T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MISIRDA SSR MOLEKÜLER MARKÖRLER İLE GENETİK ÇEŞİTLİLİĞİN BELİRLENMESİ

Başak ZEYBEKOĞLU

YÜKSEK LİSANS

Tarla Bitkileri Anabilim Dalını

Mart-2012
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

Başak ZEYBEKOĞLU

16/03/2012

ÖZET

YÜKSEK LİSANS

MISIRDA SSR MOLEKÜLER MARKÖRLER İLE GENETİK ÇEŞİTLİLİĞİN BELİRLENMESİ

Başak ZEYBEKOĞLU

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Tarla Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Bayram SADE
2.Danışman: Yrd. Doç. Dr. Mustafa YORGANCILAR

2012, 40 Sayfa

Jüri
Danışmanın Unvanı Adı SOYADI
Diğer Üyenin Unvanı Adı SOYADI
Diğer Üyenin Unvanı Adı SOYADI
Diğer Üyenin Unvanı Adı SOYADI
Diğer Üyenin Unvanı Adı SOYADI

Bu çalışmada, 96 adet atdişi mısır hattının (*Zea mays* L. *indentata* Sturt.) SSR moleküler markörleri ile genetik çeşitliliği belirlenmiştir. Araştırmada 26 tane polimorfik SSR primeri tüm hatlar için uygulanmış olup; bu çalışmada kullanılan hatlar üzerinde phi008, phi083, umc1122 ve umc1630 primerlerinin monomorfik özellik gösterdiği, diğer 22 primerin ise polimorfik olduğu gözlemlenmiştir. Yapılan çalışma sonucunda 70 adet allel üretilmiş olup, lokus başına düşen allel sayısı 2-4 arasında değerler almış ve ortalama her bir SSR lokusu başına 2.69 allel saptanmıştır. Bu araştırmada PIC (Polimorphic information content) değeri 0.04- 0.43 arasında değişmiş olup, ortalama PIC değeri 0,29 olarak bulunmuş, en düşük ve en yüksek PIC değerini veren primerlerin sırasıyla; bnlg249 ve phi015 olduğu tespit edilmiştir. Doksan altı adet atdişi mısır hattının UPGMA analizi ile filogenetik ağacı oluşturulmuştur ve mısır hatlarının 2 grup oluşturduğu gözlemlenmiş olup aynı zamanda hatlar arasındaki genetik uzaklık değerinin 0.56-1.00 katsayıları arasında olduğu ve ortalama değerin 0.78 olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Genetik çeşitlilik, mısır, moleküler markırlar, SSR markırları.

ABSTRACT

MS THESIS

DETERMINATION OF GENETIC DIVERSITY IN MAIZE VIA SSR MOLEKULAR MARKERS

Başak ZEYBEKOĞLU

THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF SELÇUK UNIVERSITY FIELD CROPS DEPARTMENT THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE

Advisor: Prof. Dr. Bayram SADE
2nd Advisor: Assoc. Prof. Dr. Mustafa YORGANCILAR

2012, 40 Pages

Jury
Advisor Danışmanın Unvanı Adı SOYADI
Diğer Üyenin Unvanı Adı SOYADI
Diğer Üyenin Unvanı Adı SOYADI
Diğer Üyenin Unvanı Adı SOYADI
Diğer Üyenin Unvanı Adı SOYADI

In this study, genetic diversity of 96 corn inbred lines (*Zea mays* L. *indentata* Sturt.) were detected with SSR molecular markers. In the research, 26 SSR markers were applied for all inbred lines and phi008, phi083, umc1122 and umc1630 showed monomorfic chracteristic on inbred lines and the other 22 primers were observed as polymorfic. Seventy allel were produced in the result of this study and 2-4 allel per locus were received and 2,69 allel were detected per SSR locus in average. In this research, PIC (Polimorphic information content) value changed between 0.04-0.43 and average PIC value was detected as 0,285, the lowest and highest PIC value showing primers were detected bnlg249 and phi015, respectively. UPGMA analysis and phylogenetic tree were formed and 2 clusters were observed for maize inbred lines and at the same time the genetic distances between the lines were detected as 0.56-1.00 and the average 0.78 coefficient value.

Keywords: Genetic diversity, maize, molekular markers, SSR markers.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın ortaya çıkmasında yoğun iş tempoma rağmen hiçbir emeğini esirgemeden çalışmamın her aşamasında beni sürekli destekleyen ve yardımcı olan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Bayram SADE' ye, araştırmalarım süresince bana yardımcı olan ve değerli bilgilerini esirgemeden destek veren ikinci danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Mustafa YORGANCILAR' a, tez aşamam süresince katkılarından dolayı sayın Prof. Dr. Süleyman SOYLU' ya ve Arş. Gör. Elif YETİM' e, araştırmamın başından sonuna kadar destek veren May-Agro Tohumculuk A.Ş. Yönetim Kuruluna ve Direktörüm Dr. Geoffrey L. THOMAS' a, çalışmamın her aşamasında bana yardımcı olan değerli bilgileriyle eğitimime katkıda bulunan ve hiçbir emeğini esirgemeden destek veren Sayın Uzman Biyolog Hasan Özgür ŞİĞVA' ya, mezun olduğum günden bugüne kadar kişisel gelişimimde hiçbir emeğini ve bilgisini esirgemeden destekleyen ve teşvik eden Müdürüm Sayın Dr. İlker ÖZMEN' e, Adana Bölgesinde çalışmasına rağmen hiçbir konuda yardımını esirgemeyen Sayın Dr. Derya TAŞÇILAR' a, araştırmamın laboratuar ve sera aşamasında yardımcı olan değerli mesai arkadaşlarım Zir. Müh. Gülden HAZARHUN, Zir. Müh. Handan ERDEMİR ve Yasemin TOK' a, değerli meslektaşım ve arkadaşım Sayın Zir. Müh. Nilüfer SARA KIZIL' a, bugüne kadar her daim yanımda olan maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili anne ve babama sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Başak ZEYBEKOĞLU
KONYA-2012

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **iv**

ABSTRACT ..... **v**

TEŞEKKÜR ..... **vi**

İÇİNDEKİLER ..... **vii**

SİMGELER VE KISALTMALAR ..... **viii**

1. GİRİŞ **1**

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI **5**

3. MATERYAL VE YÖNTEM **12**

3.1. Materyal 12
3.2. Yöntem 14
3.2.1. Bitkilerin Yetiştirilmesi 14
3.2.2. DNA Ekstraksiyonu 15
3.2.3. PCR Hazırlık İşlemleri 20
3.2.4. Primerlerin Polimorfizm Oranlarının Belirlenmesi 21
3.2.5. Primerlerin Polimorfizm Bilgi İçeriklerinin (PBİ) Belirlenmesi 21
3.2.6. Primerlerin Ayırma Güçlerinin Belirlenmesi 21
3.2.7. Jel Görüntüleri ve Veri Analizi 21

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA **23**

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER **34**

5.1. Sonuçlar 34
5.2. Öneriler 35

ÖZGEÇMİŞ **40**

SİMGELER VE KISALTMALAR

C: Celcius

CIMMYT: The International Maize and Wheat Improvement Center (Uluslar arası Mısır ve Buğday Geliştirme Merkezi)

dk: dakika

DNA: Deoksiribonükleikasit

g: gram

ha: hektar

kg: kilogram

mg: miligram

ml: mililitre

µl: mikrolitre

mM: milimetre

µM: mikrometre

n: kromozom sayısı

ng: nanogram

PCA: Principle Component Analysis (Temel bileşen analizi)

PIC: Polimorphic information content (Polimorfik bilgi içeriği)

PVP: Plant variety protection (Bitki çeşitlerini koruma)

rpm:dakikadaki devir sayısı

RRS: Resiprok tekrarlanan seleksiyon

SS: Stiff Stalk (mısır bitkisinin ait olduğu heterotik grup)

SSR: Simple Sequense Repeats (Basit dizi tekrarları)

TBE: Tris-Borate-EDTA

UPGMA: Unweighted Pair-Group Method With Arithmetical Averages (Ağirlıksız çift drup metodu ile aritletik ortalamalar)

US: United State (Amerika birleşik devletleri)

UV: mor ötesi

V: volt

yy: yüzyıl

1. GİRİŞ

Mısır; dünyada üzerinde en çok araştırma yapılan bir bitki türü olmasına rağmen hala anlaşılması zor bir türdür. Çok sayıda ülkede yetiştirilen diploid karakterli (2n=20) mısır türünün ataları olan *Zea teosinte*'nin kökeninin 8000 yıl öncesine dayandığı tahmin edilmektedir. Amerika kıtasında asırlar boyunca tarımı yapılan mısır, Avrupalıların 1492'de Amerika'yı keşfi ile tüm dünyaya yayılmaya başlamıştır. Bu tarihten itibaren 100 yıl içinde sırasıyla İtalya, Güney Fransa, Mısır, İspanya, Portekiz, Kuzey Avrupa, Balkan Yarımadası, Tüm Afrika, Hindistan ve Uzakdoğu ülkelerine kadar yayılmasını sürdürmüştür (Özmen, 2008).

Mısırın esas gen merkezlerinin Meksika' nın yüksek vadileri, Guatemala bölgesi ve Peru' nun yüksek kısımları, ikincil gen merkezlerinin de Orta Amerika, Ekvator ve Bolivya olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte, mevcut bilgilere göre mısırın orijin merkezini ve orijin tarzını ifade edebilmek mümkün değildir (Turgut, 2001).

Mısır, dünyada tarımı yapılan tahıllar içerisinde ekim alanında 157,8 milyon ha ile ikinci, üretimde ise 798,6 milyon ton ile ilk sırada yer almaktadır. Dünya mısır üretiminin yaklaşık %40' ı ABD' de, %19' u Çin'de yapılmaktadır. Dünyada mısır ihracatı yapan ülkeler arasında ABD, Arjantin ve Brezilya ilk üç sırada yer alırken; mısır ithalatı yapan ülkeler arasında ise, ilk üç sırayı Japonya, Meksika ve Güney Kore almaktadır. Türkiye' de tanelik mısır ekim alanı 594 bin ha, üretimi 4,31 milyon ton, verimi ise 7.260 kg/ha'dır. Türkiye 451 bin ton mısır ithalatı, 11 bin ton mısır ihracatı yapmaktadır. Son yıllarda yem, nişasta, yağ ve tatlandırıcı sektörü ile biyoyakıt üretiminde kullanımı artan mısırın, üretimi de buna paralel olarak artmıştır (Anonim, 2010).

Tanelik mısır üretimi için başlıca tüketim alanları olarak; yem sanayi, nişasta ve tatlandırıcı sanayi sayılabilir. Ancak özellikle son yıllarda dünya genelinde fosil yakıtların temininde yaşanan sıkıntılar ve artmakta olan enerji ihtiyacı, mısırdan etanol üretimini de gündeme getirmiştir. Başta ABD olmak üzere bazı ülkelerde etanol üretimi ve enerji olarak tüketimi tüm tartışmalara rağmen sürmektedir (Özmen, 2008).

Türkiye' de endüstriyel tarım ürünlerinin en önemlilerinden biri olan mısırın ekonomik önemi gün geçtikçe artmaktadır. Bu gelişmeye paralel olarak mısıra olan talep giderek artmaktadır. Son yıllarda mısır üretiminde görülen artış, talepteki artışı

karşılamaya yetmemekte ve özellikle yaz aylarında ülkemiz, mısır ithal etmek zorunda kalmaktadır. Uygulanan ekim, bakım, hasat yöntemleri ve buna ek olarak iklim şartları mısır üretim miktarını ve verimliliğini önemli ölçüde etkilemektedir. Mısır üretim miktarı ve ürün verimliliğinde ki dalgalanmaları minimuma indirmek, üretimi istikrarlı bir şekilde arttırmak ve bu istikrarı sürdürmek için modern mısır üretim tekniklerinin çiftçimiz tarafından bilinmesi ve doğru uygulanması gerekmektedir (Kırtok, 1998).

Darwin ve Mendel' in önemli keşifleri 20. yy. da, bitki ıslahı ve genetik çalışmalarının bilimsel temelini oluşturmuştur. Benzer bir şekilde, klasik bitki ıslah uygulamaları ile biyoteknoloji, genomik araştırmalar, moleküler marker uygulamalarının süregelen entegrasyonu, moleküler bitki ıslahının temelini yaratmış ve bu olay 21. Yüzyılda ürün gelişimini tamamıyla değiştirmiştir (Moose ve Mumm, 2008).

Melez mısırda görülen verim artışı, "melez azmanlığı" denilen genotipik durumun sonucudur. Heterosis, iki anaç arasındaki melezlemeden elde edilen dölün, verim ve bazı kalite değerleri bakımından anaçlardan daha üstün özellik göstermesi olayıdır (Turgut, 2001). Heterosis, iki farklı hattın melezlenmesinden dolayı görülen canlılıktaki artıştır. Farklı tanımlamalar yapılabilir, fakat ıslahçılar F1' in en iyi ebeveynden üstün özellik gösterecek şekilde ıslah edilmesini düşünürler. Klasik olarak, orta seviye ebeveynin üzerinde bir iyileştirme; ticari olarak, en iyi ticari kontrol çeşit üzerinde bir iyileştirme olarak tanımlanır (Baenziger, 2010).

Islah programları klasik yöntemlerle istenilen oranda amacına ulaşmış, ancak günümüzde yeni varyetelerin geliştirilmesinde moleküler markırlardan yararlanılması ıslah programlarına önemli bir fırsat sağlamıştır. Hızlı bir şekilde gelişen mevcut ıslah programlarına çok değerli olan DNA markırları eklenmiştir. Gelişen teknoloji ile birlikte yeni ürünlerin geliştirilmesinde yaratıcı girişimlerde bulunan moleküler ıslah, yeni bir alan oluşturmuştur (Peleman ve Voort, 2003). Mısır ıslah hatları arasındaki ilişkinin detaylı bir şekilde bilinmesi, aile seleksiyonlarında önemli olduğu kadar genetik analizlerde ve ıslah programlarının oluşturulmasında da büyük önem arz etmektedir. Mevcut gen kaynaklarının, genetik çeşitlilik analizleri morfolojik, coğrafik, moleküler (DNA, sequence, gen) ve fonksiyonel seviyelerde verilerden yararlanılmasına da imkan sağlamaktadır (Lu ve ark., 2009).

Herhangi bir gen havuzunda genetik çeşitliliğin bilinmesi, ıslah programını tasarlamada gerekli olan ön koşuldur. Melezlemede kullanılacak anaçların mevcut durumunun bilinmesiyle bitki ıslahının etkinlik derecesi önemli düzeyde arttırılabilmektedir. Özellikle mısır gen havuzu içinde genetik çeşitlilik çalışmaları çok yoğun bir şekilde kullanılmış ve kullanılmaya devam edilmektedir. Örneğin, Amerika Birleşik Devletleri ticari melez mısır çeşitlerinin orijini, açık tozlanan "Reid" ve "Lancaster" isimli iki popülasyondan elde edilen saf hatların melezlerine dayanmaktadır (Cömertpay, 2008; Goodman, 1990; Darrah ve Zuber, 1986). Varyasyon fenotipik ve genotipik ölçümler yoluyla belirlenebilmektedir (Gethi ve ark., 2002).

Gen kaynakları olmasaydı moleküler biyolojide son zamanlarda elde edilen gelişmeler mümkün olamazdı. Genetik stoklar yeterince korunmazsa, ihtiyaç olduğu kadar geliştirilmezse ve yayılmazsa; biyoloji ve tarım alanında sağlanacak gelişmelerin geleceği riske atılmış olacaktır (Goodman, 1990).

Genetik yakınlık-uzaklık çalışmaları hatlar arasındaki farklılıkların ortaya çıkmasını sağlamakta ve ıslah programlarında gen havuzundaki genetik çeşitliliğin arttırılmasına katkıda bulunmaktadır. Hatlar birbirinden ne kadar genetik uzaklığa sahipse, görülen varyasyon da o kadar fazla olmaktadır. Islah materyalinde görülen bu açılmalar seleksiyonu şekillendirmektedir ve ne kadar çok varyasyon elde edilirse ıslah programının başarı şansı o oranda artmaktadır, bu durum ıslahçının hedefine ulaşmasını kolaylaştırmaktadır. Genetik çeşitlilik çalışmalarında heterotik grupların belirlenmesi, yeni popülasyonların oluşturulmasına ve heterosis gösteren yüksek verimli hibrit kombinasyonlarının elde edilmesine katkıda bulunmaktadır.

Mısırın verim ve kalitesini artıran heterosisin etkili bir şekilde kullanılması, aileler arasındaki genetik ilişkinin iyi bilinmesiyle mümkündür. Kendilenmiş hat, popülasyonların genetik yapısının ve heterotik gruplar arasındaki ve içindeki genetik çeşitliliğinin bilinmesi ile hibrit ıslahını kolaylaştıran temel heterotik düzeni sağlar. Son on yıl içinde, araştırıcılar pedigri ve kombinasyon yeteneğinin dayandığı inbred grup ve heterotik yapıları araştırmışlardır. Son yıllarda da, moleküler markırlar genetik çalışmalarda yaygın olarak kullanılmakta ve mısır inbred hatlarının genetik ilişkilerinin belirlenmesi ıslah programlarına güçlü bir şekilde yarar sağlamaktadır. SSR (simple sequence repeat) markırları, genetik çeşitlilik analizlerinin temeli olarak mısır saf

hatlarının gen kaynaklarının sınıflandırılmasında kullanılmaktadır (Cheng- Lai ve ark., 2010).

Mısır saf hatlarının heterotik gruplarının bilinmesi ıslah programlarında büyük önem arz etmektedir. Mısır hatlarının lancaster, stiff stalk, reid, tropik, unrelated (herhangi bir grupla ilgisiz olan) vs. heterotik gruplarından olma durumuna göre hatların ana ve baba gruplara ayrılmasına, yeni popülasyonların elde edilmesine ya da başarılı hibrit kombinasyonların oluşturulmasına olanak sağlamakta, bu ise bitki ıslahçısına ıslah programlarının en verimli şekilde değerlendirilmesinde yardımcı olmaktadır.

Genetik çeşitliliğin değerlendirilmesi ıslahçılar tarafından alternatif bir seleksiyon metodu olarak kullanılmakta ve bu da hatların gruplar halinde düzenlenmesine yardımcı olmaktadır. Böylece, en ümitvar melezlemelerin yapılması, zaman ve masraftan tasarruf sağlanabilecek hibrit kombinasyonlarının oluşturulmasını mümkün kılmaktadır (Souza ve ark., 2008).

Bu araştırmada, moleküler yöntemler kullanılarak elde edilecek verilerden mısır saf hatlarının filogenetik ağacının elde edilmesi, hatların heterotik gruplarının belirlenmesi, genetik yakınlık-uzaklıklarının tespit edilmesi ve bu verilerin ıslah programında kullanılabilmesi amaçlanmıştır. Moleküler markırlar yolu ile hatlar arasındaki akrabalık ilişkilerinin ortaya konulması ile hem yeni güçlü popülasyonlar oluşturulmasındaki seçimlerde, hem de verimli hibritlerin oluşturulmasındaki seçimlerde başarı şansının arttırılması imkanının ortaya çıkacak olması, çalışmanın önemini açıkça ortaya koymaktadır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Modern tarımla beraber genetik erozyon ve habitatın tahrip edilmesi, bitki materyallerindeki gen kaynakları karakterlerinin önemini arttırmıştır. Bu nedenle, yararlanılan genetik kaynakların korunması için yeni stratejiler geliştirilmesi, genetik çeşitliliğin muhafazasının sağlanması bitki ıslahının temel unsurudur (Carvalho ve ark., 2004).

Mısır saf hatlarına bitki çeşitleri koruma yasası (PVPA) sertifikaları ile umumi olarak ulaşılabilmekte ve yeni gen kaynakları çoğu publik ve özel ıslah programları için potansiyel olarak kaynak sağlamaktadır. Ancak, eski PVPA mısır saf hatlarının ıslah programlarında etkili bir şekilde kullanılabilmesi için pedigrisinin ve genetik özelliklerinin tam olarak bilinmesi gerekmektedir (Nelson ve ark., 2008).

Ticari mısır hibritlerini elde etmek amacıyla oluşturulan ıslah hatları arasındaki genetik çeşitlilik artışı, aynı oranda verim artışlarını sağlayarak genetik çeşitliliğin muhafaza edilmesini güvenli hale getirmektedir. Islah programları içerisinde elit ticari saf hatlardan türetilen egzotik gen kaynaklarının genetik çeşitliliği arttırdığı görülmüştür (Glover ve ark., 2005).

Mevcut elit materyallerin melezlenmesinden türetilen yeni hatlar ve varyeteler, tüm dünyadaki mısır gen kaynaklarının daralmasına neden olmuştur. Diğer tüm ürünlerde de aynı durum söz konusudur. Mısır bitkisinin gen kaynaklarının daralması, gelecekteki hastalık kontrolü, patojenler ve agronomik faaliyetler gibi ıslah programlarına yeni katkıların oluşma esnekliğini yavaşlatmakta ve çıkmaza sokmaktadır (Goodman, 1999).

Konvansiyonel ve moleküler ıslah çalışmalarında, saf mısır hatlarının kullanımı oldukça önemlidir. Bu çalışmaların yanı sıra hibrit üretimi, bağlantı haritaları (Linkage mapping) ve kantitatif özelliklerin haritalanması (Quantitative Trait Loci) gibi haritalama çalışmalarında, moleküler evrim ve gelişim genetiği gibi alanlarda da bu saf hatlar kullanılmaktadır (Liu ve ark., 2003).

Mısır ıslahçıları son zamanlarda genetik çeşitlilik gösteren kaynakların sürdürülmesi ve bu genetik çeşitliliğin korunmasına ihtiyaçları olduğunun farkına

varmışlardır. Islah programlarında genetik farklılık gösteren hatların seçildiğinin bilinmesi bu erozyonun önlenmesine yardımcı olmaktadır (Senior ve ark., 1998).

Mısır ıslahında kullanılan orta kuşak mısır gen kaynaklarının heterotik gruplarının belirlenmesi ve heterotik desenlerinin oluşturulması yüksek verim artışlarına katkıda bulunmaktadır. Resiprok tekrarlanan seleksiyon programlarının (RRS) heterotik grup ve farklı heterotik gruplar arasında maksimum seleksiyonlara ulaşarak heterosisi ve heterotik grupları etkilediği ispatlanmıştır. Genetik çeşitliliği bilinen farklı orijinlerden türetilen mısır saf hatlarının, hibrit kombinasyonlarını maksimum düzeyde etkilediği bilinmektedir. U.S. mısır kuşağı (Corn Belt) gen kaynakları, belirli heterotik gruplardan (Reid, Stiff Stalk, Lancaster vs.) oluşturulmuş ve iki farklı heterotik gruba ait olan B73, Mo17 saf mısır hatları yeni mısır hatlarının seleksiyonu için tester olarak kullanılmıştır (Xia ve ark., 2005).

Mısır ıslah programlarında hibrit geliştirilmesinin temeli, hatların elde edilmesi ve hatlar arasındaki kombinasyon yeteneğinin değerlendirilmesinden ibarettir. Mısır ıslah programının başarısındaki temel husus, uygun hatların seçilmesidir. Islah programları çok maliyetli ve zaman alıcıdır, ticari hibrit alternatiflerinin geliştirilmesinde kombinasyon yeteneğinin kullanılması kısa sürede etkili olabilmektedir (Souza ve ark., 2008).

Yüksek verimli mısır çeşitlerinin geliştirilmesi, iyi kombinasyon yeteneğine sahip olan saf hatların kullanılmasıyla sağlanmaktadır. Top-cross blokları, ıslah programlarının erken döneminde saf hatların genel kombinasyon yeteneğinin değerlendirilmesi için oluşturulmakta olup, aynı zamanda açık tozlanan varyetelerin, saf hatların geliştirilmesinde kaynak olarak kullanılması için, seçimlerinin öngörülmesini de sağlamaktadır (Karunaratne, 2002).

Genel ve özel kombinasyon yeteneği uzun süreli bir dönemdir. Genel kombinasyon yeteneği; heterozigot tester ile melezlendiğinde, benzer grup organizmalarda başlı başına göreli bir performans olarak yıllardır bilinmektedir. Bitki ıslahının temelinde, dönemsel özel kombinasyon yeteneği, benzer nitelikteki diğer belirli melezlerin performansına bağlı olarak, belli bir melezin soy performans sonuçlarına dayandırılması alışılagelmiştir. Bir özel aile kombinasyonu ile, yüksek ya da düşük özel kombinasyon yeteneği sonucunda, melezlemelerin istenen ya da

istenmeyen ve üstün ya da üstün olmayan özellikte olduğu anlaşılmaktadır (Rinke ve Hayes, 1963).

Ürün türlerinde genetik çeşitlilik analizleri, ıslah programlarında çok önemli bir unsurdur ve o türlerin genetik zenginliği hakkında bilgi sağlanmasına yardımcı olur. Aynı zamanda, ıslah edilen popülasyonlardan alınan örnekler için bir altyapı oluşturur. Genetik çeşitlilik ve seviyelerinin doğru değerlendirilmesi; seleksiyonlar için maksimum genetik çeşitlilik ile soyların aile kombinasyonlarında sağlayacağı açılmanın tanımlanması, mevcut genetik tabandaki genetik çeşitlilik, çeşitli gen kaynaklarındaki genlerden istenen hibritleşmenin sağlanabilmesi ve bunun gibi uygulamaları içeren ıslah programlarında hayati öneme sahiptir. Saf hatlar arasındaki genetik ilişkinin bilinmesi; özellikle melezlemelerin planlanmasında, hatların özel heterotik gruplarının belirlenmesinde, bitki çeşitliliğinin korunduğu (PVP) hatların tam teşhisinde çok önemlidir (Mohammadi ve Prasanna, 2003).

Warburton ve ark. (2001), yaptıkları araştırmada, 57 tane saf hattın yüksek oranda yakın kardeş hatlar haricinde pedigrilerinin açık bir şekilde dizi oluşturmadığını görmüşlerdir. Tropik ve subtropik hibritlerin mısır ıslahı için; markırların gelecekteki hibrit ıslah programlarında iki ayrı heterotik grup oluşturmak için kullanılacağını öngörmüşlerdir. Gruplar arasında maksimum uzaklıktaki iki heterotik grupta yer alan bireyler melezlendiğinde oluşan hibritin maksimum heterotik performansı göstereceğini ifade etmişlerdir.

Warburton ve ark. (2002) tarafından SSR markırları ile 7 tane CIMMYT populasyonu ve 57 saf hat üzerinde genetik çeşitlilik çalışması yapılmıştır. Bu çalışmada, 85 tane tekrarlanabilen SSR markırı kullanılmış olup, bunlardan ancak 53 tanesinin en fazla ayrımı sağladığı ve gelecekteki rutin DNA parmak izi çalışmalarında kullanılabileceği tespit edilmiştir. Araştırıcılar çalışma sonucunda; PIC değerinin 0.46-0.85 arasında değiştiğini, 57 saf hattın ve 7 popülasyonun sırasıyla toplam 416-531 bant ürettiğini, allel değerlerinin 2-14 ve 2-16 arasında değiştiğini, ortalama allel sayısının 4.9-6.3 olduğunu tespit etmişlerdir.

Mısırda genetik çeşitlilik gelecekteki ıslah programları için anahtar rolü oynar. Moleküler markırların gelişmesi, çeşitli bitki türlerindeki DNA seviyesinin değerlendirilmesini sağlar. Özellikle SSR markırları, yüksek seviyede polimorfizm

içeren mısır genotiplerinin, DNA yapılarının, otomatik sistemler tarafından analizlerinin yüksek doğruluk ve tekrarlanabilirlikte yapılmasına imkan sağlar (Reif ve ark, 2003).

Cheng-Lai ve ark. (2010), mısır inbred hatlarının germplasm sınıflandırması için SSR markırlarını kullanmışlardır. Çalışmada; 97 mısır inbred hattı ve 112 SSR markırı UPGMA metodu ile analiz edilmiş olup, filogenetik ilişkisi kurulmuştur. Yapılan çalışmada; toplam bant sayısının 643 olduğunu, lokus başına düşen allel sayısının 2-13 arasında olduğunu ve lokus başına ortalama allel sayısının 5.7 olduğunu bildirmişlerdir. Araştırıcılar; PIC (polimorphic information content) değerini 0,2053 ile 0,6446 arasında bulmuşlar ve 97 mısır inbred hattının Reid, LRC (Lüda Red Cob), PB, SPT (Sipingtou) olmak üzere dört heterotik gruba ayrıldığını gözlemlemişlerdir.

Leal ve ark. (2010), genetik varyasyonun maksimum potansiyelinin, orijinal popülasyonların ve ilerleyen dönemlerindeki seleksiyonlarının fenotipik varyasyon ile doğru orantılı olarak ilerlediğini göstermişlerdir. Fenotipik varyasyon genetik çeşitlilik ile pozitif yönde ilişkili olmakla birlikte, aynı zamanda genetik çeşitlilik genotip x çevre arasında karşılıklı etkileşim gösterdiği ölçüde çevre faktörlerine de bağlıdır. Bu nedenden dolayı; genotipler, genotip gruplar ya da popülasyonlar arasındaki genetik çeşitliliğin belirlenmesi ıslah programları için zorunludur. Araştırmacılar, 9 SSR markırı kullanarak 10 inbred cin mısır hattında genetik çeşitlilik çalışması yapmışlar; 127 banttan 104 tanesini polimorfik olarak sınıflandırmışlar ve ortalama her bir primerin 11.6 polimorfik band verdiğini belirtmişlerdir. 14 SSR lokusu için toplam 47 allel olduğunu ve her bir lokusta allel başına 2-5 arasında allel olduğunu gözlemlemişlerdir.

Pabendon ve ark. (2009)'na göre, yüksek verim potansiyeli olan mısır hibritlerinin elde edilebilmesi için farklı heterotik gruplardaki popülasyonlara ihtiyaç duyulmaktadır. Araştırıcılar 34 mısır saf hattında 30 SSR markırı kullanarak yaptıkları araştırma sonucunda; toplam 133 allelde, lokus başına 2-8 allel düştüğünü ve ortalama her bir lokustaki allel sayısını 4.5, PIC değerinin 0.22-0.80 arasında ve ortalama PIC değerinin 0.60 olduğunu tespit etmişlerdir. Mısır hatları arasındaki genetik uzaklık değerinin 0.23-0.83 katsayıları arasında değiştiğini, ortalama değerin ise 0.53 olduğunu bildirmişlerdir.

Trindade ve ark. (2010), genetik çeşitliliğin soylar arasındaki ilişkiler hakkında bilgi sahibi olunabilmesi ve en fazla heterozigot özellik gösteren hibrit kombinasyonunun tahminlenebilmesi için çok önemli olduğunu ifade etmişlerdir.

Araştırmada, SSR markırları kullanılarak, 8 farklı germplasm bireyini içeren S6 seviyedeki cin mısır hatları değerlendirilmiştir. Araştırmacılar, 51 tane primerden, 15 tanesinin polimorfik olduğunu, toplam 45 allelde lokus başına 1-4 allel düştüğünü tespit etmişlerdir. Roger tarafından modifiye edilmiş protokol kullanılarak; hatlar arasındaki genetik benzerlik değerlendirilmiş ve genetik benzerlik P1-3 ve P8-1 arasında en az iken, P3-3 ve P8-2 arasında genetik olarak daha fazla benzerlik bulunmuştur. Bu nedenle P1-3 ve P8-1 hatları melezlendiğinde diğerlerine oranla daha yüksek heterozigot özellik göstereceğini tahmin etmişlerdir.

Xu ve ark. (2004), 15 elit saf hat ve 105 diallel melez mısır setinde genetik çeşitlilik çalışması yapmışlardır. Araştırıcılar 43 SSR primeri kullanmışlar ve 15 elit inbred hattı için toplam 191 bantta lokus başına 2-9 allel düştüğünü, her bir lokustaki ortalama allel sayısının 4.44 olduğunu, PIC değerinin 0.28 ile 0.81 arasında yer aldığını ve ortalama PIC değerinin 0,6281 olduğunu bulmuşlardır. Yapılan çalışma sonucunda, 15 elit saf hattındaki genetik uzaklığın 0.6-0.1 arasındaki katsayı değerlerini aldığı belirlenmiştir.

Laborda ve ark. (2005), 85 tropik mısır hattında SSR markırları ile genetik çeşitlilik çalışması yapmışlardır. Bu araştırıcılar 215 SSR primer çiftinin, 8 hat üzerinde yapılan testte en etkili sonucu verdiğini, 35 primerin en fazla polimorfik özelliğe sahip olduğunu belirtmişler ve 28 hat üzerinde yaptıkları çalışmada ise 15 primeri test ederek seçmişlerdir. Araştırıcılar, 8 ve 28 hat üzerinde yapılan testlerde kullanılan primerlerin polimorfik olduğunu tespit ederek araştırmada toplam 50 SSR primeri kullanmışlardır. Toplam 262 bantta allel sayısının 2-14 arasında bir değer aldığını ve ortalama allel sayısının 5.2 olduğunu, PIC değerinin ise 0.24-0.90 arasında değiştiğini ve ortalama PIC değerinin ise 0.61 olduğunu sunmuşlardır. Araştırıcılar, hatlar arasındaki genetik uzaklık değerinin 0.22-1.00 katsayıları arasında değiştiğini, ortalama değerin ise 0.61 olduğunu bildirmişlerdir.

Remington ve ark. (2001), Amerika orta kuşak bölgesinden temin edilen 53 tane, Avrupa ve Kanada' dan temin edilen 7 tane, tropik ve subtropik bölgelerden temin edilen 42 tane olmak üzere toplam 102 tane mısır inbred hattında SSR markırları ile genetik çeşitlilik çalışması yapmışlardır. Araştırmada yüksek oranda polimorfik 47 SSR markırı kullanılmış olup, allel sayılarının 2-16 arasında değerler aldığını ve lokus başına düşen allel sayısının 6.85 olduğunu ortaya koymuşlardır.

Phumichai ve ark. (2008), farklı tohum firmalarından temin ettikleri 7 ticari tek melez hibrit çeşidinde SSR markırları ile yürüttükleri genetik çeşitlilik çalışmasında, 64 SSR markırı kullanmışlardır. Araştırıcılar çalışma sonucunda; 319 allel üretildiğini, allel sayısının 2-11 arasında değiştiğini, lokus başına düşen ortalama allel sayısının 4.98 olduğunu, PIC değerinin ise 0.24-0.89 arasında değiştiğini ve ortalama PIC değerinin 0.69 olduğunu bulmuşlardır. Yapılan araştırma sonucunda, 7 ticari tek melez arasındaki uzaklık katsayılarının 0,333-0,658 arasında değerler aldığını, ortalama değerin ise 0,421 olduğunu tespit etmişlerdir.

Enoki ve ark. (2002), hibrit mısır ıslahında ıslah materyalleri arasındaki ilişki ve genetik çeşitlilik hakkında bilgi sahibi olunmasının zorunlu olduğunu ifade etmişlerdir. Araştırıcılar Japonya' nın soğuk bölgelerine adapte olmuş 51 mısır hattı ile U.S., Kanada ve Avrupa' dan temin ettikleri 14 mısır hattını karşılaştırmak için toplam 65 mısır hattında SSR markırları ile genetik çeşitlilik çalışması yapmışlardır. Altmış beş mısır hattı arasında 60 SSR markırı kullanılarak yapılan çalışmada; 433 allel üretilmiş olup, SSR lokuslarındaki allel sayısı 2-17 arasında değişmiş ve ortalama allel sayısı 7.3 olarak bulunmuştur. SSR lokuslarındaki PIC değeri ise 0.41-0.91 arasında değerler almış olup, ortalama değer 0.69 olarak sunulmuş ve kullanılmış olan mısır hatları arasındaki uzaklık değerinin 0.25-0.85 katsayıları arasında, ortalama değerin ise 0.55 olduğu belirtilmiştir.

Beyene ve ark. (2005), 62 mısır hattında 20 SSR markırı kullanarak genetik çeşitlilik çalışması yapmışlardır. Araştırma sonucunda 20 SSR lokusunda toplam 98 allel üretilmiş olup, allel sayıları 3 ile 10 arasında değerler almış, lokus başına düşen ortalama allel sayısı 4.9, PIC değeri ise 0.06 ile 0.76 arasında değişmiş, ortalama PIC değeri 0.61 olarak bildirilmiştir.

Li ve ark. (2004), 56 adet cin mısır hattı ve 21 adet normal mısır hattında SSR markırlarını kullanarak genetik çeşitlilik çalışması yapmışlardır. Araştırıcılar 113 SSR markırı kullandıkları çalışmada, 56 patlamış mısır hattının; toplam 306 allel ürettiğini, allel sayısının 1-3 arasında değiştiğini ve allel ortalamasının 2.71 olduğunu, 21 normal mısır hattının 414 allel ürettiğini, allel sayısının 1-9 arasında değiştiğini, ortalama allel sayısının 3.66 olduğunu bulmuşlardır. Araştırıcılar aynı zamanda; 56 tane cin mısır hattı arasındaki uzaklık değerinin 0,1247-0,7295 arasında, ortalama değerin ise 0,4768

olduğunu, 21 normal mısır hattının ise 0,2988-0,7150 arasında değerler aldığını, ortalama değerin ise 0,5833 olduğunu bildirmişlerdir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Bu çalışmada, May-Agro Tohumculuk A.Ş. ıslah programından geliştirilmiş 96 adet atdişi mısır hattı (*Zea mays* L. *indentata* Sturt.) materyal olarak kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan materyallerin kodları Çizelge 3.1. de sunulmuştur.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan mısır hatlarının kodları

Materyal	Materyal	Materyal	Materyal
MAY1	MAY25	MAY49	MAY73
MAY2	MAY26	MAY50	MAY74
MAY3	MAY27	MAY51	MAY75
MAY4	MAY28	MAY52	MAY76
MAY5	MAY29	MAY53	MAY77
MAY6	MAY30	MAY54	MAY78
MAY7	MAY31	MAY55	MAY79
MAY8	MAY32	MAY56	MAY80
MAY9	MAY33	MAY57	MAY81
MAY10	MAY34	MAY58	MAY82
MAY11	MAY35	MAY59	MAY83
MAY12	MAY36	MAY60	MAY84
MAY13	MAY37	MAY61	MAY85
MAY14	MAY38	MAY62	MAY86
MAY15	MAY39	MAY63	MAY87
MAY16	MAY40	MAY64	MAY88
MAY17	MAY41	MAY65	MAY89
MAY18	MAY42	MAY66	MAY90
MAY19	MAY43	MAY67	MAY91
MAY20	MAY44	MAY68	MAY92
MAY21	MAY45	MAY69	MAY93
MAY22	MAY46	MAY70	MAY94
MAY23	MAY47	MAY71	MAY95
MAY24	MAY48	MAY72	MAY96

May-Agro Tohumculuk A.Ş. ıslah programından geliştirilen 96 adet mısır hattında yapılan genetik çeşitlilik çalışmasında 26 tane SSR primeri kullanılmıştır. Bu çalışmada mısır genomunun temsil edilebilmesi için her kromozomdan en az iki adet olmak üzere SSR primerleri *http:/www.maizegdb.org/* web sitesinden seçilmiştir. Seçilen primerler, sekansları ve bulunduğu kromozom Çizelge 3.2.' de sunulmuştur.

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan primerler, sekansları, bulunduğu kromozom

Primer	İleri Sekans (F)	Geri sekans (R)	Kromozom
bnlg149	CATCCTCCAAAAGCACTACGT	CAGCTGTCCGACACTTATTCTGTA	1
bnlg1520	TCCTCTTGCTCTCCATGTCC	ACAGCTGCGTAGCTTCTTCC	2
bnlg197	GCGAGAAGAAAGCGAGCAGA	CGCCAAGAAGAAACACATCACA	3
bnlg249	CCGGTCGCAGTTAGTAGATGAT	TCGGCGTTGATTTCGTCAGTA	6
bnlg252	CGTTCTCCGTACAGCACAGACCAACGT	CTCAGATGAACTCCTCAGCAGCTGTAGCCT	4
nc003	ACCCTTGCCTTTACTGAAACACAACAGG	GCACACCGTGTGGCTGGTTC	2
nc010	TGAGCTGACGACGAGCAG	CATTATCTGTTCGGCCCG	6
nc030	CCCCTTGTCTTTCTTCCTCC	CGATTAGATTGGGGTGCG	3
nc130	GCACATGAAGATCCTGCTGA	TGTGGATGACGGTGATGC	5
nc135	CACAAAGAGCAGCCCACTTT	AAGTTGCTGACATCGATCCA	4
phi001	TGACGGACGTGGATCGCTTCAC	AGCAGGCAGCAGGTCAGCAGCG	1
phi008	CGGCTACGGAGGCGGTG	GATGGGCCCACACATCAGTC	5
phi015	ACGCTGCATTCAATTACCGGGAAG	GCAACGTACCGTACCTTTCCGA	8
phi022	TGCGCACCAGCGACTGACC	GCGGGCGACGCTTCCAAAC	9
phi034	TAGCGACAGGATGGCCTCTTCT	GGGGAGCACGCCTTCGTTCT	7
phi046	ATCTCGCGAACGTGTGCAGATTCT	TCGATCTTTCCCGGAACTCTGAC	3
phi059	AAGCTAATTAAGGCCGGTCATCCC	TCCGTGTACTCGGCGGACTC	10
phi070	GCTGAGCGATCAGTTCATCCAG	CCATGGCAGGGTCTCTCAAG	6
phi083	CAAACATCAGCCAGAGACAAGGAC	ATTCATCGACGCGTCACAGTCTACT	2
phi084	AGAAGGAATCCGATCCATCCAAGC	CACCCGTACTTGAGGAAAACCC	10
umc1066	ATGGAGCACGTCATCTCAATGG	AGCAGCAGCAACGTCTATGACACT	7
umc1069	AGAGAATCCCCAAGCAAACAAAC	CTTCATCGGAGCCATGGTGT	8
umc1122	CACAACTCCATCAGAGGACAGAGA	CTGCTACGACATACGCAAGGC	1
umc1630	CAGACCTTCGAGGGCAAGAACT	AGTTTTGGCTTCTTCTCCCAAGTC	1
umc1804	GCGGCGAGGTTAAAGGAAAA	GGTGTTTAGACACGCAGACACAAC	9
umc1943	GTGCTGCAGAATTCAACTCCTTC	ACCATTTCTGCGTTTCCACAGT	4

3.2. Yöntem

3.2.1. Bitkilerin Yetiştirilmesi

Çalışmada kullanılan mısır hatları May-Agro Tohumculuk A.Ş.' ye ait Bursa merkez tesislerinde bulunan yetiştirme seralarında, kontrollü ortamda yetiştirilmiştir. Her bir mısır hattından 10 tohum Nisan ayı içerisinde torf içeren viyollere ekilmiş, sera koşullarında gündüz sıcaklık değerinin 29 ^{0}C; gece sıcaklık değerinin 25 ^{0}C; gün uzunluğunun 14 saat; ışıklanmanın 14000 Watt olması sağlanmış, sulama ise günün erken saatlerinde ılık su ile yapılmıştır (Brown, 2009).

Mısır bitkileri 3-4 gerçek yapraklı forma geldikten sonra 10 bitkinin en genç yapraklarından alınan numuneler bulk edilerek tüplere aktarılmış ve bu numuneler DNA ekstraksiyonu için –80 ^{0}C de saklanmıştır.

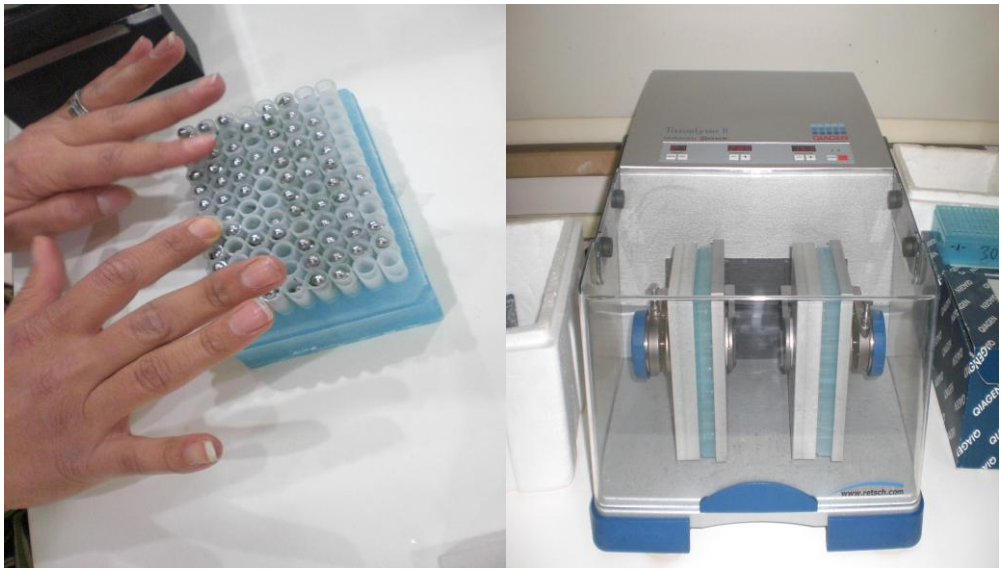


Şekil 3.1. Gerçek 3-4 yapraklı mısır bitkilerinden numune alınması.

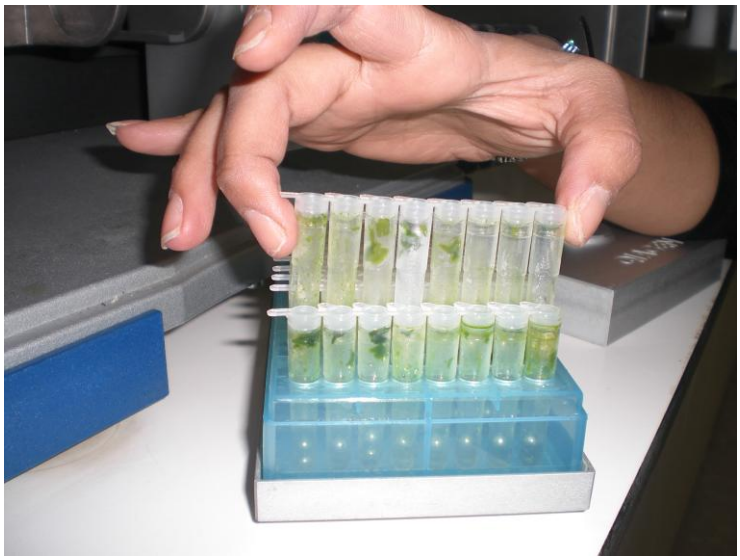
3.2.2. DNA Ekstraksiyonu

DNA ekstraksiyonu, Genomic Wizard DNA Purification, Promega kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. DNA ekstraksiyonunda kullanılan yöntem, kit ile birlikte gelen protokol listesi takip edilerek yapılmıştır. İlgili protokol aşağıda maddeler halinde verilmiştir.

1) Daha önceden toplanarak, -80 ^{0}C de dondurulan yaprak numuneleri üzerine metal bilyeler konularak mikrosantrifüj tüpü içerisine parçalanarak öğütülmüştür (Şekil 3.2.).

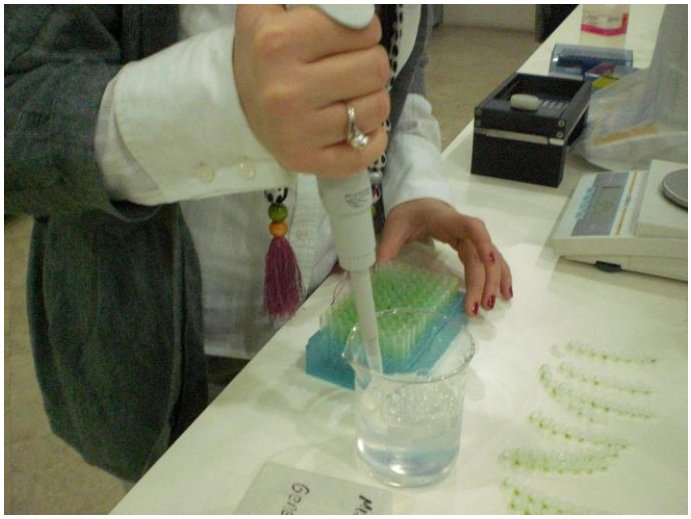


Şekil 3.2. Yaprak numunelerinin üzerine metal bilyeler konularak mikrosantrifüj tüpünde parçalanma aşamaları.



Şekil 3.3. Mikrosantrifüj tüpünde parçalanan yaprak numunelerinin görüntüsü.

2) Parçalanan yaprak numunelerinden 40 mg, 1,5 ml' lik mikrosantrifüj tüpüne ilave edilmiştir.Üzerine 600 µl nuclei lysis buffer eklenerek 1-3 saniye vortekslenmiştir.



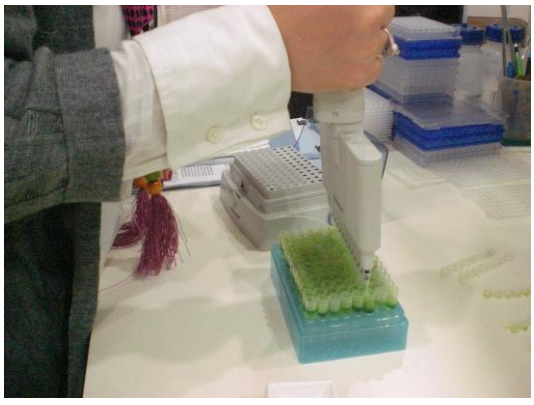
Şekil 3.4. Yaprak numuneleri üzerine nuclei lysis buffer eklenmesi.

3) 65 ^{0}C sıcaklıkta 15 dakika inkube edilmiştir.



Şekil 3.5. Sıcak su banyosu sonrasında yaprak numunelerinin görünümü.

4) 3 µl RNAse solusyonu eklenmiş, tüpler 2-5 kez çalkalanarak örnekler karıştırılmış ve 37 ^{0}C sıcaklıkta 15 dakika inkube edilmiştir. Sonraki işlemler için örnekler oda sıcaklığında 5 dakika bekletilmiştir.



Şekil 3.6. Numunelerin üzerine RNAse eklenmesine ait görüntü.

5) 200 µl protein precipitation solution ilave edilmiş ve yüksek hızda 20 saniye vortekslenmiştir.
6) 3 dakika 13,000-16,000 x g. da santrifüj yapılmıştır. Çöken proteinler sıkı taneli forma dönüşmüştür.
7) Dikkatli bir şekilde supernatant içeren DNA (önceden protein parçalarından ayrılan) çıkarılmış ve 600 µl oda sıcaklığında izopropanol içeren, temiz 1,5 ml lik mikrosantrifüj tüplerine aktarılmıştır.



Şekil 3.7. Elde edilen DNA nın izopropanol içeren tüplere aktarılmasına ait görüntü.

8) DNA dizisi sıralı dizi olana kadar solüsyon hafifçe altüst edilerek karıştırılmıştır.
9) Oda sıcaklığında 1 dk, 13,000-16,000 x g. da santrifüj yapılmıştır.
10) Dikkatli bir şekilde supernatant dökülmüştür. 600 µl oda sıcaklığında % 70 lik etanol ilave edilmiş ve tüpler birkaç kez hafifçe altüst edilerek DNA yıkanmıştır. Oda sıcaklığında 1 dk, 13,000-16,000 x g. da santrifüj yapılmıştır.
11) Kullanılan etanol dikkatli bir şekilde pasteur ya da sequence pipet ile çekilmiştir. DNA parçaları bu noktada çok seyrek olduğu için, pipetin bu çökeltinin dibine indirilmemesine dikkat edilmiştir.
12) Tüplerin üzerine kağıt havlu konularak altüst edilmiş ve 15 dk. tüp içerisindeki etanolün kuruması amacıyla bırakılmıştır.
13) 100 µl DNA Rehidrasyon solüsyonu ilave edilmiş ve rehidre DNA 65^0C de 1 saat inkube edilmiştir. Belli aralıklarla solüsyon tüpün üzerine gelecek şekilde hafifçe çalkalanmıştır. Alternatif olarak, rehidre DNA solüsyon gece boyunca 4 ^{0}C de inkube edilmiştir.
14) DNA 2-8 ^{0}C de saklanmıştır. Elde edilen DNA' lar Eppendorf Biophotometer v104 cihazında ölçülerek miktar ve kalite tayini yapılmıştır. İlgili değerler Çizelge 3.3.' de verilmiştir.



Şekil 3.8. DNA miktar ve kalitesinin ölçülmesi.

Çizelge 3.3. DNA ekstrasyonlarının miktar ve kalitesi

Materyal	dsDNA	Unit	260/280	260/230	Materyal	dsDNA	Unit	260/280	260/230
MAY1	117,7	µg/mL	1,92	1,94	MAY49	148,7	µg/mL	1,85	1,92
MAY2	127,5	µg/mL	1,75	1,86	MAY50	218,7	µg/mL	2,51	1,9
MAY3	116,2	µg/mL	1,11	1,88	MAY51	162,4	µg/mL	1,51	1,82
MAY4	133,4	µg/mL	1,76	1,94	MAY52	127,2	µg/mL	1,93	1,77
MAY5	166,5	µg/mL	1,67	1,92	MAY53	136,5	µg/mL	1,6	1,94
MAY6	181,8	µg/mL	1,7	1,67	MAY54	115	µg/mL	2,7	1,68
MAY7	125,4	µg/mL	1,78	1,82	MAY55	218,6	µg/mL	1,96	1,9
MAY8	169,6	µg/mL	1,69	2,01	MAY56	171,9	µg/mL	1,54	1,89
MAY9	136,8	µg/mL	1,79	1,88	MAY57	227,8	µg/mL	1,82	1,94
MAY10	145	µg/mL	1,52	1,88	MAY58	213,7	µg/mL	5,47	1,86
MAY11	95,1	µg/mL	1,36	1,88	MAY59	218,1	µg/mL	2,92	1,88
MAY12	279,5	µg/mL	1,47	1,88	MAY60	210,2	µg/mL	5,11	1,94
MAY13	113,3	µg/mL	1,65	1,88	MAY61	157,4	µg/mL	1,87	1,92
MAY14	136,8	µg/mL	1,79	1,88	MAY62	163,3	µg/mL	1,9	1,67
MAY15	211	µg/mL	2,75	1,94	MAY63	227,5	µg/mL	1,63	1,82
MAY16	217,7	µg/mL	1,77	1,92	MAY64	157	µg/mL	1,84	2,01
MAY17	166,8	µg/mL	1,8	1,9	MAY65	148,5	µg/mL	1,77	1,88
MAY18	129	µg/mL	1,71	1,82	MAY66	132,8	µg/mL	1,62	1,88
MAY19	145,4	µg/mL	1,67	1,77	MAY67	151,7	µg/mL	1,74	1,88
MAY20	123,9	µg/mL	2,12	1,94	MAY68	117,1	µg/mL	1,74	1,88
MAY21	135,2	µg/mL	1,84	1,68	MAY69	27,5	µg/mL	1,84	1,88
MAY22	155,8	µg/mL	1,76	1,9	MAY70	228,6	µg/mL	1,88	1,88
MAY23	154,9	µg/mL	1,76	1,89	MAY71	228,2	µg/mL	1,93	1,94
MAY24	154,9	µg/mL	1,06	1,88	MAY72	222,9	µg/mL	2,03	1,92
MAY25	214,6	µg/mL	1,61	1,79	MAY73	218,3	µg/mL	2,77	1,9
MAY26	131,9	µg/mL	1,81	2,02	MAY74	106,6	µg/mL	1,65	2,03
MAY27	153,9	µg/mL	1,77	1,8	MAY75	156,5	µg/mL	1,62	1,86
MAY28	306,5	µg/mL	1,54	1,88	MAY76	140,5	µg/mL	1,86	1,78
MAY29	131,8	µg/mL	1,67	2,04	MAY77	212,7	µg/mL	1,42	1,94
MAY30	174,4	µg/mL	1,61	1,94	MAY78	234,9	µg/mL	1,86	1,92
MAY31	152,5	µg/mL	1,9	1,88	MAY79	217	µg/mL	2,61	1,67
MAY32	151,3	µg/mL	1,83	1,88	MAY80	103,9	µg/mL	1,36	1,82
MAY33	111,6	µg/mL	1,69	1,94	MAY81	246,2	µg/mL	1,53	2,01
MAY34	171,1	µg/mL	1,75	1,92	MAY82	122,9	µg/mL	1,83	1,88
MAY35	157,4	µg/mL	1,83	1,9	MAY83	112,6	µg/mL	6,31	1,88
MAY36	116,4	µg/mL	2,22	1,82	MAY84	116,2	µg/mL	2,67	1,88
MAY37	143,1	µg/mL	1,66	1,77	MAY85	107,6	µg/mL	NaN	1,88
MAY38	137	µg/mL	1,97	1,94	MAY86	171,5	µg/mL	1,72	1,88
MAY39	163,7	µg/mL	1,89	1,68	MAY87	245,1	µg/mL	1,53	1,88
MAY40	241,2	µg/mL	1,6	1,9	MAY88	149,4	µg/mL	1,71	1,94
MAY41	236,4	µg/mL	1,84	1,89	MAY89	134,7	µg/mL	1,73	1,92
MAY42	154,1	µg/mL	1,81	1,94	MAY90	132,9	µg/mL	1,66	1,9
MAY43	247,3	µg/mL	1,77	1,94	MAY91	148,2	µg/mL	1,68	1,82
MAY44	231,8	µg/mL	1,99	1,94	MAY92	165,9	µg/mL	1,43	1,77
MAY45	210,2	µg/mL	6,8	1,94	MAY93	123,9	µg/mL	2,12	1,94
MAY46	156,6	µg/mL	1,64	1,88	MAY94	141,2	µg/mL	1,6	1,68
MAY47	154,8	µg/mL	1,81	1,88	MAY95	136,4	µg/mL	1,84	1,9
MAY48	117,5	µg/mL	3,74	1,94	MAY96	154,1	µg/mL	1,81	1,89

3.2.3. PCR Hazırlık İşlemleri

Daha önceden yapılan ön çalışma ile mısırda çalışılan materyalde polimorfik karakterde oldukları belirlenen 26 adet SSR primeri kullanılmıştır. Primer sekansları İnvitrogen firmasına sentezlettirilip, liyofilize halde gelen primerler dilusyon yapılarak kullanıma hazır hale getirilmiştir. Elde edilen DNA ların Çizelge 3.5. 'de verilen PCR master mix protokolüne tabii tutularak PCR' ı yapılmıştır. Çalışmada kullanılan termal PCR protokolü Çizelge 3.4.' de sunulmuştur.

Çizelge 3.4. Termal PCR Protokolü

94 ^{0}C	3dk
94 ^{0}C	30 saniye
60 ^{0}C	45 saniye 35X
72 ^{0}C	45 saniye
72 ^{0}C	5 dakika

Çizelge 3.5. Mısır SSR PCR Master Mix Protokolü

PCR Komponenti	**Miktar**
10X PCR Buffer	2.5 µl
Taq DNA Polimeraz Enzimi(5U)	0.2 µl
dNTP (10 mM)	0.3 µl
İleri Primer (20 µM)	0.5 µl
Geri Primer (20 µM)	0.5 µl
MgCl2 (25 mM)	1.5 µl
Distile su	16.5 µl
Template DNA (50-150 ng)	3.0 µl
Toplam	25.00 µl

PCR hazırlık aşamasında; daha önceden hazırlanmış olan DNA ekstrasyonundan 3 µl DNA, PCR tablasına aktarılarak 3000 rpm soğuk santrifüj yapılmıştır. Çizelge 3.5.' de sunulan mix hazırlanarak vortekslendikten sonra 22 µl numuneler üzerine konularak 1 saat 38 dk. PCR yapılmıştır. PCR sonucu elde edilen ürünler, 3 µl DNA yükleme boyası eklenerek, vorteks ve santrifüj işleminin ardından hazırlanacak olan % 3 lük

agaroz/metafor agaroz jeline yüklenmiştir. Bu işlemlerde %1 lik TBE buffer kullanılmıştır. Yüklenen örnekler 120 V ta 2 saat yürütülerek jel dökümantasyon cihazında UV ışık altında DNA bantları elde edilerek jel görüntüleri sunulmuştur.

3.2.4. Primerlerin Polimorfizm Oranlarının Belirlenmesi

96 adet mısır hattının genetik çeşitliliğini tespit etmek için kullanılan 26 tane SSR primerlerinin polimorfizm oranlarının yüzdesi, her bir primerin verdiği polimorfik bant sayısının, tüm primerlerin verdiği toplam bant sayısına bölünüp 100 ile çarpılmasıyla hesaplanmıştır.

Polimorfizm Oranı (%) = (Polimorfik Bant Sayısı / Toplam Bant Sayısı) x 100

3.2.5. Primerlerin Polimorfizm Bilgi İçeriklerinin (PBİ) Belirlenmesi

Bu araştırmada kullanılan SSR primerlerin polimorfizm bilgi içerikleri (PBİ) Smith ve ark.'ları (1997) tarafından sunulan formül ile hesaplanmıştır. Polimorfik bantlarda toplam var (1) ve yok (0) olan bantların sayıları tespit edilerek herbir bandın frekansı (Pi) tek tek hesaplanmıştır.

Primerlerin Polimorfizm Bilgi İçeriği (PBİ) = $1 - \Sigma Pi^2$

3.2.6. Primerlerin Ayırma Güçlerinin Belirlenmesi

Araştırmada kullanılan 26 tane SSR primerinin ayırma güçleri Prevost ve Wilkinson (1999) ' nın geliştirmiş olduğu formül ile hesaplanmıştır. Formülde yer alan p değeri her bir primerin verdiği bant sayısının toplam örnek sayısına bölünmesiyle elde edilmiştir ve bu değer 0.5 ten çıkarılarak mutlak değeri alınmıştır. Elde edilen değer iki ile çarpılmıştır ve bir sayısından çıkarılarak primerlerin ayırma güçleri hesaplanmıştır.

Primerlerin Ayırma Gücü (IB) = 1- (2 x | 0.5 - p |)

3.2.7. Jel Görüntüleri ve Veri Analizi

May Agro Tohumculuk A.Ş. ıslah programına ait 96 tane mısır hattının, genetik çeşitliliğinin belirlenmesinde, SSR marker datalarının markır sistemleri arasındaki matriks karşılaştırmaları kullanılmıştır (Mantel, 1967). SSR markırları numerik veri olarak, mısır hatlarının genomik DNA kısımlarında var olanlar (1), olmayanlar ise (0) olarak skorlanmıştır. Uzaklık matriks ve dendogramlarının değerlendirilmesinde NTSYS-pc versiyon 2.2 (Numerik Taksonomi Çok Değişkenli Analiz sistemi, Exeter Software, Setauket, N.Y.) bilgisayar programı kullanılmıştır.

Kalitatif verilerin hesaplanmasında DICE (1945) benzerlik indeksinin benzerlik katsayısı kullanılmıştır. DICE benzerlik indeksinin hesaplanmasında benzeyen iki örnek i,j arasındaki benzerlik katsayısı GS (i,j)= 2a(2a+b+c) formülü ile hesaplanmıştır. Formülde a, i ve j arasındaki polimorfik bantların numarasını, b; i de olan j de olmayan bantların numarasını ve c ise j de olan i de olmayan bantların numarasını ifade etmiştir. Benzerlik dendogramı gruplanan benzer data tarafından Unweighted Pair Group Metodu ile Aritmetik Ortalama (UPGMA) ve SAHN gruplama programı ile oluşturulmuştur.

Diğer taraftaki kalitatif data, standardizasyondan sonra korelasyon matriksinden yararlanılarak benzerlik katsayısının hesaplanmasında kullanılmıştır. Aynı zamanda benzerlik dendogramlarının oluşturulması için benzer dataların gruplandırılmasında Unweighted Pair Group Metodu ile Aritmetik Ortalama (UPGMA) ve SAHN gruplama programı kullanılmıştır.

Markırların farklı tipleri ile elde edilen datalar arasındaki karşılaştırmanın yapılmasında Mantel (1967) testi kullanılmış, iki matriksin karşılaştırılması için diğer randomizasyonların ve bunlardan biri arasındaki korelasyon ile randomizasyon prosedürü oluşturulmuştur. Başlıca birleşen analiz PCA (Principle Component Analysis) ölçülmüş ve 2D ve 3D plotları üretilmiştir.

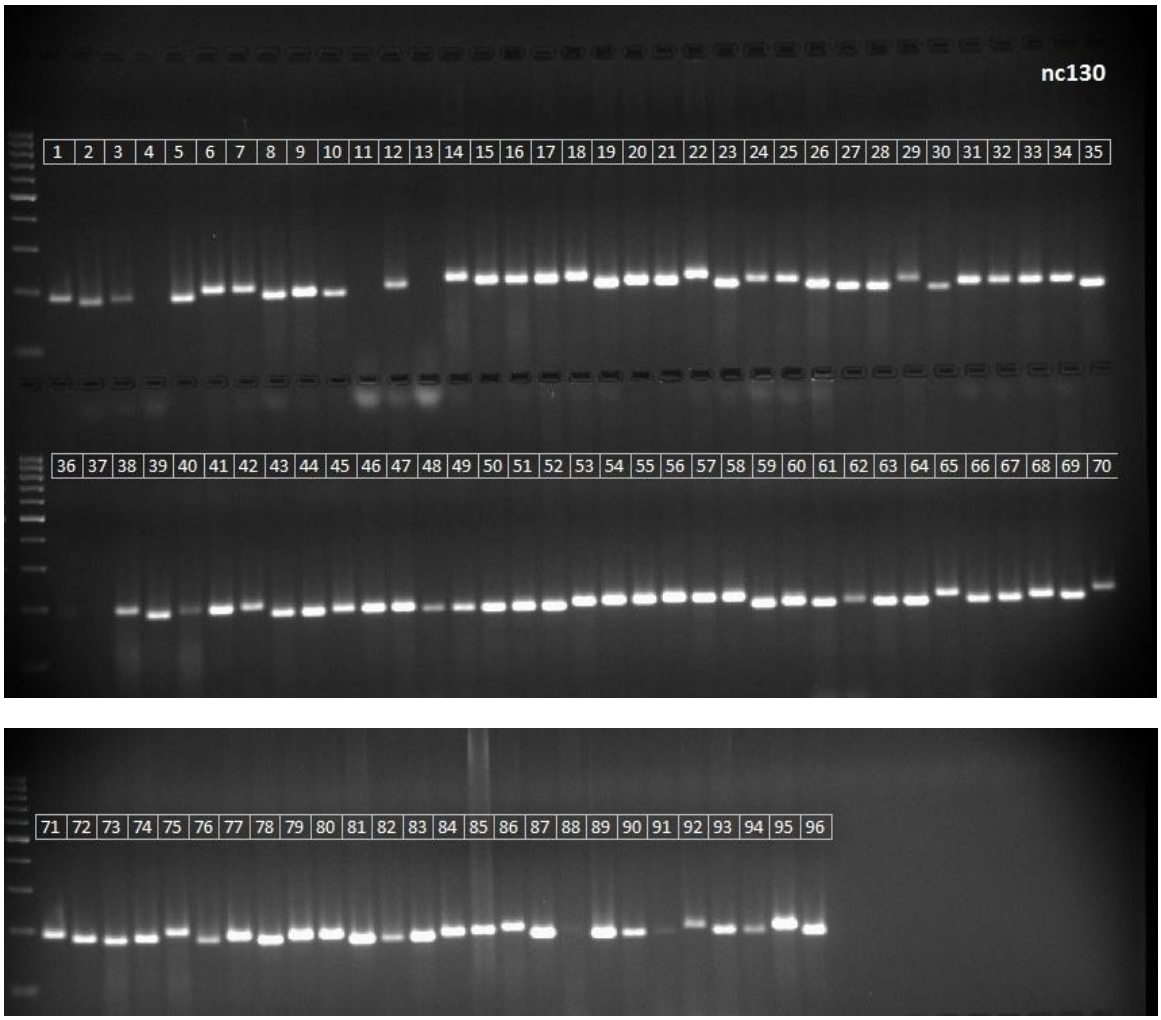
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

Araştırmada kullanılan mısır hatlarının SSR primerleri ile genetik çeşitliliğinin belirlenmesinde her bir primer için hesaplanan polimorfizm oranı (PO), polimorfizm bilgi içeriği (PBİ) ve ayırma gücü (AG) Çizelge 4.1' de sunulmuştur. Araştırmada 96 adet atdişi mısır hattında kullanılan 26 adet polimorfik SSR primeri tüm hatlar için uygulanmış olup; bu çalışmada kullanılan hatlar üzerinde phi008, phi083, umc1122 ve umc1630 primerlerinin monomorfik özellik gösterdiği, diğer 22 primerin ise polimorfik olduğu gözlemlenmiştir. Leal ve ark. (2010), SSR markırı kullanarak 10 inbred cin mısır hattında yapmış oldukları genetik çeşitlilik çalışmasında 127 banttan 104 tanesini polimorfik olarak sınıflandırmışlardır. Trindade ve ark. (2010), SSR markırları kullanılarak, 8 farklı germplazm bireyini içeren S6 seviyedeki cin mısır hatlarının değerlendirdikleri çalışmada; 51 tane primerden, 15 tanesinin polimorfik olduğunu tespit etmişlerdir.

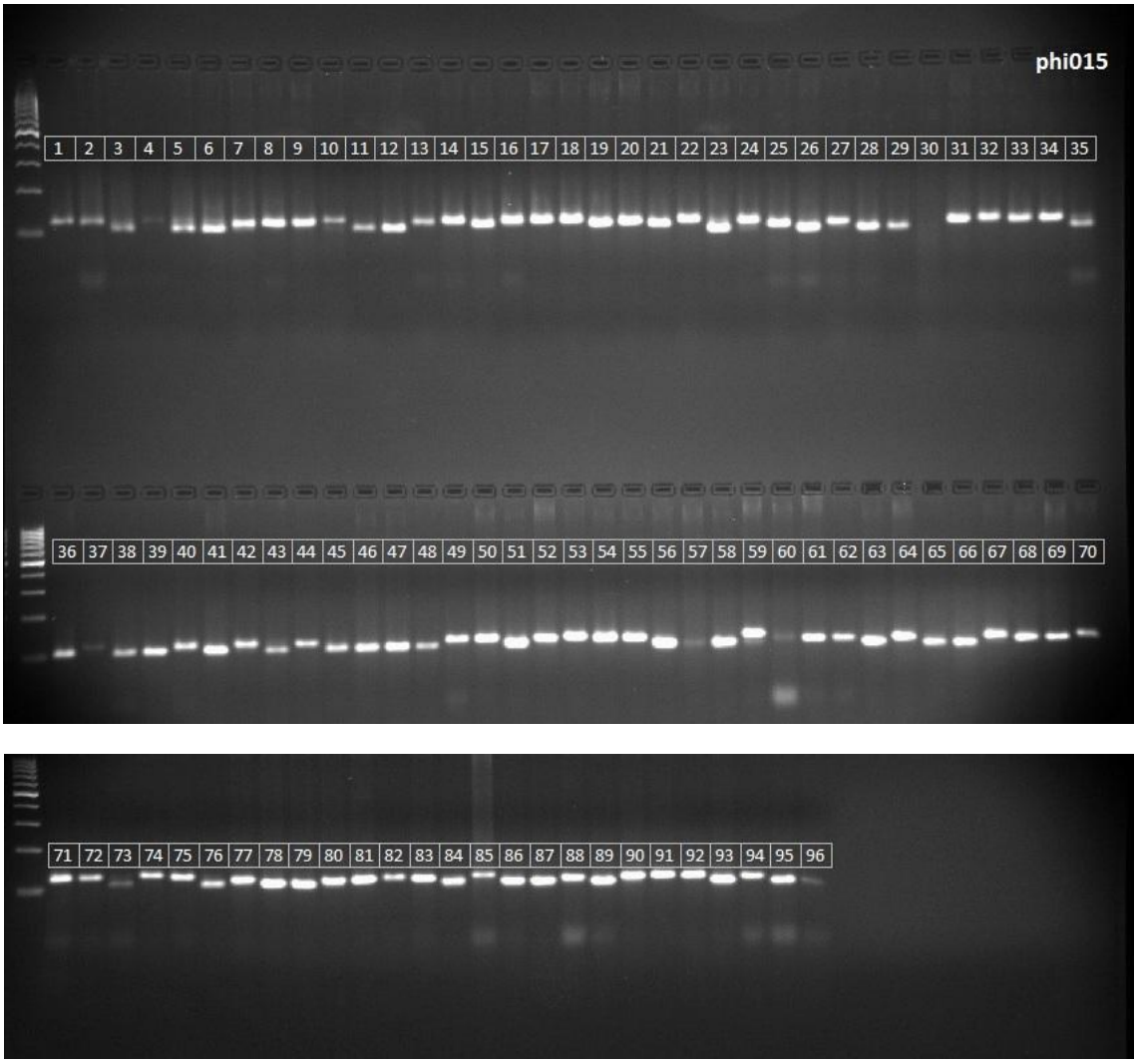
Çizelge 4.1. SSR primerlerinin polimorfizm oranı, polimorfizm bilgi içeriği ve ayırma güçlerine ait değerler.

Primer	PO (%)	PBİ	AG
bnlg149	4.29	0.35	0.06
bnlg1520	4.29	0.13	0.06
bnlg197	5.71	0.28	0.08
bnlg249	2.86	0.04	0.04
bnlg252	2.86	0.12	0.04
nc003	4.29	0.21	0.06
nc010	5.71	0.33	0.08
nc030	4.29	0.37	0.06
nc130	4.29	0.38	0.06
nc135	5.71	0.31	0.08
phi001	2.86	0.36	0.04
phi008	0.00	0.00	0.00
phi015	4.29	0.43	0.06
phi022	2.86	0.29	0.04
phi034	2.86	0.21	0.04
phi046	4.29	0.28	0.06
phi059	5.71	0.33	0.08
phi070	2.86	0.35	0.04
phi083	0.00	0.00	0.00
phi084	4.29	0.35	0.06
umc1066	5.71	0.31	0.08
umc1069	2.86	0.29	0.04
umc1122	0.00	0.00	0.00
umc1630	0.00	0.00	0.00
umc1804	2.86	0.21	0.04
umc1943	2.86	0.35	0.04
Ortalama	3.41	0.24	0.05

PCR sonuçlarına göre; çalışmada kullanılan 26 adet SSR primerinden nc130 ve phi015' e ait örnekler Şekil 4.1 ve Şekil 4.2' de verilmiştir.



Şekil 4.1. Çalışmada kullanılan 96 adet hattın nc130 SSR primerine ait jel görüntüsü.



Şekil 4.2. Çalışmada kullanılan 96 adet hattın phi015 SSR primerine ait jel görüntüsü.

Araştırma sonuçlarına göre SSR primerlerinin allel sayısı ve PIC değerleri Çizelge 4.2.' de verilmiştir.

Çizelge 4.2. SSR primerlerinin allel sayısı ve PIC değerleri

Primer	PIC değerleri	Allel sayısı
bnlg149	0.35	3
bnlg1520	0.13	3
bnlg197	0.28	4
bnlg249	0.04	2
bnlg252	0.12	2
nc003	0.21	3
nc010	0.33	4
nc030	0.37	3
nc130	0.38	3
nc135	0.31	4
phi001	0.36	2
phi008	0.00	2
phi015	0.43	3
phi022	0.29	2
phi034	0.21	2
phi046	0.28	3
phi059	0.33	4
phi070	0.35	2
phi083	0.00	2
phi084	0.35	3
umc1066	0.31	4
umc1069	0.29	2
umc1122	0.00	2
umc1630	0.00	2
umc1804	0.21	2
umc1943	0.35	2
Ortalama	0.29	2.69

Yapılan çalışma sonucunda 70 adet allel üretilmiş olup, lokus başına düşen allel sayısı 2-4 arasında olmuş ve ortalama her bir SSR lokusu başına 2.69 allel saptanmıştır(Çizelge 4.2). Değişik kaynaklı mısır varyete grupları üzerinde SSR markırları kullanılarak 2000 den sonraki yıllarda yürütülmüş araştırma sonuçları mevcuttur. Cheng-Lai ve ark. (2010), 97 mısır inbred hattının germplasm sınıflandırması için 112 SSR markırı kullanarak yapmış oldukları çalışmada, toplam bant sayısının 643 olduğunu, lokus başına düşen allel sayısının 2-13 arasında olduğunu ve lokus başına ortalama allel sayısının 5.7 olduğunu bildirmişlerdir. Leal ve ark. (2010), 9 SSR markırı kullanarak 10 inbred cin mısır hattında genetik çeşitlilik çalışması yapmışlardır. On dört SSR lokusu için toplam 47 allel olduğunu ve her bir lokusta allel başına 2-5 arasında allel olduğunu gözlemlemişlerdir. Pabendon ve ark. (2009), otuzdört saf mısır hattında 30 SSR markırı kullanarak yaptıkları araştırmada, toplam 133 allel olduğunu ve lokus başına 2-8 allel düştüğünü ve ortalama her bir lokustaki allel sayısının 4.5 olduğunu belirlemişlerdir. Trindade ve ark. (2010), 8 farklı germplasm bireyini içeren S6 seviyedeki cin mısır hatlarını değerlendirdikleri çalışmalarında; toplam 45 allelde lokus başına 1-4 allel düştüğünü tespit etmişlerdir. Xu ve ark. (2004), 15 elit inbred mısır hattında 43 SSR primeri kullanarak yaptıkları genetik çeşitlilik çalışması sonucunda, 15 elit inbred hattı için toplam 191 bantta lokus başına 2-9 allel düştüğünü ve her bir lokustaki ortalama allel sayısının 4.44 olduğunu bulmuşlardır. Laborda ve ark. (2005), 85 tropik mısır hattında 50 SSR primeri kullanarak yapmış oldukları çalışmada toplam 262 bantta allel sayısının 2-14 arasında bir değer aldığını ve ortalama allel sayısının 5.2 olduğunu bildirmişlerdir. Remington ve ark. (2001), 102 tane mısır inbred hattında 47 SSR primeri kullanılarak yaptıkları çalışma sonucunda, allel sayılarının 2-16 arasında olduğunu ve lokus başına düşen allel sayısının ise 6.85 olduğunu ortaya koymuşlardır. Phumichai ve ark. (2008), 7 ticari tek melez mısır çeşidinde 64 SSR primeri ile yaptıkları araştırma sonucunda, 319 allel üretildiğini, allel sayısının 2-11 arasında değiştiğini ve lokus başına düşen ortalama allel sayısının 4.98 olduğunu bulmuşlardır. Enoki ve ark. (2002), 65 mısır hattında 60 SSR primeri ile yaptıkları genetik çeşitlilik çalışmasında, 433 allel üretildiğini, SSR lokuslarındaki allel sayısının 2-17 arasında değiştiğini ve ortalama allel sayısının 7.3 olduğunu bildirmişlerdir. Beyene ve ark. (2005), 62 mısır hattında 20 SSR primeri kullanarak yaptıkları araştırma sonucunda, 20 SSR lokusunda toplam 98 allel üretildiğini, allel sayılarının 3-10 arasında değerler aldığını ve lokus başına düşen ortalama allel sayısının 4.9 olduğunu gözlemlemişlerdir. Li ve ark. (2004), 56 cin mısır

hattı ve 21 normal mısır hattı üzerinde 113 SSR markırı kullanarak yaptıkları çalışmada, 56 cin mısır hattının toplam 306 allel ürettiğini, allel sayısının 1-3 arasında değiştiğini ve allel ortalamasının 2.71 olduğunu; 21 normal mısır hattının 414 allel ürettiğini, allel sayısının 1-9 arasında değiştiğini, ortalama allel sayısının 3.66 olduğunu bulmuşlardır.

Bu araştırmada, doksanaltı adet atdişi mısır hattında SSR markırları ile yapılan genetik çeşitlilik çalışması sonucunda 70 adet allel üretilmiştir ve lokus başına düşen allel sayıları 2-4 arasında değerler alırken, ortalama her bir SSR lokusu başına 2.69 allel saptanmıştır. Yapılan diğer araştırmalarda; Cheng-Lai ve ark. (2010), 97 mısır inbred hattının toplam bant sayısının 643 olduğunu tespit ederek en yüksek, Trindade ve ark. (2010), 8 farklı germplasm bireyini içeren S6 seviyedeki cin mısır hattının toplam bant sayısının 45 olduğunu belirleyerek en az allel üreten araştırıcılardır. Enoki ve ark. (2002) ve Li ve ark. (2004); sırasıyla ortalama allel sayısını 65 mısır hattında en yüksek ve 56 cin mısırı hattında en düşük bulan araştırıcılardır.

Bu araştırmada PIC (Polimorphic information content) değeri 0.04- 0.43 arasında değişmiş olup, ortalama PIC değeri 0,29 olarak bulunmuştur(Çizelge 4.2). En düşük ve en yüksek PIC değerini veren primerler sırasıyla; bnlg249 ve phi015' dir. Cheng-Lai ve ark. (2010), 112 SSR markırı ile yapmış oldukları çalışmada, PIC değerini 0,2053 ile 0,6446 arasında bulmuşlardır. Pabendon ve ark. (2009), 30 SSR markırı kullanarak mısır hatlarında yaptıkları genetik çeşitlilik çalışması sonucunda, PIC değerinin 0.22-0.80 arasında olduğunu ve ortalama PIC değerinin 0.60 olduğunu gözlemlemişlerdir. Xu ve ark. (2004), mısırda 43 SSR primeri kullanarak yaptıkları araştırma sonucunda, PIC değerinin 0.28 ile 0.81 arasında bir değer aldığını ve ortalama PIC değerinin 0,6281 olduğunu bulmuşlardır. Warburton ve ark. (2002), mısırda 85 tane tekrarlanabilen SSR markırı kullandıkları çalışma sonucunda, PIC değerinin 0.46-0.85 arasında değiştiğini belirlemişlerdir. Laborda ve ark. (2005), mısırda 50 SSR primeri ile yaptıkları çalışmada, PIC değerinin 0.24-0.90 arasında değiştiğini ve ortalama PIC değerinin 0.61 olduğunu bildirmişlerdir. Phumichai ve ark. (2008), mısırda 64 SSR markırı kullandıkları araştırmada, PIC değerinin 0.24-0.89 arasında değiştiğini ve ortalama PIC değerinin 0.69 olduğunu bulmuşlardır. Enoki ve ark. (2002), 60 SSR markırı kullanılarak yapılan çalışmaları sonucunda, SSR lokuslarındaki PIC değerinin 0.41-0.91 arasında değerler aldığını ve ortalama değerin ise 0.69 olduğunu gözlemlemişlerdir. Beyene ve ark. (2005), mısırda 20 SSR markırı kullanarak yaptıkları

genetik çeşitlilik çalışmasında, PIC değerinin 0.06 ile 0.76 arasında değerler aldığını, ortalama PIC değerini ise 0.61 olduğunu bildirilmişlerdir.

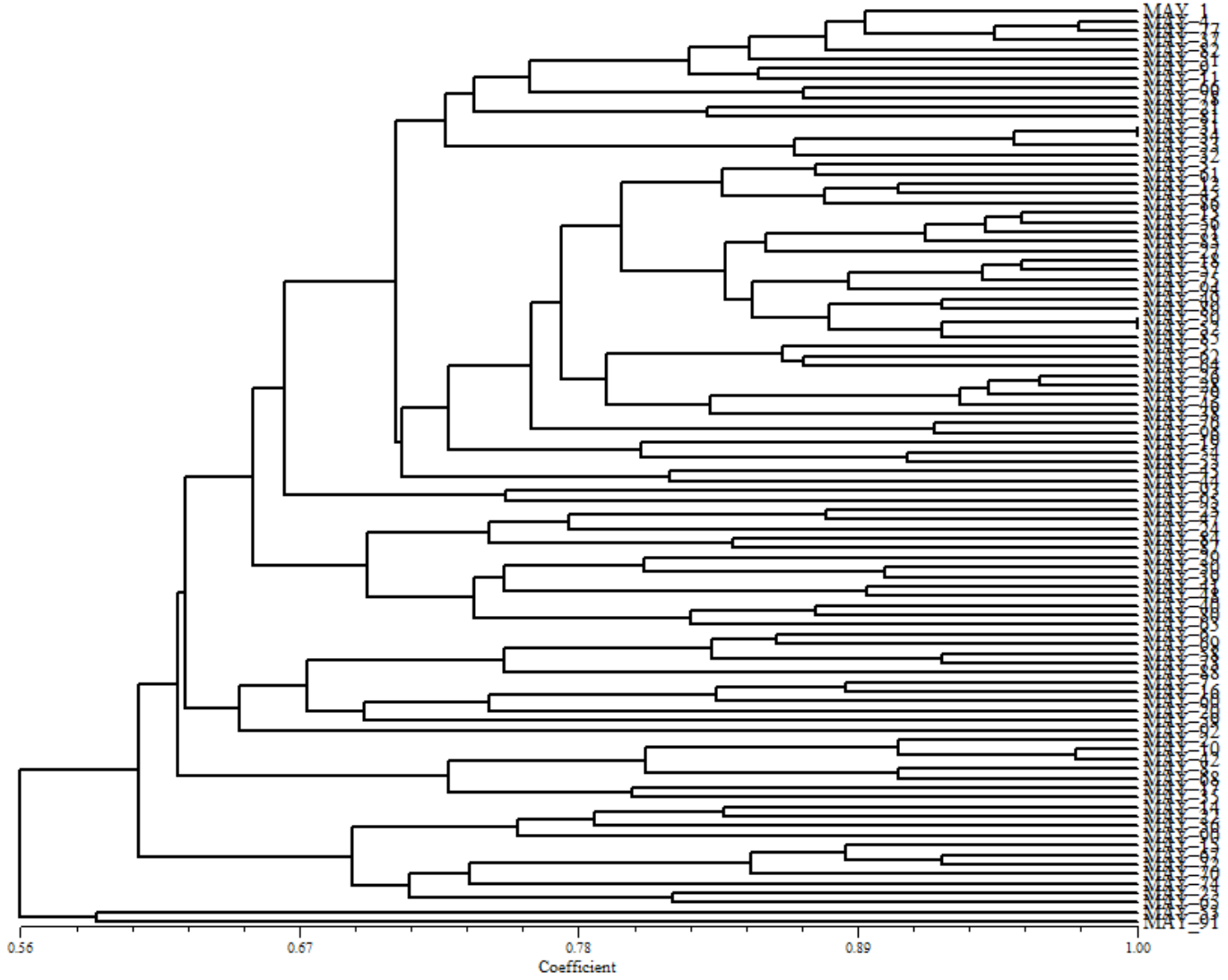
Araştırmada 96 adet MAY hattında yapılan genetik çeşitlilik çalışması sonuçlarına göre elde edilen filogenetik ağaç Şekil 4.3. de sunulmuştur. UPGMA analizi ile elde edilen sonuçlara göre, 96 adet mısır hattı 2 grup oluşturmuş ve hatlar arasındaki genetik uzaklık değeri 0.56-1.00 katsayıları arasında bulunmuş olup, ortalama değerin 0.78 olduğu tespit edilmiştir.

UPGMA analizi ile elde edilen filogenetik ağaç değerlendirildiğinde, tropik kökenli olan MAY31 ile MAY34 ve MAY50 ile MAY52 hatlarının %100 benzer olduğu görülmüştür. Kullanılan mısır hatlarından MAY1 ve MAY91 hatlarının birbirine en uzak iki hat olduğu gözlemlenmiş olup, bu iki hattın melezlenmesi sonucunda en yüksek "melez azmanlığını" gösterebileceği ve bununla beraber iki gruba giren MAY4, MAY77, MAY37, MAY82, MAY51, MAY9, MAY11, MAY66, MAY78, MAY21, MAY81 ve MAY14, MAY22, MAY36, MAY90, MAY15, MAY6, MAY72, MAY70, MAY74, MAY25, MAY65, MAY53 mısır hatları arasında yapılacak melezlemelerde daha yüksek melez azmanlığı görülebileceği tahmin edilmektedir. MAY1 hattının SS (stiff stalk), MAY91 hattının ise tropik kökenli olduğu bilinmekte olup bu durum iki hat melezlendiğinde elde edilen F1' in melez azmanlığı göstereceğini doğrulamaktadır.

Li ve ark. (2004), yapmış oldukları çalışmada, 56 tane cin mısır hattı arasındaki genetik uzaklık değerinin 0,1247-0,7295 arasında değerler aldığını, ortalama değerin ise 0,4768 olduğunu, 21 normal mısır hattının ise 0,2988-0,7150 katsayıları arasında değerler aldığını, ortalama değerin 0,5833 olduğunu araştırma sonucunda tespit etmişlerdir. Laborda ve ark. (2005), 85 tropik mısır hattı arasındaki genetik uzaklık değerinin 0.22-1.00 katsayıları arasında değiştiğini, ortalama değerin 0.61 olduğunu bildirmişlerdir. Enoki ve ark. (2002), 65 mısır hattında SSR markırları ile yaptıkları genetik çeşitlilik çalışması sonucunda, kullanmış oldukları mısır hatları arasındaki genetik uzaklık değerinin 0.25-0.85 arasında olduğunu, ortalama değerin ise 0.55 olduğunu belirtmişlerdir. Phumichai ve ark. (2008), 7 ticari tek melez mısır çeşidinde SSR markırları ile yaptıkları genetik çeşitlilik çalışması sonucunda, aralarındaki genetik uzaklık katsayılarının 0,333-0,658 arasında değerler aldığını, ortalama değerin ise 0,421 olduğunu tespit etmişlerdir. Pabendon ve ark. (2009), 34 mısır saf hattı ile yaptıkları araştırmada, hatlar arasındaki genetik uzaklık değerinin 0.23-0.83 katsayıları arasında

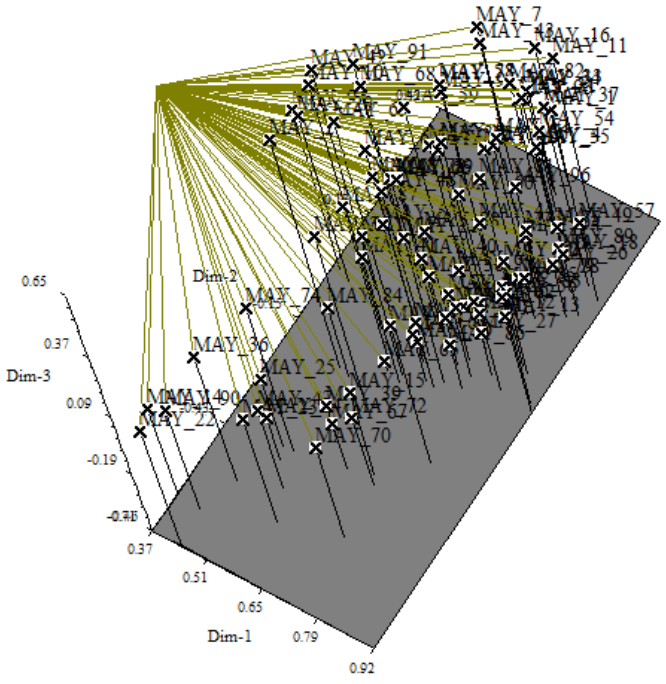
değiştiğini, ortalama değerin ise 0.53 olduğunu bildirmişlerdir. Xu ve ark. (2004), yaptıkları çalışma sonucunda, 15 elit saf mısır hattındaki genetik uzaklığın 0.1-0.6 arasındaki katsayı değerlerini aldığını belirlemişlerdir.

Doksanaltı adet MAY hattında yapılan genetik çeşitlilik çalışması sonuçlarına göre hatlar arasındaki genetik uzaklık değeri 0.56-1.00 katsayıları arasında bulunmuş olup, ortalama değerin 0.78 olduğu gözlemlenmiştir. Laborda ve ark. (2005), 85 tropik mısır hattı arasındaki genetik uzaklık değerinin 0.22-1.00 katsayıları arasında değiştiğini ve ortalama değerin 0.61 olduğunu bildirerek en yüksek genetik uzaklık değerini tespit etmişlerdir.



Şekil 4.3. 96 adet MAY hattına ait filogenetik ağaç.

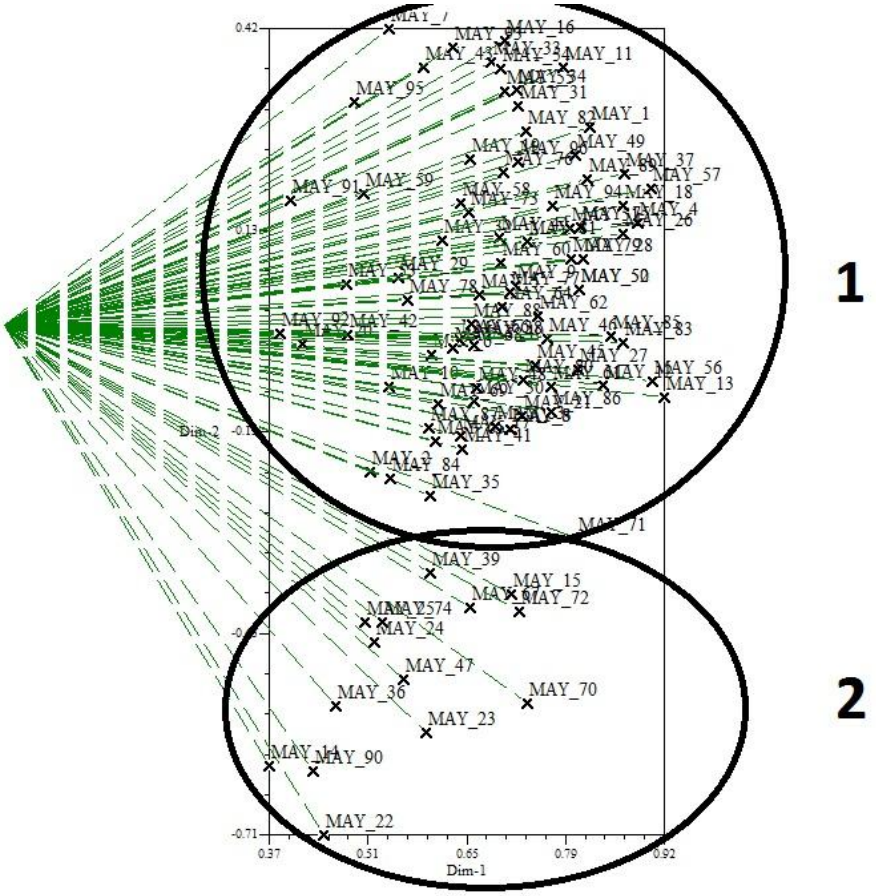
Şekil 4.4 ve Şekil 4.5’ de sırasıyla analiz sonuçlarından elde edilen 2D ve 3D görünümleri verilmiştir. Yapılan araştırmada PCA (Principle Component Analysis) ölçülerek 2D ve 3D plotları üretilmiştir. Mısır hatlarının birbirlerine olan uzaklıkları 2D plot ile iki boyutlu, 3D plot ile üç boyutlu olarak gözlemlenmiştir ve mısır hatlarının oluşturduğu iki grup daha net bir şekilde ortaya konulmuştur. Şekil 4.4 ve Şekil 4.5’ de MAY14, MAY15, MAY22, MAY23, MAY24, MAY25, MAY36, MAY39, MAY47, MAY67, MAY70, MAY72, MAY74, MAY90 mısır hatlarının bir grup ve diğer MAY hatlarının ikinci bir grup oluşturduğu görülmektedir.



Şekil 4.4. 96 adet MAY hattının SSR sonuçlarına göre 2D görünümü.

Şekil 4.5‘ de verilen 96 adet MAY mısır hatlarının SSR sonuçlarına göre 3D görünümü incelendiğinde MAY14, MAY15, MAY22, MAY23, MAY24, MAY25, MAY36, MAY39, MAY47, MAY67, MAY70, MAY72, MAY74, MAY90 mısır hatlarının ikinci grupta ve diğer MAY mısır hatlarının ise birinci grupta olduğu gözlemlenmektedir. MAY mısır hatlarından birinci grupta yer alan 32 hattın SS, 15 hattın lancaster, 28 hattın tropik, 7

hattın herhangi bir gruba (unreleated) ait olmadığı ve ikinci grupta yer alan 14 hattan 10 hattın lancaster, 4 hattın ise tropik kökenli olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.5: 96 adet MAY hattının SSR sonuçlarına göre 3D görünümü.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1 Sonuçlar

Bu araştırmada, 96 adet atdişi mısır hattının SSR markırları kullanılarak genetik çeşitliliği tespit edilmiştir. Herbir mısır hattında 10 bitkiden numune alınarak DNA ekstraksiyonu çıkarılmış ve 26 adet SSR primeri kullanılarak PCR işlemine tabi tutulmuştur. SSR markırları numerik veri olarak, mısır hatlarının genomik DNA kısımlarında var olanlar (1), olmayanlar ise (0) olarak skorlanmıştır. Markırların farklı tipleri ile elde edilen datalar arasındaki karşılaştırmanın yapılmasında Mantel (1967) testi kullanılmıştır.

Araştırma sonuçlarında kullanılan 26 adet polimorfik primerden, bu çalışmada kullanılar hatlar üzerinde 22 tane primerin polimorfik özellik gösterdiği ve phi008, phi083, umc1122 ve umc1630 primerlerinin monomorfik özellik gösterdiği saptanmıştır. SSR primerlerinin 96 tane mısır hattında 70 adet allel ürettiği, lokus başına düşen allel sayısının 2-4 arasında değerler aldığı ve ortalama her bir SSR lokusu başına 2.69 allel oluşturduğu belirlenmiştir. PIC değerinin 0.04- 0.43 arasında değiştiği, ortalama PIC değerinin 0,29 olduğu sonucuna varılmıştır. En düşük PIC değerini veren primer bnlg249 ve en yüksek PIC değerini veren primer ise phi015 olup, UPGMA analizi ile elde edilen sonuçlarda ise 96 adet mısır hattının 2 grup oluşturduğu ve hatlar arasındaki genetik uzaklık değerinin 0.56-1.00 katsayıları arasında değiştiği ve ortalama uzaklık değerin 0.78 olduğu tespit edilmiştir. Analizler sonucunda oluşturulan filogenetik ağaca göre; MAY1, MAY4, MAY77, MAY37, MAY82, MAY51, MAY9, MAY11, MAY66, MAY78, MAY21, MAY81 ve MAY14, MAY22, MAY36, MAY90, MAY15, MAY6, MAY72, MAY70, MAY74, MAY25, MAY65, MAY5, MAY91 mısır hatları arasında yapılacak melezlemelerde daha yüksek melez azmanlığı görülebileceği tahmin edilmiştir. Doksanaltı adet MAY mısır hatlarının SSR sonuçlarına göre Şekil 4.5' de sunulan 3D görünümü değerlendiğinde iki grup gözlemlenmiştir. MAY14, MAY15, MAY22, MAY23, MAY24, MAY25, MAY36, MAY39, MAY47, MAY67, MAY70, MAY72, MAY74, MAY90 mısır hatlarının ikinci grupta ve diğer MAY mısır hatlarının ise birinci grupta olduğu sonucuna varılmış, birinci grupta yer alan tropik kökenli MAY31 ile MAY34 ve MAY50 ile MAY52 hatlarının %100 benzer olduğu görülmüştür ve MAY mısır hatlarından birinci grupta yer alan 32 hattın SS, 15 hattın lancaster, 28 hattın tropik, 7 hattın herhangi bir gruba (unreleated) ait olmadığı ve ikinci grupta yer alan 14 hattan 10 hattın lancaster, 4 hattın ise tropik kökenli olduğu tespit edilmiştir.

5.2 Öneriler

Yüksek maliyetli ve zaman alıcı klasik ıslah metotları ile istenilen düzeyde yüksek verimli ve hastalıklara toleranslı mısır hat ve hibritleri elde edilmiş olmasına rağmen; küresel ısınmanın sebep olduğu iklim değişiklikleriyle ortaya çıkan; gece-gündüz arasındaki yüksek sıcaklık farklılıkları, kuraklık, yeni hastalık ve zararlılar ve benzeri etkenlerden dolayı mısırda verim kayıpları oluşmaktadır. Islah faaliyetlerinde hiçbir ürün tesadüfi olarak ortaya çıkmamakta, bitki ıslahçılarının tarla gözlemleri ve verim sonuçlarına göre elde ettiği deneyimler sayesinde farklı hibrit kombinasyonları ile yeni hat popülasyonları elde edilmektedir. Islah programlarında mevcut gen kaynaklarının genetik tabanının bilinmesi ıslah programlarının yönlendirilmesinde çok önemlidir. Mısır hat ve hibrit ıslahında melezlenen ebeveynler birbirinden genetik olarak ne kadar uzaksa elde edilen varyasyon o kadar büyük olmakta ve bu olay ıslahçılar tarafından gen kaynaklarının korunması ve arttırılması açısından büyük önem taşımaktadır.

Günümüzde klasik ıslah faaliyetlerine eklenen DNA markırları ile mısır hatları arasında yapılan genetik yakınlık-uzaklık çalışmaları sonucunda mevcut gen kaynaklarının birbirlerine olan uzaklıkları ve hatların bulunduğu heterotik gruplar tespit edilmektedir. Gelişen bu teknoloji ile yapılan çalışmalar, ıslah faaliyetlerinin planlanması ve gen kaynaklarının korunmasında büyük kolaylık sağlamakta ve bitki ıslahçılarının başarı şansını arttırmakla beraber ıslahçılar tarafından en yüksek "melez azmanlığını" verecek hatların melezlenmesiyle zaman, emek ve maddi tasarrufu sağlayarak ülke ekonomisine de katkıda bulunmaktadır.

SSR tekniğinin kullanımı, genetik tabanlı seleksiyon çalışmalarında her geçen gün artmaktadır. SSR primerleri yüksek oranda polimorfik bant verme özelliğine sahip olduğundan bitkilerde genetik tabanlı ayrımlarda önem arz etmektedir.

KAYNAKLAR

Anonim 2010, Hububat Raporu 2010, Toprak Mahsulleri Ofisi Genel Müdürlüğü, Ankara, http://www.tmo.gov.tr/Upload/Document/yayinlar/2010_Hububat_Raporu.pdf [Ziyaret Tarihi: 15 Nisan 2011].

Baenziger, S., 2010, Bitki ıslahı genel ilke ve uygulama alanları eğitim notları, *Bitki Islahı Eğitimi*, May Agro Tohumculuk A.Ş. Bursa.

Beyene Y., Botha A.M., Myburg A.A., 2005, A comparative study of molekular and morphological methods of describing genetic reletionships in traditional Ethiopian highland maize, *African Journal of Biotechnology*, 4(7):586-595.

Brown, D., 2009, Growing corn in the GH. University of Kentucky, Dept of Plant Pathalogy, Lexington,http://www.ca.uky.edu/agcollege/plantpathology/Vaillanc/Growing%20Corn%20in%20GH.pdf [Ziyaret Tarihi: 15 Mart 2011].

Carvalho, V.P., Ruas, C. F., Ferraira, J.M., Moreira, R.M.P. and Ruas, P.M., 2004, Genetic diversity among maize (*Zea mays* L.) landraces assessed by RAPD markers, *Genetics and Molecular Biology*, 27 (2): 228-236.

Cheng- Lai, W., Qian-Qian, Z., Bing-Xue, D., Sheng-Fu, L., Chun-Qing, Z., 2010, Analaysis of genetic structure and relationships of maize inbred lines in China, *ScienceDirect*, 36(11):1821-1831.

Cömertpay, G., 2008, Yerel mısır populasyonlarının morfolojik ve DNA moleküler işaretleyicilerinden SSR tekniği ile karakterizasyonu, Doktora Tezi, *Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Adana, sf. 103.

Darrah, L.L. and Zuber, M.S., 1986, United states farm maize germplasm base and comercial breeding, *Crop Science*, 26: 1109-1113.

Dice, L.R., 1945, Measures of the amount of ecologic association between species. Ecology 26:297–302.

Enoki, H., Sato, H., Koinuma, K., 2002, SSR analysis of genetic diversity among maize inbred lines adapted to cold regions of Japon, *Theor Appl Genet*, 104:1270-1277.

Fulton, T.M., Chunwongse, J. and Tanksley, S.D., 1995, microprep protocol for extraction of DNA from tomato and other herbaceous plants, *Plant molecular biology reporter*, 13 (3): 207-209.

Gethi, J. G., Labate, J. A., Lamkey, K. R., Smith, M. E. and Stephen Kresovic, 2002, SSR variation in important U.S. maize inbred lines, *Crop Science*, 42:951-957.

Glover, M.A., Willmot, D.B., Darrah, L.L., Hibbard, B.E. and Zhu, X., 2005, Diallel analyses of agronomic traits using Chinese and U.S. maize germplasm, *Crop Sci.*, 45:1096–1102.

Goodman, M.M., 1990, Genetic and germplasm stocks worth conserving, *Journal of Heredity*, 81(1): 11-16.

Goodman M.M., 1999, Broadening the genetic diversity in maize breding by use of exotic germplasm, Chapter 13/ Coors J.G.-Pandey S., *Madison USA, The Genetics and Exploitation of Heterosis in Crops*, 13:139-148.

İpek, M. 2009, Akdeniz ve Doğu Anadolu Bölgelerinden seçilen bazı dut (*Morus spp.*) genotiplerinin moleküler karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya, sf. 51.

Karunaratne, K.M., 2002. Combining ability of inbred lines and its usefulness in variety development of maize, 137- Annals of the Sri Lanka Department of Agriculture, 4: 137-141.

Kırtok, Y., 1998, Mısır Üretimi ve Kullanımı, *Kocaoluk Basım ve Yayınevi*, İstanbul, sf. 445.

Laborda, P.R., Oliveira, K.M. and Garcia, A.A.F., 2005, Tropical maize germplasm: what can we say about its genetic diversity in the light of molekular markers, *Theor Appl Genet*, 111:1208-1299.

Leal, A.A., Mangolin, C.A., Junior, A.T.A., Gonçalves, L.S.A., Scapim, C.A., Mott, A.S., Eloi, I.B.O., Cordoves, V. and Silva, M.F.P., 2010, Efficiency of RAPD versus SSR markers for determining genetic diversity among popcorn lines, *Genetics and Molecular Research*, 9 (1): 9-18.

Li, Y.L., LV., D.B., Wang, Y.Z., Chen, S.J. and Tang, J.H., 2004, Study on the genetic diversity of popcorn inbreds and their germplasm relationship with normal corn inbreds using SSR markers, *Maydica*, 49:327-333.

Liu, K., Goodman, M., Muse, S., Smith, J.S., Buckler, E. and Doebley, J., 2003, Genetic structure and diversity among maize inbred lines as inferred from DNA microsatellites, *Genetics Society of America*, 165: 2117–2128.

Lu,Y., Yan,J., Guimaraes, C. T., Taba, S., Hao,Z., Gao,S., Chen, S., Li, J., Zhang, S., Vivek, B. S., Magorokosho, C., Mugo, S., Makumbi, D., Parentoni, S. N., Shah, T., Rong, T., Crouch, J. H. and Xu, Y., 2009, Molecular characterization of global maize breeding germplasm based on genome-wide single nucleotide polymorphisms, *Theor Appl Genet* 120:93–115.

Mantel, N., 1967, The detection of disease clustering and a generalized regression approach, *Cancer Research*, 27:175-178.

Mohammadi,S.A. and Prasanna B.M., 2003, Analysis of genetic diversity in crop plants-Salient statistical tools and considerations, *Crop Science*, 43:1235-1248.

Moose, S.P. and Mumm, R. H., 2008, Molecular plant breeding as the foundation for 21st Century crop improvement, *Plant Physiology*, 147:969-977.

Nelson, P.T., Coles, N.D., Holland, J.B., Bubeck, D.M., Smith, S. and Goodman, M.M., 2008, Molecular characterization of maize inbreds with expired U.S. plant variety protection, *Crop Science*, 41:1651–1652.

Özmen, İ., 2008, Bazı melez mısır çeşit ve genotiplerinin değişik ekim bölgelerindeki adaptasyon ve uyum yeteneklerinin belirlenmesi üzerine araştırmalar, Doktora Tezi, *Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, İzmir, sf. 114.

Pabendon, M.B., Mejaya, M.J., Koswara, J., and Aswidinnoor, H., 2009, SSR-based genetic diversities among maize inbred lines and their relationships with F1 phenotypic data of MR4 and MR14 testcrosses, *Indonesian Journal of Agriculture*, 26:69-77.

Peleman, J.D. and Voort, J.R., 2003, Breeding by design, *Plant Science*, 8(7), 330-334.

Phumichai, C., Dougchan, W., Puddhanon, P., Jampatong, S., Grudloyma, P., Kirdsri, C., Chunwongse, J. and Pulam, T., 2008, SSR based and grain yield-based diversity of hybrid maize in Thailand, *Field Crops Research*, 108: 157-162.

Reif, J.C., Melchinger, A.E., Xia, X.C., Warburton, M.L., Hoisington, D.A., Vasal, S.K., Srinivasan, G., Bohn, M., and Frisch, M., 2003, Genetic distance based on simple sequence repeats and heterosis in tropical maize populations, *Crop Science*, 43:1275-1282.

Remington, D.L., Thornberry, J.M., 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, *PNAS*, 98(20), 11479-11484.

Rinke, E.H. and Hayes, H.K., 1963, General and specific combining ability in diallel crosses of 15 inbred lines of corn, *Botanical Bulletin of Academia Sinica*,5:36-41.

Senior, M.L., Murphy, J.P., Goodman, M.M. and Stuber, C.W., 1998, Utility of SSRs for determining genetic similarities and relationships in maize using an agarose gel system, *Crop Science*, 38 (4): 1088-1098.

Souza, S. G. H, Pipolo, V. C. and Ruas, C. F., 2008, Comparative analaysis of genetic diversity among the maize inbred lines (*Zea mays L.)* obtained by RAPD and SSR markers, *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 51 (1), 183-192.

Trindade, A.P.R., Pinto, R.J.B., Junior, A.T.A., Mangolin, C.A., Machado, M.F.P.S. and Scapim, C.A., 2010, Genetic diversity of breeding popcorn lines determined by SSR markers, *Electronic Journal of Biotechnology*, 13(1), 1-11.

Turgut, İ., 2001, Tahıllar II (Sıcak iklim tahılları) Ders Kitabı, Ders Notları No: 87, *Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi*, Bursa, sf. 92.

Warburton, M., Xianchun, X., Ambriz, S., Diaz, L., Villordo, E. and Hoisington, 2001, Use of molekular markers in maize diversity studies at CIMMYT, *Seventh Eastern and Southern Africa Regional Maize Conference*,Mexico, 130-133.

Warburton, M.L., Xianchun, X., Crossa, J., Franco, J., Melchinger, A.E., Frisch, M., Bohn, M. and Hoissignton, D., 2002, Genetic Characterization of CIMMYT inbred maize lines and open pollinated populations using large scale fingerprinting methods, *Crop Science*, 42:1832-1840.

Xia, X.C., Reif J.C., Melchinger, A.E., Frisch M., Hoisington, D.A., Beck, D., Pixley, K., and Waburton, M.L., 2005, Genetic diversity among CIMMYT maize inbred lines investigated with SSR markers: II. subtropical, tropical midaltitude, and highland maize inbred lines and their relationships with elite U.S. and European maize, *Crop Science*, 45:2573-2582.

Xu, S.X., Liu, J. and Liu G.S., 2004, The use of SSRs for predicting the hybrid yield and yield heterosis in 15 key inbred lines of Chinese maize, *Hereditas*, 141:207-215.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

AdıSoyadı	**:**	BaşakZeybekoğlu
Uyruğu	**:**	T.C.
DoğumYeriveTarihi	**:**	Bursa/ 25.01.1982
Telefon	**:**	0535 929 41 41
Faks	**:**	0224 351 45 18
e-mail	**:**	basak.zeybekoglu@may.com.tr

EĞİTİM

Derece		**Adı, İlçe, İl**	**BitirmeYılı**
Lise	:	Bursa Fatih Lisesi, Nilüfer, Bursa	1998
Üniversite	:	UludağÜniversitesi	2004
YüksekLisans	:	SelçukÜniversitesi	-
Doktora	:		

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	**Kurum**	**Görevi**
2004- 2011	May-Agro Tohumculuk A.Ş.	AraştırmaUzmanı-HibritMısır
2011-halen	May-Agro Tohumculuk A.Ş.	IslahçıYardımcısı-HibritMısır

UZMANLIK ALANI: Mısır Islahı

YABANCI DİLLER: İngilizce

BELİRTMEK İSTEĞİNİZ DİĞER ÖZELLİKLER

Başak ZEYBEKOĞLU, 1982 yılında Bursa' da doğdu. İlköğretim ve Lise eğitimini Bursa' da tamamladı. 2000 yılında girdiği Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitkisel Üretim Programı Bitki Koruma Bölümünden 2004 yılında mezun oldu. 2005 Aralık- 2006 Şubat dönemi arasında Malta EF Dil okullarında 3 ay İngilizce dil eğitimi aldı. Araştırıcı, 2004 yılında May-Agro Tohumculuk A.Ş.' de Mısır Islah Asistanı olarak çalışmaya başladığı firmada, Hibrit Mısır-Islahçı Yardımcısı olarak görevini sürdürmeye devam etmektedir.