



Retrotranspozon temelli moleküler belirteçler kullanılarak Türk arpa (*Hordeum vulgare* L.) çeşitlerinin genomik karakterizasyonu

Genomic characterization of Turkish barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars using retrotransposons-based molecular markers

Hülya SİPAHİ¹, Ayşen YUMURTACI²

¹Sinop Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 57000, Sinop

²Marmara Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, 34722, İstanbul

Sorumlu yazar (*Corresponding author*): H. Sipahi, e-posta (*e-mail*): hsipahi@sinop.edu.tr

Yazar(lar) e-posta (*Author e-mail*): aysen.yumurtaci@gmail.com

MAKALE BİLGİSİ

Alınış tarihi 17 Şubat 2020
Düzeltilme tarihi 01 Mayıs 2020
Kabul tarihi 03 Mayıs 2020

Anahtar Kelimeler:

Arpa
Retrotranspozon belirteçler
IRAP
REMAP
iPBS

ÖZ

Kökene Doğu Akdeniz ülkelerine dayanan, hayvan yemi ve maltlık olarak tüketilen arpanın, dünyanın birçok bölgesinde tarımı ve ıslahı yapılmaktadır. Arpa çeşitlerinde genetik çeşitliliğin belirlenmesi, çeşitler arasındaki genetik ilişkilerin ortaya çıkarılması ve ıslahçı haklarının korunması için moleküler yöntemlerden faydalanılmaktadır. Bu çalışmada, arpa genomunun önemli bileşenlerinden olan *BARE-1* retrotranspozonu ile ilişkili IRAP (Retrotranspozon-arası Çoğaltılmış Polimorfizm), REMAP (Retrotranspozon-Mikrosatellit Çoğaltılmış Polimorfizmi) ve iPBS (Primer Arası Bağlanma Yeri Polimorfizmi) olarak adlandırılan moleküler belirteçler kullanılarak ulusal birçok çeşidin karakterizasyonu yapılmıştır. Toplamda 211 alel olmak üzere, 3 IRAP primer çifti 49.5 REMAP primer çifti 55 ve 7 iPBS primer çifti için 107 alel tespit edilmiştir. Locus başına ortalama 14 alel belirlenmiştir. Polimorfik Bilgi İçeriği (PIC) ortalama değeri REMAP için 0.407, IRAP için 0.454 ve iPBS için de 0.442 bulunmuştur. Genetik benzerlik değerleri 0.41 ila 0.93 arasında değişmiştir. Tüm belirteçler için ortalama fark yöntemi (UPGMA) kümeleme analizi yapılarak, çeşitler genetik benzerliklerine göre gruplandırılmışlardır. Bu çalışmada, fazla sayıda alel ve yüksek PIC değeri vermeleri, ucuz ve kolay elde edinimleri nedeniyle, transpozon temelli moleküler belirteçler ile çok yakın ilişkili çeşitlerin dahi ayrımının kolay bir şekilde yapılabileceği görülmüştür. Transpozon esaslı belirteçler, çeşitler arasında genetik ilişkileri belirlemenin yanı sıra genetik kaynakların korunmasında ve tohum bankalarının yönetiminde faydalı olabilecektir.

ARTICLE INFO

Received 17 February 2020
Received in revised form 01 May 2020
Accepted 03 May 2020

Keywords:

Barley
Retrotransposon markers
IRAP
REMAP
iPBS

ABSTRACT

Barley, which is originated from Eastern Mediterranean countries and is consumed as animal feed and malt, is cultivated and breeding in many regions of the world. Molecular methods are benefited to determine the genetic diversity in barley cultivars, to define the genetic relationship between cultivars and to protect the breeder rights. In this study, characterization of many national cultivars was carried out using molecular markers called as IRAP (Inter retrotransposon amplified polymorphism), REMAP (Retrotransposon microsatellite polymorphism) and iPBS (inter-priming binding site) associated with *BARE-1* retrotransposons that is one of the important components of barley genome. A total of 211 alleles, 49 for 3 IRAP, 55 for 5 REMAP, and 107 for 7 iPBS primer pairs were detected. An average of 14 alleles per locus was determined. Polymorphic Information Content (PIC) mean value was 0.407 for REMAP and 0.454 for IRAP and 0.442 for iPBS. Genetic similarity values ranged from 0.41 to 0.93. Cultivars were divided into groups according to their genetic similarities by performing the unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) clustering analysis for all markers. In this study, it was observed that, due to their high number of alleles and high PIC values, and their cheap and easy acquisition, it can be easily distinguished even very closely related cultivars by using transposon-based molecular markers. Transposon based markers can be useful for conserving the genetic resources and managing the seed banks beside as determining the genetic relationship between cultivars.

1. Giriş

Bitki üretim sistemleri, daha iyi donanımlı ortamlar altında, yüksek verimli ve kaliteli seçilmiş çeşitlerin kullanılmasına dayanmaktadır. Ancak dar bir genotip aralığında olan yani genotipik olarak benzer çeşitlerin yaygın olarak kullanılmasına dayalı üretimde, zararlıların yayılması, iklim değişikliği etkilerinin ortaya çıkması gibi şartların daha az elverişli hale gelmesiyle söz konusu mahsulün tükenme olasılığını artıran riskler oluşmaktadır. Kültürü yapılan çeşitler açısından genetik varyasyonun zenginliği, değişen ortamlarda türlerin ve çeşitlerin hayatta kalmalarını ve çoğalmalarını garantilemektedir. Ayrıca ürünün mevcut genetik bileşimi, onun gelecekteki değişen fiziksel ve biyotik ortamlara ne kadar iyi adapte olabileceğini etkilemektedir. Dolayısıyla genetik çeşitliliği belirleme ve değerlendirme araçları ile genetik olarak benzersiz olan her bir çeşidin DNA parmak izini belirlemek önem taşımaktadır. Genetik varyasyon analizi, bitki genetiğinin, ıslahının ve ekolojinin ayrılmaz bir parçası olmuştur.

Moleküler belirteçler, bitki türlerinin varyasyonunu ölçmek için değerli araçlardır. Genetik belirteç bir organizmanın genotip bilgisinin elde edilebileceği herhangi bir karakterdir. Yüksek verimli moleküler belirteçler ile fazla sayıda genetik kaynağın kısa sürede karakterize edilmesi mümkündür. Moleküler belirteçler, çeşitlerin DNA parmak izlerini oluşturarak farklılıkları saptanmasının yanı sıra cins ve tür filogenilerinin belirlenmesi, bağlantı haritalarının oluşturulması, ıslah çalışmalarında istenen özellikteki hatların seçimi, popülasyonlar arasında ve içinde çeşitliliğin belirlenmesinde de kullanılmalarıyla tarımsal genetiğin vazgeçilmezidir (Henry 2013; Jiang 2013).

Genetik varyasyonun bir kısmı, hareketli genetik elementlerin (TE) transpozisyonundan kaynaklanır. Transpozonlar olarak ta bilinen yer değiştirebilen elementler, kromozomlar içinde ve arasında hareket ederek kendilerini genom içinde farklı bir yere entegre edebilirler. TE lerin, hem genleri bozma ve mutasyonlara neden olma hem de çift iplik kırıkları gibi kromozomal hasar yapma kapasiteleri bulunmaktadır (Capy ve ark. 2000). Genomda TE ailesi elementlerinin büyük bir kısmı genellikle tam değildir, delesyonludur ve otonom değildir. Retrotranspozonlar olarak bilinen TE elementlerin bir grubu, önce RNA'ya transkribe edilip daha sonra komplementer DNA'ya ters transkripsiyonu yapılarak genomda yeni bir yere hareket edebilirler. Bu elementler doğada replikatiftir ve konakçı genomda sayısını artırma eğilimindedir. Ancak yayılımları, hem elementlerin kendilerince hem de konakçı genom tarafından engellenmektedir. TE'lerin bitki genomlarındaki dağılımı ve yaygınlığı nedeniyle, bunlardan türetilen belirteçler, genomların ayrımı ve genetik çeşitlilik çalışmaları için mükemmel birer araçlardır (Kalender ve ark. 1999; Roy ve ark. 2015)

Genetik çeşitlilik çalışmalarında retrotranspozonların bitki genlerine integrasyon olaylarını araştırmak için Retrotranspozon-arası Çoğaltılmış Polimorfizm (IRAP), REtrotranspozon Mikrosatellit Çoğaltılmış Polimorfizm (REMAP) teknikleri ve Primer Arası Bağlanma Yeri Polimorfizm (iPBS) olarak adlandırılan moleküler belirteçler kullanılmıştır (Kalender ve ark. 1999; Mandoulakani ve ark. 2011). Bu metotlar PCR temellidir ve genomun büyük bir kısmını tespit ederler (Kalender ve ark. 1999; Kalender ve Schulman 2006; Branco ve ark. 2007; Sanz ve ark. 2007; Mansour ve ark. 2010; Poczai ve ark. 2013). Arpa genomunun önemli bir kısmı (yaklaşık % 80'i) retrotranspozonlardan oluşur

(Gozukirmizi ve ark. 2015). Arpa retrotranspozonlarının önemli bir kısmı evrimsel süreçler boyunca inaktive edilmelerine rağmen, bunların hareketlilik oranlarını değiştirerek bitkide strese cevap oluşturdukları belirlenmiştir (Capy ve ark. 2000; Miller ve Capy 2004). Arpa genomunun retroelementi BARE-1 kullanılarak IRAP metodu, *Oryza sativa* (Branco ve ark. 2007), *Musa* (Teo ve ark. 2005; Nair ve ark. 2005), *Brassica* (Tatout 1999), *Spartina* (Baumel ve ark. 2002), *Triticum* (Boyko ve ark. 2002) ve *Solanum* (Mansour ve ark. 2010) genotiplerinin parmak izlerinin oluşturulmasında, arpada (Manninen ve ark. 2000) ve *Aegilops tauschii* (Boyko ve ark. 2002) gen haritalama uygulamalarında ve otlarda (Vicent ve ark. 2001) genom evrimi çalışmalarında kullanılmıştır. Kalender ark. (1999) *Hordeum* cinsine ait türlerde ve 15 arpa çeşidinde BARE-1 retrotranspozonunun genomik dağılımlarını IRAP ve REMAP metotlarını kullanarak çalıştılar ve DNA parmak izini oluşturduklar. REMAP, çeltik blast patojeninde (*Magnaporthe grisea* SP) (Chadha ve Gopalakrishna 2005), spartinada (Baumel ve ark. 2002) ve yulafta (Tanhuanaa ve ark. 2007) birçok genotipin filogenetik ilişkileri, benzerlikleri ve çeşitliliğin ölçülmesinde kullanılmıştır. Branco ve ark. (2007) IRAP ve REMAP'ın pirinç çeşitleri arasındaki genetik benzerliği değerlendirmek için uygun olduğunu göstermişlerdir ve Brezilya ve Japon pirinç çeşitlerinin farklılaşmasının sonuçlarını ortaya koymuşlardır. iPBS, DNA parmak izi oluşturulmasında evrensel belirteç sistemidir (Kalender ve ark. 2010) ve birçok bitki türünde genetik çeşitlilik çalışmalarında başarılı bir şekilde kullanılmıştır (Nemli ve ark. 2015; Yıldız ve ark. 2015; Bayat ve ark. 2018; Yıldız ve ark. 2018).

Bu çalışmada, arpa BARE-1 retrotranspozonu için geliştirilmiş, Retrotranspozon-arası Çoğaltılmış Polimorfizm (IRAP), Retrotranspozon Mikrosatellit Çoğaltılmış Polimorfizm (REMAP) ve Primer Arası Bağlanma Yeri (iPBS)'ne dayalı belirteç teknikleri kullanılarak, Türkiye'de geliştirilmiş birçok arpa çeşidi arasındaki genetik varyasyonu ortaya çıkarmak ve genetik ilişkileri belirlemek amaçlanmıştır.

2. Materyal ve Yöntem

Bu çalışmada Türkiye'de tescilli 25 arpa çeşidi kullanılmıştır (Çizelge 1). Tohumlar toprağa ekilmiş ve 5-6 yapraklı aşamada yapraklardan DNA izolasyonu Song ve Herry (1995)'den alınan yönteme göre yapılmıştır. IRAP ve REMAP PCR analizleri, Miller ve Capy (2004)'ye göre küçük değişikliklerle yapılmıştır.

PCR reaksiyon karışımı; 1X Dream Taq tamponu, 1U Dream Taq polimeraz, 0.2 mM dNTP karışımı, 10-24 ng DNA, REMAP için her bir primerden 0.4 µM, iPBS (2224, 2232,

Çizelge 1. Arpa çeşit listesi.

Table 1. List of barley cultivars.

No	Çeşit adı	No	Çeşit adı	No	Çeşit adı
1	Tarm-92	10	Erginel	19	İnce arpa
2	Yesevi-93	11	Sladoran	20	Bolayır
3	Zeynelağa	12	Bülbül-89	21	Durusu
4	Çatalhöyük	13	Kral-97	22	Martı
5	Aydanhanım	14	Kalaycı-97	23	Akar
6	Karatay-94	15	Larende	24	Burakbey
7	Anadolu-86	16	Avcı-2002	25	Özen
8	Obruk-86	17	Efes-98		
9	Angora	18	Başgül		

2398, 2373) için 0.6 µM primer, iPBS (2378, 2383, 2075) için 1 µM primer, DMSO'dan IRAP 1, REMAP 2, 6 için 0.25 µl ve IRAP 2, REMAP 3, 4 için 0.25 µl içermektedir.

PCR çoğaltım koşulları: IRAP1 ve REMAP1, 2, 3, 4, 6 için; 94°C 1.5 dk, 35 döngü (94°C 30 s; primer bağlanma sıcaklığı (T_a) primere göre, 45 sn, 72°C 1 dk), 72°C 5 dk; IRAP2 ve 3 için; 95°C 3 dk, 32 döngü (95°C 15 s; primer bağlanma sıcaklığı (T_a) primere göre, 30 sn, 72°C 1 dk), 72°C 5 dk; tüm iPBS belirteçleri için; 95°C 3 dk, 30 döngü (95°C 15 s; primer bağlanma sıcaklığı (T_a) primere göre, 1 dk, 72°C 5 dk), 72°C 5 dk dır.

Primer dizi bilgileri, IRAP ve REMAP için Kalendar ve ark. (1999), iPBS için Kalendar ve ark. (2010)'dan alınmıştır (Çizelge 2). Primerlerin bağlanma sıcaklıkları (T_a); IRAP1 (60°C), IRAP2 ve IRAP3 (61.8°C), REMAP1 (60°C), REMAP2 (55°C), REMAP3, REMAP4, REMAP 6 (65°C), 2075 (51.3°C), 2398 (51°C), 2373 (51.8°C), 2224 (55°C), 2232 (57°C), 2378 (49°C), 2383 (51°C).

Elektroforez, %1.7'lik agaroz (TopVision Agarose Thermo Fisher R0491) jelde (20x20 cm), 0.5X TBE tamponunda, 80 V da 4.5-5 saat yürütülerek yapılmıştır. Jeller etidyum bromid ile boyanıp, görüntülenmiştir.

Jel değerlendirilmelerinde, her bir belirteç için, bant var ise 1, yok ise 0 verilmiştir. Polimorfik lokus oranı, lokus başına ortalama alel sayısı ve polimorfik bilgi içeriği (PIC) değerleri (PIC= $1 - \sum(P_{ij})^2$; P_{ij}; her belirteç için bir alelin frekansı) hesaplanmıştır. PIC değeri (Weber 1990)'e göre, genetik benzerlik Dice (75)'e göre hesaplanmıştır. Genetik benzerlik değerleri kullanılarak dendrogram çiziminde ortalama fark yöntemi UPGMA (Sneath and Sokal 1973) kullanılmıştır. NTSYS-peversion 2.0 istatistik programından yararlanılmıştır (Rohlf 1997).

3. Bulgular ve Tartışma

Çalışma kapsamında, retrotranspozon esaslı moleküler belirteçlerden IRAP, REMAP ve iPBS yöntemleri kullanılarak, 25 arpa çeşidine ait DNA bant modelleri elde edilip, çeşitlerdeki genetik varyasyon belirlenip, çeşitler arasındaki genetik ilişkiler ortaya konulmuştur.

IRAP ve REMAP yönteminde, *BARE-1* retrotranspozonlarının ekspresyonu ve integrasyonu için önemli olan, korunmuş uzun terminal bölge (LTR) dizilerinden dışarı yönelen primerler kullanılmaktadır (Suoniemi ve ark. 1997; Kalendar ve ark. 1999). Retrotranspozonlar genomda iki oryantasyonda entegre olurlar. Birincisi, kafa kafaya ("head-to-head") veya kuyruktan kuyruğa ("tail-to-tail"), ikincisi kafadan kuyruğa ("head-to-tail"). İlkinde, birbirine yakın iki retrotranspozon elementi arasında PCR ürünü elde etmek için tek bir primer yeterlidir. Bu çalışmada IRAP3 primeri bu şekildedir. İkincisinde kafadan kuyruğa ("head-to-tail") yönde yer alan retrotranspozonların arasına giren bölgeyi çoğaltmak için 5' ve 3' LTR primerlerine gerek vardır. Çalışmadaki IRAP1 ve IRAP2 primerleri de bu yöndedir. IRAP analiz sonuçlarına göre, 25 çeşitte, %50 ila %77.2 arasında değişen polimorfizm oranıyla, 10 ila 22 arasında bant belirlenmiştir (Çizelge 2). IRAP da görülen bant sayısı, PCR ile çoğaltılabilecek kadar birbirine yakın *BARE-1* elementlerinin sayısını yansıtmaktadır. Kalendar ve ark. (1999) *H. vulgare*'de haploid genomda yaklaşık 180×10^3 LTR'nin varlığını ve bununda 30 bant göstereceğini bildirmişlerdir. LTR lerin 5' ve 3' dış yönüne doğru kullanılan primerlerle elde edilen IRAP bant modelleri, $3-7 \times 10^4$ kopya halinde bulunan *BARE-1* elementlerinin genomda eşit aralıklarla dağılmış olmadığını, aksine birlikte kümelendiklerinin güçlü bir kanıtı olduğu belirtilmiştir. Kopyaların genomda eşit

Çizelge 2. Retrotranspozon belirteçlerine ait primer dizi bilgileri, bant sayıları, polimorfik alel yüzdesi ve PIC değerleri.

Table 2. Primer sequence information of retrotransposon markers, fragment numbers, polymorphic allel percentages and PIC values.

Belirteç	Primer Dizi Bilgisi (5'-3')	Alel sayısı	Polimorfik alel yüzdesi (%)	Polimorfizm bilgi içeriği (PIC)	Ortalama polimorfik alel yüzdesi (%)
IRAP1	LTR6149: TCGCTCGCCCACTACATCAACCGCGTTTATT	22	77.2	0.596	60.03
	LTR6150:CTGGTTCGGCCCATGTCTATGTATCCACACATGGTA				
IRAP2	LTR6149: TCGCTCGCCCACTACATCAACCGCGTTTATT	17	52.9	0.305	
	LTR-A: GGAATTCATAGCATGGATAATAAACGATTATC				
IRAP3	LTR-A: GGAATTCATAGCATGGATAATAAACGATTATC	10	50	0.461	
	LTR-A: GGAATTCATAGCATGGATAATAAACGATTATC				
REMAP 1	SSR 1: GAGAGAGAGAGAGAGAGAC	20	65	0.335	
	LTR-A: GGAATTCATAGCATGGATAATAAACGATTATC				
REMAP 2	SSR 2: CACACACACACACACACAG	8	62.5	0.521	
	LTR-A: GGAATTCATAGCATGGATAATAAACGATTATC				
REMAP 3	SSR 3: CACCACCACCACCACCACCT	9	77.8	0.471	58.40
	LTR-A: GGAATTCATAGCATGGATAATAAACGATTATC				
REMAP 4	SSR 4: CACCACCACCACCACCACCG	3	0	0	
	LTR-A: GGAATTCATAGCATGGATAATAAACGATTATC				
REMAP 6	SSR 6: ACACACACACACACACAG	15	86.7	0.708	
	LTR-A: GGAATTCATAGCATGGATAATAAACGATTATC				
2075	CTCATGATGCCA	11	45.5	0.302	
2398	GAACCCTTGCCGATACCA	21	42.9	0.318	
2373	GAACCTTGCTCCGATGCCA	23	87	0.653	
2224	ATCCTGGCAATGGAACCA	17	100	0.689	
2232	AGAGAGGCTCGGATACCA	13	61.5	0.227	
2378	GGTCTCATCCA	10	10	0.081	
2383	GCATGGCCTCCA	12	100	0.824	

aralıkta dağılmış olmaları durumunda, klasik PCR metodu ile IRAP çoğaltım ürünlerinin elde edilemeyeceği bildirilmiştir (Kalender ve ark. 1999).

Çalışılan 25 arpa çeşidinde, 4 REMAP belirtecinde (REMAP 1, 2, 3, 6) %65 ila %86.7 arasında değişen polimorfizm oranıyla, 8 ila 20 arasında bant belirlenmiştir (Çizelge 2). Bu oranlar, REMAP belirteçleri için yüksek polimorfizm oranını göstermekte olup, REMAP4 belirtecinde ise sadece 3 monomorfik bant belirlenmiştir. Kalender ve ark. (1999) bir arpa çeşidi setinde IRAP ve REMAP belirteçlerinin ıslah programlarında uygulanabilecek kadar polimorfik olduklarını belirtmişler ve tüm REMAP ve IRAP bantlarını polimorfik bulmuşlardır. REMAP bant desenleri, mikrosatellitlerin *BARE-I* LTR'lerine yakınlığından ortaya çıkmaktadır. REMAP da gözlenen varyasyonun çoğu mikrosatellitlerden ziyade *BARE-I* elementlerinin kaybı veya insersiyonundan ortaya çıkmaktadır. REMAP ile oluşturulan çoklu bantlar, *BARE-I* elementlerini tekrarlı DNA bölgelerine girme eğilimini göstermektedir (Kalender ve ark. 1999). REMAP metodunda, kullanılan primerin birine mikrosatellitlerin 3' ucuna bir nükleotit ilave edilir, böylece mikrosatellit tekrar bölgesindeki polimorfizmden kaçınılır.

Evrensel DNA parmak izi yöntemi olarak kullanılan iPBS yönteminde, iki LTR retrotranspozon arasındaki bölgelerin zit yönde çoğaltılmasını sağlayacak primer kullanılmaktadır. Bu çalışmada, iPBS belirteçleri ile 25 çeşitte, %10 ila %100 arasında değişen polimorfizm oranıyla, 10 ila 23 arasında bant belirlenmiştir (Çizelge 2). Benzer şekilde, Türkiye'de patates (Demirel ve ark. 2017), pirinç (Cömertpay ve ark. 2016), tütün (Yıldız ve ark. 2018) emmer buğday (Arystanbekkyzy ve ark. 2018), fasulye (Nemli ve ark. 2015), safran (Bayat ve ark. 2018), banya (Yıldız ve ark. 2015) genotiplerinde, iPBS belirteçlerinden elde edilen genetik çeşitlilik, genetik benzerlik verileri ve DNA profilleri sayesinde, genotiplerin tanımlanmasının mümkün olduğu, ebeveyn seçiminde bu bilgilerin ıslahçılara fayda sağlayacağı ve genotipler arasında filogenetik ilişkilerin belirlenebileceği bildirilmiştir.

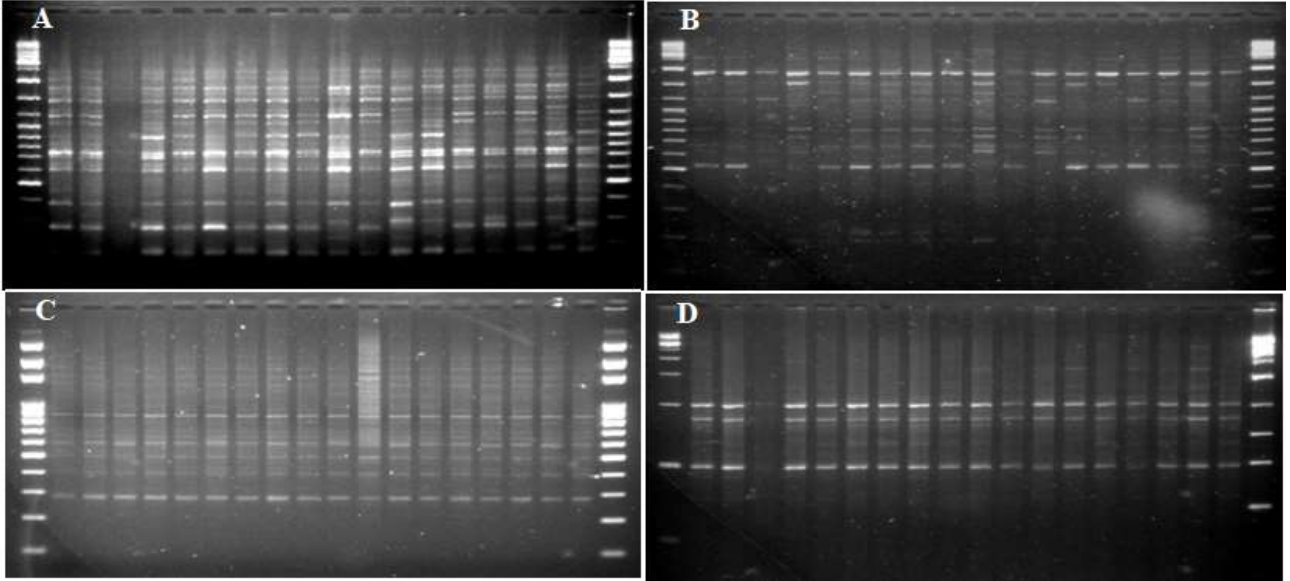
Bu çalışmada kullanılan belirteçler yönünden, çeşitler arasında bant sayılarında belirgin bir değişim bulunmamaktadır (Çizelge 2). Kalender ve ark. (1999) *Hordeum* türleri arasında filogenetik ilişkilerin incelenmesinde ve kültür arparındaki varyasyonun belirlenmesinde REMAP ve IRAP polimorfik bant modellerinin kullanışlı olduğunu göstermişlerdir. Aynı çalışmada, tür ve çeşitlerde bant sayılarındaki gözlenen varyasyonun, çoğu *BARE-I* elementinin kaybından veya insersiyonundan kaynaklandığı bildirilmiştir. Yeni bantların, genomda bir *BARE-I* LTR elementine veya bir mikrosatellit bölgesine, PCR ile çoğaltım yapılabilecek kadar yakın mesafede yeni bir *BARE-I* kopyasının ilavesiyle ortaya çıkabileceği açıklanmıştır. Herhangi bir bant kaybının ise, belirli PCR ürünlerinin baskın çoğaltımı, primer bağlanma bölgesinin 3' ucundaki nokta mutasyonları, mikrosatellitlerin veya LTR lerin rekombinasyon kayıpları ve mikrosatellitlerin tekrar sayılarındaki azalışlar olduğu bildirilmiştir. Campbell ve ark. (2011) arpada doku kültüründe somaklonal varyasyonları araştırmak için kullandıkları IRAP belirteçlerinin, genetik farklılıkları tespit etmede etkili belirteçler olduğunu vurgulamışlardır.

Bu çalışmada her belirteç için PIC değeri, çeşitlerdeki varyasyonu belirlemek için hesaplanmıştır (Çizelge 2). Kullanılan toplam 15 belirteçten, IRAP1'in 0.596, REMAP 6'nın 0.708 ve iPBS 2383'ün 0.824 en yüksek PIC değerleri ile en bilgilendirici belirteçler oldukları bulunmuştur. REMAP 4 belirteci hiç bilgilendirici bulunmazken, bunu iPBS 2378 belirteci 0.081 değeri ile takip etmiştir. En polimorfik (IRAP1, REMAP6 ve iPBS 2383) ve monomorfik belirteçlere (REMAP4) ait örnek jel fotoğrafları Şekil 1A, B, C, D'de verilmiştir. 34 Türk arpa çeşidinde mikrosatellit belirteçlerinin kullanıldığı bir diğer çalışmada, bu çalışmanın sonuçlarıyla benzer şekilde PIC değerleri değişken (0.164 ila 0.747 arasında) bulunmuştur (Sipahi 2011). Bazı belirteçler daha fazla sayıda allele sahip olmalarına rağmen daha düşük PIC değeri göstermişlerdir. Benzer sonuçlar arpa çeşitlerinde IRAP belirteçleri (Campbell ve ark. 2011) ve RAPD belirteçleri (Sipahi ve ark. 2010) için de bildirilmiştir.

25 çeşitte IRAP belirteçler REMAP belirteçlerinden genellikle daha fazla bant vermiştir. Bu sonuç, yabancı arpa ve çeşitlerinde yapılan bir çalışmanın bulgularıyla da uyumlu olmuştur (Singh ve ark. 2017). Aynı çalışmada ayrıca iki belirteç kullanılarak yapılan kümeleme analizinde, yabancılar kültür arpasından ayrı kümelerde gruplanmış olup, yabancılar kendi aralarında coğrafik orijinlerine uyumlu şekilde gruplara ayrılabilmiştir (Singh ve ark. 2017).

25 arpa çeşidinin, kullanılan üç belirtece göre elde edilen bant modellerindeki bantların varlığı veya yokluğu esas alınarak genetik benzerlik (GB) indeksi oluşturulmuştur (Çizelge 3). Buna göre en düşük benzerlik indeksi (0.70) Obruk-86 ile Zeynelağa ve Burakbey ile Erginel çeşitleri arasında olmuşken, en yüksek benzerlik indeksi (0.93) ise Yesevi-93 ile Tarm-92 çeşitleri arasında tespit edilmiştir. Genetik benzerlik oranının tüm çeşitlerde 0.70 ila 0.93 arasında değiştiği görülmüştür. Bu durum Türkiye'deki çeşitlerin çoğunun yüksek genetik benzerlik gösterdiğini ortaya koymuştur. Bu sonuç, devam eden ıslah çalışmalarında mevcut çeşitlerden genotipik olarak daha farklı hatların kullanılması ve genetik yapının devamlı revizyondan geçirilmesi gerektiğini ortaya koymaktadır. Çünkü biyotik ve abiyotik koşulların daha az elverişli hale geldiği çevre koşullarında, türün veya popülasyonun hayatta kalma ve adaptasyon olasılığı, onun genetik çeşitlilik oranıyla doğru orantılı olmaktadır.

Çeşitler arasındaki genetik ilişkileri göstermek için, genetik benzerlik indeksine göre kullanılan 3 belirteç tipi için benzerlik dendrogramları oluşturulmuştur (Şekil 2a, b, c). Her üç dendrogram incelendiğinde aynı ıslah gruplarından tescil edilen bazı çeşitlerin, genetik olarak benzer olmaları veya ortak ataları paylaşmaları nedeniyle aynı veya çok yakın gruplar halinde kümelendikleri görülmektedir (Şekil 2a, b, c). Örneğin, çeşitler arasındaki genetik benzerlik indeksi Tarm-92, Yesevi-93, Çatalhöyük, Anadolu-86 ve Aydanhanım çeşitleri için 0.93; Bülbül-89 ve Avcı için 0.90; Akar, Burakbey ve Özen için 0.84; Efes 98 ve Başgül için 0.92, Angora ve Durusu için 0.80 dir ve bunlar yakın kümelenebilirlerdir. iPBS genetik benzerlik verilerinden elde edilen verilere ve dendrograma (Şekil 1C) göre tüm çeşitlerin ayrımı mümkün olmuştur.



Şekil 1. Arpa çeşitlerine ait en polimorfik belirteçler (A; IRAP1, B; REMAP6, C; iPBS 2383) ve monomorfik belirteç (REMAP4) için jel fotoğraf örnekleri. Jellerdeki örnek sırası Çizelge 1 deki çeşit sırası ile aynıdır. A, B, C’de DNA ladder mix, D’de 1kb lik ladder kullanılmıştır.

Figure 1. An example of gel photos for the most polymorphic markers (A; IRAP1, B; REMAP6, C; iPBS 2383) and monomorphic marker (REMAP4) which belong to the barley cultivars, Sample orders on gels is the same with the cultivars given on Table 1. DNA ladder mix is used at A, B, C, 1kb ladder for D.

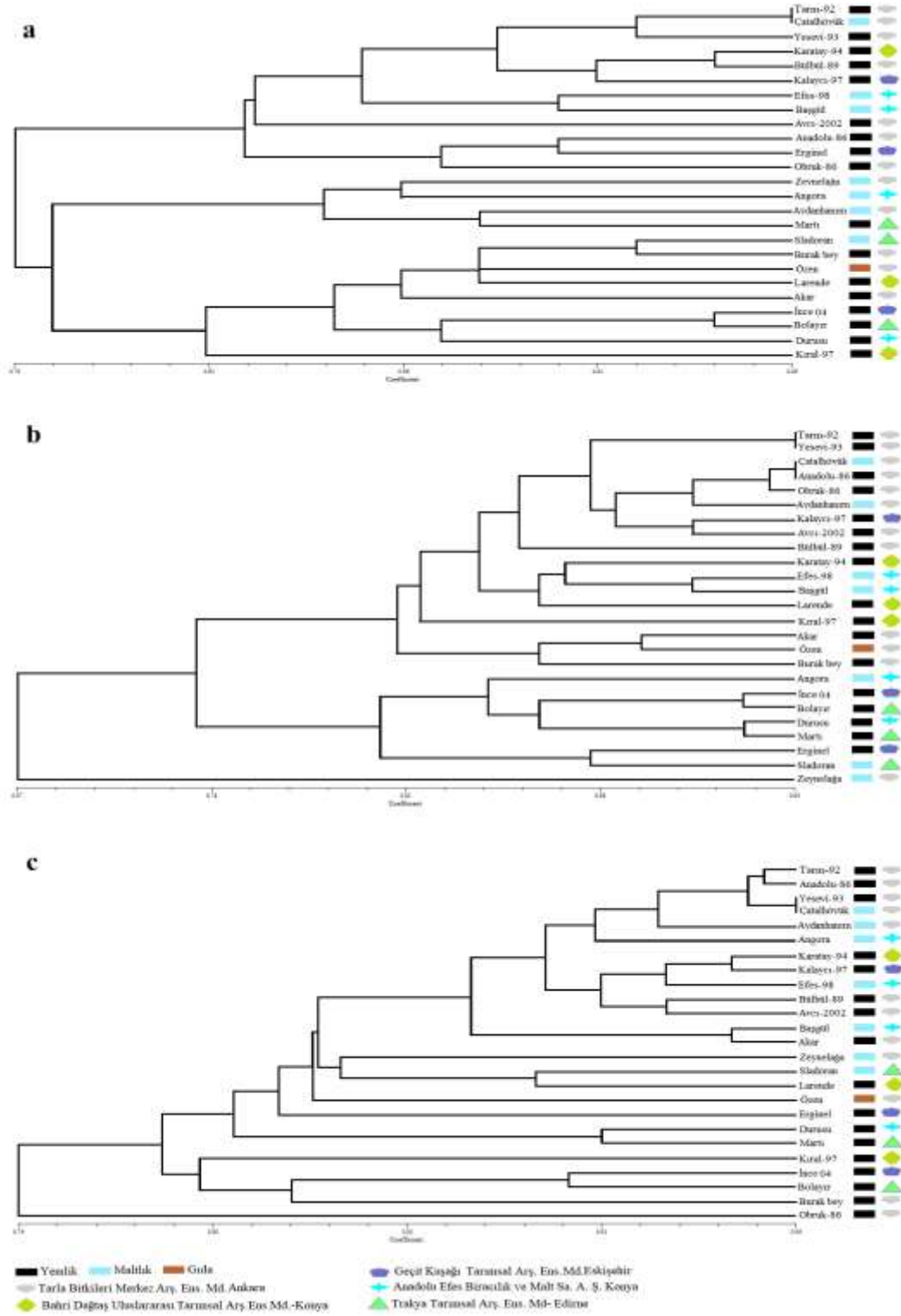
4. Sonuç

Bu çalışmada, retrotranspozon temelli moleküler belirteçler, ürettikleri polimorfik yüksek alel sayıları ve PIC değerleri ile hızlı ve etkili parmak izi metodu olarak, ülkemizdeki yakın ilişkili arpa çeşitleri arasında ayrımı kolayca sağlayabilmiş ve aralarındaki varyasyonu ortaya çıkarabilmiştir. Mevcut çeşitler arasında genetik ilişkileri göstermek üzere çizilmiş benzerlik dendrogramları, ıslah çalışmalarını yürüten çeşitli kamu veya özel araştırma grupları tarafından ıslah programlarını tasarlamada önemli olabilir. Ülkemizde tescil edilecek yeni çeşitlerin verim ve adaptasyon yeteneği yüksek genotipler olmasına odaklanılırken, aynı zamanda mevcut çeşitlerden genetik olarak daha farklı olanlara yönelmeli ve bu konuda retrotranspozon belirteçlerin bilgilendirici özelliklerinden faydalanılmalıdır. Ayrıca çeşitlere özgü belirlenen bant modelleri ıslahçı haklarının korunmasına katkı sağlayacağı gibi gelecekte arpa ıslahında belirteç aracılığı ile seleksiyon, genetik kaynakların korunması ve tohum bankalarının yönetimi konusunda da faydalı olacaktır.

Çizelge 3. IRAP, REMAP ve iPBS belirteç verilerine göre genetik benzerlik indeksi.

Table 3. Genetic similarity index according to the IRAP, REMAP, and iPBS markers data.

Çeşit adları	Tarm-92	Yesevi-93	Zeynelağa	Çatalhöyük	Aydanhanım	Karatay-94	Anadolu-86	Obruk-86	Angora	Erginel	Sladoran	Bülbül-89	Kral87	Kalaycı-97	Larende	Avcı-2002	Efes-98	Başgül	İncearpa	Bolayır	Durusu	Martı	Akar	Burakbey	Özen	
Tarm-92	1.00																									
Yesevi-93	0.93	1.00																								
Zeynelağa	0.80	0.78	1.00																							
Çatalhöyük	0.92	0.93	0.76	1.00																						
Aydanhanım	0.88	0.86	0.82	0.88	1.00																					
Karatay-94	0.88	0.88	0.75	0.89	0.84	1.00																				
Anadolu-86	0.91	0.92	0.79	0.93	0.89	0.89	1.00																			
Obruk-86	0.81	0.83	0.70	0.83	0.79	0.86	0.86	1.00																		
Angora	0.80	0.81	0.83	0.81	0.84	0.79	0.83	0.72	1.00																	
Erginel	0.81	0.81	0.79	0.81	0.81	0.80	0.83	0.74	0.84	1.00																
Sladoran	0.80	0.79	0.80	0.83	0.82	0.81	0.83	0.73	0.79	0.81	1.00															
Bülbül-89	0.86	0.89	0.72	0.89	0.81	0.88	0.88	0.82	0.76	0.77	0.82	1.00														
Kral87	0.74	0.75	0.67	0.78	0.79	0.77	0.77	0.72	0.72	0.73	0.77	0.79	1.00													
Kalaycı-97	0.85	0.87	0.71	0.88	0.82	0.91	0.87	0.82	0.80	0.76	0.79	0.91	0.80	1.00												
Larende	0.80	0.79	0.75	0.81	0.79	0.83	0.79	0.76	0.77	0.75	0.87	0.83	0.83	0.86	1.00											
Avcı-2002	0.82	0.86	0.72	0.85	0.81	0.86	0.86	0.82	0.79	0.78	0.80	0.90	0.81	0.89	0.84	1.00										
Efes-98	0.89	0.89	0.75	0.87	0.82	0.90	0.89	0.82	0.79	0.79	0.78	0.88	0.76	0.90	0.83	0.89	1.00									
Başgül	0.85	0.84	0.71	0.85	0.79	0.88	0.85	0.79	0.79	0.76	0.79	0.85	0.79	0.88	0.84	0.87	0.92	1.00								
İncearpa	0.74	0.72	0.72	0.74	0.75	0.77	0.78	0.71	0.74	0.72	0.78	0.76	0.77	0.79	0.80	0.76	0.75	0.81	1.00							
Bolayır	0.78	0.74	0.80	0.74	0.79	0.79	0.77	0.71	0.78	0.75	0.81	0.74	0.77	0.78	0.81	0.76	0.76	0.82	0.91	1.00						
Durusu	0.77	0.74	0.73	0.77	0.75	0.80	0.79	0.72	0.80	0.79	0.78	0.78	0.75	0.77	0.78	0.78	0.80	0.85	0.82	0.85	1.00					
Martı	0.78	0.76	0.77	0.78	0.79	0.78	0.77	0.69	0.83	0.83	0.77	0.76	0.71	0.76	0.76	0.75	0.80	0.81	0.77	0.81	0.90	1.00				
Akar	0.81	0.78	0.73	0.82	0.83	0.82	0.81	0.74	0.80	0.74	0.81	0.81	0.79	0.84	0.82	0.81	0.82	0.86	0.81	0.83	0.80	0.80	1.00			
Burakbey	0.79	0.76	0.72	0.79	0.78	0.80	0.79	0.74	0.72	0.70	0.80	0.79	0.79	0.81	0.81	0.79	0.81	0.84	0.81	0.84	0.80	0.78	0.85	1.00		
Özen	0.79	0.78	0.73	0.79	0.80	0.84	0.80	0.76	0.77	0.76	0.82	0.82	0.80	0.84	0.82	0.81	0.82	0.81	0.81	0.80	0.80	0.78	0.84	0.84	1.00	



Şekil 2. IRAP (a), REMAP (b) ve iPBS (c) belirteç verileri kullanılarak Dice/UPGMA analizleriyle oluşturulan dendrogramlar
 Figure 2. Dendrograms generated by Dice/UPGMA analysis using IRAP (a), REMAP (b), and iPBS (c) markers data.

Teşekkür

Bu çalışma Sinop Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimince desteklenen FEF-1901-18-20 no'lu proje kapsamında gerçekleştirilmiştir.

Kaynaklar

- Arystanbekkyzy M, Nadeem MA, Aktaş H, Yeken MZ, Zencirci N, Nawaz MA, Ali F, Haider MS, Tunc K, Chung G, Baloch FS (2018) Phylogenetic and taxonomic relationship of Turkish wild and cultivated emmer (*Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*) revealed by iPBS-retrotransposons markers. *International Journal of Agriculture and Biology* doi: 10.17957/IJAB/15.0876.
- Baumel A, Ainouche M, Kalendar R, Schulman AH (2002) Retrotransposons and genomic stability in populations of the young allopolyploid species *Spartina anglica* C.E. Hubbard (*Poaceae*). *Molecular Biology Evolution* 19: 1218-1227.
- Bayat M, Amirnia R, Özkan H, Gedik A, Ates D, Tanyolac BM, Rahimi M (2018) Diversity and phylogeny of saffron (*Crocus sativus* L.) accessions based on IPBS markers. *Genetika* 50: 33-44.
- Boyko E, Kalendar R, Korzun V (2002) A high density cytogenetic map of the *Aegilops tauschii* genome incorporating retrotransposons and defense related genes: insight into cereal chromosome structure and function. *Plant Molecular Biology* 48: 767-790.
- Branco CJ, Vieira EA, Malone G, Kopp MM, Malone E, Bernardes A, Mistura CC, Carvalho FIF, Oliveira CA (2007) IRAP and REMAP assessments of genetic similarity in rice. *Journal of Applied Genetics* 48: 107-113.
- Campbell B, LeMare S, Piperidis G, Godwin I (2011) IRAP, a retrotransposon-based marker system for the detection of somaclonal variation in barley. *Molecular Breeding* 27: 193-206.
- Capy P, Gasperi G, Biemont C, Bazin C (2000) Stress and transposable elements: co-evolution or useful parasites?. *Heredity* 85: 101-106.
- Chadha S, Gopalakrishna T (2005) Retrotransposon-microsatellite amplified polymorphism (REMAP) markers for genetic diversity assessment of the rice (*Oryza sativa*) blast pathogen (*Magnaporthe grisea*). *Genome* 48: 943-945.
- Cömertpay G, Baloch FFS, Derya M, Andeden EE, Alsaleh A, Sürek H, Özkan H (2016) Population structure of rice varieties used in Turkish rice breeding programs determined using simple-sequence repeat and inter-primer binding site-retrotransposon data. *Genetics and Molecular Research* 15(1) doi: 10.4238/gmr.15017158.
- Demirel U, Tındaş İ, Yavuz C, Baloch FS, Çalışkan ME (2017) Assessing genetic diversity of potato genotypes using inter-PBS retrotransposon marker system. *Plant Genetic Resources* 1-9.
- Gozukirmizi N, Yılmaz S, Maraklı S, Temel A (2015) Retrotransposon-based molecular markers; Tools for variation analysis in plants Applications of Molecular Markers in Plant Genome Analysis and Breeding, Taski-Ajdukovic K. ed., Research Signpost, Kerala, 19-45.
- Henry RJ (2013) Evolution of DNA marker technology in plants. In: Henry RJ (ed) *Molecular markers in plants*. Wiley-Blackwell Pub, Ames, pp. 3-20.
- Jiang GL (2013) Molecular markers and marker-assisted breeding in plants. In: Andersen SB (ed) *Agricultural and Biological Science. Plant Breeding from Laboratories to Fields* doi: 10.5772/52583.
- Kalendar R, Grob T, Regina M, Suoniemi A, Schulman AH (1999) IRAP and REMAP: Two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques. *Theoretical and Applied Genetics* 98: 704-711.
- Kalendar R, Schulman AH (2006) IRAP and REMAP for retrotransposon-based genotyping and fingerprinting. *Nature Protocols* 1: 2478-2484.
- Kalendar R, Antonius K, Smýkal P, Schulman AH (2010) iPBS: A universal method for DNA fingerprinting and retrotransposon isolation. *Theoretical Applied Genetics* 121: 1419-1430.
- Mandoulakani BA, Piri Y, Darvishzadeh R, Bernoosi I, Jafari M (2011) Retroelement insertional polymorphism and genetic diversity in *Medicago sativa* populations revealed by IRAP and REMAP markers. *Plant Molecular Biology Reporter* 30: 286-296.
- Manninen O, Kalendar R, Robinson J, Schulman AH (2000) Application of BARE-1 retrotransposon markers to the mapping of a major resistance gene for net blotch in barley. *Molecular Genetics and Genomics* 264: 324-334.
- Mansour A, Jaime A, da Silva T, Edris S, Younis RAA (2010) Comparative assessment of genetic diversity in some tomato cultivars using IRAP, ISSR and RAPD molecular markers. *Genes, Genomes and Genomics* 4: 41-47.
- Miller WJ, Capy P (2004) Mobile genetic elements as natural tools for genome evolution. *Methods in Molecular Biology* 260: 1-20.
- Nair AS, Teo CH, Schwarzacher T, Heslop-Harrison P (2005) Genome classification of banana cultivars from South India using IRAP markers. *Euphytica* 144: 285-29.
- Nemli S, Kianoosh T, Tanyolac MB (2015) Genetic diversity and population structure of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) accessions through retrotransposon-based interprimer binding sites (iPBSs) markers *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 39: 940-948.
- Poczai P, Varga I, Laos M, Cseh A, Bell N, Valkonen JPT, Hyvonen J (2013) Advances in plant gene-targeted and functional markers: A review. *Plant Methods* 19: 6.
- Rohlf FJ (1997) NTSYS-PC Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, version 2.02i, Applied Biostatistics Inc., Exeter Software, Setauket, New York.
- Roy NS, Choi JY, Lee NSK (2015) Marker utility of transposable elements for plant genetics, breeding, and ecology: A review. *Genes and Genomes* 37: 141-151.
- Sanz AM, Gonzalez SG, Syed NH, Suso MJ, Saldaña CC, Flavell AJ (2007) Genetic diversity analysis in *Vicia* species using retrotransposon-based SSAP markers. *Molecular Genetics and Genomics* 278: 433-441.
- Singh S, Nandha S, Singh J (2017) Transposon-based genetic diversity assessment in wild and cultivated barley. *The Crop Journals* 4: 296-304.
- Sipahi H, Akar T, Yıldız MA, Sayim I (2010) Determination of genetic variation and relationship in Turkish barley cultivars by hordein and RAPD markers. *Turkish Journal of Field Crops* 2: 108-113.
- Sipahi H (2011) Genetic screening of Turkish barley genotypes using simple sequence repeat markers. *Journal of Cell and Molecular Biology* 2: 19-26.
- Sneath PHA, Sokal RR (1973) *Numerical taxonomy: The principles and practice of numerical classification*. W. H. Freeman and Co., San Francisco.
- Song W, Henry RJ (1995) Molecular analysis of the DNA polymorphism of wild barley (*Hordeum spontaneum*) germplasm using the polymerase chain reaction. *Genetic Resources and Crop Evolution* 42: 273.
- Suoniemi A, Schmidt D, Schulman AH (1997) BARE-1 insertion site preferences and evolutionary conservation of RNA and cDNA processing sites. *Genetica* 100: 219-230.
- Tanhuanaa P, Kalendar R, Schulman A, Kiviharju E (2007) A major gene for grain cadmium accumulation in oat. *Genome* 50: 588-594.
- Tatout C, Warwick S, Lenoir A, Deragon JM (1999) Sine insertions as clade markers for wild Crucifer species. *Molecular Biology and Evolution* 16: 1614-1621.

- Teo CH, Tan SH, Ho CL, Faridah QZ, Othman YR, Heslop-Harrison JS, Kalendar R, Schulman AH (2005) Genome constitution and classification using retrotransposon-based markers in the orphan crop banana. *Journal of Plant Biology* 48: 96-105.
- Vicient C, Jaaskelainen M, Kalendar R, Schulman A (2001) Active retrotransposons are a common feature of grass genome. *Plant Physiology* 125: 1283-1292.
- Weber JL (1990) Informativeness of human (cC-dA)n(dG-dT)n polymorphisms. *Genomics* 7: 524-530.
- Yaldız G, Çamlıca M, Nadeem MA, Nawaz MA, Baloch FS (2018) Genetic diversity assessment in *Nicotiana tabacum* L. with iPBS-retrotransposons. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 42: 154-164.
- Yıldız M, Koçak M Baloch FS (2015) Genetic bottlenecks in Turkish okra germplasm and utility of iPBS retrotransposon markers for genetic diversity assessment. *Genetics and Molecular Research* 14: 10588-10602.