

## Kendilenmiş Cin Mısır Hatlarının SSR Primerler Kullanılarak Moleküler Karakterizasyonu

Ahmet ÖZTÜRK<sup>\*1</sup>, Bayram SADE<sup>2</sup>, Süleyman SOYLU<sup>3</sup>, Şekip ERDAL<sup>1</sup>, Hatice Filiz BOYACI<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, 07100, Antalya

<sup>2</sup>Karatay Üniversitesi Rektörlüğü, 42020, Konya

<sup>3</sup>Selçuk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, 42250, Konya

(Alınış / Received: 06.05.2016, Kabul / Accepted: 10.01.2017, Online Yayınlanma / Published Online: 08.02.2017)

### Anahtar Kelimeler

Cin mısır,  
Saf hat,  
Genetik uzaklık,  
Kümeleme,

**Özet:** Çalışmada; Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü (BATEM) ve Karadeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsüne (KTAE) ait 35 adet kendilenmiş cin mısır hattı moleküler analize tabi tutulmuştur. Moleküler karakterizasyon için 21 adet SSR primeri kullanılmış ve hatlar arasındaki genetik uzaklıklar tespit edilmeye çalışılmıştır. Araştırma sonucunda; kümeleme analizi ile elde edilen dendograma göre cin mısır hatları 2 ana ve 5 alt gruba ayrılmıştır. Çalışmada kullanılan hatlar 0.44 ile 0.95 aralığında benzerlik göstermişlerdir. Çalışmada kullanılan hatlardan 9 ve 28 nolu hatlar yakın akraba bulunur iken, 1 ve 23 nolu hatların uzak akraba bulunmuştur. Elde edilen bu sonuca göre BATEM ve KTAE ait kendilenmiş cin mısır hatları arasında genetik olarak bir varyasyonun olduğu tespit edilmiştir.

### Molecular Characterization of Popcorn Inbred Lines by Using SSR Primers

### Keywords

Popcorn,  
Inbred line,  
Genetic distance,  
Cluster,

**Abstract:** In this study, 35 popcorn inbred lines that belong to West Akdeniz Agricultural Research Institute (BATEM) and Black Sea Agricultural Research Institute (KTAE) were subjected to molecular analysis. 21 SSR primers were used to determine genetic distances among genotypes for molecular characterization. According to the unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) cluster analysis, popcorn inbred lines were divided into 2 main and 5 sub-clusters. Similarity coefficient was changed between 0.44 and 0.95 among inbred lines. The nearest genetic similarity was detected between 9 and 28 number. On the other hand, 1 and 9 numbered lines were found to be the most distant relatives. The results of the study revealed a genetic variation in the popcorn inbred lines that belong to West Mediterranean Agricultural Research Institute and Black Sea Agricultural Research Institute.

### 1. Giriş

Cin mısırın orijini ile ilgili görüşler diğer mısır varyeteleri ile aynıdır ve Amerika olarak bildirilmiştir [1; 2; 3; 4]. Avrupa'da tüketiciler cin mısır ile A.B.D'nin keşfi ile birlikte tanışmışlar, patlak mısırı süt veya krem ile karıştırarak kahvaltı gevreği şeklinde kullanmaya başlamışlardır [3]. Cin mısır tarımında kullanılan çeşitler genel itibari ile hibrit çeşitlerdir. Hibrit çeşit ıslah çalışmalarında üstün bir melez elde etmenin ilk yolu farklı ebeveynlerin tanımlanmasıdır [5]. Heterosisin mısır ıslah çalışmalarının temelini oluşturduğu bildirilmiş ve heterosis kavramı ilk kez mısırdaki yapılan çalışmalar sonucunda ortaya atılmıştır [6]. Crow [7]'un aktardığı

bilgiye göre farklı araştırmacılar [8; 9; 10] iki germplasm melezlendiğinde ortaya çıkan farklılığın sebebinin genetik farklılıktan kaynaklanan bir uyarıcının olduğunu ileri sürmüşlerdir. Mısırdaki heterosisin en önemli varsayımlarından biri, ebeveynlerin farklı genetik tabanlı materyalden seçilmesidir. Bu nedenle mısır ıslahçıları için genetik çeşitlilik ve bu çeşitliliğin ıslah programlarında kullanılması konusu, yüksek heterosisin melezlerde gözlenmesinden bu yana hep önemli olmuştur [11]. Saf hatlar arasındaki genetik ilişkinin bilinmesi; özellikle melezlemelerin planlanmasında ve hatların heterotik gruplarının belirlenmesinde çok önemli olduğu vurgulanmıştır [12].

Genetik çeşitlilik çalışmalarında morfolojik ve agronomik değerlendirmelerin yetersiz kaldığı durumlarda, biyokimyasal markörlerden yararlanılmaktadır [13]. Genetik uzaklıkların belirlenmesinde birçok moleküler markör tekniği (SSR, RFLP, RAPD, AFLP, SNP) kullanılmasına rağmen, mısırdaki moleküler karakterizasyonda daha detaylı bilgi verdiğinden dolayı SSR markörler tercih edilmektedir [14]. Powel [15]' e göre, mısır ıslahında farklı PCR-tabanlı DNA markörler içinde SSR markörlerinin tercih sebepleri arasında maliyeti, basitliği ve verimliliği gelmektedir.

Son yıllarda dünyada mısır bitkisinde genetik akrabalık tespiti çalışmalarında SSR primerleri başarı ile kullanılmaktadır. Ancak ülkemizde mısırdaki moleküler yöntemler ile genetik akrabalık tespiti çalışmaları sınırlı sayıda kalmış ve mevcut çalışmalarda atdışı mısır varyete grubunda yapılmıştır. Ülkemizde özellikle cin mısır varyetesinde moleküler markörler yardımı ile genetik çeşitlilik tespiti daha önce yapılmamıştır.

Bu çalışmada, daha sonraki ıslah çalışmalarında daha üstün melez kombinasyonları elde edebilmek için moleküler veriler kullanılarak mevcut durulmuş cin mısır hatlarının genetik uzaklıklarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

## 2. Materyal ve Metot

### 2.1. Bitkisel materyal

Materyal olarak, BATEM'e ait 27 adet ve KTAE ait 8 adet olmak üzere toplam 35 adet kendilenmiş cin mısır hattı kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan cin mısır hatlarına ait bazı özellikler Tablo 1'de verilmiştir.

### 2.2. DNA ekstraksiyonu ve SSR analizi

DNA izolasyonu için 3-4 haftalık mısır bitkilerinden, her hattan 4-5 bitkiden olmak üzere alınan yaprak örnekleri alüminyum folyolara konularak buz kutusunda laboratuvara taşınmıştır. DNA izolasyonu Aldrich [16]' e göre CTAB yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Bu yöntemle göre, 2 cm<sup>2</sup>' lik taze yaprak dokusu Tablo 2'ye göre hazırlanmış solüsyondan 1,5 ml alınarak porselen havanda ezilmiş, bu örneklerden 700'er µl alınarak 2 ayrı ependorf tüpe konulmuştur. Örnekler 65°C'de 2 saat bekletilmiştir. Daha sonra ekstraksiyon tüpü içerisine 600 µl cloroform: isoamylalcol ilave edilmiş ve tüpler oda sıcaklığında vortekslendikten sonra 15 dakika 13 000 devir/dakika'da santrifüj edilmiştir. Oluşan iki ayrı fazdan üstteki sıvı kısım bir otomatik mikro pipet yardımı ile yeni ependorf tüplere alınmış ve üzerine bu solüsyonun 2/3'ü kadar buzdolabında bekletilmiş olan soğuk isopropanol ilave edilmiştir. Ependorflar el ile yavaşça alt üst edildiğinde DNA'nın belirgin hale geldiği görülmüştür. Temiz bir DNA elde etmek için tüpler 10 dakika 13 000 rpm'de santrifüj edilmiştir.

Tüp dibinde pelet haline gelen DNA üzerindeki sıvı kısım dökülerek tüplerden uzaklaştırılmıştır. Bu aşamada DNA yıkama buffer'ı (% 76'lık etanol + 10 mM amonyum asetat) ile iki kez yıkanmıştır. Daha sonra etanol, tüplerden uzaklaştırılarak ağız açık bir şekilde kurutulmaya bırakılmıştır. Kuruyan tüplere 100µl saf su ilave edilerek 65°C'de bekletilmek suretiyle DNA'lar çözündürülmüş ve çalışmalar boyunca kullanılmak üzere -20°C'de muhafaza edilmiştir.

DNA kalitesi ve konsantrasyonunu belirlemek için 5 µl'lik DNA örnekleri % 1.3'lük agaroz (Sigma) jelde 75 V'da 45 dakika elektroforez (BIO-RAD) işlemine tabi tutulmuştur. Kontrol olarak konsantrasyonu bilinen λ DNA'sı ( 25 ng, 50 ng, 100 ng, 200 ng) kullanılmıştır. Etidyum bromid ile boyanmış olan jel, görüntüleme sistemi (KODAK GELLOGIC 200) ile görüntülenerek bilgisayar ortamına kaydedilmiştir.

Araştırmada, MaizeGDB sitesinden elde edilmiş olan ve (Cömertpay, 2008; Kostova et al. 2006; Da Silva et al. 2009; Dandolini et al. 2008; Trindade et al. 2010) tarafından kullanılmış ve başarılı bulunan 38 adet SSR primeri kullanılmıştır. Kullanılan primerlerden 21 adedi ön optimizasyon çalışmalarında başarılı bulunmuş ve nihai olarak araştırma başarılı bulunan bu primer moleküler çalışmalarda kullanılmıştır (Tablo3).

**Tablo 1.** Araştırmada morfolojik ve moleküler karakterizasyonu yapılan cin mısır saf hatları ve bazı özellikleri

Sıra No	Adı	Saf Hattın Orjini	Tane Rengi
1	Antcin-01	Aydın Populasyonu	Sarı
2	Antcin-02	Antalya Populasyonu	Sarı
3	Antcin-03	Ankara Populasyonu	Sarı
4	Antcin-04	USA P 208 hattı	Sarı
5	Antcin-05	USA P 206 hattı	Sarı
6	Antcin-06	USA HP 72-11 hattı	Sarı
7	Antcin-07	USA HP 6807 hattı	Sarı
8	Antcin-08	USA HP 301 hattı	Sarı
9	Antcin-09	USA HP 301 hattı	Sarı
10	Antcin-10	Cin mısır populasyon ıslahı	Sarı
11	Antcin-11	Aydın populasyonu	Sarı
12	Antcin-12	Almanya 1702-2 hattı	Sarı
13	Antcin-13	Almanya 1702-2 hattı	Sarı
14	Antcin-14	Aydın populasyonu	Sarı
15	Antcin-15	USA P 208 hattı	Sarı
16	Antcin-16	USA HP 6807 hattı	Sarı
17	Antcin-17	Ankara populasyonu	Sarı
18	Antcin-18	Yerli populasyon X Yugoslav Populasyon melezi	Sarı
19	Antcin-19	Antalya populasyonu	Sarı
20	Antcin-20	Ankara populasyonu	Sarı
21	Antcin-21	Antalya populasyonu	Sarı
22	TCK-51	Cin mısır Populasyon ıslahı	Sarı
23	TCK-52	Cin mısır Populasyon ıslahı	Sarı
24	TCK-53	Cin mısır Populasyon ıslahı	Sarı
25	TCK-58	Cin mısır Populasyon ıslahı	Sarı
26	TCK-65	Cin mısır Populasyon ıslahı	Sarı
27	TCK-66	Cin mısır Populasyon ıslahı	Sarı
28	TCK-78	Cin mısır Populasyon ıslahı	Sarı
29	TCK-83	Kompozit Varyete Islahı	Sarı
30	Antcin-30	Cin mısır Populasyon ıslahı	Sarı
31	Antcin-31	Cin mısır Populasyon ıslahı	Sarı
32	Antcin-32	Antalya Populasyon	Sarı
33	Antcin-33	Antalya Populasyonu	Sarı
34	Antcin-34	Konya Populasyonu	Sarı
35	Antcin-35	Aydın Populasyonu	Sarı

**Tablo 2.** CTAB Ekstraksiyon Buffer

Sol	100 ml için	Stok	Final Conc
NaCl	28 ml	5 M	1.4 M
EDTA (pH=8)	4 ml	0.5 M (pH=8)	20 mM
Tris HCl (pH=8)	10 ml	1 M (pH=8)	20 mM
CTAB	2 gr		% 2
2- Mercaptoethanol	2 mL		% 2

**Tablo 3.** Araştırmada kullanılan primerler ve baz dizilimleri

No	Primer adı	Nükleotid Dizilimi (5' den 3' )
1	Bnlg149	*F- CATCCTCCAAAAGCACTACGT **R- CAGCTGTCCGACACTTATTCTGTGA
2	Umc 1035	*F- CTGGATGATCACGCTATGTATG **R-TAACATCAGCAGGTTTGCTCATTC
3	Umc 2116	*F- CGGTCGATATAATCTTGGCTGATT **R- GGCGCAGAGATCATTGTTTAAT
4	Umc 2245	*F- GCCCTGTTATTGGAACAGTTTACG **R- CGTCGTCTTCGACATGTACTTCAC
5	Phi 090	*F- CTACCTATCCAAGCGATGGGGA **R- CGTGCAAATAATCCCCGTGGGA
6	Umc 1736	*F- CCATCCACCACTAGAAAGAGAGGA **R- TTAATCGATCGAGAGGTGCTTTTC
7	Umc 2255	*F- GCTACGCTTAAAGTATCACGGCAAC **R- CTGCTGAGGAGAAGTGATCCTGTT
8	Umc 2262	*F- TCTGTTCCGGATTCTTCTTCAGTC **R- CGTTCCTGGTACCCTGTCTATAA
9	Phi 053	*F- CTGCCTCTCAGATTCAGAGATTGAC **R- AACCAACGTAACCTCCGGCAG
10	Umc 2281	*F- CAATGATTGGAGCCTAACCCCT **R- ATGATGATCTGCAGAGCCTAGTCC
11	Umc 2280	*F- TTTTCGTCAACTTGATGTTTATGAGAGT **R- AAAAGAAGACGCTTTGTTGTTGC
12	Umc 2292	*F- AGCAGAAGAGGACAAACCAGATTC **R- ACTTCCGGCATGTCTTGTGTTT
13	Umc 2302	*F- GCATATGCGAGATCATATCGTTGA **R- CTATACAGCCCTCAGCTCTGCTGT
14	Phi 085	*F- AGCAGAAGGCAAGGGCTACT **R- TTTGGCACACCACGACGA
15	Umc 1656	*F- AGTTTTGACCGCGCAAAAGTTA **R- GTACGAGCAGGCCATTAACCC
16	Umc 1241	*F- TGAAGCAAGTCACTGGTAAGAGCA **R- TGACACACCATACTTCCAACAAG
17	Bnlg 1176	*F- ACTCCTCAAAACCTAGGTGACA **R-CACCGATGATGGTGAGTACG
18	Phi 015	*F- GCAACGTACCGTACCTTTCCGA **R- ACGCTGCATTCAATTACCGGGAAG
19	Umc 1636	*F- CATATCAGTCGTTCCGTCAGCTAA **R- GTACTGGTACAGGTGCTCGCTCTT
20	Phi 041	*F- TTGGCTCCCAGCGCCGCAAA **R- GATCCAGAGCGATTGACGGCA
21	Mmc 0501	*F-TGCTGAACACTCTAAGCAATAC **R-ATTACTTACTCGCTGCCTG

### 2.3. PCR koşulları

PCR reaksiyonları Warburton [17]'nin yapmış oldukları çalışmaya göre modifiye edilerek oluşturulmuştur. PCR reaksiyonu toplam 10 ul olacak şekilde aşağıdaki bileşenlerden meydana gelmiştir. Reaksiyon koşulu 2.0 µl DNA (20 ng DNA), 0.2 µl dNTP (0.1 mM dNTPs), 1.5 µl MgCl<sub>2</sub> (2.5 mM MgCl<sub>2</sub>), 0.2 µl Taq (0.6 U Taq DNA polymerase), 1.0 µl her bir primer (0.3 µM her bir primer), 1.0 µl (1 X ) PCR buffer ve 3.8 µl H<sub>2</sub>O şeklinde oluşturulmuştur.

PCR protokolu Warburton [17]'nin yapmış oldukları çalışmaya göre modifiye edilerek oluşturulmuştur. PCR protokolü, 94 °C'de 2 dk, ardından 30 döngü olacak şekilde, 94°C'de 30 sn, 56°C'de 1 dk, 72°C'de 1dk ve son olarak 72°C'de 5 dk şeklindedir ve son

olarak 4 °C'de durdurulur. PCR ürünleri, % 2.5' lik yüksek çözünürlüklü Agaroz jelde yürütülmüş ve 100 bp Ladder DNA kullanılarak elde edilen bantların büyüklükleri belirlenmiştir. Jel, ethidium bromide (0.2 µl/ml) boyanarak, Kodak GelLogic 200 sistemi ile görüntülenmiştir.

Moleküler analizler için, jel görüntüleme sisteminde alınan görüntüler, allel görüntüsü alınan baz çifti uzunluğuna göre değerlendirilmiştir. SSR verileri Excel programında hazırlanarak CONVERT [18] programı vasıtasıyla veriler dönüştürülerek POPGENE [19] bilgisayar paket programında analize tabii tutulmuştur. Analizde genetik benzerlik matrisleri Nei [20]'e göre hesaplanmıştır (Tablo 5). Hatların genetik uzaklıklarını gösteren UPGMA (tartısız eşli grup metodu) dendogramı Nei [20]'e göre oluşturulmuştur (Şekil 1).

### 3. Bulgular

Yapılan moleküler çalışmada elde edilen değerler ile oluşturulan dendogram Şekil 1'de verilmiştir. Dendogramın incelenmesinden de anlaşılacağı üzere, çalışmada kullanılan cin mısır hatları 2 ana olmak üzere 5 gruba ayrılmıştır. Kullanılan materyalden 1 nolu hat tek başına 1. grubu ve 7 numaralı hat tek başına 4. grubu oluşturmuştur. KTAE'ne ait hatlar genel olarak 3. grupta toplanırken 22 ve 27 numaralı hatlar 33 numaralı hat ile birlikte 5. grupta yer almıştır.

Araştırma, 35 kendilenmiş mısır hattı için başarılı bulunan 21 adet primer ile sonuçlandırılmış ve toplam 41 adet allel üretilmiştir. Ortalama SSR lokusu başına 1.95 allel saptanmıştır. Allel sayısı en az 1 ile Phi 015, Phi 041, Phi 090, Umc 1656, Umc 2116, Umc 2280, Umc 2292 ve Umc 2302 primerinden tespit edilirken, en fazla allel 3 adet ile Bnlg 1176, Umc 1241, Umc 1636, Umc 2245, Umc 2255 ve Umc 2281 primerlerinden elde edilmiştir (Tablo 4). Çalışmada kullanılan SSR primerlerinde yaklaşık allel uzunlukları 100 ile 210 baz çifti arasında değişmiştir. Allel büyüklüğü en kısa 100 bç MMC 0501, Phi 015, Phi041, Umc 1656, Umc 2262 ve Umc 1241 primerlerinden elde edilirken, en uzun allel uzunluğu ise 210 baz çifti ile Bnlg149 ve Umc 1636 lokuslarından elde edilmiştir [Tablo 4].

35 adet kendilenmiş cin mısır hattından elde edilen genetik benzerlik değerleri Tablo 5'de verilmiştir. Hatlar arasında genetik benzerlik katsayıları 0.44-0.95 değerleri arasındadır. En yakın genetik benzerlik 0.95 oran ile 9 ve 28 nolu hatlar arasında bulunurken, en uzak benzerlik 0.44 oranı ile 1 ve 23 nolu hatlar arasında tespit edilmiştir.

Çalışmada kullanılan primerler ile UPGMA metoduna göre oluşturulan dendogram ile hatların orjinlerini karşılaştırdığımızda; kullanılan primerlere göre elde edilen dendogramda oluşan gruplarla hatların orijin grupları arasında kısmen benzerlik olduğu

görülmüştür. Almanya orjinli 12 ve 13 numaralı hatlar birlikte 3. grupta yer almışlardır. Antalya popülasyonu orjinli beş adet hattın (2,19,21,32 ve 33 nolu hatlar) üç adedi (19,21 ve 32 nolu hatlar) aynı grupta yer almıştır. Aynı şekilde Ankara popülasyonu orjinli üç adet hattın (3, 17 ve 20 nolu hatlar) iki adedi (17 ve 20 nolu) aynı grupta yer almışlardır. KTAE'ne ait sekiz adet hattın (22,23,24,25,26,27,28 ve 29 nolu hatlar) altı adedi (23,24,25,26,28 ve 29 nolu hatlar) aynı grupta yer almıştır. Çalışmada kullanılan materyallere ait orijin bilgileri 1980'li yıllara dayalıdır. O yıllardan bugüne kadar hatların genetik yapısının değişmiş olma ihtimali vardır ve aynı orijin bilgisine sahip hatların farklı gruplarda yer almasının temel nedeni bu durum olabilir.

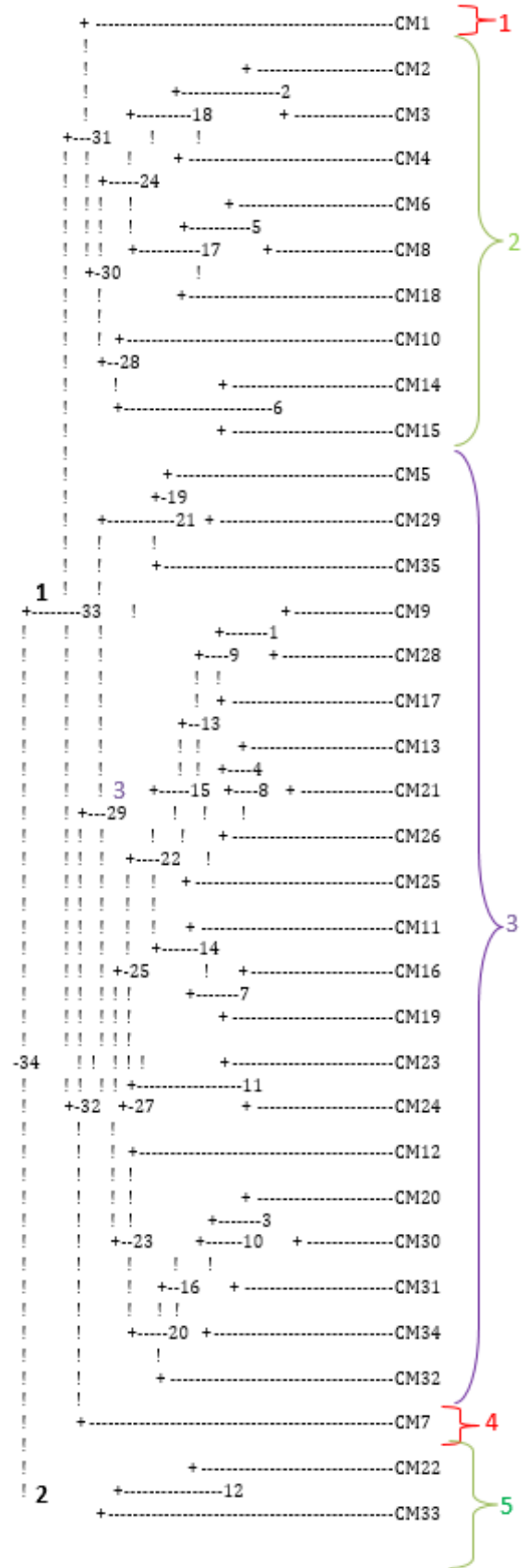
SSR primerleri kullanılarak genetik olarak benzerlik durumlarına göre oluşturulan dendogram ve hesaplanan benzerlik katsayı değerlerine göre; genotipler arasında genetik varyasyonun olduğu tespit edilmiştir.

#### 4. Tartışma ve Sonuç

Cin mısır ve diğer mısır varyetelerinin moleküler karakterizasyonunu konu edinen çeşitli araştırmalar yapılmıştır.

Bulgaristan germplazmı içerisinde 51 adet kendilenmiş mısır hattı ile genetik uzaklığı tespit etmek için yapılan çalışmada 18 adet SSR primeri kullanılmıştır. Kullandıkları materyali 2 ana gruba ayıran araştırmacılar kullandıkları primerlerden toplamda 163 adet allel üretildiğini bildirmişlerdir [21]. SSR primerler kullanarak genetik çeşitliliği tespit etmek amacıyla yürütülen çalışmada araştırmacılar 25 cin mısır genotipi ve 23 SSR primeri kullanmışlardır. Araştırmacılar cin mısır genotipleri arasında genetik çeşitlilik tespit etmişler ve genotipleri 4 gruba ayırmışlardır [22]. Farklı ülkelerden temin edilmiş olan 10 adet cin mısır hattında genetik çeşitliliği tespit etmek amacı ile Brezilya'da yürütülen çalışmada araştırmacılar 51 adet primer kullanmışlardır. Araştırmacılar cin mısır hatlarını 4 gruba ayırmışlardır [23]. Türkiye'deki yerel mısır popülasyonlarının morfolojik ve moleküler karakterizasyonunu tespit etmek için çalışmada 13 SSR primeri kullanmış ve zengin bir genetik çeşitlilik tespit etmiş ve popülasyonların iki ana grupta toplandığını tespit etmiş ve allel sayısını 2-5 arasında olduğunu bildirmiştir [13]. Cheng-Lai [24] yaptıkları çalışmada, mısır saf hatlarının germplazm sınıflandırılması için 112 adet SSR markörü kullanmışlardır. Çalışmalarında verileri UPGMA metodu ile analiz etmişler ve filogenetik ilişkiyi bildirmişlerdir. Brezilya'da sekiz farklı germplazm bireyleri içerisinde S6 seviyesindeki cin mısır hatlarının genetik çeşitliliğini tahmin etmek için yapılan çalışmada 51 adet SSR primeri kullanılmıştır. Araştırmacılar kullandıkları primerlerden 15 tanesinin polimorfik olduğunu ve toplamda 45 adet allel tespit etmişlerdir. Araştırmacılar çalıştıkları

materyali 5 gruba ayırmışlardır [25]. Araştırmamızda elde edilen bulgular önceki çalışmalar ile uyum içerisindedir.



**Şekil 1.** Moleküler veriler kullanılarak oluşturulan tartışız eşli grup metodu (UPGMA) analizine göre, genotiplerin genetik uzaklık oranlarını gösteren dendogram

**Tablo 4.** Çalışmada kullanılan primerlerin allel sayısı, allel büyüklüğü ve PIC değerleri

No	Primer	allel sayısı (adet)	allel büyüklüğü (bç)	PIC değeri
1	MMC 0501	3	100-170	0,42
2	Bnlg 149	2	200-210	0,03
3	Bnlg 1176	3	150-190	0,26
4	Phi 015	1	100	-
5	Phi 041	1	100	-
6	Phi 053	2	180-200	0,16
7	Phi 085	2	195-200	0,19
8	Phi 090	1	110	-
9	Umc1035	2	170-190	0,36
10	Umc1241	3	100-120	0,39
11	Umc1636	3	190-210	0,45
12	Umc1656	1	100	-
13	Umc1736	2	140-150	0,34
14	Umc2116	1	120	-
15	Umc2245	3	110-130	0,46
16	Umc2255	3	110-130	0,50
17	Umc2262	2	100-110	0,33
18	Umc2280	1	110	-
19	Umc2281	3	130-150	0,55
20	Umc2292	1	150	-
21	Umc2302	1	110	-
	Toplam	41	--	--
	Ortalama	1,95	--	0,21

Remington [26], toplamda 102 adet saf mısır hattında 47 adet SSR primeri kullanarak genetik uzaklık tespiti çalışması yapmışlardır. Çalışmalarında lokus başına ortalama allel sayısını 6.85 olarak tespit etmişlerdir. Warburton [17] tarafından, SSR markörleri ile 7 CIMMYT popülasyonu ve 57 saf hat üzerinde genetik çeşitlilik çalışması yapılmıştır. Bu çalışmada, 85 adet

SSR primeri kullanılmış ancak 53 tanesi ile en fazla ayırım yapıldığı ve gelecekteki rutin DNA parmak izi çalışmalarında kullanılabileceği tespit edilmiştir. Li [27], 56 adet cin mısır hattında genetik uzaklık tespiti için SSR primeri kullanmışlardır. Çalışmalarında toplam 306 allel, lokus başına ortalama allel sayısını da 2.71 olarak tespit etmişlerdir. Kullandıkları 56 adet cin mısır hattı arasındaki uzaklığın 0.12 ile 0.73 arasında değiştiğini tespit etmişlerdir. 105 diallel melez ve 15 elit saf hat mısırdan oluşan deneme setinde genetik çeşitliliğin tespiti amacı ile yaptıkları çalışmada, 43 adet SSR primeri kullanmışlardır [28]. Çalışmalarında 15 adet saf hat için 191 bant ve lokus başına 2-9 allel düştüğünü tespit etmişlerdir. 62 adet mısır hattında genetik çeşitlilik tespiti için 20 adet SSR primeri kullanmışlardır. Çalışmalarında lokus başına ortalama allel sayısını 4.9 PIC değerini de 0.61 olarak bildirmişlerdir [29]. 85 adet tropik kökenli mısır hattında yaptıkları çalışmada, 215 adet SSR primeri kullanarak genetik çeşitliliği ele almışlardır. Çalışmalarında en fazla polimorfizm gösterdiğini tespit edilen 35 adet primerden 15 adet primeri test ederek seçmişlerdir. Çalışmalarında hatlar arasında genetik uzaklığın 0.22 ile 1.00 arasında olduğunu bildirmişlerdir [30]. 34 saf mısır hattında genetik uzaklık belirlemek için 30 SSR primeri kullanmışlar ve toplam 133 allelde lokus başına 2-8 allel düştüğünü bildirmişlerdir [31]. 31 cin mısır germplasm bireyi ile yaptıkları çalışmada, 30 SSR primeri kullanmışlardır.

**Tablo 5.** Cin mısır hatları arasında ikili karşılaştırmalarla elde edilen benzerlik katsayıları (%)

No	Hatlar	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1	Antcin-01	1	0.69	0.68	0.79	0.71	0.71	0.65	0.73	0.67	0.67	0.55	0.62	0.72	0.73	0.71	0.58	0.61
2	Antcin-02		1.00	0.95	0.80	0.82	0.87	0.67	0.80	0.63	0.68	0.56	0.72	0.79	0.72	0.66	0.55	0.58
3	Antcin-03			1.00	0.84	0.76	0.81	0.60	0.73	0.56	0.67	0.49	0.76	0.72	0.71	0.64	0.48	0.51
4	Antcin-04				1.00	0.70	0.78	0.70	0.79	0.71	0.66	0.56	0.67	0.84	0.72	0.69	0.63	0.66
5	Antcin-05					1.00	0.80	0.70	0.75	0.81	0.56	0.70	0.73	0.72	0.65	0.62	0.68	0.72
6	Antcin-06						1.00	0.70	0.90	0.62	0.77	0.70	0.65	0.72	0.65	0.74	0.63	0.57
7	Antcin-07							1.00	0.75	0.72	0.62	0.70	0.49	0.72	0.50	0.56	0.83	0.67
8	Antcin-08								1.00	0.77	0.82	0.80	0.68	0.84	0.75	0.80	0.78	0.72
9	Antcin-09									1.00	0.58	0.77	0.69	0.88	0.67	0.61	0.84	0.93
10	Antcin-10										1.00	0.72	0.67	0.68	0.67	0.79	0.60	0.53
11	Antcin-11											1.00	0.68	0.72	0.60	0.67	0.83	0.67
12	Antcin-12												1.00	0.77	0.75	0.67	0.63	0.67
13	Antcin-13													1.00	0.77	0.68	0.80	0.83
14	Antcin-14														1.00	0.90	0.63	0.67
15	Antcin-15															1.00	0.68	0.61
16	Antcin-16																1.00	0.84
17	Antcin-17																	1.00
18	Antcin-18																	
19	Antcin-19																	
20	Antcin-20																	
21	Antcin-21																	
22	TCK-51																	
23	TCK-52																	
24	TCK-53																	
25	TCK-58																	
26	TCK-65																	
27	TCK-66																	
28	TCK-78																	
29	TCK-83																	
30	Antcin-30																	
31	Antcin-31																	
32	Antcin-32																	
33	Antcin-33																	
34	Antcin-34																	
35	Antcin-35																	

**Tablo 5.** Cin mısır hatları arasında ikili karşılaştırmalarla elde edilen benzerlik katsayıları (%) (devam)

No	Hatlar	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
1	Antcin-01	0.58	0.64	0.63	0.79	0.65	0.44	0.61	0.66	0.79	0.68	0.70	0.67	0.61	0.66	0.60	0.58	0.62	0.68
2	Antcin-02	0.70	0.61	0.79	0.74	0.56	0.65	0.81	0.61	0.65	0.63	0.63	0.73	0.85	0.70	0.76	0.49	0.72	0.65
3	Antcin-03	0.63	0.54	0.72	0.72	0.54	0.63	0.74	0.58	0.64	0.62	0.63	0.67	0.79	0.63	0.74	0.52	0.71	0.63
4	Antcin-04	0.62	0.69	0.65	0.89	0.53	0.65	0.76	0.70	0.78	0.59	0.77	0.71	0.70	0.70	0.70	0.57	0.67	0.68
5	Antcin-05	0.68	0.69	0.81	0.69	0.65	0.63	0.78	0.68	0.73	0.67	0.78	0.81	0.73	0.68	0.63	0.58	0.60	0.78
6	Antcin-06	0.78	0.74	0.74	0.72	0.55	0.69	0.73	0.63	0.63	0.59	0.66	0.72	0.78	0.63	0.63	0.48	0.60	0.63
7	Antcin-07	0.63	0.72	0.72	0.69	0.50	0.58	0.59	0.68	0.73	0.62	0.68	0.72	0.63	0.73	0.69	0.48	0.65	0.68
8	Antcin-08	0.86	0.84	0.78	0.82	0.65	0.71	0.76	0.76	0.78	0.63	0.80	0.81	0.81	0.76	0.74	0.63	0.62	0.63
9	Antcin-09	0.68	0.83	0.78	0.82	0.67	0.71	0.84	0.84	0.89	0.59	0.95	0.80	0.70	0.83	0.65	0.65	0.69	0.75
10	Antcin-10	0.65	0.71	0.61	0.69	0.67	0.60	0.60	0.70	0.70	0.61	0.62	0.58	0.65	0.60	0.59	0.65	0.61	0.49
11	Antcin-11	0.63	0.84	0.79	0.67	0.60	0.74	0.68	0.78	0.68	0.64	0.76	0.77	0.73	0.78	0.69	0.68	0.60	0.63
12	Antcin-12	0.58	0.69	0.82	0.72	0.75	0.71	0.76	0.76	0.79	0.72	0.71	0.59	0.79	0.74	0.69	0.66	0.76	0.66
13	Antcin-13	0.70	0.83	0.83	0.92	0.67	0.75	0.89	0.84	0.89	0.63	0.93	0.73	0.84	0.90	0.78	0.60	0.80	0.68
14	Antcin-14	0.63	0.69	0.67	0.78	0.70	0.58	0.73	0.73	0.73	0.72	0.73	0.72	0.73	0.68	0.69	0.73	0.65	0.63
15	Antcin-15	0.68	0.76	0.60	0.69	0.64	0.59	0.65	0.75	0.68	0.62	0.66	0.63	0.65	0.60	0.59	0.68	0.56	0.55
16	Antcin-16	0.67	0.89	0.80	0.73	0.59	0.72	0.71	0.81	0.81	0.60	0.82	0.75	0.71	0.82	0.67	0.62	0.68	0.72
17	Antcin-17	0.65	0.83	0.73	0.77	0.62	0.60	0.75	0.75	0.84	0.54	0.85	0.73	0.65	0.80	0.60	0.58	0.67	0.65
18	Antcin-18	1.00	0.68	0.70	0.68	0.63	0.61	0.67	0.62	0.67	0.60	0.67	0.73	0.72	0.64	0.67	0.51	0.55	0.59
19	Antcin-19		1.00	0.73	0.79	0.59	0.70	0.75	0.84	0.80	0.54	0.83	0.66	0.67	0.78	0.62	0.53	0.62	0.60
20	Antcin-20			1.00	0.75	0.72	0.70	0.80	0.70	0.80	0.76	0.78	0.78	0.94	0.90	0.81	0.65	0.82	0.75
21	Antcin-21				1.00	0.64	0.65	0.81	0.81	0.89	0.65	0.88	0.71	0.76	0.81	0.76	0.57	0.78	0.73
22	TCK-51					1.00	0.47	0.59	0.63	0.78	0.86	0.63	0.57	0.63	0.63	0.53	0.73	0.60	0.58
23	TCK-52						1.00	0.87	0.77	0.62	0.49	0.77	0.65	0.77	0.67	0.61	0.61	0.69	0.67
24	TCK-53							1.00	0.81	0.76	0.55	0.91	0.75	0.86	0.77	0.67	0.62	0.79	0.77
25	TCK-58								1.00	0.86	0.60	0.86	0.65	0.67	0.77	0.62	0.62	0.74	0.72
26	TCK-65									1.00	0.70	0.86	0.70	0.71	0.82	0.67	0.67	0.79	0.77
27	TCK-66										1.00	0.58	0.68	0.70	0.70	0.65	0.75	0.67	0.70
28	TCK-78											1.00	0.80	0.77	0.82	0.72	0.67	0.74	0.77
29	TCK-83												1.00	0.80	0.76	0.75	0.75	0.64	0.80
30	Antcin-30													1.00	0.86	0.82	0.67	0.84	0.72
31	Antcin-31														1.00	0.83	0.62	0.82	0.67
32	Antcin-32															1.00	0.61	0.74	0.61
33	Antcin-33																1.00	0.58	0.67
34	Antcin-34																	1.00	0.79
35	Antcin-35																		1.00

Toplamda 127 allel tespit etmişler ve lokus başına ortalama allel sayısını da 4.23 olarak tespit etmişlerdir [32]. Araştırmada elde edilen allel sayısı; bazı çalışmalar [11; 29; 34] ile benzerlik gösterirken, bazı çalışmaya [13; 18; 26; 28; 30; 31; 32; 33] göre düşük bulunmuştur. Kullanılan genotiplerin ve primerlerin farklılığı, gelişen teknoloji, jel sistemlerinin ayrı olması ve bant skorlama (var, yok ya da genotyper programları gibi) işlemleri farklı allel sayılarının elde edilmesine neden olabilmektedir.

Polimorfizm bilgi içeriği (PIC) allelik çeşitliliği ölçen, kullanılan primerler hakkında temel bilgi veren ve primerin etkinlik derecesini ifade eden bir parametredir ve PIC değeri 0 ile 1 arasında değişim göstermektedir. PIC değeri 0.7 ve üzerinde olursa markırın oldukça yüksek bilgilendirici, oysa değer 0.44 olursa orta derecede bilgilendirici olduğu düşünülmektedir [33]. Çalışmada PIC değerleri 0.03 ile 0.55 arasında değişmiştir ve 0.44 üzerinde ve civarında 8 adet primer tespit edilmiştir (Tablo 4). Bu durumda kullanılan primerlerin çalışılan materyalin akrabalık tespiti konusunda orta derecede bilgi verebileceği düşünülmektedir. Warburton [17], PIC değerini 0.17 ile 0.85, Xu [28] 0.28 ile 0.81 aralığında, Laborda [30], PIC değerlerini 0.24 ile 0.90 aralığında, Cömertpay [13], 0.52 ile 0.95 arasında, Okumuş [34], PIC değerlerini 0.04 ile 0.66 arasında, Pabendon [31], 0.22 ile 0.80 arasında ve Erdal [11], 0.15 ile 0.92 arasında

bulmuşlardır. Çalışmada elde edilen değerler önceki çalışmalar ile uyumludur.

BATEM ve KTAE ait toplam 35 kendilenmiş cin mısır hattında 21 adet SSR primeri kullanılarak yapılan moleküler karakterizasyon çalışmalarında 8 adet primer başarılı bulunmuştur. Genetik benzerlik bakımından bakımından 2 ana olmak üzere toplam 5 adet grup oluşmuştur. Çalışılan primerler ile elde edilen genetik benzerlik değerlerine göre oluşturulan kümeleme analizi sonucunda genetik benzerlik katsayıları 0.44-0.95 değerleri arasında değişmiştir. En yakın genetik benzerlik 0.95 oranı ile 9 ve 28 nolu hatlar arasında bulunurken, en uzak benzerlik 0.44 oranı ile 1 ve 23 nolu hatlar arasında tespit edilmiştir. Elde edilen bulgulara göre hatlar arasında varyasyonun olduğu gözlenmiştir.

Çalışmada kullanılan 21 adet primer başarılı bant üretmiştir. En az sayıda allel sayısı 1'er bantla Phi 015, Phi 041, Phi 090, Umc 1656, Umc 2116, Umc 2280, Umc 2292 ve Umc 2302 primerinden tespit edilirken, en fazla allel sayısı 3'er bant ile Bnlg 1176, Umc 1241, Umc 1636, Umc 2245, Umc 2255 ve Umc 2281 primerlerinden elde edilmiştir. Çalışılan 21 adet SSR primerden PIC değeri 0.44 civarında olan 8 adet primerin (MMC 0501, UMC1035, UMC1241, UMC1635, UMC1736, UMC2245, UMC2255, UMC2281) cin mısırdaki moleküler karakterizasyon çalışmalarında kullanılabileceği ancak karakterizasyon çalışmalarında kesin ve net sonuç

alabilmek için daha fazla SSR primeri ile morfolojik gözlemlerin birlikte değerlendirilmesi gerektiği düşünülmektedir.

Moleküler karakterizasyon çalışmaları sonrasında çalışmada kullanılan BATEM ve KTAE ait kendilenmiş cin mısır hatları arasında genetik bir varyasyon tespit edilmiştir. Bu sonuçlar ile ileride yapılacak olan cin mısır ıslah çalışmalarında mevcut materyalin ümitvar şekilde kullanılabilmesi sonucuna ulaşılmıştır. Çalışılan materyalin içerisinde farklı gruplara giren hatlar arasında yapılacak melezlemelerde üstün heterozis yakalanabileceği öngörülmektedir.

### Teşekkür

Bu çalışma Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü'nde yürütülen Yüksek lisans çalışmasının bir bölümünü içermektedir. 3001 programı kapsamında 1140039 numaralı projeyi maddi olarak destekleyen TÜBİTAK'a teşekkür ederiz.

### Kaynakça

- [1] Brunson, A. M. 1955. Popcorn, in Corn and Corn Improvement, Sprague, G. F., Ed., American Society of Agronomy, Madison, WI, 423.
- [2] Galinat, W.C. 1988. The origin of corn, p. 1-32. In: G.F. Sprague and J.W. Dudley (eds.). Corn and corn improvement. Amer. Soc. Agron., Madison, Wis.
- [3] Anonymous 2015. Popcorn profili, [http://www.agmrc.org/commodities\\_products/grains\\_oilseeds/corn\\_grain/popcorn-profile/](http://www.agmrc.org/commodities_products/grains_oilseeds/corn_grain/popcorn-profile/) (Erişim tarihi: 13.12.2015).
- [4] Dickerson G.W. 2003. Specialty corns, [http://aces.nmsu.edu/pubs/\\_h/h-232.pdf](http://aces.nmsu.edu/pubs/_h/h-232.pdf), (Erişim tarihi 06.01.2014).
- [5] Cruz, C.D., Regazzi, A.J. and Carneiro, P.C.S. 2004. Modelos biometricos aplicados ao melhoramento genetico. Ed:Editora UFV, 1: 480.
- [6] Shull, G.H. 1914. Duplicate Genes for Capsule Form in Bursa Bursa-Pastoris. J. Ind. Abst. Vererb. 12,97-149.
- [7] Crow, J.F., 1948. Alternative Hypotheses Of Hybrid Vigor. Genetics, 33, 477-487.
- [8] Shull, G.H. 1908. The Composition of Field Maize. Report of the American Breeders Association. 4, 296-301
- [9] Shull, G.H. 1911. The Genotypes of Maize. Amer. Nat. 45, 234-252.
- [10] East, E. M., 1908. Inbreeding in Corn. Report of the Connecticut Agricultural Experiment Station, 419-428.
- [11] Erdal, Ş. 2014. Kendilenmiş mısır hatlarının kuraklık stresine tolerans düzeylerinin belirlenmesi ve moleküler karakterizasyonu.

Süleyman Demirel Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Isparta.

- [12] Mohammadi, S. A. and Prasanna, B. M., 2003. Analysis of Genetic Diversity in Crop Plants—Salient Statistical Tools and Considerations. Crop Science, 43,1235-1248.
- [13] Cömertpay, A. 2008. Yerel mısır populasyonlarının morfolojik ve dna moleküler işaretleyicilerinden ssr tekniği ile karakterizasyonu. Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Adana.
- [14] Matsuoka Y., Vigouroux, Y., Goodman, M.M., Sanchez, J., Buckler, E., and Doebley, J. A. 2002. Single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping, Proceedings of the National Academy of the USA 99(9), 6080-6084.
- [15] Powel, W., Morgante, M., Andre, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingey, S., and Rafalski, A. 1996. The Comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) Markers for Germplasm Analysis. Molecular Breeding 2 (3), 225-238.
- [16] Aldrich, J., and Cullis, C. A. 1993. RAPD analysis in flax: optimization of yield and reproducibility using KlenTaq 1 DNA polymerase, chelex 100, and gel purification of genomic DNA. Plant Molecular Biology Reporter. 11 (2), 128-141
- [17] Warburton, M.L., Xianchun, X., Crossa, J., Franko, J., Melchinger, A.E., Frisch, M., Bohn, M. and Hoisington, D. 2002. Genetic characterization of CIMMYT inbred maize lines and open pollinated populations using large scale fingerprinting methods. Crop Science, 42(6), 1832-1840.
- [18] Glaubitz, J.C. 2004. CONVERT: A user-friendly program to reformat diploid genotypic data for commonly used population genetic software packages. Molecular Ecology Notes, 4, 309-310.
- [19] Yeh, F.C., Yang, R.C., Boyle, T.B.J., Ye, Z.H. and Mao, J.X. 1997. POPGENE, The user-friendly shareware for population genetic analysis, Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Canada.
- [20] Nei M. 1972. Genetic distance between population. The American Naturalist, 106 (949), 283-292.
- [21] Kostova, A., Todorovska, E., Christov, N., Sevov, V., and Atanassov, A.I. 2006. Molecular characterization of Bulgarian maize germplasm collection via SSR markers. Biotechnol. & Biotechnol, 20 (2), 29-36
- [22] Da Silva, T.A., Pinto, R.J.B., Scapim, C.A., Mangolin, C.A., Machado, M.F.P.S., and Carvalho, M.S.N. 2009. Genetic divergence in popcorn genotypes using microsatellites in bulk genomic

- DNA.Crop Breeding and Applied Biotechnology 9(1), 31-36.
- [23] Dandolini, T.S., Scapim,C.A., Amaral J.,A.T., Mangolin, C.A., Machado, M.F.P.S., Mott, A.S. and Lopes, A.D. 2008. Genetic divergence in popcorn lines detected by microsatellite markers. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 8(4), 313-320.
- [24] Cheng-Lai, W., Qian,-Qian, Z., Bing-Zue, D., Sheng-Fu, L., and Chun-Qing, Z. 2010. Analysis of Genetic Structure and Relationships of Maize Inbred Lines in China, *Acta Agronomica Sinica*, 36 (11): 1821-1831.
- [25] Trindade, A.P.R., Pinto, R.J.B., Amaral Júnior, A.T., Mangolin,C.A., Machado, M.F.P.S., and Scapim,C.A. 2010. Genetic diversity of breeding popcorn lines determined by SSR markers. *Electronic Journal of Biotechnology*, 13(1), 1-11.
- [26] Remington,D.L., Thornberry, J.M., Matsuoka, Y., Wilson, L.M., Whitt, S.R., Doebley, J., Kresovich, S., Goodman, M.M., and Buckler E.S. 2001. Structure of Linkage disequilibrium and phenotypic associations in the maize genome.PNAS, 98 (20), 11479-11484.
- [27] Li, Y.L., L.V., D.B., Wang, Y.Z., Chen, S.J., and Tang, J.H. 2004. Study on genetic diversity of popcorn inbred and their germplasm relationship with normal corn inbreds using SSRmarker. *Maydica*, 49, 327-333.
- [28] Xu, S.X., Liu, J., and Liu, G.S. 2004. The use of SSRs for predicting the hybrid yield and yield heterosis in 15 key inbred lines of Chinese maize, *Hereditas*, 141, 207-215.
- [29] Beyene Y., Botha, A.M., and Myburg, A.A. 2005. A comparative study of molecular and morphological methods of describing genetic relationships in traditional ethiopian highland maize, *African Journal of Biotechnology*, 4(7), 586-595.
- [30] Laborda, P.R., Oliveira, K.M, Garcia, A.A.F., Paterniani, M.E.A.G.Z., and Souza, A.P. 2005. Tropical Maize Germplasm: What Can We Say About Its Genetic Diversity In The Light of Molecular Markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 111: 1288-1299.
- [31] Pabendon, M.B., Mejayaa, M.J., Koswarab J, and Aswidinnoorb, H. 2009. Ssr-Based Genetic Diversities Among Maize Inbred Lines And Their Relationships With F1 Phenotypic Data Of Mr4 And Mr14 Testcrosses. *Indonesian Journal of Agriculture*, 26,69-77.
- [32] Da Silva,T.A., Cantagalli, I.,B., Saavedra, J., Lopes, A.D., Mangolin, C.A., Machado, M.F.P. and Scapim, C.A. 2015. Population structure and genetic diversity of Brazilian popcorn germplasm inferred by microsatellite markers. *Electronic Journal of Biotechnology*, 18(3),181-187.
- [33] Hildebrand, CE; Torney, DC; and Wagner, RP; 1992. Informativeness of polymorphic DNA markers. *Los Alamos Science* 20:100-102.
- [34] Okumuş, A., Öz, A., Mercan, L., ve Kapar, H. 2009. Kendilenmiş At Dişi Mısır Hatlarında Moleküler Genetik Analiz (SSR) Yöntemi İle Yüksek Verimli Muhtemel Hibrit Anaçlarının Belirlenmesi, TÜBİTAK 1050504 nolu projenin sonuç raporu.