



T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TESCİLLİ TRİTİKALE ÇEŞİTLERİNİN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

Merve ÇARIKCI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tarla Bitkileri Anabilim Dalı

Ağustos-2019
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TESCİLLİ TRİTİKALE ÇEŞİTLERİNİN MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

Merve ÇARIKCI

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Tarla Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Seydi Ahmet BAĞCI

2019, 94 Sayfa

Jüri
Prof. Dr. İsmet BAŞER
Prof. Dr. Seydi Ahmet BAĞCI
Doç. Dr. Mustafa YORGANCILAR

Tritikale hızla artan dünya nüfusunun beslenme sorunlarını çözmede alternatif bir tahıl olarak önem kazanmıştır. Tritikale verim potansiyelini makarnalık buğdaydan, soğuk, kurak ve marjinal toprak koşullarına dayanımını ise çavdardan almaktadır. Ayrıca tritikalenin pek çok hastalık ve zararlıya karşı dayanıklılık gösterdiği bilinmektedir. Bu çalışmada tescilli tritikale çeşitlerinin moleküler markör yöntemlerinden olan ISSR-PCR tekniği ile genetik karakterizasyonu belirlenmeye çalışılmıştır. DNA'ları izole edilen tescilli 15 tritikale çeşidinde 20 primerle yapılan analizler sonucunda 16 primerden polimorfik ve monomorfik bant görüntüleri oluşmuş ve %80 oranında polimorfizm elde edilmiştir. Dört primer tescilli tritikale çeşitlerinde hiç amplifikasyon göstermemiştir. Tescilli tritikale çeşitleri başlıca 2 grupta toplanmıştır. Collegial çeşidi, diğer tritikalelerden en farklı çeşit olarak bulunmuştur. Diğer çeşitler iki alt gruba ayrılmıştır. Alt gruplardaki Mikham çeşidi diğerlerine göre %29 farklılık göstermektedir. Diğer çeşitlerin birbirleri arasında en fazla %23 farklılık görülmüştür. ISSR-PCR yönteminin tritikale genotiplerinin genetik karakterizasyonunda kullanabileceği belirlenmiştir ve elde edilen sonuçlara göre bu veriler tritikale ıslah çalışmalarında temel oluşturacaktır.

Anahtar Kelimeler: ISSR=BTDAP (Basit tekrarlı diziler arası polimorfizm), Moleküler Karakterizasyon, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), Tritikale

ABSTRACT

MS THESIS

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF REGISTERED TRITICALE VARİETİES

Merve ÇARIKCI

THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF SELÇUK UNIVERSITY
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
IN AGRICULTURE ENGINEERING

Advisor: Prof. Dr. Seydi Ahmet BAĞCI

2019, 94 Pages

Jury
Prof. Dr. İsmet BAŞER
Prof. Dr. Seydi Ahmet BAĞCI
Assoc. Prof. Dr. Mustafa YORGANCILAR

Triticale has gained importance as an alternative cereal in solving nutritional problems of the rapidly growing world population. Triticale yield potential is obtained from durum wheat and its resistance to cold, arid and marginal soil conditions is obtained from rye. In addition, triticale is known to tolerate many diseases and pests. In this study, the genetic characterization of registered triticale varieties by ISSR-PCR technique which is one of the molecular marker methods has been tried to determine. Polymorphic and monomorphic band images were formed from 16 primers as a result of analysis of 20 primers in 15 registered triticale isolates, and 80% polymorphism was obtained. Four primers did not show any amplification in the registered triticale variety. Registered triticale varieties are mainly collected in 2 groups. Collegial variety was found as the most different variety. From others. Other varieties are divided into two sub-groups. Variety Mikham in the subgroups differed 29% from the others. Other varieties showed a maximum difference of 23% between each other. It has been determined that ISSR-PCR method can be used in the genetic characterization of triticale genotypes and this data will be the basis for triticale breeding studies.

Keywords: ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat), Molecular Characterization, Polimeraze Chain Reaction (PCR), Triticale

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim süresince ve tez çalışmamda yardımlarını eksik etmeyen danışman hocam Prof. Dr. S. Ahmet BAĞCI'ya, tezimin laboratuvar çalışmaları sırasında yardımlarını eksik etmeyen Zir. Yük. Müh. Özcan YORGANCILAR'a ve tekniker Fahriye VAN'a, literatür ve laboratuvar çalışmalarımda destek olan Doç. Dr. İmren KUTLU'ya, çalışmamın sonuçlarını değerlendirmede yardımlarından dolayı Prof. Dr. Tuna UYSAL ve Dr. Öğr. Üy. Meryem BOZKURT'a teşekkür ederim.

Merve ÇARIKCI
KONYA-2019

İÇİNDEKİLER

TEZ KABUL VE ONAYI ..... **i**
TEZ BİLDİRİMİ ..... **ii**
ÖZET ..... **iii**
ABSTRACT ..... **iv**
ÖNSÖZ ..... **v**
İÇİNDEKİLER ..... **vi**
SİMGELER VE KISALTMALAR ..... **viii**
1. GİRİŞ **1**
1.1. Bitki Özellikleri ve İklim İstekleri 3
1.1.1. Kullanım alanları 4
1.2. Türkiye'de Tritikale Islah Çalışmaları 5
1.2.1.Bitki ıslahı ve genetik çeşitlilik 6
1.3. Bitki Biyoteknolojisi 8
1.3.1. Genetik markörler 9
1.3.1.1. Morfolojik markörler 11
1.3.1.2. Biyokimyasal markörler 12
1.3.1.3. Moleküler markörler 12
1.3.1.3.1. Hibridizasyona dayanan moleküler markörler 16
1.3.1.3.1.1.RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism- kesilmiş parça uzunluk polimorfizmi) 17
1.3.1.3.1.2. Polimeraz zincir reaksiyonu kullanımına dayanan moleküler markörler 18
1.3.1.3.1.3. RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA- rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA) 22
1.3.1.3.1.4. AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism- çoğaltılmış parça uzunluk polimorfizmi) 22
1.3.1.3.1.5. SSR (Simple Sequence Repeat -basit dizi tekrarı, mikrosatellit) 23

1.3.1.3.1.6. STS (Sequence Tagged Site- dizisi etiketlenmiş alan).... 26
1.3.1.3.1.7. CAPS (kesilip çoğaltılmış polimorfik diziler) 26
1.3.1.3.1.8. Markör teknolojilerinde EST (ifade edilmiş dizi etiketleri) kullanımı 27
1.3.1.3.1.9. ISSR markörler (Inter Simple Sequence Repeat- basit dizi tekrarları arası bölgeler)..... 28
1.3.1.3.2. DNA dizi ve çip (mikroarray) teknolojisine dayanan moleküler markörler 33
1.3.1.3.2.1. SNP (Tek nükleotid polimorfizmi)..... 34
1.3.1.3.2.2. DArT (Diversity Array Technology – diversity array teknoloji)..... 35
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI 38
3. MATERYAL VE YÖNTEM..... 55
3.1. Materyal 55
3.1.1. Bitki materyali 55
3.2.Yöntem..... 56
3.2.1. Deneme yılı ve yeri..... 56
3.2.2. Tritikale tohumlarının çimlendirilmesi..... 56
3.2.3. DNA izolasyonu 57
3.2.4. DNA Miktar Tayini 61
3.2.5. DNA konsantrasyonu 63
3.2.6. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR koşulları) 63
3.2.6.1. ISSR analizi..... 64
3.2.6.1.1. $MgCl_2$ konsantrasyonu 66
3.2.6.1.2. Primer konsantrasyonu..... 66
3.2.6.1.3. dNTP konsantrasyonu 66
3.2.6.1.4. Taq polimeraz enzim konsantrasyonu..... 66
3.2.6.1.5. 10X buffer (tampon) Taq polimeraz enzim konsantrasyonu 67
3.2.6.2. Primerlerin DNA'ya yapışma sıcaklıklarının belirlenmesi..... 67
3.2.6.2.1. Gradient PCR analizleri 67
3.2.6.3. ISSR primerleri 67
3.2.6.4. ISSR primerleri kullanılarak elde edilen pcr ürünlerinin agaroz jel elektroforezinde görüntülenmesi..... 68
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA..... 71
4.1.Sonuçlar 71

4.2.Primerlerin Polimorfizm Oranlarının Belirlenmesi 78
4.3. DNA Bantlarının Değerlendirilmesi 79
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 81
5.1 Sonuçlar 81

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

% : Yüzde
U : Unit
Bp : Base Pair
C° : Santigrat Derece
Cm : Santimetre
DNA : Deoksiribo Nükleik Asit
Gr : Gram
Ha : Hektar
Mg : Miligram
$MgCl_2$: Magnezyum Klorür
Ml : Mililitre
mM : Milimol
ng : Nanogram
pH : Power of Hydrogen
RNA : Ribonükleik asit
Taq : DNA Polymerase
Tm : Erime Sıcaklığı
V : Volt
µl : Mikrolitre

Kısaltmalar

AFLP : Amplified Fragment Length Polymorphism Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi
AP-PCR : Arbitrarily Primed PCR
ASO : Allel- Spesifik Oligonükleotid Hibridizasyon
CAPs : Cleaved Amplified Polymorphic Sequence Çoğaltılmış Kesilmiş Polimorfik Dizi
cDNA : Kloroplast DNA
CIMMYT : Uluslararası Mısır ve Buğday Geliştirme Merkezi
DAF DNA : Amplification Fingerprinting
DArT : Diversity Arrays Technology Diversity Array Teknoloji
dNTP : Deoksiribonükleozid Trifosfat
EMR : Primerlerin Etkin Multipleks Oranı
EST : Expressed Sequence Tag İfade Edilen Dizi Etiketi
ETOH : Etanol
Fao : Gıda ve Tarım Örgütü
HA : Heterodupleks Analizi
ICARDA : International Center for Agricultural Research in the Dry Areas
IRAP : Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism
ISSR : Inter Simple Sequence Repeat
ITAP : Inter-Transposon Amplified Polymorphism

MAS : Markör Yardımıyla Seleksiyon
MI : Marker İndeksi
mRNA : Mesajcı RNA
mtDNA : Mitokondrial DNA
nDNA : Nüklear DNA
PCR : Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
PIC : Polimorfik Bilgi İçeriği
QTL : Kantitatif Karakter Lokus
RAMP : Random Amplified Microsatellite Polymorphism (Rasgele Çoğaltılmış Mikrosatellit Polimorfizmi)
RAPD : Random Amplified Polymorphic DNA (Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA)
REMAP : Retrotransposon- Microsatellite Amplified Polymorphism
RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism (Kesilmiş Parça Uzunluk Polimorfizmi)
RNase : RNA'yı Sindiren Enzim
Rp : Ayırma Gücü
SCARs : Sequnce Characterized Amplified Regions Dizisi (Karakterize Edilmiş Çoğaltılmış Bölgeler)
SNP : Single Nucleotide Polymorphism (Tek Nükleotit Polimorfizmi)
SPAR : Single Primer Amplification Reaction
SSCP : Single- Strand Conformational Polymorphism Tek İplik Konformasyonel Polimorfizmi
SSR : Simple Sequence Repeat Basit Dizi Tekrarı
STS : Sequence Tagged Site Dizisi Etiketlenmiş Alan
Taq : DNA Polimeraz
TBE : Tris-Borik Asit- EDTA Çözeltisi
TE : Tris-EDTA
UPGMA : Aritmetik Ortalamayı Kullanan Ağırlıksız Çift Grup Metodu

1. GİRİŞ

Tahıllar dünyada kültürü yapılan bitkiler içerisinde en fazla ekim alanına ve üretime sahiptirler. İnsanlar ve hayvanlar tarafından tüketilen yıllık protein miktarının yaklaşık %50'sini karşılamaktadır. (Çölkesen, 1995).

Yetersiz ve dengesiz beslenme, son yıllarda ülkelerin üzerinde durduğu konuların başında gelmektedir. Az gelişmiş ya da gelişmekte olan ülkelerde beslenme sorunları sebebiyle insanlar çeşitli hastalıklara yakalanmak veya ölmektedir. Beslenme sorunlarının çözülebilmesi için, nüfus artışı ile birlikte gıda maddelerinin de yeterli miktarda ve kalitede üretilmesi gereklidir. Hayvansal gıda ürünlerinin pahalı olması ve uzun süre depolanmalarının zorluğundan dolayı bitkisel gıda maddelerinin üretimi ön plana çıkmaktadır. Dünyada olduğu gibi Türkiye'de de tahıl ve tahıla dayalı ürünler insan beslenmesinde önemli bir yer tutmaktadır. İnsan beslenmesinde kullanılan proteinin, dünyada %52'si, Türkiye'de ise %80'i; karbonhidrat ve enerjinin dünyada %50'si, Türkiye'de %60'ı tahıllardan karşılanmaktadır (Kün 1996). Tahıllar, dünyada geniş alanlarda ekimi ve üretimi yapılan ürün grubunu oluşturmaktadır. Dünyada en fazla ekimi ve üretimi yapılan tahıllar arasında buğday, mısır, çeltik, arpa ve çavdar yer almaktadır.

Tarih boyunca gıda temini ve beslenme önemli sorun olmuştur. Dünya nüfusunda hızlı artış olmasına karşın doğal kaynakların sınırlı ve ekilebilir tarım alanlarının en üst düzeye ulaşmış olması sebebiyle, ıslah çalışmaları sayesinde tarım ürünlerinde verimin ve kalitenin artırılması son derece önemli hale gelmiştir. Diğer taraftan, tarımsal üretime fazla elverişli olmayan verimsiz toprakların da etkin şekilde üretime katılması, üzerinde önemle durulan bir diğer konudur (Bağcı, 2001). Türkiye tahıllar için uygun bir ekolojiye sahip olmasına rağmen üretim istenilen düzeyde değildir. Ülkemizdeki üretimin arttırılarak öncelikle kendine yetmesi ve sonrada Türkiye'nin dış satıcı durumuna geçmesi gerekmektedir. Bunun için yapılması gerekenler ise; birim alandan alınan verimin arttırılması, ürünlerin fiyat ve pazarlama problemlerinin çözülmesi ve yeni alternatif ürünlerin yetiştirilmesidir (Şehirali vd., 2000).

Dünya nüfusunun hızla artmasına rağmen yeryüzündeki tarım arazilerinin sınırlı olması tarımda verim artışını zorunlu kılmaktadır. Bu durum bilim adamlarını ekstrem koşullarda yetişebilecek, yüksek verime sahip, stres koşullarına dayanıklı yeni bitki, tür ve çeşitlerini geliştirmeye yönlendirmiştir. Bu konudaki ilk önemli çalışma 1875 yılında İskoçya'da yapılmış ve çalışmada buğdayın verim potansiyeline ve özelliklerine sahip, farklı coğrafya ve iklimlerde yetiştirilebilen, soğuğa, kuraklığa ve asitli topraklara

dayanıklı bir tahılın elde edilmesi planlanmıştır. Yapılan çalışmalardan üretilen en başarılı ürünlerden bir tanesi tritikaledir (Müntzing 1979).

İlk olarak 1875'te buğday ile çavdarın melezlenmesi sonucunda İskoç Botanikçi Stephen Wilson tarafından elde edilen tritikaleler denenmiş fakat melezler steril çıkmıştır. Alman Botanikçi Rimpau 1888'de yaptığı çalışmalarda kısmı fertil melezler elde etmiştir. Önemli ilk başarıya 1938 yılında buğday ve çavdar melezine colchicin (kolkisin) uygulayarak fertil tohum veren melez bitkiler elde eden İsveçli Genetikçi Müntzing tarafından ulaşılmıştır.

Bu yeni bitkiye buğday (Triticum) ve çavdar (Secale)'ın Latince isimleri birleştirilmesiyle oluşturulan X. *Triticosecale* Wittmack adı verilmiştir. İlk tritikale melezleri ekmeklik buğday ve çavdarın melezlenmesi ile oluşmuştur. 1948'de J. O. Mora'nın durum buğdayı ve çavdarı melezlemesi sonucu elde edilen tritikalenin önceki melezlere göre daha iyi özelliklere sahip olduğu görülmüştür.

Tritikale anası buğday, babası çavdar olan bir amphidiploid melezdir. Tritikale, ana ve babanın poliploidi düzeylerine bağlı olarak tetraploid, hekzaploid, oktoploid olabilmektedir. Günümüzde danesi için yaygın olarak kullanılan tritikale, durum buğdayı ve çavdar melezinden oluşan hekzaploid (2n=6x=42) tritikaledir ve amfidiploid forma sahip olup klasik genom dizilimi AABBRR 'dir (Yıldırım vd., 2007).

İlk tritikale çeşidi (1966) Avrupa'da tescil edilmiştir. Daha sonra bunu Kuzey Amerika'da tescil edilen 'Kosner' isimli tritikale çeşidi izlemiştir. Tritikale AABBRR ya da AABBDDRR genomik formülüne sahip, buğday ve çavdar türlerinin melezlenmesi sonucu elde edilen yapay bir tahıl cinsidir (Briggle 1969).

Tritikaleler oktoploid ya da tetraploid olmasına karşın, tritikale çeşitlerinin çoğu hekzaploid'dir (Lukaszewski ve Gustafson 1987). Buğday (AABB) ve çavdar (RR) melezlenmesi sonucu elde edilen hekzaploid tritikaleler birincil hekzaploid tritikale (AABBRR) olarak adlandırılmaktadır. Hekzaploid tritikalelerin melezlenmesi ya da hekzaploid buğday x tritikale melezleri ve oktoploid tritikaleler ise ikincil hekzaploid tritikale (AABBRRDD) olarak adlandırılmaktadır. İkincil tritikalelerin avantajı, ekmeklik buğdaydan D genomunun katılması sonucu genetik çeşitliliğinin artmış olmasıdır. Tritikalenin yazlık ve kışlık olarak yetiştirilen formları mevcuttur. Buğdaya oranla daha az kardeşlenme özelliğinde, daha uzun boylu ve daha büyük başaklı olduğu bilinmektedir. Tritikale çeşitleri genelde kılçıklıdır, ancak son yıllarda kılçıksız tritikale formları da geliştirilmiştir (Briggle 1969, Stallknecht vd., 1996).

Buğday x çavdar melezinin amfidiploidi olan tritikalede ilk araştırmalar daha çok taksonomi ve evrim çalışmalarını içermekteydi. Daha sonra verim ve hektolitre ağırlığının yükseltilmesinin yanında bitki boyunun kısaltılması gibi çalışmalara öncelik verilmiştir. Günümüz tritikale çeşitlerinde bu özelliklerin iyileştirilmesiyle birlikte ekim alanlarında önemli bir artış sağlanmıştır.

Tritikale verim potansiyelini makarnalık buğdaydan, soğuk, kurak ve marjinal toprak koşullarına dayanımını ise çavdardan almaktadır ve pek çok hastalık ve zararlıya karşı dayanıklılık gösterdiği bilinmektedir (Varughese, vd., 1996). Bu özelliklerinden dolayı tritikale artan dünya nüfusunun beslenme sorunlarını çözmede alternatif bir tahıl olarak öne çıkmaktadır.

1.1. Bitki Özellikleri ve İklim İstekleri

Tritikale, çavdarın iklim ve toprak özellikleri yönünden fazla seçici olmayan özelliği ile hastalık ve zararlılara dayanıklılığını; buğdayın ise yüksek verim ve kalite özelliklerini içeren bir cinstir. Tritikale; serin iklim tahıllarından buğday ve arpaya göre olumsuz çevre koşullarına daha fazla dayanmakta ve stres koşullarında bile olsa belirli bir verime ulaşabilmektedir. Almanya'da yapılan çalışmalara göre tritikale, buğday ve arpaya göre daha düşük sıcaklıklara dayanabilmektedir. Tritikale, bitki boyunun uzun olması ve sağlam sap yapısı ile yatmaya dayanıklı olması, buğdaya göre az kardeşlenmesi ve başakçık dış kavuzlarının tüylü olması gibi özellikleri ile dikkati çekmektedir. Tritikale ile marjinal alanların değerlendirilmesinde ve yeni çeşitlerin geliştirilmesiyle birlikte ekim alanı ve üretimde önemli artışların sağlanacağı düşünülmektedir. (Müntzing 1989, Mergoum vd. 1992, Kün 1996).

Tritikale, özellikle buğday tarımına elverişli olmayan alanlarda; toprak derinliği az, çorak ve kışları çok sert geçen bölgelerde buğdaydan daha verimli olabilmektedir. Tritikale diğer serin iklim tahıllarına göre çevre koşullarından daha iyi yararlanabilmekte ve daha stabil durumda kalabilmektedir. Tritikale artan yem açığının kapatılmasında, marjinal alanların değerlendirilmesinde önemli bir alternatif bitki olarak öne çıkmaktadır.

1.1. 1. Kullanım alanları

Son yıllarda yapılan çalışmalar, tritikalenin yem verimi, kuru madde oranı, lif içeriği, hazım olma derecesi gibi hayvan beslemede önemli özellikler yönünden diğer tahıllara eşdeğer ya da daha üstün olduğunu göstermiştir. Protein oranı ve amino asit içeriği ile amino asit dengesi buğdaya göre daha iyi durumdadır (Fernandez-Figares 2000). Danelerinin fosfor, mangan, demir ve bakır içeriği de oldukça yüksek bulunmuştur. Bu yüzden tritikale hayvan beslenmesinde arpa, yulaf ve buğdayın yerine kolaylıkla kullanabilir alternatif bir bitkidir. Domuz ve kanatlı hayvanların beslenmesinde yem rasyonlarına katılması önerilmektedir (Çiftçi vd. 2003).

Tritikale unu, buğday ve çavdar unu ile karıştırılarak, ekmek, pasta ve bisküvi yapımında kullanılabilmektedir. Tritikalede dane kırışıklığı, hektolitre ağırlığının ve un randımanının düşük olması nedeni ile tritikale unu buğday ununa %50-70 oranında karıştırılarak kullanılmasına karşın, son yıllarda geliştirilen yeni çeşitlerde %100 tritikale unu ile ekmek yapılabilmektedir. Üretici ve tüketicinin isteklerine uygun yeni çeşit ve hatlarının geliştirilmesi ile birlikte tritikale ekim alanları her geçen gün artış göstermektedir.

Tritikale, ticari olarak ilk defa 1969 yılında piyasaya sunulmasından günümüze kadar üretiminde önemli artış sağlanmıştır. Tritikale, dünyada insan gıdası ve hayvan yemi olarak kullanılmakta ve ekim alanları gün geçtikçe artmaktadır. Son verilere göre dünyada 4,1 milyon ha ekim alanına, 15,5 milyon ton üretime ve 3.736 kg /ha verime sahip olan tritikale'nin tarımının en fazla yapıldığı ülkeler; Polonya, Çin, Beyaz Rusya, Almanya'dır. (FAO, 2017). Özellikle Polonya ve Rusya gibi problemli topraklarda ve marjinal iklime sahip ülkelerde tritikale geniş bir üretim alanına sahiptir.

Çizelge 1. 1. 2004-2017 yılları arasında Dünya'da tritikale ekim alanı (Ha), Üretim miktarı (ton), Verim (kg/ha)

Yıllar	Ekim Alanı (Ha)	Üretim (ton)	Verim (Kg/Ha)
2004	3572214,00	14035860,00	3929,20
2005	3786032,00	13367942,00	3530,90
2006	3637361,00	10809774,00	2971,90
2007	3707678,00	12353384,00	3331,80
2008	3885605,00	14226241,00	3661,30
2009	4331787,00	15833430,00	3655,20
2010	3980772,00	13737242,00	3450,90
2011	3849066,00	13431641,00	3489,60
2012	3638985,00	13650453,00	3751,20
2013	3826524,00	14462668,00	3779,60
2014	4126179,00	17069926,00	4137,00
2015	4559828,00	16910776,00	3708,60
2016	4234298,00	15564051,00	3675,70
2017	4165783,00	15563415,00	3736,00

Günümüzde üretimi yapılan tritikale çeşitlerinin tamamına yakını makarnalık buğday ile çavdarın melezlenmesi sonucu elde edilen çeşitlerdir. Tritikale ıslahındaki amaç, daha verimli ve kaliteli yeni çeşitlerin elde edilerek üretime kazandırılmasıdır. Türkiye'de üretim izinli olarak ilk kez Bakırçay tritikale çeşidi yetiştirilmeye başlanmış, daha sonra Tatlıcak 97, Tacettinbey, Presto, Karma 2000, Melez 2001 ve MİKHAM 2002, Ege Yıldızı, Focus, Alperbey, Ümranhanım, Mehmetbey, Ayşehanım tritikale çeşitleri tescil edilmiştir. Adana, Konya, Tokat ve Sivas gibi illerimizde yetiştirilmeye başlanan tritikalenin Türkiye'de ki ekim alanı aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Çizelge 1. 2. 2004-2017 yılları arasında Türkiye'de tritikale ekim alanı (da) ve üretimi (ton)

Yıllar	Ekim Alanı (Ha)	Üretim (ton)	Verim (Kg/Ha)
2004	30000,00	95000,00	3166,70
2005	32000,00	110000,00	3437,50
2006	24111,00	77642,00	3220,20
2007	27494,00	86476,00	3145,30
2008	27391,00	93723,00	3421,70
2009	28373,00	98716,00	3479,20
2010	26844,00	93270,00	3474,50
2011	29783,00	103797,00	3485,10
2012	32227,00	105000,00	3258,10
2013	35402,00	118000,00	3333,10
2014	34895,00	110000,00	3152,30
2015	37185,00	125000,00	3361,60
2016	37621,00	125000,00	3322,60
2017	43601,00	150000,00	3289,40

1. 2. Türkiye'de Tritikale Islah Çalışmaları

Türkiye'de 1980'li yıllarda Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi ve Çukurova Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nün CIMMYT ve ICARDA'dan (International Center for Agricultural Research in the Dry Areas) temin ettikleri materyalle yaptıkları deneme ve çalışmalar üreticilerin dikkatini çekmiş ve tohum ithali için bazı girişimlerde bulunulmuştur. Fakat tritikalenin ekmeklik kalitesinin buğdaya göre daha düşük olması ve ekmeğinin lezzetli bulunmaması sonucu araştırmacı kuruluşlar tritikale üretimine girilmesine gerek olmadığını veya erken olduğunu ileri sürmüşlerdir ve tohum ithali ve tritikale üretimi kesintiye uğramıştır (Kınacı, 1998).

Üreticinin gerçek anlamda tritikale ile tanışması Bahri Dağdaş Uluslararası Tarımsal Araştırma Enstitüsü tarafından yürütülen çalışmalar sonucunda geliştirilerek tescil ettirilen ilk kışlık tritikale çeşidi "Tatlıcak 97" ile olmuştur. Bu çeşidin yüksek verim performansı göstermesi ile birlikte tritikale ekimi ülkemizde artmaya başlamıştır. Tritikale bu artışla birlikte son yıllarda, Bahri Dağdaş Uluslararası Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nün de bulunduğu ve Türkiye'nin tahıl ambarı olarak adlandırılan Konya ilinin Ticaret Borsasında işlem görmeye başlamıştır.

Tritikalenin ilk geliştirilme hedefi, insan tüketimine sunulmasıdır. Fakat pazarlama problemi, istikrarsız üretim, tanıtım eksikliği ve insanların yeni gıdaların tüketimine olan ön yargılı yaklaşımları nedeni ile dünyada üretilen tritikalenin büyük bir bölümü halen hayvan beslemesinde kullanılmaktadır. Oysa besin değeri buğdayla eşdeğer hatta bazı bileşenler açısından buğdaydan biraz daha iyi olan, buğdayın verimli olamadığı her türlü koşulda yetişebilen, yüksek verimli bir tahıl olarak kabul edilen tritikalenin en kısa zamanda insan beslenmesine daha yüksek oranda kazandırılması büyük önem taşımaktadır.

1. 2.1.Bitki Islahı ve Genetik Çeşitlilik

Gün geçtikçe artan nüfusun gıda ihtiyacını karşılamak ancak temel besin maddelerinin üretim miktarını artırmakla mümkün olacaktır. Gittikçe azalan tarım arazileri göz önüne alındığında, üretimi artırmanın en etkili yolunun bitki ıslahı olması kaçınılmazdır. Islah çalışmaları için gerekli materyal tescilli çeşitlerden, yerel çeşitlerden ve yabani akrabalardan sağlanmaktadır. Bu nedenle, bu materyallerin taranmasıyla

belirlenen uygun genlerin geliştirilmiş tekniklerle kültür çeşitlerine aktarılması gerekmektedir (Eserkaya ve ark., 2010).

Bitkiler insanlar için çok önemli bir besin kaynağıdır. Bitki ıslahı, insan eliyle ve farklı sürelerde gerçekleşen evrim olarak düşünülebilir ve ıslah çalışmaları arkeolojik bulgulara göre on binlerce yıl önce başlamıştır. İnsanlar yerleşik hayata geçmeden ve tarıma başlamadan önce ve belli zamanlarda tohumları toprağa ekerek gelişimlerini gözlemlemiş ve büyüyen bitkilerden bazılarının diğerlerine göre daha iyi gelişme göstermeleri, hayvanlar tarafından daha çok tercih edilmeleri ve yüksek verim düzeyine ulaşmalarına dikkat edilerek, yapılan bilinçli-bilinçsiz seçmelerle bitki ıslahının en temel ve önemli ilkelerinden olan "seleksiyon" (seçilim) ortaya çıkmıştır.

Bitki ıslahının en önemli ve temel amaçlarından biri de bitkideki genetik çeşitliliği devam ettirerek, klasik ıslaha ek olarak, mutasyon, melezleme ile çeşitli moleküler yöntemleri kullanmaktır. Klasik bitki ıslahı yöntemleri, insanların temel besin maddesini oluşturan pek çok kültür bitkisinin geliştirme çalışmalarında uygulanmaktadır (Ulukan, 2007). Klasik bitki ıslahı, melezleme sonucu elde edilen ve açılım gösteren bireyler arasından üstün özellikli genotiplerin fenotipik seleksiyonuna dayanmaktadır. 1970'lerin sonlarında DNA markörlerinin geliştirilmesiyle ıslah programları yeni bir boyut kazanmış ve araştırmacılar karakter ile bağlantılı markör geliştirme yolunda çalışmalara başlamışlardır (Eserkaya ve ark., 2010).

Bitki ıslahı çalışmalarında, cinsler ve türler arası melezlemelerde kullanılacak ebeveynlerin birbiri ile akraba (genetik yönden benzer) olması yeni bitki kombinasyonları elde etme konusunda başarıyı artıracaktır. Bu nedenle ıslah çalışmalarına başlamadan önce, kullanılacak bireylerin genotiplerindeki benzerliklerin bilinmesi bir gereklilik arz etmektedir (Taşpınar ve Tosun, 2002).

Genetik çeşitlilik bir türün gen havuzundaki genetik özelliklerinin toplam sayısını gösterir. Herhangi bir özelliği belirleyen gen her zaman aynıdır fakat bu genin allellerinin baz dizilimi değişkendir. Bu değişkenlik genetik çeşitliliğe neden olmaktadır (Hilooğlu, 2012). Genetik çeşitlilik ıslah programları için en önemli kaynaktır. Islah çalışmalarının zengin bir genetik çeşitlilikle sürdürülmesi, uzun vadede genetik çeşitliliğin devam ettirilmesini, zamanla değişen çevre koşullarına ve gereksinimlere karşı ihtiyaç duyulan cevabın verilebilmesine neden olacaktır (Dirik, 1997). Genetik çeşitliliğin farklı biyotik ve abiyotik streslere karşı genetik bir koruma sağladığına dair araştırmalar mevcuttur (Hughes ve Stachowicz, 2004). Genetik çeşitlilikteki artışın bitki hastalık ve zararlılarına karşı dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesinde büyük öneme sahip olduğunu belirlenmiştir

(Hajjar ve ark. 2008). DNA markörlerinin bitki ıslahında önemli bir yöntem olduğu, genetik çeşitlilik ve gen haritalama çalışmaları ile de kanıtlanmıştır (Pradeep ve ark. 2002).

Araştırılan bir özellikle ilişkili markörlerin yer aldığı detaylı bir genetik haritanın oluşturulması ıslah çalışmalarındaki veriminin arttırılmasında önemli bir yardımcıdır. Tarımsal öneme sahip birçok ürünün genetik haritalaması yapılmıştır.

Üzerinde çalışılan bitkiye ait DNA markörlerinin belirlenmesi ve o bitkiye ait genomik haritaların oluşturulması, yeni çeşitlerin kısa sürede geliştirilmesini sağlayarak, ıslah süresinin kısalmasıyla birlikte zamandan kazanç sağlanmasına ve seleksiyonda güvenilirlik ve kolaylık elde edilmesine neden olmuştur. Bu sebeple, birçok moleküler markör tekniği geliştirilerek bu yöntemlerden yararlanılmaya başlanmıştır (Michelmore vd., 1991). Son yıllarda, moleküler markör teknikleri ile iki veya daha fazla birey arasındaki spesifik sekans farklılıkları dahil tespit edilebilmektedir.

1. 3. Bitki Biyoteknolojisi

Biyoteknoloji, günümüzde en çok gündemde olan ve yeniliklere açık bilimsel alanların başında gelmektedir. Bitki biyoteknolojisi de bunlardan biridir ve bu alanda kullanılan moleküler markör teknolojileri önemli bir biyoteknolojik araç olarak günümüzde karşımıza çıkmaktadır. Moleküler markörler ile genomda herhangi bir gen bölgesi ya da gen bölgesi ile ilgili DNA parçası temsil edilmektedir. Polimer Zincir Reaksiyonunun (PCR) keşfinden sonra Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizm (AFLP), Basit Dizi Tekrarları (SSR), Dizi İlişkili Çoğaltılmış Polimorfizm (SRAP), Tek Nükleotid Polimorfizmi (SNP) ve Basit Tekrarlı Diziler Arası Polimorfizm (ISSR) gibi birçok moleküler markör tekniği geliştirilmiştir. Bu markör teknikleri; fiziksel haritalama, gen keşfi ve etiketleme, filogenetik çalışmalar, evrimsel genetik ve genetik çeşitlilik çalışmaları gibi pek çok alanda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Sonuç olarak, moleküler markörler bitki biyoteknolojisi çalışmalarının çok yol almasını sağlayarak önemli aşamalara gelmesini sağlanmış ve hızlı bilimsel sonuçların alınmasına imkân sağlamıştır.

Moleküler markör teknikleri, bireyler arasındaki DNA dizilerinin farklarını ortaya çıkarmakta kullanılmış ve son yıllarda biyolojik bilimlerde devrim etkisi yapmış yöntemlerdir. Başka bir anlatımla moleküler markörler, genom içinde bir DNA parçasının farklılıklarını temsil eder ve bu farklılıklar eklenmeler, silinmeler, yer değiştirmeler gibi

olaylardan meydana gelebilir. DNA bazlı moleküler markörler taksonomi, fizyoloji, embriyoloji, genetik mühendisliği gibi alanlarda kullanılan çok yönlü araçlardır (Schlotterer, 2004). Polimer zincir reaksiyonun (PCR) bulunmasının ardından DNA markörleri kullanılarak gen etiketleme, genetik haritalama, tarımsal açıdan önemli genlerin belirlenmesi, genetik çeşitlilik çalışmaları, filogenetik analizler, markörler yardımıyla seleksiyon (MAS) çalışmaları kolaylaşmıştır (Joshi vd., 2000).

İdeal bir moleküler markör tekniğinin;

a. Polimorfik olması

b. Genetik farklılıkları ortaya çıkarabilmesi

c. Çok sayıda, bağımsız ve güvenilir markörler üretmesi

d. Basit, hızlı ve ucuz olması

e. Az miktar DNA veya doku ihtiyacı gerektirmesi

f. Farklı fenotipler ile bağlantı oluşturabilmesi önemlidir.

Moleküler markör tekniğinin yukarıdaki özelliklere sahip olması avantajlıdır fakat hiçbir teknik bu avantajların tamamına birden sahip değildir. Moleküler markör teknikleri kullanım amacına uygun olarak farklı kriterlere göre gruplandırılabilir;

1. Geçiş türüne göre (biparental çekirdek kalıtımı, maternal çekirdek kalıtımı, maternal organel kalıtımı, paternal organel kalıtımı)

2. Gen aksiyonuna göre (dominant ve kodominant markörler)

3. Analiz metotlarına göre (PCR temelli olmayan (hibridizasyon) ve PCR temelli markörler) (Kesawat ve Das, 2009)

1. 3. 1. Genetik markörler

Kalıtım şekilleri, morfolojik, biyokimyasal ve DNA düzeyinde izlenebilen karakterlere genetik markörler denir. Bu karakterlerin markör olarak isimlendirilmesinin nedeni, incelenen organizmadaki ilgilenilen diğer özellikleri hakkında dolaylı da olsa bilgi sağlamalarıdır.Teorik olarak genomun her bir noktasını temsil eden DNA markörleri aracılığı ile birçok kültür bitkisinin linkage haritalaması yapılmıştır. Böylece istenen genlerin takibi ve seçimi mümkün olmaktadır (Yıldırım ve Kandemir, 2001).

Biyokimyadaki gelişmeler son zamanlarda markörler konusunda önemli gelişmelere katkı sağlamıştır. İlk olarak enzimlerin (izoenzimler) veya depo proteinlerinin markör olarak kullanılabileceği sonucuna ulaşılmıştır. Daha sonraki gelişmelerle DNA'nın kendisinin doğrudan markör olarak kullanılma fikri ortaya

çıkmıştır. Teorik olarak incelendiğinde DNA markörleri, sonsuz sayıdadır ve genomun her noktasını temsil etme yeteneğindedirler.

Genetik markörler organizmanın ya da türün bireyleri arasında farklılıklar gösterir. Doğrudan hedef geni göstermez fakat hedef gen için işaret veya etiket görevi görür. Genlere çok yakın yer alan (linkage durumunda olan) genetik markörler gen etiketleri olarak bilinir. Bu tür markörler ilgilenilen özelliğin fenotipini etkilemez çünkü bunlar sadece, özelliği kontrol eden genlere yakın mesafede lokalize olmuştur veya bu genlerle bağlantılı (linkage) durumdadır. Bütün genetik markörler, kromozomlarda 'lokus' olarak adlandırılan spesifik genomik pozisyonlarlarda (genler gibi) yer alır (Collard vd., 2005).

DNA üzerindeki nukleotid sıralanışına dayalı olarak görünür hale getirilen polimorfizm genotipler arasında fenotipik olarak izlenemeyen veya çevre koşulları etkisi altında gizli kalan bütün genotipik farklılıkların ortaya çıkarılmasına izin vermektedir.

Markör seçimine; yürütülecek olan çalışmanın materyaline, bütçesine, süresine ve en önemlisi de amacına uygun olacak şekilde karar verilmelidir.

Klasik bitki ıslahı yöntemleri ile üstün çeşitlerin seçilimi genellikle çevresel etkenlere bağlı olmaktadır ve uzun zaman gerekmektedir. Bu durum bitki ıslahçılarını, iyi çeşitlerin seçimini yapabilecekleri daha güvenilir ve daha az zaman alıcı teknikler geliştirmeye yönlendirmiştir. Markör teknolojileri ıslah çalışmalarındaki gerekli seçilimin yapılmasında araştırıcılara ve yetiştiricilere çeşitli kolaylıklar sağlamaktadır. Genetik markörlerin bitki ıslahında kullanımı diğer birçok alanda olduğu gibi oldukça yaygındır. Genetik markörler bitki ıslahında genetik uzaklık ve benzerlik araştırmalarında, germplazm organizasyonlarında, QTL analizlerinde, hastalıklara dayanıklılık ve genetik çalışma materyalinin tanımı gibi kalitatif ve kantitatif karakterler için yapılacak markörlere dayalı seleksiyonda, DNA parmak izi çalışmalarında, genetik ve linkage haritalamalarında, çeşit tanımlamasında ve F1 hibrit tohumluklarının kontrolünde kullanılabilmektedir.

Üç genetik markör tipi vardır:

1. Morfolojik Markörler; Morfolojik markörler (fenotipik özellikler ya da karakterler) genellikle çiçek rengi, tohum biçimi gibi özelliklerdir.

2. Biyokimyasal Markörler, bunlar enzimlerin allelik değişkenleridir ve izoenzimler olarak adlandırılırlar. İzoenzim markörleri, elektroforez işlemiyle ve spesifik boyamayla belirlenmektedir. Bu markörlerin sayılarının az olması, çevre faktörlerinden

ve bitki gelişim evrelerinden etkilenmeleri bunların en önemli dezavantajlarıdır (Collard vd., 2005).

3. Moleküler (DNA) Markörler Moleküler markörler DNA üzerindeki varyasyonları gösterir (Jones vd., 1997).

Genetik markörler morfolojik, biyokimyasal ve moleküler markörler olmak üzere üç gruba ayrılır.

Çizelge 1. 3. Genetik markörler

GENETİK MARKÖRLER	**Morfolojik Markörler**	
	Biyokimyasal Markörler	Enzim Proteinleri (Alloenzimler, izoenzimler)
		Depo proteinleri (Glutenin, gliadin)
	Moleküler Markörler	Hibridizasyona Dayanan Moleküler Markörler (RFLP)
		PCR'a Dayanan Moleküler Markörler (RAPD, AFLP, SSR, STS, SCAR, CAPS, EST-SSR, ISSR vb.)
		DNA Dizi ve Çip (Mikroarray) Teknolojisine Dayanan Moleküler Markörler (SNP, DArT)

1. 3. 1. 1. Morfolojik markörler

Morfolojik karakterler, görsel olarak değerlendirilebilen, tek genle kontrol edilebilen ve genetik markör olarak kullanılabilen kalitatif özelliklerdir. Morfolojik markörler genellikle çiçek rengi, yaprak morfolojisi, tohum biçimi gibi görülebilir fenotipik karakterlerdir. Bu morfolojik markörler bitki doğasında vardır ve mutasyon sonucu ortaya çıkmıştır (Aka ve Kaçar, 2001). Morfolojik karakterler bazı genlerin takibini kolaylaştırır ve genellikle dominant ya da resesif özelliktedir. Bu markörleri kullanabilmek için herhangi bir hazırlık, protokol ve araç gereç gerekmez. Ancak morfolojik markörlerin genom analizlerinde kullanımı sınırlı olmaktadır. Bu sınırlamalar, fenotip üzerinde olumsuz etkilere sahip olabilmeleri, istenilen bazı özellikleri taşıyan genleri maskeleyebilmeleri, sayılarının az olabilmesi, çevresel koşullardan yüksek oranlarda etkilenebilmeleri olarak sayılabilir. Ayrıca, genetik ve çevre arasındaki ilişkinin farklılığı yıllara veya değişik coğrafi bölgelere ait varyetelerin morfolojik bilgilerinin karşılaştırılmasında sorunlara, yanlış yorumlamalara neden olabilmektedir (Chawla, 2002; Farooq ve Azam, 2002). Morfolojik markörlerin olumlu yönleri analizlerinin kolay olmaları ve varyasyonlarının fenotipte görülebilmesidir (Parmaksız, 2004; Yıldırım ve Kandemir, 2001).

1. 3. 1. 2. Biyokimyasal markörler

Sistematik problemlerin aşılmasında kullanılan ilk biyokimyasal markörler proteinlerdir. Protein markörleri bir diğer genetik markör grubunu oluşturmaktadır. Enzim proteinleri (alloenzimler ve izoenzimler) ve depo proteinler (gliadin ve glütenin gibi), doğal populasyonlarda genetik değişkenliğin anlaşılması, gen akışı, tür sınırlarının tespiti, genlerin açılıp-kapanma zamanının belirlenmesi ve değişik bitki çeşitlerinin tanımlanması gibi çalışmalarda kullanılmaktadır (Murphy vd., 1990). Depo proteinleri (örneğin; buğday tohumunda bulunan glütenin ve gliadin) bir jele yüklenip elektroforezde koşturulup boyandıklarında farklı genotiplerde ortaya çıkan yapı farklılıkları genetik markör olarak kullanılabilir. Bir jel içine yüklenip elektrik akımı uygulandığında proteinler yük ve kütlelerinin oranına göre hareket etmektedir. Proteine ait seçici boyama teknikleri ile boyanan protein jelinin kendi içinde pozisyonu belirlenir. Bu pozisyona göre farklı alleller belirlenir. Proteinlerin amino asit dizisindeki farklılıklarından kaynaklanan yük ve büyüklük değişimleri jel elektroforezi (nişasta ve poliakrilamid) kullanılarak kolaylıkla tespit edilebilmekte ve genetik markör gibi kullanılabilmektedir. Enzim proteinleri kendi aralarında alloenzimler ve izoenzimler olmak üzere iki gruba ayrılır. Alloenzimler aynı genin farklı allelleri tarafından oluşturulan enzimler iken; izoenzimler farklı genler tarafından üretilip birbirine çok benzeyen enzimlerdir. Bir enzimin alternatif formları olarak ifade edilen izoenzimler, bir genin farklı allelleri ya da farklı genler tarafından kodlanır ve en çok kullanılan protein markörleri olarak bilinir. İzoenzimlerin metabolizmadaki rolünün iyi bilinmesi, kullanılan yöntemlerin hızlı ve ucuz olması, izoenzim markörlerinin olumlu yönleri arasındadır. Fakat, izoenzim lokus sayısının az olması, bazı izoenzimlerin belirli dokularda ve belirli gelişme dönemlerinde bulunması, translasyon sonrası modifikasyonlara uğramaları bu markörlerin kullanımını kısıtlamaktadır (Staub vd., 1996).

Biyokimyasal markörlerin analizleri çabuk, ucuz ve güvenilir olmasına karşın, sayılarının az olması olumsuz özellikleri arasındadır (Yıldırım ve Kandemir, 2001).

1. 3. 1. 3. Moleküler markörler

Bitkiler arasındaki genetik varyasyonu ortaya çıkarmak için farklı moleküler DNA işaretleyici teknikleri kullanılmaktadır.

Bitkilerde üstün bireylerin seçilmesinde, fizyolojik özellikleri yansıtan agronomik verilerin yanında, daha net teşhislere dayandırılmış yöntemler son zamanlarda hızla kullanılmaya başlanmıştır. Abiyotik (çevresel etkiler) ve biyotik (virüs vb.) şartlarda değişmeyen ve direkt olarak karakterlerin genetik yapısını temel alan moleküler markörler (protein ve DNA markörler) birçok alanda olduğu gibi bitki türlerini tanımlamada da kullanılmaktadır.

Moleküler markörler, fizyolojik özelliklere dayanan morfolojik markörlerden ve genlerin ürünü olan proteinlere dayanan biyokimyasal markörlerden farklı olarak, DNA düzeyindeki analizlerle saptandıklarından dolayı DNA markörleri olarak da bilinir. Son yıllarda moleküler markörlerin, birçok alanda kullanılmasının yanında hayvan ve bitkilerde gerek temel gerekse uygulamalı çalışmalarda kullanımı yaygınlaşmıştır. Moleküler markörlerin en geniş kullanım alanları arasında; hayvan, bitki, insan ve ekmeklik buğdayda detaylı genetik ve fiziksel kromozom haritalarının oluşturma çalışmaları sayılabilmektedir.

Bitkilerde önemli uygulama alanlarından biriside, ilgilenilen özelliğe bağlı moleküler markörlerin yardımı ile seleksiyon yaparak ve klasik bitki ıslahının etkinliğini arttırmaktır. Çünkü bu markörler çevreden etkilenmez ve bitki gelişiminin her safhasında incelenebilir. Nükleik asit dizilerindeki polimorfizmlere dayalı moleküler (DNA) markörler bitki genom analizlerine dayanan birçok problemin çözümünde kullanılmaktadır; örneğin genetik haritaların oluşturulmasında, basit özelliklerin haritalanmasında, kantitatif özellik lokuslarının (QTL, Quantitative Trait Loci) haritalanmasında, mutasyonların haritalanmasında, transgeniklerin saptanmasında, bitki ıslahında genetik tanımlamalarda, popülasyon genetiğinde, moleküler taksonomi ve evrimde, bireylerin saptanmasında, germplazm karakterizasyonunda, tescilli germplazmların belirlenmesinde ve genom büyüklüğünün ölçülmesinde kullanılmaktadır (Rafalski vd., 1996),(Gupta vd., 1999).

Moleküler (DNA) markörler, bitki ıslah çalışmalarında moleküler biyolojinin başvurduğu önemli araçlardan biri olup ve etkin gelişmelere olanak sağlamaktadır. Moleküler markörler, organizma genomundaki herhangi bir gen bölgesi ya da gen bölgesi ile ilişkili DNA parçasını ifade eden, biyolojik etkileri olmayan ve sonraki nesillere aktarılan DNA dizileridir. Farklı genotiplere ait DNA nükleik asit diziliş farklılığını, değişik şekillerde ortaya koyar (Yıldırım ve Kandemir, 2001). Moleküler markörler, DNA dizi seviyesindeki varyasyonların nötral bölgelerini ortaya çıkarır. Buradaki

“nötral” ifadesi fenotipte kendini göstermeyen, her biri bir kısım tekrarlı DNA veya bir gendeki tek nükleotid farkı olan varyasyonları ifade eder (Jones vd., 1997).

Sayılarının çok olması sebebiyle en yaygın kullanılan moleküler markörler çevresel etkilerden veya bitki gelişim evrelerinden etkilenmez (Collard vd., 2005). DNA’da oluşan nokta mutasyonları, insersiyonlar, delesyonlar veya tekrarlanan DNA’nın replikasyonunda oluşan hatalardan meydana gelmektedir. (Collard vd., 2005). Filogenetik bağlantıların aydınlatılmasında DNA temelli yöntemler son zamanlarda büyük gelişme göstermiştir. Bu yöntemler deneysel farklılıkların dışında genellikle PCR’ye (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) dayanmaktadır. Mitokondriyal DNA (mtDNA), kloroplast DNA (cDNA), nüklear DNA (nDNA) bu markör sistemlerinde kullanılan genomlardır.

DNA’yı temel alan markör sistemleri, diğer markör sistemlerinden daha etkilidir. Morfolojik markörler bitkinin bütününde fenotipik olarak gözlenebiliyorken; moleküler markörler tüm bitkide, doku ve hücresel düzeyde belirlenebilmektedir. Morfolojik markörler ile karşılaştırıldığında moleküler lokusların allel frekansları daha yüksektir. Morfolojik markörlerin, heterozigot çeşitlerin tanımlanmasında yetersiz olduğu kanıtlanmıştır (dominant-resesif durum sergilemelerine karşın). Moleküler markörler ise çoğunlukla kodominant kalıtım gösterir (Collard vd., 2005). Ayrıca, protein markörleri, genomun sadece anlatım yapan kısımlarını temsil ederlerken, moleküler markörler ise, anlatım yapsın yapmasın genomun her noktasını temsil eder.

Aynı veya farklı türlerin bireyleri arasında farklılık gösteren markörlere polimorfik markörler adı verilir ve bu markörler daha çok tercih edilir. Genotipler arasında farklılık göstermeyen markörlere ise monomorfik markörler adı verilir. Polimorfik markörler, homozigot ve heterozigotlar arasında farklı tepkiler vermelerine göre dominant veya kodominant özellik gösterir. Dominant markörler var (1) veya yok (0) olarak belirlenirken, kodominant markörler boyut olarak farklılık gösterirler. Bir DNA markörünün farklı formları (jeldeki farklı boyutta bant profilleri) markör allelleri olarak adlandırılırlar. Bu sebepten dolayı kodominant markörler farklı birçok allele sahip olabilirken, dominant bir markör sadece 2 allele sahiptir (Collard vd., 2005).

Moleküler markörler DNA’nın aktif bölgeleri olan genlerden veya kodlama fonksiyonu bulunmayan DNA dizilerinden geliştirilebilir.

Moleküler (DNA) markörleri ile yapılan gen haritalamaları birçok kültür bitkisi için geliştirilmiş ve istenen genlerin takibi ve seleksiyonu mümkün hale gelmiştir. Çevre etkisinden bağımsız olarak ilerleyen bu işlem genleri kolayca takip edilebilen markörlerle

bağlantı durumları incelenerek yapabilmeye olanak sağlamaktadır (Yıldırım ve Kandemir, 2001).

Genetik ve linkage haritalamalarında, çeşit tanımlamasında, F1 hibrit tohumluklarının kontrolünde, genotipler arası genetik uzaklıkların ve çeşitliliğin belirlenmesinde moleküler markörlerden yararlanılabilmektedir.

Moleküler markörler; bitkilerde istenilen özelliğin dolaylı seleksiyon yapılarak klasik ıslah metodlarının başarı şansını artırmada ve mevcut sürenin kısaltılmasında yaygın olarak kullanılmaktadır (Gupta vd., 1999).

Moleküler DNA markörlerinin bitki ıslahına adapte edilmesi, istenen genlerin çeşitler veya türler arasındaki hareketini hızlandırmasının yanında akraba yabani türlerden yeni genlerin aktarılmasına olanak sağlamış ve çok gen tarafından idare edilen karmaşık karakterlerin incelenmesine olanak sağlamıştır. Önemli özelliklerinden birisi de genlerin klonlanmasını kolaylaştırma ve birbiriyle melezlenemeyen bitkiler arasındaki genetik ilişkilerin açığa çıkmasına olanak sağlamasıdır (Yıldırım ve Kandemir, 2001).

Çizelge 1. 4. Genetik markör çeşitlerinin olumlu ve olumsuz yönlerinin karşılaştırılması

		Olumlu Yönleri	Olumsuz Yönleri
GENETİK MARKÖRLER	**Morfolojik Markörler**	• Analizleri kolaydır. • Haritalama popülasyonunda yapılacak gözlemlerle kolaylıkla belirlenirler.	• Heterozigot yapıları belirleyemezler. • Mutasyonlarla oluşabilirler. • Çevresel faktörlerden etkilenirler. • Epistatik ya da pleiotropik etkilere maruz kalırlar. • Genellikle dominanttırlar. • Sayı bakımından çok azdırlar. • Her bir lokusta 2 allel bulunur.
	Biyokimyasal Markörler	• Kodominant markörlerdir. • Analizleri çabuk, ucuz ve güvenilirdir. • Çevreden ve diğer lokuslardan etkilenmezler. • Morfolojik markörlerden sayıca fazladırlar.	• Sayı bakımından çok azdır. • Bazı izoenzimlerin özel dokularda ve belli bir gelişme periyodunda gözlemlenebilmesi. • Az da olsa epistatik etki gösterirler.
	Moleküler Markörler	• Moleküler markörler stabildir. • Tüm dokularda ortaya çıkabilirler. • Ekolojik koşullardan etkilenmezler. • Epistatik ve pleiotropik etkilere duyarlı değildirler. • Kodominant ya da dominant özellikte olabilirler. • Kalıtımı basit ilkelere sahiptir	• Pahalı bir laboratuar alt yapısı gerektirir.

Moleküler markörler temelde

1. Hibridizasyona dayanan moleküler markörler

2. Polimeraz zincir reaksiyonu kullanımına dayanan moleküler markörler

3. DNA dizi ve çip (mikroarray) teknolojisine dayanan moleküler markörler olmak üzere üç gruba ayrılırlar.

1. 3. 1. 3. 1. Hibridizasyona dayanan moleküler markörler

DNA molekülünün iki zincirinin birbirinin tamamlayıcısı olması nedeniyle DNA/DNA veya DNA/RNA arasında melez moleküller oluşturulması temeline dayanan bu yöntem, istenilen DNA parçalarının genomdaki yerlerinin belirlenmesini ve bu parçaların nükleotid dizilerinin saptanması araştırmalarında da kullanılmaktadır. Ayrıca benzerlik derecelerine bakılarak farklı organizma gruplarına ait genlerin ya da DNA

parçalarının nükleotid dizisi benzerlikleri incelenerek bu organizmaların yakınlık dereceleri moleküler düzeyde belirlenebilmektedir.

Nükleik asit hibridizasyonu, DNA'nın kromozomda yerleşim biçimini bozmadan *in situ* yapılabildiği gibi daha çok jel elektroforezinde ayrımı yapılmış DNA ya da RNA'nın bir filtreye aktarılması (Southern veya Northern blotting) ve daha sonra herhangi bir şekilde işaretlenmiş tamamlayıcı bir nükleik asit parçası (prob) kullanımıyla sağlanmaktadır.

Kesilmiş parçaların uzunluk polimorfizmi denilen ve çeşitli şekillerde kesici enzimler (restriksiyon enzimleri) ile kesilerek etiketlenmiş DNA parçalarının (prob) araştırılan DNA örneğindeki benzer veya aynı dizilişteki DNA hibridizasyonuna dayalı bir sistemdir. Kesilen DNA parçacıklarının jel elektroforez yöntemi ile ayrıştırılmasını ve bu parçacıkların membrana emdirilmesi (blotting) sonucunda prob DNA hibridizasyonu olaylarını içermektedir.

1. 3. 1. 3. 1. 1. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism- Kesilmiş parça uzunluk polimorfizmi)

Soller ve Bechman tarafından ilk geliştirilen moleküler markör sistemi olan RFLP (Soller ve Bechman, 1983), restriksiyon enzimleriyle kesilerek prob denilen etiketlenmiş DNA parçalarının, incelenen DNA örneğindeki benzer veya aynı dizilişteki DNA hibridizasyonuna dayan bir yöntemdir. İlk kez Botstein ve arkadaşları tarafından 1980 yılında insan genomu çalışmalarında kullanılmıştır. Restriksiyon enzimleri DNA'yı restriksiyon bölgelerinden keser. Birbirinden farklı restriksiyon enzimlerinden her biri özel ve karakteristik bir nükleotid dizisini tanır. Çünkü tek bir nükleotid değişikliği bile restriksiyon bölgesini etkiler. Tanıma yerlerinin baz dizilimindeki değişiklik farklı çeşitler arasındaki polimorfizmin sebebi olabilir. Bahsedilen bu polimorfizm genellikle kesici enzimlerinin tanıdığı iki kesim bölgesi arasında parça eklenmesinden (insertion) veya çıkarılmasından (deletion) kaynaklanabilmektedir (Parmaksız, 2004). Mutasyonlar bölge sayısında varyasyonlara yol açabilir. Böylece bu varyasyon (polimorfizm) bireyler arasında kesim bölgelerinin konumunu ve bunlar arasındaki DNA'nın uzunluğunu değiştirir ve farklı restriksiyon fragmentlerinin oluşmasını sağlar (Jones vd., 1997). Sistematik ve evolüsyon çalışmalarının çoğu ve farklı tahıl türlerinin moleküler haritalamaları başlangıçta RFLP markörlerinin kullanımıyla yapılmıştır (Philips ve Vassil, 1994). DNA parmak izi araştırmaları (Tanksley, 1983), olgunlaşmanın genetik

incelenmesi (Philips vd., 1992), genetik çeşitlilik çalışmaları (McCouch ve Tanksley, 1991), karşılaştırmalı haritalama (Devos vd., 1992), QTL haritalama (Byrne vd., 1996), gen işaretleme (Zhang vd., 1995), ekotip tanımlama (Pupili vd., 2000) gibi çalışmalarda da kullanılmıştır. RFLP markörlerini kullanmak için kısa ömürlü radyoaktif materyal kullanımı gerekmektedir ve bu durum bu yöntem için sınırlayıcı bir etmendir. Diğer sınırlayıcı etmenler ise yüksek konsantrasyonda, saf DNA eldesine ihtiyaç duyulması, restriksiyon kesimi uygulaması, uzun ve maliyetli izotopik etiketleme gerektirmesi olarak sıralanmaktadır. Başka bir zorluğu ise, RFLP kullanımında yakın ilişkili türler arasında polimorfizm bulunamaması ya da düşük oranda (1-3 lokus) bulunabilmesidir (Waugh ve Powell, 1992). Bu gibi zorlukların üstesinden gelmek için yeni markör sistemleri üzerine araştırmalar yapmak zorunda kalınmıştır.

1. 3. 1. 3. 1. 2. Polimeraz zincir reaksiyonu kullanımına dayanan moleküler markörler

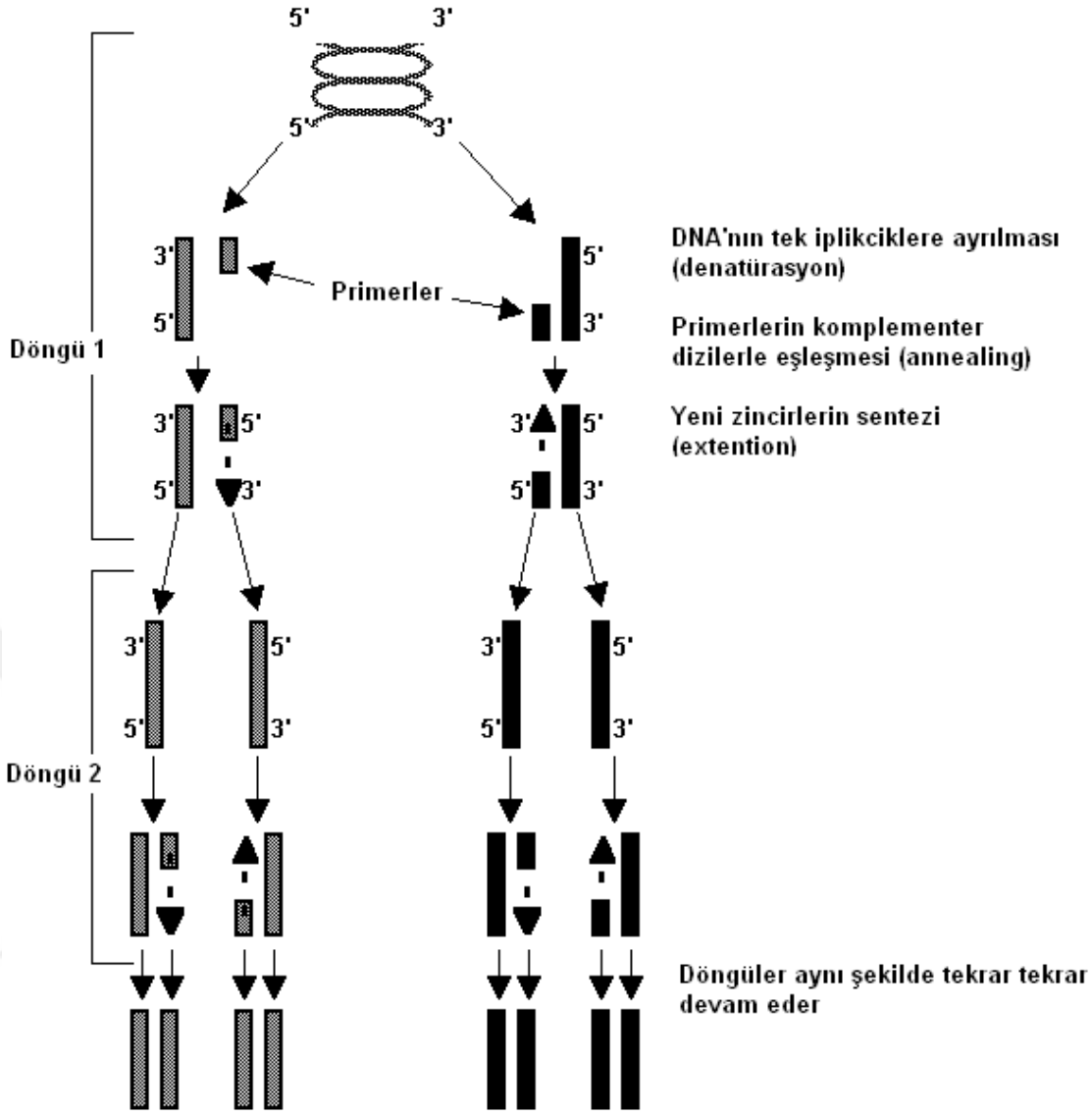
Bir çeşit ″in vitro klonlama″ olarak bilinen PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu), küçük miktarlardaki DNA'nın canlı organizmaya ihtiyaç duymadan enzimatik olarak replikasyonunu sağlayan moleküler biyoloji yöntemidir. Tek gen veya genin kısa (~10 kb) bir parçasının çoğaltılması amacıyla kullanılmaktadır. Kary Mullis tarafından 1983'te geliştirilen bu teknik PCR temelli birçok tekniğin gelişmesine olanak sağlamıştır (Mullis vd., 1986). Kary Mullis geliştirdiği bu teknikle 1993 yılında Nobel ödülünün sahibi olmuştur. Aslında temel PCR, 1968'de Kleppe ve Khorana grubu tarafından tanımlanmış fakat termostabil DNA polimeraz sınırlandırıcı etmeni yüzünden geliştirilememiştir. PCR yönteminde hedeflenen DNA, reaksiyon çözeltisinde yeterli miktarda DNA polimeraz, primerler ve dNTP (deoksinükleotid trifosfatlar) varsa, her döngüde logaritmik olarak artış gösterir (Semang vd., 2006).

Termostabil DNA polimeraz ticari olarak bulunmadığı için PCR ile yapılan ilk çalışmalarda her döngü ve sıcaklık değişiminde ortama yeni DNA polimeraz eklenmesi gerekiyordu. Ayrıca tüplerin sıcaklığını değiştiren PCR cihazlarıda bulunmamaktaydı. Thermus auquaticus bakterisi kullanılarak elde edilebilen bir DNA polimeraz olan Taq DNA polimerazın kullanılmaya başlamasıyla PCR temelli teknikler ön plana çıkmaya başlamıştır. Bu enzimin gerçek fonksiyonu termofilik bakterilerde in vivo replikasyondur ve aynı enzim in vitro replikasyonda yüksek sıcaklıklarda da kullanılabilmektedir. Bu enzim, DNA polimeraz çoğaltımının gerçekleşeceği yüksek sıcaklıklarda sabit

kalabiliyorken diğer DNA polimerazlar denatüre olmaktadır. Günümüzde çok geniş ısı aralığına sahip termostabil DNA polimerazlar bulunmaktadır (Thermus auquaticus'tan Taq, Pyrococcus furiosus'tan Pfu, Thermococcus litoralis'ten Vent). PCR tekniği hibridizasyon tekniği ile karşılaştırıldığı zaman az miktarlarda DNA'nın yeterli olması, birçok teknikte radyoizotopların elimine olması, korunmuş dokulardan DNA dizilerinin çoğaltılabilmesi, küçük laboratuvarlarda bile maddi ve ekipman yönünden uygulanabilir bir yöntem olması ve kısa sürede yüksek polimorfizm yakalanabilmesi gibi avantajları bulunmaktadır (Semang vd., 2006).

İstatistiki verilere dayanan bilgilere göre her milyon baz çiftinde bir defa DNA'ya bağlanan primer ve hedef DNA kompleksi, (Jones vd., 1997) DNA polimeraz enziminin genomik DNA'yı 3' ucundan kopyalaması için kullanılırlar (Staub ve Serquen, 1996). PCR işlemi ile farklı büyüklükteki fragment grupları yeteri kadar çoğaltılır ve DNA bant şablonlarında molekül ağırlıklarından dolayı farklılıklar oluştururlar.

Hücre içinde gerçekleşen doğal DNA replikasyonu, PCR ile bir tüp içinde taklit edilmektedir. PCR, DNA′nın iki zincirinin yüksek ısı ile birbirinden ayrılması (denatürasyon); sentetik oligonükleotidlerin hedef DNA′ya bağlanması (hibridizasyon, primer bağlanması, annealing) ve zincirin uzaması (polimerizasyon, extension, çift iplikli DNA′ların sentezi) aşamalarının belirli sayıda tekrarlanmasına dayanmaktadır. Bu üç aşama (denatürasyon/ primer bağlanması/ DNA sentezi) farklı ısılarda gerçekleştirilerek bir PCR döngüsünü oluşturulur (Şekil 1. 1.). PCR kalıtsal hastalıklarda taşıyıcının ve hastanın tanısı, prenatal tanıda, mikrobiyolojik çalışmalarda, adli tıpta (DNA parmak izi, babalık tayini), kanser oluşumunun araştırılmasında, "prob" oluşturulmasında, klonlamada, gen tanımlaması araştırmalarında, DNA dizi analizinde, büyük miktarda DNA örneklerinin oluşturulmasında, bilinmeyen dizilerin tayininde, DNA'nın incelenmesi ve evrimin aydınlanmasında, RFLP analizinde, tarımda, sistematik ve evolusyon çalışmalarında, doğadaki çeşitli canlı türlerinin tespiti ve türler arasındaki polimorfizmin belirlenmesi gibi geniş kapsamlı çalışmalarda kullanılabilmektedir.



Şekil 1. 1. PCR çalışma prensibi

PCR'a dayalı markör sistemlerinin geliştirilmesinde temel olarak 3 strateji kullanılmıştır (Staub ve Serquen, 1996):

1. PCR'da tek primerlerin kullanımıyla amplifikasyon gerçekleşir. Buradaki polimorfizm primer sekansı veya uzunluğundaki varyasyondan ve primerin 5' veya 3' ucundaki nükleotidlerin genomik DNA'ya bağlanma bölgesinden kaynaklanan polimorfizimdir (RAPD, SPAR, DAF, AP-PCR, SSR-anchored PCR).

2. İkinci stratejide ise markörler PCR'da 2 primer ile seçici olarak çoğaltılmaktadır. Bu seçicilik PCR boyunca genomik DNA'ya bağlanan primerlerin 3' ucundaki 2 ile 4 bazın diziliminden kaynaklanmaktadır (AFLP).

3. Markörler PCR'da yine 2 primer ile çoğaltılmaktadır. Bu spesifik primerlerin oluşturulmasında çoğunlukla klonlamaya veya sekanslamaya başvurulmaktadır. Elde edilen polimorfizm 2 primer arasında yer alan genomik DNA'daki farklılıklardan kaynaklanmaktadır (AMP-FLP, STR VE SSR).

PCR kullanımına dayanan SSR ("Simple Sequence Repeat"- Basit Dizi Tekrarı, Mikrosatellit) markörleri, RAPD ("Random Amplified Polymorphic DNA" - Rasgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA) markörleri, AFLP ("Amplified Fragment Length Polymorphism" - Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi) markörleri, STS ("Sequence Tagged Site" - Dizisi Etiketlenmiş Alan) markörleri ile DNA Dizi ve Çip (Mikroarray) teknolojisine dayanan SNP ("Single Nucleotide Polymorphism" - Tek Nükleotit Polimorfizmi) markörleri ve DArT (Diversity Arrays Technology) markörleri en yaygın olarak kullanılan markör sistemleridir. Ayrıca, bu moleküler markör tekniklerinin yanında, özgül oligonükleotit çiftleri ile çoğaltılan ve genetik açıdan tek bir lokus olarak tanımlanan genomik DNA fragmentlerini karakterize eden SCARs ("Sequence Characterized Amplified Regions" - Dizisi Karakterize Edilmiş Çoğaltılmış Bölgeler), PCR-RFLP olarak da bilinen ve PCR ürünlerinin restriksiyon enzimleri tarafından kesimi sonucunda oluşan DNA fragmentlerindeki polimorfizmleri yansıtan CAPS ("Cleaved Amplified Polymorphic Sequence" - Çoğaltılmış Kesilmiş Polimorfik Dizi) ve cDNA (copy DNA) klonlarının rasgele dizi analizi olarak da bilinen, genleri tanımak ve bu genlerin ifade ediliş profillerini anlamak için kullanılan etkili yollardan biri olan EST ("Expressed Sequence Tag" - İfade Edilen Dizi Etiketi)'lerden köken alan EST-SSR gibi moleküler markörleri de günümüzde tercih edilen etkin markör sistemleri arasındadır (Semang vd., 2006).

PCR'a dayalı bu moleküler markörler arasında kodominant kalıtım özelliği gösteriyor olmaları, lokusa özgü olmaları, yüksek bilgi içeriğine sahip olmaları ve PCR ile kolayca belirlenebilmeleri gibi birçok özellikleri ile tercih edilmekte olan markörler, SSR (Simple Sequence Repeat- Basit Dizi Tekrarı, Mikrosatellit) markörleridir. Basit dizi tekrarları (SSR) bütün ökaryotik genomlarda bulunmakta ve genom boyunca 1- 6 nükleotit uzunluğundaki motiflerin ardışık sıralı tekrarlanması sonucunda meydana gelmektedir (Tautz, 1989). SSR'lar mikrosatellitler olarak da bilinir.

PCR' a dayalı moleküler markörler, zamanı kısalttığı, moleküler haritalamada gerekli iş gücü ve harcamayı azalttığı için günümüzde geniş ölçüde kullanılmaktadır (Gupta vd., 1999).

1. 3. 1. 3. 1. 3. RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA- Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA)

PCR'ın geliştirilmesi (Mullis ve ark., 1986) RAPD ("Random Amplified Polymorphic DNA"-Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA) olarak adlandırılan yeni moleküler markör sisteminde geliştirilmesiyle sonuçlanmıştır. Williams ve arkadaşları (1990) tarafından rastgele seçilen bir dizi 10 nükleotide sahip tek bir PCR primerinin DNA'da rastlantısal olarak homolog diziler bulup genomun farklı bölgelerinde çoğalmasıyla keşfedilmiştir. RAPD, tek DNA primerinin kullanılmasıyla rastgele farklı dizilerde doğrudan DNA çoğaltımı olarak tanımlanmaktadır. RAPD primerleri 200-2000 kb uzunluğunda DNA'yı çoğaltabilir. Primer bağlanan bölgelerde dizi varyasyonundan dolayı polimorfizmin artması, bu yöntemi başta tahıllar olmak üzere birçok tür için kullanılabilir hale getirmektedir (Jones vd., 1997). RAPD; genetik bağlantı haritalarının oluşturulması, gen işaretleme, çeşit tanımlanması, popülasyonlarda ve türlerde genetik çeşitliliğin değerlendirilmesi, türler, alttürler ve varyeteler arasında akrabalık ilişkilerinin incelenmesi gibi değişik amaçlar doğrultusunda kullanılabilmektedir. Bu uygulamalar aynı zamanda türe, genoma ve kromozoma özgün markörlerin geliştirilmesine neden olmaktadır. En önemlisi ise, ıslah programlarında kullanılan ve genetik açılım gösteren popülasyonlarda istenen genotiplerin tanımlanması ve seleksiyonu için de bu markörler kullanılabilmektedir (Gupta vd., 1999). RFLP'ye göre RAPD metodu teknik olarak çok daha basittir, uygulaması hızlı, radyoaktif madde kullanımı gerektirmemesi ve düşük miktarda DNA'ya ihtiyaç duyması bu yöntemin avantajları arasında sayılabilir. Bu sebeplerden dolayı RFLP'ye göre daha fazla tercih edilmektedir. Buna karşın dominant markörler olmaları (açılan bir popülasyonda heterozigotların ortaya çıkarılamaması) ve tekrarlanabilir olmamaları, RAPD yönteminin dezavantajlarıdır (Jones vd., 1997; Farooq ve Azam, 2002).

1. 3. 1. 3. 1. 4. AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism- Çoğaltılmış parça uzunluk polimorfizmi)

AFLP, PCR teknolojisinden geliştirilip, RFLP ile tamamlanan bir tekniktir (Vos vd., 1995; Karp vd., 1997). Teknik, karmaşık genetik yapıları açıklayan güvenilir ve bilgi verici problardan oluşmaktadır (Powell vd., 1996). Özel restriksiyon enzimleriyle elde edilen fragmentlerin seçici çoğaltımıdır. Bu teknikte, özel çift zincirli DNA adaptörleri

DNA restriksiyon parçalarına bağlanmaktadır (Vos vd., 1995). Adaptör diziler ve restriksiyon bölgeleri birlikte primer bağlanan bölgeler olarak görev almaktadır. Primerler, bu adaptör bölgeler ve kesim bölgelerine özgü tasarlanarak 1-3 selektif baz ile 3' uçlarına ilave edilmektedirler. Seçici bazların kullanımı, restriksiyon fragmentlerinin birkaç bölgesinde çoğaltım sağlar, bu ise polimorfizmi ortaya çıkaran çok sayıda bant oluşumu ile sonuçlanmaktadır. AFLP'de tek bir primer kombinasyonu polimorfik bir RFLP marköründen 8 kat daha fazla polimorfizm ortaya çıkarma yeteneğine sahiptir. Böylece AFLP ekmeklik buğday için değerlendirildiğinde, 16 kat daha fazla lokus tarayabildiği bilgisine ulaşılmıştır (Mackill vd., 1996). RAPD gibi dizi bilgisi gerektirmemesi bu yöntemin avantajlarındandır. Bunun yanında moleküler biyolojik tekniklerde tecrübe gerektirmesi, restriksiyon enzimi kullanımı (Ridout ve Donini, 1999), uygun primer kombinasyonlarının belirlenmesi ve metodun ekonomik olmayışı AFLP'nin kullanımını sınırlayan dezavantajlarından bazılarıdır (Hartl ve Seefelder, 1998). Farklı restriksiyon enzimi ve primerler, elde edilen verilerin kalite ve miktarında farklılıklar sağladığı için hedef materyalin öncelikle farklı primer kombinasyonlarıyla denenmesini gerektirmektedir. Sınırlayıcı etmenlerden bir diğeri ise AFLP verilerini görüntüleme, farklı metotların kullanılmasını gerektirmektedir. Aynı çalışmada dominant ve kodominant bant profillerinin oluşması, AFLP'nin popülasyon genetiği çalışmalarında kullanımını sınırlayan etmenlerden biridir (Lynch ve Milligan, 1994).

1. 3. 1. 3. 1. 5. SSR (Simple Sequence Repeat-Basit dizi tekrarı, mikrosatellit)

SSR bir diğer adı ile mikrosatellitler, ökaryotik genom boyunca dağılmış bulunan ve ardışık olarak tekrarlanmakta olan 2-6 nükleotid gruplarından oluşmaktadır. Mikrosatellit terimi 1989 yılında ilk defa Litt ve Lutty tarafından kullanılmış ve SSR moleküler markör lokuslarının polimorfizm özellikleri ilk kez insanlarda belirlenmiştir. Bu gruplar örneğin mono (A, T)n, di (AT, GA)n, tri (AGG)n, tetra (AAAC)n ve penta (GGAGT)n şeklinde gösterilmekte ve n ardışık tekrar sayısını belirtmektedir. Bu tekrar eden dizi motiflerine hayvan ve bitki genomları boyunca çok sık rastlanmaktadır.

DNA replikasyonundaki hatalar sonucunda oluşmaktadırlar (Moxon ve Wills, 1999). Bu hatalar hücrede replikasyon sırasında kopya sayısındaki değişiklikler sonucu oluşabilmektedir (Jarne ve Lagoda, 1996). SSR lokuslarındaki farklılıklar, tekrar eden nükleotit gruplarının sayısındaki farklılıklardan kaynaklanmaktadır.

Yapılan çalışmalar sonucunda AC/TG tekrarlarının hayvan genomlarında en görülen motifler olduğu belirlenmiştir (Weber vd., 1989). Bitkilerde ise SSR markör lokuslarının polimorfik doğası ve frekansı üzerine ilk incelemeler 1992 yılında Akkaya ve arkadaşları tarafından yapılmıştır (Akkaya vd., 1992). Bu araştırma sonucunda mikrosatellitlerin bitki türlerinde polimorfik olmasının yanı sıra çok ve geniş bir dağılıma sahip olduğu da ortaya çıkmıştır.

Dizi bilgisi ihtiyacından dolayı SSR'ların izolasyonu zaman ve bütçe gerektiren bir yöntemdir. Bu durum genetik sistemi çok iyi bilinmeyen birçok bitki ve hayvan türü için çok pratik bir yaklaşım değildir.

Orijinal DNA molekülünde kutucuk ile gösterilen 5 tekrarlı motif bölgesi bulunurken replikasyon esnasında oluşan hata (slippage) nedeni ile yeni allellerin oluşumuna sebep olarak 4 ya da 6 tekrarlı motifler şeklinde değişikliğe neden olabilir. SSR'lar ökaryotik genomda sık bulunduklarından PCR metodu ile çalışılmaları oldukça kolay hale gelmiştir. RFLP ve RAPD'e göre yüksek düzeyde polimorfizm göstermeleri ve genomda yüksek oranda bulunmaları SSR'ları tercih edilen moleküler markörler haline getirmiştir. SSR'ları çevreleyen korunmuş DNA dizileri primer olarak kullanılarak PCR metodu vasıtasıyla bir lokustaki farklı alleller tespit edilebilir hale gelmiştir. SSR'lar ile ilgili ilk çalışma bitkilerde yapılmıştır ve SSR tekniğinin bitkilerde genetik haritalama çalışmalarındaki kullanımı avantajları nedeniyle gün geçtikçe artmaktadır. SSR'ların polimorfizm oranlarının yüksek olması bitkiler hakkında oldukça geniş bilgi edinilmesini sağlamaktadır. Ayrıca kodominant markör vermesi ve PCR kolaylığına sahip olması da kullanım oranını artırmaktadır. Son olarak, SSR'lar bitki genomlarında oldukça fazla olup eşit bir dağılıma sahiptir (Yıldırım ve Kandemir, 2001).

Condit ve Hubbel (1991), tropikal 5 ağaç türünde yüksek oranda (AC)n ve (AG)n dizilerini bulmuşlardır. Bu sonuçlar SSR'ların bitki sistemlerinde yüksek oranda varlığını doğrulamıştır. Başka bir çalışmada Akkaya ve arkadaşları (1992) SSR'ların soya fasulyesindeki yüksek polimorfizmini ve diğer bitkiler için de PCR'a dayanan yeni bir moleküler markör kaynağı olduğunu bildirmişlerdir.

SSR dizilerinin ekmeklik buğdayda moleküler markör olarak kullanım potansiyeli araştırılmış ve buğdayda (GA)n/(GT)n tekrarlarının her 270 kb DNA'da bir bulunduğu gözlenmiştir. Ayrıca 70 mikrosatellitin dizi verileri ile buğday SSR'larında dinükleotidlerin en sık bulunduğu ve nispeten uzun olduğu (yaklaşık 40 tekrar), trinükleotidlerin sıklığının dinükleotidlerin onda biri kadar olduğu ve tetranükleotidlere nadir rastlandığı gözlenmiştir (Röder vd., 1995). Benzer olarak (AC)n tekrarları her 292

kb da bir görülürken, (AG)n tekrarlarına her 212 kb da bir rastlanmıştır (Ma vd., 1996). Buğdayda SSR lokuslarının kromozom kolları üzerindeki dağılışı Plaschke ve arkadaşları tarafından (1995) belirlenmiştir. Buna göre SSR'ların dağılımı rastgeledir ve SSR'lar yüksek oranda B genomunda bulunmaktadır. Ekmeklik buğdayda 279 mikrosatellit lokusunun (Röder vd., 1998) ve 53 SSR lokusunun detaylı genetik haritalaması Stephenson ve arkadaşları tarafından (1998) yapılmıştır. Delesyon hatlarını kullanarak mikrosatellitlerin grup2 kromozomları (2A, 2B, 2D) üzerindeki fiziksel haritalama verileri ile SSR'ların buğday kromozomunda özel bölgelere kümelendiği belirlenmiştir (Röder vd., 1998). Böylece basit dizi tekrarları buğday genomunu tamamen kapsadığı için etkin olarak kullanılmaktadır.

Mikrosatellitleri kuşatan dizilerin akraba türlerde yüksek oranda korunduğu bilinmektedir (Huang vd., 1998). Bu sebeple türlerden biri için primer tasarlandığında, diğer akraba türlerin genomlarında da aynı bölgenin çoğaltımına olanak sağlayabilmektedir. Ancak buna rağmen buğday için geliştirilen SSR primerlerinin çok az bir kısmının arpada ve çavdarda polimorfizm gösterdiği belirlenmiştir (Röder vd., 1995). Agrama ve Tuinstra ise 2003 yılında 32 RAPD ve 28 SSR primeri kullanılarak morfolojik olarak birbirinden farklı 22 sorgum çeşidinde çeşitliliği inceledikleri çalışmalarında, primer başına 4,5 polimorfizm oranı ile SSR moleküler markörünün yüksek polimorfizme sahip olduğunu, RAPD moleküler markörünün polimorfizm oranının düşük olduğunu, SSR verilerine göre hesaplanan genetik uzaklık değerlerinin ise sorgum çeşitlerinin coğrafik orijini ve taksonomik sınıflandırması ile ilişkili olduğunu bildirerek SSR markörünün sorgum çeşitlerinde genetik benzerliği saptamada başarıyla kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

SSR markörlerinin; moleküler haritaların çıkartılmasında, gen işaretlemede, marköre bağlı seçim ve transgenik bitkilerin geliştirilmesine yönelik genlerin klonlanması çalışmalarında kullanılabilirliği kanıtlanmıştır (Gupta vd., 1999).

1. 3. 1. 3. 1. 6. STS (Sequence Tagged Site- Dizisi etiketlenmiş alan)

Dizisi etiketlenmiş bölgeler özel bir lokus tanımlayan ve PCR ile çoğalabilen kısa ve özgün DNA dizilerinden oluşmaktadır. STS yöntemi, RFLP güvenilirliğini ve PCR kolaylığını bir araya getiren bir yöntemdir. Nükleotid dizilişi bilinen az kopyalı RFLP problarından yeterli uzunlukta (16–24 nükleotid) başlatıcı DNA'lar oluşturulmaktadır. Başlatıcı DNA'lar ile genomik DNA üzerinde çok özgün şartlarda çoğaltım yapılması ile

RFLP probunun temsil ettiği lokus çoğaltılmaktadır (Parmaksız, 2004). Çoğaltılmış ürünlerin bant büyüklüğü farklarından polimorfizm ortaya çıkmaktadır. Talbert ve arkadaşları 1994 yılında yaptıkları çalışmada α-amilaz ve γ-gliadin genlerinden türevlenmiş primer dizileri ile PCR yaparak buğdaydaki polimorfizmi ortaya koymuşlardır. Bu grup ardından RFLP problarından türevlenmiş 115 adet STS primeri kullanarak arpaya özgü 135 markör elde etmişlerdir (Blake vd., 1996). Aynı grup buğday-arpa hatlarında polimorfik AFLP fragmentlerinden kromozoma özgü STS primerleri geliştirmişlerdir (Shan vd., 1999). Roy ve arkadaşları (1999) tarafından yapılan çalışmada bu primerler kullanılarak buğdayda fide dönemi dayanıklılığı ile genetik bağlantı gösteren bir STS markörü geliştirilmiştir. STS markörleri buğday kahverengi pas dayanıklılık genleri Lr10 (Schachermayr vd., 1997), Lr19 (Prins vd., 2001), "powdery mildew" dayanıklılık geni Pm1 (Hu vd., 1997), "Hessian fly" dayanıklılık geni H6 (Dweikat vd., 2002) ve sarı pas dayanıklılık geni YrMoro'yu (Smith vd., 2002) işaretlemek için farklı araştırmacılar tarafından çalışmalarında kullanılmıştır.

1. 3. 1. 3. 1. 7. CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence-Kesilip çoğaltılmış polimorfik diziler)

PCR-RFLP olarak da bilinen CAPS, uygun primerler kullanılarak PCR ile çoğaltılmış DNA bölgelerinin restriksiyon enzimleriyle (endonükleaz) parçalanmasına dayanan ve sonucunda DNA parçacık uzunluk polimorfizminin elde edildiği bir yöntemdir. DNA üzerinde meydana gelen SNP gibi tek nükleotid değişimleri ve eklemesilmeler (InDel) endonükleazların tanınma bölgelerini değiştirerek farklı uzunlukta DNA parçalarının oluşmasına sebep olmaktadır. Lokus-spesifik PCR ürünlerinin bir veya birden fazla endonükleazla parçalanmasıyla oluşan ürünlerin agaroz veya poliakrilamid jelde yürütülmesine dayanmaktadır. CAPS markörleri kodominant, lokus spesifiktir ve homozigot-heterozigot allel ayrımını rahatlıkla yapabilmektedir (Konieczny ve Ausubel, 1993). CAPS metodunun çok düşük miktarda DNA'ya ihtiyaç duyması, kodominant allel ayrımını yapabilmesi, basit ve ucuz olması avantajları arasında sayılabilir. Mutasyonlara bağlı olarak meydana gelen DNA dizi değişimleri endonükleazların tanıma bölgelerini etkileyerek sınırlayıcı etki oluşturabilmekte ve bundan dolayı SSR ve AFLP gibi yüksek polimorfizm elde edilmesini engellemesi ise dezavantajlarını oluşturmaktadır. Buna rağmen CAPS, gen haritalama çalışmalarında, moleküler tanımlama çalışmalarında kullanılmaktadır (Weiland ve Yu, 2003).

1. 3. 1. 3. 1. 8. Markör teknolojilerinde EST (Expressed Sequence Tag- İfade edilmiş dizi etiketleri) kullanımı

Kodlama yapan genom bölgeleri mRNA'ya (mesajcı RNA) transkripte olarak protein sentezi için kalıplık görevi görmekte ve günümüzde ters transkriptaz enzimi kullanarak RNA'dan komplementer DNA (cDNA) elde edilmektedir. cDNA RNA'dan üretilen dominant bir yapı olup yapısındaki intronlar kırpılarak (splicing) ekzonlardan oluşmuş, anlatımı yapılan bir genin dizilenmesi ile 5' EST veya 3' EST (Expressed Sequence Tag) olarak ifade edilmektedir (Jongeneel, 2000). 5' EST genelde kodlama yapan bölgelerden (ekzon) elde edilmek ile birlikte bu bölgeler genelde türler arası korunmuş ve gen aileleri içinde çok fazla değişmemişlerdir. 3' genelde kodlama yapmayan bölgelerde (intron) veya translasyona uğramayan bölgelerden (UTR) elde edilmektedir ve kodlama yapan bölgelere oranla türler arasında daha az korunmuşlardır. Son yıllarda EST belirlenmesi çok hızlı ve kolay bir şekilde yapılabilmekte, dijital veri bankalarında yaklaşık 6,5 milyon EST dizisi bulunmaktadır. EST dizileri, gen transkriptlerinin belirlenmesi, gen keşifleri, gen anlatımı ve düzenlenmesiyle ilgili bilgi edinilmesinde, dizi belirlenmesinde ve EST temelli RFLP, SSR, SNP, CAPS gibi önemli moleküler markör sistemlerinin geliştirilmesinde bir araç olarak kullanılabilmektedir. Ayrıca, EST dizileri DNA mikroarray çalışmalarında gen anlatımlarının belirlenmesinde prob olarak, genetik bağlantı haritaları ve fiziksel haritaların oluşturulmasında da kullanılmaktadır (Kurata vd., 1997; Davis vd., 1999). EST dizileri SSR dizileri için yararlı bir kaynaktır ve çeşitli bitki türlerindeki EST dizilerinin yaklaşık %1-5 arası 20 baz çifti veya daha fazla uzunlukta SSR bölgeleri bulunmaktadır (Kantety vd., 2002). EST-SSR bölgeleri, transkripte olmayan bölgelere oranla daha korunaklı olan transkripsiyon bölgelerinde bulunmakta ve yakın türlere transferleri mümkün olmaktadır. EST dizilerinden elde edilen primerler kullanılarak ilgili bölgenin çoğaltılması ve dizilenerek kıyaslanması pek çok SNP'yi ortaya çıkarabilmektedir. Temel olarak EST markörleri ilgi alanındaki spesifik genlerin klonlanmasında, komple genom dizilenmesinde, çeşitli akraba organizmalardaki fonksiyonel genlerin haritalanmasında yaygın olarak kullanılmaktadır (Kesawat ve Das, 2009).

1. 3. 1. 3. 1. 9. ISSR markörler (Inter Simple Sequence Repeat- Basit dizi tekrarları arası bölgeler)

ISSR yöntemi, ters konumlanmış ve çoğaltılabilir uzaklıktaki iki basit dizi tekrar bölgesi arasındaki DNA parçasının PCR ile çoğaltımına dayanan bir yöntemdir. (Zietkiewicz vd., 1994). Bu yöntemde, farklı büyüklükteki mikrosatellit arası dizileri çoğaltmak için çoklu genomik dizileri hedef alan 16–25 bp uzunluğundaki mikrosatellitler primer olarak kullanılmaktadır. Kullanılan mikrosatellitler dinükleotid, trinükleotid, tetranükleotid veya pentanükleotid olabilmektedir. İleri ve geri primer olmak üzere iki primer kullanılmadan tek primer kullanılmaktadır ve elde edilen PCR ürünleri agaroz jelde yürütülerek etidyum bromür ile boyandıktan sonra görünür hale gelebilmektedir (Zietkiewicz vd., 1994). ISSR markörleri dominanttır ve dizi bilgisi gerekmeden primer dizaynı yapılabilmesi avantajları arasındadır (Joshi vd., 2000). RFLP analizi, güvenirlik yönleriyle bilinmesine rağmen; fazla zaman, deneyim gerektiren ve radyoaktivite kullanımını gerektiren nispeten pahalı bir yöntemdir. RAPD analizleri ise basit, hızlı, pratik bir yöntemdir ve düşük kaliteli kalıp DNA gerektirir, ancak güvenilirlik ve tekrar edilebilirlik açısından problemli bir yöntemdir. ISSR yönteminde primerlerin bağlanma sıcaklıkları daha yüksektir. SSR'lar lokusa özgü ve kodominant markörler olmasına karşın, oligonükleotid primerleri elde etmek dizi bilgisi gerektirdiğinden zaman sarf edici, pahalı bir süreçtir ve reaksiyon başına az sayıda lokus tanımlanabilmektedir. ISSR, RFLP ve RAPD'in teknik sınırlamalarının üstesinden gelebilen yeni bir moleküler markör kaynağı olarak öne çıkmaktadır.

ISSR-PCR basit, hızlı, etkin ve radyoaktivite kullanımı gerektirmeyen bir yöntemdir. Kullanılan primerler özel olmayıp herhangi bir tekrarlı diziden sentezlenebilir ve primerler uzun olduğu için sıkı bağlanma sağlamaktadırlar. Çoğaltılan ürünler çoğunlukla 200-2000 bp uzunluğunda olup, sonuçlar agaroz ya da poliakrilamid jel ile belirlenebilmektedir. ISSR'lar genellikle Mendel kalıtımı gösteren dominant markörler vermektedirler (Gupta vd., 1994). Ancak bazı durumlarda homozigot ve heterozigotların ayrılmasını sağlayan kodominant markörler verdikleri de gözlemlenmiştir (Wu vd., 1994). Genelde (AG), (GA), (CT), (TC), (AC) ve (CA) tekrarlı primerler diğer 2 tekrarlı primerlerden ve üç ya da dört tekrarlı primerlerden daha yüksek oranda polimorfizm göstermektedir. ISSR'ın temel uygulama alanları genomik parmak izi (Charters ve Wilkinson, 2000), genetik açılım ve filogenetik analizler, SSR motif frekansı belirleme, (Nagaoka ve Ogihara, 1997), gen işaretleme ve marköre bağlı seçim (Hussain vd., 2000)

ve doğal populasyonlarda genetik çeşitliliğin belirlenmesine yönelik çalışmalardır (Qian vd., 2001).

Zietkiewicz ve arkadaşları (1994) tarafından geliştirilen hazır üretilmiş dinükleotid, tetranükleotid ve pentanükleotid tekrarlarına dayanan bazlara sahip primerlerin kullanıldığı, genotipleri birbirinden ayırma gücünün yüksek ve uygulama maliyetinin düşük olması özelliğiyle bilinen, ISSR (Basit Diziler Arası Tekrar) yöntemi; buğday (Nagaoka ve Ogihara, 1997), arpa (Sanchez vd., 1996; Fernandez vd., 2002), çeltik (Qian vd., 2001), mısır (Kantety vd., 1995), pamuk (Liu ve Wendel, 2001) ve diğer birçok kültür bitkisinde tür içi ve türler arası genetik varyasyonun belirlenmesinde, buğday (Nagaoka ve Ogihara, 1997), arpa (Tanyolaç, 2003; Fernandez vd., 2002), mısır (Pejic vd.,1998), çeltik (Blair vd., 1999), pamuk (Liu ve Wendel, 2001), patates (Prevost ve Wilkinson, 1999), bezelyede (Metais vd., 2000) ve daha birçok kültür bitkisinde türlerin veya tür içi çeşitlerin birbirlerinden ayrılmasında başarı ile kullanılmış ve yoğun bir şekilde kullanılmaya devam etmektedir.

Son yıllarda ISSR tabanlı markörlerin kullanımı aşağıdaki nedenlerden dolayı artmıştır:

1. Allelik varyasyonların yüksek seviyede olması ve kodominant karakter taşımaları bakımından maliyetlerinin düşmesi,

2. PCR uygulandığından dolayı çok düşük miktarda dokuya ihtiyaç duyması,

3. Özellikle ISSR markörlerinin diğerlerine göre daha hızlı uygulanabilmesi,

4. Bir tür için geliştirilen primerlerin akraba türlerde de aynı bölgeyi çoğaltabilmesidir [36].

ISSR markörlerin tarımsal açıdan önemli genleri işaretlemedeki yararları ilk olarak Akagi ve arkadaşları (1996) tarafından pirinçte (*Oryza sativa*) bir nüklear onarıcı genle genetik bağlantı gösteren ISSR primeri ile gösterilmiştir.

ISSR'ların diğer markör tekniklerinden üstünlükleri birçok araştırmacı tarafından kanıtlanmıştır. Salimath ve arkadaşları (1995) tarafından yapılan çalışma ile ISSR'lardan elde edilen verilerin kalite ve miktar açısından RFLP ve RAPD'den daha bilgi verici olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Yöntemin etkinliği farklı birçok bitki türü için kanıtlanmıştır. Sözen (2010), kışlık tritikale kültürlerinin arasındaki genetik çeşitliliği ve akrabalık ilişkilerini ISSR markörleri kullanarak incelemiştir. Nagaoka ve Ogihara (1997) ISSR'ların buğdayda bir genetik markör sistemi olarak kullanılabilirliğini incelemiş ve ISSR markörlerin RAPD ve RFLP'ye göre polimorfizm oranını karşılaştırmıştır. ISSR markörlerinin RAPD markörlerinden çok daha fazla bilgi verici ürünler sağladığı,

polimorfizm oranının ise RFLP ile benzer ve RAPD'den çok daha üstün olduğu sonucuna ulaşılmıştır. ISSR markörlerinin polimorfizmi ile buğday çeşitleri arasındaki akrabalık ilişkisi değerlendirilmiş, ISSR'ların genotip tanımlama, değerlendirme çalışmalarında RAPD ve RFLP markörlerine göre daha bilgi verici ve tekrarlanabilir sonuçlar verdiği tespit edilmiştir. Charters ve arkadaşları (1996) 3 adet 5' "anchored" primer ile 20 kolza (*Brassica napus*) varyetesini sınıflandırmışlardır. Acıbakla (*Lupinus albus*) bitkisinde yapılan bir çalışmada kullanılan 10 adet ISSR primerinden herhangi ikisinin çalışılan 37 adet çeşidi ayırmak için etkin olduğu sonucuna ulaşılmıştır (Gilbert vd., 1999). Benzer şekilde 4 adet ISSR primeri 34 adet patates (*Solanum tuberosum*) çeşidini sınıflandırmada kullanılmıştır (Prevost ve Wilkinson, 1999).

12 ISSR primeri kullanarak Diplotaxis cinsine ait 10 türün genetik çeşitliliği araştırılmıştır (Martín ve Sánchez-Yélamo, 2000). Cycas guizhouensis bitkisinde ISSR markörleri ile çeşitlilik araştırması yürütmüştür (Xiao LQ ve ark., 2004). *Sonneratia* cinsine ait 6 türün genetik akrabalık seviyelerini ISSR markörleri ile tespit edilmiştir (Haisehen ve Guizhu, 2008). Uruguay' dan toplanan *Buita* cinsine ait tehlikede olan *B. paraguayensis, B. lallemanti* ve B. yatay türleri arasındaki genetik çeşitliliği bu yöntem ile incelenmiştir (Gaiero ve ark., 2011). RAPD ve ISSR markörleri kullanarak *Arthrocnemum macrostachyum* (Chenopodiaceae)'un genetik çeşitliliği incelenmiştir (Saleh, 2011). Kallustan gelişen aya genç bitkilerinin somaklonal çeşitlilik araştırmasında ISSR markörlerinden yararlanarak incelenmiştir (Ahmed ve ark., 2012). ISSR markörlerini kullanarak Doğu Asya'daki tehlikede olan *Camellie japonica* türlerinin genetik çeşitliliği üzerine çalışmalarda bulunulmuştur. Bu çalışmada toplam 20 adet primer kullanılmıştır ve %90,1'lik polimorfizm oranı elde edilmiştir (Lin ve ark., 2013). ISSR markörleri kullanarak Çin'deki *Miscanthus sinensis* populasyonlarının genetik çeşitliliğini incelenmiştir. Bu çalışmada ise toplam 9 adet ISSR primeri kullanılmış ve %52,3'lük moleküler çeşitlilik oranı elde edilmiştir (Zhang ve ark., 2013). *Poa angustifolia* ve *Poa trivialis* türleri arasındaki genetik akrabalığı ve genetik çeşitliliği belirlemek için ISSR yöntemini kullanılan bir çalışma yapılmıştır (Arslan ve Tamkoç, 2011).

Yapılacak çalışmanın özelliğine uygun nitelikte ve bilgi verici primerlerin kullanımı çalışmaları kolaylaştırarak, zaman ve maliyet açısından tasarruf sağlamaktadır. Bu yöntemde farklı denaturasyon sıcaklıkları ve enzim konsantrasyonları sonunda aynı bant yapıları bulunmuştur. Sonuçta tekniğin farklı PCR parametreleri arasında sabit olduğu görülmüştür ve güvenilir bulunmuştur.

Çizelge 1. 5. Markörlerin karşılaştırılması

		Çalışma Prensibi	Olumlu Yönleri	Olumsuz Yönler
MOLEKÜLER MARKÖRLER	RFLP	• Restriksiyon ve Southern blot hibridizasyonu	• Yüksek genetik bilgi verir. • Kodominanttır. • Yüksek tekrarlanabilirlik sağlar. • Filtreler çok kez kullanılabilir. • Genomu iyi bir şekilde ifade eder. • Bütün türlerde uygulanabilir. • DNA dizi bilgisi gerektirmez. • Güvenilirdir. • Harita tabanlı klonlama için gereklidir.	• Yüksek kaliteli ve çok miktarda DNA gerektirir. • Teknik olarak daha zordur. • Otomasyonu zordur. • Radyoaktif işaretleme gerektirir. • Probların klonlanması ve tanımlanması gerekir.
	RAPD	• Rastgele primerlerle çoğaltım	• Yüksek genetik bilgi verir. • Genomu iyi ifade eder. • DNA dizi bilgisi gerektirmez. • Otomasyonu kolaydır. • Orta kalitede ve az miktarda DNA gerektirir. • Radyoaktif işaretleme gerektirmez. • Nispeten daha hızlıdır.	• Dominanttır. • Düşük tekrarlanabilirlik sağlar. • Bütün türlerde uygulanamaz.
	SSR	• Basit dizilerin PCR'ı	• Yüksek genetik bilgi verir. • Genomu çok iyi ifade eder. • Yüksek tekrarlanabilirlik sağlar. • Yüksek oranda polimorfizm ortaya koyar. • Otomasyonu kolaydır. • Radyoaktif işaretleme gerektirmez. • Çoklu allellerle çalışılabilir.	• DNA dizi bilgisi gerektirir. • Bütün türlerde uygulanamaz.

	AFLP	• Restriksiyon ve seçici PCR çoğaltımı	• Yüksek genetik bilgi verir. • Yüksek oranda polimorfizm ortaya koyar. • DNA dizi bilgisi gerektirmez. • Bütün türlerde uygulanabilir. • Rayoaktif işaretleme gerektirmez.	• Çok hassas olması, bant desenlerini etkileyebilir. • Kararlı haritalar oluşturmaz. • İyi seçilmiş adaptörlere özgün primerler gerektirir.
	STS	• Kısa dizilerin PCR çoğaltımı	• Radyoaktif işaretleme gerektirmez. • Genomu çok iyi ifade eder. • Yüksek oranda polimorfizm ortaya koyar. • Filtreler çok kez kullanılabilir. • Yüksek tekrarlanabilirlik sağlar.	• Hedef bölgeler dışındaki mutasyonu belirleyemez. • DNA dizi bilgisi gerektirir. • Primerlerin klonlanması ve tanımlanmasını gerektirir. • Zahmetlidir.
	EST-SSR	• Anlatım yapan bölgelerden (ekson) elde edilen basit dizi tekrarlarının PCR çoğaltımı	• Türler arası kullanılabilirlik sağlar. • Kaliteli bant profili sağlar. • Radyoaktif işaretleme gerektirmez. • Otomasyonu kolaydır.	• Düşük polimorfizm sağlar.
	ISSR	• Basit dizi tekrarları arası bölgelerin PCR çoğaltımı	• Yüksek polimorfizm sağlar. • Yüsek tekrarlanabilirlik sağlar. • DNA dizi bilgisi gerektirmez. • Radyoaktif işaretleme gerektirmez.	• Bant profili iyi değildir. • Çoğunlukla dominanttır.

1. 3. 1. 3. 2. DNA dizi ve çip (mikroarray) teknolojisine dayanan moleküler markörler

DNA mikroarray, gen çipi, DNA çipi ya da biyoçip olarak da bilinmektedir. Bu çipler anlatım profili oluşturmak, başka bir ifade ile binlerce genin anlatım düzeyini aynı anda izlemek amacı ile cam, plastik veya silikon çip gibi katı bir yüzeye tutturularak sıralı

bir şekilde (array) oluşturulmuş mikroskobik DNA spotlarıdır. Bir DNA mikroarray'de bu spotlardan onbinlerce bulunabilmektedir. Yüzeye tutturulan bu DNA segmentleri (20 ile 100 ya da daha fazla nükleotid uzunluğunda olabilir) prob olarak tanımlanmıştır ve bu probların binlercesi tek bir DNA mikroarray'inde birlikte bulunabilmektedir (İpekdal, 2006).

Bitkilerde mikroarray teknolojisi ilk defa Arabidopsis'de yaprak ve kökteki gen anlatım profillerini belirlemek için 48 adet cDNA parçacığını içeren array kullanılarak üretilmiştir. Daha sonra 1443 adet Arabidopsis geni içeren cDNA mikroarray farklı organ ve gelişme evresinde olan bitkilerde gen anlatım profillerini belirlemek için üretilmiştir. Son yıllarda ise mikroarray teknolojisi Arabidopsis (Lin vd., 2004), pirinç (Lan vd., 2004), mısır (Wang vd., 2003), çilek (Aharoni vd., 2002) ve fasulye (Arimura vd., 2000) gibi tarımsal açıdan önemli olan birçok bitkide, farklı koşullardaki gen anlatım profillerini belirlemek için kullanılmaktadır. Öztürk ve arkadaşları (2002), kuraklık ve diğer abiyotik streslerle ilişkin genleri tanımlamak için arpadaki ilk mikroarray analiz çalışmalarını yürütmüşlerdir. Ayrıca birçok bilim adamı tarafından mikroarrayler bitkilerde abiyotik ve biyotik stresler, meyve olgunlaşması, sirkadyen saati, fitokrom A sinyallemesi, tohum gelişmesi ve nitrat asimilasyonu sırasında aktif olan veya aktivitelerini azaltan genlerin bulunması çalışmalarında kullanılmıştır. Buna benzer çalışmalar tüm genom DNA baz dizisi belli olan *Arabidopsis* ve pirinçte kullanılabileceği gibi kısmi genom DNA dizileri belirlenmiş ya da belirlenmekte olan birçok diğer bitkide de uygulanabilmektedir (Çevik, 2005).

1. 3. 1. 3. 2. 1. SNP (Single Nucleotide Polymorphism- Tek nükleotid polimorfizmi)

Popülasyondaki bireylerin genom dizilerinde meydana gelen tek nükleotid değişimleri olarak bilinen SNP (Single Nucleotide Polymorphism), bitkilerinde dahil olduğu pek çok canlı türünde ortaya çıkan bir varyasyondur. SNP oluşmasında eklenme ve silinme nükleotid dizisi değişimine neden olan temel nedenlerdendir; gen haritalamada, markörler yardımıyla ıslah ve harita temelli klonlama çalışmalarında önemli bir yöntem olarak tercih edilmektedir. SNP oluşumları genelde kodlama yapmayan DNA bölgelerinde yaygın olarak görülmektedir veya kodlama yapan bölgelerde meydana gelirse aminoasit dizisinin değişimine neden olabileceği gibi amino asit dizisinde herhangi bir değişikliği neden olmayabilir ve bunun sonucunda gen ürününde herhangi bir değişiklik görülmez (Sunyaev vd., 1999). Mısır bitkisinde

ortalama her 60-120 baz çiftinde bir SNP' ye rastlanırken (Ching vd., 2002), insanlarda tahminen 1.000 baz çiftinde bir SNP' ye rastlanılmaktadır (Sachidanandam vd., 2001). Dizileme teknolojilerinin gelişmesine paralel olarak, EST kökenli DNA dizi temelli genetik varyasyon çalışmaları yaygın olarak yürütülmektedir (Soleimani vd., 2003). Son yıllarda SNP karakterizasyon çalışmalarında kullanılan allel spesifik hibridizasyon veya allel-spesifik oligonükleotid hibridizasyon (ASO), farklı DNA hedeflerindeki tek nükleotid pozisyonlarını hibridizasyon temelli olarak belirlenmesidir. Hibridizasyon temelli problarda hatalı eşlenmeler olabilmekte ve bundan dolayı da daha dikkatli bir prob tasarımı ve hibridizasyon protokolüne ihtiyaç duyulmaktadır. SNP temelli genotip karakterizasyonunda kullanılan DNA çipleri ve allel-spesifik PCR, fazla ürün elde edilmesi ve otomasyona uygunluğu açısından ilgi çekmektedir (Sobrino vd., 2005).

DNA dizi ve çip (mikroarray) teknolojisine dayanan moleküler markörlerden biri olan SNP, özellikle son yıllarda genom taramalarında sıkça kullanılan bir yöntemdir. SNP'ler genetik bir lokusta farklı alleller oluşturacak biçimde bazlarda meydana gelen nokta mutasyonların sebep olduğu polimorfizmlerdir. Baz değişimlerinden kaynaklanan bu tip dizi farklılıkları, 1977 yılında DNA dizi analizi yönteminin başlamasından itibaren daha iyi belirlenebilmiştir. Ancak çok fazla örnekte SNP'nin tanımlanabilmesi çip teknolojisinin uygulanabilir hale gelmesiyle artmıştır. Herhangi bir organizmada yaygın olarak bulunabilmesi, otomosyona uygun olması, diğer markör ve yöntemlerle belirlenemeyen gizli polimorfizmleri belirlemesi SNP'yi moleküler markör gelişiminde önemli bir yere getirmiştir. İnsanlarda yaklaşık olarak 3 milyon SNP'nin bulunduğu bildirilmektedir Teorik olarak, bir lokusdaki SNP dört bazdan birini bulunduracak şekilde, dört allel oluşturabilmektedir. SNP'ler hem kodlayıcı hem de kodlayıcı olmayan DNA bölgelerinde gözlenebilir. SNP profilini ortaya çıkarmak amacıyla DNA dizi analizi, SSCP (Single-Strand Conformational Polymorphism- Tek İplik Konformasyonal Polimorfizmi), HA (Heterodupleks Analizi), ASO (Allel Spesifik Oligonükleotit) analizi ve aynı anda yüzlerce SNP profilinin araştırıldığı DNA mikroarray yöntemi gibi farklı yaklaşımlar kullanılabilmektedir. Özellikle DNA mikroarray sistemlerle aynı anda yüzlerce SNP profili tarayabilmek mümkündür. Birçok gen ile ilgili aynı anda bilgi alınabilmesi, hızlı sonuç elde edilmesi ve sistem kurulduktan sonra ekonomik olması mikroarraylerin avantajları arasında sayılabilmektedir (Liu ve Cordes, 2004).

1. 3. 1. 3. 2. 2. DArT (Diversity Array Technology – Diversity array teknoloji)

Bir diğer önemli DNA dizi ve çip (mikroarray) teknolojisine dayanan moleküler markör olan DArT (Diversity Array Technology– Diversity Array Teknoloji), DNA çip teknolojisinin DNA polimorfizm teknolojisine uygulanması olan "high throughput" genom analizi olarak bilinmektedir. Bu teknoloji bir popülasyondan veya bir organizmanın genomik DNA'sından köken alan özgün bir DNA fragmentinin varlığını veya miktarını ölçmektedir. DArT, oldukça ekonomik bir yöntemdir. DNA dizi bilgisine ihtiyaç duymamakla birlikte az miktarda DNA bu teknolojinin kullanımı için yeterli olmaktadır (Jaccoud vd., 2001).

Moleküler markör sistemleri, yapılacak çalışmanın amacına göre seçilmesi oldukça önemlidir. Çalışılacak popülasyonun yapısı, genetik düzeyi, çalışma için gerekli zaman, maliyet ve sistemin kullanılabilirliği göz önünde bulundurulması gereken önemli kriterler arasındadır. Her bir sistemin kendine özgü olumlu ve olumsuz yönleri olsa da kullanılmadan önce bir sistemin yararları hakkında değerlendirme yapmak zor olabilmektedir. Bir çalışmada etkin bir biçimde kullanılan markör sistemi, başka bir çalışmada aynı düzeyde başarı sağlamayabilmektedir (Harris, 1999).

İdeal bir DNA markörünün taşıması gereken özellikleri su şekilde sıralanabilir:

a. Yüksek düzeyde polimorfik olmalı

b.Kodominant kalıtım göstermeli (diploit organizmalarda homozigot ve heterozigot durumları tespit edebilmek için)

c. Genomda sıklıkla bulunmalı

d.Seçici nötr davranışları olmalı (Organizmanın DNA sekansının çevre koşullarından veya düzenleme etkinliklerinden etkilenmemesi)

e. Kolay elde edilebilir olmalı

f. Kolay ve hızlı analiz edilebilir olmalı

g. Yüksek düzeyde tekrarlanabilir sonuçlar vermeli

h. Laboratuvarlar arasında kolay veri aktarımı yapılabilmeli.

Tüm bu özellikleri taşıyan bir markör bulmak oldukça güçtür. Ancak yapılacak çalışmanın türüne göre bu özelliklerden birkaç tanesini taşıyan bir markör seçilip verimli sonuçlar elde edilebilir.

Birçok bitki türünde çeşitler arasındaki genetik varyasyonu ortaya çıkarmakta hangi moleküler DNA tekniğinin en uygun olduğunu belirlemek amacıyla RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms), AFLP (Amplified Fragment Length

Polymorphisms), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), SSR (Simple Sequence Repeat), ve ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) DNA işaretleyici teknikleri karşılaştırılmış ve polimorfizm bakımından SSR ve AFLP teknikleri, maliyet bakımından RAPD ve ISSR teknikleri, tekrarlanabilirlik bakımından RFLP, SSR, ISSR ve AFLP DNA tekniklerinin avantajlı oldukları belirlenmiştir. Bunların yanı sıra çalışılacak laboratuvar olanakları göz önünde bulundurulduğunda, RAPD ve ISSR yöntemlerinin radyoaktif madde kullanımının olmadığı ve koşulların sınırlı olduğu laboratuvarlarda rahatlıkla kullanılabilecek yöntemler olduğu bildirilmiştir (Powell vd., 1996; Russel vd., 1997; Pejic vd., 1998). Ayrıca yüksek çözünürlükte agaroz kullanarak veya akrilamit jeli gümüş nitratla boyayarak SSR ve AFLP analizleri de radyoaktif madde kullanmadan uygulanabilmektedir (Doğan, 2006).

Russell ve arkadaşları (1997) RFLP, AFLP, SSR ve RAPD markörleri kullanarak 18 farklı arpa çeşidindeki genetik varyasyon seviyelerinin karşılaştırılmasını içeren çalışmalarında, kullanılan dört farklı markör tipinin yalnızca teknik yönden değil, elde edilen polimorfizm miktarı ve seviyesi bakımından da büyük farklılıklar gösterdiğini belirtmişlerdir. Talame ve arkadaşları (2000) makarnalık ve ekmeklik 17 ayrı buğday çeşidinde genetik çeşitliliği ortaya çıkartmak için AFLP, SSR ve RAPD teknikleri kullanmışlar ve her bir markör tipinin oluşturduğu dendogramların kısmi farklılıklar gösterdiklerini ortaya koymuşlardır. Her bir markör tipinin kısmen de olsa genomun farklı bölgelerini taraması, bu duruma sebep olarak gösterilmektedir.

Kültürü yapılan bitkiler içerisinde genetik uzaklık, çeşitler arasında ortalama genetik farklılığın belirlenmesini sağlamaktadır. Bir tür içerisindeki çeşitler arasındaki genetik ilişkinin belirlenmesi, yapılacak melezlemeler için uygun ana ve babanın seçiminde ve oluşacak döllerin performanslarını tahmin etmede yararlı olacağı belirlenmiştir (Frei vd., 1986). Bitki ıslahı programlarında ebeveynlerin benzerliği hakkındaki bilgi, genetik olarak uniform ya da çok benzer olan bireylerin melezlemede kullanılmasını önleyecek ve böylece uzun süreli seleksiyonlardan elde edilecek kazançlar tehlikeye atılmayacak, genetik kaynaklar muhafaza edilebilecektir (Sun vd., 2003).

Bu çalışmada, ülkemizde tescilli tritikale çeşitlerinin DNA markörleri ile genetik karakterizasyonu yapılmasına çalışılmıştır. Bu amaçla, tritikale ISSR-PCR Tekniği kullanılarak hatlar arasında genetik benzerlik ya da farklılıkların belirlenmesine çalışılmıştır. Tescilli tritikale çeşitlerinin genetik karakterizasyonunun yapılması bu çeşitlerin bitki ıslahı (yeni çeşitlerin geliştirilmesi) amacıyla daha etkin olarak kullanılmasında faydalı olacaktır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Vierling ve Nguyen (1993), *T. monococcum* ve *T. urartu* diploid buğday türlerinin genetik farklılığını PCR ve tesadüfi primerler kullanarak incelemişlerdir ve elde ettikleri sonuçlar *T. Monococcum* genotipleri arasında *T. urartu*'dan daha fazla bir benzerlik olduğunu tespit etmişlerdir. Verilerinin analizi, RAPD metodunun genotipler arasındaki genetik ilişkileri saptamada elverişli bir yöntem olduğunu ortaya çıkartmıştır.

Joshi ve Nguyen (1993), İsrail'den 6 lokasyondan, Türkiye ve Ürdün'den 3 lokasyondan toplanan *T. dicoccoides*'lerin 17 genotipini içeren çalışmalarında, bu türler içinde bulunan genetik varyasyonun sadece küçük bir kısmını temsil etmiştir. İsrail, Türkiye ve Ürdün'de yabani buğdayların farklı aksesyonları arasında tarımı yapılan durum buğdaylarından daha yüksek düzeyde polimorfizm elde edilmiştir. RAPD markörleri yabani ve tetraploid buğday çeşitleri arasındaki polimorfizmi tayin etmede kullanılabilmektedir.

Katety (1995), Amerika'da geliştirilen çerezlik patlamış mısır (*Zea mays* L.) hibritlerinde genetik çeşitliliğin belirlenmesinde RFLP ve genetik kaynakların karakterizasyonu ile ilgili daha önceki çalışmasında düşük polimorfizm belirlemiştir. PCR'a dayalı olan ve yeni geliştirilen bir moleküler markör tekniği olan ISSR kullanılarak 9 çeşit patlamış mısır ve 8 çeşit indent mısırlarında genetik çeşitliliği belirlemek için 10 ISSR primeri kullanılmıştır. 9 çeşit patlamış mısır çeşidinde 2'li ve 3'lü nükleotid dizin tekrarlarına dayanarak %73 ve %87 polimorfizm oranı belirlenmiş ve 8 indent çeşidinde ise bu oranı %98 olarak belirlemiştir. ISSR moleküler markör tekniğini kolay, ucuz ve kısa sürede yüksek polimorfizm veren bir teknik olarak tanımlamıştır.

DNA işaretleyicileri, kültür bitkilerinde genetik çeşitliliğin saptanmasında yaygın olarak kullanılabilmektedir. Yapılan araştırmalar sonucunda polimorfizm bakımından RAPD ve ISSR teknikleri, tekrarlanabilirlik bakımından RFLP, SSR, ISSR ve AFLP işaretleyicilerinin avantajlı oldukları tespit edilmiştir. Bunların yanı sıra çalışılacak laboratuvar olanakları göz önünde bulundurulduğunda, RAPD ve ISSR yöntemlerinin radyoaktif madde kullanımının olmadığı ve koşulların sınırlı olduğu laboratuvarlarda rahatlıkla kullanılabilecek yöntemler olduğu tespit edilmiştir (Powell ve ark., 1996; Fang ve ark., 1997; Nagaoka ve Ogihara, 1997; Moreno ve ark., 1998; Pejic ve ark., 1998; Nevo ve ark., 1998; Fatima ve ark., 1999; Martin ve ark., 2000; Blattner ve ark. 2001; Ferrnandez ve ark., 2002; Tanyolaç, 2003, Brantestam ve ark., 2004).

Bernard ve ark. (1997), RAPD moleküler işaretleyicisini kullanarak, Türkiye, İran ve İsrail'den temin ettikleri 20 yabani arpa (*Hordeum spontaneum*) popülasyonunun 88 genotipinde genetik çeşitliliği bulmak için yaptıkları araştırmada, kullanılan 33 RAPD primerinden 22 primerin iyi ürün verdiğini (1-11 polimorfik bant), 4 genotip dışındakilerin DNA parmak izlerinin aynı olmadığını, toplam genetik varyasyonun % 75'inin populasyon içinden, geri kalan %25'inin ise popülasyonlar arasında saptandığını belirtmişlerdir.

Hu ve ark. (1997), *T. aestivum* L. em Thell'de küfe dayanıklılığı sağlayan PM 1 genine bağlı RAPD markörlerini araştırmak amacıyla hastalığa duyarlı Clark ticari çeşidi ile dayanıklı Zhengzhau 871124'ün melezlenmesinden elde edilen genotipleri ve bunlardan elde edilen sonraki generasyonları materyal olarak seçmişlerdir. 10 mer'lik 1.300 primerini kullanılarak, PM 1 genin taşıyan farklı bir buğday hattında 2 RAPD markörünün (UBC 320420–UBC 638550) hastalığa dayanıklılıkta birlikte açılım gösterdiğini tespit etmişlerdir. 3 RAPD markörü OPF 12.650'de belirleyerek dayanıklılık geninden 5,.4±1,9 cM uzakta olduğunu belirlemişlerdir. Sonuçlarla RAPD markörlerinin buğday ıslahında seleksiyonu kolaylaştırabileceğini ve küfe dayanıklılıkta gen piramitleşmesine imkân verdiğini saptamışlardır.

Schut ve ark. (1997), AFLP DNA moleküler işaretleyicisini kullanarak 31 arpa genotipinde genotipler arası genetik benzerliği araştırdıkları çalışmalarında, AFLP analizinden elde edilen sonuçları farklı üç yöntem kullanarak genetik akrabalık değerlerini hesaplamışlardır. AFLP sonuçlarını pedigri ve morfolojik karakterlerle karşılaştırdıklarını, morfolojik ve pedigri özellikleri ile AFLP verilerine göre hesaplanan genetik benzerlik değerleri arasında korelasyon olduğunu tespit ettiklerini bildirmişlerdir.

Terzi (1997), bazı arpa, yulaf ve tritikale çeşitlerinin RAPD bantı oluşturma yeteneklerini saptamak amacıyla yürütülen araştırmada; arpada ve tritikalede 7, yulafta ise 6 primerin bu türler için türe özgü RAPD bantı oluşturabildiğini ayrıca RAPD tekniğinin çeşit tanımlamasında ve genotipler arası genetik ilişkileri incelemekte kullanılabileceğini tespit etmiştir.

Cao ve ark. (1998), RAPD moleküler işaretleyicisi ile, 69 *Triticum spelta* ve 32 *Triticum macha* primitif buğday türünde genetik çeşitliliği hesaplamak için yapmış oldukları araştırmada, 10 RAPD primeri kullandıklarını, elde edilen verileri genotiplerin birbirleriyle olan genetik benzerliklerini bulmak için Jaccard Genetik Benzerlik Katsayısı formülüne göre hesapladıklarını, *Triticum spelta* ve *Triticum macha* genotiplerinin coğrafi orjinleriyle uyum içinde olduklarını, *Triticum macha* buğday germplasmının

Triticum spelta buğdayından daha fazla genetik çeşitliliğe sahip olduğu, bazı genotiplerin duplike olduğunu, araştırma sonucu olarakta RAPD tekniğinin, buğday germplasm koleksiyonlarının genetik çeşitliliğini hesaplamada ve duplike örnekleri tanımlamada kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Sun ve ark. (1998), *T. aestivum*, *T. aestivum* ssp. *tibenatum* ve T.spelta türleri arasında ve içinde genetik benzerliği ve farklılığı saptamak amacıyla toplam 46 genotipte 32 RAPD primeri kullanarak çalışmalarda bulunmuşlardır. Kullanılan primerlerden 26'sı toplam 182 polimorfik bant oluşturmuştur. *T. spelta* ve *T. aestivum* ssp. *tibenatum* tür içinde *T.aestivum*'dan çok daha fazla polimorfizm göstermişlerdir. *T. aestivum* ve *T. aestivum* ssp. *tibenatum* arasında ise genetik farklılık fazla bulunmamıştır. Yapılan kümeleme analizi 46 genotipi iki grupta sınıflandırmış ve birinci grup T. spelta hatlarını kapsarken ikinci grup *T. aestivum* aksesyonlarını kapsamıştır. Bu sonuçlar RAPD markörlerinin buğday tür ve alttürleri arasında filogenetik çalışmalar için üstün bir markör olduğunu kanıtlamıştır.

Brunell ve ark. (1999), *Secale cerale* L.'de biyotik strese dayanıklı birkaç geni taşıyan 2R kromozomunun *T. aestivum* L.'in 2B kromozomuna translokasyonu çalışmasında homozigot buğday hatlarında 2RS.2BL ve 2BS.2RL merkezi translokasyonları için 489 RAPD primerini değerlendirmişler ve 69'undan tam sonuca ulaşmışlardır. 2RS kromozom kolu üzerinde 17, 2RL kolu üzerinde 15 ve 2B üzerinde de 33 markör elde etmişlerdir. Haritalama çalışmalarının bir başlangıcı olan bu araştırmanın buğday-çavdar kromozomlarında translokasyon kıvrım noktalarının lokalizasyonu için yararlı olacağına karar vermişlerdir.

Cao ve ark. (1999), gen bankalarında yanlış sınıflandırılmış materyalin teşhisinin pratik olarak yapılabilmesinde RAPD moleküler işaretleyicisinin kullanılıp kullanılamayacağını araştırdıkları çalışmalarında, sınıflandırması morfolojik verilere göre yapılan ve yanlış yapıldığından şüphelenilen 12 *T. macha* veya *T. spelta* genotipi ile kontrol olarak birer adet *T. dicoccoides*, *T. monococcum* ve *T. timopheevii*'yi RAPD moleküler işaretleyici kullanarak analiz yapmışlardır. Elde edilen sonuçlara göre kümeleme analizinde 5 genotipin *T. dicoccoides* grubunda, 1 genotipin *T. timopheevii* grubunda ve 6 genotipinde *T. monococum* grubunda olduğunu, bu sonuçların sitolojik araştırmalar ile de desteklendiğini, bu çalışma esnasında 1 RAPD işaretleyicisinin D genomuna spesifik olarak bulunduğunu ve RAPD moleküler işaretleyicilerinin *Triticum*'un alt türlerini birbirlerinden ayırt etmede rahatlıkla kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Fahima ve ark. (1999), İsrail ve Türkiye'den toplanan 11 *T. dicoccoides* populasyonundan progenitör olarak kullanılan 110 yabani tetraploid buğday genotipinde RAPD polimorfizmini araştırmışlardır. Kullandıkları 100'ün üzerinde primerlerden 10'unda polimorfik bantlar elde etmişlerdir. Değerlendirilen 59 bantın 48'i polimorfik 11'inin ise monomorfik olduğunu tespit etmişlerdir. RAPD genotiplemesine dayalı diskiriminant analizleriyle genotiplerin %95,5'ini orijin bölgesi içinde gruplandırmışlardır. Populasyonlar içindeki genetik uzaklığın populasyon orjin bölgeleri arasındaki coğrafik uzaklık ile hiçbir ilişkisinin olmadığını belirtmişlerdir. Elde edilen sonuçlar RAPD markörlerinin *T. dicoccoides*'de genetik farklılığın ölçülmesinde ve populasyon haritalarının geliştirilmesinde uygun ebeveynlerin saptanması için yararlı olduğunu göstermiştir.

Strelchenko ve ark. (1999), RAPD moleküler işaretleyicisi ile Vavilov gen bankasından morfolojik olarak farklılık gösteren 303 arpa köy çeşidinde genetik çeşitliliği saptamak için yaptıkları araştırmada, toplam 93 polimorfik bant tespit ettiklerini, bu sonuçlara göre yapılan kümeleme analizinde 3 farklı grubun oluştuğunu ve buna dayanarak arpanın evriminin yeniden gözden geçirilmesi gerektiğini ifade etmişlerdir.

Santra ve ark. (2000), nohut bitkisi ile yaptıkları çalışmada *C. arietinum* (FLIP84-92C, resistant parent) ve *C. reticulatum* Lad. (PI 599072 susceptible parent) 800 RAPD ve 100 ISSR primeri kullanmışlardır. Sonuç olarak 116 adet markör içeren 981.6 cM'lık 9 bağlantı grubundan oluşan bir harita elde etmişlerdir. Markörler arası ortalama uzaklık 8.4 cM olduğu tespit edilmiştir.

Selbach ve Molina (2000), malt kalitesi bakımından seçilmiş 13 Brezilya arpa çeşidi arasındaki genetik çeşitliliği RAPD yöntemi ile araştırdıkları çalışmada; 18 RAPD primerinden 221 üretilebilir bant elde edildiğini, elde edilen bantların % 93'ünün polimorfik olduğunu, bunların % 62'sinde çeşitler arası farklılıkların tespit edilebildiğini, genetik benzerlik katsayısının 0,28 ila 0,94 arasında değiştiğini belirterek Brezilya çeşitleri arasında genetik çeşitliliğin var olduğunu tespit etmişlerdir.

Goulao ve ark. (2001), daha önce RAPD ve AFLP markörleri kullanılarak tanımlanan 41 ticari elma çeşidini SSR ve ISSR teknikleri ile yeniden genetik açıdan tanımlamışlardır. Çalışmada, 13 SSR primer çifti kullanılmış ve toplamda 84 polimorfik allel elde etmişlerdir. ISSR analizinde ise 7 primerden toplamda 252 bant elde edilmiştir. Bu bantların %89,1'inin (176 adet) polimorfik olduğu tespit edilmiştir. Tüm çeşitlerin her iki yöntem ile kolay bir şekilde ayırt edilebildiği belirlenmiştir. Çeşitler arasındaki

benzerlik katsayısının SSR analizlerinde 0.20 ile 0.89 arasında ve ISSR metodunda da 0,71 ila 0,92 arasında olduğunu tespit edilmiştir.

Liu ve Wendel (2001), ISSR polimorfizminin pamuk bitkisine uygulanabilirliğini tespit etmek amacıyla yaptıkları çalışmada, ISSR analiz tekniğinin kalıtım düzeyinin yüksek olduğunu belirlemişlerdir. ISSR DNA analiz tekniğinin pamukta tür içi ve türler arası varyasyonu saptamada kullanılabileceği sonucuna varmışlardır.

Terzi ve ark. (2001), farklı genomlara sahip 15 *Hordeum* tür ve alt türü üzerinde PCR'a dayalı DNA moleküler işaretleyicileri ile tür içindeki filogenetik ilişkileri saptamayı amaçladıkları çalışmada; RAPD DNA işaretleyicisini, genetik uzaklık ve filogenetik ağaçları oluşturmada kullandıklarını, analiz sonuçlarına göre *H. vulgare* ssp. *vulgare*, ve *H. vulgare* ssp. *spontaneum* grubunun birincil gen havuzunu içinde, *H. bulbosum* grubunun ikincil gen havuzunda, Amerikan yabani arpalarını ve *H. bogdanii*'nin temsil ettiği üçüncül gen havuzunun birbirlerinden kolaylıkla ayrıldığını belirlemişlerdir.

Arnau ve ark. (2002), ISSR moleküler markör tekniğini kullanılarak ikili, üçlü ya da dörtlü tekrarlar içeren, 3' ya da 5' ucunda seçici nükleotid bulunan 18 adet primer ile çilek çeşitlerinde çalışmalar yapmışlardır. PCR reaksiyonu ve poliakrilamid jel elektroforezi sonrasında seçilen 5 primeri, genetik ve coğrafik orijinleri farklı olan 30 adet çilek çeşidinin karakterizasyonunda kullanmışlardır. Sonuç olarak 5 primerin kullanılması ile 390 bant elde edilmiştir. Bu bantların 113'ünün polimorfik olduğu tespit edilmiştir.

Chowdhury ve ark. (2002), 19 nohut çeşidinde genetik ilişkileri incelemek amacıyla 22 RAPD ve 22 ISSR markörü kullanmışlardır ve 6 genotipi, türe özel markörler ile belirlemişlerdir. ISSR primerlerinin RAPD primerlerine göre daha az markör oluşturduğunu ve buna karşılık ISSR primerlerinin RAPD primerlerine göre daha yüksek polimorfizm oluşturduğunu tespit etmişlerdir.

Dakir ve ark. (2002), iki çeşit genetik markör (tohum depo proteinleri ve RAPD) kullanarak Fas'tan toplanmış bazı arpa genotiplerinde genetik çeşitliliği değerlendirmek amacıyla yaptıkları çalışmada; 31 yerel arpa popülasyonundan 6'sının RAPD tekniği ile incelenerek, 21 RAPD primerinden 100 polimorfik RAPD bandı elde edildiğini, RAPD'in depo proteinlerine göre genetik çeşitliliği saptamada daha etkili bir yöntem olduğunu bildirerek Fas köy arpa popülasyonlarında çeşitliliğin fazla olduğunu belirtmişlerdir.

Fernandez ve ark. (2002), RAPD ve ISSR DNA işaretleyicileri ile farklı ülkelerden gelen 16 arpa çeşidinin filogenetik akrabalık ilişkilerini inceledikleri çalışmada, 10 RAPD ve 10 ISSR primeri kullandıklarını, 125'i RAPD ve 228'i ISSR olmak üzere toplam 353 bant elde ettiklerini, RAPD primerlerinden birinin (S10) ve ISSR primerlerinden dördünün (811, 820, 835, 881) tüm çeşitleri ayırabildiğini, iki moleküler markörün kullanılmasıyla elde edilen dendogramlarda, arpa çeşitlerinin ve yazlık / kışlık ve altı sıralı / iki sıralı olarak ayrılabildiğini bildirerek, RAPD ve ISSR markörlerinin parmak izi çıkarmada çabuk, güvenilir ve bilgilendirici DNA işaretleyicisi olduğunu tespit etmişlerdir.

Gonzalez ve ark. (2002), PCR teknolojisine dayanan markerlar (RAPD, RAMP, AFLP ve SSR) ile birlikte tritikalenin genetik haritasını geliştirmişlerdir. Bitki materyali olarak iki hekzaploid tritikale çeşidi 'Torote' ve 'Presto' ve iki çeşidin F1 hibritlerinden anterlerinin in vitro kültürü sonucunda elde edilen 73 double haploid hattı kullanmışlardır. Analiz edilen 436 markörden 385'ini (%88,3) harita üzerinde tespit etmişlerdir. Markörlerin dağılımı üç genom arasında homojen olmamıştır. En az örtülü olan A genomu %47,1 oranında R genomunda tespit etmişlerdir. Tam harita 2647,3 cM toplam uzunluğa ulaşmıştır. Mrkörler arasındaki ortalama mesafe 6,9 cM olduğunu belirtmişlerdir.

Hazen ve ark., (2002) bazı buğday aksesyonları ile genellikle genetik haritalama populasyonu olarak kullanılan Opata 85 x W7984 melezinden elde edilen 69 rekombinant kendilenmiş hatta AFLP markörleri ile çalışmalar yapmışlardır. Elde ettikleri bantların çoğunluğu (%76,8) T. Aestivum aksesyonları arasında monomorfik olarak gözlenmiştir. Kullandıkları 10 primer kombinasyonundan elde ettikleri 153 polimorfik bantın 140'nın kromozom lokasyonunu belirlemişlerdir. Ayrıca *T. aestivum* germplazmı olarak 37 çeşit ve 10 farklı ülkeden topladıkları yerel buğday türlerinde de AFLP ile genetik farklılığı inceleyen araştırıcılar rekombinant kendilenmiş hatlarda haritasını çıkardıkları bantların diğer germplazm, aksesyon ve türlerde daha çok polimorfik olabileceklerini tespit etmişlerdir.

Korbin ve ark. (2002), RAPD ve ISSR moleküler markör tekniklerini kullanarak çalışma yaptıkları doku kültürü muhafaza ve yetiştirme programında korunan çilek, elma ve kuş üzümü genotipleri arasındaki genetik mesafeyi belirlemek için çalışmalar yapmışlardır. Polimorfik DNA bantları arasındaki farklılıklara göre 60 RAPD primer arasından seçilen 20 primer, 10 ISSR primer arasından seçilen 7 primerin analizi

sonucunda bu primerlerin benzerlikleri temel alınarak genotipler arasındaki genetik uzaklık ve aralarındaki genetik ilişki tespit edilmiştir.

Potter ve ark. (2002), ISSR moleküler markör yöntemini kullanarak Kaliforniya'da Wolfskill araştırma bahçesinde yer alan 48 ceviz (J. regia) çeşidi arasındaki genetik ilişkileri incelemişlerdir. Araştırmada kullanılan 8 adet polimorfik ISSR primeri, toplam 47 primerin dört çeşitte taranması sonucu belirlenmiştir. Seçilen bu 8 primerin 48 ceviz çeşidinde analizi sonucunda 31 tanesinin (%57) polimorfik ve toplam 54 bant elde edildiği tespit edilmiştir. Sonuçlara göre primer başına düşen bant sayısı 5 ila 9 arasında değişirken, polimorfik bant sayısının ise 1 ila 7 arasında değiştiği belirlenmiştir. ISSR yöntemi ile ceviz çeşit ve genotiplerinin tanımlanmasında ve aralarındaki genetik ilişkilerin belirlenmesinde kullanılabileceği ve RAPD yöntemi ile benzer maliyete ancak daha fazla polimorfizme sahip olabileceği sonucuna varılmıştır.

Reddy ve ark. (2002), ISSR moleküler markör tekniğinin, çok lokuslu markörleri oluşturmak için; PCR'da primer olarak mikrosatellit sekanslarını kullanan basit, hızlı ve genetik çeşitlilik, filogenetik, gen işaretleme, gen haritalaması ve evrim çalışmalarında kullanılışlı bir teknik ve kullanılan ISSR markörlerini de oldukça polimorfik olduğunu belirtmişlerdir.

Röder, ve ark. (2002), Avrupa buğday çeşitlerinin mikrosatellit temelli veritabanı analizleri ve yapılandırılması için yaptıkları çalışmada, 19 mikrosatellit ve 1 sekans spesifik marker kullanılmıştır. Özellikle kışlık tipler olmak üzere 502 Avrupa buğday çeşidinin yer aldığı bir veritabanı oluşturmuşlardır. Fragment analizleri için en az iki ayrı laboratuvarda farklı teknikler kullanılarak veri noktaları geliştirilmiştir. %99,5 doğruluk seviyesinde başarı elde edilmiş ve dublikasyonlar haricinde tüm çeşitler arasında 199 allel belirlenerek tanımlanan ebeveynlerden çeşitler türetilmiştir. Güneydoğu Avrupa'da heterojenitenin üst seviyelerde olması nedeniyle çeşitlerin yaklaşık olarak %25'inde bazı heterojenik unsurlar gözlenmiş ve yüksek seviyede genetik farklılık ile çok sayıda farklı allel tespit edilmiştir. Sonuç olarak farklı coğrafik bölgelerde birçok mikrosatellit için relativ allel frekansı çeşitlendirilmiştir

Tekeoğlu ve ark. (2002), nohut bitkisi ile yaptıkları çalışmada 146 adet RIL (*C. arietinum* X *Cicer reticulatum*) bireyinde 1 adet morfolojik, 9 adet izoenzim, 17 adet ISSR ve 90 RAPD markörü kullanarak 981.6 cM büyüklüğünde, markörler arası uzaklık 8.4 cM olan bağlantı haritasını elde etmişlerdir. Elde edilen bağlantı grup sayısı 9 olmuştur.

Galvan ve ark. (2003), ISSR moleküler markör tekniğini kullanarak Arjantin orijinli on adet ve Fransa orijinli üç adet fasulye genotipinde genetik çeşitliliği araştırmışlardır. Çalışmada, 23 ISSR primeri kullanılarak primerlerin 9 adedinin polimorfik ve bu primerlerden 75 adet polimorfik bant elde edildiğini, oluşan bantların büyüklüğünün ise 300-2400 bp arasında değiştiğini bildirmişlerdir. Ayrıca elde ettikleri sonuçlara göre, trinükleotid motif primerleri ile oluşturulan ISSR markörlerinin %53'ünün polimorfik olmasına karşılık, dinükleotid primerleri ile oluşturulan ISSR markörlerinin ise %38'inin polimorfizm gösterdiğini tespit edilmiştir.

Pollegioni ve ark. (2003), İtalyan ceviz gen kaynağını geliştirmek ve korumak için dört İtalyan çeşidinin moleküler karakterizasyonunda ISSR markörlerini kullanmışlardır. Kullanılan 9 ISSR primerinden 115 bant elde etmişlerdir.

Tanyolaç (2003), ISSR ve RAPD markörlerini kullanarak, Türkiye'nin batısından elde edilen 15 yabani arpa (*Hordeum spontaneum*) popülasyonu arasındaki genetik uzaklığı hesaplamak amacıyla; 55 RAPD ve 10 ISSR olmak üzere toplam 65 primer kullanarak toplam 55 polimorfik bant elde etmiştir. Populasyonlar arasında 2 farklı kümelenmiş grup saptanmış, minimum genetik varyasyonun 'Pınarbaşı' ve 'Bornova' populasyonları arasında (Ga=0,192), maksimum genetik varyasyonun ise 'İçmeler' ve 'Aydın' populasyonları (Ga=0,926) arasında bulunduğunu belirtmiş ve ayrıca 2 dominant markör olan RAPD ve ISSR'ın genetik varyasyonu saptamada kullanılabilir DNA moleküler markörler olduğunu belirlemişlerdir.

Dangi ve ark. (2004), farklı orijinli 17 *Trigonella foenum-graecum* ve 9 *T. coerulea* populasyonunda ISSR ve RAPD moleküler markörlerini kullanarak yaptıkları çalışmada, her iki türün değişik coğrafik bölgelerden toplanan farklı populasyonlarının farklı grupları oluşturduğunu tespit etmişlerdir. Ek olarak, Pakistan ve Afganistan orijinli olan *T. foenum-graecum* populasyonların aynı grup içinde yer aldığını, Hindistan ve Nepal orijinlilerin ise diğer bir grupta yer aldığını, Türkiye orijinli populasyonların ise farklı gruplara dağıldığını tespit etmişlerdir.

Galaev ve ark. (2004), buğday hastalığına neden olan *Aegilops cylindrica* ile çarpı işareti bulunan donör genomu mantar hastalıkları, introgressive ve ebeveyn durumlarını karşılaştırmak için PCR analizine dayalı ISSR ve SSR moleküler markör tekniklerini kullanmışlardır. 7 adet ISSR primerinin 30 adet buğday çeşidinde uygulanması sonucunda BC1F9 elde edilmiştir. SSR markör tekniğinde ise 40 primer çifti kullanılarak 7 allel introgressive, 3 allel B genomu ve 4 allel ise D genomu içinde ortak buğday kromozomları belirlenmiştir. Microsatellit analiz verileri esas alınarak, yaygın buğday

kromozomunun telomerik bölge olan 6A bölgesinin değiştiği tespit edilmiştir. Bu çalışma ile; ISSR ve SSR yöntemleri ile buğdayda yabancı genetik materyalin introgression ve genomu tespit etmek için etkili olduğu sonucuna varılmıştır.

Hamza ve ark. (2004), 17 SSR primeri kullanarak Tunus'ta yetiştirilen 26 arpa çeşit ve hattında genetik çeşitliliği araştırdıkları çalışmada, 17 SSR primerinden 15'nin polimorfik olduğunu, ortalama primer başına 3,6 polimorfik bant düştüğünü, ortalama polimorfizm bilgi indeksinin 0,45 olduğunu, morfolojik ve SSR verilerine göre yapılan kümeleme analizi sonucunda arpa çeşit ve hatlarının kolaylıkla köy çeşidi, tescilli çeşit veya kullanım alanına göre yemlik veya biralık arpa olarak ayrılabildiğini, genetik çeşitliliği saptamakta kullanılan metotların birbirleriyle ilişki içinde olduğunu, SSR ve morfolojik verilere göre ayrı ayrı oluşturulan kümeleme gruplarının birbirleriyle nispeten uyumlu olduğunu ve Tunus arpa çeşitlerindeki geniş genetik çeşitliliğin bulunduğunu tespit etmişlerdir.

Kuras ve ark. (2004), Polonya'da ıslah programından alınan 24 çilek çeşidinde RAPD ve ISSR moleküler markör tekniklerini kullanarak çeşitler arasındaki akrabalıkları incelemişlerdir. ISSR yönteminde 90 adet primerden 41'i polimorfik ve 48 adet RAPD primerinden de 23'ünün polimorfik olduğunu belirlemişlerdir. Çalışmada, UPGMA analizleri ile akrabalıkları belirlemişler ve dendogram çizmişlerdir. ISSR analiz sonuçlarında RAPD analizine göre daha fazla genetik benzerlik elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Maric ve ark. (2004), 14 Hırvatistan ekmeklik buğday hattında RAPD moleküler işaretleyicisi, morfolojik özellikler ve pedigri kayıtlarını kullanarak, iki farklı buğday ıslah merkezinde geliştirilen çeşitlerin arasındaki genetik farklılığın ortaya çıkarılması için yaptıkları çalışmada, 36 RAPD primerinin üzerinde çalışıldığını ve bunlardan polimorfik olan 14 tanesinin toplam 341 polimorfik bant verdiğini, morfolojik analiz için 12 özelliğin kullanıldığını, pedigri verisi olarak geriye dönük ebeveynlerin karşılaştırıldığını, RAPD moleküler işaretleyicisinin ekmeklik buğday çeşit ve hatları arasında yüksek polimorfizm gösterdiğini ve test edilen metotlar arasında istatistiki olarak önemli bir farkın olmadığını belirtmişlerdir.

Roy ve ark. (2004), 55 elit ekmeklik buğday genotipinde AFLP verileri ile 14 morfolojik özelliği kullanarak genetik çeşitliliği hesapladıkları araştırmada, 615 AFLP bantından 287' (% 46,6) sinin polimorfik olduğunu, incelenen 14 morfolojik özelliğin verim ve verim unsurları ile bazı fizyo-morfolojik özellikleri de içerdiğini, AFLP sonuçları ile morfolojik verilere göre kümeleme analizlerini yaptıklarını bildirerek

moleküler DNA işaretleyicilerin fenotipik özelliklere kıyasla genetik çeşitliliği saptamada daha üstün olduğunu belirlemişlerdir.

Saini ve ark. (2004), 18 pirinç çeşidinde genetik çeşitliliği belirlemek için kullanılan AFLP, SSR ve ISSR moleküler markörler ile yüksek düzeyde polimorfizm oranı oluştuğu için 18 pirinç çeşidinin ayırt edildiğini bildirmişlerdir. Çalışmada analiz edilen çeşitleri birbirinden ayırt etmek için bir adet AFLP primeri, iki adet ISSR primeri ve beş adet SSR primer çiftinin kullanılması gerektiğini tespit etmişlerdir. AFLP markör tekniğinde 5 primer kombinasyonunu kullanarak 110'u polimorfik olan 171 bant elde etmişlerdir. ISSR markör tekniğinde ise 25 adet UBC primerinin amplifikasyonu ile 188'i polimorfik olmak üzere 240 bant belirlemişlerdir. Ek olarak, SSR markör tekniğinde ise 30 adet primerden toplam 160 bant elde etmişler ve bunların 159'unu polimorfik olduğunu tespit etmişlerdir. Sonuç olarak SSR, AFLP ve ISSR markörlerinin farklı pirinç çeşitlerini ticari düzeyde ayırt etmek için kullanılabilir oldukları sonucuna varmışlardır. Ayrıca genetik analiz için, bu üç moleküler markör tekniğinin son derece önemli olduğunu ve bunların tüm genetik çeşitliliği belirlemede güvenilir veriler elde etmek amacıyla uygun teknikler olduklarını tespit etmişlerdir.

Bhutta ve ark., (2005) *Triticum aestivum* L.'in 10 farklı çeşidinde, RAPD analiziyle, genetik farklılıkları araştırmışlardır. Çalışmada toplam 25 tane 10 baz'lık primer ile çalışılmıştır. Her primer ortalama 7,6 bant oluşturmuştur. Bantların %44,64'ünün polimorfik olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmanın sonucunda RAPD markörlerinin buğdayların genetik tanımlamasında yeterli olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

Bolibok ve ark. (2005), SSR, ISSR ve SAMPL yöntemlerini kullanılarak yaptıkları çalışmada, üç DNA markör sisteminin polimorfizm bulmadaki etki derecesini, 30 IL çavdar popülasyonunda yapılan çalışmalarla karşılaştırmışlardır. Bu markör sistemlerinden elde edilen verileri farklı istatistiksel metotlar ve katsayılar kullanarak incelemişlerdir. ISSR moleküler markörü için 55 ISSR primerini test etmişler, temiz ve polimorfik bant veren 14 primeri genetik çeşitlilik çalışmaları için kullanmışlar ve toplam 65 allel belirlemişlerdir. SSR analizi için, 19'u genomik kütüphanelerden, 19'u EST'den olmak üzere 38 primer seçmişlerdir. Bunlardan 55'i EST'den, 46'sı genomik SSR'dan olmak üzere toplam 101 allel belirlemişlerdir. SAMPL analizi için ise 37 SAMPL primeri (5' ve 3' ucunda mikrosatellit bölge içeren) ve 6 MseI+3 primeriyle oluşturdukları 222 kombinasyonu taramışlar ve içerisinden seçtikleri 16 primer kombinasyonunu genetik çeşitlilik çalışması için kullanmışlardır. Toplam 319 SAMPL bantı elde etmişlerdir. Sonuç olarak; ISSR, EST SSR, genomik SSR, SSR ve SAMPL için primer başına düşen

allel sayılarını sırasıyla, 4,64, 2,89, 2,42, 2,66 ve 19,94 olarak ve ISSR yönteminde genetik benzerlik ortalamasını 0.28 ve SAMPL yönteminde 0,53 olarak belirlemişlerdir. Aynı özellik için çalışmada kullanılan bütün markör sistemlerinden elde edilen verilerin ortalamasını ise 0,49 olarak tespit etmişlerdir. Polimorfizm bilgi içeriği değerlerini ISSR yöntemi için 0,88, SAMPL yöntemi için 0,40, SSR (EST) için 0,41, SSR (genomik) için 0,35 ve tüm SSR için 0,38 olarak belirlemişlerdir.

Budak ve ark. (2005), ISSR, SSR, SRAP ve RAPD moleküler markör sistemlerini kullanarak boğa otu (*Buchloe dactyloides*) bitkisinin nükleer ve organel genomlarında, çeşitli bölgelerdeki boğa otlarının akrabalıklarını ve ploidi seviyelerini tespit etmişlerdir. Bu çalışmada 20 boğa otu içerisinde diploid, tetraploid, pentaploid ve hekzaploid fertleri ISSR, SSR, SRAP, RAPD moleküler markör sistemleri ile incelenmiştir. ISSR kullanarak 30 ila 38, SSR kullanarak 28 ila 35, SRAP kullanarak 31 ila 37 arasında allel belirlenmiştir. Sonuç olarak, SRAP yönteminin SSR ve ISSR yöntemleri ile benzer sonuçlar verdiği fakat RAPD yöntemiyle yapılan çalışmada ploidi seviyeleri ile allel sayıları arasında herhangi bir ilişki bulunamamıştır. Bu nedenle, poliploid genotiplerin kullanıldığı çalışmalarda RAPD yönteminin kullanışlı olmadığı sonucuna varılmıştır.

Yalım (2005), Türkiye orjinli 28 arpa çeşidi içerisindeki genetik farklılıkları tespit etmek için bu çalışmayı yürütmüştür. Genetik farklılıkları tespit etmek için fizyo-morfolojik bazı karakterler ile ISSR tekniği kullanılmıştır. İnceleme sonucunda hem iki sıralı hem de altı sıralı arpa çeşitleri içerisinde çeşit bazında farklılıklar belirlenememiştir. Arpa çeşitlerinde DNA seviyesinde genetik çeşitliliği saptamak için 64 ISSR primeri ilk olarak 7 adet arpa çeşidinde denenmiş ve 64 ISSR primerinden 57 tanesinin PCR ürünü ürettiği belirlenmiştir. Polimorfizim oranına göre ISSR primerleri arasından 10 tanesi seçilmiştir. 28 arpa çeşidinde kullanılan 10 ISSR primeri toplam 75 adet bant üretmiş olup bunun 51'inin polimorfik olduğu tespit edilmiştir. Genetik uzaklık katsayısı 0,05 ve 0,37 sınırları arasında değişim göstermiştir. Efes-2 ile Yesevi-93 çeşitlerinin genetik olarak birbirlerine en yakın, Karatay-94 ile Aday-4 çeşitlerinin ise genetik olarak birbirine en uzak çeşit olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada, arpa çeşitleri arasındaki benzerlik ve farklılıkları saptamada fizyo-morfolojik benzerliklerin kullanılabilirliğinin yetersiz, "ISSR Markör Tekniği" ise yeterli olduğu sonucuna varılmıştır.

Yong-Cui Hou ve ark. (2005), Batı Çin kökenli 46 arpa çeşidinde genetik farklılıkları belirlemek amacıyla RAPD ve ISSR moleküler markör teknikleri kullanılmış ve yapılan analiz sonucunda her iki markörün de yüksek düzeyde polimorfizm gösterdiği, ortalama polimorfizm değerinin, RAPD için 0.574, ISSR için 0.631 olarak saptandığı,

RAPD moleküler markör bantlarının %77'sinin polimorfik olduğu, RAPD genetik benzerliğin 0.864 ortalamayla, 0,753 - 0,980 aralığında değer aldığı, ISSR marköründe ise genetik benzerliğinin, 0,674 ortalamayla, 0,212 - 0,931 aralığında değiştiği sonucuna varılarak arpa çeşitlerinin moleküler düzeyde tanımlanmasında RAPD ve ISSR DNA markörlerinin kullanılabileceği bildirilmiştir.

Guo ve ark. (2006), *Codonopsis lanceolata* (Çan çiçeği) bitkisinin olgunlaşmamış çok sayıda tohumunu kullanarak organogenesis yoluyla yeniden bitki elde etmişlerdir. Fiziksel varyasyonları belirlemek için yeni üretilen 2000'den fazla bireyin, anne ile morfolojik karşılaştırmalarını yapmışlardır. RAPD ve ISSR moleküler markör tekniklerini, 63 bireyde genetik stabilite ve genetik varyasyonu belirlemek için kullanmışlardır. Çalışmada, ISSR ve RAPD markör tekniklerinde polimorfik bantların oranını (PBO) sırasıyla 15,7 ve 24,9 olarak saptamışlardır. Küme analizi sonuçlarına göre genetik benzerliği, 64 bitki arasında RAPD ve ISSR tekniklerinde veriler temelinde yeniden sırasıyla 0,894 ve 0,933 olarak belirlemişler ve bitkilerin kümelere ayrıldığını belirtmişlerdir. Çalışmada RAPD veya ISSR markörlerden elde edilen 19 banttan sadece 3 tanesinin işlevi bilinen genlerin önemli homologu olduğu saptanmıştır. Kısa bir süre içinde elde edilen Lanceolata bitkileri arasındaki genomik varyasyonu ISSR ve RAPD analizi ile tespit etmişlerdir. Çalışmalardan elde edilen verileri doğrulama amaçlı olarak yeniden bitkiler üretilerek çalışmalar tekrarlanmıştır. Araştırmacılar, ISSR moleküler markör tekniğinin RAPD tekniğinden ve bu tekniğin de morfolojik markörlerden daha güvenli olduğu sonucuna varmışlardır.

Kafkas ve ark. (2006), RAPD, ISSR ve AFLP moleküler markörlerini kullanarak Türkiye'nin gen kaynaklarında bulunan 69 Antep fıstığı çeşidini tanımlamışlar ve bunlar arasındaki genetik ilişkileri belirlemişlerdir. Yapılan analiz sonuçlarına göre 307 tanesi polimorfizm olmak üzere toplam 572 markör elde edildiğini bildirmişlerdir. Antep fıstığı genotip çeşitleri 2 grupta toplanmıştır. İncelenen üç moleküler markör sisteminde polimorfizm karşılaştırılmış ve yapılan analiz sonuçlarına göre en iyi yöntemin AFLP olduğunu belirlemişlerdir. RAPD ile ISSR arasında polimorfizm ve bant sayısı yönünden farklılık olmamasına rağmen tekrarlanabilirlik açısından ISSR yönteminin daha üstün olduğunu tespit etmişlerdir.

Özbek (2006), AFLP ve RFLP tekniklerinin kullanıldığı çalışma ile gelişmiş durum ve ekmeklik buğdayın yabani atası olan emmer buğdayını, *Triticum turgidum* ssp *dicoccoides* (2n=4x=28; genom BBAA) popülasyonlarında genetik çeşitliliği yere ve zamana göre araştırmıştır. AFLP analizinde önce İsrail'de Ammiad bölgesinde, toplanan

yabani emmer buğday popülasyonlarında zamana göre genetik çeşitlilik 14 primer birleşimi kullanılarak AFLP yöntemi ile incelemiştir. Üretilen 1545 AFLP lokusunun 1088'inin (%70,4) 1988'de 1061'inin (%68,9) 2002'de polimorfik olduğu tespit etmiştir. Daha sonra Diyarbakır yöresinden yedi farklı yükseklikten toplanan yabani emmer popülasyonları arasındaki genetik çeşitlilik yedi primer birleşimi ile AFLP yöntemi ile karşılaştırılmıştır. Toplam 788 AFLP lokusu tespit edilmiş, bunun 629'u (%79,82) polimorfik olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Son olarak İsrail'de 18 farklı lokasyondan toplanan yabani emmer popülasyonlarında genetik çeşitlilik 5 restriksiyon enzimi ve 11 RFLP prob birleşimi kullanılarak RFLP'ye dayalı Southern blot yöntemi ile analiz edilmiştir. AFLP ve RFLP sonuçlarına göre UPGMA (Aritmetik Ortalamayı Kullanan Ağırlıksız Çift Grup Metodu) yöntemi ile oluşturulan dendogramlar popülasyonları habitatlara ve ülkelere göre 3 ila 5 arasında değişen gruplara ayırmıştır. Bu çalışmanın sonuçlarına göre zamana bağlı genetik çeşitlilik yere göre olandan önemsiz miktarda az ve habitatlar içindeki genetik çeşitlilik ile doğru orantılı olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

Pollegioni ve ark. (2006), Juglans regia ve Juglans nigra türlerinde ISSR, SSR ve RAPD moleküler markör tekniklerini kullanmışlardır. Çalışmayı 13 ISSR primeri, 17 RAPD primeri ve J. nigra için geliştirilen 10 SSR primer çifti kullanmışlardır. RAPD tekniğinden toplam 188, ISSR tekniğinden ise toplam 162 bant elde ettiklerini bildirmişlerdir. SSR tekniğinden ise 113 allel elde etmişlerdir. Çalışma ile hem dominant hem kodominant markörlerin ceviz türlerinin tanımlanması için uygun olduğu sonucuna varmışlardır.

Özatay (2007), Lens culinaris Medic. (mercimek) bitkisinin genomuna ait bağlantı genom haritası AFLP, RAPD, ISSR ve morfolojik markörler kullanılarak çıkarılmıştır. Çalışmada WA8649041 ve Precoz ebeveynlerin çaprazlanmasıyla elde edilmiş 93 adet rekombinant hat (Rekombinant Inbred Lines, RILs) kullanılmıştır. 178 adet AFLP markörü belirlenmiştir. 178 AFLP, 192 RAPD, 18 ISSR ve 3 morfolojik marker olmak üzere toplam 391 adet DNA marköründen 166 adeti ile bağlantı genom haritası elde edilmiştir. Sonuçta, toplam 11 tane bağlantı (linkage) grubu oluşturulmuştur. Elde edilen haritanın toplam büyüklüğü 2091,5 cM olarak belirlenmiştir.

Debnath ve ark. (2008), ISSR moleküler markör tekniğini kullanılarak 27 adet çilek çeşidi arasındaki genetik ilişkiyi belirlemek için 17 adet primer çifti ile çalışmışlardır. 17 primerden 225 adet polimorfik bant elde edilmiştir. UPGMA küme analizlerine göre genetik benzerliğin çeşitler arasında %63-77 oranında değiştiğini belirlemişlerdir.

Vaillancourt ve ark. (2008), bu çalışmada buğdayı çavdar genomundan ayıran ISSR ve SCAR belirteçlerini geliştirmek ve karakterize etmeyi amaçlamışlardır. Buğday, çavdar ve farklı tritikalelere ait toplam DNA'ları, PCR analizleriyle ISSR primerleri ile taramışlardır. Üç buğday tanımlayıcı dizisi tanımlamışlardır. Ek olarak teşhis edilecek olan üç çavdar türünden biri olan *Secale strictum* için özel olarak ISSR markörleri üretilmiştir. Bu spesifik sekansları çevreleyen primerler çiftleri SCAR markörleri üretmek üzere tasarlanmışlardır. İki SCAR markerının, çavdar genomuna spesifik olduğunu tespit etmişlerdir. Yedi çavdar kromozomunun tamamında bir SCAR markerının mevcut olduğunu ve bir diğeri çavdarın iki, üç, dört ve yedi kromozomlarına spesifik olduğunu bulmuşlardır. Bu yeni geliştirilen ISSR ve SCAR primerlerinin, buğday ıslahçıları için, çavdar kromatini içerebilen genotipleri taramak için yararlı olacağını savunmuşlardır.

Carvalho ve ark. (2009), ISSR yöntemini Eski Portekiz'den toplanan buğdayların genetik çeşitlilik analizlerinde kullanmışlardır. 18 ISSR primerini kullanarak, ekmeklik ve durum buğdayı kültürlerinde sırasıyla %96,3 ve %98,5 oranında ISSR polimorfizmi üretildiğini belirtmişlerdir.

Chengxiang ve ark. (2009), 34 kiraz genotipleri arasında kalıtsal çeşitlilik ve kalıtsal ilişkiler belirlemek için ISSR moleküler tekniğini kullanmışlardır. ISSR analizinde, 143'ü polimorfik olmak üzere toplam 149 bant elde etmişlerdir. ISSR markör tekniği ile elde edilen bantların sayısı 6 ila 12 arasında değiştiği ve ortalamasını ise 8,76 olarak bulmuşlardır. Çalışma sonucunda PPB, PIC ve Ne değerleri sırasıyla %0,90,1,914 ve 95,97 olarak belirlemişlerdir. Küme analizi, bütün 34 tatlı kiraz rengi germplasmın, ISSR yöntemi ile ayrıldığı belirtilmiş kiraz genotipleri arasındaki genetik ilişki belirlenmiş ve 34 germplasm, kiraz rengi germplasmda araştırma için ISSR moleküler markör tekniğinin kullanışlı ve güvenilir bir teknik olduğu sonucuna varılmıştır.

Lisek ve Rozpara (2009), ISSR tekniği, (*Prunus cerasus* L.) ekşi kirazın 18 çeşidi arasındaki genetik benzerliği araştırmak için kullanılmış ve (*Prunus avium* L.) tatlı kirazın 24 genotipi kullanılarak yapılan çalışmalar sonucunda kirazın çeşitleri için 144 polimorfik bant elde edilmiştir. Dört ISSR primeri (UBC 827, UBC 841, UBC 825, UBC 843) kullanılarak yapılan analiz sonucunda dendogram oluşturulmuştur. Çalışmada kullanılan ISSR moleküler tekniği, kiraz genotiplerin daha doğru tanımlanmasına ve test edilen genotiplerin teşhisinde için kullanılabilir bir yöntem olduğu sonucuna varılmıştır.

Sözen (2010), 11 kışlık hekzaploid tritikale çeşidindeki (Lasko, Stan-1, Malno, Purdy, AN34, Tatlıcak-97, Karma 2000, Presto, Melez 2001, Mikham 2002, Samur Sorti)

genetik ilişkiyi tanımlamak için ISSR tekniğini kullanmıştır. 20 ISSR primerinde test edilmiş ve bu primerlerin 12'sinden temiz, tekrarlanabilir bant amplifikasyonu elde etmiştir. ISSR primerleri ile elde edilen bantlar 320-2700 bp arasında değişim gösterdiğini belirlemiştir. Toplamda 159'u polimorfik olan (%76,07) 209 ISSR bant tespit etmiştir. Bütün çeşitlerin ISSR primerleri tarafından açıkça ayrıldığını belirtmiştir. Analiz Programları ile oluşturulan dendogramda 11 tritikale çeşidi 2 grup altında kümelendiğini ve birinci grup en büyük grup olup kendi içinde 4 alt gruptan oluşmuştur ve 10 çeşit burada yer aldığını belirlemiş ve sadece bir çeşit 'Stan-1' ikinci grupta yer almıştır. Bu çalışma sonucunda elde edilen polimorfik bantlar incelenerek çeşitler arasındaki genetik ilişki araştırılmış ISSR'ların tritikale'deki genetik çeşitliliği analiz etmek için nispeten basit ve etkili bir yöntem oluşturabileceğini tespit etmiştir.

Gradzielewska ve ark. (2012), tritikale hibritlerinin gelişmiş genetik stokları arasındaki genetik benzerliği tahmin ederek tritikale, *Aegilops juvenalis* geri melezleme çalışmalarını yapmışlardır. On dört ISSR primeri 12 ila 23 bant elde etmişlerdir. Primer başına polimorfik ürün sayısı üç ila dokuz arasında değişmiş olup ortalama 5,1 olarak bulmuşlardır. Polimorfik bilgi içeriği değerleri 0,39'dan 0,66'ya, ortalamasında 0,52 olduğunu tespit etmişlerdir. On üç primerin *A. juvenalis* kromatin varlığına işaret eden ürünleri çoğalttığını gözlemlemişlerdir. Diğer tüm formlarla en büyük genetik benzerlik (0,84), *A. juvenalis* 6x × [(Lanca × L506 / 79) × CZR142 / 79] melezinden türetilmiş bir ırk iken, *A. juvenalis* en az benzer (0,33) ile gösterilen ırk olduğunu tespit etmişlerdir. ISSR'larin tritikale genetik yapısındaki *A. juvenalis* kromatinini güvenilir şekilde tanımlayabileceğini ve melezlerin ve ebeveyn formlarının genetik benzerliğini etkili bir şekilde tahmin edebileceği sonucuna varmışlardır.

Orlovskaya ve ark. (2012) 20 yazlık tritikale çeşidinin moleküler genetik heterojenliği incelemişlerdir. ISSR ve RAPD markerlarının kullanımı, ortalama %80,2 ve %89,9'luk yüksek bir polimorfizm seviyesi ortaya koyduğunu belirtmişlerdir. Örneklerin genetik ilişkilerine göre gruplanmasına izin veren sırasıyla; melezlerin melezleme için ebeveyn çiftlerini seçmek de bu yöntemlerle mümkün olduğunu tespit etmişlerdir.

Tonk ve ark. (2014), PCR tabanlı markör yöntemi Inter-simple sequence repeat (ISSR) ve Random amplified polymorphic DNA (RAPD) ile Türkiye'de yetiştirilen 16 tritikale genotipinin genetik çeşitliliğini değerlendirmek ve işaretleyici sistemlerin farklı etkinliklerini karşılaştırmak için kullanmışlardır. ISSR ve RAPD markörlerinden sırasıyla 28 ve 21 primerler kullanılmıştır. Primerlerin etkin multipleks oranı (EMR), marker indeksi (MI), ayırma gücü (Rp) ve polimorfik bilgi içeriği (PIC) iki marker sistemi için

hesaplanmış ve incelenen tüm parametreler ISSR sisteminde daha yüksek bulunmuştur. Mantel testi, RAPD ve ISSR'ın Jaccard'ın benzerlik matrisleri arasında çok önemli bir korelasyon (r = 0,74) ortaya koyduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmanın en dikkat çekici sonucu, ISSR ve RAPD verilerine ilişkin kümeleme analizinin genotipleri sırasıyla büyüme alışkanlıkları ve kökenleri açısından ayırt etmesi olmuştur ve tritikale genotipleri iki farklı bakış açısı ile kümelenmiş ve her iki kümeleme niteliklerinin tutarlı sonuçlarını verdiğini savunmuşlardır. Bu çalışmanın sonuçlarına dayanarak gelecekteki tritikale genotiplerinin ıslah programlarında genetik çeşitliliğin ileri çalışmalarında özellikle burada olduğu gibi, genomun daha yüksek genetik çözünürlüğü için birden fazla marker sistemi kullanılması gerektiğini savunmuşlardır.

Szućko ve ark. (2015), oktoploid tritikale genomlarının yapısal değişiklik analizini F2 ve F3 generasyonlarında gerçekleştirmişlerdir. Bitkileri hekzaploid buğday (*Triticum aestivum*)'ın beş çeşidi ve çavdar hatlarından bir tanesi ile melezlenmesi sonucunda elde etmişlerdir. Çalışmada dört markör sistemi kullanılmıştır, bunlar inter-simple sequence repeat (ISSR), inter-retrotransposon amplified polymorphism (IRAP), retrotransposon-microsatellite amplified polymorphism (REMAP) ve inter-transposon amplified polymorphism (ITAP)'dır. Çoğunlukla spesifik çavdar bantlarının elemine olduğu gözlenmiştir. Melezleme kombinasyonuna bağlı olarak elemine olmuş çavdar bantlarının yüzdesi, %73,6'dan % 80,6'ya kadar değişmiştir. Daha düşük olan buğday bandı eleminasyon yüzdesi, melezlerin kombinasyonuna bağlı olarak %57,6'dan %76,48'e kadar çıktığını gözlemlemişlerdir. Ebeveyn formlarında mevcut olmayan, melezlerde yeni tür bantların ortaya çıkması nadir olarak gözlendiğini tespit etmişlerdir (%14,5-%17,9). Sonuçlar bitki melezlemelerinin erken dönemlerinde DNA'nın tekrarlanan nükleotid dizilerini de içeren moleküler seviyede devam eden genom değişim sürecini göstermiştir.

Tyrka ve ark. (2016), tritikalenin, Saka 3006 (X. *Triticosecale* Wittm.) ve Modus (X. *Triticosecale* Wittm.) arasındaki çaprazlamalardan köken alan F_1 bitkilerinden elde edilmiş 90 double haploid hattın bir seti kullanılarak bir genetik linkage haritası oluşturmuşlardır. Bu haritada 21 linkage grup belirlenmiş A, B ve R genomlarını içeren 155 SSR, 1385 DArT, 28 AFLP markerları örtüsü 2397 cM olmak ile birlikte iki marker arası mesafe 4,1 cM olarak bulmuşlardır. Karşılaştırmalı analiz ile birlikte tritikale kromozomlarının A ve B genomları 15 kromozom tarafından temsil edildiği 2AS.2AL#, 2AL#2BL, 6AS.6AL#, ve 2BS.6AL# bunların yerine 2A, 2B, ve 6A kombinasyonlarını içeren ortak buğday haritalarının ortaya çıktığını tespit etmişlerdir. Çavdarın yayımlanan

haritaları bakımından çavdar genomunun 1R, 2R ve 3R kromozomlarında da yeni önemli düzenlenmeleri bulmuşlardır. Bu genetik harita tritikalenin referans linkage haritası olarak gen haritalama ve marker destekli seleksiyon çalışmaları için kullanılabilir olduğu sonucuna varmışlardır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu bölümde çalışmada kullanılan materyal ve yöntemler hakkında bilgiler verilmiştir.

3. 1. Materyal

3. 1. 1. Bitki materyali

Bu çalışmada ülkemizde tescil edilmiş 15 tritikale (x. Triticosecale Wittmack) çeşidinin arasındaki genetik benzerliği belirlemek için Alperbey, Ayşehanım, Collegial, Ege Yıldızı, Focus, Istlavius, Karma, Mehmetbey, Melez, Mikham, Presto, Tacettinbey, Tatlıcak, Truva, Ümranhanım tritikale çeşitleri kullanılmıştır. Bu çeşitlerin çeşit sahibi kuruluşları ve tescil yılları Çizelge 3. 1.'de verilmiştir.

Çizelge 3. 1. Çalışmada kullanılan tescilli tritikale çeşitlerinin adı, çeşit sahibi kuruluş adı ve yılı

No	Çeşit Adı (Variety name)	Çeşit Sahibi Kuruluş (Maintainer)	Tescil Yılı (Registration date)
1	Ümranhanım	Doğu Anadolu Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü	2010
2	MİKHAM	Bahri Dağdaş Uluslararası Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü	2002
3	Melez	Bahri Dağdaş Uluslararası Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü	2001
4	Alperbey	Bahri Dağdaş Uluslararası Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü	2010
5	Tatlıcak	Bahri Dağdaş Uluslararası Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü	1997
6	Karma	Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü	2000
7	Presto	Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü	2000
8	Tacettinbey	Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi	1999
9	Collegial	Alfa Toh. Tar. Gıd. İnş. Hay. Paz. San. Tic. Ltd. Şti	2015
10	Mehmetbey	Doğu Akdeniz Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü	2013
11	Ayşehanım	Doğu Akdeniz Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü	2013
12	Istlavius*	Tasacco Tarım Sanayive Tic. A.Ş.	2011
13	Focus	Atakol Tar. Toh. Ve Hay. San. Tic.Ltd. Şti.	2007
14	Truva	Trakya Tarım ve Vet.Tic. Ltd. Şti	2005
15	Egeyıldızı	Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü	2005

*Türkiye'de üretim izinli Slovakya'da 2010 yılında tescil edilmiş çeşit

3. 2. Yöntem

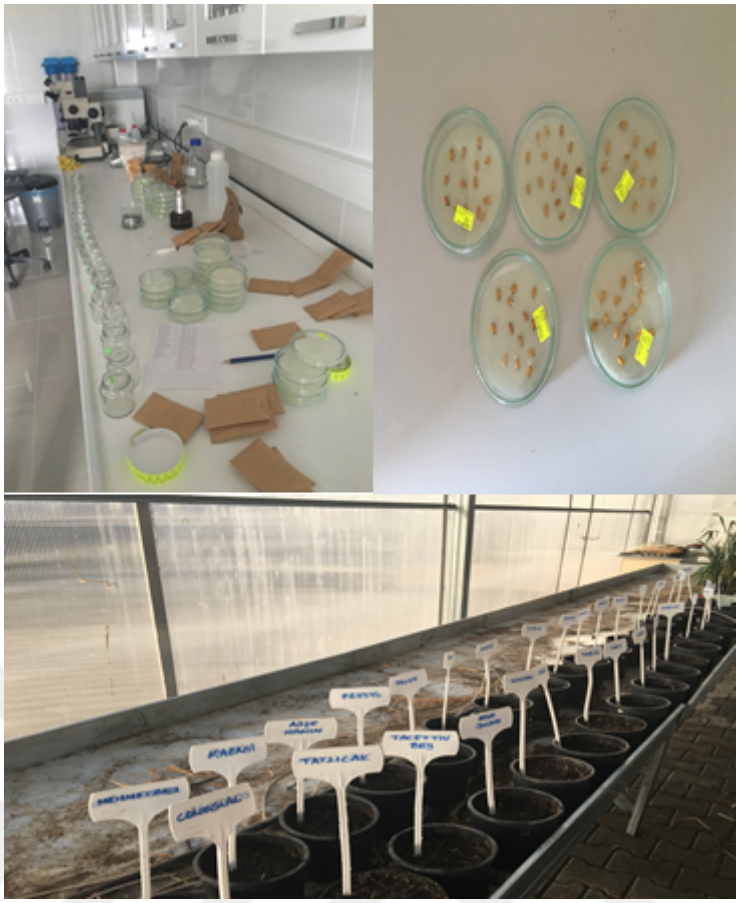
Tescilli tritikale çeşitleri arasındaki genetik çeşitliliğin ISSR-PCR tekniği ile belirlenmesinde sırasıyla DNA izolasyonu, DNA saflık ve miktar ölçümü, PCR uygulaması, PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi ile yürütülmesi, elektroforez sonuçlarının görüntülenmesi ve sonuçların bilgisayar analiz programları ile yorumlanması aşamaları gerçekleştirilmiştir.

3. 2. 1. Deneme yılı ve yeri

Konuyla ilgili bitki fideleri, 2015-2016 yetiştirme yıllarında Eskişehir Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsü Biyoteknoloji Birimi seralarında yetiştirilmiş, DNA analizleri ise Eskişehir Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsü Biyoteknoloji Birimi Laboratuvarında yürütülmüştür.

3. 2. 2. Tritikale tohumlarının çimlendirilmesi

Çalışmada tescilli tritikale çeşitlerinin her birinden 20- 25 adet tohum içlerinde kurutma kağıtları olan 9 mm çaplı petrilere yerleştirilerek iklim kabininde (Binder KBW 400) çimlenmeye bırakılmıştır. Petrilere düzenli olarak distile su verilerek kurutma kağıtlarının ıslak tutulması sağlanmıştır. Çimlenen tritikale tohumları saksılara ekilmiştir.



a. Çalışmada kullanılan tescilli tritikale tohumlarının laboratuvar koşullarında çimlendirilmesi **b.** Çimlendirilmiş olan tritikale tohumlarının sera koşullarında saksılara ekilmesi

3. 2. 3. DNA izolasyonu

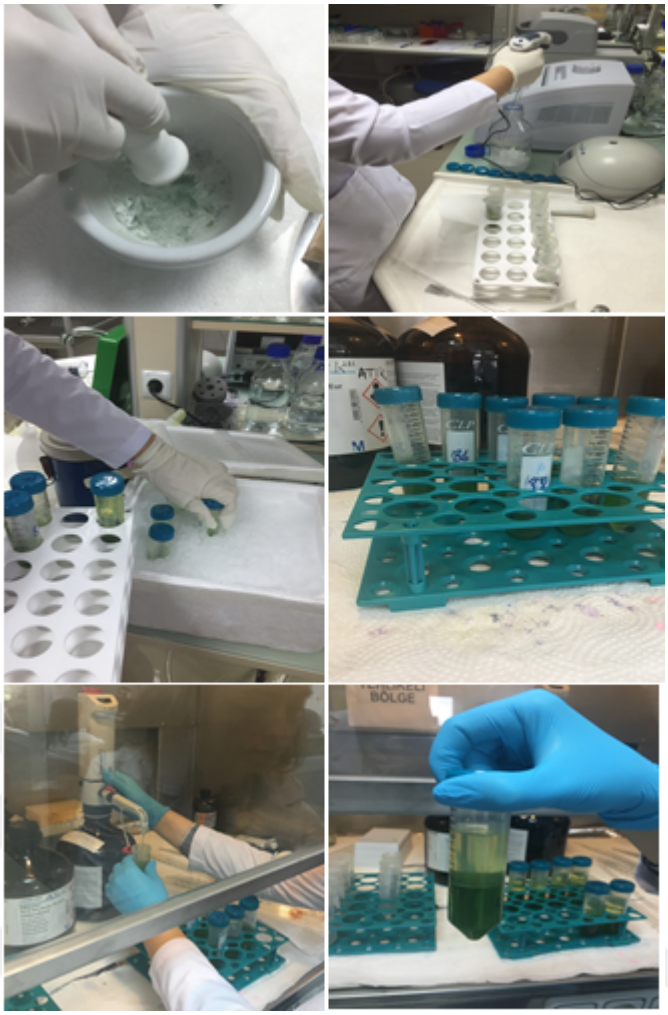
Kontrollü seralarda saksıya ekilen bitkiler 3-4 kardeşlenme seviyesine geldikten sonra genç yaprakları hasat edilmiş, alınan yaprak örnekleri -70 °C'de saklanmıştır. Genç yapraklardan literatüre dayalı olarak tritikalede uygulanabilecek DNA izolasyon yöntemleri araştırılmış ve Doyle ve Doyle'dan (1990) modifiye edilen DNA izolayonu yöntemi uygulanmıştır.



a. Genç tritikale fidelerinin görünümleri **b-c-d.** Tritikale fidelerinden DNA izolasyonu için yaprak örneklerinin alınması **e.** Tritikale yaprak örneklerinin konulduğu kese kağıtlarının buz içinde muhafazası

10-15 cm boyundaki genç tritikale fidelerinin taze yapraklarından yaklaşık 0,4 gr (40 mg) olacak şekilde alınan örnekler -70 °C'den çıkarılmıştır. -20 °C'den çıkarılan seramik havan takımının kabına bir miktar sıvı nitrojen eklendi. Bunun üzerine çıkarılan örnek konulup, bir miktar daha sıvı nitrojen ekledikten sonra iyice ezildi. Hazırlanan tüplere extraction buffer konularak içine ezilen tritikale materyali ilave edildi. Daha sonra üzerine nucleisis buffer ve %5 sarkosyl eklendi. Tüplerin kapağı iyice kapatılıp çalkalandı ve buz kabında 30 dakika bekletildi. Tüpler önceden hazır hale getirilen 65 °C' lik su banyosuna yerleştirildi ve 30-60 dakika bekletildi. Su banyosundan alınan örnekler 5 dakika bekletildikten sonra çeker ocakta 24:1'lik chloroform: isoamylalkol'den eklenerek 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüjden çıkan tüplerde üç katman oluşumu gözlendi. Altta kalan koyu renkli sıvıyı ve ortadaki bitki artıklarını

almadan, üstteki sıvı farklı steril tüplere aktarıldı. Tüplere aktarılan sıvı içine 24:1'lik chloroform: isoamylalkol'den eklenip 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüjden çıkan tüplerde iki katman oluşumu gözlendi. Üstteki koyu renkli sıvıyı (alttaki sıvıyı almadan) steril tüplere aktarıp üzerlerine %95' lik etanolden (ETOH) tüpteki sıvının iki katı eklenip hafifçe çalkalandı. DNA'lar görünür hale geldiğinde bu işlem sona erdirildi. Daha sonra DNA'ların görüldüğü bu tüpler 3 dakika santrifüj edildi ve DNA' ların dipte topak şeklinde biriktiği görüldü. DNA'lar düşürülmeden etanol döküldü. Tüpteki DNA'ların üzerine %75' lik etanol yeteri kadar eklenip 20-30 dakika bekletildi. Sonra bu sıvı da dökülerek, DNA' lar kurumaya bırakıldı. Bir gün bu şekilde bekleyen DNA'ların üzerine 500 µl 1 X TE (pH 8 olan) eklenip bir gün daha bekletildi. Her 100 µl 1 X TE için 1 µl 2-RNASE eklendi. Daha sonra DNA' ları 1,5 ml' lik tüplere aktarıp uzun süre kullanılmayacaksa -20 °C de, hemen kullanılacaksa 2-8 °C sıcaklıkta saklandı.



a. Örneklerin seramik havanda sıvı nitrojen ile ezilmesi **b.** Tüplerdeki örneklerin üzerine extraction buffer, nucleisis buffer ve %5 sarkosyl eklenmesi **c.** Hazırlanan örneklerin buz kabında 30 dakika bekletilmesi **d.** Su banyosundan alınan örneklerin çeker ocakta soğuması için bekletilmesi **e.** Örneklere çeker ocakta 24:1'lik chloroform:isoamylalkol eklenmesi **f.** Örneklerin santrifüj işleminden sonra oluşan üç katmanın görüntüsü **g.** Üstte kalan sıvı kısımın diğer iki katmana bulaştırmadan alınması **h.** Yeni tüplere aktarılan sıvı içine 24:1 lik chloroform:isoamylalkol eklenmesi **ı.** santrifüj işleminden sonraki iki katmanın üstündeki sıvı alındıktan sonra üzerine %95'lik etanol (ETOH) ilavesinden sonra görünen DNA parçaları **j.** Steril kabin içinde kurumaya bırakılmış bitki DNA'ları

3. 2. 4. DNA Miktar Tayini

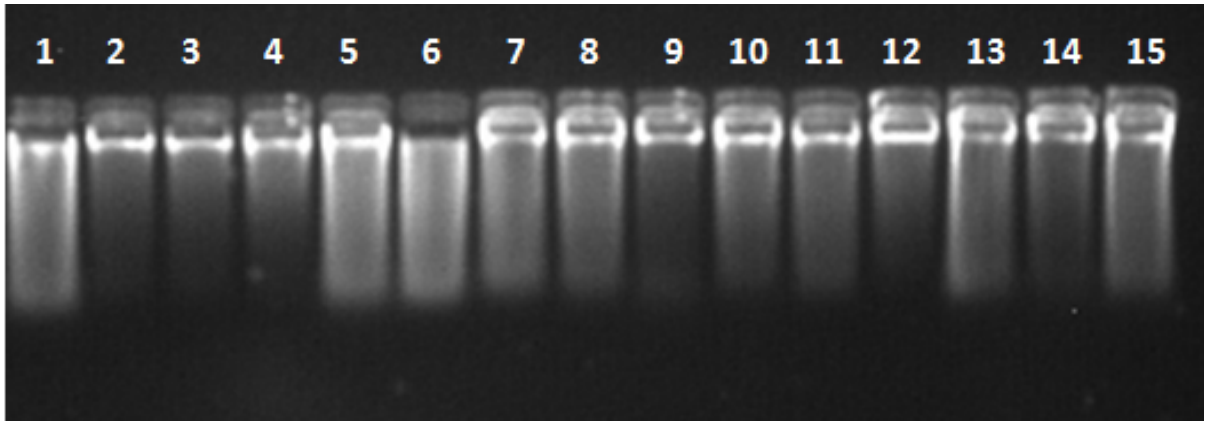
PCR reaksiyonunda her örnekten eşit miktarda DNA kullanılması gerekmektedir. Bu nedenle yukarıda açıklanan prosedürde izole edilen DNA miktarının tayini gereklidir.

DNA saflık analizi için gerekli olan %1 lik agaroz jel hazırlayacak kadar gerekli agoroz 0,5X TBE çözeltisi ile karıştırılıp 100 °C de kaynatılarak homojen hale getirilmiştir. 45 °C ye kadar soğuması beklendikten sonra elektroforez kasetlerine dökülerek örnek miktarına uygun taraklar takılmış ve yükleme işleminin yapılacağı kuyucukların açılması sağlanmıştır. Jel donduktan sonra kaset elektroforez tankının içine konulmuştur. Tanklara jelin üzerini 2-3 cm geçecek kadar 0,5X TBE çözeltisi ilave edilmiş ve jel yaklaşık 15 dakika 0,5X TBE içerisinde bekletilmiştir.

Yukarıdaki bölümde açıklandığı şekilde hazırlanan örnekler jelde açılan kuyucuklara mikro pipet yardımıyla yüklenmişlerdir. İzole edilen genomik DNA'lardan 5 µl, 10 µl yükleme tamponu ve 5 µl boya ile agaroz jele yüklenmiş ve DNA'lar 20-30 dakika elektroforezis yapılmıştır. Şekil 3.2'de görüldüğü gibi 1,5,6,7,8,10, 11, 13, 15 çeşitlerine ait DNA örneklerinin yoğun olduğu gözlenirken, 2, 3, 4, 9, 12, 14 numaralı çeşitlere ait DNA örneklerin yoğunluğunun ise daha az olduğu gözlenmiştir.

İzole edilen DNA miktarının tayini spektrofotometrede (Thermo Sicientific Nanodrop 2000c) yapılmış ve OD sonuçlarından hesaplanan DNA miktarlarına göre PCR analizi için ISSR primerlerinde kullanılmak üzere TE (Tris-EDTA) tamponu ile seyreltilmiştir.

Bu yönteme göre yapılan DNA izolasyonu sonucu elde edilen DNA'ların jel elektroforez görüntüleri Şekil 3. 1.'de, spektrometre ile yapılan ölçüm değerleri ise Çizelge 3. 2.'de verilmiştir.



Şekil 3. 1. Tescilli Tritikale Çeşitlerine Ait DNA Jel Elektroforez Görüntüleri

Çizelge 3. 2. Tescilli tritikale çeşitlerinde spektrometrede ölçülen DNA miktarları

ÇEŞİTLER		DNA (μg/ml)	A 260/280	A 260/230
1	Ümranhanım	1340,3	1,96	2,22
2	MİKHAM	347.7	1.93	2.05
3	Melez	253.6	1.91	1.95
4	Alperbey	407.9	1.91	2.00
5	Tatlıcak	1208.4	1.93	2.18
6	Karma	1317.2	1.94	2.21
7	Presto	644.7	1.90	1.95
8	Tacettinbey	900.5	1.90	1.81
9	Collegial	570.8	1.94	2.05
10	Mehmetbey	1630.1	1.92	2.19
11	Ayşehanım	1719.6	1.96	2.24
12	Istlavius	651.0	1.93	2.07
13	Focus	976.8	1.93	2.15
14	Truva	400.8	1.94	2.01
15	Ege Yıldızı	605.2	1.95	2.17

Çizelge 3. 2.'de görüldüğü gibi, tescilli tritikale çeşitlerinde genomik DNA miktarlarının 253,6–1719,6 μg/ml arasında değişmiştir. DNA miktarı 1719,6 μg/ml ile Ayşehanım tritikale çeşidinde en yüksek, 253,6 μg/ml ile Melez tritikale çeşidinde en düşük olarak bulunmuştur. DNA' nın protein saflığı (A 260/280) 1,90 ile en az, Presto ve Tacettinbey çeşitlerinde ve 1,96 ile en yüksek olarak Ümranhanım ile Ayşehanım çeşitlerinde bulunmuştur. DNA'nın temizliği için ise A260/280 ve A 260/230 değerlerine bakılmıştır. Çünkü DNA 260, protein 280 ve karbonhidratlar da 230 nm dalga boylarında pik (en yüksek değer) yapmaktadır. Temiz bir DNA' da A260/280 oranı 1,80 ile 2,00 arasında; A 260/230 oranı ise 2,00'den büyük olmalıdır. Yapılan DNA izolasyon çalışmalarında bahsedilen değerler tabloda verilmiştir.

DNA izolasyonunda büyüme periyodu başlangıcında genç sürgün ve yapraklarının kullanılması elde edilen DNA yoğunluğu ve temizliği yönünden iyi sonuç vermiştir.

3. 2. 5. DNA konsantrasyonu

Kalıp DNA konsantrasyonu amplifikasyonun başarısı için çok önemli bir faktördür. Tritikale yapraklarından izole edilen DNA miktarı, UV-spektrometrede 260 nm dalga boyunda absorbsiyon değerinden faydalanılarak hesaplanmıştır.

DNA miktarı (µg/ml) =Absorbbans değeri (OD 260) x 50 Seyreltme Katsayısı (3. 1)

Yukarıdaki formüle göre hesaplanan tüm tescilli tritikale çeşitlerine ait DNA miktarları 253,6–1719,6 µg/ml arasında değişme göstermiştir. Tekrarlanabilen ISSR profillerinin elde edilmesi için reaksiyon karışımında bulunması gereken DNA miktarının belirlenebilmesi ve reaksiyon kullanımı için her bir DNA örneği 50 ng/µl olacak şekilde TE buffer ile seyreltilmiştir. ISSR-PCR çalışmalarında kalıp DNA konsantrasyonu; Arpada 12.5 ng/25 µl (De Bustos 1998), Sorgumda 20-50 ng/20 µl (Pammi vd. 1994), buğdayda 20 ng/20 µl (Fahima vd. 1999) ve tritikalede ise 80 ng/20 µl (Amiour vd. 2002) olarak belirtilmektedir. 25 µl' lik PCR tüplerinde toplam 100 ng DNA olacak şekilde karışımlar - hazırlanmış ve ISSR reaksiyonlarında kullanılmıştır (Çizelge 4.57).

3. 2. 6. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR koşulları)

PCR, oligonükleotid primerler tarafından sınırlandırılan belirli bir DNA parçasının enzimatik olarak çoğaltılmasını sağlayan in vitro bir yöntemdir. Bu işlemde söz konusu DNA parçası milyonlarca kez çoğaltılabilir.

Genetik kaynakların karakterizasyonu, genotipler arasında genetik ilişkilerin saptanması ve çeşit tanımlanmaları gibi alanlarda (Kafkas 2006), türlerin filogenetik akrabalığını açıklamak ve legumenleri de içeren birçok tohum türünde kullanılan Polimeraz Zincir Reaksiyonu prensibine bağlı çalışan ISSR markır tekniğinin en uygun yöntem olduğu araştırmalar sonucunda belirlenmiş ve kullanılmasına karar verilmiştir.

3. 2. 6. 1. ISSR analizi

Çalışmada Çizelge 3. 5.'te gösterilen ve British Colombia Üniversitesinden elde edilen ISSR primerleri kullanılmıştır.

PCR yöntemi aşağıda belirtilen aşamalardan oluşur:

1. Kalıp DNA molekülünün yüksek sıcaklık derecelerinde (94°C) denaturasyonu

2. Oligonükleotid primerlerin tek iplikli DNA molekülleri üzerinde kendilerini komplementer bölgelere bağlaması (35-65°C)

3. DNA polimeraz enzimi, uygun tampon ve dört çeşit deoksiribonükleozid trifosfat (dNTP) ortamında primerin 3' hidroksil ucundan polimerizasyonu ve böylece kalıp DNA ipliğine tamamlayıcı olan yeni DNA molekülünün sentezlenmesi (72°C).

Yukarıda açıklanan döngünün birçok kez tekrarlanması (denaturasyon, primerin bağlanması ve yeni DNA ipliğinin sentezi) aşamalarıyla her döngüde DNA iki katına çıkar. Böylece DNA, PCR işleminde geometrik dizi biçiminde çoğaltılmış olur (2n)

DNA'ları izole edilecek türlerin amplifikasyonu için Zietkiewicz ve ark. (1994)'nın belirttiği ISSR protokolü kullanılmıştır. ISSR analizi 25 Mikrolitre amplifikasyon reaksiyon çözeltisi; 75 mM Tris-HCl, pH=8.8, 20 mM (NH4)2SO4, 2 mM MgCl2, 100 mM dATP, 100 mM dTTP, 100 mM dGTP, 100 mM dCTP, 0.2 mM primer, 1.0 unite Taq DNA polymerase ve 4-5 ng DNA içermektedir. Çalışmada primerlerin Tm ısılarına göre değişen sıcaklıklarda bağlanma sıcaklığı uygulanmıştır (50-55 °C). Genelde primerlerin Tm ısılarının 2-3 °C üzeri sıcaklıklar amplifikasyon yönünden olumlu sonuçlar vermiştir. Bu sıcaklığı takiben bağlanan primerlerin Taq polimeraz ile çoğaltılması için 70-75 °C arasında bekletilmesi gerekmektedir (Palumbi vd. 1991). Sıcaklık ve döngü koşulları olarak, 94 ºC'de 2 dk ön denatürasyon işleminden sonra, 36 döngü boyunca örnekler denatürasyon için 94 ºC'de 1 dk, primerin DNA'ya yapışması için primere göre değişen Tm derecelerinde 1 dk, ve uzama safhası için 72 ºC'de 2 dk, son uzama safhası için 72 ºC'de 10 dk tutulmuştur. Deneyler Eppendorf Mastercycler Pro S PCR System ile tamamlandı. PCR ürünleri gerektiğinde 4 °C'de buzdolabında saklanmış ve daha sonra agaroz jel elektroforez de koşturulmuştur.

Çizelge 3. 3. PCR koşulları

	Sıcaklık (°C)	**Süre (dakika)**	**Döngü Sayısı**
Ön Denatürasyon	94	2	1
Denatürasyon	94	1	36
Bağlanma	Tm	1	
Uzama	72	2	
Son Uzama	72	10	1

ISSR reaksiyonları 0.2 ml'lik ince cidarlı tüplerde gerçekleştirilmiştir. ISSR reaksiyonları her bir tüp içinde 25 µl'ye ayarlanmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda; 25 µl'lik reaksiyon tüplerine, 2 µl genomik DNA (50ng/µl), 2.5 µl MgCl2, 2.5 µl 10 X Taq polimeraz buffer, 4 µl primer, 2 µl dNTPs, 0.3 µl Taq polimeraz (1U) ve 11.7 µl distile su olacak şekilde karışım hazırlanmış ve PCR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.4.).

Çizelge 3. 4. PCR reaksiyonu

Bileşen	Miktar (µl)
H_2O	11,7
10X Taq Buffer	2,5
25 mM $MgCl_2$	2,5
2,5 mM dNTP	2
2,5mM Primer	4
Genomik DNA	2 (50 ng/ µl)
Taq Polimeraz	0,3 (1U)
Toplam	25

Her bir primer için hazırlanan negatif kontrol reaksiyonlara eklenmiştir.

3. 2. 6. 1. 1. $MgCl_2$ konsantrasyonu

Magnezyum klorür konsantrasyonu primer yapışmasına (annealing), enzim aktivitesine, ürünün belirginliğine ve primer-dimer oluşumlarına etki etmektedir (Devos ve Gale 1992, Pancholi 1995). Düşük konsantrasyonlu MgCl2 kullanıldığı zaman

genellikle düşük verimli ürün veya hiç ürün oluşmazken yüksek konsantrasyonlu Mg iyonu kullanıldığında ise istenmeyen ürünlerin oluşmasına neden olmaktadır.

3. 2. 6. 1. 2. Primer konsantrasyonu

Primer konsantrasyonu yüksek olduğu durumlarda kalıp DNA'dan bağımsız primer-dimerlerinin ve spesifik (özel) olmayan ürünlerin oluşmasına neden olmaktadır (Weeden vd. 1992). Yapılan bazı çalışmalarda tritikalede uygun primer konsantrasyonu 0.5-1.2 µM/20µl olarak belirtilmektedir (Malgorzata vd. 2002, Amiour vd. 2002).

3. 2. 6. 1. 3. dNTP konsantrasyonu

Deoksinukleotid trifosfat (dNTP) konsantrasyonunun düşük miktarda kullanımı PCR' ın güvenirliğini artırmaktadır. Düşük dNTP konsantrasyonu nükleotidlerin yanlış bağlanma olasılığını azaltmaktadır (Pancholi 1995).

3. 2. 6. 1. 4. Taq polimeraz enzim konsantrasyonu

Taq DNA polimeraz 25 µl'lik reaksiyon karışımında 0,25 ve 0,6 unite olacak şekilde önerilmektedir. Bununla birlikte Taq polimeraz miktarı kalıp DNA' ya veya primerlere göre değişmektedir. Reaksiyon karışımında eğer enzim miktarı çok yüksek olursa spesifik olmayan yan ürünler birikirken düşük Taq konsantrasyonunda istenen ürünlerün miktarı yetersiz olmaktadır (Devos and Gale 1992).

3. 2. 6. 1. 5. 10X buffer (tampon) Taq polimeraz enzim konsantrasyonu

Çalışmada kullanılan 10X buffer (Tampon) Taq polimeraz enzimi ile birlikte gelmiş olup (Promega), 50 mM Tris-HCI (pH 8.0), 100 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, %50 glcerol ve %1 TritonX-100 içermektedir.

3. 2. 6. 2. Primerlerin DNA'ya yapışma sıcaklıklarının belirlenmesi

3. 2. 6. 2. 1. Gradient PCR analizleri

Primerlerin baz dizilimleri farklı olduğu için kalıp DNA'ya yapışma sıcaklıkları da farklıdır. Temin edilen primerlerin belirlenmiş olan Tm sıcaklıkları ile çalışmalara başlanmış ancak bağlanma sağlanamadığı durumlarda primerlerin erime (melting) sıcaklığını bulmak için 5'-3' sekanslarının içerdiği Adenin, Timin, Sitozin ve Guanin baz sayıları belirlenmiştir. 15-20 bp baz uzunluğundaki primerler için geçerli olan aşağıdaki formüle göre, Adenin ve Timin baz sayılarının toplamının iki katı ile Guanin ve Sitozin baz sayılarının toplamının dört katının alınarak erime sıcaklığı hesaplanmıştır. Gradient PCR analizi sonucunda primerlerin yapışma sıcaklığının belirlenmesinden sonra erime sıcaklığının 5 derece eksiği ya da fazlası hesaplanarak bağlanma sıcaklığı bulunmuştur.

$$Tm:2(A+T) + 4(G+C)\ TA: Tm \pm 5°C \qquad (3.\ 2.)$$

20 adet primerin DNA'ya yapışma sıcaklığı yukarıdaki formülle hesaplanmış ve bulunan bu sıcaklıkların 5 derece fazla ve eksiği değerler belirlenerek PCR bloklarının sıcaklıkları ayarlanmıştır.

3. 2. 6. 3. ISSR primerleri

Çalışmada, bitki örneklerinden izole ettiğimiz DNA'lar British Colombia Üniversitesi Biyoteknoloji Laboratuvarında dizayn edilen ISSR primer setinden buğday ve çavdar çalışmalarında yaygın olarak kullanılan 20 tanesi seçilerek PCR işlemi gerçekleştirilmiştir. Primerlerin nükleotid dizilimleri, baz sayıları ve yapışma sıcaklıkları (Kafkas et al, 2006) Çizelge 3. 5'te verilmiştir.

Çizelge 3. 5. Çalışmada kullanılan ISSR primerlerinin dizileri, baz sayıları ve yapışma sıcaklık (Ta)değerleri

Sıra No	Primer No	Nükleotid Dizilimi (5'-3')	Baz Sayısı	Yapışma Sıcaklıkları (°C)
1	UBC808	AGA GAG AGA GAG AGA GC	17	52
2	UBC809	AGA GAG AGA GAG AGA GG	17	52
3	UBC810	GAG AGA GAG AGA GAG AT	17	50
4	UBC812	GAG AGA GAG AGA GAG AA	17	50
5	UBC813	CTC TCT CTC TCT CTC TT	17	50
6	UBC818	CAC ACA CAC ACA CAC AG	17	52
7	UBC820	GTG TGT GTG TGT GTG TC	17	52
8	UBC821	GTG TGT GTG TGT GTG TT	17	50
9	UBC822	TCT CTC TCT CTC TCT CA	17	50
10	UBC824	TCT CTC TCT CTC TCT CG	17	52
11	UBC826	ACA CAC ACA CAC ACA CC	17	52
12	UBC827	ACA CAC ACA CAC ACA CG	17	52
13	UBC829	TGT GTG TGT GTG TGT GC	17	52
14	UBC830	TGT GTG TGT GTG TGT GG	17	52
15	UBC834	AGA GAG AGA GAG AGA GYT	18	53
16	UBC835	AGA GAG AGA GAG AGA GYC	18	55
17	UBC840	GAG AGA GAG AGA GAG AYT	18	53
18	UBC843	CTC TCT CTC TCT CTC TRA	18	53
19	UBC844	CTC TCT CTC TCT CTC TRC	18	55
20	UBC847	CAC ACA CAC ACA CAC ARC	18	55

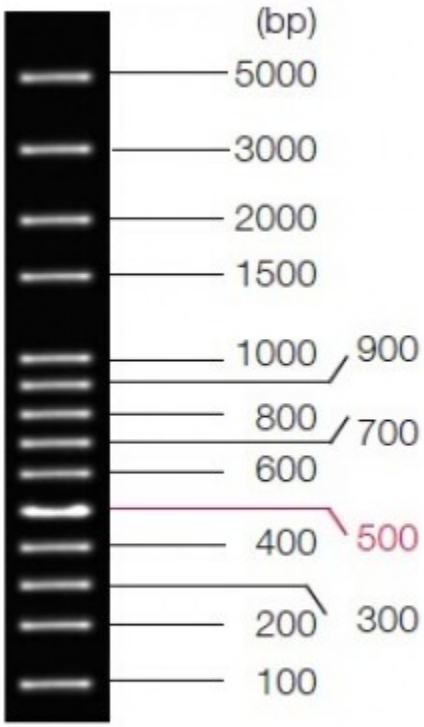
3. 2. 6. 4. ISSR primerleri kullanılarak elde edilen pcr ürünlerinin agaroz jel elektroforezinde görüntülenmesi

PCR sonucu elde edilen örnekler, agaroz jel elektroforezinde (Thermo, Midicell Promo) incelendi. Analiz için 0,5 X TBE (Tris/Borate/EDTA)'de hazırlanan 2'lik agaroz, mikrodalga fırında eritildi. Agaroz yoğunluğunun artırılması bantların sayısı ve görünebilirliğini arttırmıştır. Bu nedenle PCR ürünleri %2'lik agaroz da yürütülmesi daha

net görüntülerin elde edilmesini sağlamıştır. Agaroz jeller hazırlanırken özellikle yüksek konsantrasyonlarda jellerdeki kırılmaları önlemek amacıyla gerekli titizlik gösterilmiştir. Jellerin çok iyi şekilde erimeleri sağlanmış, sıcakken dökülen jeller de daha net görüntüler elde edilmiştir. Jel hazırlanırken yapılan hata ISSR batlarının görüntülenmesinde sorunlar çıkarmıştır.

Oda sıcaklığına gelen jel yatay elektroforez kasetine dökülmüştür. Elektroforez kaseti jelin polimerize olması için oda sıcaklığında 30 dakika bekletilmiş ve 0,5 X TBE tamponu içeren elektroforez tankına yerleştirilmiştir. PCR ürünleri 3,5 µl yükleme tamponu ile karıştırılarak 20-22 µl hacimde jel kuyularına yüklenmiştir. PCR ürünlerinin boyutunu belirleyebilmek için 100 bp Plus'lik (MBI Fermentas SM0321, Germany) DNA markerı kullanılmıştır. PCR ürünleri, 100 V'ta 2-3 saat süreyle yürütülmüştür. Koşturma süresinin az ya da çok fazla tutulması ISSR ürünlerinin görünebilirliğini olumsuz yönde etkilediğinden 2,5 saatlik koşturma görüntüleme açısından tatminkâr sonuçlar vermiştir.

Elektroforez işleminden sonra DNA'nın görünür hale getirilip değerlendirilebilmesi için ethidium bromide ile boyanmıştır. Ethidium bromide'in stok çözelti konsantrasyonu 10 mg/ml olacak şekilde hazırlanmıştır. Jel 2 µg/ml ethidium bromide içeren saf suda 20 dakika çalkalanarak boyanmış ve daha sonra fazla boyayı uzaklaştırmak için 15 dakika saf suda yıkanmıştır. UV ışık altında (Vilber Lourmat) incelenen PCR ürünlerinin, Kodak Gel Logic 200 Imaging System üzerinde fotoğrafı çekilmiştir.



Şekil 3. 2. 100 bp plus DNA marker

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

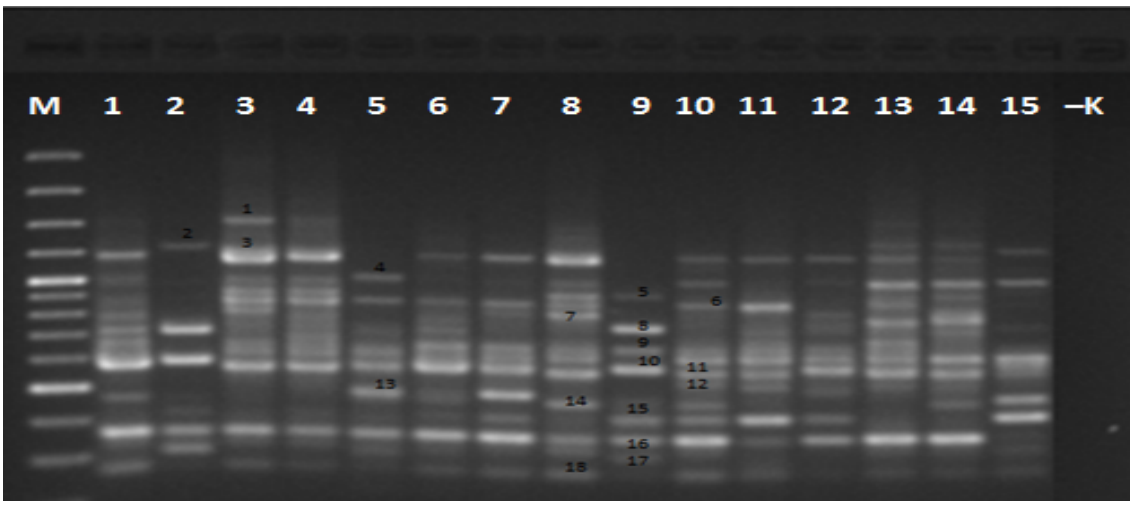
Bu bölümde çalışma sonucunda elde edilen sonuçlara yer verilmiştir.

4. 1. Sonuçlar

PCR ürünlerinin jellere yükleniş sırası Çizelge 4. 1.'de ki gibidir. Jel görüntülerinde "M" markör'ü, 1-15 tritikale çeşitlerini, -K ise negatif kontrolü ifade etmektedir.

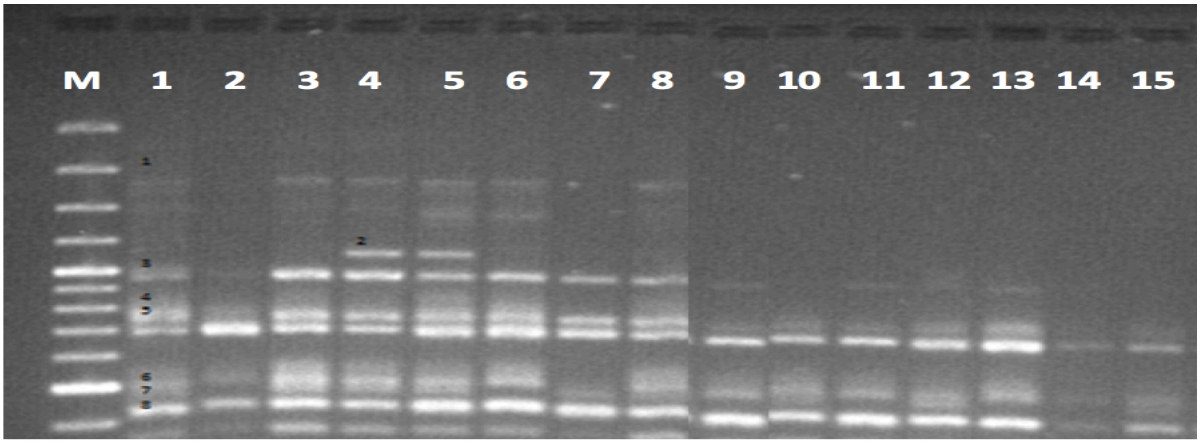
Çizelge 4. 1. Jel fotoğraflarındaki çeşitlerin adları

No	Tritikale Çeşit Adı
1	Ümranhanım
2	Mikham
3	Melez
4	Alperbey
5	Tatlıcak
6	Karma
7	Presto
8	Tacettinbey
9	Collegial
10	Mehmetbey
11	Ayşehanım
12	Istlavius
13	Focus
14	Truva
15	Ege Yıldızı



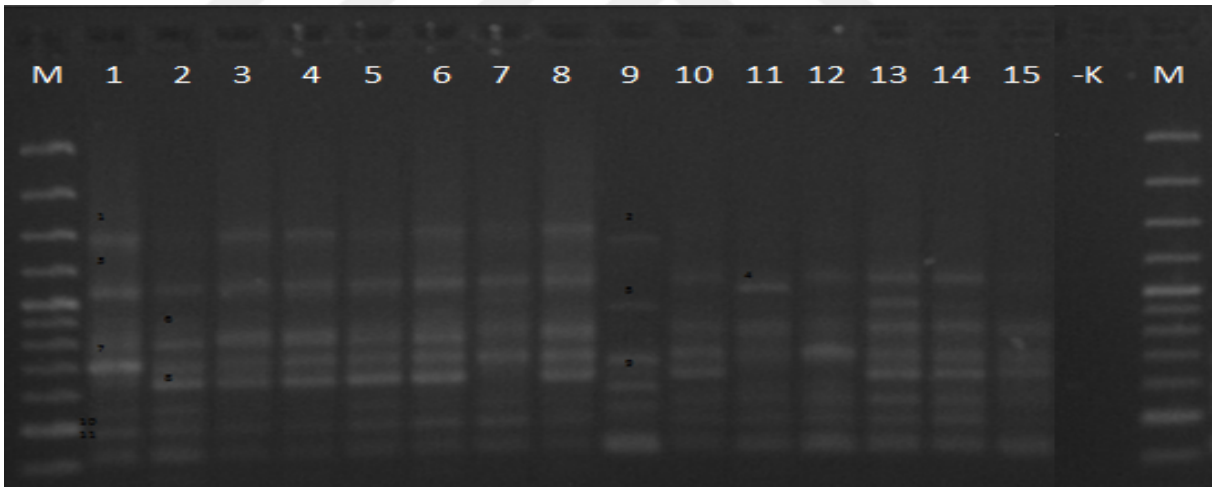
Şekil 4. 1. UBC 808 primeri ile tescil edilmiş tritikale çeşitlerinin ISSR-PCR bant profilleri

UBC 808 primeri ile 18 polimorfik bant elde edilmiştir. Polimorfizm oranı %100'dür. Bant büyüklükleri 100-2.000 bp arasında değişmektedir.



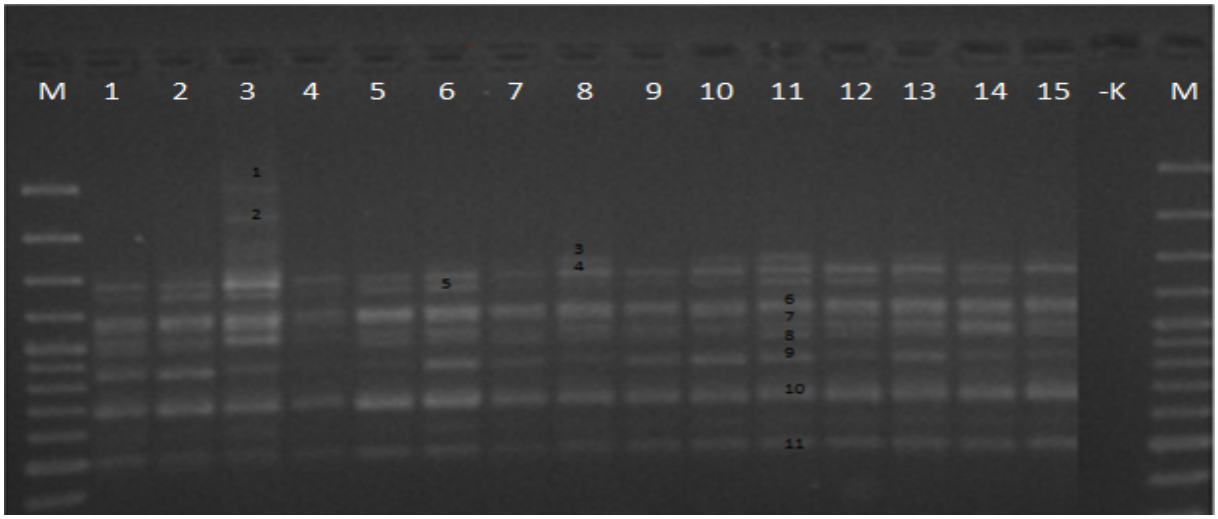
Şekil 4. 2. UBC 810 primeri ile tescil edilmiş tritikale çeşitlerinin ISSR-PCR bant profilleri

UBC 810 primeri ile 4'ü polimorfik 8 bant elde edilmiştir. Polimorfizm oranı %50'dir. Bant büyüklükleri 100-3.000 bp arasında değişmektedir.



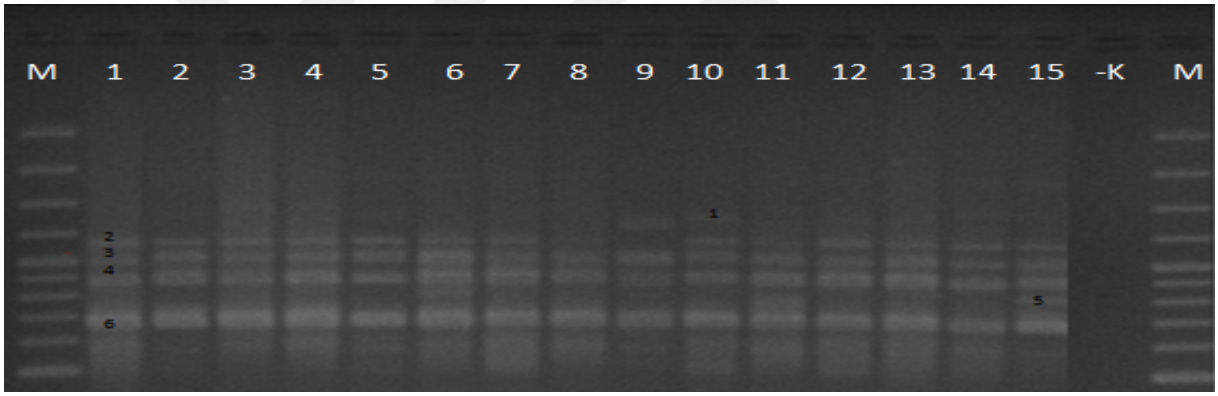
Şekil 4. 3. UBC 812 primeri ile tescil edilmiş tritikale çeşitlerinin ISSR-PCR bant profilleri

UBC 812 primeri ile 11polimorfik bant elde edilmiştir. Polimorfizm oranı %100'dür. Bant büyüklükleri 200-2.000 bp arasında değişmektedir.



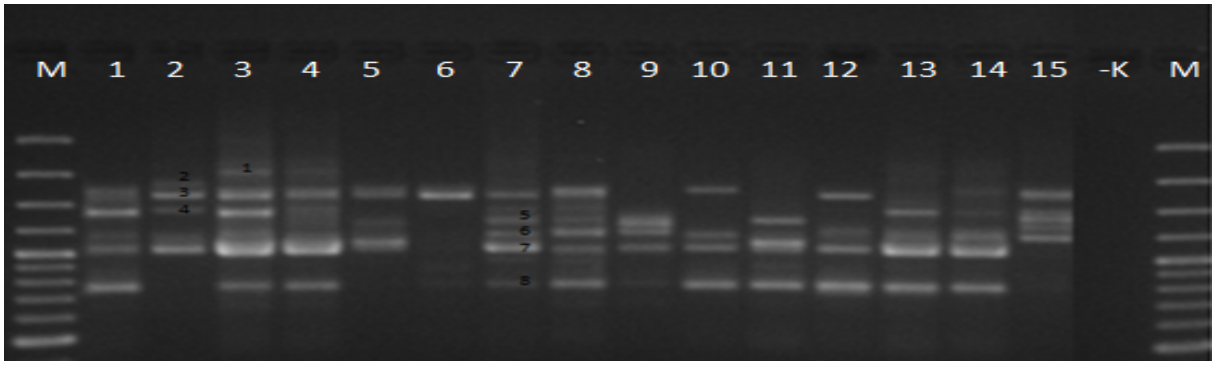
Şekil 4. 4. UBC 813 primeri ile tescil edilmiş tritikale çeşitlerinin ISSR-PCR bant profilleri

UBC 813 primeri ile 7'si polimorfik 11 bant elde edilmiştir. Polimorfizm oranı %63,7'dir. Bant büyüklükleri 100-5.000 bp arasında değişmektedir.



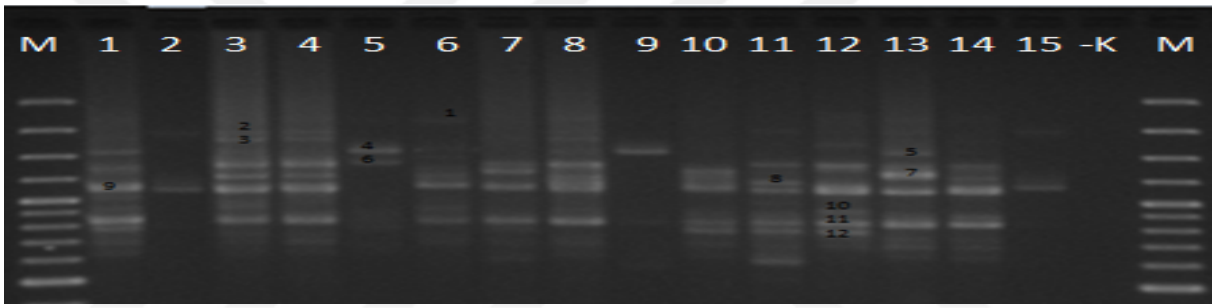
Şekil 4. 5. UBC 818 primeri ile tescil edilmiş tritikale çeşitlerinin ISSR-PCR bant profilleri

UBC 818 primeri ile 4'ü polimorfik 6 bant elde edilmiştir. Polimorfizm oranı %66,7'dir. Bant büyüklükleri 400-1.500 bp arasında değişmektedir.



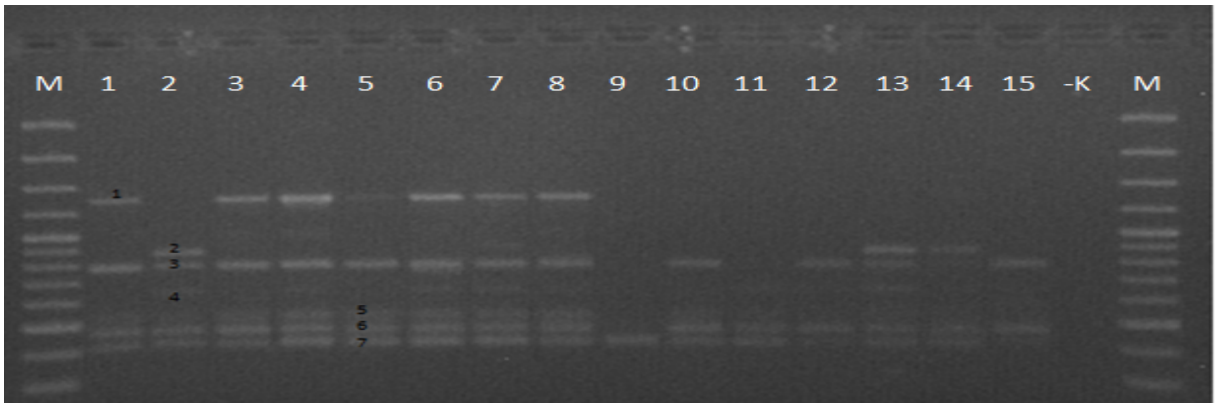
Şekil 4. 6. UBC 820 primeri ile tescil edilmiş tritikale çeşitlerinin ISSR-PCR bant profilleri

UBC 820 primeri ile 8 polimorfik bant elde edilmiştir. Polimorfizm oranı %100'dür. Bant büyüklükleri 400-3.000 bp arasında değişmektedir.



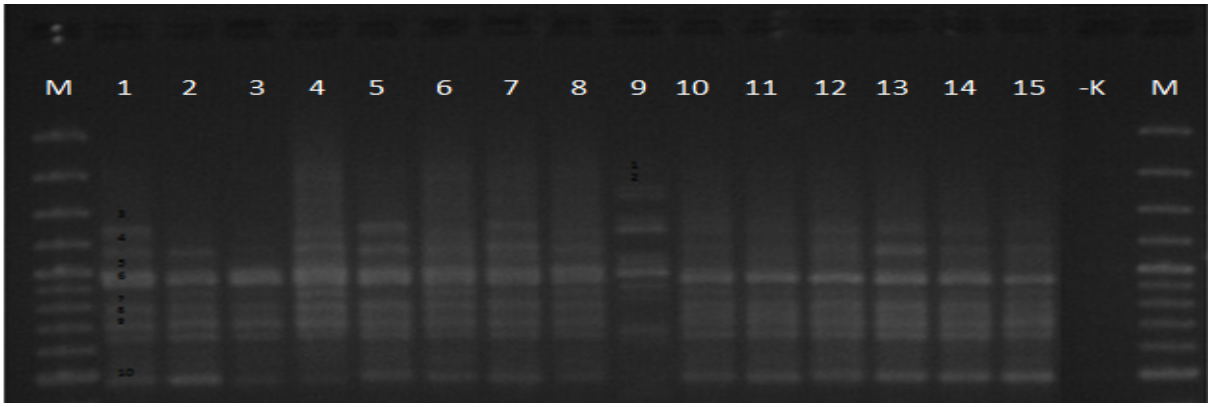
Şekil 4. 7. UBC821 primeri ile tescil edilmiş tritikale çeşitlerinin ISSR-PCR bant profilleri

UBC 821 primeri ile 12 polimorfik bant elde edilmiştir. Polimorfizm oranı %100'dür. Bant büyüklükleri 300-3.000 bp arasında değişmektedir.



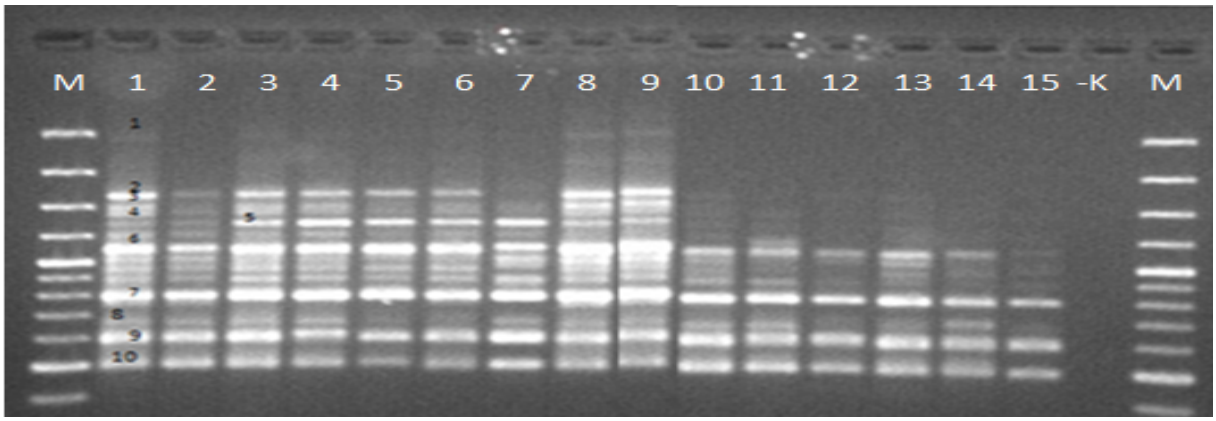
Şekil 4. 8. UBC 824 primeri ile tescil edilmiş tritikale çeşitlerinin ISSR-PCR bant profilleri

UBC 824 primeri ile 6'sı polimorfik 7bant elde edilmiştir. Polimorfizm oranı %85,8'dir. Bant büyüklükleri 200-1.800 bp arasında değişmektedir.



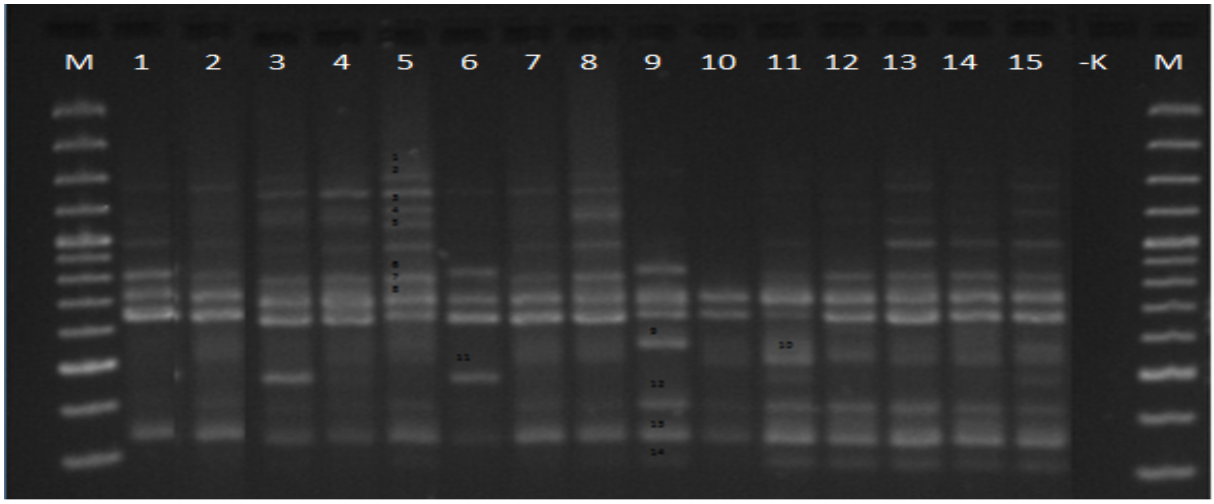
Şekil 4. 9. UBC 826 primeri ile tescil edilmiş tritikale çeşitlerinin ISSR-PCR bant profilleri

UBC 826 primeri ile 7'si polimorfik 10 bant elde edilmiştir. Polimorfizm oranı %70'tir. Bant büyüklükleri 100-3.000 bp arasında değişmektedir.



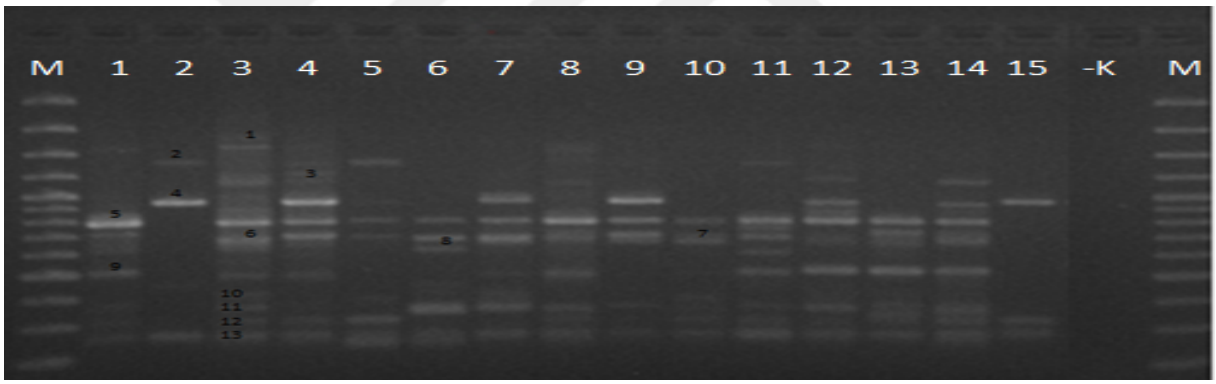
Şekil 4. 10. UBC 827 primeri ile tescil edilmiş tritikale çeşitlerinin ISSR-PCR bant profilleri

UBC 827 primeri ile 6'sı polimorfik 10 bant elde edilmiştir. Polimorfizm oranı %60'tır. Bant büyüklükleri 200-5.000 bp arasında değişmektedir.



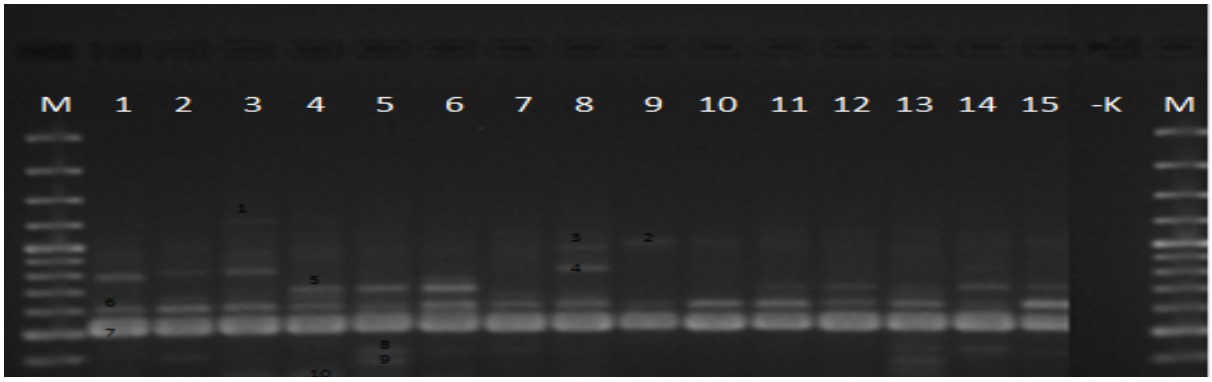
Şekil 4. 11. UBC 830 primeri ile tescil edilmiş tritikale çeşitlerinin ISSR-PCR bant profilleri

UBC 830 primeri ile 12'si polimorfik 14 bant elde edilmiştir. Polimorfizm oranı %85,8'dir. Bant büyüklükleri 100-2.800 bp arasında değişmektedir.



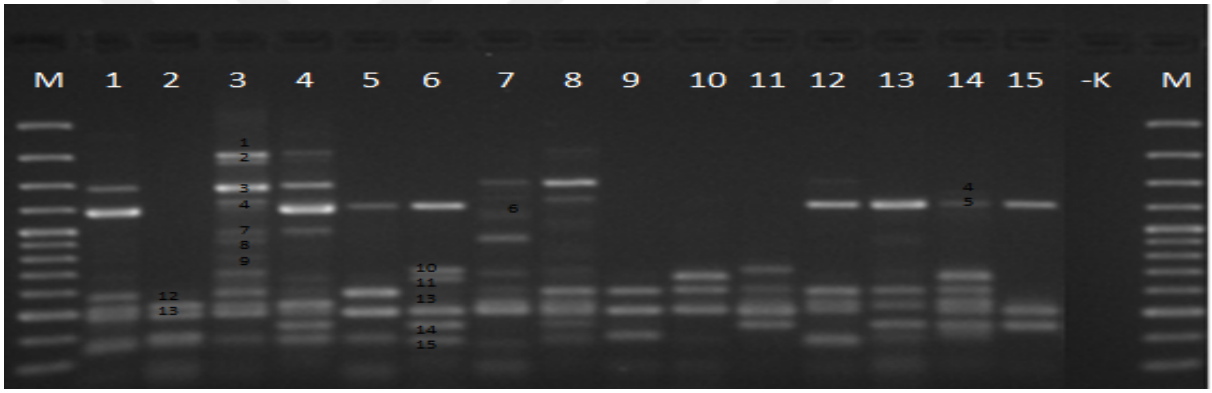
Şekil 4. 12. UBC 834 primeri ile tescil edilmiş tritikale çeşitlerinin ISSR-PCR bant profilleri

UBC 834 primeri ile 12'si polimorfik 13 bant elde edilmiştir. Polimorfizm oranı %92,3'tür. Bant büyüklükleri 200-2.700 bp arasında değişmektedir.



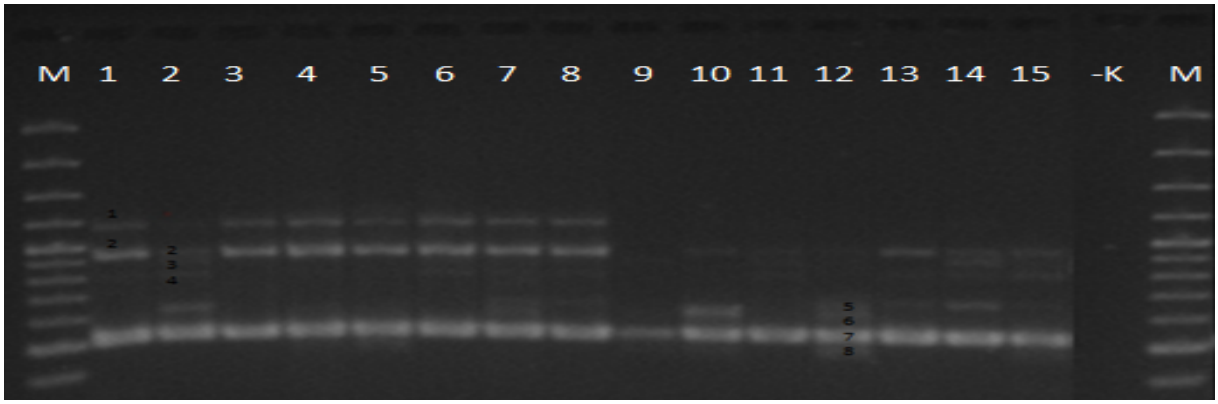
Şekil 4. 13. UBC 835 primeri ile tescil edilmiş tritikale çeşitlerinin ISSR-PCR bant profilleri

UBC 835 primeri ile 9'u polimorfik 10 bant elde edilmiştir. Polimorfizm oranı %90'dır. Bant büyüklükleri 100-1.500 bp arasında değişmektedir.



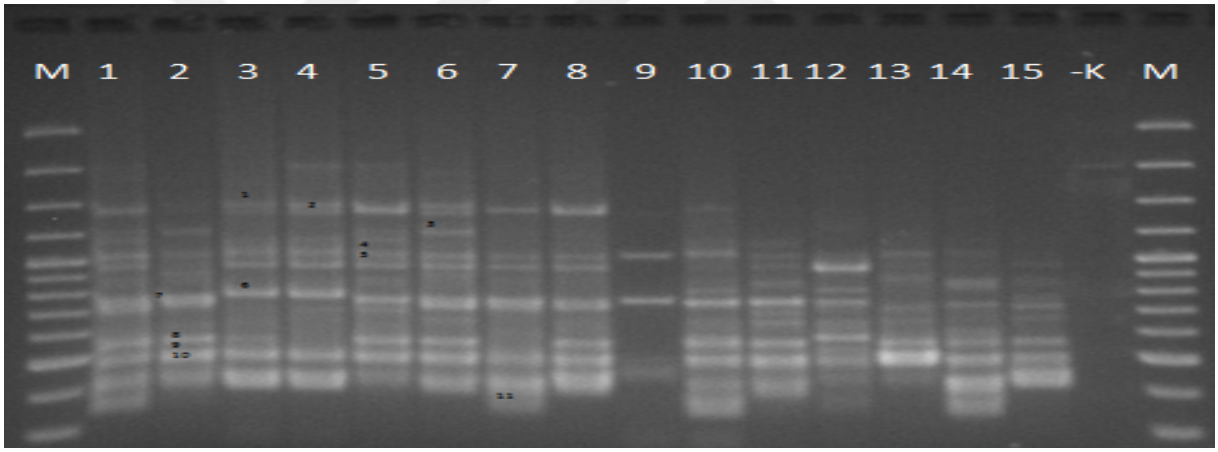
Şekil 4. 14. UBC 840 primeri ile tescil edilmiş tritikale çeşitlerinin ISSR-PCR bant profilleri

UBC 840 primeri ile 14'Ü polimorfik 15 bant elde edilmiştir. Polimorfizm oranı %93,4'tür. Bant büyüklükleri 200-3.000 bp arasında değişmektedir.



Şekil 4. 15. UBC 844 primeri ile tescil edilmiş tritikale çeşitlerinin ISSR-PCR bant profilleri

UBC 844 primeri ile 7'si polimorfik 8 bant elde edilmiştir. Polimorfizm oranı %87,5'tir. Bant büyüklükleri 200-1.500 bp arasında değişmektedir.



Şekil 4. 16. UBC 847 primeri ile tescil edilmiş tritikale çeşitlerinin ISSR-PCR bant profilleri

UBC 847 primeri ile 11 polimorfik bant elde edilmiştir. Polimorfizm oranı %100'dür. Bant büyüklükleri 200-2.000 bp arasında değişmektedir.

4. 2. Primerlerin Polimorfizm Oranlarının Belirlenmesi

Çalışmada kullanılan ISSR primerlerinin polimorfizm oranları primerlerden elde edilen polimorfik bant sayılarının toplam bant sayısına bölünüp 100 ile çarpılması ile bulunmuştur.

Polimorfizm Oranı (%) = Polimorfik Bant Sayısı / Toplam Bant Sayısı x 100 (4. 1.)

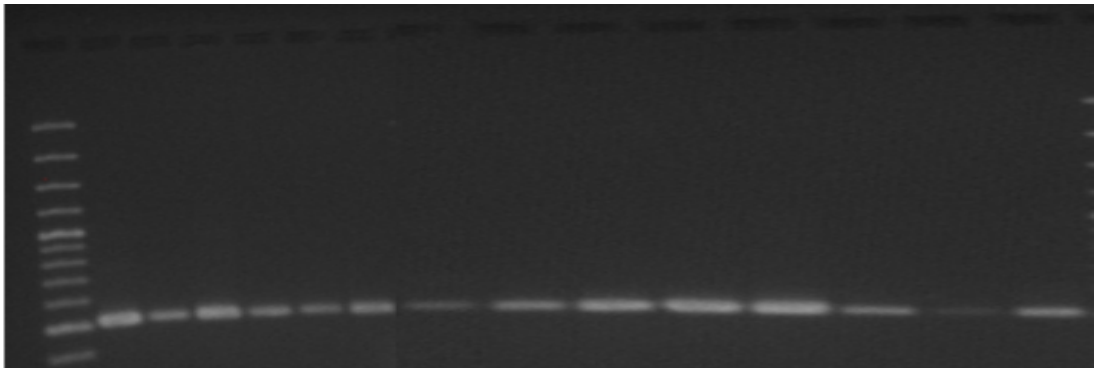
4. 3. DNA Bantlarının Değerlendirilmesi

PCR sonucu oluşan ISSR-DNA bantlarının jel elektroforez görüntüleri dikkate alınarak değerlendirilmiştir. Bantların okunması ve değerlendirilmesinde, net olarak oluşan DNA bantları değerlendirmeye alınırken oluşan silik ya da smear'li (kırık) bantlar değerlendirilme dışı bırakılmıştır. Kullanılan 20 primerden 16 tanesi (%80) tritikale genotiplerinde amplifikasyon göstermiştir. Monomorfik ve polimorfik bant üreten 16 primer ile yapılan tritikale çeşit ve hatlarının ISSR-PCR profilleri Çizelge 4. 2.'de verilmiştir.

Çizelge 4. 2. ISSR-PCR yönteminde kullanılan polimorfik ve monomorfik bant veren primerler

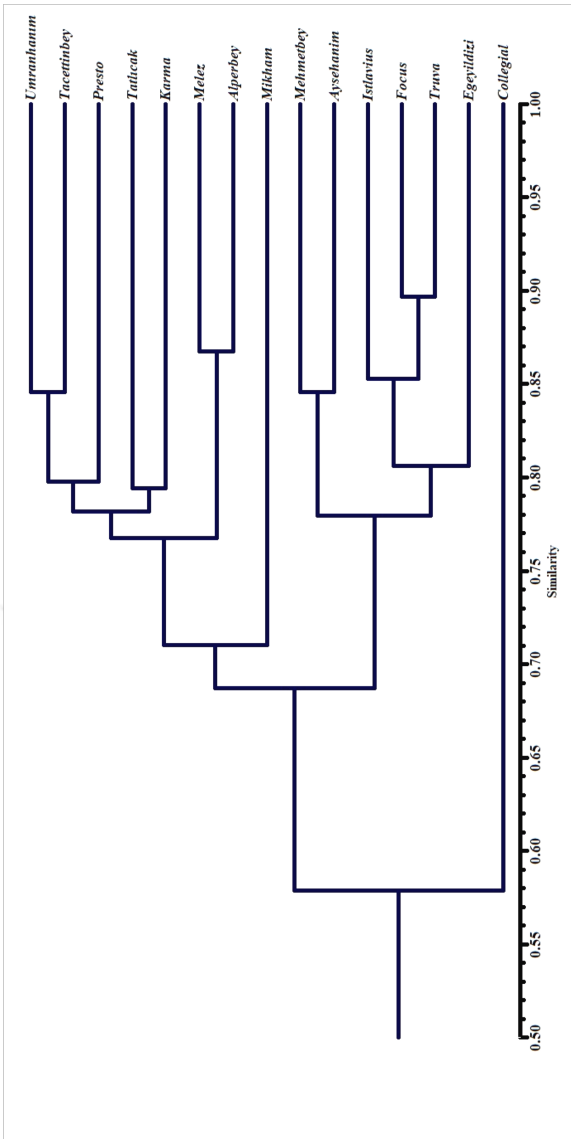
Primer Adı	Polimorfik Bant Sayısı	Toplam Bant Sayısı	% Polimorfik Bant Sayısı
UBC 808	18	18	100,0
UBC 809	-	-	-
UBC 810	4	8	50,0
UBC 812	11	11	100,0
UBC 813	7	11	63,7
UBC 818	4	6	66,7
UBC 820	8	8	100,0
UBC 821	12	12	100,0
UBC 822	-	-	-
UBC 824	6	7	85,8
UBC 826	7	10	70,0
UBC 827	6	10	60,0
UBC 829	-	-	-
UBC 830	12	14	85,8
UBC 834	12	13	92,3
UBC 835	9	10	90,0
UBC 840	14	15	93,4
UBC 843	-	-	-
UBC 844	7	8	87,5
UBC 847	11	11	100
TOPLAM	148	172	86,1

Kullanılan bazı primerler tescilli tritikale çeşitlerinde hiç amplifikasyon göstermemiştir. Bu primerler UBC 809, UBC 822, UBC 829, UBC 843'tür. Aplifikasyon göstermeyen primerlere örnek olarak UBC 809 primeri ile tescilli tritikale çeşitleri ISSR-PCR bant görüntüsü Şekil 4. 17.'de verilmiştir.



Şekil 4. 17. UBC 809 primeri ile tescilli tritikale çeşitlerinin ISSR-PCR bant profilleri

PCR sonucu oluşan ISSR-DNA bantlarının jel elektroforez görütüleri dikkate alınarak değerlendirilmiştir. ISSR amplifikasyon ürünleri var (1) ya da yok (0) şeklinde değerlendirilmiş ve elde edilen veriler IBM SPSS 20 (SPSS) adlı bilgisayar paket programında analiz edilmiştir. Genetik benzerlik indeksi Jaccard'a göre hesaplanmıştır. Dendogramın elde edilmesinde UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean Algorithm) yöntemi kullanılmıştır.



Şekil 5. 1. Çalışmada kullanılan tritikale çeşitlerine ait dendogram

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1 Sonuçlar

Elde edilen dendograma göre tritikale çeşitleri en fazla %42 uzaklıkla ayrılmaktadır. Dendogramda Collegial en farklı çeşit olarak görülmekte ve en dışta yer almaktadır. Diğer ana klad 2 alt gruba ayrılmakta olup, %69 genetik farklılık görülmektedir. Alt kladların birinde Mikham, Alperbey, Melez, Karma, Tatlıcak, Presto, Tacettinbey ve Ümranhanım çeşitleri yer alırken diğerinde Mehmetbey, Ayşehanım, Istlavius, Focus, Truva ve Egeyıldızı çeşitleri yer almaktadır.

İlk alt klad da genetik açıdan en farklılaşmış çeşit Mikham %29 farklılıkla ayrılmaktadır. Alperbey ve Melez çeşitleri birbirleriyle %88 oranında genetik açıdan benzerlik göstermekle birlikte, kalan çeşitlerden %23 farklılıkla ayrılmaktadır. Bu alt kladın nüvesini (çekirdeğini) Tatlıcak, Karma, Presto, Tacettinbey ve Ümranhanım çeşitleri oluşturmaktadır. Bunlar genetik açıdan en fazla %22 farklılık göstermektedir. Bu grupta yer alan Tacettinbey çeşidi hariç tüm çeşitler kışlık/alternatif yetişme tabiatında olup Konya Bahri Dağdaş Uluslararası Tarımsal Araştırma Enstitüsü ve Eskişhir Geçitkuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsü tarafından geliştirilen çeşitler olup aynı genetik tbana dayanmaktadır. Ümran hanım çeşidide yine Konya Bahri Dağdaş Uluslararası Tarımsal Araştırma Enstitüsü programından elde edilen genotiplerden seçilmiştir. Burada farklılık oluşturan biri kışlık (Ümranhanım) diğeri yazlık (Tacettinbey) olan iki çeşidin %14 oranında farklılık göstererek bu alt klad içerisinde genetik açıdan ilişkili çeşit olmasıdır.

Diğer alt grupta yer alan çeşitlerin genetik farklılaşma seviyesi ilk alt gruba oranla daha azdır ve çeşitler en fazla %22 genetik uzaklık göstermektedir. Bu alt klad içerisinde Focus ve Truva yanlızca %10 oranında farklı görünmekte olup, bu iki çeşide Istlavius sadece %14 genetik uzaklık göstermektedir. Egeyıldızı ise bu üç çeşide en yakın ve %19 farklılık gösteren diğer çeşittir. Bu gruptaki çeşitler Güney Avrupa ülkelerinde tescilli ve Uluslararası Mısır ve Buğday Geliştirme Merkezi'den (CIMMYT) elde edilen genotiplerinden tescil edilen yazlık/alternatif karakterli çeşitlerden oluşmaktadır.

Mehmetbey ve Ayşehanım ise %15 farklılıkla birbirinden ayrılmakta ve bu alt kladın diğer çeşitlerinden %22 farklılıkla ayrılış görünmektedir. Mehmetbey ve Ayşehanım çeşitleri Eskişehir Geçitkuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsü tarafından geliştirilmiş yazlık/alternatif tabiatlı genotipler arasından seçilerek geliştirimiş çeşitlerdir.

5.2 Öneriler

Yapılan bu çalışmada, ISSR yöntemi kullanılarak tescilli tritikale çeşitleri arasındaki akrabalık ilişkileri tespit edilebilmiştir. Benzer genetik tabana dayalı çeşitlerde düşük genetik uzaklık tespit edilmiştir. Bu sonuçlar bu yöntemin buna kullanılabileceği bu çalışma ile görülmüştür.

Bu çalışmada elektorforez ürünlerinin agoroz jele yüklenmesi ile elde edilen görüntülerde oldukça yoğun bantlar gözlenmiştir. Bu bant görüntülerinin birbirinden daha net bir şekilde ayrılmasını sağlamak için SDS Page (Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamit Gel Elektroforezi) yöntemi denenebilir.

Genetik olarak en uzak olan Collegial ve Ümranhanım çeşitleri arasında melezleme çalışmaları yapılarak genetik çeşitlilik sağlanabilir.

Tescilli tritikale çeşitlerinde morfolojik gözlemler alınarak, verim ve kalite özellikleri de değerlendirilerek; bu çalışmanın sonuçları da göz önüne alınarak ıslah çalışmaları planlanabilir.

KAYNAKLAR

Agrama, H. A., ve M. R. Tuinstra., 2003, "Phylogenetic diversity and relationships among sorghum accessions using SSRs and RAPDs." African Journal of Biotechnology 2.10. 334-340.

Aharoni, Asaph, ve Ann P. O'Connell., 2002, "Gene expression analysis of strawberry achene and receptacle maturation using DNA microarrays." Journal of Experimental Botany 53.377. 2073-2087.

Ahmed T.A., Alsamaraee S.A., Zaidan H.Z.ElmeerK., 2012, "Inter-simple Sequence Repeat (ISSR) Analysis of Somaclonal Variation in Date Palm Plantlets Regenerated from Callus," IPCBEE vol.35 ,s126-130.

Aka ve Kaçar, Y., 2001, "In vitro besi ortamında kullanılan değişik katılaştırıcı maddelerin ve farklı pH düzeylerinin bazı kiraz (*P. avium*) anaçlarının çoğaltılması üzerine etkileri I." Ulusal Sert Çekirdekli Meyveler Sempozyumu: 161-166.

Akagi H., Yokozeki Y., Inagaki A., Fujimura T., 1996, Microsatellite DNA markers for the rice chromosomes. Theor Appl Genet. 93: 1071–1077.

Akkaya, M. S., Bhagwat, A. A. and Cregan, P. B., 1992, Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean, Genetics, 134; 1131-1139.

Amiour, N., Bouguennec, A., Marcoz, C., Sourdille, P., Bourgoin, M., Khelifi, D., & Branlard, G. (2002). Diversity of seven glutenin and secalin loci within triticale cultivars grown in Europe. Euphytica, 123(3), 295-305.

Anonim, 2012, Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK), İstatiksel Tablolar, Tahıllar ve Diğer Bitkisel Ürünler, Tahıllar.

Arımura, G., Tashıro, K., Kuhara, S., Nıshıoka, T., Ozawa, R., and Takabayashı, J. 2000, Gene responses in bean leaves induced by herbivory and by herbivore-induced volatiles. Biochem. Biophys. Res. Commun. 277:305–310.

Arnau, G., Lallemand, J. and Bourgoin, M. 2002, Fast and reliable strawberry cultivar identification using inter simple sequence repeat (ISSR) amplification. Euphytica 129: 6979

Arslan E., Tamkoç A., 2011, "The Application of ISSR-PCR to Determine the genetic relationship and genetic diversity between narrow leaved bluegrass (Poa angustifolia) and rough bluegrass (*Poa trivialis*) accessions," Turk J Biol 35 s415-423.

Aykut, Fatma, 2007, Buğdayda kahverengi pasa dayanıklılık genleri ile ilgili moleküler markörler üzerinde araştırmalar. Diss. Ege Üniversitesi.

Bağcı, SA, 2001, Alternatif Bir Tahıl Tritikale. Konya Ticaret Borsası Dergisi. Sayı no: 10, s.22-29.

Bernard RB, E Nevo, AJ Douglas and A Beiles. 1997, Genetic diversity in wild barley (Hordeum spontaneum C. Koch) in the near east: a molecular analysis using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. Genetic Resources and Crop Evolution., 44: 147-157

Bhutta, W.M., S. Armghan, A. Javaid and I. Muhammad. 2005, Assessment of genetic divergence among wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes using random amplified polymorphism DNA (RAPD) analysis. Biol. Bratis., 60: 671-674.

Blair MW, Panaud O, McCouch SR 1999, Inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification for analysis of microsatellite motif frequency and fingerprinting in rice (Oryza sativa L.). Theor. Appl .Genet. 98: 780-792

Blake, T. K., Kadyrzhanova, D., Shepherd, K. W., Islam, A. K. M. R., Langridge, P. L., McDonald, C. L., ... & Talbert, L. E. 1996, STS-PCR markers appropriate for wheat-barley introgression. Theoretical and Applied Genetics, 93(5-6), 826-832.

Blattner, Frank R., and Ana G. Badani Méndez, 2001, "RAPD data do not support a second centre of barley domestication in Morocco." Genetic Resources and Crop Evolution 48.1, 13-19.

Bolibok H, Rakoczy-Trojanowska M, Hromada A and Pietrzykowski R 2005, Efficiency of different PCR-based marker systems in assessing genetic diversity among winter rye (*Secale cereale* L.) inbred lines. Euphytica 146: 109-116

Briggle, L. W., 1969, "Triticale—A Review 1." Crop Science 9.2, 197-202

Brunell, Mark S., Adam J. Lukaszewski, and Richard Whitkus, 1999, "Development of arm specific RAPD markers for rye chromosome 2R in wheat." Crop science 39.6, 1702-1706.

Budak, H., Shearman, R.C., Parmaksiz I., Gaussoin, R.E., Riordan T.P., Dweikat I. 2004, Molecular characterization of buffalograss germplasm using sequence-related amplified polymorphism markers. Theor. Appl. Genet. 108: 328-334.

Byrne RF, McMullen MD, Snook ME, Musket TA, Theur JM, Widstrom NW, Wiseman BR, Coe EH. 1996, Quantitative trait loci and metabolic pathways: genetic control of the concentration of maysin, a corn earworm resistance factor, in maize silks. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 93, 8820–8825.

Cao, W., Scoles, G., Hucl, P., & Chibbar, R. N. 1999, The use of RAPD analysis to classify Triticum accessions. Theoretical and Applied Genetics, 98(3-4), 602-607.

Cao, W., Hucl, P., Scoles, G., & Chibbar, R. N. 1998, Genetic diversity within spelta and macha wheats based on RAPD analysis. Euphytica, 104(3), 181-189.

Carvalho, A., Lima-Brito, J., Maçãs, B., & Guedes-Pinto, H. 2009, Genetic diversity and variation among botanical varieties of old Portuguese wheat cultivars revealed by ISSR assays. Biochemical genetics, 47(3-4), 276-294.

Charters YM, Wilkinson MJ 2000, The use of self pollinated progenies as in group for the genetic characterization of cocoa germplasm. Theor. Appl. Genet. 100: 160-166.

Charters, Y. M., Robertson, A., Wilkinson, M. J., & Ramsay, G. 1996, PCR analysis of oilseed rape cultivars (*Brassica napus* L. ssp. oleifera) using 5′-anchored simple sequence repeat (SSR) primers. Theoretical and Applied Genetics, 92(3-4), 442-447.

Chawla HS 2002, Introduction to plant biotechnology, 2nd edn, Science Publishers, Inc., Enfield

Chengxiang, A., Lisi, Z., Guotian, L., Hairong, W., Jing, F., & Qingzhong, L. 2008, Genetic diversity and relationship of cherry germplasm by ISSR markers. Chinese Agricultural Science Bulletin, 4.

Ching, A. D. A., Caldwell, K. S., Jung, M., Dolan, M., Smith, O. S. H., Tingey, S., ... & Rafalski, A. J. 2002, SNP frequency, haplotype structure and linkage disequilibrium in elite maize inbred lines. BMC genetics, 3(1), 19.

Chowdhury, M.A, B. Vandenberg, T. Warkentın 2002, Cultivar Identification and Genetic Relationship Among Selected Breeding Lines and Cultivars in Chickpea (*Cicer arietinum* L.). Euphytica, 127:317–325.

Collard, B. C., Jahufer, M. Z. Z., Brouwer, J. B., & Pang, E. C. K. 2005, An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. Euphytica, 142(1-2), 169-196.

Çiftçi İ, Yenice E, Eleroğlu E 2003, Use of Triticale alone and combination with wheat or maize: effect of diet type and enzyme supplementation on hen performance, egg quality, organ weights, intestinal viscosity and digestive system characteristics. Animal Feed Science and Technology, 105:149-161.

Çölkesen, M. 1995, Harran ovasında buğday tarımı ve sorunları üzerine yapılan araştırma ve gözlemler. Harran Üni., Zir. Fak. Der., 1 (1): 117-131.

Dakir ELH, Ruiz ML, Garcia P, Vega MP 2002, Genetic variability evaluation in a Moroccan collection of barley, *Hordeum vulgare* L., by means of storage proteins and RAPDs. Genet. Resour. Crop Evol. 49:619-631.

Dangi, R. S., Lagu, M. D., Choudhary, L. B., Ranjekar, P. K., & Gupta, V. S. 2004, Assessment of genetic diversity in Trigonella foenum-graecum and Trigonella caerulea using ISSR and RAPD markers. BMC Plant Biology, 4(1), 13.

Davis, G. L., McMullen, M. D., Baysdorfer, C., Musket, T., Grant, D., Staebell, M., ... & Houchins, K. 1999, A maize map standard with sequenced core markers, grass genome reference points and 932 expressed sequence tagged sites (ESTs) in a 1736-locus map. Genetics, 152(3), 1137-1172.

De Bustos, A., Casanova, C., Soler, C., & Jouve, N. 1998, RAPD variation in wild populations of four species of the genus *Hordeum* (Poaceae). Theoretical and applied genetics, 96(1), 101-111.

Debnath, S. C., Khanizadeh, S., Jamieson, A. R., & Kempler, C. 2008, Inter simple sequence repeat (ISSR) markers to assess genetic diversity and relatedness within strawberry genotypes. Canadian journal of plant science, 88(2), 313-322.

Devos KM, Gale MD, 1992, The use of random amplified polymorphic DNA markers in wheat. Theor Appl Genet; 84: 567-572

Dirik H., 1997, "Genetik Çeşitlilik ve Orman Gen Kaynaklarının Korunması," İ.Ü. Orman Fakültesi Dergisi. S113-121.

Doyle, Jeff J., and Jane L. Doyle., 1990, "Isolation ofplant DNA from fresh tissue." Focus 12.13: 39-40.

Dweikat, I., W. Zhang, and H. Ohm., 2002, "Development of STS markers linked to Hessian fly resistance gene H6 in wheat." Theoretical and Applied Genetics 105.5: 766-770.

Eserkaya Güleç T., Yıldırım A., Ateş Sönmezoğlu Ö., 2010, "Bitkilerde Markör Destekli Seleksiyon," Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi 3(2):67-79.

Fahima, T., Sun, G. L., Beharav, A., Krugman, T., Beiles, A., & Nevo, E., 1999, RAPD polymorphism of wild emmer wheat populations, Triticum dicoccoides, in Israel. Theoretical and Applied Genetics, 98(3-4), 434-447.

Fang, D. Q., Roose, M. L., Krueger, R. R. and Federici, C. T., 1997, Fingerprinting trifoliate orange germ plasm accessions with isozymes, RFLPs, and inter-simple sequence repeat markers. Theoretical and Applied Genetics, 95, 211–9.

Farooq, S., and F. Azam., 2002, "Molecular markers in plant breeding-I: Concepts and characterization." Pak J Biol Sci 5.10: 1135-1140.

Fernández ME, AM Figueiras, C Benito., 2002, The use of ISSR and RAPD markers for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity among barley cultivars with known origin. Theor Appl Genet., 104: 845-851

Fernandez-Figares, I., Marinetto, J., Royo, C., Ramos, J. M., & Del Moral, L. G., 2000, Amino-acid composition and protein and carbohydrate accumulation in the grain of triticale grown under terminal water stress simulated by a senescing agent. Journal of Cereal Science, 32(3), 249-258.

Filiz, Ertuğrul, and K. O. Ç. İbrahim., 2011, "Bitki Biyoteknolojisinde Moleküler Markörler." Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi 2011.2.

Furan, M. Alp., 2007, Buğdayda sarı pasa dayanıklılık genlerine ilişkin moleküler markörlerin araştırılması. Diss. Ege Üniversitesi.

Gaiero, P.,. Mazzella, C., Agostini, G. Bertolazzi, S., Rossato, M., 2011, "Genetic diversity among endangered Uruguayan populations of Butia Becc. Species based on ISSR" Plant Syst Evol, 292:105–116, 2011.

Galaev, A. V., L. T. Babayants, and Yu M. Sivolap., 2004, "Detection of the introgression of genome elements of the Aegilops cylindrica Host into the Triticum aestivum L. genome by ISSR and SSR analysis." Russian Journal of Genetics 40.12 : 1371-1377.

Galvan, M. Z., Bornet, B., Balatti, P. A., & 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(3), 297-301.

Gaweł, Malgorzata., Iwona Wiśniewska, and Andrzej Rafalski., 2002, "Semi-specific PCR for the evaluation of diversity among cultivars of wheat and triticale." Cell. Mol. Biol. Lett 7: 577-582.

Gilbert, J.E., R.V. Lewis, M.J. Wilkinson, and P.S.D. Caligari., 1999, Developing and appropriate strategy to assess genetic variability in plant germplasm collections. Theoretical and Applied Genetics 98:1125-1131. doi:10.1007/s001220051176.

Gonzales JM, Jouve N, Gustafson JP and Muniz LM., 2002, A Genetic Map of Molecular Markers in C *Triticosecale* Wittmack. Proceedings of the 5th International Triticale Symposium, Radzików, 85-93.

Goulão, Luís, and Cristina M. Oliveira., 2001, "Molecular characterisation of cultivars of apple (*Malus*× *domestica* Borkh.) using microsatellite (SSR and ISSR) markers." Euphytica 122.1: 81-89.

Guo, W. L., Gong, L., Ding, Z. F., Li, Y. D., Li, F. X., Zhao, S. P., & Liu, B., 2006, Genomic instability in phenotypically normal regenerants of medicinal plant Codonopsis lanceolata Benth. et Hook. f., as revealed by ISSR and RAPD markers. Plant cell reports, 25(9), 896-906.

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

Gupta, P. K., and Rajeev K. Varshney., 1999, "Molecular markers for genetic fidelity during micropropagation and germplasm conservation?." Current Science 76.10: 1308-1310.

Haisheng, L., Guizhu, C., 2008, "Genetic relationship among species in the genus Sonneratia in China as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) markers," Biochemical Systematics and Ecology, 36: 392-398.

Hajjar R., Jarvis D.I., Gemmil-Herren B., 2008, "The utility of crop genetic diversity in maintaining ecosystem services," Agriculture Ecosystem and Enviroment. 123: 261-270.

Harris, Stephen A., 1999, "Molecular approaches to assessing plant diversity." Plant conservation biotechnology. CRC Press. 37-50.

Hartl, L., and S. Seefelder., 1998, "Diversity of selected hop cultivars detected by fluorescent AFLPs." Theoretical and Applied Genetics 96.1: 112-116.

Hazen, P. S., Leroy, P., and Ward, R., 2002, AFLP in Triticum aestivumL.: Patterns of diversity and genome distributrion. Euphytica 125:89–102.Google Scholar

Hilooğlu M., 2012, Türkiye'de Yayılış Gösteren Petrorhagia Türleri Arasındaki Genetik Akrabalığın Moleküler Belirteçlerle Tespit Edilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.

Hou, Y. C., Yan, Z. H., Wei, Y. M., & Zheng, Y. L., 2005, Genetic diversity in barley from west China based on RAPD and ISSR analysis. Barley Genetics Newsletter, 35(1), 9-22.

Hoz, M. S. D. L., Davila, J. A., Loarce, Y., & Ferrer, E., 1996, Simple sequence repeat primers used in polymerase chain reaction amplifications to study genetic diversity in barley. Genome, 39(1), 112-117.

http://www.fao.org/faostat/en/

Hu, X. Y, H. W Ohm, and I. Dweikat., 1997, "Identification of RAPD markers linked to the gene Pm 1 for resistance to powdery mildew in wheat." Theoretical and Applied Genetics 94.6-7 : 832-840.

Huang, X., Börner, A., Röder, M., & Ganal, M., 2002, Assessing genetic diversity of wheat (Triticum aestivum L.) germplasm using microsatellite markers. Theoretical and Applied Genetics, 105(5), 699-707.

Hughes A.R., Stachowicz J.J., 2004, "Genetic diversity enhances the resistance of a seagrass ecosystem to disturbance," Proceeding of the National Academy of Sciences, 101:8998-9002.

Ipekdal, K., 2006, "Mikroarray Teknolojisi Evrimsel Ve Ekolojik Çalışmalarda Kullanımı." Proteomik ve Genomik.

Jaccoud, D., Peng, K., Feinstein, D., & Kilian, A., 2001, Diversity arrays: a solid state technology for sequence information independent genotyping. Nucleic acids research, 29(4), e25-e25.

Jarne, Philippe, and Pierre JL Lagoda., 1996, "Microsatellites, from molecules to populations and back." Trends in ecology & evolution 11.10: 424-429.

Jones, C. J., Edwards, K. J., Castaglione, S., Winfield, M. O., Sala, F., Van de Wiel, C., ... & Brettschneider, R., 1997, Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. Molecular breeding, 3(5), 381-390.

Jongeneel, C. Victor., 2000, "Searching the expressed sequence tag (EST) databases: panning for genes." Briefings in Bioinformatics1.1: 76-92.

Joshi, Chandrashekhar P., and Henry T. Nguyen., 1993, "Application of the random amplified polymorphic DNA technique for the detection of polymorphism among wild and cultivated tetraploid wheats." Genome 36.3: 602-609.

Joshi, S. P., Gupta, V. S., Aggarwal, R. K., Ranjekar, P. K., & Brar, D. S., 2000, Genetic diversity and phylogenetic relationship as revealed by inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism in the genus Oryza. Theoretical and Applied Genetics, 100(8), 1311-1320.

Kafkas, S., Ozkan, H., Ak, B. E., Acar, I., Atli, H. S., & Koyuncu, S., 2006, Detecting DNA polymorphism and genetic diversity in a wide pistachio germplasm: Comparison of AFLP, ISSR, and RAPD markers. Journal of the American Society for Horticultural Science, 131(4), 522-529.

Kantety, R. V., Zeng, X., Bennetzen, J. L., & Zehr, B. E., 1995, Assessment of genetic diversity in dent and popcorn (Zea mays L.) inbred lines using inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification. Molecular breeding, 1(4), 365-373.

Karp, Angela, O. L. E. Seberg, and Marcello Buiatti., 1996, "Molecular techniques in the assessment of botanical diversity." Annals of Botany 78.2: 143-149.

Kesawat, Mahipal Singh, and Basanta Das Kumar., 2009, "Molecular markers: it's application in crop improvement." Journal of Crop Science and Biotechnology 12.4: 169-181.

Kınacı, E., 1998, "Beslenmenin geleceğine yeni bir katkı: tritikale ve Türkiye'deki durumu." Unlu Mamuller Teknolojisi 3: 34-40.

Kolodinska Brantestam, A., Von Bothmer, R., Dayteg, C., Rashal, I., Tuvesson, S., & Weibull, J., 2004, Inter simple sequence repeat analysis of genetic diversity and relationships in cultivated barley of Nordic and Baltic origin. Hereditas, 141(2), 186-192.

Konieczny, Andrzej, and Frederick M. Ausubel., 1993, "A procedure for mapping Arabidopsis mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers." The plant journal 4.2 : 403-410.

Korbin, Kuras, and E. Zurawicz., 2002, "Fruit plant germplasm characterisation using molecular markers generated in RAPD and ISSR-PCR." Cellular and Molecular Biology Letters 7.2B: 785-794.

Kuras, Anita, and Małgorzata Korbin., 2004, "Comparison of suitability of RAPD and ISSR techniques for determination of strawberry (Fragaria× ananassa Duch.) relationship." Plant cell, tissue and organ culture 79.2: 189-193.

Kurata, N., Umehara, Y., Tanoue, H., & Sasaki, T., 1997, Physical mapping of the rice genome with YAC clones. In Oryza: From Molecule to Plant (pp. 101-113). Springer, Dordrecht.

Kün, E., 1996, "Tahıllar-I (Serin İklim Tahılları)." Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, Yayın 1451: 332.

Lin L., Hu Z-Y., Sui Ni S., Li J-Y., Qiu Y-X., 2013, "Genetic diversity of Camellia japonica (Theaceae), a species endangered to East Asia, detected by inter-simple sequence repeat (ISSR)," Biochemical Systematics and Ecology 50:199–206.

Lisek, A., and E. Rozpara., 2009, "Identification and genetic diversity assessment of cherry cultivars and rootstocks using the ISSR-PCR technique." Journal of Fruit and Ornamental Plant Research 17.2: 95-106.

Liu, Bao, and Jonathan F. Wendel., 2001, "Intersimple sequence repeat (ISSR) polymorphisms as a genetic marker system in cotton." Molecular Ecology Notes 1.3: 205-208.

Liu, Z. J, and J. F. Cordes., 2004, "DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics." Aquaculture 238.1-4: 1-37.

Lukaszewski, A. J., and J. P. Gustafson., 1987, "Cytogenetics of triticale." Plant breeding reviews 5: 41-93.

Lynch, Michael, and Brook G. Milligan., 1994, "Analysis of population genetic structure with RAPD markers." Molecular ecology 3.2: 91-99.

Mackill, D. J., Zhang, Z., Redona, E. D., & Colowit, P. M., 1996, Level of polymorphism and genetic mapping of AFLP markers in rice. Genome, 39(5), 969-977.

Marić, S., Bolarić, S., Martinčić, J., Pejić, I., & Kozumplik, V., 2004, Genetic diversity of hexaploid wheat cultivars estimated by RAPD markers, morphological traits and coefficients of parentage. Plant breeding, 123(4), 366-369.

Martín, J. P., Sánchez-Yélamo, M. D., 2000, "Genetic relationships among species of the genus Diplotaxis (Brassicaceae) using inter-simple sequence repeat markers," Theor Appl Genet, 101:1234–1241.

Martín, J. P., Sánchez-Yélamo, M. D., 2000, "Genetic relationships among species of the genus Diplotaxis (Brassicaceae) using inter-simple sequence repeat markers," Theor Appl Genet, 101:1234–1241.

McCouch, S. R., and S. D. Tanksley., 1991, "Development and use of restriction fragment length polymorphism in rice breeding and genetics." Rice biotechnology 6.

Mergoum, M., Ryan, J., Shroyer, J. P., & Monem, M. A., 1992, Potential for adopting triticale in Morocco. Journal of Natural Resources and Life Sciences Education, 21(2), 137-141.

Métais, I., Aubry, C., Hamon, B., Jalouzot, R., & Peltier, D., 2000, Description and analysis of genetic diversity between commercial bean lines (Phaseolus vulgaris L.). Theoretical and Applied Genetics, 101(8), 1207-1214.

Michelmore RW, Paran I, Kesseli RV., 1991, Identification of markers linked to disease resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions using segregating populations. Proc Natl Acad Sci USA 88: 9828-9832

Moreno S, Martin JP, Ortiz JM., 1998, Inter-simple sequence repeat PCR for characterization of closely related grapevine germplasm. Euphytica 101: 117-125.

Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R. K., Horn, G. T., & Erlich, H., 1986, Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. In Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology (Vol. 51, pp. 263-273). Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Muntzing, A., 1989, "Triticale Today. Tricale: A Promissing Addition To The World's Cereal Grains. 1-7. National Research Council.".

Murphy, R.W., J.W. Sites, D.G. Buth and C.H. Haufler., 1990, Protein I: isozyme electrophoresis. pp. 45-126. In: Molecular systematics. (Eds.): D.H. Hillis and C. Moritz. Sinauer Assoc., Sunderland, MA.

Müntzing, Arne., 1979, "Triticale-Results and problems." Fortschritte der Pflanzenzuechtung (Germany).

Nagaoka, T., and Y1 Ogihara., 1997, "Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers." Theoretical and applied genetics 94.5: 597-602.

Nevo E, Baum B, Beiles A, Johnson DA., 1998, Ecological correlates of RAPD DNA diversity of wild barley, Hordeum spontaneum, in the Fertile Crescent. Genetic resources and Crop Evolution 45 151-159.

Orlovskaya, O. A., L. V. Koren, and L. V. Khotyleva., 2012, "Genetic polymorphism evaluation of spring triticale (× Triticosecale wittmack) samples with use of RAPD and ISSR markers." Russian Journal of Genetics: Applied Research 2.6: 508-512.

Ozturk, Z. N., Talamé, V., Deyholos, M., Michalowski, C. B., Galbraith, D. W., Gozukirmizi, N., ... & Bohnert, H. J., 2002, Monitoring large-scale changes in transcript abundance in drought-and salt-stressed barley. Plant molecular biology, 48(5-6), 551-573.

Özatay, Şehnaz., 2007, Mercimek genomunun AFLP, RAPD, ISSR ve bazı morfolojik markörler kullanarak haritalanması. Diss. Ege Üniversitesi.

Özbek, Ö., 2006, Yabani Tetraploit Buğday Triticum turgidum var. Dicoccoides (körn,schwein) Popülasyonlarında Genetik Çeşitliliğin Moleküler Markörler (AFLP, RFLP) ile Tespit Edilmesi. Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora tezi, (PhD Thesis).

Palumbi, Steve., 1991, "Simple fool's guide to PCR.".

Pammi, S., Schertz, K., Xu, G., Hart, G., & Mullet, J. E., 1994, Random-amplified-polymorphic DNA markers in sorghum. Theoretical and applied genetics, 89(1), 80-88.

Parmaksız, İ., 2004, Papaver Cinsi Oxytona Seksiyonunun Türkiye'de Yetişen Türlerinde Genetik Çeşitliliğin RAPD Markörleri İle Analizi. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Pejic, I., Ajmone-Marsan, P., Morgante, M., Kozumplick, V., Castiglioni, P., Taramino, G., & Motto, M., 1998, Comparative analysis of genetic similarity among maize inbred lines detected by RFLPs, RAPDs, SSRs, and AFLPs. Theoretical and Applied genetics, 97(8), 1248-1255.

Plaschke, J., M. W. Ganal, and M. S. Röder., 1995, "Detection of genetic diversity in closely related bread wheat using microsatellite markers." Theoretical and Applied Genetics 91.6-7 : 1001-1007.

Pollegioni P.; Major A.; Bartoli S.; Ducci F.; Proietti R.; Malvolti M. E.; 2006, Ananzato D. Application of microsatellite and dominant molecular markers for the discrimination of species and interspecific hybrids in genus Juglans. Acta Hort 705: 191–197.

Pollegioni, P., Bartoli, S., Cannata, F., & Malvolti, M. E., 2003, Genetic differentiation of four Italian walnut (Juglans regia L.) varieties by inter simple sequence repeat (ISSR). Journal of Genetics and Breeding (Italy).

Potter, D., Gao, F., Aiello, G., Leslie, C., & McGranahan, G., 2002, Intersimple sequence repeat markers for fingerprinting and determining genetic relationships of walnut (Juglans regia) cultivars. Journal of the American Society for Horticultural Science, 127(1), 75-81.

Powell, W., Morgante, M., Andre, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingey, S., & Rafalski, A., 1996, The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. Molecular breeding, 2(3), 225-238.

Pradeep Reddy M., Sarla N., Siddiq E.A., 2002, "Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding," Euphytica 128: 9–17.

Prevost, A., and M. J. Wilkinson., 1999, "A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars." Theoretical and applied Genetics 98.1: 107-112.

Prins, R., Groenewald, J. Z., Marais, G. F., Snape, J. W., & Koebner, R. M. D., 2001, AFLP and STS tagging of Lr19, a gene conferring resistance to leaf rust in wheat. Theoretical and Applied Genetics, 103(4), 618-624.

Pupilli, F., Labombarda, P., Scotti, C., & Arcioni, S., 2000, RFLP analysis allows for the identification of alfalfa ecotypes. Plant breeding, 119(3), 271-276.

Qian, Wei, Song Ge, and D-Y. Hong., 2001, "Genetic variation within and among populations of a wild rice Oryza granulata from China detected by RAPD and ISSR markers." Theoretical and Applied Genetics 102.2-3: 440-449.

Rafalski, J. A., Vogel, J. M., Morgante, M., Powell, W., Andre, C., & Tingey, S. V., 1996, Generating and using DNA markers in plants. In Nonmammalian genomic analysis (pp. 75-134). Academic Press.

Rakoczy-Trajanowska M., Bolibok H., 2004, "Chracteristics and a comparison of three classes of microsatellite-based markers and their application in plants," Cell Mol. Biol. Lett. 9(2): 221-238.

Ridout, C. J., Donini, P., Ridout, C. J., & Donini, P., 1999, Use of AFLP in cereals research. Trends in Plant Science, 4(2), 76-79.

Roy, J. K., Lakshmikumaran, M. S., Balyan, H. S., & Gupta, P. K., 2004, AFLP-based genetic diversity and its comparison with diversity based on SSR, SAMPL, and phenotypic traits in bread wheat. Biochemical Genetics, 42(1-2), 43-59.

Roy, J. K., Prasad, M., Varshney, R. K., Balyan, H. S., Blake, T. K., Dhaliwal, H. S., ... & Gupta, P. K., 1999, Identification of a microsatellite on chromosomes 6B and a STS on 7D of bread wheat showing an association with preharvest sprouting tolerance. Theoretical and Applied Genetics, 99(1-2), 336-340.

Röder, M. S., Korzun, V., Wendehake, K., Plaschke, J., Tixier, M. H., Leroy, P., & Ganal, M. W., 1998, A microsatellite map of wheat. Genetics, 149(4), 2007-2023.

Röder, M. S., Plaschke, J., König, S. U., Börner, A., Sorrells, M. E., Tanksley, S. D., & Ganal, M. W., 1995, Abundance, variability and chromosomal location of microsatellites in wheat. Molecular and General Genetics MGG, 246(3), 327-333.

Russell, J. R., Fuller, J. D., Macaulay, M., Hatz, B. G., Jahoor, A., Powell, W., & Waugh, R., 1997, Direct comparison of levels of genetic variation among barley accessions detected by RFLPs, AFLPs, SSRs and RAPDs. Theoretical and Applied genetics, 95(4), 714-722.

S. Hamza, W.B. Hamida, A. Rebaï, M. Harrabi, 2004, SSR-based genetic diversity assessment among Tunisian winter barley and relationship with morphological traits Euphytica, 135 pp. 107-118

Sachidanandam, R., D. Weissman, and S. C. Schmidt. "Kakol, JM; Stein, LD; Marth, G.; Sherry, S.; Mullikin, JC; Mortimore, BJ; Willey, DL; Hunt, SE; Cole, CG; Coggill, PC; Rice, CM; Ning, Z.; Rogers, J.; Bentley, DR; Kwok, P.; Mardis, ER; Yeh, RT; Schultz, B.; Cook, L.; Davenport, R.; Dante, M.; Fulton, L.; Hillier, L.; Waterston, RH; McPherson, JD, 2001, A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms." Nature 409.6822: 928-933.

Saini, N., Jain, N., Jain, S., & Jain, R. K., 2004, Assessment of genetic diversity within and among Basmati and non-Basmati rice varieties using AFLP, ISSR and SSR markers. Euphytica, 140(3), 133-146.

Saleh B., 2011, "Efficiency of RAPD and ISSR markers in Assessing Genetic Variation in Arthrocnemum macrostachyum (Chenopodiaceae)," Brazilian Archives Of Biology And Technology. Vol 54;5, 859-866.

Salimath, S. S., Oliveira, A. C. D., Bennetzen, J. L., & Godwin, I. D., 1995, Assessment of genome origins and genetic diversity in the genus Eleusine with DNA markers. Genome, 38(4), 757-763.

Santra, D. K., Tekeoglu, M., Ratnaparkhe, M., Kaiser, W. J., & Muehlbauer, F. J., 2000, Identification and mapping of QTLs conferring resistance to ascochyta blight in chickpea. Crop Science, 40(6), 1606-1612.

Schachermayr, Gabriele, Catherine Feuillet, and Beat Keller., 1997, "Molecular markers for the detection of the wheat leaf rust resistance gene Lr10 in diverse genetic backgrounds." Molecular Breeding 3.1: 65-74.

Schut, J. W., X. Qi, and P. Stam., 1997, "Association between relationship measures based on AFLP markers, pedigree data and morphological traits in barley." Theoretical and Applied Genetics 95.7: 1161-1168.

Selbach, A., and S. Cavalli-Molina., 2000, "RAPD characterization of Brazilian barley (Hordeum vulgare ssp. vulgare) varieties." Euphytica 111.2: 127-135.

Shan, Xueyan, T. K. Blake, and L. E. Talbert., 1999, "Conversion of AFLP markers to sequence-specific PCR markers in barley and wheat." Theoretical and Applied Genetics 98.6-7: 1072-1078.

Smith, P., R. Koebner, and L. Boyd., 2002, "The development of a STS marker linked to a yellow rust resistance derived from the wheat cultivar Moro." Theoretical and Applied Genetics 104.8: 1278-1282.

Sobrino, Beatriz, and Angel Carracedo., 2005, "SNP typing in forensic genetics." Forensic DNA Typing Protocols. Humana Press, 107-126.

Soleimani, V. D., B. R. Baum, and D. A. Johnson., 2003, "Efficient validation of single nucleotide polymorphisms in plants by allele-specific PCR, with an example from barley." Plant molecular biology reporter 21.3: 281-288.

Soller, M., and J. S. Beckmann., 1983, "Genetic polymorphism in varietal identification and genetic improvement." Theoretical and Applied Genetics 67.1: 25-33.

Sönmezoğlu, Ö. A., Yıldırım, A., Güleç, T. E., & Kandemir, N., 2010, Markör Destekli Seleksiyonun Bugday Islahında Kullanımı. Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 2010(1), 105-112.

Sözen E., 2010, "Evaluatıon of ISSR Markers to Assess Genetic Variability and Relationship Among Winter Triticale (x Tritico secale Wıttmack) Cultivars," Pak. J. Bot., 42(4): 2755-2763.

Stallknecht, G. F., K. M. Gilbertson, and J. E. Ranney., 1996, "Alternative wheat cereals as food grains: Einkorn, emmer, spelt, kamut, and triticale." Progress in new crops: 156-170.

Staub, Jack E., Felix C. Serquen, and Manju Gupta., 1996, "Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding." HortScience 31.5: 729-741.

Stephenson, P., Bryan, G., Kirby, J., Collins, A., Devos, K., Busso, C., & Gale, M., 1998, Fifty new microsatellite loci for the wheat genetic map. Theoretical and Applied Genetics, 97(5-6), 946-949.

Strelchenko, Pjotr, Olga Kovalyova, and Kazutoshi Okuno., 1999, "Genetic differentiation and geographical distribution of barley germplasm based on RAPD markers." Genetic resources and crop evolution 46.2: 193-205.

Sun, L. V., Chen, L., Greil, F., Negre, N., Li, T. R., Cavalli, G., ... & White, K. P., 2003, Protein–DNA interaction mapping using genomic tiling path microarrays in Drosophila. Proceedings of the National Academy of Sciences, 100(16), 9428-9433.

Sun, Q., Ni, Z., Liu, Z., Gao, J., & Huang, T., 1998, Genetic relationships and diversity among Tibetan wheat, common wheat and European spelt wheat revealed by RAPD markers. Euphytica, 99(3), 205-211.

Sunyaev, S. R., Eisenhaber, F., Rodchenkov, I. V., Eisenhaber, B., Tumanyan, V. G., & Kuznetsov, E. N., 1999, PSIC: profile extraction from sequence alignments with position-specific counts of independent observations. Protein engineering, 12(5), 387-394.

Szućko, I., and S. M. Rogalska., 2015, "Application of ISSR-PCR, IRAP-PCR, REMAP-PCR, and ITAP-PCR in the assessment of genomic changes in the early generation of triticale." Biologia plantarum 59.4: 708-714.

Şahin-Çevik, M. "Mikroarray Teknolojisi ve Bitkilerde Uygulama Alanları." Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi 9.3.

ŞEHİRALİ, S., GENÇTAN, T., BİRSİN, M. A., ZENCİRCİ, N., & UÇKESEN, B., 2000, TÜRKİYE TAHIL VE YEMEKLİK TANE BAKLAGİL ÜRETİMİNİN BUGÜNKÜ VE GELECEKTEKİ BOYUTLARI.

Talamè, V., 2000, "Comparative analysis of genetic diversity among European spelt and wheat accessions using AFLP, RFLP and SSR markers." Proceedings of the 6th International Wheat Conference.

Talbert, L. E., Blake, N. K., Chee, P. W., Blake, T. K., & Magyar, G. M., 1994, Evaluation of “sequence-tagged-site” PCR products as molecular markers in wheat. Theoretical and Applied Genetics, 87(7), 789-794.

Tanksley, Steven D., 1983, "Molecular markers in plant breeding." Plant Molecular Biology Reporter 1.1: 3-8.

Tanyolac, Bahattin., 2003, "Inter-simple sequence repeat (ISSR) and RAPD variation among wild barley (Hordeum. vulgare subsp. spontaneum) populations from west Turkey." Genetic Resources and Crop Evolution 50.6: 611-614.

Taşpınar M.S., Tosun M., 2002, "İzoenzim Elektroforez Tekniğinin Bitki Islahında Kullanımı," Atatürk Üniv. Ziraat Fak. Derg. 33 (4), 451-456.

Tautz, Diethard., 1989, "Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers." Nucleic acids research 17.16: 6463-6471.

Tekeoglu, M., Rajesh, P.N., Muehlbauer, F.J., 2002. Integration of sequence tagged microsatellite sites to the chickpea genetic map. Theoretical and Applied Genetics, 105:847-854.

Terzi, V., 1997, "RAPD markers for fingerprinting barley, oat and triticale varieties." Journal of Genetıcs and Breedıng 51: 115-120.

Terzi, V., Pecchioni, N., Faccioli, P., Kučera, L., & Stanca, A. M., 2001, Phyletic relationships within the genus Hordeum using PCR-based markers. Genetic Resources and Crop Evolution, 48(5), 447-458.

Tonk, F. A., Tosun, M., Ilker, E., Istipliler, D., & Tatar, O., 2014, Evaluation and comparison of ISSR and RAPD markers for assessment of genetic diversity in triticale genotypes. Bulgarian Journal of Agricultural Science, 20(6), 1413-1420.

Tyrka, Mirosław, Dorota Tyrka, and Maria Wędzony., 2015, "Genetic map of triticale integrating microsatellite, DArT and SNP markers." PloS one 10.12: e0145714.

Ulukan H., 2007, "Klasik Bitki Islahı ve Genetik Mühendisliği ile Oluşturulan Değişimlere Genel Bakış," U. Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi, Cilt 21, Sayı 2, 27-40.

Vaillancourt, A., Nkongolo, K. K., Michael, P., & Mehes, M., 2008, Identification, characterisation, and chromosome locations of rye and wheat specific ISSR and SCAR markers useful for breeding purposes. Euphytica, 159(3), 297-306.

Varughese, G., Pfeiffer, W. H. & Peňa, R. J., 1996. Triticale: a successful alternative crop 2. Cereal Foods World, 41, 7, 635–645.

Vierling, Richard A., and Henry T. Nguyen., 1992, "Use of RAPD markers to determine the genetic diversity of diploid, wheat genotypes." Theoretical and Applied Genetics 84.7-8: 835-838.

Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Lee, T. V. D., Hornes, M., ... & Zabeau, M., 1995, AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic acids research, 23(21), 4407-4414.

Wang, H., Miyazaki, S., Kawai, K., Deyholos, M., Galbraith, D. W., & Bohnert, H. J., 2003, Temporal progression of gene expression responses to salt shock in maize roots. Plant Molecular Biology, 52(4), 873-891.

Waugh, Robbie, and Wayne Power., 1992, "Using RAPD markers for crop improvement." Trends in Biotechnology 10: 186-191.

Weber, James L., and Paula E. May., 1989, "Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction." American journal of human genetics 44.3: 388.

Weeden, N. F., 1992, "Inheritance and reliability of RAPD markers." Application of RAPD technology to plant breeding. Joint Plant Breeding Symposia Series.

Weiland, J. J., and M. H. Yu., 2003, "A cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) marker associated with root-knot nematode resistance in sugarbeet." Crop science 43.5: 1814-1818.

Williams, J. G., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., & Tingey, S. V., 1990, DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic acids research, 18(22), 6531-6535.

Wu, K. S., Jones, R., Danneberger, L., & Scolnik, P. A., 1994, Detection of microsatellite polymorphisms without cloning. Nucleic acids research, 22(15), 3257.

Xiao LQ, Ge XJ, Gong X, Hao G, Zheng SX., 2004, "ISSR variation in the endemic and endangered plant Cycas guizhouensis (Cycadaceae)," Annals of Botany, 94: 133-138.

Yalım, D., 2005, "Türkiye'de yetişen arpa çeşitlerinde genetik çeşitliliğin ISSR (Basit Dizilim Tekrarları) moleküler markör tekniği ile saptanması." Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

Yıldırım, A., and N. Kandemir., 2001, "Genetik markörler ve analiz metodları." Bitki Biyoteknolojisi II., Bölüm 23: 334-363.

Yıldırım, M., Şentürk, Ş. ve Tülek, A., 2007, 1875'ten Bugüne Tritikale. Türkiye VII. Tarla Bitkileri Kongresi, 25-27 Haziran, 2007, Erzurum, 1: 26-29.

Zhang Q.X., Shen Y.K., Shao R.X., Fang J., He Y.Q., Ren J.X., Zheng B.S., Chen G.J., 2013, "Genetic diversity of natural Miscanthus sinensis populations in China revealed by ISSR markers," Biochemical Systematics and Ecology 48:248–256.

Zhang, G., Y. Guo, S.L. Chen and S.Y. Chen., 1995, RFLP tagging of a salt tolerance gene in rice. Plant Sci., 110: 227-234.

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

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı	**:**	Merve ÇARIKCI
Uyruğu	**:**	T. C.
Doğum Yeri ve Tarihi	**:**	ESKİŞEHİR 13.01.1989
Telefon	**:**	0 555 244 02 13
Faks	**:**	
e-mail	**:**	m_carikci_@hotmail.com

EĞİTİM

Derece		**Adı, İlçe, İl**	**Bitirme Yılı**
Lise	:	**Süleyman Çakır Lisesi**	**2006**
Üniversite	:	**Uludağ Üniversitesi**	**2014**
Yüksek Lisans	:	**Selçuk Üniversitesi**	**2019**
Doktora	:		

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	**Kurum**	**Görevi**
2014-2016	**Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsü**	**Ziraat Mühendisi**
2016-…	**Eti Gıda San. Ve Tic. A.Ş.**	**Tarımsal Üretim Geliştirme Yöneticisi**

UZMANLIK ALANI

YABANCI DİLLER

BELİRTMEK İSTEĞİNİZ DİĞER ÖZELLİKLER

YAYINLAR

Yorgancılar, Ö., Yorgancılar, A., Dikmen, S., Dikmen, S., Çarıkçı, M., Evcen, F., ... & Sirel, Z. (2016). Buğdayda F2 Generasyonunda Anter Kültürü Tekniği Kullanılarak Saf Hatların Elde Edilmesi

Imren Kutlu, Merve Carikci, Ozcan Yorgancilar, Aysel Yorgancilar, Yasar Karaduman And Zeynep Sirel. Glutenin Subunits, Gliadın Patterns And Glutopeak Characteristics Of Turkey's Doubled Haploid Wheat Lines. Pakistan Journal of Botany, 49(5): 1925-1932, 2017.

Carikci, M., Bagci, S. A., Yorgancilar, O., Van, F., Kutlu, I., & Yumurtaci, A. (2017). Molecular Characterization of Some Triticale Cultivars in Turkey. International Journal of Crop Breeding and Genetics, 3(1), 61-65.