



T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KENDİLENMİŞ AT DİŞİ MISIR HATLARINDA GENETİK ÇEŞİTLİLİĞİN SSR VE ISSR MARKÖRLERİ İLE BELİRLENMESİ

Mehmet Akif YAŞAR

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Tarla Bitkileri Anabilim Dalı

Ağustos-2019
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KENDİLENMİŞ AT DİŞİ MISIR HATLARINDA GENETİK ÇEŞİTLİLİĞİN SSR VE ISSR MARKÖRLERİ İLE BELİRLENMESİ

Mehmet Akif YAŞAR

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Tarla Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Mustafa YORGANCILAR

2019, 44 Sayfa

Jüri
Prof. Dr. Süleyman SOYLU
Doç. Dr. Mustafa YORGANCILAR
Dr. Öğr. Üyesi Ali Tevfik UNCU

Bu araştırmada 38 adet saf hat mısır hattının (*Zea mays* L. indentata Sturt.) genetik çeşitliliği SSR ve ISSR markörleri kullanılarak belirlenmiştir. Çalışmada 20 adet SSR ve 20 adet ISSR markörü tüm hatlar üzerinde denenmiş olup, SSR markörlerinden 11 tanesi polimorfik özellik gösterirken 9 tanesi monomorfik özellik göstermiştir. ISSR markörlerinde ise 17 tanesi polimorfik özellik gösterirken 3 tanesi monomorfik özellik göstermiştir. SSR markörleri kullanılarak yapılan çalışmada 40 adet allel üretilmiş olup lokus başına düşen allel sayısı 2-4 arasında değer alırken her bir SSR lokusu başına ortalama 3.3 allel saptanmıştır. ISSR markörleri kullanılarak yapılan çalışmada 97 adet allel üretilmiş olup, lokus başına düşen allel sayısı 2-8 arasında değer alırken, her bir ISSR lokusu başına düşen allel sayısı 5.7 olarak saptanmıştır. Çalışmada PBİ (Polimorfik bilgi içeriği) değeri SSR markörleri için 0.51-0.92 arasında değişirken, ISSR markörleri için 0.28-.072 arasında değişmiştir. Çalışmada kullanılan 38 adet at dişi mısır hattının UPGMA analizi ile her iki markör sistemi için ayrı ayrı filogenetik ağaç oluşturulmuş olup, genellikle 3 ana grupta toplanmakla birlikte incelenen bütün hatlar her iki markör tipinde de belirgin bir şekilde birbirinden ayrılmıştır. Hibrit mısır ıslahında yüksek verim ve kalitenin temelini heterosis kavramı oluşturmaktadır. Heterosisin etkin bir şekilde kullanılması, melezlemede kullanılan saf hatlara ait genetik çeşitliliğin bilinmesi ile mümkün olmaktadır. Yüksek verimli hibrit mısır elde etmek için oluşturulan saf hatları arasındaki genetik çeşitliliğin fazla olması, aynı oranda verim artışı sağlamaktadır.

Anahtar Kelimeler: Mısır, Genetik çeşitlilik, Moleküler markör, SSR, ISSR

ABSTRACT

MS THESIS

DETERMINATION OF GENETIC DIVERSITY WITH SSR AND ISSR MARKERS IN DENT CORN INBRED LINES

Mehmet Akif YAŞAR

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

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Mustafa YORGANCILAR

2019, 44 Pages

Jury
Prof. Dr. Süleman SOYLU
Assoc. Prof. Dr. Mustafa YORGANCILAR
Asst. Prof. Dr. Ali Tevfik UNCU

In this study, genetic diversity of 38 pure maize lines (*Zea mays* L. indentata Sturt.) was determined by using SSR and ISSR markers. In this study, 20 SSR and 20 ISSR markers were tested on all lines. 11 of the SSR markers showed polymorphic properties while 9 showed monomorphic properties. In ISSR markers, 17 showed polymorphic properties and 3 showed monomorphic properties. In the study using SSR markers, 40 alleles were produced and the number of alleles per locus was between 2-4, with an average of 3.3 alleles per SSR locus. In this study, 97 alleles were produced by using ISSR markers, the number of alleles per locus was between 2-8 and the number of alleles per each ISSR locus was 5.7. In the study, PBI (Polymorphic information content) value ranged from 0.51-0.92 for SSR markers to 0.28-0.72 for ISSR markers. UPGMA analysis of 38 dent corn lines used in the study, phylogenetic trees were formed separately for both marker systems. The concept of heterosis is the basis of high yield and quality in hybrid corn breeding. The effective use of heterosis is possible by knowing the genetic diversity of the pure lines used in hybridization. The high genetic diversity between the pure lines for obtaining high yield hybrid maize yields the same increase in yield.

Keywords: *Zea mays*, Genetic variation, Molecular marker, SSR, ISSR

ÖNSÖZ

Dünya nüfusunun hızlı bir şekilde artış göstermesi ve buna bağlı olarak besin maddesi ihtiyacı, sanayide ürün eldesin de gerekli hammadde ihtiyacı gibi nedenlerle mısır üretimine olan talep sürekli olarak artış göstermektedir. Bu artışın yanında iklim koşullarının değişmesi, hastalık ve zararlı popülasyonlarının artış göstermesi dünya üzerinde üretimi sınırlandıracak etmenleri oluşturmaktadır. Bu sınırların aşılması; ekstrem iklim koşullarına dayanıklı, yüksek verim potansiyeline sahip, hastalık ve zararlılara dayanıklı yeni hibrit mısır çeşitlerinin geliştirilmesi ile mümkün olacaktır. Yeni hibrit mısır çeşitlerinin geliştirilmesi ise; elde var olan popülasyonda ki genetik yapının bilinmesi, buna bağlı olarak oluşturulacak başarılı melez kombinasyonları ve kaliteli bir ıslah programının yürütülmesi ile mümkün olmaktadır.

Yapmış olduğum bu çalışmada benden bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen, sürekli yol gösteren, değerli vakitlerini benimle paylaşan danışman hocam Doç. Dr. Mustafa YORGANCILAR'a, takıldığım her noktada beni kurtaran, bilgi ve tecrübelerini hiç esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Emine ATALAY'a teşekkürü bir borç bilirim. Ayrıca çalışmamda kullandığım materyalin temini konusunda destek olan Bahri Dağdaş Uluslararası Tarımsal Araştırma Enstitüsü personeli Ziraat Yüksek Mühendisi Mehmet TEZEL'e, çalışmamda yardım ve desteklerini esirgemeyen, çalışmamın her anında yanımda olan Ziraat Mühendisi Mustafa UYSAL' a, Ziraat Mühendisi Ayhan AYDOĞDU' ya, Ziraat Teknikeri Esra ARSLANTAŞ'a, ve beni bu günlere getiren maddi ve manevi desteklerini hiç esirgemeyen anne ve babama sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yaşamım boyunca her aşamada olduğu gibi tez çalışmam süresince de bana desteklerini, dualarını ve yardımlarını esirgemeyen değerli babam Adil YAŞAR'a, annem Fatma YAŞAR'a ve kardeşlerime sevgilerimi ve en içten sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Mehmet Akif YAŞAR
KONYA-2019

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **i**

ABSTRACT ..... **ii**

ÖNSÖZ ..... **iii**

İÇİNDEKİLER ..... **iv**

SİMGELER VE KISALTMALAR ..... **v**

1. GİRİŞ **1**

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI **2**

3. MATERYAL VE METOT **9**

3.1. Materyal 9
3.2. Metod 11
3.2.1. Bitkilerin yetiştirilmesi 11
3.2.2. DNA izolasyonu 11
3.2.3. DNA konsantrasyonu ve saflıklarının belirlenmesi 14
3.2.5. Elekroforez uygulamaları 17
3.2.6. Primerlerin polimorfizm oranlarının belirlenmesi 20
3.2.7. Polimorfizm bilgi içeriklerinin belirlenmesi 20
3.2.8. Primerlerin ayırma güçlerinin hesaplanması 21
3.2.9. Veri analizleri 21

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA **23**

4.1. DNA İzolasyon Sonuçları 23
4.2. Genetik Analizler 25
4.2.1. SSR markörlerinin analizi 25
4.2.2. ISSR markörlerinin analizi 31

5. SONUÇ VE ÖNERİLER **36**

5.1 Sonuç 36
5.2 Öneriler 38

KAYNAKLAR **40**

ÖZGEÇMİŞ **44**

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

C: Santigrat Derece

CIMMYT: The International Maize and Wheat Improvement Center (Uluslararası 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 (PBİ=Polimorfik bilgi içeriği)

PVP: Plant variety protection (Bitki çeşitlerini koruma)

rpm: dakikadaki devir sayısı

RRS: Resiprok tekrarlanan seleksiyon

SS: Stiff Stalk

SSR: Simple Sequense Repeats (Basit dizi tekrarları)

TBE: Tris-Borik Asit-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

1. GİRİŞ

Mısır, hem insan hem hayvan beslenmesinde hem de endüstride geniş kullanım alanı bulan buğday ve çeltikten sonra en fazla tarımı yapılan önemli ve stratejik bir bitkidir. İçerdiği zengin besin maddeleri açısından insan beslenmesinde kullanılmasının yanı sıra, nişasta, yağ, glikoz ve yem sanayisinde hammadde olarak kullanılmaktadır. Dünya nüfusunun hızla artması, endüstride farklı ürünlerin elde edilmesi için gerekli hammadde ihtiyacının artmasından dolayı mısıra olan talep hızlı bir şekilde artış göstermektedir. Ülkemiz mısır üretimi danelik ve yeşil hasat olarak toplam 11 253 140 dekar ekim alanına sahip olup, toplam mısır ekilen alanın 6 390 844 dekarını danelik, 4 862 296 dekarını yeşil hasat edilen alan oluşturmuştur. Danelik olarak hasat edilen ürün miktar 5 900 000 ton olurken, yeşil hasat edilen miktar ise 23 373 725 ton olarak rapor edilmiştir (TÜİK, 2017). Dünya genelinde ise, danelik olarak ekilen alan 187 959 116 hektar, toplam üretim 1 060 107 470 ton olarak rapor edilmiştir (FAO, 2016).

Mısır, binlerce yıldan beri tarımı yapılan birkaç ender bitkiden biridir. ABD'nin New Mexico eyaletinde yapılan arkeolojik kazılarda bulunan mısır tane ve koçanlarının yaklaşık 5000 yıllık olduğu tespit edilmiştir. Taksonomik sınıflandırma içerisinde *Teosinte* yabani bir bitki olup mısırın yakın akrabası olarak bilinir. *Teosinte* Guetamala'da ve Meksika'da doğal bir bitki olarak bulunur ve endemik bitkiler arasında yer alır. Bundan dolayı mısırın orijininin Meksika olduğu da düşünülmektedir. Hem mısır hem de *Teosinte Zea* (2n=20, 40 x=10)cinsine ait bitkilerdir (Wilkes, 1966). Bugüne kadar mısırın orijin ve tarihine ilişkin kesin bir bilgi elde edilememekle birlikte, çeşitli teoriler halen günümüzde tartışılmaktadır. Ancak yapılan tüm arkeolojik kazılardan elde edilen veriler sonucunda mısır bitkisinin 8000 ile 10000 yıllık bir geçmişe sahip olduğunu göstermektedir.

Mısır, *buğdaygiller* (*Poacea*) familyasına ait tek çenekli bir bitkidir. Buğdaygiller içerisinde çiçeklenme biçimi bakımından diğer türlerden farklılık göstermektedir. Çiçekleri monoik yapıda olup erkek ve dişi çiçek aynı bitki üzerinde farklı yerlerde bulunmaktadır. Mısır, 2n=20 kromozoma sahip diploid bir bitkidir. Mısır, deniz seviyesi ile 3000 metreye kadar olan yüksekliklerde dünya'nın farklı bölgelerinde ve ayrıca birçok toprak tipinde tarımı yapılabilmektedir.

Dünya üzerinde endüstride önemli yere sahip, farklı ürün gruplarına dönüştürülmesi mümkün olan mısırın ekonomik önemi gün geçtikçe artmaktadır. Bu hızlı gelişmeye paralel olarak mısır üretimine olan talep giderek artmaktadır. İklim koşullarının değişmesi, kullanılan kimyasal ilaçlara karşı hastalıkların ve zararlıların bağışıklık kazanması, mısır üretiminde istenilen verim artışını sağlamak üzere sürekli olarak yeni hibrit çeşitlerin piyasaya sürülmesi gerekmektedir. Bu talebin karşılanması ise ancak etkili ve sonuç odaklı yürütülen ıslah programlarının uygulanması ile mümkün olmaktadır.

Türkiye'de melez mısır çalışmalarına 1950 yılında başlanmış olup, başlangıçta FAO kanalıyla ABD'den getirtilen çok sayıda melez mısır Türkiye'nin mısır tarımı yapılan çeşitli ekolojik bölgelerinde denemeye alınmış, bu arada yurt içinden ve yurt dışından temin edilen materyal ile kendileme çalışmaları başlatılmıştır. Melez mısır ıslahının esasını teşkil eden kendilenmiş hatların elde edilmesi çalışmalarına da hız verilmiştir (Arıkoğlu, 1979).

Hibrit mısır ıslahında istenilen verim artışını sağlamanın temelini melez azmanlığı denilen heterosis kavramı oluşturmaktadır. İlk kez 1914 yılında araştırmacı Shull tarafından ele alınan heterosis kavramı, iki saf mısır hattının melezlenmesi sonucu oluşan F1 bitkisinin ebeveynlerinden yüksek verim potansiyeli göstermesidir. Bu sebepten dolayı hibrit mısır ıslahının ana noktası; verim potansiyelini arttıracak, ekstrem iklim koşullarında hayatını devam ettirebilen, hastalıklara dayanımı yüksek olan saf hatların geliştirilmesi ve bu hatlar arasında ki heterosisi tespit etmektir. Tüm bu durumlar klasik ıslah metotlarıyla istenilen düzeyde amacına ulaşmış, yeni hibrit çeşitlerin geliştirilmesinde moleküler genetik teknikler büyük fayda sağlamıştır. Gelişen teknoloji ile birlikte yeni ürünlerin geliştirilmesinde yaratıcı girişimlerde bulunan moleküler ıslah, yeni bir alan oluşturmuştur (Peleman ve Voort, 2003).

Hibrit mısır ıslahında klasik metotlarla belli bir aşamaya gelinmiş, istenilen özelliklerde yeni genotiplerin oluşturulması noktasında moleküler teknikler ıslahçılara büyük avantajlar sağlamıştır. Hibrit mısır ıslahının temelini oluşturan heterosisi tespit etmek, melezlemede kullanılan saf hatların genetik ilişkilerinin bilinmesi ile mümkün olmaktadır. Bu noktada moleküler tekniklerden yararlanılarak yapılan genetik yakınlık-uzaklık çalışmaları ile melezlemede kullanılacak saf hatlar arasındaki genetik ilişkiyi ortaya koymaktadır. Herhangi bir gen havuzunda genetik çeşitliliğin bilinmesi,

oluşturulacak olan ıslah programında gerekli olan ön koşuldur. Hibrit çeşit ıslahında elde bulunan mevcut materyalin birbirleri ile olan genetik ilişkilerinin bilinmesi ıslah programının etkinliğine önemli derece katkı sağlamaktadır. Özellikle mısır gen havuzu içinde genetik çeşitlilik çalışmaları çok yoğun bir şekilde kullanılmış ve kullanılmaya devam edilmektedir. Örneğin, Amerika Birleşik Devletleri ticari melez hibrit çeşitlerinin orijini, açık tozlanan "Reid" ve "Lancaster" isimli iki popülasyondan elde edilen saf hatların melezlerine dayanmaktadır (Cömertpay, 2008).

Moleküler teknikler kullanılarak yapılan genetik çeşitlilik çalışmaları hatlar arasındaki farklılığı ortaya koymakta ve ıslah programlarında ki varyasyonun arttırılmasına katkı sağlamaktadır. Hatların birbirlerine olan genetik uzaklığı ne kadar fazla ise ortaya çıkacak varyasyon o kadar fazla olmaktadır. Varyasyonun fazla olması istenilen şekilde seleksiyon yapılmasını ve ıslah programının başarıya ulaşma şansını arttırmaktadır. Mısır saf hatlarının heterojenite gruplarının belirlenmesi ıslah programlarında büyük öneme sahiptir. Moleküler teknikler kullanılarak hatların heterojenite gruplarına göre ana baba gruplarına ayrılması, yeni popülasyonların oluşturulması ve başarılı hibrit kombinasyonlarının oluşturulmasına olanak sağlamakta bu şekilde ıslah programının verimliliği artmaktadır. Genetik çeşitliliğin değerlendirilmesi ıslahçılar tarafından alternatif bir seleksiyon metodu olarak kullanılmakta, bu durum ise mevcut gen kaynağının gruplar halinde düzenlenmesine yardımcı olmaktadır. Tüm bu verilerden yararlanılarak ümit var hibrit kombinasyonlarının yapılmasını mümkün kılmaktadır (Souza ve ark., 2008).

Yapılan bu çalışma, bitki genomunda fazla miktarda bulunan, üniform dağılım gösteren SSR markörleri ve yüksek polimorfik özelliğe sahip ISSR markörleri kullanılarak hatların birbirleriyle olan genetik ilişkilerini tespit etmek amacıyla yürütülmüştür. Çalışma sonucunda elde edilecek verilerden yararlanılarak mevcut bulunan saf hatlarının filogenetik haritasının çıkartılması, genetik yakınlık-uzaklıklarının tespit edilmesi ve bu verilerin ıslah programında kullanılabilmesi hedeflenmiştir. Moleküler markörler yolu ile hatlar arasındaki genetik ilişkinin belirlenmesi ile heterosis özelliği gösterebilecek hatların melez kombinasyonları oluşturularak yüksek verimli hibritlerin meydana getirilmesi ve hibrit mısır ıslahında başarı şansının artmasına olanak sağlaması çalışmanın önemini ortaya koymaktadır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Moleküler markörler bitkiler aleminde genetik materyalin karakterizasyonu, genetik tanılama, transformantların karakterize edilmesi ve filogenetik analizlerde yaygın bir biçimde kullanılmaktadır (Rafalski ve ark., 1996). Genetik çeşitlilik çalışmalarında yaygın olarak RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), SSR (Simple Sequence Repeat), ISSR (Inter Simple Sequence Repeat), ve SNP (Single Nücleotide Polymorphism) gibi DNA markör teknikleri kullanılmaktadır.

Genetik çeşitliliği belirleme çalışmalarında farklı moleküler teknikler kullanılmasına rağmen, SSR markörleri mısır hakkında daha detaylı bilgi verdiği için tercih edilmektedir. SSR markörleri mısır bitkisinde bağlılık ve QTL haritalarının çıkarılması, genetik çeşitliliğin saptanması ve mısır bitkisinin evrimsel gelişimi üzerinde yapılan çalışmalarda yoğun olarak kullanılmıştır. Moleküler yöntemlerden SSR markörleri kullanılarak 264 mısır ve mısırın atası olan türler yapılan analizlerde, mısırın *Z. mays ssp parviglumis* türünden geldiği ve yaklaşık 9000 yıl önce Meksika'nın güneyinde kültüre alındığı tespit edilmiştir (Matsuoka ve ark., 2002). SSR markörleri lokusa özgü olmaları, yüksek bilgi içeriğine sahip olmaları nedeniyle en çok tercih edilen moleküler markörlerdendir. Ayrıca SSR'lar bitki genomun oldukça fazla ve üniform bir dağılım gösterirler (Roder ve ark., 1995).

Moleküler markör, kalıtımı güvenilir şekilde belirlenebilen, bir protein ve DNA değişkenidir. Mısır ıslah çalışmalarında moleküler markörlerin kullanılması, morfolojik değerlendirmeler ile karşılaştırıldığında hem hatlar arasındaki genetik yakınlık-uzaklıkların belirlenmesi, genetik kaynakların etkin bir şekilde kullanılması ve muhafazası, bakımından bitkinin DNA' sı düzeyine kadar inerek etkin ve güvenilir bir sonuç vermektedir (Jones ve ark., 1997).

ISSR yöntemi; bitki türlerinin genom kapsamlarının türler içi ya da türler arası olarak tahmin edilmesinde başarıyla kullanılmış bir yöntemdir. Ayrıca yöntem genom haritalanmasında doğrudan kullanılamamasına karşın RFLP ve SSR markör sistemlerini desteklemesi sebebiyle ıslahta, marköre dayalı seçilimde, karakterizasyon çalışmalarında, filogenetik akrabalıkların belirlenmesi gibi geniş bir alanda

kullanılmaktadır. Ayrıca türlere veya genlere ya da bölgelere özgü ISSR primerleri de bulunmaktadır (Reddy ve ark., 2002).

Hibrit mısır ıslahında yüksek verim ve kalitenin temelini heterosis kavramı oluşturmaktadır. Heterosisin etkin bir şekilde kullanılması, melezlemede kullanılan saf hatlara ait genetik çeşitliliğin bilinmesi ile mümkün olmaktadır. Hibrit mısır elde etmek için oluşturulan saf hatları arasındaki genetik çeşitliliğin fazla olması, aynı oranda verim artışlarını sağlayarak genetik çeşitliliğin muhafaza edilmesini güvenli hale getirmektedir. Islah programları içerisinde elit 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).

Farklı bitki türlerinde genetik çeşitlilik analizleri, ıslah programlarında çok önemli bir unsurdur ve o türlerin genetik zenginliği hakkında bilgi sağlanmasına yardımcı olur. Genetik farklılık ve farklılık seviyelerinin doğru değerlendirilmesi; yapılacak olan 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 korunmasında ve hatların tam teşhisinde çok önemlidir (Mohammadi ve Prasanna, 2003).

Mısır bitkisinde yapılan genetik çeşitlilik çalışmaları ıslah programların başarısında kilit rolü oynar. Farklı markör teknolojilerinin geliştirilmesi, farklı bitkilerde DNA seviyesinin doğru incelenmesini ve değerlendirilmesini sağlar. SSR markörleri, yüksek düzeyde polimorfik yapı içeren mısır genotiplerinin, otomatik sistemler tarafından analizlerinin yüksek doğruluk ve tekrarlanabilirlikte yapılmasına olanak sağlamaktadır (Reif ve ark., 2003).

Warburton ve ark. (2001); 57 saf hat üzerinde yaptıkları çalışmada, yüksek oranda yakın kardeş hatlar haricinde pedigrilerinin açık bir şekilde dizi oluşturmadığını görmüşlerdir. Moleküler markörlerin ilerleyen yıllarda hibrit ıslah programlarında iki ayrı heterotik grup oluşturmak için kullanılacağını öngörmüşler ve maksimum uzaklıktaki iki heterotik grupta yer alan bireyler melezlendiğinde oluşan hibritin maksimum seviyede heterosis göstereceğini ifade etmişlerdir.

Enoki ve ark. (2002); Japonya'nın soğuk koşullarına adaptasyon sağlamış 51 adet mısır hattı ile Amerika, Kanada ve Avrupa' dan temin ettikleri 14 mısır hattı arasındaki genetik farklılığı ortaya koymak için toplam 60 adet SSR markörü kullanmışlardır. Çalışmada 433 allel üretilmiş olup, lokus başına düşen allel sayısı 2-7 arasında değişkenlik göstemiştir. Kullanılan hatlar arasındaki uzaklık değerinin ise 0.25-0,85 arasında olduğu belirtilmiştir. Araştırmacılar; hibrit mısır ıslahında, ıslah materyalleri arasındaki ilişki ve bu materyaller arasında ki genetik farklılıklar hakkında bil sahibi olunmasının zorunlu hale geldiğini ifade etmişlerdir.

Warburton ve ark. (2002); tarafından ile 7 adet CIMMYT populasyonu ve 57 saf hat üzerinde 85 SSR markörleri kullanılarak genetik çeşitlilik çalışması yapılmıştır. Kullanılan 85 adet SSR marköründen 53 tanesinin polimorfizm gösterdiği ve gelecekteki rutin DNA parmak izi çalışmalarında kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Valdemar P. Carvalho. ve ark. (2002); Brezilya'da 79 adet yerel ve iki gelişmiş mısır çeşidi arasındaki genetik çeşitliliği belirlemede 9 ISSR primeri kullanmışlardır. Çalışmada 153 adet bant üretilirken, 116 adet polimorfik bant elde edilmiştir. UPGMA analizi sonucunda popülasyon 3 ana gruba ayrılmıştır. Sonuç olarak ISSR markörlerinin genetik varyasyona hızlı bir şekilde erişmek için kullanılabileceğini göstermiştir.

Barcaccia ve ark. (2003); 84 SSR ve 53 ISSR markörlerini kullanarak yaptıkları çalışmada, 10 mısır popülasyonunda 253 farklı birey kullanmışlardır. SSR lokusu başına 23 allel üretilirken, ortalama allel sayısı 6.99 olmuştur. ISSR lokusu başına 17 allel üretilirken ortalama allel sayısı 1.34 olmuştur. Popülasyon içindeki ve arasındaki ortalama genetik benzerlik katsayıları SSR markörleri için sırasıyla 0.269 ve 0.217, ISSR markörleri için ise 0.591 ve 0.564 olarak hesaplanmıştır. Sonuç olarak popülasyon içerisinde yüksek oranda çeşitlilik olmasına rağmen, genotiplerin aynı bölgeye ait olduğu tespit edilmiştir.

Li ve ark. (2004); 56 adet popcorn ve 21 adet mısır hattında 113 SSR markörlerü kullanarak genetik farklılığı belirlemeye çalışmışlardır. 56 popcorn mısır hattının; toplam 306 allel ürettiğini, allel sayısının 1-3 arasında değiştiğini ve allel ortalamasının 2.71 olduğunu, 21 mısır hattının ise 414 allel ürettiğini, allel sayısının 1-9 arasında değiştiğini, ortalama allel sayısının 3.66 olduğunu bulmuşlardır.

Beyene ve ark. (2005); 20 SSR markörü kullanarak 62 adet saf mısır hattı arasında genetik farklılığı belirlemeye çalışmışlardır. Araştırma sonucunda toplam 98 allel üretilmiş olup, allel sayıları 3 ile 10 arasında değişim göstermiştir. Lokus başına düşen ortalama allel sayısı 4.9, PIC değeri ise 0.06 ile 0.76 arasında değişmiş, ortalama PIC değeri 0.61 olarak bulunmuştur.

Cömertpay (2008); 20 adet açık tozlanan Türk yerel mısır popülasyonlarının, 13 adet morfolojik özellik ve 13 adet SSR markörü kullanarak genetik çeşitliliği belirlemeye çalışmıştır. Morfolojik özelliklere ait varyans analizi sonrasında popülasyonlar arasında önemli farklılık ve fenotipik çeşitliliğin olduğunu tespit etmiştir. Kullanılan 13 adet SSR markörü polimorfik özellik göstermiş ve toplamda 53 adet allel üretilmiştir. Lokus başına ortalama allel sayısı 4.03 iken allel sayısı 2-5 arasında değişiklik göstermiştr. Moleküler verilerlerden elde edilen analiz sonucuna göre yerel mısır popülasyonları iki ana gruba ayrılmıştır. Sonuç olarak açık tozlanan yerel mısır popülasyonlarının, mısır ıslah programları için gerekli materyali sağlamak açısından zengin genetik çeşitliliğe sahip olduğu sonucuna varmıştır.

Pabendon ve ark. (2009); 34 mısır saf hattında 30 SSR markırı kullanarak yaptıkları çalışmada 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. Yüksek verim potansiyeline sahip olan yeni hibrit mısır çeşitlerinin elde edilebilmesi için farklı heterotik gruplardaki popülasyonlara ihtiyaç olduğunu dile getirmişlerdir.

Leal ve ark. (2010); 9 SSR markörü kullanarak 10 adet kendilenmiş saf cin mısır hattı arasında ki genetik farklılığı belirlemek üzere yaptıkları çalışmada, elde edilen 127 banttan 104 tanesini polimorfik olarak belirlemişlerdir. Sonuç olarak fenotipik varyasyon genetik farklılık ile pozitif yönde ilişkili olmakla birlikte, çevre faktörlerine

de bağlıdır. Bu nedenden dolayı; saf hatlar ve popülasyonlar arasındaki genetik çeşitliliğin belirlenmesi ıslah programları için zorunludur.

Trindade ve ark. (2010); S6 generasyonunda bulunan 8 farklı germplasm bireyi içeren cin mısır hatlarını SSR markörleri kullanarak değerlendirmişlerdir. Yapılan çalışmada 51 tane primer kullanılmış olup, bunlardan 15 tanesi polimorfik özellik göstermiştir. Toplamda 45 allel üretilmiş olup, lokus başıba 1-4 allel düşmüştür. Hatlar arasındaki yapılacak olan melezlemerde diğerlerine oranla daha yüksek heterozigot özellik gösterebilecek olan hatları belirlemişlerdir. Aileler arasında genetik yakınlık uzaklık hakkında bilgi sahibi olunabilmesi ve en fazla heterozigotluk gösteren hibrit kombinasyonunun önceden tahmin edilebilmesi için genetik çeşitlilik çalışmalarının oldukça önem arz ettiğini bildirmişlerdir.

Zeybekoğlu (2012); 96 adet atdişi mısır hattının (*Zea mays* L. *indentata* Sturt.) SSR moleküler markörleri ile genetik çeşitliliği belirlemeye çalışmıştır. Araştırmada 26 tane SSR primeri uygulanmış olup, 22 tane primerin 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 bulunmuştur. Araştırmada kullanılan 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.

Lenka ve ark. (2015); 49 mısır hattının genetik çeşitliliğini 12 ISSR primeri kullanarak belirlemişlerdir. Toplamda 78 adet allel üretilirken, primer başına düşen allel sayısı 6.5 olmuştur. Hatlar arasında ki benzerlik indeksi ise 0.3-0.9 arasında değişiklik gösterirken ortalama benzerlik indeksi 0.393 olarak tespit edilmiştir. Sonuç olarak yüksek heterosis özelliği gösteren hibrit ıslahı için elde var olan genetik çeşitliliğin bilinmesi gerekmektedir.

Salami ve ark. (2016); Benin'de yetiştirilen 233 mısır çeşidinde genetik çeşitliliği belirleme çalışmasında 3 SSR primeri kullanmıştır. Toplamda 227 adet bant üretilmiş ve benzerlik katsayısı 0.51 olarak tespit edilmiştir. SSR markörleri için PİC değeri 0.58-0.81 arasında değer alırken ortalama 0.71 olarak tespit edilmiştir. UPGMA

analizi sonrasında Benin'de yetiştirilen mısır çeşitlerinin 4 ana gruba ayrıldığı görülmüştür.

Santos ve ark. (2017); Meksika'da 16 mısır popülasyonunun genetik yapısını ve çeşitliliğini belirlemede 6 ISSR markörü kullanmıştır ve toplamda %100 polimorfizm gösteren 69 adet allel üretilmiştir. Yapılan çalışma sonrasında popülasyonun 2 ana gruba ayrıldığını bildirmişlerdir.

Öztürk ve ark. (2017); 35 adet saf cin mısır hattının genetik çeşitliliğini 34 adet morfolojik özellik ve 21 adet SSR primeri kullanarak incelemişler. Çalışmada kullanılan 21 adet SSR primerinden 13 adedi polimorfik bulunmuştur. Morfolojik ve moleküler veriler kullanılarak hatların birbirine olan genetik uzaklıkları hesaplanmış ve dendogram oluşturulmuştur. Morfolojik gözlem verilerin göre hatlar 2 temel 4 ana grubuna ayrılırken, moleküler verilere göre 2 temel 5 ana gruba ayrılmıştır. Sonuç olarak morfolojik ve moleküler verilerin birlikte değerlendirilmesi gerektiğini bildirmişleridir.

Langade ve ark. (2017); 10 saf mısır hattın genetik çeşitliliği belirlemede 25 adet SSR primeri kullanmışlarıdır. Yapılan çalışmada PİC değeri 0.42-0.50 arasında değişmiş olup, ortalama PİC değeri 0.42 olarak tespit edilmiştir. Çalışmada kullanılan primerlerin mısır yağ içeriği belirmede QTL sahip olduğunu ve bu primerlerin mısır hatlarında yüksek yağ içeriğini tahmin etme noktasında markör destekli seleksiyon çalışmalarında kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Vivodík ve ark. (2017); Avrupa kökenli 40 mısır gentoipinde 10 adet SSR primeri kullanarak çeşitler arasında ki genetik farklılığı belirlemeye çalışmışlardır. Yapılan çalışmada 65 adet allel üretilmiş olup, lokus başına ortalama 6.50 allel üretilmiştir. PİC değeri 0.713-0.848 arasında değer almıştır. UPGMA analiz metedou kullanılarak elde edilen dengodramda mısır genotipleri 4 ana gruba ayrılmıştır.

Dar ve ark. (2018); 10 farklı mısır popilasyonunda 17 ISSR primeri kullanarak yaptıkları çalışmada, 108 allel elde edilmiş ve ortalama primer başına 6.35 allel hesaplanmıştır. Kullanılan primerler %72.2 genel polimorfizm yüzdesiyle polimorfik bulunmuştur. Genetik çeşitlilik indeksi ise 0.26 olarak hesaplanmıştır. Küme analizi sonucu 10 popülasyonun farklı olduğu ve yüksek oranda genetik çeşitliliğe sahip olduğu

görülmüş, elit genotipler ile melezlenerek yeni çeşit ve kombinasyonların oluşturulabileceği bildirilmiştir.

Sathua ve ark. (2018); 25 saf mısır hattında 40 SSR primerinden 2 kullanarak yaptıkları çalışmada, 70 adet allel üretmiştir. PİC değeri 0.286-0.966 arasında değişmekte olup, ortalama 0.736 olarak hesaplanmıştır. UPGMA analizi sonrasında oluşturulan dendogramda hatlar iki ana gruba ayrılmıştır. Kullanılan hatlar arasında yeterli çeşitlilik bulunduğunu ve yeni heterotik hibritlerin geliştirilmesinde faydalı olacağını belirtmişlerdir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Yapılan bu çalışmada materyal olarak Bahri Dağdaş Uluslararası Tarımsal Araştırma Enstitüsü ülkesel mısır ıslah programlarından elde edilmiş S7 kademesinde 38 adet saf at dişi (*Zea mays* L. *indentata* Sturt.) mısır hattı kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan saf hatlar Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Araştırmada Kullanılan Materyal Listesi

Sıra No	Hat Adı	Kademesi	Sıra No	Hat Adı	Kademesi
1	BDK 1	S7	20	BDK 20	S7
2	BDK 2	S7	21	BDK 21	S7
3	BDK 3	S7	22	BDK 22	S7
4	BDK 4	S7	23	BDK 23	S7
5	BDK 5	S7	24	BDK 24	S7
6	BDK 6	S7	25	BDK 25	S7
7	BDK 7	S7	26	BDK 26	S7
8	BDK 8	S7	27	BDK 27	S7
9	BDK 9	S7	28	BDK 28	S7
10	BDK 10	S7	29	BDK 29	S7
11	BDK 11	S7	30	BDK 30	S7
12	BDK 12	S7	31	BDK 31	S7
13	BDK 13	S7	32	BDK 32	S7
14	BDK 14	S7	33	BDK 33	S7
15	BDK 15	S7	34	BDK 34	S7
16	BDK 16	S7	35	BDK 35	S7
17	BDK 17	S7	36	BDK 36	S7
18	BDK 18	S7	37	BDK 37	S7
19	BDK 19	S7	38	BDK 38	S7

38 adet mısır hattın ait genetik çeşitliliği belirleme çalışmasında 20 adet SSR (Simple Sequence Repeat) ve 20 adet ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) primeri kullanılmış olup, mısır genomunun temsil edilebilmesi için her kromozoma ait iki adet SSR primeri *http:/www.maizegdb.org/ web* sitesinden, (Cömertpay, 2008); Trindade ve ark. (2010); Zeybekoğlu (2012) tarafından mısır moleküler karakterizasyon çalışmalarında kullanılmış ve başarılı bulunan SSR primerleri (Çizelge 3.2.) kullanılmıştır.

Çizelge 3.2. Araştırmada Kullanılan SSR Primerlerin Listesi

Sıra No	Primer	Forward	Reverse
1	umc1363	TGTTTAAGTGTTGGCAGAAAGCAA	TCTCCCTCCCCTGTACATGAATTA
2	phi094	AAAGAGGAGGAACGCGAAGGAC	TCACATCCTGGCGGTCACCA
3	umc1185	AGTAAAAGAGGCAAGGACTACGGC	GCGGCGATATATACGAGGTTGT
4	umc1003	AATAGATTGAATAAGACGTTGCCC	TGTTCCAATGCTTTTGTACCTCTA
5	bnlg1447	GAGAGGAGAGGCTGAGCTGA	TCCTCCCACTGAATTTCCAC
6	umc1266	CACAGGTAAAAGTAAACGCACACG	CTCGTCATTTTCAACGTCCTCTTT
7	umc1759	GTGAGGAGAGGAGACGGAGAGAG	GAAGCTCCTGTGGAACGTGTG
8	bnlg2291	CCTCTCGATGTTCTGAAGCC	GTCATAACCTTGCCTCCCAA
9	umc1019	CCAGCCATGTCTTCTCGTTCTT	AAACAAAGCACCATCAATTCGG
10	umc1225	CTAGCTCCGTGTGAGTGAGTGAGT	TTCCTTCTTTCTTTCCTGTGCAAC
11	umc1859	ATATACATGTGAGCTGGTTGCCCT	GCATGCTATTACCAATCTCCAGGT
12	umc2059	GGAAAAGGAGGAACAGTGTAAGCA	AGCGTGATCAGACGTACAATGCTA
13	phi034	TAGCGACAGGATGGCCTCTTCT	GGGGAGCACGCCTTCGTTCT
14	umc1015	CAGACACAAGCAGCAAAGCAAG	TCCGACTCCAAGAAGAGGAGAA
15	umc1904	CAGCCACTCGTTTATGGAGGTTTA	TGTTACTAGTCGATCTGATGCCCA
16	umc1460	GCTCAATCGTAGTAACAGCAGCAG	TCTGCACTAGAATGGCTTGGTACA
17	umc1040	CATTCACTCTCTTGCCAACTTGA	AGTAAGAGTGGGATATTCTGGGAGTT
18	umc1492	GAGACCCAACCAAAACTAATAATCTCTT	CTGCTGCAGACCATTTGAAATAAC
19	umc1582	AGATTACGTAGCCACGCTTATTCG	GTGCGTGTGAGAGTGATATCGAG
20	umc2122	TTGACAAGCTAGTGTGCAACTGTG	TGAAAGCCCACTGGACAAACTAAT

Kullanılan ISSR primerleri (Çizelge 3.3.); Domenyuk ve ark. (2002); (Galvan ve ark., 2003); Osipova ve ark. (2003) tarafından yapılan ISSR çalışmalarından seçilmiştir.

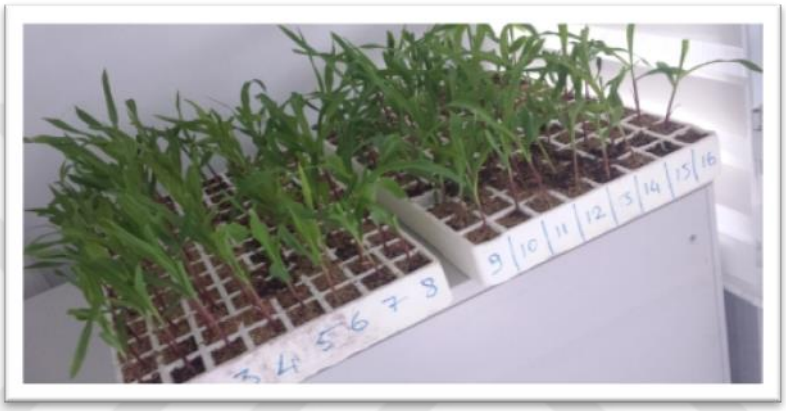
Çizelge 3.3. Araştırmada Kullanılan ISSR Primerlerin Listesi

Sıra No	Primer	Dizi Bilgisi	GC Oranı (%)
1	M1	5'-AGCAGCAGCAGCAGCAGCG-3'	68,4
2	M2	5'-ACCACCACCACCACCACCG-3'	68,4
3	M3	5'- AGCAGCAGCAGCAGCAGCC-3'	68,4
4	M4	5'- CACACACACACACACACACAC-3'	52,4
5	M5	5'- GAGAGAGAGAGAGAGAGAC-3'	52,6
6	M6	5'- GTCACCACCACCACCACCACCAC-3'	65,2
7	M7	5'- AGAGAGAGAGAGAGAGAGC- 3'	52,6
8	M8	5'- ACACACACACACACACACG-3'	52,6
9	M9	5'- ACACACACACACACACCG-3'	55,6
10	M10	5'- ACACACACACACACACCY-Wobbles-3'	52,8
11	M11	5'- CACCACCACCACCAC-3'	66,7
12	M13	5'- CACACACACACARG-3'	53,6
13	M14	5'-CACACACACACARY-Woobles-3'	50,0
14	M15	5'-CACACACACACACACAAG-3'	50,0
15	M16	5'-CACACACACACACACAGC-3'	55,6
16	F1	5'-GAGCAACAACAACAACAA-3'	38,9
17	F2	5'-CTCGTGTGTGTGTGTGTGT-3'	52,6
18	F3	5'-AGAGAGAGAGAGAGAGCG-3'	55,6
19	F5	5'-AGAGAGAGAGAGAGAG-3'	50,0
20	F6	5'-CCACCACCACCACCA-3'	66,7

3.2. Metod

3.2.1. Bitkilerin yetiştirilmesi

Çalışmada kullanılan mısır hatları Beta Ziraat ve Ticaret A.Ş.' ye ait Bursa Yenişehir tesislerinde bulunan; aydınlık sıcaklık değerinin 29 ˚C, karanlık sıcaklık değerinin 25 ˚C olan, 14 saat 1400 watt ışık şiddetine göre ayarlanmış iklim odasında kontrollü olarak yetiştirilmesi sağlanmıştır (Brown, 2009). Mısır bitkileri gerçek 3-4 yapraklı forma gelene kadar bu şartlar altında yetiştirilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. İklim Odasında Yetiştirilmiş Olan ve Örnek Alınacak Bitkilerin Genel Görüntüsü

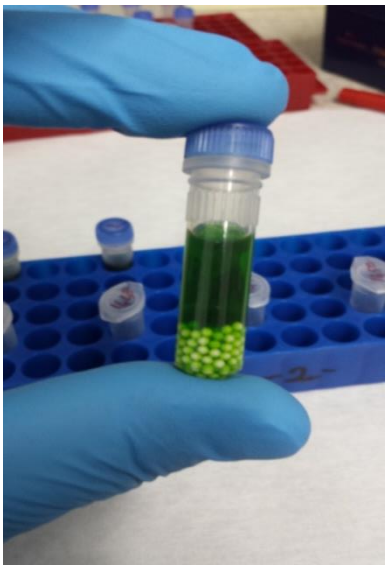
3.2.2. DNA izolasyonu

Bitki genomik DNA izolasyonu Doyle ve Doyle (1990) CTAB (hexa decyltri methyl ammonium bromide) metodundan uyarlanan bir metodla, her bir hattı temsilen 5 farklı bitkiye ait taze yapraklar kullanılarak her bitki için ayrı ayrı DNA izolasyonu yapılmıştır (Stewart ve Via, 1993). Bitki genomik DNA izolasyonunun aşamaları aşağıda verilmiştir.

- ✓ Genç mısır yaprakları 100 mg (0.1g) tartılarak içerisinde 0.3 mm çapında çelik bilye bulunan 2.5 ml steril eppendorf tüpler içerisine alınmıştır (Şekil 3.2).
- ✓ Daha sonra tüpler içerisine 1000 µl CTAB+ β-mercaptoethanol (%2 β-mercaptoethanol) çözeltisi eklenerek doku homojenizatöründe parçalama işlemi yapılmıştır (Şekil 3.3).



Şekil 3.2. Bitki Dokularının Parçalanması



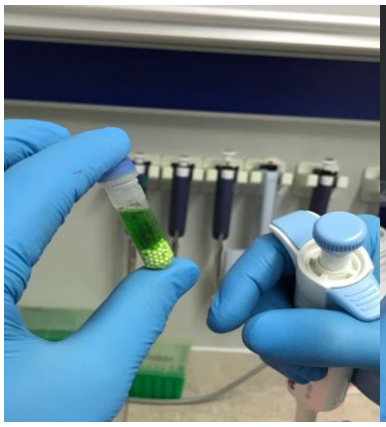
Şekil 3.3. Parçalama Sonrası Görüntü

- ✓ Parçalama işleminden sonra tüpler 4000-5000 rpm'de kısa süreli short spin yapılarak kapak açılınca homejenatın tüpten dışarı dağılması engellenir. Ardından tüplere 5 µl RNaseA ilave edilerek 65 ˚C'de 35 dk çalkalayıcı inkübatörde inkübasyona tabi tutulmuştur (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. İnkübasyon İşlemi

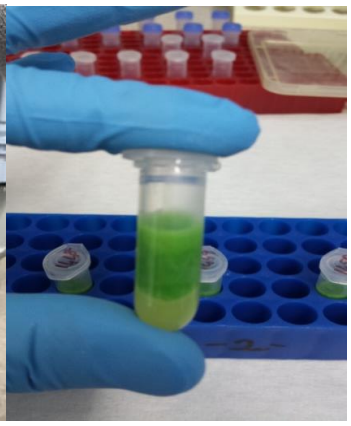
- ✓ İnkübasyonun ardından tüpler +4 ˚C'de 10000 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek katı sıvı faz ayrımı sağlanmıştır (Şekil 3.5)
- ✓ Santrifüj edilen tüplerin üzerinde oluşan sıvı fazdan otomatik pipetman yardımıyla 600 µl alınarak yeni steril 2.5 ml' lik eppendorf santrifüj tüplerine aktarılmıştır (Şekil 3.6)
- ✓ Yeni tüplere alınan örneklere 600 µl Fenol kloroform izoamilalkol (25:24:1) ilave edilerek 3-4 sn vorteks yapılarak iyice karışması sağlanır (Şekil 3.7)



Şekil 3.5. Santrifürüj İşlemi



Şekil 3.6. Sıvı Fazın Alınması

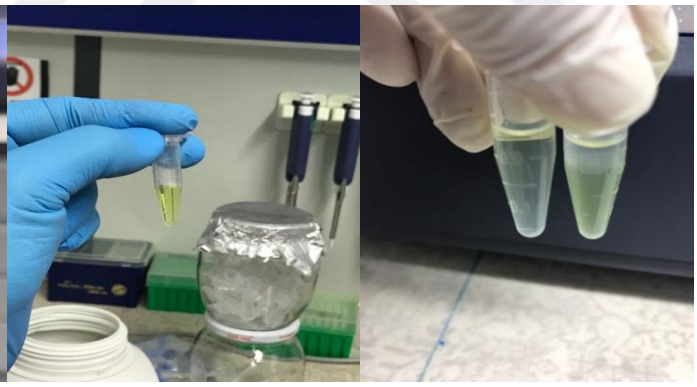


Şekil 3.7. Fenol Eklemesi

- ✓ Ardından örnekler 13000 rpm'de santrifüje tabi tutulup katı sıvı faz ayrımı sağlanır ve santrifüj sonrasında üstte bulunan şeffaf sıvı fazdan 600 µl çekilerek yeni 1.5 ml'lik eppendorf tüplere alınmıştır (Şekil 3.8).
- ✓ Yeni tüplere alınan örnekler üzerine 0.6 hacimde (360 µl) oda sıcaklığında bulunan izopropanol ilave edilmiştir. Tüpler hafif bir şekilde alt üst edilip 10 dk buz üzerinde bekletilmiştir (Şekil 3.9).



Şekil 3.8. Fenol Sonrası Katı-Sıvı Faz Ayrımı



Şekil 3.9. İzopropanol Eklenmesi

- ✓ Buzdan alınan örnekler 13000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında tüplerin dip kısmında DNA peleti gözlenmiştir (Şekil 3.10).



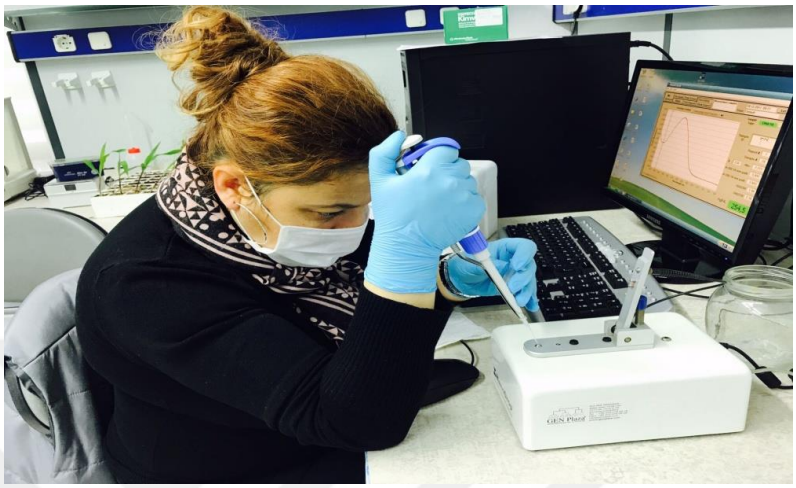
Şekil 3.10. Santrifürüj Sonrası DNA Pelet Oluşumu

- ✓ Dipte oluşan DNA peleti düşürülmeden izopropanol dökülüp, DNA peletini yıkamak için -20°C'de bekletilmiş 1000 µl %70 etanol ilave edilerek tüpler hafif çalkalanmıştır.
- ✓ Daha sonra örnekler 15000 rpm'de 5 dk santrifüj yapılıp, santrifüj sonrasında tüpler içerisinde ki etanol DNA peleti düşürülmeden dökülmüştür. Tüp içerisindeki etanolün tamamen uzaklaşması için tüplerin kapakları açık bir şekilde 45°C'de 1-2 dk kuruması sağlanmıştır.
- ✓ Etanolün tamamen uzaklaştığından emin olduktan sonra tüplere 100 µl steril saf su eklenip, tüpler bir gece +4 ˚C bekletilerek DNA peletinin çözülmesi sağlanmıştır.
- ✓ İzolasyonu yapılan örneklerin DNA miktar ve kalitesinin belirlenmesi için spektrofotometre ile ölçüm yapılmıştır.

3.2.3. DNA konsantrasyonu ve saflıklarının belirlenmesi

PCR'a dayalı moleküler genetik çalışmalarda DNA miktarı ve saflığı oldukça önem arz eder. Bu yüzden DNA izolasyonu yapılan her örneğin saflığını ve miktarını belirlemek amacıyla spektrofotometre (NanoDrop1000) cihazında çeşitli dalga boylarında okumalar yapılmıştır (Şekil 3.11). 260 nm dalga boyunda nükleik asitler, 280 nm dalga boyunda proteinlerin miktarı tespit edilir. Nükleik asitlerin saflığı oran hesaplaması ile ayırt etmek mümkündür. 260/280 oranı nükleik asitlerin saflığını

belirlemede kullanılır ve saf DNA yaklaşık 1.7-1.9 değerini vermelidir. 230 nm dalga boyunda ise ortamda bulunan aromatik bileşenler, peptitler, karbonhidratlar ve fenoller gibi maddelerle kontaminasyonunu gösterir. Saf örneklerde 260/230 oranı 2'den büyük olmalıdır.



Şekil 3.11. Spektrofotometre Cihazında DNA Miktarı ve Kalite Tayini

DNA izolasyonu yapılan tüm hatların okuma değerlerine göre DNA konsantrasyonları 25 ng/µl olacak şekilde dilüsyon hesaplamaları yapılmıştır. Tüm örnekler için hesaplanan DNA miktarları yeni tüplere (1.5 ml lik eppendorf tüp) aktarılmış, toplam hacim steril saf su ile 100 µl'ye tamamlanarak DNA konsantrasyonları eşitlenmiş ve bu şekilde tüm hatlardan 25 ng/µl yoğunluğunda 100 µl hacminde dilüsyonlar elde edilmiştir. Bulk oluşturmak için ise her hatta ait bireylerden eşit miktarlarda alınarak yeni 1.5 ml lik eppendorf tüplere aktarılmış ve bulk karışımları oluşturulmuştur.

3.4.5. PCR hazırlık işlemleri ve optimizasyon çalışmaları

Çalışmada kullanılan SSR ve ISSR primerleri Bioneer firmasından sentezletterilip, liyofilize halde gelmiştir. Her primer için sertifikasında belirtilen oranda 100pmol hacim için saf su eklenerek primerler sulandırılmıştır. PCR reaksiyonlarında ise 10 pmol/µ hacimde primer kullanıldığından her primer 10 pmol/µ olacak şekilde primer dilüsyonları hazırlanmıştır. PCR reaksiyonu için gerekli olan diğer bileşenler de kullanıma hazır halde Bionner firmasından temin edilmiştir.

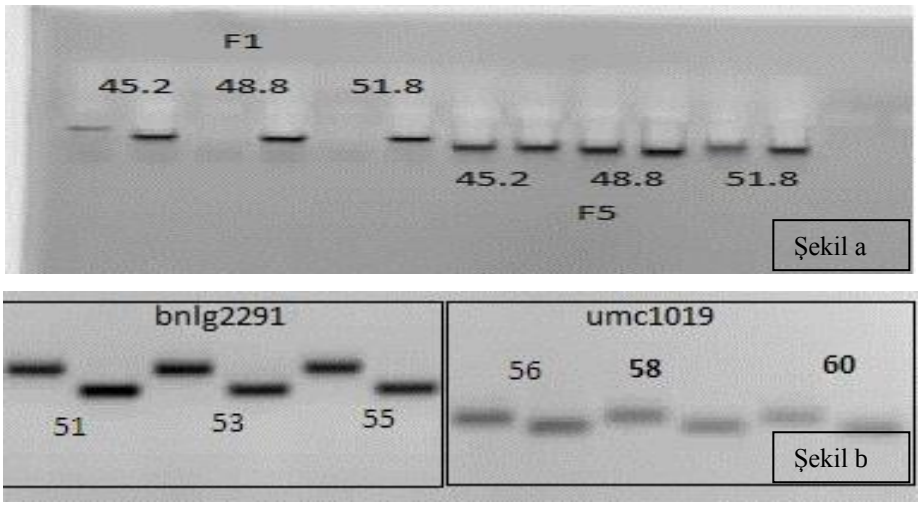
Bir PCR'da olması gereken şartlar: DNA örneği, sentetik primer; deoksinükleotit trifosfatlar (dNTP); yüksek ısıya dayanıklı *Taq* DNA polimeraz enzimi; uygun pH ve iyon koşullarını (Mg^{+2}) sağlayan tampon karışımı ve $MgCl_2$. Polimeraz zincir reaksiyonu, DNA polimeraz enziminin kullanılmasıyla suni şartlarda DNA üretilmesini ifade etmektedir. Bu üretim için 6-25 nükleotid uzunluğunda başlatıcı DNA'lar (primerler) gerekir. Reaksiyon ortamında ayrıca pH'yı ve tuz konsantrasyonunu optimum hale getiren tampon çözelti, polimeraz enziminin ihtiyaç duyduğu $MgCl_2$ ve DNA üretiminde kullanılacak A, T, G, C nükleotidlerinden her biri bulunur. Polimeraz enzimi, bu başlatıcı DNA'nın bir kalıp DNA üzerine bağlanmasından sonra, onu bir uçtan uzatmaya başlar ve kalıp DNA'nın aynısını üretir. DNA üretim işlemi birbirini izleyen bir seri çok spesifik sıcaklık devrelerinde yapılır (Özcan ve ark., 2001).

SSR ve ISSR PCR reaksiyonlarında gerekli olan bileşenler ve 1 örnek için oluşturulan PCR mixi Çizelge 3.4. de verilmiştir.

Çizelge 3.4. SSR-PCR ve ISSR-PCR Reaksiyonlarını Oluşturan Bileşenlerin Listesi

SSR-PCR Reaksiyonu		**ISSR-PCR Reaksiyonu**	
Reaksiyon bileşenleri:	**1 ünite için (µl)**	**Reaksiyon bileşenleri:**	**1 ünite için (µl)**
DNA miktarı (25 ng/µl)	1	DNA miktarı (25 ng/µl)	1.0
5 u/µl *Taq* DNA polimeraz	0.2	1X *PCR* tamon çözeltisi	1.5
25 mM $MgCl_2$	1.5	25 mM $MgCl_2$	1.5
10 mM dNTP (A, T, G, C)	0.2	10 mM dNTP (A, T, G, C)	0.2
1X *PCR* tampon çözeltisi	1.0	Primer (10 pmol/µl)	1.0
Forward Primer	1.0	5 u/µl *Taq* DNA polimeraz	0.3
Reverse Primer	1.0	ddH2O (PCR hassasiyetinde)	14.5
ddH_2O (PCR hassasiyetinde)	14.1		
Toplam Hacim (µl)	**20**	**Toplam Hacim (µl)**	**20**

PCR'da kullanılan kimyasalların optimizasyonu tamamlandıktan sonra PCR çalışmalarına başlanmıştır. Yukarıda verilen tablolara uygun olarak PCR reaksiyon karışımı oluşturulup, reaksiyonlar steril, ince çeperli, düz kapaklı, *RNase* ve *DNase-free* 0.2 ml'lik PCR tüplerinde ve 1 µl DNA + 19 µl karışım olacak şekilde 20 µl olarak şekilde hazırlanmıştır.



Şekil 3.12. a. F1 ve F5 ISSR primerlerine ait sıcaklık optimizasyonu
b. SSR primerlerine ait sıcaklık optimizasyonu

PCR protokolü ise yapılan optimizasyon çalışmaları esas alınarak programlanmıştır. Primerlerin bağlanma sıcaklıkları farklı olduğundan pcr protokolünde sadece bağlanma sıcaklıkları değiştirilmiştir. Çalışmada uygulanan PCR protokolü şu şekildedir; PCR tüpleri kullanılan PCR sırasında reaksiyon karışımının tüplerden buharlaşmasını engellemek amacıyla cihazın kapak sıcaklığı 105 °C 'ye ayarlanmıştır. 95 °C'de 5dk denatürasyon, ardından 30 döngü olacak şekilde 95 ºC'de 30 sn, 52-60 ºC'de 15 sn, 72 ºC'de 30 sn ve son olarak 72 ºC'de 10 dk şeklindedir. Tüm PCR çalışmaları aynı şartlarda gerçekleştirilmiştir. Sadece amplifikasyon sıcaklık ve süreleri kullanılan primerlerin T_m sıcaklıklarına bağlı olarak her PCR için ayrı ayrı optimize edilmiştir (Şekil 3.12).

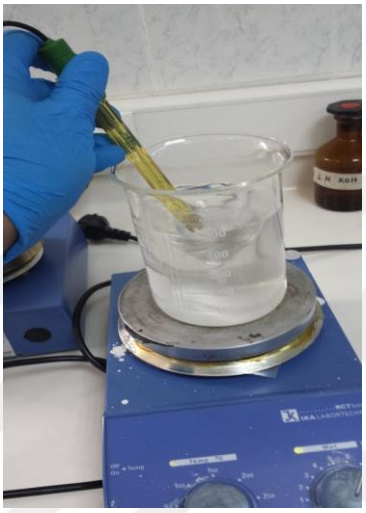
3.2.5. Elekroforez uygulamaları

PCR sonucu oluşan amplifikasyon ürünlerine ait DNA bant görüntülerinin elde edilebilmesinde takip edilen aşamalar aşağıda detaylı bir şekilde verilmiştir (Gwanama ve ark., 2000); Brown ve Myers (2002); Decker-Walters ve ark. (2004); Kwon ve ark. (2004).

Tris-borik asit-EDTA (TBE) elektrolit çözeltisinin hazırlanması

Tampon çözelti olarak Tris-Borik asit-EDTA (TBE) çözeltisi kullanılmıştır. Çözeltide kullanılan EDTA (Etilen Diamin Tetra Asetik Asit) 0.5 Molar (M) ve pH 8.0 olacak şekilde hazırlanmıştır. Daha sonra 10X yoğunlukta çözelti hazırlanmaya

başlanmıştır. Borik asit geç çözünen bir maddedir, bu nedenle manyetik karıştırıcı cihazı yardımıyla önce bir miktar saf suda borik asit çözünmüş, ardından Tris, son olarak ise EDTA ilave edilmiştir (Şekil 3.13). Kimyasallar tamamen çözündükten sonra çözeltinin son hacmi 1 litreye tamamlanmıştır. Bu stok çözeltiden 100 ml alınıp üzeri saf su ile 1 litreye tamamlanarak 1X yoğunlukta TBE elde edilmiştir. Bu çözelti hem elektroforez tankına konulmuş hem de agarozu eritmek için jel hazırlanırken kullanılmıştır.



Şekil 3.13. 0.5 M pH:8 EDTA Çözeltisinin Hazırlanması

10X TBE (1litre) stok çözeltisinin hazırlanmasında kullanılan kimyasal maddeler ve miktarları (Çizelge 3.5);

Çizelge 3.5. 10X TBE Tampon Çözeltisi İçin Gerekli Kimyasallar ve Miktarları

10X stok TBE tampon çözeltisi (1litre)	**Miktar**
Tris	108 g
Borik asit	55 g
EDTA (0.5 M, pH 8.0)	40 ml

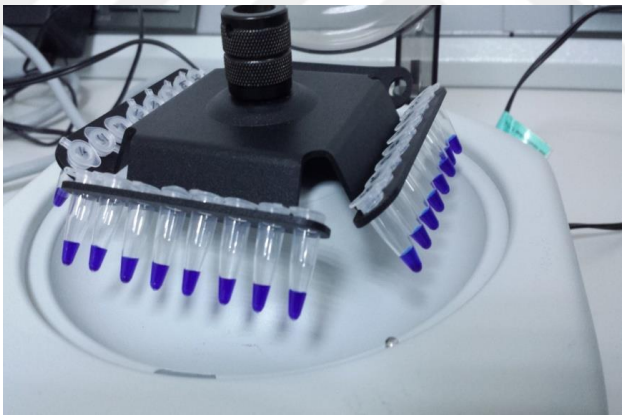
Agaroz jel hazırlanması

PCR çalışmalarının ardından, PCR'da elde edilen DNA ürünlerini elektroforezde birbirinden ayırmak için %1.5'luk agaroz jel kullanılmıştır. Jel hazırlarken, 1X yoğunluktaki TBE tampon çözelti kullanılmıştır. 300 ml'lik TBE tampon çözeltisinin içerisine 4.5 gr agaroz ilave edilmiştir. Mikrodalga fırında 350 Watt enerjide 10 dk kaynatılarak eritilmiştir. Şeffaf bir görünüm kazanınca jel mikrodalga fırından çıkarılarak soğumaya bırakılmıştır. Daha sonra soğumakta olan jelin içine PCR sonucu

oluşan bantların görüntüleme cihazında ultra viyole (UV) ışığında görüntülenebilmeleri için 300 ml'lik jel için 15 µl RedSafe ilave edilmiştir. RedSafe jelde karıştırıldıktan sonra jel tepsisine dökülmüş ve taraklar tepsiye yerleştirildikten sonra donmaya bırakılmıştır.

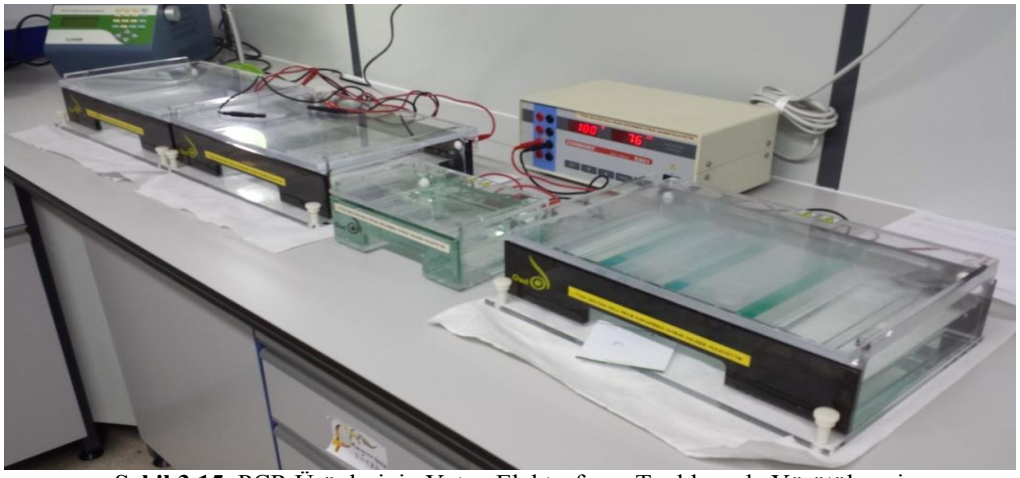
PCR ürünlerinin agaroz jele yüklenmesi

PCR'da çoğaltılan DNA parçalarının elektroforez içindeki 1X TBE çözeltisine karışmasını önlemek ve DNA'ların yürütülmesi esnasında kolay gözlemlenmesi amacıyla yoğunluğu yüksek 6X yükleme boyası (loading dye) yükleme yapılarak PCR tüpleri içerisine 4 µl ilave edilmiş ve homojen bir şekilde karıştırılmıştır (Şekil 3.14). Daha sonra, otomatik pipetman yardımıyla her tüpten 15 µl karışım alınarak jelde hazır bulunan kuyucuklara sırayla yüklenmiştir. Çoğaltılan DNA parçalarının boyunu tespit etmek amacıyla örneklerin başındaki kuyucuklara uzunluk markörü olarak 100bp DNA ladder yüklenmiştir.



Şekil 3.14. 6X Loading Dye eklenmiş PCR ürünleri

Bu çalışmada agaroz jele yüklenen PCR ürünlerine yatay elektroforez cihazına bağlı güç kaynağı ile 100 voltta bant profillerine bağlı olarak 2-2.30 saat elektrik akımı verilmiştir (Şekil 3.15). Belirli aralıklarla (20-30 dk) görüntüleme cihazında UV ışığı altında jelden görüntü alınmıştır (Şekil 3.16).



Şekil 3.15. PCR Ürünlerinin Yatay Elektroforez Tanklarında Yürütülmesi



Şekil.3.16. Jel görüntüleme sistemi

3.2.6. Primerlerin polimorfizm oranlarının belirlenmesi

Çalışmada kullanılan 20 adet SSR ve 20 adet ISSR primerinin polimorfizm oranlarının yüzdesi, her bir primerin göstermiş olduğu polimorfik bant sayısının, tüm primerlerin göstermiş olduğu toplam bant sayısına bölünüp 100 ile çarpılması ile hesaplanmıştır.

$$Polimorfizm\ Oranı\ (\%) = \left(\frac{Poliformik\ Bant\ Sayısı}{Toplam\ Bant\ Sayısı}\right) * 100$$

3.2.7. Polimorfizm bilgi içeriklerinin belirlenmesi

Çalışmada kullanılan 20 adet SSR ve 20 adet ISSR primerinin Polimorfizm bilgi içerikleri Smith ve ark. (1997) tarafından bildirilen formül ile hesaplanmıştır.

Polimorfik bantlarda toplam var (1) ve yok (0) olan bantların sayıları tespit edilerek her bir bandın frekansı (Pi) tek tek hesaplanmıştır.

$$\textbf{\textit{Primerlerin Polimorfizm Bilgi}}\ \text{İçeriği}\ (\textbf{\textit{PB}}\text{İ}) = 1 - \sum \textbf{\textit{Pi}}^2$$

3.2.8. Primerlerin ayırma güçlerinin hesaplanması

Çalışmada kullanılan 20 adet SSR ve 20 adet ISSR primerinin ayırma güçleri Prevost ve Wilkinson (1999)'un bildirmiş olduğu aşağıdaki 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.

$$\textbf{\textit{Primerlerin Ayırma Gücü}}\ (\textbf{IB}) = 1 - (2 * |0,5 - p|)$$

3.2.9. Veri analizleri

Çalışmada kullanılan 38 adet saf at dişi mısır hattının, genetik çeşitliliğinin belirlenmesinde, SSR ve ISSR markör datalarının markör sistemleri arasındaki matriks karşılaştırmaları kullanılmıştır Mantel (1967). SSR ve ISSR markörleri 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.

Markörların 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

4.1. DNA İzolasyon Sonuçları

Çalışmada 38 adet at dişi mısır hattına ait her hattı temsilen 5 bitkiden DNA izolasyonu yapılmış ve elde edilen DNA'lar %1'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülerek DNA'nın hassas yöntemler olan SSR ve ISSR için uygun olduğu belirlenmiştir.

DNA miktar ve kalitesini belirlemede NanoDrop ND-100 spektrofotometre cihazı kullanılmıştır. Çizelge 4.1.'de araştırmada kullanılan mısır hatlarının DNA izolasyonu sonuçları verilmiştir Zhang ve ark. (2008) İzolasyonu yapılmış bir örnekte nükleik asitlerin saflığının göstergesi olan A260/A_{280} oranı yaklaşık olarak 1.7-1.9 arasında olması gerektiğini bildirmişlerdir.

Çizelge 4.1. Araştırmada kullanılan materyallerin DNA izolasyon sonuçları

Sıra No	ng/uL	260/280	260/230	Sıra No	ng/uL	260/280	260/230
1*1	107.7	1.83	2.09	20*1	197.57	1,91	2.36
1*2	108.69	1.76	2.11	20*2	245.51	1,91	2.34
1*3	120.78	1.81	2.07	20*3	188.47	1,8	2.09
1*4	146.87	1.85	2.12	20*4	200.79	1,87	2.28
1*5	98.42	1.86	2.18	20*5	193.47	1,95	2.09
2*1	138.76	1.86	2.24	21*1	75.39	1,82	2.37
2*2	155.65	1.87	2.25	21*2	92.54	1,8	2.35
2*3	160.54	1.83	2.06	21*3	125.36	1,8	2.12
2*4	186.78	1.84	2.05	21*4	114.23	1,87	2.1
2*5	139.4	1.88	2.09	21*5	68.21	1,95	2.23
3*1	148.96	1.87	2.25	22*1	81.29	1,85	2.32
3*2	153.21	1.87	2.27	22*2	129.21	1,86	2.3
3*3	110.25	1.87	2.18	22*3	168.47	1,87	2.12
3*4	184.54	1.83	2.24	22*4	83.98	1,83	2.1
3*5	165.21	1.84	2.25	22*5	121.87	1,84	2.23
4*1	192.73	1.92	2.23	23*1	71.94	1,73	2.2
4*2	198.72	1.89	2.26	23*2	91.49	1,76	2.21
4*3	226.58	1.79	2.11	23*3	98.2	1,87	2.09
4*4	123.12	1.8	2.27	23*4	108.24	1,83	2.28
4*5	148.75	1.78	2.24	23*5	90.14	1,84	2.09
5*1	114.48	1.82	2.09	24*1	98.3	1,78	2.12
5*2	160.46	1.87	2.13	24*2	102.12	1,77	2.1
5*3	205.41	1.83	2.27	24*3	132.2	1,82	2.23
5*4	118.8	1.85	2.09	24*4	109.21	1,86	2.24
5*5	101.81	1.88	2.14	24*5	144.84	1,88	2.25
6*1	164.12	1.89	2.27	25*1	125.84	1,8	2.2
6*2	182.15	1.83	2.09	25*2	163.04	1,83	2.27

6*3	230.45	1.81	2.13	25*3	210.24	1,88	2.25
6*4	158.88	1.9	2.27	25*4	180.45	1,8	2.23
6*5	122.23	1.87	2.11	25*5	132.4	1,81	2.26
7*1	160,05	1.91	2.24	26*1	118.33	1,84	2.11
7*2	193.35	1.83	2.33	26*2	139.95	1,81	2.27
7*3	140.24	1.85	2.29	26*3	174.23	1,8	2.24
7*4	159.19	1.92	2.26	26*4	155.95	1,81	2.09
7*5	110.12	1.88	2.18	26*5	164.21	1,84	2.03
8*1	120.62	1.88	2,24	27*1	129.1	1,84	2.23
8*2	164.67	1.9	2.26	27*2	145.29	1,85	2.25
8*3	110.27	1.89	2.05	27*3	164.87	1,87	2.03
8*4	180.54	1.83	2.09	27*4	131.24	1,83	2.09
8*5	124.35	1.85	2.11	27*5	127.68	1,84	2.27
9*1	181.03	1.92	2.18	28*1	160.18	1,87	2.23
9*2	143.21	1.94	2.19	28*2	177.45	1,87	2.24
9*3	210.54	1.88	2.25	28*3	144.21	1,87	2.32
9*4	175.62	1.79	2.03	28*4	158.64	1,83	2.37
9*5	150.81	1.75	2.22	28*5	194.44	1,84	2.09
10*1	289.27	1.94	2.22	29*1	119.12	1,84	2.11
10*2	320.18	1.93	2.24	29*2	121.58	1,84	2.18
10*3	360.45	1.92	2.29	29*3	110.27	1,87	2.27
10*4	280.56	1.88	2.26	29*4	180.54	1,83	2.25
10*5	196.21	1.88	2.18	29*5	124.35	1,84	2.27
11*1	92.03	1.79	2.07	30*1	138.38	1,85	2.11
11*2	94.89	1.75	2.06	30*2	164.28	1,87	2.24
11*3	110.54	1.82	2.22	30*3	136.03	1,87	2.12
11*4	184.21	1.82	2.24	30*4	179.55	1,83	2.18
11*5	164.5	1.83	2.29	30*5	162.84	1,84	2.24
12*1	103.63	1.78	2.06	31*1	255.61	1,95	2.25
12*2	105.14	1.81	2.05	31*2	270.4	1,96	2.06
12*3	124.12	1.85	2.09	31*3	298.12	1,9	2.05
12*4	156.23	1.83	2.09	31*4	317.21	1,87	2.09
12*5	144.21	1.88	2.28	31*5	230.48	1,91	2.05
13*1	113.64	1.8	2.09	32*1	240.19	1,95	2.09
13*2	110.76	1.82	2.11	32*2	210.48	1,95	2.11
13*3	98.54	1.85	2.15	32*3	187.65	1,9	2.18
13*4	145.26	1.87	2.21	32*4	272.71	1,87	2.19
13*5	133.54	1.8	203	32*5	213.47	1,91	2.25
14*1	112.03	1.82	2.09	33*1	186.58	1,93	2.03
14*2	111.77	1.83	2.09	33*2	199.4	1,84	2.22
14*3	132.21	1.83	2.28	33*3	236.54	1,9	2.09
14*4	187.27	1.88	2.09	33*4	187.45	1,87	2.11
14*5	165.48	1.8	2.11	33*5	190.78	1,91	2.18
15*1	91.01	1.81	2.28	34*1	322.13	1,95	2.27
15*2	131.9	1.84	2.24	34*2	369.34	1,88	2.25
15*3	110.64	1.85	2.26	34*3	288.45	1,88	2.27
15*4	145.89	1.8	2.18	34*4	240.65	1,79	2.11
15*5	88.21	1.82	2.07	34*5	310.48	1,75	2.24
16*1	121.21	1.89	2.32	35*1	381.91	1,96	2.03

16*2	100.54	1.92	2.37	35*2	412.54	1,97	2.22
16*3	173.56	1.81	2.03	35*3	290.14	1,88	2.07
16*4	144.61	1.88	2.11	35*4	385.68	1,79	2.06
16*5	122.76	1.85	2.18	35*5	310.26	1,75	2.22
17*1	104.04	1,8	2.27	36*1	142.23	1,86	2.24
17*2	144.58	1.8	2.25	36*2	184.28	1,85	2.29
17*3	120.3	1.87	2.27	36*3	149.54	1,82	2.06
17*4	112.45	1.95	2.06	36*4	194.23	1,82	2.05
17*5	103.21	1.96	2.05	36*5	154.45	1,83	2.09
18*1	106.14	1.84	2.09	37*1	439.81	1,98	2.09
18*2	136.03	1.89	2.09	37*2	460.7	1,98	2.28
18*3	118.32	1.87	2.28	37*3	384.65	1,85	2.11
18*4	162.84	1.83	2.1	37*4	410.36	1,83	2.15
18*5	213.15	1.8	2.23	37*5	315.84	1,88	2.21
19*1	99.01	1.83	2.24	38*1	183.33	1,85	2.03
19*2	149.01	1.85	2.25	38*2	154.78	1,87	2.09
19*3	125.65	1.8	2.12	38*3	210.25	1,8	2.09
19*4	187,6	1.87	2.1	38*4	201.4	1,83	2.09
19*5	117.56	1.95	2.23	38*5	197.83	1,85	2.12

4.2. Genetik Analizler

4.2.1. SSR markörlerinin analizi

Genetik çeşitliliği belirleme çalışmalarında farklı moleküler teknikler kullanılmasına rağmen, SSR markörleri mısır hakkında daha detaylı bilgi verdiği için tercih edilmektedir. SSR markörleri mısır bitkisinde bağlılık ve QTL haritalarının çıkarılması, genetik çeşitliliğin saptanması ve mısır bitkisinin evrimsel gelişimi üzerinde yapılan çalışmalarda yoğun olarak kullanılmıştır. SSR markörleri lokusa özgü olmaları, yüksek bilgi içeriğine sahip olmaları nedeniyle en çok tercih edilen moleküler markörlerdendir. Ayrıca SSR'lar bitki genomun oldukça fazla ve üniform bir dağılım gösterirler (Roder ve ark., 1995).

Araştırmada kullanılan mısır genotiplerine ait SSR primerlerinin polimorfizm oranı (PO), polimorfizm bilgi içeriği (PBİ), ayırma gücü (AG) ve allel sayısı Çizelge 4.2.'de sunulmuştur. Çalışmada kullanılan 38 adet at dişi mısır hattına 20 adet SSR primeri uygulanmış olup, kullanılan primerlerden 9 tanesi hatlar üzerinde monomorfik özellik gösterirken, 11 tanesi polimorfik özellik göstermiştir. Warburton ve ark. (2002) tarafından 7 adet CIMMYT populasyonu ve 57 saf hat üzerinde 85 SSR markörleri kullanılarak genetik çeşitlilik çalışması yapılmıştır. Kullanılan 85 adet SSR

marköründen 53 tanesinin polimorfizm gösterdiği ve gelecekteki rutin DNA parmak izi çalışmalarında kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

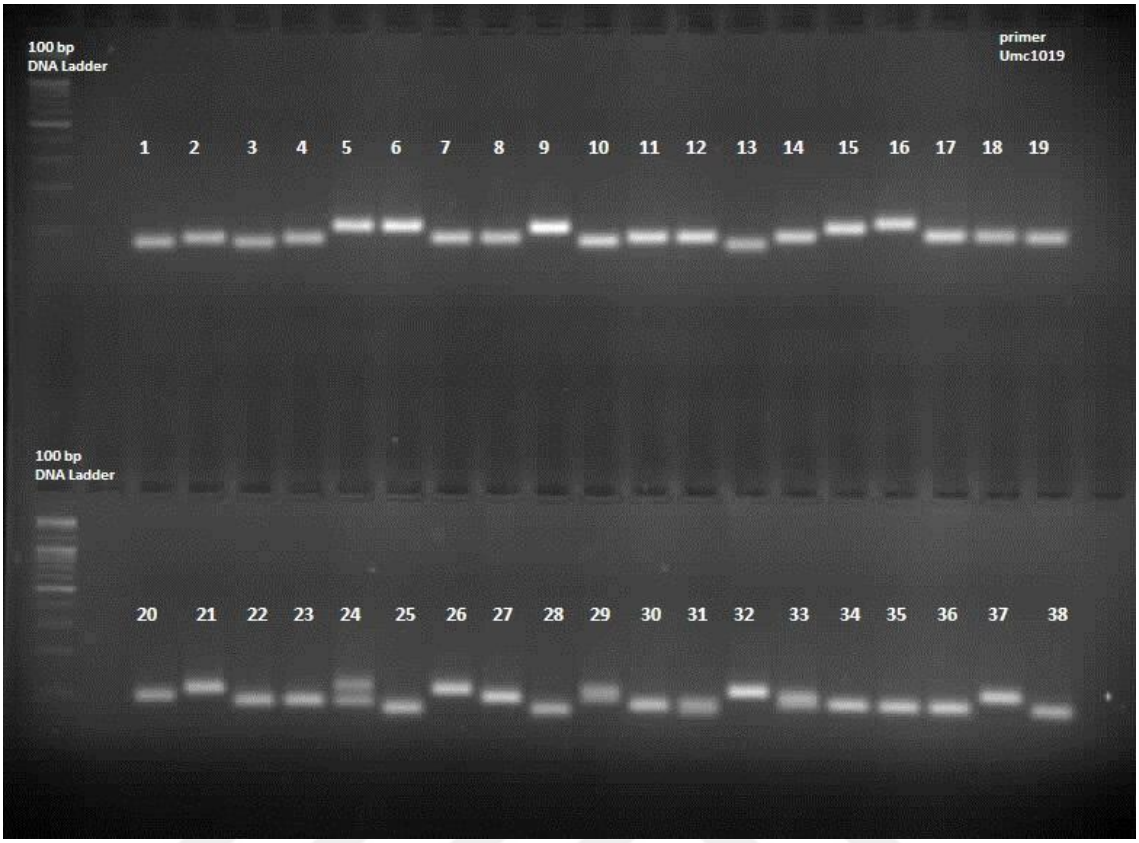
Çizelge 4.2. Kullanılan SSR Primerlerinin polimorfizm oranı (PO), polimorfizm bilgi içeriği (PBİ), ayırma gücü (AG) ve allel sayısı

Primer	PO(%)	PBİ	AG	Allel Sayısı
Umc1185	75.00	0.92	0.48	4
Umc1040	66.60	0.51	0.33	3
Umc1582	100.00	0.73	0.28	3
Umc2122	60.00	0.85	0.61	5
Umc1015	50.00	0.88	0.64	4
Umc1019	66.00	0.88	0.66	3
Umc1460	100.00	0.68	0.07	3
Umc1759	100.00	0.78	0.75	3
Umc1859	100.00	0.88	0.66	3
Umc2291	66.00	0.87	0.67	3
Umc1904	75.00	0.89	0.43	4
Phi094	100.00	0.69	0.60	2
Phi034	66.00	0.74	0.89	3
Ortalama	**--**	**0.51**	**0.35**	**3.3**

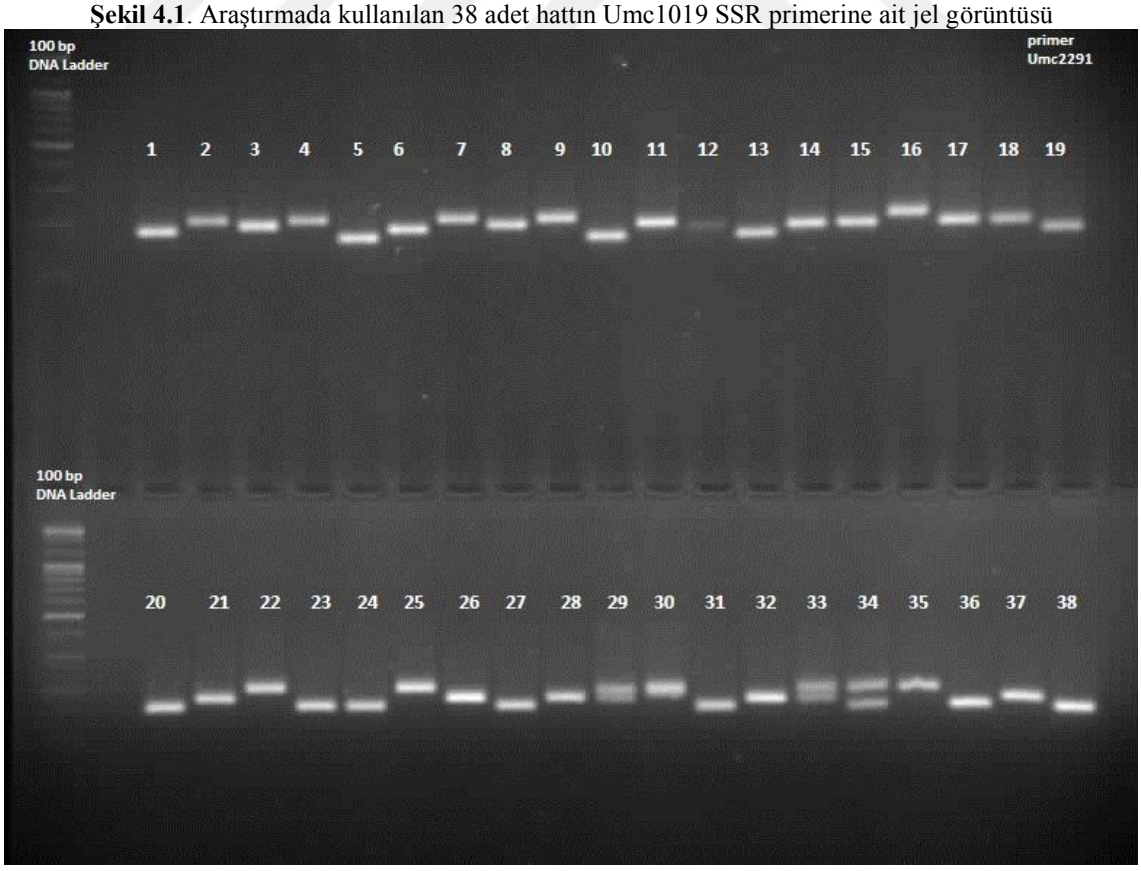
PCR sonuçlarına göre, araştırmada kullanılan 20 SSR primerinden Umc1019 primeri ve Umc2291 primerine ait görüntüler sırasıyla şekil 4.1. ve şekil 4.2.'de verilmiştir.

Araştırma sonucunda SSR markörlerinden 43 adet allel üretilmiş olup, allel sayısı 3-5 arasında değişkenlik göstermiştir ve her bir SSR lokusuna başına düşen allel sayısı 3.3 olarak hesaplanmıştır. Leal ve ark. (2010), 10 adet cin mısırı hattında 9 adet SSR markörü kullanarak yaptıkları genetik çeşitlilik çalışmasında, SSR lokuslarında toplam 47 allel olduğunu ve her bir lokusta 2-5 arasında allel olduğunu gözlemlemişlerdir. Cheng-Lai ve ark. (2010), 97 adet mısır hattında 112 SSR markörü kullanarak yapmış oldukları çalışmada, toplam 643 adet allel olduğunu, lokus başına düşen allel sayısının 2-13 arasında değiştiğini ve lokus başına düşen ortalama allel sayısının 5.7 olduğunu bildirmişlerdir.

Bu araştırmada PBİ değeri 0.51-0.92 değişmiş olup, ortalama PİC değeri 0.79 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.2). Cheng-Lai ve ark. (2010), 112 SSR markırı ile yapmış oldukları çalışmada, PIC değerini 0.205 ile 0.645 arasında bulmuşlardır. 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 PBİ değerinin 0.69 olduğunu bulmuşlardır.



Şekil 4.1. Araştırmada kullanılan 38 adet hattın Umc1019 SSR primerine ait jel görüntüsü

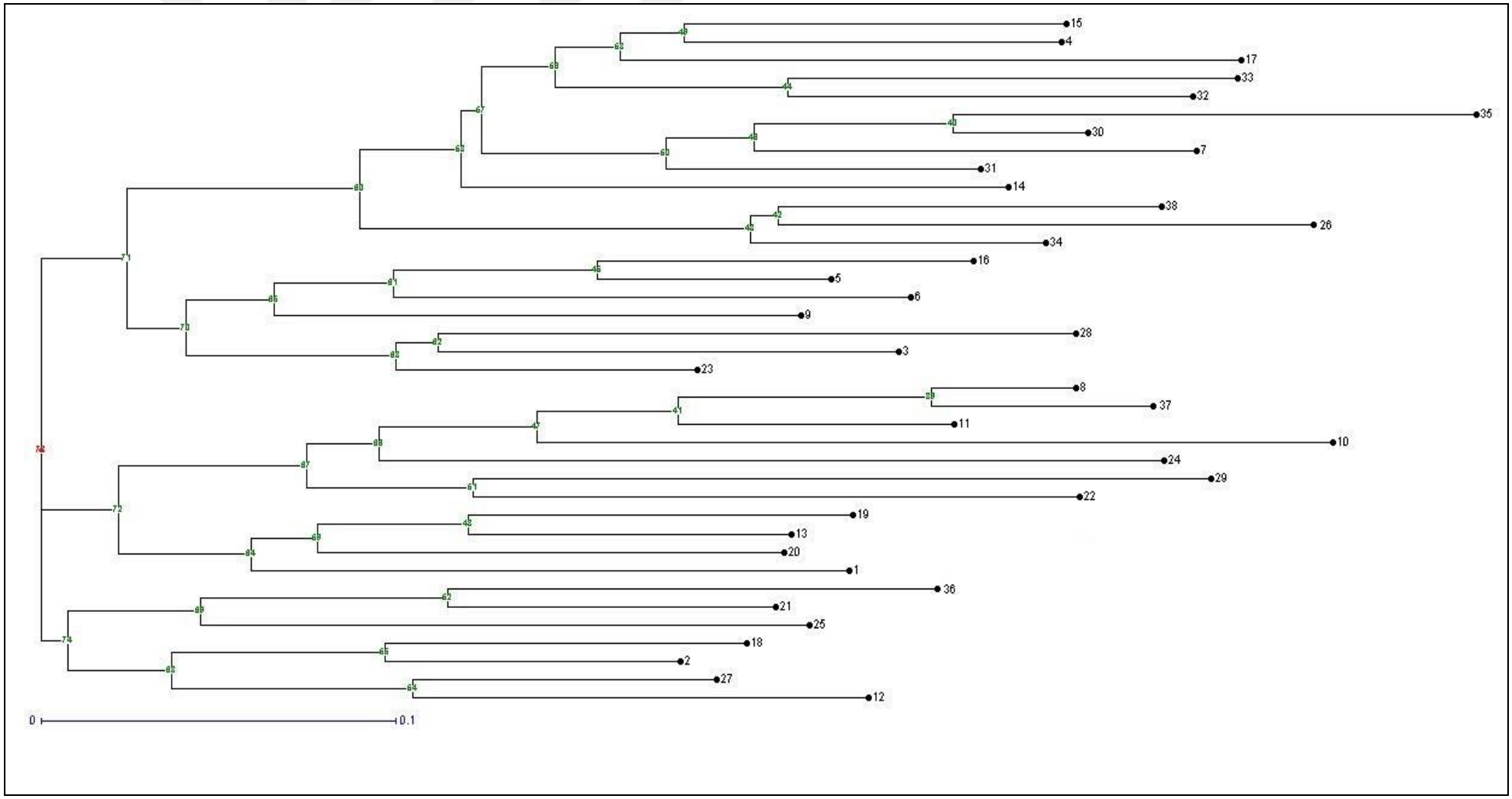


Şekil 4.2. Araştırmada kullanılan 38 adet hattın Umc2291SSR primerine ait jel görüntüsü

Araştırmada kullanılan 38 adet at dişi mısır hattında yapılan genetik çeşitlilik çalışmasından elde edilen veriler sonucunda oluşturulan filogenetik ağaç şekil 4.3'de belirtilmiştir. UPGMA analizi ile elde edilen sonuca göre 38 adet mısır hattının 3 grup oluşturduğu ve hatlar arasındaki genetik uzaklık değeri 0.60-1.00 katsayıları arasında bulunmuştur.

Genetik çeşitliliği belirleme çalışmalarında farklı moleküler teknikler kullanılmasına rağmen, SSR markörleri mısır hakkında daha detaylı bilgi verdiği için tercih edilmektedir. SSR markörleri mısır bitkisinde bağlılık ve QTL haritalarının çıkarılması, genetik çeşitliliğin saptanması ve mısır bitkisinin evrimsel gelişimi üzerinde yapılan çalışmalarda yoğun olarak kullanılmıştır (Matsuoka ve ark., 2002).

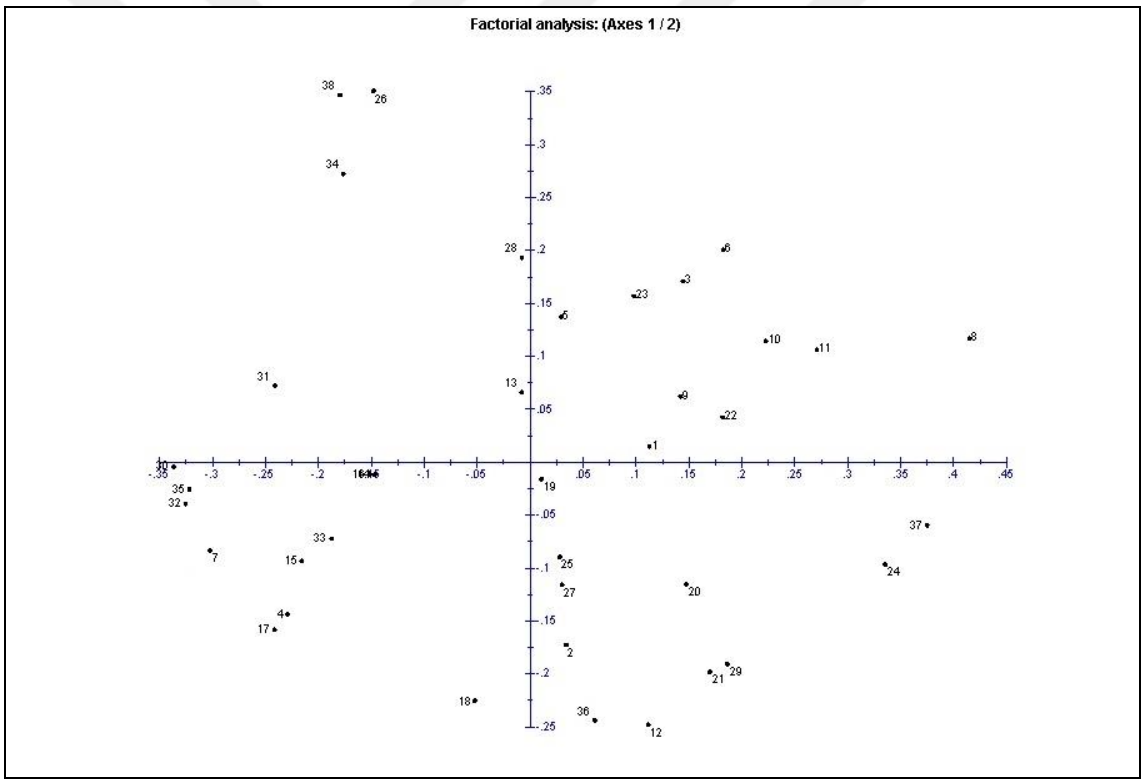
Hibrit mısır ıslahında yüksek verim ve kalitenin temelini heterosis kavramı oluşturmaktadır. Heterosisin etkin bir şekilde kullanılması, melezlemede kullanılan saf hatlara ait genetik çeşitliliğin bilinmesi ile mümkün olmaktadır. Hibrit mısır elde etmek için oluşturulan saf hatları arasındaki genetik uzaklığın fazla olması, aynı oranda verim artışlarını sağlayarak genetik çeşitliliğin muhafaza edilmesini güvenli hale getirmektedir. Islah programları içerisinde elit saf hatlardan türetilen egzotik gen kaynaklarının genetik çeşitliliği arttırdığı görülmüştür (Glover ve ark., 2005).



Şekil 4.3. Araştırmada kullanılan 38 adet hatta SSR verileri sonucu oluşturulmuş dendogram

Elde edilen veriler sonucunda oluşturulmuş filogenetik ağaç incelendiğinde 1. grupta 2, 12, 18, 21, 25, 27 ve 36 numaralı hatların, 2. grupta 1, 8, 10, 11, 13, 19, 20, 24, 29 ve 37 numaralı hatların, 3. grupta ise 3, 4, 5, 6, 7, 9, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 22, 23, 26, 28, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ve 38 numaralın hatların yer aldığı görülmektedir.

Çalışmada kullanılan hatlar yoğun olarak 3. Grupta yer almakta ve 12 numaralı hat ile 15 numaralı hattın birbirlerine en uzak hatlar olduğu görülmektedir. Çalışmada kullanılan 36 (Lancaster) ve 37 (Stiff Stalk) numaralı hatların heterojenite grupları bilinmekte olup, bu hatların yer aldığı gruplar arasında yapılacak olan melez kombinasyonlarında en yüksek melez az azmalığı elde edilmesi tahmin edilmektedir.



Şekil 4.4. Araştırmada kullanılan 38 adet hatta SSR verileri sonucu oluşturulmuş 2D görünüm

SSR verileri sonrasında yapılan PCA (Principle Component Analysis) ölçülerek 2D görüntüsü üretilmiştir. Elde edilen 2D görüntüsü şekil 4.4'de verilmiştir.

4.2.2. ISSR markörlerinin analizi

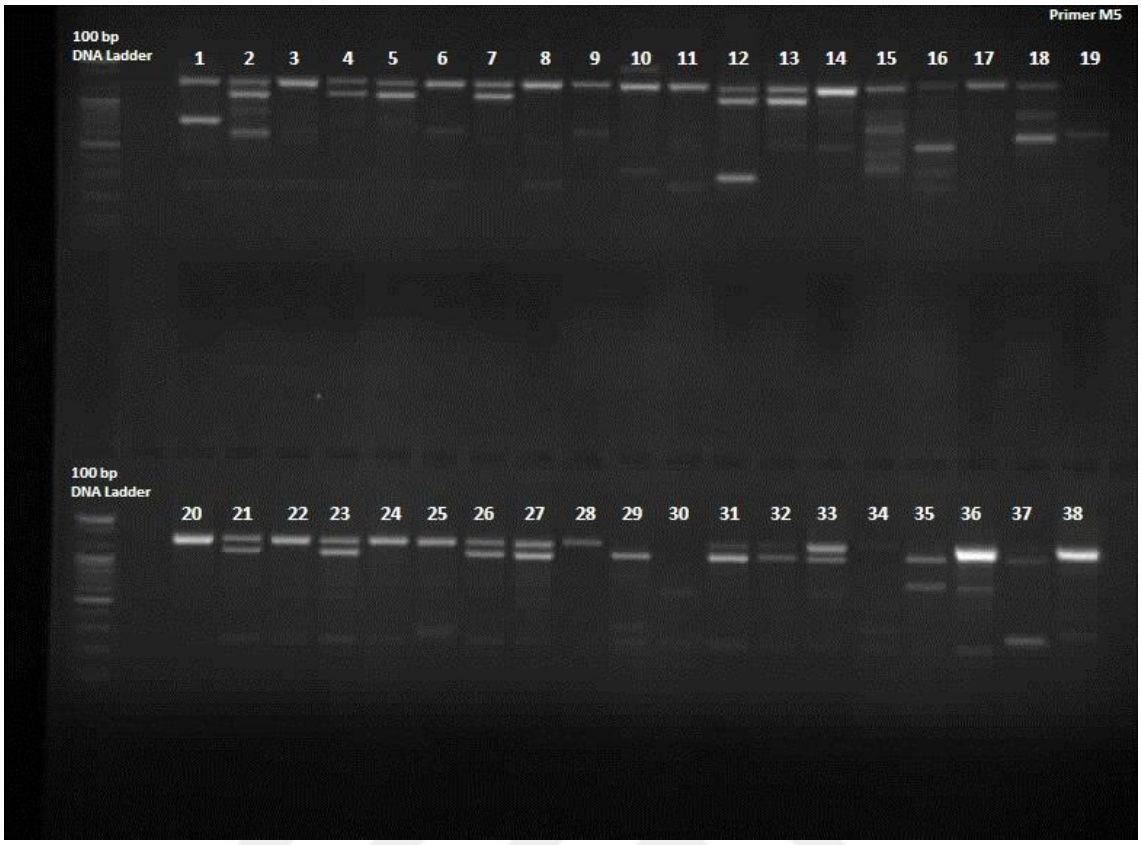
ISSR yöntemi; bitki türlerinin genom kapsamlarının türler içi ya da türler arası olarak tahmin edilmesinde başarıyla kullanılmış bir yöntemdir. Ayrıca yöntem genom haritalanmasında doğrudan kullanılamamasına karşın RFLP ve SSR markör sistemlerini desteklemesi sebebiyle ıslahta, marköre dayalı seçilimde, karakterizasyon çalışmalarında, filogenetik akrabalıkların belirlenmesi gibi geniş bir alanda kullanılmaktadır. Ayrıca türlere veya genlere ya da bölgelere özgü ISSR primerleri de bulunmaktadır (Reddy ve ark., 2002).

Araştırmada kullanılan mısır genotiplerine ait ISSR primerlerinin polimorfizm oranı (PO), polimorfizm bilgi içeriği (PBİ), ayırma gücü (AG) ve allel sayısı çizelge 4.3'de sunulmuştur. Çalışmada kullanılan 38 adet at dişi mısır hattına 20 adet ISSR primeri uygulanmış olup, kullanılan primerlerden 3 tanesi hatlar üzerinde monomorfik özellik gösterirken, 17 tanesi polimorfik özellik göstermiştir. Araştırma sonucunda ISSR markörlerinden 97 adet allel üretilmiş olup, allel sayısı 2-8 arasında değişkenlik göstermiştir ve her bir ISSR lokusuna başına düşen allel sayısı 5,7 olarak hesaplanmıştır.

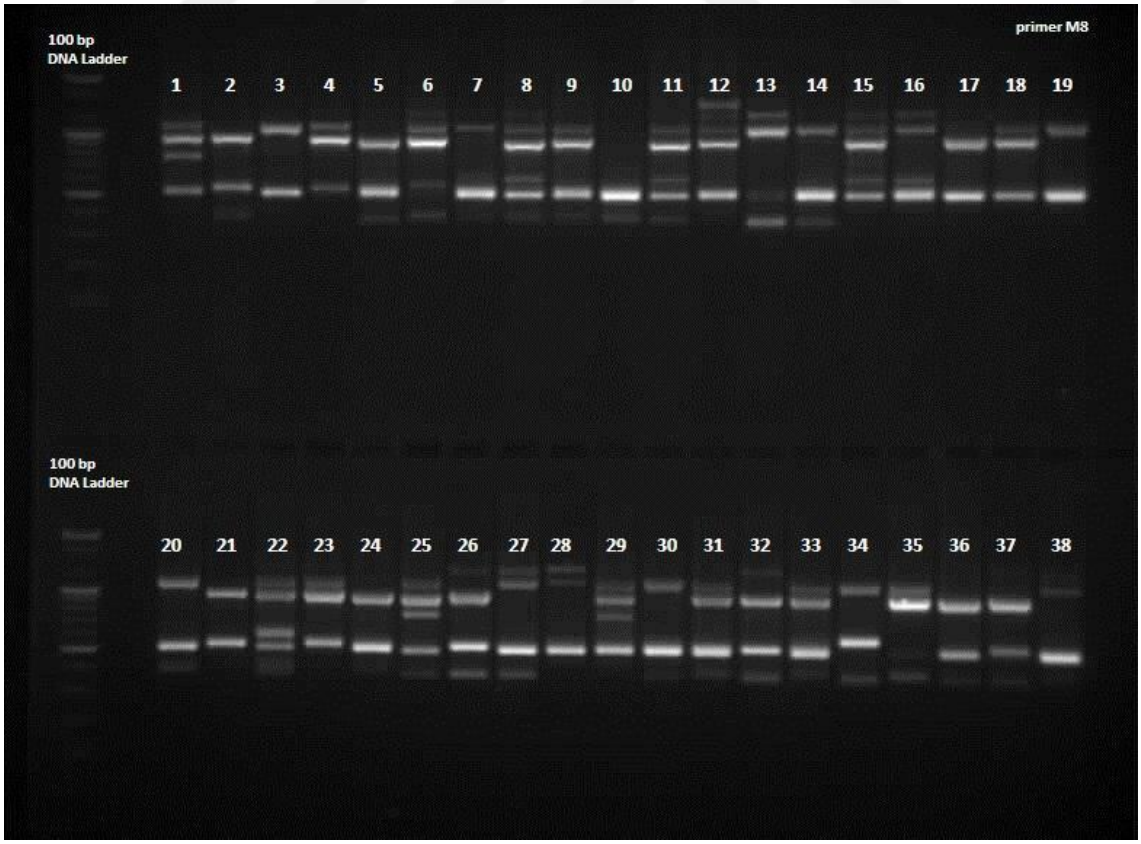
Çizelge 4.3. Kullanılan ISSR Primerlerinin polimorfizm oranı (PO), polimorfizm bilgi içeriği (PBİ), ayırma gücü (AG) ve allel sayısı

Primer	PO(%)	PBİ	AG	Allel Sayısı
M1	100	0.26	0.28	2
M2	75	0.98	0.30	4
M3	100	0.71	0.31	8
M5	100	0.77	0.51	8
M6	100	0.78	0.33	5
M8	100	0.74	0.44	7
M10	100	0.64	0.78	6
M11	100	0.69	0.44	5
M13	100	0.68	0.60	7
M14	66,7	0.69	0.68	6
M15	100	0.73	0.73	4
M16	100	0.49	0.50	2
F1	100	0.88	0.43	6
F2	83,3	0.80	0.64	6
F3	100	0.74	0.59	8
F5	100	0.78	0.69	5
F6	100	0.77	0.58	8
ORTALAMA	**--**	**0.71**	**0.53**	**5.70**

PCR sonuçlarına göre, araştırmada kullanılan 20 ISSR primerinden M5 primeri ve M8 primerine ait görüntüler sırasıyla şekil 4.5. ve şekil 4.6'de verilmiştir.



Şekil 4.5. Araştırmada kullanılan 38 adet hattın M5 ISSR primerine ait jel görüntüsü



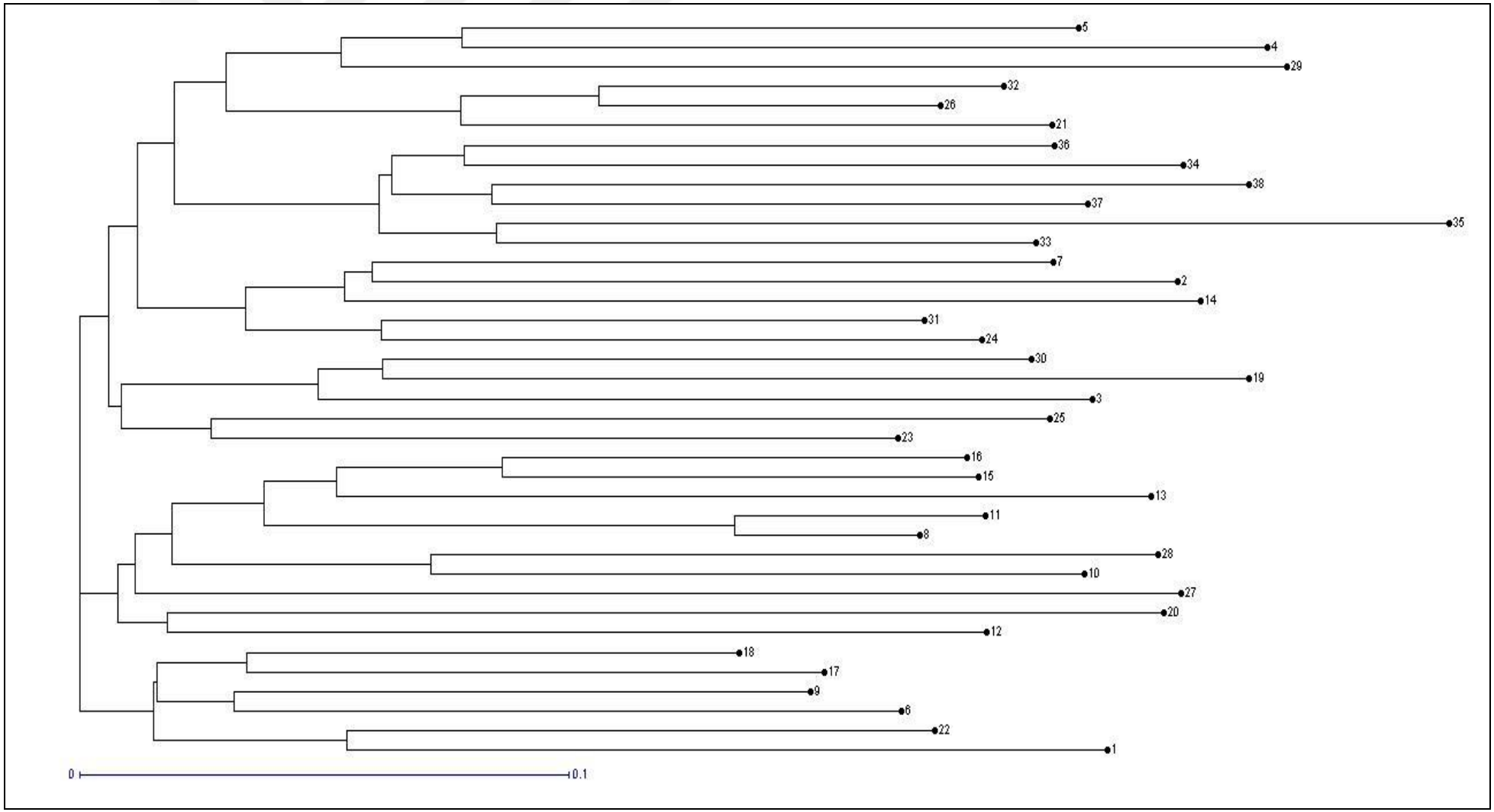
Şekil 4.6. Araştırmada kullanılan 38 adet hattın M8 ISSR primerine ait jel görüntüsü

Bu araştırmada PİC (Polimorphic İmformation Content) değeri 0.26-0.98 arasında değişmekte olup, ortalama PİC değeri 0.61 olarak hesaplanmıştır. Kullanılan ISSR primerlerinin ayırma gücü 0.28-0.78 arasında değişmekte olup primerlerin ortalama ayırma gücü 0.53 olarak hesaplanmıştır.

Araştırmada kullanılan 38 adet at dişi mısır hattında yapılan genetik çeşitlilik çalışmasından elde edilen veriler sonucunda oluşturulan filogenetik ağaç şekil'de belirtilmiştir. UPGMA analizi ile elde edilen sonuca göre 38 adet mısır hattının 3 grup oluşturduğu ve hatlar arasındaki genetik uzaklık değeri 0.61-0.92 katsayıları arasında bulunmuştur.

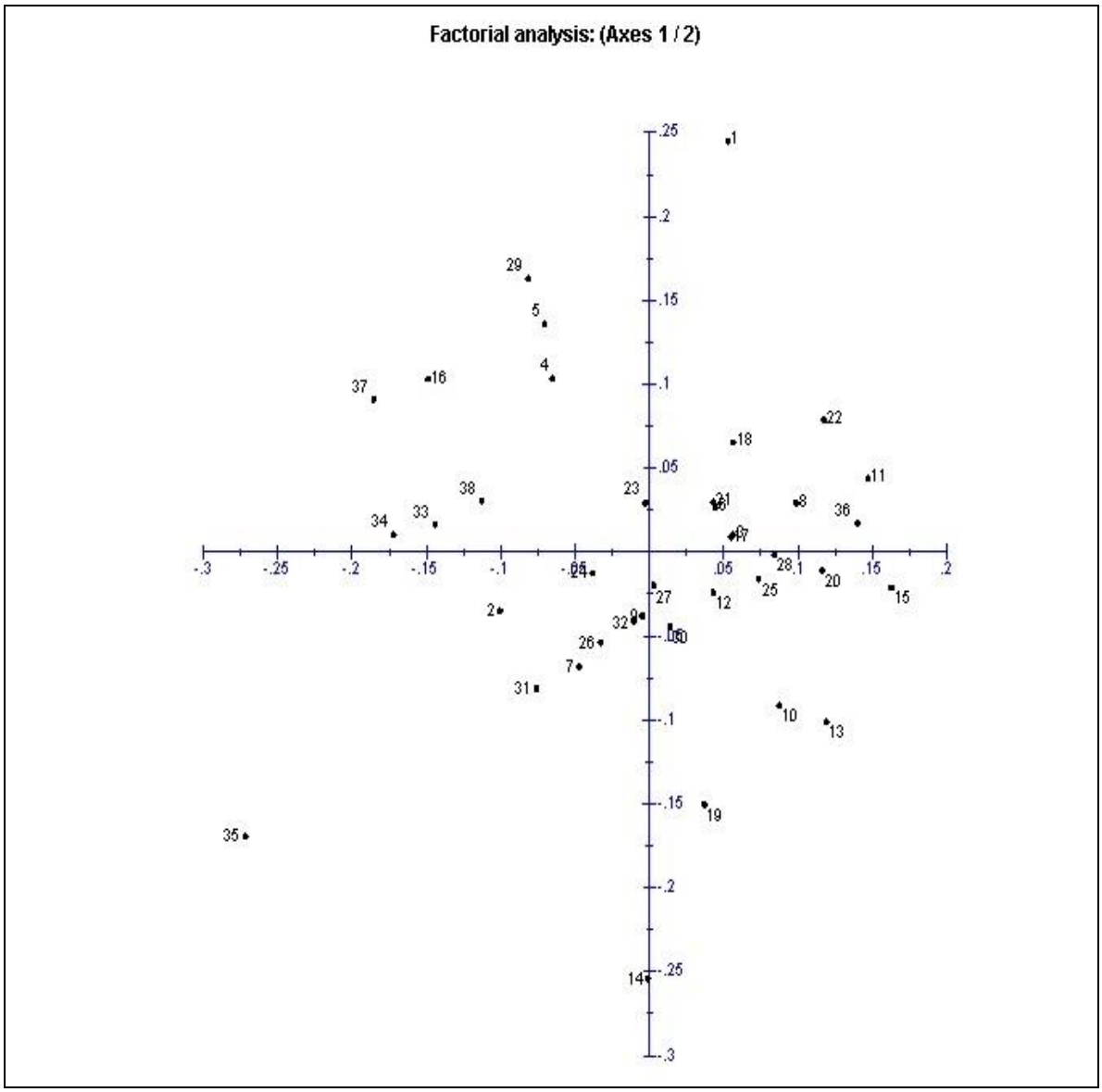
ISSR yöntemi; bitki türlerinin genom kapsamlarının türler içi ya da türler arası olarak tahmin edilmesinde başarıyla kullanılmış bir yöntemdir. Ayrıca yöntem genom haritalanmasında doğrudan kullanılamamasına karşın RFLP ve SSR markör sistemlerini desteklemesi sebebiyle ıslahta, marköre dayalı seçilimde, karakterizasyon çalışmalarında, filogenetik akrabalıkların belirlenmesi gibi geniş bir alanda kullanılmaktadır. Ayrıca türlere veya genlere ya da bölgelere özgü ISSR primerleri de bulunmaktadır (Reddy ve ark., 2002).

Valdemar P. Carvalho. ve ark. (2002); Brezilya'da 79 adet yerel ve iki gelişmiş mısır çeşidi arasındaki genetik çeşitliliği belirlemede 9 ISSR primeri kullanmışlardır. Çalışmada 153 adet bant üretilirken, 116 adet polimorfik bant elde edilmiştir. UPGMA analizi sonucunda popülasyon 3 ana gruba ayrılmıştır. Sonuç olarak ISSR markörlerinin genetik varyasyona hızlı bir şekilde erişmek için kullanılabileceğini göstermiştir.



Şekil 4.7. Araştırmada kullanılan 38 adet hatta ISSR verileri sonucu oluşturulmuş dendogram

Elde edilen veriler sonucunda oluşturulan filogenetik ağaç incelendiğinde hatların 3 ana gruba ayrıldığı, 1. Grupta 1, 6, 9, 18, 22 ve 37 numaralı hatların, 2. Grupta 8, 10, 11, 12, 13, 15, 20, 27, 28 ve 36 numaralı hatların, 2, 3, 4, 5, 7, 14, 16, 17, 19, 21, 23, 24, 25, 26, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ve 38 numaralı hatların yer aldığı görülmektedir. Çalışmada kullanılan 36 (Lancaster) ve 37 (Stiff Stalk) numaralı hatların heterojenite grupları bilinmekte olup, bu hatların yer aldığı gruplar arasında yapılacak olan melez kombinasyonlarında en yüksek melez az azmalığı elde edilmesi tahmin edilmektedir.



Şekil 4.8. Araştırmada kullanılan 38 adet hatta ISSR verileri sonucu oluşturulmuş 2D görünüm

ISSR verileri sonrasında yapılan PCA (Principle Component Analysis) ölçülerek 2D görüntüsü üretilmiştir. Elde edilen 2D görüntüsü şekil 4.8.' de verilmiştir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

5.1 Sonuç

Bu çalışmada, 38 adet at dişi mısır hattı kullanılarak SSR ve ISSR markörleri ile hatlar arasındaki genetik farklılık tespit edilmiştir. Her hattan rastgele 10 bitki seçilerek DNA izolasyonu yapılmıştır ve izolasyon sonrasında herbir hattı temsil eden 10 bitki DNA bulk yapılarak 20 adet SSR ve 20 adet ISSR markörü PCR işlemlerinde kullanılmıştır. Tüm markörler numerik veri olarak var olanlar 1 olmayanlar ise 0 olarak skorlanmıştır. Elde edilen verilerin karşılaştırılmasında Mantel (1967) testi kullanılmıştır.

Çalışmada kullanılan 38 adet at dişi mısır hattına 20 adet SSR primeri uygulanmış olup, kullanılan primerlerden 9 tanesi hatlar üzerinde monomorfik özellik gösterirken, 11 tanesi polimorfik özellik göstermiştir.Araştırma sonucunda SSR markörlerinden 43 adet allel üretilmiş olup, allel sayısı 3-5 arasında değişkenlik göstermiştir ve her bir SSR lokusuna başına düşen allel sayısı 3,3 olarak hesaplanmıştır.

Bu araştırmada PİC (Polimorphic İmformation Content) değeri 0.51-0.92 değişmiş olup, ortalama PİC değeri 0.79 olarak bulunmuştur. Araştırmada kullanılan 38 adet at dişi mısır hattında yapılan genetik çeşitlilik çalışmasından elde edilen veriler sonucunda oluşturulan filogenetik ağaç şekil 4.3'de belirtilmiştir. UPGMA analizi ile elde edilen sonuca göre 38 adet mısır hattının 3 grup oluşturduğu ve hatlar arasındaki genetik uzaklık değeri 0.60-1.00 katsayıları arasında bulunmuştur. Elde edilen veriler soncunda oluşturulmuş olan filogenetik ağaç incelendiğinde 1. Grupta 2, 12, 18, 21, 25, 27 ve 36 numaralı hatların, 2. Grupta 1, 8, 10, 11, 13, 19, 20, 24, 29 ve 37 numaralı hatların, 3. Grupta ise 3, 4, 5, 6, 7, 9, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 22, 23, 26, 28, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ve 38 numaralı hatların yer aldığı görülmektedir. Çalışmada kullanılan hatlar yoğun olarak 3. Grupta yer almakta ve 12 numaralı hat ile 15 numaralı hattın birbirlerine en uzak hatlar olduğu görülmektedir. Çalışmada kullanılan 36, 37,3 8 numaralı hatların heterojenite grupları bilinmekte olup, bu hatların yer aldığı gruplar arasında yapılacak olan melez kombinasyonlarında en yüksek melez az azmalığı elde edilmesi tahmin edilmektedir.

Çalışmada kullanılan 38 adet at dişi mısır hattına 20 adet ISSR primeri uygulanmış olup, kullanılan primerlerden 3 tanesi hatlar üzerinde monomorfik özellik

gösterirken, 17 tanesi polimorfik özellik göstermiştir. Araştırma sonucunda ISSR markörlerinden 97 adet allel üretilmiş olup, allel sayısı 2-8 arasında değişkenlik göstermiştir ve her bir ISSR lokusuna başına düşen allel sayısı 5.7 olarak hesaplanmıştır. Bu araştırmada PİC (Polimorphic İmformation Content) değeri 0.26-0.98 arasında değişmekte olup, ortalama PİC değeri 0.61 olarak hesaplanmıştır. Kullanılan ISSR primerlerinin ayırma gücü 0.28-0.78 arasında değişmekte olup primerlerin ortalama ayırma gücü 0.53 olarak hesaplanmıştır. Araştırmada kullanılan 38 adet at dişi mısır hattında yapılan genetik çeşitlilik çalışmasından elde edilen veriler sonucunda oluşturulan filogenetik ağaç şekil'de belirtilmiştir. UPGMA analizi ile elde edilen sonuca göre 38 adet mısır hattının 3 grup oluşturduğu ve hatlar arasındaki genetik uzaklık değeri 0.61-0.92 katsayıları arasında bulunmuştur. Elde edilen veriler sonucunda oluşturulan filogenetik ağaç incelendiğinde hatların 3 ana gruba ayrıldığı, 1. Grupta 1, 6, 9, 18, 22 ve 37 numaralı hatların, 2. Grupta 8, 10, 11, 12, 13, 15, 20, 27, 28 ve 36 numaralı hatların, 2, 3, 4, 5, 7, 14, 16, 17, 19, 21, 23, 24, 25, 26, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 ve 38 numaralı hatların yer aldığı görülmektedir.

Dar ve ark. (2018); 10 farklı mısır popilasyonunda 17 ISSR primeri kullanarak yaptıkları çalışmada, 108 allel elde edilmiş ve ortalama primer başına 6.35 allel hesaplanmıştır. Kullanılan primerler %72.2 genel polimorfizm yüzdesiyle polimorfik bulunmuştur. Genetik çeşitlilik indeksi ise 0.26 olarak hesaplanmıştır. Küme analizi sonucu 10 popülasyonun farklı olduğu ve yüksek oranda genetik çeşitliliğe sahip olduğu görülmüş, elit genotipler ile melezlenerek yeni çeşit ve kombinasyonların oluşturulabileceği bildirilmiştir.

SSR ve ISSR markörleri kullanılarak yapılan çalışma neticesinde elde edilen verilere ek olarak kullanılan hatların morfolojik verileri birleştirilerek gruplar arasında yapılacak olan melez kombinasyonlarından melez azmanlığı elde edileceği tahmin edilmektedir. Hibrit mısır ıslahında yüksek verim ve kalitenin temelini heterosis kavramı oluşturmaktadır. Heterosisin etkin bir şekilde kullanılması, melezlemede kullanılan saf hatlara ait genetik çeşitliliğin bilinmesi ile mümkün olmaktadır. Hibrit mısır elde etmek için oluşturulan saf hatları arasındaki genetik çeşitliliğin fazla olması, aynı oranda verim artışlarını sağlayarak genetik çeşitliliğin muhafaza edilmesini güvenli hale getirmektedir. Islah programları içerisinde elit saf hatlardan türetilen egzotik gen kaynaklarının genetik çeşitliliği arttırdığı görülmüştür (Glover ve ark., 2005)

Barcaccia ve ark. (2003); 84 SSR ve 53 ISSR markörlerini kullanarak yaptıkları çalışmada, 10 mısır popülasyonunda 253 farklı birey kullanmışlardır. SSR lokusu başına 23 allel üretilirken, ortalama allel sayısı 6.99 olmuştur. ISSR lokusu başına 17 allel üretilirken ortalama allel sayısı 1.34 olmuştur. Popülasyon içindeki ve arasındaki ortalama genetik benzerlik katsayıları SSR markörleri için sırasıyla 0.269 ve 0.217, ISSR markörleri için ise 0.591 ve 0.564 olarak hesaplanmıştır. Sonuç olarak popülasyon içerisinde yüksek oranda çeşitlilik olmasına rağmen, genotiplerin aynı bölgeye ait olduğu tespit edilmiştir.

Mısır bitkisinde yapılan genetik çeşitlilik çalışmaları ıslah programların başarısında kilit rolü oynar. Farklı markör teknolojilerinin geliştirilmesi, farklı bitkilerde DNA seviyesinin doğru incelenmesini ve değerlendirilmesini sağlar. SSR markörleri, yüksek düzeyde polimorfik yapı içeren mısır genotiplerinin, otomatik sistemler tarafından analizlerinin yüksek doğruluk ve tekrarlanabilirlikte yapılmasına olanak sağlamaktadır (Reif ve ark., 2003).

5.2 Öneriler

Mısır bitkisi geçmişten günümüze ıslah çalışmalarında kullanılan model bitkiler arasında yer almıştır. Başarılı bir ıslah programının sürdürebilirliği elde bulunan ıslah materyallerin genetik ve morfolojik farklılıklarının bilinmesi ile mümkün olmaktadır. Klasik ıslah metotlarının zaman alıcı ve yoğun iş gücüne ihtiyaç duyması yeni çeşitlerin hızlı ve sürekli bir şekilde geliştirilmesinde en büyük problemdir. Bu problem moleküler genetik çalışmaların ıslah programlarına hızlı bir şekilde entegre edilmesiyle ortadan kalkmaktadır. Mısır ıslah çalışmalarında moleküler markörlerin kullanılması, morfolojik değerlendirmeler ile karşılaştırıldığında hem hatlar arasındaki genetik yakınlık-uzaklıkların belirlenmesi, genetik kaynakların etkin bir şekilde kullanılması ve muhafazası, bakımından bitkinin DNA düzeyine kadar inerek etkin ve güvenilir bir sonuç vermektedir Jones ve ark. (1997).

Çalışmada kullanılan hatlar yoğun olarak 3. Grupta yer almakta ve 12 numaralı hat ile 15 numaralı hattın birbirlerine en uzak hatlar olduğu görülmektedir, bu iki hattın melezlemesinden sonra elde edilen hibrit kombinasyonunun yüksek verim potansiyeli göstermesi beklenmektedir. . Çalışmada kullanılan 36 (Lancaster) ve 37 (Stiff Stalk) numaralı hatların heterojenite grupları bilinmekte olup, bu hatların yer aldığı gruplar

arasında yapılacak olan melez kombinasyonlarında en yüksek melez azmalığı elde edilmesi tahmin edilmektedir. Diğer grupta toplanan hatlar ise her iki grup dışında olduğundan diğer gruplarla aralarında yapılacak olan melezlemeler sonucunda elde edilen hibrit kombinasyonlarınında heterosis özelliği göstermesi beklenmektedir.

Son zamanlarda klasik ıslah yöntemlerine eklenen moleküler teknikler ile elde var olan ıslah materyalleri arasında yapılan genetik farklılık çalışmaları ile mevcut gen havuzunun çeşitliliği ve ıslah materyallerinin heterojenite grupları belirlenmektedir. Gen havuzundaki genetik çeşitliğin ıslahçı tarafından bilinmesi gen kaynaklarının korunması ve arttırılması açısından oldukça önem arz etmektedir. Hibrit mısır ıslahında kullanılan ana ve baba hatlar birbirine ne kadar uzak ise varyasyon o kadar fazla olmakta ve başarı şansı önemli derecede artmaktadır.

KAYNAKLAR

Arıkoğlu, O., 1979, Türkiye'de Melez Mısır Islahı ve Elde Edilen Sonuçlar, Bitki Islahı Sempozyumu, İzmir, 2, 17, 275-280.

Barcaccia, G., Lucchin, M. ve Parrini, P., 2003, Characterization of a flint maize (*Zea mays var.* indurata) Italian landrace, II. Genetic diversity and relatedness assessed by SSR and Inter-SSR molecular markers, Genetic Resources and Crop Evolution, Volume 50, Issue 3, pp 253-271.

Beyene, Y., Botha, A. M. ve 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].

Brown, R. N. ve Myers, J. R., 2002, A genetic map of squash (*Cucurbita* sp.) with randomly amplified polymorphic DNA markers and morphological markers. Journal of the American Society for Horticultural Science. 127(4):568-575.

Cheng-Lai, W., Qian-Qian, Z., Bing-Xue, D., Sheng-Fu, L. ve 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 İşaretleyicilerinden Ssr Tekniği İle Karakterizasyonu. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi. Adana.

Dar, T. H., Shakeel, R. ve Verma, S., 2018, Comparative Germplasm Characterization of Maize (*Zea mays* L.) in Rajouri Region of Pir Panjal Himalaya J & K (India), based on Morphological and ISSR Markers, Journal of Crop Science and Biotechnology. 21 (1) : 43 ~ 55.

Decker-Walters, D. S., Wilkins-Ellert, M., Chung, S.-M. ve Staub, J. E., 2004, Discovery and Genetic Assessment of Wild Bottle Gourd [*Lagenaria Siceraria* (Mol.) Standley; *Cucurbitaceae*] from Zimbabwe. Economic Botany: 501-508.

Domenyuk, V. P., Verbitskaya, T. G., Belousov, A. A. ve Sivolap, Y. M., 2002, Marker analysis of quantitative traits in maize by ISSR-PCR. Russian J. Genet. 38(10): 1161-1168. Translated from Genetika. 38(10): 1370-1378.

Doyle, J. J. ve Doyle, J. L., 1990, Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12: 13-15 Edwards K, Johnstone C, Thompson C (1991) A simple and rapid method for the preparation of genomic plant DNA for PCR analysis. Nucleic Acids Res 19: 1349.

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

FAO, 2016, Food and Agriculture organization of the united nations (FAO). Http://Www.Fao.Org/Faostat/En/#Data/Qc.

Galvan, M. Z., Bornet, B., Balatti, P. A. ve Branchard, M., 2003, Inter simple sequence repeat (ISSR) markers as a tool for the assessment of both genetic diversity and gene pool origin in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Euphytica, 132: 297-301.

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

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.

Gwanama, C., Labuschagne, M. T. ve Botha, A. M., 2000, Analysis of genetic variation in Cucurbita moschata by random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. Euphytica 113: 19-24.

Jones, N., Ougham, H. ve Thomas, H., 1997, Markers and Mapping: We Are All Geneticists Now. New Phytologist 137: 165-177.

Kwon, Y. S., Tae, H. R., Kim, C. H., In, H. S. ve Kim, K. M., 2004, A comparative study of the RAPD and SSR markers in establishing a genetic relationship of the various types of Cucurbita. Korean Journal of Genetics. 26(2):115-122.

Laborda, P. R., Oliveira, K. M. ve 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.

Langade, D. M., Shahi, J. P., Srivastava, K. ve Sharma, A., 2017, Validation of parents and estimation of molecular diversity through SSR markers in maize (*Zea mays* L.), Electronic Journal of Plant Breeding, 8(4): 1035-1045.

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. ve 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.

Lenka, D., Tripathy, S. K., Kumar, R., Behera, M. ve Ranjan, R., 2015, Assessment of genetic diversity in quality protein maize (QPM) inbreds using ISSR markers, Journal of Environmental Biology, 36: 985-992.

Li, Y. L., LV., D. B., Wang, Y. Z., Chen, S. J. ve 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.

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

Matsuoka, Y., Vıgouroux, Y., Goodman, M. M., Sanchez, J., Buckler G., E. S. ve Doebley, J., 2002, A Single Domestication For Maize Shown By Multilocus Microsatellite Genotyping, Proc. Nat. Acad. Sci. Usa, 99, 6080-6084,.

.

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

Osipova, E. S., Koveza, O. V., Troitskij, A. V., Dolgikh, Y. I., Shamina, Z. B. ve Gostimskij, S. A., 2003, Analysis of Specific RAPD and ISSR Fragments in Maize (*Zea mays* L.) Somaclones and Development of SCAR Markers on Their Basis. Russian Journal of Genetics, Vol. 39, No. 12, , pp. 1412-1419. Translated from Genetika, Vol. 39, No. 12, 2003, pp. 1664-1672.

Özcan, S., Gürel, E. ve Babaoğlu, M., 2001, Bitki Biyoteknolojisi II. Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları, Selçuk Üniv. Vakıf Yayınları, Sayfa 334-363, ISBN 975-6652-05-5, Konya.

Öztürk, A., Sade, B., Soylu, S., Erdal, Ş. ve Boyacı, H. F., 2017, Kendilenmiş cin mısır hatlarının SSR primerler kullanılarak moleküler karakterizasyonu, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, Cilt 21, Sayı 2, 570-577.

Pabendon, M. B., Mejaya, M. J., Koswara, J. ve 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. ve 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. ve Pulam, T., 2008, SSR based and grain yield-based diversity of hybrid maize in Thailand, Field Crops Research, 108: 157-162.
Prevost, A. ve Wilkinson, M. J., 1999, A new system of comprasing PCR Primers applied to ISSR fingerprinting of potato accessions. Theoretical and Applied Genetics, 98: 107-112.
Rafalski, A., Morgante, M., Powell, W., Vogel, J. M. ve Tingey, S. V., 1996, Generating and Using DNA Markers in Plants. In: Birren B., Lai E. (Eds.): Analysis of Non- Mammalian Genomes - A Practical Guide. Academic Pres., New York.
Reddy, P. M., Sarla N. ve Siddiq, E. A., 2002, Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding Euphytica 128: 9-17.
Reif, J. C., Melchinger, A. E., Xia, X. C., Warburton, M. L., Hoisington, D. A., Vasal, S. K., Srinivasan, G., Bohn, M. ve Frisch, M., 2003, Genetic distance based on simple sequence repeats and heterosis in tropical maize populations, Crop Science, 43:1275-1282.
Roder, M. S., Plaschke, J., Könıg , S. U., Börner, A., Sorrells, M. E., Tanksley, S. D. ve Ganal, M. W., 1995, Abundance, Variability and Chromosomal Location Of Microsatellites İn Wheat, Mol.Gen.Genet., 246, 327-333.
Salami, H. A., Chabi Sika, K., Padonou, W., Aly, D., Yallou, C., Adjanohoun, A., Kotchoni, S. ve Baba-Moussa, L., 2016, Genetic Diversity of Maize Accessions (*Zea mays* L.) Cultivated from Benin Using Microsatellites Markers, American Journal of Molecular Biology, 6, 12-24.
Santos, L. F. C., Andueza-Noh, R. H., Ruíz, E. S., Latournerie-Moreno, L., Garruña, R., Mijangos-Cortes, J. O. ve Martínez-Casti, J., 2017, Characterization of the genetic structure and diversity of maize (*Zea mays* L.) landrace populations from Mexico, Maydica electronic publication-62.
Sathua, S. K., Shahi, J. P., Mahato, A., Gayatonde, V. ve Kumar, P., 2018, Molecular diversity analysis of maize (*Zea may*s L.) inbreds using SSR markers, Electronic Journal of Plant Breeding, 9 (3) : 1122 - 1129.
Smith, J. S. C., Chin, E. C. L., Shu, H., Smith, O. S., Wall, S. J., Senior, M. L., Mitchel, S. E., Kresorich, S. ve Tiegle, J., 1997, An evaloution of the utility of SSR loci as molecular marker in Maize (*Zea mays*): comparisons with data from RFLP and pedigree. Theor Apple Genet, 95: 163-173.
Souza, S. G. H., Pipolo, V. C. ve 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.
Stewart, C. N. J. ve Via, L. E., 1993, A Rapid CTAB DNA Isolation Technique Useful for RAPD Fingerprinting and Other PCR Applications. BioTechniques. 14(5):748-749.
Trindade, A. P. R., Pinto, R. J. B., Junior, A. T. A., Mangolin, C. A., Machado, M. F. P. S. ve Scapim, C. A., 2010, Genetic diversity of breeding popcorn lines determined by SSR markers, Electronic Journal of Biotechnology, 13(1), 1-11.
TÜİK, 2017, Türkiye İstatistik Kurumu, Https://Biruni.Tuik.Gov.Tr/Medas/?Kn=92&Locale=Tr.
Valdemar P. Carvalho., Paulo M. Ruas., Claudete, F. R., Josué, M. F. ve Rosângela, M. P. M., 2002, Assessment of genetic diversity in maize (*Zea mays* L.) landraces using inter simple sequence repeat (ISSR) markers, Crop Breeding and Applied Biotechnology, v. 2, n. 4, p. 557-568, .

Vivodík, M., Gálová, Z., Balážová, Z. ve Petrovičová, L., 2017, Genetik variation of european maize genotypes (*Zea Mays* L.) detected using SSR markers, Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences 1337-0960.

Warburton, M., Xianchun, X., Ambriz, S., Diaz, L., Villordo, E. ve Hoisington, D. A., 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. ve Hoissignton, D. A., 2002, Genetic Characterization of CIMMYT inbred maize lines and open pollinated populations using large scale fingerprinting methods, Crop Science, 42:1832-1840.

Wilkes, G., 1966, Teosinte: The Closest Relative of Maize. Cambridge, Mass., pp. 1-159.

Zeybekoğlu, B., 2012, Mısırda SSR moleküler markörler ile genetik çeşitliliğin belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Üniversitesi, Konya.

Zhang, Q., Yu, K., Yuan, W., Xue, F., Sun, H. ve Zhu, H., 2008, Purification of large scale plasmid DNAs by selective precipitation with cetyltrimethylammonium bromide. Chinese Journal of Biotechnology 24(12):2117-21.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Mehmet Akif YAŞAR
Uyruğu : T.C.
Doğum Yeri ve Tarihi : Kulu 24.06.1991
Telefon : 5349147676
Faks :
e-mail : m.akif.yasar@gmail.com

EĞİTİM

Derece		Adı, İlçe, İl	Bitirme Yılı
Lise	:	Kulu Lisesi, Kulu, KONYA	2009
Üniversite	:	Ahi Evran ÜniversitesiZiraat Fakültesi, KIRŞEHİR	2014
Yüksek Lisans	:	Selçuk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Selçuklu, KONYA	
Doktora	:		

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görevi
2015- devam ediyor.	Beta Ziraat ve Tic. A.Ş.	AR-GE Mühendisi

UZMANLIK ALANI

Biyoteknoloji ve Buğday Islahı

YABANCI DİLLER

İngilizce

YAYINLAR

1. Yorgancılar, M., Yaşar M. A., ve Atalay E., 2019, Mısır Islahında İndirgeyici Hatların Kullanımı ve Dihaploidizasyon, Bahri Bahridağdaş Bitkisel Araştırma Dergisi, 8 (1):170-177