

**TÜRKİYE'DE GELİŞTİRİLEN
BAZI ÇELTİK ÇEŞİTLERİNDE
PEROKSİDAZ GEN POLİMORFİZMİNİN
BELİRLENMESİ**

Yüksek Lisans Tezi

Gülten HİLOOĞLU

Eskişehir, 2017

**TÜRKİYE'DE GELİŞTİRİLEN BAZI ÇELTİK ÇEŞİTLERİNDE PEROKSİDAZ GEN
POLİMORFİZMİNİN BELİRLENMESİ**

Gülten HİLOOĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Emel SÖZEN

Eskişehir

Anadolu Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Mayıs, 2017

Bu Tez Çalışması, Anadolu Üniversitesi BAP Komisyonunca kabul edilen 1608F609 numaralı proje kapsamında desteklenmiştir.

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Gülten HİLOOĞLU'nun "Türkiye'de Geliştirilen Bazı Çeltik Çeşitlerinde Peroksidaz Gen Polimorfizminin Belirlenmesi" başlıklı tezi 16/05/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliği"nin ilgili maddeleri uyarınca, Biyoloji Anabilim dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

	<u>Unvanı-Adı Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Üye (Tez Danışmanı):	Doç. Dr. Emel SÖZEN
Üye	: Prof. Dr. Ersin YÜCEL
Üye	: Yrd. Doç. Dr. İsmail POYRAZ

.....
Enstitü Müdürü

ÖZET

TÜRKİYE'DE GELİŞTİRİLEN BAZI ÇELTİK ÇEŞİTLERİNDE PEROKSİDAZ GEN POLİMORFİZMİNİN BELİRLENMESİ

Gülten HİLOOĞLU

Biyoloji Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Mayıs, 2017

Danışman: Doç. Dr. Emel SÖZEN

Çeltik (*Oryza sativa* L.) en önemli besin kaynaklarından biridir. Bu çalışmada, 46'sı Türkiye'de geliştirilmiş 50 pirinç çeşidi arasındaki genetik çeşitliliğin POGP (Peroksidaz gen polimorfizm) işaretleyicileri kullanarak belirlenmesi amaçlanmıştır. PCR reaksiyonlarında on üç farklı peroksidaz gen primer (POX) kombinasyonu kullanılmıştır. İstatistiksel analizler POPGENE, FİGTREE ve NTSYS, STRUCTURE yazılımları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Primerler, 146'sı polimorfik (% 91,25) olan toplam 160 net ve tekrarlanabilir (150 ila 2500 bp arasında değişen) bant üretmiştir. UPGMA dendrogramı ve PCoA analizine göre 50 pirinç çeşidi 2 ana küme halinde gruplanmıştır. Genetik benzerliği en yüksek çeşitler Trakya ve Durağan (0,869) olurken en düşük genetik benzerliğin ise Aromatik I ile Küplü (0,631) çeşitleri arasında olduğu tespit edilmiştir. STRUCTURE analizi, 50 çeltik çeşidini üç gen havuzunu temsil eden farklılaşmış üç gruba ayırmıştır. POGP belirteçlerinin ayırıcı gücü, polimorfik bilgi içeriği (PIC) ve ayırma gücü (Rp) hesaplanarak değerlendirilmiştir. Ortalama PIC değerinin 0,661 olup sıfırdan (POX14F / POX14R) 0,877'ye (POX4F / POX4R) kadar değiştiği ve primerlerin ayırma gücünün ise 0 ile 8,585 arasında değiştiği (POX11F / POX11R) bulunmuştur. Bu çalışma Türkiye'de geliştirilen çeltik çeşitlerinde, genetik çeşitliliğin belirlenmesinde peroksidaz gen polimorfizmini kullanan ilk çalışma olmasıyla birlikte elde edilen veriler ülkemizdeki pirinç ıslahı programları için önemli bilgiler sağlayacaktır.

Anahtar Sözcükler: *Oryza sativa*, Çeltik, POGP, Peroksidaz, Genetik çeşitlilik.

ABSTRACT

DETECTION OF PEROXIDASE GENE POLYMORPHISM IN RICE VARIETIES DEVELOPED IN TURKEY

Gülten HİLOOĞLU

Department of Biology

Anadolu University, Graduate School of Sciences, May, 2017

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. EMEL SZEN

Rice (*Oryza sativa* L.) is one of the most important food sources. The aim of this study was to determine the genetic diversity among 50 rice varieties, 46 of which developed in Turkey, by using POGP (Peroxidase gene polymorphism) markers. Thirteen different peroxidase (POX) gene primer combinations were used in PCR reactions. Statistical analyses were performed by using POPGENE, FIGTREE and NTSYS, STRUCTURE softwares. The primers generated a total of 160 clear (ranged between 150 and 2500 bp) and reproducible bands, of which 146 were polymorphic (91.25%). UPGMA dendrogram and PCoA grouped 50 rice cultivars into two main clusters. The highest pairwise genetic identity was obtained between Trakya and Durağan (0.869) and lowest pairwise genetic identity was obtained between Aromatik I and Kpl (0.631). The STRUCTURE analysis resolved the 50 rice varieties in three differentiated groups, which represents three gene-pools. Discriminating power of POGP markers was assessed by calculating polymorphic information content (PIC) and resolving power (Rp). The average PIC value was 0.661 and it ranged from zero (POX14F/POX14R) to 0.877 (POX4F/POX4R) and resolving power of the primers ranged from 0 to 8.585 (POX11F/POX11R). This work represents first report using peroxidase gene polymorphism to determine genetic variation among Turkish rice cultivars and the obtained information will provide important knowledge for rice breeding programs in our country.

Keywords: *Oryza sativa*, Rice, POGP, Peroxidases, Genetic diversity.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca önerileriyle yanımda olan ve tez aşamasından itibaren katkıları ve bilgilerini esirgemeyen sevgili danışman hocam Doç. Dr. Emel SÖZEN'e,

Çeltik tohumlarının temin edildiği Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nden Dr. Halil SÜREK'e ve Karadeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Çalışma verilerinin analizlerinde katkıları olan ve her türlü desteğini sağlayan sevgili eşim Dr. Muhip HİLOOĞLU'na,

Teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca, eğitim hayatım boyunca destekleriyle her zaman yanımda olan ailelerime ve abim Selçuk YÜKSEL'e teşekkür ederim.

Bu çalışmaya maddi destek sağlayan Anadolu Üniversitesi BAP Komisyonu Başkanlığı'na (BAP No: 1608F609) teşekkürü bir borç bilirim.

Gülten HİLOOĞLU

Eskişehir, Mayıs 2017

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilemeyen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm.

Gülten HİLOOĞLU

İÇİNDEKİLER

BAŞLIK SAYFASI.....	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
TABLolar DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. <i>Oryza</i> Türleri ve Genetik Özellikleri	2
1.2. Çeltik (<i>O. sativa</i>) Türünün Morfolojik Özellikleri	5
1.3. Dünya’da ve Türkiye’de Çeltik	6
1.4. Bitki Islahı ve Genetik Çeşitlilik	8
1.5. Genetik Çeşitliliğin Tespitinde Kullanılan Belirteçler	9
1.5.1. Genetik çeşitlilik tespitinde kullanılan moleküler markırlar	9
1.5.1.1. Hibridizasyona dayalı moleküler (RFLP) belirteçler.....	10
1.5.1.2. PZR tekniğine dayalı moleküler markırlar.....	10
1.5.1.2.1. Peroksidaz gen polimorfizm (POGP) markırları.....	13
1.6. Konu İle İlgili Yapılmış Önceki Çalışmalar	16
1.7. Çalışmanın Amacı	17
2. MATERYAL VE YÖNTEM	18
2.1. Bitki Materyali	18
2.2. Çeltik Tohumlarının Çimlendirilmesi	19
2.3. DNA İzolasyonu	19
2.4. DNA Miktar ve Saflık Tayini.....	20
2.5. PZR Çalışmaları	21
2.6. Bant Okumaları ve Verilerin Değerlendirilmesi.....	23
3. BULGULAR	25
3.1. Genomik DNA İzolasyonu	25
3.1.1. DNA’ların miktar ve saflık ölçümleri	25
3.2. PZR Optimizasyonu	26
3.3. PZR çalışmaları sonucu POGP primerlerinin Agaroz jel görüntüleri...27	
3.4. POGP analizlerinin değerlendirilmesi.....	34

4. TARTIŞMA VE SONUÇ	45
4.1. Çeltiklerde Peroksidaz Gen Polimorfizmi.....	45
4.2. POGP Primerlerinin PIC ve Rp Değerlendirmesi	47
4.3. Çeltiklerde Kümeleme Analizleri ve Genetik İlişkiler.....	48
4.4. Çeltik Çeşitlerinin Genetik Yapı Analizleri.....	49
KAYNAKÇA.....	52
ÖZGEÇMİŞ	

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 1.1. <i>Oryza</i> türlerinin genel özellikleri.....	2
Tablo 1.2. Türkiye’de çeltik ile ilgili son 10 yılın verileri.....	7
Tablo 1.3. En sık kullanılan PZR temelli belirteçlerin karşılaştırılması.....	11
Tablo 1.4. Bitki peroksidazlarının sınıflandırılması	14
Tablo 2.1. Çalışmada kullanılan çeltik çeşitleri.....	18
Tablo 2.2. % 2’lik CTAB liziz tampon bileşenleri.....	20
Tablo 2.3. Çalışmada kullanılan POX primer bilgileri	21
Tablo 2.4. PZR Prosedürü	22
Tablo 3.1. Çeltik çeşitlerinin DNA miktar ve saflık değerleri.....	26
Tablo 3.2. POGP primerleri için elde edilen optimum çalışma koşulları	26
Tablo 3.3. POGP analizi sonucu oluşan bant özellikleri.....	35
Tablo 3.4. Çeltik çeşitleri arasında genetik benzerlik ve genetik uzaklık değerleri	36
Tablo 3.5. Hesaplanan Eigen değerleri.....	41
Tablo 3.6. K=1-15 için ortalama ortalama değerler	42

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. <i>Oryza</i> filogenetik ağacı.....	3
Şekil 1.2. Dünya’da farklı enstitülerdeki yabancı ve kültüre alınmış çeltik çeşitleri.....	5
Şekil 1.3. <i>Oryza</i> cinsinden 12 türün genel görüntüleri	6
Şekil 1.4. SSR ve ISSR karşılaştırması	12
Şekil 2.1. Fermantas Gene Ruler 100 bç DNA ladder Plus	23
Şekil 3.1. 50 adet çeltik çeşidinin genomik DNA agaroz jel görüntüleri.....	25
Şekil 3.2. POX1F/POX1R primer kombinasyonu ile oluşturulan bant profilleri	28
Şekil 3.3. POX3F/POX3R primer kombinasyonu ile oluşturulan bant profilleri	28
Şekil 3.4. POX4F/POX4R primer kombinasyonu ile oluşturulan bant profilleri	29
Şekil 3.5. POX5F/POX5R primer kombinasyonu ile oluşturulan bant profilleri	29
Şekil 3.6. POX6F/POX6R primer kombinasyonu ile oluşturulan bant profilleri	30
Şekil 3.7. POX7F/POX7R primer kombinasyonu ile oluşturulan bant profilleri	30
Şekil 3.8. POX8F/POX8Rb primer kombinasyonu ile oluşturulan bant profilleri	31
Şekil 3.9. POX9F/POX9R primer kombinasyonu ile oluşturulan bant profilleri	31
Şekil 3.10. POX10Fa/POX10Ra primer kombinasyonu ile oluşturulan bant profilleri	32
Şekil 3.11. POX11F/POX11R primer kombinasyonu ile oluşturulan bant profilleri	32
Şekil 3.12. POX12Fa/POX12Ra primer kombinasyonu ile oluşturulan bant profilleri	33
Şekil 3.13. POX13F/POX13R primer kombinasyonu ile oluşturulan bant profilleri	33
Şekil 3.14. POX14F/POX14R primer kombinasyonu ile oluşturulan bant profilleri	34
Şekil 3.15. UPGMA tekniği ile 50 çeltik çeşidinin genetik benzerlik dendrogramı	39
Şekil 3.16. 50 çeltik çeşidinin PAUP ağaç topolojisi.....	40
Şekil 3.17. Çeltik çeşitlerinde 3D PCA analizi	41
Şekil 3.18. Structure programında Bayesian analizi sonucu elde edilen en uygun K sonucu.....	43
Şekil 3.19. POGP varyasyonu temelli STRUCTURE analizinin sonucu.....	43
Şekil 3.20. POGP varyasyonu sonucu STRUCTURE analizine göre çeşitlerin genetik yapıları.....	44

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

A	: Adenin
bç	: Baz çifti
AFLP	: Çoğaltılmış parça uzunluk polimorfizmi
C	: Sitozin
°C	: Santigrat derece
%	: Yüzde
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deoksiribonükleosid trifosfat
FAO	: Gıda ve Tarım Örgütü (Food and Agriculture Organization)
G	: Guanin
IUCN	: Uluslararası doğayı koruma birliği
ISSR	: Basit dizin arası tekrarları
kDa	: Kilodalton
M	: Molar
Mg⁺²	: Magnezyum
MgCl₂	: Magnezyum klorür
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
mg	: Miligram
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
ng	: Nanogram
nm	: Nanometre
PCA	: Temel Bileşen Analizi
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
pH	: Asitlik bazlık derecesi
PIC	: Polimorfizm bilgi içeriği (Polymorphism information content)
POGP	: Peroksidaz gen polimorfizmi
POX	: Peroksidaz
PPB	: Polimorfik bant yüzdesi
RAPD	: Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA
RFLP	: Kesilmiş parça uzunlukları polimorfizmi
Rp	: Ayırma gücü (Resolving power)
SNP	: Tek nükleotid polimorfizmi (single nucleotide polymorphism)
SRAP	: Dizi-İlişkili Amplifiye Olmuş Polimorfizm
SSR	: Basit dizin tekrarları (mikrosatellitler)
T	: Timin
TBE	: Tris- borik asit- EDTA
TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu
IRRI	: Uluslar Arası Çeltik Araştırma Enstitüsü (The International Rice Research Institute)
U	: Ultraviole
UPGMA	: Unweighted pair group method with arithmetic means (Aritmetik ortalamalar ile ağırlıklandırılmamış eşlenmiş grup metodu)
V	: Volt

1. GİRİŞ

Oryza sativa'nın, 10.000 yıl önce Neolitik Çağ boyunca *Oryza rufipogon* Griff'den en az 2 merkez etrafında evcilleştirildiği bilinmektedir. Bunlardan biri Çin'in Yangtze Vadisi'nin aşağı kesimlerinde *japonica* varyetelerinin oluşturduğu grup, diğeri ise muhtemelen Güney Asya'daki *indica* varyetelerinin bulunduğu gruptur (Mather vd., 2007). Kültüre alınan Asya çeltiği *Oryza sativa*, dünyanın en yaygın yetiştirilen ekin çeşididir ve dünya nüfusunun yarısından fazlası için gerekli bir besin kaynağıdır (Yu vd., 2002). 2000'li yılların başında dünyada çeltik üretimi yıllık 500 milyon ton iken, 2014 yılı FAO verilerine göre yaklaşık 750 milyon tona ulaşmaktadır.

Dünyada tarımsal üretimi yapılan en önemli tahıllar 50-70 milyon yıl önce ortak bir atadan gelişmişlerdir. Ancak uzun süren bu bağımsız evrimleşmeye rağmen tahıllar yüksek derecede korunmuş genlere ve genomlara sahiptirler. Genlere ve bunların genom üzerindeki dağılım benzerliklerine rağmen tahılların genom boyutları önemli ölçüde değişkenlik gösterir. Örneğin; sorgum otu 1000 Megabaz çifti (Mbp), mısır 3000 Mbp, arpa 5000 Mbp ve buğday 16000 Mbp genom büyüklüğüne sahipken, çeltiğin çok daha küçük boyutta (450 Mbp) genoma sahip olduğunu belirtilmektedir (Goff vd., 2002). Günümüzde, çeltiğin küçük genomu ve yüksek gen yoğunluğu, tahıl genlerinin keşif çabaları ve genom dizisi analizleri için önemli bir hedef haline gelmiştir.

Son yıllarda, yapılan moleküler temelli çalışmalarla Oryzeae grubunun, Oryzinae ve Ziziniinae alt gruplarına 20-22 milyon yıl önce ayrıldığı belirtilmiştir. Bu alt gruplardan Oryzinae'nin ise 14.2 milyon yıl önce *Leersia* ve *Oryza* cinslerine ayrıldığı tespit edilmiştir (Vaughan vd., 2008).

Alem	: Plantae (Bitkiler)
Bölüm	: Magnoliphyta (Kapalı tohumlular)
Sınıf	: Liliopsida (Tek çenekliler)
Alt sınıf	: Commelinids
Takım	: Poales
Familya	: Poaceae (Buğdaygiller)
Alt familya	: Ehrhartoideae
Oymak	: Oryzeae (Pirinçgiller)
Cins	: <i>Oryza</i> L.

Oryza L. 1753, Poaceae ailesinden Oryzeae grubunda bulunan 12 cinsten birini temsil etmektedir. Günümüzde bu cins için yabani ve kültür çeltik türlerinin oluşturduğu bir adlandırma yapılmıştır (Vaughan vd., 2003; Anonim, 2005). Bu cins üç gruba

ayrılmıştır: *Padia*, *Brachyantha* ve *Oryza*. Bunlardan temel olarak kabul edilen *Padia* grubu; *O. schlechteri*, *O. ridleyi* ve *O. granulata* komplekslerinden oluşmaktadır. *Brachyantha* grubunda *O. brachyantha* tek tür olarak bulunur (Vaughan vd., 2008). *Oryza* cinsi, genetik çeşitliliğin bir yansıması olarak, dört tür kompleksi ile sınıflandırılmışlardır. Bunlar; *O. sativa*, *O. officinalis*, *O. granulata* ve *O. ridleyi* kompleksleridir. *O. brachyantha* ve *O. schlechteri* bu komplekslerin içinde yer almaz (Anonim, 2005).

1.1. *Oryza* Türleri ve Genetik Özellikleri

Oryza cinsi 22'si yabancı olmak üzere 24 tür içermektedir (Yamaki vd, 2013). *O. sativa* sensu lato subsp *indica* ve *japonica* türlerini, *O. rufipogon* sensu lato subsp *nivara* (tek yıllık) ve *rufipogon* (çok yıllık) türlerini kapsamaktadır. Ek olarak, *O. glumaepatula* ve *O. malapuzhaensis* yeni yabancı türler olarak *Oryza* cinsinde değerlendirilmektedir (Vaughan vd, 2003). Bu türlerden *O. sativa* A, *O. officinalis* B, C, D ve E genom tipine sahiptir. AA genom tipli *Oryza* türleri arasındaki ilk farklılaşmaların 2 milyon yıl önce başladığı tahmin edilmektedir (Vaughan vd., 2008). Tablo 1.1'de *Oryza* türlerinin farklılaşması gösterilmiştir (Vaughan vd., 2008; Joshi vd., 2000; Yamaki vd., 2013; Sanchez vd., 2013).

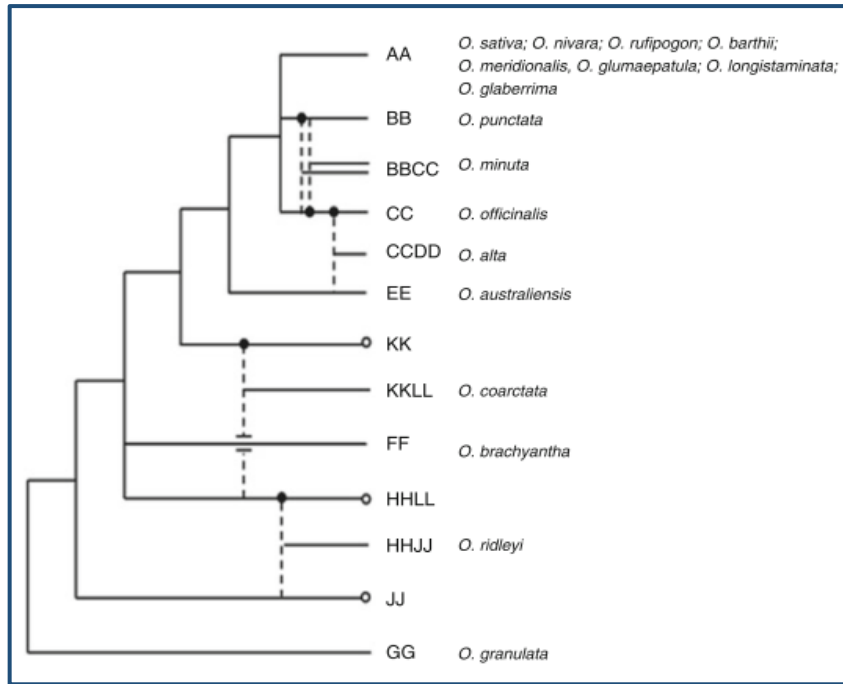
Tablo 1.1. *Oryza* türlerinin genel özellikleri

Tür Adı	Kromozom Sayısı (2n)	Genom Kaynağı	Orijin
<i>O. sativa</i>	24	AA	ABD
<i>O. glaberrima</i>	24	AA	Nijerya (USDA), Gana (USDA)
<i>O. barthii</i> (<i>O. breviligulata</i>)	24	AA	Sierra Leone ve Yeni Gine (USDA)
<i>O. glumaepatula</i>	24	AA	Güney Amerika
<i>O. longistaminata</i>	24	AA	Afrika, Hindistan
<i>O. meridionalis</i>	24	AA	Avustralya (IRRI)
<i>O. nivara</i>	24	AA	Hindistan (USDA)
<i>O. rufipogon</i>	24	AA	Tayvan (USDA), Myanmar (USDA)
<i>O. punctata</i>	24, 48	BB, BBCC	Kamerun, Hindistan
<i>O. malampuzhaensis</i>	48	BBCC	Hindistan
<i>O. minuta</i>	24	BBCC	Filipinler (IRRI)
<i>O. eichingeri</i>	24	CC	Sri Lanka (IRRI)
<i>O. officinalis</i>	24	CC	Tayland, Vietnam, Filipinler (USDA)
<i>O. rhizomatis</i>	24	CC	Sri Lanka (IRRI)
<i>O. alta</i>	48	CCDD	Guyana

Tablo 1.1. (Devam) *Oryza* türlerinin genel özellikleri

Tür Adı	Kromozom Sayısı (2n)	Genom Kaynağı	Orijin
<i>O. grandiglumis</i>	48	CCDD	Brezilya (IRRI)
<i>O. latifolia</i>	48	CCDD	Kosta Rika, Guatemala (IRRI)
<i>O. australiensis</i>	24	EE	Avustralya (IRRI)
<i>O. brachyanta</i>	24	FF	Kamerun (IRRI)
<i>O. granulata</i>	24	GG	Laos (IRRI)
<i>O. meyeriana</i>	24	GG	Filipinler (IRRI)
<i>O. longiglumis</i>	48	HHJJ	Endonezya (IRRI)
<i>O. ridleyi</i>	48	HHJJ	Malezya, Tayland (IRRI)
<i>O. schlechteri</i>	48	HHKK	Papua Yeni Gine
<i>O. coarctata</i>	48	HHKK	Asya

Öte yandan, Yamaki vd. (2013) kromozom yapısı ile ilgili olarak *Oryza* türlerinin, hibrit bitkilerde mayotik kromozomların eşleşme afinitesine göre A'dan J'ye (I yok) dokuz genomik tipe ayrıldıklarını ifade etmişlerdir. Fakat, ABD Tarım Bakanlığı (USDA) araştırma komitesi, 10 genotip (AA, BB, CC, BBCC, CCDD, EE, FF, GG, HHJJ, HHKK) belirlemiştir. Yapılan literatür taramasında 10 genotip olduğu görülmüştür (Bkz. Tablo 1.1). *Oryza* türlerinin çoğu diploittir (2n=24). Fakat tetraploid (4n=48) olanları da mevcuttur (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. *Oryza* filogenetik ağacı (Sanchez vd., 2013)

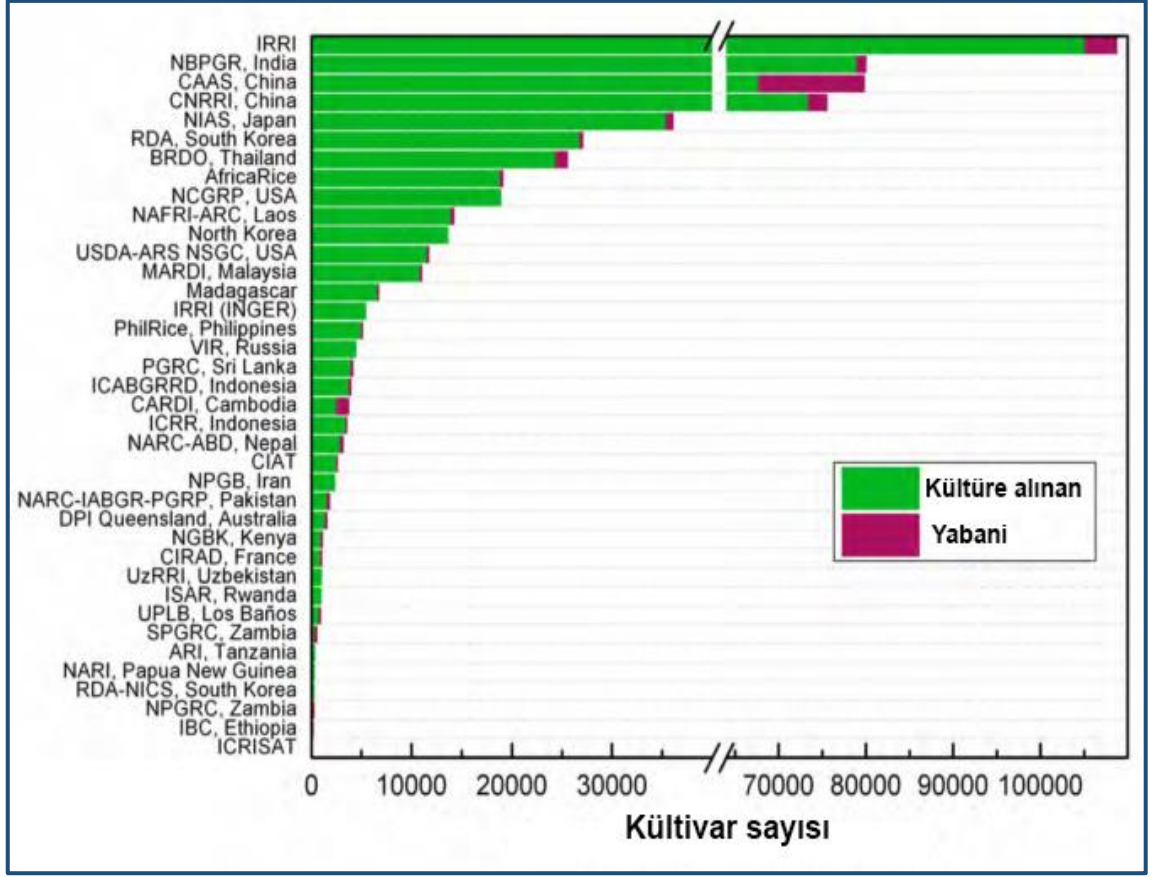
Şekil 1.1'de kesik çizgi, allotetraploidlerin kökenlerini belirtir. Dolu daire, anacın anne babasını belirtir. Açık daire, tanımlanamayan diploid türlerini belirtir.

Bugüne kadar, *O. sativa* ve *O. glaberrima* ıslah çalışmalarında yoğun olarak kullanılmış ve binlerce varyete tescil ettirilmiştir (Vaughan, 1994). Yapılan çalışmalarda, *O. sativa* türünün orijinlerinin yine diploid türler olan *O. rufipogon* ve *O. nivara* olduğu gösterilmiştir (Mackill vd., 2012).

AA genomik tipe sahip yabani türlerden *Oryza sativa* L. (çeltik) türü kültüre alınmış türlerle yakından ilişkilidir ve mevcut ıslah programları için yararlı kaynaklar oluşturmuştur (Jena, 2010). Çeltik genomunun yarısı tekrarlardan oluşur. Bu bitkinin genomu tahıllar arasındaki en küçük genoma sahip olup (430 milyon nükleotit) 43.000-63.000 arası gen taşır.

Uluslar Arası Çeltik Araştırma Enstitüsü (IRRI) 76.000'ni *O. sativa* türünden olmak üzere, 80.000'den fazla çeltik varyetesini tescil ederek koruma altına almıştır (Jackson, 1997). Çeltik genetik kaynaklarından 500.000'in üzerinde çeşit dünyada uluslararası ve ulusal gen bankalarında korunmaktadır. Bu çeşitlerin çoğunluğu az sayıda gen bankasındadır. En büyük altı gen bankası Asya'da bulunmaktadır ve tümü beraber dünyadaki toplam çeltik çeşitlerinin yaklaşık % 70'ini barındırmaktadırlar.

Yabani çeltik çeşitleri, muhtemelen koruma ve kullanmalarındaki zorluklarından dolayı az sayıda gen bankasında *ex situ* olarak korunmaktadır. En geniş yabani çeltik koleksiyonları, Çin'deki CAAS (Çin Tarım Bilimleri Akademisi), CNRRI'de (Çin Ulusal Pirinç Araştırma Enstitüsü) ve Uluslararası kuruluş olan IRRI kuruluşlarında bulunmaktadır. Diğer önemli çeltik koleksiyonları ise Endonezya Çeltik Araştırma Merkezi (ICRR), Tayland'daki Biyoteknoloji Araştırma ve Geliştirme Bürosu (BRDO), Hindistan'daki NBPGR (Ulusal Bitki Genetik Kaynakları Bürosu) ve Japonya'daki NIAS'dır (Ulusal Tarımsal Biyoloji Bilimleri Enstitüsü) (Anonim, 2010) (bkz. Şekil 1.2).



Şekil 1.2. Dünya’da farklı enstitülerdeki yabani ve kültüre alınmış çeltik çeşitleri (Anonim, 2010).

Çeşitler, bir çok özelliğe göre birbirlerinden ayrılabilirler. Bunlar, farklı su rejimlerine adaptasyon, büyüme alışkanlıkları ve boyları, saplarının renkleri, yapıları ve büyüklükleri, yaprak ayaları, salkımları, tane ve kabuk yapısı, tüylenme derecesi, soğuk-hastalık ve kuraklıklara toleransı gibi pek çok özelliğe bağlıdır (Takahashi, 1984).

1.2. Çeltik (*O. sativa*) Türünün Morfolojik Özellikleri

Çeltik dik bir bitki olup güçlü veya narin 1-1.8 metre yükseklikte farklı formlarda bulunur. Gövde, 80-120 cm boyundadır. Kümelenmiş, içi boş, düz ve tüysüz bir yapıya sahiptir. Yaprakları, 50-100 cm uzunluğunda ve 2-2.5 cm genişliğinde olabilen paralel damarlı, dilsel veya kulaksı yapıdadır. Çiçek durumu dik veya eğik, gevşek salkım, tek çiçekli, çeşitli uzunlukta dikenli veya dikensizdir. Tohum 2-3 mm kalınlığında, 5-12 mm uzunluğunda olup bir salkım 100-150 adet tohum taşımaktadır (Khush, 1997; Anonim, 2013).



Şekil 1.3. *Oryza* cinsinden 12 türün genel görüntüleri (Sanchez vd., 2013)

1.3. Dünya’da ve Türkiye’de Çeltik

Tahıllar dünyadaki besin mahsullerinin %80’ini temsil etmektedir. Tahıllardan biri olan çeltik (*Oryza sativa*) dünya nüfusunun yaklaşık yarısından fazlasının besin kaynağı olarak yararlandığı en önemli ürünlerden biridir (Khush, 1997). Çeltik Antartika hariç dünyanın her yerinde yetiştirilmekte olan yüksek ekonomik değere sahiptir (Tanweer vd, 2015). Dünya nüfusunun artmasıyla beraber çeltik üretiminin de artırılması bir zorunluluk haline gelmiştir. Dünya pirinç üretiminin % 46’sı, başka bir deyişle 206.823 bin ton ürün hastalık, yabancı ot ve zararlılar nedeniyle kaybedilmektedir (Cramer, 1967).

Türkiye’nin ilk yıllarında (1923’lü yıllar) 100.000 da.’ın altındaki üretim 30.000-40.000 ton arasında değişirken, aynı değer 1934’te 72.154 tonun üzerine çıkmış; 1935’te ise 100.000 tonu aşmıştır. 1936 yılında çıkartılan “Çeltik Kanunu” ile birlikte ekim alanlarındaki sınırlama üretime de yansarak 40.000–50.000 ton arasında değişen üretim 1940–1942 periyodunun dışında 60.000 ton’un üzerine çıkamamıştır (Taşlıgil ve Şahin, 2011). 2006-2011 yılları arasında ekim alanları (Dekar) ile üretim arasında (ton ve kg/da) pozitif yönde artan bir eğilim varken, 2011 yılından sonra ekim alanları artmasına rağmen verimde düşüşler yaşanmıştır (Tablo 1.2) (TÜİK, 2016).

Tablo 1.2. Türkiye’de çeltik ile ilgili son 10 yılın verileri

Yıl	Ekilen alan (Dekar)	Hasat edilen alan (Dekar)	Üretim (Ton)	Verim (kg/da)
2006	991.000	990.433	696.000	703
2007	939.000	937.994	648.000	691
2008	995.000	994.929	753.325	757
2009	967.541	964.441	750.000	778
2010	990.000	989.664	860.000	869
2011	994.000	993.832	900.000	906
2012	1.197.247	1.196.639	880.000	735
2013	1.105.924	1.105.924	900.000	814
2014	1.108.844	1.086.487	830.000	764
2015	1.158.561	1.158.561	920.000	794

Yıllardan beri tarımsal üretim yönünden kendine yeterli 7 ülkeden biri olarak gösterilen Türkiye malesef tarımsal ürün dışarıdan almak zorunda kalmaktadır ve yıllar geçtikçe dışalım ihtiyacı artmaktadır (Gençtan vd., 2010). Örneğin; bazı yıllarda üretilen ürün gereksinimimizi karşılamadığından, özellikle ABD, Rusya, Bulgaristan, Yunanistan ve Romanya’dan çeltik ithalatı yapılmaktadır. Türkiye İstatistik Kurumu’nun (TÜİK) dış ticaret istatistiklerine bakıldığında toplam çeltik ithalatı 2012-2013 yıllarında 291 milyon Türk Lirası’na mal olurken, 2014-2015 yıllarında ise yaklaşık 2 kat artarak 532 milyon TL’lik bir harcamaya ulaşmıştır. Gıda ve Tarım Örgütü (FAO)’nun 2014 yılına ait istatistik verilerine göre dünyada yaklaşık 150 çeltik ekim bölgesinde Türkiye 830.000 tonla 66. sırada yer almaktadır (Anonim, 2016). Geniş tarım arazileri, çeltik ekimine uygunlukları ve iş gücü potansiyeli düşünüldüğünde ülkemizin çeltik üretimi bakımından bu kadar geri sıralarda kalmasını sağlayan etmenler dikkate alınarak bilimsel çalışmalar yapılmalıdır.

Bitki ıslahı programları ile geliştirilen verimli ve kaliteli çeşitlerle insanların beslenme gereksinimleri karşılanıyor olsa da dünya tarımı değişen biyotik ve abiyotik çevresel baskılar nedeniyle ciddi sorunlarla karşılaşmaktadır. Hektar başına 10 ton çeltik alınması beklenilirken bu oran zararlı böcekler ve hastalıklardan dolayı 5 tona kadar düşmektedir (Khush ve Jena, 2009). İnsanoğlunun 2030’lu yıllarda talebinin karşılanabilmesi için çeltik üretiminin %40 oranlarında artırılması gerekmektedir (Khush, 2005). Bu hedeflerin başarılabilmesinde biyotik ve abiyotik baskılara karşı yüksek direnç gösteren çeltik çeşitlerinin geliştirilmesi gerekmektedir (Selvaraj vd., 2012). Bunun kontrolü, pirinç kayıplarını azaltmak ve kimyasal ilaç kullanmayı indirgemek için etkili bir yaklaşım olan dirençli çeşitlerin üretilmesiyle sağlanabilir. Bu nedenle, sürekli olarak yeni çeşitlerin geliştirilmesine ihtiyaç vardır.

1.4. Bitki Islahı ve Genetik Çeşitlilik

Bitkiler, insanların önemli besin kaynaklarından. Bitki ıslahı, insan eliyle çeşitli sürelerde gerçekleştirilen evrim olarak algılanabilir ve arkeolojik bilgilere göre on binlerce yıl önce yapılmaya başlanmıştır. Bilindiği gibi tarımın keşfi ile beraber insanlar yerleşik hayata geçmişlerdir. Ancak, yerleşik hayata geçmeden önce tohumları toprağa bırakarak; bitkilerden daha iyi gelişme gösterenleri, hayvanlarca daha fazla tercih edilenleri ve verimce yüksek olanları bilinçli ya da bilinçsiz seçmelere tabi tutmuşlardır. Böylece, bitki ıslahının en önemli ve temel ilkelerinden biri olan “seçilim” ortaya çıkmıştır (Ulukan, 2007). Yapay olarak gelişmiş bu seçilim ile zamanla kültüre alma gelişmiş ve bunun paralelinde meydana gelen genetik değişiklikler evrimsel süreçte bitkilerin yabani formlarından farklı olan yeni türlerin oluşumuna sebep olmuştur (Nevo vd., 2002).

Klasik bitki ıslahı yöntemleri, melezlemeyle elde edilen ve açılım gösteren yeni döller arasından üstün genotipli olanların fenotipik seçilimine dayanmaktadır (Eserkaya Güleç vd., 2010). Bitki ıslahçıları farklı teknikler kullanarak pek çok bitki türünde daha verimli, daha lezzetli, daha dayanıklı çeşitleri elde etmeyi hedeflemektedirler. Tarımsal üretimde amaç, bitkinin verim potansiyeline ulaşabilmesi için gerekli girdileri sağlayarak en iyi verimi elde etmektir. Bu yönden yapılacak çalışmalarda ıslahçının en büyük yardımcısı bitkisel gen kaynaklarıdır (Şehirali ve Özgen, 1987). Geniş genetik tabanlı çeşitlerin geliştirilmesi ise genetik değişim miktarı ile sınırlıdır (Frankel, 1973; Arnold, 1978). Bitki ıslahında en önemli ve temel amaçlarından biri genetik çeşitliliği bitki düzeyinde sürdürmektir (Ulukan, 2007).

Genetik çeşitlilik, bir türün sahip olduğu bir genin değişkenliği yani farklılığıdır. Bir özelliği belirleyen gen her zaman aynıdır fakat genin allellerinin baz dizisi değişkendir. Bu ise genetik çeşitliliğe neden olur. Örneğin; bir bitkinin çiçek rengini belirleyen bir gen için farklı alleller ortaya çıkabilir (Örneğin; pembe, mor, beyaz allel). Her bir durumda, aynı gen çiçek rengini belirler, fakat gene ait allellerinin DNA dizisi farklıdır. Bireylerin belirli bir karakter için aynı genin farklı çeşidine (allele) ya da değişik gen kombinasyonlarına sahip olmaları bireyler arası genetik çeşitliliğe neden olur. Değişen çevre koşullarında bir türün uzun süre hayatta kalması sahip olduğu populasyon içi ve populasyonlar arası genetik çeşitlilik miktarının korunmasına bağlıdır. Düşük seviyedeki genetik çeşitlilik bireylerin değişen çevre şartlarına uyumunu ya da bu ortamda hayatta kalabilmesini indirgerken, ekstrem koşullarda ise türün ortadan kalkmasına neden olabilir (Hansson ve Westerberg, 2002).

Genetik çeşitlilik, genellikle genotip ve allel frekansları, polimorfik lokus oranı, beklenen ve gözlenen heterozigotluk veya alelik çeşitlilik ile ölçülür. Populasyonların

yapısal içeriğinde, popüler olan Wright'ın (1969) fiksasyon indeksi (FST) gibi farklılaşmanın moleküler ölçüleri populasyonlar arasındaki allel frekanslarının genetik uzaklıklarına dayanmaktadır (Nei, 1987; Laval vd., 2002). En yaygın olarak kullanılan parametre, populasyonlar içerisindeki çeşitlilik ölçüsü, beklenen heterozigotluk ya da gen çeşitliliğidir. Nei (1973) tarafından tanımlanan olası olarak populasyondan rastgele seçilen iki allel farklıdır (Toro ve Caballero, 2005).

Yeni ve daha iyi özelliklere sahip bitki çeşitlerinin geliştirilmesi biyoteknolojinin en göze çarpan çıktılarından biridir. Herhangi bir bitki ıslah programı başlatılmadan önce mevcut germplasm arasındaki genetik çeşitlilik dereceleri hakkında bilgiler sağlanması çok önemlidir.

1.5. Genetik Çeşitliliğin Tespitinde Kullanılan Belirteçler

Genetik çeşitlilik morfolojik (fenotipik), biyokimyasal ve moleküler (DNA) markırlar kullanılarak belirlenebilir. Bununla birlikte, morfolojik karakterler çevresel faktörlerden yoğun olarak etkilendiklerinden yetiştirme sırasındaki çevresel koşullara bağımlılık gösterirler, ayrıca bu tip karakterlerin tespiti için genelde bitkinin olgunlaşması gereklidir.

Biyokimyasal markırlar çevresel değişikliklerden daha az etkilendiklerinden genetik çeşitlilik saptanması çalışmalarında morfolojik karakterlere göre daha fazla başarıyla kullanılırlar. Bu markırların en büyük dezavantajı genomun çok küçük bir bölümünü temsil etmelerinden dolayı var olan varyasyonların tespitinde yetersiz kalmalarıdır (Rao, 2004). Ayrıca bazı biyokimyasal markırlar bitkinin belli organlarına veya büyüme evresine göre değişiklik gösterebilirler.

Morfolojik ve biyokimyasal markırlarda karşılaşılan kısıtlamalar moleküler markırların kullanımıyla beraber aşılmıştır.

1.5.1. Genetik çeşitlilik tespitinde kullanılan moleküler markırlar

Moleküler markırlar çevresel faktörlerden etkilenmezler ve analiz bitkinin herhangi bir büyüme aşamasında yapılabilir. Moleküler belirteç, belirli bir genle beraber kalıtılan bir DNA parçasıdır (Gülşen ve Mutlu, 2005). Genomun belirli bir bölümünde tanımlanmış olan gen yada gen bölgeleri üzerinde bulunan bu DNA parçaları ilgili olduğu gen bölgesiyle kalıtıldığından belirteç olarak isimlendirilir. Son yıllarda moleküler belirteçlere dayalı teknolojilerin geliştirilmesi ve uygulanması, yeterli DNA dizisi düzeyinde polimorfizmi ortaya çıkarmak için bireyler arasındaki ve populasyon içindeki genetik çeşitliliğin tespitinde yeterli olan güçlü araçlar sunmaktadır. (Kresovich vd., 1995; Simmons vd., 2007).

Morfolojik ve biyokimyasal belirteçlerin çevresel faktörlerden etkilenmeleri ve polimorfizm oranlarının düşük olması gibi dezavantajlarından dolayı moleküler belirteçler populasyon içi ve arasındaki genetik çeşitliliğin tespitinde tercih edilir bir duruma gelmiştir. DNA polimorfizmini değerlendirmek üzere moleküler belirteçlerin çeşitli tipleri kullanılır. Bunlar; hibridizasyon temelli belirteçler ve polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) temelli belirteçler olmak üzere iki sınıfa ayrılır:

1.5.1.1. Hibridizasyona dayalı moleküler (RFLP) belirteçler

Kesilmiş Parça Uzunlukları Polimorfizmi (RFLP): RFLP belirteci, hibridizasyon temelli ko-dominant bir belirteç sistemidir (Sambrook vd., 1989). RFLP belirteçleri (Botstein vd., 1980) dokulardan izole edilen genomik DNA'nın nükleik asit dizilişlerini tanıyan DNA kesim enzimlerince spesifik olarak kesilmesi ve oluşan DNA parçalarının elektroforezde ayrıldıktan sonra naylon veya nitroselüloz membrane transfer edilerek DNA problemleriyle etiketlenmesi esasına dayanır.

RFLP belirteçleri ile türler içi ve türler arasındaki farklılık kolayca belirlenir. Güvenilir, eşbaskın (kodominant) özellikte olup polimorfizm oranı orta düzeydedir (Yıldırım ve Kandemir, 2001). En önemli dezavantajı ise maliyetinin yüksek olması, fazla zaman, işgücü gerektirmesi ile fazla miktarda ve kaliteli DNA'ya gereksinim duyulmasıdır (Walton, 1993).

1.5.1.2. PZR tekniğine dayalı moleküler markırlar

Bitkilerde genetik ilişkileri ortaya çıkarmada kullanılan ilk DNA belirteci olan RFLP yönteminin maliyetinin yüksek olması ve yavaş olması PZR'a dayalı moleküler belirteçlerin gelişmesine neden olmuştur (Wu vd., 2005). PZR'nin keşfi ile DNA polimorfizmi tespitinde kullanılan yeni belirteç sistemleri ortaya koyulmuştur. Bu belirteçlerden bazıları RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA), ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), SRAP (Sequence Related Amplified Polymorphism), SCAR (Sequence Characterized Amplified Region Markers) ve mikrosatellitlerdir (SSR-Simple Sequence Repeat). AFLP, RAPD ve ISSR dominant moleküler belirteç; SSR, RFLP ise ko-dominant moleküler belirteçlerdir. Bunların her biri belirli avantaj ve dezavantajlara sahiptir (Wu vd., 2005).

Tablo 1.3. *En sık kullanılan PZR temelli belirteçlerin karşılaştırılması*

Belirteç Tekniği	Polimorfizm	Dominantlık	Verimlilik	Otomasyon	Maliyet
POGP	Yüksek	Dominant Kodominant	Yüksek	Orta/Yüksek	Düşük
RAPD	Orta/Yüksek	Dominant	Düşük	Orta	Düşük
SCAR	Yüksek	Kodominant	Yüksek	Orta	Orta
AFLP	Yüksek	Dominant	Yüksek	Orta/Yüksek	Orta
SSR	Yüksek	Kodominant	Yüksek	Orta/Yüksek	Düşük
ISSR	Yüksek	Dominant	Orta	Orta/Yüksek	Düşük
SRAP	Yüksek	Kodominant	Orta	Orta/Yüksek	Düşük

Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA (RAPD) markırları:

Williams vd., (1990) tarafından geliştirilen RAPD tekniği basit ve kısa oligonükleotid primerler kullanılarak genomik DNA'nın rastgele bölgelerinin çoğaltılmasıdır. PZR ürünü elde edebilmek için primerin DNA zinciri üzerinde 200 ile 2000 bp mesafede rastgele farklı dizinlere yapışması gerekir. RFLP'nin tersine az miktarda DNA'ya gereksinim duyulması, zaman ve maliyet yönünden olumlu olmasına rağmen dominant belirteç (Corazza-Nunes vd., 2002) olmaları nedeni ile yorumlanması zor, güvenilirliği sınırlı ve tekrarlanma olasılıkları eğer optimizasyon çalışmaları yapılmamışsa oldukça düşüktür (Lavi vd., 1994).

Sekansı belirlenmiş ve çoğaltılmış polimorfik diziler (SCAR) markırları:

SCAR belirteç tekniğinde, RAPD ve ISSR gibi marker spesifitesi düşük olan belirteçlerden elde edilen bantlar jel üzerinde kesilerek klonlanır ve dizi analizi yapılır. 3' sonlarındaki DNA zincirlerinin tespit edilmiş olmasıyla bu lokuslara özgü daha uzun, dolayısıyla da daha özgül primerler tasarlanır. Örneğin; Dizi analizi sonucu elde edilen spesifik fragmentlere göre, ilk 10 bazı orijinal RAPD primerinden sonraki 14 bazı internal dizilerden oluşan 24 nükleotidlik yeni bir primer sentezlettilir. Bu primerler PZR analizlerinde kullanılarak SCAR markırlarının oluşturulmasında kullanılır. Bu markırlar kesim enzimleri ile kesilir ve kodominant markırlara dönüştürülebilir. Elde edilen markırların ISSR ve RAPD'e göre tekrarlanabilirliği daha yüksektir (Paran ve Michelmore, 1993; Chawla, 2002).

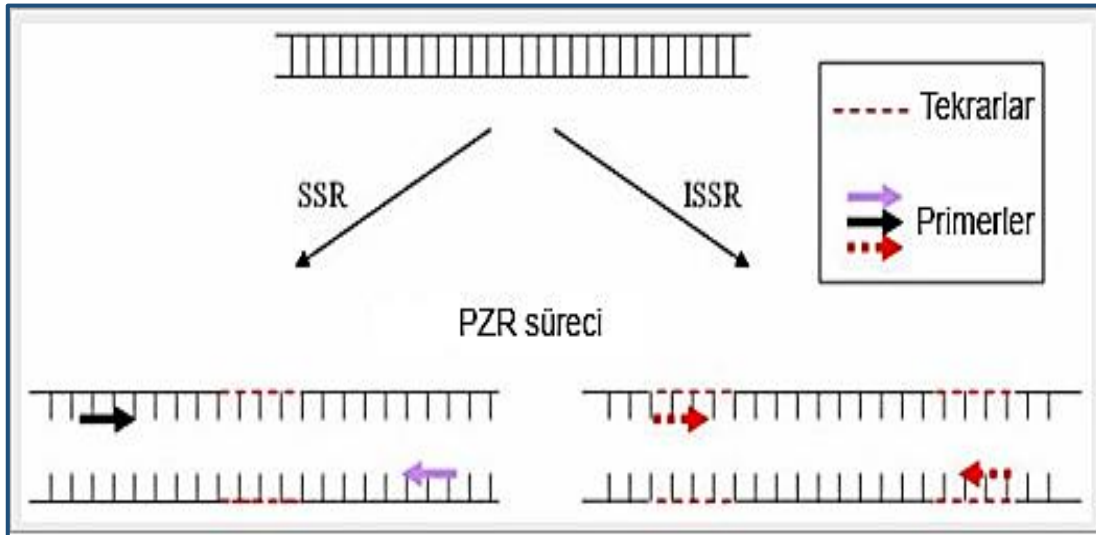
Basit tekrar dizileri (SSR) markırları:

SSR belirteç tekniği, 1993'te Rafalski ve Tingey tarafından rastgele tekrarlanan DNA bölgeleri hedef alınarak geliştirilen bir tekniktir. Ökaryotik canlı genomlarda bulunan ardışık tekrarlı 2-6 nükleotitli gruplara [(AT)_n, (GT)_n, (ATT)_n ve (GACA)_n gibi]

mikrosatellit denir. Mikrosatellitler, aynı zamanda STR veya SSR olarak adlandırılır ve 11-60 bp uzunluğundaki tekrarlardan oluşan minisatellitlerden (VNTR) farklıdır (Tautz, 1989; Gülşen ve Mutlu, 2005). SSR'lerin etrafındaki DNA dizileri aynı türün bireyleri arasında korunmuşlardır. Ardışık SSR tekrarlarının sayısındaki farklılık, PZR sonucunda farklı uzunlukta parça oluşturur. Bu teknik bu durumu temel alarak çalışır. Zaman alıcı bir teknik olup ve emek isteği de yüksektir.

Basit iç dizi tekrarları (ISSR) markırları:

ISSR (Basit iç dizi tekrarları), ilk defa Zietkiewicz vd. (1994) ve Gupta vd. (1994) tarafından geliştirilen dominant bir belirteç tekniğidir. Bu yöntem, yüksek oranda polimorfizm sağlaması açısından avantajlıdır. ISSR belirteçleri genomik DNA'yı hedef alan ve DNA üzerindeki tekrarlı bölgeler olan ve SSR (mikrosatellit) olarak adlandırılan bölgeler (100-3000 baz çifti) arasında kalan parçaların spesifik uç bağlantılı bir primer kullanarak çoğaltılması esasına dayanmaktadır (Zietkiewicz vd., 1994; Bernet vd., 2002). Dolayısıyla, primer olarak genomlarda 2, 3, veya 4'lü şekilde tekrar eden nükleotid dizileri kullanılır (Gülşen ve Mutlu, 2005). Genom boyunca rastgele dağılımları olan SSR bölgelerinden birbirlerine yakın olanlarının aralarındaki bölgeler PZR ile çoğaltılır (Şekil 1.4).



Şekil 1.4. SSR ve ISSR karşılaştırması (Yip vd., 2007).

SSR, tek bir tekrar bölgesini hedefleyen primerler kullanırken; ISSR, iki tekrar arasındaki bölgeyi çoğaltmak için tekrarlar içeren tek bir primer kullanır (Yip vd., 2007).

Çoğaltılmış fragment uzunluğu polimorfizmi (AFLP) markırları:

AFLP ya da çoğaltılmış parça uzunluğu polimorfizmi Vos vd. (1995) tarafından geliştirilmiş PZR temelli bir tekniktir. AFLP analizi polimorfizm tespiti için son derece duyarlı bir yöntemdir. Aslında RFLP ve PZR kombinasyonudur. Kısa sürede çok sayıda lokusun tahlil edilmesi, AFLP'nin çok büyük avantajıdır. RAPD ile karşılaştırıldığında, AFLP düşük hata oranları ile tekrarlanabilirlik oranı yüksektir (Jones vd., 1997). Uygulanabilirliği, RAPD tekniğine göre kolay olmasa da RFLP tekniğine göre daha kolaydır. Kuruluş aşamasında maliyet gerektirir (Walton, 1993). Masraf, iş gücü gereksinimi ve güvenilirliği RAPD ve RFLP arasında yer alır (Maughan vd., 1995).

Dizi ilişkili çoğaltılmış polimorfizm (SRAP) markırları:

SRAP belirteçleri, 2001 yılında Li G. ve Quiros C.F. tarafından *Brassica* cinsinde haritalama ve gen etiketleme çalışmasında geliştirilmiştir. Açık Okuma Çerçevesinin (ORF, Open Reading Frames) ileri ve geri primerler ile amplifikasyonunu temel alırlar. İleri ve geri primerler 17-18 baz uzunluğundadır ve ilk 10-11 baz öz (core) sekanstır ve bu bölge ileri primerde CCGG, geri primerde ise AATT sekansı ile devam etmektedir. SRAP markırlarının %20'si kodominanttır (Li ve Quiros, 2001). Basit, güvenilir, orta verimlilikte ve yüksek otomasyonu olan bir tekniktir fakat özel primer dizaynı gerektirir.

Her bir markır sistemi avantaj ve dezavantajlara sahiptir (Powell vd., 1996). ISSR yöntemi RAPD yöntemi ile çok benzer bir yöntemdir. RAPD belirteçlerinin düşük üretkenliği, AFLP belirteçlerinin yüksek maliyeti ve primer sentezlenebilmesi için sekans bilgisinin gerektiği SSR belirteçleri, bir çok çalışmada önemli kısıtlamalar oluşturmaktadır.

1.5.1.2.1. Peroksidaz gen polimorfizm (POGP) markırları

Oksidoredüktazlar sınıfına dahil olan peroksidazlar, hayvan, bitki, mantar ve mikroorganizmalarda indirgenme-yükseltgenme tepkimelerini katalizleyen bir enzim grubudur (Topçular, 2006) . Diğer organizmalarda olduğu gibi bitkilerde de peroksidaz genlerinin çeşitli moleküler formları ve geniş bir hücre altı dağılımı görülmektedir. Peroksidazlar, yapısal ve katalitik özelliklerine göre 3 sınıfa ayrılmışlardır:

- Sınıf I peroksidaz ailesi; hayvanlarda glutatyonperoksidaz, miyeloperoksidaz, eozinofilperoksidaz, laktoperoksidaz, ve prostoglandinperoksidaz sentazın bazı kısımları gibi enzimleri içerir. Glutatyonperoksidaz, hayvan peroksidazları arasında gösterilmesine rağmen aktivitesi bitkilerde de saptanmıştır (Welinder, 1991; Churin

vd., 1999).

- Sınıf II peroksidaz ailesi; hayvan, bitki, bakteri, mantar ve mayalarda bulunan katalazların oluşturduğu ailedir.
- Sınıf III peroksidaz ailesi ise; bitki, mantar, bakteri ve mayalardaki peroksidazlardan meydana gelir (Taurog, 1999).

Primer yapılarında bazı farklılıklar bulunan bitki peroksidazları da 3 alt sınıfa ayrılmaktadır. Sınıf I bitki peroksidazları, bakteriyel peroksidazlarla ilişkili intraselüler peroksidazları içerir ve bunlar gelişmiş bitkilerdeki kloroplastlar ve sitosoldaki hidrojen peroksidin uzaklaştırılmasından sorumlu ana enzim olan askorbat peroksidazları içine alır. Sınıf II bitki peroksidazları fungal peroksidazları da kapsayan (MnP, LiP vb.) ekstraselüler peroksidazları içerir ve monomerik glikoprotein yapıda olup lignin yıkımında rol alırlar. Sınıf III bitki peroksidazları ise hem intraselüler hem de ekstraselüler peroksidazları içeren monomerik glikoprotein yapısındadır (Robinson, 1991; Wada vd., 1998). Bunlar, hidrojen peroksidin kloroplast ve sitosoldan uzaklaştırılması, toksik bileşiklerin oksitlenmesi, hücre duvarının biyosentezi, yaralanmalara karşı savunma yanıtlarının oluşturulması, indol-3-asetik asit metabolizması, etilen biyosentezi gibi farklı dokulara özgü çeşitli fonksiyonlara sahiptir (Poulos vd., 1993; Öcal, 2012).

Tablo 1.4. *Bitki peroksidazlarının sınıflandırılması* (Hiraga vd., 2001)

Sınıf	Üye	Orijin	Moleküler kütle (kDa)
I	Sitokrom c peroksidaz (EC 1.11.1.5)	Maya ve bakteri	32-63
	Katalaz peroksidaz (EC 1.11.1.6)	Bakteri ve mantar	150-240
	Askorbat peroksidaz (EC 1.11.1.6)	Bitki	30-58
II	Manganez bağımlı peroksidaz (EC 1.11.1.13)	Mantar	43-49
	Ligninaz (EC 1.11.1.14)	Mantar	40-43
III	Peroksidaz (EC 1.11.17, POX)	Bitki	28-60

Sınıf III bitki peroksidazları (EC 1.11.17, POX) 1855 yılında tanımlanmış ve takip eden bir kaç on yıl sonra saflaştırılmışlardır (Hiraga, 2001). Peroksidazların 28 kDa'dan 60 kDa'a kadar değişen moleküler ağırlıklarının %25 kadarı karbonhidratlardan oluşmaktadır (Duran ve Esposito, 2000). HRP-Bayır turpu peroksidazı (Horseradish peroxidase), şalgam peroksidazı, Japon turpu peroksidazı ve yağ palmyesi peroksidazlarının sırasıyla %18, %12-18, %20 ve % 37 karbonhidrat içerdikleri rapor edilmiştir. Günümüze kadar bilinen peroksidazların çoğu monomerdirler. Örneğin: çeltik peroksidazı (48 kDa) ve pamuk peroksidazı (48 kDa), HRP'nin 44 kDa moleküler

ağırlığında bir monomerik bitki enzimi oldukları rapor edilmiştir (Fatima ve Husein, 2008).

Bitkilerin büyüme ve gelişimlerinde anahtar rol oynayan peroksidazlar başlıca hücre duvarında bulunmaktadır. Ek olarak, kotiledonlarda ve yapraklarda, yaralanan gövdelerde, çiçek saplarında buldukları bilinmektedir. Bu dokuların, hücrelerinde çekirdekte, mitokondride, ribozomda hücre duvarı ve membran ile ekstraselüler bölgelerde yer aldığı bulunmuştur (Martinez vd., 2000; Passardi vd., 2005). Bitki peroksidazları, bitkisel hücrelerde de büyük oranda bulunurlar. Bitki peroksidazları (POXs, EC 1.11.17), bir multigen ailesine aittirler ve patojen enfeksiyonu, böcek toleransı, tuz toleransı, oksin yıkımı, hücre duvarı lignifikasyonu, çimlenme ve oksidatif stres ve bitki senesensi gibi birçok fizyolojik olayda önemli rol oynarlar (Passardi vd., 2005; Gülsen vd., 2007). Peroksidaz enzimi, olumsuz dış etkilere maruz kalındığında üretilen zararlı oksijen radikallerinin seviyesini düzenleyerek, süperoksit dismutaz (SOD) ve katalazın da dahil olduğu bitki hücresinin korumada görevli enzim kompleksinin bir parçasını oluşturmaktadır (Bakardjieva vd., 1996). Yapısında *hem* proteini içeren peroksidazlar O_2 radikali ve H_2O_2 (hidrojen peroksit) varlığı halinde bu bileşikler okside edebilirler. Peroksidaz proteinleri, bir elektron taşıyıcısı olarak hidrojen peroksit aracılığıyla fenolik bileşikler ve hidrokinon benzeri çok sayıda aromatik bileşenin dehidrojenasyonunu katalizleyen bir *hem* yapısına sahiptirler (Banci, 1997; Kim vd., 2000). Hem grubunda bulunan demir (Fe) katalitik aktivitelerden sorumludur. Bu nedenlerle, peroksidazlar yüksek derecede korunmuş 3 motife sahiptirler (Hiraga vd., 2001) :

- Distal Hem-bağlayan bölge,
- Fonksiyonu bilinmeyen bir merkez bölge
- Proksimal Hem-bağlayan bölge

Günümüzde, dominant olan AFLP, RAPD ve ISSR ile kodominant olan allozimler, mikrosatellit moleküler markırlar kadar hem dominant hem de kodominant özelliğe sahip Peroksidaz gen polimorfizm (POGP) markırları populasyon genetiği, moleküler haritalama, çeşit identifikasyonu, moleküler ıslah, tohum saflık testleri gibi çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır (Obinger vd., 1996; Louarn vd., 2007). POGP markırlarının farklılığı, maruz kalınan stres faktörlerini yansıtabileceği için farklı coğrafik bölgelerde bulunan bitki genotipleri arasındaki akrabalığı tanımlamada, biyotik ve abiyotik stres varlığında oluşan gen ifadesi çalışmalarında da kullanılabilir (Gülşen vd., 2007). POGP markırları hem dominant hem de kodominant markırlar üretirler (Gülşen vd., 2010a). Bunun yanında, düşük maliyetli oldukları ve yüksek derecede polimorfizm

gösterdiklerinden dolayı bitkiler aleminde yaygın bir markır olarak kullanılabilirler (Obinger vd., 1996).

1.6. Konu İle İlgili Yapılmış Önceki Çalışmalar

Peroksidaz gen temelli markırlar kültüre alınmış birçok türde genetik akrabalık ve filogenetik analizlerinde kullanılmıştır. Son yıllarda POGP markır tekniği kullanılarak yapılmış bu tür çalışmalarda ekonomik açıdan önemli zirai bitki türlerinin genetik çeşitlilik seviyeleri tespit edilmiş ve bu verilerin çalışılan çeşitlerin ıslah programlarında kullanılabileceği önerilerinde bulunulmuştur.

Gülşen vd. (2007) manda otu [buffalograss, *Buchloe dactyloides* (Nutt.) Engelm] genotipleri ve 8 farklı çim arasında POGP markırları ile 100-750 bç (baz çifti) aralığında 41'i polimorfik 52 adet bant elde etmişlerdir.

Gülşen vd. (2010b) toplam 192 adet elma (*Malus* spp.) genotipi analizinde POGP yöntemi kullanmışlardır. 14 adet spesifik peroksidaz primeri kullanarak 44'ü polimorfik olmak üzere 80–1000 bç aralığında 46 bant elde etmişlerdir. POGP yönteminin elma genotipleri arasındaki genetik yakınlığı ve evrimsel ilişkiyi tespitinde kullanışlı olduğunu bildirmişlerdir.

Gülşen vd. (2010a) *Citrus* türleri için yaptıkları çalışmada farklı markırlar yanında POGP markırlarını da kullanmışlardır.

14 peroksidaz gen primeri ile 80 *Citrus* türü kullanılarak yapılan başka bir çalışmada üretilen 148 bandın 147'si polimorfik olarak bulunmuştur (Uzun vd., 2014).

Benzer şekilde; Türkiye'de geliştirilen 14 fasulye çeşidi SRAP ve POGP markırları kullanılarak genetik çeşitlilik seviyeleri bulunmuştur (Ceylan vd., 2014). Yine 67 fasulye çeşidi için POGP markırları ile analizler gerçekleştirilmiştir (Nemli vd., 2014).

Bir başka çalışmada, 13 peroksidaz gen primeri ile yapılan analizlerde karpuz çeşitlerinde %98 gibi yüksek polimorfizm elde edilmiştir (Öcal vd., 2014).

Mirzavand vd. (2016) peroksidaz gen temelli markırlarla 100 yabancı fıstık çeşidinde genetik akrabalık ve populasyon yapısını ortaya koymuşlardır. Ortalama 0.65 değerinde 0.29 ile 1.00 arasında değişen akrabalık dereceleri belirlemişlerdir.

Pinar vd. (2016)'da 8 peroksidaz gen primeri kullandıkları çalışmada 69'u Türk, 27'si yabancı kökenli badem çeşidi için % 94'ü polimorfik olmak üzere 89 bant elde etmişlerdir.

Türkiye'de geliştirilen bazı çeltik çeşitlerinde ise genetik çeşitlilik seviyesi bugüne dek sadece RAPD markırları ve tohum depo proteinleri ile belirlenmiştir (Büyükcünal Bal ve Bay, 2010).

Vizyon 2023 (Biyoteknoloji Ve Gen Teknolojileri Stratejisi) Projesi'nde Tarım

Biyoteknolojisi ve Gen Teknolojileri başlığı altında sıralanan 5 stratejik hedefin (Vizyon 2023, s. 16) gerçekleştirilmesi süresince “**Moleküler Markör Teknolojileri**”nden etkin şekilde faydalanılması gerekliliği vurgulanmıştır. Bilindiği gibi ıslah çalışmaları sırasında yapılan tarla denemeleri zaman alıcı, yüksek maliyetli ve fazla iş gücü gerektiren uygulamalardır. Bundan dolayı, Türkiye’de geliştirilen çeltik çeşitlerinin dünyayla eşzamanlı olarak genetik çeşitlilik ve akrabalık derecelerinin Moleküler Markör Teknolojileri yardımıyla tespit edilmesi oldukça önemlidir. Çeltik üzerinde peroksidaz gen polimorfizmine dayalı henüz bir çalışma yapılmamıştır.

1.7. Çalışmanın Amacı

Bu tez çalışmasının amacı:

- 46’sı yerli 4’ü anaç toplamda 50 çeltik çeşidinden elde edilen DNA örnekleriyle 14 adet peroksidaz gen (POX) primer çifti için polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) optimizasyonu yapmak,
- POGP markırlarının çeltikler için polimorfizm bilgi içeriği ve ayırma gücünü tespit etmektir,
- Optimize edilen PZR koşulları kullanılarak peroksidaz gen polimorfizmine (POGP) dayalı markırlarla çeltik çeşitleri arasındaki genetik ilişkiyi ortaya koymaktır.

Sonuç olarak, polimorfizm oranının yüksek olduğu belirtilen peroksidaz gen markırlarıyla ülkemizdeki çeltik çeşitlerinin genetik çeşitlilik seviyelerinin daha net bir şekilde belirlenmesi hedeflenmektedir. Böylece, ülkemizde ekimi yapılan çeltik çeşitlerinin geliştirilmesi amacıyla yapılan ıslah çalışmalarında kullanılabilecek ebeveyn çeşitlerin genetik çeşitlilik ve genetik akrabalık seviyeleri belirlenerek yeni çeşitlerin eldesinde kullanılabilecek veriler sağlanacaktır.

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Bitki Materyali

Bu çalışmada, ülkemizde geliştirilmiş 46 çeltik ve 4 adet orijin çeşit (Baldo, Balilla, Rocca ve Veneria) olmak üzere 50 çeltik çeşidi kullanılmıştır. T.C. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı'na bağlı Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nden (TTAE) 46, Karadeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nden (KTAE) ise 4 çeşit temin (Kızılırmak, Bafrayıldızı, Mevlütbey, Karadeniz) edilmiştir. Çeltik çeşitleri ile ilgili bilgiler Tablo 2.1'de verilmiştir.

Tablo 2.1. Çalışmada kullanılan çeltik çeşitleri

Sıra No	Çeşit Adı	Orijini	Verim (Kg)	Boy (cm)	Tescil yılı
1	Ergene	Delta X Zoria	700-750	100	1990
2	Meriç	Delta X Akçeltik	750-850	100	1990
3	İpsala	Rodina X Delta	750-850	110	1990
4	Demir	Plovdiv X Lido	800-900	85	2000
5	Neğiş	Vialone Nano X Sequial	700-750	102	2002
6	Gönen	Bonni X Shinei	700-750	101	2002
7	Ece	8203-TR413-6-1-1X8260-TR470-6-1-1	800-900	90-95	2004
8	Kırkpınar	İpsala X 80110-TR253-4-1-1	700-750	100-105	2004
9	Şumnu	Rialto X Korall	800-900	85-90	2006
10	Beşer	İpsala Mutasyon	700-750	100	2006
11	Aromatik-1	İntrodüksiyon (YRF-204)	600-700	75-80	2007
12	Gala	Osmancık-97 Seleksiyon-2	800-1000	95	2009
13	Hamzadere	Demir X 83013-TR631-4-1-2	800-1000	95	2011
14	Çakmak	Trakya X N1-41T-1T-0T	800-1000	95-100	2011
15	Paşalı	Osmancık-97X82070-TR480-1-1-1-1	750-900	95-100	2011
16	Mis-2013	YRF-204 X Osmacık-97	800-850	98	2013
17	Kale	Demir X 82079-TR-489	850-900	91	2013
18	Yatkın	Sürek-95 X 92057-TR467-12-1	800-1000	100	2013
19	Sürek-M711	Sürek-95 Mutasyon 2007-7-1-1	800-1000	99	2013
20	IMI-2521	Clierfield X Durağan	800-900	95	2015
21	IMI-2554	Halilbey X Clierfield	800-900	100	2015
22	Akçeltik	Türkiye	500-550	100-105	x
23	Sarıçeltik	Türkiye	500-550	95-100	x
24	Karacadağ	Türkiye	500-600	104	x
25	Karadeniz	Roma (I) X Silla	700-800	110	2003
26	Kızılırmak	N1,41 T-1T-0TX8317-TR 635-1-2	650-800	80-95	2005
27	Mevlütbey	Drago (BG) X Kral	700-750	x	2012
28	Manyasyıldızı	IR66160-5-2-3-2 X Veneria	800-850	96	2013
29	Halilbey	İpsala X Veneria	800-900	90-100	2004
30	Kızıltan	Veneria X Thainato	750-900	75-85	2007

Tablo 2.1. (Devam) Çalışmada kullanılan çeltik çeşitleri

Sıra No	Çeşit Adı	Orijini	Verim (Kg)	Boy (cm)	Tescil yılı
31	Tunca	Rocca / Thainato	800-1000	90	2009
32	Yavuz	Rocca X 1979-70-1	700-750	100	2000
33	Osmancık-97	Rocca X Europa	700-750	100	1997
34	Sürek-95	Rocca X Rodina	750-800	99	1995
35	Serhat-92	Rocca X Krasnodarsky-424	750-850	105-110	1992
36	Bafrayıldızı	Ballilla-28 (F) X TR666-8-1-1-1	650-815	x	2011
37	Kıral	Gritna X Ballilla	700-750	90	2000
38	Altınyazı	Baldo X Ribe	750-850	105-115	1990
39	Trakya	Baldo X Komsomolsky	850-900	110-115	1990
40	Edirne	Baldo X Calendal	650-700	100-105	2004
41	Durağan	Panda X Baldo	750-900	90-95	2007
42	Efe	Baldo X Demir	800-1000	100-105	2011
43	Tosyagüneşi	Baldo X Savio	800-900	98	2011
44	Bigaincisi	Baldo X Korol	750-800	104	2013
45	Küplü	Baldo X IR25571-31-1	800-900	100	2013
46	Kargı	Baldo X Balilla	700-850	101	2002
47	Baldo	İtalya	650-700	95-105	x
48	Balilla	İtalya	x	x	x
49	Rocca	İtalya	700-750	90-100	x
50	Veneria	İtalya	700-900	80-110	x

2.2. Çeltik Tohumlarının Çimlendirilmesi

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. Sulama distile su ile yapılmıştır.

Çimlenmenin ardından yaklaşık 15 cm uzunluğuna erişen fidelerden DNA izolasyonu için yaprak materyali toplanarak DNA izolasyonuna kadar -20°C'de saklanmıştır.

2.3. DNA İzolasyonu

Çeltik yapraklarından CTAB (Cetyl trimethylammonium bromide) yöntemi ile genomik DNA izolasyonu yapılmıştır (Doyle ve Doyle, 1990). Kullanılan liziz tamponu aşağıdaki gibi hazırlanmıştır (Tablo 2.2).

Sterilizasyondan sonra tampona 200 µl β-merkaptotanol eklenerek kullanılmıştır.

Tablo 2.2. % 2'lik CTAB liziz tampon bileşenleri

NaCl	4,095 gr
Tris 1M (pH=8)	5 ml
CTAB (Cetyl trimethylammonium bromide)	1 gr
EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) (0.5 M)	2 ml
PVP (Polyvynilpyrolidone)	0,5 gr
Distile su	50 ml'ye tamamlanıp otoklavlanır.

Uygulanan olan 2XCTAB metodu basamakları aşağıda verilmiştir;

- Çalışmadan önce CTAB (Hexadecyltrimethylammonium bromide) tamponu 65°C'de ısıtılarak hazır hale getirilmiştir.
- Sıvı azotta öğütülmüş 100 mg bitki dokusu 2 ml'lik ependorf tüplere aktarılarak üzerine 1000 µl CTAB tamponu eklenip homojen hale gelene kadar yavaşça pipetlenmiştir.
- Karışım tüpü 65°C'de 30 dakika inkübe edilerek belli aralıklarla tüpler alt üst edilmiştir.
- Tüpe eşit hacimde kloroform:isoamil alkol eklenerek 10 dakika boyunca alt üst edilerek karıştırılmıştır.
- Karışım 9000 rpm'de 10 dakika santrifüjden sonra üstte kalan sıvı kısım yeni 1.5 ml'lik tüpe aktarılmıştır.
- Aktarılan miktarın 2/3'ü kadar -20°C'de bekletilen isopropanol karışıma eklenmiştir ve birkaç kez alt üst edildikten sonra -20°C'de 2 saat inkübasyona bırakılmıştır.
- İnkübasyon sonunda karışım tüpü 10.000 rpm'de 10 dk santrifüjlenmiştir.
- DNA peleti 300 µl % 70'lik etil alkol ile yıkandı ve çeker ocakta veya açık havada kuruyana kadar bekletilmiştir.
- Kuruyan DNA peleti istenilen DNA konsantrasyonuna göre steril deiyonize suda çözündürülmüştür.

2.4. DNA Miktar ve Safılık Tayini

PZR çalışmalarında bitki örneklerinden elde edilen DNA'nın kalitesi ve konsantrasyonunun bilinmesi önemli ve gereklidir. Bu nedenle DNA miktar ölçümüne geçmeden önce izole edilen DNA örneklerinden 5 µl alınarak 0.5X TBE solüsyonu içerisinde bulunan % 0,8'lik agaroz jele yüklenmiştir. % 0,8'lik Agaroz jelde 1kb DNA ladder (Fermentas) ile birlikte yürütülerek DNA'ların kalitesinin PZR çalışmalarına geçmek için uygunluğu kontrol edilmiştir. Yürütme işlemi tamamlandıktan jeller UVİpro

jel dökümantasyon sistemi (Uvitec, Cambridge, İngiltere) kullanılarak fotoğraflanmıştır. Agaroz jelde çok silik veya ışıklı yol şeklinde gözüken örnekler için DNA izolasyonu tekrarlanmıştır.

Örneklerin Nanodrop Spektrofotometre (ND-1000, Wilmington, USA) ile 260 ve 280nm dalga boyunda saflık ve miktar tayinleri yapılmıştır. OD sonuçlarından hesaplanan DNA miktarlarına göre DNA örnekleri PZR çalışmaları için µl'de 2,5 ng olacak şekilde distile su ile seyreltilmiştir.

2.5. PZR Çalışmaları

Çalışmada kullanılacak olan POGP primerleri ile PZR çalışmalarında net ve güvenilir bantlar elde edilebilmesi için başta rastgele seçilen birkaç çiftle PZR optimizasyonu yapılmıştır. Kullanılan POGP primerlerine ait bilgiler Tablo 2.3'de verilmiştir.

Tablo 2.3. Çalışmada kullanılan POX primer bilgileri

Primer adı	Baz dizisi
POX1F POX1R	5'-CTCGACCTACAAGGAC-3' 5'-ATGTAGGCGCTGGTGA-3'
POX2F POX2R	5'-CTCGACGTCAAGGACCTC-3' 5'-GCCCATCTTCACCATGG-3'
POX3F POX3R	5'-CAACGAGACCAACATCGA-3' 5'-CCTGATCTGTCCCTGCG-3'
POX4F POX4R	5'-TTACGCTACATACAATTTCAA-3' 5'-ACTCGACTGCGACCAG-3'
POX5F POX5R	5'-CACACGATCGGGGCGATC-3' 5'-AATCTGCCGGCAGAGCC-3'
POX6F POX6R	5'-TACCCGACGGTGAGC-3' 5'-CTTGATCGTACTGACTCTA-3'
POX7F POX7R	5'-CTCGACACAACCGATGTTG-3' 5'-TTCACAACTAGTCACAATCACA-3'
POX8F POX8Rb	5'-CACCATCAAGAGCGTCATAAC-3' 5'-TTGCTAGAGCGAGCTGG-3'
POX9F POX9R	5'-GGCGTCGGCGTCG-3' 5'-ATCGGGAAGCTTCCCCTC-3'
POX10Fa POX10Ra	5'-CCACGCCCTCATCGC-3' 5'-CATCTGGCCGTGCGTC-3'
POX11F POX11R	5'-CCTTCTTCTTGCCATCTTGC-3' 5'-CATATCGCTCCACGACCTTT-3'
POX12Fa POX12Ra	5'-CGAGCTGAGAGTGAATCGATC-3' 5'-CTTGAACGCCTGGATGAGC-3'
POX13F POX13R	5'-GACGGTTCTATTGGGAAGAAG-3' 5'-CATGAAAGTGATGAGATGGC-3'
POX14F POX14R	5'-CTCATCGTTAACGTGCGATC-3' 5'-GATGCAAGGAGTATAGTGCAAATG-3'

Optimizasyon için 3 çiftlik çeşidi (Yavuz, Neğiş, Kargı) seçilerek her bir primer

için PZR karışımına, birbirinden bağımsız olarak farklı oranlarda primer, MgCl₂, dNTP, enzim, kalıp miktarlarında değişiklikler yapılarak PZR'lar kurulmuştur. Denenen koşullara göre en uygun çıkan oranlarla 50 çeltik çeşidi için çalışmalara devam edilmiştir. PZR reaksiyonları 13 µl'lik toplam hacimde 15 ng kalıp DNA, 3,5 µM primer, 1X enzim tamponu, 1.5 µL MgCl₂ (25 mM'lık), 10 mM dNTP karışımı ve 1 U Taq polimeraz enzimi (Fermentas) olacak şekilde hazırlanmıştır.

Kullanılan POGP primerlerinin bağlanma sıcaklıkları (T_A) hesaplanırken şu formül kullanılmıştır:

$$T_A = (A+T\text{'lerin sayısı}) \times 2 + (G+C\text{'lerin sayısı}) \times 4 \text{ } ^\circ\text{C}$$

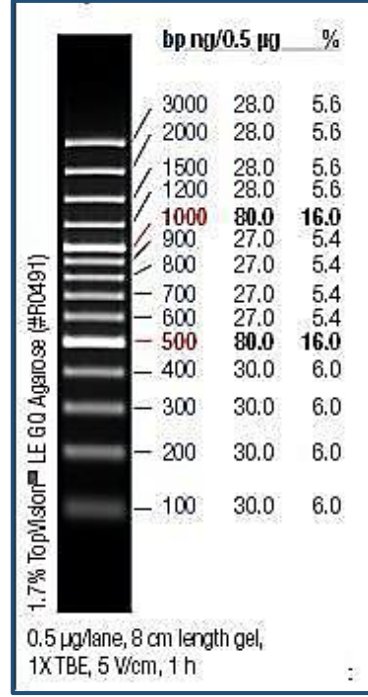
PZR amplifikasyonları Applied Biosystems Veriti gradient termal döngü cihazı (Applied Biosystems, CA, USA) ile gerçekleştirilmiştir. PZR döngü koşulları 94°C'de 4 dk başlangıç denatürasyon aşamasından sonra, 94°C'de 1 dk., 46-52°C'de 1 dk, 72°C'de 1 dk olmak üzere 40 döngü ve takiben 72°C'de 7 dk. son uzama aşamasını içermektedir (Tablo 2.4).

Tablo 2.4. PZR Prosedürü

	Sıcaklık(°C)	Süre	Döngü Sayısı
Öndenatürasyon	94	4 dk	1
Denatürasyon	94	1 dk	
Bağlanma	46-52	1 dk	40
Uzama	72	1 dk	
Son Uzama	72	7dk	1

PZR örnekleri jelde yürütülene kadar buzdolabında saklanmıştır.

PZR ürünlerinin ayrımı için yatay jel elektroforezi (Thermo, Midicell Promo) ile etidyum bromür (0.5µg/ml) içeren agaroz jeller kullanılmıştır. Bu % 1,4'lük agaroz jeller üzerinde, her bir kuyucuğa 8 µl örnek ile 1µl yükleme tamponu karıştırılarak yükleme yapılmış ve 0.5 X TBE tampon çözeltisi içerisinde beklenen bp büyüklüklerine göre 100 bp plus DNA ladder (Fermentas) (bkz. Şekil 2.1) ile birlikte koşturulmuştur (105 Volt, 120 dk).



Şekil 2.1. *Fermentas Gene Ruler 100* bç DNA ladder Plus

Agaroz jeller yürütme işleminden sonra Uvitec Biolab marka jel dökümantasyon sistemi (UVItec, Cambridge, UK) ile görüntülenmiş ve fotoğraflanmıştır.

2.6. Bant Okumaları ve Verilerin Değerlendirilmesi

Jel fotoğrafları Phoretix 1D Pro Software programında analiz edilerek her bir primer için bantlar 1 (bant var) ya da 0 (bant yok) şeklinde sayılıp excel dosyasına kaydedilmiştir. Bu veriler kullanılarak çeşitler arasındaki genetik benzerlik değerleri Dice eşitliği kullanılarak NTSYS-Pc.2.11 (Rohlf, 2000) 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 ve Temel Bileşen Analizini (PCA) gösteren üç boyutlu bir grafik elde edilmiştir.

Çalışmada kullanılan primerlerin “polimorfizm bilgi içeriği” (PIC) şu formül yardımı ile hesaplanmıştır:

$$PIC = 1 - \sum (p_{ij})^2 \text{ (Smith vd., 1997).}$$

Bu formülde pi ve pj, sırasıyla i. ve j. allellerin sıklığını göstermektedir.

Her bir primer kombinasyonu için “ayırma gücü” (Rp) ise aşağıdaki formülle hesaplanmıştır:

$$\text{Ayırma gücü (Rp)} = \sum \text{IB}$$

Bu formülde, IB ortalama bant bilgilendirme indeksini ifade eder ve

$$\text{IB} = 1 - [2x |(0,5 - P_i)|]$$

formülü ile hesaplanır. P_i , analiz edilen 50 çeltik çeşidinde ilgili aleli içerenlerin oranıdır (Prevost ve Wilkinson, 1999).

Çeşitlerin genetik yapısı ayrıca STRUCTURE v. 2.3.4 (Pritchard vd., 2000) yazılımı yardımıyla kümeleme teknikleri kullanılarak da incelenmiştir. STRUCTURE analizi ile hem karıştırma (admixture) modeli hem de örnekleme noktaları arasındaki ilintili alel frekansları hesaba katılarak çeltik genotiplerinin kaç adet gen havuzundan oluştuğu belirlenmiştir.

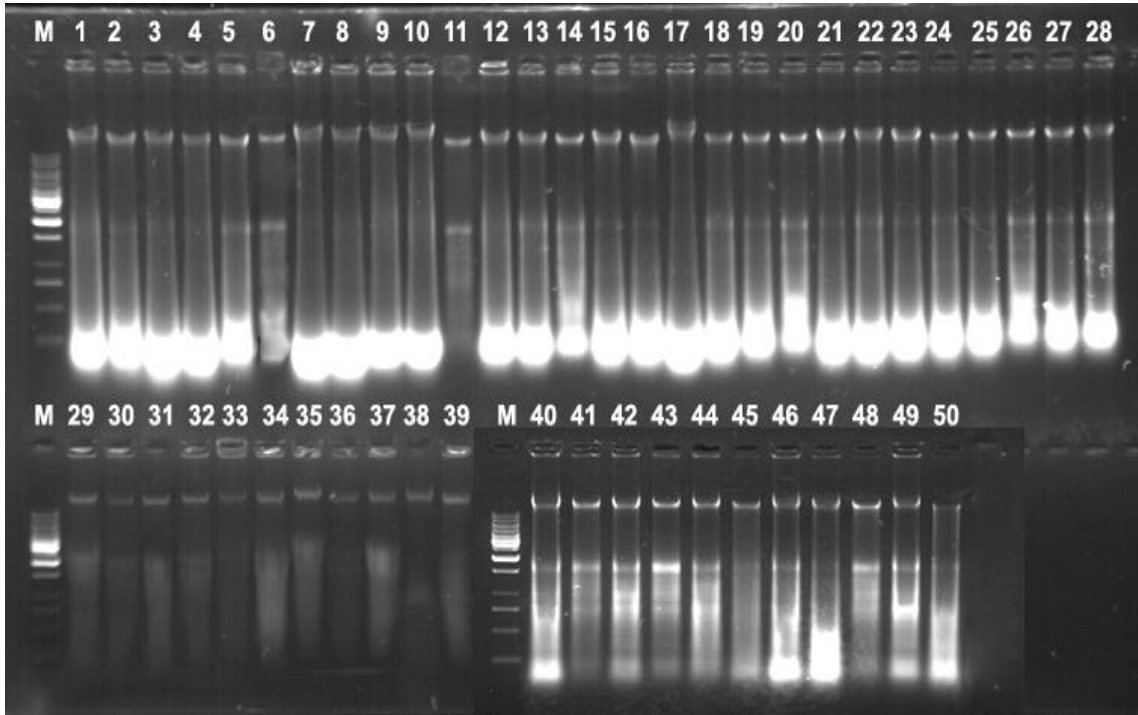
3. BULGULAR

3.1. Genomik DNA İzolasyonu

Genetik materyallerin kullanılacağı bütün çalışmalar için DNA'nın başarılı şekilde saflaştırılması gerekmektedir. Bu nedenle, bu çalışmada elimizdeki 50 çeltik (*Oryza sativa* L.) çeşidi her birinden 20-25 adet tohum olacak şekilde iklim kabininde (Sanyo, MLR-350H) çimlenmeye bırakılmıştır. Çimlenme sonrasında yaklaşık 15 cm boyuna erişen fidelerden genç yaprakları toplanmış ve 2X CTAB yöntemi ile genomik DNA izolasyonu başarılı şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.1.1. DNA'ların miktar ve saflık ölçümleri

DNA örneklerin miktar ve saflık tayinleri Nanodrop spektrofotometre cihazında 260-280nm dalga boylarında okunarak tespit edilmiştir. Miktar bakımından en düşük ve en yüksek değerler sırası ile 47,7 ng/μl (Aromatik-I) ve 1200,8 ng/μl (Şumnu) olarak elde edilmiştir. Ayrıca, DNA örnekleri % 0,8'lik agaroz jellerde yürütülerek kontrol edilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. 50 adet çeltik çeşidinin genomik DNA agaroz jel görüntüleri

İlk kontrollerden sonra saflığı kötü olan örnekler için yeniden DNA izolasyon protokolü uygulanmıştır. 50 adet çeltik çeşidinin DNA saflık ve miktar ölçümlerinin sonuçları Tablo 3.1.'de verilmiştir.

Tablo 3.1. Çeltik çeşitlerinin DNA miktar ve saflık değerleri

Çeşid adı	DNA miktarı (ng/µl)	Saflık (260/280nm)	Çeşid adı	DNA miktarı (ng/µl)	Saflık (260/280nm)
Ergene	228	1,96	Kızılırmak	381,4	2,06
Meriç	458,4	1,99	Mevlütbey	293,3	1,98
İpsala	466,9	2,04	Manyasyıldızı	323,6	2,04
Demir	442,7	1,95	Halilbey	452,3	1,95
Neğiş	488,4	1,76	Kızıltan	1255	1,98
Gönen	690,6	1,88	Tunca	682,1	1,67
Ece	464,4	1,86	Yavuz	204,2	2,07
Kırkpınar	938,3	1,94	Osmancık-97	547	2,01
Şumnu	1200,8	2,04	Sürek-95	762,5	1,91
Beşer	799,1	2,13	Serhat-92	576,2	1,90
Aromatik-1	47,7	1,80	Bafrayıldızı	402,1	1,95
Gala	1073,1	1,99	Kıral	690,1	2,02
Hamzadere	397	2,04	Altınyazı	312,8	1,89
Çakmak	279	2,06	Trakya	298	1,91
Paşalı	586,8	2,09	Edirne	534,1	2,06
Mis-2013	990,6	1,90	Durağan	624,6	2,01
Kale	440,8	2,01	Efe	344,2	1,97
Yatkin	970,9	1,95	Tosyagüneşi	993,1	1,87
Sürek-M711	790,9	1,89	Bigaincisi	465	1,83
IMI-2521	265,3	1,91	Küplü	504,5	2,02
IMI-2554	1026,8	1,84	Kargı	257,6	1,78
Akçeltik	123,1	2,02	Baldo	312,9	2,08
Sarıçeltik	607,4	2,26	Balilla	589,2	1,87
Karacadağ	560,7	2,06	Rocca	258,7	2,01
Karadeniz	317,7	1,84	Veneria	749,2	1,94

3.2. PZR Optimizasyonu

PZR çalışmalarında kullanılacak olan primerlerin net ve güvenilir bantlar vermesi için PZR miktar ve reaksiyon koşullarının optimum değerlerinin bulunması gereklidir. POGP primerleriyle optimizasyon çalışmaları için denenen koşullar ve optimum koşullar Tablo 3.2'de verilmiştir.

Tablo 3.2. POGP primerleri için elde edilen optimum çalışma koşulları

PZR parametreleri	Test edilen değerler	Optimum şartlar
DNA kalıp miktarı (ng)	5, 10, 12,5, 15, 20	15 ng
Magnezyum klorür 25mM'lık (µL)	1,5, 2, 2,5	1,5 µL
dNTP karışımı (mM)	5, 6, 10	10 mM
Primer konsantrasyonu (µM)	2,5, 3, 3,5	3,5 µM
Bağlanma sıcaklığı (°C)	36-59	46-52 arasında

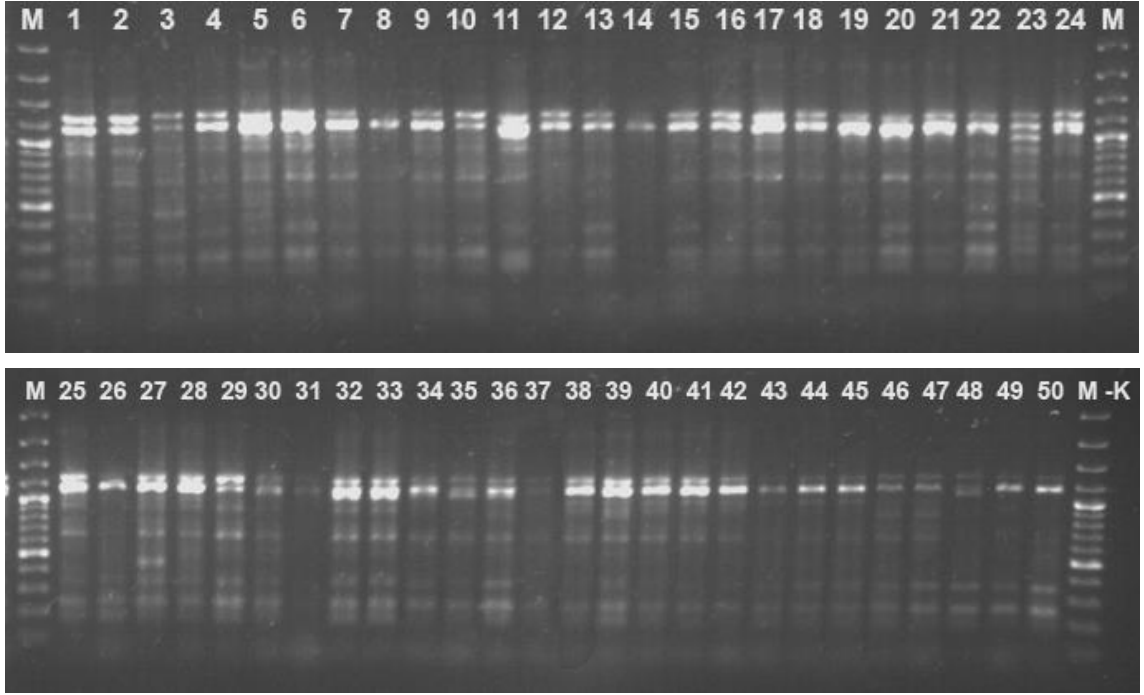
Optimizasyon için ilk aşamada rastgele olarak 3 çeltik çeşidi (Yavuz, Neğış, Kargı) seçilerek her bir primer için PZR karışımına, birbirinden bağımsız olarak farklı oranlarda primer, MgCl₂, dNTP, enzim, kalıp miktarlarında değişiklikler yapılarak PZR'lar kurulmuştur.

Elimizdeki bütün çeltik çeşitleri ile PZR çalışmalarına geçmeden önce 3 çeşit ile yapılan PZR'larda denenen farklı parametreler arasından en iyi şartlar; kalıp DNA için 15 ng, 25 mM'lık magnezyum klorür (MgCl₂) için 1.5 µL, dNTP karışımından 10 mM ve primer konsantrasyonundan ise ileri ve geri toplam 3,5 µM kullanılarak elde edilen sonuçlar olmuştur. Primerlerin bağlanma sıcaklığı her biri için hesaplanan değerlerden farklı olarak da denenmiş (36 °C ile 59 °C arasında) en iyi bağlanma sıcaklıkları 46 °C ile 52 °C arasında değişkenlik göstermiştir. Optimizasyon çalışmaları sonucunda 14 adet POGP primerinden POX2 hariç geri kalan bütün primerlerle net ve güvenilir bantlar elde edilmiştir. Böylece, 13 adet POGP primeri sonraki PZR çalışmalarında kullanılmak üzere belirlenmiştir.

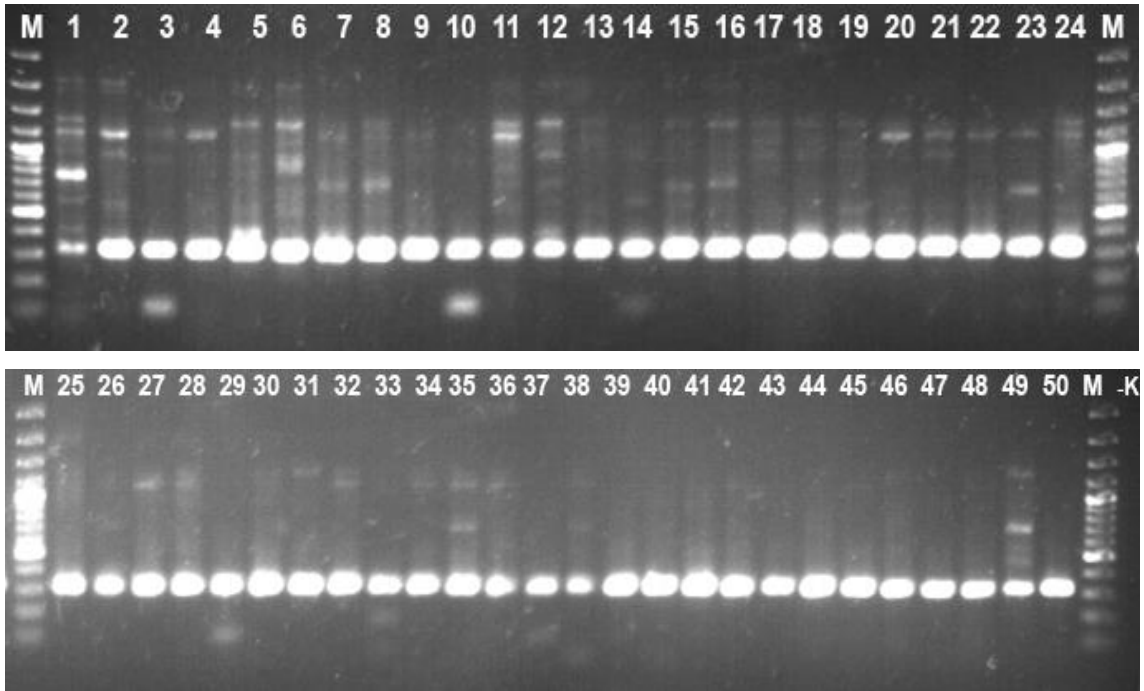
3.3. PZR çalışmaları sonucu POGP primerlerinin Agaroz jel görüntüleri

50 adet çeltik çeşidiyle POGP primerleriyle gerçekleştirilen PZR reaksiyonlarının jel görüntüleri ise Şekil 3.2-3.14'de verilmiştir (bütün jeller için M; 100bç DNA ladder plus, -K; negatif kontrolü temsil etmektedir). Tüm agaroz jelllerde PZR ürünleri aynı sıra ile yüklenmiştir:

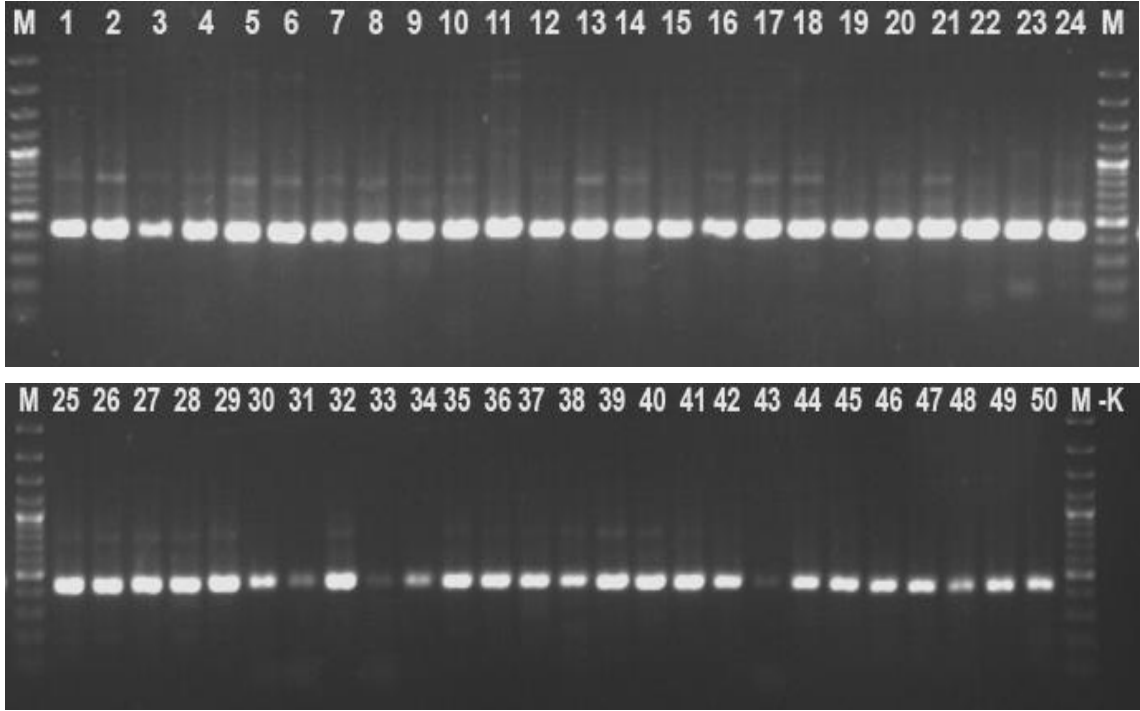
1- Ergene, 2- Meriç, 3- İpsala, 4- Demir, 5- Neğış, 6- Gönen, 7- Ece, 8- Kırkpınar, 9- Şumnu, 10- Beşer, 11- Aromatik-1, 12- Gala, 13- Hamzadere, 14- Çakmak, 15- Paşalı, 16- Mis-2013, 17- Kale, 18- Yatkın, 19- Sürek-M711, 20- IMI-2521, 21- IMI-2554, 22- Akçeltik, 23- Sarıçeltik, 24- Karacadağ, 25- Karadeniz, 26- Kızılırmak, 27- Mevlütbey, 28- Manyasyıldızı, 29- Halilbey, 30- Kızıltan, 31- Tunca, 32- Yavuz, 33- Osmancık-97, 34- Sürek-95, 35- Serhat-92, 36- Bafrayıldızı, 37- Kıral, 38- Altinyazı, 39-Trakya, 40- Edirne, 41- Durağan, 42- Efe, 43- Tosyagüneşi, 44- Bigaincisi, 45- Küplü, 46- Kargı, 47- Baldo, 48- Balilla, 49- Rocca, 50- Veneria.



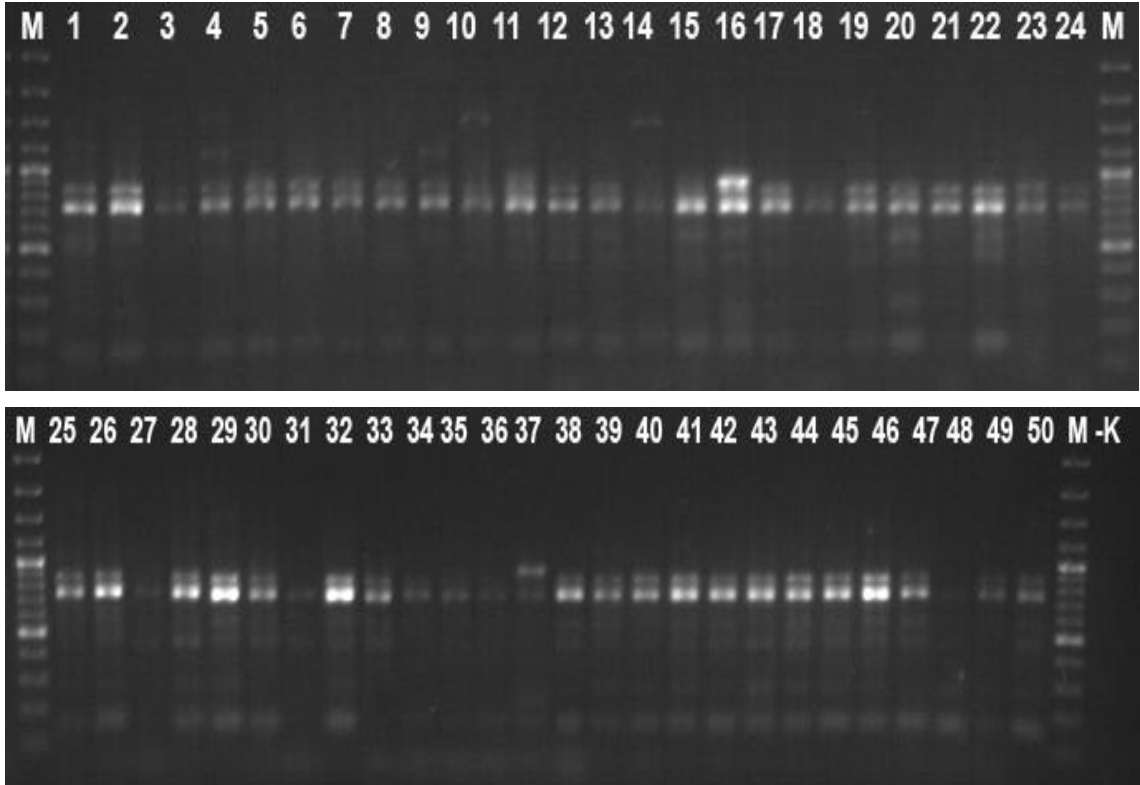
Şekil 3.2. *POX1F/POX1R primer kombinasyonu ile oluşturulan bant profilleri*



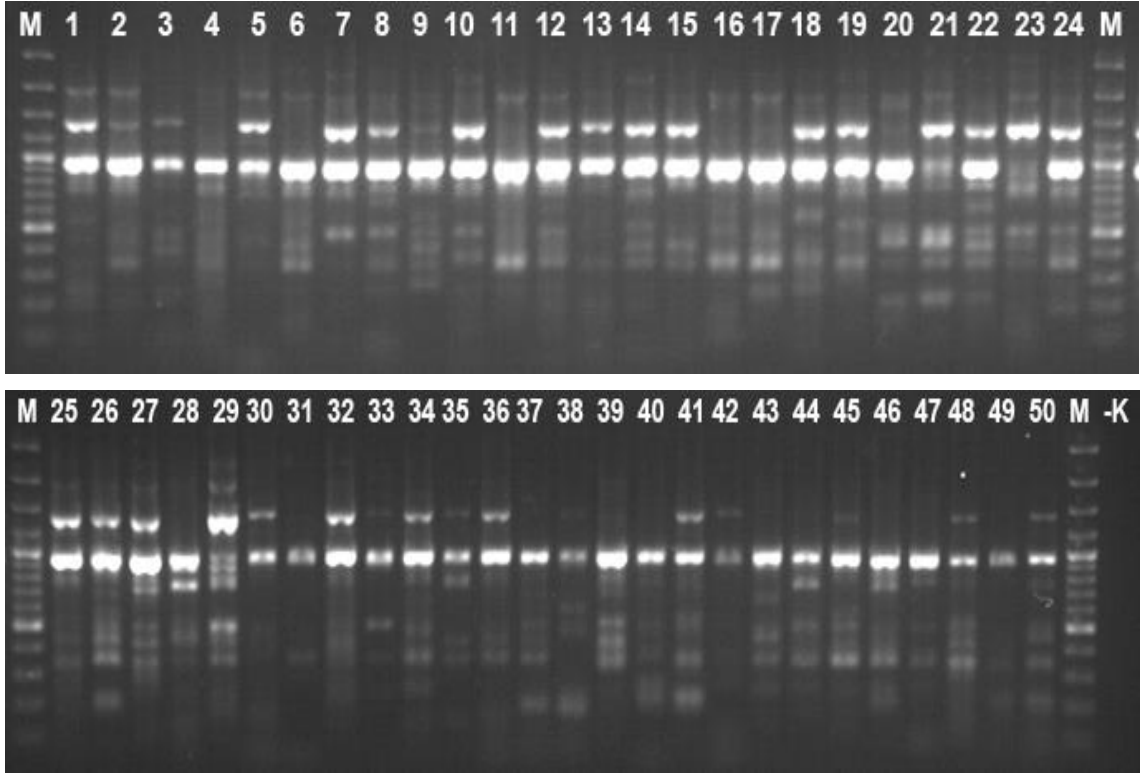
Şekil 3.3. *POX3F/POX3R primer kombinasyonu ile oluşturulan bant profilleri*



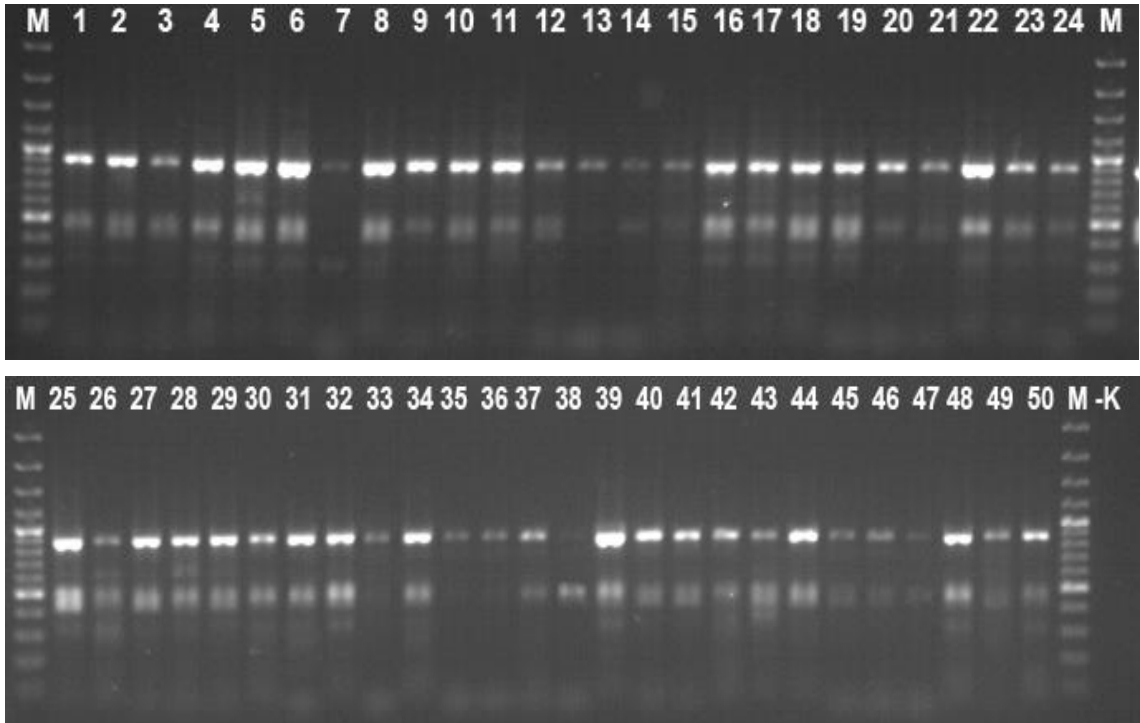
Şekil 3.4. *POX4F/POX4R primer kombinasyonu ile oluşturulan bant profilleri*



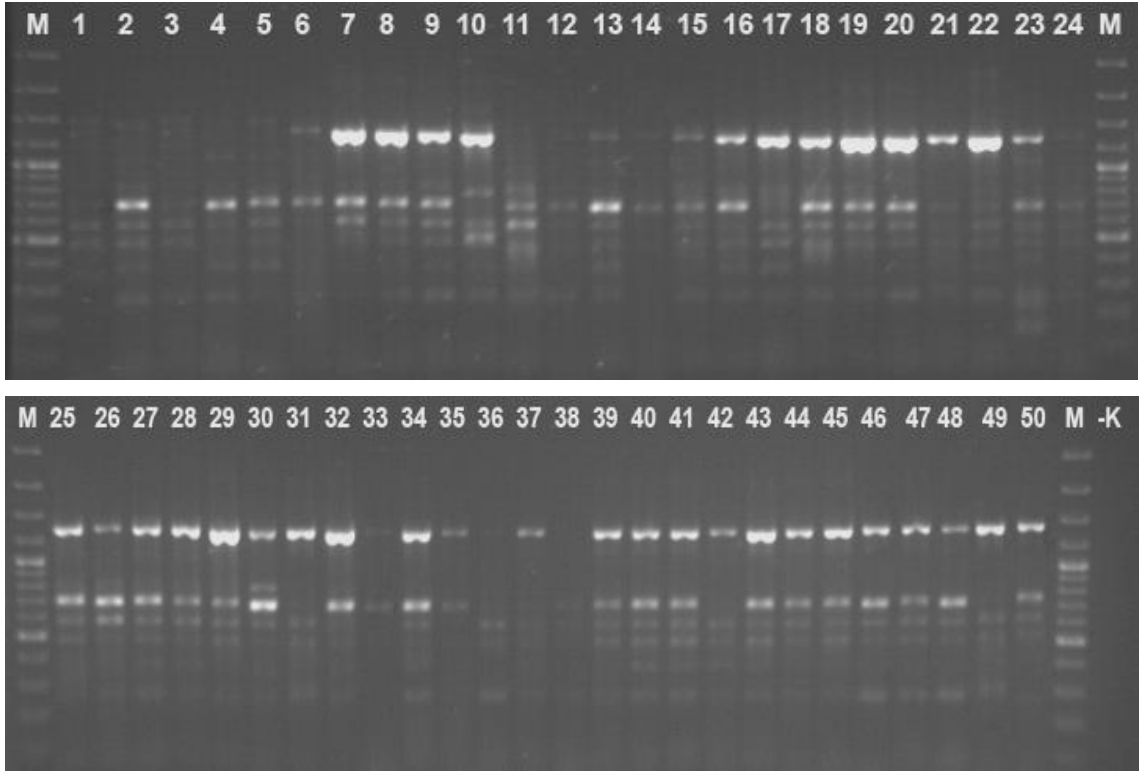
Şekil 3.5. *POX5F/POX5R primer kombinasyonu ile oluşturulan bant profilleri*



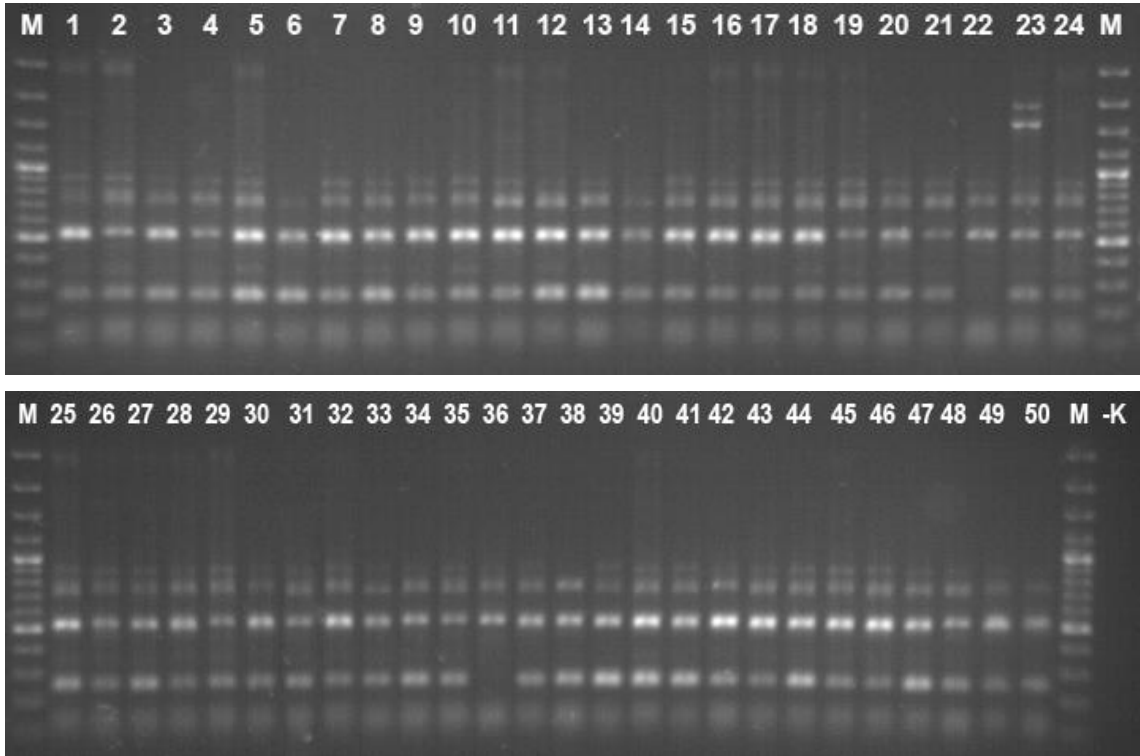
Şekil 3.6. *POX6F/POX6R primer kombinasyonu ile oluşturulan bant profilleri*



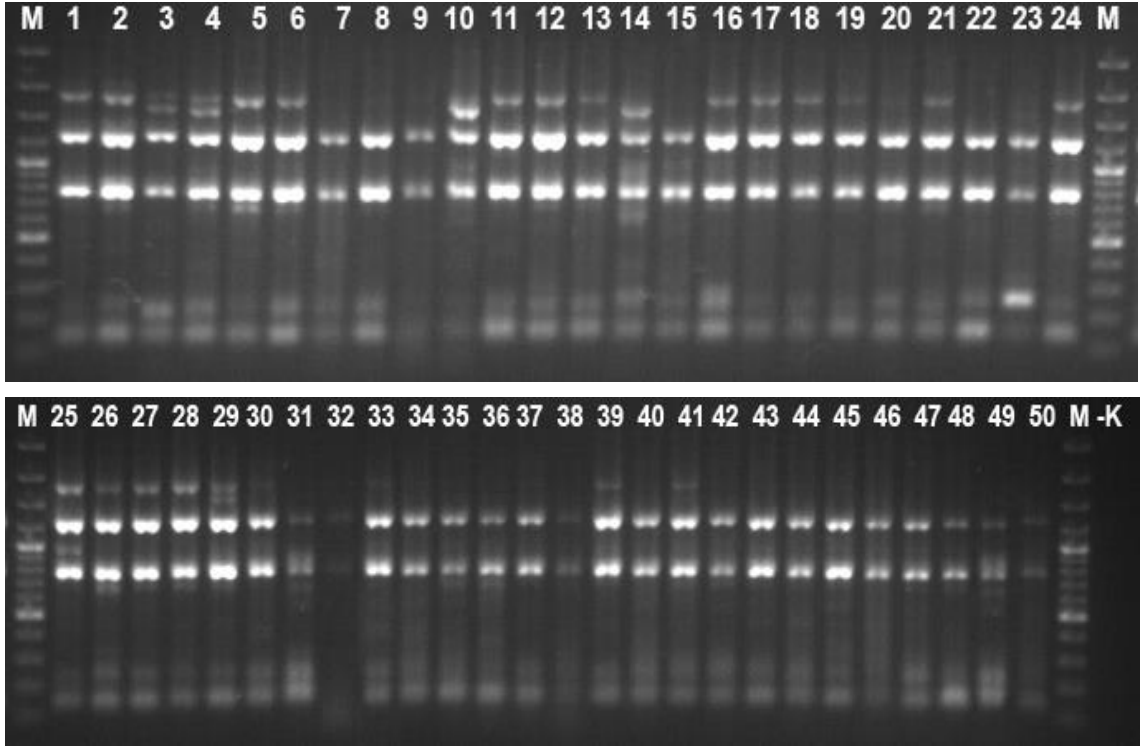
Şekil 3.7. *POX7F/POX7R primer kombinasyonu ile oluşturulan bant profilleri*



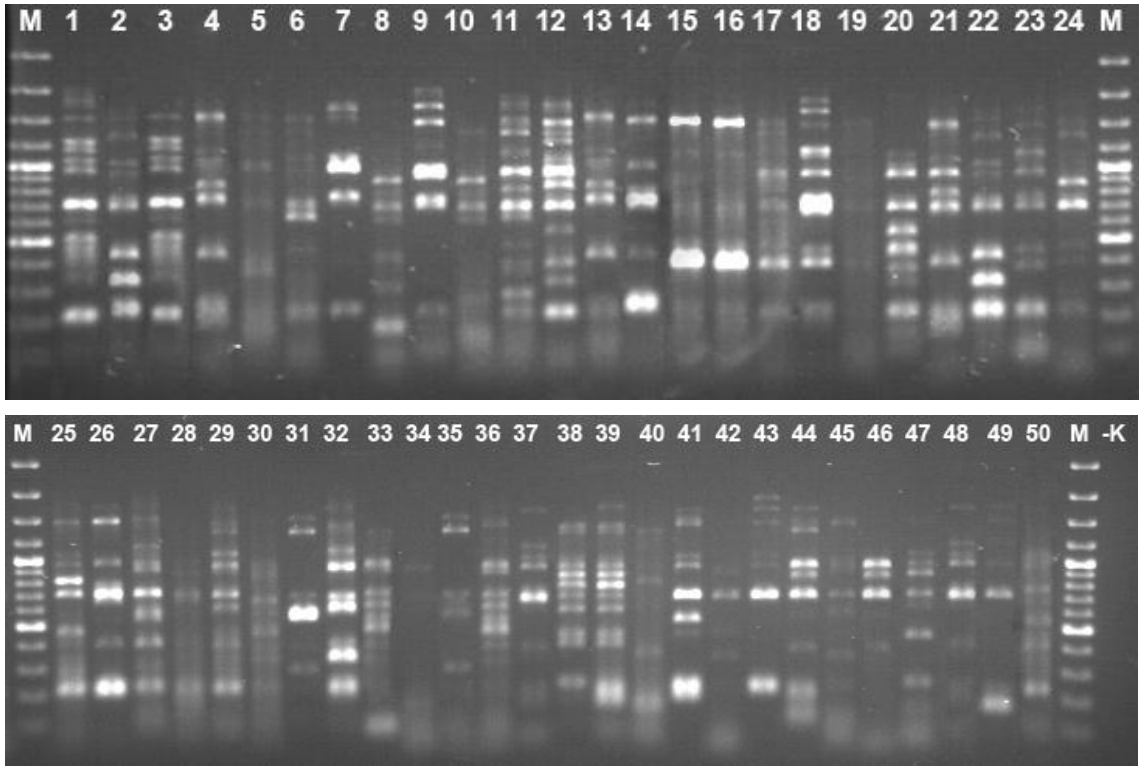
Şekil 3.8. *POX8F/POX8Rb primer kombinasyonu ile oluşturulan bant profilleri*



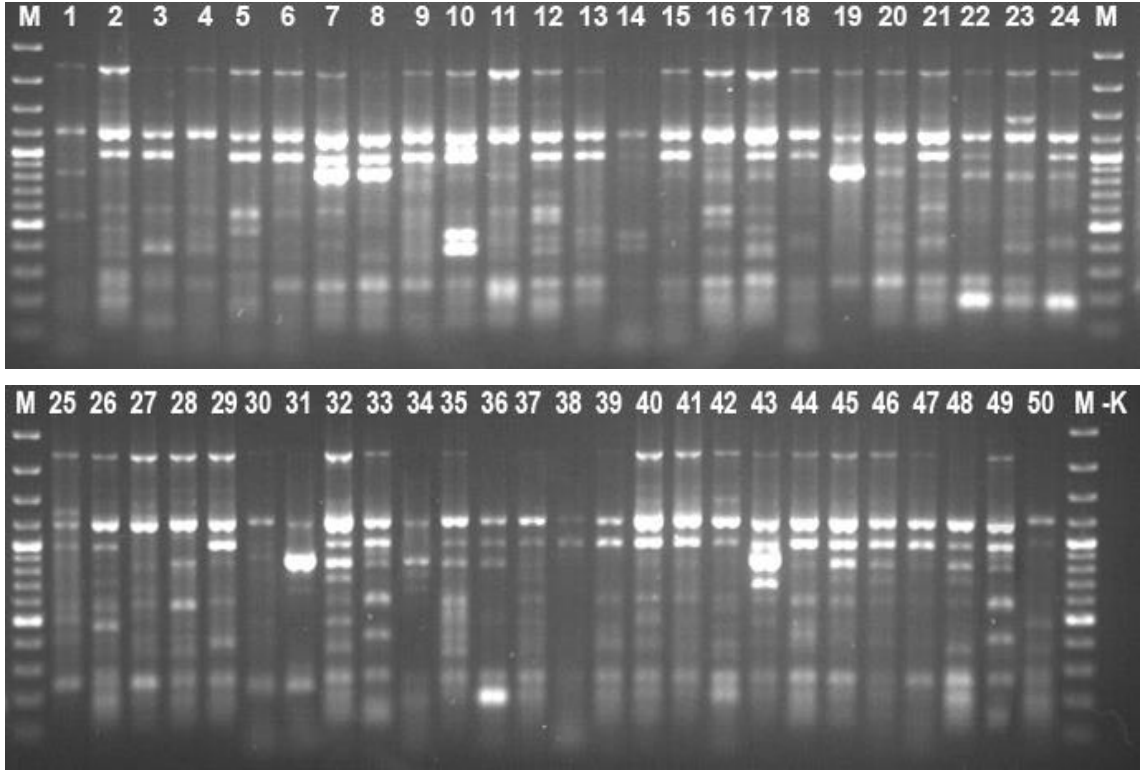
Şekil 3.9. *POX9F/POX9R primer kombinasyonu ile oluşturulan bant profilleri*



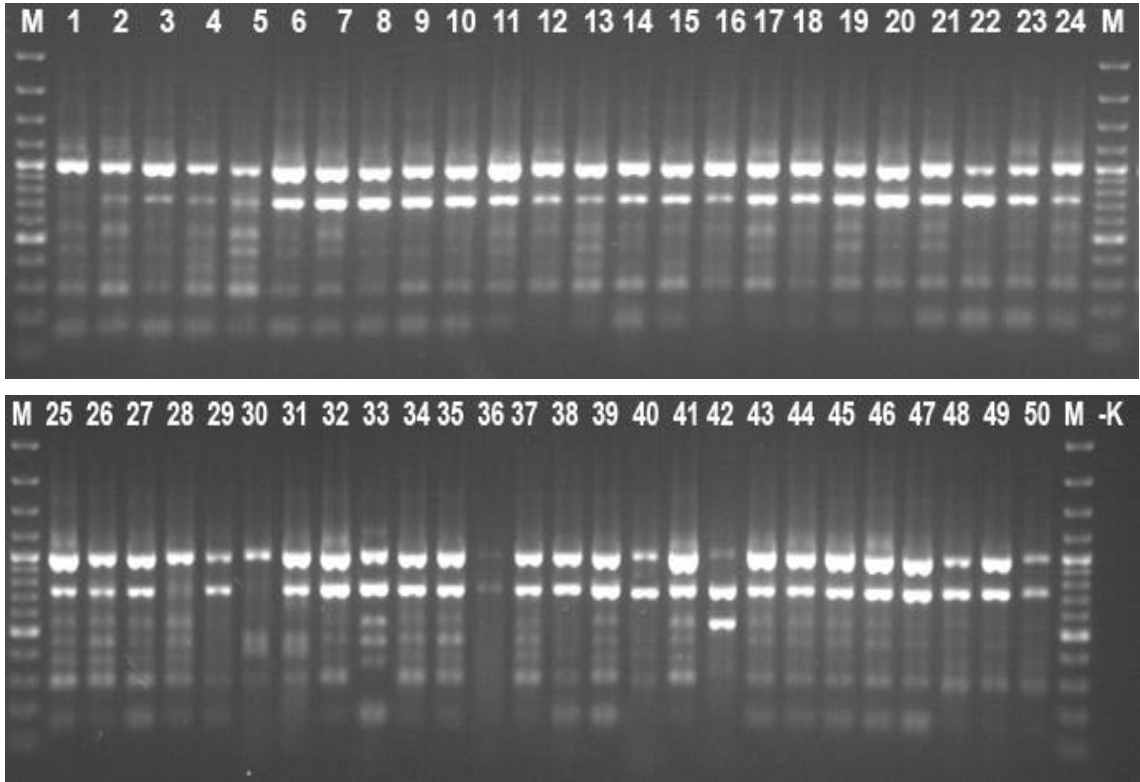
Şekil 3.10. *POX10Fa/POX10Ra primer kombinasyonu ile oluşturulan bant profilleri*



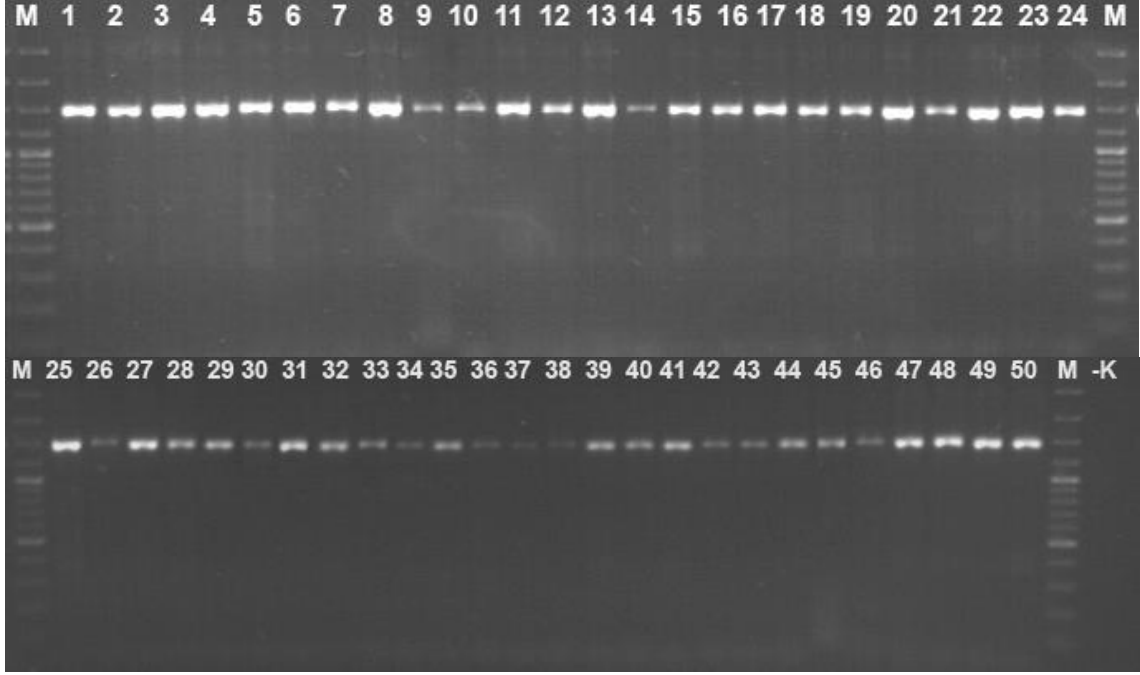
Şekil 3.11. *POX11F/POX11R primer kombinasyonu ile oluşturulan bant profilleri*



Şekil 3.12. *POX12Fa/POX12Ra primer kombinasyonu ile oluşturulan bant profilleri*



Şekil 3.13. *POX13F/POX13R primer kombinasyonu ile oluşturulan bant profilleri*



Şekil 3.14. *POX14F/POX14R primer kombinasyonu ile oluşturulan bant profilleri*

3.4. POGP analizlerinin değerlendirilmesi

13 adet ileri ve 13 adet geri POGP primeri kullanılarak elde edilen bantlar Phoretix 1D Pro Software yardımıyla var (1) ya da yok (0) şeklinde değerlendirilmiş ve analizler için kullanılacak veri dosyaları hazırlanmıştır. En fazla bant 22 bant ile POX11F/POX11R primerinde, en az bant ise 1 monomorfik bant (1500 bç boyutunda) ile POX14F/POX14R primerinde tespit edilmiştir. Bütün primerler dikkate alındığında bantların büyüklükleri 150 (POX5F/POX5R) ile 2500 bç (POX12Fa/POX12FR) arasında değişmektedir. Fakat bantlar en çok 300 ile 1000 bç arasında bulunmaktadır. Primer başına ortalama bant sayısı ise 12,3'tür.

Kullanılan 13 adet ileri ve 13 adet geri POGP primerinden toplam 160 bant oluşturmuştur. En fazla bant 22 bant ile POX11F/POX11R primerinde, en az bant ise 1 monomorfik bant (1500 bç boyutunda) ile POX14F/POX14R primerinde tespit edilmiştir. POGPENE 1.31 ve GenAlex programları ile polimorfik ve monomorfik bant sayı ve yüzdelerinin hesaplandığında; POGP primerleri ile elde edilen 160 adet bantın 14 tanesinin monomorfik, kalan 146 bant ise polimorfik olduğu tespit edilmiştir. Bunu yüzde olarak hesapladığımızda bantların % 8,75'i monomorfik, kalan % 91,25'i ise polimorfiktir. Çalışılan primerlerden POX14F/POX14R hariç hepsinde polimorfizm gözlenmiştir.

Tablo 3.3'de primerlerin oluşturduğu bant sayıları ve polimorfik monomorfik durumları, yaklaşık en küçük ve en büyük bant büyüklükleri ile polimorfik bantların yüzdeleri verilmiştir.

Tablo 3.3. POGP analizi sonucu oluşan bant özellikleri

Primer Kombinasyonu	T _A (°C)	Bant (Bç)	T _b	M _b	PIC	R _p	PPB (%)
POX1F POX1R	46	180-1400	16	1	0,679	5,947	93,75
POX3F POX3R	47	300-2200	15	1	0,841	4,056	93,3
POX4F POX4R	47	450-800	12	1	0,877	1,802	91,6
POX5F POX5R	47	150-1500	11	1	0,753	3,304	90,9
POX6F POX6R	50	200-2200	13	1	0,729	5,036	92,3
POX7F POX7R	47	300-900	8	1	0,741	1,552	87,5
POX8F POX8Rb	50	200-1400	13	1	0,704	4,310	92,3
POX9F POX9R	50	250-2000	11	1	0,664	1,181	90,9
POX10Fa POX10Ra	50	150-2000	12	2	0,653	2,763	83,3
POX11F POX11R	52	200-2100	22	-	0,849	8,585	100
POX12Fa POX12Ra	50	200-2500	17	1	0,659	7,282	94,1
POX13F POX13R	47	300-1200	9	2	0,448	3,734	77,7
POX14F POX14R	52	1500	1	1	0	0	0
Toplam			160	14	Ort.: 0,716	49,552 (Ort.; 3,811)	91,25

T_A: Bağlanma sıcaklığı, T_b: Toplam bant, M_b: Monomorfik bant, Bç: Baz çifti büyüklüğü, PPB: Polimorfik bant sayısı, PIC: Polimorfizm bilgi içeriği, R_p: Ayırma gücü

Bu veriler kullanılarak çeşitler arasındaki genetik benzerlik değerleri Dice eşitliği kullanılarak NTSYS-Pc.2.11 (Rohlf, 2000) 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. Bu eşitliğe göre oluşturulmuş olan UPGMA dendrogramında çeltik çeşitleri 0,60 ile 0,84 benzerlik katsayıları arasında kümelenmeler göstermiştir.

Tablo 3.4. Çeltik çeşitleri arasında genetik benzerlik (üst matris) ve genetik uzaklık (alt matris) değerleri

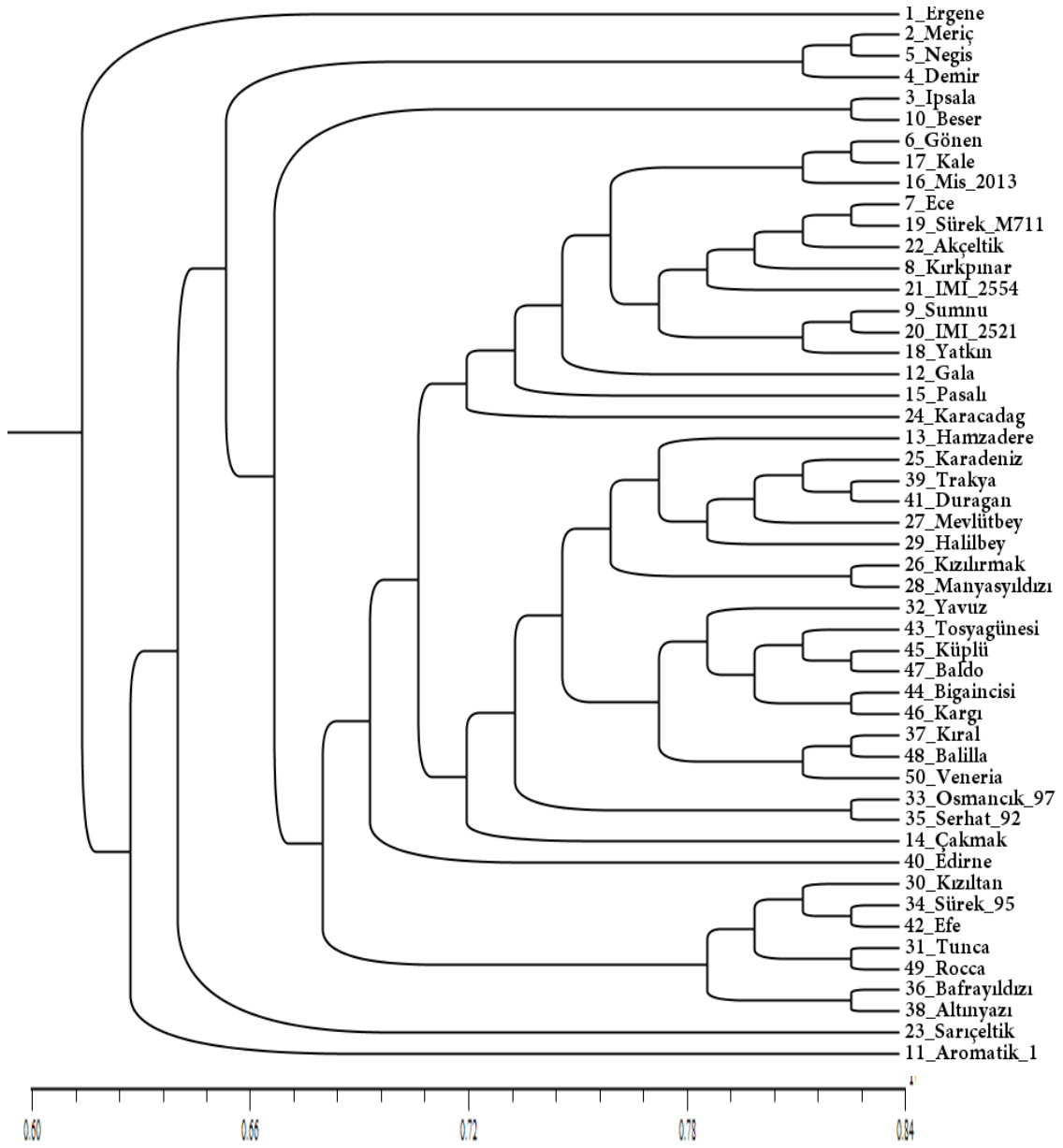
No	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1	****	0,7375	0,7312	0,6188	0,6750	0,7063	0,6875	0,7188	0,7375	0,6312	0,6500	0,6375	0,6438	0,6000	0,6438	0,6687
2	0,3045	****	0,7562	0,7188	0,7750	0,7562	0,7250	0,7312	0,7750	0,6687	0,7000	0,7250	0,7188	0,6625	0,7188	0,7562
3	0,3130	0,2794	****	0,7000	0,7188	0,7625	0,6813	0,7500	0,7438	0,7625	0,6687	0,6813	0,6875	0,7063	0,7125	0,7250
4	0,4801	0,3302	0,3567	****	0,7188	0,7375	0,7438	0,7125	0,6937	0,6750	0,6937	0,6813	0,7625	0,7188	0,6750	0,7500
5	0,3930	0,2549	0,3302	0,3302	****	0,7312	0,7375	0,7438	0,7250	0,7063	0,6750	0,7250	0,7438	0,7000	0,7312	0,7688
6	0,3478	0,2794	0,2712	0,3045	0,3130	****	0,7688	0,7875	0,7937	0,7750	0,7438	0,7688	0,7375	0,7562	0,7500	0,7750
7	0,3747	0,3216	0,3838	0,2961	0,3045	0,2630	****	0,8187	0,7750	0,7562	0,7125	0,8125	0,8313	0,8125	0,7812	0,7812
8	0,3302	0,3130	0,2877	0,3390	0,2961	0,2389	0,2000	****	0,8313	0,8125	0,7188	0,7937	0,7500	0,7438	0,7500	0,7750
9	0,3045	0,2549	0,2961	0,3656	0,3216	0,2310	0,2549	0,1848	****	0,7438	0,7250	0,7250	0,7188	0,7250	0,7438	0,7688
10	0,4601	0,4023	0,2712	0,3930	0,3478	0,2549	0,2794	0,2076	0,2961	****	0,7562	0,7438	0,6875	0,7562	0,7000	0,7375
11	0,4308	0,3567	0,4023	0,3656	0,3930	0,2961	0,3390	0,3302	0,3216	0,2794	****	0,7000	0,6687	0,6500	0,6813	0,7438
12	0,4502	0,3216	0,3838	0,3838	0,3216	0,2630	0,2076	0,2310	0,3216	0,2961	0,3567	****	0,7438	0,7250	0,7438	0,7688
13	0,4404	0,3302	0,3747	0,2712	0,2961	0,3045	0,1848	0,2877	0,3302	0,3747	0,4023	0,2961	****	0,7562	0,7625	0,7625
14	0,5108	0,4117	0,3478	0,3302	0,3567	0,2794	0,2076	0,2961	0,3216	0,2794	0,4308	0,3216	0,2794	****	0,7312	0,7188
15	0,4404	0,3302	0,3390	0,3930	0,3130	0,2877	0,2469	0,2877	0,2961	0,3567	0,3838	0,2961	0,2712	0,3130	****	0,7500
16	0,4023	0,2794	0,3216	0,2877	0,2630	0,2549	0,2469	0,2549	0,2630	0,3045	0,2961	0,2630	0,2712	0,3302	0,2877	****
17	0,2877	0,2712	0,3130	0,3302	0,2389	0,2000	0,2549	0,2154	0,2549	0,2630	0,3045	0,2549	0,2630	0,3567	0,2794	0,2000
18	0,3930	0,3045	0,3478	0,3130	0,3045	0,2154	0,2076	0,2000	0,2076	0,2794	0,2877	0,2389	0,2794	0,2877	0,2000	0,2154
19	0,3567	0,2877	0,2961	0,2961	0,3216	0,2154	0,1625	0,1699	0,2389	0,2469	0,2389	0,2231	0,2794	0,2712	0,2310	0,2154
20	0,4308	0,2549	0,2630	0,3656	0,3216	0,2469	0,2549	0,2961	0,1773	0,3130	0,3390	0,3216	0,2630	0,3045	0,2310	0,2794
21	0,3656	0,2469	0,2549	0,3045	0,2961	0,2076	0,2000	0,2231	0,2794	0,3216	0,3130	0,2961	0,2231	0,2630	0,2389	0,2549
22	0,3567	0,2877	0,3130	0,3838	0,3747	0,3130	0,1625	0,2310	0,2076	0,2961	0,3747	0,2389	0,2630	0,3045	0,2794	0,2794
23	0,4404	0,3478	0,3390	0,3747	0,3656	0,2877	0,3130	0,2877	0,2630	0,3390	0,4212	0,3130	0,3930	0,3656	0,3930	0,2877
24	0,3656	0,3130	0,3390	0,3747	0,3838	0,3045	0,2469	0,2549	0,2961	0,3390	0,3656	0,2630	0,3390	0,3130	0,3390	0,2877
25	0,4023	0,3478	0,3045	0,2549	0,3656	0,2549	0,2630	0,2877	0,3130	0,3567	0,3838	0,3478	0,2549	0,2961	0,2877	0,3567
26	0,4700	0,3045	0,3656	0,3838	0,3747	0,3656	0,2076	0,3130	0,3390	0,4404	0,4117	0,3747	0,2794	0,2549	0,2961	0,3656
27	0,3930	0,3216	0,3478	0,2961	0,3567	0,3130	0,2231	0,2310	0,2712	0,3302	0,3930	0,2712	0,2469	0,3045	0,2961	0,3656
28	0,5108	0,2877	0,4023	0,2794	0,2549	0,2630	0,2389	0,2794	0,3390	0,3656	0,3747	0,3045	0,2310	0,2549	0,3302	0,2961
29	0,4902	0,3747	0,4023	0,3130	0,3567	0,3302	0,2076	0,2310	0,3216	0,2630	0,3747	0,3045	0,2630	0,2549	0,3302	0,3130
30	0,4308	0,3747	0,2794	0,4404	0,3390	0,3130	0,3045	0,2469	0,2549	0,2630	0,3567	0,3216	0,2961	0,3216	0,2794	0,2794
31	0,4308	0,4700	0,3838	0,4212	0,4117	0,3478	0,3216	0,2961	0,3747	0,2961	0,4117	0,3045	0,3302	0,3045	0,2961	0,3838
32	0,3390	0,3216	0,2469	0,3838	0,3216	0,2469	0,2549	0,2469	0,2231	0,2961	0,3390	0,3567	0,2630	0,3216	0,2469	0,2961
33	0,4601	0,4023	0,3747	0,3930	0,3838	0,3567	0,2469	0,2877	0,3838	0,3390	0,4212	0,3478	0,3045	0,3478	0,3045	0,3747
34	0,3656	0,3302	0,2877	0,3930	0,3478	0,2549	0,2794	0,2712	0,3130	0,3390	0,3838	0,2961	0,2712	0,3478	0,2389	0,3390
35	0,5005	0,4404	0,3216	0,3390	0,3838	0,3216	0,2630	0,2712	0,3302	0,2549	0,4212	0,3302	0,3045	0,2961	0,3045	0,3747
36	0,4601	0,4212	0,3747	0,4117	0,4212	0,3390	0,2794	0,2877	0,3478	0,3930	0,4801	0,4404	0,2712	0,3478	0,3216	0,3390
37	0,4308	0,3567	0,3838	0,3478	0,4117	0,3302	0,2389	0,2961	0,3045	0,3838	0,4502	0,3390	0,2630	0,2877	0,3130	0,3302
38	0,4212	0,4023	0,3567	0,3567	0,3838	0,3216	0,2154	0,3045	0,3130	0,3390	0,4404	0,3478	0,2877	0,2794	0,2877	0,3930
39	0,3838	0,3130	0,2877	0,2712	0,3130	0,2712	0,2154	0,2076	0,2310	0,2877	0,3302	0,3130	0,2076	0,2630	0,3216	0,2712
40	0,4601	0,3656	0,3930	0,3930	0,3302	0,3930	0,2961	0,2549	0,3130	0,3747	0,4404	0,2630	0,2877	0,3838	0,3216	0,2549
41	0,3747	0,3390	0,2961	0,2794	0,3390	0,3130	0,1625	0,2961	0,2549	0,3656	0,3747	0,3390	0,2000	0,2231	0,3130	0,2961
42	0,4502	0,3747	0,3478	0,4404	0,3567	0,3478	0,2549	0,2961	0,3216	0,3478	0,4308	0,2712	0,2961	0,4117	0,2630	0,3302
43	0,4117	0,3567	0,2961	0,3838	0,3747	0,3130	0,2389	0,3302	0,2877	0,3838	0,3390	0,3390	0,2961	0,3045	0,2961	0,3478
44	0,3656	0,3478	0,3390	0,4502	0,3130	0,3216	0,2000	0,2549	0,3130	0,2877	0,3656	0,2794	0,2549	0,2961	0,2389	0,3045
45	0,4212	0,3478	0,3216	0,3747	0,3302	0,3045	0,2310	0,2877	0,2469	0,3390	0,4601	0,3478	0,2231	0,3130	0,2549	0,3390
46	0,4404	0,3478	0,3567	0,4117	0,3302	0,2877	0,2794	0,2712	0,3302	0,3045	0,3838	0,2961	0,3045	0,2961	0,2389	0,3216
47	0,4117	0,3747	0,2961	0,3478	0,3045	0,2154	0,2231	0,2630	0,2712	0,2794	0,3216	0,3216	0,2630	0,2389	0,2000	0,2794
48	0,4308	0,3567	0,3838	0,3478	0,3567	0,3130	0,2549	0,2961	0,2877	0,3130	0,3567	0,3045	0,3130	0,2877	0,2961	0,3302
49	0,4117	0,3930	0,3302	0,4212	0,3216	0,3130	0,2877	0,2630	0,3390	0,3478	0,3747	0,3216	0,2961	0,3216	0,2961	0,2961
50	0,4404	0,3838	0,3390	0,3747	0,3838	0,3747	0,2630	0,3390	0,3478	0,3930	0,5005	0,3302	0,3045	0,3130	0,3390	0,3216

Tablo 3.4. (Devam) Çeltik çeşitleri arasında genetik benzerlik (üst matris) ve genetik uzaklık (alt matris) değerleri

17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33
0,7500	0,6750	0,7000	0,6500	0,6937	0,7000	0,6438	0,6937	0,6687	0,6250	0,6750	0,6000	0,6125	0,6500	0,6500	0,7125	0,6312
0,7625	0,7375	0,7500	0,7750	0,7812	0,7500	0,7063	0,7312	0,7063	0,7375	0,7250	0,7500	0,6875	0,6875	0,6250	0,7250	0,6687
0,7312	0,7063	0,7438	0,7688	0,7750	0,7312	0,7125	0,7125	0,7375	0,6937	0,7063	0,6687	0,6687	0,7562	0,6813	0,7812	0,6875
0,7188	0,7312	0,7438	0,6937	0,7375	0,6813	0,6875	0,6875	0,7750	0,6813	0,7438	0,7562	0,7312	0,6438	0,6562	0,6813	0,6750
0,7875	0,7375	0,7250	0,7250	0,7438	0,6875	0,6937	0,6813	0,6937	0,6875	0,7000	0,7750	0,7000	0,7125	0,6625	0,7250	0,6813
0,8187	0,8063	0,8063	0,7812	0,8125	0,7312	0,7500	0,7375	0,7750	0,6937	0,7312	0,7688	0,7188	0,7312	0,7063	0,7812	0,7000
0,7750	0,8125	0,8500	0,7750	0,8187	0,8500	0,7312	0,7812	0,7688	0,8125	0,8000	0,7875	0,8125	0,7375	0,7250	0,7750	0,7812
0,8063	0,8187	0,8438	0,7438	0,8000	0,7937	0,7500	0,7750	0,7500	0,7312	0,7937	0,7562	0,7937	0,7812	0,7438	0,7812	0,7500
0,7750	0,8125	0,7875	0,8375	0,7562	0,8125	0,7688	0,7438	0,7312	0,7125	0,7625	0,7125	0,7250	0,7750	0,6875	0,8000	0,6813
0,7688	0,7562	0,7812	0,7312	0,7250	0,7438	0,7125	0,7125	0,7000	0,6438	0,7188	0,6937	0,7688	0,7688	0,7438	0,7438	0,7125
0,7375	0,7500	0,7875	0,7125	0,7312	0,6875	0,6562	0,6937	0,6813	0,6625	0,6750	0,6875	0,6875	0,7000	0,6625	0,7125	0,6562
0,7750	0,7875	0,8000	0,7250	0,7438	0,7875	0,7312	0,7688	0,7063	0,6875	0,7625	0,7375	0,7375	0,7250	0,7375	0,7000	0,7063
0,7688	0,7562	0,7562	0,7688	0,8000	0,7688	0,6750	0,7125	0,7750	0,7562	0,7812	0,7937	0,7688	0,7438	0,7188	0,7688	0,7375
0,7000	0,7500	0,7625	0,7375	0,7688	0,7375	0,6937	0,7312	0,7438	0,7750	0,7375	0,7750	0,7750	0,7250	0,7375	0,7250	0,7063
0,7562	0,8187	0,7937	0,7937	0,7875	0,7562	0,6750	0,7125	0,7500	0,7438	0,7438	0,7188	0,7188	0,7562	0,7438	0,7812	0,7375
0,8187	0,8063	0,8063	0,7562	0,7750	0,7562	0,7500	0,7500	0,7000	0,6937	0,6937	0,7438	0,7312	0,7562	0,6813	0,7438	0,6875
****	0,7875	0,8125	0,7750	0,8063	0,7375	0,7188	0,7188	0,7312	0,6875	0,7250	0,7500	0,7375	0,7500	0,7125	0,7500	0,6937
0,2389	****	0,8250	0,8250	0,8063	0,7875	0,7063	0,7562	0,7688	0,7000	0,7625	0,7375	0,7875	0,7375	0,7250	0,7875	0,7312
0,2076	0,1924	****	0,8000	0,8313	0,8375	0,7688	0,7937	0,7812	0,7750	0,8000	0,7750	0,7500	0,7875	0,7750	0,7875	0,7688
0,2549	0,1924	0,2231	****	0,8187	0,8000	0,7063	0,6937	0,7438	0,7625	0,7625	0,7875	0,7500	0,7750	0,6750	0,8000	0,6937
0,2154	0,2154	0,1848	0,2000	****	0,7937	0,7250	0,7750	0,7750	0,7688	0,7812	0,7937	0,7688	0,7188	0,7063	0,8063	0,7500
0,3045	0,2389	0,1773	0,2231	0,2310	****	0,7562	0,7562	0,7312	0,7500	0,7750	0,7250	0,7625	0,7500	0,7250	0,7500	0,7312
0,3302	0,3478	0,2630	0,3478	0,3216	0,2794	****	0,7375	0,7000	0,6687	0,7063	0,7438	0,6813	0,7312	0,6312	0,7188	0,6625
0,3302	0,2794	0,2310	0,3656	0,2549	0,2794	0,3045	****	0,7750	0,7438	0,7312	0,6937	0,7438	0,6813	0,6813	0,7438	0,7625
0,3130	0,2630	0,2469	0,2961	0,2549	0,3130	0,3567	0,2549	****	0,7937	0,7937	0,7812	0,7812	0,7312	0,6937	0,7937	0,7500
0,3747	0,3567	0,2549	0,2712	0,2630	0,2877	0,4023	0,2961	0,2310	****	0,7750	0,8125	0,7875	0,7375	0,6875	0,7750	0,7312
0,3216	0,2712	0,2231	0,2712	0,2469	0,2549	0,3478	0,3130	0,2310	0,2549	****	0,8000	0,8000	0,7500	0,7625	0,7625	0,7438
0,2877	0,3045	0,2549	0,2389	0,2310	0,3216	0,2961	0,3656	0,2469	0,2076	0,2231	****	0,7750	0,7250	0,6750	0,7250	0,7188
0,3045	0,2389	0,2877	0,2877	0,2630	0,2712	0,3838	0,2961	0,2469	0,2389	0,2231	0,2549	****	0,7500	0,7250	0,7625	0,7688
0,2877	0,3045	0,2389	0,2549	0,3302	0,2877	0,3130	0,3838	0,3130	0,3045	0,2877	0,3216	0,2877	****	0,7750	0,7750	0,7562
0,3390	0,3216	0,2549	0,3930	0,3478	0,3216	0,4601	0,3838	0,3656	0,3747	0,2712	0,3930	0,3216	0,2549	****	0,7375	0,7188
0,2877	0,2389	0,2389	0,2231	0,2154	0,2877	0,3302	0,2961	0,2310	0,2549	0,2712	0,3216	0,2712	0,2549	0,3045	****	0,7438
0,3656	0,3130	0,2630	0,3656	0,2877	0,3130	0,4117	0,2712	0,2877	0,3130	0,2961	0,3302	0,2630	0,2794	0,3302	0,2961	****
0,2961	0,3130	0,2310	0,2469	0,2076	0,2794	0,3390	0,3390	0,3567	0,2630	0,2794	0,2469	0,3478	0,2310	0,2469	0,2630	0,3045
0,3838	0,2961	0,2794	0,3130	0,3045	0,3302	0,3747	0,3390	0,2877	0,3302	0,2794	0,2961	0,3130	0,3130	0,2310	0,2794	0,2389
0,3656	0,3478	0,3302	0,3656	0,3216	0,3478	0,3930	0,4117	0,3045	0,3302	0,3478	0,3478	0,2961	0,2794	0,2961	0,3130	0,2712
0,3567	0,3045	0,2712	0,3390	0,3130	0,2712	0,3656	0,3302	0,2469	0,2389	0,2549	0,2877	0,2549	0,3045	0,2877	0,2877	0,2310
0,3838	0,3130	0,2794	0,3302	0,2712	0,2961	0,3930	0,3930	0,3045	0,2961	0,2794	0,2794	0,2961	0,2630	0,2961	0,2961	0,3045
0,2794	0,2469	0,2310	0,2961	0,2231	0,2961	0,3747	0,3045	0,1773	0,2469	0,2000	0,2469	0,1848	0,2310	0,3478	0,2000	0,2389
0,2630	0,3130	0,2794	0,3302	0,3216	0,3130	0,3747	0,3045	0,3747	0,2961	0,3130	0,2794	0,2469	0,2961	0,2961	0,3478	0,3216
0,3045	0,2389	0,2389	0,2389	0,2310	0,2389	0,3656	0,2961	0,2000	0,1924	0,2076	0,2389	0,2076	0,2877	0,3216	0,2231	0,2469
0,3045	0,3216	0,2549	0,2877	0,2961	0,2712	0,3130	0,3838	0,3656	0,3216	0,3045	0,2712	0,3390	0,2389	0,2877	0,2549	0,3130
0,3216	0,2877	0,2549	0,2877	0,2794	0,2389	0,3478	0,3478	0,2961	0,2549	0,3216	0,2712	0,3216	0,3045	0,2712	0,2231	0,2961
0,2794	0,2310	0,2469	0,2961	0,2389	0,2154	0,3567	0,2877	0,3045	0,2794	0,2794	0,2961	0,2154	0,2630	0,2961	0,2469	0,2231
0,3302	0,2469	0,2310	0,2154	0,2877	0,2469	0,3390	0,3045	0,2549	0,2469	0,2469	0,2630	0,2630	0,2310	0,2630	0,2154	0,2389
0,3302	0,2794	0,2630	0,3130	0,2549	0,2961	0,3567	0,3390	0,3216	0,2961	0,3130	0,2961	0,2630	0,3130	0,2630	0,2310	0,2389
0,2712	0,2231	0,1924	0,2712	0,2469	0,2712	0,2961	0,3302	0,2630	0,3045	0,2076	0,2712	0,2549	0,2231	0,2231	0,2076	0,2961
0,3045	0,2549	0,2549	0,3216	0,3130	0,3045	0,3478	0,3302	0,2469	0,2877	0,2076	0,2712	0,2389	0,2712	0,2231	0,2389	0,2794
0,2712	0,3045	0,2712	0,3567	0,2961	0,3045	0,3838	0,3478	0,3130	0,3390	0,3390	0,3216	0,3390	0,2549	0,2231	0,3045	0,3478
0,4023	0,3656	0,3130	0,3130	0,3216	0,2961	0,3567	0,4117	0,3567	0,2794	0,3478	0,3130	0,2469	0,2794	0,2961	0,2630	0,2712

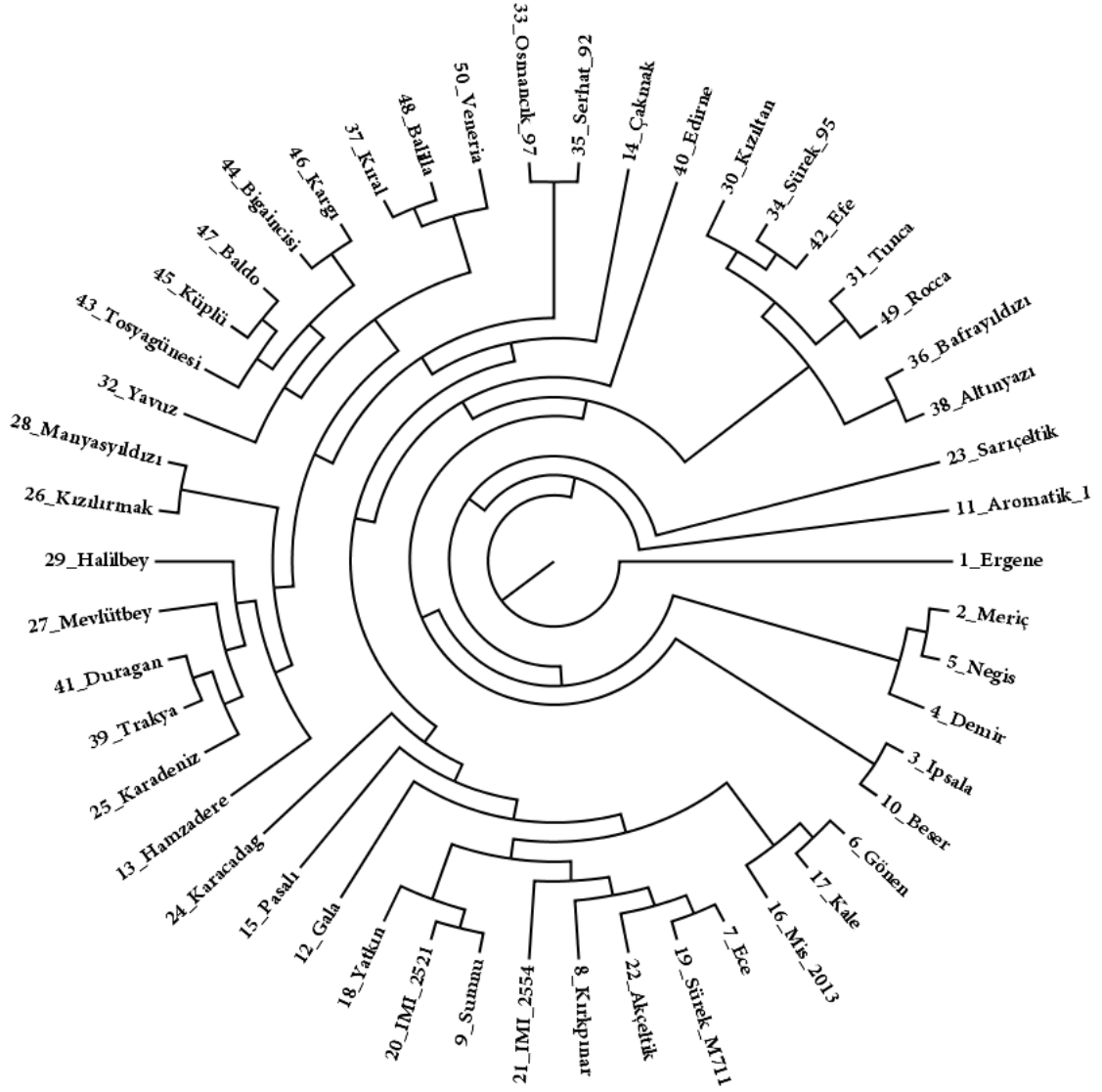
Tablo 3.4. (Devam) Çeltik çeşitleri arasında genetik benzerlik (üst matris) ve genetik uzaklık (alt matris) değerleri

34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
0,6937	0,6062	0,6312	0,6500	0,6562	0,6813	0,6312	0,6875	0,6375	0,6625	0,6937	0,6562	0,6438	0,6625	0,6500	0,6625	0,6438
0,7188	0,6438	0,6562	0,7000	0,6687	0,7312	0,6937	0,7125	0,6875	0,7000	0,7063	0,7063	0,7063	0,6875	0,7000	0,6750	0,6813
0,7500	0,7250	0,6875	0,6813	0,7000	0,7500	0,6750	0,7438	0,7063	0,7438	0,7125	0,7250	0,7000	0,7438	0,6813	0,7188	0,7125
0,6750	0,7125	0,6625	0,7063	0,7000	0,7625	0,6750	0,7562	0,6438	0,6813	0,6375	0,6875	0,6625	0,7063	0,7063	0,6562	0,6875
0,7063	0,6813	0,6562	0,6625	0,6813	0,7312	0,7188	0,7125	0,7000	0,6875	0,7312	0,7188	0,7188	0,7375	0,7000	0,7250	0,6813
0,7750	0,7250	0,7125	0,7188	0,7250	0,7625	0,6750	0,7312	0,7063	0,7312	0,7250	0,7375	0,7500	0,8063	0,7312	0,7312	0,6875
0,7562	0,7688	0,7562	0,7875	0,8063	0,8063	0,7438	0,8500	0,7750	0,7875	0,8187	0,7937	0,7562	0,8000	0,7750	0,7500	0,7688
0,7625	0,7625	0,7500	0,7438	0,7375	0,8125	0,7750	0,7438	0,7438	0,7188	0,7750	0,7500	0,7625	0,7688	0,7438	0,7688	0,7125
0,7312	0,7188	0,7063	0,7375	0,7312	0,7937	0,7312	0,7750	0,7250	0,7500	0,7312	0,7812	0,7188	0,7625	0,7500	0,7125	0,7063
0,7125	0,7750	0,6750	0,6813	0,7125	0,7500	0,6875	0,6937	0,7063	0,6813	0,7500	0,7125	0,7375	0,7562	0,7312	0,7063	0,6750
0,6813	0,6562	0,6188	0,6375	0,6438	0,7188	0,6438	0,6875	0,6500	0,7125	0,6937	0,6312	0,6813	0,7250	0,7000	0,6875	0,6062
0,7438	0,7188	0,6438	0,7125	0,7063	0,7312	0,7688	0,7125	0,7625	0,7125	0,7562	0,7063	0,7438	0,7250	0,7375	0,7250	0,7188
0,7625	0,7375	0,7625	0,7688	0,7500	0,8125	0,7500	0,8187	0,7438	0,7438	0,7750	0,8000	0,7375	0,7688	0,7312	0,7438	0,7375
0,7063	0,7438	0,7063	0,7500	0,7562	0,7688	0,6813	0,8000	0,6625	0,7375	0,7438	0,7312	0,7438	0,7875	0,7500	0,7250	0,7312
0,7875	0,7375	0,7250	0,7312	0,7500	0,7250	0,7250	0,7312	0,7688	0,7438	0,7875	0,7750	0,7875	0,8187	0,7438	0,7438	0,7125
0,7125	0,6875	0,7125	0,7188	0,6750	0,7625	0,7750	0,7438	0,7188	0,7063	0,7375	0,7125	0,7250	0,7562	0,7188	0,7438	0,7250
0,7438	0,6813	0,6937	0,7000	0,6813	0,7562	0,7688	0,7375	0,7375	0,7250	0,7562	0,7188	0,7188	0,7625	0,7375	0,7625	0,6687
0,7312	0,7438	0,7063	0,7375	0,7312	0,7812	0,7312	0,7875	0,7250	0,7500	0,7937	0,7812	0,7562	0,8000	0,7750	0,7375	0,6937
0,7937	0,7562	0,7188	0,7625	0,7562	0,7937	0,7562	0,7875	0,7750	0,7750	0,7812	0,7937	0,7688	0,8250	0,7750	0,7625	0,7312
0,7812	0,7312	0,6937	0,7125	0,7188	0,7438	0,7188	0,7875	0,7500	0,7500	0,7438	0,8063	0,7312	0,7625	0,7250	0,7000	0,7312
0,8125	0,7375	0,7250	0,7312	0,7625	0,8000	0,7250	0,7937	0,7438	0,7562	0,7875	0,7500	0,7750	0,7812	0,7312	0,7438	0,7250
0,7562	0,7188	0,7063	0,7625	0,7438	0,7438	0,7312	0,7875	0,7625	0,7875	0,8063	0,7812	0,7438	0,7625	0,7375	0,7375	0,7438
0,7125	0,6875	0,6750	0,6937	0,6750	0,6875	0,6875	0,6937	0,7312	0,7063	0,7000	0,7125	0,7000	0,7438	0,7063	0,6813	0,7000
0,7125	0,7125	0,6625	0,7188	0,6750	0,7375	0,7375	0,7438	0,6813	0,7063	0,7500	0,7375	0,7125	0,7188	0,7188	0,7063	0,6625
0,7000	0,7500	0,7375	0,7812	0,7375	0,8375	0,6875	0,8187	0,6937	0,7438	0,7375	0,7750	0,7250	0,7688	0,7812	0,7312	0,7000
0,7688	0,7188	0,7188	0,7875	0,7438	0,7812	0,7438	0,8250	0,7250	0,7750	0,7562	0,7812	0,7438	0,7375	0,7500	0,7125	0,7562
0,7562	0,7562	0,7063	0,7750	0,7562	0,8187	0,7312	0,8125	0,7375	0,7250	0,7562	0,7812	0,7312	0,8125	0,8125	0,7125	0,7063
0,7812	0,7438	0,7063	0,7500	0,7562	0,7812	0,7562	0,7875	0,7625	0,7625	0,7438	0,7688	0,7438	0,7625	0,7625	0,7250	0,7312
0,7063	0,7312	0,7438	0,7750	0,7438	0,8313	0,7812	0,8125	0,7125	0,7250	0,8063	0,7688	0,7688	0,7750	0,7875	0,7125	0,7812
0,7937	0,7312	0,7562	0,7375	0,7688	0,7937	0,7438	0,7500	0,7875	0,7375	0,7688	0,7937	0,7312	0,8000	0,7625	0,7750	0,7562
0,7812	0,7937	0,7438	0,7500	0,7438	0,7063	0,7438	0,7250	0,7500	0,7625	0,7438	0,7688	0,7688	0,8000	0,8000	0,8000	0,7438
0,7688	0,7562	0,7312	0,7500	0,7438	0,8187	0,7063	0,8000	0,7750	0,8000	0,7812	0,8063	0,7937	0,8125	0,7875	0,7375	0,7688
0,7375	0,7875	0,7625	0,7937	0,7375	0,7875	0,7250	0,7812	0,7312	0,7438	0,8000	0,7875	0,7875	0,7438	0,7562	0,7063	0,7625
****	0,7750	0,7625	0,7688	0,7875	0,7375	0,7625	0,7688	0,8313	0,7937	0,7875	0,8000	0,7875	0,7812	0,7812	0,8187	0,7500
0,2549	****	0,7500	0,7937	0,7625	0,7375	0,7500	0,7812	0,7562	0,7312	0,7500	0,7750	0,7500	0,7688	0,7562	0,7312	0,7625
0,2712	0,2877	****	0,7812	0,7875	0,7625	0,6750	0,7312	0,7562	0,7312	0,7250	0,7500	0,7375	0,7312	0,7438	0,7688	0,7625
0,2630	0,2310	0,2469	****	0,7562	0,7812	0,7688	0,8000	0,7375	0,7750	0,8187	0,7812	0,7937	0,7875	0,8375	0,7500	0,8187
0,2389	0,2712	0,2389	0,2794	****	0,8000	0,7375	0,8187	0,7937	0,7312	0,7250	0,7750	0,7125	0,7812	0,7312	0,7188	0,7625
0,3045	0,3045	0,2712	0,2469	0,2231	****	0,7500	0,8688	0,7438	0,7688	0,7750	0,7875	0,7750	0,8063	0,8187	0,7438	0,7750
0,2712	0,2877	0,3930	0,2630	0,3045	0,2877	****	0,7937	0,7937	0,7312	0,8000	0,8125	0,7625	0,7438	0,7312	0,7438	0,7500
0,2630	0,2469	0,3130	0,2231	0,2000	0,1407	0,2310	****	0,8000	0,8375	0,8063	0,8562	0,7812	0,8375	0,8000	0,7500	0,7812
0,1848	0,2794	0,2794	0,3045	0,2310	0,2961	0,2310	0,2231	****	0,8000	0,7688	0,8063	0,7688	0,7750	0,7500	0,7625	0,7562
0,2310	0,3130	0,3130	0,2549	0,3130	0,2630	0,3130	0,1773	0,2231	****	0,8063	0,8063	0,7937	0,8250	0,8125	0,7875	0,7562
0,2389	0,2877	0,3216	0,2000	0,3216	0,2549	0,2231	0,2154	0,2630	0,2154	****	0,8250	0,8625	0,8313	0,7937	0,7562	0,7875
0,2231	0,2549	0,2877	0,2469	0,2549	0,2389	0,2076	0,1552	0,2154	0,2154	0,1924	****	0,7625	0,8438	0,7812	0,7562	0,7500
0,2389	0,2877	0,3045	0,2310	0,3390	0,2549	0,2712	0,2469	0,2630	0,2310	0,1479	0,2712	****	0,8313	0,7937	0,7438	0,8000
0,2469	0,2630	0,3130	0,2389	0,2469	0,2154	0,2961	0,1773	0,2549	0,1924	0,1848	0,1699	0,1848	****	0,8250	0,8125	0,7562
0,2469	0,2794	0,2961	0,1773	0,3130	0,2000	0,3130	0,2231	0,2877	0,2076	0,2310	0,2469	0,2310	0,1924	****	0,8125	0,7688
0,2000	0,3130	0,2630	0,2877	0,3302	0,2961	0,2961	0,2877	0,2712	0,2389	0,2794	0,2794	0,2961	0,2076	0,2076	****	0,7063
0,2877	0,2712	0,2712	0,2000	0,2712	0,2549	0,2877	0,2469	0,2794	0,2794	0,2389	0,2877	0,2231	0,2794	0,2630	0,3478	****



Şekil 3.15. UPGMA tekniği ile 50 çeltik çeşidinin genetik benzerlik dendrogramı

PAUP programıyla toplam karakter farklılıklarına göre UPGMA ağacı oluşturulmuştur. Bu ağaç oluşturulurken kullanılan matris ile FigTree ver. 1.4.0 (Rambaut, 2008) programı yardımıyla ağaç düzenlenmiştir.



Şekil 3.16. 50 çeltik çeşidinin PAUP ağaç topolojisi

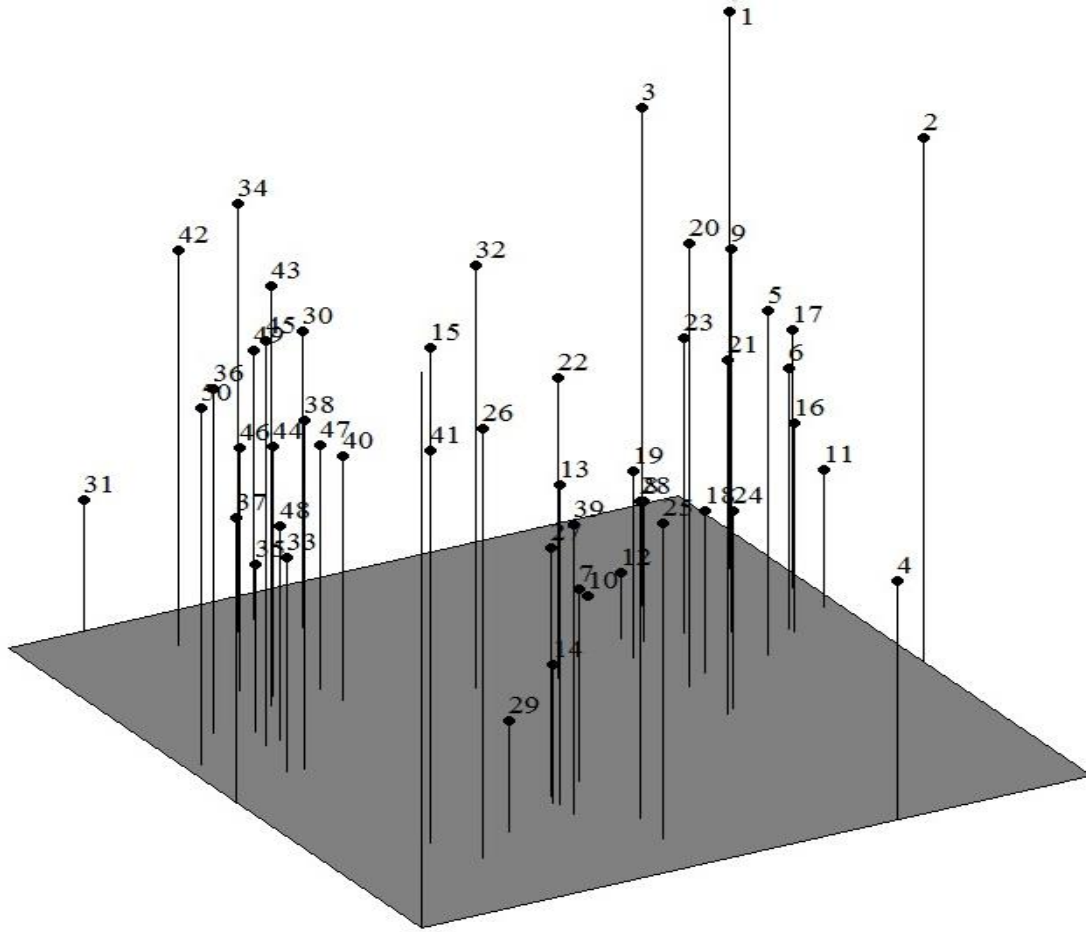
50 adet çeltik çeşidinin POGP analizleri sonucunda Temel Bileşen Analizi de (PCA) NTSYS programıyla 3 boyutlu grafik ile gösterilmiştir. Çeltik çeşitleri arasındaki genetik benzerlikler Eigen değerlerine göre (Tablo 3.5) hesaplanarak üç boyutlu grafikleri oluşturulmuştur (Şekil 3.17).

Dendrogramlara göre 2 ana küme oluşmuştur. İlk küme Ergene, Meriç, Ipsala Beşer, Demir ve Neğiş çeşitlerini kapsamaktadır. İkinci ana küme çoğunlukla 3 İtalyan çeşidinden (Baldo, Rocca ve Veneria) ve birbirleriyle melezlenen genotiplerden orijin alan çeşitlerin oluşturduğu büyük bir gruptan oluşmakta olup 3 alt gruba ayrılmaktadır. Birbirine genetik olarak en yakın çeşitler 0,869 genetik bezerlik katsayısı ile Baldo'dan köken alan Trakya ve Durağan'dır. Genetik benzerlikleri en düşük olan çeşitler ise Küplü ile Aromatik I arasında ayrıca, Sarıçeltik ve Tunca, Ergene ve Osmancık 97, Bafrayıldızı ve Edirne arasında da aynı olarak hesaplanan 0,631 değerinde olmuştur. Dendrogramda

Ergene, Sarıçeltik ile Aromatik-I çeşitlerinin tek başına grupladıkları gözlenmiştir.

Tablo 3.5. Hesaplanan Eigen değerleri

No	Eigen değeri	Yüzde	Toplam
1	2,24954322	8,8804	8
2	1,54287951	6,0908	14
3	1,26988213	5,1131	19
4	1,17460766	4,2808	24
5	1,08438919	4,1414	28



Şekil 3.17. Çeltik çeşitlerinde 3D PCA analizi

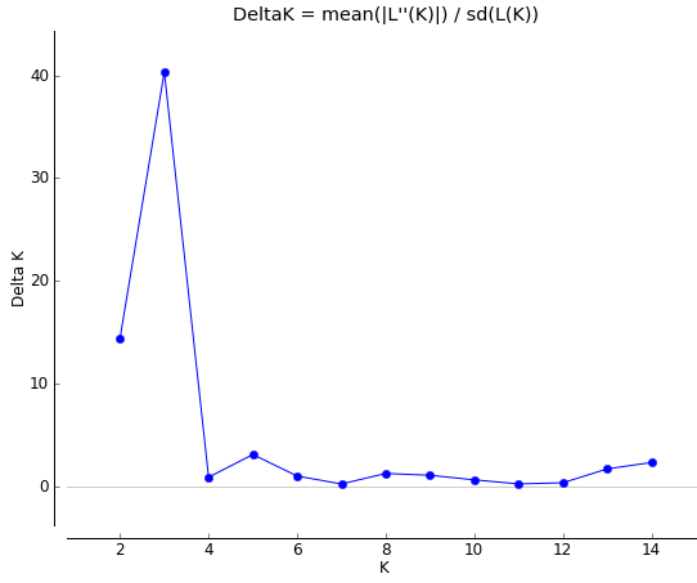
PCA analizinin ilk üç ana bileşen toplam varyasyonun sırasıyla % 8.9, % 6.1 ve % 5.1 olduğunu göstermiştir. Eigen değerlerine göre hesaplanarak oluşturulan üç boyutlu grafiğe göre UPGMA sonucunu destekler nitelikte kümelenmeler oluşmuştur. PCA analizi, 50 çeltik çeşidini toplam üç ana kümeye ayırmıştır (Şekil 3.17). Ergene, Meriç, İpsala gibi anaçları aynı olan diğer türlerin de birbirine yakın olarak kümelenmiş olduğu görülmüştür.

50 adet eltik çeşidinin genetik yapısı STRUCTURE v. 2.3.4 (Pritchard vd., 2000) yazılımı yardımıyla kümeleme teknikleri kullanılarak analizi yapılmıştır. STRUCTURE analizi ile hem karıştırma (admixture) modeli hem de örnekleme noktaları arasındaki ilintili alel frekansları hesaba katılarak bu çeşitlerin kaç adet gen havuzundan oluştuğu belirlenmiştir. Başta her birini ayrı bir genotip olarak değerlendirdiğimiz çeşitlerin gerçekte kaç adet genetik yapıdan oluştuğunu (K= Varsayımsal gen havuzu sayısı) anlamak için K= 1-15 arası ve her biri 4 tekrar olacak şekilde analiz yapılmıştır (Tablo 3.6).

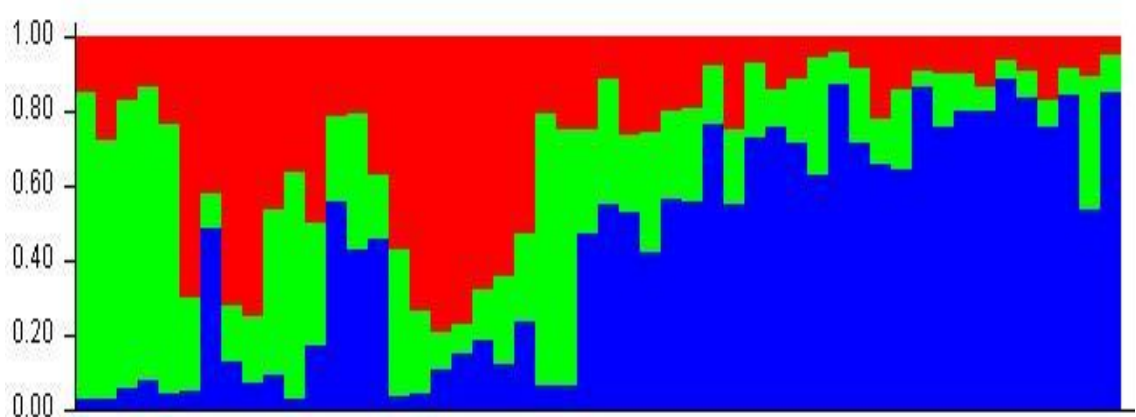
Tablo 3.6. K=1-15 için ortalama ortalama değerler

K	Tekrar	Ort. LnP(K)	Std.sp. LnP(K)	Ln'(K)	Ln''(K)	Delta K
1	4	-3262,525000	1,228481	—	—	—
2	4	-3166,600000	8,212592	95,925000	118,375000	14,413842
3	4	-3189,050000	3,419064	-22,450000	137,950000	40,347297
4	4	-3349,450000	274,614524	-160,400000	236,000000	0,859386
5	4	-3273,850000	61,209721	75,600000	188,100000	3,073041
6	4	-3386,350000	96,779009	-112,500000	94,075000	0,972060
7	4	-3404,775000	192,969572	-18,425000	38,200000	0,197959
8	4	-3461,400000	184,480911	-56,625000	226,075000	1,225466
9	4	-3744,100000	356,519537	-282,700000	374,125000	1,049381
10	4	-4400,925000	1576,940078	-656,825000	946,400000	0,600150
11	4	-4111,350000	544,827988	289,575000	113,250000	0,207864
12	4	-3708,525000	420,065212	402,825000	134,325000	0,319772
13	4	-3440,025000	342,298392	268,500000	572,000000	1,671057
14	4	-3743,525000	248,545588	-303,500000	569,925000	2,293040
15	4	-4616,950000	1154,296786	-873,425000	—	—

Uygun K değerinin (genetik yapının) belirlenmesi konusunda Evanno vd.'larının (2005) önerdiği model kullanılarak geliştirilen açık erişimli Structure Harvester (Earl and VonHoldt, 2012) sitesi üzerinden yapılmıştır. Buradan çıkan sonuçlara göre Delta K'nın en yüksek olduğu sonuç en uygun K değerini vermektedir (Şekil 3.18). Dolayısıyla, Bayesian metoduna göre en iyi sonuç k = 3 olarak elde edilen sonuç olarak bulunmuştur (Bkz. Tablo 3.6).

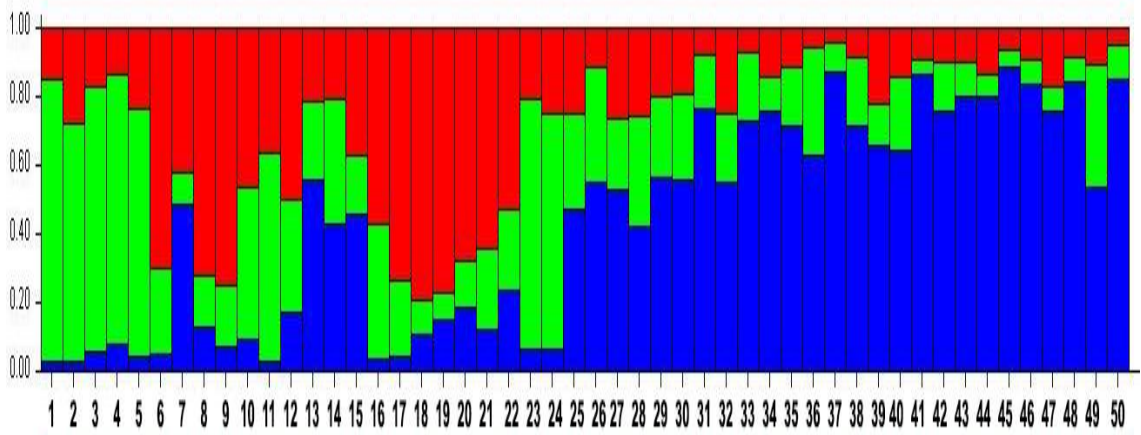


Şekil 3.18. Structure programında Bayesian analizi sonucu elde edilen en uygun K sonucu (K = 3)



Şekil 3.19. POGP varyasyonu temelli STRUCTURE analizinin sonucu (K=3 gen havuzu)

50 çeltik çeşidinin POGP varyasyonu temelli STRUCTURE analizi sonucunda 3 adet gen havuzu ile temsil edildiği belirlenmiştir (Şekil 3.19, renkler farklı gen havuzlarını temsil etmektedir). Mavi renk ile gösterilen gen havuzu en kalabalık gen havuzu olarak görülmektedir.



Şekil 3.20. *POGP varyasyonu sonucu STRUCTURE analizine göre çeşitlerin genetik yapıları. 1- Ergene, 2- Meriç, 3- İpsala, 4- Demir, 5- Neğiş, 6- Gönen, 7- Ece, 8- Kırkpınar, 9- Şumnu, 10- Beşer, 11- Aromatik-1, 12- Gala, 13- Hamzadere, 14- Çakmak, 15- Paşalı, 16- Mis-2013, 17- Kale, 18- Yatkın, 19- Sürek-M711, 20- IMI-2521, 21- IMI-2554, 22- Akçeltik, 23- Sarıçeltik, 24- Karacadağ, 25- Karadeniz, 26- Kızılırmak, 27- Mevlütbey, 28- Manyasyıldızı, 29- Halilbey, 30- Kızıltan, 31- Tunca, 32- Yavuz, 33- Osmancık-97, 34- Sürek-95, 35- Serhat-92, 36- Bafrayıldızı, 37- Kıral, 38- Altınyazı, 39-Trakya, 40- Edirne, 41- Durağan, 42- Efe, 43- Tosyagüneşi, 44- Bigaincisi, 45- Küplü, 46- Kargı, 47- Baldo, 48- Balilla, 49- Rocca, 50- Veneria.*

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Tahıllar dünya besin kaynaklarının çoğunluğunu oluşturmaktadır. Tahıl ürünlerinden biri olan *Oryza sativa* L. (çeltik) ise tek başına dünya nüfusunun % 50'sinden fazlasını karşılayan en önemli besin kaynaklarından biridir (Khush, 1997). Bu nedenle yüksek bir ekonomik değere sahiptir. Dünyada nüfusun artması ile birlikte çeltik gibi temel besin kaynaklarının üretiminin artırılması gerekmektedir. Ayrıca, Gençtan vd. (2010)'nin belirttikleri gibi ülkemizin yıllar içerisinde dışalım ihtiyacı artmakta olup tarımsal ürünleri dışardan almak zorunda kalmaktadır. TÜİK verilerine göre 2012-2015 yılları arasında sadece çeltik ithalatı için harcanan tutar 823 milyon TL'sına ulaşmıştır. Ülkemizde özellikle son yıllarda artan bu talebin yüksek maliyeti dolayısıyla da karşılanabilmesi için çeltik üretiminin artırılması zorunluluk haline gelmiştir. Bu sebeplerden dolayı bitki ıslahı programları ile verimli ve kaliteli çeşitler geliştirilmelidir.

Bitki ıslah çalışmalarında yeni bir çeşidin geliştirilmesinde gerekli 2 ana kuraldan birincisi; genetik çeşitliliğin oluşturulması veya varolandan faydalanmaktır. İkinci ana kural ise; uygun çeşitlerin seçilmesidir (Fu, 2015). Moleküler biyolojinin gelişmesiyle beraber bitki genetiği, genetik çeşitliliğin korunması ve üretimi ile ıslah çalışmalarında "Belirteç Destekli Seleksiyon" (MAS) gibi güçlü araçlar gerekli olan genetik çeşitliliği belirlemede ve seçilimi yönünde hız ve etkinliğini arttırmada önemli katkılar sağlamaktadır (Vardar-Kanlıtepe vd., 2010).

Bu çalışmada, 50 adet çeltik çeşidinin peroksidaz gen polimorfizminin (POGP) belirlenmesi amacıyla 13-24 arası baz uzunluğunda 13 adet primer kullanılmıştır. Çalışılan çeltik çeşitleri arasındaki genetik ilişkiler peroksidaz gen polimorfizmlerinden elde edilen verilerle ortaya çıkarılmıştır. Bu tez çalışması dışında, POGP markırları ile Türkiye'de geliştirilen tüm çeltik çeşitleri kullanılarak yapılmış olan herhangi bir genetik çeşitlilik çalışma yoktur. Fakat, ülkemizde geliştirilen çeltik çeşitlerinden 21 adedi üzerinde tohum depo proteinleri ve RAPD markırları kullanılmış, tohum depo proteinleri ile çeşitlerde bir ayırım yapılamamış, RAPD markırları ile az da olsa bazı sonuçlara ulaşılmıştır (Büyüknal Bal ve Bay, 2010). Ayrıca, 28 adet çeltik çeşidinin ISSR markırları kullanılarak genetik ilişkilerinin belirlendiği bir tez çalışması da mevcuttur (Törün, 2013).

4.1. Çeltiklerde Peroksidaz Gen Polimorfizmi

Çalışılan 50 çeşidin 13 adet ileri ve 13 adet geri POGP primeri kullanılarak yapılan PZR analizleri sonucunda 150-2500 bp büyüklüğü arasında 146'sı polimorfik (% 91,25) 160 bant elde edilmiştir. Bu polimorfizm oranı Türkiye'de üretilen 21 çeltik çeşidi kullanılıp RAPD analizi ile elde edilenden (%69) (Büyüknal Bay ve Bal, 2010) ve yine yerli 28

çeltik çeşidiyle ISSR analizleriyle elde edilenden (% 80,97) (Törün, 2013) yüksektir. Bu çalışmaların dışında RAPD tekniği kullanılarak yapılan araştırmalarda 10 adet Hindistan kökenli çeltikte % 85,02 (Rajani vd., 2013) ve 38'i Pakistan 2'si Japon kökenli 40 çeltik çeşidinde %89,4 polimorfizm elde edilmiştir (Rabbani vd., 2008).

Öte yandan, bugüne dek çeşitli türlerin farklı genotipleri kullanılarak elde edilen POGP markırlarının büyüklükleri şu şekildedir: bir çimen türü *Buffalo grass*'ta 100-750 bç (Gülşen vd., 2007), 192 adet elma genotipinde 80-1000 bç (Gülşen vd., 2010b), *Citrus spp.* türlerinde 80-900 bç (Uzun vd., 2014), 67 fasulye çeşidinde 100-900 bç (Nemli, 2014), 256 karpuz genotipinde 250-3100 bç (Öcal vd., 2014), 100 yabancı fıstık çeşidinde 80-1000 bç (Mirzavand vd., 2016) ve 96 badem çeşidinde 80-1500 bç (Pınar vd., 2016) büyüklüğünde markırlar üretilmiştir. Bu çalışmada elde edilen markır büyüklükleri (150-2500 bç) dikkate alındığında karpuz genotipleriyle elde edilen markırlar dışında diğer türlerin hepsinden büyüktür. Bundan dolayı, peroksidaz genlerinin çeltiklerde diğer çalışılmış olan türlere kıyasla genom üzerinde daha geniş ve yaygın olarak bulunduğuna yönelik bir fikir vermektedir. Polimorfizm açısından ise yukarıda bahsedilen çalışmalardan Gülşen vd. (2007)'nin çimen çeşitleriyle yaptıkları hariç (%78.8) hepsinde bizim çalışmamıza benzer olarak % 90 üzerinde polimorfizm oranı bulunmuştur. 50 adet çeltik kullanılarak yaptığımız bu çalışmada POX14F/POX14R primer kombinasyonunu tüm çeşitlerde monomorfik olan 1500 bç büyüklüğünde bir bant üretmiştir. Bunun dışında kalan 12 adet primer kombinasyonlarının tümünde polimorfik bantlar üretilmiştir. Bunlardan polimorfizm oranı % 100 ile en yüksek olan POX11F/POX11R ve % 77,7 ile en düşük olarak POX13F/POX13R'de gerçekleşmiştir. Peroksidaz genleri arasındaki dizi benzerliği seviyesinin 25 multigen aile arasında ikinci en düşük seviyede olması (Zhang vd., 2001) bu çalışmada kullanılan primerlerden biri hariç bütün primerlerden yüksek seviyelerde polimorfizm elde edilmesinin sebebi olarak düşünülmektedir. Bunun yanında, bitkilerin büyüme ve gelişimlerinde anahtar rol oynayan peroksidazlar (POXs, EC 1.11.1.7) (Martinez vd., 2000) farklı doku ve organlarda (rizom, çiçek sapı, yaprak, kotiledon, ribozom, çekirdek mitokondri vb.) büyük oranda bulunmaktadır (Passardi vd., 2005; Gülşen vd., 2007). Bu da bulunan yüksek seviyede polimorfizmin bir sebebi olabilir. Ayrıca, bitki peroksidazları birçok fizyolojik olayda ve bitki savunmasında aktif rol oynamalarından dolayı yüksek derecede korunmuş motiflere de sahiptirler. Bu yüzden, tüm çeşitlerde monomorfik bant oluşturan POX14F/POX14R kombinasyonlu primerin çeltiklerde korunmuş bir geni belirlediğinin bir göstergesi olabilir. Kullanılan 50 çeltik çeşidinde görülmüş olan bu bölge saflaştırılıp dizi analizine tabi tutularak farklı çalışmalardan elde edilmiş sonuçlarla karşılaştırıldığında Distal Hem-bağlayan bölge, Fonksiyonu bilinmeyen bir merkez bölge veya Proksimal Hem-bağlayan bölge mi olduğu

açığa kavuşturulabilir. Bu korunmuş bölge belirlendikten sonra elde edilen bu dizi verisinden çeltiklerle ilgili Tek Nükleotid Polimorfizmi'ne (single nucleotide polymorphism: SNPs) dayalı yeni primerler geliştirilebilir. Zira, *O. sativa* genomunda SNP seviyelerinin genelde düşük olduğu belirtilmektedir (Caicedo vd., 2007).

4.2. POGP Primerlerinin PIC ve Rp Değerlendirmesi

Üretilen POGP markırlarının ne kadar bilgilendirici olduğunu anlamak amacıyla kullanılan her primer kombinasyonu için PIC değerleri ayrı ayrı hesaplanmıştır. PIC değeri belirlenen allel sayısı ile bu allelelerin frekans dağılımlarının dikkate alınarak, ilgili lokusun ayırt etme gücünü tahmin etmeye yarar (Botstein vd., 1980; Chesnokov ve Artemyeva, 2015). Bu çalışmada, kullanılan POX primerlerinin PIC değerleri 0 ile 0,877 arasında değişmektedir. Polimorfizm bilgi içeriği açısından herhangi bir bilgilendirici değeri olmayan primer "0" değer ile POX14F/POX14R olmuştur. En yüksek değer POX4F/POX4R primerleriyle elde edilmiştir. Lokusların sayı ve dağılım frekansına göre; PIC değerlerinin 0,25'ten küçük olması az bilgilendirici olduğu, 0,25 - 0,50 arasında orta seviyede bilgilendirici olduğu, 0,5'ten büyük olduğu durumlarda da yüksek seviyede bilgilendirici olduğu varsayılmaktadır (Botstein vd., 1980). Bu durumda, bu çalışmada kullanılan POX14F/POX14R ve PIC değeri 0,448 olan POX13F/POX13R hariç geriye kalan 12 primer kombinasyonunun PIC değerlerinin 0,5'in üzerinde olmasından dolayı çeltik çeşitlerinde ürettikleri lokuslarla yüksek derece bilgilendirici özelliği sahip oldukları anlaşılmaktadır (bkz. Tablo 3.3). Literatür incelendiğinde, çeltik veya herhangi bir akraba türe yönelik peroksidaz gen polimorfizmi temelli PIC değerlerinin hesaplandığı başka bir çalışma bulunmamaktadır. Ancak, 23 mikrosatellit belirteçle (SSR) ABD, Mısır, Filipin ve Hindistan orijinli toplam 33 çeltik çeşidi üzerinde yapılan bir çalışmada ortalama PIC değeri 0,57 olarak bulunmuştur (Zeng vd., 2004). Benzer şekilde, çoğunluğu Hindistan ve Filipin kökenli 40 çeltik çeşidiyle yapılan SSR analizlerinden ortalama 0,578'lik bir PIC değeri elde edilmiştir (Ravi vd., 2003). Chakhonkaen vd. (2012)'in 43'ü Tayland orijinli ve 57'si IRRI tarafından geliştirilen toplam 101 çeşit üzerinde InDel markırlarından ortalama PIC değerini 0,440 olarak tespit etmişlerdir. 299 *Indica* çeltik çeşidinde ILP ve SSR markırlarından elde edilen PIC değerleri sırasıyla 0,22 ve 0,38'dir (Ming vd., 2015). Bundan dolayı, bu çalışmadan elde edilen sonuçlara bağlı olarak (ort. PIC= 0,716; POX14 çifti hesaba katılmamıştır.) POGP yöntemiyle çeltik ve diğer akraba türlerine yönelik ileride yapılacak olan başka çalışmalar için primer seçiminde yardımcı olabileceği düşünülmektedir. Böylelikle, araştırmacılar benzer çalışmalarını tasarlarken ve yaparken zaman ve maliyet açısından kazanç sağlamış olabileceklerdir.

13 adet POGP primer çiftinin ayırma gücü (Rp) incelendiğinde yine tek

monomorfik bant veren POX14 primer çifti dışında kalan primer çiftlerinde en düşük olarak 1,552 değer ile POX7F/POX7R'de en yüksek olarak da 8,585 değerinde POX11F/POX11R'de hesaplanmıştır. POGP primerlerinin toplam ayırma gücü 49,552 değeri ile (Ort. 3,811) oldukça yüksek olduğu anlaşılmaktadır (bkz. Tablo 3.3). Rp primer/markır kombinasyonunun çok sayıda genotip veya birey arasındaki farklılıkları tespit etme yeteneğini karakterize etmek için kullanılan bir parametredir (Prevost and Wilkinson, 1999). Dolayısıyla her primer çifti için ayrı ayrı hesaplanan Rp değerlerine göre 50 çeltik çeşidini ayırt etme potansiyeli en yüksek olanların sırasıyla; POX11F/POX11R (8,585), POX12Fa/POX12Ra (7,282), POX1F/POX1R (5,947), POX6F/POX6R (5,036), POX8F/POX8Rb (4,310), POX3F/POX3R (4,056) olduğu bulunmuştur. Geriye kalan primer çiftlerinin Rp değerleri ortalama değer altında kalmaktadır. Bugüne dek POGP markırlarıyla yapılan çalışmalarda ayırım gücünün hesaplandığı tek çalışma Satya vd. (2014)'nin yaptıkları çalışmadır. 110 *Corchorus* genotipi kullanılarak (2 türünden; *C. olitorius* ve *C. capsularis*) yaptıkları çalışma sonuçlarına göre oldukça yüksek bir Rp değeri (9,8) hesaplamışlardır. Bu ayırım gücünün çeltik çeşitleri için bulduğumuz ortalama değer çok üzerinde olması POGP markırlarının yüksek genetik polimorfizm göstermelerinin yanında farklı 2 türe ait yabancı ve kültüre alınmış çok sayıda genotipin kullanılmış olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

4.3. Çeltiklerde Kümeleme Analizleri ve Genetik İlişkiler

NTSYS-Pc.2.11 (Rohlf, 2000) programında Dice eşitliği kullanılarak elde edilen genetik benzerlik değerleri ile UPGMA'ya (Aritmetik ortalamalar ile ağırlıklandırılmamış eşlenmiş grup metodu) dayalı bir dendrogram elde edilmiştir. POGP analizleri sonucunda 46'sı yerli 4'ü anaç olan çeşitlerinin tamamı birbirinden ayrılmıştır. Dendrograma göre 2 ana küme oluşmuştur. İlk küme çalışılan çeltik çeşitleri arasında anaçlarının kullanılmadığı çeşitlerin bulunduğu grubu kapsamaktadır. Bunlar; ortak anaçtan (Fransız Delta genotipi) köken alan Ergene, Meriç, İpsala ve İpsala'dan mutasyon yoluyla elde edilen Beşer ile diğer çeşitlerden farklı olarak Bulgaristan (Plovdiv genotipi) ve İtalyan (Lido genotipi) ebeveynlerden köken alan Demir çeşidini kapsamaktadır. Bunun yanında yine İtalyan kökenli iki ebeveyn (Vialone Nano X Sequial) orijin alan Neğiş çeşidi Demir ile aynı grupta yer almaktadır. Bu çeşitler olgun bitki boyları ve verim açısından da aynı veya oldukça yakın özellik göstermektedirler (bkz Tablo 2.1). Bunların dışında, Anadolu yerli ırklarından Sarıçeltik ile yurt dışından getirilen Avustralya orijinli Aromatik-I'in dendrogramda ayrı olarak tek başlarına dallanmaları dendrogramın güvenilirliğini göstermesi bakımından önemlidir. Özellikle Aromatik-I'in

diğer çeşitlerden en büyük farkı boy uzunluğunun daha kısa ve nispeten veriminin düşük olmasıdır. Sarıçeltik çeşidi de verim açısından en düşük olmasıyla diğerlerinden ayrılmaktadır. İkinci ana küme çoğunlukla 3 İtalyan çeşidinden (Baldo, Rocca ve Veneria) ve birbirleriyle melezlenen genotiplerden orijin alan çeşitlerin oluşturduğu büyük bir gruptan oluşmaktadır. İkinci büyük küme 3 alt gruba ayrılmaktadır. Bu ilişkiler incelendiğinde birbirine genetik olarak en yakın çeşitler 0,869 genetik benzerlik katsayısı ile Baldo'dan köken alan Trakya ve Durağan olmuştur. Genetik benzerlikleri en düşük olan çeşitler ise Küplü ile en dışta görülen Aromatik-I arasında ve Sarıçeltik ile Tunca arasında aynı olarak hesaplanan 0,631 değerinde olmuştur. Ek olarak, yine 0,631 genetik benzerlik katsayısı ile Ergene ve Osmancık-97, Bafrayıldızı ve Edirne genotipleri arasında olduğu görülmektedir. Osmancık-97, Bafrayıldızı ve Edirne çeşitlerine bakıldığında ikinci ana kümenin 2 alt grubunun dışında bulunmaktadırlar. Bu grupta varolan ve en yüksek verim potansiyeline (1000 kg/da) sahip çeşitler; Çakmak, Efe, Yatkın, Sürek-M711, Gala, Hamzadere ve Tunca'dır. Dolayısıyla, bu çeşitlerden herhangi birinin ebeveyn olarak kullanılacağı bir çalışma ile verimi yüksek yeni çeşitler elde edilebilir.

PCA (Temel Bileşen) analizi sonucunda UPGMA'yı destekler sonuçlar elde edilmiştir. PCA farklı özellikleriyle değerlendirilen geniş grupların nispeten basit kümeler halinde ele alınmasını sağlayan bir analiz yöntemidir (Upadhyaya vd., 2007). Eigen değerlerine göre yapılan bu analizde eigen değerlerinin 1'in üzerinde olan faktörler önemli olarak kabul edilmektedir (Zwick ve Velicer, 1986). Bu çalışmada, 15'in üzerinde temel bileşen hesaplanmış olup ilk 5 tanesinin 1'in üzerinde olduğu görülmüştür (Bkz. Tablo 35). Böylece, üç boyutlu grafiğin oluşturulmasında en yüksek eigen değerlerine sahip ilk 3 bileşen kullanılmıştır. PCA analizi, 50 çeltik çeşidini toplam üç ana kümeye ayırmıştır (Şekil 3.17). Ergene, Meriç, İpsala gibi anaçları aynı olan diğer türlerin de birbirine yakın olarak kümelenmiş olduğu görülmüştür. Dolayısıyla, UPGMA ağacı ile PCA analizlerinin birbirini destekler nitelikte sonuçlar ortaya koymasına oluşan grupların birçok boyuttan benzer şekilde oluştuğunu da kanıtlamaktadır.

4.4. Çeltik Çeşitlerinin Genetik Yapı Analizleri

STRUCTURE ver. 2.3.4 yazılımı ile Bayesian metoduna göre 50 çeltik çeşidinin genetik yapı analizlerinde en bilgilendirici ve çeşitleri en iyi temsil eden kümenin $K = 3$ ($\Delta K = 40,347$) olduğu belirlenmiştir. Bu sonuca göre, 4'ü yabancı kökenli anaç 1'i introduksiyon gerisi yerli ırk veya Türkiye'de üretilen çeşitler olmak üzere 50 çeltik genotipi 3 grup altında 3 ayrı gen havuzunu oluşturacak şekilde toplanmıştır (Şekil 3.19- her bir renk farklı bir gen havuzunu temsil etmektedir). Kumbhar vd. (2015) aralarında

yerel çeşitler, ıslahla geliştirilmiş çeşitlerin olduğu 50 çeşit üzerinde mikrosatellit belirteçler kullanarak yaptıkları STRUCTURE analizinde 5 ayrı grup (K = 5) tespit etmişlerdir. InDel markırları ile 43'ü Tayland orijinli ve 57'si IRRİ tarafından geliştirilmiş toplam 101 çeşit üzerinde yapılan analizlerde genetik yapının K = 6 olduğu bulunmuştur (Chakhonkaen vd., 2012). 299 *Indica* çeltik çeşidinde ILP ve SSR markırlarının birleştirilen sonuçlarıyla K = 3 olarak belirlenmiştir (Ming, 2015). Bizim çalışma sonuçlarımıza göre çalışılan çeltik çeşitleri 3 farklı gen havuzuna sahiptir. 1. gen havuzu (yeşil renkli) Ergene, Meriç, İpsala, Demir, Neğiş, Aromatik-I, Sarıçeltik ve Karacadağ olmak üzere 8 çeltik çeşidini, 2. gen havuzu (kırmızı renkli) Kırkpınar, Şumnu, Mis-2013, Kale, Yatkın, Sürek-M711, IMI-2521 ve IMI-2554 ile 8 adet çeltik çeşidini, 3. gen havuzu (mavi renkli) ise Ece, Hamzadere, Paşalı ve 25-50 arası geri kalan tüm çeşitleri barındırmakta olup en kalabalık gen havuzu olarak göze çarpmaktadır (bkz. Şekil 3.20). Ancak, çeşitlerin çoğunda farklı diğer 2 genetik yapının az da olsa görüldüğü, bazılarında ise Gönen, Ece ve Çakmak'ta olduğu gibi yaklaşık olarak eşit olduğu görülmektedir. Bunun sebebi, çeşitler elde edilirken kullanılan ikinci anaçların bazı genotipler için ortak veya ataların benziyor olmasıdır. Örneğin; İtalyan orijinli 4 genotipin (Baldo, Rocca, Veneria, Balilla) anaçlardan biri olarak kullanıldığı Türkiye'de üretilmiş olan genotiplerin genetik yapılarının oluşmasında etkili oldukları görülmektedir. Çünkü, Bayesian yaklaşımı esas alınarak oluşan 3. gen havuzuna dahil olan çeşitlerin genetik yapısının oluşmasında İtalyan çeşitlerin diğer anaçlardan daha etkili olduğu anlaşılmıştır. Fransız Delta'nın anaç olarak kullanıldığı Ergene, Meriç ve İpsala çeşitlerinde genetik yapının diğer kullanılan Türkiye ve Bulgaristan orijinli anaçlardan daha etkili olduğu görülmüştür. Bunun yanında, anaçlarının bir kısmı İtalyan olan ve ülkemizde üretilen Osmancık-97, Sürek-95, Durağan, Halilbey gibi çeşitlerin 2. anaç olarak kullanıldığı çeşitlerde genetik yapının diğer anaçların özelliklerini taşımasıyla beraber değişmeye başladığı ve bu genotiplerin melezleme ya da ıslah çalışmalarının ülkemizdeki başarılı örnekleri olarak sayılabileceklerinin göstergesidir. Bunu anlamak için POGP varyasyonundan elde edilen STRUCTURE analizinin 16-21 nolu arası çeşitlere (Mis-2013, Kale, Yatkın, Sürek-M711, IMI-2521, IMI-2554) bakılabilir (Şekil 3.20). Bu durum, Ulukan (2007)'in vurguladığı bitki ıslah çalışmalarının en temel ilkelerinden biri olan seçilimin önemini ortaya koymaktadır. Yapay olarak gelişmiş olan bu seçim ilkesinden faydalanarak geliştirilen yeni çeşitlerde meydana gelen genetik değişiklikler zaman içinde bitkilerin köken aldıkları formlarından farklı olan yeni tiplerin oluşumuna sebep olmaktadır (Nevo vd., 2002). Çalışılan çeltik çeşitlerinde genetik tabanı genişletmekle beraber verimi de arttırmak için oluşan gen havuzlarından verimi en yüksek olup farklı gen havuzlarına dahil olan çeşitlerin ıslah çalışmalarında kullanılması gerekmektedir. Bu nedenle, ıslah çalışması

planlarken 1. gen havuzundan (yeşil) verimi en yüksek olan Demir (900 kg/Da), Neğiş ve İpsala (850 kg/Da), 2. gen havuzundan (kırmızı) başta Yatkın ve Sürek (1000 kg/Da) ile sırasıyla Kale (850-900 kg/Da), IMI-2521, IMI-2554 ve Şumnu (800-900 kg/Da) çeşitleri anaç olarak seçilebilir (bkz Tablo 2.1). En kalabalık olan 3. gen havuzunun oluşturduğu çeşitlerden ise başta 1000 kg/Da verim potansiyeline sahip olan Gala, Tunca, Efe, Hamzadere ve Çakmak ile 800-900 kg/Da verime ulaşan Halilbey, Ece, Tosyagüneşi ve Küplü çeşitlerinin anaç olarak tercih edilmesi yararlı olacaktır. Bu yabancı gen kaynaklarının korunmasına sadık kalma koşuluyla istenen bir durumdur.

Bitki ıslahçılarının hedefi farklı tekniklerden faydalanılarak bitki türlerinde daha verimli, daha lezzetli, daha dayanıklı çeşitleri elde etmektir. Bu nedenle yapılması amaçlanan çalışmalarda ıslahçının en büyük yardımcısı bitkisel gen kaynaklarıdır (Şehirli ve Özgen, 1987). Çeltikte de verimlilik ve kalitede iyileşmenin önemi hala devam ettiğinden dolayı, çeşit geliştirme programları, ıslah stoklarının genetik tabanını genişletmeyi amaçlamalıdır (Vanaja ve Babu, 2004). Dolayısıyla, bu çalışmadan STRUCTURE analizi sonucunda elde edilen sonuçlar doğrultusunda üç gen havuzundaki genetik özelliklerden yararlanılarak Türkiye’de devam eden çeşit geliştirme programlarında varolan genetik tabanının seçim yoluyla genişletilmesine katkı sağlanabilecektir.

Sonuç olarak, bilindiği gibi klasik ıslah çalışmaları yapılırken tarla denemeleri sırasında fazla zaman kaybı, yüksek maliyet ve yüksek oranda iş gücü gerekmektedir. Bu kayıpları mümkün olduğunca azaltmak için günümüzde “Moleküler Markör Teknolojileri”nden faydalanılarak Türkiye’de geliştirilen çeltik çeşitlerinin dünyayla eşzamanlı şekilde genetik çeşitlilik ve akrabalık seviyelerinin tespit edilmesi oldukça önemlidir. Bu tez çalışmasıyla, polimorfizm oranının ve ayırma gücünün yüksek olduğu gösterilen peroksidaz gen markırlarıyla ülkemizde geliştirilen tüm çeltik çeşitlerinin genetik çeşitlilik ve genetik akrabalık seviyeleri ile genetik yapıları net bir şekilde belirlenmiştir. Böylece, çalışılan çeltik çeşitlerinden yararlanarak yeni çeşitlerin eldesinde kullanılacak ebeveynlerin seçiminde ileride planlanacak olan ıslah çalışmaları için veriler sağlanmıştır. Bu çalışmaya kadar, ülkemizde geliştirilen tüm çeltik çeşitlerinin kullanıldığı bir genetik çeşitlilik ve akrabalık çalışması yapılmamıştır. Ayrıca, bu çalışma peroksidaz gen polimorfizmine dayalı çeltiklerle yapılmış ilk çalışma özelliğine sahiptir.

KAYNAKÇA

- Anonim, (2005). The Biology and Ecology of Rice (*Oryza sativa* L.) in Australia Australian Government, Department of Health and Ageing, Australia: Office of the Gene Technology Regulator
- Anonim, (2010). *Global strategy for the ex situ conservation of rice genetic resources*. Philippines, Metro Manila: International Rice Research Institute
- Anonim, (2013). *GeoChemBio, Ecology and General Biology*, <http://www.geochembio.com/biology/organisms/rice> (Erişim tarihi: 12.02.2017).
- Anonim, (2016). Food and Agriculture Organization Of the United Nations 2016. STATISTICS DIVISION <http://faostat3.fao.org/download/Q/QC/E> (Erişim Tarihi: 18 Şubat 2016)
- Arnold, M.H. (1978). The end Results: Breeding Improved Crop Varieties. In: Conservation of Plant genetic resources (ad. J. G. Hawkes). Univ. of Aston in Birmingham, pp.46-54.
- Bakardjieva, N., Christov, K. (1996). Effect Of Calcium And Zinc İons On The Sensitivity Of Peroxidase From Mosses (*Mnium* sp.) And Ferns (*Polydium vulgare*) To Hight Temperature. *Can. J. Bot.*, 74, 1665-1670.
- Banci, L. (1997). Structural properties of peroxidase. *J. Biotechnol.* 53, 253-263.
- Bornet B.C., Muller F.P., Branchard M. (2002). Highly informative nature of inter simple sequence repeat (ISSR) sequences amplified using tri- and tetra-nucleotide primers from DNA of cauliflower (*Brassica oleracea* var. 'botrytus' L.). *Genome*, 45, 890–896.
- Bostein, D., White, R.L., Skolnick, M., Davis R.W. (1980). Construction of genetic linkage map in man using restriction length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.*, 32, 314–331.
- Büyükünal Bal, E. ve Bay, S. (2010). Genetic analysis of Turkish rice varieties (*Oryza sativa* L.) using seed storage proteins and RAPD markers. *Eur. Food Res. Technol.* 230, 609-617.

- Caicedo, A.L., Williamson, S.H., Hernandez, R.D., Boyko, A., et al. (2007). Genome-wide patterns of nucleotide polymorphism in domesticated rice. *PLoS Genet.* 3, 1745-1756.
- Ceylan, A., Öcal, N., Akbulut, M. (2014). Genetic diversity among the Turkish common bean cultivars (*Phaseolus vulgaris* L.) as assessed by SRAP, POGP and cpSSR markers. *Biochemical Systematics and Ecology*, 54, 219–229.
- Chakhonkaen, S., Pitnjam, K., Saisuk, W., Ukoskit, K., Muangprom, A. (2012). Genetic structure of Thai rice and rice accessions obtained from the International Rice Research Institute. *Rice*, 5 (1), 19.
- Chawla, H.S. (2002). *Introduction to plant biotechnology*. Second edition, USA: Science Publisher Inc. pp: 330-358.
- Chesnokov, Y.V., Artemyeva, A.M. (2015). Evaluation of the Measure of Polymorphism Information of Genetic Diversity. *Agricultural Biology*, 50 (5), 571-578.
- Churin, Y., Schilling, S., Börner, T. (1999). A Gene Family Encoding Glutathione Peroxidase Homologues in *Hordeum vulgare* (Barley). *FEBS Lett.*, 459, 33-38.
- Corazza-Nunes M. J., Machado, M. A., Nunes W. M. C., Cristofani, M., Targon M. (2002). Asswssment of genetic variability in grapefruits (*C. paradisi* Macf.) and pummelos (*C. maxima*) (Burm.) Merr.) using RAPD and SSRs markers. *Euphytica*, 126,169-76.
- Cramer, H.H. (1967). Plant protection and world crop protection. *Pflanzenschutz nachrichten Bayer Leverkusen*, 524.
- Doyle, J. and Doyle, J. (1990). Isolation of Plant DNA from Fresh Tissue. *Focus*, 12, 13-15.
- Duran, N. and Esposito, E. (2000). Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. *Applied Catalysis B: Environmental*, 28, 83–99.
- Eserkaya Güleç, T., Yıldırım, A., Ateş Sönmezoğlu, Ö. (2010). Bitkilerde Markör Destekli Seleksiyon. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 3 (2), 67-79.
- Evanno, G., Regnaut, S. and Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of

- individuals using the software STRUCTURE: A simulation study. *Molec. Ecol.* 14, 2611–2620.
- Fatima, A., Husain, Q. (2008). Purification and characterization of a novel peroxidase from bitter melon (*Momordica charantia*). *Protein Pept Lett*, 15 (4), 377–384.
- Frankel, O.H. (1973). Survey of Crop Genetic Resources in Their Centres of Diversity., Rome: First report. FAO / IBP.
- Fu, Y.B. (2015). Understanding crop genetic diversity under modern plant breeding. *Theoretical and Applied Genetics*, 128 (11), 2131–2142.
- Gençtan, T., Öktem, A., Sürek, H., Gevrek, M., Balkan, A. (2010). Sıcak İklim Tahılları Üretiminin Artırılması Olanakları. Türkiye Ziraat Mühendisliği 7. Teknik Kongresi, Ankara, 1-22.
- Goff, S. A., Ricke, D., Lan, T.H., Presting, G., Wang, R., Dunn, M., Briggs, S. (2002). A Draft Sequence of the Rice Genome (*Oryza sativa* L . ssp.). *Science*, 296 (5565), 92–100.
- Gülşen, O. ve Mutlu, N. (2005). Bitki Biliminde Kullanılan Genetik Markırlar ve Kullanım Alanları. *Alatırım*, 4 (2), 27-37.
- Gülşen, O., Kaymak, S., Ozongun, S., Uzun, A. (2010b). Genetic analysis of Turkish apple germplasm using peroxidase gene-based markers. *Sci Horti.*, 125, 368–373.
- Gülşen, O., Shearman, R.C., Heng-Moss, T.M., Mutlu, N., Lee, D.J., Sarath, G. (2007) Peroxidase gene polymorphism in buffalograss and other grasses. *Crop Sci.*, 47, 767–772.
- Gülşen, O., Uzun, A., Canan, I., Seday, U., Canihos, E. (2010a). A new citrus linkage map based on SRAP, SSR, ISSR, POGP, RGA and RAPD markers. *Euphytica*, 173, 265–277.
- Gupta, M., Chyi, Y.S., Romero-Severson, J., Owen, J.L. (1994). Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple sequence repeats. *Theor. Appl. Genet.*, 89, 998-1006.

- Hansson B., Westerberg L. (2002). On the correlation between heterozygosity and fitness in natural populations. *Molecular Ecology*, 11, 2467-2474.
- Hiraga, S., Yamamoto, K., Ito, H., Sasaki, K., Matsui, H., Honma, M., Nagamura, Y., Sasaki, T., Ohashi, Y. (2001). Diverse expression profiles of 21 rice peroxidase genes. *FEBS Lett.*, 471, 245–250.
- Jackson, M.T. (1997). Conservation of rice genetic resources: the role of the International Rice Genebank at IRRI. *Plant Molecular Biology*, 35, 61–67.
- Jena, K.K. (2010). The species of the genus *Oryza* and transfer of useful genes from wild species into cultivated rice, *O. sativa*. *Breed. Sci.*, 60, 518–523.
- Jones C.J., Edwards K.J., Castaglione S., Winfield M.O., Sale F., Van de Wiel C., Bredemeijer G., Buiatti M., Maestri E., Malcevshi A., Marmioli N., Aert R., Volckaert G., Rueda J., Linacero R., Vazquez A., Karp A. (1997). Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. *Mol. Breed.*, 3, 381-390.
- Joshi, S.P., Gupta, V.S., Aggarwal, R.K., Ranjekar, P.K., Brar, D.S. (2000). Genetic diversity and phylogenetic relationship as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) polymorphism in the genus *Oryza*. *Theor. Appl. Genet.*, 100, 1311–1320.
- Khush G.S. and Jena K. (2009). Current status and future prospects for research on blast resistance in rice (*Oryza sativa* L.), Şu eserde: X. Wang, B. Valent (Eds.), *Advances in Genetics, Genomics and Control of Rice Blast Disease*, Dordrecht: Springer. pp 1-10.
- Khush, G.S. (1997). Origin, dispersal, cultivation and variation of rice. *Plant Mol. Biol.*, 35, 25-34.
- Khush, G.S. (2005). What it will take to feed 5.0 billion rice consumers in 2030. *Plant Mol. Biol.*, 59 (1), 1-6.
- Kim, K.Y., Kwon, H. K., Kwon, S.Y., Lee, H. S., Hur, Y., Bang, J.W., Choi, K.S., and Kwak, S.S. (2000). Differential Expression of Four Sweet Potato Peroxidase Genes in Response to Abscisic Acid and Ethaphon. *Phytochemistry*, 54, 19-22.

- Kresovich, S., Szewc-Mcfadden, A.K., Blick, S., Mcferson J.R. (1995). Abundance and characterization of simple sequence repeats (SSRs) isolated from a size fractionated genomic library of *Brassica napus* L. (rapeseed). *Theor. Appl. Genet.*, 91, 206-211.
- Kumbhar, S.D., Kulwal, P.L., Patil, J.V., Sarawate, C.D., Gaikwad, A.P., Jadhav, A.S. (2015). Genetic diversity and population structure in landraces and improved rice varieties from India. *Rice Science*, 22 (3), 99–107.
- Laval, G., SanCristobal, M., Chevalet, C. (2002). Measuring genetic distances between breeds: use of some distances in various shortterm evolution models. *Genet Sel Evol.* 34, 481–507.
- Lavi, U., Cregan, P., Scchap, T. Millel J. (1994). *Amplification and breeding of perennial fruit crops*, Şu eserde: Janick, J. (ed) Plant Breeding Reviews. NY: John Wiley Sons, 397-401.
- Li G. and Quiros C.F. (2001). Sequence Related Amplified Polymorphism (SRAP), A New Marker System Based on a Basic PCR Reaction: Its Application to Mapping and Gene Tagging in Brassica. *Ther Appl Genet*, 103, 455-461.
- Louarn, S., Torp, A.M., Holme, I.B., Andersen, S.B., Jensen, B.D. (2007) Database derived microsatellite markers (SSRs) for cultivar differentiation in *Brassica oleracea*. *Genet Resour Crop Evol* 54, 1717-1725.
- Mackill, D.J., Ismail, A. M., Singh, U.S., Labios, R.V., Paris, T.R. (2012). *Development and rapid adoption of submergence-tolerant (Sub1) rice varieties*. *Advances in Agronomy* (1st ed., Vol. 115). Elsevier Inc.
- Martinez, C., Baccou, J. C., Bresson, E., Baissac, Y., Daniel, J. F., Jalloul, A, Nicole, M. (2000). Salicylic acid mediated by the oxidative burst is a key molecule in local and systemic responses of cotton challenged by an avirulent race of *Xanthomonas campestris* pv *malvacearum*. *Plant Physiology*, 122 (3), 757–766.
- Mather, K. A., Caicedo, A. L., Polato, N. R., Olsen, K. M., McCouch, S., Purugganan, M. D. (2007). The extent of linkage disequilibrium in rice (*Oryza sativa* L.). *Genetics*, 177 (4), 2223–2232.

- Maughan, P.J., Maroof M.A.S., Buss. G.R. (1995). Microsatellite and amplified length polymorphisms in cultivated and wild soybean. *Genome*, 38, 715-723.
- Ming, H., Ya-hui, W., Xing-xing, T., Yong-zhu, L., Gui-li, Y., Zhi-qiang, C. (2015). Genetic Diversity of Main Inbred Indica Rice Varieties Applied in Guangdong Province as Revealed by Molecular Marker. *Rice Science*, 22 (1), 1–8.
- Mirzavand, S., Sorkheh, K., Siahpoosh, M.R. (2016). Peroxidase Gene-Based Estimation of Genetic Relationships and Population Structure Among Wild Pistacia Species Populations. *Biochemical Genetics*. DOI 10.1007/s10528-016-9776-3.
- Nei, M. (1987). *Molecular Evolutionary Genetics*. New York: Columbia Uni. Press.
- Nemli, S., Kaya, H.B., Tanyolac, B. (2014). Genetic assessment of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) accessions by peroxidase gene-based markers. *J Sci Food Agric*. 94 (8), 1672–1680.
- Nevo, E., Korol A.B., Beiles A., and Fahima T. (2002). *Evolution of wild emer wheat and wheat improvement*. Almany, Berlin: Springer-Verlag.
- Obinger, C., Burner, U., Ebermann, R., Penel, C., and Greppin, H. (1996). Plant Peroxidases, Biochemistry and Physiology, University of Agriculture, Vienna and University of Geneva, Geneva.
- Öcal, N. (2012). *Peroksidaz gen markırları kullanılarak bazı karpuz çeşitlerinde genetik çeşitliliğin belirlenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kayseri.
- Öcal, N., Akbuluta, M., Gulsen, O., Yetisir, H., Solmaz, I., Sari, N. (2014) Genetic diversity, population structure and linkage disequilibrium among watermelons based on peroxidase gene markers. *Sci Horti*, 176, 151–161.
- Paran, I. and Michelmore, R.W. (1993). Development of Reliable PCR-Based Markers Linked to Downy Mildew Resistance Genes in Lettuce. *Theor. Appl. Genet.*, 85, 985-993.
- Passardi, F., Cosio, C., Penel, C., and Dunand, C. (2005). Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. *Plant Cell Rep*. 24, 255–265.

- Pinar, H., Unlu, M., Ercisli, S., Uzun, A., Bircan, M. (2016). Genetic analysis of selected almond genotypes and cultivars grown in Turkey using peroxidase-gene-based markers. *Journal of Forestry Research*, 27 (4), 747–754.
- Poulos, T.L., Edwards, S.L., Wariishi, H. and Godl, M.H. (1993). Crystallographic Refinement of Lignin Peroxidase at 2 Å. *The Journal of Biological Chemistry*, 268, 4429-4440.
- Powell, W., Morgante, M., Andre, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingeg, S., Rafalski, A. (1996). The comparison of RFLP, RAPD, AFLP, and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Mol. Breed.* 2, 225–238.
- Prevost, A., Wilkinson, M.J. (1999). A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theor. Appl. Genet.*, 98, 107–112.
- Pritchard, J.K., Stephens, M. and Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155 (2), 945–959.
- Rabbani, M.A., Pervaiz, Z.H., Masood, M.S. (2008). Genetic diversity analysis of traditional and improved cultivars of Pakistani rice (*Oryza sativa* L.) using RAPD markers. *Electronic Journal of Biotechnology*, 11 (3), 1-10.
- Rajani J., Deepu V., Nair G. M., Nair A. J. (2013). 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.
- Rambaut, A. (2008). FigTree, v1.4.0. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburg.
- Rao, N.K. (2004). Plant genetic resources: advancing conservation and use through biotechnology. *Afr. J. Biotechnol.* 3, 136–145.
- Ravi, M., Geethanjali, S. (2003). Molecular marker based genetic diversity analysis in rice (*Oryza sativa* L.) using RAPD and SSR markers. *Euphytica*, 133, 243–252.
- Robinson, D.S. (1991). *Peroxidases and Catalases in Food*. Robinson D.S., Eskin, A.M. (Ed) "Oxidative Enzymes in Foods" England, Essex: Elsevier Science Publishers Ltd., s. 1-47.

- Rohlf, M. (2000). NTSYSPC. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Version 2.11; Department of Ecology and Evolution: State University of New York, NY, USA.
- Sambrook, J., Fritschi, E.F., Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanchez, P.L., Wing R.A. and Brar D.S. (2013). *The Wild Relative of Rice: Genetics and Genomics*. In Plant Genetics and Genomics of Rice: Crops and Models. Q. Zhang and R. Wing (Eds.). New York: Springer Science, 5: 9-25.
- Satya, P., Banerjee, R., Biswas, C., Karan, M., Ghosh, S., Ali, N. (2014). Genetic analysis of population structure using peroxidase gene and phenylalanine ammonia-lyase gene-based DNA markers: a case study in jute (*Corchorus spp.*). *Crop Science*, 54 (4), 1609–1620.
- Şehirali, S. ve Özgen, M. (1987). Bitki genetik kaynakları. No: 1020. Ders Kitabı: 294, Ankara: Ankara Üniv. Ziraat Fak. Yayınları.
- Selvaraj, K., Chander, S., Sujithra, M. (2012). Determination of multiple-species economic injury levels for rice insect pests. *Crop Prot.*, 32, 150–160.
- Simmons, M.P., Zhang, L.B., Webb, C.T., Müller, K. (2007). A penalty of using anonymous dominant markers (AFLPs, ISSRs, and RAPDs) for phylogenetic inference. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 42, 528-542.
- Smith, J.S.C., Chin, E.C.L., Shu, H., Smith, O.S., Wall, S.J., Senior, M.L., Mitchel, S.E., Kresovich, S., Tiegler, J. (1997). An evaluation of the utility of SSR loci as molecular markers in maize (*Zea mays*): comparisons with data from RFLP and pedigree. *Theor. Appl. Genet.*, 95, 163–173.
- Takahashi, N. (1984). *Differentiation of ecotypes in Oryza sativa L.* Chapter 2. In: S Tsunoda, N Takahashi, eds. Biology of rice. Elsevier, Amsterdam. pp 31-67.
- Tanweer, F.A., Rafii, M.Y., Sijam, K., Rahim, H.A., Ahmed, F., Latif, M.A. (2015). Current advance methods for the identification of blast resistance genes in rice. *Comptes Rendus Biologies*, 338 (5), 321–334.
- Taşlıgil, N. ve Şahin, G. (2011). Türkiye’de Çeltik Yetiştiriciliği ve Coğrafi Dağılımı.

Adıyaman Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü Dergisi, 4 (6), 182-203.

- Taurog, A. (1999). Molecular Evolution Of Thyroid Peroxidase, *Biochimie*, 81, 557– 562.
- Tautz, D. (1989). Hypervariability of Simple Sequences as General Source for Polymorphic DNA Markers, *Nucleic acid research*, 17, 463-6471.
- Topçular, C. (2006). Taşıyıcılı ve Taşıyıcısız Sistemlerde İmmobilize Peroksidaz Enziminin Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Toro, M.A., Caballero, A. (2005). Characterization and conservation of genetic diversity in subdivided populations. *Philos Trans R Soc ond B*, 360,1367-1378.
- Törün, B. (2013). Türkiye'de yetiştirilen bazı çeltik çeşitlerinin genetik çeşitliliğinin ISSR tekniği ile saptanması, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- TÜİK, (2016). Bitkisel Üretim İstatistikleri. “Türkiye’de çeltik ile ilgili son 10 yılın verileri”. <https://biruni.tuik.gov.tr/bitkiselapp/bitkisel.zul> (Erişim Tarihi: 16 Şubat 2017)
- Ulukan H., (2007). 'Klasik Bitki Islahı ve Genetik Mühendisliği ile Oluşturulan Değişimlere Genel Bakış. *U. Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi*, 21 (2), 27-40.
- Upadhyaya, H.D., Dwivedi, S.L., Gowda, C.L.L. and Singh, S. (2007). Identification of diverse germplasm lines for agronomic traits in a chickpea (*Cicer arietinum* L.) core collection for use in crop improvement. *Field Crops Research*, 100, 320-326.
- Uzun, A., Gulsen, O., Seday, U., Yesiloglu, T., Aka Kacar, Y. (2014). Peroxidase gene-based estimation of genetic relationships and population structure among Citrus spp. and their relatives. *Genet Resour Crop Evol.*, 61, 1307–1318.
- Vanaja T, Babu L.C. (2004). Heterosis for yield and yield components in rice (*Oryza sativa* L.). *J Trop Agric*, 42 (1/2), 43–44.
- Vardar-Kanlıtepe, Ç., Aras, S., Cansaran-Duman, D. (2010). Bitki ıslahında moleküler belirteçlerin kullanımı ve gen aktarımı. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 67 (1), 33-43.

- Vaughan, D.A. (1994). *The Wild Relatives of Rice.*, Los Banos, Filipinler: International Rice Research Institute.
- Vaughan, D.A., Ge, S., Kaga, A., Tomooka, N. (2008) . Phylogeny and Biogeography of the Genus *Oryza*. *Rice Biology in the Genomics Era. Biotechnology in Agriculture and Forestry*, 62, 219-234,
- Vaughan, D.A., Morishima, H., Kadowaki, K. (2003). Diversity in the *Oryza* Genus. *Current Opinion in Plant Biology*, 6, 139-146.
- Vos, P., Bleeker, M., Reijans, M., Van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., Zabeau, M. (1995). AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.*, 23, 4407–4414.
- Wada, N., Kinoshita, S., Matsuo, M., Amako, K., Miyake, C., and Asada, K. (1998). Purification and Molecular Properties of Ascorbate Peroxidase from Bovine Eye. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 242, 256-261.
- Walton, M. (1993). Molecular markers: which ones to use?, *Seed World*, July,23-29.
- Welinder, K.G. (1991). *In Biochemical, Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidases*. Switzerland: University of Genève pp. 3-13.
- Williams, J.G.K., Hanafey, M.K., Rafalski, J.A., Tingey, S.V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res*, 18, 6531–6535.
- Wright, S. (1969). *Evolution and the genetics of populations*. vol. 2, *The theory of gene frequencies*. Illinois, USA. Chicago: University of Chicago Press.
- Wu, W., Zheng, Y.L., Chen, L., Wei, Y.M., Yang, R.W., Yan Z.H. (2005). Evaluation of genetic relationships in the genus *Houttuynia* Thunb. in China based on RAPD and ISSR markers. *Biochemical Systematics and Ecology*, 33, 1141-1157.
- Yamaki, S., Ohyanagi, H., Yamasaki, M., Eiguchi, M., Miyabayashi, T., Kubo, T., Kurata, N. and Nonomura, K.I. (2013). Development of INDEL markers to discriminate all genome types rapidly in the genus *Oryza*. *Breed. Sci.*, 63, 246–254.

- Yıldırım, A. ve Kandemir, N. (2001). Genetik Markörler ve Analiz Metodları. Bölüm 23. Şu eserde: Özcan, S. Gürel, E., Babaoğlu, M. Bitki Biyoteknolojisi II. Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları. (ed.). ISBN 975-6652-05-5. Konya: Selçuk Üniv. Vakıf Yayınları, Sayfa 112–159.
- Yip, P.Y., Chau, C.F., Mak, C.Y., Kwan, H.S. (2007). DNA methods for identification of Chinese medicinal materials. *Chinese Medicine*, 2, 9. doi:10.1186/1749-8546-2-9.
- Zeng, L., Kwon, T. R., Liu, X., Wilson, C., Grieve, C. M., & Gregorio, G. B. (2004). Genetic diversity analyzed by microsatellite markers among rice (*Oryza sativa* L.) genotypes with different adaptations to saline soils. *Plant Science*, 166 (5), 1275–1285.
- Zhang, L., Pond, S.K., Gaut, B.S., (2001). A survey of the molecular evolutionary dynamics of twenty-five multigene families from four taxa. *J. Mol. Evol.* 52, 144–156.
- Zietkiewicz, E., Rafalski, A., Labuda D. (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20, 176–183.
- Zwick, W.R., and Velicer, W. F. (1986). Factor Influencing Five Rules for Determining The Number of Components to Retain. *Psychological Bulletin*, 99, 432-442.