BÖLÜM 9

SEBZE TOHUM VE FİDELERİNDE GENETİK SAFLIK

Özhan ŞİMŞEK[1]
Halit YETİŞİR[2]
Hakan FİDAN[3]

[1]Doç. Dr., Erciyes Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü, Melikgazi -Kayseri

[2]Prof. Dr., Erciyes Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü, Melikgazi -Kayseri

[3]Doç. Dr., Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü, Antalya

1. GİRİŞ

Bitkisel üretimde kullanılacak olan tohum ve fide gibi materyaller adına doğru ve hem fiziksel hem de genetik olarak ticari sınırların üstünde saf olmalıdır. Tohumlardaki veya fidelerdeki fiziksel karışımlar ve genetik saflığın yeterli düzeyde olmaması üretimde standart, verimli ve kaliteli bir sonucu kıstlayacak olan en önemli faktördür. Tohumun fiziksel sağlığının yetersizliği yetiştiricilik, hasat ve paketleme anındaki yetersizlikler ve ihmallerden kaynaklanabilir. Tohumun fiziksel saflığı yeterli olmasına rağmen tohum gücünde ve fide gücünde sorunlar görülebilir. Tohum hasat edildikten sonra kalite özelliklerine (büyüklük, ağırlık, renk vb.) göre sınıflanmadığı durumlarda çimlenme, çıkış ve fideye dönüşümde heterojen sonuçlarla karşılaşılabilmektedir. Diğer taraftan heterojenitye (tip dışı fideler) sebep olan konu ise çeşitlerin/ebeveyn hatların ıslah sürecinde yeterince saflaştırılmaması veya tohum üretimi anında polen bulaşmalarının (özellikle açık tozlanan türlerde) olmasıdır. Fide üretiminde ortaya çıkabilecek sorunlardan olan 'adına doğru olmama', 'karışık olma' ve 'fizyolojik heterojenlik' sorunları, üretici ile fide üreten işletmeler arasında sorunlara sebep olabilmektedir. Bu bölümde tohum ve fidede saflığın önemi, fiziksel saflık, fizyolojik homojenite, genetik saflık ve test yöntemleri hakkında bilgi verilmiştir.

2. SEBZE TOHUM VE FİDELERİNDE SAFLIĞIN ÖNEMİ

Tohum testi, tohumların kalitesini değerlendirmeye yardımcı olan ve tohumların gerçekten ekilebilir nitelikte oldukları ile ilgili yol gösteren bilimsel yöntem topluluğudur. Başlangıçta her ne kadar ekonomik tarla ve bahçe bitkileri tohumları için geliştirilmiş olsa da tohum testi, günümüzde birçok farklı türe ait tohum kalitesini belirlemek için eşit derecede değerlidir. 'Tohum kalitesi' terimi, ekim için tohumun toplam değerini yansıtmak için kullanılır; bu nedenle, üretimin temel birimi olarak tohumun rolü, canlılığı tohum kalitesinin belki de en yaygın olarak tanınan yönünü ifade eder. Fiziksel saflık bilgisi, muhtemelen tohumların test edildiği en önemli ikinci faktördür. Bu, inert maddeden (yabancı madde) ve ayrıca yabani otların veya diğer mahsullerin tohumlarından arî olmasını ifade eder. Kalitenin diğer yönleri arasında canlılık, tohum kaynaklı hastalıklardan arîlik, yabani ot tohumlarının bulunmaması, nem içeriği ve çeşit veya genetik kimlik ve saflık yer alır. Tohumların tarımsal kullanımı tarihi kayıtlardan önceye dayanmasına rağmen, tohum testi sanatı ve bilimi ancak son yüzyılda gelişmiştir. İlk tohum test laboratuvarı 1869'da Almanya'nın Saksonya kentinde, Amerika'da 1876'da Connecticut Tarımsal Deney İstasyonu'nda; Kanada'daki ilk laboratuvar ise

1902'de Ottawa'daki istasyonda kurulmuştur. Günümüzde resmî tohum test laboratuvarlarının çoğu ABD'de yer almakla birlikte, dünyanın hemen hemen her ülkesinde bulunmaktadır. Ayrıca tüm dünyada özel olarak işletilen birçok ticari tohum test laboratuvarı bulunmaktadır (Elias ve ark., 2012).

Pek çok tohumlu bitki, yaklaşık 10 bin yıl önce, tarımın başlangıcından beri kültüre alınmış ve yetiştirilmiş olup o zamandan beri insan ve hayvanların beslenmesinde hayati rol oynamaktadır. Bitkisel üretimde iki gamet hücresinin (yumurta hücresi ve polen) birleşmesi ile oluşan tohum, hem üretim hem de genetik çeşitliliğin devamlılığı açısından önemli bir organdır. Tipik bir tohum üç ana bileşenden oluşur: embriyo, besin maddesi (kotiledonlar, endosperm veya perisperm) ve koruyucu bir tohum kabuğu (Sabelli ve Larkins, 2015). Tohumlar, modern tarımda, özellikle bitkisel üretimde elzemdir ve insanlara, hayvanlara gıda sağladığı için ekonomik öneme sahiptir. Tohumlar, küresel gıda tedarikinde önemli bir rol oynar ve insanlar tarafından tüketilen kalorilerin %70'inden fazlasını ve hayvan yemlerindeki günlük ihtiyacı karşılamaktadır (Sreenivasulu ve Wobus, 2013). Bitkisel üretim yöntemlerinden biri olan 'fide ile üretim'de tohum kalitesi (genetik, fiziksel, fizyolojik) çok önemlidir. İster eşeyli ister eşeysiz üretim olsun üretilen materyalin adına doğru ve homojen olması istenir. Üretimde kullanılacak tohumlar yabancı maddelerden arî, fizyolojik olarak olgun ve genetik yapısı homojen olmalıdır. Tohum fizyolojisi, tohumların kalitesini, olgunlaşmasını, dinlenmesini, çimlenmesini ve uzun ömürlülüğünü içermektedir. Ticari fide üretiminde sağlıklı ve homojen bir çimlenme, çıkış ve bitkiye dönüşüm fide üretiminde temel gerekliliktir. Tohum çimlenmesi doğal veya bitkisel üretim sistemlerinde bitkiye dönüşümü tanımlayan ve bitki genetik kaynaklarının etkili bir şekilde korunmasını sağlayan önemli biyolojik ve tarımsal özellikleri sembolize eder (Gupta ve ark., 2022). Çok önemli bir olay olan tohum çimlenmesi ve fide oluşumu su alımı, hücre bölünmesi, hücresel metabolizmalar ve kök çıkışı gibi olayları içerir. Tipik çimlenme, üretim koşulları, genetik yapı, tohum fizyolojik olgunluğu, depolama koşulları, tohumun yaşı ve çevresel faktörlerin etkisi altındadır. Doğal koşullarda, tohumlar çevresel koşulları algılar ve hayatta kalma olasılıkları maksimum olduğunda çimlenir. Tarımsal üretim söz konusu olduğunda da uygun tohum çimlenmesini ve fide büyümesini sağlamak, gıda güvenliğini sağlayabilmek amacıyla araştırıcıların, çiftçilerin ve tohum şirketlerinin ana hedeflerinden biri olmuştur. Ticari yetiştirme programları, bitki homojenliği ile sonuçlanan hızlı, homojen ve tam çimlenme talep etmektedir (Chen ve Arora, 2013). Günümüzde sebzecilikte fide üretimi, adına doğru ve fizyolojik olgunluğu sağlamış olan tohumlar

ile türlerin istedikleri çevresel koşullar sağlanarak yapılmaktadır. Yeterli tohum çimlenmesi ve erken/hızlı fide oluşumu, tohumların kalitesine bağlı olan tohumların yüksek canlılığı ile elde edilebilir (Ellis, 2004). Tohumların kalitesi olgunlaşma, hasat, kurutma, paketleme ve depolama gibi çeşitli faktörlere bağlıdır. Tohumların kalitesi, yetiştirme, ıslah ve tohum muameleleri gibi temel yaklaşımlar kullanılarak iyileştirilebilir [örn., fizyolojik (tohum hazırlama, kaplama), fiziksel (manyetik ve radyasyon) ve biyolojik (faydalı mikroorganizmalar)] (Halmer, 2008; Sharma ve ark., 2015). Ticari fide üretiminde kullanılacak tohumlar fiziksel olarak saf, fizyolojik olarak homojen olgunlukta, adına doğru ve hastalık/zararlılardan arî olmalıdır. Günümüzde hizmet alımı şeklinde yapılan fide üretiminde fidelerin homojenitesi (genetik/fizyolojik) konusunda üreticiler ile fide yetiştiricileri arasında bazı sorunlar yaşanabilmektedir. Bu sorunların çözümünde ulusal ve uluslararası ve kurumların belirlemiş olduğu test yöntemlerinden yararlanılmaktadır.

Uluslararası Tohum Test Derneği (ISTA), uluslararası kapsamda tohum testine adanmış dünya çapında bir kuruluştur. Hedefleri şunları içerir: (1) tohum testi için kuralların geliştirilmesi, (2) test tekniklerinin standardizasyonu, (3) tohum araştırmaları ve (4) tohum iyileştirme için diğer uluslararası kuruluşlarla iş birliği. ISTA'nın kuruluşu 1900'lerin başlarında, birkaç Avrupa laboratuvarından tohum yetkililerinin farklı ülkelerdeki tohum laboratuvarları arasında daha fazla tohum testi bilgisi alışverişi ve iletişim ihtiyacı hissettiği zaman başlamıştır. Bu dönemde, uluslararası tohum ticareti daha sağlam bir şekilde kuruluyor ve tohum kalitesi kavramlarının ulusal sınırların ötesinde standartlaştırılmasına ihtiyaç duyuluyordu. Bu ihtiyacın giderilmesine yönelik atılımlar ilk olarak birkaç kişinin bir Avrupa tohum testi derneği planlamak için gayriresmi olarak bir araya geldiği Viyana'daki 1905 Botanik Kongresi'nde eyleme geçirilmiştir. ISTA, başlangıcından bu yana mükemmel bir büyüme ve başarı elde etmiş ve hem kapsam hem de temsil açısından dünya çapında etkili bir kurum haline gelmiştir. ISTA 2022 yılı itibariyle 400'ün üzerinde yetkin ve enerjik tohum bilimcisi ve analistinden oluşan uluslararası bir topluluğun kâr amacı gütmeyen iş birliğine dayanmaktadır. Üye laboratuvarların 130'dan fazlası ISTA tarafından akredite edilmiş olup 'ISTA Sertifikası' vermeye yetkilidir. Üyelik, dünyanın dört bir yanındaki üniversitelerden, araştırma merkezlerinden ve tohum test laboratuvarlarından tohum bilimcileri ve analistlerinin çeşitli iş birliği şeklinde gerçekleşmektedir. ISTA'nın dikkate değer başarılarından bazıları aşağıda sıralanmıştır:

1. Laboratuvarlar arasında tohum testi sonuçlarının birörnekliliği sağlanmıştır. Böylece tohumun uluslararası sınırlar boyunca hare-

keti kolaylaştırılmış ve çiftçilerin menşei ülkeden bağımsız olarak mümkün olan en iyi tohuma sahip olmalarına yardımcı olmuştur.

2. Tohum bilimcileri ve araştırıcılarının bir araya gelip tohum testi sorunlarını tartışmaları ve bunlara çözüm bulmaları için düzenlemeler yapılmıştır. Tohum testi kurallarının taslağını hazırlayarak ve bunların yorumlarını tartışarak, dünya çapında üreticileri ve diğer tohum kullanıcılarını korumak için tohum yasalarının çıkarılması için sağlam bir temel sağlanmıştır.

3. Test sonuçları ile tarla performansı arasında sağlıklı bir bağlantının kurulmasına yardımcı olma ve üreticilerin nitelikli tohumlara ulaşmasına destek olma konusunda ilerleme sağlanmıştır.

4. Hızla gelişmekte olan tarım alanlarında tohum testinin teşvik edilmesine yardımcı olmak için Afrika, Asya ve Güney Amerika'da eğitim kursları ve çalıştaylar düzenlenmiştir.

5. Tohum konusundaki bilginin, merkezî bir noktada odaklanması sağlanmıştır (Elias ve ark., 2012).

3. FİZİKSEL SAFLIK

Çimlenme ile saflık testleri, tohum analistleri tarafından gerçekleştirilen en eski ve en yaygın testlerin başında gelmektedir. Bu testlerin amacı, küçük bir temsili çalışma numunesi üzerinde ayrıntılı ve kesin bir ayırma gerçekleştirerek bir tohum partisinin fiziksel bileşimini belirlemektir. Prosedür, numunenin dört bileşene (saf tohum, diğer türlerin tohumu, yabani ot tohumu ve cansız diğer maddeler) ayrılmasından oluşur, böylece her birinin ağırlıkça yüzde bileşimi belirlenebilir. Bir tohum laboratuvarının saflık testi bölümü, aydınlatmaya özel önem verilerek tasarlanmalıdır. Mümkün olduğunca; kuzeye bakan ve masa hizasına kadar aşağıya uzanan büyük pencerelerden gelen doğal gün ışığından yararlanılmalıdır. Bu düzenleme, ek aydınlatma kullanımına en az düzeyde ihtiyaç duyulmasını sağladığı gibi renk, doku ve şekildeki küçük farklılıkların kritik olduğu durumlarda kesin tespitler yapmak için uygundur. Ayrıca doğal ışığın yapay kaynaklardan gelen ışıktan daha az göz yorgunluğuna ve yorgunluğa neden olduğuna inanılmaktadır. Ek ışık gerektiğinde soğuk beyaz tipte bireysel, ayarlanabilir, çok tüplü floresan lambalardan yararlanılabilir. Saflık ayrımları diyafanoskoplarda, çekmeceli ahşap çalışma tahtalarında yapılabilir. Bu tür çalışma tahtaları, birkaç saatlik titiz ve yoğun, özenli çalışma boyunca analiste rahat çalışma imkânı oluşturmak üzere uygun yükseklikteki masalar üzerine yerleştirilmelidir. Bazı laboratuvarlarda, tohum testleri yapan çalışanların bunları iste-

nen herhangi bir yüksekliğe ayarlamasına izin veren masalar ve/veya sandalyeler bulunmaktadır.

Saflık testinde çeşitli grupları birbirinden ayırmak üzere küçük petri kutuları, saat camları, küçük cam şişeler veya jelatin kapsüller gibi çeşitli küçük kaplar kullanılabilir. Tohum partilerinden tesadüfi olarak alınan örnekler, bu kaplara yerleştirilerek tanımlama ve tartım sırasında yabancı ot tohumları veya diğer mahsul tohumları olarak gruplandırılabilir. Laboratuvarlar, çeşitli numune bileşenlerini tutmak ve depolamak için farklı türde zarflar kullanır. Saflık analizi yaparken 'el merceği (büyüteç)' kullanılabileceği gibi, ışıklandırılmış masa büyüteçleri, binoküler stereomikroskoplar da türe bağlı olarak kullanılabilmektedir. Çalışma sırasında büyüteç ile numune arasında yeterli bir çalışma mesafesi ayarlanarak tohum testlerini yapan kişilerin dik oturmasını sağlanmalı ve böylece tohumların elle işleme tabi tutulması için uygun koşullar oluşturulmalıdır. 5x ile 15x arasındaki büyütmeler genellikle tohumlardaki saflık testleri için yeterlidir. Binoküler mikroskoplar masaya veya laboratuvar tezgahları üzerine monte edilmesi sayesinde tohum örneklerinin eğimli olmayan düz bir zeminde, sarsılmadan incelenmesi mümkün hâle getirilebilir.



Şekil 1. Fiziksel saflık analizlerinde tohumların ışıklı platform üzerinde incelenmesi (Elias ve ark., 2012).

Çalışma numunesi öncelikle çalışma alanına yerleştirilmeli ve tohumların türü veya çeşitlerine göre uygun şekilde etiketlendiğinden ve doğru ağırlığa göre alt bölümlere ayrıldığından emin olunmalıdır. Kont-

rol etme aşamasından sonra, saflık testini yapacak kişi tarafından analiz sırasında üfleme veya eleme prosedürlerinin kullanılıp kullanılmayacağını belirlemek için tohum dikkatlice incelenmelidir. Saflık analizinde, incelenen tohum türünden 'yoğunluk bakımından' (üfleyiciler) veya 'boyut özelliği açısından' (elekler) farklı olan cansız madde ve yabancı ot/diğer türlere ait tohumların ayrılmasını kolaylaştırmak için hava basıncı veren üfleyiciler ve titreşimli elekler kullanılmaktadır.

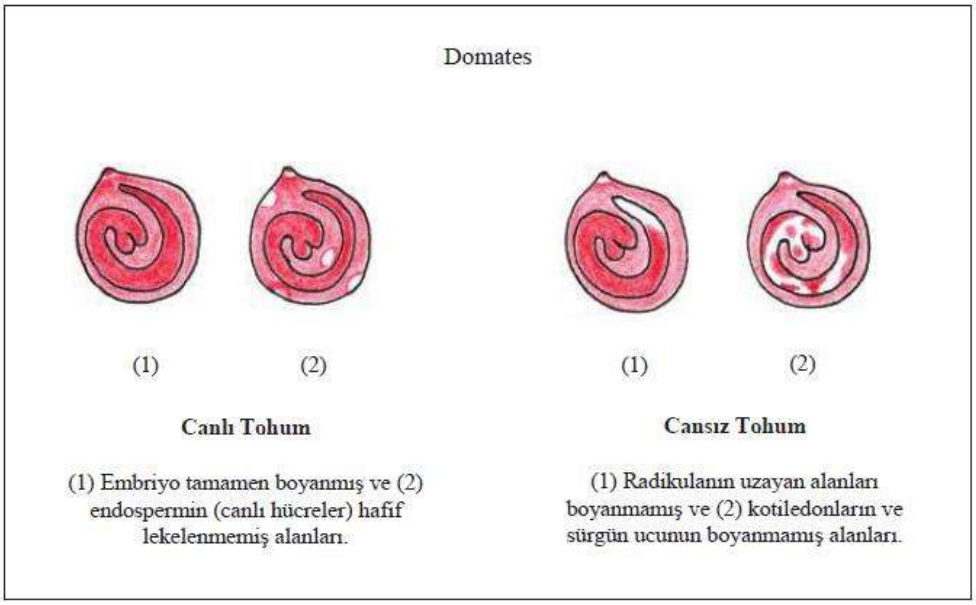
4. FİZYOLOJİK SAFLIK

Tohumların metabolizma ve fizyolojik performans bakımından sağlıklı ve güçlü bitkilere dönüşmesi, fidecilik açısından çok önemlidir. Ancak, fiziksel ve genetik saflık yeterli seviyede olmasına rağmen, her zaman aynı homojenlikte fideler elde edilemeyebilir (Adhikari ve ark., 2022). Bunun sebebi tohumun fizyolojik homojenitesi ile ilgilidir. Yetiştiricilik sırasındaki koşullar, kurutma, paketleme ve depolama anında olabilecek aksaklıklardan dolayı aynı lotta bulunan tohumların fizyolojik olgunlukları farklılık arz edebilmekte ve farklı fide performansları gözlenebilmektedir (Demir ve Ermiş, 2005). Tohum renginde, tohum kabuğu yapısında (kırışıklık vb.) ve büyüklüğündeki bazı farklılıklar tohumun fizyolojik olgunluğu hakkında fikir verebilir. Tohum kabuğu rengi, tohum büyüklüğü ve tohum kabuğu şekli açısından farklılık gösteren tohumlar ve bunların oranı, morfolojik olarak laboratuvar koşullarında belirlenebilir. Çeşide has büyüklük ve tohum rengini almamış tohumları içeren tohum lotlarında 'heterojen tohum ve fide gücü' ile karşılaşılabilir. Tohumların canlılık ve çimlenme testleri farklı yöntemlerle yapılmaktadır. Tohum lotlarındaki tohum ve fide gücü homojenitesi ISTA'nın yayınlamış olduğu kurallar çerçevesinde laboratuvar, sera ve tarla koşullarında yapılmaktadır (ISTA, 2022).

Çoğu zaman tohumların dış yüzeyinde fark edilebilecek herhangi bir farklılık oluşmadığı halde, çimlenme meydana gelmeyebilmektedir. Bu durumda tohumun canlı olup omadığının anlaşılabilmesi için bazı testler yapılmaktadır. Tohum canlılığını test etmek için kullanılan geleneksel yöntemler olan çimlenme testi ve tetrazolyum testi (TZ), oldukça zaman alıcı olduğu kadar tohuma fiziksel olarak da zarar vermekte, kullanılamaz duruma getirmektedir. Bu nedenle, büyük tohum miktarlarını verimli bir şekilde yöneterek etkili sonuç alınabilecek hızlı bir tohum canlılık testine ve sınıflandırma tekniğine ihtiyaç vardır. Tohumun ticari piyasada pazarlanmasından önce tohum kalitesini hızlı ve verimli bir şekilde değerlendirebilecek yöntemlerin geliştirilmesi, günümüzde artan bir ilgi görmektedir (Yasmin ve ark., 2019). Tetrazolyum testi her ne kadar kullanılan en yay-

gın yöntemlerden biri olsa da belirli sınırlamaları vardır. Bunlar arasında; (1) dinlenmede olan tohumu dinlenmede olmayan tohumdan ayırt edememesi, (2) fungal patojenlerle kontamine olmuş tohumları tespit edememesi, (3) fümigasyon zararlanması bulunması halinde bunları tespit edememesi ve (4) eğitim ve beceri gerektirmesi sayılabilir. Bu dezavantajlar ve TZ sonuçlarının yorumlanmasındaki öznellik nedeniyle, TZ testi resmî olarak kabul görmeyen bir test olmaya devam etmektedir. TZ testinde elde edilebilecek görüntüye bir örnek Şekil 2'de sunulmuştur. TZ testinden başka canlılık testleri de mevcuttur. Sivritepe (2011) tarafından özetlenen farklı tohum canlılık testleri aşağıda verilmiştir:

- Diğer Biyokimyasal Canlılık Testleri
  1. Canlı renklendirme yöntemleri
  2. Enzim aktivitesi yöntemleri
  3. Selenit yöntemi
- Diğer Canlılık Testleri
  1. Serbest yağ asitleri testi
  2. Hidrojen peroksit (H_2O_2) testi
  3. Demir klorür ($FeCl_2$) testi
  4. İndoksil asetat testi
  5. Hızlı yeşil test
  6. Sodyum hipoklorit (NaOCl) testi
  7. Elektriksel iletkenlik testi
  8. Çıkarılmış embriyo testi
  9. X-Işını testi



Şekil 2. Tetrazolyum testi sonucunda domatesin canlı ve cansız tohumlarının görüntüsü (Elias ve ark., 2012).

Tohum canlılığının hızlı bir şekilde tespit edilmesi, tohum üreten endüstriler için hızlı karar vermeyi sağlayacak birçok avantaja sahiptir. Tohum kalitesinin belirlenmesi, uygun bir metodoloji ile kesin bir şekilde tohum canlılığının tahmin edilebilmesi, üreticiler için çok anlamlı bir değerlendirmedir. Bu yöntemlerden biri olan FT-NIR (Fourier Transform Near Infrared) spektroskopik analizi yöntemi, canlı ve cansız tohumları belirlemede oldukça etkindir. FT-NIR spektroskopik ile birleştirilmiş kemometrik analiz; basitliği, hızlılığı ve numune hazırlama kolaylığı nedeniyle canlı ve cansız tohumları belirlemek için kullanılan analitik bir yaklaşımdır. FT-NIR spektroskopisinin kimyasal içermeyen, tahribatsız, güvenilir ve hızlı bir teknik olması nedeniyle gıda sektöründe kullanımı gün geçtikçe artmaktadır. FT-NIR, buğdaydaki normal tohumu ayırt etmede (Juhász ve ark., 2005) olduğu gibi ayrıca yapay olarak yaşlandırılmış *Pinus plata* tohumu (Tigabu ve Odén, 2003), turp tohumu (Tai-Gi ve Kang, 2008) ve karpuz tohumunun (Lohumi ve ark., 2013) herhangi biz fiziksel zarar oluşturmaksızın sınıflandırmasında etkili olduğu rapor edilmiştir. Tohumlara zarar vermeksizin, ışın yansımalarına bağlı olarak incelenen tohumların fizyolojik durumlarını tahmin edebilecek yöntemler üzerinde çalışmalara dünya genelinde devam edilmektedir.

5. GENETİK SAFLIK

Genetik saflık, tohum partisinin tür ve çeşidine göre doğruluğu (adına doğru) anlamına gelir. Çeşitleri farklı kılan genetik kimliğin sağlanması önemlidir. Genetik saflık en iyi şekilde, bir tohum lotundaki tip dışı yüzdesinin belirlendiği bir saha denemesi yoluyla değerlendirilebilir. Bir çeşidin adına doğru olmamasına yol açan nedenler; gerçek üretici ve ıslahçı olmayanlar tarafından izolasyon mesafesi veya türün ihtiyaçları göz önüne alınmaksızın farklı şekillerde üretilerek piyasaya sürülen tohumlar olabildiği gibi, F_1 melez bireylerin kendilemesi ile üretilen F_2 generasyonuna ait tohumların piyasaya sürülmesi de olabilir. Bir tohum partisinde tip dışı genotiplerin olma sebepleri; fiziksel karışım, açık tozlanan tohumların üretiminde doğal yabancı tozlanmalar, hibrit tohum üretiminde hatalı emaskülayon ve tozlamalar ya da izolasyon/kontroldeki yetersizlikler olarak sıralanabilir. Tohum şirketleri, sözleşme partilerinin genetik kalitesini değerlendirmek için genellikle her sezon çeşit denemeleri yürütür. Şahit çeşitlerin de katılımı ile morfolojik karakterizasyon incelemeleri yapılan çeşit denemelerinin sonuçlarına göre tohum üretimleri sağlıklı bir şekilde sürdürülür.

Genetik saflık değerlendirmesi, transgenik (GDO) kontaminasyonu belirlemek üzere yapılan taramayı da içerebilir. Özellikle mısır ve

pancar gibi bazı ürünler transgenik materyallerin tespit edilebilmesi amacıyla giderek daha fazla test edilmektedir. Genetik saflık analizleri kurumsal olarak yapıldığı gibi bağımsız laboratuvarlarda da yapılabilmektedir. Organik tohumların GDO testlemeleri zorunlu olmasa da gün geçtikçe bu gurpta da farklı testler talep edilmektedir. Tohum üretimi yapan firmalar, yabancı döllenmeden kaçınmak üzere açık tozlanan türlerde izolasyon mesafelerine uymalıdır. Bir homojenite testi, normal olarak bir tarlada veya serada tekerrürlü olarak bitkinin farklı dönemlerini (fide, vegetatif devre veya bütün hayat döngüsü) kapsayacak şekilde yapılabilir. Bütün hayat döngüsünü kapsayacak şekilde yapılan testler iki yetiştirme sezonu boyunca gerçekleştirilir. Bu süre zarfında bazı morfolojik özellikler kaydedilir. Homojenite testi ister deneme alanında ister serada yapılsın, uluslararası kabul görmüş protokolleri ve UPOV yönergeleri takip edilmelidir (Jördens, 2005). 300'den fazla test kılavuzu günümüzde farklı bitki türleri için mevcuttur ve bu yönergelere https://www.upov.int/resource/en/dus_guidance.html adresinde yer alan UPOV web sitesinden erişilebilir (Erişim tarihi: 22.11.2022).

Karışık tohum lotları veya adına doğru olamayan çeşitler farklı şekillerde belirlenebilmektedir. En bilinen yöntem, morfolojik özellikler esas alınarak yapılan homojenite testidir. Bu testte öncelikle bitkiler yetiştirilir ve tohumdan başlayarak belli özellikleri aynı koşullar altına karşılaştırılarak aynı lottan gelen bitkilerin benzerlikleri ve farklılıkları tespit edilir. Çizelge 1'de fide ile yetiştirilen bazı önemli sebze türlerinde morfolojik homojenite testinde kullanılabilecek özellikler verilmiştir (UPOV, 2022).

Fenotip tabanlı homojenite testi, zaman alıcı, zahmetli (sıklıkla beceri ve yeterli deneyim gerektirir) ve maliyetli bir tarla ve sera değerlendirme sürecidir (Srinivasan, 2004; Wang ve ark., 2016; Jamali ve ark., 2019). Bazı durumlarda, örneğin lahana ve soğanda vernalizasyon gibi, testleri gerçekleştirmek için özel koşullar veya deneme tasarımları gerekir. Ayrıca, test edilecek genotiplerin ve bilinen çeşitlerin sayısı arttıkça, agronomik performansta farklılıklar olsa bile, bunları yalnızca morfolojik özelliklere dayalı olarak ayırt etme yeteneği daha zor hale gelmektedir.

5.1. GELENEKSEL FENOTİPE DAYALI HOMOJENİTE TESTİNİN KISITLARI

Mevcut sistemde, birçok faktör, homojenite testi yapmak için morfolojik özelliklerin kullanımını sınırlamaktadır.

Çizelge 1. Bazı önemli sebze türlerinde fenotipik homojenite testlerinde kullanılabilecek farklı fenolojik dönemlere ait özellikler

Domates	**Biber**	**Karpuz**	**Hıyar**	**Lahana**	**Marul**
Kotiledon şekli	Kotiledon şekli	Kotiledon şekli	Kotiledon şekli	Kotiledon şekli	Tohum rengi
Kotiledon büyüklüğü	Kotiledon büyüklüğü	Kotiledon büyüklüğü	Kotiledon büyüklüğü	Kotiledon büyüklüğü	Kotiledon şekli
Hipokotilde antosiyanin varlığı	Hipokotilde antosiyanin varlığı	Kotiledon renk yoğunluğu	Kotiledon renk yoğunluğu	Hipokotilde antosiyanin varlığı	Kotiledon büyüklüğü
Gövdede tüylülük	Bitki büyüme şekli	Kotiledonda leke varlığı	Kotiledonda leke varlığı	Yaprak şekli	Hipokotilde antosiyanin varlığı
Bitki büyüme şekli	Bitki yüksekliği	Hipkotil uzunluğu	Hipkotil uzunluğu	Yaprak büyüklüğü	Yaprak şekli
Gövdede antosiyanin varlığı	Boğum arası uzunluğu	Büyüme alışkanlığı	Büyüme alışkanlığı	Yaprak rengi	Yaprak büyüklüğü
Boğum arası uzunluğu	Boğum arası uzunluğu	Yaprak duruş şekli	Yaprak duruş şekli	Yaprak renk yoğunluğu	Yaprak rengi
Bitki yüksekliği	Gövdede antosiyanin varlığı	Yaprak uzunluğu	Yaprak uzunluğu	Yaprakta tüylülük	Yaprak renk yoğunluğu
Yaprak duruş şekli	Boğumlarda antosiyanin yoğunluğu	Yaprak uzunluk/ genişlik oranı	Yaprak uzunluk/ genişlik oranı	Bitki yüksekliği	Yaprakta tüylülük
Yaprak uzunluğu	Gövdede tüylülük	Yaprak rengi	Yaprak uç şekli	Bitki çapı (dış yaprakar dahil)	Bitki çapı
Yaprak genişliği	Yaprak duruş şekli	Renk yoğunluğu	Yeşil renk yoğunluğu	Gövde uzunluğu	Bitki yüksekliği
Yaprak şekli	Yaprak uzunluğu	Yaprakta pirimer parçalılık oranı	Yaprakta kabarcıklık	Dış yaprakların duruş şekli	Yaprak duruş şekli
Yaprak büyüklüğü	Yaprak genişliği	Yaprakta sekonder parçalılık oranı	Yaprak kenarında dişlilik	Dış yaprakların büyüklüğü	Yaprakta bölünme
Yaprakta yeşil renk yoğunluğu	Yaprak şekli	Yaprakta kabarcıklık	Yaprak kenarında dalgalanma	Yaprak ayası şekli	Yaprakta antosiyan oluşumu

Çizelge 1 (devam). Bazı önemli sebze türlerinde fenotipik homojenite testlerinde kullanılabilecek farklı fenolojik dönemlere ait özellikler

Domates	Biber	Karpuz	Hıyar	Lahana	Marul
Yaprakta tüylülük	Yeşil renk yoğunluğu	Yaprak sapı uzunluğu	Dişi çiçek açma zamanı	Yaprak ayası duruş şekli	Antosiyan yoğunluğu
Yaprakta kabarcıklık	Yaprakta antosiyanin oluşumu	Çiçeklenme zamanı	Cinsiyet	Yaprak ayasından kabarcıklık	Antosiyan oluşan alan
Yaprakcıkların duruş şekli	Yaprakta antosiyanin dağılımı	Cinsiyet	Boğumda dişi çiçek sayısı	Kabarcıklığın derecesi	Yaprak parlaklığı
Gümüşlenmeye duyarlılık	Yaprakta alacalılık	Dişi çiçek büyüklüğü	Yumurtalık rengi	Kabarcıkların büyüklüğü	Yaprak kalınlığı
Çiçeklenme zamanı	Yaprak kenarında dalgalanma	Çiçek sapı uzunluğu	Partenokarpi	Dış yaprakların rengi	Yaprakta kabarcıklık
Çiçek salkım şekli	Yaprakta kabarcıklık	Yumurtalık şekli	Yumurtalıkta dikenlilik	Rengin yoğunluğu	Kabarcığın büyüklüğü
Çiçek rengi	Yaprakta parlaklık	Yumurtalık büyüklüğü	Diken yoğunluğu	Yaprakta mumsu yapı varlığı	Yaprakta kıvırcıklık
Dişicik borusunda tüylülük	Çiçeklenme zamanı	Yumurtalıkta tüylenme	Diken rengi	Yaprak kenarında dalgalılık	Yaprak kenarında dalgalılık
Çiçek sapında dirsek varlığı	Çiçeğin duruş şekli	Meyve büyüklüğü	Meyve uzunluğu	Baş uzunluğu	Yaprak kenarında dişlilik
Yeşil yaka varlığı	Çanak yaprak rengi	Meyve şekli	Meyve çapı	Baş genişliği	Yaprak kenarında diş derinliği
Yeşil yaka büyüklüğü	Kalikste dişlilik	Meyve kabuğu ana rengi	Meyve uzunluğu/ çapı oranı	Çapın en geniş olduğu yer	Yaprakta damarlanma
Ham meyvede yeşil renk yoğunluğu	Taç yaprak rengi	Ana renk yoğunluğu	Meyve özünün meyve çapına oranı	Boyuna kesitte baş şekli	Yaprakların üst kısmının örtüşme oranı
Ham meyvede yeşil çizgi varlığı	Taç yaprakta ikinci renklenme	Meyve sap bağlantısı büyüklüğü	Meyve enine kesit şekli	Boyuna kesitte taban şekli	Yaprakta yağlanma

Çizelge 1 (devam). Bazı önemli sebze türlerinde fenotipik homojenite testlerinde kullanılabilecek farklı fenolojik dönemlere ait özellikler

Domates	Biber	Karpuz	Hıyar	Lahana	Marul
Olgunlaşma zamanı	Anter rengi	Meyve sap bağlantısı şekli	Meyve sapı bağlantı şekli	Enine kesitte baş şekli	Gövde uzunluğu
Meyve büyüklüğü	Sapçık rengi	Çiçek burnu şekli	Boyun varlığı	Başın kapalılık durumu	Gövde genişliği
Meyve uzunluk çap oranı	Ham meyve rengi	Çiçek burnunda basıklık	Boyun uzunluğu	Kapak yaprağının rengi	Boyuna kesitte şekil
Meyvenin uzunluğuna şekli	Meyve duruş pozisyonu	Stilus yarası büyüklüğü	Meyve kabuk rengi	Kapak yaprağının renk yoğunluğu	Gövde rengi
Meyve sap çukurunda kırışıklık	Meyve uzunluğu	Meyvede olukluluk	Meyvede zemin rengi	Kapak yaprağında antosiyanin oluşumu	Göbek şekli
Meyve sap çukurunda basıklık	Meyve genişliği	Meyve kabuğunda şeritler	Meyvede olukluluk	Başın iç rengi	Göbek büyüklüğü
Meyve sap bağlantısı büyüklüğü	Meyve genişliği	Şeritlerin genişliği	Meyve yüzeyinde kırışıklık	Baş yoğunluğu (sertliği)	Baş şekli
Meyvede stilus izi büyüklüğü	Meyve uzunluk/ genişlik oranı	Şerit şekli	Meyvede siğil varlığı	Başın iç yapısı	Baş büyüklüğü
Meyvede stilus izi şekli	Boyuna kesit şekli	Şeritlerin renk yoğunluğu	Siğil büyüklüğü	Gövdenin başa oranı	Hasat zamanı
Çiçek burnu şekli	Enine kesit şekli	Kabuk kalınlığı	Meyvede çizgililik	Hasat zamanı	Çiçeklenme zamanı
Meyve özünün meyve çapına oranı	Meyvede kıvrılma	Meyve eti rengi	Meyvede lekelilik	Başın yarılma zamanı	Yan dallanma
Meyve eti kalınlığı	Meyve uç kısmında dalgalanma	Meyve eti renk yoğunluğu	Lekelerin dağılımı	Erkek kısırlık	

Çizelge 1 (devam). Bazı önemli sebze türlerinde fenotipik homojenite testlerinde kullanılabilecek farklı fenolojik dönemlere ait özellikler

Domates	**Biber**	**Karpuz**	**Hıyar**	**Lahana**
Karpel (lop) sayısı	Meyvede körük oluşumu	Meyve eti sertliği	Meyve sapı uzunluğu	Belli başlı hastalıklara dayanıklılık durumu
Meyve olgunluk rengi	Meyve çiçek burnu şekli	Tohum miktarı	Olgunlukta meyve rengi	
Meyve et rengi	Meyve yüzey şekli	Tohum büyüklüğü	Meyvede kıvrılma	
Meyve kabuğu parlaklığı	Olgun meyve rengi	Tohum rengi	Çiçek burnu şekli	
Epidermis rengi	Renk yoğunluğu	Tohum zemin rengi	Stilus izi büyüklüğü	
Meyve sertliği	Meyve sap bağlantısı şekli	Tohum ikincil rengi	Belli başlı hastalıklara dayanıklılık durumu	
Raf ömrü	Meyve sap bağlantısı kalınlığı	Tohum ikincil renk dağılımı		
Belli başlı hastalıklara dayanıklılık durumu	Karpel (lop) sayısı	Hilum rengi		
Tohum büyüklüğü	Meyve eti kalınlığı	Olgunluk zamanı		
Belli başlı hastalıklara dayanıklılık durumu	Plasenta şekli	Belli başlı hastalıklara dayanıklılık durumu		
	Acılık			
	Tohum büyüklüğü			
	Belli başlı hastalıklara dayanıklılık durumu			

Morfolojik özelliklerin ölçümü, değerlendirmeyi zorlaştırabilecek konumlar ve zaman aralıkları gibi çevresel faktörlerden etkilenebilir (Cooke ve Reeves, 2003; Wang ve ark., 2016). Bu faktörler, morfolojik özelliklerin oluşumunu etkileyerek hassasiyetin ve ayırt edici gücün azalmasına neden olabilir. Bu, türlerin çoğu için zorunlu olan hastalığa dayanıklılık özelliklerin veya kuraklık ve çiçeklenme süresi gibi poligenetik (kompleks) özelliklerin değerlendirilmesi için özellikle dezavantajlıdır (Cooke ve Reeves, 2003; Achard ve ark., 2020). Geriye melezleme veya mutasyon ıslahı ile geliştirilmiş ve başlangıç çeşidine göre çok küçük farklılıklar içeren genotipler, morfolojik özelliklerle birbirinden ayrılamamaktadır. Yeni geliştirilmiş çeşidi belirlemek veya gelişmiş çeşidi taklitlerinden ayırt etmek için fenotipe dayalı homojenlik testlerine yönelik olarak kullanılan kriterler ve prosedürler genellikle yetersizdir veya uygulanamaz. Çünkü sonradan geliştirilmiş benzer bir çeşidi, orijinal çeşitten ayıran önemli morfolojik özellikler her zaman mevcut olmayabilecektir (Heckenberger ve ark., 2005). Moleküler markırların artan kullanılabilirliği ve maliyet etkinliği, onları mevcut fenotip tabanlı homojenite testlerini tamamlayan etkili seçenekler haline getirmektedir. Moleküler markırlara dayalı homojenite testlerinin fenotipe dayalı testlerine göre yüksek ayrım gücü, yüksek tekrarlanabilirlik, çevresel etkilerden bağımsızlık, tohuma veya bitkilerin erken büyüme aşamalarına uygulanabilirlik, hızlı veri üretimi ve analizi ve uygunluk gibi birçok önemli avantajları vardır. Binlerce çeşidin kayıtlarını içeren kolayca aranabilir veritabanları, aynı zamanda küresel uyumlaştırmayı da kolaylaştırabilir (Yang ve ark., 2021). Ek olarak, geliştirilmiş çeşitleri karakterize etmek için, başlangıç çeşitlerinin ve geliştirilmiş çeşitlerin genetik akrabalığına dayanan testleri yürütmek için moleküler belirteçler kullanılabilir (Heckenberger ve ark., 2005; Yu ve Chung, 2021).

Çeşitlerde, genetik saflık testi şu açılardan önemlidir: (1) Bitki Çeşitlerini Koruma Yasası veya kullanım patentleri yoluyla fikri mülkiyet koruması elde edilebilir ve daha sonra muhafaza edilebilir, (2) ıslahçıların, yetiştiricilerin ve tüketicilerin taleplerini karşılayan tek tip görünüme ve agronomik performansa sahip çeşitler geliştirilebilir, (3) öngörülemeyen çevresel dalgalanmalar göz önüne alındığında bitki performansının mümkün olduğu kadar öngörülebilir olması için sabit genetik kimliklere sahip çeşitler oluşturulabilir ve (4) ıslahçılar genetik çeşitliliği daha eksiksiz ve kesin olarak karakterize edebilir ve ölçebilir, böylece genetik kaynaklar bitki performansı açısından daha kapsamlı bir şekilde değerlendirilebilir ve geliştirilmiş çeşitlerin üretilmesi için daha etkin bir şekilde kullanılabilir (Smith ve Register, 1998). Tohum çoğaltma, üretim ve koşullandırma (priming) sırasında, melezleme, genetik kaymalar, mekanik karışım ve yanlış

etiketleme gibi birkaç faktör çeşidin saflığını etkileyebilir. Bu faktörler, orijinal çeşitlerin genetik bütünlüğünü değiştirebilir ve bir tohum partisinin genetik saflık seviyesini belirlemek için çeşit tanımlamasını zorunlu hale getirebilir. Geleneksel olarak, bitki yetiştiricileri, tohum şirketleri ve sertifika kuruluşları, tohum, fide veya olgun bitki tarafından ifade edilen fiziksel özellikleri kullanarak genetik saflık hakkında bir fikir sahibi olmaktadır. Ancak, fenotipik özelliklerin temel alındığı laboratuvar ve saha testlerinin başarısı sınırlıdır çünkü çevresel koşullar (özellikle stres) veya hasat sonrası işleme prosedürler, tohum ve fidelerdeki bazı morfolojik özellikleri gizleyebilir veya değiştirebilir. Sonuç olarak, genetik saflık belirlemeleri, günümüzde giderek artan bir şekilde elektroforetik jeller üzerinde ayrılan tohum/fide enzimlerinin biyokimyasal karakterizasyonlarına yönelmiştir. Moleküler tekniklerin kullanılmaya başlandığı ilk dönemlerde mısır tohumu endüstrisi, izozim analizi kullanarak hibritlerin genetik saflığını rutin olarak taramıştır (McDonald, 1995). Ancak son yıllarda hızla gelişen moleküler teknikler sayesinde biyokimyasal karakterizasyon yöntemlerinin yerine DNA analizleri kullanılmaya başlanmış olup moleküler markırlarla genetik saflığın belirlenmesi en güvenilir yöntem olarak yerini korumaktadır.

5.2. GENETİK SAFLIKTA DNA ANALİZ YÖNTEMLERİ

DNA markır yöntemleri son yıllarda gerçekleşen yenilikler ile çeşit belirleme için oldukça standart hale gelmiştir. DNA profilleme teknikleri, geleneksel morfolojik tanımlamalara göre birçok avantaj sunar. Bu teknikler daha nesneldir, spesifiktir, gelişmenin tüm aşamalarında test yapılmasına izin verir ve daha uygun maliyetli hale gelmiştir. DNA testleri, alışılagelmiş ortalama bir tohum testi laboratuvarının üzerindeki bir seviyede uzmanlık ve ekipman gerektirir. Bununla birlikte, bir test prosedürünün bir kısmı veya tamamı için kitlerin artan mevcudiyeti ile her bir test için gereken beceriler azalmaktadır. DNA testleri, sadece çeşit belirleme ile sınırlı değildir (Henry, 2001; Weising, 2005). Diğer uygulamalar arasında GDO taraması, genotipleme, DNA dizileme ve patojen saptama yer alır. PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) tekniği, basit, düşük maliyetli moleküler işaretleyici tekniklerin geliştirilmesini kolaylaştırmıştır. Çeşit testi için çok sayıda PCR tabanlı teknik bulunmaktadır.

Sınırlı Parça Uzunlukları Polimorfizmi/(Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

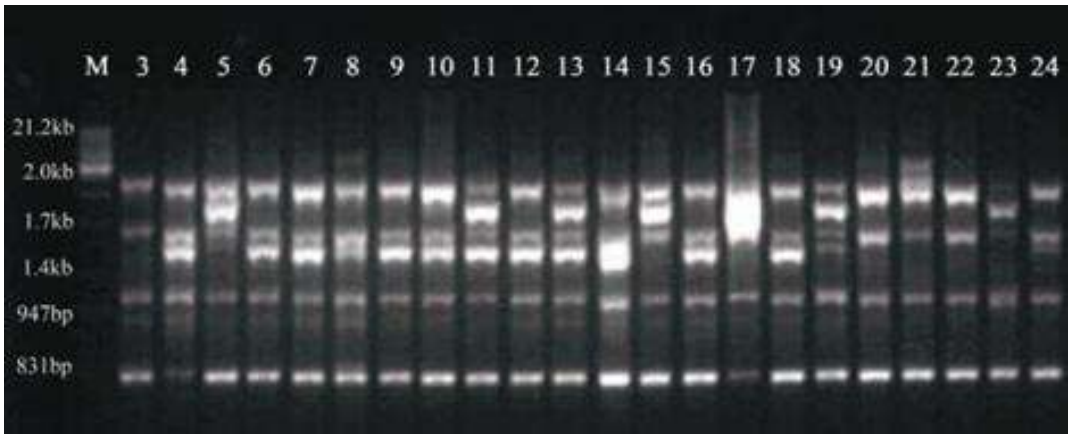
RFLP, çeşitleri tanımlamak için kullanılan ilk DNA markır tekniklerinden biridir. RFLP'ler, genetik hastalıklarının tespiti için insan

DNA taraması ve adli DNA parmak izi dahil olmak üzere başka amaçlar için de kullanılmıştır. RFLP, çeşitlerin (veya daha genel olarak organizmaların), DNA'larının belirli bölgelerinin restriksiyon enzimleri ile kesilmesi ile elde edilen DNA bölümlerini tarayan bir tekniktir. Restriksiyon enzimleri (restriksiyon endonükleazları), DNA'yı belirli noktalarda keserek kesin olarak tanımlanmış uzunlukta DNA parçaları üretir. İki birey arasındaki homolog DNA dizilerindeki polimorfizmler gibi farklılıklar, elektroforez ile ayrıldıktan sonra farklı uzunluktaki fragmanların (parçaların) varlığı ile tespit edilir. DNA fragmanları, bir radyoaktif veya floresan prob kullanılarak görüntülenebilir. Bir prob tipik olarak, elektroforez ile bu fragmanlar ayrıldıktan sonra tamamlayıcı bir nükleotit sekansına sahip bir veya daha fazla fragmanla hibridleşen kısa, tek sarmallı bir genomik veya cDNA sekansıdır. RFLP markırları kodominant (heterozigot numunedeki her iki allel de belirlenebilir) özelliktedir ve tek bir lokusta eksiksiz genetik bilgi sağlar. Rutin genetik saflık analizinde RFLP markırlarının kullanımının genişletilmesine yardımcı olan bir gelişme, radyoaktif probların yerine radyoaktif olmayan hassas işaretleyici sistemlerin kullanılabilmesi olmuştur. Bununla birlikte, rutin çeşit tanımlaması için RFLP'nin kullanımı çeşitli faktörler nedeniyle sınırlandırılmıştır. Faktörlerden biri, RFLP analizi için gerekli olan ve tipik olarak 5 ilâ 10 µg arasında değişen yüksek miktarda DNA ihtilacıdır, bu da yeterli DNA miktarlarının izolasyonunu zaman alıcı ve emek yoğun hale getirir. Buğday veya domates gibi ürünler arasında gözlenen görece düşük polimorfizm seviyesi (Smith, 1995; Bryan ve ark., 1997; Manifesto ve ark., 2001), RFLP analizinin kullanımını sınırlayan bir başka faktördür. Son olarak, özellikle diğer DNA markır yöntemleriyle karşılaştırıldığında yöntemin maliyeti ve karmaşıklığı, RFLP'nin çeşit tanımlaması için kullanımını sınırlandırmaktadır. Bu nedenle RAPD, ISSR, SSR gibi PCR teknikleriyle mümkün kılınan ikinci nesil basit, düşük maliyetli testlerin kullanımı yaygınlaşmıştır. Moleküler markırlar ile son yıllarda hızla gelişen DNA dizileme teknolojileri de çeşit tanımlada önemli bir yer tutmaktadır.

Rastgele Çoğaltılmış DNA Polimorfizmi/Randomly Amplified Polymorphism DNA (RAPD)

Genetik saflık testlerindeki bir ilerleme, polimorfik DNA'nın rastgele amplifikasyonu veya RAPD olarak adlandırılan polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) teknolojisi olmuştur (Williams ve ark., 1990). RAPD reaksiyonları, bilinmeyen (rastgele) DNA segmentlerini çoğaltır. Bu nedenle, RAPD analizinin başlıca avantajlarından biri, hedef DNA dizileri hakkında hiçbir bilgi gerekmediğinden kapsamlı veya maliyetli işaret geliştirme gerektirmemesidir, bu da onu bir genetik

saflık test programında başlatmak için en ucuz PCR tabanlı yöntem haline getirir. Bu teknik, tümü veya bir kısmı, tamamlayıcı DNA'nın her sarmalında bir tane olmak üzere iki farklı bölgede ayrı ayrı tohumların büyük bir genomik DNA şablonuna hibridize olacak birkaç gelişigüzel kısa primer (8-12 nükleotit) kullanır. Uygun sıcaklık değişimleri altında, termostabil bir DNA polimeraz ayrık DNA ürünlerini (genellikle 200 ilâ 2.000 baz çifti uzunluğunda) sentezler. Her primer, daha sonra bir elektroforetik jel üzerinde ayrılan birkaç benzersiz DNA fragmanını sürekli olarak çoğaltabilir. Bu parçalardan bazıları bir genotipin karakteristiğidir ve genetik saflık testlerinde kullanılır (Şekil 3).



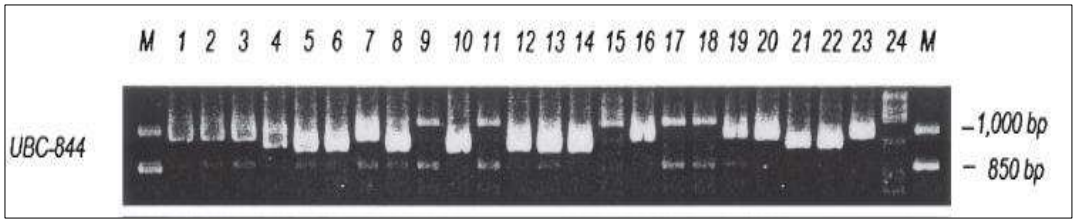
Şekil 3. Farklı soya fasulyesi genotipleri için RAPD fragman polimorfizmleri. M=moleküler markır belirteci (Weian ve ark., 2009).

RAPD tekniği ile yapılan çalışmalar çoğunlukla, büyümekte olan bitkilerden alınan dokular üzerinde yürütülmektedir. McDonald ve ark. (1994), 5 farklı tarımsal ürün için doğrudan kuru tohumlardan yapılabilen ve analiz süresini kısaltan bir DNA ekstraksiyon prosedürü geliştirmiştir. Soya fasulyesi tohumlarıyla yapılan bir başka çalışma ise; tohum bozulmasının, funguslar nedeniyle ortaya çıkan kontaminasyonun veya farklı tohum olgunlaşma ortamlarının RAPD markırlarının stabilitesini etkilemediğini ortaya koymuştur (McDonald, 1995).

Basit Tekrarlı Diziler Arası Polimorfizm/Inter Simple Sequence Repeat (ISSR)

ISSR yöntemi, ökaryotik genomlarda tekrar eden 2, 3, 4, 5 gibi nükleotid birimlerinin lokustan bağımsız bir şekilde genomda rastgele dağılımlarını esas alan ancak RAPD yöntemine göre daha hassas ve tekrarlanabilirliği yüksek olan bir yöntemdir (Zietkiewicz ve ark.,

1994; Gupta ve ark., 1994). ISSR markırlarının kullanımı hızlı, uygulanması kolay ve primerleri daha uzun olduklarından güvenilirlikleri fazladır (Bornet ve Branchard, 2001). ISSR markırları, heterozigotiyi ayırt edemeyen dominant markır sistemler arasındadır. ISSR tekniği düşük maliyet, zamandan tasarruf ve genetik analizlerde kolaylık sağlamaktadır (Yorgancılar ve ark., 2015). Havuç (Şekerci ve ark., 2021), biber (Tsonev ve ark., 2017), domates (Kiani ve Siahchehreh, 2018), kavun (Guliyev ve ark., 2018), karpuz (Soghani ve ark., 2018) ve birçok farklı sebze türünde ISSR markırları başarılı sonuçlar vermiştir (Şekil 4).



Şekil 4. Farklı karpuz genotipleri için ISSR agaroz jel görüntüsü. M=moleküler markır (Levi ve ark, 2014).

Basit Tekrarlı Diziler veya Mikrosatelitler/Simple Sequence Repeat (SSR)

Basit tekrarlı diziler (mikrosatellitler, mikrosatellit tekrar polimorfizmleri veya kısa ardışık tekrarlar olarak da bilinir), bitki genom analizi ve markır destekli ıslah için en önemli moleküler markırlardan biri haline gelmiştir. SSR'lar, ardışık olarak tekrarlanan ve ökaryotik genomlar boyunca her yerde yaygın olarak dağılan 1 ilâ 6 bp'den (baz çiftleri) oluşan genetik lokuslardır; burada, tüm tekrarlayan bölge, tekrar birimlerinin sayısını etkileyen yüksek mutasyon oranları nedeniyle 150 bp'yi geçmez. SSR'lar kapsamlı uzunluk polimorfizmi gösterir (Morgante ve Olivieri, 1993) ve bu nedenle DNA parmak izi ve çeşitlilik çalışmaları için idealdir. SSR'lar PCR ile kolayca tahlil edilebildiğinden, yüksek yoğunluklu bağlantı haritalarının oluşturulması için en uygun genetik belirteçler olarak da kabul edilirler (Pearson ve Sinden, 1998). Polimorfizmler, tekrar bölgesini kuşatan benzersiz bir primer çifti kullanılarak elde edilen PCR ile güçlendirilmiş fragmanların jel ayrımlarıyla kolayca saptanabilir (Weber ve May, 1989). Mikrosatellitler, genom boyunca her yerde dağılmış durumda olup, tek bir lokusta birden fazla allelin tanımlanmasına izin verir ve çoğalan bölgenin homozigot ya da heterozigot olup olmadığı konusunda bilgi verebilen kodominat bir markır sistemidir. SSR analizi, kavun, hıyar (Danin-Poleg, 2001; Kacar ve ark., 2012), bezelye (Burstin ve ark., 2001), domates (Areshehenkova ve Ganal, 2002; He

ve ark., 2003), karpuz (Solmaz ve ark., 2016a) ve acur (Solmaz ve ark., 2016b) gibi çok farklı türlerin genotip tanımlaması için kullanılmıştır.

DNA Dizileme Teknolojileri

DNA dizi analizi, bir DNA parçasında bulunan A, C, G, T nükleotid sıralarının belirlenmesi olarak tanımlanmaktadır. DNA dizileme sonucunda DNA parçalarına ait nükleotid sıralarının belirlenmesi birçok farklı amaç için gerçekleştirilmektedir (Dönmez ve ark., 2015). Son dönemlerde birçok bitki türünde çeşit tanımlanması çalışmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. DNA dizi analizi ile ilgili ilk araştırmalar 1960'lı yıllarda başlamıştır. 1977 yılında Maxam-Walter Gilbert (1977) ve Frederick Sanger ve ark. (1977) tarafından geliştirilen iki farklı DNA dizi analizi yöntemi yaygın kullanım alanı bulmuştur. Günümüzde ise yeni nesil dizileme teknolojisi yaygın olarak kullanılmaktadır ve yüzlerce türün tüm genom dizileri bir araya getirilmiş olup, bu da büyük ölçekli yeniden dizilemeyi teşvik etmiş ve genetik araştırmalar için milyonlarca SNP (Single Nucleotide Polymorphism) üretilmiştir. Bu SNP'ler ıslah programlarında genetik çeşitlilik analizi, çeşit tanımlama, genetik kaynakların karakterizasyonu ve agronomik özelliklerle ilişkilendirme gibi faaliyetler için rutin olarak kullanılabilir (Edwards ve Batley, 2010; Lu ve ark., 2012). Özellikle, SNP'ler en sık görülen genetik polimorfizm tipini temsil ederler (Edwards ve Batley, 2010). Hassas bir şekilde çözümlenirler, son derece kararlı ve güvenilirdirler ve ultra yüksek verimli otomasyon ve algılama ile uyumludurlar. Genellikle bir genomun yeniden dizilenmesiyle geliştirilen genom çapında bir SNP seti, genetik araştırma ve ıslahta çok değerli bir kaynaktır (Davey ve ark., 2011). İlk yeni nesil dizileme sistemi, 2005 yılında 454 Life Sciences Roche (Dereck ve ark., 2011) tarafından piyasaya sürülmüş ve daha sonra 2013'te (Slatko ve ark., 2018) pirosekanslama (Parameswaran ve ark., 2007) çağı açılmıştır. 2006–2007 yılları arasında dizileme teknolojilerine iki platform daha açılmıştır: Ligasyon yoluyla alternatif dizilemeyi öneren SOLiD (Thermo-Fisher Scientific) (Huang ve ark., 2012) ve daha sonra Illumina tarafından satın alınan ve adaptör köprü amplifikasyonunu geliştiren Solexa (Kircher ve ark., 2011). Solexa sistemi, SOLiD'e kıyasla daha fazla okuma uzunluğu ve derinliği sağlamıştır (Buermans ve ark., 2014). Ion Torrent; floresan veya lüminesan teknikleri kullanılmadan sentez yoluyla dizileme yaklaşımına dayanan, böylece maliyetleri azaltan ve dizileme sürecini hızlandıran son önemli ikinci nesil platformu olmuştur (Rothberg ve ark., 2011). Günümüzde Illumina, birkaç gigabazdan 6 terabaza kadar

değişen çıktılarla genom ve transkriptom dizileme ve yeniden dizileme için çeşitli seçenekler sunduğundan sebzelerde genotipleme çalışmaları için en yaygın kullanılan teknolojidir (Eisenstein, 2019; Tripodi, 2022). Üçüncü nesil veya uzun okumalı dizileme, önceki yaklaşımlara göre büyük bir sıçrama yaparak, hataları azaltarak ve tekrarlayan bölgelerde çözünürlüğünü iyileştirerek daha hızlı ve daha doğru bir dizilme yöntemi sunmuştur (Bleidorn, 2016). Pacific Biosciences (PacBio) ve Oxford Nanopore Technologies (ONT), uzun okuma uygulayan iki teknolojidir. İlki, hem polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) amplifikasyonunun yokluğunda reaksiyonu hem de etiketli nükleotidler DNA'ya dahil edildiğinde floresans sinyallerinin gerçek zamanlı olarak yakalanmasını sağlayan bir DNA polimeraza dayalı tek moleküllü gerçek zamanlı (SMRT) teknolojisini benimser (Roberts ver ark., 2013; Xiao ve Zhou, 2020). İkincisi, diferansiyel bir elektrik potansiyelinin uygulandığı nano ölçekli çaplarda biyogözenekli bir zar kullanır, bu nedenle sıralama işlemi sırasında gözenekler yoluyla nükleotidlerin saptanmasına izin verir. SMRT PacBio'nun avantajları arasında doğruluk ve düşük yanlılık oluşumu ve epigenetik olayların tanımlanması yer alır, böylece karmaşık genom bölgelerinde sıralamanın yüksek çözünürlüğünü sağlar (Nakano ve ark., 2017). Nanopor dizileme, hata oranının daha yüksek olduğu bildirilmesine rağmen PacBio ile aynı avantajları sunar (Rhoads ve Au, 2015). Ayrıca, sıralama cihazlarının küçük boyutu göz önüne alındığında, Nanopore teknolojileri alan gereksinimleri açısından hızlı, uygun fiyatlı ve esnektir.

Dizileme teknolojileri çok sayıda varyantı genom boyu belirleyebilmeleri bakımından moleküler çalışmaları ileri seviyeye taşımıştır. Ancak yüksek maliyet bu teknolojilerin geniş anlamda kullanımını kısıtlamaktadır. Özellike tüm genom dizileme (WGS-Whole genome sequencing) yaklaşımı ile genomik yapının ortaya çıkarılması günümüzde hala oldukça masraflıdır. Çeşit saflığı, akrabalık, benzerlik gibi işlemlerin uygulanmasında çok sayıda bitki ile örnekleme ihtiyacı bu yaklaşımın bitki tanımlama sistemlerinde de yaygın kullanımını önemli derecede azaltmaktadır. Maliyet anlamında bu darboğazı giderme adına azaltılmış temsili kütüphane (RRL-Reduced representation libraries) (Scheben ve ark., 2017) metodu önemli bir alternatif sunmaktadır. Bu metotta farklı kesim enzimleri ile genom redüksiyonu sağlanmakta ve genom boyu çok sayıda varyantın belirlenmesi mümkün kılınmaktadır. Temel olarak kesim enzimleri kullanılarak kütüphane oluşturulması ve sonrasında kütüphanenin dizilenmesini içeren bu yaklaşımda birçok farklı metot geliştirilmiştir. GBS (Elshire ve ark., 2011), RAD (Baird ve ark., 2008), 2bRAD (Wang ve ark., 2012), ddRAD (Peterson ve ark., 2012) ve SLAF-Seq (Sun ve ark.,

2013) günümüzde popüler olarak kullanılan temsili kütühane dizileme yaklaşımları olup bu metotlardan elde edilen veriler ile genomu temsil eden geniş çapta polimorfizm elde edilebilmektedir. Elde edilen veriler birçok farklı bitki türünde markır geliştirme (Kizil ve ark., 2020), genetik çeşitlilik (Basak ve ark., 2019; Adamo ve ark., 2021), haritalama (Chen ve ark., 2013; Spindel ve ark., 2013) ve GWAS (Morris ve ark., 2013; Fu ve ark., 2016) çalışmalarında yoğun olarak kullanılmaktadır. Dolayısıyla bu yaklaşım izlenerek yüksek sayıda varyantın kullanıldığı ve düşük maliyetli saflık, benzerlik, yakınlık-uzaklık ve akrabalık testlerini yapmak mümkündür.

6. SONUÇ

Tohum ve tohum kalitesinin/saflığının belirlenmesi konuları sebzeciklikte oldukça önemli ve dikkatle yapılarak takip edilmesi gereken konular arasındadır. Bitkisel üretimin başarılı ve sürdürülebilir olması için zorunnlu olduğu gibi, aynı zamanda tohum ve fideyi üreten ve satan firmalar ile çiftçiler arasında ortaya çıkabilecek sorunların en başından giderilmesi için de tohum ve fide saflıklarının tespit edilmesi çok önemlidir. Bu bölümde tohum ve fidede saflığın önemi, fiziksel saflık, fizyolojik homjenite ve genetik saflık ve test yöntemleri hakkında bilgiler ve pratikteki örnekleri verilmiştir. Özellikle son yıllarda moleküler biyoloji alanındaki hızlı gelişmeler sayesinde birçok markır ve DNA dizileme teknolojisi bu alanda yerini almıştır. Bununla birlikte, fiziksel/fizyolojik ve fenotipe dayalı genetik saflık analizlerinin de halen geçerli ve kıymetli olduğu da net şekilde görülmektedir. Sebze tohum ve fidelerinde genetik saflığın belirlenmesi konusunda farklı yöntemlerin nasıl ve ne şekilde kullanılması gerektiği bilim insanları, ıslahçılar, üreticiler ve konuyla ilgili diğer paydaşların beraber tartışması ve ortak bir yol haritası çizmesi ile mümkün olabilecektir.

KAYNAKLAR

Achard F, Butruille M, Madjarac S, Nelson PT, Duesing J, Laffont JL, Nelson B, Xiong J, Mikel MA, Smith JSC (2020). Singlenucleotide polymorphisms facilitate Distinctness-uniformity-stability testing of soybean cultivars for plant variety protection. Crop Science 60: 2280–2303.

Adamo M, Blandino M, Capo L, Ravetto Enri S, Fusconi A, Lonati M, Mucciarell M (2021). A ddRADseq Survey of the Genetic Diversity of Rye (*Secale cereale* L.) Landraces from the Western Alps Reveals the Progressive Reduction of the Local Gene Pool. Plants 10: 2415. doi:10.3390/plants10112415.

Adhikari B, Olorunwa OJ, Barickman TC (2022). Seed priming enhances seed germination and morphological traits of *Lactuca sativa* L. under salt stress. Seeds 1 (2): 74-86.

Areshchenkova T, Ganal MW (2002). Comparative analysis of polymorphism and chromosomal location of tomato microsatellite markers isolated from different sources. Theoretical and Applied Genetics 104: 229-235.

Baird NA, Etter PD, Atwood TS, Currey MC, Shiver AL, Lewis ZA, Selker EU, Cresko WA, Johnson EA (2008). Rapid SNP discovery and genetic mapping using sequenced RAD markers. PLoS One 3(10):e3376.

Basak M, Uzun B, Yol E (2019) Genetic diversity and population structure of the Mediterranean sesame core collection with use of genome-wide SNPs developed by double digest RAD-Seq. PLoS ONE 14 (10): e0223757. doi:10. 1371/journal.pone.0223757.

Bleidorn C (2016). Third generation sequencing: technology and its potential impact on evolutionary biodiversity research. Systematics and Biodiversity 14 (1): 1–8. doi:10.1080/14772000.2015.1099575.

Bornet B, Branchard M (2001). Nonanchored inter-simple sequence repeat (ISSR) markers: Reproducible and specific tools for genome fingerprinting. Plant Molecular Biology Reporter 19: 209–215.

Bryan GJ, Collins AJ, Stephenson P, Orry A, Smith JB, Gale MD (1997). Isolation of microsatellites from hexaploid bread wheat. Theoretical and Applied Genetics 94: 557-563.

Buermans HPJ, den Dunnen JT (2014). Next generation sequencing technology: advances and applications. Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease 1842: 1932–1941.

Burstin J, Deniot G, Potier J, Weinachter C, Aubert G, Barranger A (2001). Microsatellite polymorphism in *Pisum sativum*. Plant Breeding 120: 311–317.

Chen K, Arora R (2013). Priming memory invokes seed stress-tolerance. Environmental and Experimental Botany 94: 33–45.

Chen X, Li X, Zhang B, Xu J, Wu Z, Wang B, Li H, Younas M, Huang L, Luo YF, Wu JS, Hu SN, Liu K (2013). Detection and genotyping of restriction fragment associated polymorphisms in polyploid crops with a pseudo-reference sequence: a case study in allotetraploid *Brassica napus*. BMC Genomics 14: 346. doi:10.1186/1471-2164-14-346.

Cooke RJ, Reeves JC (2003). Plant genetic resources and molecular markers: Variety registration in a new era. Plant Genetic Resources 1: 81–87.

Danin-Poleg Y, Reis N, Tzuri G, Katzir N (2001) Development and characterization of microsatellite markers in Cucumis. Theoretical and Applied Genetics 102: 61-72.

Davey JW, Hohenlohe PA, Etter PD, Boone JQ, Catchen JM, Blaxter ML (2011). Genome-wide genetic marker discovery and genotyping using next-generation sequencing. Nature Reviews Genetics 12: 499–510.

Dönmez D, Şimşek Ö, Kaçar YA (2015). Next generation DNA sequencing technologies and their use in plants. Turkish Journal of Scientific Reviews 1: 30-37.

Edwards D, Batley J (2010). Plant genome sequencing: applications for crop improvement. Plant Biotechnology Journal 8: 2–9.

Eisenstein M (2019). Playing a long game. Nature Methods. 16: 683–686.

Elias SG, Copeland LO, McDonald MB, Baalbaki RZ (2012). Seed testing: principles and practices. Michigan State University Press.

Ellis RH (2004). Seed and seedling vigour in relation to crop growth and yield. Plant Growth Regulation 11: 249–255.

Elshire RJ, Glaubitz JC, Sun Q, Poland JA, Kawamoto K, Buckler ES, Mitchell SE (2011). A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. PLoS ONE. 6:e19379. doi:10.1371/journal.pone.0019379 PMID: 21573248.

Fu LX, Cai CC, Cui YN, Wu J, Liang JL, Cheng F, Wang XW (2016). Pooled mapping: an efficient method of calling variations for population samples with low-depth resequencing data. Molecular Breeding 36: 48. doi:10.1007/s11032-016-0476-9.

Guliyev N, Sharifova S, Ojaghi J, Abbasov M, Akparov Z (2018). Genetic diversity among melon (*Cucumis melo* L.) accessionsrevealed by morphological traits and ISSR markers. Turkish Journal of Agriculture and Forestry 42 (6): 393-401.

Gupta M, Chyi YS, Romero-Severson J, Owen JL (1994). Amplification of DNA markers from evalutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. Theoretical and Applied Genetics 89: 998-1006.

Gupta S, Van Staden J, Doležal K (2022). An understanding of the role of seed physiology for better crop productivity and food security. Plant Growth Regulation 97: 171–173.

Halmer P (2008). Seed technology and seed enhancement. Acta Horticulturae 771: 17–26.

He C, Poysa V, Yu K (2003). Development and characterization of simple sequence repeat (SSR) markers and their use in determining relationships among *Lycopersicon esculentum* cultivars. Theoretical and Applied Genetics 106: 363-373.

Heckenberger M, Bohn M, Frisch M, Maurer, H, Melchinger A (2005). Identification of essentially derived varieties with molecular markers: An approach based on statistical test theory and computer simulations. Theoretical and Applied Genetics 111: 598–608.

Huang YF, Chen SC, Chiang YS, Chen TH, Chiu KP (2012). Palindromic sequence impedes sequencing-by-ligation mechanism. BMC Systems Biology 6 (2): 1-7. doi:10.1186/1752-0509-6-S2-S10.

Jamali SH, Cockram J, Hickey LT (2019). Insights into deployment of DNA markers in plant variety protection and registration. Theoretical and Applied Genetics 132: 1911–1929.

Jördens R (2005). Progress of plant variety protection based on the international convention for the protection of new varieties of plants (UPOV Convention). World Patent Information 27: 232–243.

Juhász R, Gergely S, Gelencsér T, Salgó A (2005). Relationship Between NIR Spectra and RVA Parameters During Wheat Germination. Cereal Chemistry 82: 488–493.

Kaçar YA, Simsek O, Solmaz I, Sari N, Mendi YY (2012). Genetic diversity among melon accessions (*Cucumis melo*) from Turkey based on SSR markers. Genetics and Molecular Research 11: 4622-4631.

Kiani G, Siahchehreh M (2018). Genetic diversity in tomato varieties assessed by ISSR markers. International Journal of Vegetable Science 24 (4): 353-360.

Kircher M, Heyn P, Kelso J (2011). Addressing challenges in the production and analysis of illumina sequencing data. BMC Genomics 12: 382. doi:10.1186/1471-2164-12-382.

Kizil S, Basak M, Guden B, Tosun HS, Uzun B, Yol E (2020). Genome-Wide Discovery of InDel Markers in Sesame (*Sesamum indicum* L.) Using ddRADSeq. Plants (Basel) 9 (10): 1262. doi:10.3390/plants9101262.

Levi A, Thomas CE, Newman M, Reddy OUK, Zhang X, Xu Y (2004). ISSR and AFLP markers differ among American watermelon cultivars with limited genetic diversity. Journal of the American Society for Horticultural Science 129 (4): 553-558.

Lohumi S, Mo C, Kang JS, Hong SJ, Cho BK (2013). Nondestructive evaluation for the viability of watermelon (*Citrullus lanatus*) seeds using fourier transform near infrared spectroscopy. Journal of Biosystem Engineering 38: 312–317.

Lu FH, Kwon SW, Yoon MY, Kim KT, Cho MC, Yoon MK, Park YJ (2012). SNP marker integration and QTL analysis of 12 agronomic and morphological traits in F8 RILs of pepper (*Capsicum annuum* L.). Molecular Cell 34: 25–34.

Manifesto MM, Schlatter AR, Hopp HE, Suárez EY, Dubcovsky J (2001). Quantitative evaluation of genetic diversity in wheat germplasm using molecular markers. Crop Science 41: 682-690.

Maxam AM, Gilbert W (1977). A new method for sequencing DNA. Proceedings of the National Academy of Sciences 74 (2): 560-564.

McDonald MB (1995) Genetic purity: From protein electrophoresis to RAPDs. Proc. Ann. Corn and Sorghum Conf., Amer. Seed Trade Assoc., Washington, DC.

McDonald MB, Elliot LJ, Sweeney PM (1994). DNA extraction from dry seeds for RAPD analyses in varietal identification studies. Seed Science and Technology 22: 171-176.

Morgante M, Olivieri AM (1993). PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. Plant Journal 3: 175-182.

Morris GP, Ramu P, Deshpande SP, Hash CT, Shah T, Upadhyaya HD, Riera-Lizarazu O, Brown PJ, Acharya CB, Mitchell SE, Harriman J, Glaubitz JC, Buckler ES, Kresovich S (2013). Population genomic and genome-wide association studies of agroclimatic traits in sorghum. Proceedungs of the National Academy of Sciences of the USA (PNAS) 110: 453–445. doi:10.1073/ pnas.1215985110.

Nakano K, Shiroma A, Shimoji M, Tamotsu H, Ashimine N, Ohki S, Shinzato M, Minami M, Nakanishi T, Teruya K, Satou K, Hirano T (2017). Advantages of genome sequencing by long-read sequencer using SMRT technology in medical area. Human Cell 30 (3): 149–161. doi:10.1007/ s13577-017-0168-8.

Parameswaran P, Jalili R, Tao L, Shokralla S, Gharizadeh B, Ronaghi M, Fire AZ (2007). A pyrosequencing-tailored nucleotide barcode design unveils opportunities for large-scale sample multiplexing. Nucleic Acids Research 35 (19): e130. doi:10.1093/nar/gkm760.

Peterson BK, Weber JN, Kay EH, Fisher HS, Hoekstra HE (2012). Double digest RADseq: an inexpensive method for de novo SNP discovery and genotyping in model and non-model species. PLoS ONE 7: e37135. doi:10.1371/journal.pone.0037135.

Rhoads A, Au KF (2015). PacBio sequencing and its applications. Genomics Proteomics Bioinformatics 13: 278–289.

Roberts RJ, Carneiro MO, Schatz MC (2013). The advantages of SMRT sequencing. Genome Biology 14: 405. doi:10.1186/gb-2013-14-7-405.

Rothberg JM, Hinz W, Rearick TM, Schultz J, Mileski W, Davey M, Bustillo J (2011). An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. Nature 475 (7356): 348-352.

Sabelli PA, Larkins BA (2015). New insights into how seeds are made. Frontiers in Plant Science 6: 196. doi:10.3389/fpls.2015.00196.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proceedings of the National Ccademy of Sciences (PNOS) 74 (12): 5463-5467.

Scheben A, Batley J, Edwards D (2017). Genotyping-by-sequencing approaches to characterize crop genomes: choosing the right tool for the right application. Plant Biotechnol Journal 15: 149–161. doi:10.1111/ pbi.12645.

Sharma KK, Singh US, Sharma P, Kumar A, Sharma L (2015). Seed treatments for sustainable agriculture A review. Journal of Applied and Natural Science 7: 521–539.

Sivritepe HÖ (2011). Tohum canlılığının değerlendirilmesi. Alatarım 10 (2): 94-105.

Slatko BE, Gardner AF, Ausubel FM (2018). Overview of next-generation sequencing technologies. Current protocols in molecular biology 122 (1): e59. doi:10.1002/cpmb.59.

Smith JSC (1995). Identification of cultivated varieties by nucleotide analysis. In: Identification of food grain varieties. Wrigley CW (Ed.) p.131-151. American Association Cereal Chemists, St. Paul, MN.

Smith JSC, JC Register (1998). Genetic purity and testing technologies for seed quality: a company perspective. Seed Science Research 8: 285-293.

Soghani ZN, Rahimi M, Nasab MA, Maleki M (2018). Grouping and genetic diversity of different watermelon ecotypes based on agro-morphological traits and ISSR marker. Iheringia, Série Botânica 73 (1): 53-59.

Solmaz I, Kacar YA, Simsek O, Sari N (2016b). Genetic characterization of Turkish snake melon (*Cucumis melo* L. subsp. *melo flexuosus* Group) accessions revealed by SSR markers. Biochemical Genetics 54 (4): 534-543.

Solmaz I, Kaçar Y, Sari, N, Şimşek Ö (2016a). Genetic diversity within Turkish watermelon [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsumura & Nakai] accessions revealed by SSR and SRAP markers. Turkish Journal of Agriculture and Forestry 40 (3): 407-419.

Spindel J, Wright M, Chen C, Cobb J, Gage J, Harrington S, Lorieux M, Ahmadi N, McCouch S (2013). Bridging the genotyping gap: using genotyping by sequencing (GBS) to add high-density SNP markers and new value to traditional bi-parental mapping and breeding populations. Theoretical and Applied Genetics 126: 2699–2716. doi:10.1007/s00122-013-2166-x.

Sreenivasulu N, Wobus U (2013). Seed-development programs: a systems biology-based comparison between dicots and monocots. Annual Reviews in Plant Biology 64: 189–217.

Srinivasan CS (2004). Plant variety protection, innovation, and transferability: Some empirical evidence. Review of Agricultural Economics 26 (4): 445–471. https://www.jstor.org/stable/3700791.

Sun XW, Liu DY, Zhang XF, Li WB, Liu H, Hong WG, Jiang CB, Guan N, Ma CX, Zeng HP, Xu CH, Song J, Huang L, Wang CM, Shi JJ, Wang R, Zheng XH, Lu CY, Wang XW, Zheng HK (2013). SLAF-seq: an efficient method of large-scale de novo SNP discovery and genotyping using high-throughput sequencing. PLoS ONE 8: e58700. doi:10.1371/journal.pone.0058700.

Şekerci AD, Erişdi H, Akın F, Türkmen Ö, Hakkı EE (2021). Purple carrot (*Daucus carota* L.) genetic diversity of Central Anatolia revealed by AFLP and ISSR: purple carrot. International Journal of Agricultural and Natural Sciences 14 (2): 139-151.

Tai-Gi M, Kang WS (2008). Nondestructive classification of viable and non-viable radish (*Raphanus sativus* L.) seeds using single seed near infrared spectroscopy. Horticultural and Environmental Biotechnology 49: 42–46.

Tigabu M, Odén PC (2003). Discrimination of viable and empty seeds of Pinus patula Schiede & Deppe with near-infrared spectroscopy. New Forests 25: 163–176. doi:10.1023/A:1022916615477.

Tripodi P (2022). Next generation sequencing technologies to explore the diversity of germplasm resources: achievements and trends in tomato. Computational and Structural Biotechnology Journal 20: 6250-6258. doi:10. 1016/j.csbj.2022.11.028.

Tsonev S, Todorova V, Groseva S, Popova T, Todorovska EG (2017). Evaluation of diversity in Bulgarian pepper cultivars by agronomical traits and ISSR markers. Genetika 49 (2): 647-662.

UPOV (2022). https://www.upov.int/resource/en/dus_guidance.html

Wang J, Cogan NO, Forster JW (2016). Prospects for applications of genomic tools in registration testing and seed certification of ryegrass varieties. Plant Breeding 135: 405–412.

Wang S, Meyer E, McKay JK, Matz MV (2012). 2b-RAD: a simple and flexible method for genome-wide genotyping. Nature Methods 9: 808–810.

Weber JL, May PE (1989). Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. The American Journal of Human Genetics 44: 388-396.

Wei A, Zhao HK, Wang YM, Li QY, Zhuang BC, Gong L, Bao L (2009). Genetic diversity in annual wild soybean (*Glycine soja* sieb. et zucc.) and cultivated soybean (g. max.merr.) from different latitudes in China. Pakistan Journal of Botany 41 (5): 2229-2242.

Williams JG, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research 18: 6531-6535.

Xiao T, Zhou W (2020). The third-generation sequencing: the advanced approach to genetic diseases. Translational Pediatrics 9 (2): 63–73.

Yang CJ, Russell J, Ramsay L, Thomas W, Powell W, Mackay I (2021). Overcoming barriers to the registration of new plant varieties under the DUS system. Communications Biology 4: 302. doi:10.1038/s42003-021-01840-9.

Yasmin J, Raju Ahmed M, Lohumi S, Wakholi C, Kim MS, Cho BK (2019). Classification method for viability screening of naturally aged watermelon seeds using FT-NIR spectroscopy. Sensors (Basel) 19 (5): 1190. doi:10. 3390/ s19051190.

Yorgancılar M, Yakışır E, Erkoyuncu MT (2015). Moleküler markörlerin bitki ıslahında kullanımı. Bahri Dağdaş Bitkisel Araştırma Dergisi 4 (2): 1-12.

Yu JK, Chung YS (2021). Plant variety protection: Current practices and insights. Genes (Basel)12 (8): 1127. doi:10.3390/genes12081127.

Zietkiewicz E, Rafalski JA, Labuda D (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. Genomics 20: 176–183. doi:10.1006/geno.1994.1151.