

**TÜRKİYE'DE YETİŞTİRİLEN BAZI ÇELTİK
ÇEŞİTLERİNİN GENETİK ÇEŞİTLİLİĞİNİN ISSR TEKNİĞİ
İLE SAPTANMASI**

Bahadır TÖRÜN
Yüksek Lisans Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı
Temmuz-2013

**Bu tez çalışması Anadolu Üniversitesi Bilmsel Araştırma Projeleri
Komisyonu Başkanlığı Tarafından Desteklenmiştir. Proje No: 1302F029**

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Bahadır TÖRÜN'ün 'Türkiye'de Yetiştirilen Bazı Çeltik Çeşitlerinin Genetik Çeşitliliğinin ISSR Tekniği İle Saptanması' başlıklı **Biyoloji** Anabilim Dalındaki Yüksek Lisans Tezi 01/07/2013 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı) :	Doç. Dr. EMEL SÖZEN	
Üye (Asil) :	Prof. Dr. ERSİN YÜCEL	
Üye (Asil) :	Yard. Doç. Dr. İSMAİL POYRAZ	

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun.....
tarih vesayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

TÜRKİYE'DE YETİŞTİRİLEN BAZI ÇELTİK ÇEŞİTLERİNİN GENETİK ÇEŞİTLİLİĞİNİN ISSR TEKNİĞİ İLE SAPTANMASI

Bahadır TÖRÜN

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Emel SÖZEN

2013, 64 Sayfa

Bu tez çalışmasında, Türkiye’de geliştirilen 28 çeltik (*Oryza sativa* L.) çeşitlerinin genetik çeşitlilik seviyeleri ISSR markırları kullanılarak belirlenmiştir. Çalışmada 20 adet ISSR primeri kullanılmış ve 217'si polimorfik toplam 268 bant elde edilmiştir. Oluşan bantların büyüklükleri 250 bp ile 2500 bp arasında değişmiştir. Primerlerin oluşturduğu bant sayıları 5-22 arasında olup primer başına ortalama bant sayısı ise 13.4 olarak hesaplanmıştır. Elde edilen bantlar var (1) ya da yok (0) şeklinde değerlendirilmiş ve NTSYS Pc 2.0 programı kullanılarak benzerlik matrisi ve UPGMA tekniğine göre dendrogram oluşturulmuştur. Primerlerin hepsi polimorfizm göstermiştir. Primerlerin polimorfizm yüzdeleri %40.00 ile %94.12 arasında değişmiş, ortalama polimorfizm ise %80.97 olarak bulunmuştur. Polimorfizm Bilgi İçeriği (PBI) değerleri 0.274 ile 0.374 arasında değişmiş ve ortalama değeri 0.347 olarak hesaplanmıştır. Çalışma sonucunda birbirine en çok benzeyen çeşitler Efe ve Hamzadere (0.856) , birbirine en az benzeyen çeşitlerin ise Demir ve Bafra Yıldızı (0.395) çeşitleri olduğu görülmüştür. Bu çalışmanın devam etmekte olan çeltik ıslah çalışmalarına katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Oryza sativa* , Çeltik, ISSR-PCR, Genetik Çeşitlilik

ABSTRACT

Master of Science Thesis

DETERMINATION OF THE GENETIC DIVERSITY BETWEEN SOME RICE VARIETIES DEVELOPED IN TURKEY USING ISSR TECHNIQUE

Bahadır TÖRÜN

Anadolu University Graduate School of Sciences Biology Program

Supervisor: Assoc. Prof.Dr. EMEL SÖZEN

2013, 66 Pages

In this study, the genetic diversity levels of 28 different Rice varieties developed in Turkey were determined by using ISSR markers. We used 20 different ISSR primers and obtained 268 bands of which 217 were polymorphic. Band size varied between 250 bp and 2500 bp. Band numbers for each primer produced varied between 5-22 with an average number of 13.4. Bands were recorded as present (1) or absent (0) and similarity matrix was created by using NTSYS Pc 2.0 software and a dendrogram was constructed based on UPGMA technique. All primers used showed polymorphism. Polymorphism percentages varied between 40.00% and 94.12% with an average of 80.97%. Polymorphism Information Content (PIC) values varied between 0.274 and 0.374 with an average value of 0.347. As a result, the most similar varieties were found as Efe and Hamzadere (0.856) and the least similar varieties were found as Demir and Bafra Yıldızı (0.395). The results obtained from this study is thought to contribute the ongoing rice improvement programs.

Key Words: *Oryza sativa* , Rice, ISSR-PCR, Genetic Diversity

TEŞEKKÜR

Yüksek lisansımda ve tez çalışmamın her aşamasında büyük yardımı olan danışmanım Doç. Dr. Emel SÖZEN'e

Yine tez çalışmamın her aşamasında bana yardım eden Muhip HİLOOĞLU'na,

Ayrıca aileme,

Teşekkür ederim.

Bahadır TÖRÜN

Temmuz 2013

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	viii

1.GİRİŞ	1
1.1. <i>Oryza sativa</i> L.'nın Taksonomisi.....	1
1.2. <i>Oryza</i> Cinsinin Filogenisi.....	1
1.3. Çeltik (<i>Oryza sativa</i>) türünün morfolojik özellikleri.....	4
1.4. Çeltiğin Genetik Özellikleri.....	5
1.5. Çeltiğin Yaşam Döngüsü.....	5
1.6. Çeltik Yetiştirme Koşulları.....	6
1.7. Türkiye'de Çeltik Yetiştiriciliği.....	7
1.8. Bitki Islahı ve Genetik Çeşitlilik.....	9
1.9. Genetik Çeşitlilik Tespitinde Kullanılan Belirteç Sistemleri.....	11
1.9.1. Morfolojik belirteçler.....	11
1.9.2. Biyokimyasal belirteçler.....	12
1.9.3. DNA belirteçleri.....	12
1.9.3.1. Hibridizasyona Dayalı Belirteçler.....	12
1.9.3.2. PCR'a Dayalı Belirteç Sistemleri.....	13
A. RAPD-PCR.....	14
B. AFLP-PCR.....	14
C. SSR-PCR.....	14
D. SRAP-PCR.....	15
E. ISSR-PCR.....	15
1.10. Konu İle İlgili Önceki Çalışmalar.....	17

1.11. Çalışmanın Amacı.....	20
2. MATERYAL, YÖNTEM	21
2.1. Materyal.....	21
2.2. Yöntem.....	23
2.2.1. Çeltik tohumlarının çimlendirilmesi.....	24
2.2.2. DNA izolasyonu ve saflaştırılması.....	24
2.2.3. DNA miktar ölçümü.....	25
2.2.4. ISSR-PCR analizleri.....	25
2.2.5. Jel Elektroforezi Uygulamaları.....	28
2.2.6. Elektroforez Sonuçlarının Görüntülenmesi ve Değerlendirilmesi.....	29
2.2.7. Polimorfizm Bilgi İçeriğinin Hesaplanması.....	29
3. BULGULAR	30
3.1. DNA İzolasyonu.....	30
3.2.DNA Miktar ve Saflık Tayini.....	30
3.3. ISSR PCR Optimizasyonu.....	32
3.4. ISSR PCR Analizi.....	33
3.5. PCR Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	44
4. TARTIŞMA,SONUÇ ve ÖNERİLER	48
4.1. Bant Sayıları ve Polimorfizm Oranlarının Belirlenmesi.....	48
4.2. Polimorfizm Bilgi İçeriğinin Değerlendirilmesi.....	50
4.3. Benzerlik Çizelgesinin ve Dendrogramın Değerlendirilmesi.....	51
4.4. Çeşitlerin Benzerliğinin Ebeveynler Açısından Değerlendirilmesi.....	52
4.5. Sonuçlar.....	55
5. KAYNAKLAR	56

ŞEKİLLER DİZİNİ

1.1 Moleküler ve morfolojik karakterlere dayanılarak hazırlanan Poaceae ailesinin filogenisi.....	2
1.2. <i>Oryza sativa</i> L. başakları.....	4
2.1 Fermantas Gene Ruler 100 bp DNA ladder Plus.....	28
3.1 GAG-(CAA) ₅ primeri ile <i>Oryza sativa</i> çeşitlerinde oluşan bant profilleri	34
3.2 (CAG) ₅ primeri ile <i>Oryza sativa</i> çeşitlerinde oluşan bant profilleri	34
3.3 VHV-(GT) ₇ -G primeri ile <i>Oryza sativa</i> çeşitlerinde oluşan bant profilleri.....	35
3.4 (AG) ₈ -G primeri ile <i>Oryza sativa</i> çeşitlerinde oluşan bant profilleri.....	35
3.5 (GA) ₈ -T primeri ile <i>Oryza sativa</i> çeşitlerinde oluşan bant profilleri.....	36
3.6 (GT) ₈ -YC primeri ile <i>Oryza sativa</i> çeşitlerinde oluşan bant profilleri.....	36
3.7 (GA) ₈ -A primeri ile <i>Oryza sativa</i> çeşitlerinde oluşan bant profilleri.....	37
3.8 (AG) ₈ -T primeri ile <i>Oryza sativa</i> çeşitlerinde oluşan bant profilleri.....	37
3.9 (AG) ₈ -C primeri ile <i>Oryza sativa</i> çeşitlerinde oluşan bant profilleri.....	38
3.10 (AC) ₈ -C primeri ile <i>Oryza sativa</i> çeşitlerinde oluşan bant profilleri.....	38
3.11 (CAA) ₅ primeri ile <i>Oryza sativa</i> çeşitlerinde oluşan bant profilleri.....	39
3.12 (TCG) ₆ -G primeri ile <i>Oryza sativa</i> çeşitlerinde oluşan bant profilleri.....	39
3.13 (AGC) ₆ -T primeri ile <i>Oryza sativa</i> çeşitlerinde oluşan bant profilleri.....	40
3.14 (AGC) ₈ -G primeri ile <i>Oryza sativa</i> çeşitlerinde oluşan bant profilleri.....	40
3.15 (AGC) ₆ -C primeri ile <i>Oryza sativa</i> çeşitlerinde oluşan bant profilleri.....	41
3.16 (AC) ₈ -G primeri ile <i>Oryza sativa</i> çeşitlerinde oluşan bant profilleri.....	41
3.17 (GT) ₈ -C primeri ile <i>Oryza sativa</i> çeşitlerinde oluşan bant profilleri.....	42
3.18 DBD-(AC) ₇ primeri ile <i>Oryza sativa</i> çeşitlerinde oluşan bant profilleri.....	42
3.19 DD-(CGA) ₅ primeri ile <i>Oryza sativa</i> çeşitlerinde oluşan bant profilleri.....	43
3.20 (AG) ₈ -YT primeri ile <i>Oryza sativa</i> çeşitlerinde oluşan bant profilleri.....	43
3.21 Çeltik çeşitlerinin ISSR belirteçleri kullanılarak oluşturulan dendrogramı...	47

ÇİZELGELER DİZİNİ

1.1 Çeltik (<i>Oryza sp</i>) cinsinin türleri, kromozom sayısı, genom grubu ve yetiştirme alanları.....	3
1.2 PCR temelli tekniklerin karşılaştırılması.....	13
2.1. Tarımsal Araştırma Enstitülerinden temin edilen çeşitleri ve ebeveyn bilgileri.....	22
2.2 Çeltik çeşitlerinin olgunlaşma gün sayısı, verimleri ve boy uzunlukları.....	23
2.3. 2X CTAB lizis tampon hazırlanması.....	24
2.4 Kullanılan ISSR Primerleri ile İlgili Bilgiler.....	26
2.5. PCR Prosedürü.....	26
2.6 Kullanılan PCR Bileşenleri ve miktarları.....	27
3.1 Çeltik çeşitlerinden izole edilmiş DNA'ların miktar ve saflık ölçüm sonuçları.....	31
3.2 Ticari MasterMix için PCR Bileşenleri.....	32
3.3 Ticari Master Mix için Reaksiyon Koşulları.....	32
3.4 Ticari MasterMix ile optimizasyon amaçlı denenen Bileşenlerin miktarları.....	33
3.5 Primerlerin ortalama bant büyüklükleri, % polimorfizm oranları ve PBI değerleri.....	44
3.6 NTSYS-Pc.2.02 programı ile elde edilen benzerlik oranları.....	46

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

A	: Adenin
AFLP	: Amplified Fragment Length Polymorphism (Çoğaltılmış parça uzunluk polimorfizmi)
BG	: Bulgaristan
bç	: baz çifti
C :	Sitozin
CTAB	: Cetil Three Metil Amonyum Bromid
DNA	: Deoksribonükleik asit
dNTP	: Deoksribonükleosid trifosfat
F	: Fransa
G	: Guanin
GIMP	: GNU Image Manipulation Program (GNU Resim Manüpülasyon Programı)
I	: İtalya
ISSR	: Inter Simple Sequence Repeats (Basit dizi arası tekrarları)
ITIS	: Integrated Taxonomic Information System (Bütünleşmiş Taksonomik Bilgi Sistemi)
KTAE	: Karadeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü
M	: Molar
Mg ⁺²	: Magnezyum
MgCl ₂	: Magnezyum klorür
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
mg	: Miligram
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
ng	: Nanogram
nm	: Nanometre

OECD	: Organisation for Economic Co-operation and Development (Ekonomik İş Birliği ve Gelişim Organizasyonu)
PBİ	: Polimorfizm Bilgi İçeriği
PCR	: Polymerase chain Reaction (Polimeraz zincir reaksiyonu)
PlantsDB	: Plants Data Base (Bitkiler Veri Tabanı)
RAPD	: Randomly Amplified Polymorphic DNA (Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA)
RFLP	: Restriction Fragment Length Polymorphism (Kesilmiş parça uzunlukları polimorfizmi)
RUS	: Rusya
SRAP	: Sequence Related Amplified Polymorphism (Dizi-İlişkili Amplifiye Olmuş Polimorfizm)
SSR	: Simple Sequence Repeats (Basit dizin tekrarları)
T	: Timin
Taq	: Taq polimeraz enzimi
T.C.	: Türkiye Cumhuriyeti
TBE	: Tris- borik asit- EDTA
TR	: Türkiye
TTAE	: Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü
USDA	: United States Department of Agriculture (Birleşik Devletler Tarım Bakanlığı)
UV	: Ultraviole
UPGMA	: Unweighted pair group method with arithmetic means (Aritmetik ortalamalar ile ağırlıklandırılmamış eşlenmiş grup metodu)
V	: Volt

1. GİRİŞ

1.1. *Oryza sativa* L.'nin Taksonomisi

Domain	: Eukaryota
Kingdom	: Viridiplantae
Phylum	: Streptophyta
Class	: Liliopsida
Subclass	: Commelinids
Ordo	: Poales
Family	: Poaceae
Subfamily	: Ehrhartoideae
Tribe	: Oryzeae
Genus	: <i>Oryza</i>
Species	: <i>Oryza sativa</i> L. [1]

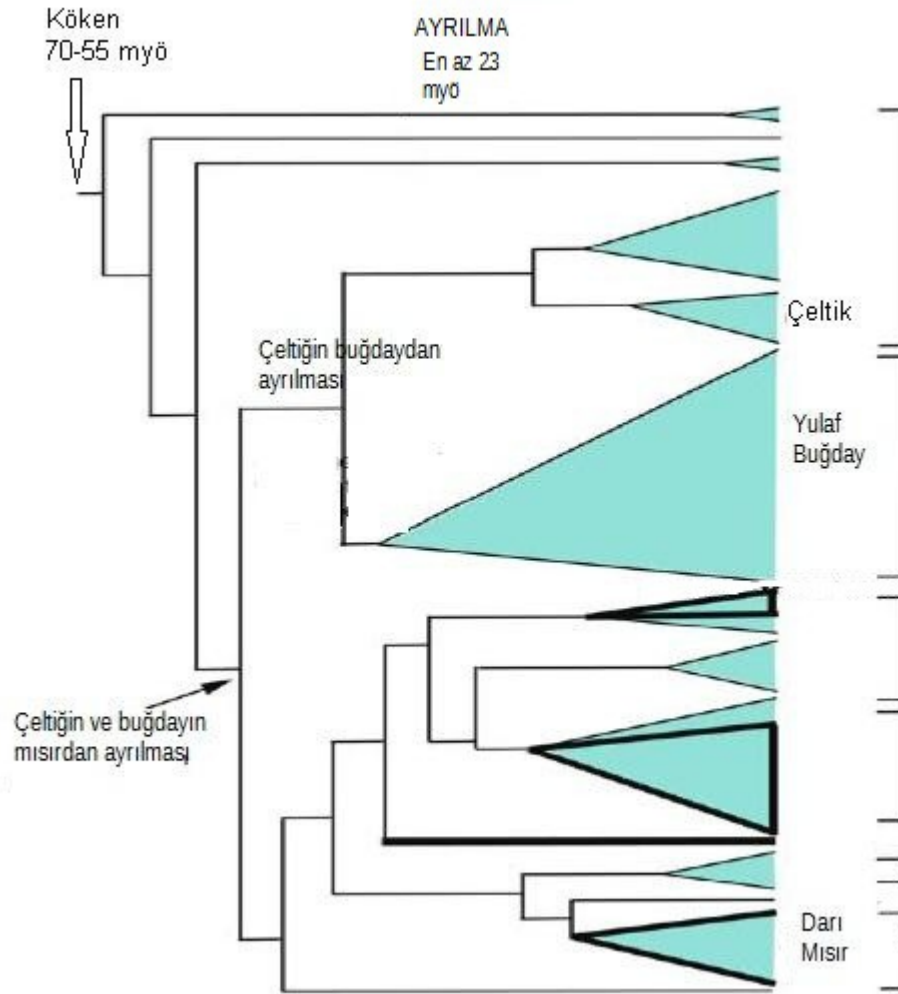
Oryza cinsi 1753 yılında Linnaeus tarafından tanımlanmıştır [2]. Poaceae ailesinden Oryzeae grubuna aittir. Oryzeae grubu 12 adet cins içerir [3]. *Oryza* cinsi ise 20'si yabanıl tip olmak üzere 22 tür içerir [4]. Voughan ve ark. [2] kültür ve yabanıl çeltik türleri için yeni bir adlandırma önermiştir: *O.sativa* sensu lacto subspp *indica* ve *japonica*, ve *O.rufipogon* sensu lacto subspp *nivara* (tek yıllık) ve *rufipogon* (çok yıllık). Buna ek olarak iki yeni yabani çeltik türü daha *Oryza* cinsi altında tanınmıştır (*O.glumaepatula*, *O.malapuzhaensis*). Çizelge 1.1'de *Oryza* cinsinin türleri, genomik sınıflandırılması ve kromozom sayısı verilmiştir.

1.2. *Oryza* Cinsinin'nin Filogenisi

Moleküler saat verileri baz alınarak Oryzeae grubunun 20-22 milyon yıl önce Oryzinae ve Ziziniinae alt gruplarına ayrıldığı, Oryzinae alt grubunun ise 14.2 milyon yıl önce *Oryza* ve *Leersia* cinslerine ayrıldığı belirlenmiştir [5]. *Oryza* cinsi üç gruba ayrılmıştır: *Padia*, *Brachyantha* ve *Oryza* [5]. Taban olarak kabul edilen *Padia*'da *O.schlechteri*, *O.ridleyi*, *O.granulata* kompleksleri

bulunmaktadır. *Branchyantha* grubundaki tek tür *O.branchyantha* türüdür. *Oryza* grubunda ise *O. officinalis* ve *O.sativa* kompleksleri bulunmaktadır [5].

Bu komplekslerden *O. sativa* A, *O. officinalis* B,C, D ve E genom tipine sahiptir. AA genom tipine sahip *Oryza* türleri arasındaki ilk ayrımın 2 milyon yıl önce olduğu düşünülmektedir [5]. Şekil 1.1'de Poaceae ailesinin farklılaşması gösterilmiştir.



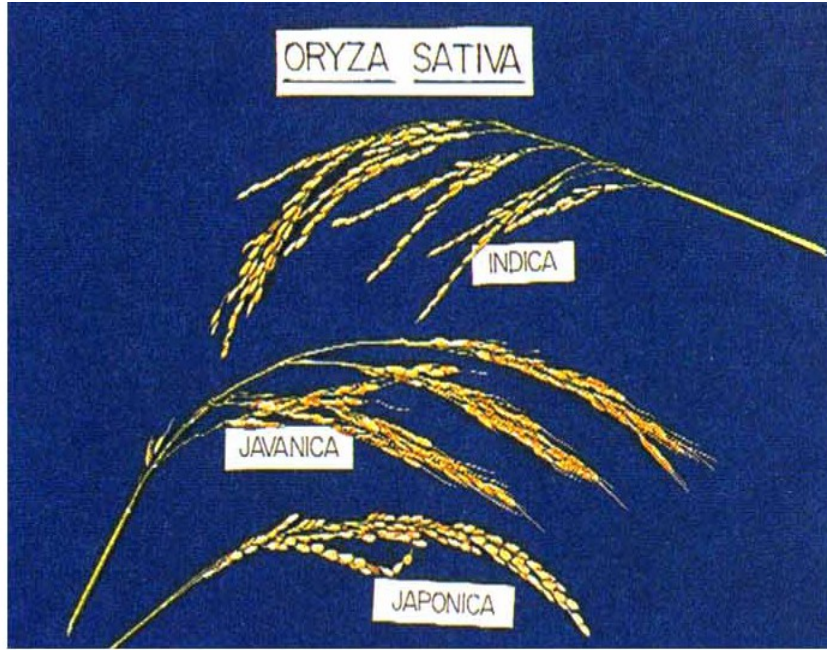
Şekil 1.1. Moleküler ve morfolojik karakterlere dayanılarak hazırlanan Poaceae ailesinin filogenisi [5]

Çizelge 1.1. Çeltik (*Oryza sp*) cinsinin türleri, kromozom sayısı, genom grubu ve yetişme alanları
[4]

Tür Adı	Kromozom Sayısı (2n)	Genom Tipi	Afrika	Orta ve Güney Amerika	Asya	Avustralya
<i>O.sativa</i>	24	AA	+	+	+	+
<i>O.glaberrima</i>	24	AA	+			
<i>O.barthii</i>	24	AA	+			
<i>O.glumaepatula</i>	24	AA		+		
<i>O.longistaminata</i>	24	AA	+			
<i>O.meridionalis</i>	24	AA				+
<i>O.nivara</i>	24	AA			+	
<i>O.rufipogon</i>	24	AA		+	+	+
<i>O.punctata</i>	24	BB,BBCC	+			
<i>O.malampuzhaensis</i>	48	BBCC			+	
<i>O.minuta</i>	24	BBCC			+	+
<i>O.eichingeri</i>	24	CC	+		+	
<i>O.officinalis</i>	24	CC			+	+
<i>O.rhizomatis</i>	24	CC			+	
<i>O.alta</i>	48	CCDD		+		
<i>O.grandiglumis</i>	48	CCDD		+		
<i>O.latifolia</i>	48	CCDD		+		
<i>O.australiensis</i>	24	EE				+
<i>O.brachyanta</i>	24	FF	+			
<i>O.granulata</i>	24	GG			+	
<i>O.meyeriana</i>	24	GG			+	
<i>O.longiglumis</i>	48	HHJJ				+
<i>O.ridleyi</i>	48	HHJJ			+	+
<i>O.schlechteri</i> *	48	HHKK				+
<i>O.coarctata</i> **	24	HHKK			+	
OECD 1999 : Vaughan & Morishima 2003, * Ge S., Sang T., Lu B., Hong D. 1999 ** http://www.gramene.org/db/ontology/search?id=44109 ,						

1.3. Çeltik (*Oryza sativa*) Türünün Morfolojik Özellikleri

Çeltik dik, güçlü veya narin çeşitli yükseklik ve formlarda bulunan bir bitkidir. Gövdesi 80-120 cm boyunda kümelenmiş içi boş bir yapıdadır. Düz ve tüysüz bir yapısı vardır. Yaprak 15-30 cm uzunluğunda paralel damarlı, dilsî veya kulaksî yapıdadır. Çiçek durumu dik veya eğik gevşek salkım, spiklet 7 mm uzunluğunda, düz, tek çiçekli, çeşitli uzunlukta dikenli veya dikensizdir [6].



Şekil 1.2. *Oryza sativa* subsp. başakları [4]

1.4. eltiğın Genetik zellikleri

O. sativa'nın genetik nclerinin *O. rufipogon* ve *O. nivara* olduğu yapılan araştırmalarla gösterilmiştir [7]. PlantsDB (Plant Database) ve ITIS (Integrated Taxonomic Information System)'e göre *Oryza* cinsinin 7 adet kabul edilen türü vardır. Bunlar; *Oryza barthii*, *Oryza glaberrima*, *Oryza latifolia*, *Oryza longistaminata*, *Oryza punctata*, *Oryza rufipogon*, *Oryza sativa*'dır. Bu kaynaklar genelde Kuzey Amerika'ya yöneliktir; fakat ABD Tarım Bakanlığı (USDA) araştırma komitesi 23 tür ve 10 genotip (AA, BB, CC, BBCC, CCDD, EE, FF, GG, HHJJ, HHKK) belirlemiştir (izelge 1.1). Çeltik tahıllar arasında en küçük genoma sahip bitkidir (430 milyon nükleotit) ve 43.000-63.000 arası gene sahiptir. Genomunun yarısı tekrarlardan oluşmaktadır. *O. sativa* ve diğer *Oryza* türlerinin çoğu diploittir ($2n=24$). Fakat tetraploid olanları da mevcuttur ($4n=48$) (izelge 1.1).

Oryza cinsi, cinsin genetik çeşitliliğini yansıtmamanın bir yolu olarak, dört kompleks halinde sınıflandırılmışlardır [3]. Bu kompleksler *O. sativa* kompleksi, *O. officinalis* kompleksi, *O. granulata* kompleksi ve *O. ridleyi* kompleksidir. *O. brachyantha* ve *O. schlechteri* bu komplekslerin içinde yer almaz.

1.5. eltiğın Yaşam Döngüsü

eltiğın yaşam döngüsü şoyledir; dormant tohum, çimlenme, fide (imlenmeden sonra 30 gün), köklerin büyümesi (imlenmeden sonra 30-60 gün arası), gövde uzaması (imlenmeden sonra 60. gün ve sonrası), erken tomurcuk (ieklenmeden 20-25 gün öncesi), salkım oluşumu, çiçeklenme (imlenmeden 85-110 gün sonrası, 6-10gn süre), olgunlaşma (ieklenmeden sonraki 35 gün), olgunluk (imlenmeden sonra 107-120 gün) [8].

1.6. Çeltik Yetiştirme Koşulları

Çeltik tarımı, çeltik sıcak iklim bitkisi olduğu için, en çok sıcaklık ve yağıştan etkilenir. Esas olarak bol yağışlı ve sıcak bölgelerde yetişen çeltik bitkileri, Kuzey Yarımküre’de ve Asya’da 41°–42° enlemine; Hokkaido Adası’nda 44° enlemine; Avrupa’da ise İtalya’nın 46° enlemine kadar çıkabildiği gibi; Güney Yarımküre’de Avustralya’nın 35° enlemine kadar inebilmektedir [9]. Soğuk sularda çeltik tohumunun çimlenmesi yavaşlar. Yetişmek için optimum sıcaklık 18-35 °C olmalıdır. Çeltiğin sıcaklığa en duyarlı olduğu evre salkım oluşumunun olduğu evre ile salkım çıkarma evresinin arasındaki süredir [9]. Diğer bir nokta ise su miktarıdır. Çeltik bol su isteyen bir bitkidir. Bu yüzden yetiştirildiği yerdeki yağış miktarı ve sulama koşulları çok önemlidir. Yetiştirilme döneminde minimum yağış isteği 1000-1200 mm/m²’dir [9]. Fakat ülkemizdeki çeltik yetiştirilen Edirne, Samsun ve Balıkesir’de yağış miktarı yeterli değildir. Bu yüzden sulama teknikleri çok önem taşır. Ayrıca ekim için su sıcaklığının ortalama 12 °C [10], toprak sıcaklığının da 12 °C’nin üzerinde olması gereklidir [11]. Nem oranı ise Karadeniz Bölgesi hariç diğer bölgelerde verimi etkileyecek düzeyde değildir.

Çeltik tarımı için arazinin düz veya düze yakın olması gerekmektedir. Yani ova veya vadi tabanları çeltik tarımı için uygun alanları oluşturmaktadır. Çeltik yetiştiriciliğinin yapıldığı topraklara çeltik tavaları denir [9]. Bu çeltik tavarlarındaki su akışkan olmalı ve oksijen bakımından zengin olmalıdır. Bu yüzden çeltik tavaları hafif eğimli olmalıdır.

Çeltik her çeşit toprakta yetişebilse de yüksek verim alabilmek için toprağın bitki besin maddelerince zengin, yumuşak ve su geçirmeyen killi yapıda olması gerekmektedir [9]. Kök sisteminin gelişimi için 20-25 cm derinlik ve 4.5-7.5 arası pH değerine sahip topraklar idealdir [12].

1.7. Türkiye'de Çeltik Yetiştiriciliği

Ülkemizde çeltik tarımı 11.06.1936 tarih ve 3039 sayılı Çeltik Kanunu ve 14.06.1936 tarih ve 5335 sayılı kararname ile yürütülmektedir. Bu kanuna göre, sıtma gibi hastalıklara yol açmamak için çeltik tarımı izin alınarak yapılabilmektedir.

2008 yılında dünyada 685.013.374 ton pirinç üretimi gerçekleşmiştir. Üretimde ilk sırada Çin gelmektedir. Ülkemiz 735.325 ton ile üretimde 35. sırada yer almaktadır [13]. Ülke kuruluşunun ilk yıllarında üretim 30.000-40.000 ton arasında değişmiştir. 1935 'te 100.000 tonun üzerine çıkmıştır. 1936 yılında çıkarılan kanun ile üretim 40.000-50.000 ton arasına düşmüştür. 1940-1942 yıllarında 60.000 tonun altında kalmıştır [14]. 1950 yılından sonra üretim miktarı artmış 1960'tan sonra 100.000 tonun altına inmemiştir. 1965'ten sonra 200.000 tonun üzerine çıkmıştır. 1990'lı yıllarda 200.000-300.000 ton arasında, 2000 yılından sonra 300.000 tonun üzerine çıkmıştır. 2004 yılında 400.000 tonun üzerine çıkmış, 2005'te 600.000 ton, 2006'da 700.000 ton, 2007'de 648.000 ton, 2008'de ise 753.325 ton üretim olmuştur [14]. 2011 yılında ise pirinç üretimi 99000 ha alanda 516.000 ton üretim yapılmıştır. Bu 516.000 tonun 510.840 tonu kullanılabilir üretimdir. Ülkemizin pirinç talebi ise 786.107 ton olmuş, aradaki fark ithal edilmiştir [15]. Yine 2011 yılında pirinç yurtiçi tüketim 563.376 ton, ihracat ise 105.874 ton olmuştur [15]. Toprak Mahsulleri Ofisinin 2011 yılı pirinç alımı 12.849 ton, alımın üretime oranı ise % 1.4 olmuştur. Verim ise 2009 yılında 7752 ha/kg, 2010 yılında 8687 ha/kg, 2011 yılında ise 9054 ha/kg olmuştur [16].

Bölgelere göre üretim oranı ise en fazla Marmara Bölgesinde (%72), ardından Karadeniz Bölgesinde (%19), İç Anadolu bölgesi (%4.5), Güneydoğu Anadolu bölgesi (%2.7) ve diğer bölgelerde ise %1' lik bir üretim vardır [14] Üretilen iller çoktan aza doğru sırası ile Edirne, Balıkesir, Samsun, Çorum, Çankırı, Tekirdağ, Çanakkale ve Kırklareli şeklindedir.

Çeltik diğer tahıllara göre daha kısa sürede yetişir. Bu yüzden tarlada ikinci bir ürün alabilme imkanı verir. Güney ve Güneydoğu Asyada çeltik muson yağmurları döneminde ekilir, diğer mevsimlerde mısır, yerfıstığı, kırmızı biber,

soğan ve susam ekilerek ekim nöbetine sokulur [9].

2006'da Türkiye'de tahıl ekim alanının (130.162.242 dekar) %0.9'unda, 2008 yılında ise ekilebilir tahıl alanının (119.899.739 dekar) %0.8'i çeltik tarımına ayrılmıştır [14].

1923 yılından beri çeltik üretimi ihtiyacı karşılayamamış ve ithalat yapılmıştır. Bu ekonomik bir kayıptır. 2000 yılında 146.909 ton, 2003 yılında 213.528 ton, 2004'te 103.887 ton, 2005'te 158.423 ton, 2008'de 179.603 ton ithalat gerçekleşmiştir [14]. Yine aynı yıl ton başına 803 \$ toplam 144.310 \$ ödeme yapılmıştır. İhracat miktarı ise çok düşüktür. 2000 yılında 1435 ton, 2000-2008 arası 1000 ton altında, 2008' de ise 4058 ton ihracat yapılmıştır [14]. Kazanç ise 4986\$ olmuştur. Çeltik diğer tahıllara göre daha yüksek verime sahiptir (buğday 244 kg/da, çavdar 199 kg/da, mısır 720 kg/da, pirinç 757 kg/da) ve uluslararası piyasada getirisi diğerlerinden yüksektir [14]. Bu yüzden pirinç ekonomik olarak daha fazla kazanç sağlamaktadır. Çeltik verimi 1925 yılında 104 kg/da, 1927 yılında 91 kg/da, 1927'den 1958'e kadar 200 kg/da üstü, 1958'de 300 kg/da üstü, 1980'den itibaren 400 kg/da üstü, 2000'de 500 kg/da, 2004'te 600 kg/da, 2007'de 691 kg/da, 2008'de 747 kg/da olmuştur [14].

Ekim alanları zamanla çeşitli değişimler geçirir. Ülkemizde en fazla değişime uğrayan ekim alanı çeltiğe aittir. Pirinç ithalatına getirilen serbestlik, ziraatin güç ve pahalı olması gibi sebepler ile ekim alanları yerini başka ürünlere bırakmıştır. 1980'de Ege Bölgesinde bir artış gözlenmiş, 1981 yılındaki kuraklık nedeni ile önemini yitirmiş, şimdi ise hiç çeltik tarımı yapılmamaktadır [9]. Trakya bölgesinde ise çeltiğin önemi artmış ve günümüzde en çok ekim yapılan bölge haline gelmiştir.

1.8. Bitki Islahı ve Genetik Çeşitlilik

Bitkiler insanlar için en önemli besin kaynağıdır. Dar anlamda insan eliyle ve farklı sürelerde gerçekleşen evrim olarak algılanabilen bitki ıslahı, arkeolojik bulgulara göre on binlerce yıl önce başlamıştır [17]. İnsanlar henüz yerleşik hayata ve tarıma geçmeden önce ve ancak belli zamanlarda tohumları toprağa bırakmışlar; daha sonra, büyüyen bitkilerden bazılarının daha iyi gelişme göstermeleri ya da hayvanlarca daha çok tercih edilmelerine veya daha yüksek verim düzeyine ulaşmalarına dikkat edilerek, yapılan bilinçli-bilinçsiz seçimlerle bitki ıslahının en temel ve önemli ilkelerinden olan “seçilim” ortaya çıkmıştır [17].

İnsanların ihtiyaçlarını (üretim ve tüketim) gidermekte kullandıkları bitki ve hayvanların uyum sağlayabilmeleri için yapılan seçim işlemi (=kültüre alma), belirli zaman, bölge ve çevre koşullarının etkisi altında doğada da oluşmaktadır, üreticilerin yaptıkları seçim işlemi bu sürecin yalnızca bir uzantısı olup daha çok aralarından amaca uygun olanların seçilimine yöneliktir [17].

Bitki ıslahının en önemli ve temel amaçlarından biri genetik çeşitliliği bitki düzeyinde sürdürerek, klasik ıslaha ek olarak seçim, mutasyon, melezleme ile çeşitli moleküler yöntemleri kullanmaktır [17]. Klasik bitki ıslahı yöntemleri, insanlığın temel besin maddesini oluşturan pek çok kültür bitkisinin üretiminde uygulanmaktadır [17]. Klasik bitki ıslahı, melezleme sonucu elde edilen ve açılım gösteren döller arasından üstün genotiplerin fenotipik seçilimine dayanmaktadır [18]. 1970’lerin sonlarında DNA markörlerinin geliştirilmesiyle ıslah programları yön değiştirmiş ve araştırmacılar karakter ile bağlantılı markör geliştirme yoluna gitmişlerdir [18]. Modern biyoteknoloji olarak adlandırılan bu teknikler ile normal şartlarda klasik ıslah yöntemleri ile veya doğal yollarla aktarılamayan DNA dizilerinin hücre veya dokularına *in-vitro* şartlarda çeşitli gen aktarım teknikleri ile aktarılması ve transgenik bitkilerin elde edilmesi mümkün olmaktadır [19].

Sonrasında ortaya çıkan transgenik teknolojinin önemli başarıları arasında; pestisitlere, virüslere, herbisitlere dayanıklı (*Bt*) bitkilerinin (örnek mısır, soya, pamuk) geliştirilmesi, virüs kılıf proteinlerini yapan genlerin aktarılmasıyla virüse

dayanıklı bitkilerin elde edilmesi, kültür bitkilerinde besin maddesi içeriğinin artırılması gibi gelişmeler sayılabilir [17]. Bitki ıslahı programlarında, özellikle cinsler ve türler arası melezlemelerde kullanılacak ebeveynlerin birbirine genetik yönden benzer (akraba) olması melez bitki elde edilmesi konusunda başarıyı artıracaktır. Bu nedenle melezleme programına başlamadan önce, kullanılacak genotiplerin benzerliklerinin bilinmesi bir gereklilik olarak karşımıza çıkmaktadır [20].

Giderek artan nüfusun besin ihtiyacını karşılamak ancak temel besin maddelerinin üretimini artırmakla mümkün olacaktır. Tarım alanlarının gün geçtikçe azaldığı düşünüldüğünde, üretimi artırmanın en etkili yolunun bitki ıslahı olması kaçınılmazdır [18]. Islah çalışmaları için gerekli varyasyon tescilli çeşitlerden, yerel çeşitlerden ve yabani akrabalarından sağlanmaktadır. Bu nedenle, bu materyallerin taranması ve belirlenen uygun genlerin geliştirilmiş tekniklerle kültür çeşitlerine aktarılması gerekmektedir [18].

Genetik çeşitlilik biyolojik çeşitliliğin türüdür. Biyolojik çeşitlilik sırasıyla i) bir mekan içerisinde ekosistemlerin çeşitliliğini, ii) ekosistemler içindeki türlerin çeşitliliğini, iii) türler içerisinde genetik çeşitliliği kapsar [21]. Genetik çeşitliliğin oluşumunda etkili olan esas güçler doğal mutasyonlar ve bu mutasyonları filtreleyen doğal seleksiyonlardır [21]. Mutasyonların yanında göç, tecrit ve rekombinasyonlar popülasyonları yavaş yavaş fakat devamlı şekilde alt popülasyonlara ayırarak coğrafik ırklar, alt türler ve de türler oluşturarak ekolojik koşullara uyumlu genetik ve biyolojik çeşitlilik oluşturur [21]. Tür içi genetik çeşitlilik türlerin ve ekosistemlerin çeşitliliğinin başlıca kaynağı olmanın yanında aynı zamanda ekosistemlerin stabilitesinin yani dinamik dengesinin de temelini oluşturmaktadır [21]. Amerikan Ulusal Bilim Vakfı'nın 2007 yılında yaptığı çalışmada bir türün kendi içindeki çeşitliliğin, türler arası çeşitliliğin devam edip sürdürülmesinde veya tersinde, vazgeçilmez ve gerekli olduğu, genetik çeşitlilik ile biyoçeşitlilik arasında bağlantı olduğunu ortaya çıkarmıştır [22]. Tür içi genetik çeşitlilik canlıların değişen çevresel şartlara uyum sağlayabilmesinin ve türün devamlılığının sağlamanın bir güvencesidir [21].

Genetik çeşitlilik bir türün gen havuzundaki genetik özelliklerinin toplam sayısını gösterir. Bir özelliği belirleyen gen her zaman aynıdır fakat genin allellerinin baz dizisi değişkendir. Bu ise genetik çeşitliliğe neden olur [23]. Genetik çeşitlilik ıslah programları için başlıca kaynaktır. Islah çalışmalarının geniş bir genetik taban üzerinde yürütülmesi, hem uzun vadede genetik çeşitliliğin devam ettirilmesini, hem de zamanla değişen çevre koşullarına ve gereksinimlere karşı cevap verebilmeyi sağlayacaktır [21]. Genetik çeşitliliğin farklı biyotik ve abiyotik streslere karşı genetik bir bariyer oluşturduğuna dair araştırmalar bulunmaktadır [24]. Hajjar ve ark. [25] genetik çeşitlilikteki artışın bitki hastalık ve zararlılarına karşı dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesinde dolayısıyla da türün geliştirilmesinde önemli olduğunu göstermişlerdir. DNA belirteçlerinin bitki ıslahında değerli bir yöntem olduğu, özellikle genetik çeşitlilik ve gen haritalama çalışmaları ile de kanıtlanmıştır [26].

1.9. Genetik Çeşitlilik Tespitinde Kullanılan Belirteç Sistemleri

Genetik çeşitlilik belirlenmesinde üç değişik belirteç tipi bulunmaktadır. Bunlar, morfolojik belirteçler, biyokimyasal belirteçler ve DNA belirteçleridir.

1.9.1. Morfolojik Belirteçler

Adından da anlaşılacağı gibi morfolojik özellikler dikkate alınır. Kalitatif bir gözlem yapılır. Populasyonda bireyi ya da bir birey grubunu diğerlerine göre farklı kılan özellik belirteç olarak kullanılır. Mesela çiçeğin rengi veya yaprağın şekli gibi özellikler morfolojik belirteç olarak kullanılır [27]. Fakat bu belirteçler kısıtlıdır ve aynı morfolojideki başka tür veya çeşitler ile karıştırılabilir.

1.9.2. Biyokimyasal Belirteçler

Biyokimyasal belirteçler içerisinde sekonder metabolitler, tohum depo

proteinleri ve izozimler sayılabilir. Moleküler belirteçlere göre daha ucuzdurlar. Bu belirteçlerdeki varyasyonlar, kodlayıcı DNA bölgelerindeki benzer olmayan değişikliklerden ya da translasyon sonrası (post-translasyonel) protein modifikasyonlarından kaynaklanırlar [23]. Populasyonun yapısı biyokimyasal belirteçlerin kullanımını etkiler. İzozimler türler arası belirteç olarak iyi çalışmalarına rağmen yakın akraba türler arasında kullanışlı değildir.

1.9.3. DNA Belirteçleri

Moleküler belirteçleri, morfolojik belirteçlerden ayrılan en önemli özellikleri şunlardır [28]:

- Morfolojik belirteçlerin çoğunun fenotipi tüm bitki seviyesinde teşhis edilebilir. Ancak moleküler lokuslar, tüm bitkide, doku ve hücre seviyesinde denenebilirler.

- Allel frekansı, morfolojik belirteçler ile karşılaştırıldığında moleküler lokuslarda daha yüksek olma eğilimindedir.

- Morfolojik mutantlar, istenilmeyen fenolojik etkiler ile bir arada olmaya meyillidirler.

- Morfolojik lokustaki alleller, heterozigot genotiplerin tanımlanmasını sınırlayan bir dominant-resesif tarzında birbirini etkiler.

- Moleküler lokuslar, bir populasyondaki bireylerin genotiplerinin belirlenmesine izin veren kodominant tarz sergilerler.

Tek bir belirteç bütün ihtiyaçları karşılayamaz. Bu yüzden çeşitli belirteçler bir arada kullanılmaktadır. Belirteç seçerken şu noktalara dikkat etmek gerekir: yüksek polimorfizm, dominant-kodominant durumu, belirteçin genomda dağılımı, tekrarlanabilirlik, güvenilirlik, kolay analiz ve otomasyon uygunluğudur. Bu özellikler tek bir belirteçde olmadığı için bu özelliklerden en fazla uygunluk gösteren seçilmelidir [29]. DNA belirteçleri hibridizasyona dayalı ve PCR' dayalı olmak üzere iki gruba ayrılır.

1.9.3.1. Hibridizasyona Dayalı Belirteçler (RFLP)

Kesilmiş Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) hibridizasyona dayalı kodominant bir belirteç sistemidir [30]. Bu yöntemde DNA restriksiyon enzimleri ile kesilir, oluşan parçalar elektroforez ile ayrılır ve sonra naylon veya nitroselüloz membrana transfer edilir. Daha sonra işaretli prob lar yardımı ile belirlenir. Güvenilirdir, kodominanttır ve orta derecede polimorfizm gösterir. Bunun yanında pahalı bir tekniktir, yüksek miktar ve kalitede DNA gerektirir. Ayrıca nitelikli iş gücü ihtiyacı da vardır.

1.9.3.2. PCR'a Dayalı Belirteç Sistemleri

PCR ilk olarak Saiki ve ark. [23] tarafından kullanılmıştır. PCR tekniği ile DNA parçaları, ısı yardımı ile, hücre dışında çoğaltılabilmektedir. Günümüzde PCR biyolojinin pek çok alanında pek çok farklı amaçla kullanılmaktadır. Genetik çeşitlilik ve populasyon genetiği çalışmalarında, rekombinant DNA çalışmalarında, gen klonlamada, moleküler sistematik çalışmalarda, mikroorganizmaların tanılanmasında blotlama işlemlerinde, cDNA kütüphanelerinin oluşturulmasında olduğu gibi veya gerektiğinde modifiye edilerek kullanılmaktadır. PCR işlemi üç temel aşamadan oluşur. Bunlar: denatürasyon, bağlanma ve uzamadır. Denatürasyon aşamasında Çift iplikli kalıp DNA ısı yardımı ile denatüre edilir ve tek iplikli hale getirilir. Primer bu tek iplikli DNA üzerinde komplementer kendine komplementer olan bölgeye bağlanır. Taq polimeraz enzimi ortamdaki dNTP' leri kullanarak yeni DNA ipliğini sentezler. Bu aşamaların hepsi bir döngüyü oluşturur. Bu döngü başa dönerek 30-45 kez tekrar eder.

PCR'a dayalı belirteç sistemleri genetik çeşitlilik çalışmalarında en çok kullanılan sistemlerdir. RFLP'nin dezavantajlarından dolayı PCR 'a dayanan teknikler önem kazanmış ve gelişmiştir. Bu teknikler RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), SSR (Simple Sequence Repeats), ISSR (Inter Simple Sequence

Repeats), SRAP (Sequence Related Amplified Polymorphism) teknikleridir. Çizelge 1.2' de bu tekniklerin karşılaştırılması gösterilmiştir.

Çizelge 1.2. PCR temelli tekniklerin karşılaştırılması ([23, 33])

Teknik	Polimorfizm	Dominantlık	Verimlilik	Otomasyon	Maliyet
RAPD	Orta/Yüksek	Dominant	Düşük	Orta	Düşük
AFLP	Yüksek	Dominant	Yüksek	Orta/Yüksek	Orta
SSR	Yüksek	Kodominant	Yüksek	Orta/Yüksek	Düşük
ISSR	Yüksek	Dominant	Yüksek	Orta/Yüksek	Düşük
SRAP	Yüksek	Kodominant	Orta	Orta/Yüksek	Düşük

A. RAPD-PCR

RAPD tekniği 1990 yılında Williams ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir. Kolay, hızlı ve dizi bilgisi istemeyen bir tekniktir. Fakat bu tekniğin uzunluk sınırlaması vardır. 2000 bp'den daha uzun mesafelerde polimerazın çalışma kabiliyeti azalır [23]. Tekrarlanabilirliği düşüktür. RAPD belirteçlerinin en büyük dezavantajı, belirteçin üretildiği popülasyonun dışında o belirteçin bulunamamasıdır [23]. Bu teknikte kısa primerler kullanılarak genomik DNA'nın rastgele bölgeleri çoğaltılır. Az miktarda DNA yeterlidir. Ucuz ve hızlıdır. Dominant belirteç özelliğindedirler. Tekrarlanabilirliği düşüktür ve güvenilirliği sınırlıdır.

B. AFLP-PCR

AFLP tekniği Vos ve ark. [31] tarafından ticari bir kitin modifiye edilmesi ile geliştirilmiştir. AFLP restriksiyon enzimlerinin spesifikliğini PCR tekniğinin yalınlığı ile birleştiren bir tekniktir [32]. AFLP tekniği PCR amplifikasyonuna dayanarak genomik restriksiyon fragmentlerinin belirlenmesini sağlar. Bu teknik üç basamaktan oluşur:

- DNA'nın restriksiyonu ve oligonükleotit adaptörlerin ligasyonu
- Restriksiyon fragmentlerinin seçici amplikasyonu
- Fragmentlerin jel analizleri [32]

Maliyetli olmasına rağmen RFLP tekniğine göre daha kolaydır ve yüksek polimorfizm gösterir. Bu yöntemin en büyük dezavantajı karmaşık olmasıdır. Her bir basamak için yapılan optimizasyon bu yöntemi zorlaştırır [33].

C. SSR-PCR

Ökaryotik canlıların genomunda bulunan 2-6 nükleotit uzunluğunda tekrar eden dizilere mikrosatellit denir. Mikrosatellitler STR (Short Tandem Repeat) veya SSR (Simple Sequence Repeat) olarak da adlandırılmaktadır [23]. Telomer bölgelerde bulunan minisatellitlerin aksine genomda yayılım gösterirler. Kodominant özellik gösterirler, fakat bunların geliştirilmesi pahalı ve zaman alıcıdır [33]. SSR'lerin etrafındaki DNA dizileri aynı türün bireyleri arasında korunmuşlardır. Ardışık SSR tekrarlarının sayısındaki farklılık, PCR sonucunda farklı uzunlukta parça oluşturur [23]. Bu teknik bu durumu temel alarak çalışır. Zaman ve emek isteği yüksek bir tekniktir.

D. SRAP-PCR

Li G. ve Quiros C.F. [33] tarafından *Brassica* cinsinde haritalama ve gen etiketleme çalışmasında geliştirilmiştir. ORF'lerin (Open Reading Frames-Açık Okuma Çerçeveleri) amplifikasyonuna dayanır. İki primer amplifikasyonunu temel alır [33]. İleri ve geri primerler 17-18 baz uzunluğundadır ve ilk 10-11 baz merkez sekanstır ve ileri primerde CCGG, geri primerde ise AATT sekansı ile devam eder. SRAP belirteçlerinin %20'si kodominanttır [33]. Basit, güvenilir, orta verimlilikte ve yüksek otomasyonu olan bir tekniktir. Özel primer isteği bu tekniğin dezavantajıdır.

E. ISSR-PCR

İlk olarak Zietkiewicz ve ark. [34] ve Gupta ve ark. [35] tarafından geliştirilmiştir. Bu yöntemde SSR bölgeleri arasında kalan parçalar PCR aracılığı ile çoğaltılır ve analiz edilir. Dominant özellik gösterir ve otomasyon seviyesi yüksektir. ISSR yöntemi hızlı, uygulaması basit ve ucuz bir yöntemdir. Bu yüzden genetik araştırmalarda sıklıkla kullanılır. ISSR'nin en büyük avantajı sekans bilgisine ihtiyaç duymamasıdır. Bu yüzden özel primer tasarımına gerek yoktur.

ISSR tekniği 5' ve 3' sonda güçlendirilen kısa, tekrarlanan DNA zincirlerinin primer olarak kullanılmasını, PCR ürünlerinin elektroforez ile büyüklüklerine göre ayrılmasını ve jel üzerinde DNA'ların tespitini içerir [23]. Tek primer kullanılır. Yani ileri ve geri primer olmak üzere iki primer kullanılmaz. Yöntemin primerleri, basit olarak tekrarlanan DNA zincirleridir (Örn: GAG CAA CAA CAA CAA CAA). Yüksek bant sayısı önemli bir avantajdır. RAPD yöntemi ile benzemesine rağmen primerlerin bağlanma sıcaklıkları daha yüksektir. Son yıllarda SSR tabanlı belirteçlerin kullanımı şu sebeplerden 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 belirteçlerinin diğerlerine göre daha hızlı uygulanabilmesi,

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

ISSR belirteçleri genetik yapı, genetik çeşitlilik, filogeni, gen tespiti, genom haritalama çalışmalarında ve evrimsel biyolojide kullanılmaktadır. Örneğin; Martin ve ark. [37] 12 ISSR primeri kullanarak *Diploaxis* cinsine ait 10 türün genetik çeşitliliğini incelemişlerdir. Xiao LQ [38] *Cycas guizhouensis* bitkisinde ISSR belirteçleri ile çeşitlilik araştırması yapmıştır. Haisehen ve Guizhu [39] *Sonneratia* cinsine ait 6 türün genetik akrabalık seviyelerini ISSR

belirteçleriyle belirlemişlerdir. Gaiero ve ark. [40] Uruguay' dan toplanan *Buita* cinsine ait tehlikede olan *B. paraguayensis*, *B. lallemanti* ve *B. yatay* türleri arasındaki genetik çeşitliliği incelemişlerdir. Saleh [41] RAPD ve ISSR belirteçleri kullanarak *Arthrocnemum macrostachyum* (Chenopodiaceae)'un genetik çeşitliliğini yorumlamışlardır. Ahmed ve ark. [42] Kallustan gelişen aya genç bitkilerinin somaklonal çeşitlilik araştırmasında ISSR belirteçlerinden yararlanmışlardır. Lin ve ark. [43] ISSR belirteçlerini kullanarak Doğu Asya'daki tehlikede olan *Camellie japonica* türlerinin genetik çeşitliliğini araştırmışlardır. Toplam 20 adet primer kullanmışlar ve %90.1'lik polimorfizm oranı elde etmişlerdir. Zhang ve ark. [44] ISSR belirteçleri kullanarak Çin'deki *Miscanthus sinensis* popülasyonlarının genetik çeşitliliğini araştırmışlardır. Toplam 9 adet ISSR primeri kullanmışlar ve %52.3'lük moleküler çeşitlilik oranı elde etmişlerdir. Sözen [45] kışlık Triticale kültürlerinin arasındaki genetik çeşitliliği ve akrabalık ilişkilerini ISSR belirteçleri ile değerlendirmiştir. Arslan ve Tamkoç [46] *Poa angustifolia* ve *Poa trivialis* türleri arasındaki genetik akrabalığı ve genetik çeşitliliği belirlemek için ISSR-PCR yöntemini kullanmışlardır.

1.10. Konu İle İlgili Önceki Çalışmalar

Blair ve ark. [47] çeltikte mikrosatellit motif frekansını ve parmak izi analizini ISSR belirteçleri kullanarak yapmışlardır. 59 kültüre edilmiş çeltik çeşidi kullanmışlar ve çoklu-(GA) motifinin çoklu-(GT) motifinden daha fazla olduğunu bulmuşlardır.

Nagaraju ve ark. [48] florasan tabanlı ISSR-PCR ve SSR belirteçleri kullanarak geleneksel ve evrimleşmiş Basmati ve Basmati olmayan çeltik çeşitlerinin genetik analizini yapmışlardır. Çalışmalarında 19 SSR ve 12 ISSR primeri kullanmışlardır. PCR reaksiyonlarının sonucunda 70 SSR ve 481 ISSR bandı elde etmişlerdir. En az genetik çeşitliliği geleneksel Basmati çeşitlerinde en çok genetik çeşitliliği ise evrimleşmiş Basmati çeşitlerinde gözlemişlerdir.

Parashant ve ark. [49] *Oryza sativa* subsp *indica*'nın genetik çeşitliliğini AFLP belirteçleri ile araştırmışlardır. Araştırmalarında 49 hint çeltik çeşidi

kullanmışlar ve 9 primer kombinasyonu ile 644 AFLP belirteci ortaya çıkarmışlardır.

Wu ve ark. [50] RAPD ve ISSR belirteçleri kullanarak *Oryza* cinsinin bir türü olan *Oryza granulata* ile çalışmışlardır. Bu çalışmadaki amaç Çin'in Yunnan bölgesinde tehlikede olan yabani çeltik türlerini koruyabilmektir. Bu çalışmanın sonucunda *O. granulata* populasyonları arasındaki genetik varyasyon oranının diğer populasyonlara göre daha yüksek olduğu bulunmuştur. Çekirdek populasyonların *in situ* korunması gerektiği önerisi yapılmıştır.

Garris ve ark. [51] yaptığı çalışmada *Oryza sativa* L'nin genetik yapısını ve çeşitliliğini araştırmıştır. SSR belirteçleri ile yaptıkları araştırmanın sonucunda 169 nükleer ve iki kloroplast lokusu bulmuşlardır.

Cao ve ark. [52] SSR belirteçleri kullanarak kuzeydoğu Çin'deki *Oryza sativa* f. *spontanea* populasyonlarının genetik çeşitliliğini araştırmışlardır. Araştırma sonucunda bölgeler arasında %35'lik genetik varyasyon belirlenmiştir.

Qian ve ark. [53] RAPD belirteçleriyle güney ve güneydoğu Asya *O. granulata* çeşitlerinin genetik çeşitliliğini araştırmışlardır. Çalışmaları sonucunda 203'ü polimorfik 243 bant elde etmişler ve %83.5'lik polimorfizm oranı bulmuşlardır.

Bhuyan ve ark. [54] RAPD ve ISSR belirteçleri kullanarak geleneksel Assam çeltiğinin genetik çeşitlilik analizini yapmışlardır. Çalışmalarında 24 adet çeltik çeşidi kullanmışlar ve % 92,5 polimorfizm oranına sahip 81 RAPD bandı ve %98 polimorfizm oranına sahip 201 ISSR bandı elde etmişlerdir.

Wan ve ark. [55] ISSR belirteçleri kullanarak Çin'in Yunnan bölgesindeki *Oryza meyeriana*'nın 34 populasyonunda genetik çeşitlilik araştırması yapmışlardır. 13 ISSR belirteci kullanılmış, toplamda 168 bant amplifiye edilmiş bunlardan 135'i polimorfik çıkmıştır.

Seetharam ve ark. [56] SSR belirteçleri ve morfolojik karakterler kullanarak çeşitlilik araştırması yapmışlardır. Bu çalışmada 30 çeltik genotipinin kara ırkları, saf hatlar, somaklonlar, üretim hatları ve sahil tuzlu ortama adapte olmuş varyetelerinin genetik çeşitlilik dereceleri incelenmiştir.

Zhao ve ark. [57] *Oryza rufipogon* ve *Oryza sativa* arasındaki genetik farklılığı Alttür-spesifik İntron Uzunluk Polimorfizm (SSILP) belirteçleri kullanarak çalışmışlardır. Çalışmalarında her bir türden 10 bireyle çalışarak 57 SSILP belirteçi elde etmişlerdir.

Kumagai ve ark. [58] kloroplast DNA'sının yüksek değişken bölgelerini kullanarak yaptıkları çalışmada *Oryza* cinsinin genetik çeşitliliğini ve evrimsel ilişkilerini araştırmışlardır. Araştırmaya tüm kloroplast sekansını kıyaslayarak başlamışlardır. Tüm kloroplast genomunu ve yüksek değişken bölgeleri *in silico* ön analizle karşılaştırmışlar ve bunun sonucunda çeşitliliği yüksek kalitede test etmeye yarayacak önemli bölgelere ulaşmışlardır.

Kanawapee ve ark. [59] RAPD ve SSR belirteçleri kullanarak tuz toleransındaki değişimlerde genetik çeşitliliği incelemişlerdir. 30 çeltik kültürünü 5 tolerans kategorisine ayırmışlardır. 20 adet RAPD primeri ve 20 adet SSR primeri kullanılmıştır. Toplamda 161 RAPD belirteçi ve 190 SSR alleli üretilmiş ve %68,94 ve %89,47 polimorfizm oranı elde edilmiştir.

Mengistu [60] yüksek lisans tez çalışmasında Etiyopya'daki çeltik çeşitlerinin genotipini ISSR parmak izi, fenotipik çeşitlilik ve özellik ilişkilerini incelemişlerdir. Bu çalışmada, 18 çeltik çeşidinde 5 ISSR primeri ile 62'si polimorfik (% 82,67) 75 bant elde edilmiştir.

Swamy ve ark. [61] QTL analizleri kullanarak *Oryza sativa* cv Swarna x *O. nivara* geri çaprazlamalarıyla moleküler haritalama yapmışlardır. Araştırma sonucunda 30 QTL belirlenmiştir.

Kumbhar ve ark. [62] ISSR belirteçleri kullanarak çeltiğin moleküler çeşitliliğini incelemişlerdir. Toplam 13 ISSR primeri ile %97.08'lik polimorfizm oranına sahip 103 bant elde etmişlerdir.

Çeltik ile ülkemizde yapılan moleküler çalışmalar sınırlı sayıdadır.

Sürek H. ve Beşer N. [63] Trakya'da yetişen çeltiğin verim komponentleri arasındaki ilişkiler ile bunların çeltik tane verimi üzerindeki doğrudan ve dolaylı etkilerini incelemişlerdir. Biyolojik verim ve hasat indeksinin tane verimi üzerinde doğrudan etkiye sahip olduğunu gözlemişlerdir.

Şahin [64] "Tosya-Osmancık ve Kargı ilçelerinde Çeltik Ziraatı" isimli

çalışmayı yapmıştır. Bu çalışma ile çeltik tarımının yapılma şartlarını belirlemeye çalışmış ve yukarıdaki ilçelerdeki durumu ortaya çıkarmayı amaçlamıştır.

Büyükunal ve Bay [65] Türkiye'deki çeltik çeşitlerinin tohum depo proteinleri ve RAPD belirteçleri ile genetik analizini yapmışlardır. Toplamda 29 tanesi polimorfik olmak üzere 42 bant ve %69'luk polimorfizm oranı elde etmişlerdir.

Taşlıgil ve Şahin [66] 'Türkiye'de Çeltik Yetiştiriciliği ve Coğrafi Dağılımı' isimli bir çalışma yapmışlardır.

1.11. Çalışmanın Amacı

Çeltik Türkiye'deki ve dünyadaki en önemli besin kaynaklarından biridir. Ayrıca ekonomik açıdan da çok önemli bir bitkidir. Günümüzde azalan su kaynakları ve daralan ekim alanları göz önüne alındığında kıt kaynaklara daha dayanıklı, daha az alanda daha çok dane verimli çeşitlerin geliştirilmesi son derece önemlidir. Bu sebeplerle bu bitkinin ıslah çalışmaları devam etmektedir.

Islah çalışmalarında kullanılmak üzere seçilecek ebeveyn bitkilerin genetik çeşitlilik seviyelerindeki farklılık yeni çeşitlerin geliştirilmesi için oldukça önemlidir. Ülkemizde çeltik çeşitlerinde genetik çeşitlilik üzerine moleküler seviyede yapılan tek çalışma RAPD ve tohum depo proteinlerinin kullanıldığı bir çalışmadır. Yapılan literatür araştırmasında çeltik çeşitleri üzerinde ISSR analizine dayalı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle çalışmamızda Türkiye'de geliştirilmiş olan çeltik çeşitlerinden 28 tanesinin ISSR-PCR yöntemi ile genetik benzerlik seviyelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. MATERYAL, YÖNTEM

2.1. Materyal

Bu çalışmada ülkemizde geliştirilmiş 28 çeltik çeşidi kullanılmıştır. Bu çeşitlerden 23 tanesi T.C. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı'na bağlı Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsünden (TTAE), 5 tanesi Karadeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nden (KTAE) temin edilmiştir. Çalışmada kullanılan çeltik çeşitleri ve ebeveyn bilgileri Çizelge 2.1'de listelenmiştir. Çeşitlerin olgunlaşma gün sayısı ve verim bilgileri ve boy uzunlukları Çizelge 2.2'de verilmiştir.

Çizelge 2. 1. Tarımsal Araştırma Enstitülerinden temin edilen çeltik çeşitleri ve ebeveyn bilgileri [TTAE (1-23)'den sağlanan çeşitler, KTAE (24-28)'den sağlanan çeşitler]

SIRA NO	ÇEŞİT ADI	ANA ADI	BABA ADI
1	Osmancık 97	Rocca (I)	Europa (I)
2	Demir	Plovdiv (BG)	Lido (I)
3	Kıral	Gritna (I)	Balilla-28 (F)
4	Gönen	Bonni (I)	Shinei
5	Halilbey	İpsala	Veneria (I)
6	Ece	8203- TR413-6-1-1	8260- TR470-6-1-1
7	Kırkpınar	İpsala	80110-TR253-4-1-1
8	Şumnu	Rialto (I)	Koral
9	Beşer	İpsala Mutasyon	
10	Kızıltan	Veneria (I)	Thainato
11	Aromatik-I	İntrodüksiyon	
12	Tunca	Rocca (I)	Thainato
13	Paşalı	Osmancık-97	820700-TR480-1-1-1-1
14	Çakmak	Trakya	N1-41T-1T-0T
15	Efe	Baldo (I)	Demir
16	Hamzadere	Demir	83013-TR631-4-1-2
17	Sürek 95	Rocca (I)	Rodina (BG)
18	Serhat 92	Rocca (I)	Krasnodarsky-424 (RUS)
19	Trakya	Baldo (I)	Komsomolsky (RUS)
20	Ergene	Delta (F)	Zoria (BG)
21	Meriç	Delta (F)	Akçeltik (TR)
22	İpsala	Rodina (BG)	Delta (F)
23	Altınyazı	Baldo (I)	Ribe (I)
24	Mevlütbey	Drago (BG)	Kral
25	Kızılırmak	N1,41 T-1T-0T	8317-TR 635-1-2
26	Osmancık	-	-
27	Karadeniz	Roma (I)	Silla
28	Bafra Yıldızı	Ballilla-28 (F)	TR666-8-1-1-1

BG=Bulgaristan, F=Fransa, I=İtalya, RUS=Rusya, TR=Türkiye

Çizelge 2.2. Çeltik çeşitlerinin olgunlaşma gün sayısı, verimleri ve boy uzunlukları [86]

Çeşit adı	Olgunlaşma (Gün)	Verim Potansiyeli (kg/da)	Boy Uzunluğu (cm)
Trakya	128	850	113
Ergene	117	800	100
Meriç	125	800	100
İpsala	125	850	110
Altınyazı	130	800	110
Serhat-92	128	800	105
Sürek-95	130	1000	100
Osmancık-97	130	1000	100
Kıral	130	900	90
Demir	135	1100	85
Gönen	125	850	105
Halilbey	132	1100	100
Kırkpınar	125	900	105
Ece	135	900	90
Şumnu	135	900	90
Beşer	130	850	100
Kızıltan	135	1000	85
Aromatik-1	140	700	80
Tunca	135-140	800-900	90
Çakmak	130	800-1000	95-100
Efe	125-130	800-900	100-105
Hamzadere	130	800-900	95
Paşalı	120-125	780-850	95-100
Osmancık	-	800-850	-
Karadeniz	118-131	600-650	100-130
Bafra Yıldızı	-	650-815	-
Mevlüt Bey	129-135	700-750	-
Kızılırmak	115-130	658-813	80-95

2.2. Yöntem

Çeltik 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.

2.2.1. Çeltik tohumlarının çimlendirilmesi

Planlanan çalışmada enstitülerden gelen çeltik çeşitlerinin her birinden 20-25 adet tohum içlerinde kurutma kağıtları olan 9 mm çaplı petrilere yerleştirilerek 13 saat ışık, 11 saat karanlık ve % 60 nem derecesine ayarlanmış iklim kabininde (Sanyo, MLR-350H) çimlenmeye bırakılmıştır. Petrilere düzenli olarak distile su verilerek kurutma kağıtlarının ıslak tutulması sağlanmıştır. Çimlenmenin 17. gününde yaklaşık 15 cm uzunluğuna erişen fidelerden DNA izolasyonu için yaprak materyali toplanmıştır. Kesilen yaprak parçaları alüminyum folyolara sarılarak etiketlenmiş ve -20°C'ye kaldırılmıştır.

2.2.2. DNA izolasyonu ve saflaştırılması

Yaprak örnekleri sıvı azot kullanılarak havanda pudra haline gelene dek öğütüldükten sonra 2ml'lik ependorfların içine alınmıştır. DNA izolasyonu için 2X CTAB (cetil three metil amonyum bromid) yöntemi kullanılmıştır [67]. 2X CTAB lizis tamponu Çizelge 2.3'teki gibi hazırlanmıştır.

Çizelge 2.3. 2X CTAB lizis tamponu bileşenleri

NaCl	14ml 1.4M veya 4.095g toz
Tris 1M (pH=8)	5ml
CTAB	1g
EDTA (0.5M)	2ml
PVP (Polyvinyl pyrodine)	0.5g

Çözeltinin son hacmi distile su ile 50 ml'ye tamamlanmış ve 120°C 'de 20 dk otoklavlanmıştır. Daha sonra tampona 200 µl merkaptotanol eklenmiştir.

DNA izolasyon prosedürü ise aşağıdaki gibi uygulanmıştır:

2X CTAB tamponu 65°C'ye ısıtılıp hazır hale getirilmiştir.

1. Sıvı azotta öğütülmüş 500 mg bitki materyali 2 ml'lik ependorf tüpe alınarak üzerine 800-1500 µl CTAB eklenmiş ve pipetle karıştırılarak homojen hale getirilmiştir.

2. Tüpler 62°C 'de 30-60 dk inkübe edilmiş ve her 5 dk'da bir tüpler alt üst edilmiştir.
3. Karışım tüpüne eşit hacimde kloroform:izoamil alkol eklenerek 10dk alt üst edilerek karıştırılmıştır.
4. Tüpler 10000 rpm'de 10 dk santrifüjlenmiş ve süpernatant yeni tüpe aktarılmıştır.
5. Aktarılan miktarın 2/3'ü kadar -20°C 'de izopropanol eklenmiş, birkaç kere alt üst edildikten sonra -20°C 'de 2 saat inkübe edilmiştir.
6. Tüpler 10000 rpm'de 10 dk santrifüjlenmiştir.
7. DNA pelleti 300 µl %70 etil alkol ile yıkanmış ve çeker ocakta kuruyana kadar bekletilmiştir.
8. Kuruyan DNA pelleti istenilen DNA konsantrasyonuna göre 50-100 µl steril deiyonize suda çözündürülmüştür.

2.2.3. DNA miktar ölçümü

DNA miktar ölçümüne geçmeden önce izole edilen DNA örneklerinden 8 µl alınarak % 0.8'lik 75 ml agaroz jelde 90 V'ta 35 dk yürütülmüş ve DNA'ların kalitesinin prosedüre devam etmeye uygun olup olmadığı kontrol edilmiştir. DNA'lar jelde tek, parlak bir bant olarak gözlenmiş ve bu örneklerin Nanodrop Spektrofotometre ile 260 ve 280 nm dalga boyunda saflık ve miktar tayinleri yapılmıştır. Agaroz jelde çok silik veya ışıklı yol şeklinde gözüken örnekler için DNA izolasyonu tekrarlanmıştır. Ölçüm sonuçlarına göre DNA örnekleri PCR çalışmalarında kullanılmak üzere µl'sinde 2 ng olacak şekilde steril distile su ile seyreltilmiştir.

2.2.4. ISSR-PCR analizleri

Bitki örneklerinden izole ettiğimiz DNA'lar ve British Colombia Üniversitesi Biyoteknoloji laboratuvarında dizayn edilen ISSR primer setinden 20 tanesi rastgele seçilerek PCR işlemi gerçekleştirilmiştir.

Deneyler sırasında 20 adet ISSR primeri kullanılmıştır. Kullanılan primerler Çizelge 2.4' te listelenmiştir. Uygulanan PCR protokolü ise Çizelge 2.5' teki gibidir. PCR bileşenleri ve miktarları Çizelge 2.6' da verilmiştir.

Çizelge 2.4 Kullanılan ISSR primerleri ile ilgili bilgiler

Primer Adı	Primer Dizisi	T _A (°C)	Uzunluk	% G/C
GAG-(CAA) ₅	Gag CAA CAA CAA CAA CAA	50	18	38,89
(CAG) ₅	CAG CAG CAG CAG CAG	50	15	66,67
VHV-(GT) ₇ G	VHV gTg TgT gTg TgT gTg	55	18	44,44
(AG) ₈ -G	AgA gAg AgA gAg AgA gG	52	17	52,94
(GA) ₈ -T	gAg AgA gAg AgA gAg AT	50	17	44,44
(GA) ₈ -A	gAg AgA gAg AgA gAg AA	50	17	47,06
(AG) ₈ -T	AgA gAg AgA gAg AgA gT	50	17	47,06
(AG) ₈ -C	AgA gAg AgA gAg AgA gC	52	17	52,94
(AC) ₈ -C	ACA CAC ACA CAC ACA CC	52	17	52,94
(TCG) ₆ -G	TCg TCg TCg TCg TCg TCg g	64	19	68,42
(AGC) ₆ -T	AgC AgC AgC AgC AgC AgC T	62	19	63,16
(AGC) ₆ -G	AgC AgC AgC AgC AgC AgC g	64	19	68,42
(AGC) ₆ -C	AgC AgC AgC AgC AgC AgC C	64	19	68,42
(AC) ₈ -G	ACA CAC ACA CAC ACA Cg	52	17	52,94
(GT) ₈ -C	gTg TgT gTg TgT gTg TC	52	17	52,94
BDB-(ACA) ₅	BDB ACA ACA ACA ACA ACA	52	18	27,78
DD-(CGA) ₅	DDC gAC gAC gAC gAC gA	55	17	58,82
(AG) ₈ -YT	AgA gAg AgA gAg AgA gYT	52	18	44,44
(GT) ₈ -YC	gTg TgT gTg TgT gTg TYC	55	18	50,00
(CAA) ₅	CAA CAA CAA CAA CAA	40	15	33,33

(Y= (C,T) B= (C,G,T) D= (A,G,T) V= (A,G,C))

Çizelge 2.5. PCR prosedürü

	SICAKLIK (°C)	SÜRE	DÖNGÜ SAYISI
ÖNDENATÜRASYON	94	4 dk	1
DENATÜRASYON	94	45 sn	45
BAĞLANMA	40-64	45 sn	
UZAMA	72	90 sn	
SON UZAMA	72	7 dk	1

Çizelge 2.6 Kullanılan PCR bileşenleri ve miktarları

BİLEŞEN	MİKTAR
dH ₂ O	12.8 µl
10X Taq Buffer (Fermantas)	2.5 µl (1X)
25mM MgCl ₂ (Fermantas)	2 µl (2 µM)
2,5mM dNTP	2.5 µl (2.5 µM)
2,5mM Primer	2 µl (2.5 µM)
Kalıp DNA	3 µl (6 ng)
Taq Polimeraz (Fermantas)	0.2 µl (1 U)
Toplam	25 µl

PCR reaksiyonları 25 µl hacimde 1X Taq Buffer, 2 µM MgCl₂, 2.5 µM dNTP, 2.5 µM primer, 6 ng kalıp DNA ve 1U Taq polimeraz enzimi ile hazırlanmıştır. Her bir primer için hazırlanan negatif kontrol reaksiyonlara eklenmiştir. Ayrıca reaksiyonların bant profillerinden emin olmak için bazı bireyler rastgele seçilip PCR reaksiyonu ikinci kez tekrarlanmıştır.

Primerlerin bağlanma sıcaklığının belirlenmesinde aşağıdaki formül kullanılmıştır;

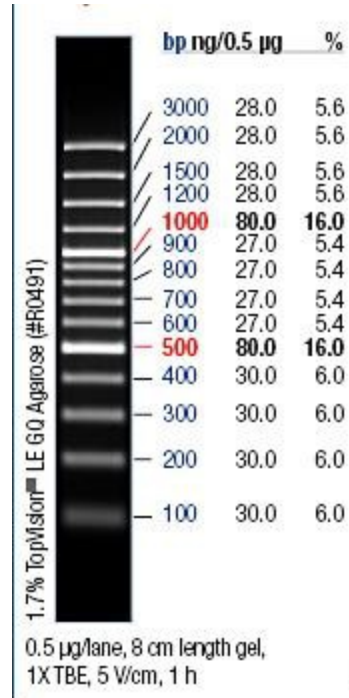
$$(A+T) \times 2^{\circ}\text{C} + (G+C) \times 4^{\circ}\text{C}$$

PCR reaksiyon koşulları ön denatürasyon için 94°C 4 dk, denatürasyon için 94°C 45 sn, bağlanma için 40°C-64°C arasında hesaplanan değere göre 45 sn, uzama için 72°C 90 sn ve son uzama için 72°C 7 dk sıcaklık ve süreler ile yapılmıştır. Denatürasyon, bağlanma ve uzama aşamaları "1 döngü" olarak kabul edilmiş ve 45 defa tekrarlanmıştır. Deneyler Applied Biosystems Veriti gradient termal döngü cihazı ile gerçekleştirilmiştir.

2.2.5. Jel elektroforezi uygulamaları

PCR ürünleri yatay jel elektroforezi (Thermo, Midicell Promo) ile %1.2'lik agaroz jel üzerinde ayrılmıştır. Jeller 0.5X TBE tamponundan hazırlanmış ve yürütme işlemi yine 0.5X TBE tamponu ile yapılmıştır. Jellere katılmasından önce 10µl etidyum bromid (0.5 µg/ml) eklenmiştir.

PCR ürünleri her bir kuyucuğa 9 µl örnek 1 µl yükleme tamponu olmak üzere 10 µl yüklemiş ve 90 V'ta 80 dk yürütülmüştür. Bant büyüklüklerinin belirlenmesi amacıyla her jelde ilk ve son kuyucuklara 100 bp'lik DNA ladder (Fermentas) yüklenmiştir. (Şekil 2.1)



Şekil 2.1 Fermentas Gene Ruler 100 bp DNA ladder Plus

2.2.6. Elektroforez sonuçlarının görüntülenmesi ve değerlendirilmesi

Jeller yürütme işleminden sonra Uvitec Biolab marka jel dökümantasyon sistemi ile görüntülenmiş ve fotoğraflanmıştır. Fotoğraflar GNU Image Manipulation Program (GIMP) ile düzenlenmiştir. PCR sonrasında oluşan bantların büyüklükleri 100 bp DNA ladderin bant büyüklükleri (Şekil 2.1) ile kıyaslanmıştır.

Her bir primer için elde edilen bantlar jel fotoğrafları üzerinde karşılaştırılarak her bireyde var (1) veya yok (0) şeklinde sayılanması ile ikili matris oluşturulmuştur. Bu veriler kullanılarak çeşitler arasındaki genetik benzerlik değerleri Jaccard eşitliği [68, 69] kullanılarak NTSYS-Pc.2.02. [70] programında belirlenmiştir. Yine aynı programda bu benzerlik değerleri kullanılarak UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) metodu ile çeşitler arasındaki genetik ilişkileri gösteren dendrogram elde edilmiştir.

2.2.7. Polimorfizm bilgi içeriğinin hesaplanması

Polimorfizm bilgi içeriği (PBI), bir markırın bir popülasyon içindeki polimorfizmi belirleme değeridir. PBI belirlenebilir allellerin sayısına ve bunların dağılım frekansına dayanır ve gen çeşitliliğinin eşdeğeridir [71].

Çalışmada kullandığımız primerlerin polimorfizm bilgi içerikleri (PBI) Riek De ve ark. (2001) dominant markırlar için kullandığı aşağıdaki formül yardımı ile hesaplanmıştır [72]:

$$PBI = 1 - [f^2 + (1 - f)^2] \quad (2.1)$$

Bu formülde f, veri setindeki markırın frekansıdır.

3. BULGULAR

3.1. DNA İzolasyonu

Genetik materyal kullanmayı gerektiren bütün çalışmalar için DNA ekstraksiyonu ve saflaştırılması şarttır. Bu nedenle bizim çalışmamızda da elimizdeki 28 çeltik (*Oryza sativa* L.) çeşidinin iklim kabininde çimlendirilen tohumlarından çimlenmeden 17 gün sonra genç yaprakları toplanmış ve yapraklar sıvı azot kullanılarak porselen havan ve tokmakla toz hale getirilmiştir. Sonrasında bu toz materyalden 2X CTAB yöntemi ile genomik DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir [67].

3.2.DNA Miktar ve Saflık Tayini

Moleküler biyolojide izolasyon sonrası basamaklara geçmeden önce elde edilen DNA'ların saflığının kontrolü gereklidir. Ayrıca DNA'nın miktarının nanogram veya mikrogram düzeyinde belirlenmesi de elzemdir. Bunları sağlamak için genellikle ultraviyole ışık absorpsiyona dayalı spektrofotometrik ölçümler yapılır. Çeltik çeşitlerinden elde ettiğimiz DNA'ların saflık ve miktarları Nanodrop Spektrofotometre ile ölçülmüştür. Miktar bakımından en yüksek ve en düşük değerler sırası ile 1295.9 ng/μl (Kızıltan) ve 64.8 ng/μl (Aromatik-I) olarak elde edilmiştir. Nükleik asitler ışığı en iyi 260 ve 280 nm dalga boyunda absorbe ederler. Bu yüzden ölçüm bu iki değer arasında yapılır ve bunların birbirine oranı nükleik asitlerin saflığını verir. Bu oranın 1.8-2.0 değerleri arasındaki ölçümü saf olarak kabul edilir. Aksi takdirde fenol bileşiklerinin ve/veya proteinlerin gerektiği kadar uzaklaştırılamadığı yorumu yapılabilir. Çalışmamızda DNA örneklerinin saflık değerleri 2.0-2.24 arasında bulunmuştur. Saflık değerleri 2.0'nin üzerinde olan DNA örnekleri PCR reaksiyonlarında başarılı sonuçlar verdiklerinden tekrar izolasyon yapılmamıştır. Elde edilen DNA saflık ve miktar değerleri Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Çeltik çeşitlerinden izole edilmiş DNA'ların miktar ve saflık ölçüm sonuçları

Çeşit Adı	260/280 nm	ng/ml
Osmancık-97	2.24	337.5
Demir	2.07	306.3
Kıral	2.08	492.9
Gönen	2.06	548.0
Halilbey	2.08	372.2
Ece	2.00	484.5
Kırkpınar	2.16	1022.9
Şumnu	2.14	1244.9
Beşer	2.14	960.5
Kızıltan	2.15	1295.3
Aromatik-I	2.04	64.8
Tunca	2.17	676.2
Paşalı	2.03	508.0
Çakmak	2.04	313.0
Efe	2.06	449.9
Hamzadere	2.11	306.2
Sürek-96	2.17	866.8
Serhat 92	2.08	544.0
Trakya	2.17	298.0
Ergene	2.15	215.1
Meriç	2.06	380.7
İpsala	2.01	545.3
Altınyazı	2.01	349.8
Mevlütbey	2.04	347.9
Kızılırmak	2.11	461.7
Osmancık	2.14	230.6
Karadeniz	2.13	278.5
Bafra Yıldızı	2.04	388.8

3.3. ISSR PCR Optimizasyonu

Kullandığımız primerlerin en iyi sonuçları verebilmesi için miktar ve reaksiyon koşullarının optimum değerlerinin bulunması gereklidir. Çalışmamızda ilk olarak ticari PCR karışımı şeklinde satılmakta olan ve işlemleri hızlandıracağını düşündüğümüz OneTaq QuickLoad 2X Master Mix with Standart Buffer (New England Biolab: UK) denenmiştir. Bu denemede Çizelge 3.2'deki miktarlar ve Çizelge 3.3'teki şartlarda GAG-(CAA)₅ primeri ile PCR kurulmuştur. Yapılan elektroforez sonrasında tatmin edici sonuçlar gözlenememiştir. Daha sonra ticari miks optimize edilmeye çalışılmıştır. Optimizasyon için karışıma, birbirinden bağımsız olarak primer, MgCl₂, dNTP, enzim, kalıp miktarlarında değişiklikler yapılarak PCR kurulmuştur (Çizelge 3.4). Fakat tatmin edici sonuçlar elde edilememiştir.

Çizelge 3.2. Ticari MasterMix için PCR Bileşenleri

Bileşen	Miktar (µl)
MasterMix	12.5
dH ₂ O	7.5
Primer	2
Kalıp DNA	3
Toplam	25

Çizelge 3.3. Ticari Master Mix için Reaksiyon Koşulları

Basamak	Sıcaklık (°C)	Süre (sn)	Döngü
Ön denatürasyon	94	30	1
Denatürasyon	94	30	30
Bağlanma	50-64	45	
Uzama	68	90	
Son Uzama	68	300	1

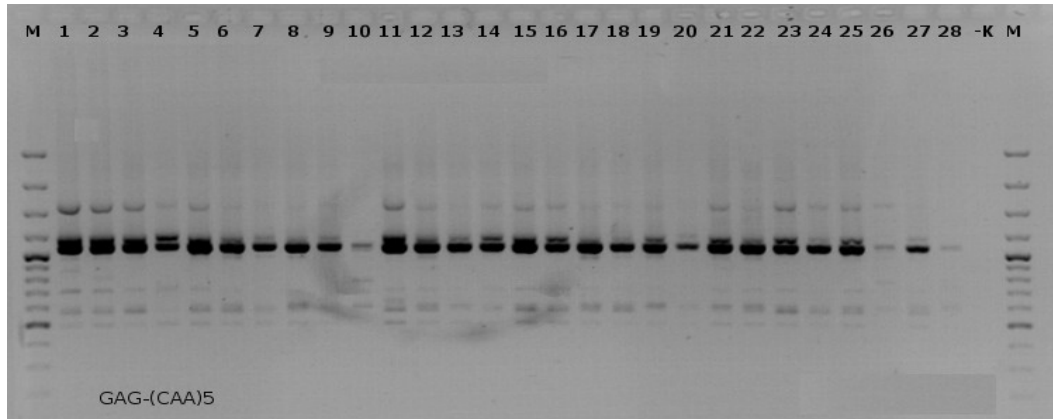
Çizelge 3.4. Ticari MasterMix ile optimizasyon amaçlı denenen bileşenlerin miktarları

Bileşen	Karışıma Eklenen Miktarlar (µl)
MasterMix	12.5
Primer	1.5- 2.0-3.0
MgCl ₂	0-1.33-1.66
dNTP	0-0.5-2.0
Enzim	0-0.1
Kalıp	1.5-3.0
dH ₂ O	25µl'ye tamamlayacak şekilde

Bu denemelerden sonra normal PCR prosedürüne geri dönmüştür. Çizelge 2.5'teki şartlar ve Çizelge 2.6'daki miktarlar ile deneme yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar tatmin edici olunca çalışmaya bu şartlar kullanılarak devam edilmiştir.

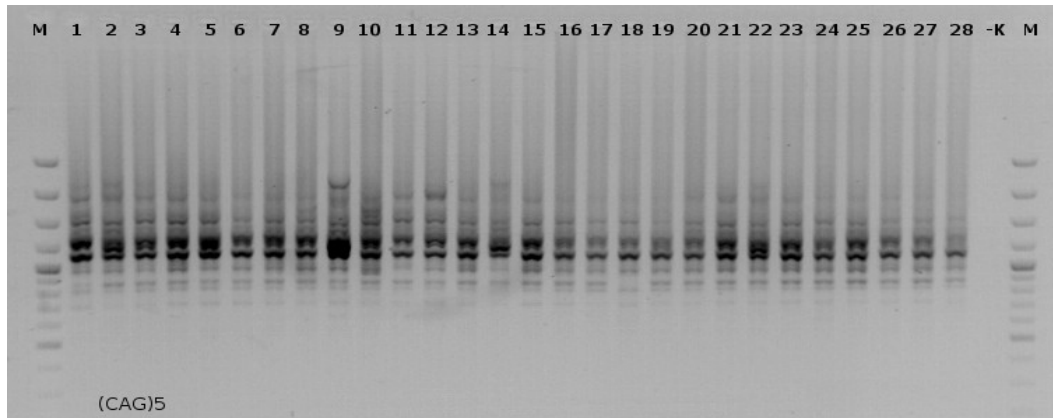
3.4. ISSR PCR Analizi

Aşağıdaki şekillerde M markırı, 1-28 çeltik çeşitlerini (Çeşit adları için Bkz. Çizelge 2.1), -K ise negatif kontrolü ifade etmektedir.



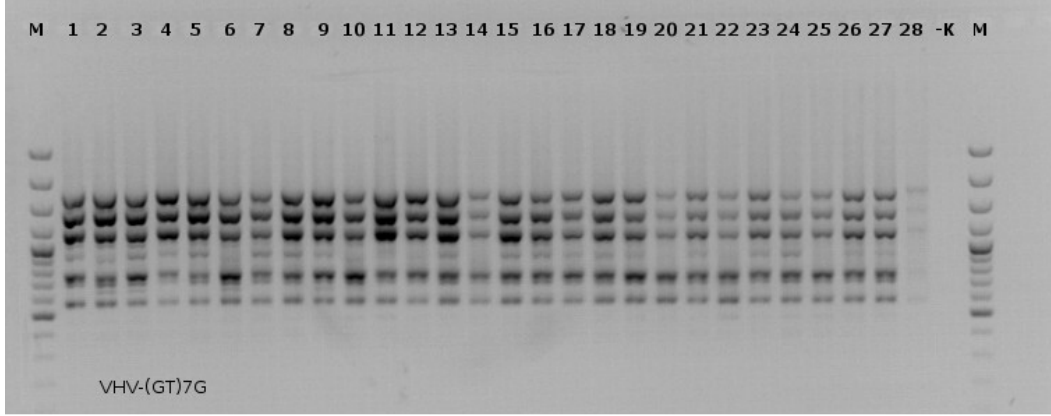
Şekil 3.1. GAG-(CAA)₅ primeri ile *Oryza sativa* çeşitlerinde oluşan bant profilleri

GAG-(CAA)₅ primeri ile 15'i polimorfik 17 bant elde edilmiştir. Polimorfizm oranı % 80.24'tür. Elde edilen PBİ değeri ise 0.352'dir. Bant büyüklükleri 500-1600 bp arasında değişmektedir.



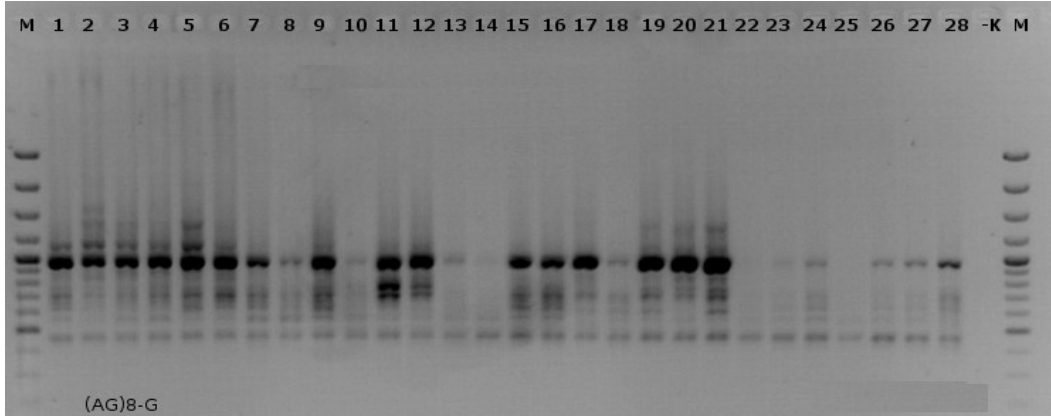
Şekil 3.2. (CAG)₅ primeri ile *Oryza sativa* çeşitlerinde oluşan bant profilleri

(CAG)₅ primeri ile 16'sı polimorfik 19 bant elde edilmiştir. Polimorfizm oranı % 84.22'dir. Elde edilen PBİ değeri 0.373'tür. Bant büyüklükleri 700-1650 bp arasında değişmektedir.



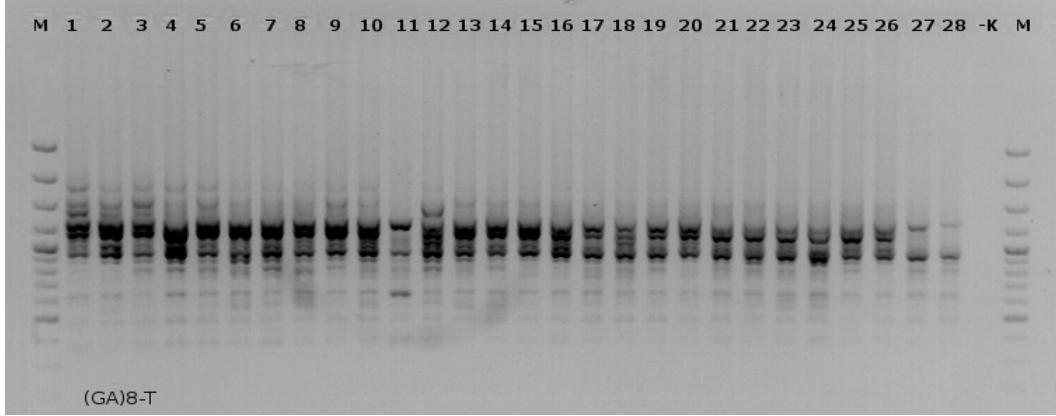
Şekil 3.3. VH V-(GT)₇-G primeri ile *Oryza sativa* çeşitlerinde oluşan bant profilleri

VHV-(GT)₇-G primeri ile 15'i polimorfik 17 bant elde edilmiştir. Polimorfizm oranı % 88.24'tür. Polimorfizm bilgi içeriği 0.364'tür. Bant büyüklükleri 500-1750 bp arasında değişmektedir.



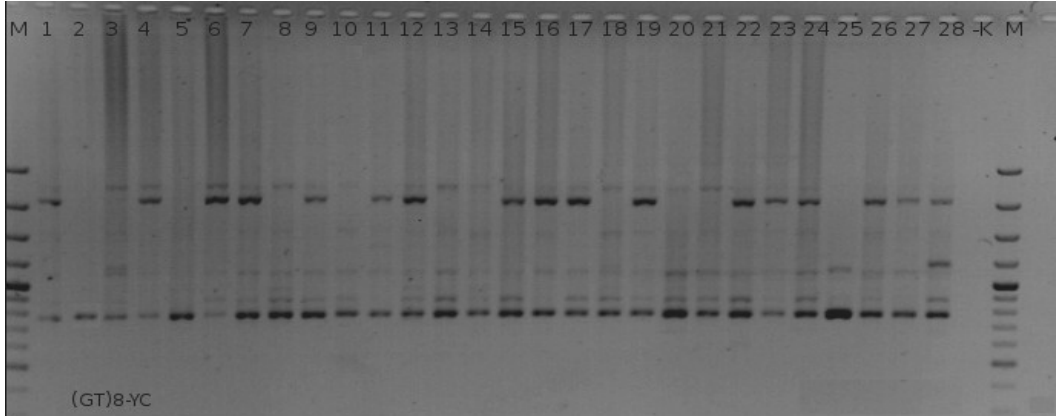
Şekil 3.4. (AG)₈-G primeri ile *Oryza sativa* çeşitlerinde oluşan bant profilleri

(AG)₈-G primeri ile 9'u polimorfik 11 bant elde edilmiştir. Polimorfizm oranı % 81.82'dir. Polimorfizm bilgi içeriği 0.370'tir. Bant büyüklükleri 450-1550 bp arasında değişmektedir.



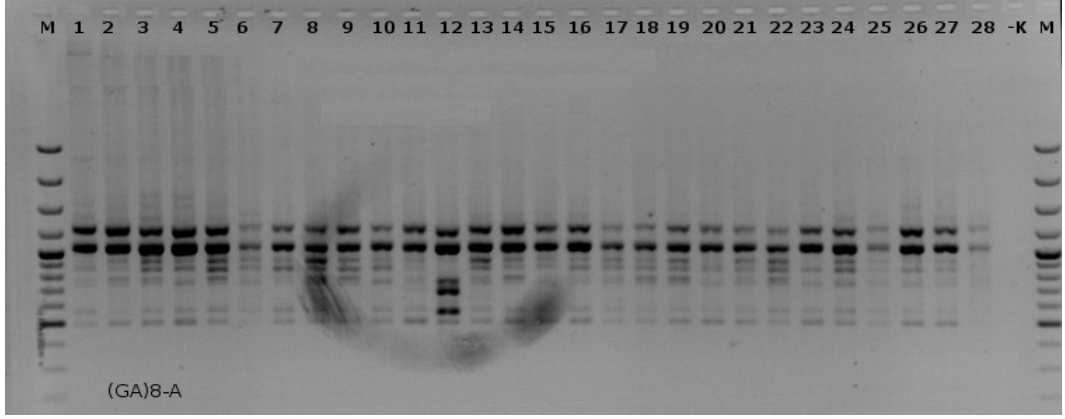
Şekil 3.5. (GA)₈-T primeri ile *Oryza sativa* çeşitlerinde oluşan bant profilleri

(GA)₈-T primeri ile 19'u polimorfik 22 bant elde edilmiştir. Polimorfizm oranı % 83.37'dir. Elde edilen PBI değeri ise 0.374'tür. Bant büyüklükleri 350-1900 bp arasında değişmektedir.



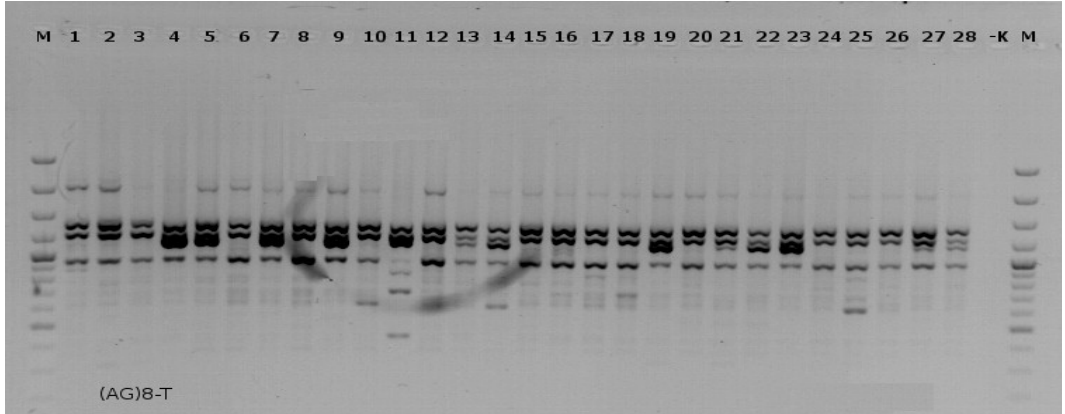
Şekil 3.6. (GT)₈-YC primeri ile *Oryza sativa* çeşitlerinde oluşan bant profilleri

(GT)₈-YC primeri ile 12'si polimorfik 13 bant elde edilmiştir. Polimorfizm oranı % 92.31'dir. Elde edilen PBI değeri ise 0.366'dır. Bant büyüklükleri 650-1500 bp arasında değişmektedir.



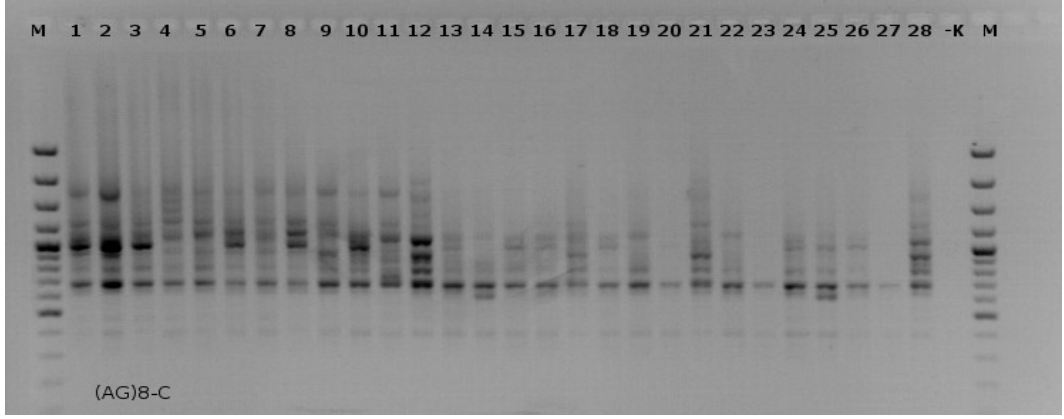
Şekil 3.7. (GA)₈-A primeri ile *Oryza sativa* çeşitlerinde oluşan bant profilleri

(GA)₈-A primeri ile 9'u polimorfik 13 bant elde edilmiştir. Polimorfizm oranı % 69.24'tür. Elde edilen PBI değeri ise 0.364'tür. Bant büyüklükleri 500-1600 bp arasında değişmektedir.



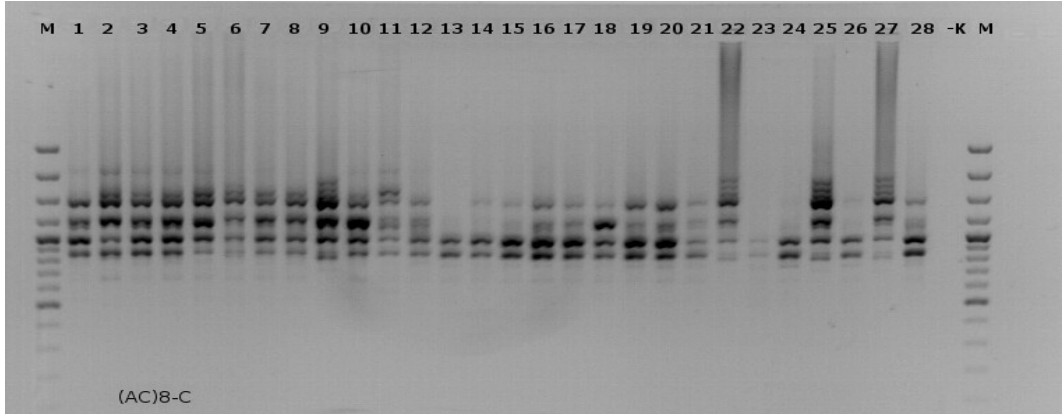
Şekil 3.8. (AG)₈-T primeri ile *Oryza sativa* çeşitlerinde oluşan bant profilleri

(AG)₈-T primeri ile 8'i polimorfik 13 bant elde edilmiştir. Polimorfizm oranı % 61.54'tür. Elde edilen PBI değeri ise 0.374'tür. Bant büyüklükleri 450-2100 bp arasında değişmektedir.



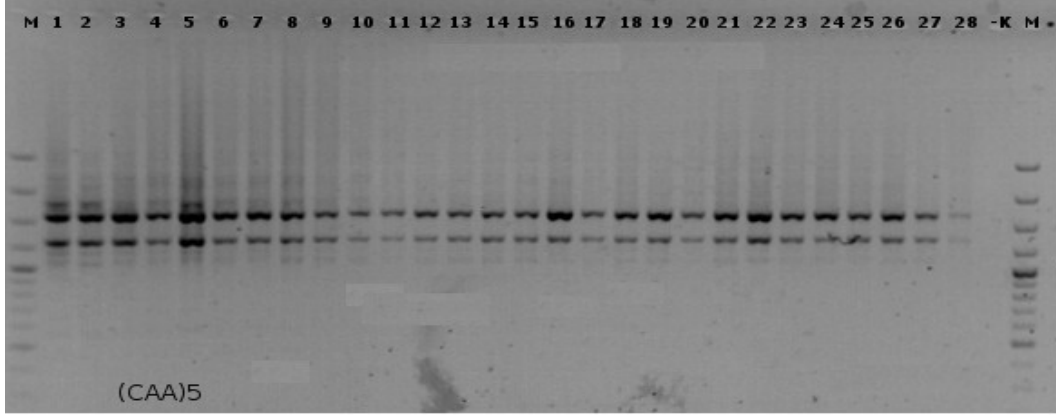
Şekil 3.9. (AG)₈-C primeri ile *Oryza sativa* çeşitlerinde oluşan bant profilleri

(AG)₈-C primeri ile 19'u polimorfik 21 bant elde edilmiştir. Polimorfizm oranı % 90.48'dir. Elde edilen PBI değeri ise 0.320'dir. Bant büyüklükleri 400-2500 bp arasında değişmektedir.



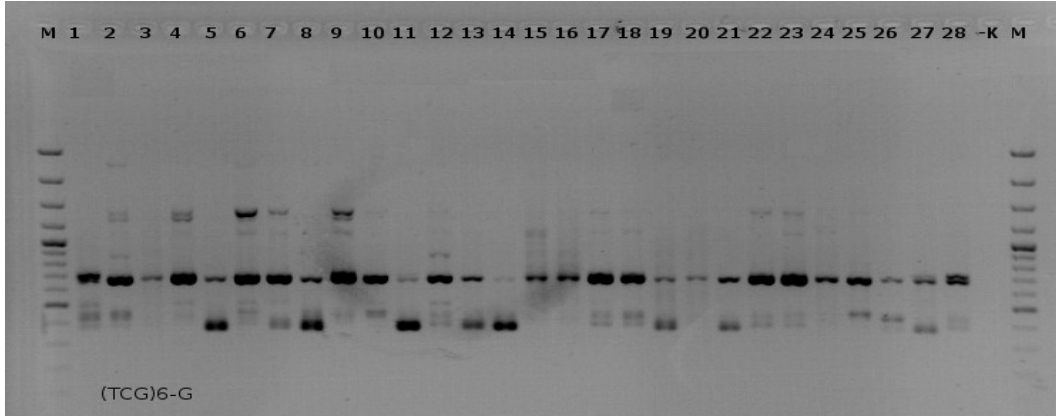
Şekil 3.10. (AC)₈-C primeri ile *Oryza sativa* çeşitlerinde oluşan bant profilleri

(AC)₈-C primeri ile 13'ü polimorfik 15 bant elde edilmiştir. Polimorfizm oranı % 86.67'dir. Elde edilen PBI değeri ise 0.340'tır. Bant büyüklükleri 650-2100 bp arasında değişmektedir.



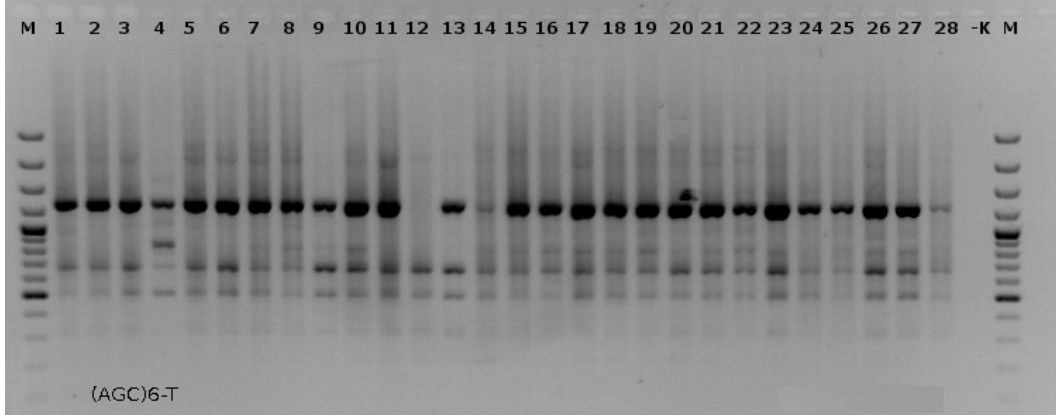
Şekil 3.11. (CAA)₅ primeri ile *Oryza sativa* çeşitlerinde oluşan bant profilleri

(CAA)₅ primeri ile 2'si polimorfik 5 bant elde edilmiştir. Polimorfizm oranı % 40.00'dır. Elde edilen PBI değeri ise 0.300'dür. Bant büyüklükleri 1100-1300 bp arasında değişmektedir.



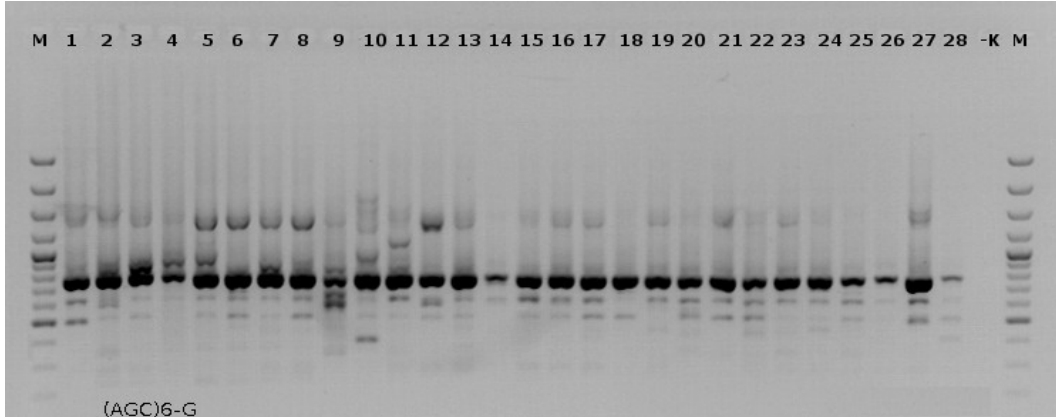
Şekil 3.12. (TCG)₆-G primeri ile *Oryza sativa* çeşitlerinde oluşan bant profilleri

(TCG)₆-G primeri ile 13'ü polimorfik 14 bant elde edilmiştir. Polimorfizm oranı % 92.86'dır. Elde edilen PBI değeri ise 0.274'tür. Bant büyüklükleri 400-1500 bp arasında değişmektedir.



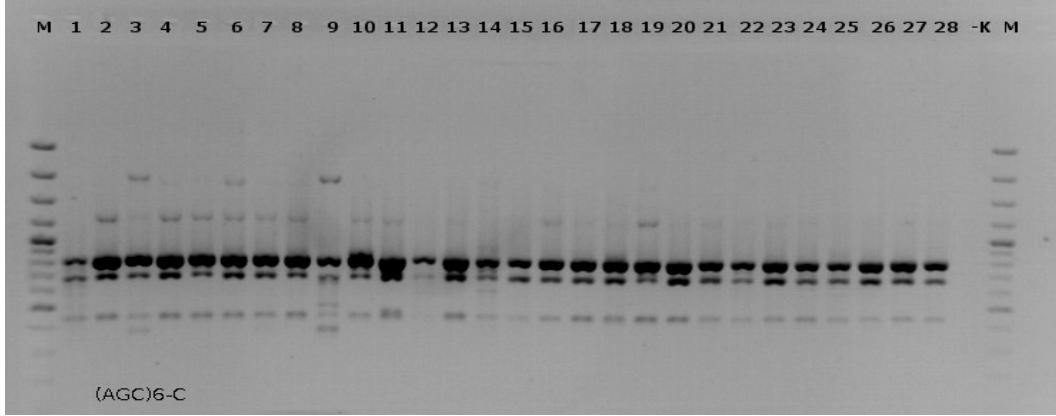
Şekil 3.13. (AGC)₆-T primeri ile *Oryza sativa* çeşitlerinde oluşan bant profilleri

(AGC)₆-T primeri ile 4'ü polimorfik 6 bant elde edilmiştir. Polimorfizm oranı % 66.66'dır. Elde edilen PBI değeri ise 0.360'tır. Bant büyüklükleri 350-2100 bp arasında değişmektedir.



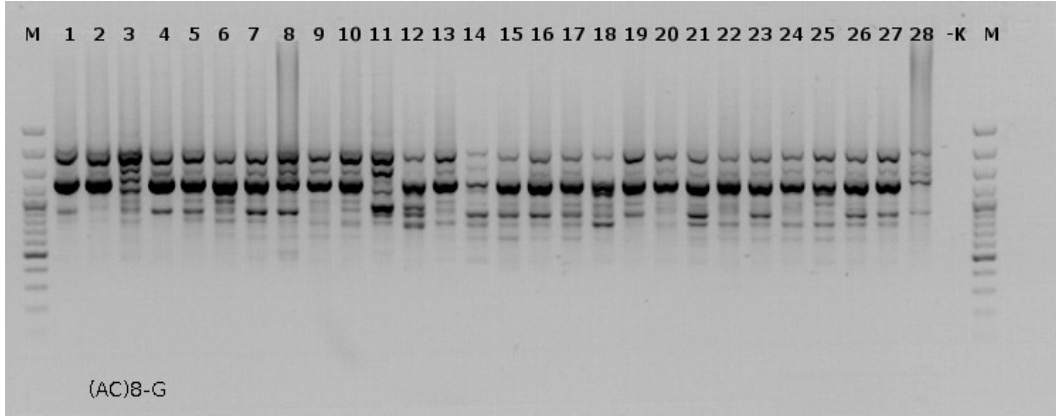
Şekil 3.14. (AGC)₆-G primeri ile *Oryza sativa* çeşitlerinde oluşan bant profilleri

(AGC)₆-G primeri ile 16'sı polimorfik 17 bant elde edilmiştir. Polimorfizm oranı % 94.12'dir. Elde edilen PBI değeri ise 0.304'tür. Bant büyüklükleri 250-1900 bp arasında değişmektedir.



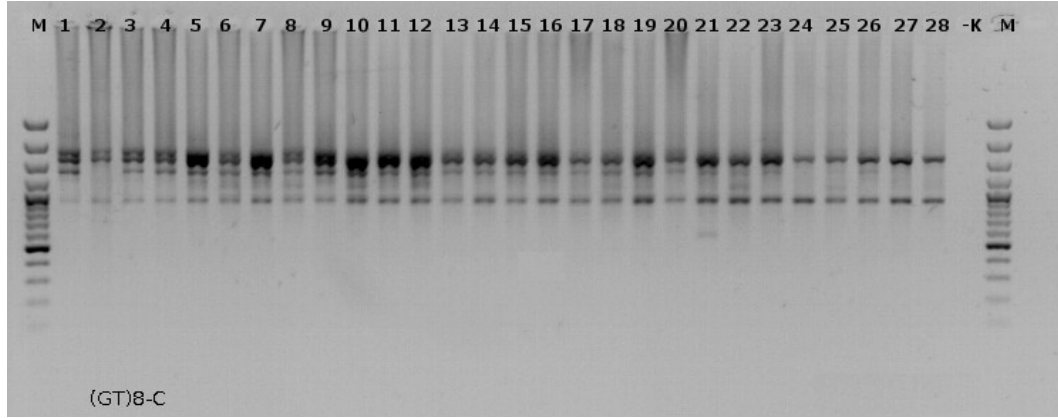
Şekil 3.15. (AGC)₆-C primeri ile *Oryza sativa* çeşitlerinde oluşan bant profilleri

(AGC)₆-C primeri ile 9'u polimorfik 12 bant elde edilmiştir. Polimorfizm oranı % 72.73'tür. Elde edilen PBI değeri ise 0.347'dir. Bant büyüklükleri 300-2500 bp arasında değişmektedir.



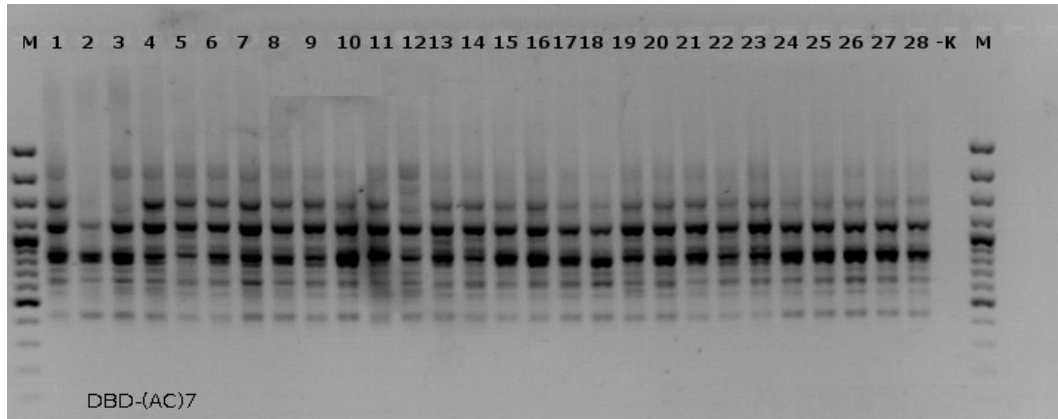
Şekil 3.16. (AC)₈-G primeri ile *Oryza sativa* çeşitlerinde oluşan bant profilleri

(AC)₈-G primeri ile 12'si polimorfik 14 bant elde edilmiştir. Polimorfizm oranı % 85.72'dir. Elde edilen PBI değeri ise 0.372'dir. Bant büyüklükleri 500-2500 bp arasında değişmektedir.



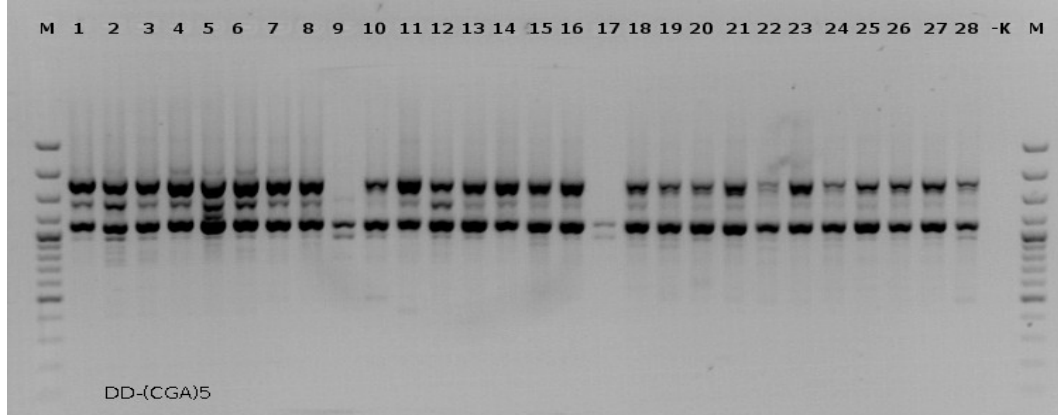
Şekil 3.17. (GT)₈-C primeri ile *Oryza sativa* çeşitlerinde oluşan bant profilleri

(GT)₈-C primeri ile 5'i polimorfik 7 bant elde edilmiştir. Polimorfizm oranı % 71.43'tür. Elde edilen PBI değeri ise 0.363'tür. Bant büyüklükleri 600-2400 bp arasında değişmektedir.



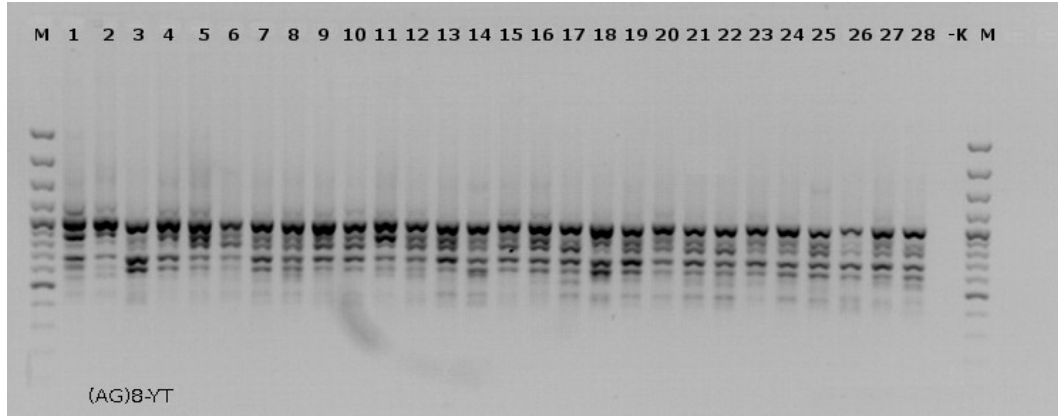
Şekil 3.18. DBD-(AC)₇ primeri ile *Oryza sativa* çeşitlerinde oluşan bant profilleri

DBD-(ACA)₇ primeri ile 6'sı polimorfik 10 bant elde edilmiştir. Polimorfizm oranı % 60.00'tür. Elde edilen PBI değeri ise 0.309'dur. Bant büyüklükleri 450-2200 bp arasında değişmektedir.



Şekil 3.19. DD-(CGA)₅ primeri ile *Oryza sativa* çeşitlerinde oluşan bant profilleri

DD-(CGA)₅ primeri ile 10'u polimorfik 11 bant elde edilmiştir. Polimorfizm oranı % 90.91'dir. Elde edilen PBI değeri ise 0.371'dir. Bant büyüklükleri 500-2000 bp arasında değişmektedir.



Şekil 3.20. (AG)₈-YT primeri ile *Oryza sativa* L. çeşitlerinde oluşan bant profilleri

(AG)₈-YT primeri ile 5'i polimorfik 11 bant elde edilmiştir. Polimorfizm oranı % 45.46'dır. Elde edilen PBI değeri ise 0.350'dir. Bant büyüklükleri 400-1600 bp arasında değişmektedir.

3.5. PCR Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Kullanılan 20 adet ISSR primerinden toplam 268 adet bant oluşturmuştur. En fazla bant 22 bant ile (GA)₈-T primerinde, en az bant ise 5 bant ile (CAA)₅ primerinde ortaya çıkmıştır. Primer başına ortalama bant sayısı ise 13.4'tür. Bantlar var (1) ya da yok (0) şeklinde değerlendirilmiştir. PCR deneyleri sonucunda oluşan 268 adet bandın 51 tanesi monomorfik, kalan 217 bant ise polimorfiktir. Bunu yüzde olarak hesapladığımızda bantların %19.02'si monomorfik, kalan %80.97'si ise polimorfiktir. Çalışılan primerin hepsinde polimorfizm gözlenmiştir. Çizelge 3.6'da primerlerin oluşturduğu bant sayısı, yaklaşık en büyük ve en küçük bant boyutları ile polimorfik bantların %'leri verilmiştir. Bütün primerler dikkate alındığında bantların büyüklükleri 250 ile 2500 bp arasında değişmektedir.

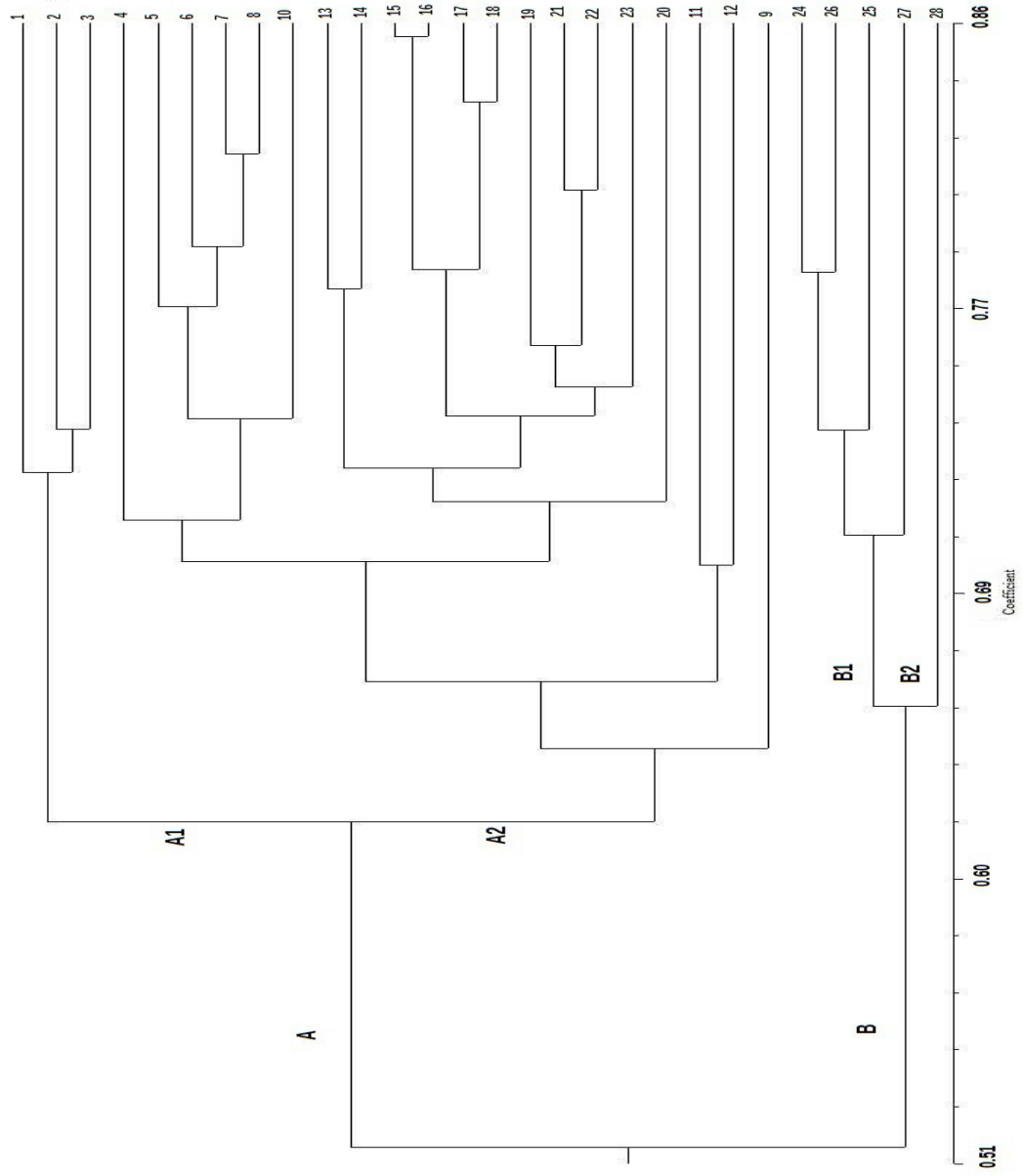
Çizelge 3.5. Primerlerin ortalama bant büyüklükleri ve % polimorfizm oranları ve PBI değerleri

Primer Adı	Bant Sayısı	Baz Çifti Aralığı (bp)	% Polimorfizm	Polimorfizm Bilgi İçeriği (PBI)
GAG-(CAA) ₅	17	500-1600	88.24	0.351
(CAG) ₅	19	700-1650	84.22	0.373
VHV-(GT) ₇ G	17	500-1750	88.24	0.364
(AG) ₈ -G	11	450-1550	81.82	0.370
(GA) ₈ -T	22	350-1900	83.37	0.374
(GA) ₈ -A	13	500-1600	69.24	0.364
(AG) ₈ -T	13	450-2100	61.54	0.374
(AG) ₈ -C	21	400-2500	90.48	0.320
(AC) ₈ -C	15	650-2100	86.67	0.340
(TCG) ₆ -G	14	400-1500	92.86	0.274
(AGC) ₆ -T	6	350-2100	66.66	0.360
(AGC) ₆ -G	17	250-1900	94.12	0.304
(AGC) ₆ -C	12	300-2500	72.73	0.347
(AC) ₈ -G	14	500-2200	85.72	0.372
(GT) ₈ -C	7	600-2400	71.43	0.363
BDB-(ACA) ₇	10	450-2200	60.0	0.309
DD-(CGA) ₅	11	500-2000	90.91	0.371
(AG) ₈ -YT	11	400-1600	45.46	0.350
(GT) ₈ -YC	13	650-1500	92.31	0.366
(CAA) ₅	5	1100-1300	40.0	0.300

Bantlar var (1) ya da yok (0) şeklinde değerlendirildikten sonra NTSYS-Pc.2.02 programı kullanılarak analiz edilmiş ve benzerlik Çizelgesi (Çizelge 3.7) ile Jaccard benzerlik değerlerinden yola çıkarak bir dendogram (Şekil 3.21) elde edilmiştir.

Çizelge 3.6. NTSYS-Pc.2.02 programı ile elde edilen benzerlik oranları

		Osmancık 97	Demir	Kıral	Gönen	Halilbey	Ece	Kırkpınar	Şumnu	Beşer	Kızaltan	Aromatik-I	Tunca	Paşalı	Çakmak	Efe	Hamzadere	Sürek-95	Serhat-92	Trakya	Ergene	Meriç	İpsala	Altınyaza	Mevlîbey	Kızılırmak	Osmancık	Karadeniz	Bafra Yıldızı
		1.000																											
	Osmancık 97		0.730	1.000																									
	Demir	0.730	1.000																										
	Kıral	0.714	0.736	1.000																									
	Gönen	0.635	0.653	0.716	1.000																								
	Halilbey	0.665	0.719	0.737	0.769	1.000																							
	Ece	0.667	0.667	0.695	0.737	0.763	1.000																						
	Kırkpınar	0.680	0.616	0.720	0.728	0.762	0.818	1.000																					
	Şumnu	0.671	0.640	0.688	0.662	0.774	0.766	0.820	1.000																				
	Beşer	0.616	0.568	0.644	0.619	0.627	0.716	0.743	0.675	1.000																			
	Kızaltan	0.579	0.571	0.627	0.643	0.696	0.759	0.763	0.738	0.678	1.000																		
	Aromatik-I	0.623	0.564	0.641	0.636	0.701	0.680	0.706	0.673	0.607	0.664	1.000																	
	Tunca	0.606	0.560	0.624	0.609	0.668	0.671	0.661	0.665	0.580	0.666	0.694	1.000																
	Paşalı	0.612	0.603	0.668	0.648	0.730	0.733	0.763	0.763	0.662	0.742	0.684	0.674	1.000															
	Çakmak	0.536	0.509	0.616	0.622	0.630	0.665	0.706	0.671	0.612	0.674	0.643	0.623	0.779	1.000														
	Efe	0.573	0.555	0.613	0.641	0.666	0.701	0.716	0.705	0.643	0.684	0.669	0.667	0.792	0.796	1.000													
	Hamzadere	0.607	0.567	0.647	0.676	0.697	0.725	0.764	0.704	0.655	0.708	0.726	0.667	0.760	0.740	0.856	1.000												
	Sürek-95	0.595	0.547	0.592	0.629	0.683	0.759	0.737	0.713	0.653	0.693	0.686	0.664	0.729	0.697	0.790	0.831	1.000											
	Serhat-92	0.607	0.568	0.624	0.589	0.682	0.697	0.711	0.748	0.590	0.669	0.640	0.653	0.727	0.709	0.760	0.768	0.836	1.000										
	Trakya	0.571	0.563	0.621	0.683	0.716	0.683	0.736	0.761	0.628	0.691	0.660	0.628	0.740	0.696	0.732	0.731	0.741	0.752	1.000									
	Ergene	0.568	0.539	0.641	0.625	0.634	0.668	0.712	0.688	0.604	0.705	0.636	0.627	0.702	0.696	0.694	0.720	0.664	0.702	0.756	1.000								
	Meriç	0.601	0.603	0.660	0.678	0.733	0.689	0.752	0.776	0.595	0.667	0.667	0.668	0.731	0.701	0.750	0.761	0.719	0.712	0.732	0.760	1.000							
	İpsala	0.589	0.562	0.606	0.643	0.673	0.669	0.701	0.726	0.613	0.684	0.609	0.646	0.661	0.674	0.746	0.721	0.743	0.728	0.741	0.718	0.809	1.000						
	Altınyaza	0.573	0.565	0.613	0.653	0.680	0.688	0.716	0.693	0.610	0.684	0.629	0.632	0.734	0.701	0.769	0.766	0.746	0.707	0.732	0.721	0.724	0.789	1.000					
	Mevlûbey	0.465	0.461	0.513	0.524	0.564	0.576	0.569	0.571	0.517	0.549	0.562	0.517	0.608	0.603	0.661	0.661	0.612	0.601	0.574	0.594	0.596	0.616	0.664	1.000				
	Kızılırmak	0.447	0.461	0.485	0.460	0.533	0.564	0.566	0.560	0.516	0.569	0.541	0.467	0.571	0.590	0.567	0.600	0.599	0.569	0.560	0.561	0.569	0.567	0.723	1.000				
	Osmancık	0.421	0.417	0.460	0.471	0.467	0.527	0.549	0.524	0.460	0.532	0.493	0.471	0.566	0.566	0.606	0.596	0.560	0.566	0.567	0.536	0.563	0.619	0.764	0.746	1.000			
	Karadeniz	0.405	0.409	0.399	0.417	0.466	0.465	0.503	0.491	0.442	0.468	0.471	0.424	0.493	0.500	0.529	0.521	0.500	0.493	0.507	0.533	0.500	0.507	0.540	0.677	0.688	0.744	1.000	
	Bafra Yıldızı	0.399	0.395	0.410	0.402	0.434	0.452	0.461	0.431	0.423	0.454	0.447	0.446	0.500	0.466	0.504	0.466	0.476	0.460	0.462	0.466	0.446	0.464	0.515	0.613	0.624	0.690	0.676	1.000



Şekil 3.21.Çeltik çeşitlerinin ISSR markırları kullanılarak oluşturulan dendogramı

(1:Osmancık97, 2:Demir, 3:Kıral, 4:Gönen, 5:Halilbey, 6:Ece, 7:Kırkpınar, 8:Şumnu, 9:Beşer, 10:Kızıltan, 11:Aromatik-I, 12:Tunca, 13:Paşalı, 14:Çakmak, 15:Efe, 16:Hamzadere, 17:Sürek95, 18:Serhat92, 19:Trakya, 20:Ergene, 21:Meriç, 22:İpsala, 23:Altınyazı, 24:Mevlütbey, 25:Kızılırmak, 26:Osmancık, 27:Karadeniz, 28:Bafra Yıldızı)

4. TARTIŞMA, SONUÇ ve ÖNERİLER

Çeltik dünyada buğday ve mısırla beraber en çok tarımı yapılan tahıldır. Ayrıca, yüksek besin değerleriyle, dünyanın en önemli besin kaynakları arasındadır. Bu nedenlerle çeltiğin ekonomik önemi çok büyüktür. Bu çalışmada 20 adet ISSR primeri kullanılarak analiz edilen 28 adet çeltik çeşidinin genotipleri arasındaki genetik ilişkiler dominant bir markır tekniği olan ISSR-PCR yöntemi ile ortaya çıkarılmıştır. Literatür araştırması sonucunda Türkiye'de geliştirilmiş çeltik çeşitleri üzerine ISSR markırları ile yapılmış genetik bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmamıza en yakın çalışma Büyükünol ve Bay [65]'in Türkiye'deki çeltik çeşitlerinin tohum depo proteinleri ve RAPD markırları kullanarak yaptıkları genetik analiz çalışmasıdır. ISSR analizleri sonucunda 28 çeltik çeşidinin tamamı birbirinden ayrılmıştır. Genetik benzerlik indeksi Jaccard eşitliğine göre NTSYS-Pc.2.02. [70] programında hesaplanmıştır. Soyağacının elde edilmesinde UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average) yöntemi kullanılmıştır. Analiz sonucunda elde edilen soyağacında 2 ana grup oluşmuştur. İlk ve büyük grubu Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsünden gelen çeşitler (A), ikinci ve küçük grubu ise Karadeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsünden gelen çeşitler (B) oluşturmuştur (Şekil 3.21).

4.1. Bant Sayıları ve Polimorfizm Oranlarının Belirlenmesi

Çalışmada kullanılan 20 adet ISSR primeri toplam 268 bant vermiş olup en az bant (5 adet) (CAA)₅ primerinden, en fazla bant (22 adet) (GA)₈-T primerinden elde edilmiştir. Oluşan 268 bandın 217 tanesi polimorfiktir dolayısıyla gözlenen polimorfizm oranı %80.97' dir. Primerlerin polimorfizm oranları %40.00-%94.12 arasında değişmektedir. Polimorfizm oranı en düşük olan primer %40.00 ile 5 bant veren (CAA)₅, polimorfizm oranı en yüksek olan primer de %94.12 ile 17 bant veren (AGC)₆-G primeridir. En fazla bant veren (GA)₈-T primerinde 22 bandın 19' u polimorfiktir. En az bandı veren (CAA)₅ primerinde 5 bandın 2' si polimorfiktir

Wan ve ark. [55] *Oryza meyeriana*'nın 34 farklı popülasyonunda 13 farklı ISSR primeri ile yaptıkları çalışmada 135' i polimorfik olan 168 bant elde etmişler ve polimorfizm oranını %80.36 bulmuşlardır. Qian ve ark. [53] *Oryza granulata* ile RAPD markırları kullanarak yaptıkları çalışmada 203' ü polimorfik olmak üzere, %83.5 polimorfizm oranı ile 243 bant elde etmişlerdir. Rajani ve ark. [73] 10 adet *Oryza sativa* çeşidi ile RAPD primerleri kullanarak yaptıkları çalışmada 363' ü polimorfik 428 bant elde etmişlerdir. Bu bantların polimorfizm oranı ise %85.02 dir. Görüldüğü üzere çalışmamızda elde edilen polimorfizm oranları benzer veya farklı markır sistemleri kullanılarak yapılan diğer çalışmalarda elde edilen polimorfizm oranları ile uyumludur.

Çalışmamızda farklı sabitleyici nükleotitlere sahip aynı tekrar dizilerinden oluşan primerler farklı sayıda bant oluşturmuştur. Örneğin, sabitleyici bazı G olan (AC)₈-G primeri 14 bant, sabitleyici bazı C olan (AC)₈-C primeri 15 bant oluşturmuştur. Aynı şekilde sabitleyici bazı A olan (GA)₈-A primeri 13 bant, sabitleyici bazı T olan (GA)₈-T primeri ise 22 bant oluşturmuştur. Diğer bir benzer primer grubuna bakacak olursak sabitleyici bazı C olan (AGC)₆-C primeri 12 bant, sabitleyici bazı G olan (AGC)₆-G primeri 17 bant ve sabitleyici bazı T olan (AGC)₆-T primeri 6 bant oluşturmuştur. Son olarak sabitleyici bazı C olan (AG)₈-C primeri 21 bant, sabitleyici bazı G olan (AG)₈-G primeri 11 bant ve sabitleyici bazı T olan (AG)₈-T primeri 13 bant oluşturmuştur. Bu sonuç bize kısa dizi tekrarlarından oluşan ISSR primerlerine farklı sabitleyici baz eklenmesi suretiyle bu primerlerin genomda farklı bölgelere bağlanma olasılığının arttırılabileceğini göstermektedir.

Reddy ve ark. [74] (AG) ve (GA) tekrarlı primerlerin çeltik genomunda daha net bantlar oluşturduğunu söylemişlerdir. Ayrıca Sonah ve ark. [75] çalışmalarında *O. sativa*' da 313 tane (AG) tekrarı bulmuşlardır. Bizim çalışmamızda en yüksek bant sayısını (GA) ve (AG) tekrarlı primerler vermiştir. Çalışmada kullandığımız dinükleotit ve trinükleotit tekrarlı primerlerden elde edilen polimorfizm değerleri farklılık göstermektedir. Dinükleotit tekrarlı primerlerin oluşturdukları ortalama bant sayısı 13.92, polimorfizm yüzdesi ise % 79.04 iken trinükleotit tekrarlı primerlerin oluşturdukları ortalama bant sayısı

12.63, polimorfizm yüzdesi ise % 84.1' dir. Benzer şekilde Galvan ve ark. [76] yaptıkları çalışmada trinükleotit tekrarlı primerlerin ürettikleri bantların %53' ünün, dinükleotit tekrarlı primerlerin ürettikleri bantların ise %38' inin polimorfik olduğunu bulmuşlardır. Dinükleotit tekrarlı primerlerin oluşturduğu bant sayısı trinükleotit tekrarlı primerlerin oluşturduğu bant sayısından yüksek bulunmuştur. Bu beklenen bir sonuçtur. Çünkü Sonah ve ark. [75] yaptıkları bir çalışmada monokotil ve dikotil bitki türlerindeki mikrosatellit bölgelerinin dağılımını araştırmışlar ve *Oryza sativa*' da dinükleotit tekrar bölgelerinin sayısının (37.282) trinükleotit tekrar bölgelerinin sayısından (29.819) daha fazla olduğunu göstermişlerdir.

4.2. Polimorfizm Bilgi İçeriğinin Değerlendirilmesi

Farklı markır sistemleri polimorfizm seviyelerine bağlı olarak farklı bilgi içeriğine sahiptirler [77]. Dolayısıyla bir genetik çalışma tasarlanırken polimorfik lokuslara sahip bir markırın bulunmasının zorluğu/kolaylığı, çalışmada ne kadar markırın gerekli olacağı ve bu markırların hangi oranda polimorfik olmaları gerektiği göz önünde bulundurulmalıdır. Bu sorular markırların bilgi içeriğini ölçerek cevaplandırılabilir [77].

Polimorfizm bilgi içeriği (PBİ) değeri genetikte yaygın olarak kullanılan bir markır lokusunun polimorfizm ölçüsü olarak kullanılır. Bu değer ebeveynlerin sahip olduğu markır allellerinden hangilerinin bir sonraki nesle kalıtıldığını gösterir. PBİ değeri kodominant markırlar için 0.5 ile 1.0 arasında değişirken dominant markırlar için (ISSR, RAPD, AFLP gibi) azami 0.5 değerine sahiptir [78].

Çizelge 3.6' daki polimorfizm bilgi içeriği değerlerine bakıldığında primerlerinin PBİ değerlerin 0.274 ile 0.374 arasında değiştiği görülebilir. PBİ değerinin ortalaması ise 0.347'dir. ISSR markırları dominant karakterli olduğundan çalışmamızdaki markırların PBİ değeri beklenildiği gibi 0.5 'in altında kalmıştır. Polimorfizm bilgi içeriği açısından bakıldığında en düşük değere sahip olan primerin (0.274) (TCG)₆-G primeri, en yüksek değere sahip olan

primerin de (0.374) (CAG)₅ primeri olduğu belirlenmiştir. Bu da bize 28 çeltik çeşidinden oluşan popülasyonda, çalışmada kullandığımız 20 adet ISSR primerinden en fazla polimorfizm bilgisini (CAG)₅ primerinden, en az polimorfizm bilgisini ise (TCG)₆-G primerinden elde edebileceğimizi göstermektedir.

4.3. Benzerlik Çizelgesinin ve Dendrogramın Değerlendirilmesi

Genetik benzerlik değerlerine bakıldığında Efe ve Hamzadere çeşitlerinin en yakın çeşit olup, en yüksek benzerlik değerine (0.856) sahip olduğu saptanmıştır. Diğer en yakın çeşitler (0.800 ve üstü) ise Ece ve Kırkpınar (0.818), Kırkpınar ve Şumnu (0.820), Hamzadere ve Sürek-95 (0.831), Sürek-95 ve Serhat-92 (0.836), Meriç ve İpsala (0.809) çeşitleridir. Birbirine en az benzer çeşitler ise Demir ve Bafra Yıldızı olup, en küçük benzerlik değerine (0.395) sahiptirler. Diğer az benzer çeşitler (0.410 ve altı) ise Osmancık-97 ve Karadeniz (0.405), Osmancık-97 ve Bafra yıldızı (0.399), Demir ve Karadeniz (0.409), Kırıl ve Karadeniz (0.399), Kırıl ve Bafra Yıldızı (0.410), Gönen ve Bafra Yıldızı (0.402) çeşitleridir. Trakya'dan gelen çeşitler içinde genetik açıdan birbirine en yakın iki çeşidin Efe ve Hamzadere (0.856) çeşitleri olduğu, Karadeniz'den gelen çeşitler arasında genetik olarak en yakın çeşitlerin Mevlütbey ve Osmancık (0.784) çeşitleri olduğu belirlenmiştir. Karadeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsünden ve Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsünden gelen çeşitler tek grup olarak ele alındığında en fazla benzerlik Altınyazı ve Mevlütbey (0.664) çeşitleri arasındadır. Tüm çeşitlere ait ortalama benzerlik değeri 0.656 olarak hesaplanmıştır.

Dendrograma baktığımızda (Şekil 3.21) çeşitlerin net bir şekilde iki ana gruba ayrıldığını görebiliriz (A ve B). Büyük grup olan A grubu en fazla farklılaşmanın olduğu gruptur ve net bir şekilde A1 ve A2 olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. A1 grubu A2 grubundan küçük olup Osmancık-97, Demir ve Kırıl çeşitlerini kapsamaktadır. Bu çeşitler hemen hemen benzer olgunlaşma süresinesahiptirler, fakat verim ve boy uzunluğu açısından farklıdırlar. A2 grubu

da iki alt dala ayrılmıştır. Bu dallardan birisini tek başına Beşer çeşidi oluşturmaktadır. Beşer çeşidi İpsala çeşidinden mutasyon ile elde edilmesine rağmen (Çizelge 2.1) İpsala çeşidi A2 grubunun diğer dalında yer almıştır. Yine A2' nin alt dallarından diğerinde bulunan Gönen çeşidinin en büyük farkı veriminin diğerlerinden daha düşük olmasıdır. Daha ileri bir boğumdan dallanan Kızıltan çeşidinin boyunun diğerlerinden daha kısa olması bu dallanmayı açıklamada kullanılabilir. A2 grubundaki diğer çeşitlerin verimleri 800-900 kg/da (Çizelge 2.2) arasında değişmektedir. Büyükcünal ve Bay [65] çalışmalarında, RAPD markırlar kullanmalarına rağmen, bizim çalışmamızda olduğu gibi Sürek-95 ve Serhat-92 çeşitlerini aynı boğumdan dallandırmışlardır. Fakat bizim çalışmamızın aksine, bizim çalışmamızda farklı alt gruplarda yer alan (A1 ve A2) Osmancık-97 ve Altınyazı çeşitleri ile Demir ve İpsala çeşitlerini aynı yerde kümelenmişlerdir.

B grubu ise tamamıyla KTAE' den gelen çeşitleri kapsamaktadır. B grubu da B1 ve B2 olarak ikiye ayrılmıştır. B2 grubundaki tek çeşit Bafra Yıldızı çeşidi olmuştur. Bafra Yıldızı çeşidinin verim açısından B1 grubundaki çeşitlerden çok fazla farkı yoktur. Bu durum morfolojik farklılıkların Bafra Yıldızı çeşidinin ayrı bir dal oluşturmada katkısı olabileceğine işaret etmektedir.

Dendrogram ve benzerlik indeksi matriksi incelendiğinde; TTAE'den temin edilen çeşitlerin bir arada kümelenedikleri, KTAE'den temin edilen çeşitlerin de yine kendi aralarında kümeleniği görülmüştür (Şekil 3.21). Kültüre alınmış çeltikte çoğunlukla kendine tozlaşma görülsede düşük oranda doğal çapraz tozlaşma da görülmektedir [79]. Çapraz tozlaşmanın görüldüğü durumlar %1 gibi düşük bir oranda ifade edilsede bu oran birbirine bitişik ekim alanlarındaki fiziksel temas ve rüzgarın etkisi ile daha yüksek olabilir. Özellikle stigması başak kabuğundan dışarıya doğru uzanan çeltik varyetelerinde dış çaprazlanma oranı yüksektir [79]. Dolayısıyla, TTAE' den ve KTAE' den gelen çeşitlerin ayrı gruplar oluşturmalarının sebebi birbirine yakın konumlu ekim alanlarındaki farklı çeltik çeşitlerine ait polenlerin çeşitli etkenlerle bitkiler arası taşınarak çapraz tozlaşmanın gerçekleşmesi ve çeşitlerin birbirlerine olan benzerliğini arttırması olabilir.

Genotiplerin geliştirildikleri merkezlere göre gruplanmaları Triticale [45], pamuk [80], Basmati çeltik çeşitleri [81] ve buğday [82] çeşitleri için de bildirilmiştir.

4.4. Çeşitlerin Benzerliğinin Ebeveynler Açısından Değerlendirilmesi

Birbirine en yakın çeşit olan Efe ve Hamzadere çeşitlerinin ebeveynlerine bakacak olursak Efe çeşidi Baldo (ana) ve Demir (baba) çeşitlerinden geliştirilmiş, Hamzadere çeşidi ise Demir (ana) ve 83013-TR631-4-1-2 (baba) çeşidinden geliştirilmiştir. İkisinde de ortak olan ebeveyn Demir çeşididir. Ayrıca bu iki çeşidin birbirine yüksek oranda benzemesi bu iki çeşidin diğer ebeveynlerinin çok yakın olmasa da ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Bu iki çeşidin ebeveynlerinden biri olan Demir çeşidi ile benzerliğine bakıldığında; Demir çeşidinin Efe çeşidi ile benzerliği 0.555, Demir çeşidinin Hamzadere çeşidi ile benzerliğine bakıldığında ise 0.567 olduğu görülmektedir (Çizelge 3.6). İkinci birbirine en yakın olan Sürek-95 ve Serhat-92 çeşitlerinin ebeveynlerine bakıldığında sırası ile Rocca (İtalyan) ve Rodina (Bulgar), Rocca ve Krasnodarsky-424 (Rus) olduğu görülmektedir. Bu iki çeşidin yine dişi ebeveyni Rocca olan Osmancık-97 ile olan benzerliğine bakacak olursak Sürek-95'in Osmancık-97 ile olan benzerliğinin 0.595, Serhat-92' nin Osmancık-97 ile olan benzerliğinin 0.607 olduğunu görürüz. Genel olarak baktığımızda ortak ebeveyni olan çeşitler dendrogramda daha yakın konumlarda bulunmaktadır.

Birbirine en az benzeyen çeşit olan Demir ve Bafra yıldızı çeşitlerinin ebeveynleri sırası ile Plovdiv (ana) ve Lido (baba), Ballilla-28 (ana) ve TR666-8-1-1-1 (baba)'dir. Ayrıca ebeveyn bilgilerine ulaşamadığımız Osmancık çeşidinin benzer adı taşıyan Osmancık-97 çeşidi ile benzerliğinin 0.421 olduğu görülmektedir. Bu ise bize Osmancık çeşidinin ebeveynlerinin Osmancık-97'den farklı olduğunu göstermektedir. Osmancık çeşidine en yakın çeşit olan Mevlütbey çeşidi ile olan benzerliği 0.784'lük oran dikkate alındığında bu yüksek oran bize Mevlütbey çeşidinin ebeveynleri olan Drago ve Kral çeşitlerinden birinin Osmancık çeşidinin ebeveynlerinden biri olabileceğine işaret etmektedir.

Görüldüğü gibi dendrogramda bazı çeşitler ebeveynlerine yakın gruplanırken bazı çeşitler ise ebeveynleriyle uyumlu bir şekilde dallanmamışlardır. İleride yapılacak çalışmalarda çeşitlerin ebeveynlerinin de analizlere dahil edilmesi daha net sonuçlara ulaşılmasını sağlayacaktır.

Geleneksel ıslah yöntemleri ile çok sayıda yeni çeşit, üreticilerin hizmetine sunulmuştur. Ancak, bu yöntemlerle çeşit geliştirmede uzun zamana, fazla emeğe ve kaynağa gerek duyulmaktadır [83, 84]. Mutasyon ile yeni çeşitler oluşturma geleneksel yöntemlere göre daha hızlı gerçekleşmektedir. Mutasyon ıslahı ile melezleme ıslahı karşılaştırıldığında, mutasyon ıslahı sonucunda çeşidin genotipinde oldukça az değişiklik meydana gelmektedir [85]. Bu çalışmada kullanılan çeltik çeşitlerinden İpsala ve Beşer buna bir örnek oluşturabilir. Bu iki çeşidin benzerlik oranı 0.613 olarak bulunmuştur. İpsala ve Beşer çeşitlerinde oluşturulan bant profillerine bakıldığında (AG)₈-T (Şekil 3.5) primerinin hem İpsala hem de Beşer çeşidinde aynı moleküler ağırlıklara sahip 6 bant oluşturduğu görülmektedir. Diğer taraftan (AG)₈-G (Şekil 3.4) primeri Beşer’de 6 bant oluştururken, İpsala’da 3 bant oluşturmıştır. Bu bantlardan sadece 2’ si İpsala’daki bantlarla ortak olup diğerleri farklıdır.

Erkek ebeveynleri aynı olan (Thainato) Kızıltan ve Tunca çeşitlerinin benzerliği 0.656’ dır. Yurt dışından getirilen Aromatik-I çeşidinin en benzer olduğu çeşit 0.694 ile ebeveynleri Rocca (İtalyan) ve Thainato (İspanyol) olan Tunca çeşididir. Buradan Aromatik-I çeşidinin ebeveynlerinin İtalyan Rocca veya İspanyol Thainato ile ilişkili olabileceği düşünülebilir.

Çeşitlerin geneline bakacak olursak en fazla verim potansiyeli 1100 kg/da ile Demir ve Halilbey çeşitlerindedir [86]. Bu çeşitlerden Demir A1 dalında yer alırken, Halilbey A2 dalında yer almaktadır. TTAE’ den gelen çeşitler arasında en az verim potansiyeli ise 700 kg/da ile Aromatik-I çeşidindedir. Diğer çeşitler için bu potansiyel 800-1000 kg/da arasında değişmektedir. KTAE’ den gelen çeşitler arasında en az verim potansiyeli 648.43 kg/da ile Karadeniz çeşidinde, en fazla verim potansiyeli ise 836.93 kg/da ile Osmancık çeşidindedir. Bunların yanında yukarıda bahsettiğimiz İpsala’nın mutasyonu olan Beşer ile verim potansiyeli açısından aynı olduğu görülmektedir (Çizelge 2.2). En fazla verime sahip olan

Demir ve Halilbey çeşitlerinin benzerliği 0.719' dur. Dolayısıyla, bu çeşitlerden herhangi birinin ebeveyn olarak kullanılacağı bir çalışma ile verimi yüksek yeni çeşitler elde edilebilir.

Demir ve Halilbey çeşitlerinin ebeveynlerine bakacak olursak Demir çeşidi Plovdiv (BG) ve Lido (I) olduğu görülmektedir (Çizelge 2.1). Halilbey çeşidinin ebeveynleri ise Bulgar ve Fransız melezi olan İpsala ile Veneria (I)'dır (Çizelge 2.1). Aynı şekilde diğer yüksek verimli çeşitlere bakarsak; (1000 kg/da) Osmancık-97'nin ebeveynlerinden biri İtalyan kökenli Rocca'dır, Sürek-95' in bir ebeveyni İtalyan (Rocca), diğeri ise Bulgar (Rodina)'dır. En yüksek verime sahip çeşitlerin ebeveynlerinden birinin İtalyan olduğu görülmektedir. İki ebeveyni de İtalyan olan Osmancık-97 ve Altınyazı çeşitlerinden Osmancık-97'nin daha yüksek verime sahip olduğu görülmektedir. Bu durum devam eden çeltik geliştirme çalışmalarında İtalyan kökenli çeşitlerin daha yüksek verimli çeşitlerin geliştirilmesinde yardımcı olabileceğini düşündürmektedir.

4.5. Sonuçlar

- Bu çalışmada toplan 28 adet çeltik çeşidi kullanılmıştır. Bu çeşitler arasındaki genetik benzerlik seviyeleri ISSR markırlarıyla tespit edilmiştir.
- Yapılan deneyler sonucunda benzerlik değerlerinin 0.395 ile 0.856 arasında değiştiği görülmektedir. Ortalama benzerlik değeri ise 0.656 olarak bulunmuştur. Birbirine en çok benzeyen çeşitler Efe ve Hamzadere (0.856), birbirine en az benzeyen çeşitler ise Demir ve Bafra Yıldızı (0.395) çeşitleridir (Çizelge 3.7 ve Şekil 3.21).
- Çalışmada 217' si polimorfik 268 bant elde edilmiş ve polimorfizm oranı %80.97 olarak bulunmuştur. Primerlerin polimorfizm oranları %40.00 ile %94.12 arasında değişmektedir. En düşük polimorfizm oranı %40 ile (CAA)₅ primerinde, en yüksek polimorfizm oranı ise %94.12 ile (AGC)₆-G primerindedir.
- Trinükleotit tekrarlı primerlerin polimorfizm oranı dinükleotit tekrarlı primerlerin polimorfizm oranından yüksektir. Trinükleotit tekrarlı primerlerin polimorfizm oranı %84.1, dinükleotit tekrarlı primerlerin

polimorfizm oranı %79.04 olarak bulunmuştur.

- PBI deęerleri 0.274 ile 0.374 arasında deęiřmektedir. Ortalama PBI deęeri 0.347'dir. En dūřuk PBI deęeri 0.274 ile (TCG)₆-G primerinde, en yūksək PBI deęeri ise 0.374 ile (CAG)₅ primerindedir.
- Elde ettięimiz sonuçlar doęrultusunda çalıřtıęımız çeřitlerin ISSR markırlarıyla net bir řekilde ayrılabilceęi gōrūlmūřtur. Fakat benzerlik deęerlerinin yūksək olması genetik çeřitlilik oranının dūřuk olduęunu gōstermektedir.
- Genetik çeşitliliğin korunması adına eltik ışlah çalışmalarında birbirine genetik açıdan az benzeyen çeşitlerin kullanılması önemlidir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçların bir başka markır sistemiyle de teyit edildikten sonra ileride yapılacak ışlah çalışmalarına katkı sağlayacağı dūřūnūlmektedir.

5. KAYNAKLAR

- [1] National Center for Biotechnology Information (NCBI), Taxonomy Browser, 2013. <http://www.ncbi.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>
- [2] Vaughan D.A., Morishima H., Kadowaki K., "Diversity in the *Oryza* Genus," Current Opinion in Plant Biology, vol 6, s. 139-146, 2003.
- [3] Anonim, *The Biology and Ecology of Rice (Oryza sativa L.) in Australia* Australian Government, Department of Health and Ageing, Office of the Gene Technology Regulator, Australia, 2005.
- [4] Vaughan D.A. *The Wild Relatives of Rice*, International Rice Research Institute, Los Banos, Filipinler, 1994.
- [5] Vaughan D.A., Ge S., Kaga A., Tomooka N., "Phylogeny and Biogeography of the Genus *Oryza*," Rice Biology in the Genomics Era. Biotechnology in Agriculture and Forestry 62:219-234, 2008.
- [6] Anonim, International Rice Research Institute (IRRI), Rice Knowledge Bank, 2013. <http://www.knowledgebank.irri.org/ipm/thedirtydozen/oryzasativa-1.html>
- [7] Vaughan D.A. ve Morishima H., "*Biosystematics of the Genus Oryza*" *Rice. Origin, History, Technology and Production*, (Ed. Smith W.C., Dilday R.H.), John Wiley and Sons Inc., Hoboken, New Jersey, 27-65, 2003.
- [8] Anonim, GeoChemBio, Ecology and General Biology, 2013. <http://www.geochembio.com/biology/organisms/rice/>,
- [9] Taşlıgil N. ve Şahin G., "Türkiye'de Çeltik (*Oryza sativa* L.) Yetiştiriciliği ve Coğrafi Dağılımı," Adıyaman Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü Dergisi, sayı 6, s. 182-203, 2011.
- [10] Sürek H. *Çeltik Tarımı*, Hasad Yayıncılık, İstanbul, 2002.
- [11] Kün E., Çiftçi C.Y., Birsin M., Ülger A.C., Karahan S., Zencirci N., Öktem A., Güler M., Yılmaz N., Atak M. "Tahıl ve Yemeklik Tane Baklagiller Üretimi" Türkiye Tarım Mühendisliği VI. Teknik Kongresi, 3-7 Ocak, TMMOB Ziraat Mühendisleri Odası, cilt 1, s. 367-407, 2005.

- [12] Göney S. *Sıcak Bölgelerde Ziraat Hayatı* Coğ. Enstitüsü Yayınları, Yayın No 116, Edebiyat Fakültesi Yayınları, Yayın No 2732, Edebiyat Fak. Matbaası, İ.Ü., İstanbul, 1980.
- [13] Anonim, Food and Agriculture Organisation (FAO), FAO Statistics, 2011.
- [14] Anonim, Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) (2009), İstatiksel Tablolar, Tahıllar ve Diğer Bitkisel Ürünler, Tahıllar, 2009.
- [15] Anonim, Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK), İstatiksel Tablolar, Tahıllar ve Diğer Bitkisel Ürünler, Tahıllar, 2012.
- [16] Anonim, Toprak Mahsulleri Ofisi (TMO), İstatistikler, Tablolar, Türkiye Çeltik Ekiliş- Üretim-Verim ve TMO Alımları, 2012.
- [17] Ulukan H., "Klasik Bitki Islahı ve Genetik Mühendisliği ile Oluşturulan Değişimlere Genel Bakış," U. Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi, Cilt 21, Sayı 2, 27-40, 2007.
- [18] Eserkaya Güleç T., Yıldırım A., Ateş Sönmezoğlu Ö., "Bitkilerde Markör Destekli Seleksiyon," Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi 3(2):67-79, 2010.
- [19] Özgen M., Ertunç F., Kınacı G., Yıldız M., Birsin M., Ulukan H., Emiroğlu H., Koyuncu N., Sancak C., Tarım Teknolojisinde Yeni Yaklaşımlar ve Uygulamalar: Bitki Biyoteknolojisi, 6. Türkiye Ziraat Mühendisleri Teknik Kongresi, Ankara, 2005.
- [20] Taşpınar M.S., Tosun M., "İzoenzim Elektroforez Tekniğinin Bitki Islahında Kullanımı," Atatürk Üniv. Ziraat Fak. Derg. 33 (4), 451-456, 2002.
- [21] Dirik H., "Genetik Çeşitlilik ve Orman Gen Kaynaklarının Korunması," İ.Ü. Orman Fakültesi Dergisi. S113-121, 1997.
- [22] Lankau R., "Loss Of Genetic Diversity Threatens Species Diversity", Enviromental News Network, Wild Life, 2007.
- [23] Hilooğlu M., *Türkiye'de Yayılış Gösteren Petrorrhagia Türleri Arasındaki Genetik Akrabalığın Moleküler Belirteçlerle Tespit Edilmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, 2012.

- [24] Hughes A.R., Stachowicz J.J., "Genetic diversity enhances the resistance of a seagrass ecosystem to disturbance," *Proceeding of the National Academy of Sciences*, 101:8998-9002, 2004.
- [25] Hajjar R., Jarvis D.I., Gemmil-Herren B., "The utility of crop genetic diversity in maintaining ecosystem services," *Agriculture Ecosystem and Enviroment*. 123: 261-270, 2008.
- [26] Pradeep Reddy M., Sarla N., Siddiq E.A., "Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding," *Euphytica* 128: 9–17, 2002.
- [27] Gülşen, O., Mutlu, N., "Bitki Biliminde Kullanılan Genetik Markırlar ve Kullanım Alanları," *Alatarım*, 4 (2): 27-37, 2005.
- [28] Khang, S., Spoor W., "Use of moleculer and morfolojik markers as a quality control in plant tissue culture," *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 4(4):479-482, 2001.
- [29] Tamam, A., *Bazı Avokado (Persea americana Mill.) Çeşitlerinin Morfolojik ve Moleküler Karakterizasyonu* Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Adana, 2008.
- [30] Sambrook J, Fritschi. E.F., Maniatis. T., *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.
- [31] Levi A., Thomas C.H., Trebitsh T., Salman A., King J., Karalius J., Newman M., Reddy O.U.K., Xu Y., Zhang X., "An Extended Linkage Map For Watermelon Based on SRAP, AFLP, SSR, ISSR and RAPD Markers," *J. Amer SOC. HORT. SCI.* 131(3):393-402, 2006.
- [32] Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M., Zabeau M., "AFLP: A New Technique for DNA Fingerprinting," *Oxford University Press, Nucleic Acids Research*, Vol 23, No 21, p. 4407-4414, 1995.

- [33] Li G., Quiros C.F., "Sequence Related Amplified Polymorphism (SRAP), A New Marker System Based on a Basic PCR Reaction: Its Application to Mapping and Gene Tagging in *Brassica*" *Theor Appl Genet*, 103, s 455-461, 2001.
- [34] Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D., "Genom Fingerprinting by Simple Sequence Repeat (SSR)-Anchored Polymerase Chain Reaction Amplification" *Genomics*, 20, 176-183, 1994.
- [35] Gupta, M., Chyi Y.S., Romero-Severson, J., Owen, J.L., "Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple sequence repeats," *Theor. Appl. Genet.*, 89: 998 -1006, 1994.
- [36] Rakoczy-Trajanowska M., Bolibok H., "Characteristics and a comparison of three classes of microsatellite-based markers and their application in plants," *Cell Mol. Biol. Lett.* 9(2): 221-238, 2004.
- [37] Martín, J. P., Sánchez-Yélamo, M. D., "Genetic relationships among species of the genus *Diplotaxis* (Brassicaceae) using inter-simple sequence repeat markers," *Theor Appl Genet*, 101:1234–1241, 2000.
- [38] Xiao LQ, Ge XJ, Gong X, Hao G, Zheng SX., "ISSR variation in the endemic and endangered plant *Cycas guizhouensis* (Cycadaceae)," *Annals of Botany*, 94: 133-138, 2004.
- [39] Haisheng, L., Guizhu, C., "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, 2008.
- [40] Gaiero, P., Mazzella, C., Agostini, G. Bertolazzi, S., Rossato, M., "Genetic diversity among endangered Uruguayan populations of *Butia Becc.* species based on ISSR" *Plant Syst Evol*, 292:105–116, 2011.
- [41] Saleh B., "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, 2011.

- [42] Ahmed T.A., Alsamarae S.A., Zaidan H.Z.ElmeerK., "Inter-simple Sequence Repeat (ISSR) Analysis of Somaclonal Variation in Date Palm Plantlets Regenerated from Callus," IPCBEE vol.35 ,s126-130, 2012.
- [43] Lin L., Hu Z-Y., Sui Ni S., Li J-Y., Qiu Y-X., "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, 2013.
- [44] Zhang Q.X., Shen Y.K., Shao R.X., Fang J., He Y.Q., Ren J.X., Zheng B.S., Chen G.J., "Genetic diversity of natural *Miscanthus sinensis* populations in China revealed by ISSR markers," *Biochemical Systematics and Ecology* 48:248–256, 2013.
- [45] Sözen E., "Evaluation of ISSR Markers to Assess Genetic Variability and Relationship Among Winter Triticale (x *Triticosecale* Wittmack) Cultivars," *Pak. J. Bot.*, 42(4): 2755-2763, 2010.
- [46] Arslan E., Tamkoç A., "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, 2011.
- [47] Blair M.W., Panaud O., McCouch S.R., "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, 1999.
- [48] Nagaraju J., Kathirvel M., Ramesh Kumar R., Siddiq E. A., Seyed E. H., "Genetic analysis of traditional and evolved Basmati and non-Basmati rice varieties by using fluorescence-based ISSR-PCR and SSR markers," *PNAS*, Vol 99;9, 5836-5841, 2002.
- [49] Parashant S.R. Parani M., Mohanty B.P., Talame V., Tuberosa R., Parida A., "Genetic diversity in cultivars and landraces of *Oryza sativa* subsp. *indica* as revealed by AFLP markers," *NRC Research Press Web site at <http://genome.nrc.ca>*, 45:451-459, 2002.

- [50] Wu C.J., Cheng Z.Q., Huang X.Q., Yin S.H., Cao K.M., Sun C.R., "Genetic diversity among and within populations of *Oryza granulata* from Yunnan of China revealed by RAPD and ISSR markers: implications for conservation of the endangered species," *Plant Science* 167:35-42, 2004.
- [51] Garris A.J., Tai T.H., Coburn J., Kresovic S., McCouch S., "Genetic Structure and Diversity in *Oryza sativa* L." *Genetics* 169: 1631-1638, 2005.
- [52] Cao Q., Lu B.R., Xia H., Rong J., Sala F., Spada A., Grassi F., "Genetic Diversity and Origin of Weedy Rice (*Oryza sativa* f. *spontanea*) Populations Found in North-eastern China Revealed by Simple Sequence Repeat (SSR) Markers," *Annals of Botany* 98: 1241-1252, 2006.
- [53] Qian W., Ge S., Hong D., "Genetic diversity in accessions of wild rice *Oryza granulata* from South and Southeast Asia," *Genetic Resources and Crop Evolution*, 53: 197-204, 2006.
- [54] Bhuyan N., Borah B.K., Sarma R.N., "Genetic diversity analysis in traditional lowland rice (*Oryza sativa* L.) of Assam using RAPD and ISSR markers," *Current Science*, Vol 93;7, 967-972, 2007.
- [55] Wan Y., A X., Fan C., Xu F., Yu T., Tang C., Dai L., "ISSR Analysis on Genetic Diversity of the 34 Populations of *Oryza meyeriana* Distributing in Yunnan Province, China," *Rice Science*, 15(1): 13-20, 2008.
- [56] Seetharam K., Thirumeni S., Paramasivam K., "Estimation of genetic diversity in rice (*Oryza sativa* L.) genotypes using SSR markers and morphological characters," *African Journal of Biotechnology*, 8(10): 2050-2059, 2009.
- [57] Zhao X., Yang L., Zheng Y., Xu Y., Wu W., "Subspecies-specific intron length polymorphism markers reveal clear genetic differentiation in common wild rice (*Oryza rufipogon* L.) in relation to the domestication of cultivated rice (*O. sativa* L.)," *Genomics*, 36: 435-442, 2009.
- [58] Kumagai M., Wang L., Ueda S., "Genetic diversity and evolutionary relationships in genus *Oryza* revealed by using highly variable regions of chloroplast DNA," *Gene* 462: 44-51, 2010.

- [59] Kanawapee N., Sanitchon J., Srihaban P., Theerakulpisut P., "Genetic diversity analysis of rice cultivars (*Oryza sativa* L.) differing in salinity tolerance based on RAPD and SSR markers," Electronic Journal of Biotechnology, Vol 14, Sec 6, fulltext 4, 2011.
- [60] Mengistu A.M., *Inter Simple Sequence Repeats (ISSRs) Fingerprinting, Phenotypic Variability and Trait Associations in Released and Elite Rice (Oryza sativa L.) Genotypes of Ethiopia*. Yüksek Lisans Tezi, Addis Ababa Üniversitesi, Etiyopya, 2011.
- [61] Swamy B.P.M., Kaladhar K., Ramesha M.S., Viraktamath B.C., Sarla N., "Molecular Mapping of QTLs for Yield and Yield-Related Traits in *Oryza sativa* cv Swarna $\times$ O. nivara (IRGC81848) Backcross Population," Rice Science, 18(3): 178-186, 2011.
- [62] Kumbhar S. D., Patil J. V., Kulwal P. L., Chmote V. P., "Molecular Diversity in Rice (*Oryza Sativa* L.) Using ISSR Markers," Int. J. Int sci. Tech. Sec. A, Vol.2;2, 17-23, 2013.
- [63] Sürek H., Beşer N., "Correlation and Path Coefficient Analysis For Some Yield-Related Traits in Rice (*Oryza Sativa* L.) Under Thrace Conditions," Turk J Agric For 27, 77-83, 2003.
- [64] Şahin S., "Tosya-Osmancık ve Kargı İlçelerinde Çeltik Ziraati," G.Ü. Gazi Eğitim Fakültesi Dergisi, Cilt 22, sayı 3, 19-35, 2002.
- [65] Büyükcinal Bal, E. ve Bay, S., "Genetic analysis of Turkish rice varieties (*Oryza sativa* L.) using seed storage proteins and RAPD markers," Eur. Food Res. Technol. 230: 609-617, 2010.
- [66] Taşlıgil N., Şahin G., "Türkiye'de Çeltik (*Oryza sativa* L.) Yetiştiriciliği ve Coğrafi Dağılımı," Adıyaman Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü Dergisi, Sayı 6, 182-203, 2011.
- [67] Doyle J.J., Doyle J.L., "Isolation of Plant DNA From Fresh Tissue," Focus 12, 13-15, 1987.
- [68] Jaccard P., "Lois de distribution florale," Bulletin de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles 38:67-130, 1902.

- [69] Jaccard P., "The distribution of the flora in the alpine zone," *New Phytologist* 11(2):37-50, 1912.
- [70] Rohlf, M., *NTSYSPC. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Version 2.02*; Department of Ecology and Evaluation: State University of New York, NY, USA, 1998.
- [71] Anderson J. A., Churchill G. A., Autrique J. E., Tanksley S. D., Sorrells M. E., "Optimizing parental selection for genetic linkage maps," *Genome*, 36(1):181-186, 1993.
- [72] De Riek J., Calsyn E., I. Everaert · Van Bockstaele E., De Loose M., "AFLP based alternatives for the assessment of Distinctness, Uniformity and Stability of sugar beet varieties," *Theor Appl Genet* 103:1254–1265, 2001.
- [73] Rajani J., Deepu V., Nair G. M., Nair A. J., "Molecular characterization of selected cultivars of rice, *Oryza sativa* L. using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) markers," *International Food Research Journal* 20(2): 919-923, 2013.
- [74] Reddy P.M., Sarla N., Siddiq E.A., "Inter Simple Sequence Repeats (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding," *Euphytica* 128: 9-17, 2002.
- [75] Sonah H, Deshmukh RK, Sharma A, Singh VP, Gupta D.K., Gacche R.N., Rana J.C., Singh N.K., Sharma N.T., "Genome-Wide Distribution and Organization of Microsatellites in Plants: An Insight into Marker Development in *Brachypodium*," *PLoS ONE* 6(6):e21298. doi:10.1371/journal.pone.0021298, 2011.
- [76] Galvan, M.Z., Bornet, B., Balatti, P.A, Branchard, M., "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): 287-301, 2003.

- [77] Nagy S., Poczai P., Cernak I., Gorji A.M., Hegedüs G., Taller J., "PICcalc: An online Program to Calculate Polymorphic Informative Content for Molecular Genetic Studies," *Biochem Genet* 50:670–672, 2012.
- [78] Boopathi N.M., *Genetic Mapping and Marker Asisted Seletion: Basics, Practice and Benefits*'Springer, India, 2013.
- [79] Reona R., Pham J.L., "Does crosspollination between accessions occur during seed regeneration at the International Rice Genbank," *International Rice Research Notes*. 23:3, 5-6, 1980.
- [80] Iqbal, M.J., N. Aziz, N.A. Saees, Y. Zafar and K.A. Malik., "Genetic diversity evaluation of some elite cotton varieties by RAPD analysis," *Theor. Appl. Genet.*, 94: 139 -144, 1997.
- [81] Bligh, H.F.J., N.W. Blackhall, K.J. Edwards and A.M. McClung., "Using amplified fragment length polymorphisms and simple sequence length polymorphisms to identify cultivars of brown and white milled rice," *Crop Sci.*, 39: 1715-1721, 1999.
- [82] Bhutta, W.M., "Biochemical and molecular characterization of wheat genotypes determined by RAPD analysis," *Acta Agr. Scand B- S P.*, 57: 335-341, 2006.
- [83] Tosun M., Sağsöz S., "Somaklonal Varyasyon ve Bitki Islahı," *Atatürk Üniv. Zir. Fak. Der.* 26(3): 400-411, 1995.
- [84] Başer İ., Bilgin O., Korkut K.Z., Balkan A., "Makarnalık Buğdayda Mutasyon Islahı ile Bazı Kantitatif Karakterlerin Geliştirilmesi," *Ankara Üniv. Zir. Fak. Tarım Bil. Der.* 13(4): 346-353, 2007.
- [85] Kunter B., Değirmenci Karataş D., "Asmalarda Mutasyonlar ve Mutant *Vitis Vinifera* L. Çeşitleri," *YYÜ Tar Bil. Der.* 21(2): 146-151, 2011.
- [86] Anonim, Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü, 2013.
<http://www.ttae.gov.tr/index.php/urun-cesitleri/celtik>