

**TRAP VE SSR MOLEKÜLER
İŞARETÇİLERİ KULLANARAK AYÇİÇEĞİ
GENOTİPLERİNDE GENETİK
BİYOÇEŞİTLİLİĞİN BELİRLENMESİ**

Hossein ZEİNALZADEH TABRİZİ

**Doktora Tezi
Tarla Bitkileri Anabilim Dalı
Tarla Bitkileri Yetiştiriciliği ve Islahı Bilim Dalı
Prof. Dr. Kamil HALILOĞLU**

2014

Her hakkı saklıdır

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

TRAP VE SSR MOLEKÜLER İŞARETÇİLERİ KULLANARAK
AYÇİÇEĞİ GENOTİPLERİNDE GENETİK *BİYO*ÇEŞİTLİLİĞİN
BELİRLENMESİ

Hossein ZEİNALZADEH TABRİZİ

TARLA BİTKİLERİ ANABİLİM DALI
Tarla Bitkileri Yetiştiriciliği ve Islahı Bilim Dalı

ERZURUM
2014

Her hakkı saklıdır



**T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



TEZ ONAY FORMU

**TRAP VE SSR MOLEKÜLER İŞARETÇİLERİ KULLANARAK AYÇİÇEĞİ
GENOTİPLERİNDE GENETİK BİYOÇEŞİTLİLİĞİN BELİRLENMESİ**

Prof. Dr. Kamil HALİLOĞLU danışmanlığında, Hossein ZEİNALZADEH TABRİZİ tarafından hazırlanan bu çalışma 13.11.2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Tarla Bitkileri Anabilim Dalı'nda Doktora tezi olarak **oybirliği** ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Kamil HALİLOĞLU

İmza

Üye : Prof. Dr. Güleray AĞAR

İmza

Üye : Prof. Dr. Mustafa ERAYMAN

İmza

Üye : Prof. Dr. Metin TOSUN

İmza

Üye : Yrd. Doç. Dr. Murat AYDIN

İmza

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu 04/12/2014 tarih ve 48/1615 nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. İhsan EFEOĞLU
Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Doktora Tezi

TRAP VE SSR MOLEKÜLER İŞARETÇİLERİ KULLANARAK AYÇİÇEĞİ GENOTİPLERİNDE GENETİK BİYOÇEŞİTLİLİĞİN BELİRLENMESİ

Hossein ZEİNALZADEH TABRİZİ

Atatürk Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Tarla Bitkileri Anabilim Dalı
Tarla Bitkileri Yetiştiriciliği ve Islahı Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Kamil HALİLOĞLU

Bitki genetik materyallerin genetik biyoçeşitliliğin belirlenmesi her ıslah programının temel faaliyetlerinden biridir. İran ayçiçeği genotiplerinin biyoçeşitlilik ve akrabalık ilişkilerini ve SSR ve TRAP moleküler işaretçilerin ayırım güçlerini belirlemek amacıyla, İran'dan temin edilen 68 ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.) genotipler (23'ü restorer kendilenmiş hat, 30'u CMS kendilenmiş hat, 3'ü İran hibrit, 8'i yabancı hibrit ve 4'ü yabancı açık tozlaşan) incelenmiştir. DNA örnekleri 15-20 günlük taze yapraklardan yeni bir modifiye yöntem ile alınmıştır. SSR işaretçi için 21 çift primer, TRAP işaretçi ise 6 sabit primer ile 6 tesadüfi primer (19 kombinasyon) kullanmıştır. Gruplar içindeki ve arasındaki polimorfizm ve diğer genetik parametreler, Dice katsayısı kullanarak, kümeleme ve temel koordinat analiz ile belirlenmiştir. Kümeleme analizinin sonucunda, SSR ve TRAP işaretçileri kullanarak elde edilen dendrogramlar aynı sonucu vermiştir. Her iki analize göre İran hibritleri diğer gruplardan daha farklı olarak kendisini göstermiştir. Bu sonuç yapılan tüm analizlerde de tespit edilmiştir. SSR işaretçisinde CMS grubu ve TRAP işaretçisinde restorer grubu her iki işaretçi sisteminde diğer gruplara göre yüksek polimorfik oranı göstermelerine rağmen farklı biyoçeşitlilik grupları olarak belirlenmiştir. Her iki işaretçi sisteminde restorer ve CMS grubu en düşük genetik mesafeye sahip olan gruplar olarak belirlenmiştir (SSR=0,070 ve TRAP=0,066). SSR ve TRAP işaretçi sisteminden elde edilen verileri birlikte kullanarak kümeleme analizinin sonucunda benzerlik katsayısı iki işaretçinin üzerinden 0,524 (R42 ve CMS328 hatların arasında) ile 0,892 (iki R2 ve R3 hatların arasında) ve ortalama 0,712 hesaplanmıştır.

2014, 88 sayfa

Anahtar Kelimeler: Ayçiçeği, biyoçeşitlilik, kümeleme analizi, SSR, TRAP

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

GENETIC DIVERSITY OF SUNFLOWER GENOTYPES USING SSR AND TRAP MOLECULAR MARKERS

Hossein ZEİNALZADEH TABRİZİ

Ataturk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Field Crops
Plant Genetics and Breeding

Supervisor: Prof. Dr. Kamil HALILOĞLU

Genetic diversity estimation of plant genetic materials is one of the important pre-breeding activities in breeding field crops. In order to genetic diversity estimation and relationship of 68 Iranian sunflower genotypes (*Helianthus annuus* L.) (23 restorer inbred lines, 30 CMS inbred lines, 3 Iranian hybrids, 8 foreign commercial hybrids and 4 foreign commercial open-pollinated varieties) were investigated using SSR and TRAP molecular markers. DNA samples were isolated from 15-20 days-old young leaves using a new modified DNA extraction method. 21 SSR primer pairs and 6 fixed with 6 arbitrary TRAP primers (19 combinations) were used in this research. Polymorphism of between and within groups along with other genetic parameters were investigated using Dice coefficient, cluster and principal coordinates analysis. Cluster analysis of each two SSR and TRAP markers were similar. Based of these two analyses, Iranian hybrids were completely different compare to other genotypes. These results were same using other analyses. In the SSR makers, CMS group and in the TRAP markers, restorer group had high polymorphic ratio and known as diversity groups. In both marker systems, restorer and CMS groups were identified as lower genetic distance groups (SSR=0,070 and TRAP=0,066). Similarity coefficient based on two markers were estimated 0.524 (between R42 and CMS328 inbred lines) and 0.892 (between R2 and R3 CMS328 inbred lines) respectively and the mean value was 0.712.

2014, 88 pages

Keywords: cluster analysis, genetic diversity, sunflower, SSR, TRAP

TEŞEKKÜR

Çalışmanın her aşamasında yardım, teşvik ve desteğini esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. Kamil HALİLOĞLU'na çok teşekkür ederim. Her zaman ve her konuda beni asla yalnız bırakmayan ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili eşim Leila SHAHMORAD'a ve aileme teşekkür ederim.

Çalışmamız süresince bilgilerinden ve tecrübesinden özellikle istatistik analizlerinde desteğini esirgemeyen İran Tebriz Tarımsal Araştırma Merkezinin Araştırma Üyesi Sayın Dr. Ahmad RAZBAN HAGHİGHİ'ye teşekkür ederim.

Değerli arkadaşlarım, Hamid ZAMANLU, Hojjat GHAHRAMANZADEH, Morteza TAHMASBİ, Fatemeh GOHARKHANEH ve Arash HOSSEİNPOUR'a, bütün Türk arkadaşlarıma, Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Anabilim Dalı Öğretim Elemanlarına, tezimin değerli Jüri Üyelerine ve Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne teşekkürlerimi sunarım.

Hossein ZEİNALZADEH TABRİZİ

Eylül, 2014

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Çalışmanın Amacı.....	6
2. KURAMSAL TEMELLER.....	7
2.1. Ayçiçeğin tanımı, taksonomisi, bitkisel özellikleri ve önemi.....	7
2.2. Ayçiçeğin Genetiği ve Üreme Sistemi.....	8
2.3. Ayçiçeğinde Klasik Islahın Tarihçesi ve Amaçları.....	9
2.4. İran ve Türkiye İçin Ayçiçeği Islahının Önemi.....	10
2.5. Ayçiçeğinde Moleküler Islahın Önemi.....	11
2.6. Genetik Materyalin Karakterizasyonunda Moleküler Uygulamalar.....	12
2.7. Genetik Çeşitlilik.....	12
2.7.1. DNA temelli işaret teknikleri kullanarak ayçiçeğin genetik analizi.....	12
2.7.1.a. RFLP.....	13
2.7.1.b. RAPD.....	14
2.7.1.c. AFLP.....	15
2.7.1.d. SSR.....	16
2.7.2. Ayçiçeğinde ifade edilen dizi etiketi (EST).....	18
2.7.2.a. TRAP.....	19
2.7.3. Genetik mesafe.....	20
2.7.4. DNA işaretçilerinde arzu edilen özellikler.....	22
2.7.5. Bu çalışmada SSR ve TRAP işaretçi sisteminin tercih edilme nedenleri.....	23
2.7.6. Ayçiçeğinde biyoçeşitliliğin önemi, örnekler ve kullanılan yöntemler.....	23
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	27
3.1. Bitki Materyali.....	27

3.2. DNA İzolasyonunda Kullanılan Kimyasallar ve Hazırlanışları	36
3.3. Jel Hazırlanmada Kullanılan Kimyasallar ve Hazırlanışları	38
3.4. DNA İzolasyonu	39
3.5. DNA'nın Kalitesi ve Miktarının Tayini	41
3.6. Primer Seçimi	41
3.7. Primerlerin Sulandırılması	44
3.8. PCR Çoğaltmaları.....	45
3.8.1. SSR.....	45
3.8.1.a. PCR bileşenleri ve şartları	45
3.8.1.b. PCR ürünlerin yürütülmesi.....	45
3.8.1.c. PCR ürünlerin görüntülenmesi	45
3.8.2. TRAP.....	46
3.8.2.a. PCR bileşenleri ve şartları	46
3.8.2.b. PCR ürünlerin yürütülmesi.....	46
3.8.2.c. PCR ürünlerin görüntülenmesi	46
3.9. Verilerin Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analizi	47
3.9.1. Bantların Puanlaması.....	47
3.9.2. SSR ve TRAP işaretçilerinin PİC değerlerinin hesaplanması.....	47
3.9.3. Gruplar içindeki genetik çeşitliliğin tahmini.....	48
3.9.4. Gruplar arasındaki genetik mesafenin tahmini.....	48
3.9.5. Gruplar arasındaki bant modeli	49
3.9.6. Moleküler varyasyon analizi (Analysis of molecular variance-AMOVA)	49
3.9.7. Temel koordinat analizi (Principal coordinates analysis-PCoA)	49
3.9.8. Kümeleme analizi.....	49
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....	50
4.1. SSR İşaretçinin Polimorfizmi.....	50
4.2. TRAP İşaretçinin Polimorfizmi.....	55
4.3. Gruplar Arasında Bant Deseni ve Dağılımı	58
4.3.1. SSR.....	58
4.3.2. TRAP.....	59
4.4. Gruplar İçi Genetik Çeşitlilik	60

4.4.1. SSR.....	60
4.4.2. TRAP.....	60
4.5. Gruplar Arası Genetik Çeşitliliğin Belirlenmesi	61
4.5.1. Nei'in gen çeşitlilik indeksine göre genetik mesafesinin tahmini.....	61
4.5.1.a. SSR	61
4.5.1.b. TRAP.....	61
4.5.2. Kümeleme analizine göre genetik çeşitliliğin tahmini	62
4.5.2.a. SSR	62
4.5.2.b. TRAP	63
4.5.3. Temel koordinat analizine göre genetik çeşitliliğin belirlenmesi	64
4.5.3.a. SSR	64
4.5.3.b TRAP.....	66
4.6. Tüm Genotiplerin Genel Kümeleme Analizi	69
4.6.1. SSR.....	69
4.6.2. TRAP.....	71
4.6.3. SSR ve TRAP işaretçi birlikte kümeleme analizi	73
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	76
KAYNAKLAR	79
ÖZGEÇMİŞ	89

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

<	küçük
>	büyük
°C	santigrat derece
µl	Mikrolitre
bç	baz çifti
cm	santimetre
dk	dakika
g	gram
Gbç	giga baz çift
ha	hektar
kb	kilobase pair (kilobaz çifti=kbç=1000 bç)
kg	kilogram
m	metre
M	molar
Mbç	mega baz çift
mg	Miligram
MgCl ₂	Magnezyum Klorür
ml	mililitre
mm	milimetre
mM	milimolar
n	Döngü sayısı
ng	nanogram
pmol	piko mol
rpm	revolutions per minute (dakikada devir)
sn	saniye
Taq	Taq polymerase (<i>Thermus aquaticus</i> 'dan izole edilen enzim)
V	volt

v/v	Hacim / Hacim
w/v	Ağırlık / Hacim
μM	Mikrogram

Kısaltmalar

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism (Çoğaltılan Parça Uzunluk Polimorfizmi)
AMOVA	Analysis of Molecular Variance (Moleküler varyans analizi)
CTAB	Cetyl methyl tri-ammonium bromide
DNA	Deoksiribo nükleik asit
dNTP	Deoksi-Nükleotit Trifosfat
FAO	Food and Agriculture Organization (Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü)
EDTA	Ethylene di-amin tetra acetic acid (Etilen diamin asetik asit)
EST	Expressed Sequence Tags (İfade edilen dizi etiketi)
GMS	Genetic Male Sterility
He	Expected heterozygosity (Beklenen heterozigotluk)
NCBI	The National Center for Biotechnology Information
PBR	Plant Breeders' Rights
PCoA	Principal Coordinates Analysis-PCoA (Temel koordinat analizi)
PCR	Polimerase Chain Reaction (Polimeraz zincir reaksiyonu)
PET1	Fransız sitoplazması
PIC	Polymorphic Information Content (Polimorfik bilgi içeriği)
RAPD	Randomly Amplified Polymorphic DNA (Rasgele çoğaltılmış DNA polimorfizmi)
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism (Kesilmiş parçaların uzunluk polimorfizmi)
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences (İstatistik bilgisayar programı)

SRAP	Sequence Related Amplified Polymorphism (Sekansa bağlı çoğaltılmış polimorfizm)
SSR	Simple Sequence Repeats (Basit dizi tekrarları)
STR	Short Tandem Repeats (Kısa bitişik tekrarlar)
SNP	Single Nucleotide Polymorphism (Tek nükleotit polimorfizmi)
TBE	Tris-Borat-EDTA bafırı
TE	Tris-EDTA tamponu
TRAP	Target Region Amplification Polymorfisim (Hedef bölge çoğaltım polimorfizmi)
Tris-HCl	Tris-hidroklorür
UHe	Unbaised Expected heterozigosity (Tarafsız beklenen heterozigotluk)
UPGMA	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average (Aritmetik ortalamaları ile tartılı olmayan çift grup metot analizi)
USDA-ARS	United States Department of Agriculture-Agricultural Research Service

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Ayçiçeğinde hibrit üretiminin aşamaları	10
Şekil 2.2. Germplazmda genetik biyoçeşitliliğin gösterimi	26
Şekil 3.1. Türkiye’de DNA düzeyinde yapılacak çalışmalar için İran Tarım Bakanlığından alınan izin belgesi	35
Şekil 3.2. CTAB yöntem ile elde edilen DNA’nın %0.8 agaroz jeldeki görüntüsü	41
Şekil 4.1. SSR Ha 514 işaretçisinden oluşan bantların jel fotoğrafı	51
Şekil 4.2. Sabit MSP03 primeri ile tesadüfi TRAP03 TRAP primer kombinasyonun akrilamit jel üzerinde bulunan fotoğrafı	52
Şekil 4.3. Polimorfik bilgi içeriği değerlerinin 116 TRAP işaretçisinde dağılımı	58
Şekil 4.4. Beş grup arasında SSR işaretçi kullanarak UPGMA metoduyla oluşturulan kümeleme analizi	63
Şekil 4.5. Beş grup arasında TRAP işaretçi kullanarak UPGMA metoduyla oluşturulan kümeleme analizi	64
Şekil 4.6. SSR işaretçi kullanarak beş ayçiçeği grubunun temel koordinat analizi ve onların iki boyutlu diyagram üzerinde ayrımı	65
Şekil 4.7. TRAP işaretçi kullanarak beş ayçiçeği grubunun temel koordinat analizi ve onların iki boyutlu diyagram üzerinde ayrımı	67
Şekil 4.8. 68 İran ayçiçeğinin SSR işaretçi ve Dice benzerlik ve UPGMA yöntemi kullanarak kümeleme analizi sonucunda elde edilen dendrogram	71
Şekil 4.9. 68 İran ayçiçeğinin TRAP işaretçi ve Dice benzerlik ve UPGMA yöntemi kullanarak kümeleme analizi sonucunda elde edilen dendrogram	73
Şekil 4.10. 68 İran ayçiçeğinin SSR ve TRAP işaretçi, Dice benzerlik ve UPGMA yöntemi kullanarak kümeleme analizi sonucunda elde edilen dendrogram	74

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. En yaygın olarak kullanılan DNA işaretçi sistemleri karşılanması	23
Çizelge 2.2. Ayçiçeğinde genetik biyoçeşitlilik açısından kendilenmiş hatlar, açık tozlaşan çeşitler ve yerel çeşitlerin karşılaştırılması	25
Çizelge 3.1. Araştırmada kullanılan ayçiçeği genotiplerinin özellikleri.....	34
Çizelge 3.2. Bu çalışmada kullanılan SSR primerlerin bilgileri.....	43
Çizelge 3.3. Ayçiçeğinde hedef bölge çoğaltım polimorfizmi (TRAP) analizi için kullanılan sabit ve tesadüfi primer kaynak ve dizi bilgisi	44
Çizelge 4.1. SSR işaretçisinden elde edilen bilgiler	53
Çizelge 4.2. SSR ve TRAP işaretçilerinden ayçiçeği gruplar hakkında elde edilen bilgiler	54
Çizelge 4.3. TRAP işaretçisinden elde edilen bilgiler	56
Çizelge 4.4. Gruplar arasındaki farklı bant sayısı, özel bant sayısı ve diğer bilgiler.....	59
Çizelge 4.5. SSR işaretçisinde Nei'in tarafsız genetik mesafesinin ikili gruplar matrisi	61
Çizelge 4.6. TRAP işaretçisinde Nei'in tarafsız genetik mesafesinin ikili gruplar matrisi	62
Çizelge 4.7. SSR işaretçi kullanarak ilk 3 bileşen tarafından varyasyon yüzdesinin açıklanması	65
Çizelge 4.8. SSR işaretçi kullanarak incelenen özelliklerin temel koordinat analizine göre faktör değerleri ve bunlara karşı gelen bileşenler	65
Çizelge 4.9. TRAP işaretçi kullanarak ilk 3 bileşen tarafından varyasyon yüzdesinin açıklanması	66
Çizelge 4.10. TRAP işaretçi kullanarak incelenen özelliklerin temel koordinat analizine göre faktör değerleri ve bunlara karşı gelen bileşenler	66
Çizelge 4.11. SSR ve TRAP işaretçiler kullanarak Dice katsayılarının gruplar arasındaki ortalama değerleri	70

1. GİRİŞ

Yağlar, insan vücudu için yaşamsal değeri olan ve insanların beslenmesinde önemli yer tutan temel ihtiyaç maddelerinden biridir. Özellikle doymuş yağ oranlarının düşük olması, hücre yapısı için gerekli olan serbest yağ asitlerini içermesi ve insan vücudunda A, D, E, K gibi yağda eriyen vitaminleri çözmesi gibi özellikleriyle bitkisel yağlar, insan sağlığına katkıları ve yüksek besin değerine sahip olmaları bakımından önemli bir yere sahiptirler (Göksu 2007).

Ayçiçeği yağlık ve çerezlik olmak üzere iki sınıfa ayrılır. En fazla kültürü yapılan yağlık ayçiçeği olmasına rağmen çerezlik ayçiçeğinin pazar ve üretim alanında son yıllarda artış görülmektedir (Yue *et al.* 2009).

Dünyada tüketilen bitkisel kaynaklı yemeklik yağın yaklaşık %10'u ayçiçeği yağından karşılanmaktadır (Jan and Seiler 2007). Ayçiçeği tohumu yağının yaklaşık %11'i doymuş yağ asidi (palmitik ve stearik asit), %20-50'si tekli doymamış yağ asidi (oleik asit), yüksek miktarda çoklu doymamış yağ asidi (linoleik asit) ve linolenik asidi içermektedir (Gordon Dorrell and Vick 1997; León *et al.* 2003). Günümüzde, ayçiçeği tohumu yağ olarak kullanımının yanında diğer alanlarda da kullanılmaktadır (Putt 1997). Ayçiçeği tohumları küçük hayvanların ve kuşların beslenmesinde, yem olarak kullanılması ve çerez olarak insanlar tarafından tüketilmektedir. Ayrıca ekonomik bakımdan *Helianthus* cinsi genetik adaptasyon ve türleşme çalışmalarında model bitki olarak kullanılan yabancı türleri içermesi nedeniyle en önemli evrimsel taksonomidir (Rieseberg *et al.* 1995; Lexer *et al.* 2003).

Ayçiçeği hem dünyada hem de İran'da ve Türkiye'de en önemli bitkisel yağ kaynaklarından biridir. Artan nüfusa paralel olarak bitkisel yağ ihtiyacı giderek artmaktadır. İran'da ve Türkiye'de bitkisel yağ tüketiminde çoğunlukla ayçiçeği yağı tercih edilmektedir. Gerekli olan bitkisel yağın Türkiye'de yarısını İran ise %90'ını

dışarıdan ithal edilmesi ayçiçeğinin önemini giderek artırmaktadır (Yalçın 2004; Anonymous 2012).

Son yıllarda İran'da yemeklik yağ ihtiyacı yıllık 900.000 ton olup bu miktarın %90'ı başka ülkelerden ithal edilmektedir. İran'da 2012 verilerine göre 70.000 hektar alanda 78.000 ton ayçiçeği üretimi gerçekleşmiştir. Türkiye ise 2012'de bu miktarlar 605.000 hektar ve 1.370.000 ton olarak gerçekleşmiştir (FAO 2012).

Günümüzde, ayçiçeği yemeklik yağ için yetiştirilen, dünyanın en önemli bitkilerinden birisidir (Putt 1997). 2012 yılında dünyada ayçiçeğinin ekim alanı yaklaşık 24,8 milyon hektar ve tohum üretimi 37,5 milyon ton olmuştur (FAO 2012).

Ayçiçeği yağı dünya bitkisel yağ üretimindeki %7,5'lik pay ile soya, kolza ve palmyeden sonra dördüncü sırada yer almaktadır (Yılmaz 2009). Türkiye, 2009 yılı üretim verilerine göre dünya ayçiçeği üretiminde ilk on ülke arasında yer almıştır ve dünya ayçiçeği ekim alanının %2,45'ini, üretim miktarının ise %3,30'unu oluşturmuştur (FAO 2010). Bu nedenle ayçiçeği, bitki ıslahçıları için önemli bir bitki konumundadır.

Ayçiçeğinde, seleksiyon ıslahı yoluyla yağ oranının yükseltilmesi çalışmaları 1860'ta başladığı Jakovski tarafından bildirilmiştir. 1890'da ayçiçeği güvesine (*Homoeosoma nebulella* Hb) karşı ıslah çalışmalarının başladığı bildirilmiştir. 1925'te ıslah çalışmaları sadece birkaç merkezde yapılmaktaydı. Pustovoit, ilk ıslah çalışmalarına Krasnodar, Rusya'da başlamıştır. 1940'da Rusya'daki varyetelerde tanedeki yağ oranı ortalama %33 iken, 1965'de Pustovoit'in geliştirdiği çeşitlerin yağ oranları %55'e yükselmiştir (Mohammad Sharif 2006).

Ayçiçeği ıslahında temel amaç, tohum verimini ve tohumdaki yağ oranını artırarak verimliliği yükseltmektir. Tohum verimi ve yağ oranının ardından hastalık ve zararlılara dayanıklılık diğer önemli ıslah amaçları arasında yer almaktadır. Ayrıca tohum veriminde önemli katkılarda bulunan verim öğelerindeki (tabla çapı, tablada tane sayısı,

tabladaki fertil çiçek sayısı, bin tane ağırlığı vb.) artışlar birim alan tane verimindeki artışta önemli rol oynamaktadır. Bu ıslah amaçlarının gerçekleştirilmesinde, ayçiçeğinin yabancı dölleme özelliğinden yararlanılarak geliştirilen, hibrit çeşitler yaygın olarak kullanılmıştır (Carter and Fuccillo 1978; Kaya and Kolsarici 2005).

Ayçiçeği melezlemesinde kullanılan ebeveyn çeşitlerin ve melezleme sonrası elde edilen hatların seleksiyonu için bitki özelliklerinin detaylı olarak ortaya konulmasına ihtiyaç vardır. Bu yöntemler ayçiçeği çeşitlerini sadece dış görünüşünden teşhis etmeye dayalı yöntemlerdir (Eryiğit vd 2011). Bir çeşit üzerinde yapılan morfolojik çalışma farklı lokasyonlarda tekerrürlü olarak yürütülmelidir (Manivannan *et al.* 2008). Islah kademelerinin farklı aşamalarında, tarlada bitki boyu, tabla çapı, çiçeklenme gün sayısı, fizyolojik olgunluk gün sayısı, hasat sonrasında, tane verimi, 1000 tane ağırlığı, yağ verimi, yağ oranı, yağ asitleri kompozisyonu gibi karakterlerin ortaya konulması mümkündür (Eryiğit vd 2011). Ayçiçeği ıslah ve seleksiyonunda, genetik saflığın kontrolü tipik olarak morfolojik karakterlere (ya da fenotipe) dayanmaktadır. Bu kontrol yöntemi bitkilerin direkt değerlendirilmelerini içermektedir. Bu gibi durumlarda morfolojik karakterlere dayalı genetik varyabilitenin belirlenmesi tek başına çeşit teşhis etmede yeterli olmayabilir (Aksyonov 2005). Bu yöntemin en önemli avantajı kolay ve ucuz olmasıdır. Buna karşın, çok geniş alanlara ve zamana ihtiyaç göstermesi, tarlada yapılan gözlemlerde, farklı çeşitleri çok açık ve kolay bir şekilde karşılaştırmanın çok zor olması, yetiştirme periyodu boyunca değişen hava şartlarından dolayı bu karakterlerin oluşumunda çok büyük farklılıklar meydana gelebilme ihtimalinin olması ise en önemli dezavantajlarıdır (Eryiğit vd 2011).

Tek melez hibrit ayçiçeğinin elde edildiği 1970’li yıllardan beri sitoplazmik erkek kısır (CMS) hatlar ile fertil restorer hatların melezlenmesi ile geliştirilmiştir (Fick and Zimmer 1974).

Halen ayçiçeği tarımında genelde hibrit çeşitler kullanılmasına rağmen, aynı CMS gen kaynakları kullanılması nedeniyle, geleneksel ıslah metotları kullanılarak elde edilen

çeşitlerde, genetik verimlilik kapasitesinin üst sınırına yaklaşılmıştır. Gerek ayçiçeğinde, gerekse hibrit ıslahının uygulandığı diğer türlerdeki yüksek verimin elde edildiği hibritlerde, kullanılan ebeveynler arasındaki akrabalık derecesi ne kadar düşükse, yani birbirileri arasında genetik uzaklık ne kadar fazla ise, özellikle tane veriminde heterosis olarak adlandırdığımız melez azmanlığı o kadar yüksek olmaktadır (Miller and Fick 1997).

Bugün ayçiçeğinde yüksek verim için mutlaka farklı genetik kaynaklara sahip kendilenmiş ebeveyn hatlara ihtiyaç vardır. Bu farklı genler, ayçiçeğinde çok sayıdaki tek veya çok yıllık yabani ayçiçeği türlerinde mevcut olup, bu yeni genotip kaynakların kültürü yapılan tek yıllık *Helianthus annuus* L. türüne bir an önce aktarılması gerekmektedir. Ancak bu gen kaynaklarının kullanılması, türler arası melezlemeler ile mümkün olup, bunların klasik ıslah metotlarını kullanarak elde edilmesine olanak yoktur (Bidney and Scelonge 1997). Bu genlerin, yabani türlerden tarımı yapılan kültür bitkilerine aktarılması, ancak biyoteknolojik metotların kullanılmasıyla mümkündür. Bu nedenle, son yıllarda bu çerçevede yapılan çalışmalar gün geçtikçe önem kazanmakta ve her yıl yeni başarılar elde edilmektedir (Yalçın 2004).

Biyokimyasal metotların elde edildiği doku kaynağı, bitkinin fizyolojik durumu ve yetiştirme şartlarından büyük oranda etkilenmesinden dolayı, ayçiçeği çeşitleri arasındaki genetik akrabalığı ya da farklılığı belirlemede biyoteknolojik yöntemleri ön plana çıkarmıştır (Eryiğit vd 2011). Dünyada kullanımı gittikçe yaygınlaşan bu moleküler metotların ayçiçeği ıslahında ve çeşit teşhisinde kullanılması, hem zaman ve hem de uzun dönemde uygulandığı takdirde yapılacak masraflar açısından da çok büyük kolaylıklar sağlamaktadır. Büyük oranda DNA işaretçilerini esas alan genetik haritalar, modern ayçiçeği ıslahçıları için önemli tarımsal karakterleri analiz etmede, özellikli genlerin veya genomik bölgelerin aktarımı çalışmalarında ve önemli genlerin klonlanmasında güçlü bir araç haline gelmiş, ayrıca karşılaştırmalı haritalama yoluyla farklı ayçiçeği türleri ve cinsleri arasındaki benzerlikler ve farklılıklar ortaya konulmuştur. Bu yöntemler, morfolojik ve hastalıklara dayanıklılık verilerinin elde

edilmesinde, çeşit muhafaza ve korumada, çeşit sınıflandırma çizelgelerinde ve genetik farklılığın seviyesinin belirlenmesinde uygulanan en güçlü yöntemler konumuna gelmişlerdir (Eryiğit vd 2011).

Ayçiçeğinde başarı ile uygulanabilen biyoteknolojik ve moleküler yöntemler şunlardır (Yalçın 2004):

- In vitro kültür teknikleri (protoplast ile çoğaltım, protoplast kültürü, katlanmış haploitlerin üretilmesi)
- Genetik transformasyon
- Moleküler klonlama
- Moleküler işaretçilerin uygulaması (RFLP, RAPD, AFLP, SSR, TRAP vs.)

TRAP (Hedef Bölge Çoğaltım Polimorfizmi) bu teknikler içinde oldukça yeni bir tekniktir ve ilk olarak 2003 yılında ayçiçeğinde kullanılmıştır (Hu and Vick 2003).

Moleküler işaretçiler kullanılarak uygulanan DNA parmak izi metotları yanında, karşılaştırmalı haritalama yöntemi ile farklı ayçiçeği genotipleri arasındaki akrabalık ilişkileri, genetik varyabilite, verim ve kaliteyi etkileyen genlerin belirlenmesi hastalık ve zararlılara dayanıklılık ile ilgili detaylı özelliklerin ortaya konulması da mümkün olmuştur (Eryiğit vd 2011).

Son yıllarda moleküler biyolojide görülen hızlı ilerleme, bitki genetiği çalışmalarında, genetik çeşitliliğin korunması, üretimi, ıslah gibi hedefler doğrultusunda kullanımına çok büyük ve önemli katkı sağlamıştır. Fakat bu işaretçi yardımcı moleküler biyolojik uygulamalar, moleküler işaretçilerin tamamlayıcısı olmaktadır (Vardar-Kanlıtepe vd 2010).

Ayçiçeğinde ilk kullanılan işaretçi RFLP'dir. Bunu RAPD ve AFLP teknikleri izlemiştir. RFLP işaretçisi çok zahmetli bir teknik olmasına rağmen, RAPD ve AFLP

işaretçilerine göre bazı avantajlara sahiptir ama spesifik olmamalarına rağmen, genom bağıllık haritalama çalışmalarında daha az kullanılmıştır (Kole 2006). Yine, Mikrosatelit SSR, EST (ifade edilen dizi etiketi)-SSR, SNP ve TRAP işaretçileri, ayçiçeğinde çok az kullanılmıştır.

1.1. Çalışmanın Amacı

- Bu çalışmada TRAP ve SSR moleküler işaretçiler kullanarak İran'daki Tarım Araştırma Merkezinden temin edilen ayçiçeği genotiplerinin genetik çeşitliliğini ve akrabalığını belirlenmek
- Ayçiçeği üzerinde moleküler bilgi eksikliğinden dolayı gelecekte ayçiçeği germplazm geliştirme ve kullanımı için bilgi oluşturmak
- Restorerler, CMS'ler, yabancı ticari hibritler, İran hibritleri ve yabancı ticari açık tozlaşan genotipler için moleküler seviyede ayırmak için uygun bir yöntem geliştirmek
- Ayçiçeği genotipleri arasında PİC (Polimorfik Bilgi İçeriği) ve ayırt gücü açısından iki SSR ve TRAP moleküler işaretçiler sistemlerinin karşılaştırmak
- Heterosisten faydalanması ve ileride hibrit üretimi için restorer ve CMS hatların arasındaki genetik mesafesinin tahmini ve heterotik grupların belirlenmesidir.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Ayçiçeğin tanımı, taksonomisi, bitkisel özellikleri ve önemi

Kültür ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.), *Helianthus* cinsine ait 67 türden biridir. Ayçiçeği türlerinin çoğu başta ABD olmak üzere Kuzey Amerika kökenlidir. Bu bitki şüana kadar yağ bitkisi, çerezlik, kuşyemi, süs bitkisi ve kesme çiçek üretimi gibi birçok amaç için ıslah edilmiş ılıman ve subtropikal iklimlerde yetiştirilmektedir (Hu *et al.* 2010).

Ayçiçeği *Compositae* (*Asteraceae*) familyasında yer alan, genellikle tek yıllık, büyük bir çiçek tablasına sahip (çiçek topluluğuna kapitulum denir ve 30 cm'ye kadar ulaşan bir çapa sahip) açık tozlaşan ve 3 metreye ulaşan dik büyüyen bir bitkidir (Kole 2006).

Helianthus cinsinde temel kromozom sayısı 17 olup diploit, tetraploit ve hekzaploit formları söz konusudur. Yaklaşık beşte biri tek yıllık olan ayçiçeği türlerinin büyük çoğunluğu çok yıllıktır (Kole 2006).

Ayçiçeği Türkiye'de ve dünyada yağlık ve çerezlik olarak iki tip olarak yetiştirilmektedir. Çerezlik olarak insanların tüketimi ve kuşyemi olarak değerlendirilir. Yağlık olmayan tipler çerezlik olarak adlandırılır ve tohumları çizgili ve iri, yağlık tiplere göre kalın kabuklu olup, kabuğu çabuk ayrılmaya müsaittir. Bu tiplerden iri olmayanlar ise, kuşyemi olarak değerlendirilmektedir. Bunun yanında yağlık tiplerden daha düşük yağ oranına ve hektolitre ağırlığına sahiptir. Yağlık ayçiçeği tipleri ise, genelde siyah renkli, ince kabuklu ve linoleik ve oleik yağ asitleri içeren tiplerdir. Yağlık ayçiçeği taneleri %38-50 arasında yağ ve %20 oranında protein içerir (Kaya 2003).

2.2. Ayçiçeğin Genetiği ve Üreme Sistemi

Ayçiçeği (*Helianthea*, *Asteroidea*, *Compositae*) tek yıllık ve temel kromozom sayısı 17 olan diploit ($2n=34$) bir bitkidir. Bu bitkinin tetraploit ($2n=68$) ve hekzaploit ($2n=102$) türlerde bulunmaktadır (Gupta and Tsuchiya 1991).

Ayçiçeği yabancı döllenene (%98) bir bitkidir. Ancak düşük oranda kendine döllenme (autogami) de görülmektedir. Erkek organları polenleri çeşitli böcek türleri ve rüzgar ile taşınmasına rağmen, tozlaşmada böcekler ve özellikle de balarılar (*Apis mellifera*) daha etkilidir (Çoşke 2005). Ayçiçeğinde protandri (erkek organların, dişi organlardan önce dölleme olgunluğuna gelmesi durumu) bulunmakta olup, bu durum yabancı döllenme oranını artırmaktadır. Bir ayçiçeği tablasında steril (kısır) çiçekler ve fertil (verimli) çiçekler olmak üzere iki tip çiçek bulunmaktadır. Fertil çiçeklerde tozlanma ve döllenme, buna bağlı olarak da tohum olgunlaştırma tablada dıştan içe doğru olmaktadır.

Ayçiçeğinde ve diğer yabancı dölenen bitkilerde iki tür kısırlık vardır. Bunlar sitoplazmik erkek kısırlığı (CMS) ile genetik erkek kısırlığıdır (GMS). Ayçiçeğinde her iki tip kısırlık da mevcuttur. Bunlardan sitoplazmik erkek kısırlığı (CMS) bitki ıslahında ayçiçeğinde ilk defa 1969 yılında Leclercq tarafından *H. annuus* $\times$ *H. petiolaris* türlerinin melezlenmesinden elde edilmiştir. Bu sistemde yabancı ayçiçeği *H. petiolaris* türünden elde edildiği için PET1 olarak kodlandırılmıştır. Yine bu sistemde daha sonra elde edilen kaynaklar da bu sisteme göre, ilk üç harfi elde edildiği türe göre kodlanarak isimlendirilmiştir. PET1 CMS kaynağı 1990'lara kadar, ticari hibrit üretiminde kullanılan tek kaynaktır. Oldukça istikrarlı olup, bitki ve tohum özelliklerine herhangi bir olumsuz etkisi yoktur. Ayçiçeğinin tüm dünyada yayılmasında en önemli etken sitoplazmik erkek kısırlığın ve bunu restore eden genlerin bulunması sonucunda hibrit üretiminin pratikleşmesidir. Diğer taraftan, 1970 yıllardan beri ayçiçeği hibritleri sadece PET1'in ana hat olarak kullanılmasıyla elde edilen hibritler dar bir genetik tabana sahip olması ve dolayısıyla bitkinin hastalıklara hassas olmasına neden olmuştur. Bu nedenle

ayçiçeğinin genetik biyoçeşitliliğin artırılmasına şiddetli bir şekilde ihtiyaç duyulmaktadır (Singh 2007; Zeinalzadeh Tabrizi and Ghaffari 2009).

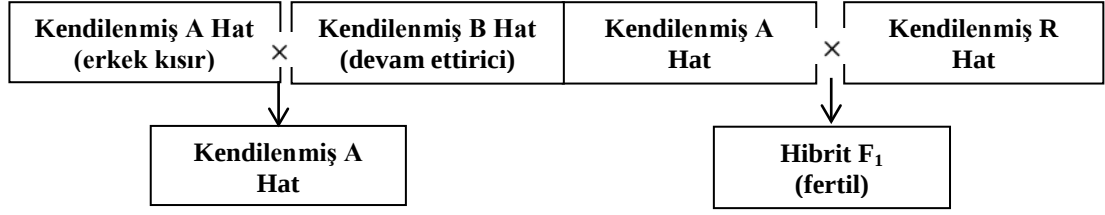
Şuana kadar 72 yeni erkek kısırlık kaynağı *Helianthus* germplazmasında bulunmuştur (Meena *et al.* 2013) ama bunların hastalıklara dayanıksız olmaları ve ilgili devam ettirici ve restorer hatlarının uygun olmamaları, ayçiçeği hibrit üretiminin teknolojisinde bir sınırlama meydana getirmiştir. Bu yüzden yeni erkek kısır kaynakları ve onlara göre uygun devam ettirici ve restorer hatlarının bulunması, ayçiçeği ıslahçıların son yıllarda ilgilerini çekmektedir (Zeinalzadeh Tabrizi and Ghaffari 2009).

Ayçiçeği bir tahmine göre yaklaşık 3,000 M bç/1C haploit genom büyüklüğüne, diğer bir tahmine göre yaklaşık 3,5 G bç ve 3,6 G bç genom büyüklüğüne sahiptir (Hu *et al.* 2010).

Moleküler işaretçileri kullanarak, bitki tescil ve koruma için genetik mesafesinin tahmini, uluslararası tohum şirketleri için çok önemlidir (Dubreuil *et al.* 2000). Bu nedenle, ayçiçeği ıslahçıları ve ticari tohum şirketleri için genetik çeşitliliğin belirlenmesi ve etkili bir işaretçi sisteminin geliştirilmesi oldukça önemlidir.

2.3. Ayçiçeğinde Klasik Islahın Tarihçesi ve Amaçları

Ayçiçeğinin ticari ıslahı bu bitkiyi üreten birçok Avrupa ve Amerika ülkelerinde 1920-1950 yılları arasında başlanmıştır. Yağ oranı, tabla çapı, erkencilik, mildiyö gibi hastalıklara dayanaklılık karakterleri, çalışılan özellikler arasındadır. Anlamlı verim artışı, 1966'da Leclercq tarafından ilk kez tanımlanan heterosisten sonra ve ardından da sitoplazmik erkek kısır hatların kullanılmasıyla başlanmıştır. Klasik ıslah olarak en sık kullanılan yöntem, erkek-fertil hatların üretimi (R ya da restorer hat), B ya da devam ettirici hat ve androsteril ya da erkek kısır hat (A ya da CMS hat), 6 ya da fazla ardışık kendilenme döngülerden en iyi hatların seçilmesiyle gerçekleşmiştir. Sekil 2.1'de de ayçiçeği hibrit üretiminin şematik yolu gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Ayçiçeğinde hibrit üretiminin aşamaları

Bu yöntemle geliştirilen özellikler, verim, protein ve yağ miktarı, yağ asitlerin (linoleik ve oleik) kompozisyonu, hastalıklara dayanaklılık (*Sclerotinia*, *Phomopsis*, mildiyö), böceklerle dayanaklılık (*Liriomyza spencerella*, *Rachiplusia nu*, ve *Spilosoma virginica*) ve abiyotik streslere dayanaklılıktır. Bu ıslah programların genetik tabanı, farklı *Helianthus annuus* L. türlerinden ve türler arası diğer *Helianthus* melezlemeyle gerçekleşmiştir (Kole 2006).

Ayçiçeği ıslahının amaçları, yüksek verim potansiyeline ve stabilitesine sahip, yüksek yağ verimli ve kaliteli, biyotik ve abiyotik stres faktörlerine dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesini içermektedir. Klasik ıslah yöntemleriyle istenilen özellikler F_2 popülasyonundan tek bitkilerin ya da tümünün seçilmesiyle bu amaçlara ulaşılmıştır. Ancak, bu ıslah yöntemlerinin en önemli dezavantajı, fazla zaman alması, ekonomik olmaması ve bunun yanında gen havuzunda türlerin az olmasıdır (Durante *et al.* 2002). Bu sebeplerden dolayı DNA temelli işaretçiler bu olumsuzları ortadan kaldırmada çok önemli bir yere sahiptirler. Çünkü bu yöntemler fenotipik karakterlerin genomik lokusu ile bağlantısına izin verir. Gerçekte, ayçiçeğinde, genom ve ekspresyon analizi için yeni işaretçiler araçların geliştirilmesi temel hedeflerden birisidir (Durante *et al.* 2002).

2.4. İran ve Türkiye İçin Ayçiçeği Islahının Önemi

Şimdiye kadar İran'da ve Türkiye'deki ayçiçeği ıslah programlarında sadece klasik ıslah metotları kullanılmış ve henüz ayçiçeği gen kaynaklarının çeşitliliği moleküler düzeyde belirlenmemiştir. İran'daki ayçiçeği araştırmalarının amacı tek melez hibritlerin

geliştirilmesi ve üçlü hibrit melezle yüksek yağ oranı, tohum verimi ve verim stabilitesine sahip hibritleri elde etmektir. Bunun yanında hastalıklar (mildiyö) başta olmak üzere diğer biyotik ve abiyotik stres faktörlerine dayanıklı, kısa vejetasyon süresi ve yeni sitoplazmik erkek kısır kaynaklarının bulunması ayçiçeği ıslah programlarında ana amaçtır (Ghafari 2004).

Diğer taraftan İran'da ayçiçeğinin moleküler genetik çeşitliliği üzerine herhangi bir yaygın ve yeterli bilgi bulunmayıp ve bu konuyla ilgili literatüre rastlanılmamıştır. Yine, İran'daki ayçiçeği genotiplerinin genetik çeşitliliği belirlenmemiş olup araştırmacıların elindeki genetik materyallerin çeşitliliği hakkında bilgi yoktur. Özellikle İran'da TRAP moleküler işaretçi sistemi ayçiçeğinde uygulanmamış olup diğer işaretçilerle karşılaştırılmaları değerlendirilmemiştir.

2.5. Ayçiçeğinde Moleküler Islahın Önemi

Ayçiçeği ikinci büyük hibrit ve birinci yağ bitkisidir. Ayçiçeği tarımı düşük fertiliteye sahip kurak topraklarda ve yüksek ya da düşük sıcaklığa sahip alanlarda yapıldığından yıllık üretim oldukça değişkendir. Bu nedenle ayçiçeği ıslahı bu marjinal çevre şartlarına adapte olabilen ve aynı zamanda tohum veriminin artışına yönelik yapılmaktadır (Singh 2007).

Ayçiçeği hibritlerinin elde edilmesinde dünyada tek bir dişi ebeveyn kullanıldığı için en dar genetik tabana sahiptir. Bu durum oldukça ciddi sorunlara yol açabilmektedir. Bu nedenle kültür ayçiçeğinde genetik çeşitliliğin artırılmasına ihtiyaç vardır. Ayçiçeğinin yabani türleri, özellikle hastalıklar başta olmak üzere böceklerle dayanıklı çok sayıda gen kaynağına sahiptir. Hem de bu yabani türler, tüm hibrit çeşit ayçiçekleri için ana ebeveyn olarak hizmet etmektedir. Özellikle yabani türlerin toplanması ve korunması ile bu durum oldukça artış göstermiştir. Bu da, ayçiçeğinin geliştirilmesinde genetik biyoçeşitliliğin elde edilmesini artırmaktadır. Ancak bu genetik çeşitliliğin çok az bir kısmı kullanılmıştır. Birçok agronomik özellikler için faydalı germplazmlar

belirlenmiştir ve bazı moleküler işaretçiler istenen allellerin indirek seleksiyonu ve QTL için daha çok kullanılabilir hale getirilmiştir. Bunun yanında alternatif rekombinasyon ve seleksiyon metotları geliştirilmiştir (Singh 2007).

Moleküler biyoloji, ayçiçeği ıslah programının gelişimini etkilemiştir ve bu da bitki manipülasyonuna yol açmaktadır. (Singh 2007). Ayçiçeğinin gelecekteki ıslah yönü, yabani akrabalarından kültür ayçiçeğine hedef genlerin aktarılmasıdır. Bu nedenle, yeni ayçiçeği hibritleri, diğer organizmalardan, akraba olmayan bitkilerden ve birçok uzak akrabalarından hastalıklara ve böceklerle dayanıklılık genlerine sahip olacaktırlar. (Seiler and Marek 2011).

2.6. Genetik Materyalin Karakterizasyonunda Moleküler Uygulamalar

Moleküler işaretçiler genetik çeşitliliği belirlenmede ve kültür ile yabani *Helianthus* türler arasında filogenetik ilişkilerin kurulmasında etkili bir araç olarak kullanılmaktadır. Hem kalitatif hem de kantitatif özelliklere ve genlere bağlı işaretçiler, işaretçi destekli seleksiyonu kolaylaştıracak ve sonunda klonlama ve arzu edilen genlerin manipülasyonuna yol açmaktadır (Singh 2007).

2.7. Genetik Çeşitlilik

2.7.1. DNA temelli işaret teknikleri kullanarak ayçiçeğin genetik analizi

Birçok teknik, hayvanlarda, bitkilerde ve diğer mikro-organizmalarda DNA seviyesinde polimorfizmi belirlemek için geliştirilmiştir. Bir DNA işaretçi, DNA düzeyindeki varyasyonunu ortaya çıkarma ve genotipler arasında benzerliklerin belirlenmesini sağlamaktadır.

Çok sayıda yapılan genetik çeşitlilik çalışmalarında nükleotit polimorfizmi incelenmiştir. Bu çalışmalar *Arabidopsis*'te (Savolainen *et al.* 2000; Aguadé 2001; Nordborg *et al.* 2002; Wright *et al.* 2003), birçok önemli tarla bitkisinde (White and Doebley 1999; Tenaillon *et al.* 2002; Garriss *et al.* 2003; Zhu *et al.* 2003; Hamblin *et al.* 2004) ve bazı taksonlar üzerinde başarıyla gerçekleştirilmiştir (Garcia-Gil *et al.* 2003; Kado *et al.* 2003; Brown *et al.* 2004; Ingvarsson 2005).

Aşağıda ayçiçeğinde kullanılan DNA işaretçi teknikleri kısaca tartışılmıştır.

2.7.1.a. RFLP

RFLP (Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi) insan genom haritası için geliştirilmiş olan ilk DNA işaretçi tekniğidir (Botstein *et al.* 1980). Bu teknikle restriksiyon enzim tanıma bölgesinin kazanç veya kaybını ya da iki restriksiyon bölgesi arasındaki DNA parçacıklarının insersiyon ya da delesyonu ile ortaya çıkan varyasyonu ölçülmektedir. RFLP işaretçi, deneysel bireylerden izole edilmiş yüksek molekül ağırlıklı DNA örneklerini restriksiyon endonükleaz ile parçalanması, ayrılan DNA parçalarının büyüklüklerine göre agaroz jel elektroforezi, naylon membran DNA parçacıkları blotlama, etiketlenmiş DNA probu ile hibridizasyonuna bir özel dizilişe bağlanmış ve hibridizasyon sinyallerinin keşfini içermektedir. Prob, genomik ya da cDNA kütüphanesinden klonlanmış bir parçadır. İlk zamanlarda RFLP analizleri hibridizasyon sinyalleri p32 etiketli prob ile ortaya çıkmıştır. Bu yöntemle tek dizin hibridizasyonunun tamamlanması için 2 ya da 3 hafta zamana gerek duyulmaktadır. 1990'ların ortasında enzime bağlı problemlerin icadı ve kemilüminesans (kimyasal ışıltama) yönteminin ortaya çıkışı bu süreci hızlandırmıştır. Üstelik RFLP yavaş ve emek-gerektiren bir teknik olup büyük miktarda yüksek kaliteli DNA'ya ihtiyaç vardır. Ancak RFLP tekrarlanan ve mükemmel sonuçlar veren bir yöntemdir. RFLP ile ekonomik açıdan önemli olan pek çok hayvan ve bitki türünün genom karakterizasyonu yapılmıştır.

Ayçiçeğinde RLFP analiziyle, Gentzbittel *et al.* (1992) 44 *Helianthus* cinsini inceleyerek ayçiçeği cinsinin soy ağacını çıkarmışlar ve bunu takiben öncelikle yabani türler incelenerek basit bir ayçiçeği genomik haritası hazırlanmış, daha sonra bu harita genişletilmiştir (Yalçın 2004).

Son yıllarda kültür ayçiçeğinde dört RFLP bağıllık haritası yayınlanmıştır (Gentzbittel *et al.* 1999; Gedil *et al.* 2001). Bu haritalardan ikisi fenotipik ve kantitatif karakter lokusunun haritalanmasında kullanılmıştır (Al-Chaarani *et al.* 2002; Pérez-Vich *et al.* 2002; León *et al.* 2003). Ayçiçeğinde RFLP işaretçileri ve haritalarının yaygın bir şekilde kullanılmamasının nedeni, RFLP problemlerinin eksikliği ve bu işaretçinin düşük verimliliğidir (Yu *et al.* 2003).

2.7.1.b. RAPD

RAPD (Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA), rastgele seçilmiş tekli primerler kullanılarak DNA üzerinde rastgele bölgelerinin çoğaltıldığı polimorfizm yöntemidir (Williams *et al.* 1990; Welsh and McClelland 1991). Amplifikasyonu, oryantasyona ve genomda test edilen onlu nükleotit primerlerin tamamlayıcı olan rastgele dağılmış dizinlerinin mesafesine bağlıdır.

RAPD’de polimorfizm iki bağlanma bölgesi arasındaki insersiyon ya da delesyonlar ve bağlanma bölgesindeki kazanç ya da kayıplarından dolayı ortaya çıkmıştır. Bu nedenle RAPD’in çalışması için önceki DNA dizini hakkında bilgiye gerek yoktur. Çünkü primerler kalıpta herhangi bir yere bağlanacak ve DNA polimerazın parçacıkları çoğaltılmasına izin verecektir. DNA dizi bilgisi az olduğu için ekonomik önemi olan birçok tür için bu bir avantajdır. Buna ilave olarak, RAPD yönteminin uygulamasının kolay olması RAPD’i bitki araştırmalarında popüler yapmıştır.

Genetik çeşitlilik ve ortak soy (co-ancestry) analizleri RAPD işaretçisi kullanarak gerçekleştirilmiştir (Arias and Rieseberg 1995).

Ayçiçeği araştırmacıları RAPD işaretçisini genom haritalama ve pas hastalığı (Lawson *et al.* 1998) ile orobanşa dayanıklı genlerin belirlenmesinde kullanmışlardır (Lu *et al.* 2000).

RAPD dominant bir işaretçi olarak bulunması nedeniyle düşük çözünürlüğe sahip olduğu için diğer işaretçi tekniklerine yol göstermiştir. Çünkü bu yöntem genom içerisinde özel bir bölgeye spesifik değildir, tekrarlanabilirliği oldukça düşük olması belirgin şekilde dezavantajdır (Jones *et al.* 1997).

2.7.1.c. AFLP

AFLP (Çoğaltılan Parça Uzunluk Polimorfizmi) PCR'a dayalı olan diğer bir DNA parmak izi tekniğidir. Bu teknik, RFLP'nin hibridizasyona dayalı sistemini amplifikasyona dayalı sistemine çevirmektedir. Diğer bir ifadeyle, AFLP metodu ile PCR çalıştırılarak dolaylı ve toptan olarak RFLP belirlenmektedir. AFLP yöntemi uzun zaman alıcı ve karışıktır. İlk basamakta, DNA iki farklı restriksiyon enzimiyle genelde 6 bazlık ve 4 bazlık kesici kullanılarak kesilir. İkinci basamakta, sentetik oligonükleotidlerin (adaptörleri) restriksiyon parçacığının sonuna bağlanmasıdır. Üçüncü basamakta, dizilişi tamamlayıcı olan primerlerin parçacıklarının ön amplifikasyonudur. Dördüncü aşama, ön amplikasyon aşamasında kullanılan primerlere ilave olarak 3 seçici nükleotit içeren primerle gerçekleştirilen seçici amplifikasyondur. Bu adımda, sadece restriksiyon bölgelerinin yanaşma bölgelerdeki nükleotidleri ile eşleşen bölgeler bu aşamada çoğaltılır. Son basamak ise denatüre akrilamit jel ile elektroforez ve gümüş boyama ya da oto radyografi teknik ile parçacıkların gösterilmesi ve onların amplifikasyonudur. Genelde her primer kombinasyonu 50-100 parçacıkları amplifiye edebilir ve bu da sekans jel üzerinde birçok-bant profili meydana getirir (Vos *et al.* 1995).

AFLP farklı genom büyüklüğündeki bütün organizmalar için mükemmel bir genotipleme tekniğidir. AFLP, yüksek uygulanabilirliği nedeniyle etkin bir işaretçi

sistemidir. Örneğin genetik haritalamada, DNA parmak izi ve çeşitlilik analizlerinde kullanılmaktadır (Kusterer *et al.* 2004). Cheres and Knapp (1998) çalışmalarında bu tekniği ayçiçeği DNA parmak izi analizinde güçlü bir araç olarak göstermişlerdir. AFLP birçok tarla bitkisinde (pirinç, mısır ve son zamanlarda ayçiçeği) genetik haritalamada başarıyla kullanılmıştır (Al-Chaarani *et al.* 2002).

RAPD ve AFLP işaretçileri çok kullanan yöntemler olmasına rağmen her ikisi de dominant, çoklu kopyaya sahip ve genellikle spesifik olmayan işaretlerdir. Ancak, AFLP çok sayıda polimorfik lokusları belirleyebilmekte ve RAPD'den daha iyi tekrarlanabilmektedir.

Ayçiçeğinde yapılan bir araştırmada, Hongtrakul *et al.* (1997) 24 kendilenmiş hatta AFLP işaretçi kullanarak genetik çeşitliğinin belirlenmesinde, hatları heterotik gruplara ayırmada ve tek melez hibritlerin oluşturulmasında kullanılmıştır.

2.7.1.d. SSR

SSR (Basit Dizi Tekrarları), aynı zamanda, mikrosatelit veya STR (Kısa Bitişik Tekrarlar) olarak bilinen çok tekrarlanan iki-, üç-, dört-, veya beş- nükleotitlik motifler ile (örneğin CACACACA..., CATCATCAT..., ACGTACGTACGT..., ya TAAAATAAAATAAAA) DNA'da bulunan, 1-6 baz çifti uzunluğundaki tekrar eden dizilerdir. SSR polimorfizmi tekrarları içeren küçük bir DNA parçasının PCR ile çoğaltılması ve daha sonra çoğaltılan parçaların agaroz, poliakrilamid jel veya kapiler elektroforezde boyutlandırmasıdır. Tekrarların sayısı, incelenen genotipler arasında değişmektedir ve sonuç olarak çoğaltılan parçalarda bir uzunluk değişimine neden olmaktadır.

Son derecede polimorfik, ko-dominant kalıtmı, analitik olarak basit ve kolayca transfer edilebilmesi nedeniyle diğer işaretçi sistemlerine göre genom çalışmalarında SSR işaretçileri daha çok tercih edilmektedir. SSR polimorfizmi ilk olarak soya bitkisinde

bildirilmiştir (Akkaya *et al.* 1992). O zamandan beri SSR işaretçileri çeltikte (Morgante and Olivieri 1993); (Wu and Tanksley 1993), arpa (Becker and Heun 1995), mısır (Senior and Heun 1993) ve domates (Broun and Tanksley 1996) gibi bitki türlerinde geliştirilmiştir.

Sadece bitki genom haritalamasında değil genotip tanımlamada ve varyete korumasında (Smith and Helentjaris 1996), tohum saflık değerlendirmesinde, germplazm korumasında (Brown and Kresovich 1996) ve çeşitlilik çalışmalarında (Xiao *et al.* 1996), QTL analizlerinde (Blair and McCouch 1997), soyağacı analizinde, işaretçi destekli ıslah çalışmalarında (Ayres *et al.* 1997) ve pozisyonel gen klonlama için büyük DNA kütüphanelerin taranmasında SSR işaretçileri, RFLP işaretçilerin yerine geçmişlerdir.

Bireysel SSR işaretçileri için özel primer çiftlerinin tasarımında diziliş bilgisine ihtiyaç duyulduğundan dolayı, SSR'ların ilk gelişimi genetik kütüphanelerin SSR problemleriyle melezlenmesi ve pozitif melezlenmiş klonların sekans analizi ile taranması zahmetli ve pahalı bir yaklaşım olarak başlamıştır. Tarla bitkilerinde EST'nin artmasıyla SSR için geniş-çaplı aramayı ve SSR primerlerinin tasarımında bilgisayar programlarının kullanılmasına olanak sağlamıştır. Çok sayıda SSR işaretçileri çeşitli tarla bitki türlerinin veri tabanlarından elde edilen EST sekanslarından geliştirilmiştir (Holton *et al.* 2002; Thiel *et al.* 2003).

Ayçiçeğinde SSR işaretçi geliştirmede ve genom haritalama çalışmalarında Oregon State Üniversitesinde Steven Knapp Laboratuvarı öncülük etmiştir (Huestis *et al.* 1996; Tang *et al.* 2002; Yu *et al.* 2002; Yu *et al.* 2003).

Ayçiçeğinde SSR işaretçi ile ilgili ilk rapor 1994 yılında yayınlanmış olmasına rağmen (Brunel 1994) SSR işaretçilerinin sayısı 2002 yılından önce 100'e ulaşamamıştır (Whitton *et al.* 1997; Hongtrakul *et al.* 1998; Hongtrakul *et al.* 1998).

Yu *et al.* (2002) 970 (CA) n -, (CT) n -, (CAA) n -, (CATA) n -, ya (GATA) n - zenginleştirilmiş genomik DNA kütüphanelerinden izole edilmiş klonlardan 131 tanesini ayçiçeğinde SSR işaretçi olarak kullanılmışlardır. Elit ıslah hatlar aralarındaki çeşitliliğin testinde di-, tri- ve tetranükleotit tekrarları için her lokusta sırasıyla 3.7, 3.6, ve 9.5 allel meydana geldiğini belirlemişlerdir. Ortalama PIC değeri di-, tri- ve tetra nükleotit tekrarları için sırasıyla 0,53, 0,53 ve 0,83 olarak hesaplanmıştır. Bu değerlerin Ayçiçeğinde RFLP'ye göre çok daha yüksek olduğu bildirilmişlerdir.

Tang *et al.* (2002) 1089 SSR işaretçisinden 462 tanesini iki USDA-ARS'dan geliştirilmiş ayçiçeği hatların RHA 280 ve RHA 801 arasındaki melezden elde edilmiş bir rekombinant kendilenmiş hat popülasyonun haritalamasında kullanılmışlardır. Yine SSR işaretçileri ayçiçeğinde 16 elit saf hat arasında ve 19 elit saf hat ile 28 yerli ve yabani germplazma katılımlar Amerikan yerel çeşitlerin de dahil olmak üzere genetik çeşitliliğinin belirlenmesi için geliştirilmiştir (Paniego *et al.* 2002; Tang and Knapp 2003; Yu *et al.* 2003).

2.7.2. Ayçiçeğinde ifade edilen dizi etiketi (EST)

İfade edilen dizi etiketi bir dizileme temelli yöntem olarak ters transkriptaz enzimiyle ve olgun bir mRNA'dan sentezlenen 200-500 bp uzunluğunda bir cDNA parçasıdır. Bir cDNA haritası, kromozomda olan haritadaki anlatım yapan DNA bölgelerinin (eksonların) yerleşimini göstermektedir. Bu cDNA parçaları, bilinmeyen genlerin tanımlanmasında, yeni genleri tespitinde ve gen ekspresyonunda kullanılmaktadır (Adams *et al.* 1993).

EST'lerin veri tabanları, evrim çalışmalarında ve moleküler işaretçilerin geliştirilmesinde önemli bir kaynaktır. EST-kaynaklı işaretçiler genomun transkripsiyon bölgesinden geldiğinden diğer işaretçilere göre daha geniş bir taksonomik aralıkta korunmuştur (Pashley *et al.* 2006). EST kullanımı, *Compositae* gibi genetik kaynakları

sınırlı olan ya da dizi analizi yapılmayan türlerde faydalı olabilmektedir (Lai *et al.* 2005).

Bugüne kadar oluşturulan EST kütüphaneleri gen bulunmasında, moleküler işaretçilerin geliştirmesinde ve tüm genom düzeyinde gen ekspresyon analizinde ve istenilen fenotipler için aday genlerin belirlenmesinde mükemmel bir kaynak oldukları kanıtlanmışlardır (Clarke *et al.* 2003; Gupta and Rustgi 2004). Bu yöntem doğrudan bir özelliği ya da dizi karşılaştırma temeline dayalı fonksiyonun belirlenmesi nedeniyle genetik haritalama için spesifik diziliş sahip bir genin haritalanmasına yardımcı olabilir (Tamborindéguy *et al.* 2004; Ben *et al.* 2005).

Compositae Genom Projesi kapsamında, ayçiçeği ve marul (diğer bir önemli *Compositae* bitkisi) için geniş kapsamlı ve açıklamalı EST veri tabanı geliştirilmiştir (<http://cgpdb.ucdavis.edu>). Ayçiçeği için EST'ler *H. annuus* L., *H. argophyllus*, *H. ciliaris*, *H. exilis*, *H. paradoxus*, *H. petiolaris* ve *H. tuberosus*'tan elde edilmiştir. Bunlar yaklaşık 136,935 tek geni temsil etmektedir ve NCBI veri tabanında saklanmaktadır (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/PLANTS/PlantList.htm>. html # EST) (Hamrit 2009).

2.7.2.a. TRAP

TRAP oldukça yeni bir tekniktir ve ilk defa ayçiçeği genotipleri üzerinde yapılmıştır (Hu and Vick 2003). TRAP mevcut diziliş bilgilerinin kullanımı ve biyoinformatik araçlardan hızlı bir şekilde istenilen özelliklerle ilişkili olan işaretçilerin geliştirilmesi için tasarlanmıştır. TRAP varsayılan genlerin bilinen dizilerine karşı tasarlanmış sabit primer ile rastgele dizilenmiş primerler ile kombinasyonu sonucunda polimorfizmi hedeflenen genomik bölgede yakalamak için tasarlanmıştır (Hu and Vick 2003). TRAP işaretçi RAPD ve AFLP işaretçilerine göre incelenen fenotipe bağlı olarak daha yüksek bir polimorfizm sunmaktadır.

TRAP ayçiçeğinin beş önemli tarımsal özelliğinin işaretçilerinin geliştirmesinde başarıyla kullanılmıştır. Bu özellikler mildiyö hastalığına dayanıklılıkta dominant bir gen (Hu *et al.* 2004), apikal dallanmanın kontrolünde bir resesif gen (Rojas-Barros *et al.* 2008), tam erkek kısırlılığını yöneten bir resesif gen (Chen *et al.* 2006), azaltılmış klorofil içeriği nedeniyle açık yeşil yaprak rengini yöneten bir resesif gen, çiçek rengini kontrol eden iki genin birisini (Yue *et al.* 2008) ve *Sclerotinia* (tabla çürüklüğüne) karşı dayanıklı QTL'dir (Yue *et al.* 2008).

Ayrıca TRAP, *Arabidopsis* gibi telomeraz tekrar dizilişe karşı sabit primerler ile ayçiçeği bağlılık gurubu uçlarının tanımlanmasına yönelik işaretçilerin üretilmesinde kullanılmıştır (Hu 2006).

Bu teknik buğdayın genetik bağlılık haritasının oluşturulmasında ve ayçiçeğinin mildiyö hastalığının (*Plasmopara halstedii* (Farl.) Berl and de Toni) moleküler farklılık analizinde başarıyla kullanmıştır (Chen *et al.* 2005).

2.7.3. Genetik mesafe

Genetik mesafe, allelik varyasyon açısından iki birey arasındaki farklılık olarak tanımlanabilir. Bu tanım sonralarda Nei (1987) tarafından iki popülasyon veya tür arasındaki genetik farklılıkların sayısal ölçümü şeklinde detaylandırılmıştır (Mohammadi and Prasanna 2003).

Genetik mesafe çeşitliliğin bir ölçümü olarak bitki çeşitlerinin (daha çok ticari ürünlerde) tanımlanmasında önemli bir araçtır. Moleküler işaretçiler genetik mesafeyi belirlemek için yaygın olarak kullanılmaktadır (Camlin 2000; Cooke and Reeves 2003). Carrera *et al.* (1996) ayçiçeği ebeveyn genotipleri arasındaki gen frekansı farklılığını önemli bir gösterge olarak belirtmiştir. Ebeveynler arasındaki gen frekansı ne kadar yüksek ise oluşacak heterosis de o kadar yüksek olacağını vurgulamıştır.

Smith *et al.* (2009), bitki ıslahçı popülasyonun geliştirilmesinde yapılacak melezlemede ebeveynlerin seçiminde doğru karar verebilmesi için genetik mesafe bilgisini kullanabileceğini belirtmişlerdir. Aynı zamanda heterosisin seviyesini en üst düzeye çıkarmak amacıyla, hibrit kombinasyonların oluşturulmasında genetik yönden çeşitlilik gösteren ebeveynlerin belirlenmesinde yardımcı olmaktadır.

Genetik mesafe, türler arasındaki ya da bir tür içinde popülasyonların genetik farklılığı olarak tanımlanabilir. Daha küçük bir genetik mesafe, yakın genetik ilişki olma eğilimindedir ve büyük genetik mesafelerde daha uzak bir genetik ilişkiyi sunmaktadır. Üstelik genetik mesafe farklı türler arasındaki benzerliğin karşılaştırmasında da kullanılabilir.

Genetik mesafeyi ölçmek için çeşitli yollar vardır. En yaygın olarak kullanılan üç mesafe, Nei'in genetik mesafesi (Nei 1972; Nei 1978), Cavalli-Sforza Chord'un mesafesi (Cavalli-Sforza and Edwards 1967), ve Reynolds, Weir ve Cockerhams'ın (Reynolds *et al.* 1983) mesafesidir. Nei'in standart genetik mesafesi genetik farklılıkları mutasyonlar ve genetik sürüklenme etkisini kaynak almaktadır. Cavalli-Sforza Chord ve Reynolds, Weir and Cockerhams mesafesi genetik farklılıkları sadece sürüklenme etkisine göre ölçmektedir.

Moleküler işaretçiler kullanarak genetik mesafenin saptanması uluslararası tohum şirketleri için bitki kaydı ve bitki ıslahçı haklarının korunması açısından oldukça önemlidir. Tang *et al.* (2002) SSR işaretçileri temelinde ilk ayçiçeğinin bağlantı haritasını ve aynı zamanda tek veya düşük kopya DNA işaretçileri ile genetik bağlantı haritasını oluşturmuştur.

Ebeveyn hatlarının genetik çeşitliliğini anlamak, özellikle hibrit tohum üretiminde çok önemlidir. Bu bilgiler, bir ıslahçıya heterotik guruplar ve bu yüzden ebeveyn hatlarda heterosisi üst düzeye çıkarma potansiyeline netlik vermektedir.

Moleküler işaretçiler, morfolojik ve biyokimyasal veriler ile ebeveyn hatlar arasında genetik mesafenin belirlenmesinde bağ kurmaktadır. Veri setleri genetik çeşitliliği yansıtmak için morfolojiye (Bar-Hen *et al.* 1995), izozimlere (Hamrick and Godt 1997) ve protein profillerine göre (Smith *et al.* 1987) derlenmiştir. Son yıllarda DNA işaretçilerin kullanması genotiplerin hassas ve güvenilir karakterizasyonu ve ayrımcılığı için önerilmiştir (Jaikishan *et al.* 2006).

2.7.4. DNA işaretçilerinde arzu edilen özellikler

- Doğal olarak yüksek polimorfik olmalı
- Ko-dominant katılıma sahip olmalı (diploit organizmaların hetrozigot ve homozigotluk durumlarını saptamalı)
- Çevresel faktörlerden etkilenmemeli
- Kolay erişilebilir (bulunmalı)
- Kolay ve hızlı uygulanabilmeli
- Laboratuvarlar arasında bilgi akışının kolay olması

Yukarıdaki kriterlerin tamamını karşılayacak bir moleküler işaretçi bulmak son derece zordur. Yürütülecek çalışmanın tipine bağlı olarak yukarıdaki kriterlerden en az bir kaçını karşılayabilecek bir işaretçi sistemi kullanılmalıdır (Joshi *et al.* 1999).

En yaygın olarak kullanılan DNA işaretçi sistemleri çizelge 2.1’de tablo halinde sunulmuştur (Korzun 2003; Sujatha *et al.* 2010).

Çizelge 2.1. En yaygın olarak kullanılan DNA işaretçi sistemleri karşılanması

Özellik/İşaretçi	RFLP	RAPD	AFLP	SSR	TRAP
PCR-temelli	hayır	evet	evet	evet	evet
Polimorfizm	orta-düşük	orta- yüksek	yüksek	yüksek	yüksek
Baskınlık	ko-dominant	dominant	dominant	ko-dominant	dominant
Geliştirme maliyeti	orta	düşük	orta-yüksek	yüksek	orta-yüksek
Analiz başına maliyet	yüksek	düşük	düşük	orta	orta
Taşınabilirlik (lab/bitki)	yüksek/yüksek	düşük/düşük	yüksek/düşük	yüksek/düşük	orta/yüksek
DNA miktarı/kalitesi	yüksek/yüksek	düşük/düşük	düşük/yüksek	düşük/orta	düşük/orta
Jel sistemi	agaroz	agaroz	akrilamit	akrilamit/agaroz	akrilamit

2.7.5. Bu çalışmada SSR ve TRAP işaretçi sisteminin tercih edilme nedenleri

SSR işaretçi sistemini yüksek oranda yeniden tekrarlanabilirlik bir tekniktir. Genomu oldukça iyi kapsamaktadır ve yüksek polimorfizme sahiptir. Radyoaktif etiketlemeye ihtiyaç duymamaktadır ve otomasyonu kolaydır.

TRAP ise bir PCR temelli, etkili ve hızlı bir işaretçi sistemidir. Bu sistem biyoinformatik araçlardan kullanmakta ve EST veri tabanı bilgilerinden elde edilmektedir. Bu teknikte hedeflenen olası aday gen dizileri etrafında polimorfik işaretçiler oluşturmaktadır.

2.7.6. Ayçiçeğinde biyoçeşitliliğin önemi, örnekler ve kullanılan yöntemler

Bitki genetiğinde ve ıslahında cinsler, türler, alt türler, popülasyonlar ve elit ıslah materyalleri arasında olan genetik biyoçeşitliliğin bilinmesi önemlidir. Bitki ıslahçıları için genellikle popülasyonlar ve elit germplazmlar arasında ve içindeki olan biyoçeşitlilik çok önemlidir. Çünkü gelecekte ıslah programlarında başarının belirlenmesini sağlamaktadır. Diğer taraftan, ıslah materyalleri arasındaki ilişkiler

hakkındaki bilgiler ve mevcut germplazmın genetik biyoçeşitliliği, bitki ıslah programlarında ebeveynlerin seçiminde önemli bir yere sahiptir (Coors and Pandey 1999).

1970'den önceki yöntemler taksonomik birimler arasındaki genetik biyoçeşitliliğin ölçümü sadece soyağacı analizi (pedigree analysis) ve morfolojik, fizyolojik ve sitolojik işaretçiler üzerinde ve kalitatif özelliklerin biyometrik analizleri gibi, heterosis veya melezlemede sonra açılan açılım varyansına dayanmaktaydı (Coors and Pandey 1999). Ancak bu tür fenotipe dayalı verilerden biyoçeşitliliğin belirlenmesi çok zor olup, uzun yıllar çalışmak ve yüksek maliyet gerektirmektedir.

1970'den sonraki yıllarda izoenzimler çok sayıda taksonomik ve evrimsel çalışmalarda başarılı bir şekilde kullanılmıştır (Hamrick and Godt 1997). Ancak düşük polimorfizme ve sınırlı sayıda işaretçi lokusuna sahip olduklarından dolayı genellikle elit yetiştirme materyallerinin sınıflandırılmasında başarısız olmuşlardır (Coors and Pandey 1999).

Son yıllarda RFLP, RAPD, AFLP, ve SSR gibi moleküler işaretçilerin gelişimi, izoenzimler ile ilgili sınırlamaların çoğunu ortadan kaldırmıştır. Bu arada önemli bitki türlerinde bağlılık haritaları geliştirilmiştir. Bu işaretçi sistemleri farklılıkları DNA düzeyinde meydana çıkardıkları için kültür ve yabancı bitki türlerinin hızlı bir şekilde genetik biyoçeşitliliğin değerlendirilmesinde ve fenotipik verilerin doğrulanmasında son derecede güçlü araç olmuşlardır (Coors and Pandey 1999).

Bu işaretçi sistemlerinin farklı özellikleri olmasına rağmen farklı sonuçlar ve farklı genetik biyoçeşitliliği ortaya çıkarabilirler. Bu nedenle farklı işaretçi sistemlerinden oluşan farklı genetik biyoçeşitlilik üzerine yapılan çalışmalar önem taşımaktadır (Rauf *et al.* 2010).

Bitki ıslahçıları her zaman insanların ihtiyacına uygun bitkilerin seçimine yoğunlaşmışlardır. Sonuçta, genotiplerin büyümesinde ve gelişmesinde daha üniform

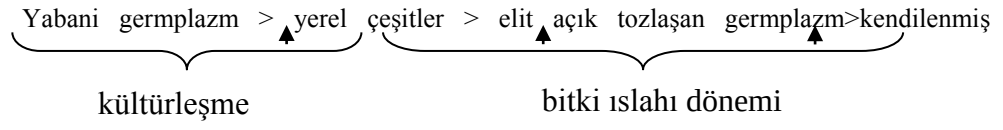
olanlar seçilmekte ve genel ekim için önerilmektedirler (Rauf *et al.* 2010). Fu (2006)'ya göre bitki ıslahı, genetik tabanı genişletmekte ya da darlaştırmakta veya değiştirmektedir. Bu nedenle bitki ıslah faaliyetleri önemli derecede allelik kayıplara yol açmaktadır.

Ayçiçeği üretimi heterosise dayalıdır ve çok sayıda ticari hibrit çeşitlerin ekimi mevcuttur. Heterosisi ticari tabanda kullanılması için kendilenmiş hatların ebeveynlerin 6-7 generasyonda kedileşmesi yöntemiyle seleksiyonuna ihtiyaç vardır. Çizelge 2.2'de bu çalışmalar sonuçları özet olarak verilmiştir.

Çizelge 2.2. Ayçiçeğinde genetik biyoçeşitlilik açısından kendilenmiş hatlar, açık tozlaşan çeşitler ve yerel çeşitlerin karşılaştırılması (Rauf *et al.* 2010).

Kaynak	İşaretçi	Bitki Materyali	Allelik		Genetik Mesafe	Genetik Biyoçeşitlilik
			kayıp	kazanç		
Lawson <i>et al.</i> 1994	RAPD	ticari çeşitler gelişmiş hatlar yabani ayçiçeği türleri	-	evet	Genetik benzersizlik Hibritler birbirlerine %27 benzersiz Yabaniler ise %38	yüksek biyoçeşitlilik ve tam farklılık grupları arasında
Gentzbittel <i>et al.</i> 1994	181 RFLP probları	17 kendilenmiş hat	-	-	Genetik mesafe (Nei 1978) 0,21	düşük
Zhang <i>et al.</i> 1996	81 prob enzym	26 kendilenmiş hat	-	-	-	düşük
Jie <i>et al.</i> 2003	23 RAPD 10 AFLP	23 çerezlik kendilenmiş hat	-	-	Genetik mesafe Nei ve Li (1979) RAPD 0.35; AFLP 0.31	yüksek
Liu and Burke, 2006	9 EST-SNP	yabani ayçiçeğiyle kültür arasında	-	-	Nükleotit çeşitlilik (Rozas and Rozas 1999) yabani (0,014) ile ekili (0,006)	kültür ayçiçeği %50-60 daha düşük
Yue <i>et al.</i> 2009	12 TRAP	177 kendilenmiş hat	-	-	Genetik mesafe (Nei 1978) 0.42	önemli derecede

Şu ana kadarki ayçiçeği çalışmalarda genetik biyoçeşitliliğine az örnekte gösterilmiştir (Lawson *et al.* 1994; Liu *et al.* 2003; Yue *et al.* 2009). Bunun yanında bazı çalışmalar da genetik biyoçeşitliliğin azalmasını yansıtmıştır (Gentzbittel *et al.* 1994; Zhang TP *et al.* 1996). Liu and Burke (2006)'a göre yabani ayçiçeği ile karşılaştırıldığında kültür ayçiçeği %50-60 daha düşük biyoçeşitliliğe sahiptir. Bu nedenle türler arası melezlenmeyle tavsiye edilmiştir.



Şekil 2.2. Germplazmda genetik biyoçeşitliliğin gösterimi. (>: yüksek genetik biyoçeşitlilik)

3. MATERİYAL ve YÖNTEM

3.1. Bitki Materyali

Bu çalışmada bitki materyali olarak İran'dan temin edilen 68 ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.) genotipi (ticari açık tozlaşan genotipler, hibritler, ve kendilenmiş hatlar) kullanılmıştır (Çizelge 3.1). Kendilenmiş R ve CMS hatları İran'da ayçiçeği ıslah programlarında Araştırma Merkezinde elde edilmiştir. Diğer ticari hibrit ve açık tozlaşan çeşitler ise ticari olarak hale hazırda kullanılmaktadır.

Türkiye'de bu genotipleri üzerinde çalışmak için her genotipten 15-20 günlük 10 tane taze yapraklar alınmış ve bu yaprak örnekleri ayrı ayrı sıvı nitrojen kapsülünde İran Tarım Bakanlığı 7028 numaralı izin (Şekil 3.1) ile Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümünün Bitki Genetik Laboratuvarına getirilmiştir.

Çizelge 3.1. Araştırmada kullanılan ayçiçeği genotiplerinin özellikleri

Numarası	Genotipin Adı	Genotipin Türü
1	R 2	Restorer Hat (R)
2	R 3	Restorer Hat
3	R 5	Restorer Hat
4	R 15	Restorer Hat
5	R 19	Restorer Hat
6	R 21	Restorer Hat
7	R 22	Restorer Hat
8	R 23	Restorer Hat
9	R 24	Restorer Hat
10	R 26	Restorer Hat
11	R 27	Restorer Hat
12	R 29	Restorer Hat
13	R 33	Restorer Hat
14	R 34	Restorer Hat
15	R 38	Restorer Hat
16	R 41	Restorer Hat
17	R 42	Restorer Hat
18	R 43	Restorer Hat
19	R 46	Restorer Hat
20	R 50	Restorer Hat
21	R 53	Restorer Hat
22	R 55	Restorer Hat
23	R 56	Restorer Hat
1	Armada-GL	Yabancı hibrit (YH)
2	ES-Biba	Yabancı hibrit
3	ES-Karamba	Yabancı hibrit
4	Brocar-RM	Yabancı hibrit
5	Euroflor	Yabancı hibrit
6	Tekny	Yabancı hibrit
7	Allstar	Yabancı hibrit
8	Sor	Yabancı hibrit
1	R453	İran hibrit (İH)
2	43/128	İran hibrit
3	Azargol	İran hibrit

1	Berezanski	Yabancı açık tozlaşan (YAT)
2	Master	Yabancı açık tozlaşan
3	Zaria	Yabancı açık tozlaşan
4	Record	Yabancı açık tozlaşan
1	CMS 16	CMS Hat (CMS)
2	CMS 26	CMS Hat
3	CMS 28	CMS Hat
4	CMS 30	CMS Hat
5	CMS 32	CMS Hat
6	CMS 36	CMS Hat
7	CMS 38	CMS Hat
8	CMS 40	CMS Hat
9	CMS 42	CMS Hat
10	CMS 44	CMS Hat
11	CMS 46	CMS Hat
12	CMS 54	CMS Hat
13	CMS 58	CMS Hat
14	CMS 78	CMS Hat
15	CMS 82	CMS Hat
16	CMS 96	CMS Hat
17	CMS 110	CMS Hat
18	CMS 154	CMS Hat
19	CMS 212	CMS Hat
20	CMS 222	CMS Hat
21	CMS 234	CMS Hat
22	CMS 262	CMS Hat
23	CMS 298	CMS Hat
24	CMS 310	CMS Hat
25	CMS 328	CMS Hat
26	CMS 330	CMS Hat
27	CMS 354	CMS Hat
28	CMS 358	CMS Hat
29	CMS 376	CMS Hat
30	CMS 502	CMS Hat

PHYTOSANITARY CERTIFICATE گواهی بهداشت نباتی		 جمهوری اسلامی ایران ISLAMIC REPUBLIC OF IRAN وزارت جهاد کشاورزی MINISTRY OF JIHAD-E-AGRICULTURE سازمان حفظ نباتات PLANT PROTECTION ORGANIZATION		Sr.No. 91:31:393222 شماره سریال	
1. Name and Address of Exporter نام و نشانی صادر کننده Mr. Hossein Zeinalzadeh-Tabrizi		2. Declared Name and Address of Consignee نام و نشانی اظهار شده گیرنده TR./- Ataturk University Erzurum			
3. To Plant Protection Organization(s) of به سازمان (های) حفظ نباتات TURKEY		4. Place of Origin مبدأ I.R.IRAN			
5. Declared Means of Conveyance وسیله نقلیه اظهار شده Truck No: -		6. Declared Point of Entry محل ورود اظهار شده -			
7. Name of Produce نام محصول Sunflower leaf	Botanical Name of Plants نام علمی گیاهان Helianthus annus	Number and Description of Packages تعداد و نوع بسته ها 68 Number	Distinguishing Marks علامت مشخصه -	Quantity Declared مقدار اظهار شده -	
8. This is to certify that the plants, plant products or other regulated articles described herein have been inspected and/or tested according to appropriate official procedures and are considered to be free from the quarantine pests specified by the importing contracting party and to conform with the current phytosanitary requirements of the importing contracting party, including those for regulated non-quarantine pest. بدین وسیله گواهی میشود که گیاهان، محصولات گیاهی یا دیگر اقلام مشمول مقررات بهداشت گیاهی مشروحه بالا بر اساس شیوه های رسمی مقتضی مورد بازرسی و یا بررسی قرار گرفته و ماری از آفات قرنطینه ای مورد نظر کشور وارد کننده محسوب میشود و یا موافق بهداشت گیاهی فعلی کشور وارد کننده از جمله مواردی که برای آفات غیر قرنطینه ای مشمول مقررات بهداشت گیاهی در نظر گرفته شده مطابقت دارد.					
9. Additional Declaration توضیحات تکمیلی Carrying In Liquid Nitrogen Capsule.					
DISINFESTATION AND/OR DISINFECTION TREATMENT روش آفت زدایی و یا رفع آلودگی			16. Place of Issue محل صدور West Azarbayjan Urmia		
10. Treatment روش درمان *			Issue No. شماره گواهی 7028		
11. Chemical (Active Ingredient) ماده شیمیایی (ماده موثر) *		12. Duration and Temperature مدت و دما *		Date تاریخ 10/03/2013	
13. Concentration غلظت *		14. Date تاریخ *		Name and Signature of Authorized Officer نام، نام خانوادگی و امضای کارشناس قرنطینه Nader Dapeshmand Shahbazian	
15. Additional Information اطلاعات تکمیلی *			Seal مهر قرنطینه		
No financial liability with respect to this certificate shall attach to the Plant Protection Organization of I.R.Iran or to any of its officers or representatives. هیچ گونه تعهد مالی از بابت صدور این گواهی برعهده سازمان حفظ نباتات جمهوری اسلامی ایران و نمایندگانها و مأمورین آن نخواهد بود.					

Şekil 3.1. Türkiye’de DNA düzeyinde yapılacak çalışmalar için İran Tarım Bakanlığından alınan izin belgesi.

3.2. DNA İzolasyonunda Kullanılan Kimyasallar ve Hazırlanışları

1 M Tris-HCl (pH 7,5)

121,1 g TrisBase ve 120-125 ml HCl 1 litre saf suda iyice karıştırılmış ve otoklavlanmıştır.

0,5 M EDTA, (500 ml stok, pH 8,0)

93 g EDTA (disodyum etilenediaminetetra-asetat·2H₂O) 400 ml ultra saf suda eritilmiştir. pH'si 8'e ayarlanmıştır. (yaklaşık ~10 g NaOH pellet ile). pH ayarlanırken NaOH tamamen erildikten sonra toplam hacim ultra saf ile 500 ml'ye tamamlanmıştır.

5 M NaCl

292 g NaCl 1 litre ultra saf suda eritilmiştir.

1X TE Tampon çözeltisi

Ortamda 10 mM Tris-HCl (pH 8,0) ve 1 mM EDTA (pH 8,0) olacak şekilde hazırlanmıştır. Her 500 ml için:

5 ml 1 M Tris-HCl (pH=7,5), 1 ml 0,5 M EDTA (pH=8,0) olarak toplam hacim 500 ml'ye tamamlanmıştır.

3 M Sodyum Asetat (pH=5)

408 g sodyum asetat trihidrat ($\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) 800 ml ddH₂O eritilmiş ve 3 M asetik asit ile pH'sı 5'e ayarlanmıştır. Toplam hacim ultra saf su ile 1 litreye tamamlanmış ve filtreden geçirilerek steril edilmiştir.

10M Amonyum Asetat ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$)

192,70 g amonyum asetat 250ml saf suda yavaşça ısıtarak eritilmiş ve sonra filtreden geçirilerek sterilizasyonu yapılmıştır.

Fenol:Kloroform:İzoamil Alkol

25:24:1 oranında hazır olarak kullanılmıştır.

Kloroform:İzoamil alkol

24:1 oranında hazır olarak kullanılmıştır.

%70'lik Etil Alkol:

%100'lük etil alkolden 70 ml alınmış ve toplam hacmi steril distile su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır.

3.3. Jel Hazırlanmada Kullanılan Kimyasallar ve Hazırlanışları

10X TBE (Tris/Borat/EDTA)

108 g Tris base (890 mM)

55 g borik asit (890 mM)

960 ml ddH₂O eritilmiş ve üzerine 40 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) eklenmiş ve ultra saf su ile toplam hacmi 1 litreye tamamlanmıştır. Daha sonra filtre kağıdından geçirilmiştir.

20X Sodyum Borat (SB)

45 g borik asit, 8 g NaOH 500 ml saf suda iyice karıştırılmış ve toplam hacmi ultra saf su ile 1 litreye tamamlanmıştır

%20'lik akrilamit jel (19:1)

190 g akrilamit, 10 g bis-akrilamit, 1 litre saf suda eritilmiş ve filtreden geçirilmiştir.

6X Loading Dye (10 ml)

10 mM Tris-HCL (pH 7,5)

50 mM EDTA

%10 ficol 400

%0,25 bromofenol blue

%0,25 zaylen siyanol FF

Amonyum Per Sülfat %10 (w/v)

10 g amonyum per sülfat 100 ml saf suda eritilmiş ve -20°C saklanmıştır.

%2'lik agaroz jelin hazırlanışı

Bu çalışmadaki kullanılan elektroforez tankının hacmi 330 ml olduğundan dolayı 6,6 g agaroz 330 ml 1X SB bufferında karıştırılıp mikrodalga fırında eritilmiştir. Biraz soğuduktan sonra (yaklaşık 60°C'de) 15 µl etidiyum bromit (10 ng/ml) eklenmiş ve tanka dökülmüştür. 40-60 dk bekledikten sonra jelin tarakları biraz SB buffer üstüne dökülerek yavaşça çıkartılmıştır.

%6'lık akrilamit jelin hazırlanışı

54 ml %20'lik akrilamit (19:1), 9 ml 10X TBE, 117 ml saf su bir beherde karıştırılmıştır. 1,2 ml amonyum per sülfat ve 132 µl TEMED karışıma eklenmiş ve jelin kalınlığı 1,5 mm olacak şekilde ayarlanmış camlar arasına yüklenmiştir.

3.4. DNA İzolasyonu

Çalışmamızda DNA izolasyonu aşağıda verilen şekilde CTAB yöntemi kullanarak yapılmıştır.

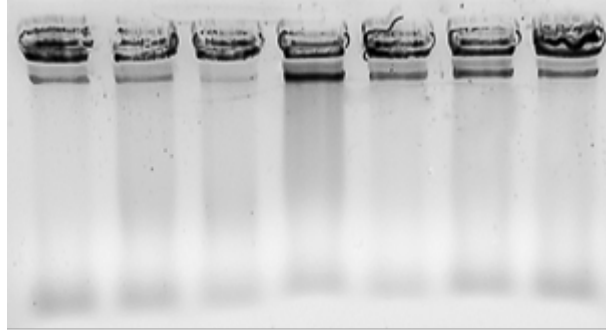
- 1- Yaprak örnekleri direkt seradan alınmıştır (veya -80°C dolabından alınabilir).
- 2- Örnekler havan içerisine konularak üzerine sıvı nitrojen eklenmiş ve toz kıvamında öğütülmüştür.
- 3- 200-300 mg öğütülmüş haldeki bu örneklerden 2 ml'lik eppendorf tüpleri içerisine konmuştur.

- 4- Tüplerin içersine 1ml önceden ısıtılmış ekstraksiyon bufferi (%2 CTAB (w/v); 1,42 M NaCl; 200 mM EDTA; 100 mM Tris-HCl, pH 8,0; %1 Na₂S₂O₃; %0,2'lik 2-merkaptöetanol) eklenmiş ve tüp hafifçe alt-üst edilerek karıştırılmıştır.
- 5- Tüpler 1 saat süre ile su banyosunda 65°C bekletilmiştir.
- 6- 1 saatlik süre içerisinde öğütölmüş halde bulunan yaprak örneklerinin tüpe yapışmasını önlemek amacıyla her 10 dakikada bir alt-üst edilerek yavaşça karıştırılmıştır.
- 7- Bu süre sonunda tüplerin soğuması için 5 dk süre ile oda sıcaklığında bekletilmiştir.
- 8- Tüpler 24°C 10 dk süre ile 14000 rpm'de santrifüj edilmiştir.
- 9- Santrifüj işleminden sonra yaklaşık 750 µl üst fazdan alınarak yeni tüpe aktarılmıştır.
- 10- Üzerine 750 µl kloroform-izoamil-alkol (24:1) eklenmiştir.
- 11- Tüpler 1 dk süre ile yavaşça alt-üst edilerek karıştırılmıştır.
- 12- Tüpler 4°C 14000 rpm'de 10 dk süre ile santrifüj edilmiştir.
- 13- Üst fazdan 600 µl alınarak yeni tüplere aktarılmıştır.
- 14- Üzerine 600 µl kloroform-izoamil-alkol (24:1) eklenmiştir. (Bu işlemde sonra çalışmanın geri kalan kısmı buz içerisinde yapılmıştır).
- 15- Bu işlemde sonra tüpler 4°C 14000 rpm'de 10 dk süre ile santrifüj edilmiştir.
- 16- 500 µl üst fazdan yeni tüpe aktararak üzerine 100 µl amonyum asetat (10 M), 100 µl sodyum asetat (3 M PH=5,5) ve 500 µl -20°C önceden soğutulmuş izopropanol eklenmiştir. (bu aşamada tüpler yavaşça alt-üst edilerek sarmal yapının görölmesi sağlanır).
- 17- Tüpler 4°C 14000 rpm'de 10 dk süre ile santrifüj edilmiştir.
- 18- Tüpler santrifüjden alınarak üst faz dökölerek uzaklaştırılmış ve DNA pellet'i görölmeğe başlamıştır.
- 19- Tüpler ters çevrilerek oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır.
- 20- Tüplerin kısa sürede kuruması için 54°C 15 dk süre ile bekletilmiştir.
- 21- Elde edilen DNA örnekleri 150 µl TE bufferında çözdürölmüş ve kullanmaya kadar -20°C saklanmıştır.

3.5. DNA'nın Kalitesi ve Miktarının Tayini

Elde edilen DNA örneklerinin kantitatif tayini için her örnekten 1 µl alınarak NanoDrop ND-3300 spektrofotometre cihazı ile (NanoDrop Technologies, USA) protein kontaminasyonu için 260/280 ve polifenol ve polisakaritler kontaminasyonu için 260/230 oranları belirlenmiştir. Bu oranlar 1,7- 2,2 ve 2-2,2 arasında olması gerekir. En uygun değer 260/280 oranının 1,8'dir.

DNA örneklerinin kalitatif tayini için %0,8'lik agaroz jel 1X SB bufferında hazırlanmıştır ve örnekleri yüklemek için 5 µl DNA örneği, 5 µl ultra saf su ve 3 µl 6X loading buffer toplamda 13 µl olacak şekilde jele yerleştirilen tarak aracılığıyla oluşturulan kuyucuklara yüklenmiştir. 30 dk süre ile 60 V'da elektroforez'de yürütülmüştür. Daha sonra ise UV ışığı altında (Vilber Lourmat, France) cihazında DNA bantları görünmüştür (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. CTAB yöntem ile elde edilen DNA'nın %0.8 agaroz jeldeki görüntüsü

3.6. Primer Seçimi

SSR analizleri için daha önce gerçekleştirilen birçok araştırma kapsamında kullanılan ve başarılı sonuçların alındığı SSR primerleri Tang *et al.* (2002) ve Paniego *et al.* (2002) 32 çift primer kullanılmıştır. Çizelge 3.2'de araştırılan mikrosatelit lokusların özellikleri

verilmiştir. TRAP analizi için ise (Yue *et al.* 2009) (Şekil 3.3) tarafından bildirilen sabit ve tesadüfi primerlerden oluşan 19 farklı kombinasyon kullanmıştır.

Çizelge 3.2. Bu çalışmada kullanılan SSR primerlerin bilgileri

Sıra No.	Lokus	Motif	İleri primer dizilişi 5'–3'	Geri primer dizilişi 5'–3'	Boyut aralığı beklentisi (bp)
1	Ha 432	GT	CTT TAT CCC CCA CCC CCT CC	GGG TTT AGT GGC CAG TAG TTG TC	168-720
2	Ha 514	GA	GGT CAA CGG ATT TAG AGT C	GTA TTG ATT CCA ACA TCC AG	164-200
3	Ha 1327	ATT	CCG TTA GGT AGT TTA CTT GCG AC	GGT GGG GGG AAT ATT CTG AGG TG	175-550
4	Ha 1442	ATT	GCT TAT GTG CTT ACG TGT TCC TG	CTA AAC AGT TCG GCG AGT GTA GG	202-244
5	Ha 1608	ATT	GAT CTT AGG TCC GCC AC	GAT GGC ATT TGG CTA GAC	169-331
6	ORS-6	AGG	GTG GAG AGA GGT GTA GAG AGC	CAC CCC TCA CCC TGA CAC	250-260
7	ORS-5	AAC	ATC TGG AGC AGC AAA TTC AG	CTG CTG CCC ACC ATA CTG	275-350
8	HNCA-2	GT	TGA GAC AAG CAT AAG CAC	TAG ACA AGA CAA GGG ACT	208-320
9	Ha 357-ar	(GA) ₁₅	GTGGGTGTGGAAGGAAGAATC	CAGACACATGCTAGTCGTCGTG	92-132
10	Ha 360-ar	(GA) ₁₅	CAACAAGGAACCGATAACTGCT	CACCCTTCATCTCCTTC	191–199
11	Ha 494-ar	(GA) ₁₇ A (GA) ₂ N ₁₂ T ₁₅	GCGTTGGTTAAGGCCTGAGGTC	GAGCAGCAAACAGAGGGTACACC	193–209
12	Ha 806-ar	(GT) ₈ N ₂₇ (GA) ₆	GATGTTCTTCCTGCAC	GGTTGGATAATGGGGCAGC	189–199
13	Ha 991-ar	(GA) ₄ T (GA) ₁₂	GCCCCCTTGATGCCCTTTTC	GAATCGCCATTGGAATCGCCAG	137–145
14	Ha 1167-ar	(GT) ₉ N ₂ (GT) ₄	CGATGTCGGCGATTTCGGACTGGAG	CCCCATCTACACTTCAATACTG	155–165
15	Ha 1287-ar	(GA) ₂₆	GATATGAGCCCATCACTCATC	GAAGATATGTCAGGTCACACCC	151–171
16	ORS-31	(AAG) ₁₀	AAT TCA TGC CCC AAG AGA TG	CAC AAT TCA TGC ATT TCT CTG G	250-300
17	ORS-53	(T) ₃₀	GCT GGC AAT TTC TGA TAC ACG AT	CAT CTA GAC AAC GAC AGA AGA TG	450-510
18	ORS-78	(AAG) ₁₀	GTT CGT CGA GTA CAT GTT CTG C	TTT CCC TCT GGA AAG TTG TCA	160-172
19	ORS-176	(TG) ₁₆	CCCTAACTGGTTTTCTGACCC	AACTTTTGTTTGTGTTGTCCAGG	430-480
20	ORS-204	(GT) ₁₇	CGTCTGGCATTATGAAATCGTC	CCGCATAACAGCAATGGTCAAC	280-300
21	ORS-54	(TACA) ₂₅	AAATCCCACCTTCATACAAACGT	CCTTCAGTGCTCATGCAGTG	370-580

Çizelge 3.3. Ayçiçeğinde hedef bölge çoğaltım polimorfizmi (TRAP) analizi için kullanılan sabit ve tesadüfi primer kaynak ve dizi bilgisi (Yue *et al.* 2009)

Kod	EST kimliği veya Gen Bankası katılım sayısı	Diziliş 5'-3'
Sabit primerler		
MSP03	Olası erkek-kısır gen	GTTGCCATGGACATCAACAC
A11D14F	QHA11D14	GGGGTTCTAAACAAGGTG
B14G14B	QHB14G14	AATCTCAAGGACAAAAGG
F15O11F1	QHF15O11	CTGGAGCCAAGACATCTG
K11F05	QHK11F05	GAACCAAACCTGGGGTATGTA
MAX3BR	AT2G44990	ACGTTATGAGCCCCATGAAGA
Tesadüfi primerler		
TRAP03	IR-700	CGTAGCGCGTCAATTATG
Sa12	IR-700	TTCTAGGTAATCCAACAACA
Sa4	IR-700	TTCTTCTTCCCTGGACACAAA
TRAP13	IR-800	GCGCGATGATAAATTATC
Ga3	IR-800	TCATCTCAAACCATCTACAC
Ga5	IR-800	GGAACCAAACACATGAAGA

3.7. Primerlerin Sulandırılması

21 çift SSR primeri ve 6 çift TRAP primeri alındığı firmanın belirttiği kullanma talimatına göre ultra saf su ile sulandırılmıştır ve -20°C'de saklanmıştır, ancak tüm primerlerin yoğunlukları sabit olmak üzere 100 pmol veya 1 µM olarak ayarlanmıştır.

3.8. PCR oğaltmaları

3.8.1. SSR

3.8.1.a. PCR bileşenleri ve şartları

PCR işlemi MultiGene Gradient Thermal Cycler (TC9600-G-230V, Labnet International, Inc.) aletinde yapılmıştır. PCR için 0,2 ml'lik PCR tüpüne 10X PCR bufferinden 2 µL, 25 mM MgCl₂'den 1µL, 10 mM dNTP'lerden 0,5 µL, 100 pmol primerlerin her birinden 0,5 µL ve Taq polimerazdan 1U alınmış ve toplam hacmi ultra saf su ile 20 µL'ye tamamlanmıştır. DNA kalıbının denatürasyonunu için 1 döngü 2 dk 96°C'de yapılmıştır. Sonra 30 döngü 96°C'de 30 sn, 50-60°C'de (her çift primerin uygun sıcaklığına göre) 45 sn ve 1 dakika boyunca 72°C'de gerçekleştirilmiştir ve son uzama süresi 15 dakika 72°C olmuştur.

3.8.1.b. PCR ürünlerin yürütülmesi

PCR ürünleri %2'lik agaroz jelinde etidiyum bromit boyamasıyla 200 V'ta 1 saat 45 dakika yürütülmüştür.

3.8.1.c. PCR ürünlerin görüntülenmesi

UV ışığı cihazının (Vilber Lourmat, France) altında Nikon Coolpix500 makinesi ile ve etidiyum bromiti engellemek için koyu sarı filtre kullanarak fotoğrafı çekilmiştir.

3.8.2. TRAP

3.8.2.a. PCR bileşenleri ve şartları

PCR işlemi MultiGene Gradient Thermal Cycler (TC9600-G-230V, Labnet International, Inc.) aletinde yapılmıştır. PCR için 0,2 ml'lik PCR tüpüne 10X PCR bufferinden 2 µL, 25 mM MgCl₂'den 1µL, 10 mM dNTP'lerden 0,5 µL, 100 pmol primerlerin her birinden 0,5 µL ve Taq polimerazdan 1,5U alınmış ve toplam hacmi ultra saf su ile 20 µL'ye tamamlanmıştır. DNA kalıbının denatürasyonunu için 1 döngü 2 dk 94°C'de yapılmıştır. Sonra 5 döngü 94°C'de 45 sn, 35°C'de 45 sn ve 1 dakika boyunca 72°C'de gerçekleştirilmiştir ve onun ardından 35 döngü 94°C'de 45 sn, 50°C'de 45 sn ve 1 dakika boyunca 72°C'de yapılmıştır. Son uzatma aşaması 7 dakika 72°C'de olmuştur.

3.8.2.b. PCR ürünlerin yürütülmesi

PCR ürünleri (Wang *et al.* 2003) yöntemiyle %6'luk akrilamid dikey gelinde etidiyum bromit boyamasıyla 300 V'ta 2 saat yürütülmüştür. Bunu gerçekleştirilmesi için 20 µL PCR ürününe 3 µL 6X Loading Dye eklenerek ondan 15 µL alınıp ve jele yüklenmiştir.

3.8.2.c. PCR ürünlerin görüntülenmesi

UV ışığı cihazının (Vilber Lourmat, France) altında Nikon Coolpix500 makinesi ile ve etidiyum bromiti engellemek için koyu sarı filtre kullanarak fotoğrafı çekilmiştir.

3.9. Verilerin Değerlendirilmesi ve İstatistiksel Analizi

3.9.1. Bantların Puanlaması

Jel üzerine bulunan açıkça seçilebilen ve kolaylıkla sayılabilen bantlar 0 (yok), 1 (var) ve 9 (kayıp bant ve ya amplifiye olmamış) olarak puanlandırılmıştır. Oluşturulacak veri matrisi NTSYS-pc versiyon 2.11f (Rohlf 1992) , Popgen (Yeh *et al.* 1997) ve GenAlex (Peakall and Smouse 2006) programı kullanılarak incelenmiştir.

3.9.2. SSR ve TRAP işaretçilerinin PİC değerlerinin hesaplanması

Çalışmada her SSR ve TRAP işaretçinin PİC değerleri aşağıdaki formüllerden yararlanarak hesaplanmıştır.

SSR işaretçi kodominant olduğundan dolayı, allel kodlamasıyla ve Power Marker (Liu and Muse 2005) programını kullanarak PİC değerleri yapılmıştır. TRAP ise dominant işaretçi olduğundan dolayı Excel programı kullanılarak hesaplanmıştır.

$$1. \quad \text{SSR işaretçi için: } P\dot{I}C = 1 - \sum_{i=1}^1 p_i^2 - 2 \sum_{i=1}^1 \sum_{j=i+1}^1 p_i^2 p_j^2$$

Not: Bir 2 allel kodominant işaretçi için bu değer 0,0 ile 0,5 arasında ve ikiden fazla allel için 0,0 ile 1 arasında olmalıdır.

Formülde p ve q mevcut ve kayıp bantın frekansı; p_i= i'inci allelin frekansı

$$2. \quad \text{TRAP işaretçi için: } H_e = P\dot{I}C = 1 - p^2 - q^2 \quad / \quad H_e = P\dot{I}C = 1 - \sum p_i^2$$

Not: Hetrozigotluk ve PİC değerleri dominant işaretçilerde aynı formülden hesaplanır. Bu değer 0,0 ve 0,5 arasında olmalıdır ve her primer kombinasyonuna polimorfik bantların ortalaması alınarak hesaplanır (Mohammadi and Prasanna 2003).

3.9.3. Gruplar içindeki genetik çeşitliliğin tahmini

Gruplar içindeki genetik çeşitliliği Nei'in gen çeşitlilik indeksi (Nei *et al.* 1983) ve Shannon bilgi indeksi (Lewontin 1995) kullanarak aşağıdaki eşitliklerden ve Popgen programıyla (Yeh *et al.* 1997) hesaplanmıştır.

$$D = 1 - \sum P_i^2$$

$$i = - \sum P_i \log_2 P_i$$

P_i= i'inci allel için allel frekansı

3.9.4. Gruplar arasındaki genetik mesafenin tahmini

Gruplar arasındaki genetik mesafe Nei'in katsayısını (Nei *et al.* 1983) kullanarak Popgen programıyla (Yeh *et al.* 1997) hesaplanmıştır.

$$D = \frac{-\ln[\sum X_i Y_j]}{\sqrt{\sum X_i \sum Y_j}}$$

X_i=i allel frekansı X popülasyonunda

Y_j= j allel frekansı Y popülasyonunda

3.9.5. Gruplar arasındaki bant modeli

Gruplar arasındaki bant modeli ve grupları temsil eden özel bantların belirlenmesi için GenAlex (Peakall and Smouse 2006) programı kullanılmıştır.

3.9.6. Moleküler varyans analizi (Analysis of molecular variance-AMOVA)

Gruplar içindeki ve arasındaki genetik varyans, AMOVA yöntemi kullanarak GenAlex programıyla (Peakall and Smouse 2006) incelenmiştir.

3.9.7. Temel koordinat analizi (Principal coordinates analysis-PCoA)

Gruplar arasındaki çeşitliliği daha iyi anlamak için temel koordinat analizi, GenAlex programı kullanarak yapılmıştır. İlk iki koordinatın toplam varyansı kapsayarak elde edilen 2 boyutlu diyagram üzerinde gruplar belirlenmiştir ve kümeleme analiziyle karşılaştırılmıştır.

3.9.8. Kümeleme analizi

SSR ve TRAP işaretçisinden elde edilen verilerin kümeleme analizi için NTSYS-pc versiyon 2.11f (Rohlf 1992) kullanılmıştır. Benzerlik matrisi SIMQUAL alt programı ve Dice $[2a/(2a+b+c)]$ benzerlik katsayısı kullanılarak hesaplanmıştır. Gruplandırma SAHN alt programı ve Unweighted Paired Group Method Using Arithmetic Averages (UPGMA) metodu kullanılarak yapılmıştır. Kümeleme analizlerinin uyum iyiliğini sağlamak amacıyla, kofenetik katsayıları NTSYS-pc kullanarak hesaplanmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

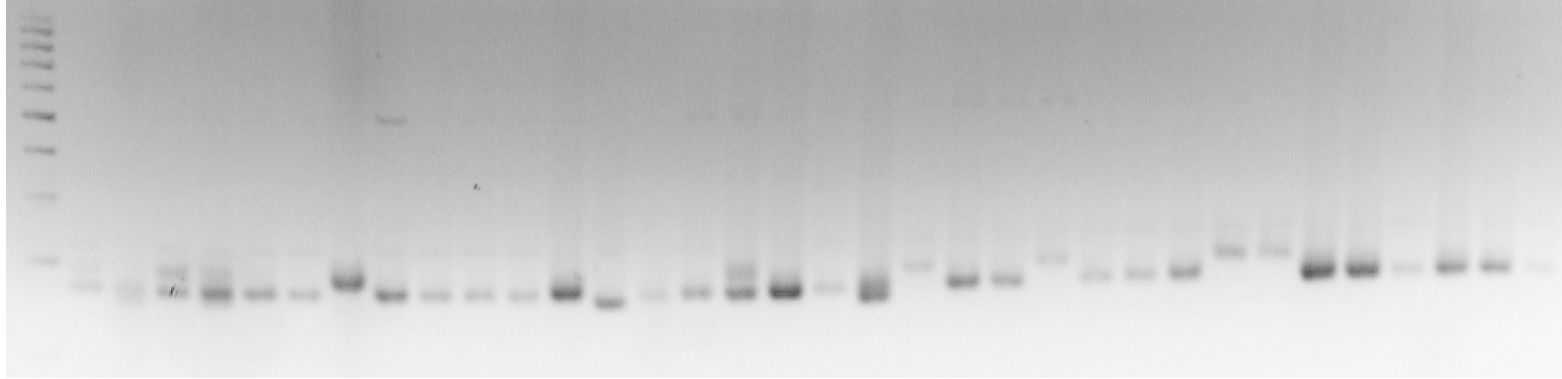
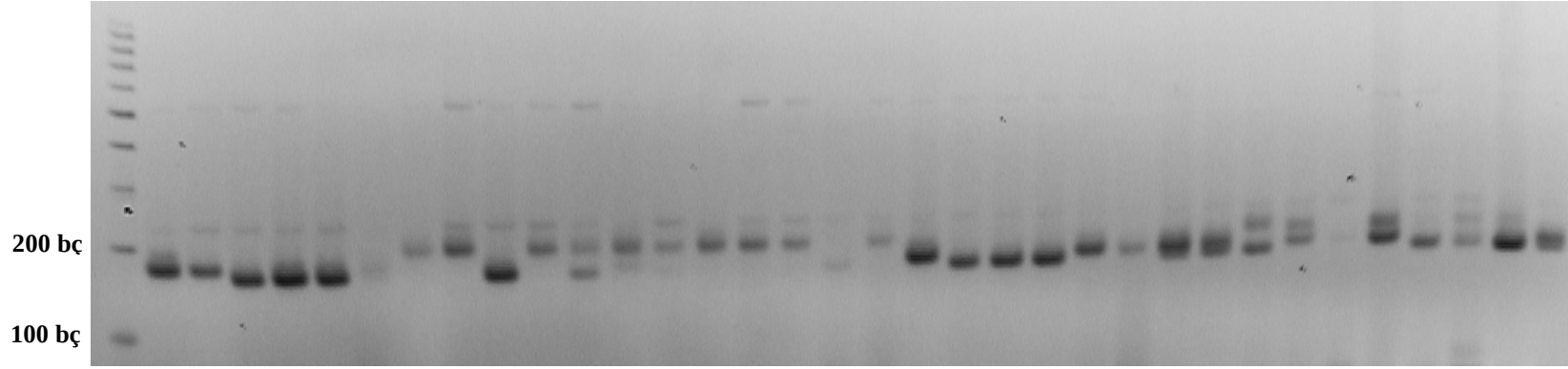
4.1. SSR İşaretçinin Polimorfizmi

Bu çalışmada kullanılan 32 çift SSR işaretçisinden, 21'i polimorfik olarak, net, tekrarlanabilen ve puanlanabilen bant deseni meydana getirmiştir. Geri kalan 11 adet SSR işaretçisinden bant elde edilmemiştir. Şekil 4.1'de örnek olarak Ha514 işaretçinin bant deseni gösterilmiştir.

SSR işaretçilerinin polimorfik bilgi içeriği (PIC) değerleri dikkate alındığında en yüksek ve en düşük polimorfizm değerleri Ha806-ar ve Ha494-ar lokusları için sırasıyla 0,58 ve 0,10 olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.1). Ha806-ar ve ORS-31 gibi yüksek PIC değerlerine sahip işaretçiler ayçiçeği biyoçeşitlilik çalışmalarında iyi ayırmacı olarak kullanılabilirler.

Beş grup içinde yerleşen genotiplerin analizinde toplam 49 polimorfik bant oluşmuştur. Amplifiye olan DNA parçacıkları 92-850 bp arasında değişmiştir. Her lokus için allel sayısı 2-6 arasında ve ortalama 2.86 olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.1).

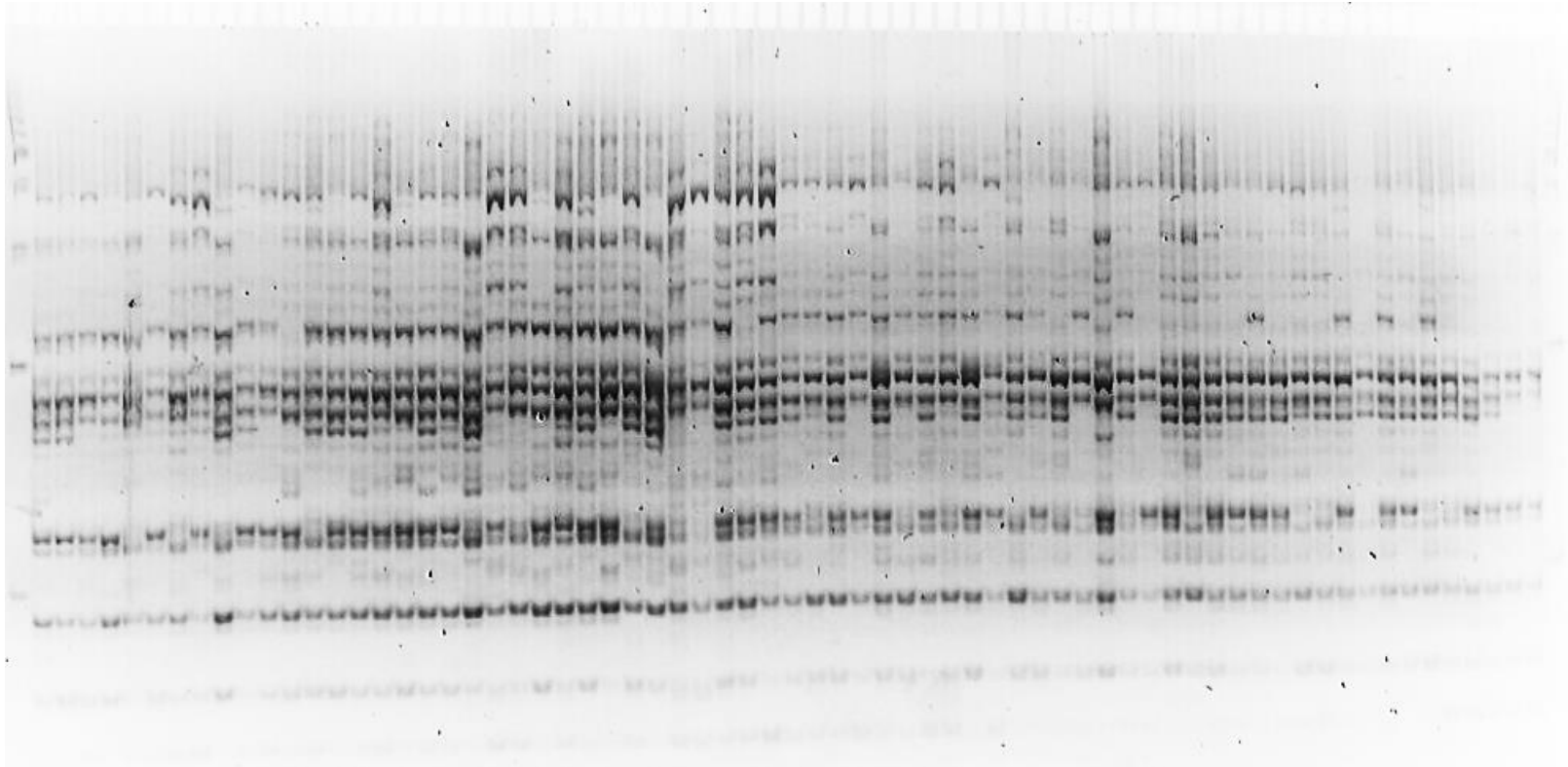
PIC değeri, bir işaretçinin ayırmacı gücünü göstermektedir. Bu çalışmada SSR işaretçilerinin PIC değerleri 0,10 ve 0,58 arasında (ortalaması 0,36) olmuş bu değerler Lochner (2011)'in çalışmasında 0,06-0,75 arasında (ortalama 0,51), Erasmus (2010)'un çalışmasında 0,17-0,80 (ortalama 0,56), Darvishzadeh *et al.* (2010)'ın çalışmasında 0,09-0,62 (ortalama 0,41) olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.1. SSR Ha 514 işaretçisinden oluşan bantların jel fotoğrafı

200 bç

100 bç



Şekil 4.2. Sabit MSP03 primeri ile tesadüfî TRAP03 TRAP primer kombinasyonun akrilamit jel üzerinde bulunan fotoğrafı

Çizelge 4.1. SSR işaretçisinden elde edilen bilgiler

Sıra No.	Lokus	Allel sayısı	Polimorfik allel sayısı	Allel frekansı	Gen çeşitliliği	Hetrozigotluk	PİC	Polimorfizm yüzdesi
1	Ha 432	6	4	0.58	0.49	0.64	0.37	%66,7
2	Ha 514	2	2	0.72	0.40	0.14	0.32	%100
3	Ha 1327	5	5	0.59	0.48	0.11	0.37	%100
4	Ha 1442	2	1	0.73	0.40	0.55	0.32	%50
5	Ha 1608	4	4	0.56	0.49	0.11	0.37	%100
6	ORS-6	2	2	0.65	0.45	0.70	0.35	%100
7	ORS-5	3	3	0.66	0.45	0.12	0.35	%100
8	HNCA-2	3	2	0.66	0.45	0.68	0.35	%66,7
9	Ha 357-ar	2	2	0.60	0.48	0.15	0.37	%100
10	Ha 360-ar	2	2	0.56	0.49	0.09	0.37	%100
11	Ha 494-ar	3	3	0.95	0.10	0.04	0.10	%100
12	Ha 806-ar	3	3	0.39	0.66	0.79	0.58	%100
13	Ha 991-ar	2	2	0.74	0.38	0.00	0.31	%100
14	Ha 1167-	2	2	0.62	0.47	0.00	0.36	%100
15	Ha 1287-	5	5	0.79	0.35	0.05	0.34	%100
16	ORS-31	3	3	0.47	0.59	0.03	0.51	%100
17	ORS-53	3	3	0.63	0.48	0.10	0.38	%100
18	ORS-78	2	2	0.63	0.47	0.01	0.36	%100
19	ORS-176	2	2	0.70	0.42	0.18	0.33	%100
20	ORS-204	2	2	0.51	0.50	0.66	0.37	%100
21	ORS-54	3	2	0.55	0.50	0.02	0.37	%66,7

Antonova *et al.* (2006) tarafından yapılmış bir çalışmada 10 SSR işaretçi kullanarak, 17 adet ayçiçeği kendilenmiş hatının ve hibritlerinin biyoçeşitliliği incelenmiştir. Çalışmada ortalama lokus sayısı 2,2 olarak belirlenmiştir. Diğer çalışmalarda da bu değere yakın veriler elde edilmiştir. Solodenko and Sivolap (2005)'ın çalışmasında ortalama allel sayısı 3, Paniego *et al.* (2002) ise 3,5 olarak belirlenmiştir.

Bu çalışmada CMS grubu 26,714 polimorfik bant ile en çok polimorfik lokus yüzdesini (%81,63) göstermiş ve İran hibritler grubu 2,408 polimorfik bant ile en az polimorfizm lokus yüzdesini (%32,65) oluşturmuşlardır (Çizelge 4.2). Beş grupta Ortalama polimorfik bant sayısı ve polimorfik lokus yüzdesi %11,98 ve %59,18 civarında değişmiştir.

Çizelge 4.2. SSR ve TRAP işaretçillerinden ayçiçeği gruplar hakkında elde edilen bilgiler

		SSR							TRAP						
Gruplar		N	Na	Ne	İ	He	UHe	PO %	N	Na	Ne	İ	He	UHe	PO %
R	Ortalama	20,592	1,592	1,492	0,412	0,280	0,287	%73,47	22,767	1,802	1,532	0,452	0,305	0,312	%84,48
	SE	0,508	0,105	0,055	0,040	0,028	0,029		0,050	0,046	0,034	0,023	0,017	0,017	
YH	Ortalama	6,776	1,449	1,374	0,318	0,214	0,230	%59,18	7,974	1,698	1,574	0,453	0,314	0,335	%75,00
	SE	0,213	0,105	0,057	0,042	0,030	0,032		0,019	0,052	0,037	0,026	0,019	0,020	
İH	Ortalama	2,408	1,061	1,243	0,197	0,136	0,166	%32,65	2,974	1,259	1,309	0,246	0,170	0,204	%40,52
	SE	0,105	0,111	0,054	0,041	0,029	0,035		0,019	0,065	0,038	0,028	0,020	0,024	
YAT	Ortalama	3,449	1,286	1,362	0,291	0,200	0,236	%48,98	3,966	1,466	1,414	0,330	0,228	0,261	%55,17
	SE	0,134	0,113	0,060	0,044	0,031	0,037		0,021	0,061	0,039	0,029	0,020	0,023	
CMS	Ortalama	26,714	1,694	1,527	0,443	0,301	0,307	%81,63	28,138	1,759	1,503	0,432	0,291	0,296	%80,17
	SE	0,691	0,098	0,052	0,038	0,027	0,028		0,565	0,048	0,034	0,024	0,017	0,018	
Toplam	Ortalama	11,988	1,416	1,400	0,332	0,226	0,245	%59,18	13,164	1,597	1,467	0,383	0,262	0,282	%67,07
	SE	0,654	0,049	0,026	0,019	0,013	0,015	%8,71	0,443	0,026	0,017	0,012	0,009	0,009	%8,32

R: Restorer; YH: Yabani Hibrit; İH: İran Hibrit; YAT: Yabani Açık Tozlaşan; CMS: Sitoplazmik Erkek Kısır

N: bant sayısı

Na: Farklı allellerin sayısı

Ne: Etkili allellerin sayısı=1 / (p² + q²)

İ: Shanon bilgi indeksi (gen çeşitliliği)

He: Beklenen hetrozigotluk=2 * p * q (Nei 1973)

UHe: Tarafsız beklenen hetrozigotluk =(2N / (2N-1)) * He (Diploit ikili veriler için ve Hardy-Weinberg denkleğini varsayarak) ,q= (1 – bant frekansı) ^ 0,5 ve p= 1 - q. (Nei 1978)

PO %: Polimorfik lokus yüzdesi

SE: Standart sapma

Son yıllarda SSR işaretçi kullanarak DNA seviyesinde polimorfizmi tahmin etmek, kolay yöntemlerden sayılmaktadır. Bu çalışmada CMS hatlar en yüksek polimorfizmi ve İran hibritleri en az polimorfizmi göstermişlerdir. Bunun yanında diğer yabancı hibritler ve açık tozlaşanlarda restorer ve CMS hatlara göre düşük bir polimorfizm göstermişlerdir. Belirlenen bu düşük polimorfizmden dolayı ileri ayçiçeği ıslah programlarında yeni zengin genetik kaynağın oluşturulması ve onun içinden yeni kendilenmiş hatların seçilmesi gerekmektedir.

4.2. TRAP İşaretçinin Polimorfizmi

Bu çalışmada kullanılan tüm 6 çift sabit ve 6 çift tesadüfi işaretçi (toplam 19 kombinasyon ile), net, tekrarlanabilen ve puanlanabilen bant deseni elde edilmiştir. Şekil 4.2’de bir örnek olarak sabit MSP03 primeri ile tesadüfi TRAP03 TRAP primer kombinasyonu gösterilmiştir. Tüm TRAP işaretçi kombinasyonları polimorfik bant üretmiştir ve 17’inci kombinasyon (MAX3BR ile Sa12) PİC değeri 0,49 ile en polimorfik lokus olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.3).

Beş grup içinde yerleşen genotiplerin analizinde toplam 116 bant oluşmuş bantların 109 tanesi polimorfik olarak belirlenmiştir. Ortalama bant sayısı her TRAP işaretçi için 5,79 olarak hesaplanmıştır. Amplifiye olan DNA fragmanları 25-920 bp arasında değişmiştir. TRAP işaretçi için PİC değerleri 0,03 ile 0,50 arasında ve ortalama 0,33 olarak gerçekleşmiştir.

Çizelge 4.3. TRAP işaretçisinden elde edilen bilgiler

Kombinasyon No.	Sabit primer	Tesadüfi primer	Allel sayısı	Polimorfik allel sayısı	PİC	Polimorfizm yüzdesi
1	MSP03	TRAP03	11	11	0,43	%100
2	MSP03	Sa12	5	5	0,42	%100
3	MSP03	Sa4	11	11	0,36	%100
4	A11D14F	TRAP03	11	10	0,27	%90,1
5	A11D14F	Sa12	3	2	0,31	%66,7
6	A11D14F	Sa4	5	4	0,39	%80
7	B14G14B	Sa4	2	2	0,47	%100
8	F15O11F1	TRAP03	8	7	0,22	%87,5
9	F15O11F1	Sa12	6	6	0,38	%100
10	F15O11F1	Sa4	5	5	0,21	%100
11	F15O11F1	TRAP13	8	6	0,25	%75
12	K11F05	TRAP03	3	2	0,13	%66,7
13	K11F05	Sa12	5	4	0,24	%80
14	K11F05	Sa4	5	5	0,21	%100
15	K11F05	Ga3	6	6	0,43	%100
16	MAX3BR	TRAP03	5	4	0,30	%80
17	MAX3BR	Sa12	7	7	0,49	%100
18	MAX3BR	Sa4	5	5	0,37	%100
19	MAX3BR	Ga5	5	5	0,26	%100

Yue *et al.* (2009) tarafından yapılan bir çalışmada 177 ayçiçeği kendilenmiş hatta, 12 TRAP kombinasyonunda toplam 230 polimorfik işaretçi oluşmuştur. Ortalama bant sayısı her TRAP işaretçi için 19,2 ve PİC değerleri 0,02 ile 0,50 arasında değişmiştir. DNA fragmentleri 38-1042 bp arasında oluşmuştur. Çalışmalarında yaklaşık %50 TRAP işaretçilerinin PİC değerleri 0,45 ile 0,50 arasında olmasına rağmen genotiplerin o lokuslarda 2 allel ve eşit frekansta (45–50%) oldukları belirtmiştir ve bu da bizim elde ettiğimiz sonuca yakın bir sonuç olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.3).

Bizim çalışmada elde ettiğimiz bant sayısı, Yue *et al.* (2009)'ın çalışmasına göre daha düşük olmuştur. Bunun temel sebebi farklı boyama ve jel sistemleri kullanılması olabilmektedir. Çalışmalarında gümüş boyama ve kapilari sekans sisteminden

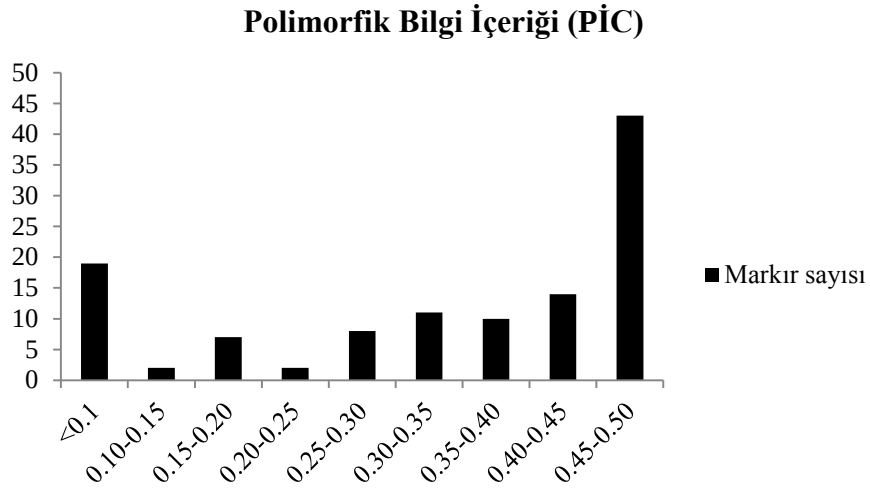
yararlanmaları daha net ve puanlanabilen bantın sayılmasını (yaklaşık 30-50 arasında) mümkün etmiştir. Diğer parametre sonuçları çalışmamız ile uyum içerisindedir.

Yaptığımız çalışmada polimorfik bantların PIC değerlerinin yaklaşık yarısı, 0,45 ile 0,50 arasında bulunmuştur (Şekil 4.3). Yue *et al.* (2009) çalışmasında da benzer sonuç elde edilmişlerdir.

Şeker pancarında 30 genotipte biyoçeşitliliğin belirlenmesi için yapılmış bir çalışmada TRAP işaretçisini 18 sabit ve tesadüfi primer kombinasyonu kullanmıştır. Denemede 600 bant elde edilmiştir ve onların 529 tanesi polimorfik olarak değerlendirmişlerdir. Bant büyüklüğü 100-700 bp arasında PIC değerler ise 0,11 ile 0,36 arasında (ortalama 0,24) değişmiştir. Polimorfik bant ortalaması 29,38 olarak hesaplanmıştır (Alwala *et al.* 2006).

Diğer bir çalışmada Chen *et al.* (2005) ayçiçeğinin mildiyö hastalığına sebep olan 92 *Plasmopara halstedii* izolatlarının genetik biyoçeşitliliğinin belirlenmesi için TRAP işaretçi kullanılmışlardır. 54 primer kombinasyon sonucunda 86 polimorfik TRAP bant elde etmişlerdir. Bant büyüklüğü 50-900 bp arasında değişmiş ve ortalama 5,4 polimorfik bant her lokus için belirlenmiştir. Çalışmada 86 işaretçiden hiç birisinin patojenite veya izolatların orijini arasında güçlü bir bağ bulmamışlar ama TRAP işaretçi tekniğini ayçiçeği mildiyö hastalıklarının izolatlarının ayrımı için yeterli bir sistem olarak belirtmişlerdir.

Bu çalışmada restorer grubu ortalama 22,767 polimorfik bant ile en çok polimorfik lokus yüzdesi (%84,48) ve İran hibritler grubu ortalama 2,974 polimorfik bantıyla en az polimorfik lokus yüzdesi (%40,52) elde edilmiştir (Çizelge 4.2). Ortalama polimorfik bant sayısı ve polimorfik lokus yüzdesini 5 grup arasında 13,164 ve %67,07 elde edilmiştir.



Şekil 4.3. Polimorfik bilgi içeriği değerlerinin 116 TRAP işaretçisinde dağılımı

Elde edilen sonuçlara göre, SSR işaretçisinde CMS grubu ve TRAP işaretçisinde restorer grubu her iki işaretçi sisteminde yüksek polimorfizm oranı göstermişler ve biyoçeşitlilik grupları olarak belirlenmişler. Kendilenmiş hatlarında gözlenen yüksek polimorfizmin temel nedeni, kendilenme için seçilen ebeveynler arasındaki mevcut yüksek biyoçeşitlilikten kaynaklanmıştır. Seçilen ebeveynler, İran'daki ayçiçeği ıslah programı kapsamında yeni genetik materyalin oluşturulması için ülkeye ithal edilen birçok ticari hibritten seçilmiştir (Ghaffari and Farrokhi 2004). Bu yüzden her iki işaretçi sisteminde kendilenmiş restorer ve CMS hatların kümeleme ve temel bileşenler analizleri sonucunda aynı veya yakın benzerlikte çıkmasının temel sebebi olarak da düşünülmektedir.

4.3. Gruplar Arasında Bant Deseni ve Dağılımı

4.3.1. SSR

Çizelge 4.4'te gruplar arasındaki bant deseni ve dağılımı her iki tip işaretçi sistemine göre verilmiştir. Bu çizelgeye göre CMS grubu 43 bant sayısı ile en çok farklı banta

sahip ve İran hibritleri 36 bant sayısı ile en düşük banta sahip belirlenmiştir. Ayrıca CMS grubu 2 özel banta ve İran hibritler grubu 1 özel banta sahip olmasına rağmen diğer gruplara göre daha iyi bir şekilde ayrılmışlardır.

4.3.2. TRAP

TRAP işaretçisine göre CMS ve restorer grubu 111 bant sayısı ile en fazla farklı banta sahip ve İran hibritleri 99 bant sayısı ile en düşük farklı banta sahip grup olarak belirlenmiştir. Ayrıca CMS grubu 3 özel bant ve yabancı hibritler grubu 1 özel bant sahip olmasına rağmen diğer gruplara göre daha iyi bir şekilde ayrılmışlardır (Çizelge 4.4).

İki işaretçi sistemini bant deseni ve dağılımı açısından karşılaştırdığında, TRAP işaretçi sistemi bir fazla özel bant oluşturmaya rağmen, grupların ayrılmasında daha etkili olarak bulunmuştur. Bunun nedeni, TRAP işaretçisinin sabit primerlerden birisi (MSP03) erkek kısır lokusuna ait bir EST'den üretilmiş olmasından dolayı olabilir. TRAP işaretçi erkek kısır genotipleri diğer genotiplere göre ayrılmasında iyi bir işaret sistemi olarak düşünülmektedir.

Çizelge 4.4. Gruplar arasındaki farklı bant sayısı, özel bant sayısı ve diğer bilgiler

Grup	SSR					TRAP				
	R	YH	İH	YAT	CMS	R	YH	İH	YAT	CMS
Farklı bant sayısı	42	42	36	39	43	111	110	99	106	111
Frekansı %5 fazla olan farklı bant sayısı	40	42	36	39	42	105	110	99	106	108
Özel bant sayısı	0	0	1	0	2	0	1	0	0	3

4.4. Gruplar İçi Genetik eşitlilik

4.4.1. SSR

Çizelge 4.2’de, grupların genetik eşitliliği, Nei’in gen çeşitlilik indeksi (Nei 1973) ve Shannon bilgi indeksine göre (Shannon and Weaver 1949) gösterilmiştir.

Bu iki indekse göre CMS grubu en çok genetik çeşitliliğe (sırasıyla 0,307 ve 0,443) ve İran hibritler grubu en az genetik çeşitliliğe (sırasıyla 0,166 ve 0,197) sahiptirler. Bu iki değere göre ortalama gruplar içindeki genetik çeşitlilikte sırasıyla 0,245 ve 0,332 hesaplanmıştır.

4.4.2. TRAP

TRAP işaretçi sistemi ise, yukarıdaki iki indeks açısından değerlendirildiğinde en yüksek genetik çeşitlilik restorer grubu (sırasıyla 0,312 ve 0,452) ve en az genetik eşitlilik İran hibritler grubu (sırasıyla 0,204 ve 0,246) belirlemiştir. Bu iki değere göre ortalama gruplar içindeki genetik çeşitlilikte sırasıyla 0,282 ve 0,383 hesaplanmıştır.

Nei’in gen çeşitlilik indeksi (Nei 1973) ve Shannon bilgi indeksi grupların ve popülasyonların içindeki genetik çeşitliliğin belirlenmesinde güçlü kriterler olarak tanımlanmaktadır. Genetik çeşitliliğin belirlenmesinde bu iki indeks birbiriyle uyum göstermeleri önemlidir. Bu çalışmada iki indeks hem SSR hem de TRAP işaretçisinde birbiriyle uyumluk göstermişlerdir.

4.5. Gruplar Arası Genetik Çeşitliliğin Belirlenmesi

4.5.1. Nei'in gen çeşitlilik indeksine göre genetik mesafesinin tahmini

4.5.1.a. SSR

Çizelge 4.5'te, Nei'in gen çeşitlilik indeksine (Nei *et al.* 1983) göre gruplar arasındaki genetik çeşitlilik verilmiştir. En yüksek genetik farklılık İran hibritler ve restorer hatların arasında (0,282) bulunmuştur ve en yüksek genetik benzerlik restorer ve CMS hatların arasında (0,070) belirlenmiştir (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5. SSR işaretçisinde Nei'in tarafsız genetik mesafesinin ikili gruplar matrisi

Gruplar	R	YH	İH	YAT	CMS
R	0				
YH	0,110	0			
İH	0,282	0,258	0		
YAT	0,140	0,176	0,206	0	
CMS	0,070	0,171	0,265	0,183	0

4.5.1.b. TRAP

Çizelge 4.6'te, Nei'in gen çeşitlilik indeksine (Nei *et al.* 1983) göre gruplar arasındaki genetik çeşitlilik göstermektedir. En yüksek genetik farklılık İran hibritler ve restorer hatların arasında (0,151) gözlenmiştir ve en yüksek genetik benzerlik yabancı hibritler ile yabancı açık tozlaşan genotipler arasında (0,064) belirlenmiştir (Çizelge 4.6)

Bu analizin sonucu bir önceki polimorfizm kısmında açıklanan sonuç ile benzerlik göstermektedir. Her iki işaretçi sisteminde restorer ve CMS grubu en düşük genetik mesafeye sahip olan gruplar olarak belirlenmiştir (SSR=0,070 ve TRAP=0,066). Bu iki tip kendilenmiş hatlar, son yıllarda İran'a ithal edilen ticari hibritlerden seçildiklerinden

dolayı aralarında çok yüksek genetik benzerlik göstermektedirler. Yabancı hibritler ile yabancı açık tozlaşanlar da bu iki gruba her iki işaretçi sisteminde yakın genetik mesafeleri olmaları da aynı sebepten kaynaklanmaktadır.

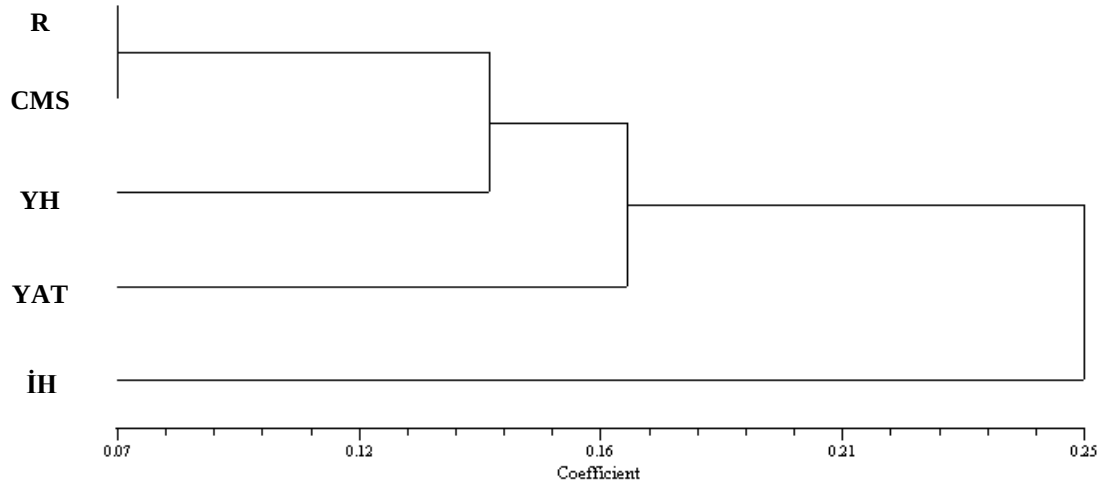
Çizelge 4.6. TRAP işaretçisinde Nei'in tarafsız genetik mesafesinin ikili gruplar matrisi

Gruplar	R	YH	İH	YAT	CMS
R	0				
YH	0,071	0			
İH	0,151	0,109	0		
YAT	0,110	0,064	0,113	0	
CMS	0,066	0,071	0,139	0,085	0

4.5.2. Kümeleme analizine göre genetik çeşitliliğin tahmini

4.5.2.a. SSR

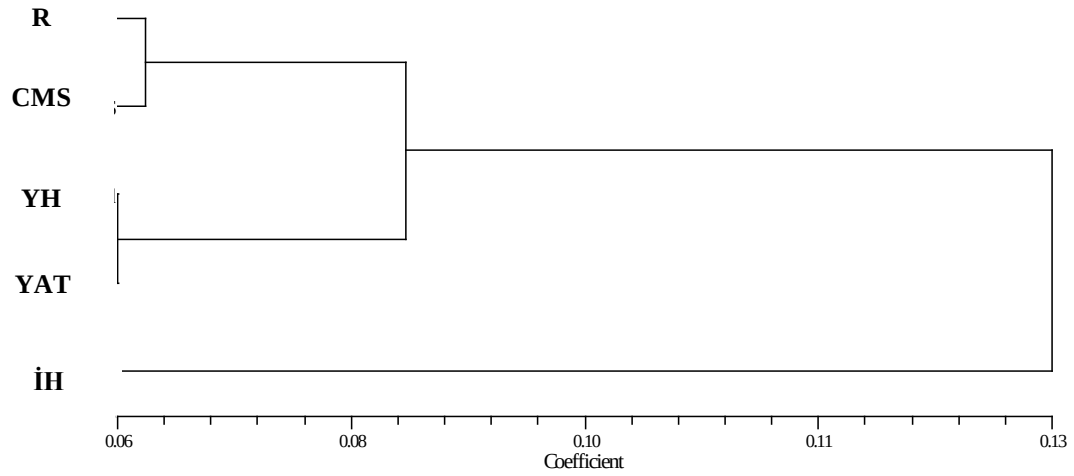
Gruplar arasındaki ilişkiyi daha iyi anlamak amacıyla, Nei'in genetik mesafesi ve UPGMA metodunu kullanarak 5 grup arasında kümeleme analizi yapılmıştır. Bu analize göre restorer ve CMS hatları yabancı hibritler ile birlikte birinci grupta, yabancı açık tozlaşan genotipler ikinci grupta ve İran hibritleri ise üçüncü ayrı bir grup içerisinde yer almışlardır (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Beş grup arasında SSR işaretçi kullanarak UPGMA metoduyla oluşturulan kümeleme analizi

4.5.2.b. TRAP

SSR işaretçi gibi TRAP işaretçi kullanarak ve grupların arasındaki ilişkiyi daha iyi anlamak amacıyla, Nei'in genetik mesafesi ve UPGMA metodunu kullanarak 5 grup arasında kümeleme analizi yapılmıştır. Bu analizin sunucuda SSR işaretçisine benzer şekilde olmuştur fakat yabancı hibritler ve yabancı açık tozlaşan genotipler bir grup içerisinde yer almışlar. İran hibritler ise tek ve farklı grupta yer almışlardır (Şekil 4.5). Genelde iki klastırı karşılaştırdığımızda iki dendrogramda aynı sonucu ifade etmektedirler. Hem yabancı hibritler ve hem yabancı açık tozlaşan genotiplerin bir grupta olması, bununla beraber restorer ve CMS hatların aynı grupta yer alması tahmin edilebilen bir sonuçtur. İran hibritlerinin ebeveyn hatlarının genetik anlamda farklı oldukları bu analizler ile daha iyi anlaşılmış ve ortaya konmuştur.



Şekil 4.5. Beş grup arasında TRAP işaretçi kullanarak UPGMA metoduyla oluşturulan kümeleme analizi

4.5.3. Temel koordinat analizine göre genetik çeşitliliğin belirlenmesi

4.5.3.a. SSR

Daha önce yapılan SSR biyoçeşitlilik çalışmasından elde edilen kümeleme analizinin sonuçlarını doğrulamak amacıyla ve grupların içine yerleşen genotiplerin sayılarının dengesiz olmasından dolayı, Temel koordinat analizi, Nei'in tarafsız genetik mesafesini kullanarak yapılmıştır.

İlk 3 bileşen %93,13'lük bir varyasyonu açıklamaktadır (Çizelge 4.7). İlk iki bileşenlerin üzerinde elde edilen 2 boyutlu diyagramda gruplar iyi bir şekilde ayrılmışlardır. Yabancı hibritler, restorerler ve CMS'ler ile birlikte bir grup oluşturarak belirgin şekilde İran hibritlerinden ve yabancı açık tozlaşan genotiplerden ayrılmıştır (Şekil 4.6).

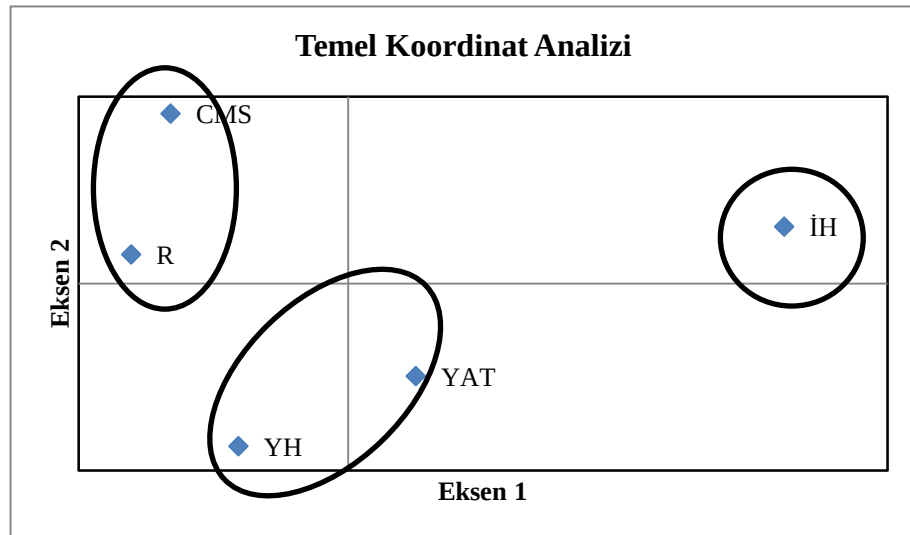
Bu ayrım, İran hibritlerinin ilk bileşende en yüksek eigen değerine sahip olması (0,243) ve diğer grupların yakın değere sahip olmalarından kaynaklanmıştır (Çizelge 4.8).

Çizelge 4.7. SSR işaretçi kullanarak ilk 3 bileşen tarafından varyasyon yüzdesinin açıklanması

Bileşenler	1	2	3
Varyasyon yüzdesi %	47,42	23,48	22,22
Kümülatif varyasyon yüzdesi %	47,42	70,90	93,13

Çizelge 4.8. SSR işaretçi kullanarak incelenen özelliklerin temel koordinat analizine göre faktör değerleri ve bunlara karşı gelen bileşenler

	Bileşen Numarası			
	1	2	3	4
Özdeğer	0,088	0,044	0,041	0,013
R	-0,121	0,023	0,007	0,089
YH	-0,061	-0,131	-0,113	-0,028
İH	0,243	0,046	-0,052	0,017
YAT	0,038	-0,074	0,161	-0,020
CMS	-0,099	0,136	-0,004	-0,058



Şekil 4.6. SSR işaretçi kullanarak beş ayçiçeği grubunun temel koordinat analizi ve onların iki boyutlu diyagram üzerinde ayrımı

4.5.3.b TRAP

TRAP işaretçi kullanarak, yapılan temel koordinat analizinde ilk 3 bileşen %86,94'lük varyasyonu açıklamıştır (Çizelge 4.9). İlk iki bileşenlerin üzerinden elde edilen 2 boyutlu diyagramda gruplar belirgin şekilde ayrılmışlardır. Yabancı hibritler, restorerler ve CMS'ler ile birlikte bir grup oluşturarak İran hibritleri ve yabancı açık tozlaşan genotiplerden ayrılmışlardır (Şekil 4.7).

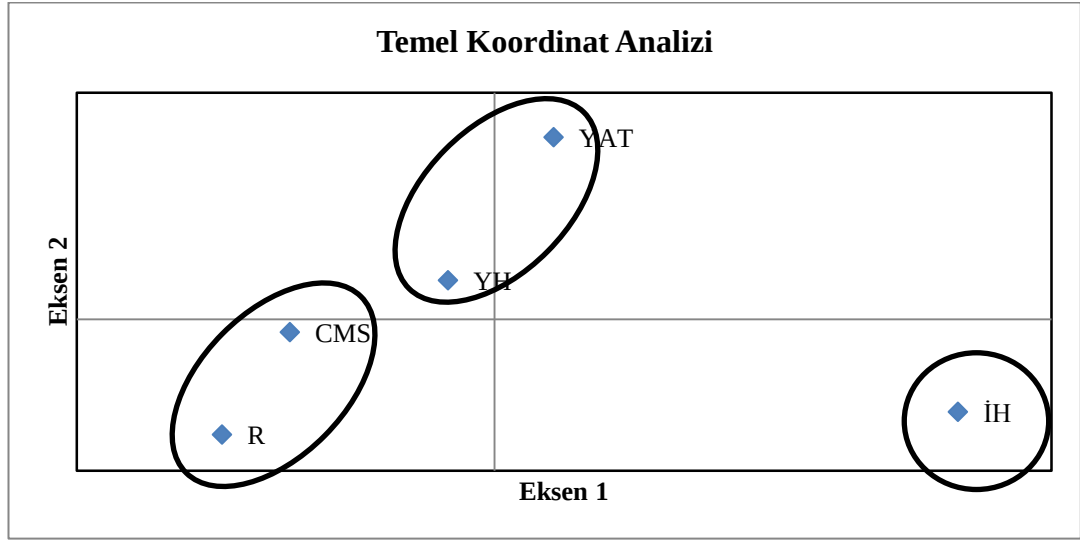
Bu ayrım İran hibritlerinin ilk bileşende en yüksek eigen değerine sahip olması üzerine (0,166) ve SSR işaretçi gibi diğer grupların yakın değere sahip olmalarından kaynaklanmıştır (Çizelge 4.10).

Çizelge 4.9. TRAP işaretçi kullanarak ilk 3 bileşen tarafından varyasyon yüzdesinin açıklanması

Bileşen	1	2	3
Varyasyon yüzdesi %	44,33	25,36	17,26
Kümülatif varyasyon yüzdesi %	44,33	69,68	86,94

Çizelge 4.10. TRAP işaretçi kullanarak incelenen özelliklerin temel koordinat analizine göre faktör değerleri ve bunlara karşı gelen bileşenler

	Bileşen Numarası			
	1	2	3	4
Özdeğer	0,043	0,025	0,017	0,013
R	-0,098	-0,076	-0,042	-0,055
YH	-0,017	0,026	-0,071	0,078
İH	0,166	-0,061	0,012	-0,004
YAT	0,021	0,120	0,001	-0,051
CMS	-0,073	-0,009	0,100	0,033



Şekil 4.7. TRAP işaretçi kullanarak beş ayçiçeği grubunun temel koordinat analizi ve onların iki boyutlu diyagram üzerinde ayrımı

Her iki analize göre İran hibritleri diğer gruplardan daha farklı olarak kendisini göstermiştir. Bu sonuç önceki analizlerde de tespit edilmiştir.

Temel koordinat analizi bir ölçekleme veya koordinasyon yöntemi olarak tanımlanmaktadır. Bu yöntem bireyler arasındaki bir benzerlik veya uzaklık matrisi ile oluşan iki boyutlu diyagramda, oluşan gruplar arasındaki mesafeler, gerçek uzaklıkları yansıtmaktadır (Mohammadi and Prasanna 2003). Bu yöntem ile temel bileşenler analizi kıyaslandığında, farklı başlangıç matrislerinin olması söz konusudur. Temel koordinat analizi bir benzerlik veya uzaklık matrisi ile başlamaktadır. Ancak temel bileşenler analizi allellerin 0 (yok) veya 1 (var) matrisi ile başlamaktadır. Verilerin az ve bağlı karakterlerden oluşumu durumunda veya kayıp veri olmadığı durumlarda her iki analizin sonucu çok yakın olacaktır (Mohammadi and Prasanna 2003). Rohlf (1972) bu gibi durumlarda yani verilerde birçok kaybın olduğu veya az sayıda karakterin bağlı olduğu durumlarda temel koordinat analizi, temel bileşenler analizine göre tercih edilmesinin uygun olduğunu belirtmiştir.

Diğer taraftan, genelde ilk 2 veya 3 temel bileşen, kümülatif varyasyonun büyük bir kısmını açıklamaktadır. Kantitatif verilerde her ne kadar az sayıda bileşen, toplam varyasyonun büyük bir kısmını açıklaması durumunda, grupların oluşumu daha iyi ve net bir şekilde iki boyutlu diyagramda gözükecektir. Ancak moleküler verilerde (0 veya 1 gibi) tam ters bir durumun olması beklenmektedir (her bileşenin toplam varyasyona katkısı en fazla %10-20). Bu durum grafiksel açıdan pek çok iyi olmasa da genetik açıdan iyi bir durum olarak değerlendirilmektedir. Nitekim çok sayıda bileşen, az varyasyon yüzdesini açıklıyorsa, seçilen primerlerin tüm genomu kapsadıkları söylenebilir (Mohammadi and Prasanna 2003).

Bizim çalışmada ilk 3 bileşen, SSR işaretçisinde %93,13'lük ve TRAP işaretçisinde %86,94'lük varyasyonu açıklamaktadır. Bunun nedeni, verilerde çok kayıp bant olmasından ve özellikle moleküler verilerde düşünülmektedir. Zira fazla kayıp bant durumlarda, temel bileşen analizinde kayıp verilerin ortamaları hesaplanarak, yakın benzerlik değerlerine sahip olmalarına rağmen, diyagramda bu tür kayıp veri olan genotipler aynı grup içinde yerleşebilirler ve sonuç olarak yüksek varyasyon yüzdesini ortaya çıkarabilirler (Rohlf 1972). Sonuç olarak, moleküler biyoçeşitlilik çalışmalarda seçilen primerler bitkinin tüm genomunun kapsamı ve çok veri kayıp durumlarda temel bileşenler analizi yerine temel koordinat analizinin kullanması önerilmektedir.

Hongtrakul *et al.* (1997) çalışmasında AFLP işaretçi kullanarak temel koordinat analizini 23 ayçiçeği kendilenmiş restorer ve CMS hatların biyoçeşitliliğinde ve ayrılmasında uygulamışlardır. Analizin sonucunda genotipler 2 boyutlu diyagram üzerinde devam ettirici (B hat) ve restorer (R hat) iki ana gruba ayrılmışlardır. İlk 3 bileşen, %34 genetik varyansını açıklamıştır.

Cronn *et al.* (1997) alozim işaretçi kullanarak kültür ve yabani ayçiçeği aksesyonlarının genetik biyoçeşitliliğinde temel koordinat analizini taksonomik uzaklılık üzere uygulamışlardır. İlk 2 bileşen, %34,1 varyansını açıklamıştır. Onların çalışmasında

temel bileşenler analiziyle temel koordinat analizinin sonuçları çok yakın çıkmıştır ancak verilerinde kayıp bant olduğundan dolayı temel koordinat analizini tercih etmişlerdir. Sonuç olarak yabani ayçiçeğinin genetik biyoçeşitliliği kültür ayçiçeğine göre daha yüksek belirlenmiştir. Kültür ayçiçeğinin düşük biyoçeşitliliğinin nedenini, allelik çeşitliğin azalması, polimorfik lokuslarının payının azalması ve beklenen hetrogizotluğun azalması olarak açıklamışlardır.

Diğer bir araştırmada Darvishzadeh *et al.* (2010) SSR işaretçi kullanarak 28 ayçiçeği genotiplerin biyoçeşitliliğinin belirlenmesinde ve kümele analizinin sonuçlarını doğrulamak amacıyla, temel koordinat analizi kullanmışlardır. İlk 3 bileşen %34,05 kümülatif varyans açıklanmıştır. Bu analizden elde edilen sonuç, kümeleme analizine çok yakın olmuştur.

4.6. Tüm Genotiplerin Genel Kümeleme Analizi

4.6.1. SSR

Genotipler arasındaki akrabalık ilişkisini daha iyi anlamak ve ayrıca heterotik genotipler ve grupları belirlemek amacıyla tüm genotiplerin arasında kümeleme analizi yapılmıştır. Genotipler arasındaki genetik biyoçeşitliliğin belirlenmesi için ikili genetik benzerlik katsayısı Dice yöntemi kullanarak hesaplanmıştır. Dice katsayısı biyoçeşitlilik çalışmalarda en çok kullanılan genetik mesafelerinden biridir. Çalışmamızda 3 farklı genetik mesafe (Jaccard, Dice ve Simple Matching) ve 3 farklı kümeleme yöntemi (UPGMA, Single Linkage ve Complete Linkage) denenmiş olup en yüksek kofenetik katsayısı olan genetik mesafe ve kümeleme yöntemi (Dice ve UPGMA) seçilmiştir. Yüksen kofenetik katsayısı olan yöntem, kümelemenin uyumlu olduğunu göstermektedir.

Bu benzerlik katsayısı 49 SSR polimorfik bant üzerinden 0,364 (R26 ve CMS502 hatların arasında) ile 0,978 (iki restorer R2 ve R3 hatların arasında) ve ortalama 0,673 hesaplanmıştır. Ortalama olarak CMS grubunun benzerlik katsayısı (0,661) diğer gruplara göre daha az belirlenmiştir (Çizelge 4.11). Bu sonuç CMS hatların biyoçeşitliliğinin diğer gruplara göre daha yüksek olmasını yansıtmaktadır. Ayrıca bu sonuç başka yöntemlerle elde ettiğimiz sonuçları doğrulamaktadır. Hem AMOVA yöntemi hem de kümeleme ve PCOA yöntemlerinde de CMS grubunun polimorfizmi diğer gruplara göre yüksek olduğunu göstermiştir.

SSR işaretçi kullanarak, R26 ve CMS502 hatlar arasında en yüksek genetik mesafeye sahip olmaları ve bu yüzden heterozis olayından faydalanmak için ileride hibrit üretimi amaçlı ayçiçeği ıslah programlarında önerilmektedir.

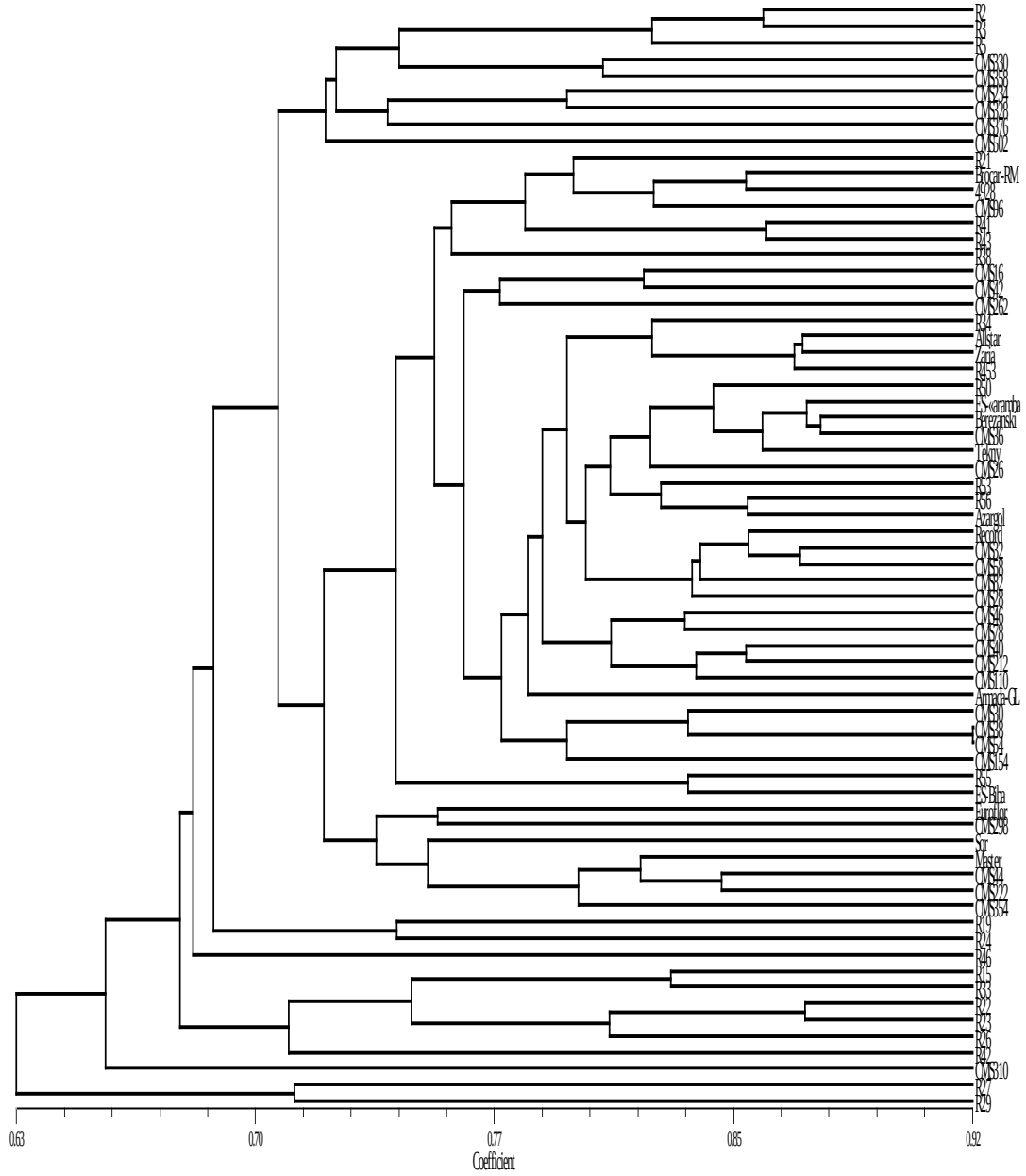
Çizelge 4.11. SSR ve TRAP işaretçiler kullanarak Dice katsayılarının gruplar arasındaki ortalama değerleri

	SSR	TRAP	SSR+TRAP
Gruplar	Ort.	Ort.	Ort.
R	0,721	0,701	0,712
YH	0,757	0,758	0,758
İH	0,750	0,797	0,788
YAT	0,753	0,768	0,764
CMS	0,661	0,751	0,730
Ort.	0,728	0,755	0,750



sonuç başka yöntemlerle elde ettiğimiz sonuçları doğrulamaktadır. Hem AMOVA yöntemi hem de kümeleme ve PCOA yöntemlerinde de R grubunun polimorfizmi diğer gruplara göre yüksek olması belirlenmiştir.

TRAP işaretçi kullanarak, R42 ve CMS328 hatların en yüksek genetik mesafeye sahip olmaları ve bu yüzden heterozis olayından faydalanmak için ileride hibrit üretimi amaçlı ayçiçeği ıslah programlarında önerilmektedir.



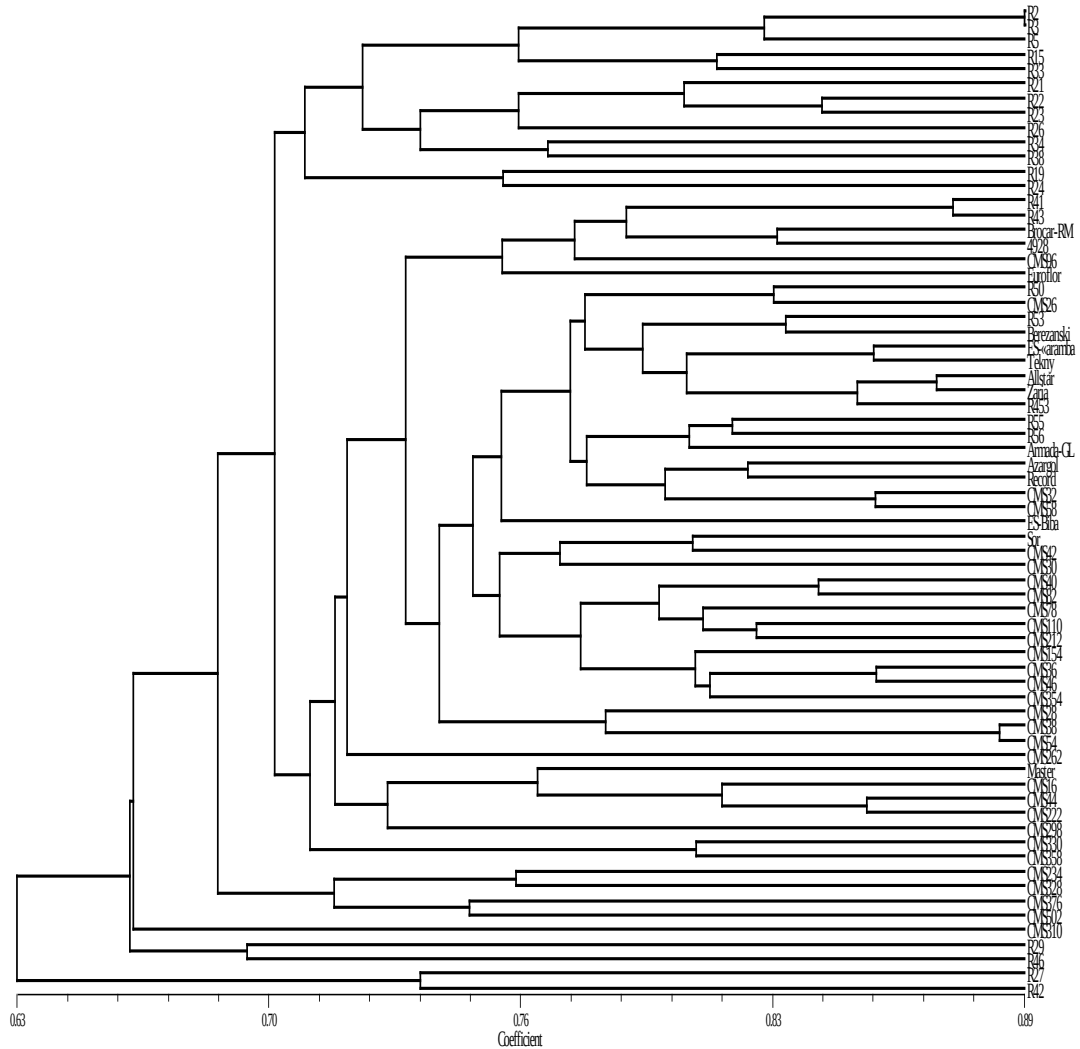
Şekil 4.9. 68 İran ayçiçeğinin TRAP işaretçi ve Dice benzerlik ve UPGMA yöntemi kullanarak kümeleme analizi sonucunda elde edilen dendrogram

4.6.3. SSR ve TRAP işaretçi birlikte kümeleme analizi

SSR ve TRAP işaretçi sistemlerinden elde edilen verileri birlikte kullanarak kümeleme analizi yapılmıştır. Benzerlik katsayısı iki işaretçinin üzerinden 0,524 (R42 ve CMS328

hatların arasında) ile 0,892 (iki R2 ve R3 hatların arasında) ve ortalama 0,712 hesaplanmıştır.

İki işaretçisinde farklı hatların uzak genetik mesafenin ortaya çıkma nedeni, bu iki sistemin farklı yönden bireyler arasında genetik biyoçeşitliliğin belirlenmesi düşünülmektedir. Yue *et al.* (2009) farklı genotip setlerin üzerinde çalışılması ve farklı yöntemlerin kullanılması, değişik sonuçların elde etmesine neden olabildiğini ifade etmişlerdir.



Şekil 4.10. 68 İran ayçiçeğinin SSR ve TRAP işaretçi, Dice benzerlik ve UPGMA yöntemi kullanarak kümeleme analizi sonucunda elde edilen dendrogram

İki SSR ve TRAP işaretçinin benzerlik matriksinden elde edilen dendrogramda, genotiplerin gruplamaları daha iyi görünmektedir. Restorerlerin çoğu dendrogramın üst kısmında, ticari çeşitler orta kısmında ve CMS'ler aşağı kısmında yer almaktadırlar. Dendrogramın en alt kısmında 4 restorer hattı, CMS'ler ile aynı grupta yer almaları onların soylarının karışmalarını göstermektedir. Yue *et al.* (2009)'ın çalışmasında 177 ayçiçeği kendilenmiş hatlarının (65 tanesi devam ettirici, 71 tanesi yağlı restorer, 22 tanesi çerezlik devam ettirici ve 19 tanesi çerezlik restorer) TRAP işaretçisiyle genetik biyoçeşitliliğin belirlenmesinde, 7 tane restorer hatların devam ettirici grubunda yer almasını ifade etmişlerdir.

Kültür ayçiçeğinin genetik biyoçeşitlilik tabanı, kültüre alma ve ıslah programları nedeniyle daralmıştır (Tang and Knapp 2003; Liu and Burke 2006). Gentzbittel *et al.* (1994) 17 ayçiçeği kendilenmiş hatlarında RFLP işaretçiler kullanarak yaptıkları bir çalışmada diğer tarla bitkilerine göre daha düşük genetik değişkenliği elde etmişler ve yabani ayçiçeği türlerinden yeni genlerin kültür ayçiçeğine aktarılmasını ifade etmişler.

Ronicke *et al.* (2005) çalışmasında, genetik benzerliğin 25 ayçiçeği kendilenmiş hatlarda 0,58 ile 0,98 arasında ve ortalama 0,70 belirlenmiştir. Hongtrakul *et al.* (1997) çalışmasında, 24 ayçiçeği kendilenmiş hatlarda AFLP işaretçi kullanarak genetik benzerlik 0,70 ile 0,91 arasında belirlenmiştir. Yue *et al.* (2009) 177 ayçiçeği kendilenmiş hatlarda genetik benzerlik 0,30 ile arasında 0,97 ve ortalama 0,58 olarak ifade edilmiştir. Bizim çalışmamızda genetik benzerlik SSR işaretçi kullanarak ortalama 0,728 ve TRAP işaretçi kullanarak 0,755 ve toplam ortalama 0,750 belirlenmiştir (Çizelge 4.11). Bu iki işaretçi sisteminden elde edilen sonuçlar, genel olarak toplam 68 genotipin genetik biyoçeşitliliğinin düşük olduğunu göstermektedir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

SSR ve TRAP işaretçileri ile yapılan analizlere göre 68 ayçiçeği genotipinin arasındaki genetik biyoçeşitlilik açısından düşük olarak gözükmetedir. Gruplar arasında önemli derecede uzaklık mevcuttur ve bu gruplardan özellikle restorer ve CMS kendilenmiş hatlardan, ileride yapılacak ıslah çalışmalarında yeni ebeveyn hatlar seçilebilir, ancak bu 68 ayçiçeği genotipinin genel benzerlik değeri yüksek olduğundan dolayı biyoçeşitlik açısından, dar bir genetik tabana sahip olduğu söylenebilir.

Aşağıda çalışmamızdan çıkarılan sonuç ve öneriler liste halinde sunulmuştur.

Ayçiçeğinin DNA izolasyonunda farklı yöntemler test edilmiş, hızlı ve temiz şekilde DNA elde edilmesi için yöntemler modifiye edilmiş ve sunulmuştur.

Hem SSR hem de TRAP işaretçi sisteminin sonuçları çok yakın olmuş ancak TRAP işaretçi daha çok polimorfik bant ürettiğinden ve sabit primerleri EST'lerden elde edilmesinden dolayı, ayçiçeğinde özellikle kendilenmiş ebeveyn hatların seçiminde etkili bir işaretçi olarak görülmektedir.

SSR işaretçisinde CMS grubu ve TRAP işaretçisinde restorer grubu her iki işaretçi sisteminde yüksek polimorfizm oranı göstermelerinden dolayı farklı heterotik gruplar olarak belirlenmiştir. Kendilenmiş hatlarında gözlenen yüksek polimorfizm, kendilenme için seçilen ebeveynler arasındaki mevcut yüksek biyoçeşitlilikten kaynaklanmaktadır. Seçilen ebeveynler, İran'daki ayçiçeği ıslah programı kapsamında yeni genetik materyalin oluşturması için ülkeye ithal edilen birçok ticari hibritten seçilmiştir. Her iki işaretçi sisteminde kendilenmiş restorer ve CMS hatların kümeleme ve temel bileşenler analizleri sonucunda aynı veya yakın benzerlikte çıkmasının temel sebebi olarak düşünülmektedir.

İki işaretçi sistemini bant deseni ve dağılımı açısından karşılaştırdığında, TRAP işaretçi sistemi bir fazla özel bant oluşturduğundan dolayı, grupların ayrılmasında daha etkili olarak bulunmuştur. Bunun nedeni, TRAP işaretçinin sabit primerlerden birisinin (MSP03) erkek kısırılık lokusuna ait bir EST'den üretilmiş olması olabilir. Bu nedenle TRAP işaretçisinin erkek kısır genotiplerin ayırt edilmesinde iyi bir işaret sistemi olduğu düşünülmektedir. Her iki işaretçi sisteminin bant modeli ve dağılımına göre, sonraki çalışmalarda özel bantların jel üzerinden kesilmesi ve sekans analizlerinin yapılması, işaret destekli seleksiyon gibi çalışmalarda faydalı yöntem olarak önerilebilmektedir.

Her iki işaretçi sisteminde restorer ve CMS grubu en düşük genetik mesafeye sahip gruplar olarak belirlenmiştir (SSR=0,070 ve TRAP=0,066).

Kümeleme analizinin sonucunda iki işaretçinin dendrogramları aynı sonucu ifade etmektedirler. Hem yabancı hibritlerin hem de yabancı açık tozlaşan genotiplerin bir grupta olması, bununla beraber restorer ve CMS hatların aynı grupta yer alması tahmin edilebilen bir sonuçtur. İran hibritlerinin ebeveyn hatlarının genetik anlamda farklı oldukları bu analizler ile daha iyi anlaşılmış ve ortaya konmuştur.

Ayçiçeği genotipler ve kendilenmiş hatların hakkında genetik biyoçeşitlilik ve akrabalık bilgileri, hem germplazm korumasında ve kendilenmiş hatların teşhisinde, hem de hibrit üretimi için ebeveyn hatların seçilmesinde faydalı ve etkili olabilmektedir.

Moleküler genetik biyoçeşitlilik çalışmalarda seçilen primerlerin bitkinin tüm genomunun kapsaması ve veri kaybının çok olması gibi durumlarda temel bileşenler analizi yerine temel koordinat analizinin kullanması önerilmektedir.

SSR işaretçi kullanarak, R26 ve CMS502 hatların en yüksek genetik mesafeye sahip oldukları belirlenmiş bu nedenle heterosis olayından faydalanmak için ileride

yapılabilecek hibrit üretimi amaçlı ayçiçeği ıslah programlarında ebeveyn olarak kullanılmaları önerilmektedir.

TRAP işaretçi kullanarak, R42 ve CMS328 hatların en yüksek genetik mesafeye sahip oldukları belirlenmiş bu nedenle heterosis olayından faydalanmak için ileride yapılabilecek hibrit üretimi amaçlı ayçiçeği ıslah programlarında ebeveyn olarak kullanılmaları önerilmektedir.

Hem SSR hem de TRAP işaretçileri ayçiçeği genomunda farklı hedef bölgelerini çoğaltma nedeniyle elde edilen en uzak genetik mesafeye sahip genotipler birbirinden farklı olmuştur.

SSR ve TRAP işaretçisinin benzerlik matriksinden kombine olarak elde edilen dendrogramda, genotiplerin gruplamaları daha iyi görünmektedir. Restorerlerin çoğu dendrogramın üst kısımda, ticari çeşitler orta kısımda ve CMS'ler aşağı kısımda yer almışlardır.

KAYNAKLAR

- Adams, M.D., Soares, M.B., Kerlavage, A.R., Fields, C., Venter, J.C., 1993. Rapid cDNA sequencing (expressed sequence tags) from a directionally cloned human infant brain cDNA library. *Nature genetics*, 4, (4), 373-380.
- Aguadé, M., 2001. Nucleotide sequence variation at two genes of the phenylpropanoid pathway, the FAH1 and F3H genes, in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Biology and Evolution*, 18, (1), 1-9.
- Akkaya, M.S., Bhagwat, A.A., Cregan, P.B., 1992. Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean. *Genetics*, 132, (4), 1131-1139.
- Aksyonov, I.V., 2005. Protein Markers Specificity of Sunflower Inbred Lines. *HELIA*, 28, (43), 49-54.
- Al-Chaarani, G.R., Roustaee, A., Gentzbittel, L., Mokrani, L., Barrault, G., Dechamp-Guillaume, G., Sarrafi, A., 2002. A QTL analysis of sunflower partial resistance to downy mildew (*Plasmopara halstedii*) and black stem (*Phoma macdonaldii*) by the use of recombinant inbred lines (RILs). *Theoretical and applied genetics*, 104, (2-3), 490-496.
- Alwala, S., Suman, A., Arro, J.A., Veremis, J.C., Kimbeng, C.A., 2006. Target region amplification polymorphism (TRAP) for assessing genetic diversity in sugarcane germplasm collections. *Crop science*, 46, (1), 448-455.
- Anonymous. 2012. Annual Report. Iranian Vegetable Oil Industry Association,
- Antonova, T., Guchetl, S., Tchelustnikova, T., Ramasanova, S., 2006. Development of marker system for identification and certification of sunflower lines and hybrids on the basis of SSR-analysis. *Helia*, 29, (45), 63-72.
- Arias, D., Rieseberg, L., 1995. Genetic relationships among domesticated and wild sunflowers (*Helianthus annuus*, *Asteraceae*). *Economic botany*, 49, (3), 239-248.
- Ayres, N., McClung, A., Larkin, P., Bligh, H., Jones, C., Park, W., 1997. Microsatellites and a single-nucleotide polymorphism differentiate apparent amylose classes in an extended pedigree of US rice germplasm. *Theoretical and applied genetics*, 94, (6-7), 773-781.
- Bar-Hen, A., Charcosset, A., Bourgoïn, M., Guiard, J., 1995. Relationship between genetic markers and morphological traits in a maize inbred lines collection. *Euphytica*, 84, (2), 145-154.
- Becker, J., Heun, M., 1995. Barley microsatellites: allele variation and mapping. *Plant molecular biology*, 27, (4), 835-845.
- Ben, C., Hewezi, T., Jardinaud, M.F., Bena, F., Ladouce, N., Moretti, S., Tamborindéguy, C., Liboz, T., Petitprez, M., Gentzbittel, L., 2005. Comparative analysis of early embryonic sunflower cDNA libraries. *Plant molecular biology*, 57, (2), 255-270.
- Bidney, D., Scelonge, C., 1997. Sunflower biotechnology. *Sunflower technology and production, (sunflowertechno)*, 559-593.

- Blair, M., McCouch, S., 1997. Microsatellite and sequence-tagged site markers diagnostic for the rice bacterial leaf blight resistance gene xa-5. *Theoretical and applied genetics*, 95, (1-2), 174-184.
- Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M., Davis, R.W., 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American journal of human genetics*, 32, (3), 314.
- Broun, P., Tanksley, S.D., 1996. Characterization and genetic mapping of simple repeat sequences in the tomato genome. *Molecular and General Genetics MGG*, 250, (1), 39-49.
- Brown, G.R., Gill, G.P., Kuntz, R.J., Langley, C.H., Neale, D.B., 2004. Nucleotide diversity and linkage disequilibrium in loblolly pine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, (42), 15255-15260.
- Brown, S., Kresovich, S., 1996. Molecular characterization for plant genetic resources conservation. *Genome Mapping of Plants*, Paterson, A.H. USA, RG Landes, New York, 85-93.
- Brunel, D., 1994. A microsatellite marker in *Helianthus annuus* L. *Plant molecular biology*, 24, (2), 397-400.
- Camlin, M., 2000. Possible future roles for molecular techniques in the identification and registration of new plant cultivars. *International Symposium on Molecular Markers for Characterizing Genotypes and Identifying Cultivars in Horticulture. Acta Hort. (ISHS)* 546:289-296.
- Carrera, A., Poverene, M., Rodriguez, R., 1996. Isozyme variability in *Helianthus argophyllus*. Its application in crosses with cultivated sunflower. *Helia*, 19, 19-28.
- Carter, J.F., Fuccillo, D., 1978. *Sunflower Science and Technology*. American Society of Agronomy Madison, Wisconsin.
- Cavalli-Sforza, L.L., Edwards, A.W., 1967. Phylogenetic analysis. Models and estimation procedures. *American journal of human genetics*, 19, (3 Pt 1), 233.
- Chen, J., Gulya, T.J., Vick, B.A., Hu, J., 2005. TRAP analysis of molecular variability of a global collection of sunflower downy mildew, *Plasmopara Halstedii*. *Proceedings Sunflower Research Workshop, 27th Sunflower Research Workshop, January 12-13, 2005, Fargo, ND*.
- Chen, J., Hu, J., Vick, B.A., Jan, C., 2006. Molecular mapping of a nuclear male-sterility gene in sunflower (*Helianthus annuus* L.) using TRAP and SSR markers. *Theoretical and applied genetics*, 113, (1), 122-127.
- Cheres, M.T., Knapp, S.J., 1998. Ancestral origins and genetic diversity of cultivated sunflower: coancestry analysis of public germplasm. *Crop science*, 38, (6), 1476-1482.
- Clarke, B., Lambrecht, M., Rhee, S.Y., 2003. Arabidopsis genomic information for interpreting wheat EST sequences. *Functional & integrative genomics*, 3, (1-2), 33-38.
- Cooke, R.J., Reeves, J.C., 2003. Plant genetic resources and molecular markers: variety registration in a new era. *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization*, 1, (2-3), 81-87.

- Coors, J.G., Pandey, S., 1999. Genetic diversity and heterosis. *Genetics*, 1, 99-118.
- Çoşke, B., 2005. Ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.)'nin çiçek morfolojisi, tozlaşması ve farklı tozlaşma metotlarının bazı verim öğeleri üzerine etkileri. Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 9, (1), 30-34.
- Cronn, R., Brothers, M., Klier, K., Bretting, P., Wendel, J., 1997. Allozyme variation in domesticated annual sunflower and its wild relatives. *Theoretical and applied genetics*, 95, (4), 532-545.
- Darvishzadeh, R., Azizi, M., Hatami-Maleki, H., Bernousi, I., AbdollahiMandoulakani, B., Jafari, M., Sarrafi, A., 2010. Molecular characterization and similarity relationships among sunflower (*Helianthus annuus* L.) inbred lines using some mapped simple sequence repeats. *African Journal of Biotechnology*, 9, (43), 7280-7288.
- Dubreuil, P., Dilmann, C., Baril, C., Lombard, V., 2000. Genetic distance estimators based on molecular data for plant registration and protection: a review. *International Symposium on Molecular Markers for Characterizing Genotypes and Identifying Cultivars in Horticulture, Acta Hort. (ISHS)* 546:289-296.
- Durante, M., Vannozzi, G.P., Pugliesi, C., Bernardi, R., 2002. The role of biotechnologies in the development of sunflower cultures in the world. *Helia*, 25, (36), 1-28.
- Erasmus, T.E., 2010. Genetic diversity of proprietary inbred lines of sunflower, determined by mapped SSR markers and total protein analysis. PhD Thesis, University of KwaZulu-Natal, Pietermaritzburg, South Africa.
- Eryiğit, T., Kumlay, A.M., Sancaktaroğlu, S., 2011. Ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.) çeşit teşhisinde morfolojik, biyokimyasal ve moleküler tekniklerin kullanımı. 9. Tarla Bitkileri Kongresi Bursa, Turkey,
- FAO. 2010, FAO web site. from www.fao.org.
- FAO. 2012, FAO web site. from www.fao.org.
- Fick, G., Zimmer, D., 1974. Fertility restoration in confectionery sunflowers. *Crop science*, 14, (4), 603-604.
- Fu, Y.B., 2006. Impact of plant breeding on genetic diversity of agricultural crops: searching for molecular evidence. *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization*, 4, (01), 71-78.
- Garcia-Gil, M.R., Mikkonen, M., Savolainen, O., 2003. Nucleotide diversity at two phytochrome loci along a latitudinal cline in *Pinus sylvestris*. *Molecular Ecology*, 12, (5), 1195-1206.
- Garris, A.J., McCOUCH, S.R., Kresovich, S., 2003. Population structure and its effect on haplotype diversity and linkage disequilibrium surrounding the xa5 locus of rice (*Oryza sativa* L.). *Genetics*, 165, (2), 759-769.
- Gedil, M.A., Wye, C., Berry, S., Segers, B., Peleman, J., Jones, R., Leon, A., Slabaugh, M.B., Knapp, S.J., 2001. An integrated restriction fragment length polymorphism-amplified fragment length polymorphism linkage map for cultivated sunflower. *Genome*, 44, (2), 213-221.
- Gentzbittel, L., Mestries, E., Mouzeyar, S., Mazeyrat, F., Badaoui, S., Vear, F., de Labrouhe, D.T., Nicolas, P., 1999. A composite map of expressed sequences and

- phenotypic traits of the sunflower (*Helianthus annuus* L.) genome. Theoretical and applied genetics, 99, (1-2), 218-234.
- Gentzbittel, L., Perrault, A., Nicolas, P., 1992. Molecular phylogeny of the *Helianthus* genus, based on nuclear restriction fragment length polymorphism (RFLP). *Molecular Biology and Evolution*, 9, 872-892.
- Gentzbittel, L., Zhang, Y.X., Vear, F., Griveau, B., Nicolas, P., 1994. RFLP studies of genetic relationships among inbred lines of the cultivated sunflower, *Helianthus annuus* L.: evidence for distinct restorer and maintainer germplasm pools. *Theoretical and applied genetics*, 89, (4), 419-425.
- Ghafari, M., 2004. Use of principle component analysis method for selection of superior three way cross hybrids in sunflower. *Seed and Plant Improvement Journal*, 19, (4), 513-527.
- Ghaffari, M., Farrokhi, I., 2004. Evaluation and providing plant genetic materials for sunflower breeding program for moderate and cold regions of Iran. Report, West Azarbaijan Agricultural and Natural Resource Center, Iran,
- Göksu, Ç., 2007. Bitkisel yağlar. TC Başbakanlık Dış Ticaret Müsteşarlığı İhracatı Geliştirme Etüd Merkezi, Ankara.
- Gordon Dorrell, D., Vick, B.A., 1997. Properties and processing of oilseed sunflower. *Sunflower technology and production*, (sunflowertechno), 709-745.
- Gupta, P., Rustgi, S., 2004. Molecular markers from the transcribed/expressed region of the genome in higher plants. *Functional & integrative genomics*, 4, (3), 139-162.
- Gupta, P.K., Tsuchiya, T., 1991. *Chromosome engineering in plants: genetics, breeding, evolution*. Newnes.
- Hamblin, M.T., Mitchell, S.E., White, G.M., Gallego, J., Kukatla, R., Wing, R.A., Paterson, A.H., Kresovich, S., 2004. Comparative population genetics of the panicoid grasses: sequence polymorphism, linkage disequilibrium and selection in a diverse sample of *Sorghum bicolor*. *Genetics*, 167, (1), 471-483.
- Hamrick, J., Godt, M., 1997. Allozyme diversity in cultivated crops. *Crop science*, 37, (1), 26-30.
- Hamrit, S., 2009. Chromosome walking at the fertility restorer locus Rf1 in sunflower (*Helianthus annuus* L.). Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.) der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Rostock.
- Holton, T.A., Christopher, J.T., McClure, L., Harker, N., Henry, R.J., 2002. Identification and mapping of polymorphic SSR markers from expressed gene sequences of barley and wheat. *Molecular Breeding*, 9, (2), 63-71.
- Hongtrakul, V., Huestis, G.M., Knapp, S.J., 1997. Amplified fragment length polymorphisms as a tool for DNA fingerprinting sunflower germplasm: genetic diversity among oilseed inbred lines. *Theoretical and applied genetics*, 95, (3), 400-407.
- Hongtrakul, V., Slabaugh, M.B., Knapp, S.J., 1998. DFLP, SSCP, and SSR markers for Δ^9 -stearoyl-acyl carrier protein desaturases strongly expressed in developing seeds of sunflower: intron lengths are polymorphic among elite inbred lines. *Molecular Breeding*, 4, (3), 195-203.

- Hongtrakul, V., Slabaugh, M.B., Knapp, S.J., 1998. A seed specific Δ -12 oleate desaturase gene is duplicated, rearranged, and weakly expressed in high oleic acid sunflower lines. *Crop science*, 38, (5), 1245-1249.
- Hu, J., 2006. Defining the sunflower (*Helianthus annuus* L.) linkage group ends with the Arabidopsis-type telomere sequence repeat-derived markers. *Chromosome Research*, 14, (5), 535-548.
- Hu, J., Chen, J., Gulya, T., Miller, J., 2004. TRAP markers for a sunflower downy mildew resistance gene from a new *Helianthus annuus* source, PI468435. *Proc. 16th International Sunflower Conference Proceedings*, August 29-September 2, 2004, Fargo, ND. p. 623-630.
- Hu, J., Seiler, G.J., Kole, C., 2010. *Genetics, genomics and breeding of sunflower*. Science Publishers.
- Hu, J., Vick, B.A., 2003. Target region amplification polymorphism: a novel marker technique for plant genotyping. *Plant Molecular Biology Reporter*, 21, (3), 289-294.
- Huestis, G., Kimura, Y., Knapp, S., 1996. Simple sequence repeat (SSR) markers for sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Proc 18th Sunflower Res Forum*, Fargo, ND, USA.
- Ingvarsson, P.K., 2005. Nucleotide polymorphism and linkage disequilibrium within and among natural populations of European aspen (*Populus tremula* L., *Salicaceae*). *Genetics*, 169, (2), 945-953.
- Jaikishan, I., Ramesha, M., Rajendrakumar, P., Srinivasarao, K., Neeraja, C., Balachandran, S., 2006. Characterization of genetic diversity in hybrid rice parental lines using EST-derived and non-EST SSR markers. *Rice Genet. Newsl*, 23, 24-28.
- Jan, C.C., Seiler, G., 2007. Sunflower. *Genetic resources, chromosome engineering, and crop improvement. Oilseed crops*, Singh, R. New York: CRC Press, Taylor and Francis Group, 4, 103-165.
- Jones, C., Edwards, K., Castaglione, S., Winfield, M., Sala, F., Van de Wiel, C., Bredemeijer, G., Vosman, B., Matthes, M., Daly, A., 1997. Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. *Molecular Breeding*, 3, (5), 381-390.
- Joshi, S.P., Ranjekar, P.K., Gupta, V.S., 1999. Molecular markers in plant genome analysis. *Curr Sci*, 77, (2), 230-240.
- Kado, T., Yoshimaru, H., Tsumura, Y., Tachida, H., 2003. DNA variation in a conifer, *Cryptomeria japonica* (*Cupressaceae sensu lato*). *Genetics*, 164, (4), 1547-1559.
- Kaya, M.D., Kolsarici, Ö., 2005. Ayçiçeği ıslahında yeni hedef: imidazolinone dayanıklılık. *Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 9, (2), 69-72.
- Kaya, Y., 2003. Ayçiçek Tarımı. *Tarım İstanbul Dergisi*, 84, 24-25.
- Kole, C., 2006. 4 Genome mapping and molecular breeding in plants, Springer, Volume 2: Oilseeds, 153-177.

- Korzun, V., 2003. Molecular markers and their applications in cereals breeding. FAO International Workshop on "Marker assisted selection: A fast track to increase genetic gain in plant and animal breeding?", Turin, Italy.
- Kusterer, B., Rozynek, B., Brahm, L., Prüfe, M., Tzigos, S., Horn, R., Friedt, W., 2004. Construction of a genetic map and localization of major traits in sunflower, *Helianthus annuus* L. *Helia*, 27, (40), 15-24.
- Lai, Z., Livingstone, K., Zou, Y., Church, S., Knapp, S., Andrews, J., Rieseberg, L., 2005. Identification and mapping of SNPs from ESTs in sunflower. *Theoretical and applied genetics*, 111, (8), 1532-1544.
- Lawson, W., Henry, R., Kochman, J., Kong, G., 1994. Genetic diversity in sunflower (*Helianthus annuus* L.) as revealed by random amplified polymorphic DNA analysis. *Crop and Pasture Science*, 45, (7), 1319-1327.
- León, A.J., Andrade, F.H., Lee, M., 2003. Genetic analysis of seed-oil concentration across generations and environments in sunflower. *Crop science*, 43, (1), 135-140.
- Lewontin, R.C., 1995. The apportionment of human diversity. *Evolutionary biology*, Springer, 381-398.
- Lexer, C., Welch, M., Durphy, J., Rieseberg, L., 2003. Natural selection for salt tolerance quantitative trait loci (QTLs) in wild sunflower hybrids: implications for the origin of *Helianthus paradoxus*, a diploid hybrid species. *Molecular Ecology*, 12, (5), 1225-1235.
- Liu, A., Burke, J.M., 2006. Patterns of nucleotide diversity in wild and cultivated sunflower. *Genetics*, 173, (1), 321-330.
- Liu, J., Liu, G.-S., Jan, C.-C., 2003. Comparison of genetic diversity of the germplasm resources of confectionary sunflower (*Helianthus annuus*) in China based on RAPDs and AFLPs. *Acta Botanica Sinica*, 45, (3), 352-358.
- Liu, K., Muse, S.V., 2005. PowerMarker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis. *Bioinformatics*, 21, (9), 2128-2129.
- Lochner, T.C., 2011. Prediction of heterotic groups and hybrid performance in south african sunflower (*Helianthus annuus* L.) germplasm using SSR analysis. Msc Thesis, University of the Free State, South Africa.
- Lu, Y., Melero-Vara, J., Garcia-Tejada, J., Blanchard, P., 2000. Development of SCAR markers linked to the gene Or5 conferring resistance to broomrape (*Orobancha cumana* Wallr.) in sunflower. *Theoretical and applied genetics*, 100, (3-4), 625-632.
- Manivannan, N., Karthika, R., Punitha, B., Vindhiyavarman, P., Muralidharan, V., 2008. Association pattern among the yield attributes in varieties and hybrids of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Helia*, 31, (49), 83-90.
- Meena, H., Sujatha, M., Varaprasad, K., 2013. Achievements and bottlenecks of heterosis breeding of sunflower (*Helianthus annuus* L.) in India. *Indian Journal of Genetics and Plant Breeding*, 73, (2), 123-130.
- Miller, J.F., Fick, G.N., 1997. The genetics of sunflower. *Sunflower technology and production, (sunflowertechno)*, 441-495.

- Mohammad Sharrif, M., 2006. Genetik erkısır ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.)’nde farklı oranlarda fertilite gösteren bitkilerde ait çiçek tozlarının erkısır oranına etkisi. Doktora Tezi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara Üniversitesi.
- Mohammadi, S., Prasanna, B., 2003. Analysis of genetic diversity in crop plants-salient statistical tools and considerations. *Crop science*, 43, (4), 1235-1248.
- Morgante, M., Olivieri, A., 1993. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *The Plant Journal*, 3, (1), 175-182.
- Nei, M., 1972. Genetic distance between populations. *American naturalist*, 283-292.
- Nei, M., 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70, (12), 3321-3323.
- Nei, M., 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89, (3), 583-590.
- Nei, M., Tajima, F., Tatenno, Y., 1983. Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. *Journal of Molecular Evolution*, 19, (2), 153-170.
- Nordborg, M., Borevitz, J.O., Bergelson, J., Berry, C.C., Chory, J., Hagenblad, J., Kreitman, M., Maloof, J.N., Noyes, T., Oefner, P.J., 2002. The extent of linkage disequilibrium in *Arabidopsis thaliana*. *Nature genetics*, 30, (2), 190-193.
- Paniego, N., Echaide, M., Muñoz, M., Fernández, L., Torales, S., Faccio, P., Fuxan, I., Carrera, M., Zandomeni, R., Suárez, E.Y., 2002. Microsatellite isolation and characterization in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Genome*, 45, (1), 34-43.
- Pashley, C.H., Ellis, J.R., McCauley, D.E., Burke, J.M., 2006. EST databases as a source for molecular markers: lessons from *Helianthus*. *Journal of Heredity*, 97, (4), 381-388.
- Peakall, R., Smouse, P.E., 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6, (1), 288-295.
- Pérez-Vich, B., Fernandez-Martinez, J., Grondona, M., Knapp, S., Berry, S., 2002. Stearoyl-ACP and oleoyl-PC desaturase genes cosegregate with quantitative trait loci underlying high stearic and high oleic acid mutant phenotypes in sunflower. *Theoretical and applied genetics*, 104, (2-3), 338-349.
- Putt, E.D., 1997. Early history of sunflower. In A. A. Schneider (ed). *Sunflower technology and production*. Am Soc Agron, Agronomy Series 35, Madison, WI.
- Rauf, S., Teixeira da Silva, J., Khan, A.A., Naveed, A., 2010. Consequences of plant breeding on genetic diversity. *International Journal of Plant Breeding*, 4, (1), 1-21.
- Reynolds, J., Weir, B.S., Cockerham, C.C., 1983. Estimation of the coancestry coefficient: basis for a short-term genetic distance. *Genetics*, 105, (3), 767-779.
- Rieseberg, L.H., Linder, C.R., Seiler, G.J., 1995. Chromosomal and genic barriers to introgression in *Helianthus*. *Genetics*, 141, (3), 1163.
- Rohlf, F.J., 1972. An empirical comparison of three ordination techniques in numerical taxonomy. *Systematic Biology*, 21, (3), 271-280.
- Rohlf, F.J., 1992. NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system. *Applied Biostatistics*.

- Rojas-Barros, P., Hu, J., Jan, C., 2008. Molecular mapping of an apical branching gene of cultivated sunflower (*Helianthus annuus* L.). Theoretical and applied genetics, 117, (1), 19-28.
- Ronicke, S., Hahn, V., Friedt, W., 2005. Resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* of 'high oleic' sunflower inbred lines. Plant breeding, 124, (4), 376-381.
- Savolainen, O., Langley, C., Lazzaro, B., Fr, H., 2000. Contrasting patterns of nucleotide polymorphism at the alcohol dehydrogenase locus in the outcrossing *Arabidopsis lyrata* and the selfing *Arabidopsis thaliana*. Molecular Biology and Evolution, 17, (4), 645-655.
- Seiler, G., Marek, F.L., 2011. Germplasm resources for increasing the genetic diversity of global cultivated sunflower. *Helia*, 34, (55), 1-20.
- Senior, M.L., Heun, M., 1993. Mapping maize microsatellites and polymerase chain reaction confirmation of the targeted repeats using a CT primer. *Genome*, 36, (5), 884-889.
- Shannon, C.E., Weaver, W., 1949. The mathematical theory of communication. University of Illinois Press.
- Singh, R., 2007. Sunflower. Genetic resources, chromosome engineering, and crop improvement: Oilseed crops, Jan, C.C. and G. Seiler. Taylor & Francis Ltd, 4, 103-165.
- Smith, J., Paszkiewicz, S., Smith, O., Schaffer, J., 1987. Electrophoretic, chromatographic, and genetic techniques for identifying associations and measuring genetic diversity among corn hybrids. In: Proc. 42nd Annual Corn Sorghum Res. Conf., Chicago, IL, Am. Seed Trade Assoc., Washington, DC, pp. 187-203.
- Smith, J.S.C., Hoeft, E., Cole, G., Lu, H., Jones, E.S., Wall, S.J., Berry, D.A., 2009. Genetic diversity among US sunflower inbreds and hybrids: Assessing probability of ancestry and potential for use in plant variety protection. *Crop science*, 49, (4), 1295-1303.
- Smith, S., Helentjaris, T., 1996. DNA fingerprinting and plant variety protection. *Genome mapping in plants*, Paterson, A.H. USA, RG Landes, New York, 95-110.
- Solodenko, A., Sivolap, Y., 2005. Genotyping of *Helianthus* based on microsatellite sequences. *Helia*, 28, (42), 19-26.
- Sujatha, M., Reddy, K.P., Shilpa, K.S., Tarakeswari, M., 2010. Molecular markers and markers assisted selection in oilseed crops. *Biotechnology Developments and Applications*. Malik CP (Editor) Pointer publishers Jaipur, 87-113.
- Tamborindeguy, C., Ben, C., Liboz, T., Gentzbittel, L., 2004. Sequence evaluation of four specific cDNA libraries for developmental genomics of sunflower. *Molecular Genetics and Genomics*, 271, (3), 367-375.
- Tang, S., Knapp, S.J., 2003. Microsatellites uncover extraordinary diversity in native American land races and wild populations of cultivated sunflower. Theoretical and applied genetics, 106, (6), 990-1003.

- Tang, S., Yu, J.-K., Slabaugh, M., Shintani, D., Knapp, S., 2002. Simple sequence repeat map of the sunflower genome. *Theoretical and applied genetics*, 105, (8), 1124-1136.
- Tenaillon, M.I., Sawkins, M.C., Anderson, L.K., Stack, S.M., Doebley, J., Gaut, B.S., 2002. Patterns of diversity and recombination along chromosome 1 of maize (*Zea mays ssp. mays* L.). *Genetics*, 162, (3), 1401-1413.
- Thiel, T., Michalek, W., Varshney, R., Graner, A., 2003. Exploiting EST databases for the development and characterization of gene-derived SSR-markers in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theoretical and applied genetics*, 106, (3), 411-422.
- Vardar-Kanlıtepe, Ç., Aras, S., Cansaran-Duman, D., 2010. Bitki islahında moleküler belirteçlerin kullanımı ve gen aktarımı. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 33.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van De Lee, T., Hornes, M., Friters, A., Pot, J., Paleman, J., Kuiper, M., 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic acids research*, 23, (21), 4407-4414.
- Wang, D., Shi, J., Carlson, S., Cregan, P., Ward, R., Diers, B., 2003. A low-cost, high-throughput polyacrylamide gel electrophoresis system for genotyping with microsatellite DNA markers. *Crop science*, 43, (5), 1828-1832.
- Welsh, J., McClelland, M., 1991. Genomic fingerprints produced by PCR with consensus tRNA gene primers. *Nucleic acids research*, 19, (4), 861-866.
- White, S.E., Doebley, J.F., 1999. The molecular evolution of terminal ear1, a regulatory gene in the genus *Zea*. *Genetics*, 153, (3), 1455-1462.
- Whitton, J., Rieseberg, L.H., Ungerer, M.C., 1997. Microsatellite loci are not conserved across the *Asteraceae*. *Molecular Biology and Evolution*, 14, (2), 204-209.
- Williams, J.G., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V., 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic acids research*, 18, (22), 6531-6535.
- Wright, S.I., Lauga, B., Charlesworth, D., 2003. Subdivision and haplotype structure in natural populations of *Arabidopsis lyrata*. *Molecular Ecology*, 12, (5), 1247-1263.
- Wu, K.-S., Tanksley, S.D., 1993. Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in rice. *Molecular and General Genetics MGG*, 241, (1-2), 225-235.
- Xiao, J., Li, J., Yuan, L., McCouch, S., Tanksley, S., 1996. Genetic diversity and its relationship to hybrid performance and heterosis in rice as revealed by PCR-based markers. *Theoretical and applied genetics*, 92, (6), 637-643.
- Yalçın, K., 2004. Ayçiçeği biyoteknolojisinde son gelişmeler ve islahında kullanım olanakları. *Trakya Univ J Sci*, 5, (2), 141-147.
- Yeh, F., Yang, R., Boyle, T., Ye, Z., Mao, J., 1997. POPGEN Ver. 1.32. The user-friendly software for population genetic analysis. *Molecular Biology and Biotechnology Center, University of Alberta, Alberta, Canada*.
- Yılmaz, N., 2009. GTIP 512 Ayçiçeği Yağı. Uluslararası Ticaret Merkezi (ITC). Ürün Analizleri. Enterprise Europe Network. İstanbul.

- Yu, J.K., Mangor, J., Thompson, L., Edwards, K.J., Slabaugh, M.B., Knapp, S.J., 2002. Allelic diversity of simple sequence repeats among elite inbred lines of cultivated sunflower. *Genome*, 45, (4), 652-660.
- Yu, J.K., Tang, S., Slabaugh, M.B., Heesacker, A., Cole, G., Herring, M., Soper, J., Han, F., Chu, W.-C., Webb, D.M., 2003. Towards a saturated molecular genetic linkage map for cultivated sunflower. *Crop science*, 43, (1), 367-387.
- Yue, B., Cai, X., Vick, B.A., Hu, J., 2009. Genetic diversity and relationships among 177 public sunflower inbred lines assessed by TRAP markers. *Crop science*, 49, (4), 1242-1249.
- Yue, B., Radi, S., Vick, B., Cai, X., Tang, S., Knapp, S., Gulya, T., Miller, J., Hu, J., 2008. Identifying quantitative trait loci for resistance to Sclerotinia head rot in two USDA sunflower germplasms. *Phytopathology*, 98, (8), 926-931.
- Yue, B., Vick, B.A., Yuan, W., Hu, J., 2008. Mapping one of the 2 genes controlling lemon ray flower color in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Journal of Heredity*, 99, (5), 564-567.
- Zeinalzadeh-Tabrizi, H., Ghaffari, M., 2009. Production of sunflower hybrids based on new cytoplasmic male sterility sources. 3rd International Symposium on Plant Protection and Plant Health in Europe, Berlin, Germany.
- Zhang TP, Zhao SY, Gao JY, JP, G., 1996. Esterase isozyme research for varieties of sunflower from South Mountain District in Guizhou. China Agriculture Science and Technology Press, Beijing, 571-575.
- Zhu, Y., Song, Q., Hyten, D., Van Tassell, C., Matukumalli, L., Grimm, D., Hyatt, S., Fickus, E., Young, N., Cregan, P., 2003. Single-nucleotide polymorphisms in soybean. *Genetics*, 163, (3), 1123-1134.

ÖZGEÇMİŞ

Hossein ZEİNALZADEH TABRİZİ, 1980 yılında İran'ın Khoy şehrinde doğdu. 1998 yılında Khoy Şehit Kuçeri Lisesi'ni bitirdi. 2000 yılında girdiği Khoy Azad Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü'nden 2004 yılında mezun oldu. Aynı yıl girdiği Tabriz Azad Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü'nde 2007 yılında yüksek lisansını bitirdi. 2008 yılına kadar Tahran'da bir özel biyoteknoloji şirketinde üretim müdürü olarak çalışmalarına devam etti. 2009 yılında Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarla Bitkileri Anabilim dalında doktora programına başladı. Uluslararası ve ulusal hakemli dergilerde makaleler ve uluslararası kongre ve sempozyumlarda bildiriler yayınladı. 2012 yılında Yurt Dışı Türkler ve Akraba Toplulukları Başkanlığın'dan Araştırma Burs'u kazandı.