer markırlara alternatif olarak geliştirilmeye başlanmıştır. Çünkü bu markırlar genom üzerinde göreceli olarak eşit dağılım gösterirler (Chagne' et al., 2007). Toplamda 48 SNP primeri kullanarak 105 polimorfik bant elde edilmiş ve ortalama polimorfik bant sayısı 2 olarak hesaplanmıştır. Fasulyede SNP markırları kullanarak az sayıda genetik çeşitlilik çalışması bulunmaktadır (Corte's et al., 2011). Bu çalışmada kullanılan SNP primerlerinin ortalama PIC değeri 0.65 bulunmuştur. Corte's et al. (2011), çalışmalarında SNP markırlarının ortalama PIC değerini 0.47 olarak belirlemişlerdir. Blair et al.'un (2013) fasulyede genetik çeşitliliği belirlemek amacıyla SNP primeri kullanmışlardır. Ortalama PIC değerini 0.32 olarak hesaplamışlardır. Bu çalışmada kullandığımız SNP primerlerinin ortalama PIC değeri, Corte's et al. (2011), Blair et al.'un (2013) bulduğu PIC değerinden ve ayrıca çalışmamızda kullandığımız AFLP ve SSR primerlerinin ortalama PIC değerinden yüksektir. SNP markırları tek nükleotid polimorfizmine dayanan oldukça spesifik markırlardır. Bu nedenden dolayı SNP primerlerinin ayırt etme gücü oldukça yüksektir.

Bu çalışmada Hindistan, Amerika, Hollanda, İngiltere, Almanya, Bulgaristan ve Türkiye'nin farklı bölgelerinden toplanmış oldukça geniş lokasyon aralığına sahip genotipler yer almıştır. Populasyon yapısı; tüm populasyon içinde oluşan sabit alt grupları ifade etmektedir. Alt grupların iyi ayrımlanmış olması ilişki haritaların gücünü de belirlemektedir (Abdurakhmonov and Abdurkarimov, 2008). Bu nedenle haritalama çalışması yapmadan önce bu grupların belirlenmesi çok önemlidir. Bu çalışmada populasyon yapısını belirlemek amacıyla STRUCTURE programı kullanılmıştır. AFLP, SSR ve SNP markır analizlerinden elde edilen sonuçlar excel programında matrix oluşturularak STRUCTURE programına veri sağlanmıştır. STRUCTURE programından elde edilen sonuca göre genotipler kendi arasında 7 ayrı gruba (K=7) ayrılmıştır (Bkz. Şekil 4.20). Ancak populasyonda genel olarak iki ana grup görülmektedir (Grup III ve VII). Bunlar büyük ihtimalle Mezoamerikan ve Andean gen havuzlarını temsil eden gruplardır. Muhtemelen oluşan diğer küçük gruplar bu iki ana gruba ait bireylerin melezlenmeleri sonucu oluşan genotiplerden kaynaklanmaktadır. Bu çalışmada

kullanılan populasyonların lokasyonlarına bakıldığında en uzak lokasyon Hindistan'dır ve Hindistan'a ait iki genotip (#51 ve #52) diğer genotiplerden tamamen ayrı bir grup oluşturmuştur. Türkiye'nin farklı coğrafik bölgelerinden elde edilen 4 genotip ise diğer Türkiye orijinli genotiplerden ayrılarak her biri farklı bir grupta yer almıştır (#32:Tire, #9:Bozdağ, #3:Gölcük, #29:Selçuk). Diğer iki grup, ağırlıklı olarak Türkiye orijinli olup her iki grupta da dünyanın farklı bölgelerini temsil eden fasulye genotipleri vardır. Ayrıca NTSYS programından elde edilen genetik yakınlık sonucuna göre en yakın genotiplerin #11 (Kırklareli/Türkiye) ile #12 (Bandırma/Türkiye) (0.93) olduğu, en uzak genotiplerin ise #52 (Hindistan) ile #32 (Tire/Türkiye) (0.09) olduğu görülmektedir. Maras et al. (2008), SSR markırlarını kullanarak yaptıkları fasulye genetik çeşitlilik çalışmasında varyasyon oranını 0 ile 75 arasında bulmuşlardır. Kumar et al. (2008) ise AFLP markırları ile yaptıkları çalışmada bu oranı 0.18–0.76 arasında tespit etmişlerdir. Fasulye orta Amerika kökenlidir. Türkiye fasulyenin anavatanı değildir, ülkemizde bulunan tüm fasulye çeşitleri diğer ülkelerden introduksiyon materyali olarak gelmiştir. Bu yüzden elde ettiğimiz sonuçlar fasulye genotipleri arasında genetik çeşitliliğin bulundukları lokasyona bağlı olarak gruplandığını tam desteklememektedir. Fasulyede STRUCTURE programı ile yapılan çalışmalara baktığımızda; Burle et al. (2010), Brezilya'da bulunan 279 fasulye genotipinin STRUCTURE analiz sonucunda iki gruba ($K=2$) ayrıldığını ve bunların Andean ve Mezoamerikan olduğunu saptamışlardır. Hegay et al. (2012), Mezoamerikan ve Andean gen havuzlarına ait Kırgızistan'dan toplanan 28 fasulye genotipinde genetik çeşitlilik analizi yapmışlardır. STRUCTURE programında yapılan populasyon yapısı analizi sonucunda genotiplerin iki gruba ($K=2$) ayrıldığını ve Mesoamerikan genotiplerinin Andean genotiplerine göre kendi aralarında daha fazla çeşitlilik gösterdiğini bildirmişlerdir. Blair et al. (2012), 108 fasulye genotipinin Andean, Kolombiya, Ekvator, Kuzey Peru, Guatemala ve Mezoamerikan olmak üzere 5 gruba ayrıldığını ($K=5$) bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar 2013 yılında SNP markırlarını kullanarak genotiplerin Andean ve Mezoamerikan olmak üzere iki gruba ($K=2$) ayırmışlardır. Yaptığımız bu çalışmada dünyanın farklı coğrafik bölgelerinden toplanmış, geniş lokasyon aralığına sahip fasulye genotipleri kullanılmıştır. Bu genotipler melez ıslah programları sonucunda geliştirilmiş ve bu nedenle genetik varyasyon bu genotiplerde daralmıştır. Büyük olasılıkla bu genotiplerin ebeveynleri Mezoamerikan ya da Andean kökenli olması nedeniyle melezlerde bu karışım söz konusu olabilir. Bu çalışmada elde edilen STRUCTURE grup sayısının fasulyenin temel iki grubu olan Mezoamerikan ya da Andean grup sayısından büyük olması melez çeşitlerin kombinasyonlarından

kaynaklanabilir. Ancak çalışmamızda Andean ya da Mezoamerikan olduğu bilinen genotip kullanılmadığı için kesin önerilerde bulunmak zordur.

İlişki haritalama; farklı lokuslardaki allellerin bağlantı dengesizliğine dayanan kantitatif özelliklerin haritalanması ve bu kantitatif özellikler ile markırlar arasındaki ilişkinin belirlenmesi için geliştirilen etkin bir yöntemdir. Bu yöntem sayesinde geleneksel bağlantı haritalarına göre daha az zamanda ve daha az maliyette sonuç elde edilir (Myles et al., 2009). Bitkilerde ilişki haritalamada önemli faktörlerden birisi de analiz edilecek olan populasyonun seçimidir. Daha fazla sayıda allel elde etmek için populasyon içerisinde maksimum çeşitliliği içeren ve daha fazla rekombinasyon olasılığına izin veren bireylerin seçilmesi gerekir. İlişki haritalarda, geliştirilmesi zaman alıcı melez populasyonlara (F_2 , RIL, DH) gerek kalmadan daha kısa sürede kalıcı sonuç veren doğal populasyonlar kullanılmaktadır. Genetik araştırmalarda, yol açtığı istatistiksel yöntemlerdeki gelişmelerden, etkin ve yeni allellerin belirlenmesinden ve genomik teknolojilerindeki avantajlarından dolayı, ilişki haritalama metodu bitkilerde kullanılmaya başlandığından bu yana hızlı bir şekilde önem kazanmaya devam etmektedir (Shehzad et al., 2009).

İlişki haritalamadaki başarı; fenotipik özellikleri etkileyen alleller ve markır allelleri arasında LD'nin belirlenmesine bağlıdır (Stich et al., 2005). LD; genomun taranması için gerekli markır yoğunluğunu ve haritanın çözünürlüğünü belirlemektedir. Eğer LD dağılımı dar bir alan içerisinde ise haritalama çözünürlüğünün yüksek olması beklenir ancak bunun için çok sayıda markır gereklidir. LD, geniş bir alanda dağılım gösterirse haritalama çözünürlüğü düşük olacaktır, ancak az sayıda markır yeterli olacaktır (Zhu et al., 2008). Çalışmamızda markırların önem seviyesini hesaplamada, r^2 değeri yüksek ($1'e$ yakın) ve p değeri 0.01'den küçük olan değerler önemli kabul edilmiştir. AFLP, SSR ve SNP markırlarını birlikte kullanarak fasulye genomunun tümünü mümkün olduğunca geniş tarayarak bu ilişkinin yüksek olması sağlanmıştır. AFLP, SSR ve SNP markırlarından elde edilen toplam 418 markırdan 267'si önemli bulunmuştur. Bulunan bu LD değeri; geçmişten günümüze kadar fasulye çeşitlerinin kültüre alınma çalışmaları boyunca, insanlar tarafından istenilen fenotipik özelliklere sahip bireylerin seçilmesi ve dolayısı ile benzer haplotip bloklarının ıslah edilmiş bireylerde bulunması ile açıklanabilir. Ayrıca kendine döllen bir bitki olan fasulyede; mısır (Remington et al., 2001), şalgam (Zhao et al., 2007) ve ayçiçeği (Mandel et al., 2013) gibi yabancı döllen bitkilere göre daha yüksek LD bulunması beklenen bir durumdur. Çünkü kendine döllen

bitkiler daha hızlı homozigotlaşma oranına sahiptirler. Chen et al. (2012), buğdayda yaptıkları LD analizi çalışması ile bu sonucu desteklemektedir.

Stich et al. (2005), mısır genotiplerinde yaptıkları LD analizine göre sert mısır grubunda 2. kromozomda 105 cM'a kadar, at dişi mısır grubunda 7. kromozomda 103 cM'a kadar oldukça geniş aralıkta LD belirlemişlerdir. Aynı araştırmacılar 2006 yılında mısır genotiplerinde yaptıkları çalışmada LD değerini belirlemek amacıyla AFLP ve SSR markırlarını kullanmışlardır. AFLP (4cM) markırlarına göre SSR markırları (30-31 cM) kullandıklarında daha geniş LD bulmuşlardır. Breseghello et al. (2006), 36 SSR markırı ile buğdayda yaptıkları çalışmada 5A ve 2D kromozom bölgelerinde ortalama <1 ve ~5 cM alanda güçlü LD değeri saptamışlardır. Shehzad et al. (2009), sorghumda 470 SSR markırları ile yaptıkları çalışmada LD değerlerinin düşük olduğuna ve bu değerın QTL belirlemek için yeterli olmadığı sonucuna varmışlardır. Bunun üstesinden gelebilmek için sorghumda daha fazla markır kullanılması gerektiğini bildirmişlerdir. Aynı kromozom üzerinde birbirine yakın bulunan markırlar arasında dar LD'ler tespit edilebilir ancak bu durum her zaman net sonuçlar vermeyebilir. Bunlar kromozom üzerinde fiziksel bağlantılardan ve yetersiz markır sayısından dolayı oluşmaktadırlar.

Bu çalışmada elde edilen LD saptanan markır sayısı fasulyede yapılan diğer LD analizlerinde elde edilen sayıya göre yüksek bulunmuştur. Galeano et al. (2012), yaptıkları analiz sonucunda 110 SNP and 24 SSR markırını önemli bulmuşlardır. Çalışmalarında düşük LD değeri belirlemeleri populasyon yapısından kaynaklanıyor olabilir. Çünkü LD değerinin belirlenmesi populasyonda gerçekleşen rekombinasyon olaylarına bağlıdır (Abdurakhmonov and Abdukarimov, 2008). Zhu et al. (2003), soya fasulyesinde SNP markırını kullandıklarında düşük oranda LD saptamışlardır. Ayrıca Jun et al. (2008), soya fasulyesinde 150-300 markırın ilişki haritalama yapmak için yeterli olduğunu belirlemişlerdir. Soya fasulyesinin genomunun büyüklüğü fasulye genomuna çok benzer olduğundan bu çalışmada kullanılan markır sayısı, fasulyede ilişki haritalama yapmak için yeterlidir.

Çalışmamızda ilişki haritalama için, LD analizinde önemli bulunan AFLP, SSR ve SNP markırlarından toplam 267 markır kullanılmıştır. Böylece farklı markır sistemlerinden faydalananak tüm genomun temsil edilmesi ile haritanın doygunluğu sağlanmıştır. Benzer şekilde Galeano et al. (2012), verim ve verimle ilişkili özellikler ile ilişkili markırları belirlemek için SNP ve SSR markırlarını

kullanmışlardır. Blair et al. (2012), fasulyede yaptıkları QTL analizinde AFLP, RAPD ve SSR markırlarını kullanmışlardır. Haritalamalarda, ayrıca tek markır sisteminin kullanıldığı çalışmalar da bulunmaktadır. Abdurakhmonov et al. (2008) pamuk genotiplerinde sadece SSR markırını kullanarak lif kalitesi özelliği ile ilişki haritalama çalışması yapmışlardır. Agrama et al. (2007), çalışmalarında aynı şekilde sadece SSR markırlarını kullanmışlardır. Ancak, SSR markırları yüksek derece polimorfizm göstermelerine rağmen ilişki haritalama çalışmalarında tek başlarına yeterli değildir (Ching et al., 2002). Bu çalışma sonucunda fasulye genomunun 4. ve 5. bağlantı grupları hariç tüm bağlantı gruplarını temsil edecek şekilde markır-fenotipik özellikler arasında yüksek korelasyon saptanmıştır.

Bugüne kadar yapılmış QTL çalışmalarında F_2 ya da RIL gibi iki ebeveynin melezlenmesi sonucunda elde edilen melez populasyonlar kullanılmıştır (Freyre et al., 1998; Miklas et al., 2001; Blair et al., 2003; Blair et al., 2012). Ancak bu populasyonların geliştirilmesi için belirli bir zamana ihtiyaç duyulmaktadır. İlişki haritalarda bu zaman alıcı populasyonlara gerek kalmadan daha kısa sürede kalıcı sonuç veren doğal populasyonlar kullanılmaktadır (Oraguzie et al., 2007). Ayrıca ilişki haritalarda kullanılan popülasyondaki birey sayısı oldukça önemlidir (Agrama et al., 2007; Galeano et al., 2012). Bu çalışmada markır-fenotip arasındaki ilişkiyi belirlemek amacıyla farklı coğrafik bölgelerden elde edilmiş 66 adet fasulye genotipi kullanılmıştır. Benzer şekilde Roy et al. (2006), ilişki harita çalışmalarında 55 buğday genotipi ve Simko et al. (2009), 68 marul genotipi kullanmışlardır. Bu nedenle bu çalışmada kullanılan genotip sayısı fasulyede ilişki haritalama için yeterli ve uygun bulunmuştur.

Fenotipik özellikler ile markırlar arasındaki ilişkiyi belirlemek amacıyla TASSEL programı kullanılmıştır. TASSEL programında analizler için GLM metodu seçilmiştir. Bugüne kadar fasulyede ilişki haritalama yapılmış iki çalışma bulunmaktadır (Shi et al., 2011; Galeano et al., 2012). Galeano et al. (2012), çiçeklenme zamanı, olgunlaşma zamanı, bitkideki bakla sayısı, tohum taslağı sayısı, bitkideki tohum sayısı, % boş bakla, ortalama bakla uzunluğu, 100 tohum ağırlığı ve verim özelliklerini GLM metodunu kullanarak incelemişlerdir. Ayrıca ilişki haritalamada GLM metodunun kullanıldığı birçok çalışma vardır (Inostroza et al., 2007; Jaiswal et al., 2012). Shi et al. (2011), çalışmalarında MLM metodunu kullanarak yaprak yanıklığı ile ilişkili markırları bulmayı hedeflemişlerdir. Çalışmamızda da kullandığımız GLM metodunun avantajı; bu metod sayesinde daha fazla sayıda önemli p değeri hesaplaması ve bunun

sonucunda markır-fenotipik özellik arasında daha fazla ilişki bulmasıdır (Galeano et al., 2012).

Literatürde moleküler markırlar ve fenotipik özellikler arasındaki korelasyonun önemli sayılabilmesi için p değerinin 0.01 ve 0.05'den küçük olduğu değerlerinin her ikisi de kullanılmıştır (Jun et al., 2008; Cockram et al., 2008; Hou et al., 2011). Ayrıca moleküler markırlar tarafından açıklanan fenotipik varyasyonun oranını ölçmek için QTL haritalarda r^2 değeri kullanılır (Shi et al., 2011). Çalışmamızda 0.01'den küçük olan p değerleri önemli kabul edilmiştir. Toplamda 5 fenotipik özellik 62 markır ile ilişkili bulunmuştur. Bunlardan 13 markır liflilik özelliği, 11 markır bitki tipi, 14 markır bitki büyüme şekli, 2 markır tohum taslağı sayısı ve 22 markır çiçeklenme zamanı ile ilişkili bulunmuştur.

Bu çalışmada üç SNP markırı (SNP1, SNP16, SNP32) ile liflilik özelliği arasında yüksek korelasyon saptanmıştır. SNP1 markırı daha önce Galeano et al. (2012) tarafından LG1'de haritalanmıştır, ancak SNP16 ve SNP32 markırları daha önce herhangi bir bağlantı grubunda haritalanmamıştır. Bu 3 SNP markırı toplam varyasyonun % 36'sını açıklamaktadır (Bkz. Çizelge 4.9). Ayrıca liflilik özelliği, 5 SSR markırı ve 5 AFLP ile de ilişkili bulunmuştur. Liflilik özelliği ile ilişkili olarak saptanan bu AFLP markırlarının hiçbirisi daha önce herhangi bir çalışmada haritalanmamıştır. Liflilik özelliği ile ilişkili olarak saptadığımız SSR Bmd1 ve BM181 markırları LG3'te, Bmd42 markırı LG10'da ve Bmd46 markırı LG9'da Galeano et al. (2012) tarafından haritalanmıştır. Dört SSR markırı toplam varyasyonun % 66'sını açıklamaktadır.

Bu çalışmada SSR markırları (BM157, BM160, BM170, BM183 ve BM210) ve bitki büyüme şekli arasında yüksek korelasyon saptanmıştır. Daha önce bu SSR markırlarından BM157 markırı LG10'da, BM170 markırı LG6'da ve BM160, BM183 ve BM210 markırları LG7'de Galeano et al. (2012) tarafından haritalanmıştır. Ayrıca Galeano et al. (2012) tarafından LG1'de haritalanan SNP1 markırı bitki büyüme şekli ile ilişkili bulunmuştur. Chavvaro et al. (2010), ise bitki büyüme şeklinin belirlenmesi ile ilişkili *fin* lokusunun, LG1'de SSR Bmd10 ve Bmd201 markırları arasında bulunduğunu bildirmişlerdir. Daha önceki çalışmalarda da bu bölgenin *fin* lokusu ile ilişkili olduğu bulunmuştur (Pañeda et al., 2008; Kwak et al., 2008). Ayrıca çalışmada, Pañeda et al. (2008), Kwak et al. (2008) ve Chavvaro et al.'un (2010) çalışmaları ile aynı bölgede haritalanmış SNP1 markırı da bitki büyüme şekli ile ilişkili bulunmuştur.

Bu çalışmada kullanılan diğer fenotipik özellikler ile karşılaştırıldığında tohum taslağı sayısı ile az sayıda markır arasında yüksek korelasyon saptanmıştır. Sadece 1 SSR markırı (Bmd45) ve daha önce haritalanmamış 1 AFLP (M-CAA/E-ACG) markırı tohum taslağı sayısı ile ilişkili bulunmuştur. Bmd45 markırı Galenoa et al. (2012) tarafından LG1'de haritalanmıştır. Ayrıca tohum taslağı sayısı ile SNP markırları arasında ilişki saptanmamıştır. Galeano et al. (2012) yaptıkları çalışmada, LG7'de lokalize olmuş BM160 markırını tohum taslağı sayısı ile ilişki bulmuşlardır. BM160 markırının bu çalışmada 4 alleli olduğu belirlenmiş ve bitki büyüme şekli ve bitki tipi ile ilişkili bulunmuştur. Bu alleller genoma dağılmış olabilir ve her farklı allel farklı özelliklere etki edebilir.

Bu çalışmada 22 markır çiçeklenme zamanı ile ilişkili bulunmuştur. En önemli yüksek korelasyon ise, çiçeklenme zamanı ve 18 markır arasında saptanmıştır ($r^2 = 0.88$, $p = 4 \times 10^{-12}$). Bunlardan 3'ü SSR markırı; BM210, BM151 ve BM157'dir. Bu markırlar fasulye genomunda sırasıyla LG7'de 127 cM, LG8'de 124 cM'da ve LG10'da 46 cM'da haritalanmıştır (Galeano et al., 2012). Ayrıca saptadığımız bu sonuçlar Chavvaro et al. (2010) ve Blair et al. (2012) çalışmaları ile de benzerlik göstermektedir. Chavvaro et al. (2010), çiçeklenme zamanı ile ilgili geni LG1'de *fin* lokusu yakınında lokalize olduğunu bulmuşlardır. Blair et al. (2012) ise fasulyede RIL populasyonları ile yaptıkları ilişki haritalama çalışmasında, LG7'de bulunan BM185 ve LG5'de bulunan BM138 markırları ve çiçeklenme zamanı arasında yüksek korelasyon bulmuşlardır. Yine SNP ile yapılan çalışmamızda; SNP1, SNP24, SNP31, SNP32, SNP33, SNP34, SNP41, SNP43, SNP45, SNP46 olmak üzere 10 SNP markırı ile çiçeklenme zamanı arasında yüksek korelasyon bulunmuştur. Fasulye genomunda SNP1 markırı LG1'de 69 cM'da, SNP41 markırı LG2'de 5 cM'da ve SNP43 markırı ise LG2'de 5 cM'da haritalanmıştır (Galeano et al., 2012). Taran et al. (2002) ise 142 birey içeren F₂ fasulye populasyonunda yaptıkları çalışmada, benzer şekilde LG11'de çiçeklenme zamanı ile ilişkili markır bulmuşlardır. Çalışmada bulunan SNP39 markırı, Taran et al.'un (2002) çiçeklenme zamanı ile bulduğu bu bölgeyle aynıdır. Geriye kalan 5 önemli büyük korelasyon, AFLP markırları (M-CAA/E-AAC, M-CAA/E-AAG, M-CAA/E-AGG, M-GAT/E-ACT, M-GAT/E-AGT) ile çiçeklenme zamanı arasında bulunmuştur.

Çalışmada her bir fenotipik özellik için en önemli ilişkiye sahip markırlar belirlenmiştir. Liflilik özelliği ile SSR Bmd39 markırı ($p=0.00263$, $r^2=0.15$), bitki tipi özelliği ile M-CAA/E-ACG ve M-GAT/E-ACT ($p=0.00110$, $r^2=0.18$) AFLP markırları, bitki büyüme şekli özelliği ile M-GAT/E-ACT ($p=0.00112$, $r^2=0.18$) AFLP markırı, tohum taslağı sayısı özelliği ile M-CAA/E-ACG ($p=0.00195$, $r^2=0.16$) AFLP markırı arasında yüksek r^2 oranları saptanmıştır.

Bu çalışmada kullanılan bazı markırlar birden fazla özellik ile korelasyon halindedir. Bu sonuca göre; SNP1, M-CAA/E-AAC, M-CAA/E-AAG, M-GAT/E-ACT, M-GAT/E-AGT markırları, liflilik özelliği, bitki tipi, bitki büyüme şekli ve çiçeklenme zamanı ile ilişkili bulunmuştur (Bkz. Çizelge 4.9). Galeano et al. (2012), LG2’de bulunan BSn66_SNP2 markırını olgunlaşma süresi, % boş bakla, bitkideki bakla sayısı, bakladaki tohum sayısı, bitkideki tohum sayısı ve verim ile ilişkili, LG3’de bulunan BSn44_2 markırını çiçeklenme zamanı, olgunlaşma süresi, 100 dane ağırlığı, ortalama bakla uzunluğu, bakladaki tohum sayısı, bitkideki tohum sayısı ve verim ile ilişkili bulmuşlardır. Hou et al. (2011), soya fasulyesinde yaptıkları çalışmada benzer şekilde bazı markırların birden fazla agronomik özellik ile ilişkili bulunduğunu bildirmişlerdir. Örneğin *satt001* markırını sukroz içeriği, 100 dane ağırlığı ve 100 bakla ağırlığı ile ilişkili, *satt588* markırını serbest aminoasit içeriği, 100 dane ağırlığı ve 100 bakla ağırlığı ile ilişkili bulmuşlardır. Bir markırın birden çok agronomik karakter ile ilişkili olmasının nedeni bu karakterleri kontrol eden genlerin pleiotropik etkisinden kaynaklanmış olabilir (Tommasini et al., 2007; Xu et al., 2013).

Bu çalışmada, Bmd1 ve Bmd45 markırları sırasıyla liflilik ve tohum taslağı sayısı ile ilişkili bulunmuştur. Leite et al. (2011), fasulyede BMD1 ve BMD45 markırlarını tane verimi ile ilişkili bulmuşlardır. Yaptığımız bu çalışmada BM160, BM170, BM183 ve BM210 SSR markırları ile bitki tipi ve bitki büyüme şekli özellikleri arasında korelasyon belirlenmiştir. Bu markırlar Galeano et al. (2012) tarafından LG6 ve LG7’de haritalanmıştır. Galeano et al. (2012), BM160 markırı ve olgunlaşma süresi, % boş bakla, bitkideki bakla sayısı, bakladaki tohum sayısı ve bitkideki tohum sayısı arasında yüksek korelasyon olduğunu bildirmişler ve BM183 markırını, % boş bakla ve bitkideki tohum sayısı ile ilişkili bulmuşlardır. Teixeira et al. (2005) ise, BM210 markırını (LG7) yaprak lekesi hastalığı ile ilişkili QTL olarak belirlemişlerdir.

Bu çalışmada fenotipik özellikler ile ilişkili bulunan ancak daha önce haritalanmamış bazı SSR, SNP markırları da saptanmıştır. Ayrıca ilişkili bulunan fenotipik karakterlerle arasında ilişki saptanan AFLP markırlarının hepsi günümüze kadar herhangi bir çalışmada haritalanmamış ve ilişkili olarak saptanmamıştır. Bu nedenle bu markırlar daha önce haritalanmadığı ve ilişki haritalama çalışmamızda istatistiki olarak önemli saptandığı için; fasulye bitki ıslahında markıra dayalı seleksiyonda kullanılmak amacıyla yeni DNA markırları olarak kullanılabilir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Genetik çeşitlilik ve genotipler ile ilgili genetik parametrelerin belirlenmesi çalışmaları, moleküler ıslah çalışmaları için çok önemlidir. Çünkü bitki ıslahının temel amacı genetik çeşitliliğin belirlenmesi ve belirlenen bu ebeveynleri melezleyerek melez popülasyonda mümkün olduğunca rekombinat bireylerin elde edilmesidir. DNA markırlarını kullanarak erken generasyonlarda isabetli seçimler yapılabilir ve istenilen karakterler tek bireyde kombine edilmeye çalışılabilir. Bu çalışmada DNA markırları kullanılarak fasulye genotipleri arasında genetik çeşitlilik başarılı bir şekilde belirlenmiştir. Ayrıca çalışmada SNP markırlarının ayırım gücünün SSR ve AFLP markırlarına göre daha yüksek olduğu saptanmıştır. SNP ve SSR markırlarının ko-dominant olmaları nedeniyle ıslah programlarında doğrudan kullanılabileceği sonucuna varılmıştır. AFLP markırlarının dominant karakterde bir markır olması, kromozomun sentromer bölgelerinde daha çok yoğunluk kazanması gibi dezavantajları bulunmaktadır. Bu nedenle saptanan bu AFLP markırlarının öncelikle ko-dominant markıra dönüştürülmesi gerekmektedir.

STRUCTURE programında yapılan analize göre Türkiye kökenli genotipler temel olarak iki ana gruba ayrılmıştır. Muhtemelen bu grupların fasulyenin gen merkezi olan Mezoamerikan ve Andean gen havuzlarına ait bireyleri temsil ettiği düşünülmektedir. Ayrıca yabancı lokasyonlu genotiplerin kendi arasında daha fazla çeşitlilik gösterdiği belirlenmiştir. Böylece oluşan grup sayısının fazla olması orijinal fasulye genotiplerinin melezlenmesi sonucu genetik varyasyonun daraldığını göstermektedir.

Bugüne kadar yapılan klasik haritalama çalışmalarında en büyük dezavantaj analizin çok sayıda markır gerektirmesidir (Agrama et al., 2007). LD analizine göre bu çalışmada kullanılan çoğu markır önemli bulunmuştur. Bu markırlar doğrultusunda yapılacak olan haritalama sonuçlarının güvenilir olacağını göstermektedir. Çok sayıda markıra gerek kalmadan yapılan ilişki haritalama çalışması ile klasik haritalama çalışmalarında ortaya çıkan bu dezavantajın üstesinden gelinebilmiştir.

İlişki haritaları; fenotipik özelliği etkileyen lokus ile markır arasında LD analizine dayanmaktadır. İlişki haritalar ile diğer klasik bağlantı haritaları arasındaki en önemli fark; QTL belirlemede rekombinasyon analizlerinin miktarıdır. Çalışmada ilişki haritalama metodu sayesinde kısa sürede farklı

fenotipik özellikler ile ilişkili çok sayıda markır belirlenmiştir. Beş fenotipik özellik 62 markır ile ilişkili bulunmuştur. Bu nedenle ilişki haritaları markır yardımcı seleksiyon ve fenotip-markır arasındaki ilişkilerin belirlenmesinde bağlantı haritalarına güçlü bir alternatif olabilir.

Bu çalışma, moleküler markırlar kullanılarak yapılacak olan gelecekteki haritalama çalışmalarına ve istatistiksel yaklaşımlarının anlaşılmasına değerli bilgiler sunabilir. Melez populasyonlar kullanarak yapılan geleneksel QTL haritaların aksine ilişki haritalarda daha fazla çeşitliliğe sahip doğal populasyonlar kullanarak kalıcı QTL'lerin belirlendiğini göstermektedir. Bu markırlar markıra dayalı seleksiyonda, genom haritasına dayalı gen klonlanmasında, izole edilen genlerin gen fonksiyonlarının araştırılmasında kullanılabilir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abdurakhmonov, I.Y. and Abdukarimov, A.,** 2008, Application of Association Mapping to Understanding the Genetic Diversity of Plant Germplasm Resources, Hindawi Publishing Corporation International Journal of Plant Genomics, doi:10.1155/2008/574927.
- Abdurakhmonov, I.Y., Kohel, R.J., Yu, J.Z., Pepper, A.E., Abdullaev, A.A., Kushanov, F.N., Salakhutdinov, I.B., Buriev, Z.T., Saha, S., Scheffler, B.E., Jenkins, J.N. and Abdukarimov, A.,** 2008, Molecular diversity and association mapping of fiber quality traits in exotic *G. hirsutum* L. Germplasm. Genomics, 92, 478–487.
- Agrama, H.A., Eizenga, G.C., and Yan, W.,** 2007, Association mapping of yield and its components in rice cultivars, Molecular Breeding, 19:341-356.
- Alzate–Marin, A., Costa M., Sartorato, A., Peloso, J., Borro, E. and Moreira, M.,** 2003, Genetic variability and pedigree analysis of Brazilian common bean elite genotypes, Scientia Agricola, 60 (2): 283 – 290.
- Anderson, J.A., Churchill, G.A., Autrique, J.E., Tanksley S.D. and Sorrells, M.E.,** 1993, Optimizing parental selection for genetic linkage maps, Genome, 36: 181–186.
- Aranzana, M.J., Kim, S., Zhao, K., Bakker, E., Horton, M., Jakob, K., Lister, C., Molitor, J., Shindo, C. and Tang, C., et al.,** 2005, Genome-wide association mapping in arabidopsis identifies previously known flowering time and pathogen resistance genes. PLoS Genet., 1:e60.
- Bar-Hen, A. and Charcosset, A.,** 1995, Relationship between molecular and morphological distances in a maize inbred lines collection-application for breeders' rights protection, In: van Ooijen, J. W. and Jansen, J. (eds) Biometrics in Plant Breeding: Applications of Molecular Markers, pp. 57–66. Proceedings of the Ninth Meeting of the EUCARPIA Section Biometrics in Plant Breeding, Wageningen.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Becerra Velasquez, L. and Gepts, P.,** 1994, RFLP diversity of common bean (*Phaseolus vulgaris*) in its centres of origin, *Genome*, 37, 256–263.
- Becerra, V.V., Paredes, M.C. and Debouck, D.,** 2010, Genetic Relationships Of Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Race Chile With Wild Andean And Mesoamerican Germplasm, *Chilean Journal of Agricultural Research*, 71(1):3-15.
- Beebe, S., Skroch, P.W., Tohme, J., Duque, M.C., Pedraza, F. and Nienhuis, J.,** 2000, STRUCTURE of genetic diversity among common bean landraces of middle American origin based on correspondence analysis of RAPD, *Crop Sci.*, 40:264–273.
- Beebe, S., Rengifo, J., Gaitan, E., Duque, M.C. and Tohme, J.,** 2001, Diversity and origin of Andean landraces of common bean. *Crop Sci.*, 41:854–862.
- Beer, S.C., Siripoonwiwat, W., O'donoghue, L.S., Souza, E., Matthews, D. and Sorrels, M.E.,** 1997, Associations between molecular markers and quantitative traits in an oat germplasm pool: can we infer linkages?, *Journal of Agricultural Genomics*, vol. 3, paper 197.
- Benchimol, L.L., Campos, T., Carbonell, S.A.M., Colombo, C.A., Chioratto, A.F., Formighieri, E.F. and Souza, A.P.,** 2007, STRUCTURE of genetic diversity among common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties of Mesoamerican and Andean origins using new developed microsatellite markers, *Genet Resour Crop Evol*, 54:1747-1762.
- Bernatzky, R. and Tanksley, S.D.,** 1989, Restriction fragments as molecular markers for germplasm analysis and utilization in: Brown A.D.H., Marshall, D.R., Frankel, O.H. Williams J.T (eds), *The Use of Plant Genetic Resources*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 353-362.
- Blair, M.W., Pedraza, F., Buendia, H.F., Gaitán-Solís, E. and Beebe, S.E., et al.,** 2003, Development of a genome-wide anchored microsatellite map for common bean (*Phaseolus vulgaris* L), *Theor Appl Genet*, 107, 1362–1374.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Blair, M.W., Giraldo, M.C., Buendía, H.F., Tovar, E., Duque, M.C. and Beebe, S.E.,** 2006, Microsatellite marker diversity in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.), *Theor Appl Genet*, 113:100- 109.
- Blair, M.W., Diaz, J.M., Hidalgo, R., Diaz, L.M. and Duque, M.C.,** 2007, Microsatellite characterization of Andean races of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.), *Theor. Appl. Genet.*, 116:29–43.
- Blair, M.W., Soler, A. and Cortés, A.J.,** 2012, Diversification and Population STRUCTURE in Common Beans (*Phaseolus vulgaris* L.), *PLoS ONE*, 7(11): e49488. doi:10.1371/journal.pone.0049488.
- Blair, M.W., Cortés, A.J., Penmetza, R.V., Farmer, A., Carrasquilla-Garcia, N. and Cook, D.R.,** 2013, A high-throughput SNP marker system for parental polymorphism screening, and diversity analysis in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.), *Theor Appl Genet*, 126:535–548 DOI 10.1007/s00122-012-1999-z.
- Bradbury, P.J., Zhang, Z., Kroon, D.E., Casstevens, T.M., Ramdoss, Y. and Buckler, E.S.,** 2007, TASSEL: software for association mapping of complex traits in diverse samples, *Genetics and population analysis*, 23 (19), pages 2633–2635, doi:10.1093/bioinformatics/btm308.
- Breseghele, F. and Sorrells, M.E.,** 2006, Association mapping of kernel size and milling quality in wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars, *Genetics*, 172:1165–1177.
- Burle, M.L., Fonseca, J.R., Kami, J.A. and Gepts, P.,** 2010, Microsatellite diversity and genetic STRUCTURE among common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) landraces in Brazil, a secondary center of diversity, *Theor. Appl. Genet.*, 121: 801–813.
- Buso, G.S.C., Amaral, Z.P.S., Brondani, R.P.V. and Ferreira, M.E.,** 2006, Microsatellite markers for the common bean *Phaseolus vulgaris*, *Molecular Ecology Notes*, 6:252-254.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Cabral, P.D.S., Soares, T.C.B., Lima, A.B.P., de Miranda, F.D., Souza, F.B. and Gonçalves, L.S.A.,** 2011, Genetic diversity in local and commercial dry bean (*Phaseolus vulgaris*) accessions based on microsatellite markers, Genetics and Molecular Research, 10 (1): 140-149.
- Chagne', D., Batley, J., Edwards, D. and Forster, J.W.,** 2007, Single nucleotide polymorphism genotyping in plants. In: Oraguzie NC, Rikkerink EHA, Gardiner SE, Silva HNd (eds) Association mapping in plants, pp 77–9
- Chavarro, M.C. and Blair, M.W.,** 2010, QTL Analysis and Effect of the fin Locus on Tropical Adaptation in an Inter-Gene Pool Common Bean Population. Tropical Plant Biol., (2010) 3:204–218. doi 10.1007/s12042-010-9058-x.
- Chen, X., Min, D., Yasir, T.A. and Hu, Y-G.,** 2012, Genetic Diversity, Population STRUCTURE and Linkage Disequilibrium in Elite Chinese Winter Wheat Investigated with SSR Markers, PLoS ONE, 7(9): e44510. doi:10.1371/journal.pone.0044510.
- Chin, E.C.L., Senior, M.L. and Shu, H.,** 1996, Maize simple repetitive DNA sequences: Abundance and allele variation, Genome, 39:866-873.
- Ching, A., Cladwell, Ks., Jung, M., Dolan, M., Smith, Os., Tingey, S., Morgante, M. and Rafalski, Aj.,** 2002, SNP frequency, haplotype STRUCTURE and linkage disequilibrium in elite maize inbred lines, BMC Genet, 3:19-33.
- Cho, G-T., Lee, J., Moon, J-K., Yoon, M-S., Baek, H-J., Kang, J-H., Kim, T-S. and Paek, N-C.,** 2008, Genetic Diversity and Population STRUCTURE of Korean Soybean Landrace [*Glycine max* (L.) Merr.], J. Crop Sci. Biotech., 11 (2) : 83 ~ 90.
- CIAT,** 1984, Morfología de la planta de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). Guía de estudio. Cali, Colombia: Spanish. Centro Internacional de Agricultura Tropical.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Cockram, J., White, J., Leigh, F.J., Lea, V.J., Chiapparino, E., Laurie, D.A., Mackay, I.J., Powell, W. and O'Sullivan, D.M.,** 2008, Association mapping of partitioning loci in barley, *BMC Genetics*, 9:16 doi:10.1186/1471-2156-9-16.
- Cockram, J., White, J., Zuluaga, D.L., Smith, D., Comadran, J., Macaulay, M., Luo, Z., Kearsy, M.J., Werner, P. and Harrap, D., et al,** 2010, Genome-wide association mapping to candidate polymorphism resolution in the unsequenced barley genome PNAS, doi:10.1073/pnas.1010179107.
- Cortés, A.J., Chavarro, M.C. and Blair, M.W.,** 2011, SNP marker diversity in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.), *Theor Appl Genet*, 123(5):827–845.
- Dawson, D.A., Akesson, M., Burke, T., Pemberton, J.M., Slate, J. and Hansson, B.,** 2007, Gene order and recombination rate in homologous chromosome regions of the chicken and a passerine bird, *Molecular Biology and Evolution*, 24(7):1537-1552.
- Debouck, D.G.,** 1986, Primary diversification of *Phaseolus* in the Americas: three centres?, *Plant Genetetic Resources, Newsl. (FAO/IBPGR)* 67, p. 2–8.
- Debouck, D.G., Toro, O., Paredes, O.M., Johnson, W.C. and Gepts, P.,** 1993, Genetic diversity and ecological distribution of *Phaseolus vulgaris* (Fabaceae) in northwestern South America, *Economic Botany* 47: 408-423.
- Denduangboripant, J., Piteekan, T. and Nantharat, M.,** 2010, Genetic Polymorphism Between Tobacco Cultivar-groups Revealed by Amplified Fragment Length Polymorphism Analysis, ISSN: 1916-9752 *Journal of Agricultural Science* E-ISSN: 1916-9760, June 2010,8p.
- Durán, L.A., Blair, M.W., Giraldo, M.C. and Macchiavelli, R., et al.,** 2005, Morphological and molecular characterization of common bean landraces and cultivars from the Caribbean, *Crop Sci.* 45: 1320-1328.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ender, M., Terpstra, K. and Kelly, J.D.,** 2008, Marker assisted selection for white mold resistance in common bean, *Mol Breed*, 2:149-157.
- Evanno, G., Regnaut, S. and Goudet, J.,** 2005, Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study, *Mol. Ecol*, 14, 2611—2620.
- Freyre, R., Skroch, P., Geffroy, V., Adam-Blondon, A-F. and Shirmohamadali, A., et al.,** 1998, Towards an integrated linkage map of common bean. 4. Development of a core map and alignment of RFLP maps, *Theor Appl Genet*, 97:847–856.
- Gaitan-Solis, E., Duque, M.C., Edwards, K.J. and Tohme, J.,** 2002, Microsatellite repeats in common bean (*Phaseolus vulgaris*): isolation, characterization, and cross-species amplification in *Phaseolus* ssp, *Crop Science*, 42: 2128–2136.
- Gaitan-Solis, E., Choi, I.Y., Quigley, C., Cregan, P. and Tohme, J.,** 2008, Single nucleotide polymorphisms in common bean: their discovery and genotyping using a multiplex detection system, *Plant Genome*, 1:125–134.
- Galeano, C.H., Gomez, M., Rodriguez, L.M. and Blair, M.W.,** 2009a, CEL I Nuclease Digestion for SNP Discovery and Marker Development in Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.), *Crop Sci*, 49:1–14 doi: 10.2135/cropsci 2008.07.0413.
- Galeano, C.H., Fernández, A.C., Gómez, M. and Blair, M.W.,** 2009b, Single strand conformation polymorphism based SNP and Indel markers for genetic mapping and syntenic analysis of common bean, (*Phaseolus vulgaris* L.), *BMC Genomics*, 10:629.
- Galeano, C.H., Cortés, A.J., Fernández, A.C., Soler, Á., Franco-Herrera, N., Makunde, G., Vanderleyden, J. and Blair, M.W.,** 2012, Gene-Based Single Nucleotide Polymorphism Markers for Genetic and Association Mapping in Common Bean, *BMC Genetics*, 13:48.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Gao, L.Z.**, 2003, The conservation of Chinese rice biodiversity: genetic erosion, ethnobotany and prospects, *Genetic Resources and Crop Evolution*, 50: 17–32.
- Garcia, E.H., Pena-Valdivia, C.B., Aguirre, J.R.R. and Muruaga, J.S.M.**, 1997, Morphological and Agronomic Traits of a Wild Population and an Improved Cultivar of Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.), *Annals of Botany*, 79: 207±213.
- Garcia, A.A.F., Benchimol, L.L., Barbosa, A.M.M., Geraldi, I.O., Júnior, C.L.S. and Souza, A.P.**, 2004, Comparison of RAPD, RFLP, AFLP and SSR markers for diversity studies in tropical maize inbred lines, *Genet Mol Biol*, 27:579-588.
- Garris, A., McCouch, S. and Kresovich, S.**, 2003, Population STRUCTURE and its effect on haplotype diversity and linkage disequilibrium surrounding the xa5 locus of rice (*Oryza sativa* L.), *Genetics*, 165: 759–769.
- Geleta, L.F., Labuschagne, M.T. and Viljoen, C.D.**, 2005, Genetic variability in pepper (*Capsicum annuum* L.) estimated by morphological data and amplified fragment length polymorphism markers, *Biodivers Conserv*, 14:2361-2375.
- Gepts, P., Osborn, T.C., Rashka, K. and Bliss, F.A.**, 1986, Phaseolin-protein variability in wild forms and landraces of the common bean (*Phaseolus vulgaris*)-evidence for multiple centers of domestication, *Economic Botany*, 40:451-468.
- Gepts, P.**, 2001, Origins of plant agriculture and major crop plants, In: *Our Fragile World, forerunner volumes to the Encyclopedia of Life-Supporting Systems*, MK Tolba (ed.), EOLSS Publishers, Oxford, UK. Vol. 1, pp. 629-637.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Gepts, P., Aragão, F., de Barros, E., Blair, M.W., Brondani, R., Broughton, W., Galasso, I., Hernández, G., Kami, J. and Lariguet, P., *et.al*, 2008,** Genomics of *Phaseolus* beans, a major source of dietary protein and micronutrients in the tropics. In: Moore P and Ming R (eds), Genomics of Tropical Crop Plants, Springer, Heidelberg, pp 113-143.
- Gonzalez-Martinez, S.C., Ersoz, E., Brown, G.R., Wheeler, N.C. and Neale, D.B., 2006,** DNA sequence variation and selection of Tag singlenucleotide polymorphisms at candidate genes for drought-stress response in *Pinus taeda* L., Genetics, 172:1915–1926.
- Grisi, M.C.M., Blair, M.W., Gepts, P., Brondani, C., Pereira, P.A.A. and Brondadi, R.P.V., 2007,** Genetic mapping of a new set of microsatellite markers in a reference common bean (*Phaseolus vulgaris*) population BAT93 x Jalo EEP558, Genet Mol Res, 3:691-706.
- Gupta, P.K., Rustgi, S. and Kulwal, P.L., 2005,** Linkage disequilibrium and association studies in higher plants: present status and future prospects, Plant Molec. Biol., 57: 461–485.
- Hanai, L.R., Santini, L., Aranha, L.E.C., Pelegrinelli, M.H.F., Gepts, P., Tsai, S.M. and Carneiro, M.L., 2010,** Extension of the core map of common bean with EST-SSR, RGA, AFLP, and putative functional markers, Mol Breeding, 25:25–45.
- Hegay, S., Geleta, M., Bryngelsson, T., Gustavsson, L., Hovmalm, H.P. and Ortiz, R., 2012,** Comparing genetic diversity and population STRUCTURE of common beans grown in Kyrgyzstan using microsatellites, Scientific Journal of Crop Science, 1(4), 63–75.
- Hidalgo, R., 1991,** CIAT's World *Phaseolus* Collection. In: “Common beans: research for crop improvement”, van Schoonhoven, A. and Voysest, O. (eds.), Common wealth Agricultural Bureaux International, Wallingford, United Kingdom, pp. 163–197.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Holland, J.B.**, 2007, Genetic architecture of complex traits in plants, *Curr. Opin. Plant Biol.*, 10:156–161.
- Hou, J., Wang, C ., Hong, X., Zhao, J., Xue, C., Guo, N., Gai, J. and Xing, H.**, 2011, Association analysis of vegetable soybean quality traits with SSR markers, *Plant Breeding* 130, 444–449, doi:10.1111/j.1439-0523.2011.01852.x.
- Huang, X., Wei, X., Sang, T., Zhao, Q., Feng, Q., Zhao, Y., Li, C., Zhu, C., Lu, T. and Zhang, Z., et al**, 2010, Genome-wide association studies of 14 agronomic traits in rice landraces, *Nature Genetics* , 42(11):961–967.
- Hyten, D.L., Hartman, G.L., Nelson, R.L., Frederick, R.D., Concibido, V.C., Narvel, J.M. and Cregan, P.B.**, 2007, Map location of the *Rpp1* locus that confers resistance to soybean rust in soybean, *Crop Sci*, 47:837–838.
- Hyten, D.L., Song, Q., Fickus, E.W., Quigley, C.V., Lim, J-S., Choi, I-Y., Hwang, E-Y., Pastor-Corrales, M. and Cregan, P.B.**, 2010, High throughput SNP discovery and assay development in common bean, *BMC Genomics*, 11:475.
- Inostroza, L., del Pozo, A., Matus, I., Castillo, D., Hayes, P., Machado, S. and Corey, A.**, 2007, Association mapping of plant height, yield, and yield stability in recombinant chromosome substitution lines (RCSLs) using *Hordeum vulgare* subsp. *spontaneum* as a source of donor alleles in a *Hordeum vulgare* subsp. *vulgare* background, *Mol. Breeding*, doi 10.1007/s11032–008–9239–6.
- Ionescu, A. and Ionescu, C.**, 1995, Use of biotechnologies in breeding of French bean. *Anale Institutul de Cercetari Pentru Legumicultura si Floricultura*, Vidra 13, 23–30.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Jaiswal, V., Mir, R.R., Mohan, A., Balyan, H.S. and Gupta, P.K.,** 2012, Association mapping for pre-harvest sprouting tolerance in common wheat (*Triticum aestivum* L.), *Euphytica*, 188:89–102, doi 10.1007/s10681-012-0713-1.
- Jones, E., Chu, W-C., Ayele, M., Ho, J., Bruggeman, E., Yourstone, K., Rafalski, A., Smith, O., McMullen, M., Bezawada, C., Warren, J., Babayev, J., Basu, S. and Smith, S.,** 2009, Development of single nucleotide polymorphism (SNP) markers for use in commercial maize (*Zea mays* L.) germplasm, *Molecular Breeding*, 24(2):165–176.
- Jun, T.H., Van, K., Kim, M.Y., Lee, S. and Walker, D.R.,** 2008, Association analysis using SSR markers to find QTL for seed protein content in soybean, *Euphytica*, 162:179–191.
- Kardolus, J.P., Van Eck, H.J. and Van den Berg, R.G.,** 1998, The potential of AFLPs in biosystematics: A first application in *Solanum* taxonomy (*Solanaceae*), *Plant Systematics and Evolution*, 210: 87–103.
- Kelly, J.D. and Miklas, J.R.,** 1998, The role of RAPD markers in breeding for disease resistance in common bean, *Mol. Breed.*, 4:1–11.
- Khairallah, M.M., Sears, B.B. and Adams, M.W.,** 1992, Mitochondrial restriction fragment length polymorphism in wild *Phaseolus vulgaris* L.: Insights on the domestication of the common bean, *Theor. Appl. Gen.*, 84, 915–922.
- Kraakman, A.T.W., Martinez, F., Mussiraliyev, B., Eeuwijk, F.A.V. and Niks, R.E.,** 2006, Linkage disequilibrium mapping of morphological, resistance, and other agronomically relevant traits in modern spring barley cultivars, *Mol. Breed.*, 17:41–58.
- Kruglyak, L.,** 1999, Prospects for whole-genome linkage disequilibrium mapping of common disease genes, *Nat. Genet.*, 22:139–144.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kumar, V., Sharma, S., Kero, S., Sharma, S., Sharma, K., Kumar M. and Bhat, K.V.,** 2008, Assessment of genetic diversity in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Germplasm using amplified fragment length polymorphism (AFLP), *Scientia Hort.*, 116:138–143.
- Kump, K.L., Bradbury, P.J., Wisser, R.J., Buckler, E.S., Belcher, A.R., Oropeza-Rosas, M.A. and Zwonitzer, J.C., et al.,** 2011, Genome-wide association study of quantitative resistance to southern leaf blight in the maize nested association mapping population, *Nat Genet.*, 43:163–8.
- Kwak, M., Velasco, D. and Gepts, P.,** 2008, Mapping Homologous Sequences for Determinacy and Photoperiod Sensitivity in Common Bean (*Phaseolus vulgaris*), *Journal of Heredity*, 2008:99(3):283–291.
- Kwak, M. and Gepts, P.,** 2009, STRUCTURE of genetic diversity in the two major gene pools of common bean (*Phaseolus vulgaris* L., Fabaceae), *Theor. Appl. Genet.*, 118: 979–992.
- Leite, M.E., dos Santos, J.B., Carneiro, F.F. and Couto, K.R.,** 2011, Natural selection in common bean microsatellite alleles and identification of QTLs for grain yield, *Electronic Journal of Biotechnology* ISSN: 0717-3458 DOI: 10.2225/vol14-issue1-fulltext–7.
- Li, A. and Ge, S.,** 2001, Genetic Variation and Clonal Diversity of *Psammochloa villosa* (Poaceae) Detected by ISSR Markers, *Annals of Botany*, 87: 585±590, doi:10.1006/anbo.2001.1390.
- Li, Y., Huang, Y., Bergelson, J., Nordborg, M. and Borevitz, J.O.,** 2010, Association mapping of local climate-sensitive quantitative trait loci in *Arabidopsis thaliana*, *Proc Natl Acad Sci, USA*, 107: 21199–21204.
- Li, X., Wei, Y., Moore, K.J., Michaud, R., Viands, D.R., Hansen, J.L., Acharya, A. and Brummer, E.C.,** 2011, Association Mapping of Biomass Yield and Stem Composition in a Tetraploid Alfalfa Breeding Population, *The Plant Genome*, 4:24–35., doi: 10.3835/plantgenome2010.09.0022.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Litt, M. and Luty, J.A.**, 1989, A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene, *Am. J. Hum. Genet.*, 44, 397–401.
- Maciel, F.L., Echeverrigaray, S., Gerald, L.T.S. and Graziotin, F.G.**, 2003, Genetic relationships and diversity among Brazilian cultivars and landraces of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) revealed by AFLP markers, *Genetic Resources and Crop Evolution*, 50: 887–893.
- Malosetti, M., Linden, van der C.G., Vosman, B. and van Eeuwijk, F.A.**, 2007, A mixed-model approach to association mapping using pedigree information with an illustration of resistance to *phytophthora infestans* in potato, *Genetics*, 175:879–889.
- Malyshev, S.H. and Kartel, N.A.**, 1997, Molecular markers in mapping plant genomes, *Molecular Biology*, 31(2):163–171.
- Mandel, J.R., Nambeesan, S., Bowers, J.E., Marek, L.F., Ebert, D., Rieseberg, L.H., Knapp, S.J. and Burke, J.M.**, 2013, Association Mapping and the Genomic Consequences of Selection in Sunflower. *PLoS Genet.*, 9(3): e1003378. doi:10.1371/journal.pgen.1003378.
- Maras, M., Susnik, S., Sustar-Vozlic, J. and Meglic, V.**, 2006, Temporal changes in genetic diversity of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) accessions cultivated between 1800 and 2000, *Russian J Genet.*, 42:775-782.
- Maras, M., Sustar-Vozlic, J., Javornik, B. and Meglic, V.**, 2008, The efficiency of AFLP and SSR markers in genetic diversity estimation and gene pool classification of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.), *Acta Agric Slov*, 91:87–96.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Marotti, I., Bonetti, A., Minelli, M., Catizone, P. and Dinelli, G., 2007,** Characterization of some Italian common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) landraces by RAPD, semi-random and ISSR molecular markers, Genet. Resour. Crop. Evol., 54:175–188.
- Martos, V., Royo, C., Rharrabti, Y. and Garcia del Moral, L.F., 2005,** Using AFLPs to determine phylogenetic relationships and genetic erosion in durum wheat cultivars released in Italy and Spain throughout the 20th century, Field Crops Research, 91, 107–116.
- Masi, P., Logozzo, G., Donini, P. and Spagnoletti, Z.P., 2009,** Analysis of genetic STRUCTURE in widely distributed common bean landraces with different plant growth habits using SSR and AFLP markers, Crop. Sci., 49:187–199.
- McConnell, M., Mamidi, S., Lee, R., Chikara, S., Rossi, M., Papa, R. and McClean, P., 2010,** Syntenic relationships among legumes revealed using a gene-based genetic linkage map of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.), Theor. Appl. Genet., 121:1103–1116.
- McCouch, S.R., Temnykh, S., Lukashova, A., Coburn, J., Declerck, G., Cartinhour, S., Harrington, S., Thomson, M., Septiningsi, E. and Semon, M., et. al, 2001,** Microsatellite markers in rice: Abundance, diversity and applications. In: Khush GS, Brar DS and Hardy B (eds), Rice Genetics, IV. IRRI, Manila, pp. 117–135.
- Metais, I., Aubry, C., Hamon, B., Jalouzot, R. and Peltier, D., 2000,** Description and analysis of genetic diversity between commercial bean lines (*Phaseolus vulgaris* L.), Theor. Appl. Genet., 101:1207–1214.
- Metais, I., Hamon, B., Jalouzot, R. and Peltier, D., 2002,** STRUCTURE and level of genetic diversity in various bean types evidenced with microsatellite markers isolated from a genomic enriched library, Theoretical and Applied Genetics, 104: 1346–1352.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Miklas, P.N., Johnson, W.C., Delorme, R. and Gepts, P.,** 2001, QTL conditioning physiological resistance and avoidance to white mold in dry bean, *Crop Sci.*, 41:309–315.
- Mohammadi, S.A., Prasanna, B.M.,** 2003, Analysis of genetic diversity in crop plants- salient statistical tools and considerations, *Crop Sci.*, 43:1235–1248.
- Myers, J.R. and Baggett, J.R.,** 1999, Improvement of snap beans, In:Singh, S. (ed.), *Common Bean Improvement for the 21st Century*. Kluwer Acad. Publ., Boston. p. 289–329.
- Myles, S., Peiffer, J., Brown, P., Ersoz, E., Zhang, Z., Costich, D. and Buckler, E.,** 2009, Association mapping: critical considerations shift from genotyping to experimental design, *Plant Cell*, Online 21, 2194—2202.
- Nemri, A., Atwell, S., Tarone, A.M., Huang, Y.S., Zhao, K., Studholme, D.J., Nordborg, M. And Jones, J.D.,** 2010, Genome-wide survey of *Arabidopsis* natural variation in downy mildew resistance using combined association and linkage mapping, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 107: 10302–10307.
- Nodari, R.O., Tsai, S.M., Gilbertson, R.L. and Gepts, P.,** 1993, Towards an integrated linkage map of common bean. II. Development of an RFLP-based linkage map, *Theor. Appl. Genet.*, 85:513–520.
- Olsen, K., Halldorsdottir, S., Stinchcombe, J., Weinig, C., Schmitt, J. and Purugganan, M.,** 2004, Linkage disequilibrium mapping of *Arabidopsis* CRY2 flowering time alleles, *Genetics*, 167, 1361—1369.
- Oraguzie, N.C., Rikkerink, E.H.A., Gardiner, S.E. and De Silva, H.N.,** 2007, *Association Mapping in Plants*. Springer, New York, doi:10.1007/978-0-387-36011-9-1.
- Pallottini, L., Garcia, E., Kami, J., Barcaccia, G. and Gepts, P.,** 2004, The genetic anatomy of a patented yellow bean, *Crop Sci.*, 44:968–977.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Pañeda, A., Rodríguez-Suárez, C., Campa, A., Ferreira, J.J. and Giraldez, R.,** 2008, Molecular markers linked to the fin gene controlling determinate growth habit in common bean, *Euphytica*, 162: 241–248.
- Papa, R. and Gepts, P.,** 2003, Asymmetry of gene flow and differential geographical STRUCTURE of molecular diversity in wild and domesticated common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) from Mesoamerica, *Theor. Appl. Genet.*, 106:239–250.
- Park, S.O., Coyne, D.P., Mutlu, N., Jung, G. and Steadman, J.R.,** 1999, Confirmation of molecular markers and flower colour associated with QTL for resistance to common bacterial blight in common beans, *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, 124:519–526.
- Park, S.O., Coyne, D.P., Jung, G., Skroch, P.W., Arnaud-Santana, E., Steadman, J.R., Ariyaratne, H.M. and Nienhuis, J.,** 2000, Mapping of QTL for seed size and shape traits in common bean, *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, 125:466–475.
- Park, S.O., Coyne, D.P., Steadman, J.R. and Skroch, P.W.,** 2001, Mapping of QTL resistance for white mold disease in common bean, *Crop Sci.*, 41:1253–1262.
- Payró de la Cruz, E., Gepts, P., Colunga-GarcíaMarín, P. and Zizumbo-Villareal, D.,** 2005, Spatial distribution of genetic diversity in wild populations of *Phaseolus vulgaris* L. from Guanajuato and Michoacán, Mexico, *Genet. Resour. Crop. Evol.*, 52:589–599.
- Penner, G.A., Bush, A., Wise, R., Kim, W., Domier, L., Kasha, K., Laroche, A., Scoles, G., Molnar, S.J. and Fedak, G.,** 1993, Reproducibility of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis among laboratories, *PCR Meth. Appl.*, 2, 341–345.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Piergiiovanni, A.R. and Lioi, L.**, 2010 Italian Common Bean Landraces: History, Genetic Diversity and Seed Quality, Diversity, 2,837–862; doi:10.3390/d2060837.
- Poehlman, J.M. and Sleper, D.A.**, 1995, Breeding Field Crops, Iowa State University Press.
- Poland, J.A., Bradbury, P.J., Buckler, E.S. and Nelson, R.J.**, 2011, Genome-wide nested association mapping of quantitative resistance to northern leaf blight in maize, doi:10.1073/pnas.1010894108.
- Posa-Macalincag, M.C.T., Hosfield, G.L., Grafton, K.F., Uebersax, M.A. and Kelly, J.D.**, 2000, Quantitative trait loci (QTL) analysis of canning quality traits in kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.), J. Am. Soc. Hortic. Sci., 127:608–615.
- Powell, W., Morgante, M., Andre, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingey, S. and Rafalski, A.**, 1996, The comparison of RFLP, RAPD, AFLP, and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis, Mol. Breed., 2:225–238.
- Price, A.L., Patterson, N.J., Plenge, R.M., Weinblatt, M.E., Shadick, N.A. and Reich, D.**, 2006, Principal components analysis corrects for stratification in genome-wide association studies, Nat. Genet., 38:904–909.
- Pritchard, J.K., Stephens, M. And Donnelly, P.**, 2000a, Inference of population STRUCTURE using multilocus genotype data, Genetics, 155:945–959.
- Pritchard, J.K., Stephens, M., Rosenberg, N.A. and Donnelly, P.**, 2000b, Association mapping in STRUCTURED population, Am. J. Human Genet., 67: 170–181.
- Pritchard, J.K. and Donnelly, P.**, 2001, Case-control studies of association in STRUCTURED or admixed populations, Theor. Popul. Biol., 60:227–237.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Pritchard, J.K., Wena, X. and Falush, D.,** 2010, Documentation for STRUCTURE software: Version 2.3., Department of Human Genetics, University of Chicago.
- Rafalski, J.A., Vogel, J.M., Morgante, M., Powell, W., Andre, C. and Tingey, S.V.,** 1996, Generating and using DNA markers in plants, In: B. Birren and E. Lai (eds), Nonmammalian genomic analysis, A practical guide, Academic, San Diego, 75–134pp.
- Rafalski, J.A.,** 2002, Novel genetic mapping tools in plants: SNPs and LD-based approaches, Plant Sci., 162:329–333.
- Raman, H., Stodart, B., Ryan, P.R., R.P., Delhaize, E., Emebiri, L., Rosy Raman, R., Coombes, N. and Milgate, A.,** 2010, Genome-wide association analyses of common wheat (*Triticum aestivum* L.) germplasm identifies multiple loci for aluminium resistance, Genome, Vol. 53 No 11, 957–966.
- Ramirez, M., Graham, M.A., Blanco-Lopez, L., Silvente, S., Medrano-Soto, A., Blair, M.W., Hernandez, G., Vance, C.P. and Lara, M.,** 2005, Sequencing and analysis of common bean ESTs. Building a foundation for functional genomics, Plant Physiol., 137:1211– 1227.
- Remington, D.L., Je Vry, M.T., Matsuoka, Y., Wilson, L.M., Whitt, S.R., Doebley, J., Kresovich, S., Goodman, M.M. and Buckler, E.S.,** 2001, STRUCTURE of linkage disequilibrium and phenotypic associations in the maize genome, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 98:1147–11484.
- Ridout, C.R. and Donini, P.,** 1999, Use of AFLP in cereals research, Trends in Plant Science, 4:76–79.
- Rosales-Serna, R., Hernandez-Delgado, S., Gonzalez-Paz, M., Acosta-Gallegos, J.A. and Mayek-Perez, N.,** 2005, Genetic relationships and diversity revealed by AFLP markers in Mexican common bean bred cultivars, Crop Sci., 45:1951–1957.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Rousset, M., Bonnin, I., Remoué, C., Falque, M. And Rhoné, B., et al.,** 2011, Deciphering the genetics of flowering time by an association study on candidate genes in bread wheat (*Triticum aestivum* L.), Theor. Appl. Genet., 123: 907–926.
- Roy, J.K., Bandopadhyay, R., Rustgi, S., Balyan, H.S. and Gupta, P.K.,** 2006, Association analysis of agronomically important traits using SSR, SAMPL and AFLP markers in bread wheat, Current Science, Vol. 90, No. 5.
- Saghai-Marrof, M.A., Soliman, K.M., Jorgensen, R.A. and Allard, R.W.,** 1984, Ribosomal DNA spacer-length polymorphism in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 81, 8014–8018.
- Saitou, N. and Nei, M.,** 1987, The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees, Mol Biol Evol., 4(4):406–25.
- Salisbury, BA., Pungliya, M., Choi, J.Y., Jiang, R., Sun, X.J. and Stephens, J. C.,** 2003, SNP and haplotype variation in the human genome, Mutation Research, 526 53–61.
- Salmaso, M., Faes, G., Segala, C., Stefanini, M., Salakhutdinov, I., Zyprian, E., Toepfer, R., Grando, M.S. and Velasco, R.,** 2004, Genome diversity and gene haplotypes in the grapevine (*Vitis vinifera* L.), as revealed by single nucleotide polymorphisms, Molecular Breeding, 14(4):385–395.
- Sa´nchez-Pe´rez, R., Ruiz, D., Dicenta, F., Egea, J. and Marti´nez-Go´mez, P.,** 2005, Application of simple sequence repeat (SSR) markers in apricot breeding: molecular characterization, protection, and genetic relationships, Scientia Horticulturae, 103305–315.
- Satyavathi, T.C., Bhat, K.V., Bharadwaj, C., Tiwari, S.P. and Chaudhary, V.,** 2006, AFLP based DNA profiling and genetic diversity assessment of Indian soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) varieties, Genet. Resour. Crop Evol., 53, 1069–1079.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Saunders, J.A., Hemeida, A.A. and Mischke, S.,** 2001, USDA DNA fingerprinting programme for identification of *Theobroma cacao* accessions. In: Bekele et al. F (ed) Proceedings of the International Workshop on New Technology in Cocoa Breeding 2000. INGENIC Press, London, pp. 108–144.
- Sax, K.,** 1923, The association of size differences with seed-coat pattern and pigmentation in *Phaseolus vulgaris*, *Genetics*, 8, 552–560.
- Schneider, K., Brothers, M.E. and Kelly, J.D.,** 1997, Marker-assisted selection to improve drought resistance in common bean, *Crop Sci.*, 37:51–60.
- Scott, K.D., Egger, P., Seaton, G., Rossetto, M., Ablett, E.M., Lee, L.S. and Henry, R.J.,** 2000, Analysis of SSRs derived from grape ESTs. *Theor Appl Genet*, 100(5):723–726. doi: 10.1007/s001220051344.
- Shehzad, T., Iwata, H. and Okuno, K.,** 2009, Genome-wide association mapping of quantitative traits in sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) by using multiple models, *Breeding Science*, 59:217–227.
- Shete, S., Tiwari, H. and Elston, R.,** 2000, On estimating the heterozygosity and polymorphism information content value, *Theor Popul Biol.*, 57:265–271. doi: 10.1006/tpbi.2000.1452.
- Shi, C., Navabi, A. and Yu, K.,** 2011, Association mapping of common bacterial blight resistance QTL in Ontario bean breeding populations, *BMC Plant Biology*, 11:52.
- Simko, I., Pechenick, D.A., McHale, L.K., Truco, M.J., Ochoa, O.E., Michelmore, R.W. and Scheffler, B.E.,** 2009, Association mapping and marker-assisted selection of the lettuce dieback resistance gene TvrI, *BMC Plant Biology*, doi:10.1186/1471-2229-9-135.
- Singh, S.P., Gepts, P. and Debouck, D.G.,** 1991a, Races of common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae), *Economic Botany*, 45:379–396.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Singh, S.P., Nodari, R. and Gepts, P.,** 1991b, Genetic diversity in cultivated common bean: 1. Allozymes, *Crop Science*, 31: 19–23.
- Slatkin, M.,** 2008, Linkage disequilibrium - understanding the evolutionary past and mapping the medical future, *Nature Reviews Genetics*, 9(6):477–485.
- Smartt, J.,** 1976, Comparative evolution of pulse crops, *Euphytica*, 25:139–143.
- Smartt, J.,** 1988, Morphological, physiological and biochemical changes in *Phaseolus* beans under domestication. In Gepts P (Ed.), *Genetic resources of Phaseolus beans* (Kluwer, Dordrecht, The Netherlands), pp. 143–161.
- Stich, B., Melchinger, A.E., Frisch, M., Maurer, H.P., Heckenberger, M. and Reif, J.C.,** 2005, Linkage disequilibrium in European elite maize germplasm investigated with SSRs, *Theoretical and Applied Genetics*, 111, pp. 723–730.
- Stich, B., Maurer, H.P. and Melchinger, A.E, et al.,** 2006, Comparison of linkage disequilibrium in elite European maize inbred lines using AFLP and SSR markers, *Molecular Breeding*, 17, 3, pp. 217–226.
- Sturtevant, A.H.,** 1913, The linear arrangement of six sex-linked factors in *Drosophila*, as shown by their mode of association, *J. Exp. Zool.*, 14, 43–59.
- Sunyaev. S., Hanke, J., Aydin, A., Wirkner, U., Zastrow, I., Reich, J. and Bork, P.,** 1999, Prediction of nonsynonymous single nucleotide polymorphisms in human disease-associated genes, *J. Mol. Med.*, 77:754–760.
- Svetleva, D., Pereira, G., Carlier, J., Cabrita, L., Leitão, J. and Genchev, D.,** 2006, Molecular characterization of *Phaseolus vulgaris* L. genotypes included in Bulgarian collection by ISSR and AFLP analyses, *Sci. Hort.*, 109:198–206.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Tar'an, B., Michaels, T.E. and Pauls, K.P.,** 2002, Genetic Mapping of Agronomic Traits in Common Bean, *Crop Sci.*, 42:544–556.
- Teixeira, F.F., dos Santos, J.B., Ramalho, M.A.P., Abreu, Â.F.B., Guimarães, C.T. and de Oliveira, A.C.,** 2005, QTL mapping for angular leaf spot in common bean using microsatellite markers, *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 5:272–278.
- Thornsberry, J., Goodman, M., Doebley, J., Kresovich, S., Nielsen, D. and Buckler, E.,** 2001, Dwarf8 polymorphisms associate with variation in flowering time, *Nat. Genet.*, 28, 286—289.
- Thoquet, P., Gherardi, M., Journet, E.P., Kereszt, A., Ané, J.M., Prosperi, J.M. and Huguet, T.,** 2002, The molecular genetic linkage map of the model legume *Medicago truncatula*: an essential tool for comparative legume genomics and the isolation of agronomically important genes ,*BMC. Plant Biol.*, 2:1.
- Thumma, B.R. and Nolan, M.F.,** 2005, Polymorphisms in cinnamoyl CoA reductase (CCR) are associated with variation in microfi bril angle in *Eucalyptus* spp., *Genetics*, 173:1257–1265.
- Tian, F., Bradbury, P.J., Brown, P.J., Hung, H., Sun, Q., Flint-Garcia, S., Rocheford, T.R., McMullen,M.D., Holland, J.B. and Buckler, E.S.,** 2011, Genome-wide association study of leaf architecture in the maize nested association mapping population, *Nat. Genet.*, 43:159–62.
- Tohme, J., Orlando-Gonzalez, D., Beebe, S. and Duque, M.C.,** 1996, AFLP analysis of gene pools of a wild bean core collection, *Crop Sci.*, 36:1375–1384.
- Tommasini, L., Schnurbusch, T., Fossati, D., Mascher, F. and Keller, B.,** 2007, Association mapping of *Stagonospora nodorum* blotch resistance in modern European winter wheat varieties, *Theor. Appl. Genet.*, 115:697–708

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Vallejos, C.E., Sakiyama, N.S. and Chase, C.D.,** 1992, A molecular marker-based linkage map of *Phaseolus vulgaris* L, *Genetics*, 131:733–740.
- Van Schoonhoven, A. and Pastor-Corrales, M.A.,** 1987, Standard system for the evaluation of bean germplasm, Cali, Colombia, CIAT.
- Van, K., Hwang, E.Y., Kim, M.Y., Park, H.J., Lee, S.H. and Cregan, P.B.,** 2005, Discovery of SNPs in soybean genotypes frequently used as the parents of mapping populations in the United States and Korea, *J. Hered.*, 96(5):529–535.
- Virk, P.S., Ford-Lloyd, B.V., Jackson, M. T., Pooni, H.S., Clemeno, T.P. and Newbury, H.J.,** 1996, Predicting quantitative variation within rice germplasm using molecular markers, *Heredity*, 76, 3, pp. 296–304.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. and Zabeau, M.,** 1995, AFLP: A new technique for DNA fingerprinting, *Nucleic Acids Res.*, 23:4407–4414.
- Voysest, O., Valencia M.C. and Amezquita, M.C.,** 1994, Genetic diversity among Latin American Andean and Mesoamerican common bean cultivars, *Crop Sci.*, 34: 1100–1110.
- Wang, D.G., Fan, J.B., Siao, C., Berno, A., Young, P., Sapolsky, R., Ghandour, G., Perkins, N. and Winchester, E., et. al.,** 1998, Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome, *Science*, 280:1077–1082.
- Wang, J., McClean, P.E., Lee, R., Goos, R.J. and Helms, T.,** 2008, Association mapping of iron deficiency chlorosis loci in soybean (*Glycine max* L. Merr.) advanced breeding lines, *Theor. Appl. Genet.*, 116: 777–787.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Wei, X.M., Jackson, P.A., McIntyre, C.L., Aitken, K.S. and Croft, B., 2006,** Associations between DNA markers and resistance to diseases in sugarcane and effects of population subSTRUCTURE, *Theor. Appl. Genet.*, 114:155–164.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V., 1990,** DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers, *Nucleic Acids Res.*, 18: 6531–6535.
- Wilson, L.M., Whitt, S.R., Rocheford, T.R., Goodman, M.M. and Buckler, E.S., 2004,** Dissection of maize kernel composition and starch production by candidate gene association. *Plant Cell*, 16:2719–2733.
- Woolley, J., Lépiz, R. I., Portes e Castro, T.A. and Voss, J., 1991,** Bean cropping systems in tropics and subtropics and their determinants, p. 679–706. *In* A, van Schoonhoven and O. Voysest (ed.), *Common beans: Research for crop improvement*. C.A.B. Intl., Wallingford, UK and CIAT, Cali, Colombia.
- Xu, J., Ranc, N., Munõs, S., Rolland, S., Bouchet, J., Desplat, N., Le Paslier, M., Liang, Y., Brunel, D. and Causse, M., 2013,** Phenotypic diversity and association mapping for fruit quality traits in cultivated tomato and related species *Theor. Appl. Genet.*, 126:567–581
- Yan, J.B., Yang, X.H., Hector, S., Sanchez, H., Li, J.S., Warburton, M., Zhou, Y., Crouch, J.H. and Xu, Y.B., 2010,** High-throughput SNP genotyping with the golden gate assay in maize, *Mol. Breed.*, 25:441–451.
- Young, N.D., 1994,** Plant gene mapping, *Encyclopedia of Agricultural Science*, 3:275–82.
- Yu, Z., Stall, R. and Vallejos, C., 1998,** Detection of genes for resistance to common bacterial blight of beans, *Crop Sci.*, 38:1290–1296.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Yu, K., Park, S.J. and Poysa, V.,** 1999, Abundance and variation of microsatellite DNA sequences in beans (*Phaseolus* and *Vigna*), *Genome*, 42:27–34.
- Yu, K., Park, J., Poysa, V. and Gepts, P.,** 2000, Integration of Simple Sequence Repeats (SSR) markers into a molecular linkage map of common bean (*Phaseolus vulgaris*), *J. Hered.*, 91:429–434.
- Zhang, X., Blair, M.W. and Wang, S.,** 2008, Genetic diversity of Chinese common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) landraces assessed with simple sequence repeat markers, *Theor. Appl. Genet.*, 117: 629–640.
- Zhao, J., Paulo, M., Jamar, D., Lou, P., van Eeuwijk, F., Bonnema, G., Vreugdenhil, D. and Koornneef, M.,** 2007, Association mapping of leaf traits, flowering time, and phytate content in *Brassica rapa*, *Genome*, 50: 963–973.
- Zhu, Y.L., Song, Q.J., Hyten, D.L., Van Tassell, C.P., Matukumalli, L.K., Grimm, D.R., Hyatt, S.M., Fickus, E.W., Young, N.D. and Cregan, P.B.,** 2003, Single-nucleotide polymorphisms in soybean, *Genetics*, 163:1123–1134.
- Zhu, C., Gore, Mb. Buckler, E.S. and Yu, J.,** 2008 Status and Prospects of Association Mapping in Plants, *The Plant Genome*, 1:5-20.
- Zou, J., Zhu, J., Huang, S., Tian, E., Xiao, Y., Fu, D., Tu, J-X., Fu, T-D., Meng, J.,** 2010, Broadening the avenue of intersubgenomic heterosis in oilseed *Brassica*, *Theor. Appl. Genet.*, 120:283–290.

ÖZGEÇMİŞ

Seda NEMLİ, 3 Şubat 1982’de Balıkesir’de doğdu. 1993 yılında Balıkesir Ali Şuuri İlkokulu’ndan, 1996 yılında Balıkesir Ortaokulu’ndan, 2000 yılında ise Balıkesir Yabancı Dil Ağırlıklı Lisesi’nden mezun oldu. Aynı yıl Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü’nü kazandı. 2009 yılında Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalı’nda doktora eğitimine başlamıştır.

EKLER

Ek 1.1 DNA İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler

Ek 1.2 Agaroz Jel Elektroforezi'nde Kullanılan Çözeltiler

Ek 1.3 AFLP Markır Analizinde Kullanılan Çözeltilerin İçerikleri

Ek 1.4 Poliakrilamid Jelin İçeriğindeki Maddeler ve Hazırlanışı

EKLER

EK 1.1 DNA İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler

CTAB Buffer:

Bileşen	Miktar
Tris- HCl (pH 7.4)	100 mM
NaCl	1.4 M
EDTA	20 mM
CTAB	% 2
PVP (Polyvinylpyrrolidone)	% 2
Na ₂ S ₂ O ₅	% 0.1

TE Tamponu:

Bileşen	Miktar
Tris- HCl (pH 7.4)	10 mM
EDTA	1 mM

EK 1.2 Agaroz Jel Elektroforezi’nde Kullanılan Çözeltiler

50X TAE (Tris-Asetat-EDTA) Çözeltisi(1 L için):

Bileşen	Miktar
Tris	242 g
Asetik asit (glacial)	57.1 ml
EDTA	37.2 g

1X Yürütme tamponu ise 50X stok TBE çözeltisinin ultra saf su ile 50 kat seyreltilmesi ile hazırlanır.

Brom Fenol Blue Boyası:

Bileşen	Miktar
Gliserol	7 ml
50X TAE	200 µl
SDS (sodyum dodesil sülfat) (% 20)	100 µl
EDTA (0.5 M)	400 µl
Ultra saf su	2.3 ml

Etidyum Bromid Çözeltisi (0.5µg/ml):

Bileşen	Miktar
Etidyum Bromid (10mg/ml)	25 µl
Distile su	500 ml

EK 1.3 AFLP Markır Analizinde Kullanılan Çözeltilerin İçerikleri

EcoRI/MseI Enzim Karışımı (1.25 U/μl):

Bileşen	Miktar
Tris- HCl (pH 7.4)	10 mM
NaCl	50 mM
EDTA	1 mM
DTT (Dikloro difenol trikloroethan)	1 mM
BSA	200 μg/ml
Gliserol	% 50
Triton X- 100	% 0.15

5X Reaksiyon Tamponu:

Bileşen	Miktar
Tris-HCl	50 mM
Mg-Asetat	50 mM
K-Asetat	250 mM

T4 DNA Ligaz (5 U/μl):

Bileşen	Miktar
EDTA	0.1 mM
DDT	1mM
KCl	50 mM
BSA (Bovine Serum Albümin)	200 μg/ml
Gliserol	% 50

Adaptör Karışımı (EcoRI / MseI adaptörleri):

Bileşen	Miktar
ATP	0.4 mM
Tris-HCl (pH= 7.5)	10 mM
Mg-Asetat	10 mM
K-Asetat	50 mM

EK 1.4 Poliakrilamid Jelin İçeriğindeki Maddeler ve Hazırlanışı

5X Stok TBE Çözeltisi (Tris-Borik Asit) (1 L için):

Bileşen	Miktar
Tris	53.9 g
Borik Asit	27.5 g
0.5 M EDTA	20 ml

Yürütme tamponu ise 5X stok TBE çözeltisinin ultra saf su ile 5 kat seyreltilmesi ile hazırlanır.

% 8 Akrilamid Jel İçeriği:

Bileşen	Miktar
Üre	12.6 g
5X TBE	6 ml
% 40 Akrilamid	6 ml
Ultra saf su ile 30 ml'ye tamamlanır.	

% 10 APS (Amonyum Persülfat):

Bileşen	Miktar
APS	0.1 g
Ultra Saf Su	1 ml

Poliakrilamid Jel Hazırlanışı:

4°C'de saklanan % 8 Akrilamid jelden 30 ml olarak alınır. Aşağıda belirtilen hacimlerde 225µl APS ve 22.5 µl TEMED (Tetramethylethylenediamine) aynı anda eklenir. Jel hızlıca dökülür ve polimerizasyonu için beklenir.