

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



**Ayçiçeği Islahında Moleküler Markır Yardımlı Seleksiyon ile Restorer (Rf/rf)
Allellerinin Tespiti**

Aray ZAILASHEVA

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

OCAK 2023

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



**Ayçiçeği Islahında Moleküler Markır Yardımlı Seleksiyon ile Restorer (Rf/rf)
Allellerinin Tespiti.**

Aray ZAILASHEVA

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

OCAK 2023

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ayçiçeği Islahında Moleküler Markır Yardımlı Seleksiyon ile Restorer (Rf/rf)
Allellerinin Tespiti

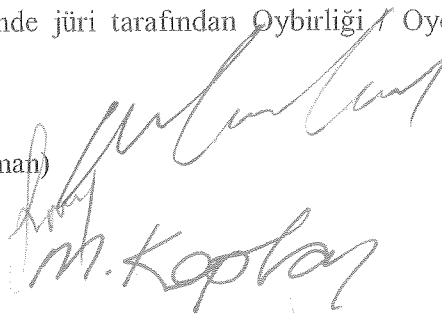
Aray ZAILASHEVA
TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez 26/01/2023 tarihinde jüri tarafından Oybirliği / Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Nedim MUTLU (Danışman)

Prof. Dr. Faik KANTAR

Prof. Dr. Mahmut KAPLAN



ÖZET

AYÇİÇEĞİ ISLAHINDA MOLEKÜLER MARKIR YARDIMLI SELEKSİYON İLE RESTORER (Rf/Rf) ALLELLERİNİN TESPİTİ

Aray ZAILASHEVA

Yüksek Lisans Tezi, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Nedim MUTLU

OCAK 2023; 53 sayfa

Ayçiçeği ıslahında moleküler markır yardımcı seleksiyon ile idameci (maintainer) ve restorer (Rf) nükleusu taşıyan bitkilerin tespiti amaçlanmıştır.

Yerli hibrit ayçiçeği ıslahında moleküler markır yardımcı seleksiyon ile idameci (maintainer) ve restorer (Rf) nükleusu taşıyan bitkilerin tespiti için kodominant SCAR ve dominant markırları Rf1/rf1 allellerinin belirlenmesinde kullanılanlardır. B hattı geliştirmek için fertil sitoplazma taşıyan B grubu bitkilere heterozigot Rfrf nükleusu taşıyan bitkilerle yapılan geriye melezleme çalışmalarında %50 rfrf, %50 Rfrf geriye melez populasyonları elde edilmektedir ve ayrıca heterozigot Rfrf B grubu bitkilerin kendilenmesi sonucu RfRf, Rfrf, ve rfrf genotipindeki F2 genotipik açılımları (BCnF2) de ortaya çıkmaktadır. Bu rfrf genotipindeki bitkilerin belirlenebilmesi için test melezlemeleri yapıp bir sonraki generasyonda F1 döllerinde çiçekler uygun iklim koşullarında testlenerek ayrıştırılarak aynı zamanda Rf/rf ayrımı yapan moleküler markılar kullanılıp istenilen genotiplerin markırlarla doğru ve verimli bir şekilde belirlenip belirlenemediği kontrol edilmektedir. Bir başka ifade ile, idameci (B) hatlarında sitoplazmaları fertil olduğundan nükleuslarındaki Rf/rf allellerinin durumunu tespit etmek mümkün değildir. B hatlarının nükleusunda Rf/rf durumunu ancak kısır (A) hatlarına test melezlemesi ve elde edilen F1 bitkilerinin yetiştirilip kısır ya da fertil olup olmamasının gözlemlenmesi ile anlaşılmaktadır. B hatlarında Rf/rf allellerinin moleküler markırlar ile tespiti hem maliyet hemde ıslah süresini azaltmak için önemlidir.

ANAHTAR KELİMELEER: Ayçiçek, CMS, Maintainer, MYS, Restorer, SCAR .

JÜRİ: Prof. Dr. Nedim MUTLU (Danışman)

ABSTRACT

DETECTION OF RESTORER (RF/RF) ALLELES BY MOLECULAR MARKER ASSISTED SELECTION IN SUNFLOWER BREEDING

Aray ZAILASHEVA

MSc Thesis in Agricultural Biotechnology

Supervisor: Prof. Dr. Nedim MUTLU

JANUARY 2023; 53 pages

In sunflower breeding, it was aimed to determine the plants carrying the maintainer and restorer (Rf) nucleus by molecular marker assisted selection.

In domestic hybrid sunflower breeding, molecular marker-assisted selection was used to determine the codominant SCAR and its dominant markers Rf1/rf1 alleles specified for the detection of plants carrying maintainer and restorer (Rf) nucleus. In order to develop a B line, 50% rfrf and 50% Rfrf backcross population obtained in backcrossing studies with plants carrying Rfrf nucleus that are heterozygous for group B plants carrying fertile cytoplasm and also heterozygous Rfrf group B plants will self-introduce F2 genotypic expansions (BCnF2) in the RfRf, Rfrf, and rfrf genotypes. In order to determine the plants in this rfrf genotype, test crosses made and in the next generation, the flowers in the F1 progeny was tested under suitable climatic conditions and was separated. At the same time, molecular markers that distinguish Rf/rf will be used to check whether the desired genotypes could be determined accurately and efficiently with the markers. In other words, it is not possible to detect the status of the Rf/rf alleles in the nucleus of the maintainer (B) lines, since their cytoplasm is fertile. Rf/rf status in the nucleus of B lines can only be understood by test crossing into sterile (A) lines and observing whether the obtained F1 plants are grown and whether they are sterile or fertile. Detection of Rf/rf alleles in B lines with molecular markers is important to reduce both cost and breeding time.

KEYWORDS: Sunflower, CMS, Maintainer, MAS, Restorer, SCAR.

COMMITTEE: Prof. Dr. Nedim MUTLU (Supervisor)

ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasında ayçiçeği ıslahında moleküler markır yardımcı seleksiyon ile idameci (maintainer) ve restorer (Rf) nükleusu taşıyan bitkilerin tespiti amaçlanmıştır.

Öncelikle tez konumu seçerken isteklerimi göz önünde bulundurup bana yardımcı olan tez danışmanım Prof. Dr. Nedim MUTLU'ya teşekkürlerimi sunarım. Tezimin ilerleyişi için yardım talep ettiğim en önemlisi tüm eğitim hayatım boyunca benden maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, bugün bu tezi hazırlamama vesile olan sevgili aileme teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca sınıf arkadaşlarıma düzenleme yardımları, bildirim oturumları ve manevi destekleri için minnettarım.

İÇİNDEKİLER

| | |
|---|------|
| ÖZET | i |
| ABSTRACT | ii |
| ÖNSÖZ..... | iii |
| İÇİNDEKİLER..... | ivii |
| AKADEMİK BEYAN | vi |
| SİMGELER VE KISALTMALAR | viii |
| ŞEKİLLER DİZİNİ | viii |
| ÇİZELGELER DİZİNİ | x |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 2. KAYNAK TARAMASI..... | 6 |
| 2.1. Ayçiçeğinin çeşitli grupları..... | 6 |
| 2.2. Erkek kısırlığı..... | 7 |
| 2.3. Sitoplazmik erkek kısırlığı (CMS)..... | 8 |
| 2.4. Ayçiçek Genetik Haritalama Çalışmaları ve Markır Yardımıyla Seleksiyon (MYS)..... | 12 |
| 2.4.1. Rastgele arttırılmış polimorfik DNA (Randomly amplified polymorphic DNAs(RAPD))..... | 12 |
| 2.4.2. Restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi (Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP))..... | 13 |
| 2.4.3. Çoğaltılmış parça uzunluk polimorfizmi (Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP))..... | 14 |
| 2.4.4. SCAR Yöntemi..... | 15 |
| 2.4.5. CAPS Yöntemi..... | 16 |
| 2.4.6. Basit tekrarlı dizi (Simple sequence repeats (SSR)) markırları..... | 17 |
| 2.5. Popülasyonların haritalanması..... | 18 |
| 3. MATERYAL VE METOD..... | 20 |
| 3.1. Analiz İçin Kullanılan Bitki Materyali..... | 20 |
| 3.2. Bitkilerin Yetiştirilmesi..... | 24 |
| 3.3. DNA İzolasyonu..... | 24 |
| 3.4. Markır Analizleri..... | 24 |
| 3.4.1. SCAR markır analizleri..... | 24 |

| | |
|--------------------------------|----|
| 3.5. Jel Elektroforezi..... | 26 |
| 4. BULGULAR ve TARTIŞMA..... | 27 |
| 4.1. Moleküler çalışmalar..... | 27 |
| <u>5. SONUÇ</u> | 45 |
| <u>6. KAYNAKLAR</u> | 46 |
| ÖZGEÇMİŞ | |

AKADEMİK BEYAN

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Ayçiçeği Islahında Moleküler Markır Yardımlı Seleksiyon ile Restorer (Rf/rf) allellerinin Tespiti” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

26/01/2023

Aray ZAILASHEVA



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

| | |
|----|------------------|
| % | Yüzde |
| °C | Santigrat derece |
| G | Gram |
| cM | Centimorgan |
| µg | Mikrogram |
| µL | Mikrolitre |

Kısaltmalar

| | |
|-----|-----------------------------------|
| DNA | Deoksiribo Nükleik Asit |
| FAO | Food and Agriculture Organization |
| PCR | Polymerase Chain Reaction |
| CMS | Sitoplazmik erkek kısırlık |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| | |
|---|----|
| Şekil 1.1. Dünya Ayçiçeği Verileri | 2 |
| Şekil 1.2. Ayçiçeğinin ekim alanında (a) ve üretiminde (b) önemli ülkeler | 2 |
| Şekil 1.3. Ayçiçeği İthalatı (a) ve İhracatı (b) | 3 |
| Şekil 1.4. Türkiye’de 2015–2020 yıllarındaki ayçiçeği ekim alanı ve üretimi | 3 |
| Şekil 1.5. Ayçiçeğinin Yurt içi ve Yurt Dışı Fiyatları (Eylül 2020 – Eylül 2021)..... | 4 |
| Şekil 2.1. Ayçiçeğindeki fertil (verimli) (a) ve steril (kısır) (b) çiçekler..... | 7 |
| Şekil 2.2. Rf1 restore edici genini taşıyan LG 13'ün markır haritası | 10 |
| Şekil 3.1. Analiz için kullanılan ayçiçeği bitki materyalleri..... | 20 |
| Şekil 4.1. SCAR – PPR621.5_F1/Rev (164 bp (rf)) markır primeri taraması | 27 |
| Şekil 4.2. HRG02_F/R (738 bp (Rf)) ve atp9 (474 bp) görüntüsü..... | 28 |
| Şekil 4.3. 1-20 restorer, 21-40 idameci, 41-60 CMS örneklerinin görüntüsü..... | 29 |
| Şekil 4.4. 67N04_F2b/Rev (155 bp (rf)) primerleri ile elde edilen görüntü | 31 |
| Şekil 4.5. 1-20 restorer, 21-40 idameci, 41-60 CMS bitki örnekleri..... | 32 |
| Şekil 4.6. 1-20 restorer, 21-40 idameci, 41-60 CMS bitki örnekleri..... | 32 |
| Şekil 4.7. HRG02_F/R (738 bp (Rf)) ve atp9 (474 bp) primerleri kombinasyonu | 33 |
| Şekil 4.8. 67N04_F1a/Rev (170 bp (Rf)) ve 67N04_F2b/Rev primerleri..... | 34 |
| Şekil 4.9. 31 ayçiçeği örneklerine PPR621.5_F1/Rev, PPR621.5_F2/Rev primeri..... | 35 |
| Şekil 4.10. HRG02 F/R ve atp9 primerleri ile 32 farklı ayçiçeği örneği..... | 36 |
| Şekil 4.11. PPR621.5_F1/Rev ve PPR621.5_F2/Rev primer jel görüntüleri..... | 37 |
| Şekil 4.12. PPR621.5_F1/Rev primer ile BC1F1-B hattın 76 ayçiçeği görüntüleri..... | 39 |
| Şekil 4.13. PPR621.5_F2/Rev primer ile BC1F1-B hattın 76 ayçiçeği görüntüleri..... | 40 |
| Şekil 4.14. Heterozigot ve homozigot nükleusa sahip B hattının kısır ile testcross melezlemesi..... | 41 |
| Şekil 4.15. Heterozigot nükleusa sahip BC1F1-B hattının testcross sonucu..... | 41 |
| Şekil 4.16. Homozigot nükleusa sahip BC1F1-B hattının testcross sonucu..... | 42 |

| | |
|---|----|
| Şekil 4.17. B hattının gelişimi..... | 42 |
| Şekil 4.18. HRG02 F/R ve atp9 markeri ile dupleks PCR görüntüleri..... | 41 |

ÇİZELGELER DİZİNİ

| | |
|---|----|
| Çizelge 3.1. Analiz için kullanılan restorer, idameci, CMS ayçiçeğinin materyalleri..... | 20 |
| Çizelge 3.2. Analiz için kullanılan SCAR markırları, ilgili primerleri..... | 23 |
| Çizelge 3.3. SCAR analizlerinde kullanılan PCR bileşenleri..... | 25 |
| Çizelge 3.4. SCAR (67NO4 primer) analizlerinde kullanılan PCR döngüsü | 25 |
| Çizelge 3.5. SCAR (PPR621.5 primer) analizlerinde kullanılan PCR döngüsü | 25 |
| Çizelge 3.6. SCAR (HRG02 primer) analizlerinde kullanılan PCR döngüsü | 26 |
| Çizelge 4.1. SCAR markır analizinde kullanılan genotipler..... | 27 |
| Çizelge 4.2. Dominant SCAR markırları analizinde kullanılan genotipler..... | 29 |
| Çizelge 4.3. SCAR markır 67N04_F1a/Rev ve 67N04_F2b/Rev primerleri | 34 |
| Çizelge 4.4. SCAR markır PPR621.5_F1/Rev ve PPR621.5_F2/Rev primerleri | 37 |

1. GİRİŞ

Dünyadaki birçok bitki türünün tohumları yağ içermektedir. Bu bitkilerden bazıları yabani ve bazıları kültür formunda olup tarımı yapılmaktadır. Tarla ziraatı halinde yetiştirilen ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.), susam (*Sesamum indicum*), yerfıstığı (*Arachis hypogaea*), haşhaş (*Papaver* L.), soya (*Glycine max*), kolza (*Brassica napus*), aspir (*Carthamus tinctorius*), pelemir (*Cephalaria syriaca*) ve diğer bazı tek yıllık bitki türleri tohumlarında yağ içermektedirler. Tohumlarındaki yağ çeşitli yöntemlerle elde edilir. Gıda ve sanayi sektörlerinin birçok farklı alanında değerlendirilmektedir.

Temel gıdalarımızdan biri olan bitkisel yağ yağ bitkilerinden elde edilmektedir. İnsan vücuduna dışarıdan alınması gereken temel yağ asitleri, bitkisel yağlarda hayvansal yağlara oranla daha çok bulunmaktadır. Dünya yemeklik bitkisel yağ üretiminin yaklaşık %80'den fazlası soya, ayçiçeği, yerfıstığı, kolza ve pamuktan üretilmektedir. Bugün ayçiçeği, soya fasulyesi, kanola ve yer fıstığından sonra yemeklik yağ için yetiştirilen dünyanın en önemli ürünlerinden biridir (Putt 1997). Türkiye'de yağ üretiminin yaklaşık %80'i bitkisel yağlardan oluşmaktadır. Bitkisel yağ üretiminin ilk sırasını ise ayçiçeği oluşturmaktadır.

Ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.) dünyadaki en önemli yağlı tohum bitkilerinden biridir. Ayçiçeği Kuzey Amerika'da orjinli türdür. 16. yüzyılda çiçek dekorasyonu için Kuzey Amerika'dan İspanya'ya getirilmiştir (Gentzbittel vd. 1994). Avrupa'ya geldikten sonra yavaş yavaş bir yağ bitkisi olarak Rusya'ya yayılmıştır. Bir yağlı bitkisi ve çerezlik olarak kullanılmak üzere ayçiçeğinin tarımsal gelişimi, 1800'lerin sonlarında Rusya'da gerçekleştirilmiştir. Ayçiçeği, 19. yüzyılın ikinci yarısında Rusya'dan Kuzey Amerika'ya yeniden yayılmıştır (Hladni 2016).

Türkiye'ye 1. Dünya savaşından sonrasında Romanya ve Bulgaristan'dan gelen göçmenler tarafından getirilmesi sayesinde yayılmış olduğu sanılmaktadır. İlk olarak Trakya'da başlayan üretimi sonrasında Türkiye'nin her tarafına yayılmıştır (Arıoğlu 1999). Toplam ayçiçeği ekim alanının %70'inden fazlası Trakya-Marmara bölgesinde, özellikle de Tekirdağ, Edirne ve Kırklareli illerinde bulunmaktadır (Anonim 1).

USDA verilerine göre, dünyada 2019/2020 üretim döneminde 26,3 milyon hektar alanda ayçiçeği ekimi yapılmış ve 2 ton verim alınmıştır. 2020/2021 üretim döneminde bir önceki yıla oranla %3,3 artarak 56,7 milyon ton olacağı, ekim alanının ise %2,7 oranında artarak 27,1 milyon hektara yükseleceği öngörülmektedir. Dünyada ayçiçeği tohumu ihracatı, yağa oranla oldukça düşük düzeydedir. İhracatın büyük kısmı kırma işleminden sonra ham yağ olarak yapılmaktadır. 2019/2020 üretim döneminde ayçiçeği tohumunun sadece %5,7'si ihraç edilmiştir (Şekil 1.1).

| | 2016/17 | 2017/18 | 2018/2019 | 2019/20 ¹ | 2020/21 ² | Değişim (%) ³ |
|------------------|---------|---------|-----------|----------------------|----------------------|--------------------------|
| Alan (bin ha) | 25.920 | 25.917 | 25.808 | 26.378 | 27.103 | 2,7 |
| Verim (ton/ha) | 1,86 | 1,85 | 1,96 | 2,08 | 2,10 | 1,0 |
| Üretim | 48.230 | 47.846 | 50.535 | 54.976 | 56.780 | 3,3 |
| Tüketim | 47.346 | 48.192 | 50.156 | 54.905 | 55.696 | 1,4 |
| Yılsonu Stokları | 3.408 | 2.694 | 2.499 | 2.222 | 2.629 | 18,3 |
| İthalat | 2.190 | 2.148 | 2.486 | 2.830 | 2.723 | -3,8 |
| İhracat | 2.465 | 2.516 | 3.060 | 3.178 | 3.400 | 7,0 |

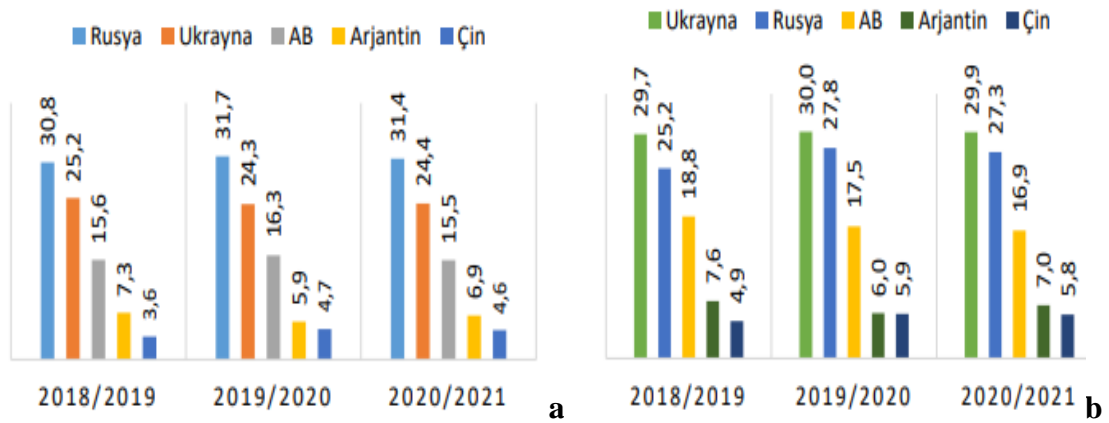
Kaynak: USDA (Erişim tarihi: 01.07.2020)¹/Tahmin,²/ Öngörü,³/Son iki pazarlama yılının değişimini göstermektedir.

Şekil 1.1. Dünya Ayçiçeği Verileri

2019/2020 üretim döneminde ayçiçeği tarımı dünyada en fazla Rusya, Ukrayna, Avrupa Birliği, Arjantin ve Çin'de yapılmış olup, Rusya, Ukrayna ve Avrupa Birliği dünya ayçiçeği üretiminin %75,3'ünü gerçekleştirmişlerdir. 2020/2021 üretim döneminde dünya ayçiçeği üretiminde önemli bir değişiklik beklenmezken, bir önceki pazarlama yılına göre Rusya'nın ayçiçeği üretiminde %0,5, Ukrayna'da ise %0,1 oranında azalma olacağı öngörülmektedir (Şekil 1.2).

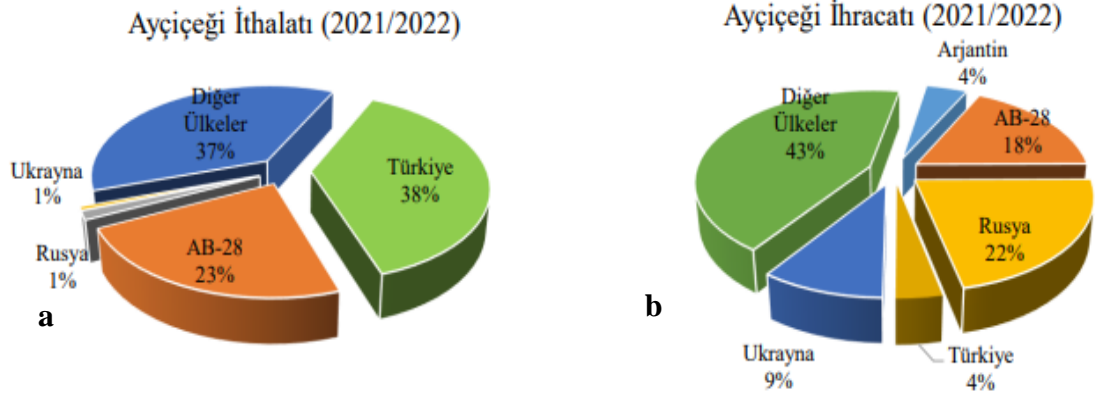
Ayçiçeği ekim alanında önemli ülkeler (%)

Ayçiçeği üretiminde önemli ülkeler (%)



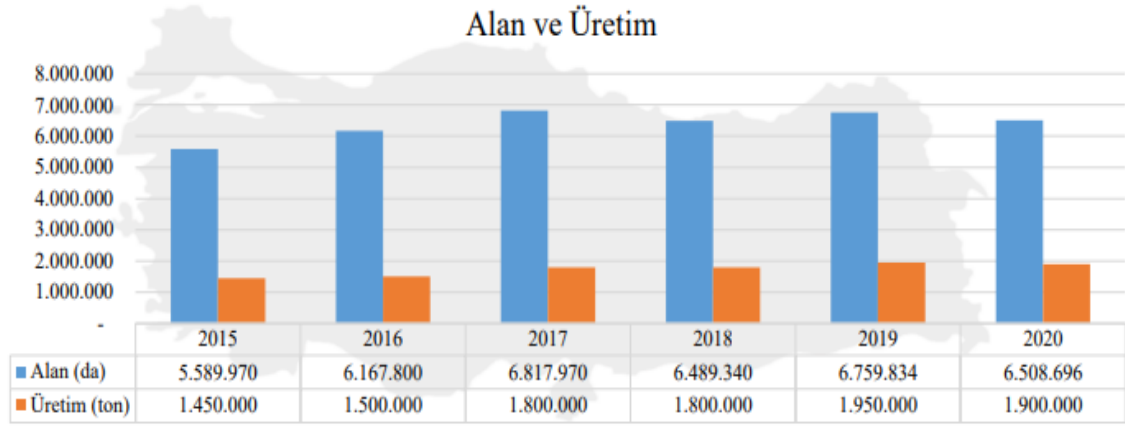
Şekil 1.2. Ayçiçeğinin a) ekim alanında ve b) üretiminde önemli ülkeler

2021/2022 üretim döneminde eylül ayı itibariyle dünya genelinde 3,50 milyon ton ithalat ve 3,69 milyon ton ihracat gerçekleşmiştir. Ayçiçeği ihracatında önde gelen ülkeler Avrupa Birliği ülkeleri ve Rusya'dır. 2021/2022 üretim döneminde, ayçiçeği tohum ihracatında, Rusya %22 ile ilk sırada yer alırken Avrupa Birliği %18 ile ikinci sırada yer almaktadır. 2021/2022 üretim döneminde, ayçiçeği tohum ithalatının %60'ı Avrupa Birliği ve Türkiye tarafından gerçekleştirilmiştir (Şekil 1.3). 2019/2020 üretim döneminde toplam ihracatın %84,6'sı Moldova, Avrupa Birliği, Çin, Kazakistan ve Rusya tarafından yapılmaktadır.



Şekil 1.3. Ayçiçeği a) ithalatı ve b) ihracatı

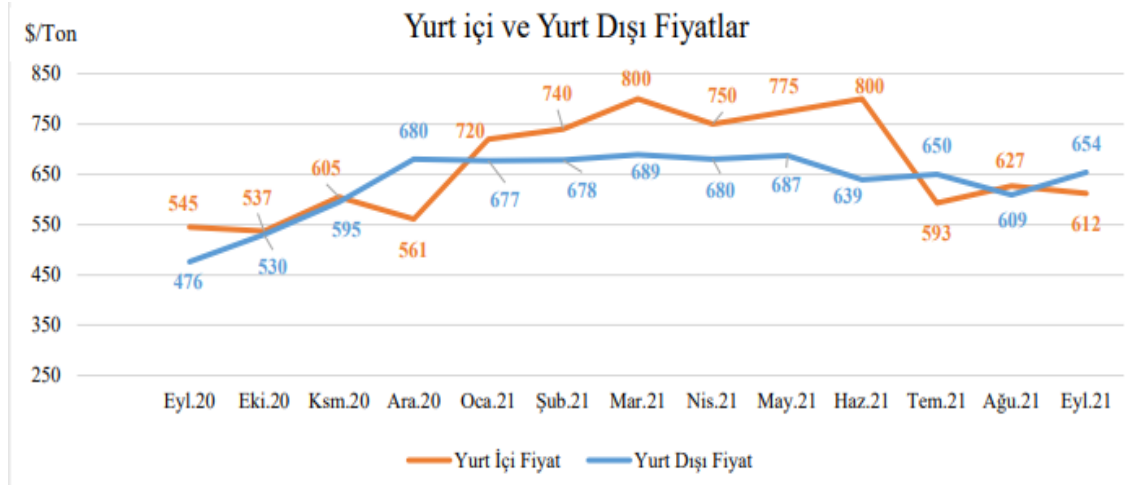
Türkiye’de yağlık ayçiçeği ekiliş alanları 2015 yılında 5,6 milyon dekar iken 2020 yılında yaklaşık %17 artarak 6,5 milyon dekara yükselmiştir. Diğer yandan 2015 yılında 1,45 milyon ton olan yağlık ayçiçeği üretimi 2020 yılında 1,9 milyon tona ulaşmıştır (Şekil 1.4).



Şekil 1.4. Türkiye’de 2015-2020 yıllarındaki ayçiçeği ekim alanı ve üretimi

Tekirdağ (136 bin ha), Edirne (95 bin ha), Adana (84 bin ha) Kırklareli (74 bin ha) ve Konya (72 bin ha) ile yağlık ayçiçeği ekim alanının %68’ini oluşturmaktadır. Yağlık ayçiçeği üretiminde Tekirdağ (342 bin ton), Konya (298 bin ton), Adana (264 bin ton), Edirne (249 bin ton), ve Kırklareli (210 bin ton)’luk payla ilk sıralarda yer almıştır.

Dünya genelinde ayçiçeği yağına karşı oluşan talebin etkisiyle yurt dışı borsa fiyatlarında artış yaşanmaktadır. 2020 yılı eylül ayında 545 \$/ton olan yurt dışı ayçiçeği fiyatı 2021 yılı eylül ayında %20 artarak 654 \$/ton olmuştur. Yurt içi borsalarda ise 2020 yılı fiyatları bir önceki yıla göre artış göstererek ortalama 484 \$/ton seviyelerine gelmiştir. Ağustos ayında ortalama 5.323 TL/ton’dan (627 \$/ton) işlem gören ayçiçeği fiyatları, eylül ayında 5.579 TL/ton (654 \$/ton), 27 Ekim 2021 tarihinde ise 6.600 TL/ton’dan (695 \$/ton) işlem görmektedir (Şekil 1.5).



Şekil 1.5. Ayçiçeğinin Yurt İçi ve Yurt Dışı Fiyatları (Eylül 2020 – Eylül 2021)

Türkiye 2020 yılı ayçiçeği tohumu ithalatı 1,14 milyon ton olarak gerçekleşmiştir. Ayçiçeği tohumu ithalatında öne çıkan ülkeler Rusya ve Bulgaristan'dır. 2020 yılı ilk 8 ayında 892 bin ton iken 2021 yılının ilk 8 ayında %31 azalışla 616 bin ton olarak gerçekleşmiştir.

Orta ve Doğu Avrupa, Rusya, Bulgaristan, Yugoslavya, Romanya, Macaristan ve Türkiye'de ayçiçeği yetiştirmektedir. Güney Afrika, Arjantin ve Uruguay ülkelerinde ayçiçeği ekim alanının %82 sini dünya üretiminin %84'den fazlasını karşılamaktadırlar.

Dünyada ve Türkiye'de ayçiçeği çerezlik olarak da yetiştirilmekte ve tüketilmekte olup, dünya ayçiçeği üretiminin %2,6'si çerezlik olarak tüketilmektedir. Türkiye'de 2017 yılı ayçiçeği üretiminin %8,37'si çerezlik olarak üretilmiştir (Anonim 2).

Önemli E vitamini ve potasyum bakımından da zengin olan ayçiçeği (0,5-0,8 mg/g) çekirdeği önemli bir linoleik asit kaynağıdır. Linoleik asit bakımından zengin yiyecekler kandaki kolesterol seviyesinin düşmesine yardımcı olduğuna için ayçiçeğinin insan beslenmesindeki değeri de yüksektir. Bunların yanında ayçiçeği yağı B1, B3 ve B6 vitaminlerince de zengindir ve ayrıca tohumlarında %17.0-18.3 oranında protein de bulunmaktadır (Lahaye vd. 2004).

Yüksek oranda doymuş yağ asidi içeren ayçiçeği çeşitlerinin geliştirilmesi, belirli gıda amaçları için yağın yararlılığını artırabilir (Kinney 1994; Pérez-Vich vd. 2000). Yüksek oleik asit çeşitleri, daha yüksek oksidatif stabilite ile yüksek bir besin değerine sahiptir. Yüksek stearik asit içerikli çeşitlerin geliştirilmesi katı veya yarı katı bitkisel yağ üretiminin önünü açmıştır (Pérez-Vich vd. 2002, 2006).

Ayçiçeği bir yağ bitkisi olmakla beraber aynı zamanda bir yem ve süs bitkisidir. Kabuklu tohumlarında %35, iç kısımlarında %45-55 arasında yağ vardır. Ayçiçeği süs bitkisi olarak ta park ve ev bahçelerinde kullanılır. Yapraklarından kinine benzer bir madde elde edilir.

Günümüzde teknoloji ve biyoteknoloji alanlarında artan bilgi birikimi ile ıslah araştırmaları hızlanmaktadır. Markır destekli seleksiyon (MAS) yöntemleri, uzun yıllardır uygulanan klasik ıslaha alternatif ve tamamlayıcı olarak kullanılmaya başlanmıştır.

Ayçiçeğinin muazzam ekonomik önemine rağmen, bu mahsulle ilgili ilk moleküler araştırmalar, benzer veya daha düşük öneme sahip diğere türlere kıyasla önemli ölçüde gecikmiştir. Aslında, ayçiçeğinde moleküler markırların gelişimi ile ilgili ilk raporlar, yaklaşık on yıl önce kesilmiş parça uzunluk polimorfizmi (RFLP) haritalaması çalışmaları ile ortaya çıkmıştır. Bununla birlikte, ayçiçeğindeki moleküler araştırmalar, son yıllarda genetik bağlantı haritalarının oluşturulup önemli özellikleri kontrol eden genlerin haritalanıp karakterize edilmesiyle genetik yapısının anlaşılmasına önemli katkılar yapmıştır. Ayçiçeği konusunda hala çok sayıda yenilikçi araştırmalar yürütülmektedir ve birçok araç sürekli olarak geliştirilmesi ile ayçiçeği ıslahçılarının kullanımına sunulmaktadır.

Bu tezin kapsamında yerli hibrit ayçiçeği ıslahında moleküler markır yardımcı seleksiyon ile idameci (maintainer) ve restorer (Rf) nükleusu taşıyan bitkilerin tespiti için Horn vd. (2019) ve (2002) yıllarında belirtilen kodominant SCAR ve dominant markırları Rf1/rf1 allellerinin belirlenmesinde kullanılmıştır. B hattı geliştirmek için fertil sitoplazma taşıyan B grubu bitkilere heterozigot Rfrf nükleusu taşıyan bitkilerle yapılan geriye melezleme çalışmaları %50 rfrf, %50 Rfrf geriye melez popülasyonları elde edilecek ve ayrıca heterozigot Rfrf B grubu bitkilerin kendilenmesi sonucu RFRf, Rfrf, ve rfrf genotipindeki F2 genotipik açılımları (BC_nF₂) de ortaya çıkmaktadır. Bu rfrf (kısır nükleusa sahip B hattı) genotipindeki bitkilerin belirlenebilmesi için test melezlemeleri yapıp bir sonraki generasyonda F1 döllerinde çiçekler uygun iklim koşullarında testlenerek ayrıştırılacak aynı zamanda Rf/rf ayrımı yapan moleküler markırlar kullanılıp istenilen genotiplerin markırlarla doğru ve verimli bir şekilde belirlenip belirlenemediği kontrol edilecektir. Bir başka ifade ile, idameci (B) hatlarında sitoplazmaları fertil olduğundan nükleuslarındaki Rf/rf allellerinin durumunu tespit etmek mümkün değildir. B hatlarının nükleusunda Rf/rf durumunu ancak kısır (A) hatlarına test melezlemesi ve elde edilen F1 bitkilerinin yetiştirilip kısır yada fertil olup olmamasının gözlemlenmesi ile anlaşılacaktır. B hatlarında Rf/rf allellerinin moleküler markırlar ile tespiti hem maliyet hemde ıslah süresini azaltmak için önemlidir.

SCAR markırlarını kullanarak ayçiçeği bitki örneklerinin nükleusu heterozigot ya da homozigot mu olduğunu tespit etmek ve kullanılan markırların hangisi iyi çalışıp çalışmadığını öğrenmektir.

2. KAYNAK TARAMASI

2.1. Ayçiçeğinin çeşitli grupları

Ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.) *Asterales* takımının, *Asteraceae* familyasından *Helianthus* cinsine bağlı tek yıllık bir türdür. Haploid kromozom sayısı 17'dir. *Helianthus* cinsi diploid, tetraploid ve hexaploid türlerini içermektedir. *Tithonia*, *Viguiera* ve *Phoebanthus* en yakın akraba türleridir. *H. annuus* ve *H. tuberosus* gıda amaçlı olarak kültüre alınan türlerdir. Diğer türler süs bitkisi olarak kullanılmaktadır. *Helianthus* adı Yunanca 'helios' güneş ve 'anthus' çiçek anlamına gelen kelimelerden türetilmiştir. Ayçiçeğinin İspanolca adı 'girasol' ve Fransızca 'tournesol' "güneşle dön" anlamını vermektedir (Fick 1989).

Heiser vd. (1969) Kuzey Amerika'dan 14 tek yıllık ve 36 çok yıllık türü ve Güney Amerika'dan 17 tür ile birlikte *Helianthus* cinsinin bir tür sınıflandırmasını önermiştir. Schilling ve Heiser (1981); Jan ve Seiler (2007) tarafından yapılan araştırmada daha yeni sınıflandırmalar bazı değişiklikler getirmiştir. Yeni sınıflandırma, 14 tek yıllık ve 37 çok yıllık türle tür sayısını 51'e çıkarmaktadır.

Yetiştiriciliği yapılan ayçiçeği çeşitlerinin üç ana grubu vardır (*H. annuus*): tohumundan çıkarılan yağı için kullanılanlar (yağlı tohumluk tipleri), tohumların doğrudan tüketimi için kullanılan (çerezlik tipleri) ve süs olarak kullanılanlardır. Günümüzde yetiştiriciliği her üç grup için çoğunlukla hibrid çeşitler yoğun olarak kullanılmaktadır. Bugüne kadar, ayçiçeği üretiminin büyük kısmını yağlık tipler oluşturmaktadır. Ayçiçek yağı geleneksel olarak sağlıklı bir bitkisel yağ olarak görülmüştür ve salata, yemek pişirme ve margarin üretimi için birinci sınıf bir yağ olarak kabul edilir. Çerezlik ayçiçeği çeşitlerinin tohumları, kuşlar ve küçük evcil hayvanların beslenmesinde de kullanılmaktadır. Yağlık ve çerezlik ayçiçeği tiplerini ayıran temel özellikler tohum yağ içeriği ve büyüklüğüdür. Yağlık tipteki çeşitler ince kabuklu ve çok yüksek yağ içeriğine (yaklaşık %50) sahip küçük siyah tohumlara sahiptir. Tersine, çerezlik ayçiçeği çeşitleri, genellikle beyaz çizgili siyah, daha düşük yağ içeriğine (yaklaşık %30) ve daha yüksek kabuk kalınlığına sahip büyük tohumlara sahiptir. Yağlı tohum ayçiçeği çeşitleri oleik asit içeriğine göre üç gruba ayrılır: linoleik, orta oleik ve yüksek oleik. Linoleik (geleneksel) çeşitler, çevreye bağlı olarak %45 ile %75 arasında linoleik asit içeriğine sahiptir. Salata sosu ve margarin üretimi için uygun sağlıklı bir bitkisel yağ olarak kabul edilir. Orta ve yüksek oleik çeşitlerin tohum yağı sırasıyla %55-75 ve %85-90 oleik asit içeriğine sahiptir. Bu yağlar, daha iyi bir termo oksidatif stabilite ile karakterize edilir, bu da onları kızartmalık kullanım için daha uygun hale getirir.

Çerezlik ayçiçeği kalitesinin ana kriteri tohum büyüklüğüdür. En büyük boy (>7mm) tip, atıştırılabilir olarak kullanılmak üzere iç çekirdek pazarına girer. Orta büyüklükteki tohumlar çekirdek pazarına ve en küçük boyuta sahip olanlar kuş ve evcil hayvan yemi pazarına girer.

Son olarak kullanılan ayçiçeği çeşidi grubu, süs amaçlı yetiştirilen tipleri içerir. Bitki boyu kadar çiçek rengi (sarı, krem, turuncu, gül, kırmızı, bordo ve iki renk) ve morfolojisi açısından da büyük çeşitlilik vardır. Kafa çapı 10 ila 30 cm'den fazla ve bitki boyu 50 ila 500 cm arasında değişebilir (Miller ve Fick 1997). Süs ayçiçeği çeşitleri bahçelerde, kentsel peyzaj alanları veya kesme çiçek olarak kullanılır. Kentsel peyzaj alanlarında kullanılan çeşitler genellikle dev veya çok uzun boylu tipler (2,5-5 m), yarı bodur tipler (1-2,5 m) ve bodur tipleri (< 1 m) içeren bitki boylarına göre ayrılmış gruplar halinde sınıflandırılır. Kesme çiçek olarak kullanılan çeşitler, sitoplazmik erkek kısırlık özelliğini içeren polen içermeyen tiplerdir. Süs çeşitleri genellikle yabani *Helianthus*'un genlerini içermektedir.

2.2. Erkek kısırlığı

Ayçiçeğinde 2 türlü çiçek vardır (Şekil 2.1).

- Fertil (verimli) çiçekler, bu çiçeklerde erkek ve dişi çiçekler bir çiçekte bulunurlar buna rağmen kendi kendini dölleyemez.
- Steril (kısır) çiçekler. Tohum tutmayan bu çiçeklerde anter keseleri yoktur. Bu çiçeklerin görevi böcek popülasyonlarını çiçek üzerine çekmektir (Elçi vd. 1987).



Şekil 2.1. Ayçiçeğindeki a) fertil (verimli) ve b) steril (kısır) çiçekler

Bitkilerde yabancı döllemeyi zorunlu kılan nedenlerden biri de erkek kısırlıktır. Erkek kısırlık bitki ıslahı ve özellikle hibrit tohum üretiminde çok önemlidir. Kalıtsal olan erkek kısırlık hem kromozomlar üzerindeki bazı genler hem de sitoplazmanın kalıtsal mekanizması tarafından kontrol edilmektedir.

Kültür bitkilerinin çoğunluğu erkek ve dişi organlarını aynı bitki üzerinde, aynı çiçekte (pamuk, buğday, domates, kolza vb.) veya farklı çiçeklerde (kenevir, mısır vb.)

taşırlar. Bu durum ise özellikle geniş ölçekli hibrit tohum üretiminde büyük bir sorun teşkil etmektedir. Hibrit tohum üretiminde, kendine döllenmeyi önlemek için anne hatlarda erkek organların mekanik olarak veya elle uzaklaştırılması (emaskülasyon) gerekmektedir, bu da maliyeti büyük ölçüde artırmaktadır. Bu nedenle, erkek kısırlık bitki ıslahçıları ve tohum üreticilerinin en çok arzuladığı karakterlerden birisidir. Hibrit tohum üretimi yapan firmaları, erkek kısır hatların elde edilmesi için büyük yatırımlar yapmaktadırlar.

Hibrit tohumunun ticari üretimi için erkek kısırlığının mevcudiyeti esastır. Erkek kısırlık doğada yüksek oranda kendine dölenen bitkilerde yabancı döllenmeyi sağlamak için kullanılır. Erkek kısırlığın F1 hibrit tohum üretiminde kullanımı, ayçiçeği, mısır ve sorgum gibi bitkilerde hibrit tohum üretiminin patlamasına yol açmıştır. Ayçiçeğinde ve diğer yabancı dölenen bitkilerde iki ana tür kısırlık vardır: nükleer erkek kısırlığı (NMS) ve sitoplazmik erkek kısırlığı (CMS) tanımlanmıştır. Nükleer erkek kısırlığı genellikle resesif bir gen tarafından kontrol edilir. NMS ayçiçeği hatlarında ms1'den ms11'e kadar on bir farklı gen tanımlanmıştır (Chen vd. 2006).

2.3. Sitoplazmik erkek kısırlığı (CMS)

Sitoplazmik erkek kısırlığı, doğrudan doğruya sitoplazma tarafından meydana getirilmektedir. Normal sitoplazma (N), kısırlığı meydana getiren sitoplazma ise (S) ile gösterilmektedir. "S" sitoplazmayı taşıyan bitkiler, "erkek kısır" olup yabancı tozlama olduğu takdirde tohum oluşumu sağlanabilmektedir. Yani normal bitkiler ile tozlandıklarında tohum oluşturabilirler.

Sitoplazmik erkek kısırlığı, bitkilerin normal polen üretmesini engelleyen maternal olarak kalıtsal bir özelliktir. CMS F1 hibrit tohum üretmek için bir araç olarak kullanılır. Kökenine göre, CMS otoplazmik veya alloplazmik olarak sınıflandırılır. Otoplazmik CMS, sitoplazmadaki mutasyonel değişikliklerin bir sonucu olarak CMS'nin türler içinde ortaya çıktığı vakaları ifade eder. Alloplazmik erkek kısırlığı, çekirdek ve sitoplazma arasındaki uyumsuzluğa bağlı olarak spesifik, intergenerik ve bazen intraspesifik melezlerden kaynaklanır. Ayçiçeğinde her iki CMS türü de tanımlanmıştır.

Sitoplazmik erkek kısırlık (CMS) bitki ıslahında ilk defa mısırdaki 1960'larda kullanılmaya başlamıştır. Ancak ayçiçeğinde ilk defa 1968 yılında Leclercq tarafından *H. annuus* X *H. petiolaris* melezlenmesinden elde edilmiştir. Bu sistemde yabani 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 (Schnabel vd. 2008). CMS kendiliğinden ortaya çıkabilir (Serieys ve Vincourt 1987). Yabani *H. annuus* ve *H. argophyllus*'tan çeşitli CMS kaynakları ve *H. petiolaris*'ten daha fazla sitoplazmik kaynak keşfedilmiştir. Birkaç çok yıllık türler ayrıca yeni CMS kaynaklarının geliştirilmesine katkıda bulunmuştur.

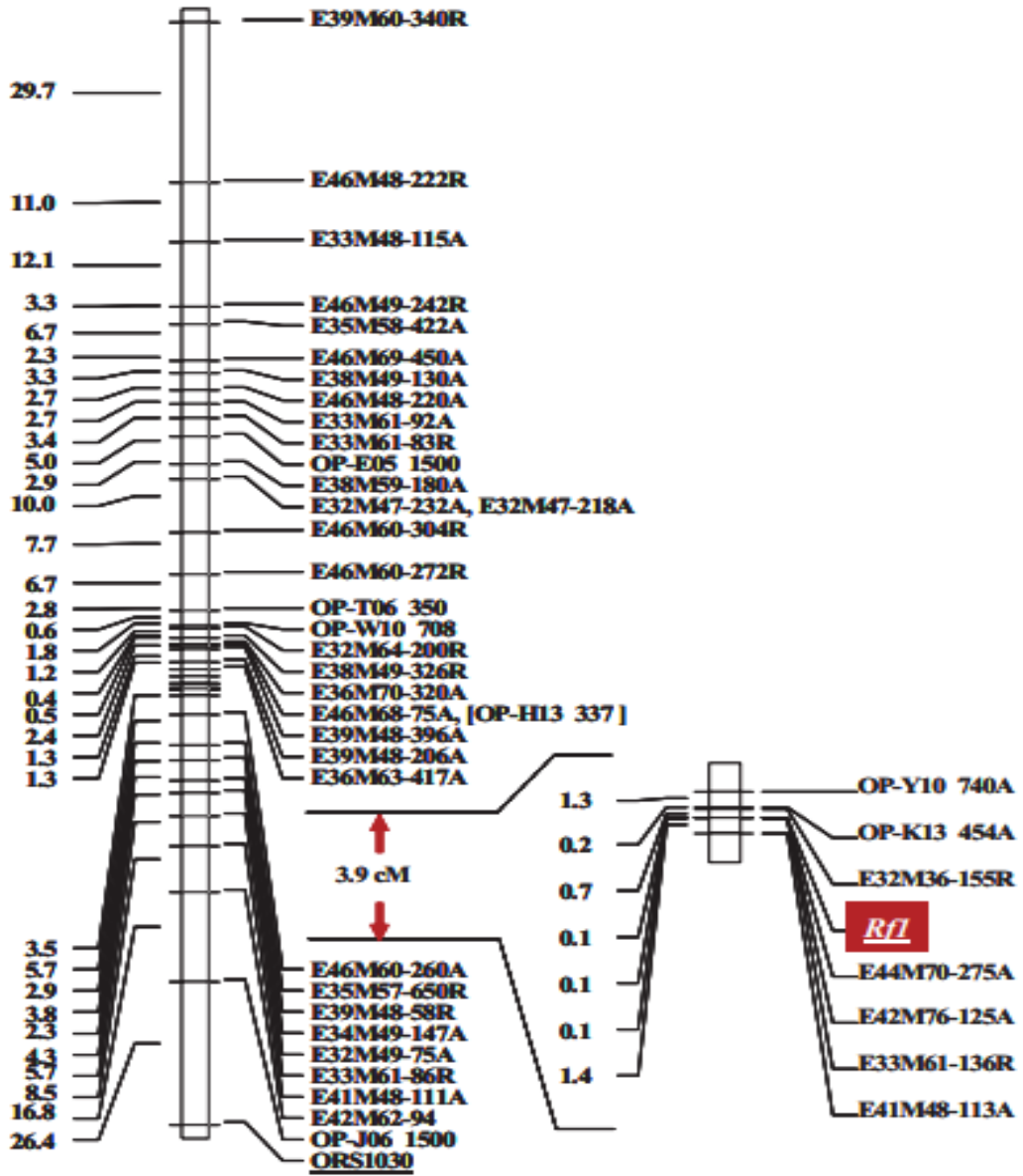
Bu sitoplazmik erkek kısırlığı, ayçiçeğinin patojenlere karşı genetik hassasiyetini azaltmak ve Mendel kalıtımına uymayan bir şekilde genlerin çeşitliliği arttırmak için bir alternatif olabilir (Horn ve Friedt 1997). Kökeni ne olursa olsun, genellikle CMS'nin nükleer sitoplazmik uyumsuzluktan kaynaklandığı ve farklı sistemlerde muhtemelen farklı mekanizmaların olduğu söylenir (Horn 2006).

PET1 CMS kaynağı 1990'lara kadar, ticari hibrit üretiminde kullanılan tek kaynaktır. Oldukça stabil 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 pratikleşmesi ve maliyetini azaltmasıdır. 1970 yılında ABD de, CMS tam olarak restore eden genlerin bulunmasıyla ilk hibrit 1972 yılında elde edilmiş ve 5 yıl süre içerisinde toplam üretimin %80 ne ulaşmıştır (Wani vd. 2010).

Ayçiçeğinde PET1 sitoplazması için restore edici genleri bu sitoplazmanın ayçiçeği hibrit ıslahında ticari kullanımı nedeniyle en iyi karakterize edilenlerini temsil eder. Kinman (1970) tarafından T66006-2-1-B hattında keşfedilen restore edici geni Rf1, o zamandan beri RHA 271, RHA 272, RHA 273 ve diğerleri gibi bir dizi USDA / ARS RHA hattına entegre edilmiştir (Korell vd. 1992). Yabani *H. annuus* ve ekilişi yapılan ayçiçeği melezlerinden elde edilen Kanada hatlarıyla yapılan bir çalışmada Enns vd. (1970), fertilitate restorasyonunun tek bir baskın gen tarafından kontrol edildiğini bildirmiştir. Vranceanu ve Stoenescu (1971), çeşitli coğrafi ve genetik yapıya sahip saf hatların polen fertilitate restorasyonu için başka faktörlere sahip olup olmadığını belirlemek için çalışmalar başlattılar. Mezhedeshy'nin yerel ayçiçeği popülasyonundan sekiz jenerasyon boyunca seçilen tek bir kaynak olan MZ-1398'in restorasyon kapasitesi gösterdiğini buldular. Fick ve Zimmer (1974), yağlı olmayan hatları CMS HA267 ve RHA280 arasındaki melezlerde iki tamamlayıcı baskın genin varlığını doğrulamıştır. Çalışmalar, *H. annuus ssp. lenticularis* veya CMS ANL1'den geliştirilen sitoplazmaya erkek fertilitatesini geri kazandıran tek bir baskın gen olan Rf1'i bildirmiştir (Miller ve Fick (1997)'de gözden geçirilmiştir).

Ayçiçeğinde erkek fertilitatesini geri kazandıran genleri izole etmek için dünya çapında birkaç grup tarafından harita bazlı bir klonlama yaklaşımı başlatılmıştır. Gentzittel vd. (1995, 1999) araştırmasında PET1 sitoplazmik erkek kısırlığının iki farklı fertilitate restorasyon lokusunun varlığını bildirmiştir. Rf1 LG 6'da, Msc1 ise LG 12'de RFLP haritasında ve konsensus haritasında haritalanmıştır. Jan vd. (1998), Rf1 fertilitate restorasyon genini, haritalarındaki yakın bir markırdan 25 cM mesafede LG 2'nin bir ucuna eşlemiştir. Araştırmaları için RHA271 ve HA234 hatlarının melezlenmesinden elde edilen 93 F2 bitkisi kullanmışlar. Horn vd. (2003), PET1 sitoplazmasına sahip ayçiçeği melezlerinin restore edici geni Rf1 için PCR bazlı markırlar geliştirmiştir. Ek olarak, 75 SSR markırı F2 popülasyonunda analiz edilmiş ve haritalanmıştır (Tang vd. 2002; Burke vd. 2002). Restore edici gen Rf1'in etrafındaki bağlantı grubu 43 markır, yani 35 AFLP markırı, 7 RAPD markırı ve 25.3 cM'yi kapsayan 1 SSR markırı içeriyordu

(Şekil 2.2). Ek olarak, SSR markır analizleri Rf_PEF1'in LG 13'te Rf1 olarak bulunmadığını göstermiştir.



Şekil 2.2. Rf1 restore edici genini taşıyan LG 13'ün markır haritası RHA325 X HA342 melezinin F2 popülasyonunda AFLP markırları, RAPD markırları ve SSR markırları kullanarak oluşturuldu. Rf1 geninin etrafında 3.9 cM'lik bir bölge büyütülmüş olarak gösterilmiştir (Kusterer vd. 2005).

T66006-2-1-B ve MZO1398 arasındaki bir test melezinde ikinci bir ana dominant restore edici geni Rf2 keşfedildi. Bununla birlikte, bu Rf2 geni, CMS PET1'in idameci hatları ile tüm ekili ayçiçeği hatlarında mevcut görünmektedir (Serieys vd. 2005).

Ekili ayçiçeklerinin çoğunda, iki baskın nükleer gen Rf1 ve Rf2 fertilitenin restorasyonundan sorumludur. PET1 için çeşitli restore edici hatlar mevcuttur. Bunların çoğu, her ikisi de polen fertilitenin geri kazanılmasından sorumlu olan Rf1 ve Rf2 genlerini taşır. Rf2'nin CMS taşıyıcıları da dahil olmak üzere tüm saf hatlarda mevcut olduğu açıklanmıştır. Genel olarak, verimli ayçiçeği melezleri üretmek için restorer hatları tarafından yalnızca ilk gen (Rf1) katkıda bulunur. Restore edici gen olan Rf1 SSR markırları kullanılarak ayçiçeği referans haritasının 13. bağlantı grubunda haritalanmıştır (Kusterer vd. 2005).

Son zamanlarda hem Rf1 hem de Rf2'den farklı olan bir fertilitate restore edici geni olan Rf3 RHA280 hattına aktarılmıştır (Jan ve Vick 2007). Feng ve Jan (2008) araştırmasında *H. giganteus* ve *H. annuus* L. cv. HA89 arasındaki türler arası bir melezlemeden elde edilen CMS GIG2 adlı yeni bir sitoplazmik erkek kısırlığı ve polen fertilitenin restore eden yeni bir tamamen baskın gen olan Rf4'ü tanımlamıştır. Rf4 geni, SSR markırları ve RFLP bazlı STS markırları kullanılarak haritalanıp bağlantı grubu 3'te ve SSR markırı ORS1114'ten yaklaşık 0.9 cM uzakta olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışma için Feng ve Jan (2008), 933 bireylik bir açılım popülasyonu kullanarak Tang vd. (2002) ve Yu vd. (2002, 2003) haritasından rastgele seçilen 200 SSR markırı kullanmışlardır. Bu fertilitate restore edici genin CMS PET1'in Rf1'inden farklı olduğu sonucuna varmışlardır, çünkü CMS PET1 için tüm restore edici hatları polen fertilitenin CMS G1 G2 kısırlık sisteminde sağlamamıştır (Feng ve Jan 2008). Fertilitate genleri ile bağlantılı tüm bu markırlar, bu genlerin genetik analizi ve ayçiçeği yetiştiriciliğinde markır destekli seleksiyon için önemli bir temel sağlar.

Toplam 72 farklı CMS kaynağı tanımlanmıştır, 34'ü için restore edici genleri mevcuttur. CMS kaynaklarının çoğu kısırlık restorasyonu için en az iki gen gerektirir, ancak bazıları tek gen ile de kalıtılabilir. Bu CMS kaynaklarının 19'u için ayrıntılı kalıtım çalışmaları yapılmıştır. Bu nedenle, yaygın olarak kullanılan PET 1 dışındaki çeşitli CMS sistemleri de pratik hibrit tohum üretimi için kullanılabilir (Vollmann ve Rajcan 2009).

Ayçiçeği Asteraceae familyasında CMS gen kaynağı olan tek bitkidir. Ayçiçeğinde CMS, sporofitik karakterde yani sporla çoğalmakta ve maternal olarak, yani anaya bağlı kalıtımı olarak sadece dişi bitkinin kısırlığı ile ilgili bir özelliktir. Ayçiçeğinde CMS bitkilerin diğerlerinden farkı, çiçek tozu keseleri normallerin yarısı genişliğinde olmaları ve çiçek borusundan anter (çiçek tozu kesesi) çıkarmamalarıdır. Anterler üstten değil, sadece dipten çıkmaktadırlar. Bazı ana hatlarında ise, corolla'dan (çiçek borusundan) anter çıkarmasına rağmen, bunlar boştur ve çiçek tozu içermezler. Döllenen dişi bitkiler aynı normal görünümde olup, döllenmeyen bitkiler uzun bir süre yeşil yapraklı görünümünü muhafaza etmektedirler. Bu nedenle, bitkilerin döllenip döllenmediğini dış görünüşüne bakarak anlaşılabilir (Seiler ve Rieseberg 1997).

Ayçiçeğinde ve diğer bitkilerde yüksek verim sağlayan hibrit çeşit ıslahının kolaylaşmasını sağlayan sitoplazmik erkek kısırlığın tek kaynaktan elde edilmesinin büyük avantajları yanında, hastalıklara karşı duyarlılık ihtimalini de ortaya çıkarmaktadır.

2.4. Ayçiçek Genetik Haritalama Çalışmaları ve Markır Yardımıyla Seleksiyon (MYS)

Ayçiçeğinde farklı markır sistemleri ile oluşturulan genetik haritalar birçok araştırmacı tarafından tanımlanmıştır. En önemli markırlar şunlardır: Kesilmiş fragment uzunluk polimorfizmi (RFLP), Çoğaltılmış parça uzunluk polimorfizmi (AFLP), Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA (RAPD) ve Basit tekrarlı dizi (SSR) markırlarıdır.

Son olarak, fonksiyonel markırlar, fenotipik özellik varyasyonu ile nedensel olarak ilişkili genler içindeki polimorfik bölgelerden türetilir. Moleküler markırlar, PCR temelli moleküler markırlar (SSR, RAPD, AFLP, SRAP gibi), PCR temelli olmayan moleküler markırlar (RFLP) ve DNA çip ve dizilemeye bağlı olanlar (SNP'ler gibi) olmak üzere üç guruba ayrılmaktadırlar. Son yıllarda sistematik çalışmalarda yaygın olarak kullanılan moleküler markırların birçok avantajı vardır; 1) çevre faktörlerinden etkilenmezler; 2) çekirdek ve farklı kalıtım şekline sahip kloroplast ve mitokondri gibi organel genomlar ayrı ayrı çalışılabilir; 3) genetik değişiklikleri daha fazla yansıttıkları için daha az pleiotropiktir (bir genin birden fazla karakteri kontrol etmesi); 4) her bir ebeveynden gelen farklı karakterler tespit edilebildiği için bitkilerin genetik orijini tespit edilebilir; 5) sonsuz sayıda moleküler markır elde edilebilir (Gülşen ve Mutlu 2005).

Şimdiye kadar, tek bir sitoplazmik erkek kısırlık (CMS) kaynağı olan PET1, ayçiçeğinde hibrit üreme için dünyada kullanılmaktadır. Polen fertilitesi restorasyonundan sorumlu olan restorer gen Rf1'in yeni ıslah materyaline aktarılması, etkili bir markır yardımcı seleksiyon yapmak için yüksek bağlantı derecesine sahip markırlar gerektirir.

2.4.1. Rastgele arttırılmış polimorfik DNA (Randomly amplified polymorphic DNAs (RAPD))

Williams vd. (1990) tarafından geliştirilen RAPD tekniği, basit ve kısa oligonükleotid primerler (6-10 bç) kullanılarak genomik DNA'nın rastgele bölgelerinin çoğaltılmasıdır.

RAPD markırlarının dominant ve düşük tekrarlanabilir olmasına rağmen, bunlar ayçiçeğinde erken genetik çalışmalarda kullanılmıştır. RAPD markırlarının kullanılması, yabani *H. annuus*'un yetiştirilen ayçiçeğinin atası olduğu hipotezini desteklemiştir. Ayçiçeği türlerinde yüksek düzeyde RAPD varyasyonu bildirilmiştir ve polimorfik lokusların oranı çoğu hat için ortalama %50'den fazladır. Toplu segregant analizi gibi

yöntemler, ayçiçeğindeki önemli özelliklerle ilişkili RAPD markırlarının hızlı bir şekilde tanımlanmasına izin vermiştir. RAPD markır sisteminin sınırlamalarının üstesinden gelmek için, RAPD bantları SCAR markırlarına dönüştürülebilir.

Toplu Segregant analizlerle 520 primerin incelenmesi, restorasyon geni Rf1'e bağlı beş RAPD markırı tanımlanmıştır. 183 bireylerden oluşan F2 popülasyonunda, RAPD markırlarından biri olan OPK13_454, Rf1'den 0.8 cM, ardından 2 cM ile OPY10_740 markırı haritalanmıştır. Bu iki RAPD markırı daha güvenilir, kullanımı daha kolay SCAR markırları HRG01 ve HRG02'ye dönüştürülmüştür. 48 AFLP primer kombinasyonu kullanılarak yapılan toplu segregant analizinde, Rf1 ile aynı bağlantı grubunda haritalanabilen 17 polimorfizm tanımlanmıştır. E33M61_136 ve E41M48_113, Rf1 geninden sırasıyla 0.3 cM ve 1.6 cM mesafede haritalanmıştır (Horn vd. 2003).

AFLP markırları ile kombinasyon halinde RAPD markırları, restorer gen Rf1'in haritalanması için çok kullanışlı bulunmuştur (Horn vd. 2003).

RAPD, ayçiçeğinde, özellikle yabancı türlerde haritalama için kullanılmıştır. Rieseberg vd. (1993) tarafından 161 RAPD markırına ve bir izozim lokusuna dayanan bir *Helianthus anomalus* haritasını oluşturmuştur. Daha sonra bu harita genişletilmiş ve şimdi 17 bağlantı grubunu ve 1.983 cM'yi kapsayan 549 RAPD, 151 AFLP ve bir izozim lokusu içermektedir. Yabancı *H. annuus* ve *H. petiolaris* için sırasıyla 212 ve 400 RAPD lokusuna dayalı oluşturulan RAPD haritaları da geliştirilmiştir. Bu araştırmacılar, *H. annuus* için 1.084 cM ve *H. petiolaris* için 1.761 cM'yi kapsayan her iki tür için 17 bağlantı grubu bildirmiştir (Rieseberg vd. 1995).

2.4.2. Restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi (Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP))

RFLP DNA markırları içerisinde ilk keşfedilen markırdır. RFLP'nin moleküler temeli, nükleotid baz değişimleri (substitutions), eklemeler, silmeler, inversion (ters çevrilme) ve duplication (katlama) gibi olaylar genomda restriksiyon (kesim) bölgelerini kaldırabilir yada yeni kesim bölgeleri oluşturabilir.

Ayçiçeğinde geliştirilen ilk DNA bazlı markırlar RFLP markırdır. Berry ve arkadaşları tarafından üç bağımsız restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi (RFLP) haritası oluşturulmuştur (Berry vd. 1995, 1996, 1997; Gentzbittel vd. 1995, 1999; Jan vd. 1998). Berry vd. (1995), yetiştiriciliği yapılan ayçiçeğinin ilk RFLP haritasını saf hat olan HA89 ve ZENB8 hatları arasındaki bir melezlemelerde elde edilen F2 popülasyonunu kullanarak yayınlamışlardır. RFLP markırları ayçiçeğinde başlangıçta farklı araştırma grupları tarafından çalışılmış ve bunlara dayanan genetik haritalar rapor edilmiştir. Ek olarak, Berry vd. (1996), dokuz F2 haritasını birleştirdi ve bu türdeki haploid kromozom sayısına karşılık gelen 17 bağlantı grubunda düzenlenmiş 635 RFLP

markırını entegre etmişlerdir. Bu harita 1.380 cM'yi kapsıyor ve ortalama 5.9 cM yoğunluğa sahipti. Berry vd. (1997), 81 cDNA probu tarafından tespit edilen 81 RFLP lokusu rapor etmişlerdir.

Berry vd. (1995); Jan vd. (1998) tarafından yapılan haritaları bireysel F2 popülasyonlarına dayanırken, Gentzbittel vd. (1999) ve Berry vd. (1996) tarafından yapılan haritalar farklı haritalama popülasyonlarının verilerine dayanan bileşik haritalardır.

Gentzbittel vd. (1995), 180 prob-enzim kombinasyonu ile tespit edilen 237 ayırıcı lokusa dayanan kültür ayçiçeği için bir RFLP bağlantı haritasını tanımlamıştır. Bu haritanın ortalama markır yoğunluğu yaklaşık 7 cM ve 23 bağlantı grubu ile 1.150 cM'yi kapsıyordu. Ayçiçeğindeki haploid kromozom sayısından daha fazla 6 bağlantı grubuna sahip olan bu harita muhtemelen ayçiçeği genomunun yaklaşık %70'ini temsil etmektedir. Yazarlar, 17 bağlantı grubu elde etmek ve markır bulunmayan bölgeleri kapsayacak şekilde ek RFLP markırlarının gerekli olduğu sonucuna varmışlardır. Bu amaçla Gentzbittel vd. (1999), yedi ayrı haritayı entegre etti ve neredeyse RFLP markırlarına dayanan ve başlıca fenotipik özellikleri içeren tamamlanmış bir bağlantı haritası kurmuştur. Bu entegre harita, 238 lokus içeren 17 ana bağlantı grubu halinde düzenlenmiştir ve 1.650 cM'yi kapsamaktadır. Berry vd. (1995); Gentzbittel vd. (1995) tarafından düzensiz segregasyon ve dublike olmuş RFLP lokusları tespit edilmiştir.

Jan vd. (1998), 232 cDNA probu kullanılarak saf hatlar olan RHA271 ve HA234 arasındaki melezlerden elde edilen bir F2 popülasyonunda 271 RFLP lokusunu haritalamışlardır. Bu haritada, ayçiçeği genomunun 1.164 cM'sini kapsayan 20 bağlantı grubu vardı ve ortalama marker-marker mesafesi 4.6 cM' idi.

Burke vd. (2004), *H. petiolaris* genomunun ortak bir SSR/RAPD genetik bağlantı haritasını tanımladı ve *Helianthus* içindeki genom yapısının evrimini incelemek için dört bağımsız *H. annuus* L. haritalama popülasyonundan üretilen entegre bir SSR haritasıyla birlikte kullanmıştır. Bu çalışmanın sonuçları, en az sekiz translokasyon ve üç inversiyondan kaynaklanan 27 ortak segmentin varlığını göstermiştir. Birlikte ele alındığında, bu yeniden düzenlemeler en az 20 kromozomal kırılma / translokasyon oluştuğunu gösteriyordu. *H. petiolaris* SSR / RAPD haritası 17 bağlantı grubunu ve 1.592 cM'yi kapsar.

2.4.3. Çoğaltılmış parça uzunluk polimorfizmi (Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP))

AFLP ve RAPD PCR'in geliştirdikten sonra ilk geliştirilen markır sistemidir. AFLP, genom haritalama ve genetik değişkenlik çalışmaları için güçlü bir markır sistemidir çünkü bunlar yüksek oranda tekrarlanabilir, önceden dizi bilgisi gerektirmez

ve yüksek bir polimorfizm oranına sahiptir. Bununla birlikte, AFLP markırları genel olarak dominant markırlardır ve bu nedenle baskınlığın dezavantajlı olmadığı projeler için büyüktür kullanışlıdır. AFLP markırları, yeni genetik haritalar oluşturmak, yoğunluğu artırmak ve halihazırda geliştirilmiş genetik haritaların boşluklarını doldurmak için kullanılmıştır. Peerbolte ve Peleman (1996); Gentzittel vd. (1995) tarafından kullanılan F2 popülasyonlarının ikisine 291 AFLP lokusu eklemiştir. Bu markırlar iki bağlantı grubunu bir araya getirmiş ve daha önce bağlanmamış birkaç RFLP lokusunun haritalanmasına izin vermiştir. Gedil vd. (2001); Berry vd. (1996); Jan vd. (1998), markırlara dayanan 104 RFLP lokus haritasına 296 AFLP lokusu ekledi ve 17 linkage grubundan oluşan, ortalama yoğunluğu 3,3 cM olan ve 1,326 cM uzunluğunda bir AFLP-RFLP haritasını oluşturmuştur. Başka AFLP haritaları da geliştirilmiştir. 99 rekombinant kendilenmiş hat kullanarak 2.833,7 cM'lik bir AFLP haritası oluşturulmuş ve daha sonra ek AFLP markırıyla geliştirilmiştir (Flores-Berrios vd. 2000). Direk uzunluk polimorfizmi (DALP) markırlarının ve AFLP markırlarını birleştiren 2,169 cM uzunluğunda bir genetik harita oluşturulmuştur (Langar vd. 2003).

2.4.4. SCAR Yöntemi

RAPD ve ISSR gibi markır spesifitesi düşük olan markırların gücü, bu yöntemlerle elde edilen bantların jel üzerinden çıkarılarak, 3' uçlarındaki DNA zincirlerinin tespiti ve bunların daha uzun, dolayısıyla da daha spesifik primerler olarak PCR reaksiyonlarında kullanılması ile artırılır (Paran ve Michelmore 1993). Tekrarlanabilirliği, RAPD ve ISSR markırlarına nazaran çok daha yüksektir. Genellikle dominant markırlar oluşturmasına rağmen, bantların restriksiyon enzimleriyle kesilmesiyle kodominant markırlara dönüştürülebilir (Gülşen ve Mutlu 2005).

İki SCAR markırı - HRG01 ve HRG02 ayçiçeği bitkilerinin seçimlerinde Rf1 geninin alellerinin tanımlanması için ilişkilendirilmiştir. Restorer hatların (Rf1Rf1) PCR ürünleri sadece 450 bp uzunluğunda bantlar vermiştir. HRG01 primerinin annealing sıcaklığını 58'den 54 dereceye düşürülmesi tüm CMS hatlarında PCR ürünleri (rf1rf1) 350 bp uzunluğunda elde edilmesine neden olmuştur. F1 melezlerinin (Rf1rf1) PCR ürünlerinde her iki bantlarda görülmüştür. HRG01 markırının kodominant karakteri ve çok yıllık türlerde Rf1 tespiti için daha verimli olduğunu kanıtlarken, HRG02 tek yıllık türler için daha iyi sonuçlar vermiştir. Ayrıca, Rf1 ve CMS-PET1 ile ilişkili mitokondrial haplotiplerin baskın alellerini aynı anda tespit etmeyi sağlayan multipleks RT-PCR test sistemi geliştirilmiştir (Markin vd. 2017).

İki SCAR markırı, PPR621.5M ve PPR621.5R, idameci hatlar için G (PPR621.5M) ve restorer hatların C (PPR621.5R) tespiti için başarıyla geliştirilmiştir. PPR621.5_F1 ve PPR621.5_Rev primer kombinasyonu sadece rf (idameci) alleline özgü 164 bp uzunluğunda bir band oluştururken, PPR621.5_F2 ve PPR621.5_Rev primer

kombinasyonu sadece Rf (restorer) alleline özgü 164 bp uzunluğunda bir band oluşturmaktadır (Horn vd. 2019).

HRG01 ve HRG02, farklı büyüklükteki amplifikasyon ürünleri oluşturmaktadır. HRG01 için multipleks PCR ürünlerinin *coxII* restiriksion enzim kesim bölgesi oluşturmak için ilave primerler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. HRG02 durumunda, atp9 için primerler PCR reaksiyonuna dahil edildi ve her iki multipleks PCR reaksiyonu da çok iyi çalışmaktadır (Kusterer vd. 2005).

59 ayçiçeği hattının haritalamasında üç yeni markır, bir kodominant markır 67N04_P ve iki dominant markır, restorer için PPR621.5R ve idameci için PPR621.5M geliştirilmiş ve doğrulanmıştır. Yeni geliştirilen üç markırın yanı sıra restore edici gen olan Rf1 (HRG01 ve HRG02, CAPS-markır H13) için mevcut üç markırın çok yönlülüğü, 557 bireyden oluşan geniş bir ilişkilendirme haritalamasında analiz edilmiştir (Horn vd. 2019).

67N04_P adlı PAMSA markır, HanXRQ ile karşılaştırıldığında gözlenen 67N04-B2 BamHI BAC-bitiş dizisindeki bir G ile bir A mutasyonun saptanması için oluşturulmuştur. Bu SNP'nin tespiti, basit donanımlı laboratuvarlarda bile erişilebilir hale getirmek için agaroz jellerinde gerçekleştirilmiştir. Oluşturulan kodominant markır, oluşan bantlar 15 bp uzunluk farkından dolayı restorer hattı RHA 325 ile idameci hattı HA 342 arasında ayırım yapılmasını sağlamıştır. Restorer hatlarında 170 bp'lik bir bant görülürken idameci hatlarında sadece 155 bp'lik bir bant görülebilmıştır.

Araştırmacılar ve bitki ıslahçıları farklı taleplere ve laboratuvar ekipmanlara sahip olduklarından, markırların ıslah programlarına uygulanması en başından beri zor olmuştur. Çalışmamızda, 67N04_P, PPR621.5R, ve PPR621.5M üç adet yeni geliştirilen PAMSA (Çoklu spesifik alellerin PCR amplifikasyonu) markırları markır destekli seleksiyon için çok değerli araçlar olduğunu kanıtlamıştır, PAMSA 67N04_P bir kodominant markırdı ve PPR621.5R ve PPR621.5M ayrı ayrı PCR reaksiyonları gerektirmelerine rağmen kombinasyon halinde çalışmak, heterozigot bitkilerin belirlenmesine de izin vermektedir.

Özellikle, yeni geliştirilen üç markır (kodominant PAMSA 67N04_P ve SCAR markırları PPR621.5R ve PPR621.5M), ayçiçeği hibrit ıslahında markır destekli seçim için değerli araçları temsil etmektedir (Horn vd. 2019).

2.4.5. CAPS Yöntem

CAPS markırları RFLP markırlarına dayanır. PCR geliştirildikten sonra birleştirilmiştir. O nedenle PCR-RFLP diye CAPS markırlarına da denir.

CAPS markırı olan H13 kodominanttı, ancak ıslah programlarında gerçek kullanım için restorer geni olan Rf1'e 7,7 cM uzaktadır. CAPS markırı H13, PCR ürününü HinfI ile kesilen RAPD markır OPH13_337'den geliştirilmiştir. CAPS markırı olan H13, restorer ve idameci hatlar arasındaki ayırım için kullanışlı olmayan bir markır olarak bulunmuştur (Horn vd. 2019).

2.4.6. Basit tekrarlı dizi (Simple sequence repeats (SSR)) markırları

Mikrosatellitler veya Basit tekrarları dizi (SSR'ler), basit bir iç tekrar yapısında düzenlenmiş kısa dizi parçalarıdır (Tautz 1989). Şimdiye kadar analiz edilen her organizmanın genomunda SSR'ler tespit edilmiştir (Li vd. 2002). Mikrosatellitlerin sayısının türler içinde ve türler arasında oldukça değişken olduğu gösterilmiştir.

Mikrosatellit markırları, yüksek polimorfizm seviyeleri, çoklu allellik doğası, kodominant kalıtımı, genomlarda geniş dağılımı, PCR kullanarak analiz kolaylığı ve laboratuvarlar arasında yayılma kolaylığı nedeniyle genetik haritalama ve popülasyon çalışmaları için ideal bir DNA markır sistemidir. Farklı araştırma grupları SSR markırlarının gelişimini ve karakterizasyonunu tanımlamıştır ve toplam 2.040 markır yayımlanmıştır (Paniego vd. 2007). Tang vd. (2002), basit dizi tekrarı (SSR) markırları temelinde ayçiçeği için ilk genetik bağlantı haritasını oluşturmuştur. Harita çerezlik ve yağlık restorer hatları (RHA280 = RHA801) arasındaki melezlerden elde edilen rekombinant kendilenmiş hatlar (RILs) ile oluşturulmuştur. Harita 1.368 cM uzunluğundaydı ve ortalama 3,1 cM yoğunluğa sahipti. Burada açıklanan SSR markırları, ayçiçeğinin genetik haritalarını oluşturmak için kritik bir DNA markırlarını sağlar ve yabancı ve kültür ayçiçeği için geliştirilen çok sayıda genetik haritanın birleştirilmesi ve çapraz referanslanması için temel oluşturur.

Daha sonra Yu vd. (2003), SSR markırlarına dayalı yeni bir RIL haritası (PHA × PHB) oluşturarak ayçiçeği haritasının yoğunluğunu arttırmıştır. Yu vd. (2003), 701 yeni SSR ve 89 RFLP veya INDEL markır lokusunu, ikisi daha önce Gedil vd. (2001); Tang vd. (2002) tarafından kullanılan üç popülasyona haritalayarak ilk ayçiçeği çapraz referanslı haritaları oluşturmuştur. Bu haritalardan Tang vd. (2003), 657 lokusu, lokus başına ortalama 2,2 cM yoğunluğa sahip 1.423 cM'lik bir haritaya entegre eden ayçiçeği birleşik bir SSR bağlantı haritası geliştirmiştir.

Ayçiçeği bağlantı grubu uçlarını tanımlamak ve yayınlanan ayçiçeği basit dizi tekrarı (SSR) bağlantı haritasını genişletmek için hedef bölge amplifikasyon polimorfizmi (TRAP) markır tekniği de kullanılmıştır (Hu vd. 2004, 2007).

Rachid Al-Chaarani vd. (2002) tarafından geliştirilen AFLP haritası, AFLP markırlarının sayısını artırarak ve 38 SSR markırını entegre ederek geliştirilmiştir. Yeni haritada 2.916 cM'yi kapsayan 21 bağlantı grubuna 367 AFLP ve SSR markır lokusu

yerleştirilmiştir. Bu SSR-AFLP haritasının yakın zamanda farklı kaynaklardan 161 yeni SSR markırlarını entegre eden Tang vd. (2002) tarafından ek bir gelişme kaydedildiği ve bu haritaya Paniego vd. (2007), genel SSR haritasına çapraz referans verildiği bildirilmiştir.

Günümüzde SSR'ler, kültür bitkilerinde DNA parmak izi, genetik haritalama ve moleküler ıslah dahil olmak üzere popülasyon genetiği analizleri için tercih edilen markırlar haline gelmiştir (Powell vd. 1996). Mikrosatellit markırları, farklı melezler arasındaki karşılaştırmalı analizler için harita tabanlı klonlama yaklaşımlarında da kullanışlıdır.

Genetik haritalar, birçok kültür bitkisinde, tek bir ayrı popülasyonda birkaç markır sistemi kullanılarak oluşturulmuştur. Bu markır tipleri, bilgi içeriği, reaksiyon başına düşen skorlanabilir polimorfik bant sayısı, otomasyon derecesi bakımından farklılık gösterir, ancak ilgilenilen özelliğin fenotipini etkilemez, çünkü bunlar yalnızca özelliği kontrol eden genin yakınında veya onunla bağlantılıdır (Collard vd. 2005). Genellikle, yöntem seçimi, ihtiyaç duyulan genetik çözünürlüğe, mevcut teknolojiye ve finansal kısıtlamalara bağlıdır. Çeşitli moleküler markırlar arasında RFLP'ler ayçiçeği de dahil olmak üzere birçok bitki türünde geliştirilmiştir (Botstein vd. 1980). RFLP'ler kodominant markırlardır ve benzersiz bir lokusu tanımlayabilir. RFLP markırları tarafından tespit edilen polimorfizm, spesifik restriksiyon enzimleri tarafından tanınmayı ve spesifik bir prob ile hibridizasyonu içerdiğinden çok güvenilirdir (Mohan vd. 1997). Bununla birlikte, RFLP analizleri zor, zaman alıcıdır ve başarıları genomun büyüklüğü ve karmaşıklığı ile ters orantılıdır (Zhang ve Wing 1997). Buna karşılık, polimeraz zincir reaksiyonuna (PCR) dayanan yeni yaklaşımlar oldukça basittir. Çoğaltılmış parça uzunluk polimorfizmi (AFLP), spesifik restriksiyon enzimleri ve oligonükleotit adaptörleri tarafından üretilen restriksiyon fragmentlerinin PCR amplifikasyonuna dayanır (Vos vd. 1995). Bu yöntem, polimorfizmlerin saptanmasını kolaylaştıran çok sayıda kesim parçası üretir. Yükseltgen DNA fragmanlarının sayısı, adaptör primer dizilerine eklenen farklı sayıda seçici nükleotid seçilerek kontrol edilebilir. Bu yaklaşım ilişkilendirme haritalamasında ve çeşitler arasındaki ayrımlarda faydalıdır. Yüksek tekrarlanabilirlik ve yüksek tanımlanabilir polimorfizm sıklığı ile karakterize edilmiştir (Lin vd. 1996). Bununla birlikte, AFLP'lerin üretilmesi hala pahalıdır çünkü bantlar gümüş boyama, floresan boya veya radyoaktivite ile tespit edilir (Mohan vd. 1997).

2.5. Popülasyonların haritalanması

Haritalama için kullanılan popülasyonun seçimi, haritalama bilgilerinin etkinliği ve erişilebilirliği üzerinde önemli sonuçlara sebep olabilir (Burr ve Burr 1991). Haritalama genellikle F2 popülasyonları, geri melez popülasyonları (BC) veya rekombinant kendilenmiş hatlar (RIL) kullanılarak yapılır.

F2 popülasyonu, F1 bireylerinin kendilenmesi ile üretilir. F1 bireyleri, ilgili özellikler bakımından farklılık gösteren iki hattın aralarında melezlenmesi ile geliştirilir. Geriye melez popülasyonları, F1-bireyleri ilk melezlemede kullanılan iki ebeveynden biriyle tekrarlı melezlemeler ile geliştirilir. F2 ve BC1-popülasyonlar, kendi döllenmiş türler için geliştirilen en basit haritalama popülasyonlarıdır. Başlıca avantajları, yapımı kolay ve ucuz olmaları ve üretilmeleri için sadece kısa bir süre gerektirmeleridir (Langar vd. 2003; Collard vd. 2005). Bununla birlikte, F2 veya BC1 popülasyonlarının kullanılmasının en büyük dezavantajları, bu popülasyonların kalıcı olmaması ve DNA veya proteini izole etmek için doku kaynaklarının zaman içinde bir noktada tükenmesidir (Ferreira vd. 2006). Sonra başka bir popülasyonda tekrar haritalamaya başlamak zorunda kalınmaktadır. RILs kullanımı bu soruna güçlü bir çözüm olabilir. Rekombinant kendilenmiş hatlar (RIL's), F2 popülasyonunun tek tek bitkilerinden tek tohum seçimleri ile geliştirilir. Tek tohumlu seleksiyonu birkaç generasyon boyunca tekrarlanır, bu da her biri orijinal ebeveynlerden benzersiz bir kromozomal segment kombinasyonu içeren bir dizi homozigot saf hatlar geliştirilir. Bu popülasyonların birkaç avantajları vardır. İlk olarak, RIL's sınırsız haritalama olanaklarına sahip sonsuz bir popülasyonun geliştirilmesine imkân verirler. Bu, homozigotluk elde edildikten sonra, rekombinant kendilenmiş saf hatlar açılım olmaksızın süresiz olarak çoğaltılabileceği anlamına gelir (Burr ve Burr 1991). İkincisi, RIL's, hastalık direnci gibi morfolojik özellikler veya gelişmekte olan bir moleküler harita üzerinde derlenebilen verim gibi nicel özellikler için tekrar tekrar değerlendirilebilir. Üçüncüsü, RIL'leri F2 veya BC1 popülasyonlarından ayıran önemli bir faktör: RIL'ler homozigotluğa ulaşmadan önce birden fazla mayoz bölünmeye maruz kalmalarıdır. Sonuç olarak, bağlantılı markırlar ve genlerin rekombinasyon olasılığı daha yüksektir (Burr ve Burr 1991).

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Analizler İçin Kullanılan Bitki Materyalleri

Bitki materyalleri ayçiçek ıslahı yapan yerli firmaların genetik havuzundan temin edilmiştir. Bitkilerin yetiştiriciliği 2021 yılı sonbahar ve 2022 yılı ilkbahar sera yetiştiriciliği dönemlerinde iki sezon yapılmıştır. Analiz için kullanılan bitki materyalleri Şekil 3.1’de gösterilmektedir.



Şekil 3.1. Analiz için kullanılan ayçiçeği bitki materyalleri

Analiz için kullanılan bitki materyallerinin pedigree listesi yapılmıştır (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. Analiz için kullanılan restorer, idameci, CMS ayçiçeği bitki materyallerinin pedigree listesi

| | | |
|-------------------|----------------|-----------------|
| 1. SSU2 | BC1F2 | BC1F2 – A grubu |
| 2. SSU7 | BC1F2 | BC1F2 – A grubu |
| 3. SB423 | R | Restorer |
| 4. SIM4 | BC1F2 | BC1F2 – A grubu |
| | | |
| Restorer | İdameci | CMS |
| 1. BTÜ 220 – A419 | 21. m652 – A41 | 41. S653 – A41 |
| 2. BTÜ 222 – A419 | 22. m653 – A41 | 42. S654 – A41 |
| 3. BTÜ 223 – A419 | 23. m654 – A41 | 43. S655 – A41 |
| 4. BTÜ 224 – A419 | 24. m655 – A41 | 44. S656 – A41 |
| 5. BTÜ 225 – A420 | 25. m656 – A41 | 45. S658 – A41 |
| 6. BTÜ 229 – A420 | 26. m658 – A41 | 46. S659 – A48 |

Çizelge 3.1'nin devamı

| | | |
|-----------------------|-----------------|-----------------|
| 7. BTÜ 230 – A420 | 27. m659 – A48 | 47. S660 – A48 |
| 8. BTÜ 232 – A420 | 28. m660 – A48 | 48. S661 – A412 |
| 9. BTÜ 233 – A420 | 29. m662 – A412 | 49. S662 – A412 |
| 10. BTÜ 235 – A420 | 30. m663 – A412 | 50. S663 – A412 |
| 11. BTÜ 236 – A420 | 31. m664 – A412 | 51. S664 – A412 |
| 12. BTÜ 237 – A420 | 32. m665 – A412 | 52. S665 – A412 |
| 13. BTÜ 238 – B420 | 33. m666 – A412 | 53. S666 – A412 |
| 14. BTÜ 239 – B420 | 34. m667 – A412 | 54. S667 – A412 |
| 15. BTÜ 240 – B420 | 35. m668 – A412 | 55. S668 – A412 |
| 16. BTÜ 241 – B421 | 36. m669 – A412 | 56. S669 – A412 |
| 17. BTÜ 243 – B421 | 37. m670 – A412 | 57. S670 – A412 |
| 18. BTÜ 244 – B421 | 38. m671 – A412 | 58. S671 – A412 |
| 19. BTÜ 245 – B421 | 39. m677 – A412 | 59. S672 – A412 |
| 20. BTÜ 246 – B421 | 40. m678 – A412 | 60. S673 – A412 |
| | | |
| 1. A20 | CMS | A410 |
| 2. A21 | M | A410 |
| 3. AC7 | CMS | A421 |
| 4. AC8 | M | A421 |
| 5. AC16 | CMS | A421 |
| 6. AC17 | M | A421 |
| 7. AC75 | CMS | A424 |
| 8. AC76 | M | A424 |
| 9. AC86 | CMS | A424 |
| 10. AC87 | M | A424 |
| 11. A431*A430 | M | A424 |
| 12. A430 | M | A424 |
| 13. AC139 | CMS | A410 |
| 14. AC140 | M | A410 |
| 15. MA5*MA6 | CMS | A410 |
| 16. MA6 | M | A410 |
| 17. BTÜ25 | R | A43 |
| 18. BTÜ42 | R | A44 |
| 19. BTÜ53 | R | A44 |
| 20. BTÜ117 | R | A410 |
| 21. BTÜ171 | R | A414 |
| 22. BTÜ118 | R | A410 |
| 23. BTÜ164 | R | A414 |
| 24. SU153 | CMS | A44 |
| 25. M3 SU154 | M | A44 |
| 26. SU157 | CMS | A44 |
| 27. SU163 | CMS | A44 |
| 28. SU154 M1 | M | A44 |
| 29. SU169 C1*SU170 M1 | CMS | A44 |
| 30. SU154 M2 | M | A44 |
| 31. SU172 M1 | M | A44 |
| 32. SU171 C1*SU172 M1 | CMS | A44 |

Çizelge 3.1'nin devamı

| | | |
|-------------------|---|---------------|
| 1. SIM1- 1. Bt | M | BC1F1-B hattı |
| 2. SIM1- 2. Bt | M | BC1F1-B hattı |
| 3. SIM1- 3. Bt | M | BC1F1-B hattı |
| 4. SIM1- 4. Bt | M | BC1F1-B hattı |
| 5. SIM1- 5. Bt | M | BC1F1-B hattı |
| 6. SIM1- 6. Bt | M | BC1F1-B hattı |
| 7. SIM1- 7. Bt | M | BC1F1-B hattı |
| 8. SIM1- 8. Bt | M | BC1F1-B hattı |
| 9. SIM1- 9. Bt | M | BC1F1-B hattı |
| 10. SIM1- 10. Bt | M | BC1F1-B hattı |
| 11. SIM1- 11. Bt | M | BC1F1-B hattı |
| 12. SIM1- 12. Bt | M | BC1F1-B hattı |
| 13. SIM1- 13. Bt | M | BC1F1-B hattı |
| 14. SIM1- 14. Bt | M | BC1F1-B hattı |
| 15. SIM1- 15. Bt | M | BC1F1-B hattı |
| 16. SIM1- 16. Bt | M | BC1F1-B hattı |
| 17. SIM1- 17. Bt | M | BC1F1-B hattı |
| 18. SIM1- 18. Bt | M | BC1F1-B hattı |
| 19. SIM1- 19. Bt | M | BC1F1-B hattı |
| 20. SIM1- 20. Bt | M | BC1F1-B hattı |
| 21. SIM1- 21. Bt | M | BC1F1-B hattı |
| 22. SIM2 - 1. Bt | M | BC1F1-B hattı |
| 23. SIM2 - 2. Bt | M | BC1F1-B hattı |
| 24. SIM2 - 3. Bt | M | BC1F1-B hattı |
| 25. SIM2 - 4. Bt | M | BC1F1-B hattı |
| 26. SIM2 - 5. Bt | M | BC1F1-B hattı |
| 27. SIM2 - 6. Bt | M | BC1F1-B hattı |
| 28. SIM2 - 7. Bt | M | BC1F1-B hattı |
| 29. SIM2 - 8. Bt | M | BC1F1-B hattı |
| 30. SIM2 - 9. Bt | M | BC1F1-B hattı |
| 31. SIM2 - 10. Bt | M | BC1F1-B hattı |
| 32. SIM2 - 11. Bt | M | BC1F1-B hattı |
| 33. SIM2 - 12. Bt | M | BC1F1-B hattı |
| 34. SIM2 - 13. Bt | M | BC1F1-B hattı |
| 35. SIM2 - 14. Bt | M | BC1F1-B hattı |
| 36. SIM2 - 15. Bt | M | BC1F1-B hattı |
| 37. SIM2 - 16. Bt | M | BC1F1-B hattı |
| 38. SIM2 - 17. Bt | M | BC1F1-B hattı |
| 39. SIM2 - 18. Bt | M | BC1F1-B hattı |
| 40. SIM2 - 19. Bt | M | BC1F1-B hattı |
| 41. SIM2 - 20. Bt | M | BC1F1-B hattı |
| 42. SIM3 - 1. Bt | M | BC1F1-B hattı |
| 43. SIM3 - 2. Bt | M | BC1F1-B hattı |
| 44. SIM3 - 3. Bt | M | BC1F1-B hattı |
| 45. SIM3 - 4. Bt | M | BC1F1-B hattı |
| 46. SIM4 - 1. Bt | M | BC1F1-B hattı |
| 47. SIM4 - 2. Bt | M | BC1F1-B hattı |
| 48. SIM4 - 3. Bt | M | BC1F1-B hattı |

Çizelge 3.1'nin devamı

| | | |
|------------------|-----|---------------|
| 49. SIM4 - 4. Bt | M | BC1F1-B hattı |
| 50. SIM4 - 5. Bt | M | BC1F1-B hattı |
| 51. SIM4 - 6. Bt | M | BC1F1-B hattı |
| 52. SIM4 - 7. Bt | M | BC1F1-B hattı |
| 53. CMS | CMS | CMS |

Yöntem olarak bu çalışmada bitki materyallerine uygun DNA izolasyon protokolü ve primerlere uygun PCR protokolü uygulanmıştır (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. Analiz için kullanılan SCAR markırları, ilgili primerler, beklenen PCR amplifikasyon ürünleri büyüklükleri ve literatürler sunulmuştur

| Markır / primer adı | Primer sekansı (5'-3') | Band büyüklüğü (bp) ve alleli (Rf/rf) | Yararlanılan kaynak |
|---------------------|---|---|---------------------|
| 67N04_F1a | TGCAAGATAGGCGACTGAGGGC TCATCTCCAATTA | 170 (Rf) | Horn vd. 2019 |
| 67N04_F2b | TGAGGGCTCATCTCCAGCTG | 155 (rf) | Horn vd. 2019 |
| 67N04_R | GGCTGCCATTAGTGAAGGAG | Ortak (Rf/rf) | |
| PPR621.5 F1 | CAGTAATCTCCACATGAACATTG | 164 (rf) | Horn vd. 2019 |
| PPR621.5 F2 | CAATAATCTCCACATGAACATTC | 164 (Rf) | Horn vd. 2019 |
| PPR621.5 Rev | CCGGATTGTGTTCCGATTAG | Ortak (164 Rf/rf) | |
| HRG02 F | AAA CGT GGG AGA GAG GTG G | 738 (Rf) | Horn vd. 2003 |
| HRG02 R | AAA CGT GGG CTG AAG AAC TA | (Restorer alleli için B-planı, atp9 ile birlikte kullanılacaktır) | |
| atp9_for | GGTGCAAAATCAATAGGGGCCG | 474 (internal kontrol) | Accession X51895 |
| atp9_rev | ACCGAATGAATGCGTCACAAGG | dominant markır ile kullanılacaktır. | |

3.2. Bitkilerin Yetiştirilmesi

2021 gz döneminde yetiştirilen maintainer ve kısır hatların DNA rnekleri, Osterras Tarım Őirketinin Antalya'nın Serik ilçesine bağlı Kocayatak lokasyonundaki deneme alanından, diğer bitki örnekleri de Akdeniz Üniversitesi Süs bitkileri seralarında "Ss Ayçiğeği Islahı" projesi kapsamında yetiştirilen popülasyonlardan 2022 ilkbahar döneminde ve 2022 ilkbahar yaz döneminde alınmıştır.

3.3. DNA İzolasyonu

Ayçiçek bitkinin en taze yapraklarından izole edilen DNA'lar moleküler analizler için kullanılmıştır. DNA izolasyonu tissue lyser cihaz yardımı ile CTAB protokolüne göre yapılmıştır. CTAB tampon zltisi; 2% CTAB, 20 mM EDTA, 100 mM TrisHCl (pH=8), 1.4 M NaCl, 0.2% β-mercaptoethanol tarifine göre hazırlanmıŐtır.

Taze ayçiçek yaprakları tüplere konulup üzerine 200 µl CTAB zltisi eklenerek ezme iŐlemi yapılmıştır. Ezilen rnekler 250 µl daha CTAB zltisi eklenerek 65°C'de 1 saat inkübasyona bırakılmıŐtır. 1 saat sonra inkübasyondan alınan örnekler 450 µl 24:1 oranındaki kloroform-izoamil alkol zltisi eklenip 20 dk santrifüjde iki fazlı solüsyon oluşması saėlanmıŐtır. Oluşan iki fazlı zltinin üst fazında DNA olduğu kabul edilip pipet ile yeni tüplere aktarılmıştır (yaklaşık 300 µl). Aktarılan fazın üzerine 300 µl izopropanol zltisi eklenip 1 gece -20°C'deki buzdolabında bekletilmıŐtır. Ertesi gün -20°C'ten çıkarılan örnekler santrifüj edilip tüplerin tabanında pellet oluşumu saėlanmıŐtır. Oluşan pelletlerdeki zlti dikkatlice dökülüp yerine 300 µl etanol ekleyerek tekrar santrifüj yapılmıştır. Bu iŐlemi iki kez yaptıktan sonra tüplerdeki pelletin düŐmemesine dikkat edilerek içerisindeki zlti döküldükten sonra 1 saat kurumaya bırakılmıŐtır. Kuruyan tüplere 100 µl distile su eklenerek stok DNA zltisi elde edilmiŐtır.

3.4. Markır Analizleri

3.4.1. SCAR markır analizleri

Rf1/rf1 restorer geni için, 67NO4 bir kodominant SCAR markırıdır.  primerden birisi her iki allele Rf/rf ortak, birisi Rf alleleline diğeride rf alleleline spesifiktir. l primer seti sadece 170 bp uzunluğunda bir band oluşturur ise RfRf homozigot restorer, sadece 155 bp uzunluğunda band oluşturur ise rfrf homozigot idameci (maintainer) ve her iki bandı oluşturur ise de Rfrf heterozigot olduğunu göstermektedir.

Yine Rf1 için geliştirilen ve Rf1 için aday gen olarak gösterilen bir genden dizayn edilen iki farklı dominant markır; PPR621.5_F1/PPR621.5_Rev primer kombinasyonu sadece rf (idameci) alleleline özgü 164 bp uzunluğunda bir band oluştururken, PPR621.5_F2/PPR621.5_Rev primer kombinasyonu sadece Rf (restorer) alleleline özgü 164 bp uzunluğunda bir bant oluşturmaktadır.

HRG02 dominant SCAR markırıda Horn vd. (2002) yılında Rfl restorer alleleline spesifik olarak geliştirilmiştir. B-planı olarak bu dominant SCAR markırısı atp9 markırısı ile birlikte kullanılacak ve band yokluğunda rrf mi yoksa PCR reaksiyonundaki bir hatadan dolayı mı beklenen 738 bp uzunluğundaki markır bandının görülmediği anlaşılır.

SCAR primerlerinin testlenmesinde PCR bileşenleri Çizelge 3.3'te ve SCAR (67NO4) primerlerinin PCR döngüsü Çizelge 3.4'te, SCAR (PPR621.5) primerlerinin PCR döngüsü Çizelge 3.5'te, SCAR (HRG02) primerlerinin ise Çizelge 3.6'da sunulan şekilde kullanılmıştır.

Çizelge 3.3. SCAR analizlerinde kullanılan PCR bileşenleri

| Bileşenler | Miktar |
|---|--------------|
| DNA | 2 µL |
| 10x Taq amonium Buffer ((NH ₄) ₂ SO ₄) | 1.5 µL |
| 25 mM MgCl ₂ | 1.5 µL |
| 5 mM dNTPs | 1.5 µL |
| 2,4 U/µL Taq DNA polymerase enzimi | 0.2 µL |
| 10 mM 67NO4 Primeri (Forward) | 1.8 µL |
| 10 mM 67NO4 Primeri (Reverse) | 1.8 µL |
| ddH ₂ O | 4.7 µL |
| TOPLAM | 15 µL |

Çizelge 3.4. SCAR (67NO4 primer) analizlerinde kullanılan PCR döngüsü

| Sıcaklık | Süre | Döngü sayısı |
|----------|-------|--------------|
| 94.0°C | 3 dk | 1 |
| 94.0°C | 1 dk | 40 |
| 65°C | 1 dk | 40 |
| 72°C | 30 sn | 40 |
| 72°C | 7 dk | 1 |
| 4°C | ∞ | 1 |

Çizelge 3.5. SCAR (PPR621.5 primer) analizlerinde kullanılan PCR döngüsü

| Sıcaklık | Süre | Döngü sayısı |
|----------|-------|--------------|
| 94.0°C | 2 dk | 1 |
| 94.0°C | 30 sn | 30 |
| 62°C | 30 sn | 30 |
| 72°C | 1 dk | 30 |
| 72°C | 4 dk | 1 |
| 4°C | ∞ | 1 |

Çizelge 3.6. SCAR (HRG02 primer) analizlerinde kullanılan PCR döngüsü

| Sıcaklık | Süre | Döngü sayısı |
|----------|-------|--------------|
| 94.0°C | 10 dk | 1 |
| 94.0°C | 45 sn | 35 |
| 65°C | 45 sn | 35 |
| 72°C | 1 dk | 35 |
| 72°C | 6 dk | 1 |
| 4°C | ∞ | 1 |

3.5. Jel Elektroforezi

PCR reaksiyonlarında üretilen SCAR primerlerinin PCR ürünlerinin UV altında görüntüleneilmesi %3'lük jel (400 ml TBE tampon çözeltisi, 12 g agaroz, 6 µL etidyum bromid), %2'lik (400 ml TBE tampon çözeltisi, 8 g agaroz, 6 µL etidyum bromid) ve %1.5'lik agaroz jel kullanılmıştır. Jelin hazırlanmasında kullanılan TBE tampon çözeltilerin hazırlanması:

- **1X TBE tamponu:**

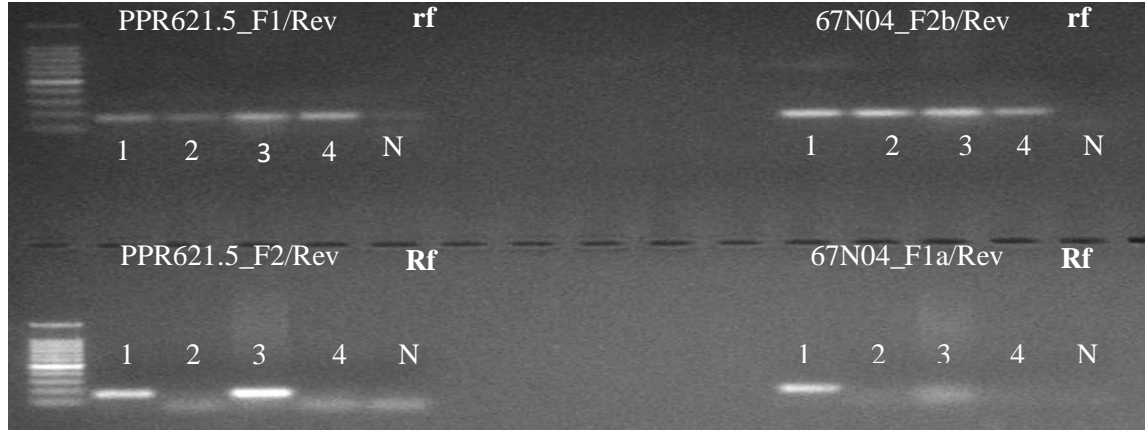
108 g tris, 55 g borik asit ve 7.5 g EDTA 1000 ml saf su içinde çözündürülmüş ve 10X'lik stok çözelti oluşturulmuştur. Daha sonra bu 10X'lik çözelti 9 L saf su ile karıştırılarak 1X'lik seyreltilmiş çözelti hali ile kullanılmıştır.

PCR ürünlerinin üzerine 5 µL yükleme bufferı (15 ml gliserol, 35 ml saf su, 0.05 g bromofenol blue) eklenerek jele yüklemesi yapılmıştır. Ürünler 110 V elektrik akımı ile yaklaşık 2 saat 1X'lik TBE tampon çözeltisinin içerisinde koşturulmuştur. Her jel yüklemesinde ilk kuyucuklara 3µL 100 bp'lik DNA Ladder (Thermo, GeneRuler) yüklenmiştir. Jel görüntülemesi Minilumi, DNR Bio-İmaging Systems markalı cihazda yapılmıştır.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. Moleküler çalışmalar

SCAR markır analizi için 4 tane ayçiçek örneklerine 5 farklı primerin taraması yapılmıştır. PCR sonuçları %3'lük agaroz jelde görüntülenmiştir (Şekil 4.1, 4.2).



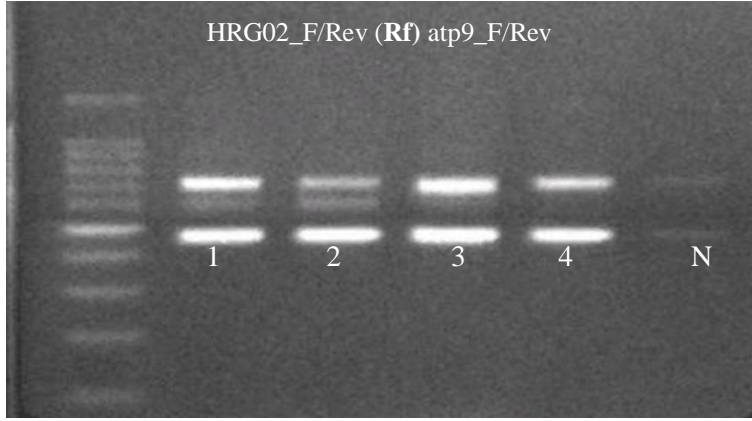
Şekil 4.1. SCAR – **PPR621.5_F1/Rev** (164 bp (rf)) ve **PPR621.5_F2/Rev** (164 bp (Rf)) ve **67N04_F2b/Rev** (155 bp (rf)) ve **67N04_F1a/Rev** (170 bp (Rf)) markır primeri taramasının görüntüleri, 1. SSU2 – BC1F2 – A hat fertil heterozigot, 2. SSU7 – BC1F2 – A hat kısır, 3. SB423 – R, 4. SIM4 – BC1F2 – A hat kısır Restorer heterozigot

Çizelge 4.1. SCAR markır analizinde kullanılan genotipler

| Restorer | 67N04_F1a/Rev (170 bp (Rf)) | 67N04_F2b/Rev (155 bp (rf)) | PPR621.5_F1/Rev (164 bp (rf)) | PPR621.5_F2/Rev (164 bp (Rf)) | HRG02_F/R (738 bp (Rf)) ve atp9 (474 bp) |
|--|-----------------------------|-----------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--|
| 1. SSU2 – BC1F2 – A hat fertil heterozigot | R | r | r | R | RR |
| 2. SSU7 – BC1F2 – A hat kısır | | r | r | | RR |
| 3. SB423 – R Restorer heterozigot | R | r | r | R | RR |
| 4. SIM4 – BC1F2 – A hat kısır | | r | r | | RR |

Elde edilen görüntülerde Rf1 için geliştirilen dominant markır PPR621.5_F2/Rev primer kombinasyonu 1. ve 3. örneklerinde 164 bp uzunluğunda bant oluşturulmuştur, ve beklendiği gibi Rf allelinin varlığına işaret etmektedir. PPR621.5_F1/Rev primer kombinasyonu bütün örneklerde rf allele özgü 164 bp uzunluğunda band oluşturulmuştur, ve kısır (rfrf) veya heterozigot Rfrf genotiplerini doğrulamaktadır.

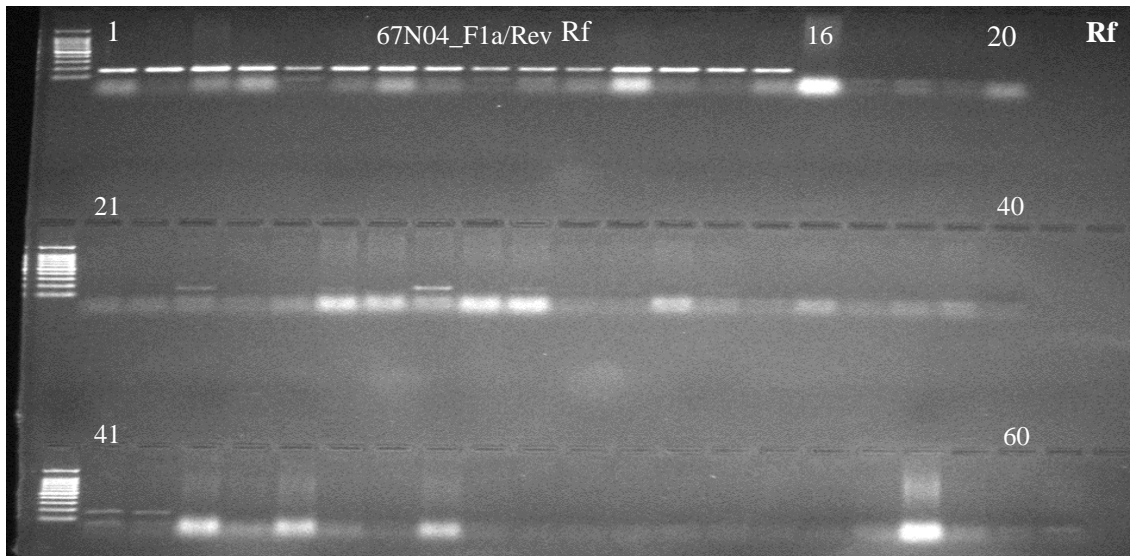
Dominant 67N04_F2b/Rev primer ile 155 bp uzunluğunda band oluşturup rf alleli, 67N04_F1a/Rev primeri Rf alleleine spesifik 170 bp uzunluğunda sadece 1. ve 3. örnekte band oluşması her iki markır sonucuna bakılarak heterozigot (1. ve 3. örnekler) olduğunu göstermiştir.



Şekil 4.2. HRG02_F/R (738 bp (Rf)) ve atp9 (474 bp) birlikte yapılan primerleri ile üretilen PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü

HRG02 dominant Rf alleleine spesifik atp9 primeri ile birlikte 738 bp uzunluğunda band elde edilmiştir. Ancak 2. ve 4. örneklerde beklemediğimiz Rf bandı elde edilerek hatalı sonuç göstermiştir. HRG02_F/R (738 bp (Rf)) ve atp9 (474 bp) primerleri ile yapılan analizde kullanılan genotipler Çizelge 4.1’de gösterilmiştir.

SCAR markır analizi için 67N04_F1a/Rev ve 67N04_F2b/Rev primerleri ile 20 restorer, 20 idameci, 20 CMS primer taraması yapılmıştır (Şekil 4.3, 4.4). SCAR markırları analizinde kullanılan genotipler ve dominant markır sonuçlarına it genotipler Çizelge 4.2’de gösterilmiştir.



Şekil 4.3. 1-20 restorer, 21-40 idameci, 41-60 CMS bitki örnekleri ile yapılan **67N04_F1a/Rev** (170 bp (Rf)) primeri ile üretilen PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü

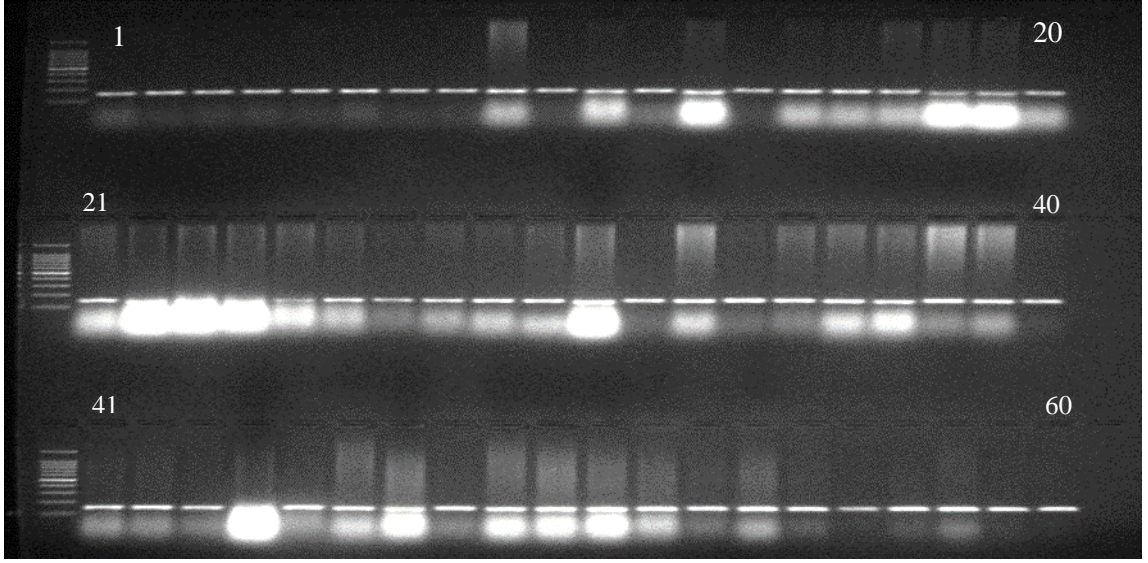
Çizelge 4.2. Dominant SCAR markırları analizinde kullanılan genotipler ve dominant markır sonuçlarına ait genotipler

| Restorer | 67N04_F1 a/Rev (170 bp (Rf)) | 67N04_F2 b/Rev (155 bp (rf)) | PPR621.5_F 1/Rev (164 bp (rf)) | PPR621.5_ F2/Rev (164 bp (Rf)) | HRG02_F/R (738 bp (Rf)) ve atp9 (474 bp) |
|-----------------|------------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|---|---|
| 1. BTÜ 220 – R | R | r | | R | R |
| 2. BTÜ 222 – R | R | r | | R | R |
| 3. BTÜ 223 – R | R | r | | R | R |
| 4. BTÜ 224 – R | R | r | | R | R |
| 5. BTÜ 225 – R | R | r | | R | R |
| 6. BTÜ 229 – R | R | r | | R | R |
| 7. BTÜ 230 – R | R | r | | R | R |
| 8. BTÜ 232 – R | R | r | | R | R |
| 9. BTÜ 233 – R | R | r | | R | R |
| 10. BTÜ 235 – R | R | r | | R | R |
| 11. BTÜ 236 – R | R | r | | R | R |
| 12. BTÜ 237 – R | R | r | | R | R |
| 13. BTÜ 238 – R | R | r | | R | R |
| 14. BTÜ 239 – R | R | r | | R | R |
| 15. BTÜ 240 – R | R | r | | R | R |
| 16. BTÜ 241 – R | | r | r | | |
| 17. BTÜ 243 – R | | r | r | | |
| 18. BTÜ 244 – R | | r | r | | |
| 19. BTÜ 245 – R | | r | r | | |
| 20. BTÜ 246 – R | | r | r | | |
| İdameci | | | | | |
| 21. m652 – M | | r | r | | R |
| 22. m653 – M | | r | r | | |
| 23. m654 – M | R | r | r | | R |
| 24. m655 – M | | r | r | | R |
| 25. m656 – M | | r | r | | |
| 26. m658 – M | | r | r | | |
| 27. m659 – M | | r | r | | R |
| 28. m660 – M | R | r | r | | |
| 29. m662 – M | | r | r | | R |
| 30. m663 – M | | r | r | | |
| 31. m664 – M | | r | r | | |
| 32. m665 – M | | r | r | | R |
| 33. m666 – M | | r | r | | R |
| 34. m667 – M | | r | r | | R |
| 35. m668 – M | | r | r | | |
| 36. m669 – M | | r | r | | R |
| 37. m670 – M | | r | r | | R |

Çizelge 4.2'nin devamı

| CMS | 67N04_F1a /Rev (170 bp (Rf)) | 67N04_F2b/ Rev (155 bp (rf)) | PPR621.5_F1 /Rev (164 bp (rf)) | PPR621.5_ F2/Rev (164 bp (Rf)) | HRG02_F/R (738 bp (Rf)) ve atp9 (474 bp) |
|----------------|------------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--|
| 38. m671 – M | | r | r | | R |
| 39. m677 – M | | r | r | | R |
| 40. m678 – M | | r | r | | R |
| 41. S653 – CMS | R | r | r | | R |
| 42. S654 – CMS | R | r | r | | R |
| 43. S655 – CMS | | r | r | | R |
| 44. S656 – CMS | | r | r | | |
| 45. S658 – CMS | | r | r | | |
| 46. S659 – CMS | | r | r | | R |
| 47. S660 – CMS | | r | r | | |
| 48. S661 – CMS | | r | r | | R |
| 49. S662 – CMS | | r | r | | R |
| 50. S663 – CMS | | r | r | | R |
| 51. S664 – CMS | | r | r | | R |
| 52. S665 – CMS | | r | r | | R |
| 53. S666 – CMS | | r | r | | R |
| 54. S667 – CMS | | r | r | | R |
| 55. S668 – CMS | | r | r | | R |
| 56. S669 – CMS | | r | r | | R |
| 57. S670 – CMS | | r | r | | R |
| 58. S671 – CMS | | r | r | | R |
| 59. S672 – CMS | | r | r | | R |
| 60. S673 – CMS | | r | r | | |

Rf1 alleleline sahip 67N04_F1a/Rev primeri ile 20 tane restorer bitki örneklerinin 15 tanesinde 170 bp uzunluğunda Rf homozigot restorer band oluşturmuştur. Fakat Rf alleli spesifik bu markırım 21-40 idameci, ve 41-60 CMS bitki örneklerinde band göstermesi beklenmemektedir. Son iki grupta henüz saflaşmamış ve Rf alleli taşıyan ikişer bitki tespit edilmiştir.

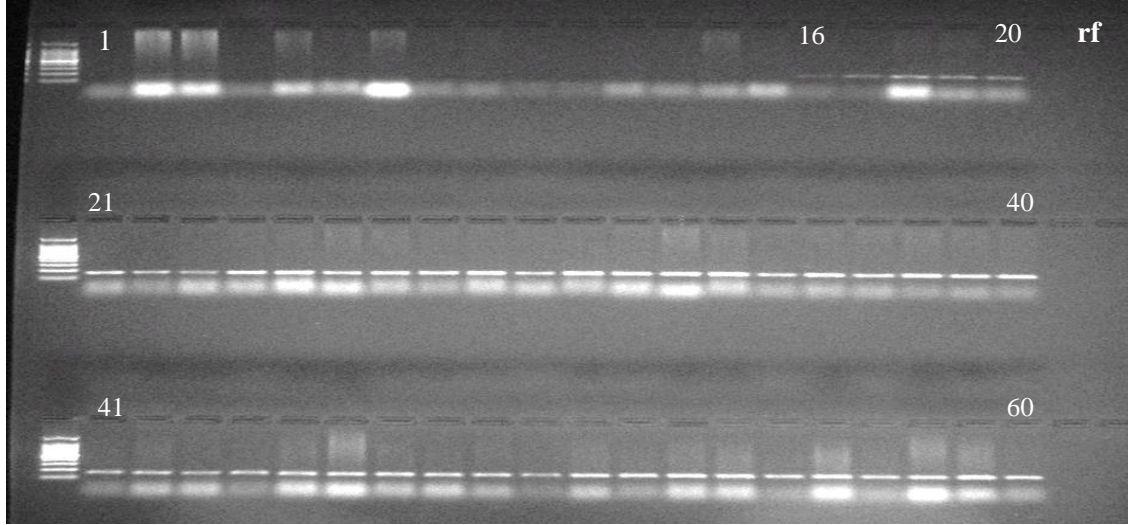


Şekil 4.4. 67N04_F2b/Rev (155 bp (rf)) primerleri ile elde edilen 1-20 restorer, 21-40 idameci, 41-60 CMS bitki örneklerinin PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz %3'lük jel elektroforezi görüntüsü

67N04_F2b/Rev (155 bp (rf)) primerleri ile yapılan analizde kullanılan genotipler Çizelge 4.2'de gösterilmiştir.

Restorer 1-15 bitki örneklerinde Şekil 4.3'te Rf homozigot restorer, Şekil 4.4'te 16-20 bitki örneklerinde rf homozigot idameci ve beklemediğimiz 1-15 bitki örneklerinde rf bandı oluşturarak hatalı sonuç gösterilmiştir ve kalan 15-20 idameci 20-40 ve CMS 40-60 bitki örnekleri sadece 155 bp uzunluğunda band elde edilip rf homozigot idameci olduğunu gösterilmiştir. Bu yüzden bu primer bizim yaptığımız analizde hatalı sonuç göstererek her popülasyonda çalışmayabilmektedir.

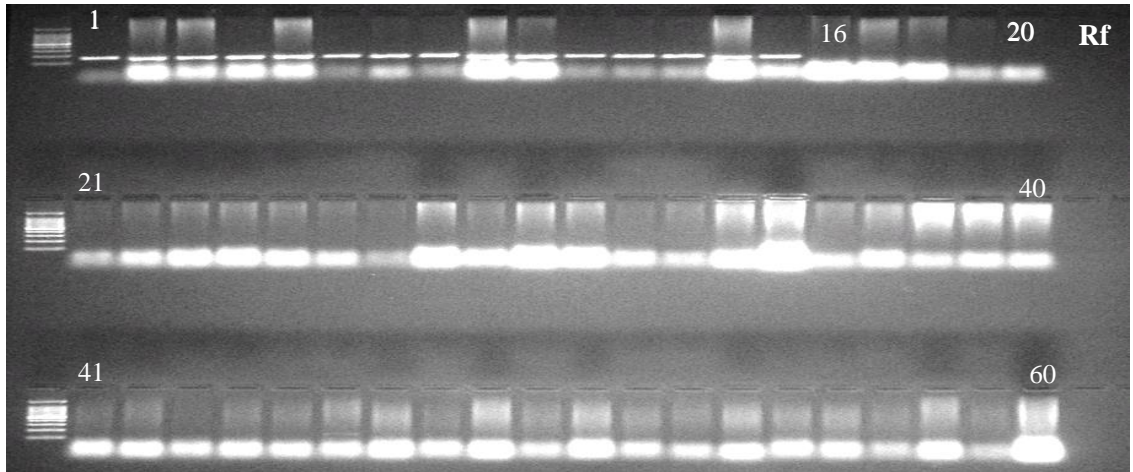
SCAR markır PPR621.5_F1/Rev ve PPR621.5_F2/Rev primerleri ile 1-20 restorer, 21-40 idameci, 40-60 CMS bitki örneklerine primer taraması yapılmıştır (Şekil 4.5, 4.6).



Şekil 4.5. 1-20 restorer, 21-40 idameci, 41-60 CMS bitki örnekleri ile **PPR621.5_F1/Rev** (164 bp (rf)) primerleri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin %3'lük agaroz jel elektroforezindeki görüntüleri

PPR621.5_F1/Rev primerleri ile yapılan analizde kullanılan genotipler Çizelge 4.2'de gösterilmiştir.

Dominant markır PPR621.5_F1/Rev primer kombinasyonu 16-20 restorer, 21-40 idameci ve 41-60 CMS bitki örneklerinde rf alleleine özgü 164 bp uzunluğunda band elde edilmiştir.

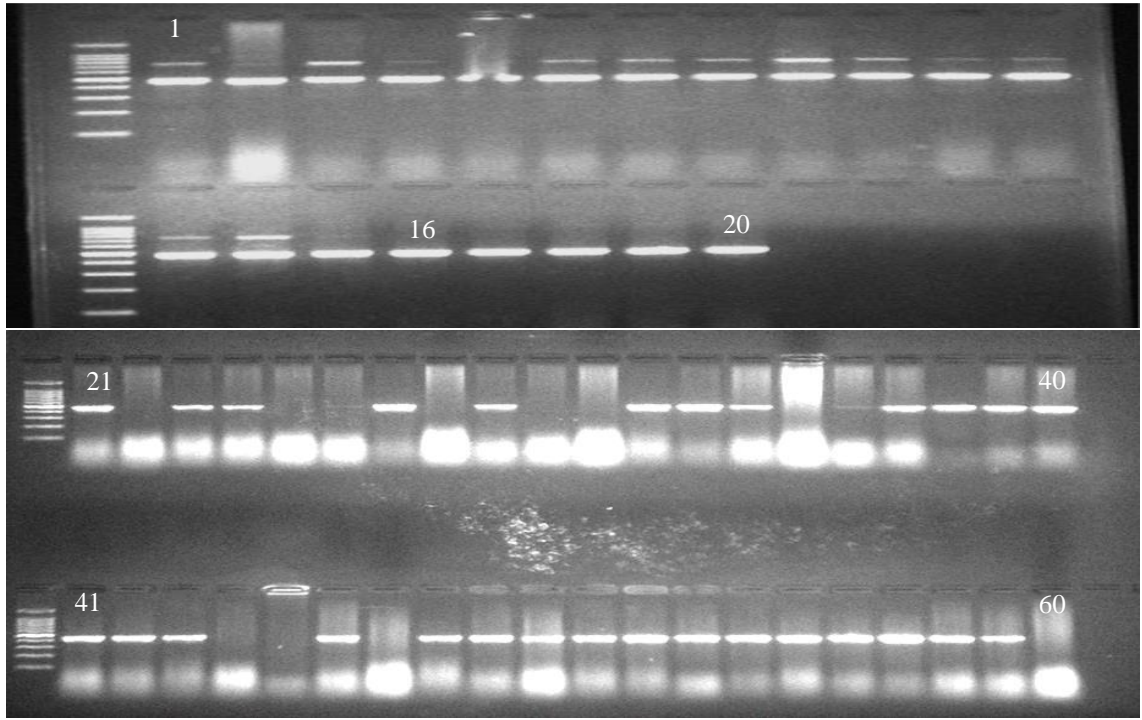


Şekil 4.6. 1-20 restorer, 21-40 idameci, 41-60 CMS bitki örnekleri ile **PPR621.5_F2/Rev** (164 bp (Rf)) primerleri ile yapılan PCR amplifikasyonu ürünlerinin %3'lük agaroz jel elektroforezindeki görüntüleri

PPR621.5_F2/Rev primerleri ile yapılan analizde kullanılan genotipler Çizelge 4.2'de gösterilmiştir.

Dominant markır Rf1 için geliştirilen PPR621.5_F2/Rev primeri ile elde edilen görüntüde 1-15 restorer örnekleri 164 bp uzunluğunda Rf alleleine özgü band oluşturmuştur. 21-40 idameci ve 41-60 CMS bitki örneklerinde ise beklendiği gibi band elde edilmemiştir. PPR621.5_F1/Rev ve PPR621.5_F2/Rev primerleri ile yaptığımız analizde beklemediğimiz sonuçları alarak bu primerlerin Rf allelini güvenli tespit edebildiği görülmüştür.

SCAR markır HRG02_F/R primeri atp9 primeri ile restorer, idameci, CMS bitki örneklerine primer taraması yapılmıştır (Şekil 4.7).

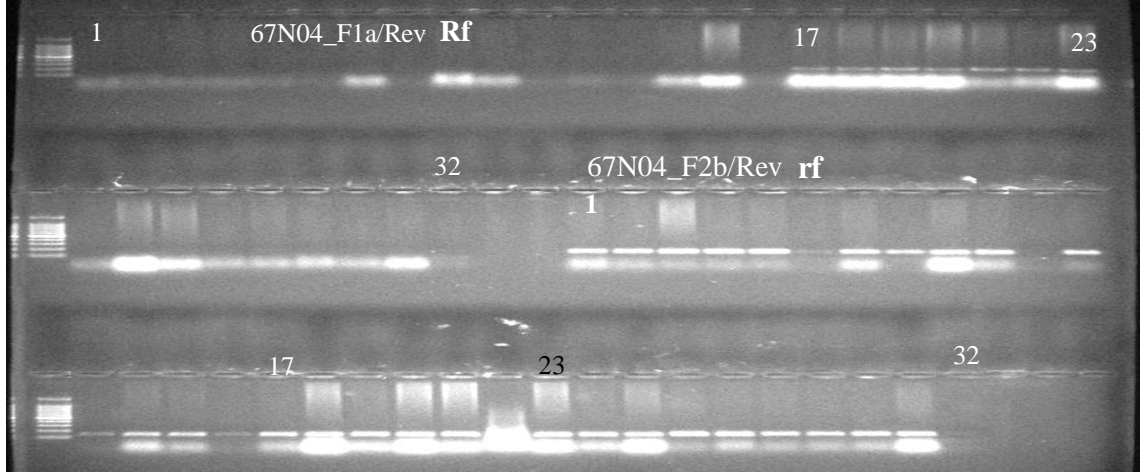


Şekil 4.7. HRG02_F/R (738 bp (Rf)) ve atp9 (474 bp) primerleri kombinasyonu ile 1-20 restorer, 21-40 idameci, 41-60 CMS bitki örnekleri PCR amplifikasyon ürünlerinin %2'lik ve %1,5'lik agaroz jel elektroforezindeki görüntüleri

HRG02_F/R primeri atp9 primerleri ile analizde kullanılan genotipler Çizelge 4.2'de gösterilmiştir.

HRG02 dominant markır Rf1 restorer alleleine spesifik olarak PCR görüntüde 1-15 restorer bitki örneklerinde beklenen 738 bp uzunluğunda markır bandı elde edilmiştir.

32 farklı ayçiçeği bitki örneklerine 67N04_F1a/Rev ve 67N04_F2b/Rev primerleri ile PCR taraması yapılmıştır (Şekil 4.8). SCAR markır 67N04_F1a/Rev ve 67N04_F2b/Rev primerleri ile analizinde kullanılan 32 farklı ayçiçeği bitki genotipleri Çizelge 4.3'te gösterilmiştir.



Şekil 4.8. 67N04_F1a/Rev (170 bp (Rf)) ve 67N04_F2b/Rev (155 bp (rf)) primerleri ile 32 farklı ayçiçeği örneği ile yapılan PCR amplifikasyon ürünlerinin %3'lük agaroz jel elektroforezindeki görüntüleri

Çizelge 4.3. SCAR markır 67N04_F1a/Rev ve 67N04_F2b/Rev primerleri ile analizinde kullanılan 32 farklı ayçiçeği bitki genotipleri

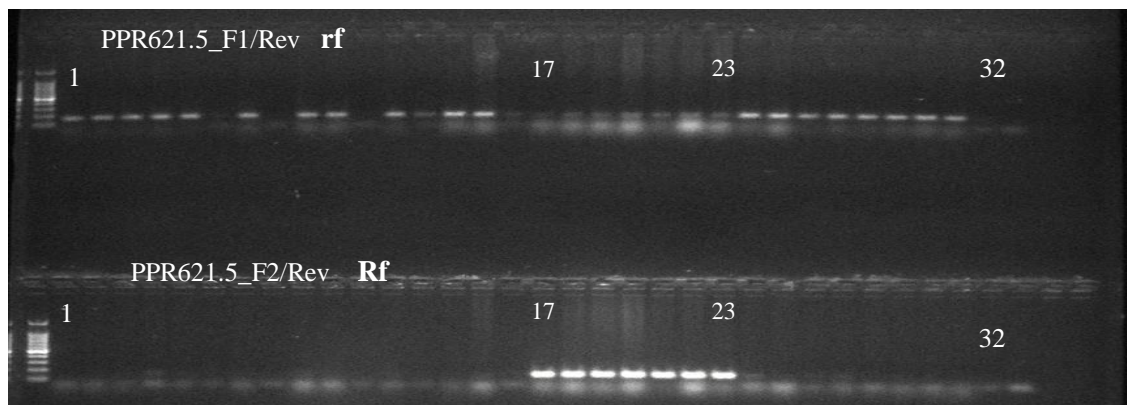
| | 67N04_F1 a/Rev (170 bp (Rf)) | 67N04_F 2b/Rev (155 bp (rf)) | PPR621.5_F 1/Rev (164 bp (rf)) | PPR621.5_ F2/Rev (164 bp (Rf)) | HRG02 F/R (738 bp (Rf)) ve atp9 (474 bp) |
|----------------------|------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|---|---|
| 1. A20 – CMS | | r | r | | |
| 2. A21 – M | | r | r | | |
| 3. AC7 – CMS | | r | r | | |
| 4. AC8 – M | | r | r | | |
| 5. AC16 – CMS | | r | r | | |
| 6. AC17 – M | | r | r | | |
| 7. AC75 – CMS | | r | r | | |
| 8. AC76 – M | | r | r | | |
| 9. AC86 – CMS | | r | r | | |
| 10. AC87 – M | | r | r | | |
| 11. A431*A430 – M | | r | r | | |
| 12. A430 – M | | r | r | | |
| 13. AC139 - CMS | | r | r | | |
| 14. AC140 - M | | r | r | | |
| 15. MA5*MA6 – CMS | | r | r | | |
| 16. MA6 - M | | r | r | | |
| 17. BTÜ25 - R | R | r | r | R | R |
| 18. BTÜ42 - R | R | r | r | R | R |
| 19. BTÜ53 - R | R | r | r | R | R |
| 20. BTÜ117 - R | R | r | r | R | R |

Çizelge 4.3'ün devamı

| | 67N04_F1 a/Rev (170 bp (Rf)) | 67N04_F 2b/Rev (155 bp (rf)) | PPR621.5_F 1/Rev (164 bp (rf)) | PPR621.5_ F2/Rev (164 bp (Rf)) | HRG02 F/R (738 bp (Rf)) ve atp9 (474 bp) |
|-----------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|---|---|
| 21. BTÜ171 - R | R | r | r | R | R |
| 22. BTÜ118 - R | R | r | r | R | R |
| 23. BTÜ164 - R | R | r | r | R | R |
| 24. SU153 - CMS | | r | r | | |
| 25. M3 SU154 - M | | r | r | | |
| 26. SU157 - CMS | | r | r | | |
| 27. SU163 - CMS | | r | r | | |
| 28. SU154 M1 - M | | r | r | | |
| 29. SU169 C1*SU170 M1- CMS | | r | r | | |
| 30. SU154 M2 - M | | r | r | | |
| 31. SU172 M1 - M | | r | r | | |
| 32. SU171 C1*SU172 M1 – CMS | | r | r | | |

Rf1 (Rf/rf) restorer geni için geliştirilen kodominant 67N04_F1a/Rev primer ile 32 tane bitki örneklerinin sonuçta 17-23 bitki örneklerinde 170 bp uzunluğunda Rf homozigot restorer band elde edilmiştir. 67N04_F2b/Rev primeri ile 17-23 bitki örneklerinde beklemediğimiz bandı oluşturarak hatalı sonuç göstermiştir.

PPR621.5_F1/Rev ve PPR621.5_F2/Rev primerleri ile 32 tane bitki örneklerine primer taraması yapılmıştır (Şekil 4.9).

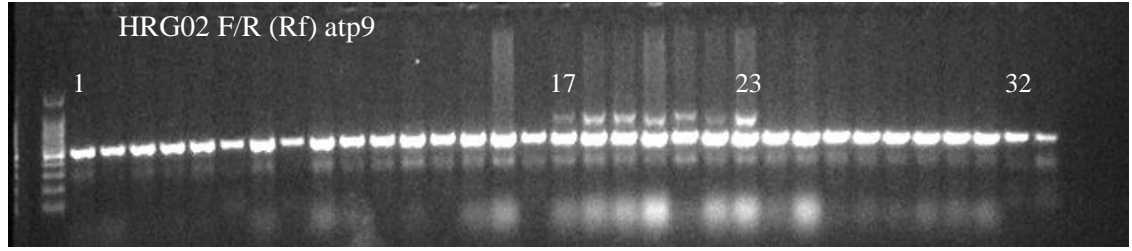


Şekil 4.9. 31 farklı ayçiçeği örneklerine **PPR621.5_F1/Rev** (164 bp (rf)) ve **PPR621.5_F2/Rev** (164 bp (Rf)) primerleri ile elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin %1.5'lük agaroz jel elektroforezindeki görüntüleri

PPR621.5_F1/Rev ve PPR621.5_F2/Rev primerleri ile elde edilen analizde kullanılan 32 farklı ayçiçeği bitki genotipleri Çizelge 4.3’de gösterilmiştir.

PPR621.5_F1/Rev primer kombinasyonu sadece rf allele 17-23 arasında bitkiler zayıf band elde edilmemiştir. Eğer PCR sıcaklığını arttırdığımız zaman band elde edilmeyebilir. PPR621.5_F2/Rev primer kombinasyonu ile 17-23 bitkilerde Rf1 (restorer) allele özgü 164 bp uzunluğunda beklediğimiz band oluşturulmuştur.

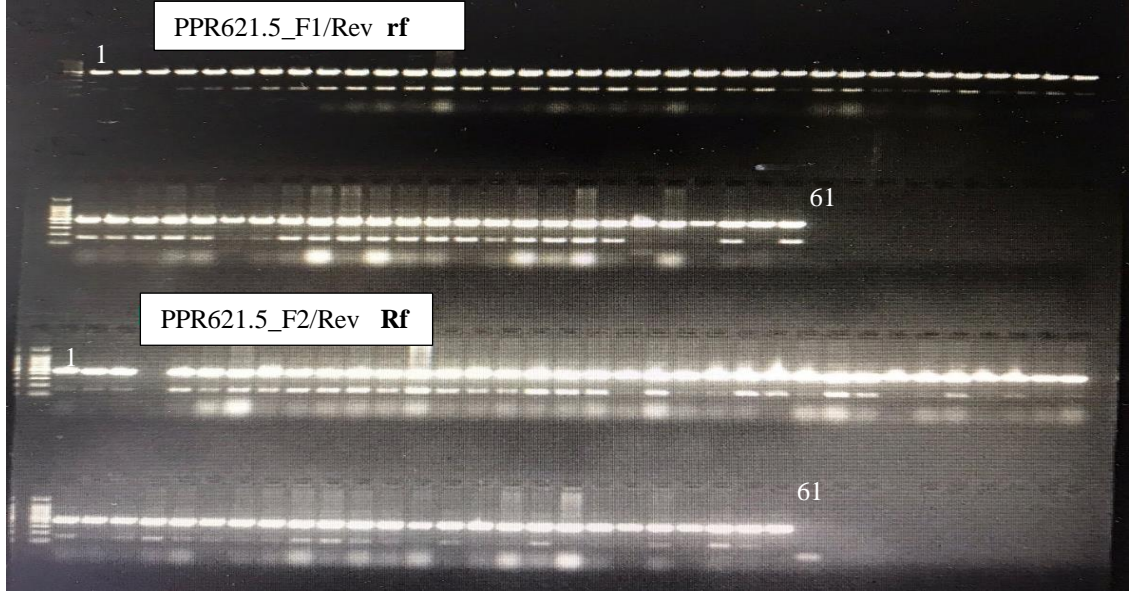
Bant elde edilen HRG02/atp9 primeri ile 32 genotipin markır taramasına ilişkin görüntüler Şekil 4.10’daki gibidir.



Şekil 4.10. HRG02 F/R (738 bp (Rf)) ve atp9 (474 bp) primerleri ile 32 farklı ayçiçeği örneğinden elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin %1.5’lik agaroz jel elektroforezindeki görüntüleri

HRG02 F/R ve atp9 primerleri ile elde edilen analizde kullanılan 32 farklı ayçiçeği bitki genotipleri Çizelge 4.3’te gösterilmiştir. HRG02 dominant Rf1 restorer alleleline spesifik markırı ile 17-23 bitki örneklerinde band elde edilmiştir.

Her popülasyonda çalışabilen PPR621.5_F1/Rev ve PPR621.5_F2/Rev primer ile SIM1, SIM2, SIM3, SIM4 bitki kodlarının 52 bitki örneklerine ve CMS bitki örneği ve kontrol edici bitki örneklerine primer taraması yapılmıştır (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. PPR621.5_F1/Rev (164 bp (rf)) ve PPR621.5_F2/Rev (164 bp (Rf)) primer ile 61 farklı ayçiçeği örneğinden elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin %1.5'lik agaroz jel elektroforezindeki görüntüleri

Çizelge 4.4. SCAR markır PPR621.5_F1/Rev (164 bp (rf)) ve PPR621.5_F2/Rev (164 bp (Rf)) primerleri ile analizinde kullanılan 61 ayçiçeği bitki genotipleri

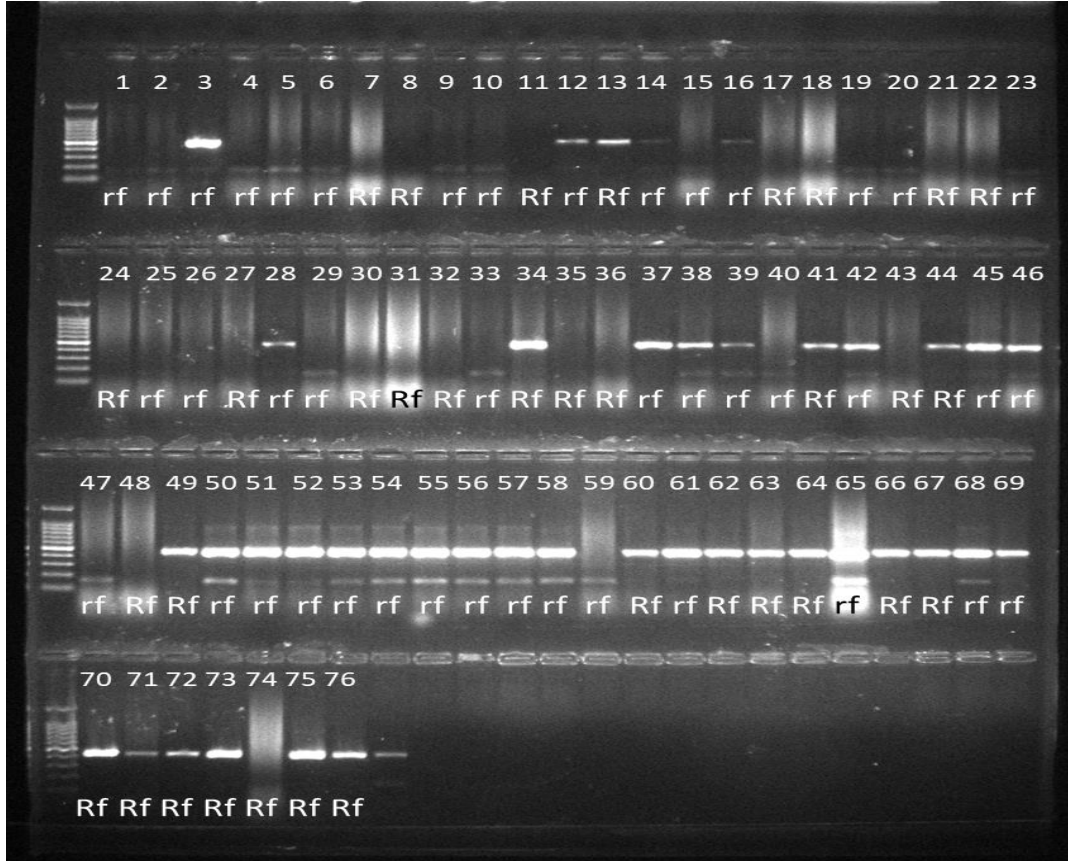
| | PPR621.5_F1/Rev (164 bp (rf)) | PPR621.5_F2/Rev (164bp (Rf)) |
|----------------------|-------------------------------|------------------------------|
| 1. SIM1- 1. Bt – M | r | R |
| 2. SIM1- 2. Bt – M | r | R |
| 3. SIM1- 3. Bt – M | | R |
| 4. SIM1- 4. Bt – M | r | |
| 5. SIM1- 5. Bt – M | r | R |
| 6. SIM1- 6. Bt – M | r | R |
| 7. SIM1- 7. Bt – M | r | R |
| 8. SIM1- 8. Bt – M | r | R |
| 9. SIM1- 9. Bt – M | r | R |
| 10. SIM1- 10. Bt – M | r | R |
| 11. SIM1- 11. Bt - M | r | R |
| 12. SIM1- 12. Bt – M | r | R |
| 13. SIM1- 13. Bt – M | r | R |
| 14. SIM1- 14. Bt - M | r | R |
| 15. SIM1- 15. Bt – M | r | R |
| 16. SIM1- 16. Bt – M | r | R |
| 17. SIM1- 17. Bt – M | r | R |
| 18. SIM1- 18. Bt – M | r | R |
| 19. SIM1- 19. Bt – M | r | R |
| 20. SIM1- 20. Bt – M | r | R |
| 21. SIM1- 21. Bt – M | r | R |
| 22. SIM2 - 1. Bt - M | r | R |
| 23. SIM2 - 2. Bt - M | r | R |

Çizelge 4.4'in devamı

| | | |
|-----------------------|---|---|
| 24. SIM2 - 3. Bt – M | r | R |
| 25. SIM2 - 4. Bt – M | r | R |
| 26. SIM2 - 5. Bt – M | r | R |
| 27. SIM2 - 6. Bt -M | r | R |
| 28. SIM2 - 7. Bt – M | r | R |
| 29. SIM2 - 8. Bt – M | r | |
| 30. SIM2 - 9. Bt - M | r | R |
| 31. SIM2 - 10. Bt – M | r | R |
| 32. SIM2 - 11. Bt -M | r | |
| 33. SIM2 - 12. Bt – M | r | R |
| 34. SIM2 - 13. Bt – M | r | |
| 35. SIM2 - 14. Bt - M | r | R |
| 36. SIM2 - 15. Bt – M | r | R |
| 37. SIM2 - 16. Bt – M | r | R |
| 38. SIM2 - 17. Bt – M | r | R |
| 39. SIM2 - 18. Bt – M | r | R |
| 40. SIM2 - 19. Bt – M | r | R |
| 41. SIM2 - 20. Bt – M | r | R |
| 42. SIM3 - 1. Bt – M | r | R |
| 43. SIM3 - 2. Bt – M | r | R |
| 44. SIM3 - 3. Bt – M | r | R |
| 45. SIM3 - 4. Bt – M | r | R |
| 46. SIM4 - 1. Bt – M | r | R |
| 47. SIM4 - 2. Bt – M | r | R |
| 48. SIM4 - 3. Bt - M | r | |
| 49. SIM4 - 4. Bt – M | r | R |
| 50. SIM4 - 5. Bt – M | r | |
| 51. SIM4 - 6. Bt – M | r | |
| 52. SIM4 - 7. Bt - M | r | R |
| 53. CMS | r | |
| 54. CMS | r | |
| 55. CMS | | |
| 56. CMS | | R |
| 57. CMS | | |
| 58. CMS | r | R |
| 59. CMS | | R |
| 60. CMS | r | |
| 61. CMS | | |

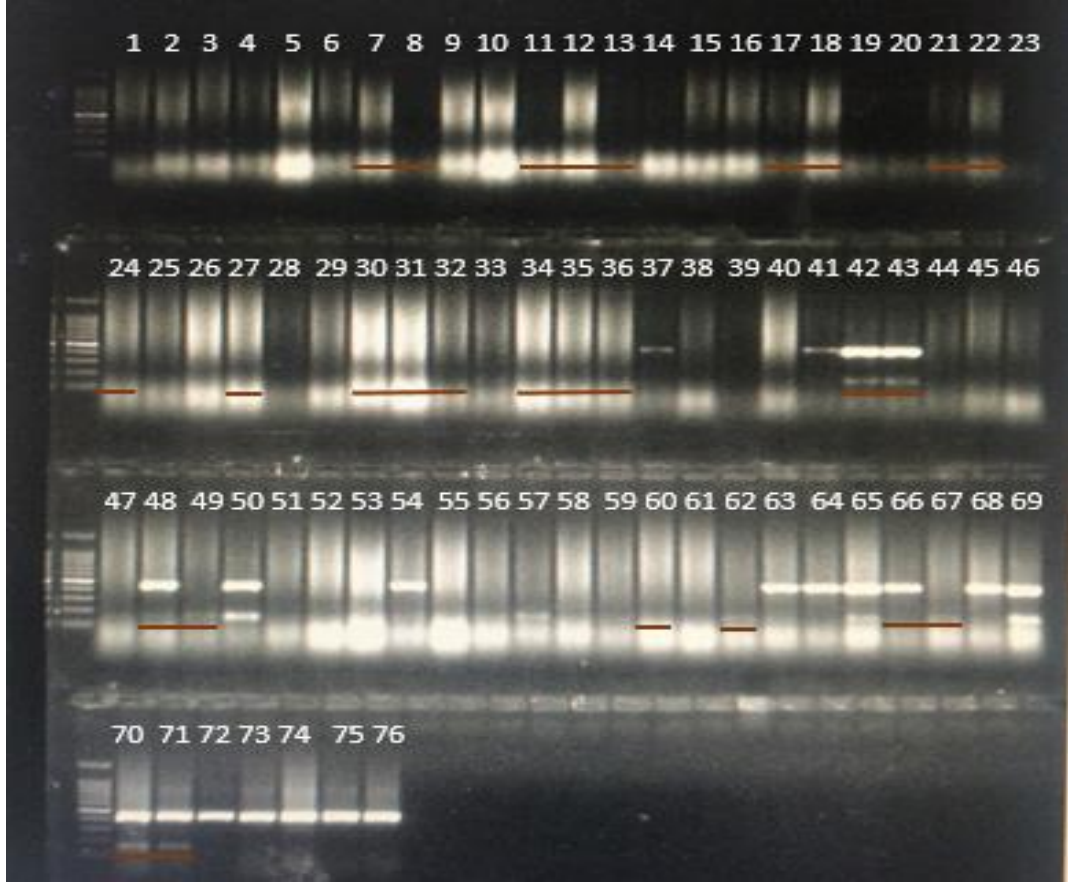
Bu bireyler maintainer hattı idi ve çekirdeğinde hangi allel Rrf yada rrf olduğunu belirlemek için yapılmıştır. 61 örnekten alınan örneklerde 45 tane Rrf, 10 tane rrf ve 3 tane RfRf ve kalan 3 tanesinde band elde edilmemiştir. Üç bir açılım göstermiştir. Baba olarak BC1F1, F2 ve F3 bitkileri bulk yapılarak kullanılmıştır. F2 ve F3 lerden dolayı heterozigot oranı yüksek çıkmıştır. Sadece BC1F1 baba olarak kullanılıyorsa yarısı Rrf yarısı rrf olması beklenir.

BC1F1-B hattın 76 ayçiçek örneğinin nükleusunun heterozigot mu homozigot mu olduğunu bilmek için SCAR markır PPR621.5_F1/Rev (164 bp (rf)) ve PPR621.5_F2/Rev (164 bp (Rf)) primerleri ile analizinde primer taraması ve aynı anda serada testcross yapılmıştı (Şekil 4.12, 4.13, 4.14).



Şekil 4.12. PPR621.5_F1/Rev (164 bp (rf)) primer ile BC1F1-B hattın 76 ayçiçeği örneğinden elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin %1.5'lik agaroz jel elektroforezindeki görüntüleri

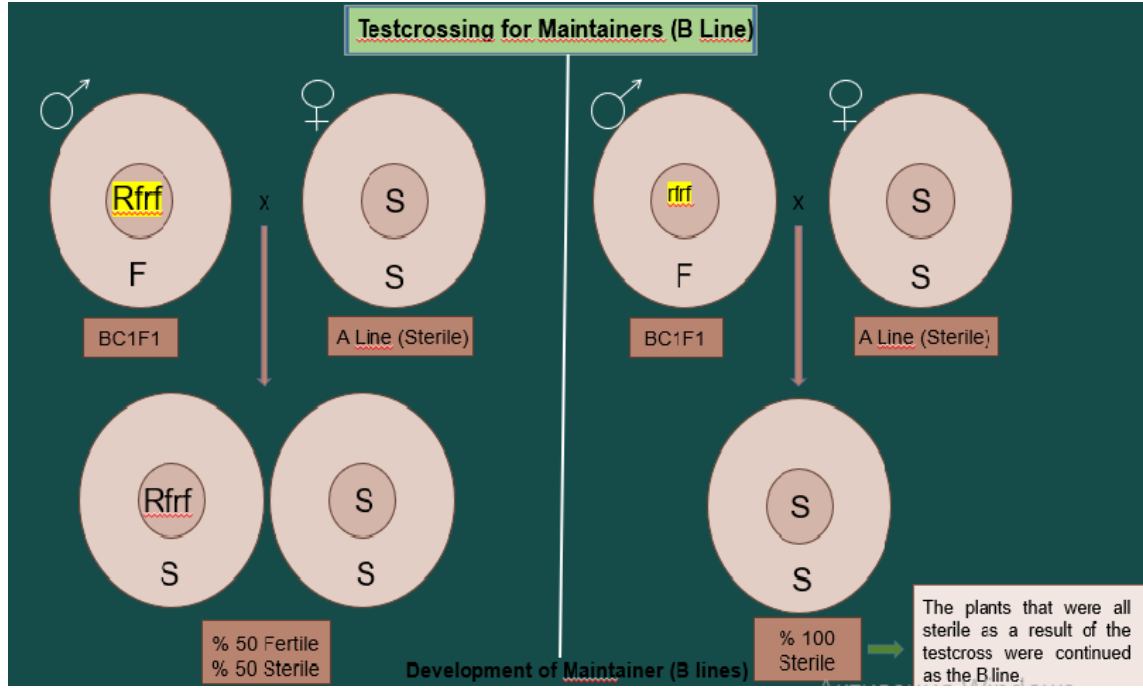
Yaptığımız analiz sonucunda 42 tane homozigot nükleus (F1 (rf)) ve 34 tane heterozigot nükleus (F2 (Rf)) olduğunu bilirlenmiştir.



Şekil 4.13. PPR621.5_F2/Rev (164 bp (Rf)) primer ile BC1F1-B hattın 76 ayçiçeği örneğinden elde edilen PCR amplifikasyon ürünlerinin %1.5'lik agaroz jel elektroforezideki görüntüleri

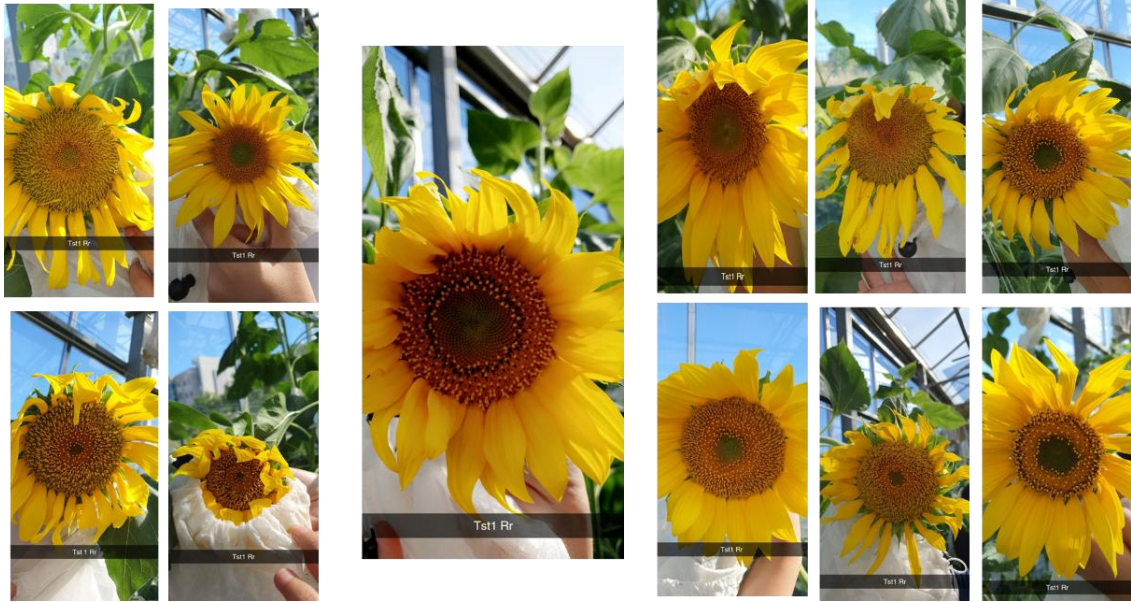
Aynı zamanda markır analizini doğrulamak amaçlı heterozigot nükleusa sahip B hattından yani 31. örnekten bitki çiçek açtığı zamanda testcross için pollen alınmış kısır (CMS) bitkiye pollen verilmiştir, homozigot nükleusa sahip B hattından da 65. örnekten bitki çiçek açığında testcross için pollen alınmıştır ve kısır (CMS) bitkiye pollen verilmiştir. Peredovik (B hattından)'den de kısır bitkiye polen verilmiştir.

Markır Yardımlı Seleksiyon ile nükleustaki homozigot rfrf'ler tespit edilmiştir. Rf alleli tespiti için PPR621,5_F1/Rev markırı, Rf alleli için de PPR621,5_F2 markırı kullanılmıştır.



Şekil 4.14. Heterozigot nükleusa ve homozigot nükleusa sahip B hattının kısır ile testcross melezlemesi

Hassat edilen heterozigot nükleusa sahip BC1F1-B tohumlarından 16 tane ekilmiştir. Sonuçta 8 tanesi fertil ve 8 tanesi kısır açılım göstermiştir (Şekil 4.15, 4.16).



Şekil 4.15. Heterozigot nükleusa sahip BC1F1-B hattının testcross sonucu

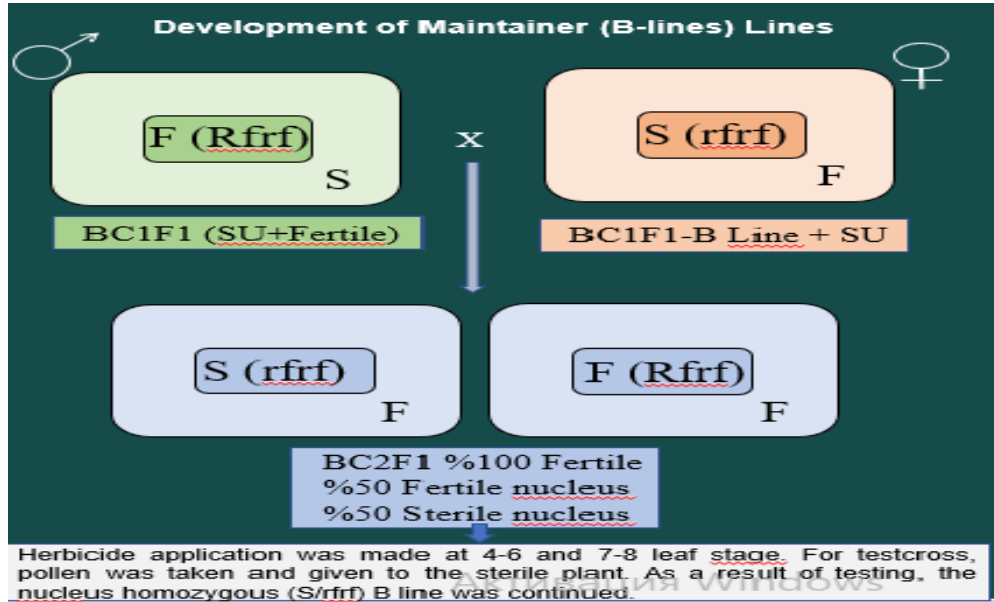
Maintainer grubu Hassat edilen homozigot rfrf nükleusa sahip BC1F1-B tohumlarından 30 tane ekilmiştir. Sonuçta 30 tanesinde kısırlık göstermiştir (Şekil 4.16).



Şekil 4.16. Homozigot nükleusa sahip BC1F1-B hattının testcross sonucu

Sonuçlar test melezlemesinden elde edilen bitkilerin kısır/fertil/açılım durumlarına göre 2022 güz döneminde doğrulanmıştır.

B hattı geliştirmek için fertil sitoplazma taşıyan B grubu bitkilere heterozigot Rfrf nükleusu taşıyan bitkilerle yapılan geriye melezleme çalışmalarında %50 rfrf, %50 Rfrf geriye melez popülasyonları elde edilmiştir (Şekil 4.17).



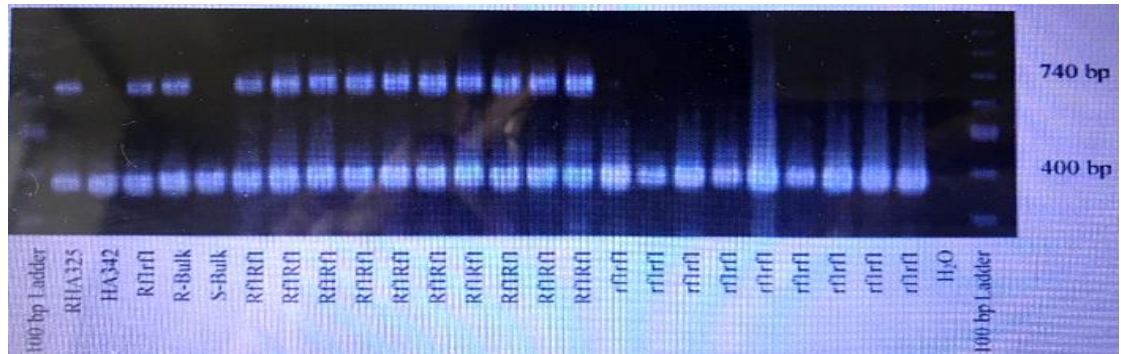
Şekil 4.17. B hattının gelişimi

Horn (2003) tarafından geliştirilen HRG02 ve HRG01 markırı ile çalışmada 9 idameci ve 11 Restorer hattı kullanılmıştır. Restorer hattı RHA325'E ek olarak, Amerikan hatları RHA 265, RHA348, CM 587, CM 592, CM596, CM610 ve G1a 55 ile birlikte türler arası melezlerden geliştirilen üç saf hat (Kräuter vd. 1991) araştırmalara dahil edilmiştir. İdameci hatların DNA analizleri için HA 342, HA 89, HA 291, HA 323, HA 350, HA 850, CM594, CM603 ve CM611 hatları kullanılmıştır. Her iki RAPD markırı başarıyla SCAR markırlarına dönüştürülmüştür. Sırasıyla 426 bp ve 738 bp uzunluğunda bant veren HRG01 ve HRG02 markırları geliştirilmiştir. 20 örnek test edildiği zaman HRG02 markırı çalışmıştır. Restorer alleleline özgü band elde edilmiştir. Bu, SCAR markırları HRG01 hem de HRG02'nin, türler arası melezlerden elde edilecek yeni ayçiçeği hatlarının geliştirilmesinde de kullanılabileceğini göstermişlerdir.

Ek olarak, hem SCAR markırları, HRG01 hem de HRG02, restorer ve idameci hatları arasındaki melezlerde neredeyse evrensel olarak kullanılabilir olduğunu kanıtlamıştır. İki RAPD markırının SCAR markırına dönüştürülmesi, markır destekli seleksiyonda markırların kolayca ele alınmasına neden olmuştur. Özellikle türler arası melezlerden elde edilen kendilenmiş saf hatlardaki geniş kullanılabilirlik, onları ayçiçeği ıslahı programları için değerli bir araç haline getirir. SCAR markırları ile ayçiçeği hibrit ıslahı için yeni restorer ve idameci hatların geliştirilmesi artık çok daha verimli bir şekilde gerçekleştirilecektir.

Kusterer vd. (2005) çalışmasında iki farklı mitokondriyal gen dizisi test edilmiştir, HRG01 ve HRG02, farklı büyüklükteki amplifikasyon ürünlerine yol açmıştır. HRG01 için dupleks PCR, cox II için ilave primerler kullanılarak yapılmıştır (Horn 2002). HRG02 durumunda, atp9 için primerler PCR reaksiyonuna dahil edilmiştir.

Bu çalışmada en yakın bağlantı markırları – Rf1 geni etrafında yaklaşık 2.5 cM - PET1 sitoplazmasına dayanan bir dizi 20 idameci ve restorer hattında test edilmişti (Şekil 4.18). Kullanılan idameci hatları HA342, HA 89, HA 291, HA 323, HA 350, HA 850, CM 594, CM603 ve CM611 idi. Restorer hatlarının DNA analizleri RHA325, diğer yedi Amerikan hattı (RHA265, RHA348, CM587, CM 592, CM 596, CM 610, G1a 55) ve türler arası melezlerden elde edilen saf hat ile yapılmıştır.



Şekil 4.18. HRG02 F/R (738 bp (Rf)) ve atp9 (474 bp) markeri ile dupleks PCR görüntüsü (Horn 2003).

Restorer hatları çalışmıştır yani Rf alleleline özgü band elde edilmiştir. HRG02 ve atp9 markırı ile dupleks PCR reaksiyonuda çok iyi çalıştığını ve bu nedenle güvenilir internal kontrolleri temsil ettiğini göstermektedir.

Markin vd. (2017) araştırmasında N.I.Vavilov Bitki Genetik Kaynakları Enstitüsü'nden elde edilen 5 yıllık ve 26 çok yıllık ayçiçeği örneklerine test yapılmıştır. Yıllık ayçiçeği türlerinin HRG01 ve HRG02 markırları ile incelenmesi belirsiz sonuçlar ortaya koymuştur. HRG02 amplikasyon ürünleri (yaklaşık 740 bp) sadece *H. annuus* ve *H. petiolaris*'te gözlenmiştir. HRG02 markırı *H. annuus* (441236, 441245) örneklerinin %50'sinde, *H. annuus* (441183) ve *H. petiolaris* (440560) örneklerinin %25'inde tespit edilmiştir. Çok yıllık tür araştırmalarının sonuçlarından farklı olarak, çalışılan tüm çok yıllık örneklerde HRG02 (yaklaşık 740 bp) markırı tanımlanırken, HRG01'in amplifikasyonu sadece 26 türün 12'sinde gözlenmiştir.

Bu nedenle çok yıllık türlerde tespit edilen HRG02 markırı, Rf1 geninin oldukça bilgilendirici bir tanımlayıcısı olarak düşünülebilir. Bu yüzden SCAR markırları HRG01 ve HRG02 ve geliştirilen RT-PCR test sistemi, ayçiçeğinin markır destekli seleksiyonu için kullanılabilir. HRG02 markırı yabancı türler arasında fertilitate restorer genini (Rf1) taramak için de faydalıdır.

Karbitsina vd. (2016) araştırmasında N.I.Vavilov Bitki Genetik Kaynakları Enstitüsü'nden elde edilen ayçiçeği genetik koleksiyonunun 95 hatına test yapılmıştır. Materyal, 92 verimli hat ve 3 CMS hattı içeriyordu. Moleküler analiz, nükleer Rf1 genine bağlı 7 primer çifti (SCAR, STS, SSR) fragmanları ve PET1 tipi CMS ile ilişkili mitokondriyal orfH522 lokusu kullanılarak yapılmıştır. Hatlar SCAR markırları - HRG01 ve HRG02; STS markırları - STS115 ve orfH522; SSR markırları - ORS224, ORS511 ve ORS799 kullanılarak karakterize edilmiştir. STS markırı orfH522 kullanılarak 79 ayçiçek hatında steril (PET1) sitoplazma genotiplerinde fertilitate restorasyon genlerinin varlığını tanımlanmıştır. STS markırı orfH522 verimli sitoplazmaya sahip olduğu 9 ayçiçek hatında tespit edilememiştir. Onun 3 ayçiçek hatında geriye melezlemede fertilitateyi geri getirmemiştir. 7 ayçiçek hatında Rf1 genine bağlı HRG01, HRG02 ve STS115 markırları yoktu. Bununla birlikte, bu hatların steril tip sitoplazması ve hibridolojik analiz sonuçları, polen verimliliğini geri kazandıran bir gene sahip olduklarını göstermiştir. HRG01, HRG02 ve STS115 markırları, gelişirken ayrılan hibrit popülasyonların taranması için yeniden tasarlanmıştır. HRG01, HRG02 ve STS115 markırları, VIR koleksiyonunun materyalini kullanarak baba hibrit hatları geliştirirken ayrılan hibrit popülasyonların taranması için önerilir.

Anisimova vd. (2009) araştırmasında yıllık ekili ayçiçeği *H. annuus* hatları, çok yıllık türlerin temsilcileri, VIR ortakları tarafından elde edilen türler arası melezler (ekilen ayçiçeğinin çok yıllık yabancı türlerle CMS hatlarının çaprazlarından) dahil olmak üzere VIR koleksiyonundan 61 ayçiçeğinde HRG01 ve HRG02 markırları dizilerinin amplifikasyonu için K13 ve Y10 primerleri kullanılmıştır. Markır HRG01 (454 bp) 23 ayçiçeğinde, markır HRG02 (740 bp) 42'de ve her iki markır 23 ayçiçek hattında ortaya çıkmıştır. Çok yıllık türlerin tüm hatlarının PCR ürünlerinde bir HRG02 markır bandı

görülmüştür, HRG01 markırı ise yalnızca bir tanesinde (*H. angustifolius*) türünde görülmüştür. Tüm yıllık türlerde (*H. argophyllus*, *H. debilis* ve *H. petiolaris*) HRG02 markır bandı gözlenmiştir.

45 otofertil hat dahil olmak üzere CMS PET1'e göre steril olan altısı; CMS RIG0'a göre steril olan üçü; ve onların verimli analogları ile VIR'de üretilen ve uzun yıllar bakımı yapılan 60 hat ayçiçeği koleksiyonu ile yapılan çalışmada SCAR markırları HRG01 ve HRG02'nin çalışıp çalışmadığını bilirmişlerdir. SCAR markırları HRG01 ve HRG02 ile yapılan sonuçta 24 ayçiçek hatında Rf1Rf1 genotipine özgü band oluştururken, 2 tanesinde genotip belirlenmemiş, ve 6 tane hatında band oluşturmamıştı. 6 ayçiçek hatında rf1rf1 genotipine özgü bir band oluştururken, 12 ayçiçek hatında band oluşturmamıştı. (Anisimova vd. 2014).

Kodominant SCAR markırı Rf1/rf1 restorer geni için geliştirilen 67N04 primeri çok faydalıdır, çünkü heterozigot bireylerin tanımlanmasına da imkan vermektedir. Horn (2019) çalışmasında oluşturulan kodominant markırı, Rf/rf uzunluğundaki 15 bp farkından dolayı restorer hattı RHA325 ile idameci hattı HA342 arasında ayırım yapılmasını sağlamıştır. Restorer hattında 170 bp'lik bir bant güçlendirilirken, idameci hattında sadece 155 bp'lik bir bant görülmüştür.

Horn (2019) çalışmasında primer kombinasyonu PPR621.5_F1 ve PPR621.5_Rev (PPR621.5M) kullanılarak HA 342 idameci hatında yaklaşık 164 bp'lik bir bant güçlendirilirken, restorer hattı RHA 325'te bant görülmemiştir. PCR reaksiyonlarında restorer ve idameci hatlarının tanımlanmasına izin veren iki SCAR markırı (PPR621.5R ve PPR621.5M) geliştirmek için başarıyla kullanılmıştır.

67N04 ve HRG02 primerleriyle önceki çalışmalarda iyi sonuçlar vermiş olsa da ancak bizim yapmış olduğumuz çalışmalarda sonuçların her popülasyonda tamamıyla tutarlı olmadığı bulunmuştur, yani bu markır her popülasyonda çalışmayabilmektedir.

Radanovi'c vd. (2022) çalışmasında Rf1 tarafından CMS PET1'in fertil restorasyonu ile önemli ölçüde ilişkili dört SNP'lerin tespiti için dört KASP (Kompetitive allele spesifik PCR) markırı geliştirilmiştir. Üç SNP bazlı markır, bir kodominant PAMSA (birden fazla spesifik alelin polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) amplifikasyonu) ve restorer hattı idame edici hatlardan açıkça ayırt eden iki dominant markır geliştirilmiştir. KASP markırları, yaklaşık 3 Mb'lik bir alana yayılan fertilitate restorer lokusu Rf1'i kapsar, ve restorer ve idameci hatlarını açıkça ayırt eder.

Bu KASP markırları, restorer ve idameci hatlardan ve hibritlerden oluşan bir ayçiçeği genotipleri panelinde test edildi. KASP markırı 621.5, restorer hatlar, idameci hatlar ve F1 hibritleri arasında en iyi ayırımı verdiler ve en verimli ayırımı sağladı ve bu nedenle hibrit üretim için genetik saflık testinde daha fazla doğrulama için seçildi. KASP 621.5, idame edici hatlar, restorer hatlar ve melezler arasında en iyi ayırım ile en güvenilir markır olduğunu kanıtlamıştır. Dört KASP markırları (621.5, 621.11, 841.38 and 861.19), Rf1'in restorer gen haplotipini tanımlar ve bu restorer lokusunu seçmek için kullanılabilir.

Bizim yaptığımız çalışmada PPR621.5 primeri güvenli sonuçlar vermiştir. Bu markırlar tutarlı sonuçlar vermiş olup gelecek çalışmalarda bu primeri markır yardımcı seleksiyon amacıyla CMS, idameci ve restorer hat geliştirilmesinde kullanabiliriz.

5. SONUÇ

Ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.) ekonomik açıdan önemli bir yağlı tohum bitkisidir. Yüksek tohum ve yağ verimi, ayçiçeği yetiştiriciliğinin temel amaçlarıdır ve heterosis veya hibrit canlılığın kullanılması, yüksek verim ıslahı için en önemli araçlardan biri olmuştur. Ayçiçeğinde, sitoplazmik erkek kısırılığı sistemi (CMS) kullanılarak hibrit tohum elde edilir. CMS sistemlerinin kullanılması, elle emaskulasyon yapma ihtiyacını ortadan kaldırır ve büyük ölçekli hibrit tohum üretimini sağlar. CMS, tür içi ve türler arası melezleme veya mutagenез ile kendiliğinden ortaya çıkabilir. Genel olarak CMS'nin nükleer sitoplazmik uyumsuzluktan kaynaklandığı varsayılmaktadır.

Ayçiçeğinde, ticari hibrit ıslahı, *Helianthus petiolaris* Nutt ve *Helianthus annuus* L. arasındaki türler arası bir melezlerden kaynaklanan tek bir erkek kısırılık kaynağı olan PET1'e dayanır. Polen fertilitesi, baskın nükleer restore edici genlerin (Rf) tanımlanmasıyla kullanılabilir.

Bu çalışmada, ayçiçeği ıslahında moleküler markır yardımcı seleksiyon ile kısır/idameci (maintainer) (rf) ve restorer (Rf) nükleusu taşıyan bitkilerin tespiti için belirtilen kodominant SCAR ve dominant markırlarını (67N04_F1a/Rev, 67N04_F2b/Rev, PPR621.5_F1/Rev, PPR621.5_F2/Rev, HRG02_F/Rev, atp9_for/rev) kullanarak farklı dönemlerde yetiştirilen ayçiçek bitki materyallerini kullanarak test yapılmıştır. Ve restorer, idameci ve CMS farklı ayçiçek bitki materyalleri kullanılmıştır. PCR sonuçlarına bakarak hangi markırların çalışıp çalışmadığı belirlenmiştir.

67N04 primeri önceki çalışmalarda iyi sonuçlar vermiş olsa da bizim yapmış olduğumuz çalışmalarda sonuçların her populasyonda tutarlı olmadığı bulunmuştur, yani bu markır her populasyonda çalışmayabilmektedir. HRG02 markırı çalışmanın çoğunda güvenli sonuç vermiştir.

Bu tez çalışmasında PPR621.5 primeri güvenli sonuçlar vermiştir. Bu markırlar tutarlı sonuçlar vermiş olup gelecek çalışmalarda bu primeri markır yardımcı seleksiyon amacıyla CMS, idameci ve restorer hat geliştirilmesinde kullanabiliriz.

Bu ayçiçeği örneklerinden moleküler markır sonuçlarına göre CMS, maintainer ve restorer olarak belirlenen bitkilerden bir kısmı testcross amaçlı melezlemelere alınmıştır. Sonuçlar test melezlemesinden elde edilen bitkilerin kısır/fertil/açılım durumlarına göre 2022 güz döneminde doğrulanmıştır.

SCAR markırları ile ayçiçeği hibrit ıslahı için yeni restorer ve idameci hatların geliştirilmesi artık çok daha verimli bir şekilde gerçekleştirilebicektir ve idameci hatların nükleuslarında Rf/rf allelerinin durumunu anlamak için test melezlemesi yapmaya gerek kalmayacaktır.

Ayçiçeğindeki moleküler genetik çalışmaları, son yıllarda genetik bağlantı haritalarının oluşturulup önemli özellikleri kontrol eden genlerin haritalanması ve linkaj durumu doğrulanmış güvenilir moleküler markırlar geliştirilmesine hizmet etmiştir. Ayçiçeği konusunda hala çok sayıda yenilikçi araştırmalar yürütülmektedir ve ayçiçeği ıslahlarının kullanımına sunulmaktadır.

6. KAYNAKLAR

Arioglu, H. 1999. Yağ bitkileri yetiştirme ve ıslahı. Çukurova Üniv. Ziraat Fakültesi Yayınları; 2045, Ders kitabı, Adana, 37-43.

Anonim 1: <https://arastirma.tarimorman.gov.tr/ttae> [13.06.2022].

Anonim 2: <https://arastirma.tarimorman.gov.tr/tepge> [13.06.2022].

Berry, S.T., Leon, A.J., Hanfrey, C.C., Challis, P., Burkholz, A., Barnes, S.R., Rufener, G.K., Lee, M., Caligari, P.D.S. 1995. Molecular-marker analysis of *Helianthus annuus* L. 2. Construction of an RFLP linkage map for cultivated sunflower. *Theoretical and Applied Genetics*, 91: 195–199.

Berry, S.T., Leon, A.J., Challis, P., Livini, C., Jones, R., Hanfrey, C.C., Griffiths, S. A., Roberts, A. 1996. Construction of a high density, composite RFLP linkage map for cultivated sunflower (*Helianthus annuus* L.). In: Proc. 14th Int. Sunflower Conf. Beijing, China, pp. 1155–1160.

Berry, S.T., León, A.J., Peerbolte, R., Challis, C., Livini, C., Jones, R., Feingold, S. 1997. Presentation of the Advanta sunflower RFLP linkage map for public research. In: Proc. 19th Sunflower Research Workshop, Fargo, ND, National Sunflower Association, Bismarck, ND, pp. 113-118.

Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M., Davis, R.W. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet*, 32(3): 314–331.

Burke, J.M., Tang, S., Knapp, S.T., Rieseberg, L.H. 2002. Genetic analysis of sunflower domestication. *Genetics*, 161: 1257-1267.

Burke, J.M., Lai, Z., Salmaso, M., Nakasato, T., Tang, S., Heesacker, A., Knapp, S.T., Rieseberg, L.H. 2004. Comparative mapping and rapid karyotypic evolution in the genus *Helianthus*. *Genetics*, 167: 449-457.

Burr, B., Burr, F.A. 1991. Recombinant inbreeds for molecular mapping in maize: Theoretical and practical considerations. *TIG February 7*: 56-60.

Chen, J., Hu, J., Vick, B.A., Jan, C.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: 122-127.

Collard, B.C.Y., Jahufer, M.Z.Z., Brouwer, J.B., Pang, E.C.K. 2005. An introduction to markers, quantitative trait (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica*, 142: 169-196.

Elçi, Ş., Kolsarici, Ö., Geçit, H.H. 1987. Tarla bitkileri. Ankara Üniv. Ziraat Fakültesi Yayınları: 1008, Ders Kitabı, Ankara, 110.

- Enns, H., Dorell, D.G., Hoes, J.A., Chubb, W.O. 1970. Sunflower research, a progress report. Proc of the 4th Int Sunflower Conf, ISA, Memphis Tennessee, USA, pp. 162-167.
- Feng, J., Jan, C.C. 2008. Introgression and molecular tagging of Rf4, a new male fertility restoration gene from wild sunflower *Helianthus maximiliani* L. *Theoretical and Applied Genetics*, 117: 241-249.
- Ferreira, A., Siva, M.F., Costa, Siva. L., Cruz, C.D. 2006. Estimating the effects of population size and type on the accuracy of genetic maps. *Genetics and Molecular Biology*, 29: 187-192.
- Fick, G.N., Zimmer, D.E. 1974. Fertility restoration in confectionery sunflowers. *Crop Science*, 14: 603-604.
- Fick, G.N. 1989. Sunflower. In: Rbbelen, G., Downey, R.K., Ashri, A. (Eds.), *Oil Crops of the World*. McGraw-Hill, New York, pp. 301-318.
- Flores-Berrios, E., Gentzbittel, L., Kayyal, H., Alibert, G., Sarrafi, A. 2000. AFLP mapping of QTLs for in vitro organogenesis traits using recombinant inbred lines in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 101: 1299–1306.
- Gedil, M.A., Slabaugh, M.B., Berry, S., Johnson, R., Michelmore, R., Miller, J., Gulya, T., Knapp, S.J. 2001. Candidate disease resistance genes in sunflower cloned using conserved nucleotide-binding site motifs: Genetic mapping and linkage to the downy mildew resistance gene P11. *Genome*, 44: 205-212.
- 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: 419–425.
- Gentzbittel, L., Vear, F., Zhang, Y.X., Bervillé, A., Nicolas, P. 1995. Development of a consensus linkage RFLP map of cultivated sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 90: 1079-1086.
- Gentzbittel, L., Mestries, E., Mouzeyar, S., Mazeyrat, F., Badaoui, S., Vear, F., Tourvieille, D.E., Labrouhe, D., Nicolas, P. 1999. A composite map of expressed sequences and phenotypic traits of the sunflower (*Helianthus annuus* L.) genome. *Theoretical and Applied Genetics*, 99: 218-234.
- Gülşen, O., Mutlu, N. 2005. Bitki Biliminde Kullanılan Genetik Markırlar ve Kullanım Alanları. *Alatarım*, 4 (2): 27-37.
- Heiser, C.B., Smith, D.M., Clevenger, S.B., Martin, W.C. 1969. The North American sunflowers (*Helianthus*). *Mem. Torr. Bot. Club* 22: 1-218.
- Hladni, N. 2016. Present status and future prospects of global Confectionery sunflower production. 19th International Sunflower Conf., Edirne, Turkey, 47-60.

- Horn, R., Friedt, W. 1997. Fertility restoration of new CMS sources in sunflower. *Plant Breeding*, 116: 317-322.
- Horn, R. 2002. Molecular diversity of male sterility inducing and male-fertile cytoplasm in the genus *Helianthus*. *Theoretical and Applied Genetics*, 104, 562–570.
- Horn, R., Kusterer, B., Lazarescu, E., Prüfe, M., Friedt, W. 2003. Molecular mapping of the Rf1 gene restoring pollen fertility in PET1-based F1 hybrids in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 106: 599-606.
- Horn, R. 2006. Cytoplasmic male sterility and fertility restoration in higher plants. *Progress in Botany*, 67: 31-52.
- Horn, R., Radanovic, A., Fuhrmann, L., Sprycha, Y., Hamrit, S., Jockovic, M., Miladinovic, D., Jansen, C. 2019. Development and Validation of Markers for the Fertility Restorer Gene Rf1 in Sunflower. *Molecular. Sciences*, 20: 1260.
- Hu, J., Chen, J., Berville, A., Vick, B.A. 2004. High potential of TRAP markers in sunflower genome mapping. In: Proc. 16th Int. Sunflower Conf. Fargo, ND, USA, pp. 665–671.
- Hu, J., Yue, B., Vick, B.A. 2007. Integration of TRAP markers onto a sunflower SSR marker linkage map constructed from 92 recombinant inbred lines. *Helia*, 30: 25-36.
- Jan, C.C., Seiler, G. 2007. Sunflower. In: Singh R.J. (Ed.), Oilseed Crops, Genetic Resources, Chromosome Engineering, and Crop Improvement. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp. 103-165.
- Jan, C.C., Vick, B.A., Miller, J.F., Kahler, A.L., Butler, E.T. 1998. Construction of an RFLP linkage map for cultivated sunflower. *Theoretical and Applied Genetics*, 96: 15-22.
- Jan, C.C., Vick, B.A. 2007. Inheritance and allelic relationships of fertility restoration genes for seven new sources of male-sterile cytoplasm in sunflower. *Plant Breeding*, 126: 213-217.
- Karbitsina, Yu.I., Anisimova, I.N., Gavrilova, V.A., Alpatieva, N.V., Pinaev, A.G., Kuznetsova, E. B., Rozhkova, V.T. 2018. Molecular marking of sunflower lines with different ability to suppression of the cytoplasmic male sterility phenotype. *Trudy po prikladnoj botanike, genetike i selekcii*, 177 (2): 99-107.
- Kinman, M.L. 1970. New developments in the USDA and state experiment station sunflower breeding programs. In: Proc. 4th Int. Sunflower Conf. Memphis, TN, USA, pp. 181–183.
- Kinney, A.J. 1994. Genetic modification of the storage lipids of plants. *Current Opinion in Biotechnology*, 5: 144-151.

- Korell, M., Mösges, G., Friedt, W. 1992. Construction of a sunflower pedigree map. *Helia*, 15: 7-6.
- Krauter, R., Steinmetz, A., Friedt, W. 1991. Efficient interspecific hybridization in the genus *Helianthus* via ‘‘embryo rescue’’ and characterization of the hybrids. *Theoretical and Applied Genetics*, 82: 521–525.
- Kustere, R. B., Horn, R., Friedt, W. 2005. Molecular mapping of the fertility restoration locus Rf1 in sunflower and development of diagnostic markers for the restorer gene. *Euphytica*, 143: 35-43.
- Lahaye, L., Ganier, P., Thibaul, T.J., Sève, B. 2004. Technological processes of feed manufacturing affect protein endogenous losses and amino acid availability for body protein deposition in pigs. *Animal Feed Science and Technology*, 113: 141–156.
- Langar, K., Lorieux, M., Desmarais, E., Griveau, Y., Gentzbittel, L., Berville, A. 2003. Combined mapping of DALP and AFLP markers in cultivated sunflower using F9 recombinant inbred lines. *Theoretical and Applied Genetics*, 106: 1068–1074.
- Li, Y.C., Korol, A.B., Fahima, T., Beiles, A., Nevo, E. 2002. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular Ecology*, 11: 2453-2465.
- Lin, J.J., Kuo, J., Ma, J., Saunders, J.A., Beard, H.S., Macdonald, M.H., Kenworthy, W., Ude, G.N., Matthews, B.F. 1996. Identification of Molecular markers in Soybean comparing RFLP, RAPD, and AFLP DNA mapping techniques. *Plant Molecular Biology Reporter*, 14: 156-169.
- Markin, N., Usatov, A., Makarenko, M., Azarin, K., Gorachenko, O., Kolokolova, N., Usatenko, T., Markina, O., Gavrilova, V. 2017. Study of informative DNA markers of the Rf1 gene in sunflower for breeding practice. *Plant Breeding*, 53: 69–75.
- Miller, J.F., Fick, G.N. 1997. The genetics of sunflower. In: Schneiter, A.A. (Ed.), *Sunflower Production and Technology*. Agronomy Monograph 35. ASA-CSSA-SSSA, Madison, WI, USA, pp. 441-495.
- Mohan, M., Nair, S., Bhagwat, A., Krishna, T.G., Yano, M., Bhatia, C.R., Sasaki, T. 1997. Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants. *Molecular Breeding*, 3: 87-103.
- Paniego, N., Heinz, R., Fernández, P., Talia, P., Nishinakamasu, V., Hopp, H.E. 2007. Sunflower. In: Kole, C. (Ed.), *Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants, Oilseeds*. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, Germany, pp. 153–177.
- Paran, I., Michelmore, R.W. 1993. Development of Reliable PCR-based Markers Linked to Downy Mildew Resistance Genes in Lettuce. *Theoretical and Applied Genetics*, 85: 985-993.

- Peerbolte, R.P., Peleman, J. 1996. The CARTISOL sunflower RFLP map (146 loci) extended with 291 AFLP markers. In: Proc of the 18th sunflower research forum, Fargo, ND. National Sunflower Association, Bismarck, ND pp. 174-178.
- Pérez-vich, B., Garcés, R., Fernández-martinez, J.M. 2000. Genetic relationships between loci controlling the high stearic and the high oleic acid traits in sunflower. *Crop Science*, 40: 990-995.
- Pérez-vich, B., Fernández-martinez, J.M., Grondona, M., Knapp, S.J., Berry, S.T. 2002. Stearoyl-ACP and oleo1-PC desaturase genes cosegregate with quantitative trait loci underlying stearic and high oleic acid mutant phenotypes in sunflower. *Theoretical and Applied Genetics*, 104: 338-349.
- Pérez-vich, B., Velasco, L., Munoz-ruz, J., Fernández-martinez, J.M. 2006. Inheritance of high stearic acid content in the sunflower mutant CAS-14. *Crop Science*, 46: 22-29.
- Powell, W., Machray, G.C., Provan, J. 1996. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends in Plant Science*, 7: 215–222.
- Putt, E.D. 1997. Early History of Sunflower. In: Schneiter A.A. (Ed.), Sunflower Technology and Production, Madison, Wisconsin, USA, pp. 1-19.
- Rachid 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: 490–496.
- Radanović, A., Sprycha, Y., Jocković, M., Sundt, M., Miladinović, D., Jansen, C., Horn, R. 2022. KASP Markers Specific for the Fertility Restorer Locus Rf1 and Application for Genetic Purity Testing in Sunflowers (*Helianthus annuus* L.). *Genes*, 13(3): 465.
- Rieseberg, L.H., Choi, H., Chan, R., Spore, C. 1993. Genomic map of a diploid hybrid species. *Heredity*, 70: 285-293.
- Rieseberg, L.H., Van Fossen, C., Desrochers, A. 1995. Hybrid speciation accompanied by genomic reorganization in wild sunflowers. *Nature*, 375: 313-316.
- Schilling, E.E., Heiser, C.B. 1981. Infrageneric classification of *Helianthus* (Compositae). *Taxon*, 30: 393-403.
- Schnabel, U., Engelmann, U., Horn, R. 2008. Development of markers for the use of the PEF1 cytoplasm in sunflower hybrid breeding. *Plant Breeding*, 127: 587-591.
- Seiler, G.J., Rieseberg, L.H. 1997. Systematic, origin and germplasm resources of the wild and domesticated sunflower. In: Schneiter, A.A. (Ed.), Sunflower Production and Technology. Agronomy Monograph 35. ASA-CSSA-SSSA, Madison, WI, USA, pp. 21-65.

Serieys, H., Vincourt, P. 1987. Caractérisation de nouvelles sources de stérilité mâle chez le tournesol. *Les Colloques de l'INRA Paris*, 45: 53-64.

Serieys, H. 2005. Identification, study, and utilization in breeding programs of new CMS sources, in the FAO Subnetwork. In: Proc. 2005 sunflower Subnetwork progress report, 17-20 July 2005, FAO, Rome, Italy, pp. 47-53.

Tang, S., Yu, J.K., Slabaugh, M.B., Shintani, D.K., Knapp, S.J. 2002. Simple sequence repeats map of the sunflower genome. *Theoretical and Applied Genetics*, 105: 1124-1136.

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: 990-1003.

Tautz, D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research*, 17: 6463-6471.

Vollmann, J. ve Rajcan, I. 2009. Oil Crops. In: Prohens, J., Nuez, F., Carena, M.J. (Eds.), Handbook of plant breeding. Springer Dordrecht Heidelberg London New York, pp. 155-235.

Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van De Lee, T., Horenes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., Zabeau, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23: 4407- 4414.

Vranceanu, V.A., Stoenescu, F.M. 1971. Pollen fertility restorer gene from cultivated sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Euphytica*, 20: 536-541.

Wani, S.H., Saini, H.K., Gupta, V., Bhat, M.A., Singh, N.B. 2010. Present Status and Future Prospect for heterosis breeding in Sunflower (*Helianthus annuus* L.) *Asian Journal of Science and Technology*, 2: 049-054.

Willams, J.G.K., 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: 6531-6535.

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: 652-660.

Yu, J.K., Tang, S.X., Slabaugh, M.B., Heesacker, A., Cole, G., Herring, M., Soper, J., Han, F., Chu, W.C., Webb, D.M., Thompson, L., Edwards, K.J., Berry, S., León, A.J., Grondona, M., Olungo, C., Maes, N., Knapp, S.J. 2003. Towards a saturated molecular genetic linkage map for cultivated sunflower. *Crop Science*, 43: 367-387.

Zhang, H.B., Wing, R.A. 1997. Physical mapping of the rice genome with BACs. *Plant Molecular Biology*, 35: 115-12.

ÖZGEÇMİŞ

Aray ZAILASHEVA
azailashova@gmail.com



ÖĞRENİM BİLGİLERİ

| | |
|----------------------------|--|
| Yüksek Lisans 2020-2023 | Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarımsal Biyoteknoloji, Anabilim Dalı, Antalya |
| Lisans 2015-2019 | S.Seyfullin adındaki Kazak Tarım Tekniği Üniversitesi Tarım Bölümü, Tarım Bilimi, Kazakistan, Astana |

MESLEKİ VE İDARİ GÖREVLER

| | |
|-------------------------------|--|
| Stajyer Haziran-Kasım,2018 | S.Seyfullin adındaki Kazak Tarım Tekniği Üniversitesi Tarımsal Biyoteknoloji Araştırma Platformu |
|-------------------------------|--|