

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



YERFISTIĞINDA (*Arachis hypogaea* L.) MUTAGEN UYGULAMASI İLE AGRO-MORFOLOJİK VARYASYONUN OLUŞTURULMASI VE TILLING METODU KULLANILARAK YAĞ ASİDİ SENTEZİ VE ALERJİNİTEDEN SORUMLU GENLERDEKİ TEK BAZ DEĞİŞİKLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Kürşat KARAMAN

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TARLA BİTKİLERİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANSTEZİ

HAZİRAN 2019

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



**YERFİSTİĞİNDA (*Arachis hypogaea* L.) MUTAGEN UYGULAMASI İLE
AGRO-MORFOLOJİK VARYASYONUN OLUŞTURULMASI VE TILLING
METODU KULLANILARAK YAĞ ASİDİ SENTEZİ VE ALERJİNİTEDEN
SORUMLU GENLERDEKİ TEK BAZ DEĞİŞİKLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

Kürşat KARAMAN

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TARLA BİTKİLERİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANSTEZİ

HAZİRAN 2019

ANTALYA

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

**YERFISTIĞINDA (*Arachis hypogaea* L.) MUTAGEN UYGULAMASI İLE
AGRO-MORFOLOJİK VARYASYONUN OLUŞTURULMASI VE TILLING
METODU KULLANILARAK YAĞ ASİDİ SENTEZİ VE ALERJİNİTEDEN
SORUMLU GENLERDEKİ TEK BAZ DEĞİŞİKLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

**Kürşat KARAMAN
TARLA BİTKİLERİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Bu tez Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından FYL-2017-
2990 nolu proje ile desteklenmiştir.**

HAZİRAN 2019

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**YERFISTIĞINDA (*Arachis hypogaea* L.) MUTAGEN UYGULAMASI İLE
AGRO-MORFOLOJİK VARYASYONUN OLUŞTURULMASI VE TILLING
METODU KULLANILARAK YAĞ ASİDİ SENTEZİ VE ALERJİNİTEDEN
SORUMLU GENLERDEKİ TEK BAZ DEĞİŞİKLİKLERİNİN BELİRLENMESİ**

**Kürşat KARAMAN
TARLA BİTKİLERİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

Bu tez 21/06/2019 tarihinde jüri tarafından Oybirliği/Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Engin YOL (Danışman)
Prof. Dr. Bülent UZUN
Prof. Dr. Mevlüt TÜRK



ÖZET

YERFISTIĞINDA (*Arachis hypogaea* L.) MUTAGEN UYGULAMASI İLE AGRO-MORFOLOJİK VARYASYONUN OLUŞTURULMASI VE TILLING METODU KULLANILARAK YAĞ ASİDİ SENTEZİ VE ALERJİNİTEDEN SORUMLU GENLERDEKİ TEK BAZ DEĞİŞİKLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Kürşat KARAMAN

Yüksek Lisans Tezi, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Engin YOL

Haziran 2019; 71 sayfa

Yerfistığı (*Arachis hypogaea* L.) içerdiği yüksek yağ ve protein oranı ile dünyada kültürü yapılan önemli bir yağlı tohum bitkisidir. Bu çalışmada yerfistığının tohum kalitesinin artırılması amacıyla TILLING çalışması yürütülmüştür. Genetik kaynak olarak ülkemizde yaygın olarak yetiştirilen NC-7 yerfistığı çeşidi kullanılmıştır. Varyasyon oluşturma amacıyla bu çeşidin tohumları %0,4 ve %1,2 etil metan sülfanat (EMS) mutageni ile muamele edilmiş ve ardında tohumlar M₁ popülasyonu oluşturmak amacıyla tarla şartlarında ekilmiştir. M₁ popülasyonundan elde edilen tohumlar M₂ popülasyonu için sera şartlarında yetiştirilmiş ve yapraklardan numuneler alınarak DNA izolasyonu yapılmıştır. Çalışmada alerjiniteden sorumlu genler *ara h 1.01*, *ara h 1.02*, *ara h 2.01*, *ara h 2.02* ve yağ asit sentezinden sorumlu genler *ah FAD2A* ve *ah FAD2B* TILLING metodunda kullanılmak üzere seçilmiştir. Belirlenen gen bölgeleri için geliştirilmiş markerler kullanılarak PCR ile tarama yapılmış ve heterodupleks PCR ile prosedüre devam edilmiştir. Fragment AnalyzerTM cihazında potansiyel mutant genotipler belirlenmiş ve bu genotiplere ait PCR ürünleri doğrulama için sekanslamaya gönderilmiştir. Sekanslama sonuçlarına göre alerjiniteden sorumlu genlerde mutasyon yakalanamamıştır. Ancak yağ asidi sentezinden sorumlu *ah FAD2A* ve *ah FAD2B* genlerinde beklenen mutasyonlar yakalanmıştır. %0,4 EMS M₂ popülasyonunda *ah FAD2A* geni için 1 SNP/317 kb, %1,2 EMS M₂ popülasyonunda *ah FAD2B* geni için 1 SNP/466 kb mutasyon frekansı hesaplanmıştır. Böylece yürütülen tez çalışması ile yüksek oleik/linoleik oranına sahip potansiyel genotipler geliştirilmiştir. Bu mutant genetik kaynaklar ileri yerfistığı ıslah çalışmalarında yüksek oleik asitli çeşitler geliştirmek amacıyla kullanılabilecektir. Ayrıca bu yüksek lisans tezi ile farklı çalışmalarda kullanılmak üzere M₂ popülasyonu geliştirilmiştir. Bu çalışma ülkemizde yerfistığı bitkisi üzerine yürütülen ilk TILLING çalışmasıdır.

ANAHTAR KELİMELEER: Alerjinite, EMS, Linoleik Yağ Asidi, Mutasyon, Oleik Asit, SNP

JÜRİ : Doç. Dr. Engin YOL

Prof. Dr. Bülent UZUN

Prof. Dr. Mevlüt TÜRK

ABSTRACT

DEVELOPING OF AGROMORPHOLOGICAL VARIATION BY MUTAGENIC TREATMENTS AND DETERMINATION OF SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS IN GENES RESPONSIBLE FOR MAJOR ALLERGENS AND FATTY ACID SYNTHESIS BY TILLING METHOD IN GROUNDNUT

Kürşat KARAMAN

MSc Thesis in Department of Field Crops

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Engin YOL

July 2019; 71 pages

Peanut or groundnut (*Arachis hypogaea* L.) includes high oil and protein content and is cultivated worldwide. The present thesis was conducted to improve its seed quality with the TILLING method. The groundnut variety, NC-7, which is widely grown in Turkey was used as a genetic resource. The seeds of this variety were treated with 0.4% and 1.2% ethyl methane sulfanate (EMS) mutagen for variation, and seeds were planted under field conditions to form M₁ population. The seeds obtained from the M₁ population were grown under greenhouse conditions for M₂ population and DNA samples were taken from the leaves. In the study, the genes responsible for allergenicity (*ara h 1.01*, *ara h 1.02*, *ara h 2.01*, *ara h 2.02*) and fatty acid synthesis genes (*ah FAD2A* and *ah FAD2B*) were selected for TILLING method. PCR screening was performed using markers developed for the identified gene regions and procedure was continued with heteroduplex PCR. Potential mutant genotypes were identified on the Fragment AnalyzerTM and PCR products of these genotypes were sequenced for verification. According to the sequencing results, mutation was not detected in the genes responsible for the allergen. However, expected mutations in the *ah FAD2A* and *ah FAD2B* genes responsible for fatty acid synthesis were detected. The mutation frequency was estimated 1 SNP / 317 kb for the *ah FAD2A* gene in the 0.4% EMS M₂ population and 1 SNP / 466 kb for the *ah FAD2B* gene in the 1.2% EMS M₂ population. Thus, potential genotypes with high oleic / linoleic ratio were developed by the thesis study. These mutant genetic resources can be used to develop varieties with high oleic acid in advanced groundnut breeding studies. In addition, M₂ population has been developed for different researches. This is the first TILLING study on groundnut crop in Turkey.

KEYWORDS: Allergen, EMS, Groundnut, Linoleic Fatty Acid, Mutation, Oleic Acid, Peanut

COMMITTEE: Assoc. Prof. Dr. Engin YOL

Prof. Dr. Bülent UZUN

Prof. Dr. Mevlüt TÜRK

ÖNSÖZ

Yerfistığı önemli bir yağ ve protein kaynağıdır. Ayrıca yetiştirildiği ülkelerde çiftçiler için önemli bir gelir kaynağı oluşturmaktadır. Yüksek yağ içeriğine sahip yerfistığı çeşitleri, yağ endüstrisi için ve özellikle de yerfistığının büyük bir kısmını yemeklik yağı için işleyen gelişmiş ülkelerde oldukça önemlidir. Ancak ülkemizde yerfistığı genelde çerezlik olarak yetiştirilmekte ve neredeyse yok denecek kadar az bir miktar yağ sanayisinde değerlendirilmektedir. Ülkemizin mevcut bitkisel yağ açığı göz önüne alındığında bu alanda yapılacak her türlü iyileştirmeler önem kazanmaktadır. Dolayısıyla tohumları %48-50 arasında yağ içeren yerfistığının yağ kalitesini iyileştirecek her türlü çalışma bir katma değer yaratarak ülkemiz açısından faydalı olacaktır. Bu nedenle bu tez çalışmasında yerfistığının yağ kalitesini artırmak amacıyla EMS mutageni ile varyasyonlar oluşturulmuştur. Oluşturulan varyasyonlarda alerjen genler ve tohum oleik/linoleik yağ asit oranını belirleyen genler TILLING metodu kullanılarak taranmıştır. Tez çalışmasında yüksek oleik/linoleik özelliğine sahip mutant genotipler tanımlanmıştır. Bu özelliği taşıyan genotiplerin yağları içerdikleri yüksek tekli doymamış yağ asitlerinden dolayı hem kardiyovasküler açıdan daha sağlıklıdır hem de oksidasyona dayanıklı oldukları için daha uzun raf ömrüne sahiptir. Tespit edilen bu genotipler yerfistığı ıslah programlarında bu özellikleri için melezlemede kullanılarak mevcut germplazmalar iyileştirilebilir. Ayrıca tez çalışması ile oluşturulan TILLING popülasyonu da bir sonraki çalışmalar için yeni bir genetik kaynak sunmaktadır.

Tez çalışmasını FYL-2017-2990 nolu proje ile destekleyerek maddi imkân sağlayan Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine ve tez çalışmasında popülasyonların yetiştirilmesi için gerekli olan saha ve moleküler analizler için laboratuvar ve ekipmanları sağlayan Akdeniz Üniversitesi Tarla Bitkileri Bölümüne teşekkür ederim.

Tez çalışmasında bilgisiyle, tecrübesiyle, disiplini ile her türlü katkıyı veren; konusuna hakimiyetiyle, vizyon sahipliğiyle bana yol gösteren, moleküler ıslah çalışmalarına giriş yapmamı sağlayan danışman hocam Sayın Doç. Dr. Engin YOL'a sonsuz teşekkür ederim.

Yüksek lisans derslerindeki moleküler genetik ve ıslah bilgisi ile bana konuyu sevdiren, motivesi ile bu konuda daha da fazla çalışma şevki aşıl原因 Sayın Prof. Dr. Bülent UZUN'a teşekkür ederim.

Yüksek lisans tez yapmam konusundabana vesile olan, yüksek lisans derslerindeki ıslah ve tahıllar konusunda geniş bilgisiyle bana yol gösteren Sayın Prof. Dr. Taner AKAR'a teşekkür ederim.

Tez süreci boyunca hem saha çalışmalarında hem de laboratuvar çalışmalarında büyük katkılar veren, hiçbir yardımlarını esirgemeyen, her türlü desteklerini veren Sayın Zir. Müh. Sibel KIZIL'a, Sayın Zir. Müh. Merve BAŞAK'a, Sayın Zir. Yüksek Müh. Volkan GÜÇLÜ ve Sayın Zir. Yüksek Müh. Rüstem ÜSTÜN'e çok teşekkür ederim.

Tez konusunda beni hep destekleyen, mesleki tecrübeleri ve bilgileriyle bana yol gösteren, Anadolu Efes Konya Fabrikası Tarımsal Ürün Geliştirme Departman

Yöneticisi Sayın Zir. Müh. Tayyib ARSLAN ve Operasyon Müdürü Sayın Dr. Ahmet ENGİN'e teşekkür ederim.

Ve tabi ki beni her zaman destekleyen biricik anneme ve kardeşime teşekkür ederim.



İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ	iii
AKADEMİK BEYAN	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK TARAMASI	9
3. MATERYAL VE METOT	20
3.1. Materyal.....	20
3.1.1. TILLING popülasyonunda kullanılan NC-7 çeşidinin özellikleri.....	20
3.1.2. Deneme yerinin iklim değerleri ve toprak yapısı	20
3.2. Metot	21
3.2.1. TILLING popülasyonu oluşturulması	21
3.2.2. M ₂ popülasyonundaki bitkilerden DNA izolasyonu.....	23
3.2.3. TILLING protokolü	25
3.3.4. Jel kesme protokolü	36
4. BULGULAR	38
4.1. TILLING Popülasyonun Oluşturulması	38
4.2. Fragment Analyzer™ ile Potansiyel Mutasyonların Belirlenmesi.....	38
4.3. Seçilen Genotiplerde Dizileme İşlemi.....	56
5. TARTIŞMA	60
6. SONUÇLAR	64
7. KAYNAKLAR	65
ÖZGEÇMİŞ	

AKADEMİK BEYAN

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Yerfıstığında (*Arachis hypogaea* L.) Mutagen Uygulaması ile Agromorfolojik Varyasyonun Oluşturulması ve Tilling Metodu Kullanılarak Yağ Asidi Sentezi ve Alerjinite Sorumlu Genlerdeki Tek Baz Değişikliklerinin Belirlenmesi” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

21/06/2019

Kürşat KARAMAN

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

bp	: Baz çifti
cM	: Santimorgan
cm	: Santimetre
Ca	: Kalsiyum
g	: Gram
ha	: Hektar
HCl	: Hidrojen klorür
K	: Potasyum
Kb	: Kilobaz
Kg	: Kilogram
kR	: Kilorad
L	: Litre
Mg	: Magnezyum
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
NaCl	: Sodyum Klorür
ng	: Nanogram
P	: Fosfor
T	: Ton
pH	: Hidrojen gücü
pmol	: pikomol
U	: Ünite
µl	: Mikrolitre
γ	:Gama parçacığı
°C	: Santigrat derece

Kısaltmalar

AFLP	: Amplified Fragment Length Polimorphism - oğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizm
AZ-MNU	: Sodyum azid + Nitrozo üre
CTAB	: Cetyl Trimethylammonium Bromide
DES	: Di Etil Sülfat.
EMS	: Etil Metan Sülfanat
FAO	: Food and Agriculture Organization of the United Nations - Dünya Tarım Örgütü
FT-IR	: Foirer Transform Infrared Spektrofotometre - Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopis
ICRISAT	: The International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics - Yarı Kurak Bölgeler İçin Uluslararası Bitki Araştırma Enstitüsü
ISSR	: Inter-simple Sequence Repeat - Kısa dizi tekrarları arası
MALDI-TOF	: Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization - Matriks İle Desteklenmiş Lazer Desorpsiyon/İyonizasyon
NMU	: N-nitrozo - N-metil üre
PCR	: Polymerase Chain Reaction - Polimeraz Zincirleme Tepkimesi
RAPD	:Random Amplified Polymorphic DNA - Rastgele oğaltılan DNA Farklılığı
RPM	: Revolutions Per Minute - Dakikada Devir Sayısı
SA	: Sodyum Azid
SNP	: Single Nucleotide Ploymorphism - Tez Baz Değişikliği
SSR	: Simple Sequence Repeats - Basit Dizi Tekrarları
TILLING	:Targeting Induced Local Lesions In Genomes - Genomda İndüklenmiş Lokal Lezyonların Belirtilmesi
TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu
UV	: Ultra Viyole
QTL	: Quantitative Trait Locus - Kantitatif Özellik Lokusu

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. EMS uygulaması.....	21
Şekil 3.2. M1 popülasyonunun oluşturulması amacı ile EMS ile muamele edilmiş tohumların tarlaya ekilmesi.....	22
Şekil 3.3. M ₁ popülasyonunun yetiştirilme, hasat ve kurutma aşamaları	22
Şekil 3.4. M ₂ popülasyonunun yetiştirilmesi	23
Şekil 3.5. M ₂ popülasyonundaki bitkilerden DNA izolasyonu.....	24
Şekil 3.6. M ₂ bitkilerinden seçilen bazı bitkilere ait DNA izolasyonu sonrası agaroz jel görüntüsü	25
Şekil 3.7. Kullanılan PCR cihazları	28
Şekil 3.8. <i>ah FAD2A</i> ve <i>ah FAD2B</i> için PCR sonrası örnek jel görüntüsü	30
Şekil 3.9. <i>ara h 1.01</i> ve <i>ara h 1.02</i> için PCR sonrası örnek jel görüntüsü	30
Şekil 3.10. Tezde kullanılan jel görüntüleme sistemleri.....	31
Şekil 3.11. Fragment Analyzer™ cihazı.....	32
Şekil 3.12. PCR işlemi sonrası üste mutasyon taşımayan homodupleks yapı.....	32
Şekil 3.13. Enzimatik kesim için karışımların hazırlanması ve aktarılması	33
Şekil 3.14. Fragment Analyzer™ yazılımı “Solution Levels” menüsü	34
Şekil 3.15. Fragment Analyzer™ yazılımı “Prime” menüsü.....	34
Şekil 3.16. Fragment Analyzer™ yazılımı “Separation Setup” menüsü	35
Şekil 3.17. Fragment Analyzer™ yazılımı “Separation Setup” menüsünden açılan “edit” penceresi	35
Şekil 3.18. Analizin başlatılması	36
Şekil 4.1. Mutasyonun bitkiler üzerindeki yıkıcı etkileri	38
Şekil 4.2. <i>ah FAD2A</i> geni için %0,4 EMS’li M ₂ genotiplere ait sanal jel görüntüsü	40
Şekil 4.3. <i>ah FAD2A</i> geni için %0,4 EMS’li A12 kuyucuğunun PROSize™ programında ayrıntılı görüntülenmesi.....	41

Şekil 4.4 <i>ah FAD2A</i> geni için %1,2 EMS’li M ₂ genotiplere ait sanal jel görüntüsü	42
Şekil 4.5. <i>ah FAD2B</i> geni için %0,4 EMS’li M ₂ genotiplere ait sanal jel görüntüsü	43
Şekil 4.6. <i>ah FAD2B</i> geni için %1,2 EMS’li M ₂ genotiplere ait sanal jel görüntüsü	44
Şekil 4.7. <i>ah FAD2B</i> geni için %1,2 EMS’li A7 kuyucuğunun PROSize™ programında ayrıntılı görüntülenmesi	45
Şekil 4.8. <i>ah FAD2B</i> geni için %1,2 EMS’li A8 kuyucuğunun PROSize™ programında ayrıntılı görüntülenmesi	46
Şekil 4.9. <i>ara h 1.01</i> geni için %0,4 EMS’li M ₂ genotiplere ait sanal jel görüntüsü	47
Şekil 4.10. <i>ara h 1.01</i> geni için %1,2 EMS’li M ₂ genotiplere ait sanal jel görüntüsü	48
Şekil 4.11. <i>ara h 1.01</i> geni için %1,2 EMS’li B2 kuyucuğunun PROSize™ programında ayrıntılı görüntülenmesi; a) B2 kuyucuğuna ait grafikte peak noktaları ...	49
Şekil 4.12. <i>ara h 1.01</i> geni için %1,2 EMS’li B12 kuyucuğunun PROSize™ ‘programında ayrıntılı görüntülenmesi	50
Şekil 4.13. <i>ara h 1.02</i> geni için %0,4 EMS’li M ₂ genotiplere ait sanal jel görüntüsü	51
Şekil 4.14. <i>ara h 1.02</i> geni için %0,4 EMS’li A10 kuyucuğunun PROSize™ ‘programında ayrıntılı görüntülenmesi	52
Şekil 4.15. <i>ara h 1.02</i> geni için %0,4 EMS’li G10 kuyucuğunun PROSize™ programında ayrıntılı görüntülenmesi	53
Şekil 4.16 <i>ara h 1.02</i> geni %1,2 EMS’li M ₂ genotiplere ait sanal jel görüntüsü	54
Şekil 4.17. <i>ara h 1.02</i> geni için %1,2 EMS’li C6 kuyucuğunun PROSize™ programında ayrıntılı görüntülenmesi; a) C6 kuyucuğuna ait grafikte peak noktaları ...	55
Şekil 4.18. Potansiyel mutant genotipler	57
Şekil 4.19. %1,2 EMS ile muamele edilmiş 339 numaralı genotipin <i>ah FAD2B</i> gen bölgesinin 480. bazındaki SNP	57
Şekil 4.20. Kontrol NC-7 çeşidine ait <i>ah FAD2B</i> gen bölgesi için dizileme	58
Şekil 4.21. %0,4 EMS ile muamele edilmiş 547 numaralı genotipin <i>ah FAD2A</i> gen bölgesinin 336. bazındaki SNP	58
Şekil 4.22. Kontrol NC-7 çeşidine ait <i>ah FAD2A</i> gen bölgesi için dizileme	59

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. <i>Arachis hypogaea</i> 'nın alttürleri, botanik varyeteleri ve agronomik tipleri ..	4
Çizelge 3.1. 2018 yetiştirme sezonu meteorolojik verileri	20
Çizelge 3.2. Mutasyonların tespiti için izlenen aşamalar	25
Çizelge 3.3. %0,4 EMS uygulanmış bitkilerin DNA'ların 96'lık plakaya 4'lü bulklama listesi	26
Çizelge 3.4. %1,2 EMS uygulanmış bitkilerin DNA'ların 96'lık plakaya 4'lü bulklama listesi	27
Çizelge 3.5. Tez çalışmasında kullanılan primeler ve dizileri	28
Çizelge 3.6. Tez çalışmasında yürütülen PCR protokolü ve solüsyon oranları.....	29
Çizelge 3.7. DNF-910-K1000T Kit içeriği	32
Çizelge 3.8. Heterodupleks ürünlerin oluşması için uygulanan PCR programı	33
Çizelge 3.9. Thermo Scientific GeneJET Gel Extraction Kit İçeriği	36
Çizelge 4.1. Dizilemeye gönderilen genotipler.....	56

1. GİRİŞ

Kültürü yapılan yerfıstığı (*Arachis hypogaea* L.) önemli bir yağ ve protein kaynağıdır. Ayrıca yetiştirildiği ülkelerde çiftçiler için mühim bir gelir kaynağıdır. Baklagiller familyasına ait olan bu bitki, 40° Kuzey ve 40° Güney enlemleri arasında 100'den fazla ülkede yetiştirilmektedir (Liao ve Holbrook 2007). 2017 yılı için küresel üretim miktarı yaklaşık 120 ülkede 27,9 milyon hektar (mil. ha) alandan elde edilen 47,1 milyon ton (mil. t) üründür. Asya kıtası en önemli üretim bölgesidir. Bu bölgedeki Çin ve Hindistan 2017 yılında sırasıyla, 17,1 mil. t ve 9,2 mil. t üretim miktarları ile küresel üretime önemli derecede katkı sağlamaktadırlar. Asya kıtasından sonra Afrika kıtası ikinci büyük yerfıstığı üretim bölgesidir. Bu bölgede ise Nijerya 2,4 mil. t ve Sudan 1,6 mil. t üretimleriyle bölgedeki önemli üreticilerdir. Afrika kıtasını ise üretim miktarı bakımından Amerika kıtası izlemektedir. Amerika kıtasında da Amerika Birleşik Devletleri 3,2 mil. t ve Arjantin 1,0 mil. t üretim değerleri ile bölgenin önemli yerfıstığı üreten ülkeleridir (FAO 2019). Asya ve Afrika'da yerfıstığı çoğunlukla kaynakları dar olan çiftçiler tarafından yetiştirilir. Yerfıstığı yetiştiriciliği ABD ve Avustralya gibi birkaç ülkede mekanizasyon ile gerçekleştirilirken diğer ülkelerde elle yapılmaktadır (Liao ve Holbrook 2007). Yerfıstığı verimi bölgeden bölgeye, ülkeden ülkeye olmak üzere çok değişkenlik göstermektedir. Afrika kıtası en büyük ikinci yerfıstığı üreticisi konumunda olmasına rağmen ortalama 1 t/ha verimi ile Asya (2,1 t/ha) ve Amerika'ya (3,7 t/ha) kıyasla en düşük verim ortalamasına sahiptir. Batı Afrika'da, Nijer'in yerfıstığı verimi 0,5 t/ha iken, Senegal ve Nijerya'da ise 1,0 t/ha'dır. Özellikle bu kıtada ülkeden ülkeye çok büyük verim farklılıkları bulunmaktadır. Asya'da ise Çin'in yerfıstığı verim ortalaması 3,7 t/ha olmasına karşın bu değer Hindistan'da 1,7 t/ha'dır (FAO 2019). Küresel yerfıstığının %90'nının üretildiği bölgeler yağışların öngörülemez olduğu yarı kurak tropik bölgeler olup bu bölgelerdeki sık kuraklık durumları verimdeki dengesizliğin önemli nedenlerinden biri olarak gözükmektedir. Doğal olarak yerfıstığı yağışlı sezonlarda yetiştirilmeye çalışılır ve yılda bir kez ekilebilmektedir. Ancak Asya'da iklimin el verdiği durumlarda (uygun sıcaklıklarda) sulama yapılarak ya da uygun toprak nemi ile yerfıstığı yılda iki veya üç kez ekilebilmektedir (Nigam ve Aruna 2008). Dwivedi vd. (2003)'e göre, küresel yerfıstığının üretiminin yaklaşık %53'ü yağ üretimi için, %32'si gıda amaçlı tane üretimi için, geriye kalan %15'i de tohum üretiminde ve hayvan beslemesinde kullanılmak üzere değerlendirilmektedir (Liao ve Holbrook 2007). Bu oranlara bakılarak, yerfıstığı bitkisinin önemli bir yağlı tohum bitkisi olduğu söylenebilir. Liao (2001)'e göre, yerfıstığının mevcut bu kullanım oranlarında yakın gelecekte çok fazla değişiklik göstermesini beklenmemektedir.

Ülkemizde yerfıstığı son on yılda (2009 yılında ülkemizde 25,3 bin ha alandan 90 bin t ürün alınmıştır) üretimini yaklaşık ikiye katlayarak 2018 yılında 44,3 bin ha alandan 3,9 t/ha verim alınmıştır. En fazla yerfıstığı üretimi (Türkiye'nin yaklaşık %84'nün) Adana ve Osmaniye illerinde gerçekleşmektedir. Bu iki ilin 2018 üretimleri sırasıyla 98,8 bin ton ve 47,6 bin tondur (TÜİK 2019). TÜİK verilerinden de anlaşılacağı üzere ülkemizde yerfıstığı Akdeniz ikliminin etkisinde kalan bölgelerde yetiştirilmektedir. Bu bölgelerde sulu tarımla kültür yapılmaktadır. Toprak bakımından drenajlı, havalanması iyi, tınlı kum veya kumlu tın bünyede, orta düzey organik maddeli ve pH'sı 6.0-6.4 arasındaki topraklarda iyi yetiştirilebilmektedir (Kadiroğlu vd. 2011). Ana ürün olarak 10 Nisan ile 20 Mayıs tarihleri arasında ekilmekte, ikincil ürün olarak

ise en geç 15 Hazirana kadar ekilebilmektedir(Kadiroğlu 2008). Ülkemiz 2017 yılındaki 165,3 bin t yerfıstığı üretimi ile küresel üretiminin (47,1 mil. t) sadece %0,35'ini karşılayabilmektedir (FAO 2019). Diğer gelişmekte olan ülkelerde olduğu gibi ülkemizin de yenilebilir yağ açığı bulunmaktadır ve açığın kapatılmasında yerfıstığı kilit bir rol oynayabilir.

Kültürü yapılan yerfıstığı (*A. hypogaea* L.) Güney Amerika kökenlidir ve bu kıtadan evrimleşmiştir. Krapovickas ve Gregory (1994) *A. hypogaea* L. için Güney Amerika'da 6 farklı bölgeyi orijin merkezi olarak tanımlamışlardır. (1) Guarani (Paraguay-Parana), (2) Yukarı Amazon ve Peru'nun batı sahilleri, (3) Brezilya'nın Goiás ve Minas Gerais Bölgeleri, (4) Brezilya'nın Rondonia ve Mato Grosso'nun kuzeybatı bölgesi, (5) Bolivya güneybatı Amazon ve (6) Brezilya'nın kuzeydoğusu (Liao ve Holbrook 2007). Kültür yerfıstığı tetraploid bir türdür ve *Fabaceae* familyası, *Aeschynomeneae* oymağı, *Stylosanthinae* altoymağının *Arachis* cinsindendir (Nigam ve Aruna 2008). *Arachis* cinsine ait bitki türlerine has toprak üstü çiçeklenmelerine rağmen meyve gelişimlerinin toprak altında gerçekleşmesi karakteristiği bu cins üyelerini neredeyse diğer tüm bitki türlerinden ayırmaktadır (Liao ve Holbrook 2007). Hammons (1982), kültür yerfıstığının 1753 yılında Linnaeus tarafından *Arachis* (arachos yunanca "ot" demektir) ve *hypogaea* (yunanca "yeraltı odası" anlamına gelmektedir) şeklinde adlandırıldığını bildirmiştir (Liao ve Holbrook 2007). *Arachis* cinsinin tanımlanmış 80 türü vardır ve tetraploid ($2n=4x=40$), diploid ($2n=2x=20$) ve aneuploid ($2n=2x=18$) kromozom sayılarına sahip türlerin oluşturduğu 9 alt cins bölüme ayrılmıştır (Liao ve Holbrook 2007). Krapovickas ve Gregory (1994) tarafından bu dokuz bölüm hakkında kısaca şu tanımlamalar yapılmıştır:

- ***Arachis* Bölümü:** Yaprakları dört yaprakçık şeklindedir, dik veya yarı yatık büyüme gösterir, gineforlar yaklaşık 45°lik açıyla toprağa girerler. Bitkileri tek veya çok yıllık olabilir. $2n=4x=40$ veya $2n=2x=20$ kromozom sayıları vardır. Bölümün tipik türü *A. hypogaea* L. ($2n=4x=40$).
- ***Caulorrhizae* Bölümü:** Yaprakları dört yaprakçık şeklindedir. Boğum yerlerinde kök/köklerin başlangıçları olan gövdelere sahiptir. Bitkileri çok yıllıktır. $2n=2x=20$ kromozom sayıları vardır. Bölümün tipik türü *A. repens* Handro.
- ***Erectoides* Bölümü:** Yaprakları dört yaprakçık şeklindedir, dik veya yarı yatık büyüme gösterir. Çiçekler ve meyve genel olarak bitkilerinin tabanında gruplaşmaktadır. Çoğu türünde gelişmiş lateral kökler vardır. Bitkileri çok yıllıktır. Bazı gineforları 1 metre veya daha uzun olabilmektedir. $2n=2x=20$ kromozom sayıları vardır. Bölümün tipik türü *A. benthamii* Handro.
- ***Extranervosae* Bölümü:** Yaprakları dört yaprakçık şeklindedir. Kökleri farklı boyut ve şekillerdedir (genellikle silindirik). Bayrak taç yaprağı arka tarafında kırmızı çizgiler taşır ve tüm çiçekleri daha geniş taç yapraklı tipik baklagiller çiçeklerdir. Bitkileri çok yıllıktır. $2n=2x=20$ kromozom sayıları vardır. Bölümün tipik türü *A. prostrata* Benth.
- ***Heteranthae* Bölümü:** Yaprakları dört yaprakçık şeklindedir. Bayrak taç yaprağı önünde veya her iki tarafında kırmızı çizgiler taşır. Çiçekleri dimorfiktir, normal ve açık veya küçük ve kapalı olmak üzere. Çiçeklerinin taç yaprakları küçüktür

ve çanak yaprakları geçmez. Bitkileri tek veya iki yıllık olur. $2n=2x=20$ kromozom sayıları vardır. Bölümün tipik türü *A. dardani* Krapov. & W.C.Gregory(= *Ambinervosae* Krap. et Greg. nom. und.).

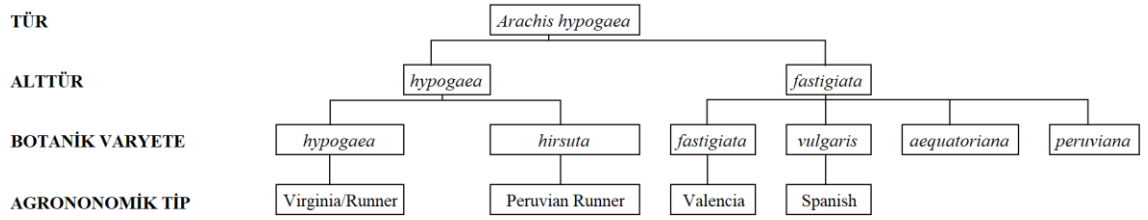
- *Procumbentes* Bölümü: Yaprakları dört yaprakçık şeklindedir. Gövdelerinin boğum aralarında kökler oluşur. Gineforları kalındır, yataydır ve çoğu durumda uzundur. Bitkileri çok yıllıktır. $2n=2x=20$ kromozom sayıları vardır. Bölümün tipik türü *A. rigonii* Krapov. & W.C. Gregory.

- *Rhizomatosae* Bölümü: Yaprakları dört yaprakçık şeklindedir. Bitkileri rizomludur. Bitkileri çok yıllıktır. $2n=2x=20$ (Ser. *Prorhizomatosae*), $2n= 4x= 40$ (Ser. *Rhizomatosae*) kromozomludur. Bölümün tipik türü *A. glabrata* Benth.

- *Trierectoides* Bölümü: Yaprakları üç yaprakçık şeklindedir. Hipokotil tuberiformdur. Bitkileri dik gelişir. Çiçekler ve meyveler bitki ana gövdesinin tabanında yoğunlaşmıştır. Gineforlar çok uzundur, yatay ve yüzeysel gelişir. Bitkileri çok yıllıktır. $2n=2x=20$ kromozom sayıları vardır. Bölümün tipik türü *A. guaranitica* Chodat & Hassl.

- *Triseminatae* Bölümü: Yaprakları dört yaprakçık şeklindedir. Meyveleri iki veya dört segmentlidir. Yan dallarıyla birlikte çiçekleri ve meyveleriyle yarı dik gelişir. Bayrak taç yaprağı her iki tarafında kırmızı çizgiler taşır. Kotiledonlar yukarı yüzlerinde çıkıntılar bulundurur. Bitkileri çok yıllıktır. $2n=2x=20$ kromozom sayıları vardır. Bölümün tipik türü *A. triseminata* Krapov. & W.C. Gregory.

Krapovickas ve Gregory (1994)'e göre bu bölümler seksüel uyumluluk, morfolojik, sitogenetik özellikler ve coğrafik dağılımlara göre düzenlenmiştir. Ayrıca seksüel uyumluluk hakkındaki bilgilerin, cins içerisindeki gen havuzlarında yapılan çok sayıdaki melezleme çalışmalarının sonucu oluşturulduğunu belirtmişlerdir (Rami vd. 2014). Kültürü yapılan yerfıstığı (*Arachis hypogaea* L.) vejetatif ve generatif organlarının ana dal ve yan dalları üzerindeki dağılımları ile dallanma tiplerindeki farklılıklara göre *hypogaea* ve *fastigiata* olarak iki alttüre ayrılmaktadır (Krapovickas ve Gregory 1994). Alttür *hypogaea*'da, ana aksil çiçeksizdir ve yan dallar üzerinde generatif ve vejetatif boğumlar düzenli alternatif şeklindedir. *hypogaea* alttüreine ait çeşitler genellikle geç olgunlaşır ve hasat sonrası tohumları dormansi gösterir (Nigam ve Aruna 2008). Bu alttür *hypogaea* ve *hirsuta* olarak iki botanik varyeteye ayrılır. *hirsuta* varyetesi daha tüylü yaprakçıkları ve daha uzun yaşam döngüsü ile farklılık göstermektedir. *hypogaea* için "Virginia/Runner", *hirsuta* için "Peruvian/Runner" agronomik tipler şeklinde sınıflandırılmıştır (Rami vd. 2014). *fastigiata* alttüreünün ana aksili çiçeklidir ve yan dallar üzerinde generatif ve vejetatif boğumlar düzensiz şekilde sıralanmaktadır. *fastigiata* alttüreine ait çeşitler genelde erkencidir ve hasat sonrası tohum dormansisi göstermez (Nigam ve Aruna 2008). Bu alttür de 4 botanik varyete ayrılmaktadır: *fastigiata*, *vulgaris*, *aequatoriana* ve *peruviana*. İlk ikisinin ekonomik değeri daha çoktur ve bunların agronomik tipleri sırasıyla "Spanish" ve "Valencia"dır" (Rami vd. 2014). Çizelge 1.1.'de *Arachis hypogaea*'nın alttürleri, botanik varyeteleri ve agronomik tipleri gösterilmektedir.

Çizelge 1.1. *Arachis hypogaea* 'nın alttürleri, botanik varyeteleri ve agronomik tipleri

Liao ve Holbrook (2007) tarafından bildirildiğine göre *Arachis* türlerinin kromozomları 1,4 ile 3-9 μ m boyutlarında küçük kromozomlardır ve birçok türü karyotiplenmiştir (Stalker ve Dalmacio 1981; Singh ve Moss 1982; Stalker 1985, 1991; Lavia 1998). Tetraploid türleri *Arachis* bölümünde (*A. hypogaea* ve *A. monticola* Krapov. & Rigoni), *Extranervosae* bölümünde ve *Rhizomatosae* bölümünde bulunur. Poliploidin farklı zamanlarda birbirinden bağımsız şekilde evrildiği ve diploitlerin tetraploitlere göre daha eski olduğu düşünülmektedir (Smartt ve Stalker 1982). *Arachis* bölümündeki bitkilerden asimetrik kromozom yapısı gösteren *A. glandulifera* Stalker hariç, diğerlerinde metasentrik kromozom yapıları görülmektedir (Stalker 1991). Karyotip olarak, 6 kromozomu birbirleri benzemektedirler, 7. kromozomun nükleos organizatör bölgesi farklı pozisyonda bulunmaktadır. Diğer 3 kromozomda da yapısal olarak birçok farklılıklar vardır (Bharathi vd. 1983; Kirti vd. 1983; Jahnavi ve Murty 1985). *Erectoides*, *Extranervosae* ve *Triseminatae* bölümündeki türlerin, *Arachis* ve *Rhizomatosae* bölümlerindekilere göre daha eski olduğu düşünülmektedir (Liao ve Holbrook 2007). *Arachis* bölümünde *A. hypogaea* dâhil 27 türün tanımlaması yapılmıştır. *Arachis* bölümündeki 3 genomun tanımlaması şu şekilde yapılmıştır; A genomu çoğu türde bulunmaktadır; B genomu *A. batizocoi* Krapov. & W.C. Gregory, *A. ipaensis* Krapov. & W.C. Gregory, *A. cruziana* Krapov., W.C. Gregory & C.E. Simpson (Burow vd. 1996), *A. williamsii* Krapov. & W.C. Gregory (Lavia 1996; Tallury vd. 2001), *A. hoehnei* Krapov. & W.C. Gregory, *A. magna* Krapov., W.C. Gregory & C.E. Simpson türlerinde; D genomu *A. glandulifera* türünde bulunmaktadır (Stalker, 1991). *Rhizomatosae* bölümündeki tetraploitlerin genomları, *Erectoides* ve *Arachis* bölümündekiler ile benzerlikler göstermektedir (Stalker, 1981). Rami vd. (2014) tarafından bildirildiğine göre, tür içerisindeki en yaygın genom tipi A genomudur. Bu genomun karakteristiği, boyutları küçülmüş kromozom çiftinin olması ve kromozomların yoğun bir sentromerik bandıyla birleşmesidir (Husted 1936; Seijo vd. 2004). Bir sonraki en yaygın olan genom tipi B'dir. Bu genomun da karakteristiği, küçük kromozom çiftinin olmaması ve sentromerik bölgedeki DNA yoğunluğunun daha düşük olmasıdır (Robledo ve Seijo 2010). Kültürü yapılan yerfıstığındaki (*A. hypogaea* L. - genom AABB) A ve B genomlarının, *A. duranensis* (A genomu) ve *A. ipaensis* (B genomu) türlerinden gelmektedir (Hilu ve Stalker 1995). Moleküler veriler, kültür yerfıstığının tek bir olay sonucu (doğal hibridizasyonundan) evrimleştiğine, diğer türlerden introgresyonun ise sınırlı olduğuna işaret etmektedir (Kochert vd. 1996). *A. monticola*, *Arachis* bölümündeki bir diğer tetraploid türdür ve Stalker ve Simpson (1995)'e göre, bu türün *A. hypogaea*'nın atasından ziyade onun çalı formundan türemiştir (Liao ve Holbrook 2007). Raina ve Mukai (1999), kültür yerfıstığının yabani türleri arasındaki ilişkilerini, evrimini ve genom düzenini incelemek için yaptıkları genomik *in situ* hibridizasyon çalışmasında, *A. hypogaea* ve *A. monticola*'nın allopoloid doğasını teyit etmişlerdir. Elde ettikleri bu sonuçlar, *A. monticola* ve *A. hypogaea*'nın

birbirlerini çok yakın olduğu görüşü ile *A. villosa* ve *A. ipaensis*'in tetraploid türlerin diploid ataları olduğu görüşlerini desteklemektedir (Liao ve Holbrook 2007).

Kültürü yapılan yerfıstığı kazık köklü, yere dik olacak şekilde 30 ile 60 cm arasında boylanan, yere paralel olacak şekilde ise 40-50 cm uzayabilen bir bitkidir. Çiçekleri sarı renkli olup, generatif dallarda yani vejetatif olmayan dallar üzerinde yer alır. Çiçek yapısı klasik baklagiller ailesine ait bitkilerinkindendir. En dışta 5 adet çanak yaprak, bunun içerisinde 2 adet kayıkçık, 2 adet kanatçık ve 1 adet bayrak yaprak bulundurulur. Her bir çiçeği 10 adet erkek organı ve 1 adet dişi organ bulundurulur (Kadiroğlu 2013). Nigam ve Aruna (2008) tarafından bildirildiğine göre, bitkinin yaprakların aksilinde çiçek durumu teşekkül eder. Çiçek durumu, basit veya birleşik monopodi olabilir ve her bir çiçek durumu en fazla 5 çiçek barındırır. Genelde, herhangi bir zamanda çiçek durumu başına sadece bir çiçek açar. Çiçeklenmenin başlaması gün uzunluğundan bağımsızdır. Ancak kısa gün koşulları veya ortalama sıcaklığın 30°C'ye çıktığı durumlar, çiçek sayısını artırır (Bagnall ve King 1991). Kültürel uygulamalara, çeşide ve iklim koşullarına bağlı olmak üzere yerfıstığında çiçeklenme en erken ekimden 17-18 gün sonra başlayıp 85-100 gün sürebilir (Smith 1954). *hypogaea* alttüründe bitki başına 40-250 çiçek (Seshadri 1962); *fastigiata* alttüründe ise bitki başına 95-148 çiçek görülebilir (Sastri vd. 1985). Ancak çiçeklerin sadece %8 ile %20'si kapsül oluşturur (Cahaner ve Ashri 1974; Sastri vd. 1985). Erken oluşan çiçeklerin büyük bir kısmı kapsül bağlar (Gregory vd. 1951; Cahaner ve Ashri 1974). Erken oluşan kapsüller de daha hızlı büyür ve daha fazla tohum ihtiva ederler (Williams 1979). Çiçeklerin çoğu kendine döllendir, yabancı tozlaşma nadirdir. Polen tüplerinin ovaryuma ulaşp, döllenmeyi başlatması, tozlaşmadan 10-18 saat sonra gerçekleşir (Smith 1956). Döllenmeden sonra çiçekler hızlıca solar ve ovaryumdan gelişen meristematik hücreler ginefor olarak adlandırılan sapa benzer yapılar oluşturur, bu yapı jeotropiktir yani yerçekimi yönünde ilerler. Embriyo gelişimine bağlı olarak gineforlar ilk başta yavaş büyürler ama sonra hızlanırlar. Gineforun ucunda genellikle iki adet (botanik varyeteye bağlı olarak üç veya beş olabilir) dölllenmiş ovül bulunur. Gineforun geliştiği dönemde embriyo 8-12 hücreli devresinde ve durgun olduğu evrededir (Pattee ve Mohapatra 1987). Gineforların büyümesi toprağa girinceye kadar devam eder (dölllenmeden 8-14 gün sonraya kadar). Toprağa ulaştığında fiziksel olarak uyarılır ve ginefor kapsüle doğru dönüşmeye başlar (Zamski ve Ziv 1976). Bu evrede, ovül ve embriyo büyümesi başlar. Embriyolar tohumlara dönüşürken, ovül de daha sonra kuru ve kırılğan olacak kabuğa dönüşür. Spanish genotiplerde (varyete *vulgaris*) kapsüller 7 hafta sonra hasata hazır olur; Virginia genotiplerde (büyük tohumlu tipi varyete *hypogaea*) toprak altı gelişiminin 11'inci haftasından sonra olgunlaşır (Schenk 1961).

Yerfıstığı tohumları, %48-50 arasında yağ ve %26-28 arasında protein içermektedir. Aynı zamanda mineral, vitamin ve lif kaynağı açısından da zengindirler. Tohumları ham, kavrulmuş veya kaynatılmış olarak tüketilebilir; yerfıstığı ezmesi, sos olarak veya birçok şekerleme türünün hazırlanmasında kullanılabilir. Yağı çıkarıldıktan sonra kalan posası yem sanayisinde değerlendirilir. Kabuklarından yakıt olarak, yem sanayisinde dolgu ve ayrıca kutu yapımında katkı maddesi olarak yararlanılabilir. Baklagiller familyasından bir bitki olmasından dolayı toprağa nitrojen bağlar. Küçük çiftlik işletmeleri için hem gelir hem de gıda kaynağıdır (Nigam ve Aruna 2008). Yerfıstığının insan sağlığı üzerine olumlu etkilerinin olduğu ve ayrıca yüksek besin değerleri sayesinde yetersiz çocuk beslenmesinde kullanılabileceği belirtilmiştir (Briend

2001). Bu yüzden bu bitki gelişmemiş ve gelişmekte olan ülkelerde açlığa karşı mücadelede de stratejik bir bitki olabilir. Yerfıstığına varyete geliştirmek için genetik ilerlemelerin kritik bir rolü vardır. Dünya genelindeki araştırma programlarında, yüksek verimli ve kaliteli tohumluk birinci önceliklidir.

Biyotik ve abiyotik stres faktörlerine dayanıklı yerfıstığı verimliliği artıracaktır ancak ürünün kalitesini artırmaya yönelik geliştirmelere de ihtiyaç vardır. Yerfıstığının gıda kalitesi hakkındaki tüketici endişeleri giderek önem kazanmaya başlamıştır. Yerfıstığı üretim, işleme, depolama ve nakliye sırasında aflatoksin kontaminasyonuna sebebiyet veren *Aspergillus* enfeksiyonuna hassastır. Genel olarak aflatoksin kontaminasyonu yetersiz mücadelenin yapıldığı sıcak tropik ve subtropik bölgelerde daha ciddidir. Bir başka tüketici endişesi de alerjidir. Yerfıstığı proteinleri toplumun yaklaşık %0,6'sında alerjik tepkilere sebebiyet vermektedir (Li vd. 2000). Eser miktar yerfıstığı proteini bile alerjiye sahip kişilerde, ölümcül anafilaktik tepkiler meydana getirebilir (Maleki vd. 2000). Yerfıstığının kuru kavrulması, proteinlerin alerjik özelliklerinin arttırmaktadır. İşlenmiş yerfıstığı yağı normalde protein içermediği için alerjik değildir. Ancak, dünya genelinde uygulanan tohumların soğuk pres yöntemi ile yağının çıkarması, yağ içerisinde proteinlerin kalmasına sebebiyet verebilmekte ve bu durum yemek için kullanılan yağın da alerjik tepkiler oluşturmaya neden olabilmektedir (Liao ve Holbrook 2007). Yerfıstığı yağı genel olarak, %45-50 oranında tekli doymamış yağ asitleri, %30-35 oranında çoklu doymamış yağ asitleri ve %17-18 oranında doymuş yağ asitleri içerir (Gunasekaran ve Pavadaı 2015). Çoklu doymamış yağ asitleri oksidasyona uğramalarından dolayı istenmeyen tatları oluşturma potansiyelleri yüksektir. Yerfıstığı yağının oksidatif bozulması, depolama sırasında kavrulmuş yerfıstığının ve yerfıstığından yapılan şekerlemelerin bozulmasının en önemli sebebidir. Oksidasyon, ana ürün olarak tatsız ve kokusuz hidroperoksitlerin oluşmasına öncülük eder. Hidroperoksitlerin ayrışması da aldehitler ve ketonlar gibi geniş yelpazede birçok bileşimin oluşmasına sebep olur. Bu bileşenler istenmeyen tat ve kokuları meydana getirmektedir. Yerfıstığında linoleik asit içeriği ile yağ asidi kararlılığı arasında güçlü bir negatif korelasyon bulunmaktadır (Gunasekaran ve Pavadaı 2015). Linoleik ve linolenik asitlerin oksidasyonu, oleik aside göre sırasıyla 10 ve 25 kat daha yüksektir (Frankel 1991; Lands 1997). Oleik asit oranı linoleik asit oranına göre daha yüksek olan yağlar, tohum veya yağ olarak kalitesini daha uzun süre koruyabilmektedir. Dolayısıyla çoklu doymamış yağ asit içeriği (linoleik asit) veya yağ içeriğindeki oleik asidin linoleik aside oranı (O/L) yağ kalitesini belirleyen en önemli belirleyici etkidir (Gunasekaran ve Pavadaı 2015). Oksidasyon kararlılığı ve uzun raf ömürlü yerfıstığı ve ürünleri O/L oranını artırarak elde edilebilir (Liao ve Holbrook 2007). Ortalama botanik tipler açısından dragon tipi (varyete *hirsuta*), %51,1 ile en yüksek oleik asit içeriğine sahip tipken, Valencia tipi ise %32,2 ile en düşük olandır (Liao 2001).

Yerfıstığının geleneksel ıslahında çok sayıda melezleme yapmaktaki zorluklar ve melez başına elde edilen döllerin sayısının azlığı ıslah sürecini yavaşlatmaktadır. Bu durum kültürü yapılan genetik kaynaklarla çalışmayı ve bunlardan yararlanmayı sınırlandırmaktadır (Rami vd. 2014). Yabancı diploid türler (*A. monticola* hariç) ile yapılan melezlemelerde ortaya çıkan genetik bariyer, kendine döllenme ve çok az sayıda elit hattın ıslah çalışmalarında kullanılması yerfıstığının çok dar bir genetik varyasyona sahip olmasına neden olmaktadır (Moretzsohn vd. 2004). Bu duruma en iyi örnek,

yerfistiğinin yabancı türlerinin hastalıklara karşı göstermiş olduğu yüksek dayanıklılıklara rağmen kültürü yapılan yerfistiği çeşitlerinde böyle güçlü dayanıklılıklar gözlemlenmemesidir. Ayrıca verim, kuralığa dayanıklılık ve kaliteyi etkileyen karakterler oldukça kompleks karakterlerdir (Rami vd. 2014). Bitki ıslahındaki temel strateji, ıslah edilen materyalden kullanışlı genetik varyasyonu tanımlamak ve seçmektir. Yerfistiğinde istenen özelliklere sahip yerel hatların seçilmesi ve genetik varyasyonun oluşturulması oldukça uzun bir geçmişe sahiptir (Liao 2014). İstenen varyasyonun oluşturulması amacıyla klasik ıslah yöntemlerine alternatif olarak, mutasyon tekniklerinin kullanılması ise etkili bir varyasyon yaratma yöntemidir. Klasik ıslah yöntemleri ile karşılaştırıldığında daha kısa sürede varyasyonunun oluşturulabildiği bu yöntemde, mutasyon yaratmak için iyonize radyasyonlar, ultraviyole ışınlar ve kimyasallar gibi çeşitli mutagenik ajanlar kullanılır. Bu mutagenik ajanlardan, iyonize radyasyonlara ve ultraviyole ışınlara kolay erişimin olamamasından dolayı kimyasal mutagenikler bitki ıslahında varyasyon yaratmak için aktif olarak kullanılmakta, ayrıca nokta mutasyon yaratma potansiyeli yüksek olduğu için bitki ıslahçıları tarafından tercih edilmektedir (Sagel vd. 2016).

Genetik mutasyon güçlü genomik araçlardan bir tanesidir. Bu araç, gen ürününün biyokimyasal fonksiyonları ile bunların *in vivo*'daki rolleri arasında direkt bağlantı kurulmasını sağlamaktadır. Uzun yıllar genlerin tanımlanması yapılmış ve ilgili kısma ait spesifik prosesinde işlevi olmayan mutantların izole edilmesi ve üstünde çalışılması ile gen ürünlerinin fonksiyonları anlaşılmaya çalışılmıştır (ileri genetik). Moleküler biyolojinin ilerlemesiyle, genlerin fonksiyonlarının anlaşılabilmesi için klon genlerde mutasyonların oluşturulması veya tanımlanması gibi farklı birtakım teknikler geliştirilmiştir (tersine genetik). Bitkilerde genom başına çok sayıda resesif mutasyonların indüklenmesi için en fazla kullanılan kimyasal mutagen ajan etil metan sülfanattır (EMS) (Lightner ve Caspar 1998). EMS gibi bir diğer alkilleyici ajan etil nitrozo üre (ENU) de efektif şekilde kullanılmaktadır. İndüklenmiş nokta mutasyonlar, genetik analizlerde çok çeşitli alleller oluşturabilmektedir. EMS mutagenizlerin avantajı, genomda rastgele bir şekilde dağılımlarıdır. Böylece çok sayıda mutasyon özümlemesi, aşırı kollateral DNA zararları oluşmadan elde edilebilmektedir. EMS'nin bunun gibi avantajları olmasına rağmen nokta mutasyonları tespit edebilecek verimli bir teknik olmamasından dolayı yakın geleceğe kadar tersine genetikte efektif şekilde kullanılamamıştır. Bu durum 2000'li yılların başında TILLING (Targeting Induced Local Lesions in Genomes) metodunun geliştirilmesi ile aşılmıştır (Gilchrist ve Haughn 2005). TILLING, bitkilerde önemli karakterleri kontrol eden aday genler ve/veya mevcut genlerdeki farklılıkları belirleyebilme imkânı sağlayan önemli bir moleküler tekniktir. Özellikle mutagen uygulaması sonrası ilgilenilen gen bölgesinde meydana gelen tek baz değişikliklerinin tespitinde kullanılan bu yöntem ile anlamlı ya da anlamsız her türlü lezyon belirlenebilmektedir. İlk defa McCallum vd. (2000) tarafından *Arabidopsis* bitkisinde uygulanan bu metod ile mutagen uygulaması sonrası birçok mutasyon elde edilmiştir. Temel olarak bitki tohumlarına mutagenin uygulanması ve M₂ neslinde elde edilen bitkilerden DNA'nın izole edilmesi ile başlayan bu yöntemin uygulanmasında floresan işaretli primerler ile PCR'lar kurulmakta ve heterodupleks bölgeler *Cell* ya da *EndoI* enzimleri ile kesilmektedir. Kesim işleminin ardından ise çeşitli görüntüleme sistemleri ile mutasyona uğramış bölgeler belirlenebilmektedir. TILLING metodu ile birçok bitkide farklı genlerde mutasyonlar belirlenmiştir (Till vd. 2004; Perry vd. 2009; Stephenson vd. 2010; Sabetta vd. 2011).

Bu tez çalışmasında, yarfıftığı tohumlarına EMS mutageni uygulanarak agro-morfolojik varyasyonun oluşturulması ve bu hatların yarfıftığı ıslah çalışmaları kazandırılması amaçlanmıştır. Ayrıca oluşturulan mutant popölasyonunda yağ asidi sentezinden (*ah FAD2A* ve *ah FAD2B*) ve alerjiniteden (*ara h 1.01*, *ara h 1.02*, *ara h 2.01* ve *ara h 2.02*) sorumlu genlerde meydana gelebilecek mutasyonların TILLING metodu ile belirlenip muhtemel mutasyonlar sonucunda yüksek oleik asitli ve/veya alerjik reaksiyonlara neden olmayan genotiplerin belirlenmesi ve geliştirilmesi hedeflenmiştir.



2. KAYNAK TARAMASI

Till vd. (2007), çeltikte biri EMS diğeri de AZ-MNU (Sodyum Azid + Nitrozo Üre) olmak üzere iki adet mutasyon popülasyonu oluşturup TILLING yöntemini uygulamışlardır. İndüklenmiş mutasyonların tespiti için 0,7 – 1,5 kb büyüklüğündeki hedef bölgeye özel flüorsan boyalı primer etiketleri kullanarak PCR işlemi yapmışlardır. Denatürasyonla heterodupleksleri oluşturmuşlar ve PCR ürünlerini çoğaltmışlardır. Mismatchler ham *CELI* nükleaz ile parçalanmış ve ardından denatüre poliakrilamid jel elektroforez ile kesilmiş ürünleri görüntülemişlerdir. 10 hedef gen taramasında EMS ile muamele edilmiş popülasyonda 27 nükleotid değişikliği, AZ-NMU ile muamele edilmiş popülasyonda ise 30 nükleotid değişikliği tanımlamışlardır. Daha önceki çeltik çalışmalarına kıyasla 2 veya 3 kat daha fazla mutasyon yoğunluğu (yaklaşık 1/300 kb) elde ettiklerini araştırmacılar raporlamışlardır.

Cooper vd. (2008), önemli azot bağlayıcı ve yağ bitkisi olan soya fasulyesinde (*Glycine max* L. Merr.) TILLING çalışması ele almışlardır. Üçü EMS biri de NMU (N-nitrozo -N-metil üre) kullanılarak dört mutasyon popülasyonu oluşturulmuş ve hedeflenen mutasyonları TILLING metodu ile taramışlardır. Yedi hedef gen bölgesi için her bir mutasyonda tarama yapılmış ve 116 adet indüklenmiş mutant bulmuşlardır. NMU ile muamele edilmiş popülasyon ile EMS ile muamele edilmiş popülasyondaki mutasyon frekansları yoğunlukları benzer elde edilmiştir (~ 1/250 kb). Buna karşın diğer iki EMS ile muamele edilmiş popülasyonlarda ~1/550 kb mutasyon frekansı bulunmuştur. Soya fasulyesinin poliploid atasından kaynaklı olarak bazı primerlerin çok iyi çalışmadığı ortaya konmuş ve bunun neticesinde de düşük kaliteli veriler elde edilmiştir. Bu sorunu çözmek için genomik DNA'ları restriksiyon enzimi ile bir ön işleminden geçirip hedef dışı bölgeleri uzaklaştırmışlardır. Kesim işlemi sonrası kesilmemiş PCR ürününe kıyasla fazladan dört mutant allel elde etmişlerdir. Oluşturdukları dört mutasyon popülasyonu ve elde ettikleri kayda değer derecede mutasyon yoğunluğu, soya fasulyesinin yeni nesil mutasyon taraması için oldukça elverişli bir bitki olduğunu ortaya koymuşlardır.

Wang vd. (2008), *Brassica napus* bitkisinde fonksiyonel genomik altyapı ve kolza ıslah çalışmaları için yeni allel varyasyonları oluşturmak amacıyla TILLING çalışması ele almışlardır. Çalışmalarında, yarı kışlık Ningyou7 çeşidi kullanılarak iki EMS mutant popülasyonu oluşturulmuştur. M₂ popülasyonundan gelen mutantların ileri genetik taramalarında çok sayıda yeni fenotipler tanımlamışlardır. Ters genetik taramasında ise kolza tohumunda erüik asit sentezini kontrol eden potansiyel çoklu paralogous geni *FAE1*'e (fatty acid elongase 1) yoğunlaşmışlardır. *B. napus* BAC kütüphanesini ve referans haritalanmış popülasyondaki (TNDH) loci taramasını gerçekleştirmişlerdir. Yaptıkları tarama sonucunda *FAE1*'in iki paralogous kopyasının *B. napus*'un her bir alt genomu A ve C'de bulunduğunu tespit etmişlerdir. Genomda iki veya daha fazla birbirlerine çok benzer gen kopyalarının bulunduğu durumlarda yeni mutasyonların tanımlanabilmesi bir prosedür geliştirmişlerdir. Geliştirdikleri prosedürde, tek bitkilerin TILLING'ini yaparken mevcut SNP'leri pozitif kontrol olarak kullanmışlardır. Her iki paralogous *FAE1* genini eş zamanlı şekilde çoğaltmak için dizayn ettikleri primerlere dayanarak yeni mutasyonları tanımlayabilmişlerdir. Bu prosedürle 1.344 M₂ bitkisinde üçü erüik asit içeriği düşürülmüş olmak üzere 19 adet mutasyonun tanımlamasını gerçekleştirdiklerini araştırmacılar raporlamışlardır.

Xin vd. (2008), en önemli beşinci tahıl bitkisi olan sorgumda (*Sorghum bicolor* L.) bir TILLING çalışması yürütmüşlerdir. Çalışmalarında sorgum genomunun tamamlanması sayesinde fonksiyonel genlerin tanımlanmasının önünün açıldığını ancak genetik kaynakların özellikle de mutant hatların sınırlı olduğunu ifade etmişlerdir. Ayrıca sorgum genomunda kimyasal mutagenlerle mutasyon hatlarının oluşturulması ve agronomik özellikleri bulunan mutant değişikliklerinin taranmasının bu sınırlı genetik kaynaklar için çözüm olduğunu belirtmişlerdir. Bu amaçla araştırmacılar, kendilenmiş BTx623 sorgum hattının tohumlarını EMS mutageni ile muamele etmişlerdir. Bu işlem sonucunda 1.600 adet mutant hattı içeren bir popülasyon oluşturmuşlardır. Daha sonra araştırmacılar, popülasyonun tarla koşullarındaki M₂ ve M₃ hatlarında mutasyonun sebep olduğu morfolojik ve agronomik özelliklerin fenotiplerini gözlemlemişlerdir. Dört adet hedef gen bölgesi kullanan araştırmacılar seçtikleri 768 adet mutantın TILLING ile analizini gerçekleştirmişlerdir. Toplamda beş mutasyonun tanımlanmasını yapmışlardır. Araştırmacılar elde ettikleri mutasyonların karşılık geldiği mutasyon frekansını 1/526 kb olarak hesaplamışlardır. TILLING ile tanımlanmasını yaptıkları mutasyonlardan iki tanesini sekanslama ile doğrulamışlardır ve birbirinden bağımsız iki adet mutant hatta bu mutasyonları “kafeik asit O-metiltransferaz (COMT)” gen bölgesinde tespit etmişlerdir. Araştırmacılar lignin içeriğinin değiştiği ve sindiriminin arttığı özelliklerle ilişkilendirilen yaprak orta damar kahverengileşmesi (brown midrib - *bmr*) fenotipi için bu iki hattın tanımlanmasını gerçekleştirmişlerdir.

Uauy vd. (2009), gıda tüketimi açısından dünyanın birçok bölgesinde önemli bir bitki olan buğdayda (*Triticum ssp.*) bir TILLING çalışması ele almışlardır. Araştırmacılar genetik kaynakların kısıtlılığının, ürün geliştirmede engel oluşturduğunu belirtmişlerdir ve bu durumun, mutasyonların yüksek verimli taramasının yapılabildiği etkili ters genetik yaklaşımı olan TILLING metodu ile kimyasal mutagenlerin sağladığı yüksek mutasyon varyasyonunun birleştirilmesiyle aşılabileceğini ifade etmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar buğdayın poliploidik yapısı nedeniyle yüksek mutasyon yoğunluklarını tolere edebildiğini ve bu yüzden de TILLING için uygun olduğunu vurgulamışlardır. Çalışmalarında durum ve ekmeklik buğdayların mutasyon popülasyonlarını oluşturmuşlardır ve popülasyonlardan elde ettikleri mutant bitkilere TILLING metodu uygulamışlardır. Araştırmacılar çalışmalarını sadeleştirmek ve maliyetleri düşürmek amacıyla heterodupleks yapıları *CJE* (celery juice extract) kullanarak parçalamışlardır ve elde ettikleri parçaları tespit etmek için etidyum bromürlü denatüre olmayan poliakrilamid jel geliştirmişlerdir. Geliştirdikleri bu tespit yönteminin, geleneksel LI-COR taramasına yakın hassaslık gösterdiğini ve geçerli bir alternatif olabileceğini belirtmişlerdir. Hedef genlerinin çoklu homolog kopyalarından kaçınmak için genoma özel primerler geliştirmişlerdir. Her mutant kütüphanesini TILLING yöntemiyle karakterize ederek hem heksaploid popülasyonda (~1/38 kb) hem de tetraploid popülasyonda (~1/51 kb) %50 G:C hedefinde yüksek mutasyon yoğunluğunu tespit etmişlerdir. Araştırmacıların yaptıkları mutasyon frekans hesaplarına göre, %50 G:C içeren 1,3 kb hedef gen bölgesi için 1.536 adet hattın heksaploid için ~52, tetraploid için ise ~39 mutant allel ile sonuçlandığını hesaplamışlardır. Araştırmacılar çalışmalarında, heksaploid ve tetraploid buğdayda 11 hedef gen/genomda toplam olarak 275’in üzerinde yeni allel tanımlaması yapmışlardır ve bunları tohum stoklarına aldıklarını raporlamışlardır.

Martin vd. (2009), moleküler çalışmalar için model bir bitki olan *Arabidopsis thaliana*'da TILLING kaynaklarını artırmak amacıyla bitkinin Landsberg *erecta* (Ler) çeşidini kullanmışlardır. Bu çeşidin tohumlarına EMS mutageniyle muamele etmişlerdir ve bu sayede yeni bir popülasyon oluşturmuşlardır. Farklı EMS konsantrasyonları ile çalışan araştırmacılar kalıcı olarak 3.712 adet M₂/M₃ hattı elde etmişlerdir. Elde ettikleri bu popülasyona TILLer koleksiyonu adını vermişlerdir. Hat başına en yüksek mutasyon frekansını, düşük olmasına rağmen yeterli tohum canlılığına sahip M₁ bitkilerinde sağlamışlardır. Mutantları bulmak amacıyla yaptıkları TILLING çalışmasında, 450 mutanta karşılık gelen 14 adet gende, gen başına 21 ile 46 mutasyon tanımlamışlardır. Ortalama olarak bu mutant hatlarda 89 kb başına 1 mutasyon elde etmişlerdir. Ler popülasyonlarında ise beş milyondan fazla indüklenmiş mutasyon bulduklarını ifade etmişlerdir. Araştırmacılar oluşturdukları TILLer koleksiyonun, diğer *A. thaliana* popülasyonlarına göre iki veya üç kat daha fazla EMS mutasyon frekansına sahip olduğunu raporlamışlardır.

Dierking ve Bilyeu (2009), çalışmalarında TILLING metodunu kullanarak soya fasulyesinde bir mutasyon popülasyonu elde etmişlerdir. Araştırmacılar bu popülasyonda rafinoz sentez ve omega-6 yağ asit desaturaz genleri için yeni allel taraması gerçekleştirmişlerdir. Rafinoz sentez geni RS2'de dört mutasyon tanımlamışlardır; iki mutasyon amino asit mutasyonu ve bir tanesi de tohumdaki oligosakkarit yapısının değişimi ile sonuçlandığını belirtmişlerdir. Fenotiplerde ise tohum sükröz seviyesi artarken rafinoz ve stachyose tohum oligosakkarit seviyesinin düştüğünü gözlemlemişlerdir. FAD2-IA omega-6 yağ asit desaturaz geninde üç mutasyon tanımlamışlardır. Tüm bu üç mutasyon, amino asit mutasyonlarında missense ile sonuçlandığını ifade etmişlerdir ve ayrıca bir tanesinin tohumda oleik asit miktarını artıran, linoleik asit miktarını düşüren yağ asit profil değişikliği ile sonuçlandığını belirtmişlerdir. RS2 allelindeki mutasyonla, rafinoz ve stachyose seviyelerinin düştüğünün ve bunların da besin değerleri olmadığını için bu mutantlarda görülen oligosakkarit değişikliklerinin pozitif olduğunu vurgulamışlardır. Tohum yağ asit fenotipini kontrol eden FAD2-IAallelindeki mutasyon yardımıyla tohum yağındaki oleik asit miktarını artırmışlardır. Araştırmacılar bu fenotipler için geliştirdikleri moleküler markerler ile mutant allellerin aktarımlarının güvenli bir şekilde tespit edilebileceğini dolayısıyla da ıslah çalışmalarında kullanabileceğini raporlamışlardır.

Chawade vd. (2010) önemli tahıllardan bir tanesi olan yulaf (*Avena sativa*) üzerine bir TILLING çalışması yürütmüşlerdir. Çalışmalarında yazlık yulaf çeşidi SW Belinda kullanmışlardır. Bu çeşitten M₂'de 2.600 adet tohum, M₃'te ise 2.550 adet tohum elde etmişlerdir. M₂ popülasyonunu, ilk olarak görsel ve kısa/uzun boylu, erken/geçci, yaprak morfolojisi/kloroz gibi farklı fenotipik gözlemlere göre değerlendirmişlerdir. 1.824 adet M₂ hattından gelen ve floroglusinol/HCl ile boyanan M₃ tohumlarının bir takım potansiyel lignin mutalarına sahip olabileceğini belirtmişlerdir. Çalışmalarının ileri safhalarında bu potansiyel mutantları kantitatif analizler ile teyit etmişlerdir. M₂ popülasyondan gelen genomik DNA'ların RAPD-PCR parmak izi analizinde 1/20 kb mutasyon frekansı; MALDI-TOF analizinde 1/38 kb mutasyon frekansı ve DNA sekanslama analizinde ise 1/22,4 kb mutasyon frekansı hesaplamışlardır. Genel olarak kullandıkları analize göre 20-40 kb başına bir mutasyon frekansı elde etmişlerdir. Çalışmalarında fenilalanin amonyak-liyaz (*AsPAL1*) geninde 6

farklı mutasyon ve selüloz sentez (*AsCslF6*) β -glukan biyosentez geninde ise 10 farklı mutasyon tanımlanmıştır.

Stephenson vd. (2010), *Arabidopsis thaliana* bitkisini içeren *Brassicaceae* familyasına ait önemli bir yağlı tohum bitkisi olan *Brassica rapa*'da TILLING kaynağı oluşturma amacıyla EMS ile mutasyon uygulaması yapmışlardır. Araştırmacılar bu amaçla kolza ile benzer gelişimler gösteren A genomuna sahip diploid *B. rapa* "R-o-18" genotipini kullanmışlardır. Böylece çalışmalarında elde edilecek sonuçların kolza verimi ve yağ kalitesini artırmada faydalanabileceğini belirtmişlerdir. Oluşturdıkları 9.216 adet M₂ popülasyondan DNA çıkarmışlardır ve TILLING için bulmuşlardır. Araştırmacılar 6 adet gen için yaptıkları analizlerde, 60 kb başına bir mutasyon frekansı gibi yüksek seviyede bir frekans elde etmişlerdir. Yaptıkları bu analizlerin sonuçlarına göre, oluşturmuş oldukları popülasyonun sadece üçte birinde (3.072 adet M₂ bitkisi) 1 kb ampikon için yapılacak taramada ortalama 68 adet mutasyon öngörmüşlerdir. Araştırmacılar her bitkinin ortalama ~10.000 mutasyon içerdiğini hesaplamışlardır ve ele aldıkları bitki sayısının fazla olmasından dolayı popülasyonlarındaki mevcut genomlarda GC baz çiftlerinin yaklaşık yarısında mutasyon olduğunu hesaplamışlardır. Diploid *Brassica* türü *B. rapa*'da ilk EMS TILLING kaynağının oluşturulduğunu, popülasyonlarındaki 60 kb başına 1 mutasyon ile yayınlanmış olan TILLING popülasyonları içerisinde en yoğun mutasyona sahip diploid popülasyonun oluşturulduğunu raporlamışlardır.

Dahmani-Mardas vd. (2010), kavun raf ömrünü uzatma amacıyla bir TILLING çalışması yürütmüşlerdir. Araştırmalarında meyvelerin raf ömrünü etkileyen hormonun etilen olduğunu ve etilenin metabolik yolunda rol alan kilit genlerin *Arabidopsis* ve domateste tanımlandığı bildirmişlerdir. Araştırmacılar yaptıkları çalışmada, kavunda etilen biyosentez enzimi ACC oksidaz 1'de iki adet missense mutasyonu tanımlamışlardır, L124F ve G194D. L124F mutasyonunun enzim aktif bölgesinden uzakta olduğunu dolayısıyla da etilen üretimini ve meyve olgunlaşmasında bir etkisi olmadığını belirtmişlerdir. Bunun tersine G194D mutasyonu ise kristalografik analizlerle enzim aktivasyonunu etkilediğini tespit etmişlerdir. G194D mutantının fenotipik analizlerinde meyve olgunlaşmasının ve sararmasının geciktirilerek raf ömrünün uzatıldığı, L124F mutasyonun ise tahmin edildiği gibi meyve raf ömründe bir etkisinin olmadığını raporlamışlardır. Çalışmalarında 4.023 adet M₂ mutant koleksiyonu oluşturmuşlardır. 11 adet genin TILLING'ine göre 1/573 kb mutasyon frekansı ve till kilobaz başına 8 adet allel elde etmişlerdir.

Cho vd. (2010), gama ışınlarıyla mutasyona uğrattıkları çeltik tohumlarından (çeşit Donganbyeo) yaklaşık 15.000 adet M₃ hattında TILLING uygulamışlar, sonrasında seleksiyon yapmışlardır. Çalışmalarında TILLING popülasyonunun genetik çeşitliliğini değerlendirmek amacıyla AFLP çoklu dominant marker tekniğini kullanmışlardır. Toplam 96 adet (%0,64) TILLING hattını rast gele seçmişlerdir aynı zamanda Donganbyeo çeşidini de kontrol amaçlı seçmişlerdir. Araştırmacılar 5 adet primerin kombinasyonunu kullanarak AFLP marker polimorfizmi ile genetik farklılıkları değerlendirmişlerdir. Yapmış oldukları primer kombinasyonlarını kullanarak, 97'den 106'ya kadar ortalama 100,4 loci tespit etmişlerdir. Donganbyeo ve 96 hattın her biri arasında 158 (%31,4) polimorfik loci elde etmişlerdir. Donganbyeo ve 96 hattın arasında %80'den %96'ya kadar ortalama %89 büyük ölçüde benzerlik gözlemlemişlerdir. Yaklaşık 28 polimorfik lociyi klonlamışlardır ve bunların

dizilimlerini, tüm çeltik genom dizilimiyle kıyaslayarak BLAST taraması yapmışlardır. Tarama sonucunda ekson, intron, 1 kb upstream ve 1 kb downstreamleri de içeren gen gövdelerinde 20 uyum elde etmişlerdir. Çeltik psödomolekülleri ile kıyasladıklarında gen kod bölgelerinde 6 polimorfik lociyi tanımlayabilmişlerdir. Araştırmacılar elde ettikleri bu 6 mutasyondan 4'nün loci missense mutasyonu, diğer 2'sinin ise silent mutasyonu olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmalarının sonucunda, TILLING çeltik popülasyonlarının fonksiyonel genomik çalışmalarda ve aynı zamanda mutasyon ıslah uygulamalarında kullanışlı olduğunu raporlamışlardır.

Sabetta vd. (2011), küresel olarak önemli yağlı tohum bitkilerinden biri olan ayçiçeğinde (*Helianthus annuus* L.) ilk TILLING kaynağını oluşturan bir çalışma yürütmüşlerdir. Çalışmalarında, en yüksek mutasyon yoğunluk dengesini bulmak için farklı EMS dozları ve farklı maruz bırakma süreleri ile denemeler yapmışlardır ve kabul edilebilir hayatta kalan bitki oranını tespit etmişlerdir. Sonuçlardan elde ettikleri çimlenme oranlarına göre %0,7'lik EMS dozundan 6 saat bekletme uygulamasını seçmişlerdir. Bu doz ve bekletme süresi ile M₂'de 3.651 adet döllenebilen bitki elde etmişlerdir. Araştırmacılar toplam popülasyonlarının %4,79'unda bariz fenotipik farklılıklar gözlemlemişlerdir. TILLING prosedürünü başarılı bir şekilde ayçiçeği bitkisine uygulamışlardır. Mutasyon uygulamasının etkinliğini belirlemek için pilot 1.152 adet M₂ bitkisinde dört gen için tarama yapmışlardır. Ele aldıkları bu dört genin üçünün yağ asit biyosentezi ile ilgili diğerinin ise ayçiçeği mildiyösüne dayanıklılıkla ilgili olduğunu ifade etmişlerdir. Toplamda 9 mutant hattı sekanslamayla doğrulamışlardır ve toplam mutasyon frekansının da 1/475 kb olduğunu raporlamışlardır.

Knoll vd. (2011), yerfıstığında alerjiye sebep olan proteinlerin düşürülmesi ve oleik asit oranını artırmak amacıyla TILLING çalışması yürütmüşlerdir. Çalışmalarında yerfıstığı kaynaklı alerjik reaksiyonların ölümcül olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca bu alerjiye neden olan proteinlerin, işlenmiş gıda üretimlerin doğası gereği tamamen önlenemediğini belirtmişlerdir. Araştırmacılar bu sorunun çözümünün mutasyon ile alerjiye sebep olan proteinleri ortadan kaldırmak veya değiştirmek olduğunu öne sürmüşlerdir. Bu amaçla araştırmalarında yerfıstığının her bir alt genomunda (Genom A ve B) tanımlanmış olan alerjen genler *Ara h 1* ve *Ara h 2*'yi kullanmışlardır. Allotetraploid yerfıstığında homolog genler arasında ayırım yapmanın zorluğundan dolayı, araştırmacılar etiketsiz primerler kullanmışlardır ve her iki genin çoğaltıldığı iç içe PCR yönetimini yürütmüşlerdir. Sonrasında, gene özel etiketli primerler kullanarak PCR çalıştırmışlardır, PCR sonucu heterodupleks yapıları oluşturmuşlar, *CEL1* nükleaz enzimi ile kesmişlerdir ve fragmentlere birleşen etiketlerin tespiti için elektroforetik analiz yapmışlardır. Çalışmalarında mutagen olarak EMS kullanmışlardır ve 3.420 M₂ bitkisinde 1 SNP/967 kb mutasyon frekansı gözlemlemişlerdir. Çalışmalarında tanımladıkları en önemli mutasyonların *Ara h 2.02*'nin başlangıç kodonundaki bozulma ve *ara h 1.02*'nin bitiş kodonundaki prematüre olduğunu bildirmişlerdir. Bu iki mutasyonu bir sonraki jenerasyonlara homozigot olarak aktarmışlardır ve *ara h 2.02* proteinin ortadan kaldırıldığını doğrulamışlardır. 2D jel analiz sonuçlarına göre çeşitli *ara h 1* protein izoformlarını ortadan kaldırdıklarını veya düşürdüklerini belirtmişlerdir. Araştırmacılar TILLING çalışmalarında ayrıca tohumun oleik/linoleik oranını kontrol eden doymuş yağ desaturaz *ahFAD2* (iki kopya halindedir) genindeki mutasyonları da tanımlamışlardır. *ahFAD2B* proteinin inaktivasyonunu ile sonuçlanan bir frameshift

mutasyonu tanımlamışlardır. *ahFAD2A* geninde normal olarak inaktif enzimlerin fonksiyonlarını düzelter bir mutasyon tahmin ettiklerini raporlamışlardır.

Slade vd. (2012), gıda tüketiminde çok önemli bir yeri olan buğday (*Triticum spp.*) üzerinde bir TILLING çalışması yürütmüşlerdir. Çalışmalarında buğdayın amiloz seviyesini yükseltmeyi amaçlamışlardır. Çalışmalarında yüksek amiloz ve yüksek dirençli nişasta arasında pozitif bir korelasyon bulunduğunu bunun da özellikle diyabet hastalığı ve obezite ile mücadelede insan sağlığı açısından yararlı olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar TILLING kullanarak, direkt fenotipik seleksiyonlara ihtiyaç duyulmadan, yeni gen varyasyonları tanımlanabileceğini belirtmişlerdir. Çalışmalarında tetraploid durum buğdayındaki A ve B genomlarında ve heksaploid ekmeklik buğdayındaki A, B ve D genomlarında yeni genetik varyasyonlar tanımlamışlardır. Nişasta dallandırma enzim Ila geninde (*SBEIIa*) tek nükleotid polimorfizmleri (SNPs) formundaki mutasyonları tespit etmişlerdir. Bu *SBEIIa* genindeki yeni alleller ile ıslah çalışmalarını birleştirdiklerinde, yabani tip buğdaylara kıyasla %47-55 oranında amiloz içeren ve nişasta dallandırması artırılmış daha yüksek amiloz içerikli durum ve ekmeklik buğday çeşitleri elde etmişlerdir. Yüksek amiloz içerikli bu hatları kütle spektrometresi ile incelediklerinde, *SBEIIa* RNA gen ifadelerinin azaldığını, nişasta granül morfolojisinde ve nişasta granül protein yapılarında değişiklikler olduğunu raporlamışlardır. Araştırmacılar bu çalışmaları ile buğday gibi daha komplike bir genom yapısına sahip bir bitkide, transgenik modifikasyonlar olmadan TILLING kullanılarak yeni özellikler geliştirilebileceği bildirmişlerdir.

Chen vd. (2012), ekmeklik buğdayda TILLING çalışması yürütmüşlerdir. Çalışmalarında ekmeklik buğday genomunun karmaşık olmasından dolayı fenotipik taramalara dayanan seleksiyonlar ile istenilen genetik değişikliklerin elde edilemediğini belirtmişlerdir. Araştırmacılar bu sorunun aşılmasında nokta mutasyonların tespitinde etkili bir ters genetik strateji olan TILLING'in çözüm olabileceğini bildirmişlerdir. Ayrıca özellikle de buğdayın poliploidi seviyesi sayesinde yüksek mutasyon yoğunluklarına dayanıklı olduğunu bu yüzden de TILLING için ideal bir bitki olduğunu ifade etmişlerdir. Çalışmalarında Jinmai 47 isimli çeşidi kullanmışlardır ve 2.160 adet mutant M₂popülasyon elde etmişlerdir. Tarla koşullarında M₂ ve M₃ hatlarından birçok farklı morfolojik değişikliklere uğrayan fenotipler gözlemlenmişlerdir. TILLING prosedürünü sadeleştirmek ve maliyetini azaltmak için mutasyonların tespitinde, etiketlenmemiş primerler ve denatüre olmayan poliakrilamid veya agaroz jel kullanmışlardır. Geliştirdikleri bu prosedürün etkinliğini, 300 ve 512 adet mutant hatta belirledikleri 3 adet gen için RAPD ve Intron-spliced junction (ISJ) primerli PCR kullanarak test etmişlerdir. RAPD/ISJ ile 1/34 kb ve TILLING ile 1/47 mutasyon frekansı gibi yüksek bir değer elde etmişlerdir. Belirlemiş oldukları 3 gende toplamdan 31 yeni allel tanımlamışlardır ve bunları sekanslama ile doğrulamışlardır. Araştırmacılar elde ettikleri sonuçlarla, buğday araştırmalarında kullanışlı mutant popülasyonlarının oluşturabileceğini ve yeni allellerin tanımlanabileceğini raporlamışlardır.

Reddy vd. (2012), gıda harici ticari olarak kullanılan tütün bitkisinde TILLING çalışması yürütmüşlerdir. Çalışmalarında tütünde ekonomik olarak yaprak verimliliğinin önemli olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar yaprak verimliliği ve metabolik özellikler elde etmek amacıyla EMS kullanarak TILLING popülasyonu oluşturmuşlardır. DNA ve tohum kütüphanelerini 7.800 adet M₂ bitkisinden

hazırlamışlardır. Mutasyon taraması için 3.072 adet M₂ bitkisinden elde ettikleri ampliconların 3D bulklaması ile yüksek çıktılı dizileme teknolojinin kombine etmişlerdir. Yaprak biyokütlesi ile potansiyel ilişkisi olabilecek genlerde (*NtFW2.2* ve *NtLS*) ve ikincil metabolizm genlerinde (*NtMYB12* ve *NtGGR*) toplamda 7 adet mutasyon tanımlamışlardır. Popülasyonlarındaki mutasyon yoğunluğunun 1/1,423 milyon baz çifti; genom başına da 3.162 mutasyon hesaplamışlardır. *NtFW2.2*'de üç tanesi hariç aday nokta mutasyon tespit etmişlerdir ve bu mutasyonların prematüre stop kodonlarına sebebiyet verdiğini belirtmişlerdir. Araştırmacılar oluşturmuş oldukları popülasyondan yaprak sayısı fazla ve daha geniş yapraklara sahip özellikli mutant hatları seçmişlerdir ve bunları bir sonraki jenerasyonlara aktarmışlardır.

Frerichmann vd. (2013), şeker pancarı (*Beta vulgaris* ssp. *vulgaris* L) üzerine bir EcoTILLING çalışması yürütmüşlerdir. Çalışmalarında genel olarak şeker pancarının ilkbaharda ekilip sonbaharda hasat edildiğini, münavebe ekim sistemlerinde ise şeker pancarının verimliliğini artırmak için sonbahar ekilip, tüm yıl boyunca yetiştirildiğini belirtmişlerdir. Ancak bu münavebe sistemindeki “kışlık şeker pancarı” üretiminde yeterli kış dayanımının ve tohumun kalkmanın kontrolünün önemini vurgulamışlardır. Araştırmacılar, 268 adet *B. Vulgaris* koleksiyonunu, EcoTILLING ile üç adet çiçeklenme zamanıyla ilişkili genler için taramışlardır. Yaptıkları tarla çalışmalarında, şeker pancarlarının tohumun kalkma ve kışa dayanımlarını denemişlerdir. EcoTILLING ile 50 haplotiple sonuçlanan *BTC1*, *BvFL1* ve *BvFT1* genlerinde 20 silent SNPs ve 1 non-synonymous SNP tanımlamışlardır. Ayrıca çalışmalarında, kış öncesi tohumun kalkma ve aynı zamanda kışa dayanımla ilgili *BvFL1*’de nükleotid polimorfizm tespit etmişlerdir. Araştırmacılar yaptıkları çalışma ile şeker pancarında *BvFL1*’in homoloğu *FLC*’nin fonksiyonu hakkında veri elde etmişlerdir. Şeker pancarında genetik farklılığın ve allellerin tespiti için EcoTILLING’in etkili bir metot olduğunu araştırmacılar raporlamışlardır.

Gilchrist vd. (2013), *Brassica napus* bitkisinde EMS ile bir mutasyon popülasyonu oluşturmuşlardır. Bu popülasyondan 3.158 adet hat elde etmişlerdir. Bu hatlar arasından yararlı mutasyonların tespiti için TILLING çalışması yürütmüşlerdir. Çalışmalarında klasik TILLING’te, mutasyona uğratılmış popülasyonunun oluşturulmasına takiben sadece mutasyon taşıyan PCR ürünlerini ayıran mismatche özel endonükleazlar kullanılarak DNA taraması gerçekleştirildiğini belirtmişlerdir. Daha sonra Poliakrilamid gel ile çalışılan gendeki mutasyonların görselleştirildiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar da bahsettikleri bu tekniği kullanmışlardır ve *B. napus*’ta (kanola varyete *DH12075*) 26 farklı gende 432 mutasyon tanımlamışlardır. Lokusa bağlı olarak 1/56 kb’den 1/308 kb’ye kadar ortalama ise 1/109 kb mutasyon frekansı hesaplamışlardır. Ayrıca poliploid türlerde bile yeni nesil DNA dizileme (Next Generation Sequencing) teknolojisinin popülasyondaki nadir mutasyonları tanımlayabilecek efektif bir yaklaşım olduğunu raporlamışlardır.

Sparla vd. (2014), ekiliş alanı ve toplamda hasat edilen miktarı bakımından en önemli dördüncü tahıl olan arpada (*Hordeum vulgare* L.) TILLING çalışması yürütmüşlerdir. Çalışmalarında arpanın endosperm yapısındaki nişastayı incelemişlerdir. Araştırmacılar arpa nişastasının, amiloz ve amilopektinin 1:3 oranında ve farklı boyutlardaki granül yapılarında depolanmasıyla şekillendiğini bildirmişlerdir. Bu granüllerin, B-granülleri ve A-granülleri olmak üzere iki çeşit olduğunu, B-granüllerinin küre şeklinde küçük boyutlarda çoğunlukta; A-granüllerinin ise diskoid

şeklinde az sayıda ama boyut olarak büyük olduğunu bildirmişlerdir. Nişasta granüllerinin X-ray kırınımı desenli yarı-kristal yapıda olduğunu ve bu nişasta granüllerine ait özelliklerin farklı enzimler tarafından kontrol edildiğini ifade etmişlerdir. Bu yapıların arpanın endüstriyel uygulamalarını veya besin değerlerini etkilediğini belirtmişlerdir. Araştırmacılar yaptıkları çalışmada arpaya sodyum azid mutageni ile muamele etmişler ve oluşturdukları TILLING popülasyonunda nişasta metabolizmasını etkileyen 5 adet gen için 29 yeni allel tanımlamışlardır. Dane doldurma sırasında endospermde ifade edilen bu beş genin: *BMV1* (Beta-amylase 1), *GBSSI* (Granule Bound Starch Synthase I), *LDA1* (Limit Dextrinase 1), *SSI* (Starch Synthase I), *SSIIa* (Starch Synthase IIa) olduğunu ifade etmişlerdir. Çalışmalarında missense veya nonsense mutasyon içeren 9 adet M₃ hattının rezerv nişastalarının granül boyutları, kristallik ve amiloz/amilopektin oranı açısından analiz etmişlerdir ve yabancı tipe göre farklı özellikte nişasta yapısı gösteren 7 adet mutant hat belirlemişlerdir. Belirledikleri bu mutant hatları (i) *GBSSI*'de missense mutasyonu gösteren hattın amiloz/amilopektin oranı 4 kat daha düşüktür. (ii) *SSI*'de missense mutasyonu gösteren hattın A:B granül oranı 2 kat daha fazladır. (iii) *SSIIa*'da nonsense mutasyonu gösteren hattın amiloz/amilopektin oranı 2 kat daha fazladır ve granüllerinde farklı tipte kristal depolama vardır. (iv) Geri kalan 4 adet missense mutasyonları da granül başlangıcında rolü olan *LDA1* ve A-granüllerinin boyutlarında rolü olan *SSIIa*'da tanımladıklarını raporlamışlardır.

Vivekanand vd. (2014), TILLING ile yulaf tohumunun lignin içerik farklılıkları hakkında bir çalışma yürütmüşlerdir. Bu amaçla mutasyona uğrattıkları yulaf TILLING popülasyonundan rastgele 520 bağımsız hat seçmişlerdir ve bu hatları taramışlardır. Ele aldıkları tohumların lignin içeriklerinin 20 ile 63 g/kg arasında olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmalarında kullandıkları ticari yulaf çeşidi olan Belinda'nın tohum lignin içeriğini 41g/kg olduğunu tespit etmişlerdir, TILLING popülasyonunu da bu çeşitten oluşturmuşlardır. Çalışmalarında kontrol amacıyla ele aldıkları düşük lignin içerik özelliğine sahip Kanada yulaf çeşidi Assiniboia'nın lignin içeriğinin ise 21g/kg olduğunu belirtmişlerdir. Araştırmacılar mutant hatlardan çıkardıkları ligninin Belinda'dan kalitatif olarak farklı olup olmadığını belirlemek için en düşük ve en yüksek lignin içerikli iki hattı seçip XRD, UV ve FT-IR spektroskopi kullanarak yapısal olarak analizlerini gerçekleştirmişlerdir. Yapmış oldukları analizlerin sonuçlarına göre, Belinda çeşidine kıyasla önemli derecede kalitatif olarak tohum lignin içerik farklılıkları elde etmişlerdir. Bu sonuçlara dayanarak mutant hatların tohumlarının, Belinda çeşidinin tohumlarına göre ruminant beslemesinde daha kolay sindirilebilir olduğunu belirtmişlerdir. Sonuçlarını, ön *in vitro* sindirim denemeleri ile doğruladıklarını raporlamışlardır.

Hoshino vd. (2014), soya fasulyesinde (*Glycine max* (L.) Merr.) α -linoleik asit içeriği düşürmek için bir TILLING çalışması yürütmüşlerdir. Tipik soya fasulyesinde %8 α -linoleik asit içeriğinin bulunduğunu, bu α -linoleik asidin de oldukça kararsız ve kolayca okside olduğunu belirtmişlerdir. Bu özellik birçok gıda ve endüstriyel uygulamalarda istenmeyen bir durum olduğunu dolayısıyla da α -linoleik asit içeriğinin düşürülmesine yönelik genetik stratejilerin ekonomik olarak değerinin bulunduğunu vurgulamışlardır. Doğal soya fasulyesi varyasyonları arasında düşük α -linoleik asit içerikli genetik kaynakların kısıtlı olduğunu, çoklu doymamış yağ asit metabolizma yolunda α -linoleik sentezinden mikrozomal omega 3 yağ asit desaturaz (*FAD3*)

sorumlu olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmalarında soya fasulyesi genomunda 4 adet *FAD3* homoloğu (*Glyma02g39230*, *Glyma11g27190*, *Glyma14g37350* ve *Glyma18g06950*) bulunduğunu ifade etmişlerdir. Bunlardan *Glyma02g39230* (*GmFAD3-1a*) ve *Glyma14g37350* (*GmFAD3-1b*)’de fonksiyonel olmayan alleller; *Glyma18g06950* (*GmFAD3-2a*)’de küçük varyasyonlar bulunduğunu belirtmişlerdir. Çalışmalarında, *GmFAD3-2a* allellinden 7 adet mutanıt izole etmişlerdir. TILLING kullanarak elde ettikleri 39.100 adet bağımsız mutant hattan elde ettikleri bu 7 hattın her birinin tek nükleotid değişikliği içerdiğini bildirmişlerdir. *GmFAD3-2a* transkriptinin ve enzim aktivitelerinin analizlerinde fonksiyonel olmayan *GmFAD3-2a* alleli içeren bir missense mutanıt (P1-A9) tanımlamışlardır. Fonksiyonel olmayan üç allelin (*GmFAD3-1a*, *GmFAD3-1b* ve *GmFAD3-2a*) kombinasyonu ile %2’den az α -linoleik asit içeren soya fasulyesi hatları oluşturduklarını raporlamışlardır.

Kim ve Tai (2014), çeltikte düşük fitik asit mutasyonları için bir TILLING çalışması yürütmüşlerdir. Fitik asidin (myo-inositol-1,2,3,4,5,6-hexakisphosphate veya InsP_6) tohumdaki toplam fosforun %75-85’inden sorumlu olduğunu belirtmişlerdir. Düşük fitik asit (*lpa*) mutasyonlarının tohumdaki InsP_6 ’yi düşürdüğünü bunun da inorganik P’nin yükselttiğini bildirmişlerdir. İnorganik P, fitik asit P’nin aksine insanlar ve monogastrik hayvanlar tarafından rahatlıkla sindirildiğini vurgulamışlardır. InsP_6 , ana mineral katyonların biyo-yararlarını düşürdüğünü ve *Lpa* tohumları geliştirmenin insan ve hayvan beslenmesi açısından önemli olduğunu bildirmişlerdir. Bunu gerçekleştirmek için InsP_6 metabolizması iyi anlaşılması gerektiğinin ve diğer bitki proseslerindeki rollerinin tanımlanması gerektiğini belirtmişlerdir. Çalışmalarında, dört yeni *lpa* mutasyonlarını tanımlamak için kamuya açık çeltik TILLING kaynaklarını kullanmışlardır. Bu mutasyonlardan ikisinin inositol (1,3,4)P3 5/6-kinase (ITPK) gene ailesine ait (LOC_Os09g34300); diğer ikisi ise çoklu ilaç direnç proteini (MRP) ile ilişkili gene ait (LOC_Os03g04920) olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar ITPK genindeki mutasyonlarda, InsP_6 oranlarının önemli derecede düşük olduğu iki mutant (%46 ve 68) elde etmişlerdir. MRP genindeki mutasyonlarda ise InsP_6 oranlarının daha da düşük olduğu iki mutant (%20 ve 30) raporlamışlardır. ITPL genindeki bir mutantın (%46 InsP_6), MRP genindeki her iki mutantın da tohum ağırlığı, çimlenme ve fide gelişimlerinin yabancı tip ile benzerlik gösterdiğini bildirmişlerdir.

Guo vd. (2015), yerfıstığı için sekanslama metoduna uygun bir TILLING geliştirmek ve bu metodu stres ile ilgili indüklemiş gen mutasyonlarını tanımlamada kullanmak amacıyla bir çalışma yürütmüşlerdir. Yürüttükleri çalışmada TILLING’in fonksiyonel genomik çalışmalar için efektif bir ters genetik yaklaşımı olduğunu belirtmişlerdir. Biyotik ve abiyotik strese dayanıklılık genlerini tespit edebilmek için mutasyon tahmin edici parametre olarak, minimum referansız nükleotid okuması yapan ya da minimum varyantlı çoğaltıcı iki-boyutlu bulklama stratejisi ile birlikte yüksek verimli sekanslama kullanmışlardır. Yerfıstığında, *Aspergillus spp.* ile enfekte olmuş olgun tohumlarda, lipoksigenaz (lipoxygenase) genlerini yüksek derecede tetiklendiğini, bunun da bitki-fungus etkileşimi açısından önemli olduğuna işaret etmişlerdir. Araştırmacılar, son çalışmalarda fosfolipaz D (phospholipase D, PLD) gen ifadesinin kurağa dayanıklı yerfıstığı hatlarında, kurağa hassas hatlara göre fazla olduğunun ortaya çıkarıldığını ifade ederek, TILLING için yenice keşfedilmiş yerfıstığı lipoksigenaz (lipoxygenase) genleri ile birlikte önceki çalışmalardan yerfıstığı PLD genlerini seçmişlerdir. Bunlara ek olarak, iki önemli alerjen genleri *Ara h 1* ile *Ara h 2* ve

tohumdaki oleik ve linoleik oranını kontrol eden yağ asidi desaturaz (desaturase) *ahFAD2* genini çalışmışlardır. Sonuç olarak çalışmalarında bir yerfistığı kök cDNA kütüphanesini taramışlardır ve *LOX* geni için 3 aday gen tanımlamışlardır. *ahLOX7* genini, kök ve tohumlardaki yüksek gen ifadesinden dolayı TILLING metodu için seçmişlerdir. TILLING popülasyonundan 768 M₂hattını taramışlar ve *ahLOX7* geni için 4 adet missense mutasyonu; *ahPLD* geni için 3 adet missense mutasyonu; *ara h 1.01* geni için 1 adet missense, 2 adet silent mutasyonu; *Ara h 1.02* geni için 5 adet missense, 3 adet silent mutasyonu; *ahFAD2B* geni için 1 adet missense mutasyonu; *ara h 2.02* geni için 1 adet silent mutasyon tanımlamışlardır. Genel olarak da çalışmalarındaki mutasyon frekansının 1 SNP/1.066 kb; tek kopya gen için SNP frekansının 1 SNP/344 kb ve çoklu kopya gen için de 1 SNP/3.028 kb olduğunu raporlamışlardır.

Sestili vd. (2015), durum buğday üzerinde yaptıkları TILLING çalışmasında yüksek amiloz içerikli fenotipler yakalamışlardır. Çalışmalarında durum buğdayında, amiloz/amilopektin oranının nişasta yapısı ve özellikleri üzerinde büyük etkiye sahip ve optimal son kullanım açısından önemli olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar, nişasta dallanma enzimi IIa'yı (Starch Branching Enzyme - *SBEIIa-A* ve *SBEIIa-B*) kodlayan her iki homolog gendeki allellerin susturulması ile durum buğdayını ıslah etmişlerdir ve yüksek amilozlu hatlar elde etmişlerdir. Bu genlerin tamamen susturulmasıyla nişasta sentezi üzerinde birtakım pleiotropik etkiler oluştuğunu bildirmişlerdir. Bu etkilerin: (Buğday dallanma enzimi) transkripsiyonel aktivitesini ve enzim sentezlerini kodlayan tüm genleri (*SSI*, *SSIIa*, *SSIII* ve *GBSSI*) etkilediğini belirtmişlerdir. Araştırmacılar çift *SBEIIa* mutantlarının danelerinden elde ettikleri nişastaların yabancı tiplere göre yaklaşık 1,95 kat daha fazla amiloz ve yaklaşık 8 kat daha fazla dirençli nişasta içerdiğini raporlamışlardır.

Reddy ve Saiprasad (2015) çalışmalarında nikotin, parasempatomimetik haricinde insektisit ve tedavi edici uygulamaları gibi geniş kullanım alanlarından dolayı ticari değeri yüksek önemli bir bitki metaboliti olduğunu ifade etmişlerdir. Ayrıca nikotin biyosentezi, bitkilerde ikincil metabolitleri düzenleyen genlerin çalışılması için model bir metabolik yol teşkil ettiğini belirtmişlerdir. Araştırmacılar, nikotin biyosentezi ile ilgili genlerde SNP bakımından genetik varyasyonları tanımlamışlardır. Nikotin biyosentezi ile ilgili 19 gende 50 adet doğal varyasyon raporlamışlardır. Bunlara ek olarak tütün TILLING mutant popülasyonunda da mutasyonlar tanımlamışlardır. PMT2 genindeki sinonim olmayan bir SNP, PMT2 proteininde H25Q dönüşümüne sebep olduğunu belirtmişlerdir. Yapmış oldukları germplasmaların regresyon analizi, bu tarz SNP'lerin nikotin içeriğinde görülen toplam varyasyonların %3'üne tekabül ettiğini hesaplamışlardır. Ayrıca, minör allel içeren germplasm hatlarının hepsinin nikotin içerikleri, ticari çeşit Kanchan'ın(K326) nikotin içeriğinden daha fazla olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmalarında tanımladıkları doğal/indüklenmiş fonksiyonel karakterlerin, ikincil metabolitleri düzenleyen genlerin anlaşılmasında ve farklı nikotin içerikli ıslah hatların geliştirilmesinde kullanılabileceğini raporlamışlardır.

Bajaj vd. (2016), çalışmalarında nohut bitkisi üstünde, zamandan tasarruf sağlayan, işçiliği azaltan ve ekonomik bir yaklaşım sunan agaroz jel tespitli bir EcoTILLING yürütmüşlerdir. Araştırmacılar 192 adet farklı desi ve kabulü nohut koleksiyonunda yaptıkları genotiplemeyle, 1.133 adet transkripsiyon faktör (TF) genlerinin düzenleyici dizilimleri ve ayrıştırıcı kodlarından yeni SNP allel varyantları bulmuşlardır. SNP genotiplemeden elde etikleri veriler ve 192 adet koleksiyonun tarla

koşullarındaki tohum ağırlık fenotiplerinden gelen verileri birleştirmişlerdir. Bu sayede nohutta tohum ağırlığını düzenleyen 8 TF genindeki 8 SNP allelini tanımlamışlardır. Tohum ağırlığı fenotipinde, %31 fenotipik varyasyon gözlemlemişlerdir. Tohum ağırlığıyla ilişkili olan doğal allel varyantları ve TF gen adaylarının, nohutun marker yardımcı genetik iyileştirmelerini hızlandıracak potansiyeli olduğunu raporlamışlardır.



3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. TILLING popülasyonunda kullanılan NC-7 çeşidinin özellikleri

TILLING popülasyonu NC-7 isimli yerfıstığı çeşidi kullanılarak oluşturulmuştur. Bu çeşit, kültür yerfıstığının (*Arachis hypogaea* L.) *hypogaea* alttürüne ait *hypogaea* varyetesinin “virginia” agronomik tipidir. Çeşit ABD’den introduksiyon yöntemiyle ıslah edilmiş ve 1991 yılında Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü tarafından tescil ettirilmiştir. Ülkemizde en fazla ekilişi yapılan yerfıstığı çeşididir (Kadiroğlu 2018). Yarı yatık büyüme gösterir, daneleri büyüktür, silindirik şekildedir ve açık pembe rengindedir. Ortalama bin dane ağırlığı 900-950 g’dır. İç oranı %70-75’dir. 140-160 günde olgunlaşır ve verim potansiyeli 4-4,5 t/ha’dır. Çeşidin tohum protein oranı %22, yağ oranı %50-52, yağ kompozisyonu da oleik asit %55 ve linoleik asit %27 şeklindedir.

3.1.2. Deneme yerinin iklim değerleri ve toprak yapısı

M₁ popülasyonu Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesine ait deneme alanında açık tarla koşullarında 2018 yılı yaz sezonunda yetiştirilmiştir. Akdeniz Üniversitesi 18955 numaralı Meteoroloji İstasyonundan alınan 2018 yetiştirme sezonu meteorolojik verileri Çizelge 3.1.’de verilmiştir. Açık deneme tarlası toprağı pH 7,7 hafif alkali, tınlı kil yapısındadır. M₂ popülasyonu ise sera koşullarında viyollerde yetiştirilmiştir. Viyoller için toprak sıklılığın artmasına yardım ederek su drenajını azaltmak ve nemi muhafaza etmek için “perlit”; toprak pH aralığını düzenlemesi için “torf”; toprak havalanmasını düzenlemesi için “vermikulit” ve organik ve inorganik bitki besin maddeleri için “toprak” sırasıyla 1:1:3 oranlarındaki karışım kullanılmıştır.

Çizelge 3.1. 2018 yetiştirme sezonu meteorolojik verileri

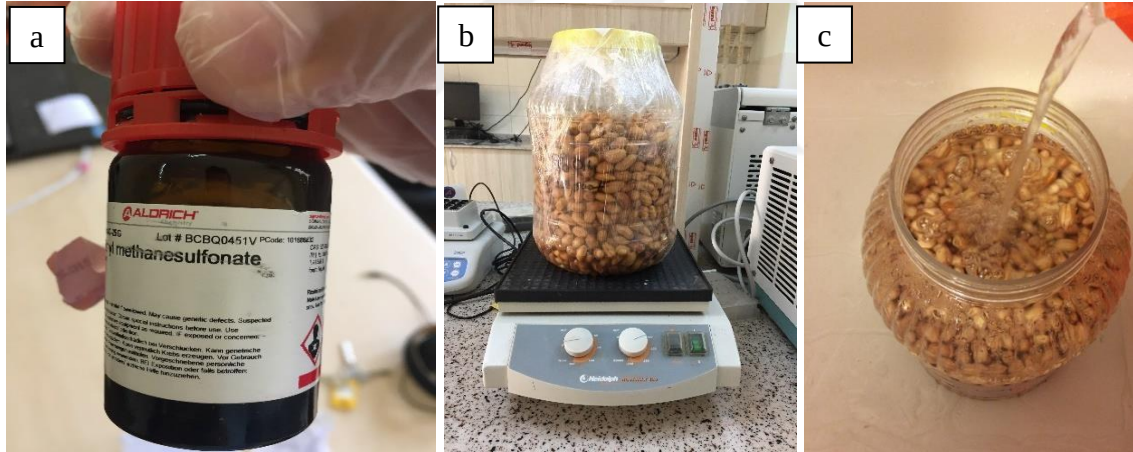
Aylar (2018 Yılı)	Ortalama Sıcaklık (°C)	Ortalama 50 cm Toprak Sıcaklığı (°C)	Ortalama Nispi Nem (%)	Toplam Buharlaşma (mm)
Mayıs	23,4	22,7	64,5	415,3
Haziran	25,8	26,4	70,7	617,6
Temmuz	29,8	29,0	58,8	475,8
Ağustos	29,3	30,0	61,6	357,3
Eylül	27,4	28,4	52,4	305,9
Ekim	21,9	22,6	55,1	526,6

3.2. Metot

3.2.1. TILLING popülasyonu oluşturulması

3.2.1.1. EMS uygulaması

Mutasyon oluşturulması amacıyla Sigma Aldrich kimyadan M0880-25 ürün koduyla temin edilen etil metan sülfanat (EMS - moleküler formülü: $C_3H_8O_3S$, Cas Numarası: 62-50-0) yerfıstığı tohumlarına %0,4 ve %1,2 olmak üzere iki doz halinde uygulanmıştır. 25 g paketler halinde gelen kimyasalın yoğunluğu 20°C’de 1.206 g/ml’dir. 25 g sıvı olarak 20,0 ml’dir. Çalışmada %0,4 ve %1,2 oranında dozlar 1.988 ml de-iyonize su içerisine bırakılmıştır. Uygulama öncesi toplam 3000 adet tohum, 10 saat boyunca musluk suyunda bekletilmiştir. Sonrası da 3000 adet tohumun yarısı (1.500 adet) %0,4’lük, diğer yarısı da %1,2’lik orandaki 2000 ml EMS’li su içeren kavanozlara alınmış ve kimyasalın tohumlara eşit dağılması için 150 rpm devirde 2 saat boyunca karıştırıcı üzerine alınmıştır. Karıştırma işlemi sonrası %0,4’lük EMS solüsyonundaki tohumlar 10 saat, %1,2’likte olanlar ise 2,5 saat bekletilmeye bırakılmıştır. Tohumlar EMS kalıntılarından temizlenmesi için de-iyonize su ile üç defa yıkanmış ve tüm gece boyunca akan suda durulama işlemi yapılmıştır (Şekil 3.1.).



Şekil 3.1. EMS uygulaması; **a)** kullanılan mutagen kimyasal; **b)** karıştırıcı üzerine alınan EMS solüsyonlu tohum kavanozu; **c)** EMS kalıntılarından temizlenmesi için akan su ile durulama işlemi

3.2.1.2. M₁ popülasyonunun oluşturulması

EMS ile muamele edilmiş tohumlar açık tarlaya ekilmeden önce tarla hazırlığı yapılmıştır. Tarla hazırlığı kapsamında ilk olarak pulluk ile 30-40 cm derinliğinde sürüm gerçekleştirilmiştir. Sürümden sonra ortaya çıkan büyük keseklerin parçalanması için diskaro çekilerek tarla hazırlanmıştır. Ekim işleminden önce herhangi bir gübreleme uygulaması yapılmamıştır. Tohumlar 70 cm sıra arası ve 20 cm sıra üzeri olacak şekilde tekerrüsusüz olarak 14.05.2018 tarihinde öğrencilerin yardımıyla 1.500 adeti %0,4 ve yine 1.500 adeti %1,2 dozunda EMS ile muamele edilmiş toplam 3.000

adet tohum ekilmiştir. Sıraların takibi amacıyla her 10 sraya bir etiket yerleştirilmiştir. Ekim işleminden sonra damlama sistemi kurulmuş ve ortalama haftada bir kere 2 saat sulama yapılmıştır (Şekil 3.2.).



Şekil 3.2. M1 popülasyonunun oluşturulması amacı ile EMS ile muamele edilmiş tohumların tarlaya ekilmesi

3.2.1.3. M₁ popülasyonunun hasadı

Hasat işlemlerine 10.10.2018 tarihinde başlanmıştır. %0,4'lük ve %1,2'lik EMS'li bitkilerin hasadı karışmayacak şekilde öğrencilerin yardımıyla yapılmıştır. Hasadı yapılan yerfıstıkları kuruması için cam seraya alınmıştır. Kuruyan bitkilerin tohumları da birbirlerine karışmayacak şekilde ayrı kese kâğıtlarına konularak depolanmıştır (Şekil 3.3.).



Şekil 3.3. M₁ popülasyonunun yetiştirilme, hasat ve kurutma aşamaları; **a)** yeni çıkış yapmış bitkiler; **b); c)** yetiştirme aşaması; **d); e); f)** hasat aşaması; **g); h); i)** kurutma aşaması

3.2.1.4. M₂ popülasyonunun oluşturulması

M₁ popülasyonunda en çok tohum (kapsül) bağlayan 768 tek bitki seçilmiştir. Seçimin yarısı %0,4'lük EMS bitkilerinden, diğer kalan yarısı da %1,2'lik EMS bitkileri arasından yapılmıştır. Seçilen tek bitkilerin kapsülleri arasından da genel görünüşü iyi ve büyük olan tohumlar ekilmek için ayrılmıştır. Seçilen tohumlar ve kontrol olarak NC-7 çeşidi 2018 yılı Kasım ayı içerisinde viyollere ekilmiştir. Sonbaharda ekim işlemi gerçekleştirildiği ve sera açıklıklarından soğuk girdiği için sera içerisine polietilen naylondan küçük bir sera kurulmuş ve bu küçük seranın ısınması için de elektrikli ısıtıcı kullanılmıştır. Viyollere ekilen tohumlar bu küçük seraya yerleştirilmiş ve sıraları etiketler üzerine yazılarak takibi sağlanmıştır (Şekil 3.4.).



Şekil 3.4. M₂ popülasyonunun yetiştirilmesi

3.2.2. M₂ popülasyonundaki bitkilerden DNA izolasyonu

Ekimi yapılan tüm M₂ bitkilerinin her birinden ve kontrol NC-7 çeşidinden DNA izolasyonu için yaprak örneği alınmıştır. DNA izolasyonu için Doyle ve Doyle (1990) tarafından geliştirilen CTAB metodu kullanılmıştır (Şekil 3.5.).

CTAB metoduna göre (Doyle ve Doyle 1990);

1. Seradaki bitkilerin yaprak örnekleri, 1,5 ml'lik eppendorf tüplerin baş kısımlarının kapakçıkları boyutunda yaklaşık 0.1 g alınarak tüplerin içerisine konmuştur. Yaprak örneğinin alındığı her bir tüp üzerine bitkinin sıra numarası ve EMS dozu asetat kalem ile yazılmıştır. Laboratuvarında tüp içerisindeki yaprak örneğinin üstüne 0.5 ml içerisinde binde 5 oranında merkaptotanol bulunan CTAB (100 mM Tris-HCl, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, %2 CTAB) tampon çözeltisi ilave edilmiştir.
2. Eppendorf tüp içerisindeki yaprak örneğini çözelti içerisinde ezmek amacıyla plastik çubuklar kullanılarak yaprak örnekleri iyice ezilmiştir. DNA kontaminasyonu önleme amacıyla her tüp için farklı plastik çubuk kullanılmıştır (Şekil 3.5.a).
3. Ezme işleminden sonra DNA'ların çözeltiye geçmesi amacıyla önceden sıcaklığı 65 °C'ye ayarlanmış olan su banyosunda örnekler 3 saat inkübasyona bırakılmış ve her 15 dakikada bir çökmesini engellemek amacıyla hafifçe çalkalanmıştır.
4. İnkübasyondan sonra örneklerin proteinlerinin uzaklaştırılması amacıyla 600 µl kloroform-izoamil alkol (24:1) çözeltisi eppendorf tüplere konulmuş ardından tüplerin ağızları kapatılarak 10 saniye kadar hafifçe ters düz edilerek çalkalanmıştır.
5. Bu işlemin ardından eppendorf tüp içerisindeki örnekler 20 dakika boyunca 14.000 rpm devrinde santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası eppendorf tüplerin içerisinde 3 faz gözlemlenmiştir. Alt kısmındaki fazda kloroform, orta tabakadaki fazda

protein ve üst kısımdaki fazda ise DNA'nın bulunduğu sıvı bulunmaktadır. Eppendorf tüpün içerisindeki üst kısım (supernatant) 1.5 ml'lik temiz eppendorf tüpe aktarılmıştır (yaklaşık 300 µl). Bu aşama daha temiz DNA izolasyonu elde etmek amacıyla bir kez daha tekrarlanmıştır. İkinci tekrardan sonra yeni eppendorf tüplere yaklaşık olarak 150 µl üst faz çekilmiştir.

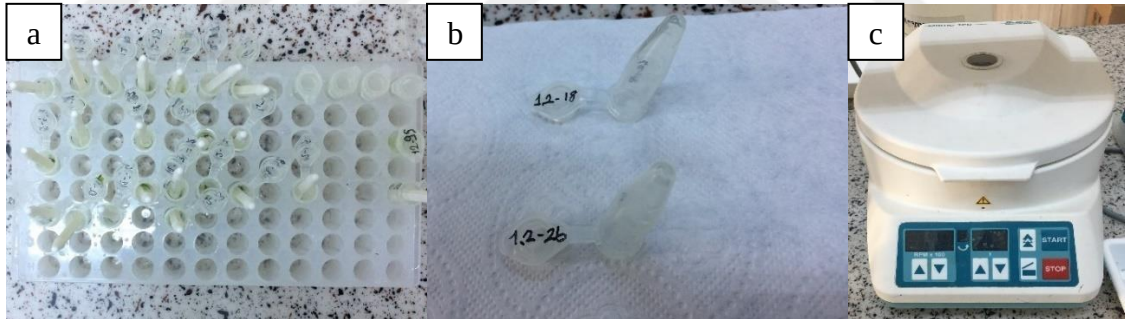
6. Üst fazdan çekilen sıvı içerisindeki DNA'nın çökmesi için üzerine 500 µl hacminde -20 °C'de bulunan soğuk izopropional konulmuştur. Eppendorf tüplerinin ağzları iyice kapatılarak yaklaşık 10 saniye hafifçe ters düz etmek suretiyle çalkalanmıştır ve DNA'nın daha iyi çökmesi amacıyla 1 gece -20 °C'de bekletilmiştir.

7. Bir gece bekletilen örnekler -20 °C'den alınmış ve 14.000 rpm devirde 10 dakika boyunca santrifüj edilmiştir.

8. Bu işlem sonrasında eppendorf tüplerin dibinde pelet olduğu gözlemlenmiştir. Pelet yerinden oynatılmayarak tüpün içerisindeki sıvı boşaltılmıştır ve pelet üzerine -20 °C'de bulunan %70'lik etanolden 300 µl konulmuştur. Eppendorf tüpünün ağzı iyice kapatılarak 14.000 rpm devirde 5 dakika boyunca santrifüj yapılmıştır. Bu aşama bir kez daha tekrarlandıktan sonra santrifüj edilen tüplerin dibindeki pelete zarar vermeden sıvılar dikkatlice boşaltılmıştır.

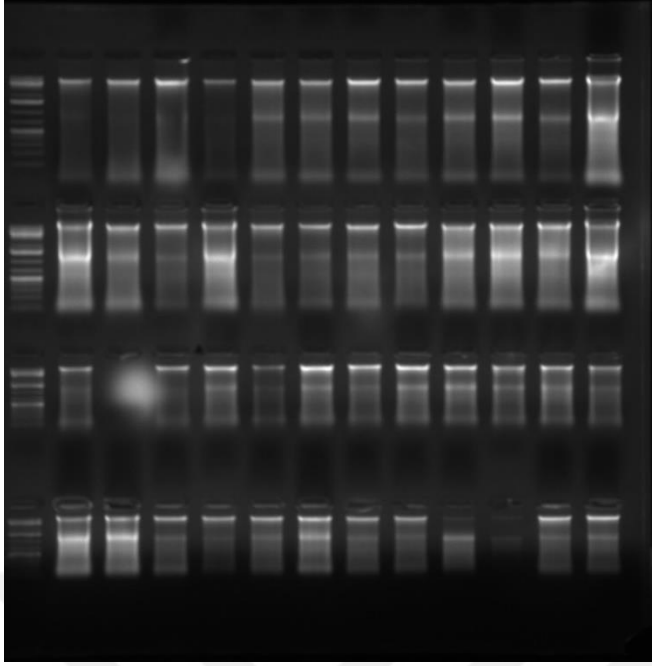
9. Sıvısı boşaltılmış tüpler, içerisindeki etanol damlacıklarının uzaklaştırılması amacıyla ağzları açık ters çevrilmiş vaziyette kurumaya bırakılmıştır (Şekil 3.5.b).

10. Kuruma aşamasından sonra eppendorf tüp içerisindeki pelet üzerine 150 µl saf su ilave edilmiştir. DNA'ların suya geçmesi amacıyla örnekler +4 °C'de bir gece bekletilmiştir. Daha sonrasında ise DNA'ların bozulmamaları için -20 °C'de saklanmıştır.



Şekil 3.5. M₂ popülasyonundaki bitkilerden DNA izolasyonu; **a)** yaprak örneklerinin tampon sıvı içerisinde plastik çubuklarla ezilmesi (aşama 2); **b)** tüp içerisinde kalan etanol damlacıklarının kurutulması (aşama 9); **c)** santrifüj için kullanılan cihaz

DNA izolasyonu yapılan örneklerin DNA kalitelerine bakmak amacı ile her bir bitkiden çıkartılan DNA'lardan 7 µl hacminde alınmış ve 2 µl yükleme boyası ile karıştırılarak %1'lik agaroz jele yüklenmiştir. Elektroforez cihazında 15 dakika boyunca 65 voltta koşturulan örnekler daha sonra ultraviyole ışık altında görüntülenmiştir (Şekil 3.6.).

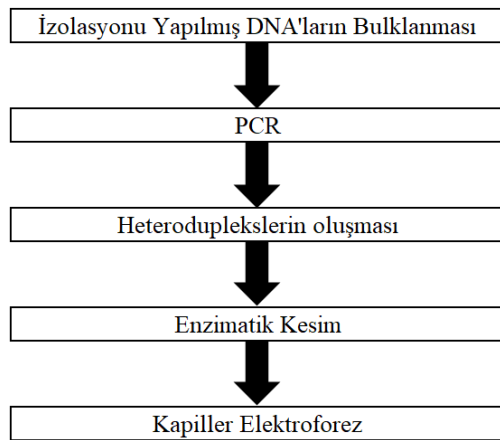


Şekil 3.6. M₂ bitkilerinden seçilen bazı bitkilere ait DNA izolasyonu sonrası agaroz jel görüntüsü

3.2.3. TILLING protokolü

TILLING için mutasyon popülasyonun oluşturulmasından sonra mutasyonlarının tespitinde şu aşamalar izlenmiştir; izolasyonu yapılmış DNA'ların bulklanması, DNA'ların amplifikasyonu ve mutasyonun olduğu heterodupleks ürünlerin oluşması için PCR, heterodupleks ürünleri parçalamak için enzimatik kesim ve son olarak da kesilen bu heterodupleks DNA'ların tespiti için kapiller elektroforez çalıştırılması (Çizelge 3.2.). Bu tez çalışmasında bahsedilen aşamalar uygulanarak potansiyel mutasyonların tespiti yapılmaya çalışılmıştır.

Çizelge 3.2. Mutasyonların tespiti için izlenen aşamalar



3.2.3.1. İzolasyonu yapılmış DNA'ların bulklanması

DNA izolasyonları yapılmış bitkiler, %0,4 ve %1,2 EMS dozlarına göre eppendorf tüplerde -20 °C'de depolanmıştır. Daha sonra PCR işlemleri için DNA izolasyonu yapılmış tüm bitkiler (kontrol bitkileri dâhil) EMS dozlarına göre 96'lık plakalara her bir üründen 50 mikrolitre olacak şekilde 4'lü bulklama yapılarak aktarılmıştır. Çizelge 3.3.'de %0,4'lük EMS bitkilerinin 96'lık plakaya bulklama listesi, Çizelge 3.4.'te %1,2'lik EMS bitkilerinin 96'lık plakaya bulklama listesi gösterilmiştir.

Çizelge 3.3. %0,4 EMS uygulanmış bitkilerin DNA'ların 96'lık plakaya 4'lü bulklama listesi

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2	72	136	175	222	274	329	367	415	468	510	546
	3	73	137	177	223	275	330	369	418	469	511	547
	5	76	138	178	224	279	331	373	420	470	512	548
	6	79	139	179	226	282	332	374	421	472	513	549
B	7	81	140	181	229	284	333	375	423	474	514	550
	8	83	141	183	232	288	336	376	424	475	515	551
	10	84	142	187	234	289	337	377	425	476	516	552
	16	85	143	188	235	290	338	378	426	477	517	553
C	19	87	145	189	236	291	339	379	428	480	518	556
	20	88	146	190	238	292	340	381	429	482	519	557
	23	89	147	191	239	293	341	382	430	483	521	558
	25	93	148	193	240	294	343	383	431	484	522	559
D	30	94	150	194	241	295	344	384	433	485	523	560
	32	95	151	195	242	296	345	385	436	486	524	561
	33	96	152	196	244	301	346	387	437	487	525	562
	35	97	153	197	245	304	347	388	440	488	527	565
E	36	99	155	198	246	305	348	389	442	490	528	566
	37	102	156	199	247	307	349	390	443	491	529	567
	40	103	157	200	248	308	351	391	444	492	530	568
	44	105	159	201	253	311	353	392	445	494	531	569
F	46	107	160	202	254	312	354	394	446	495	532	570
	48	108	161	203	256	313	355	395	447	496	533	571
	51	109	162	205	258	314	356	396	449	497	536	573
	52	113	163	206	259	316	357	398	450	498	537	574
G	54	114	165	208	265	317	358	399	452	499	538	575
	55	116	166	210	266	318	359	400	454	500	539	576
	56	119	168	211	267	319	360	402	456	501	540	577
	58	120	169	214	268	321	362	405	457	502	541	580
H	60	122	171	215	270	324	361	407	458	503	542	NC7-1
	62	125	172	216	271	325	364	409	460	504	543	NC7-2
	67	126	173	217	272	326	365	411	463	507	544	NC7-3
	71	130	174	218	273	327	366	412	464	509	545	NC7-4

Çizelge 3.4. %1,2 EMS uygulanmış bitkilerin DNA'ların 96'lık plakaya 4'lü bulklama listesi

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	50	112	156	212	274	339	378	425	475	519	566
	2	52	113	160	213	276	340	380	428	476	520	568
	3	57	115	167	215	279	341	381	429	477	528	569
	4	53	118	166	218	280	342	382	430	479	529	570
B	6	59	119	164	220	281	343	383	431	480	530	571
	7	62	120	159	221	282	344	384	432	481	531	572
	9	64	121	157	224	289	345	385	434	482	532	573
	10	66	122	114	225	291	346	386	436	483	533	574
C	12	71	124	123	226	295	347	387	437	484	534	575
	13	72	125	132	228	301	348	388	439	485	535	578
	16	73	126	160	230	303	349	389	441	486	536	580
	18	80	127	168	232	305	351	390	443	487	537	581
D	19	81	128	169	233	309	352	391	445	488	538	586
	20	84	131	171	235	310	353	393	449	489	539	588
	21	85	133	172	236	311	355	396	450	491	542	589
	24	87	134	173	237	313	357	397	451	492	545	590
E	25	90	136	177	242	315	358	398	452	493	546	591
	26	91	138	178	243	317	359	399	453	494	547	592
	27	92	139	179	244	318	360	400	455	495	548	594
	28	94	140	180	248	319	362	401	458	497	549	595
F	32	95	141	181	252	320	363	402	459	498	550	596
	36	96	142	182	253	322	364	404	462	499	551	597
	37	99	143	185	255	326	365	408	463	502	552	599
	38	98	145	189	257	328	366	409	465	524	553	600
G	40	102	146	190	259	329	367	410	466	504	554	602
	42	104	147	193	262	330	368	414	467	505	555	604
	43	101	149	195	261	333	370	415	468	508	557	605
	44	105	151	196	263	334	371	416	470	510	559	606
H	45	106	152	197	264	335	372	417	471	512	560	NC7-1
	46	107	153	198	266	336	373	418	472	515	562	NC7-2
	49	108	154	203	270	337	374	419	473	513	564	NC7-3
	48	110	155	210	271	338	377	420	474	516	565	NC7-4

3.2.3.2. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) analizleri

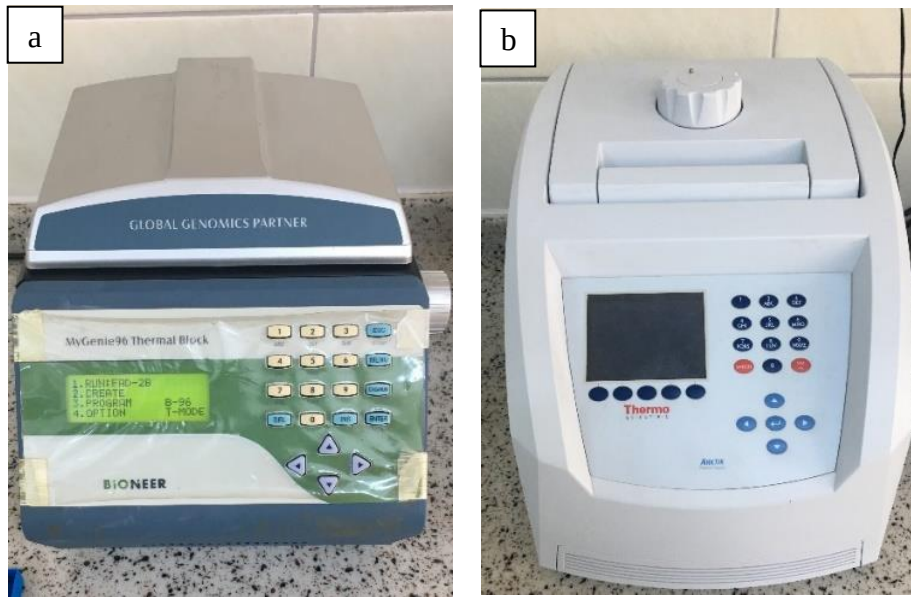
PCR, DNA iplikçiklerinin ayrılması (denaturation), primerlerin DNA zincirlerindeki tamamlayıcı bölgelere yapışması (annealing) ve DNA'ya yapışan primer ile Taq polimeraz yardımıyla DNA zincirinin sentezlenmesi (extention) aşamalarından oluşmaktadır. PCR koşulları, miktarları ve oranları her çalışmaya göre farklılaşmaktadır.

Bu tez çalışmasında daha önceki araştırmalarda tanımlaması yapılan primerler kullanılarak mutasyonun oluşması istenilen bölgelerin amplifikasyonu için PCR analizleri yapılmıştır. Yerfıstığında alerji ve yağ asit sentezinden sorumlu genlerdeki belli bölgelerin amplifikasyonunu sağlayan primerler bu çalışmada potansiyel mutasyon bölgelerinin taranmasında kullanılmıştır. Tasarlanan primerler Guo vd. (2015) ve Chu vd. (2011) tarafından yürütülen çalışmalardan alınmıştır. Primerlere ait dizi bilgileri Çizelge 3.5’de yer almaktadır. DNA izolasyonu sonucu net agaroz jel görüntüleri elde edilemediği için *ara h 2.01* ve *ara h 2.02* primerleri için PCR kurulmamıştır.

Çizelge 3.5. Tez çalışmasında kullanılan primeler ve dizileri

Gou vd. (2016) Alerjiye sebep olan proteinleri kontrol eden genlerin primleri					
Gen	Amplikon (bp)	F primer No.	Dizilim (5'-3')	R Primer No.	Dizilim (5'-3')
<i>ara h 1.01</i>	1.865	1306	GAGCAATGAGAGGGA GGGT	2079	TCTTCGTCTTCGTCCTCC TCTTCTT
<i>ara h 1.02</i>	1.666	1306	GAGCAATGAGAGGGA GGGT	1309	CCTCCTCTTCTTCCCACT CTTG
Chu vd. (2011) Oleik/Linoleik oranını kontrol eden genlerin primleri					
Gen	Amplikon (bp)	F primer No.	Dizilim (5'-3')	R Primer No.	Dizilim (5'-3')
<i>ah FAD2A</i>	826	aF19	GATTACTGATTATTGA CTT	1056R	CCAACCCAAACCTTTCA GAG
<i>ah FAD2B</i>	1.214	bF19	CAGAACCATTAGCTTT G	R1/FAD	CTCTGACTATGCATCAG

ah FAD2 gen bölgelerinin çoğaltılmasında kullanılacak PCR protokolü için de Chu vd. (2011) tarafından geliştirilen protokol optimize edilerek en iyi sonucu veren solüsyon miktarları ve oranları uygulanmıştır (Çizelge 3.6.). PCR uygulamalarında MyGenie-96 Gradient Thermal Cycler marka PCR cihaz ve Thermo Scientific Arktik Thermal Cycler cihazları kullanılmıştır (Şekil 3.7.).

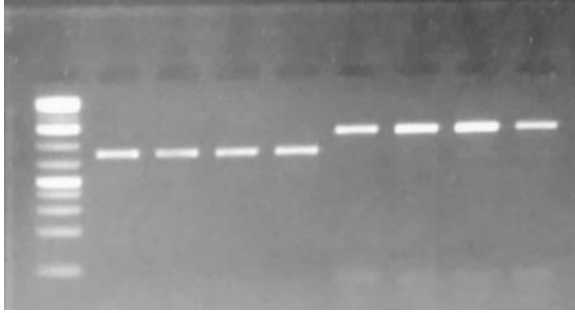


Şekil 3.7. Kullanılan PCR cihazları; **a)** MyGenie-96 Gradient Thermal Cycler Cihazı; **b)** Thermo Scientific Arktik Thermal Cycler Cihazı

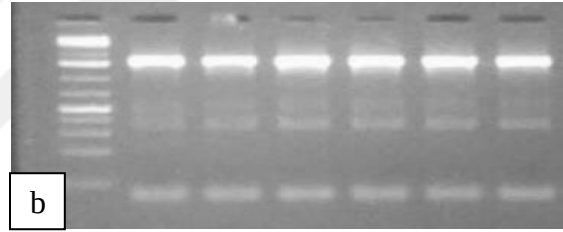
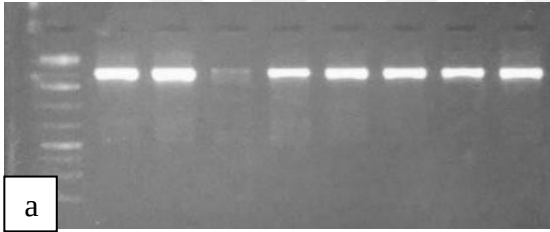
Çizelge 3.6. Tez çalışmasında yürütülen PCR protokolü ve solüsyon oranları

ara h 1.01 geni için PCR şartları			PCR programı		
PCR mix	Miktar	Oran			
10X buffer	1,3 µl	1/10	98°C	30 saniye	
Forward primer	0,4 µl	10 pmol	98°C	10 saniye	35 Döngü
Reverse primer	0,4 µl	10 pmol	58,7°C	1 dakika	
Taq DNA polimeraz	0,1 µl	5 Unite	72°C	1 dakika 30 saniye	
dNTP	0,4 µl	0.2 mM	72°C	10 dakika	
MgCl ₂	1,3 µl	2.5 mM	4°C	Saklama (∞)	
Kalıp DNA	1,5 µl	50 ng			
ddH ₂ O	14,1 µl				
Toplam	19,5 µl				
ara h 1.02 geni için PCR şartları			PCR programı		
PCR mix	Miktar	Oran			
10X buffer	1,3 µl	1/10	98°C	30 saniye	
Forward primer	0,4 µl	10 pmol	98°C	10 saniye	35 Döngü
Reverse primer	0,4 µl	10 pmol	59,6°C	1 dakika	
Taq DNA polimeraz	0,1 µl	5 Unite	72°C	1 dakika 30 saniye	
dNTP	0,4 µl	0.2 mM	72°C	10 dakika	
MgCl ₂	1,3 µl	2.5 mM	4°C	Saklama (∞)	
Kalıp DNA	1,5 µl	50 ng			
ddH ₂ O	14,1 µl				
Toplam	19,5 µl				
ah FAD2A/B genleri için PCR şartları			PCR programı		
PCR mix	Miktar	Oran			
10X buffer	1,5 µl	1/10	95°C	5 dakika	
Forward primer	0,4 µl	10 pmol	95°C	30 saniye	30 Döngü
Reverse primer	0,4 µl	10 pmol	48°C	30 saniye	
Taq DNA polimeraz	0,1 µl	5 Ünite	72°C	1 dakika	
dNTP	0,4 µl	0.2 mM	4°C	Saklama (∞)	
MgCl ₂	1,5 µl	2.5 mM			
Kalıp DNA	1,5 µl	50 ng			
ddH ₂ O	14,1 µl				
Toplam	19,9 µl				

PCR protokollerinin çalışıp çalışmadığının kontrolü için PCR sonrası rastgele alınan numunelerde jel görüntüleme yapılmıştır. *ah FAD2A* ve *ah FAD2B* genlerinin örnek PCR sonrası jel görüntüsü Şekil 3.8.'de, *ara h 1.01* ve *ara h 1.02* için PCR sonrası jel görüntüsü ise Şekil 3.9.'da verilmiştir. *ara h 2.01* ve *ara h 2.02* için istenilen kalitede PCR ürünü elde edilmediği için ileri aşamalara bu gen bölgesi için TILLING çalışması yürütülmemiştir.



Şekil 3.8. *ah FAD2A* ve *ah FAD2B* için PCR sonrası örnek jel görüntüsü; ilk yükleme 100 bp'lik ladder, takip eden dört tanesi *ah FAD2A* primeri ile sonraki dört tanesi de *ah FAD2B* primeri ile yürütülen PCR ürünlerinin jel görüntüsüdür



Şekil 3.9. *ara h 1.01* ve *ara h 1.02* için PCR sonrası örnek jel görüntüsü; ilk yüklemeler 100 bp'lik ladder; **a)** *ara h 1.01* primeri PCR sonrası bazı genotiplere ait agaroz jel görüntüsü; **b)** *ara h 1.02* primeri ile yürütülen PCR sonrası elde edilen agaroz jel görüntüsü

3.2.3.3. Elektrolit çözeltisi

Elektroforez işleminde tampon çözeltisi olarak Tris/Borate/EDTA (TBE) kullanılmıştır. Çözelti için 54 g Tris base, 27,5 g borik asit, 40 ml EDTA (0,5 M) kimyasalları kullanılmıştır. Çözeltinin pH 8.3'sü olacak şekilde ve 10x yoğunluğunda hazırlanarak 1.000 ml suda çözündürülmüştür. Bu stok çözeltiden 100 ml alıp saf su ile 1.000 ml'ye tamamlanmış ve böylece elektroforez için 1x'lik TBE tamponu hazırlanmıştır.

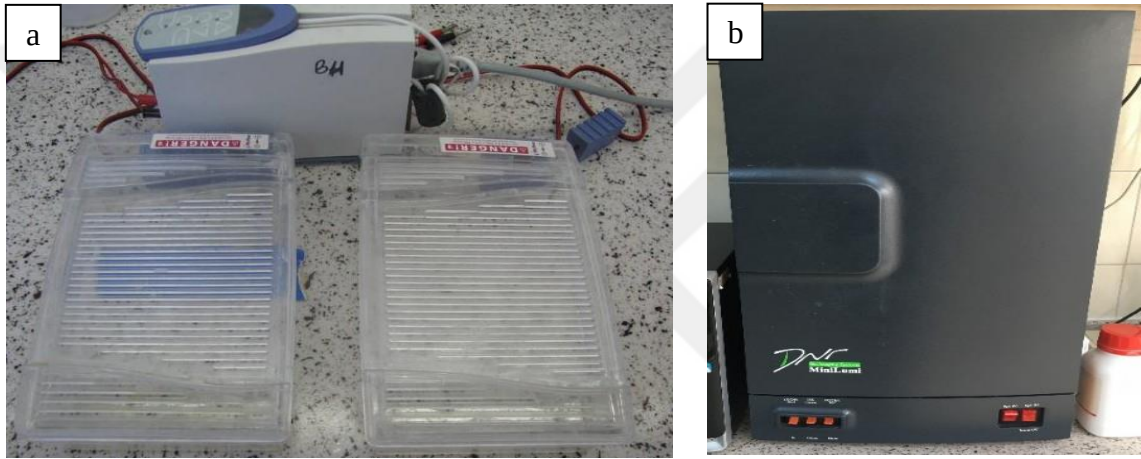
3.2.3.4. Jelin hazırlanması

PCR sonucu elde edilen DNA ürünlerinin birbirlerinden ayırt edilebilmesi ve görsel olarak incelenebilmesi amacıyla agaroz jel elektroforezinden yararlanılmıştır. %2.5'lik agaroz jel için TBE tampon çözeltisi ile bir erlen mayerde mikrodalgada 2-3 dakika boyunca ısıtılarak hazırlanmıştır. Soğutulduktan sonra 100 ml jel için UV ışık altında görülebilmesini sağlayan 3.5 µl Ethidium Bromide (10 mg/ml) eklenmiş ve homojen bir şekilde jelin içinde karışması için hafifçe çalkanmıştır. Jel kalıbına

dökülmeden önce DNA örneklerinin yükleneceği kuyucuklar için taraklar yerleştirilmiştir. Jel tamamen donduktan sonra tarak yavaşça çıkarılmış ve elektroforez tankının (Şekil 3.10.a) içine, jelin üst kısmını kapatacak kadar elektrolit çözeltisi (1x TBE) dökülmüştür.

3.2.3.5. PCR ürünlerinin jele yüklenmesi ve elektroforez işlemi

15 µl PCR ürünlerine 2 µl yükleme boyası (bromophenylblue) eklenmiştir. Bu karışım %2.5'luk agaroz jele yüklenmiş ve 1 saat boyunca 60 voltta koşturulmuştur. Görüntüleme işlemi sırasında DNA molekül ağırlıklarının belirlenmesi amacıyla marker olarak GeneRuler 100 bp kullanılmıştır. Elde edilen bantları UV ışık altında görüntülemek için DNR-Minilumi cihazıyla kullanılmıştır (Şekil 3.10.b).



Şekil 3.10. Tezde kullanılan jel görüntüleme sistemleri; **a)** i-MyRun marka elektroforez cihazı; **b)** DNR-Minilumi marka jel görüntüleme cihazı

3.2.3.6. TILLING için Fragment Analyzer™

Fragment Analyzer™ (Advanced Analytical Technologies GmbH, Heidelberg, Germany) Advanced Analytical firmasının geliştirdiği otomatik kapiller elektroforez sistemidir (Şekil 3.11.). Bu cihaz sayesinde PCR sonucu elde edilen ürünler yüksek hassasiyet ve çözünürlükte hem sanal jel ortamında hem de kromatogramlarla değerlendirilebilmektedir. Cihazın mutasyonların belirleyebilmesi için Advanced Analytical Technologies firmasından temin edilen DNF-910-K1000T isimli kit kullanılmıştır. Bu kit içeriği Çizelge 3.7.'de verilmiştir.

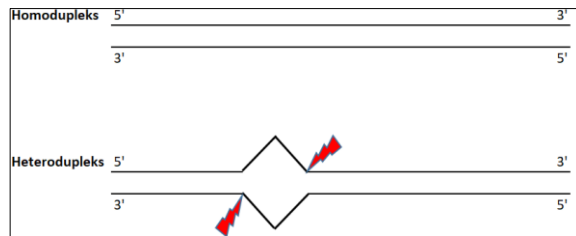


Şekil 3.11. Fragment Analyzer™ cihazı

Çizelge 3.7. DNF-910-K1000T Kit içeriği

Mutation Discovery 910 Gel Kit, 1,000 samples (part # DNF-910-K1000T)	
1	FA dsDNA Gel 35-1500 bp, 500 mL, AATI part # DNF-810-0500
2	Intercalating Dye, 30 mL x 2, AATI part# DNF-600-U030
3	5X 930 dsDNA Inlet Buffer, 300 mL, AATI part # DNF-355-0300
4	5X Capillary Conditioning Solution, 100 mL, AATI part # DNF-475-0100
5	Mutation Detection Kit DNA Ladder, 1.0 mL, AATI part # FS-SLR480-0001
6	35bp and 5000bp Markers, 3.2 mL, AATI part # FS-SMK480-0003
7	Mineral Oil Dropper Bottle, 15 mL, AATI part # FS-SMO15
dsDNA Cleavage Kit, 3000 samples (part # DNF-480-3000)	
1	T-Digest Buffer, 6 mL, AATI part # FS-CLKTBF
2	dsDNA Cleavage Enzyme, 50 µL, AATI part # FS-CLKENZ
3	Dilution Buffer E, 60 mL, AATI part # FS-CLKDBE

TILLING protokolünde PCR yürütüldükten sonra heterodupleks yapının oluşması için kısa bir PCR programı daha yürütülmüştür (Çizelge 3.8.). Heterodupleks yapılar mutasyon taşıyan ürünlerdir ve mutasyonun olduğu bölgeden enzimatik kesim yapılarak mutasyonun tespiti yapılabilmektedir (Şekil 3.12.).



Şekil 3.12. PCR işlemi sonrası üste mutasyon taşımayan homodupleks yapı, altta mutasyon taşıyan heterodupleks yapı, cleavage enzimi kırmızı oklar ile gösterilen SNP bölgelerinden kesmektedir

Çizelge 3.8. Heterodupleks ürünlerin oluşması için uygulanan PCR programı

95°C	3 dakika
70°C	20 saniye, 70 döngü ve döngü başına 0,3 °C azalma
8°C	Saklama (∞)

İkinci PCR sonrası elde edilen heterodupleks yapılarının SNP bölgelerinden enzimatik kesimi yapılabilmesi için 1:125 oranında enzim buffer karışımı hazırlanmıştır. Bu karışım miktarları 96'lık plakalara göre ayarlanmıştır. Bunun için 198,4 µl T-Digest Buffer (AATI part # FS-CLKTBF) ve 1,6 µl dsDNA Cleavage enzimini (AATI part # FS-CLKENZ) toplamda ise 200 µl karışım kullanılmıştır. Yeni bir 96 well-plate'e her bir kuyucuğa olacak şekilde 2 µl PCR ürünü ve 2 µl enzim-buffer karışımı aktarılmış ve kuyucuklar içerisinde iyice karışması için pipetle 2-3 kere çekilip bırakılarak karıştırılmıştır (Şekil 3.13.). Kuyucuklar içerisinde hava kabarcıklarını gidermek amacıyla da yaklaşık 20-30 saniye santrifüj yapılmıştır. Kullanılan kimyasalların ve PCR ürünlerinin bozulmaması için işlemler buzun üzerinde gerçekleştirilmiştir.

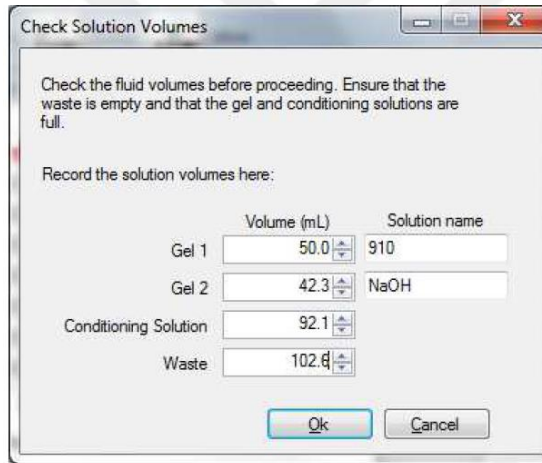
Enzimatik işlemlerin gerçekleşebilmesi için PCR ürünü + enzim buffer bulunduran 96'lık plaka santrifüj sonrası 45°C'de 45 dakika olacak şekilde PCR'a aktarılmıştır. Daha sonra PCR 4°C'de sabitlenmiştir. PCR sonrası 96'lık plaka buzun üstüne yerleştirilmiş ve hemen ardından her bir kuyucuğa 20 µl Dilution Buffer E (AATI part # FS-CLKDBE) eklenmiştir. Bu işlem sonrası hava kabarcıklarının giderilmesi için yine santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonrası 96'lık plaka Fragment Analyzer™ cihazının dördüncü bölmesine aktarılmıştır.

**Şekil 3.13.** Enzimatik kesim için karışımların hazırlanması ve aktarılması

Fragment Analyzer™'da analiz yapmadan önce cihaz için TILLING'te gerekli olan jel hazırlanmıştır. Bunun için cihazın en üst bölgesine cihazın çalıştığı süre boyunca kapiller sistem üzerinde tampon görevi gören 5X 930 dsDNA Inlet Buffer (AATI part # DNF-355-0300) 1X olarak hazırlanmış ve 96'lık plakanın her bir kuyucuğa 1000 µl olacak şekilde aktarılmıştır. Ardından inlet buffer içeren bu 96'lık

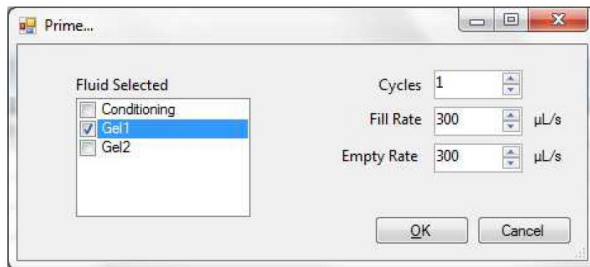
plaka cihazın birinci bölümüne yerleştirilmiştir. Cihazın analiz atıklarının biriktirildiği ikinci bölme temizlenmiştir. Cihazın yan bölgesinde yer alan ve bağlantı bölgesinde “COND” yazan büyük tüpe 5X Capillary Conditioning Solution (AATI part # DNF-475-0100) 1X olarak hazırlanmış ve tüpe 200 ml eklenmiştir. Hacmi 50 ml olan küçük tüpe ise 40 ml FA dsDNA Gel 35-1500 bp (AATI part # DNF-810-0500) separation gel ve 4 µl interclating dye (AATI part# DNF-600-U030) koyulmuştur. 35-5000 markerini (AATI part # FS-SMK480-0003) yeni bir 96’lık plakaya her bir kuyucuğa 30 µl konulmuş ve üzerine her kuyucuğa 20 µl gelecek Şekilde Mineral Yağ (AATI part # FS-SMO15) eklenmiştir. Hazırlanan bu marker solüsyonlu 96’lık plakanın H12 kuyucuğuna 24 µl Mutation Detection Kit DNA Ladder (AATI part # FS-SLR480-0001) eklenerek cihazın üçüncü bölümüne yerleştirilmiştir.

Cihazın analize hazır hale getirilmesinin ardından yazılımı açılarak gerekli ayarlar yapılmıştır. Bunun için yazılım açıldıktan sonra ilk işlem olarak üst çubukta yer alan “Utilities” sekmesi altındaki “Solution Levels” menüsü seçilmiştir. Açılan pencereye cihaza yüklenen kimyasalların seviyeleri girilmiştir (Şekil 3.14.). Gel 1 yazan kutucuğa 44 ml, Condition solution kutucuğuna ise 200 ml’lik değerler girilmiştir. Waste yazan kutucuğa ise atık şişesi boşaltıldıktan sonra 0 yazılmıştır.



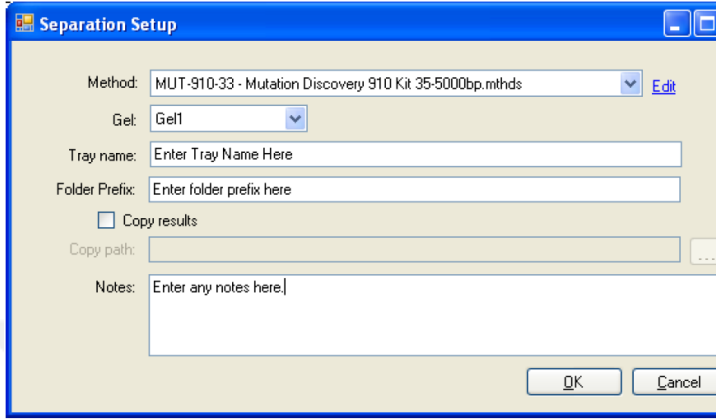
Şekil 3.14. Fragment Analyzer™ yazılımı “Solution Levels” menüsü

Bu işlemin ardından yine “Utilities” sekmesi altındaki “Prime” menüsü seçilmiştir. Açılan “Fluid selected” sekmesinden kullanacak olduğumuz jel (Gel 1) seçilmiştir. “Fill Rate”, “Cycles” ve “Empty Rate” değerleri ise tüm tez boyunca sabit tutulmuştur (Şekil 3.15.).

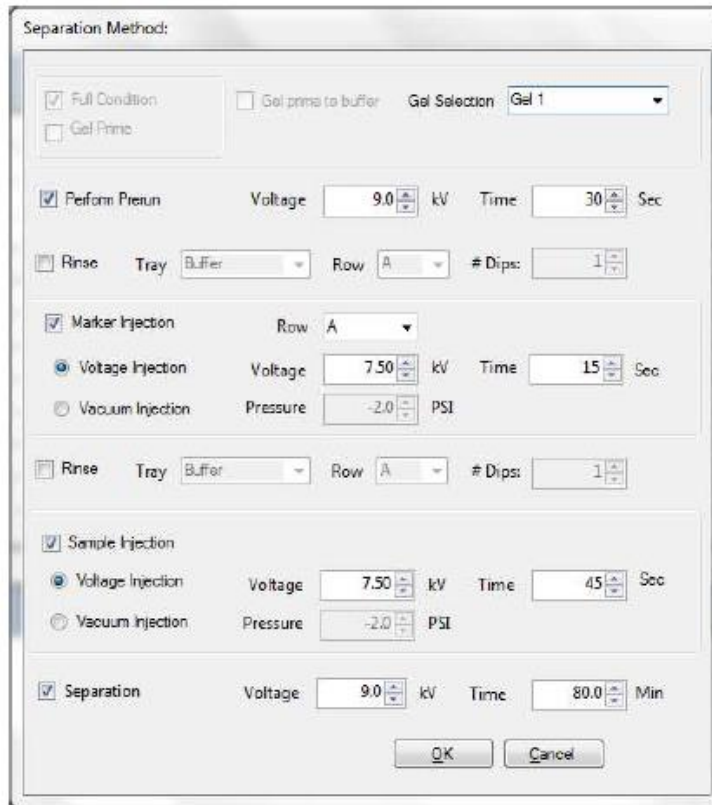


Şekil 3.15. Fragment Analyzer™ yazılımı “Prime” menüsü

Cihazın analize başlaması için hangi kite ait metodun kullanılacağı “Run Entire Tray” başlığı altındaki “Aqq to queue” linkindeki “Separation Setup” menüsünde belirlenmiştir (Şekil 3.16.). Bu menüde MUT-910-55 metodu seçilmiş ve ardından “Ok” butonuna tıklanmıştır. Metot seçiminin hangi jele uygulanacağını belirlemek için aynı menü içerisindeki “edit” linkine tıklanmıştır. Açılan pencerede “gel selection” kutusundan metodun uygulanacağı “Gel 1” bölümü seçilmiştir (Şekil 3.17.).

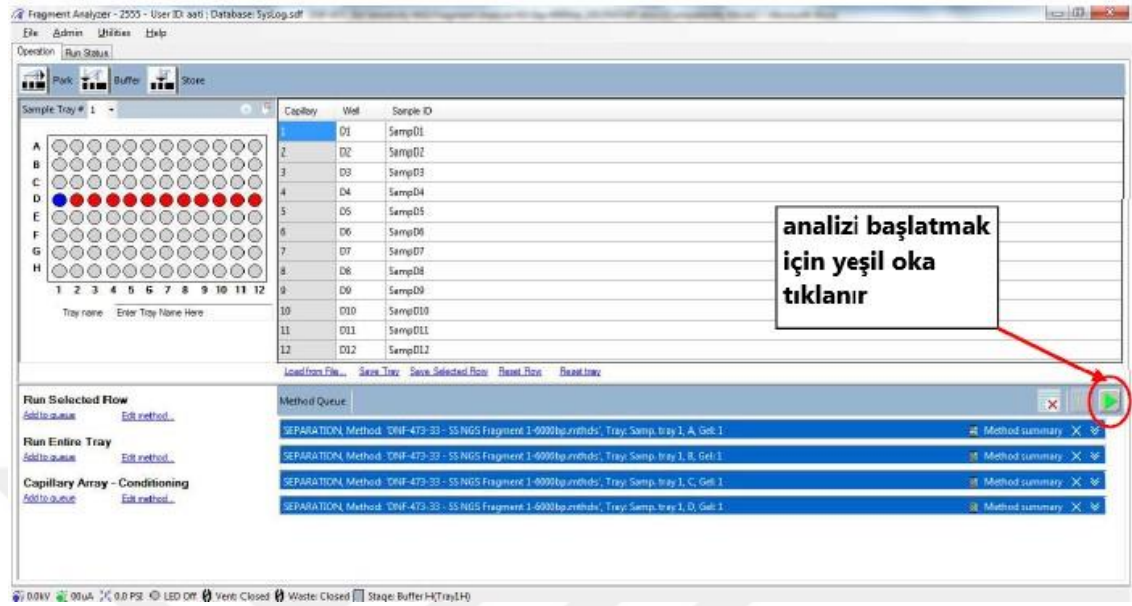


Şekil 3.16. Fragment Analyzer™ yazılımı “Separation Setup” menüsü



Şekil 3.17. Fragment Analyzer™ yazılımı “Separation Setup” menüsünden açılan “edit” penceresi

Tüm bu işlemler sonrasında yazılıma analiz bilgileri girilmiştir. Analizin başlaması için ana sayfadaki alt kısımda bulunan ok işareti tıklanmıştır (Şekil 3.18.).



Şekil 3.18. Analizin başlatılması

3.3.4. Jel kesme protokolü

Fragment Analyzer™ cihazının analiz sonuçlarına göre olası mutasyon yakalanan bitkiler sekanslamaya gönderilmiştir. Sekanslamaya gönderilmeden önce Thermo Scientific GeneJET Gel Extraction Kit (#K0692) kullanılarak jel kesme protokolü uygulanmıştır. Kit içeriği Çizelge 3.9.'da verilmiştir.

Çizelge 3.9. Thermo Scientific GeneJET Gel Extraction Kit İçeriği

No.	Kit İçeriği
1	Binding Buffer
2	Wash Buffer
3	Elution Buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.5)
4	GeneJET Purification Columns

Bu amaçla mutasyon taşıyan PCR ürünleri %2.5'luk agaroz jele yüklenmiştir ve bantlar birbirinden tamamen ayrılıncaya kadar 100 voltta 40-45 dakika koşturulmuştur. Jel görüntüsü jel görüntüleme cihazından alınan görüntülerinden sonra neşterlerle olabildiğince DNA'ya yakın kesilmiştir. Kesilen jellerdeki her bir DNA bandı yükleme sırasına göre eppendorf tüplere aktarılmıştır. Eppendorf tüplerin darası alınarak, tüp içerisindeki jellerin ağırlıkları ölçülmüştür. 100 mg'a 100 µL gelecek Şekilde (1:1 oranında) eppendorf tüplere Binding Buffer eklenmiştir (örneğin 0,9 mg jel için 90 µL Binding Buffer eklenir). Ekleme sonrası eppendorflar su banyosunda 58 °C'de jel tamamen eriyene kadar yaklaşık 10 dakika kadar bekletilmiştir. Daha sonra eppendorf tüplerin içindeki bu sıvı jel karışımı GeneJET Purification Column'lara (silika membran

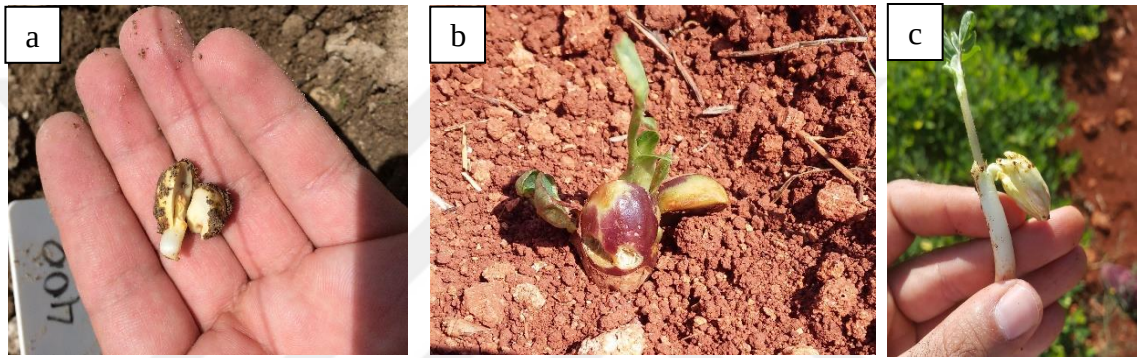
filtreli iki tüp içeren tüpler) aktarılmış ve 30 saniye boyunca 12.000 rpm devirde santrifüj yapılmıştır. GeneJET Purification Column'un alt tüpünde kalan sıvı dökülmüştür, üzerine 600 µL Wash Buffer eklenmiştir. Ekleme sonrası 12.000 rpm devirde 1 dakika boyunca tekrar santrifüj yapılmış ve alt tüpte kalan sıvı dökülmüştür. Alt tüpteki sıvı döküldükten sonra üst tüplere de 2 dakika boyunca 12.000 rpm devirde santrifüj yapılmıştır. Bu sırada yeni eppendorf tüplere bitki sıra takip numaraları yazılmıştır ve üst tüpler bu isimlendirmesi yapılan eppendorfların üstüne geçirilmiştir. Üst tüplerin içerisindeki alkol uçuncaya kadar tüpler ağızları açık bir şekilde 2-3 dakika boyunca kurutulmuştur. Kuruma işlemi sonrası silika membran filtredeki DNA'nın eppendorfa geçmesi amacıyla tüplerin üzerine 35 µL Elution Buffer eklenmiş ve ardından 5 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Böylece DNA'lar alttaki eppendorf tüplere aktarılması gerçekleştirilmiştir. Filtreli üst tüpler işlemin ardından atılmıştır. Sekanslamaya gönderilinceye kadar DNA içeren alt tüpler -20°C'de saklanmıştır.



4. BULGULAR

4.1. TILLING Popülasyonunun Oluşturulması

M₁ popülasyonu oluşturmak amacıyla %0, 4 ve %1,2 EMS dozları ile muamele edilmiş yerfıstığı tohumları Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi deneme arazilerine ekilmiştir. Her bir doz için 1.500 adet tohum mutagen ile muamele edilmiştir. Ekim sonrası, %0,4'lük EMS uygulaması yapılmış bitkilerde %90,1 çıkış (1.353 adet); %1,2 EMS uygulanmış olanlarda ise %60,4 (906 adet) oranında çıkış gözlemlenmiştir. Çıkış yapan bitkilerde de %0,4'lük EMS uygulaması olan bitkilerin %68,7'si (930 adeti) kapsül bağlamış, %1,2'lik EMS uygulanmış olanların da %0,4'lük bitkilere çok yakın bir oranda %67,4'ü (611 adeti) kapsül bağlamıştır. Mutasyonun yıkıcı etkileri ise hem çıkışlar hem de bitki gelişimleri üzerinde gözlemlenmiştir (Şekil 4.1.).



Şekil 4.1. Mutasyonun bitkiler üzerindeki yıkıcı etkileri; **a)** çıkış yapamayan tohum üzerindeki etkisi; **b); c)** çıkış yapan bitkiler üzerindeki etkisi

4.2. Fragment Analyzer™ ile Potansiyel Mutasyonların Belirlenmesi

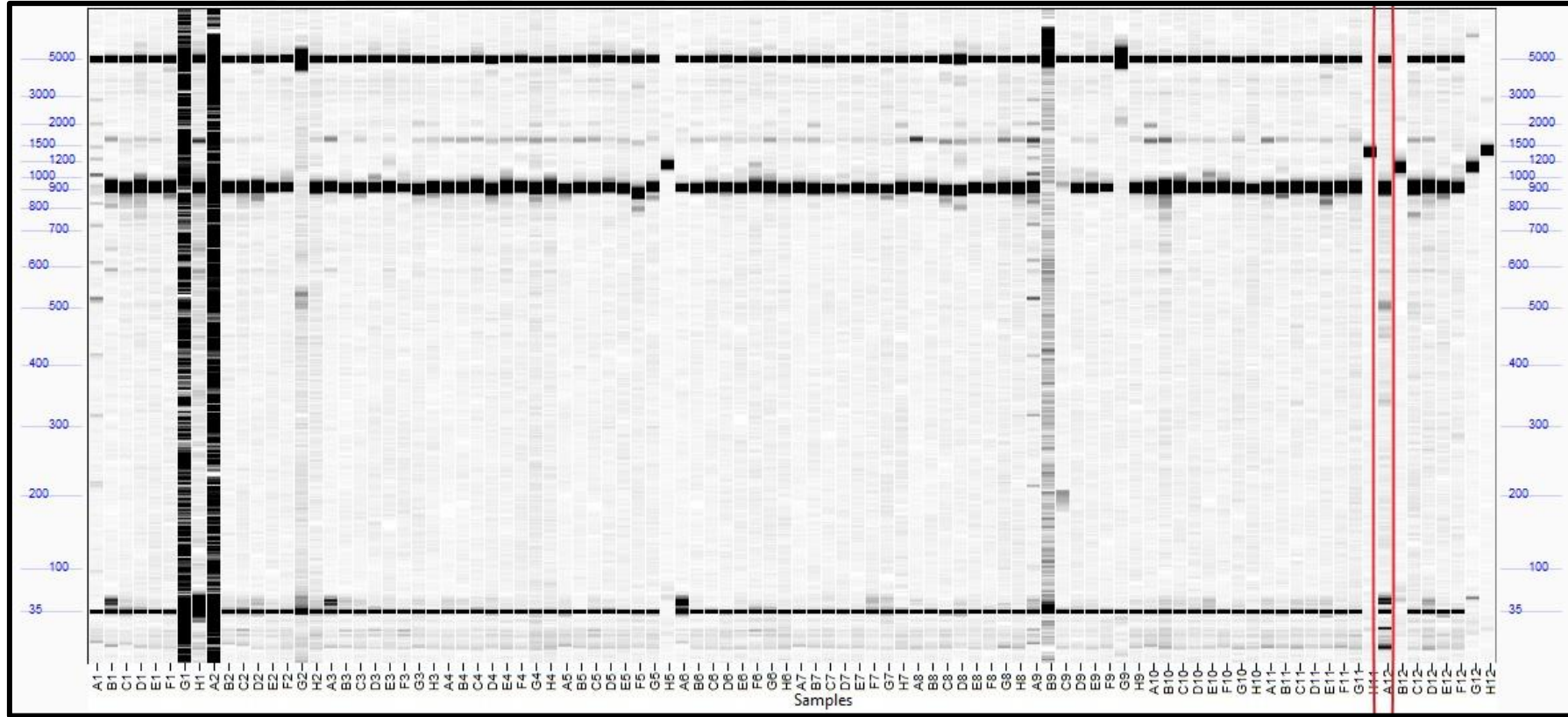
M₁ bitkilerinden en çok kapsül bağlayan 384 adet %0,4'lük ve 384 adet %1,2'lik EMS'li tohumlar sera ortamında M₂ popülasyonu oluşturmak amacıyla viyollere ekilmiş ve ekimi gerçekleştirilen tüm tohumlarda çıkış sağlanmıştır (Şekil 3.4). M₂ bitkilerinin yapraklarından örnekler alınarak DNA izolasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Oleik asitten ve alerjiniteden sorumlu genlerde potansiyel mutasyonları tespit etmek amacıyla sırasıyla Chu vd. (2011) ve Guo vd. (2015) tarafından kullanılan ve bu gen bölgelerini çoğaltan primerler kullanılmıştır. Elde edilen PCR ürünleri daha sonra heterodupleks yapı için tekrar PCR ortamına alınmış ve ardından DNF-910-K1000T kit içeriğindeki enzim PCR ürünleri muamele edilmiştir. Kesimi yapılan potansiyel parçaların tespiti için (mutasyon taşıyan bitkilerin tespiti için) Fragment Analyzer™ cihazında görüntüleme yapılmıştır.

%0,4 dozunda EMS uygulanmış tohumlara ait M₂ jenerasyonun *ah FAD2A* geni için Fragment Analyzer™ sonuçları Şekil 4.2.'de verilmiştir. Bu gen için A12 kuyucuğuna yüklenen 546, 547, 548, 549 numaralarına sahip genotiplerde kesilmiş PCR ürünleri tespit edilmiş ancak peak noktaları solüsyon konsantrasyonunun düşük olmasından dolayı zayıf çıkmıştır (Şekil 4.3.). Aynı genin %1,2 dozundan elde edilen sonuçları Şekil 4.4.'te verilmiştir. Bu dozda ise hiçbir genotipte kesilmiş PCR ürünlerine rastlanmamıştır.

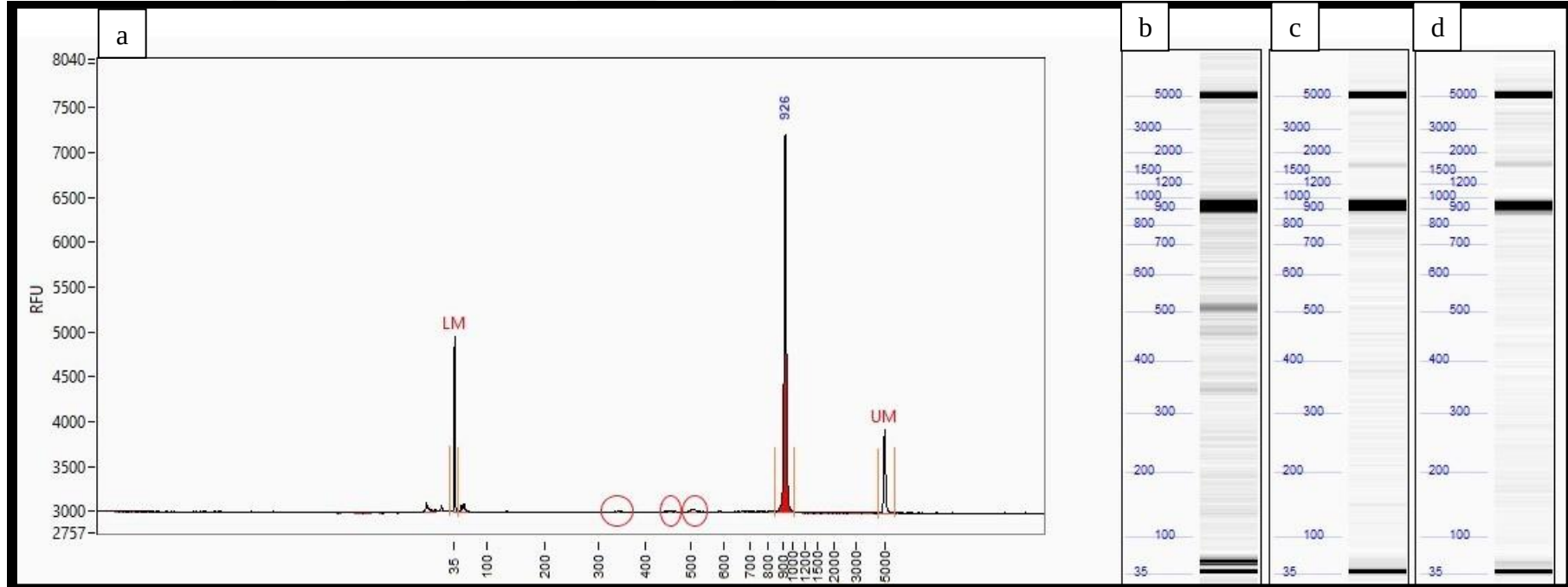
%0,4 dozunda EMS uygulanmış tohumlara ait M₂ jenerasyonun *ah FAD2B* geni için Fragment Analyzer™ sonuçları Şekil 4.5.'te verilmiştir. Bu gen için bu dozda potansiyel mutasyon yakalanamamıştır. Ancak bu gen için %1,2 dozunda elde edilen sonuçlarda (Şekil 4.6.) A7 kuyucuğuna yüklenen 339, 340, 341, 342 (Şekil 4.7) ve A8 kuyucuğuna yüklenen 378, 380, 381, 382 (Şekil 4.8) genotiplerinde kesilmiş PCR ürünleri tespit edilmiştir.

%0,4 dozunda EMS uygulanmış tohumlara ait M₂ jenerasyonun *ara h 1.01* geni için Fragment Analyzer™ sonuçları Şekil 4.9.'da verilmiştir. Bu gen bölgesi için bu dozda kesilmiş PCR ürünlerine rastlanamamıştır. Ancak bu genin %1,2 dozunda elde edilen sonuçlarında (Şekil 4.10.) B7 kuyucuğuna yüklenen 59, 62, 64, 66 (Şekil 4.11.) ve B12 kuyucuğuna yüklenen 571, 572, 573, 574 (Şekil 4.12.) genotiplerinde kesilmiş PCR ürünleri tespit edilmiştir.

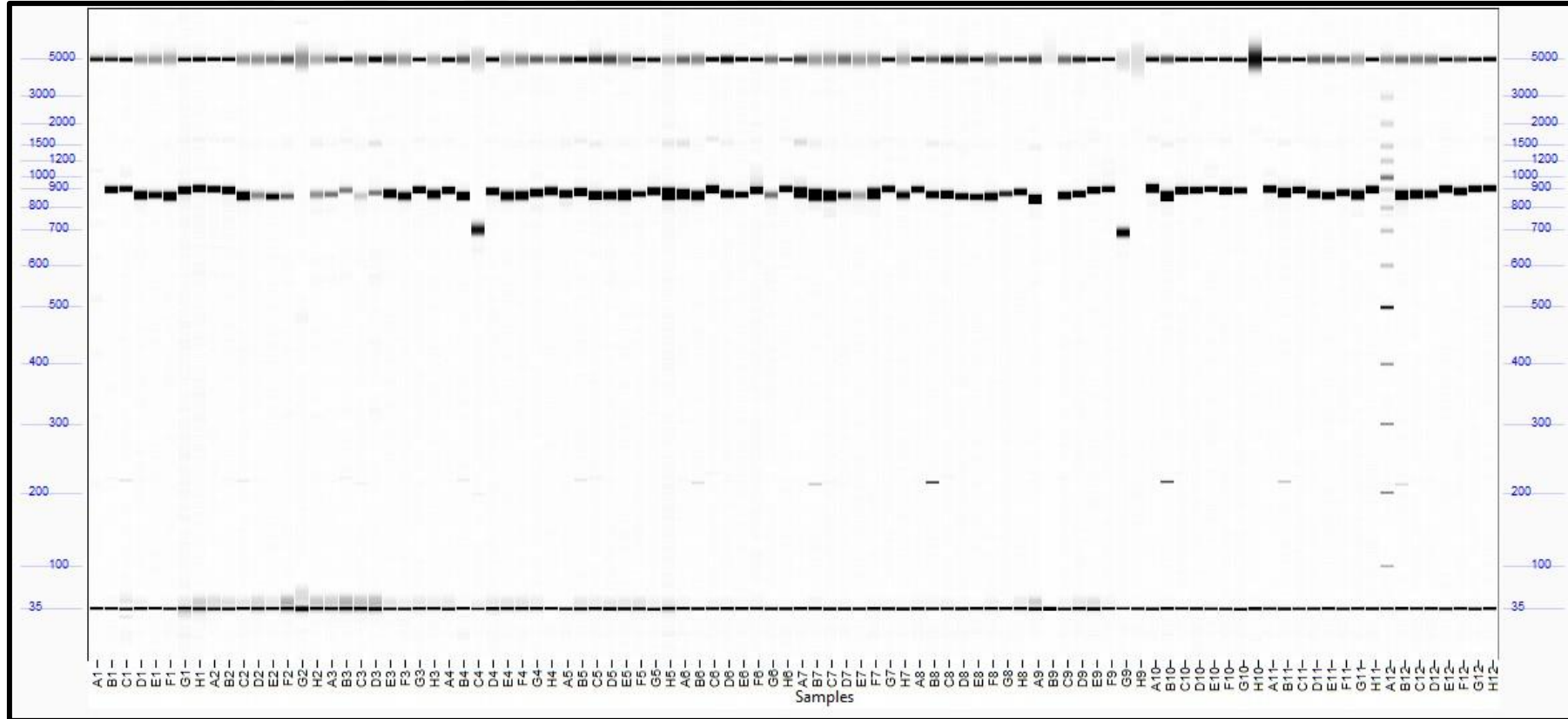
%0,4 ve %1,2 dozunda EMS uygulanmış tohumlara ait M₂ jenerasyonun *ara h 1.02* geni için Fragment Analyzer™ sonuçları Şekil 4.13 ve 4.16'da sırasıyla verilmiştir. Her iki doza ait uygulamalarda kesilmiş PCR ürünlerine rastlanmıştır. Bu gen için %0,4 doz uygulamasındaki A10 kuyucuğuna yüklenen 468, 469, 470, 472 (Şekil 4.14) ve G10 kuyucuğuna yüklenen 499, 500, 501, 502 (Şekil 4.15) numaralarına sahip genotiplerde ise kesilmiş PCR ürünleri tespit edilmiştir. Bu genin %1,2 dozunda elde edilen sonuçları Şekil 4.16.'da verilmiştir. Bu doz için de C6 kuyucuğuna yüklenen 295, 301, 303, 305 numaralarına sahip genotiplerde kesilmiş PCR ürünleri tespit edilmiştir (Şekil 4.17.).



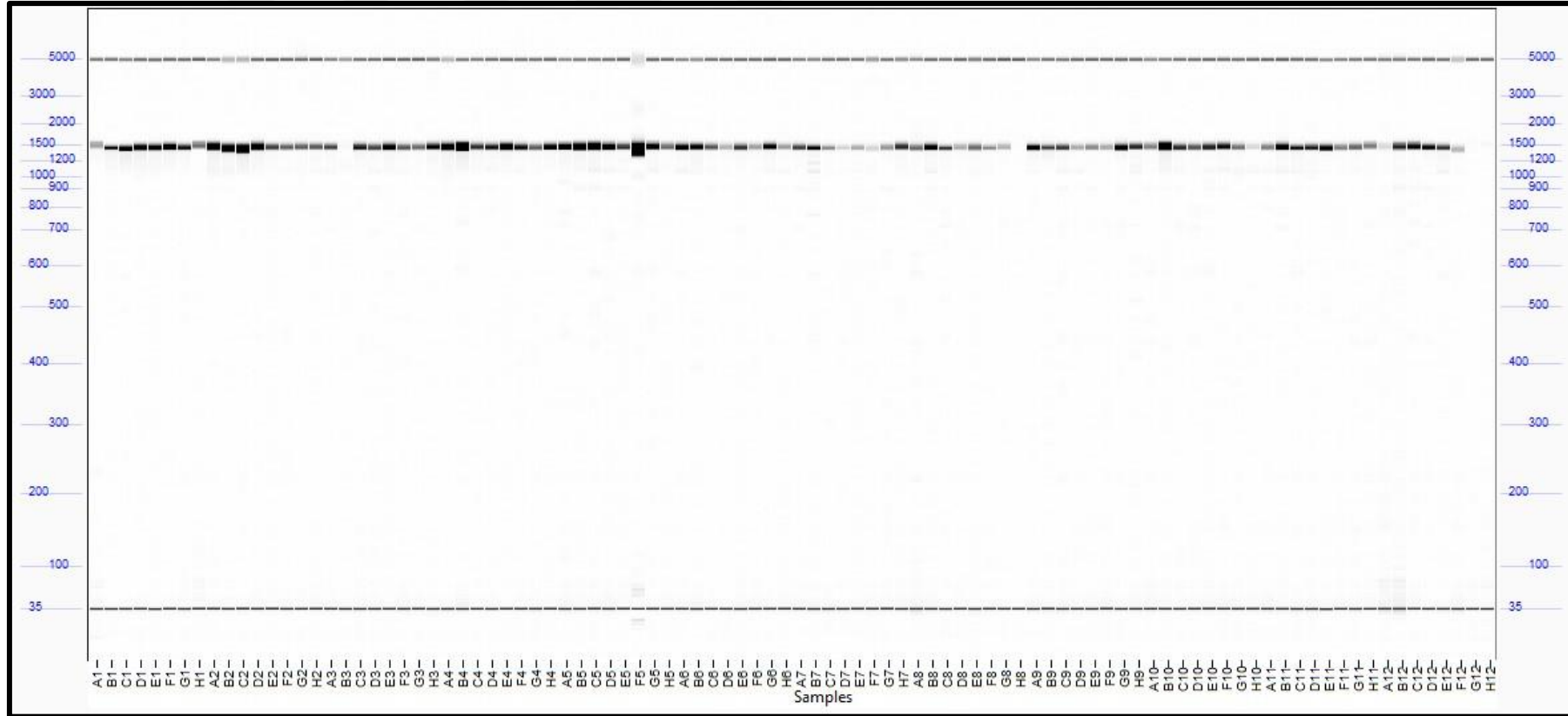
Şekil 4.2. *ah FAD2A* geni için %0,4 EMS'li M_2 genotiplere ait sanal jel görüntüsü; iki kırmızı çizgi arasındaki A12 kuyucuğunda kesilmiş DNA görüntüleri tespit edilmiştir



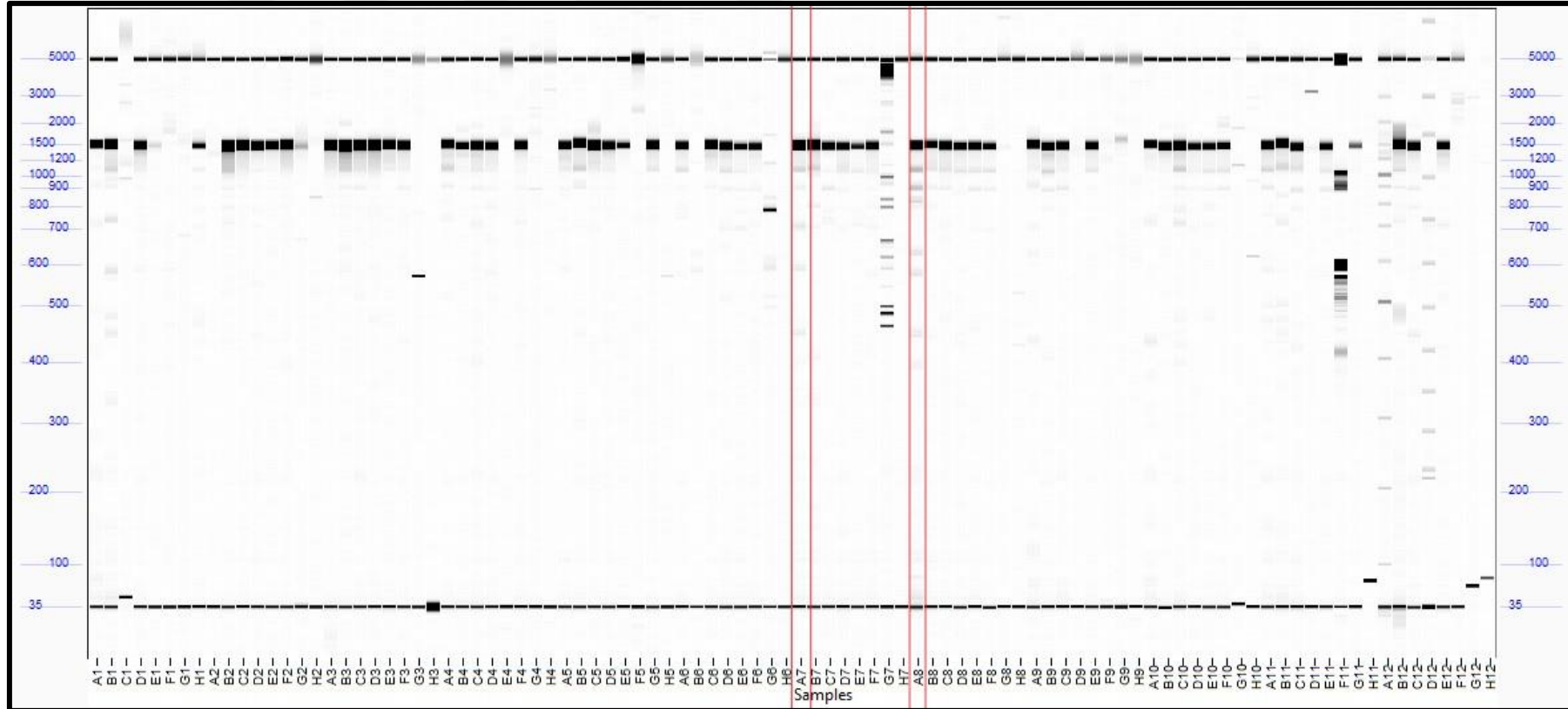
Şekil 4.3. *ah FAD2A* geni için %0,4 EMS'li A12 kuyucuğunun PROSize™ programında ayrıntılı görüntülenmesi; **a)** grafikte peak noktaları; **b)** kesilmiş PCR ürünü içeren A12 kuyucuğunun sanal jel görüntüsü; **c)** kesilmiş PCR ürünü içermeyen B2 kuyucuğuna ait sanal jel görüntüsü; **d)** kesilmiş PCR ürünü içermeyen C3 kuyucuğuna ait sanal jel görüntüsü



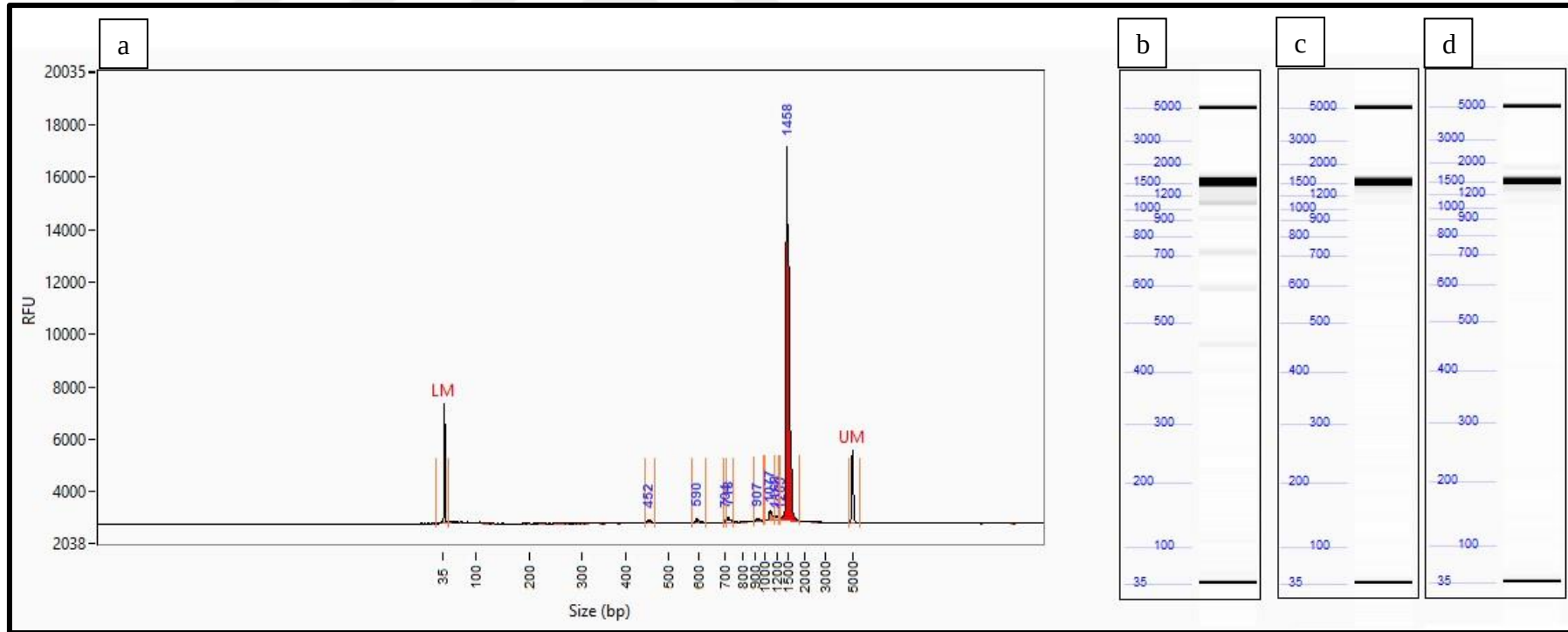
Şekil 4.4 *ah FAD2A* geni için %1,2 EMS'li M_2 genotiplere ait sanal jel görüntüsü; bu uygulamada kesilmiş PCR ürünleri tespit edilememiştir; A12 kuyucuğuna ladder yüklenmiştir



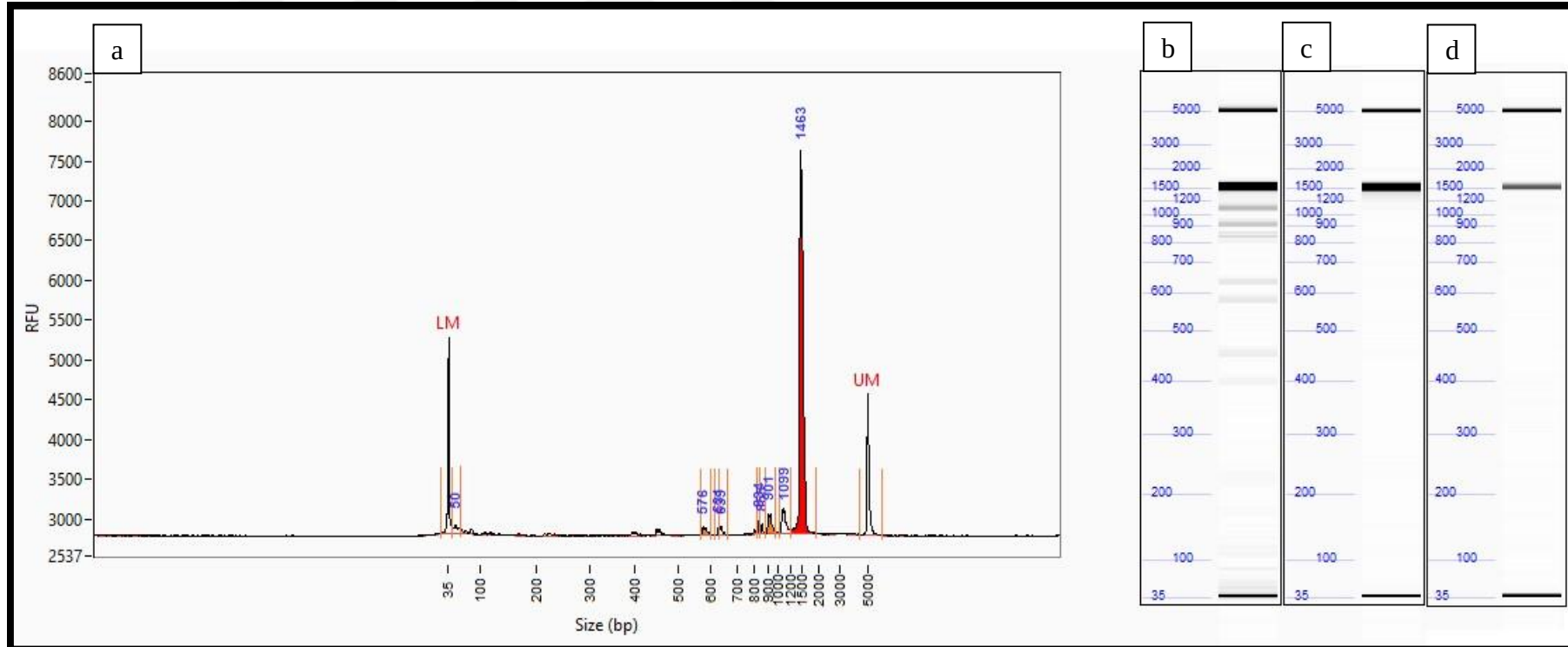
Şekil 4.5. *ah FAD2B* geni için %0,4 EMS’li M_2 genotiplere ait sanal jel görüntüsü; bu uygulamada kesilmiş PCR ürünleri tespit edilememiştir



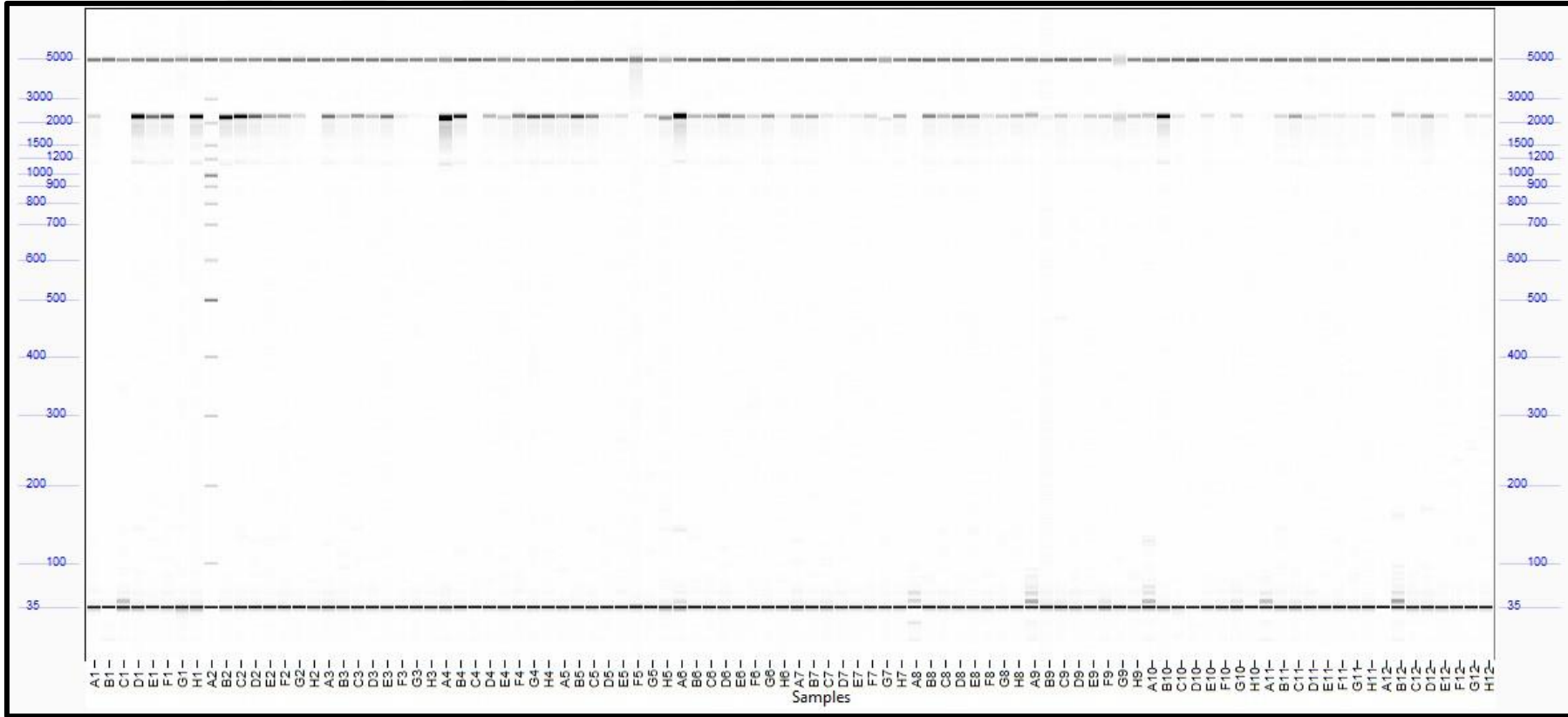
Şekil 4.6. *ah FAD2B* geni için %1,2 EMS'li M_2 genotiplere ait sanal jel görüntüsü; iki kırmızı çizgi arasındaki A7 ve A8 kuyucuklarında kesilmiş PCR ürünleri tespit edilmiştir; A12 kuyucuğuna ladder yüklenmiştir



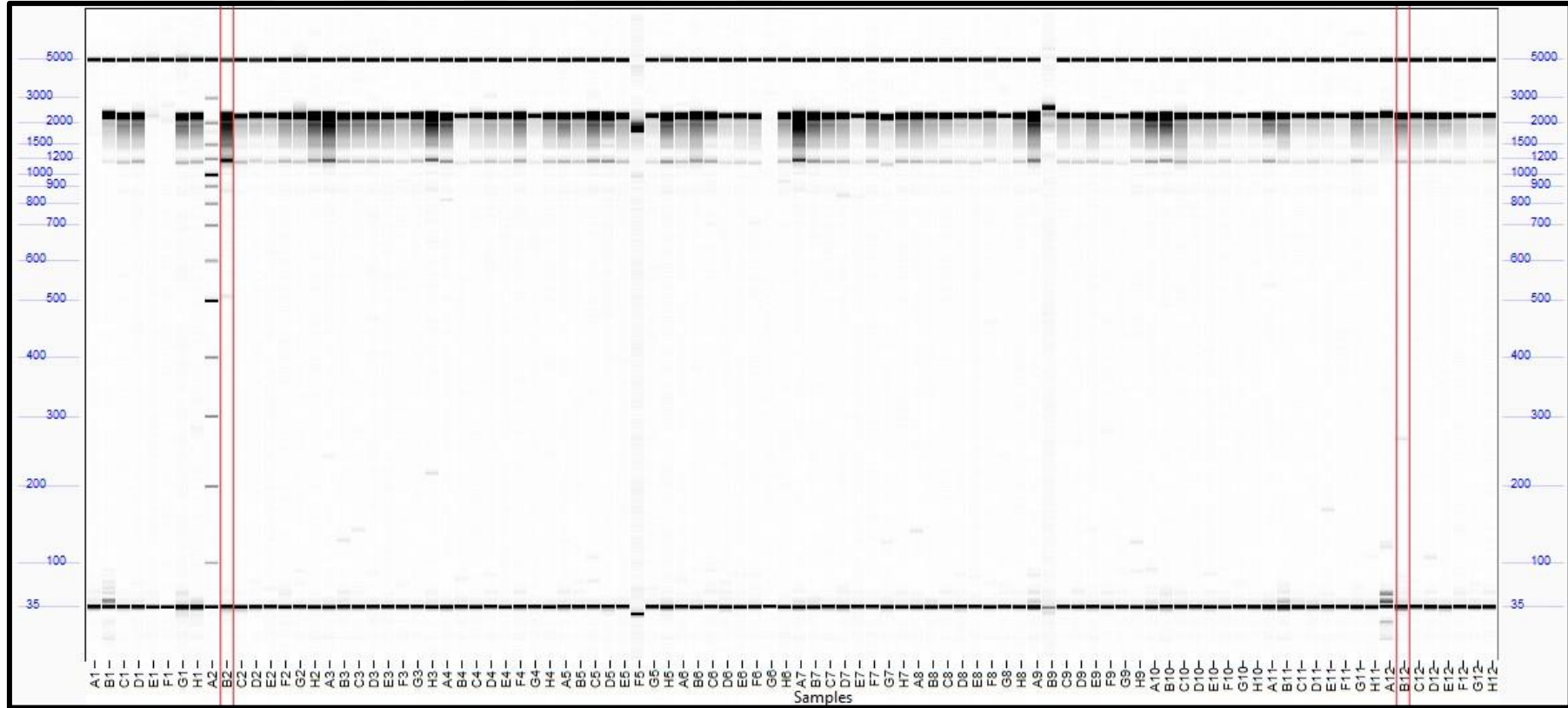
Şekil 4.7. *ah FAD2B* geni için %1,2 EMS'li A7 kuyucuğunun PROSize™ programında ayrıntılı görüntülenmesi; **a)** A7 kuyucuğuna ait peak noktaları (kesilmiş PCR ürünleri); **b)** kesilmiş PCR ürünü içeren A7 kuyucuğunun sanal jel görüntüsü; **c)** kesilmiş PCR ürünü içermeyen E2 kuyucuğuna ait sanal jel görüntüsü; **d)** kesilmiş PCR ürünü içermeyen B4 kuyucuğuna ait sanal jel görüntüsü



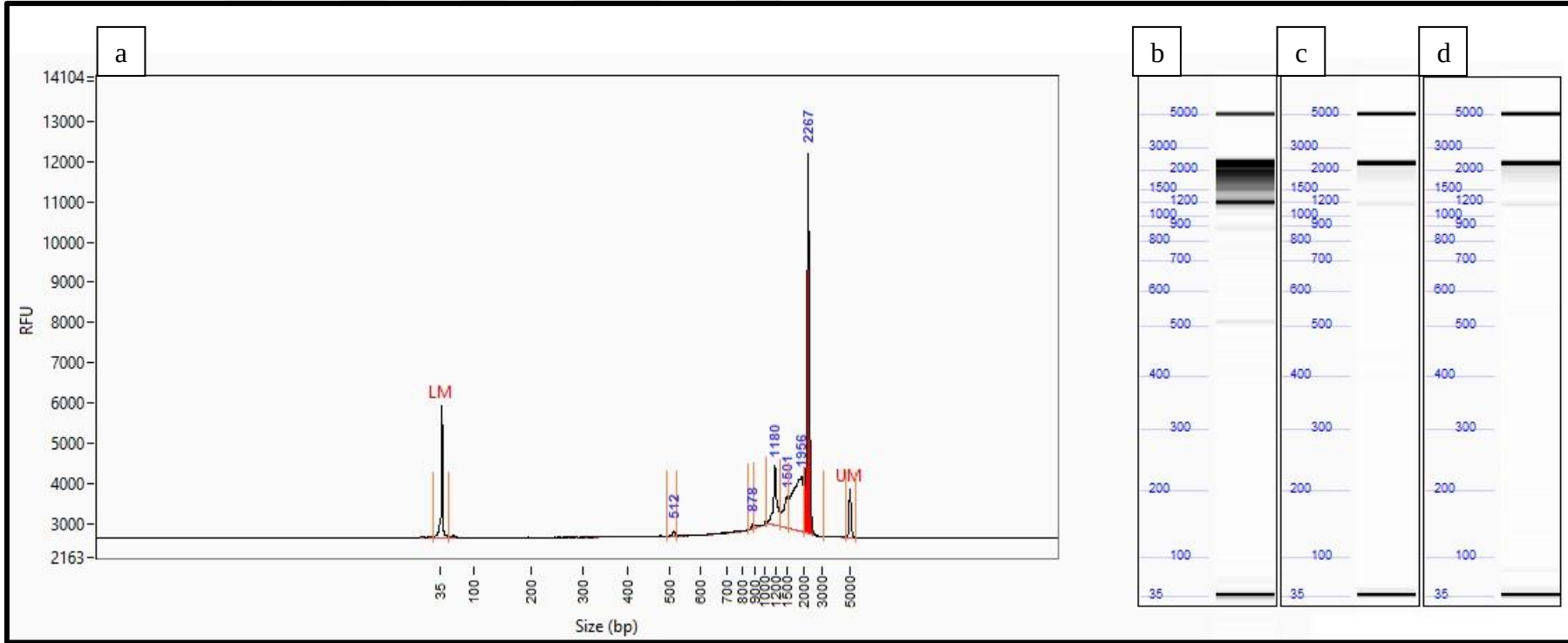
Şekil 4.8. *ah FAD2B* geni için %1,2 EMS’li A8 kuyucuğunun PROSize™ programında ayrıntılı görüntülenmesi; **a)** A8 kuyucuğuna ait peak noktaları (kesilmiş PCR ürünleri); **b)** kesilmiş PCR ürünü içeren A8 kuyucuğunun sanal jel görüntüsü; **c)** kesilmiş PCR ürünü içermeyen B10 kuyucuğuna ait sanal jel görüntüsü; **d)** kesilmiş PCR ürünü içermeyen G11 kuyucuğuna ait sanal jel görüntüsü



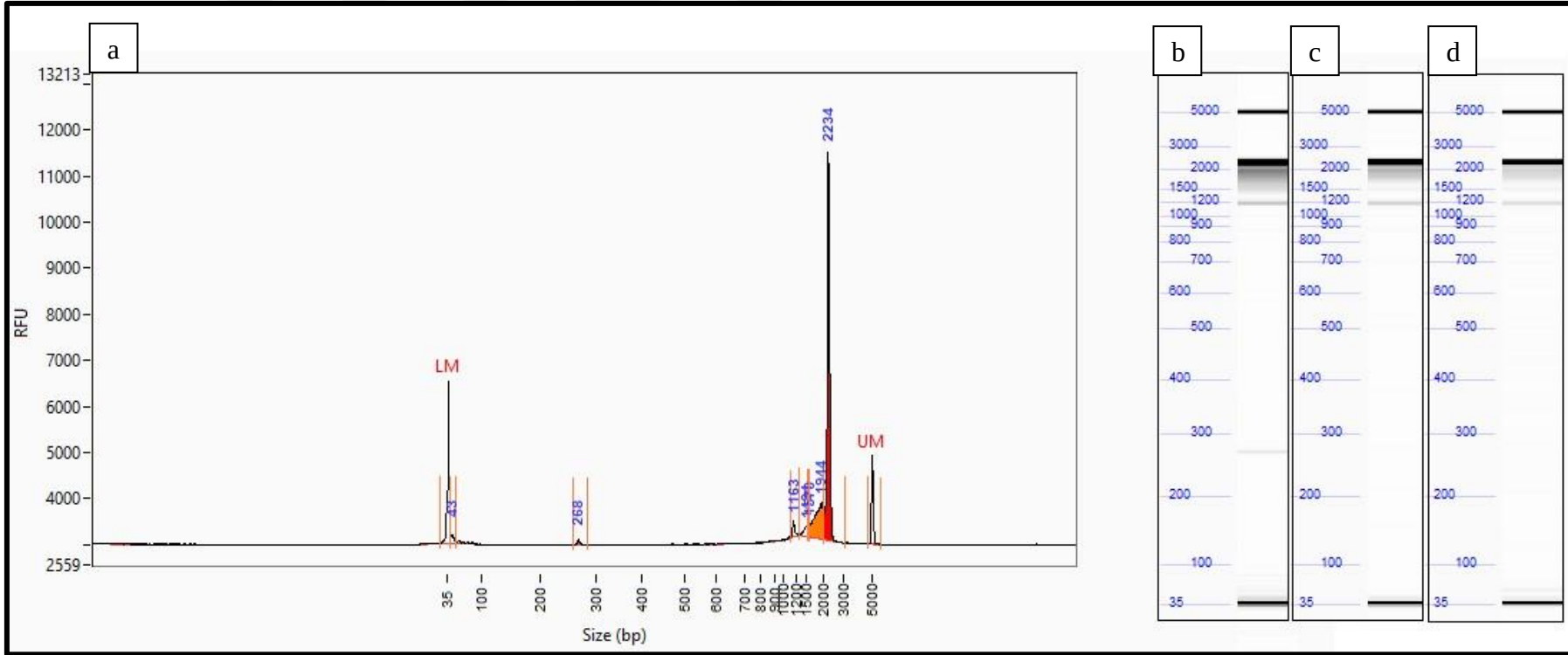
Şekil 4.9. *ara h 1.01* geni için %0,4 EMS'li M_2 genotiplere ait sanal jel görüntüsü; bu uygulamada kesilmiş PCR ürünleri tespit edilememiştir; A2 kuyucuğuna ladder yüklenmiştir



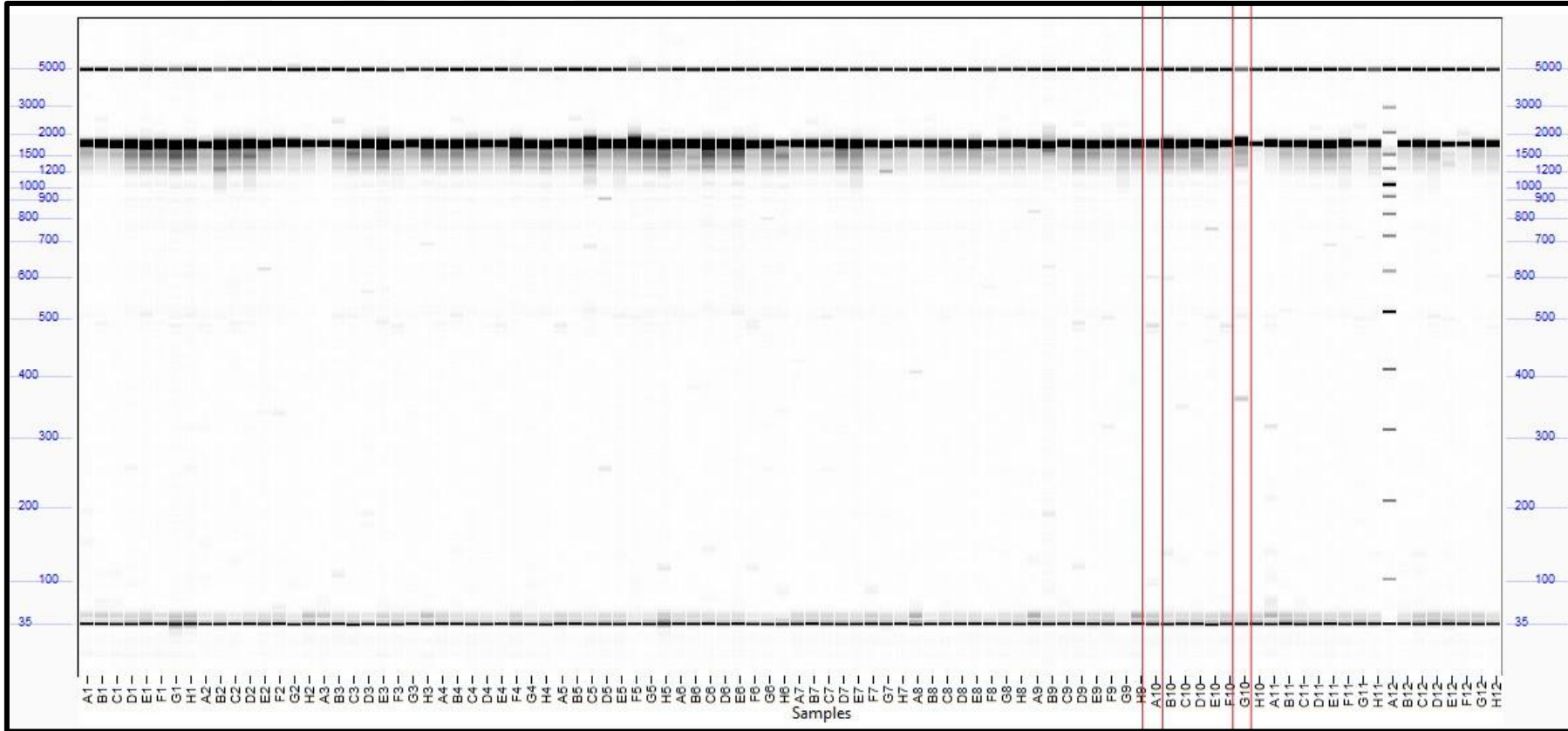
Şekil 4.10. *ara h 1.01* geni için %1,2 EMS'li M_2 genotiplere ait sanal jel görüntüsü; iki kırmızı çizgi arasındaki B2 ve B12 kuyucuklarında kesilmiş PCR ürünleri tespit edilmiştir; A2 kuyucuğuna ladder yüklenmiştir



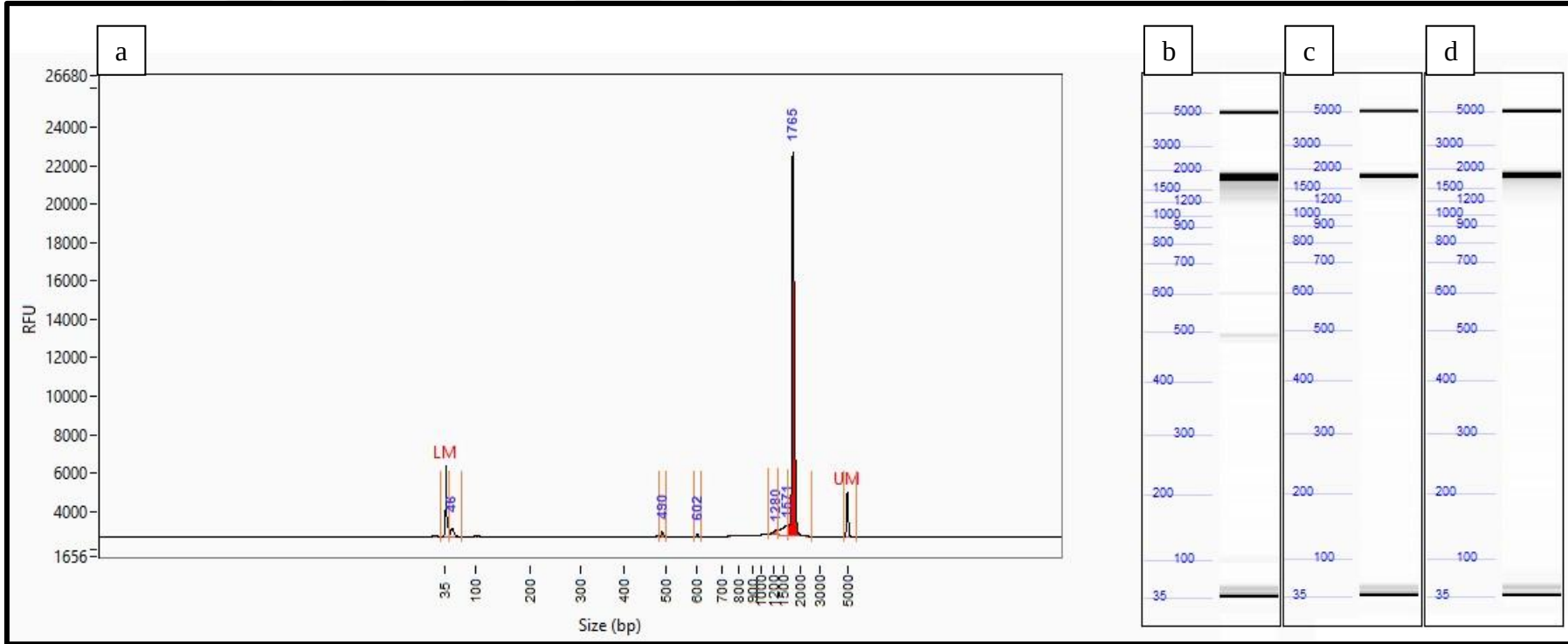
Şekil 4.11. *ara h 1.01* geni için %1,2 EMS'li B2 kuyucuğunun PROSize™ programında ayrıntılı görüntülenmesi; **a)** B2 kuyucuğuna ait grafikte peak noktaları; **b)** kesilmiş PCR ürünü içeren B2 kuyucuğunun sanal jel görüntüsü; **c)** kesilmiş PCR ürünü içermeyen F11 kuyucuğuna ait sanal jel görüntüsü; **d)** kesilmiş PCR ürünü içermeyen B4 kuyucuğuna ait sanal jel görüntüsü



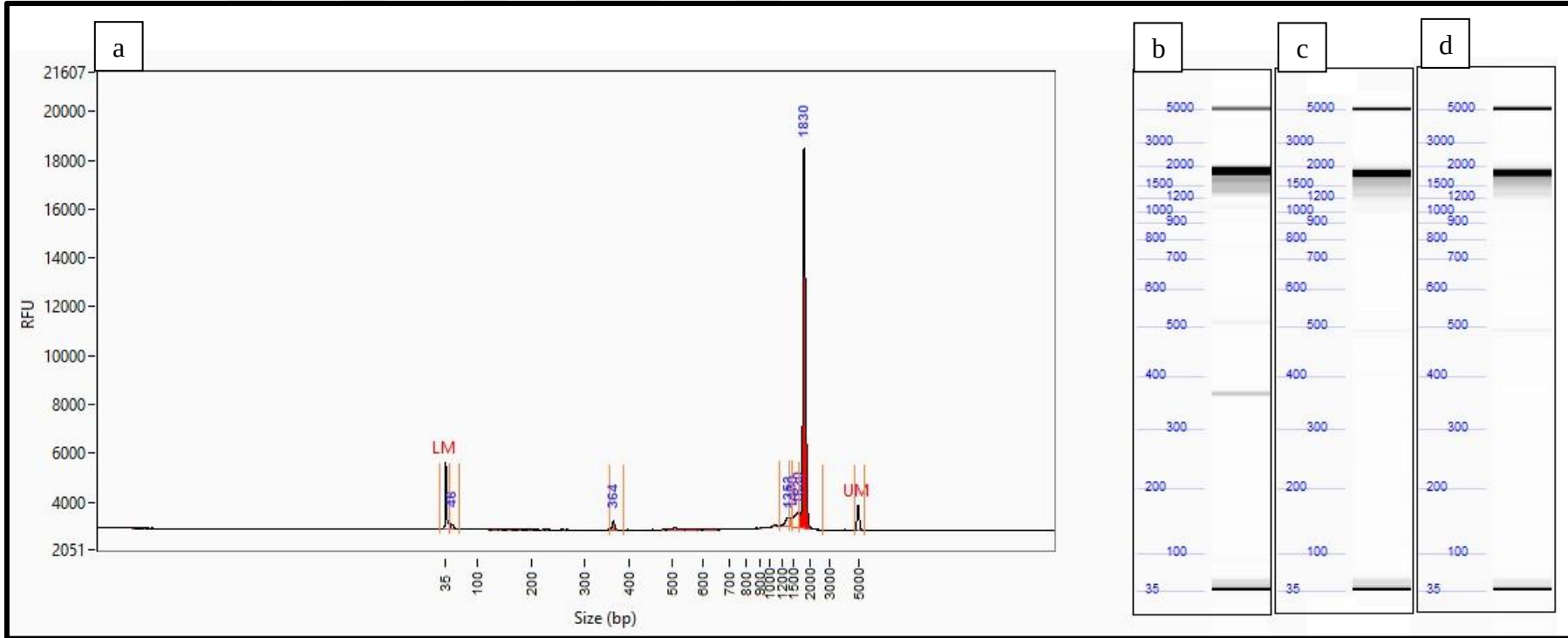
Şekil 4.12. *ara h 1.01* geni için %1,2 EMS’li B12 kuyucuğunun PROSize™ ‘programında ayrıntılı görüntülenmesi; **a)** B12 kuyucuğuna ait grafikte peak noktaları; **b)** kesilmiş PCR ürünü içeren B12 kuyucuğunun sanal jel görüntüsü; **c)** kesilmiş PCR ürünü içermeyen E12 kuyucuğu ait sanal jel görüntüsü; **d)** kesilmiş PCR ürünü içermeyen H12 kuyucuğuna ait sanal jel görüntüsü



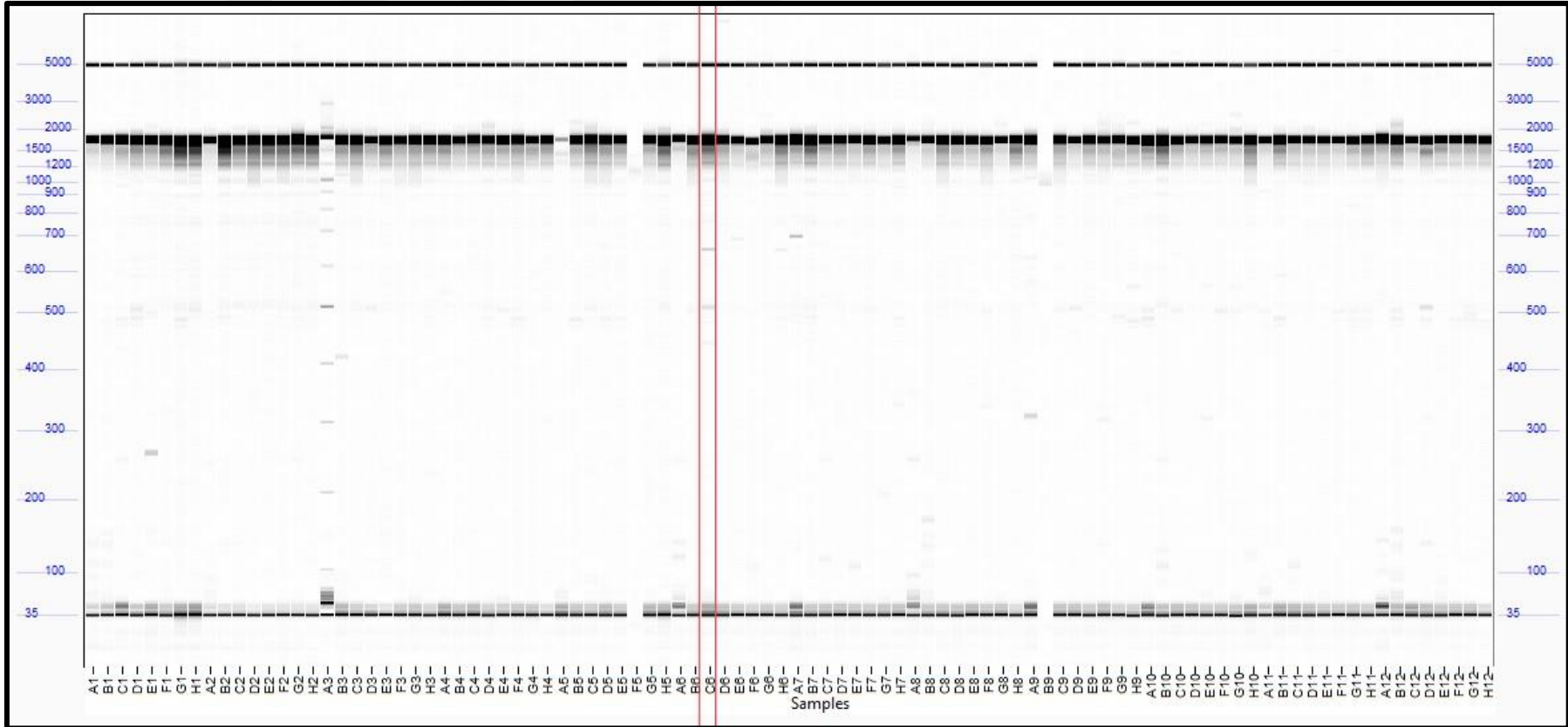
Şekil 4.13. *ara h 1.02* geni için %0,4 EMS'li M_2 genotiplere ait sanal jel görüntüsü; iki kırmızı çizgi arasındaki A10 ve G10 kuyucuklarında kesilmiş PCR ürünleri tespit edilmiştir; A12 kuyucuğuna ladder yüklenmiştir



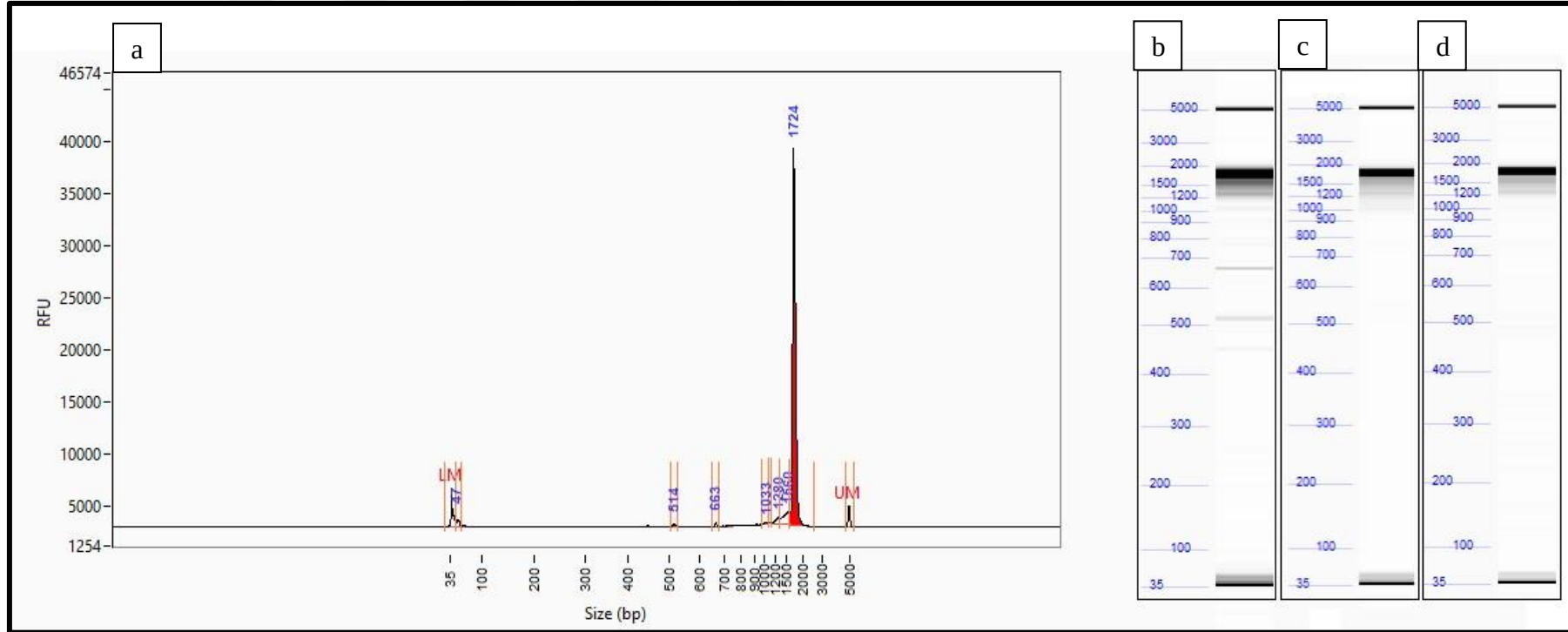
Şekil 4.14. *ara h 1.02* geni için %0,4 EMS’li A10 kuyucuğunun PROSize™ ‘programında ayrıntılı görüntülenmesi; **a)** A10 kuyucuğuna ait grafikte peak noktaları; **b)** kesilmiş PCR ürünü içeren A10 kuyucuğunun sanal jel görüntüsü; **c)** kesilmiş PCR ürünü içermeyen H10 kuyucuğuna ait sanal jel görüntüsü; **d)** kesilmiş PCR ürünü içermeyen G11 kuyucuğuna ait sanal jel görüntüsü



Şekil 4.15. *ara h 1.02* geni için %0,4 EMS’li G10 kuyucuğunun PROSize™ programında ayrıntılı görüntülenmesi; **a)** G10 kuyucuğuna ait grafikte peak noktaları; **b)** kesilmiş PCR ürünü içeren G10 kuyucuğunun sanal jel görüntüsü; **c)** kesilmiş PCR ürünü içermeyen C3 kuyucuğuna ait sanal jel görüntüsü; **d)** kesilmiş PCR ürünü içermeyen E4 kuyucuğuna ait sanal jel görüntüsü



Şekil 4.16 *ara h 1.02* geni %1,2 EMS'li M2 genotiplere ait sanal jel görüntüsü; iki kırmızı çizgi arasındaki C6 kuyucuğunda kesilmiş PCR ürünleri tespit edilmiştir; A3 kuyucuğuna ladder yüklenmiştir



Şekil 4.17. *ara h 1.02* geni için %1,2 EMS’li C6 kuyucuğunun PROSize™ programında ayrıntılı görüntülenmesi; **a)** C6 kuyucuğuna ait grafikte peak noktaları; **b)** kesilmiş PCR ürünü içeren C6 kuyucuğunun sanal jel görüntüsü; **c)** kesilmiş PCR ürünü içermeyen F3 kuyucuğuna ait sanal jel görüntüsü; **d)** kesilmiş PCR ürünü içermeyen H12 kuyucuğuna ait sanal jel görüntüsü

4.3. Seçilen Genotiplerde Dizileme İşlemi

Fragment Analyzer™ cihazının sonuçlarına göre potansiyel mutasyon içeren genotiplere ait PCR ürünleri elde edilen sonuçları teyit etmek amacıyla dizilemeye gönderilmiştir. Bu işlem için seçilen 32 genotip Çizelge 4.1.'de verilmiştir. Ayrıca her bir gen bölgesi için kontrol bitkilerde dizilemeye tabi tutulmuştur. Dizilemeye gönderilen her bir genotip ise viyollerden alınarak saksılara ekilmiş böylece ileri çalışmalarda kullanılmak üzere muhafaza edilmiştir (Şekil 4.18.).

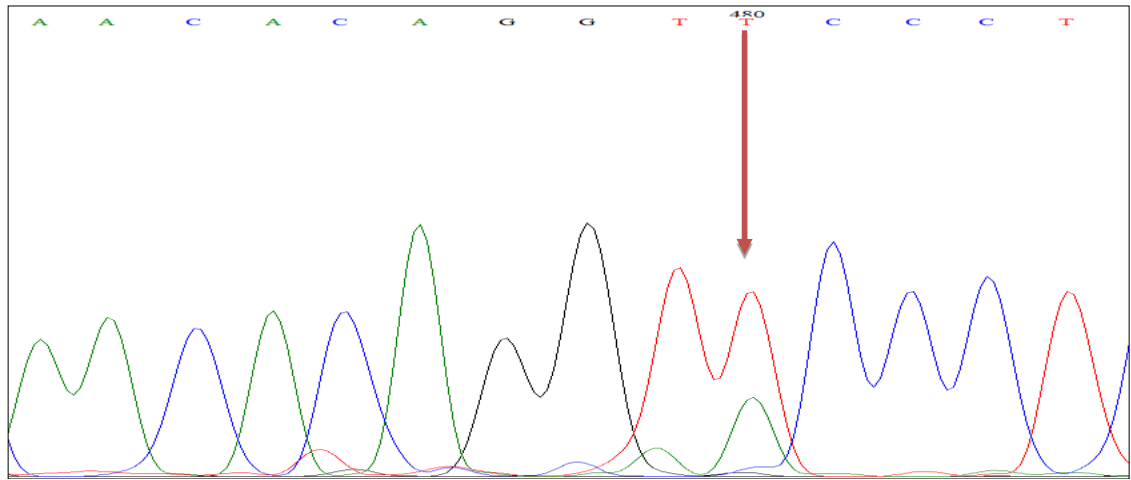
Çizelge 4.1. Dizilemeye gönderilen genotipler

Sıra Nu.	EMS Dozu (%)	Gen	96'lık Plaka Kuyucuk Numarası	Genotip Numarası
1	0,4	<i>ah FAD2A</i>	A12	546
2	0,4	<i>ah FAD2A</i>	A12	547
3	0,4	<i>ah FAD2A</i>	A12	548
4	0,4	<i>ah FAD2A</i>	A12	549
5	1,2	<i>ah FAD2B</i>	A7	339
6	1,2	<i>ah FAD2B</i>	A7	340
7	1,2	<i>ah FAD2B</i>	A7	341
8	1,2	<i>ah FAD2B</i>	A7	342
9	1,2	<i>ah FAD2B</i>	A8	378
10	1,2	<i>ah FAD2B</i>	A8	380
11	1,2	<i>ah FAD2B</i>	A8	381
12	1,2	<i>ah FAD2B</i>	A8	382
13	1,2	<i>ara h 1.01</i>	B2	59
14	1,2	<i>ara h 1.01</i>	B2	62
15	1,2	<i>ara h 1.01</i>	B2	64
16	1,2	<i>ara h 1.01</i>	B2	66
17	1,2	<i>ara h 1.01</i>	B12	571
18	1,2	<i>ara h 1.01</i>	B12	572
19	1,2	<i>ara h 1.01</i>	B12	573
20	1,2	<i>ara h 1.01</i>	B12	574
21	0,4	<i>ara h 1.02</i>	A10	468
22	0,4	<i>ara h 1.02</i>	A10	469
23	0,4	<i>ara h 1.02</i>	A10	470
24	0,4	<i>ara h 1.02</i>	A10	472
25	0,4	<i>ara h 1.02</i>	G10	499
26	0,4	<i>ara h 1.02</i>	G10	500
27	0,4	<i>ara h 1.02</i>	G10	501
28	0,4	<i>ara h 1.02</i>	G10	502
29	1,2	<i>ara h 1.02</i>	C6	295
30	1,2	<i>ara h 1.02</i>	C6	301
31	1,2	<i>ara h 1.02</i>	C6	303
32	1,2	<i>ara h 1.02</i>	C6	305

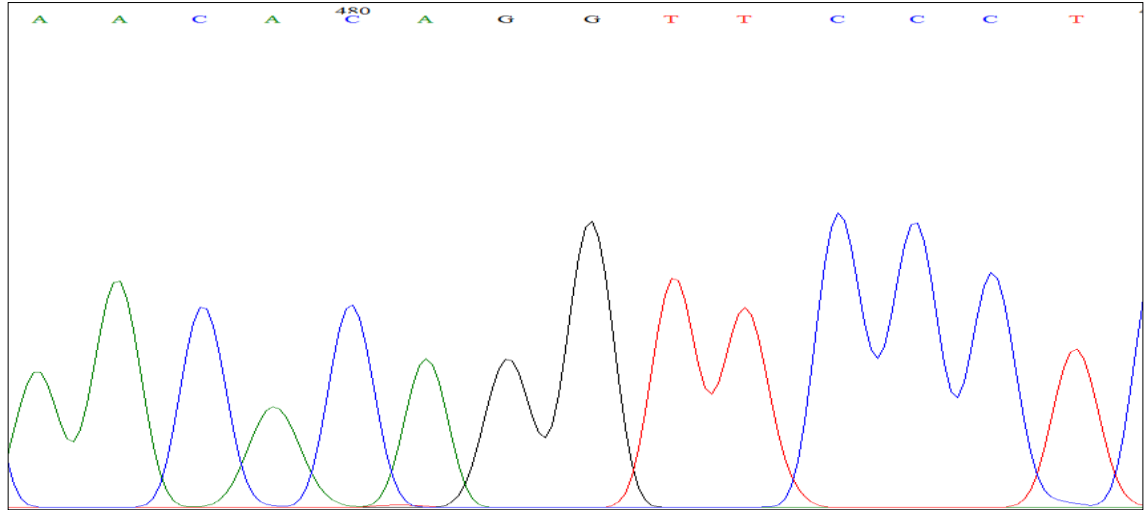


Şekil 4.18. Potansiyel mutant genotipler

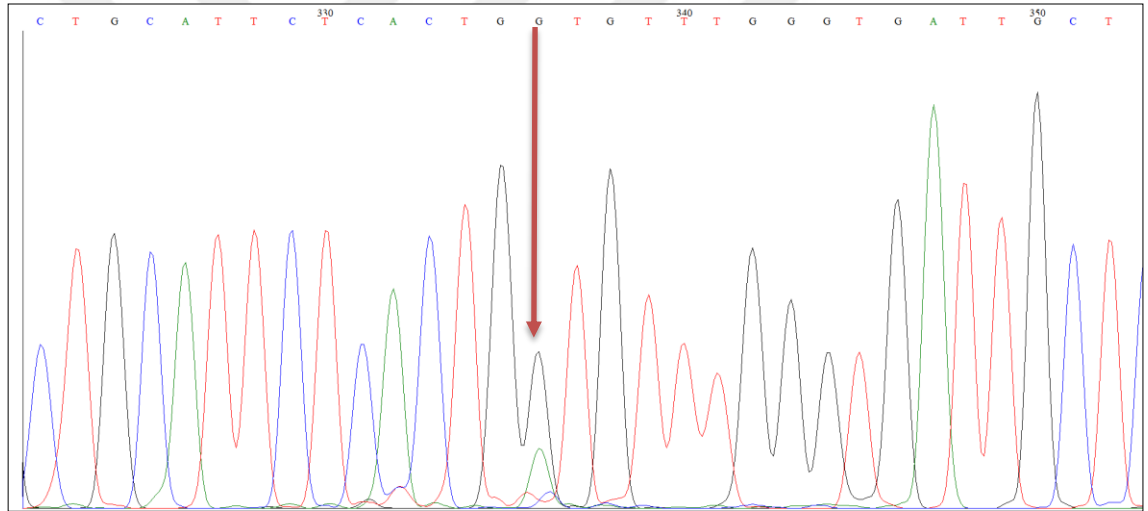
Dizileme sonuçlarında sadece *ah FAD2* genlerinde mutasyon tespit edilmiş olup diğer *ara h* genlerinde mutasyon bulunamamıştır. %1,2 EMS ile muamele edilmiş 339 numaralı genotipin *ah FAD2B* gen bölgesinin 480. bazında T:A (Şekil 4.19.); %0,4 EMS ile muamele edilmiş 547 numaralı genotipin ise *ah FAD2A* gen bölgesinin 336. bazında G:A (Şekil 4.20.) şeklinde heterozigot SNP tespit edilmiştir. Kontrol gruplarına ait dizileme sonuçları ise *ah FAD2B* için Şekil 4.21.’de; *ah FAD2A* için ise Şekil 4.22’de verilmiştir. Böylelikle mutasyon frekansı “Bulunan Mutasyon Adeti / (Toplam Taranan Genotip Sayısı x Taranan Gen Bölgesi Uzunluğu)” formülüne göre *ah FAD2A* için 1/317 kb (1/384x826 bp), *ah FAD2B* için ise 1/466 kb (1/384x1.214 bp) olarak hesaplanmıştır.



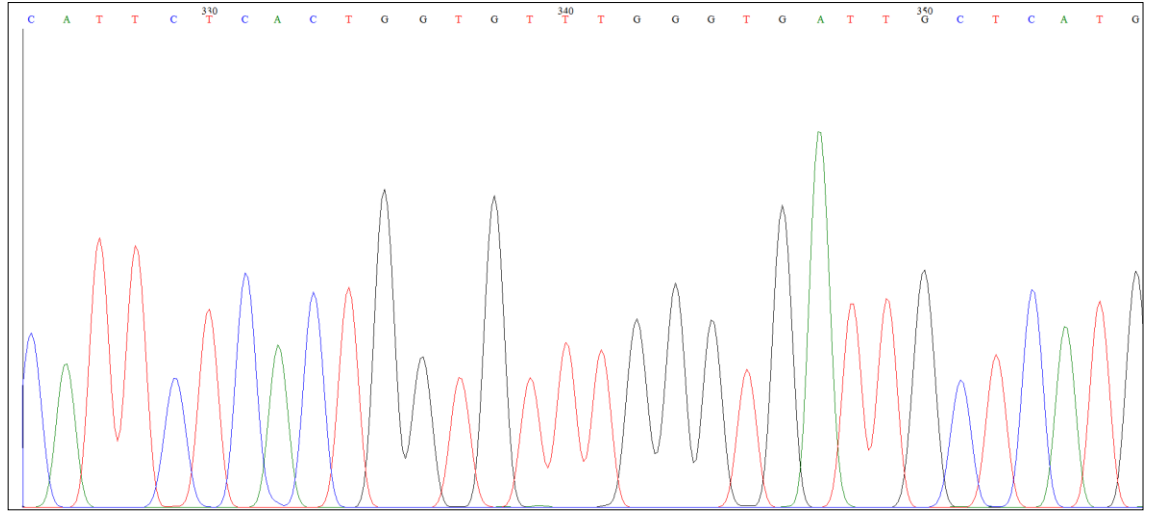
Şekil 4.19. %1,2 EMS ile muamele edilmiş 339 numaralı genotipin *ah FAD2B* gen bölgesinin 480. bazındaki SNP



Şekil 4.20. Kontrol NC-7 çeşidine ait *ah FAD2B* gen bölgesi için dizileme



Şekil 4.21. %0,4 EMS ile muamele edilmiş 547 numaralı genotipin *ah FAD2A* gen bölgesinin 336. bazındaki SNP



Şekil 4.22. Kontrol NC-7 çeşidine ait *ah FAD2A* gen bölgesi için dizileme

5. TARTIŞMA

TILLING için M_1 mutasyon popülasyonu oluşturmak amacıyla yerfistiği NC-7 çeşidine ait 3.000 adet tohum EMS kimyasalının tohum tarafından kolay alınabilmesi için 10 saat distile suda bekletilmiş, sonrasında ise 1.500 adet tohumu %0,4 EMS dozlu solüsyonda 12 saat, bir diğer 1.500 adet tohumu ise %1,2 EMS dozunda 4,5 saat bekletilmiş daha sonrasında tohumlar 12 saat akan suda yıkanmıştır. Bu tohumlar açık tarla şartlarında ekimleri gerçekleştirilmiş ve %0,4 EMS dozunda %90,1 çıkış (1.353 adet); %1,2 EMS uygulanmış olanlarda ise %60,4 (906 adet) oranında çıkış gerçekleşmiştir. Çıkış yapan bitkilerde de %0,4'lük EMS uygulaması olan bitkilerin %68,7'si (930 adeti) kapsül bağlamış, %1,2'lik EMS uygulanmış olanların da %0,4'lük bitkilere çok yakın bir oranda %67,4'ü (611 adeti) kapsül bağladığı gözlemlenmiştir. EMS dozunun özellikle bitki çıkış yüzdeleri üzerinde farklı etkileri olduğu ancak çıkış sonrası kapsül bağlama oranlarında ise yakın yüzdelere sahip oldukları tespit edilmiştir. Yerfistiğinde benzer bir çalışmada Gunasekaran ve Pavadai (2015), M_1 mutasyon popülasyonu oluşturmak için tohumlara 6'şar farklı dozda γ -ışını ve EMS uygulamışlardır. γ -ışını uygulaması için 10, 20, 30, 40, 50 ve 60 kR dozunu, EMS uygulaması için de %0,1, %0,2, %0,3, %0,4, %0,5 ve %0,6 dozlarını kullanmışlardır. EMS uygulamaları için tohumları 6 saat suda beklettikten sonra EMS'li solüsyonda 2 saat bekletmişler daha sonrasında tohumları 4 saat yıkamışlardır. Çalışmalarında 10, 20, 30, 40, 50 ve 60 kR γ -ışını dozları için sırasıyla %86,6, %77,9, %71,6, %61,5, %52,4 ve %40,2 M_1 bitki çimlenme yüzdeleri elde etmişlerdir. %0,1, %0,2, %0,3, %0,4, %0,5 ve %0,6 EMS dozları için ise sırasıyla %8,1, %81,6, %73,5, %60,6, %51,3 ve %41,5 elde etmişlerdir. Farklı suda bekletme sürelerinden dolayı Gunasekaran ve Pavadai (2015) çalışmalarında bu tezde elde edilen %0,4 EMS dozundan farklı çimlenme yüzdeleri elde edilmiştir. Ancak bu tez çalışmasına benzer şekilde mutagen uygulama dozları arttıkça çimlenme oranların düştüğü gözlenmiştir. Gunasekaran ve Pavadai (2015) doz arttıkça çimlenme oranının düşmesinin nedenini mutagenlerin bitki kromozomu üzerinde oluşturdukları zararlar olduğunu bildirmişlerdir. Gunasekaran ve Pavadai (2015) çalışmalarında çimlenme sonrası hayatta kalan bitkilerin sayılarını da hesaplamışlardır. Buna göre 10, 20, 30, 40, 50 ve 60 kR γ -ışını dozları sonrası çimlenen bitkilerin hayatta kalma yüzdeleri sırasıyla %97,3, %96,9, %7,3, %94,7, %94,4, %92,5'dir. %0,1, %0,2, %0,3, %0,4, %0,5 ve %0,6 EMS dozları için ise sırasıyla %98,2, %97,1, %97,3, %92,3, %91,9, %86,5'dir. Araştırmacılar ayrıca çalışmalarında kapsül bağlayan bitkilerin yüzdelerini hesaplamamışlardır ancak hayatta kalan bitki yüzdelerine bakarak mutasyon uygulamalarının özellikle yerfistiği çimlenmesi üzerinde etkili olduğu, çimlenme sonrası ise bitkiler birbirlerine yakın yüzdelere hayatta kaldığı görülmüştür. Bu tez çalışmasında da farklı dozda mutasyon uygulamaları özellikle çimlenme yüzdesi arasında farklar olduğu ancak çimlenme sonrası birbirlerine yakın yüzdelere bitkilerin kapsül bağladığı tespit edilmiştir. Kharade vd. (2015) benzer şekilde γ -ışını ve EMS mutagenlerini kullanarak yerfistiğinde bir çalışma yapmışlardır. Çalışmalarında γ -ışını 20, 30 ve 40 kR dozunu uygulamışlardır. EMS için ise tohumları önce 6 saat suda bekletmişler sonrasında ise %0,4 ve %0,6 EMS dozundaki solüsyonlarda 24 saat boyunca tohumları bekletmişler ve daha sonrasında tohumları 4 saat yıkamışlardır. 20, 30 ve 40 kR γ -ışını uygulamalarında sırasıyla %76,0, %69,5 ve %72,0 M_1 bitki çimlenme yüzdesi; %0,4 ve %0,6 EMS uygulamalarında ise sırasıyla %86 ve %82 M_1 bitki çimlenme yüzdesi elde etmişlerdir. Bu çalışmada da özellikle EMS dozu arttıkça çimlenme yüzdeleri düşmüştür. Suda bekletme sürelerinin

yürüttüğümüz çalışmadaki sürelerle yakın olmasından dolayı %0,4 EMS dozunda benzer çimlenme yüzdeleri elde edilmiştir. Hem Gunasekaran ve Pavadai (2015) hem de Kharade vd. (2015) çalışmalarında M_2 popülasyonunda normal çimlenme yüzdeleri görüldüğü belirtilmiş ve bu tez çalışmasında da aynı şekilde M_2 popülasyonu kontrollere yakın bir yüzdeyle çimlenmiştir. Bir başka benzer çalışmada Jadhav vd. (2018) yerfıstığında tohumlara SA ve EMS uygulaması yapmışlardır. Çalışmalarında SA uygulamadan önce tohumları 24 saat suda bekletmişler, sonrasında %0,2, %0,4, %0,6, %0,8, %1,0 ve %1,2 dozlarındaki SA solüsyon ile muamele etmişlerdir. EMS uygulaması öncesi tohumlar 6 saat suda bekletilmiş sonrasında %0,2, %0,4, %0,6, %0,8, %1,0 ve %1,2 dozlarındaki EMS solüsyonlarında bekletilmiştir. %0,2, %0,4, %0,6, %0,8, %1,0 ve %1,2 SA uygulamalarında sırasıyla %80,3, %48,3, %44,0, %30,0, %21,0, %15,3, %11,7 M_1 bitkilerinde çimlenme yüzdesi elde etmiştir. Aynı dozlar için EMS uygulamalarında ise sırasıyla %86,7, %82,0, %81,0, %74,3, %67,3, %59,3 ve %67,0 çimlenme yüzdesi elde edilmiştir. Bu çalışmada da mutagen uygulaması arttıkça çimlenme yüzdesi düştüğü görülmüştür.

M_1 bitkilerinden en çok tohum bağlayan 384 adet %0,4 EMS ve 384 adet %1,2 EMS bitkisi M_2 popülasyonu için sera koşullarında yetiştirilmiş, yapraklardan örnek alınması sonrası DNA izolasyonu gerçekleştirilmiş, TILLING tespiti için Fragment Analyzer™ cihazında enzim muamelesi sonrası görüntüleme yapılmış ve seçilmiş genotipler elde edilen sonuçların teyiti için dizilemeye tabi tutulmuştur. Dizileme ile mutasyonların tespiti sayesinde oleik /linoleik asit oranını kontrol eden *ah FAD2A* ve *ah FAD2B* genlerinde için beklenen mutasyonlar yakalanmış ancak alerjen proteinleri kodlayan *ara h 1.01* ve *ara h 1.02* genleri için mutasyon yakalanamamıştır. *ara h 2.01* ve *ara h 2.02* için gen bölgeleri için ise PCR sisteminde yaşanan sorunlardan dolayı TILLING çalışmasına dâhil edilmemiştir. Mutasyon yakalanan %0,4 EMS popülasyonundaki 547 numaralı genotipin *ah FAD2A* geninin 336. bazında G:A baz değişikliği, %1,2 EMS popülasyonunun 339 numaralı genotipinde ise *ah FAD2B* geninin 480. bazında T:A baz değişikliği tespit edilmiştir. *ah FAD2A* için 1/317 kb, *ah FAD2B* için ise 1/466 kb mutasyon frekansı hesaplanmıştır. Benzer bir çalışmada Knoll vd. (2011) yerfıstığı için EMS ve DES mutagenleri kullanarak oluşturdukları toplam 3.480 M_2 mutasyon popülasyonunda *ara h 1.01*, *ara h 1.02*, *ara h 2.01*, *ara h 2.02*, *ah FAD2A* ve *ah FAD2B* genleri için mutasyon taraması yapmışlardır. 4,5 saat %0,25 DES ile oluşturdukları mutasyon popülasyonunda bu genler için herhangi bir mutasyon tespit edememişlerdir. Ancak 12 saat %0,4 EMS uygulaması ve 4,5 saat %1,2 EMS uygulamalarında ise bu 6 gen bölgeleri için toplamda 27 SNP mutasyonları tespit etmişlerdir. 12 saat %0,4 EMS popülasyonunda *ara h 1.01* için 2, *ara h 1.02* için 1, *ara h 2.01* için 7, *ara h 2.02* için 2, *ah FAD2A* için 5, *ah FAD2B* için 3 adet mutasyon tespit etmişlerdir. 4,5 saat %1,2 EMS popülasyonunda *ara h 1.01* için 2, *ara h 2.01* için 2, *ara h 2.02* için 3 mutasyon tespit etmişlerdir. %0,4 EMS popülasyonunda *ah FAD2A* için 1/502 kb, *ah FAD2B* için ise 1/831 kb mutasyon frekansı hesaplamışlardır. %1,2 EMS popülasyonunda ise *ah FAD2* genleri için bir mutasyon tespit edememişlerdir. *ara h 1.01* geni için %0,4 EMS popülasyonunda 1/2.454 kb; %1,2 EMS popülasyonunda 1/984 kb; *ara h 1.02* geni için %0,4 EMS popülasyonunda 1/3.570 kb mutasyon frekansı hesaplamışlardır. *ara h 1.02* geni için %1,2 EMS popülasyonunda ise bu gen için mutasyon tespit edememişlerdir. Bu tez çalışmasında %0,4 EMS popülasyonu *ah FAD2A* geni için hesaplanan 1/317 kb mutasyon frekansı, Knoll vd. (2011)'in aynı doz için hesapladığı frekansa (1/502 kb) yakındır. Knoll vd. (2011) çalışmalarında alerjen

genlerini kontrol eden *ara h 1* genleri için daha düşük mutasyon frekansı hesaplamışlardır (1/2.454 kb veya 1/3.50 kb). Yürütülen bu tez çalışmasında %1,2 EMS popülasyonu *ah FAD2B* geni için mutasyon frekansı 1/466 kb olarak tespit edilmiş ancak Knoll vd. (2011) bu dozda *ah FAD2* genlerinde mutasyon yakalayamamıştır. Knoll vd. (2011) %1,2 EMS solüsyonunda tohumları 4,5 saat, yürütülen tez çalışmasında ise 12 saat bekletilmiş olup yüksek süreli mutagen ile muamelenin bunun bir sonucu olabileceği fikri ortaya çıkmıştır. Knoll vd. (2011) %0,4 EMS popülasyonunda *ah FAD2A* geni için tespit ettikleri 5 mutasyondan 3'nün 448. bazında A:G baz değişikliği, 1'nin 718. bazında C:T baz değişikliği, 1'nin de 761. bazında C:T baz değişikliği gözlemlemişlerdir. %0,4 EMS popülasyonunda *ah FAD2B* geni için tespit ettikleri 3 mutasyondan 2'sinin 442. bazında insersiyon, diğerinin ise 566. bazında C:T baz değişikliği gözlemlemişlerdir. Yürütülen bu tez çalışmasında *ah FAD2A* geninde G:A baz değişikliği, *ah FAD2B* geninde ise T:A baz değişikliği gözlemlenmiştir. EMS ile indüklenmiş mutasyonlarda tipik olarak C:T veya G:A baz değişiklikleri gözlenmektedir. Buna göre Knoll vd. (2011) *ah FAD2B* için EMS ile indüklenmiş mutasyonlarda tipik görülen C:T baz değişikliği tespit etmiş, *ah FAD2A* için ise yaygın görülmeyen A:G baz değişikliğini bildirmişlerdir. Bu tez çalışmasında ise *ah FAD2A* geninde EMS ile indüklenmiş mutasyonlarda tipik görülen G:A baz değişikliği tespit edilmiş, *ah FAD2B* için ise yaygın görülmeyen T:A baz değişikliği gözlemlenmiştir.

Bir başka benzer çalışmada Guo vd. (2015) yerfistiğinde 12 saat %0,4 EMS dozu ile oluşturdukları M_1 popülasyonundan elde ettikleri 768 adet M_2 genotipinde TILLING çalışması yürütmüşlerdir. Çalışmalarında oluşturdukları mutasyon popülasyonunda alerjen proteinleri kodlayan *ara h 1.01*, *ara h 1.02*, *ara h 2.01*, *ara h 2.02* genleri, oleik/linoleik asit oranını kontrol eden *ah FAD2A*, *ah FAD2B* genleri ve stres faktörlerine dayanıklılıkta rolü olan *ahPLD1*, *ahPLD2*, *ahLOX7-3'*, *ahLOX-5'* genleri için tarama işlemi yapmışlardır. Çalışmalarında toplamda 20 mutasyon tanımlamışlardır. Bu 20 mutasyonun 3 tanesi *ara h 1.01*, 8 tanesi *ara h 1.02*, 1 tanesi *ahFAD2B*, 1 tanesi *ara h 2.02*, 1 tanesi *ahLOX-3'*, 3 tanesi *ahLOX7-5'*, 2 tanesi *ahPLD1* ve 1 tanesi *ahPLD2* gen bölgesinde tespit etmişlerdir. *ara h 1.01* geninde tespit ettikleri 3 mutasyonda C:T baz değişikliği gözlemlemişlerdir. Bu baz değişiklikleri 321, 377 ve 1.687. bazda olduğunu bildirmişlerdir. *ara h 1.02*'de tespit ettikleri 8 mutasyonun 2 tanesi 1.258. bazda ve 694. bazda A:G baz değişikliği, 2 tanesi 428. ve 765. bazda C:T baz değişikliği olduğunu gözlemlemişlerdir, diğer baz değişikliklerinin ise EMS ile indüklenmiş mutasyonlarda yaygın görülmeyen 72. bazda G:T, 644. bazda C:A, 891. bazda G:A ve 742. bazda A:C baz değişikliği olduğunu belirtmişlerdir. *ah FAD2B* için 632. bazda C:T baz değişikliği tespit etmişlerdir. *ah FAD2A* için ise bir mutasyon yakalayamamışlardır. Mutasyon frekansları ise *ara h 1.01* için 1/477 kb, *ara h 1.02* için 1/160 kb, *ah FAD2B* için 1/947 kb hesaplamışlardır. Guo vd. (2015) alerjen proteinleri kontrol eden *ara h 1* genleri için yüksek mutasyon frekansı yakalamışlar, *ah FAD2B* geni için ise bu tez çalışmasında hesaplanan mutasyon frekansına (1/466 kb) yakın değer elde etmişlerdir.

Farklı bitkilerde de TILLING çalışmaları başarılı sonuçlar verdiği raporlanmıştır. Buna benzer bir çalışmayı Sabetta vd. (2011) ayçiçeğinde (*Helianthus annuus* L.) yürütmüştür. Mutasyon oluşturmak için ilk başta farklı EMS dozlarında ve farklı uygulama sürelerinde çalışma yapmışlardır. 3 saat ve 6 saat bekletme sürelerinde

%0, %0,5, %0,7, %1,2 ve %1,5 doz uygulaması yürütmüşlerdir ve 3 saat bekleme süresi için bu dozlarda sırasıyla %85, %78, %75, %58 ve %50; 6 saat bekleme süresi için sırasıyla %86, %3, %65, %45 ve %31 çimlenme yüzdeleri elde etmişlerdir. Sabetta vd. (2011) yaptıkları EMS testlerinin sonucuna göre 6 saat %0,7 EMS uygulamasını seçmişler ve yaklaşık 30.000 adet tohumu uygulamışlardır. M_1 popülasyonunda çimlenen 13.000 bitkinin de yaklaşık olarak %50'si hayatta kalarak tohum bağlamıştır. M_1 'den seçtikleri her bitkiden 4 ile 10 arasında tohum toplamışlar ve bunları M_2 yetiştirmek üzere ekimlerini gerçekleştirmişlerdir. Ekilen M_2 bitkilerinin de %64'ü çimlenmiş ve 4.211 adet M_2 bitkisinde TILLING çalışmışlardır. Yürütülen tez çalışmasına kıyasla diploid bir bitki olan ayçiçeği bitkisinin ($2n=2x=34$) EMS mutageninin ölümcül etkilerinden daha çok etkilendiği tahmin edilmiştir. Yerfistığının tetraploid yapısı EMS'nin bu ölümcül etkilerini tolere edebilmiştir. Sabetta vd. (2011) M_2 elde ettikleri DNA'ları yağ asit biyosentez metabolizmasında rol alan *kasII* ve *kasIII* genleri, oleik/linoleik oranını belirleyen *fad2-1* geni ve ayçiçeği mildiyösüne (*Plasmopara halstedii*) dayanıklılık geni AY490791 için taramışlardır. *KasII* için 4 adet, *fad2-1* için 3 adet, AY490791 için ise 2 adet mutasyon tanımlamışlardır. Tüm genler için 1/475 kb, *fad2-1* için ise 1/332 kb mutasyon frekansı hesaplamışlardır.

Yulafta (*Avena sativa*) yapılan bir TILLING çalışmasında ise Chawade vd. (2010) mutasyon oluşturmak için EMS mutageni kullanmışlardır. TILLING popülasyonu için en uygun EMS dozunu belirlemek için bir ön çalışma yapmışlardır. Yaklaşık 200 adet yulaf tohumuna %0,8, %0,9, %1,0, %1,2, %1,4, %1,6, %1,8 ve %2,0 EMS dozlarında 16 saat bekletmişlerdir. Bu EMS doz uygulamaları için sırasıyla yaklaşık %80, %40, %30, %20, %10, %1, %0 ve %0 çimlenme oranları elde etmişlerdir. Elde ettikleri sonuçlara göre %0,9 EMS doz uygulamasını seçmişler ve yaklaşık 9.000 adet yulaf tohumuna uygulamışlardır. Bu tohumların 2.880 adeti çimlenmiş ve çimlenen bu tohumların da yaklaşık %97'si (2.800 adet) tohum bağlamıştır. M_1 'den hasat ettikleri bu 2.800 adet tohumdan da M_2 'de yaklaşık %93 (2.600 adet) çimlenme oranı elde etmişlerdir. Heksaploid bir bitki olan yulaf ($2n=6x=42$) ploidi seviyesinden dolayı EMS'nin öldürücü etkilerinden daha az etkilendiği görülmüştür. Yürütülen tez çalışmasına kıyasla daha yüksek oran EMS dozu ve daha fazla bekletme oranlarına rağmen yulaf, yerfistığına oranla daha yüksek yüzdelere çimlenmiş, çimlenen bitkilerden de daha yüksek oranlarda tohum bağladığı tespit edilmiştir. Chawade vd. (2010) M_2 popülasyonlarından elde ettikleri DNA'ları lignin biyosentezinde rol alan *AsPAL1* ve β -glukan biyosentezinde rol alan *AsCslF6* genleri için taramışlardır. Toplamda 16 adet mutasyon tespit etmişlerdir. Tespit ettikleri bu 16 mutasyonun 6 adetinin *AsPAL1* geninde, kalan 10 adetinin ise *AsCslF6* geninde olduğunu belirtmişlerdir. *AsPAL1* genin elde ettikleri mutasyonlarının 4 tanesinin C:T, geri kalan 2 tanesinin ise G:A baz değişikliği olduğunu bildirmişlerdir. *AsCslF6* geninde ise tespit ettikleri 10 genin 7'si G:A, 2'si C:T, 1'nin ise EMS ile indüklenmiş mutasyonlarda yaygın görülmeyen A:T baz değişikliği olduğunu bildirmişlerdir. Yürütülen bu tez çalışmasına kıyasla çok daha yüksek oranda 1/20 kb ile 1/40 kb arasında mutasyon frekansı yakalamışlardır.

6. SONUÇLAR

Bu tez çalışmasında Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsüne ait olan NC-7 isimli yerfıstığı çeşidikullanılarak tohumlara %0,4 ve %1,2'lik EMS dozları uygulanmış ve M₁ popülasyonu oluşturulmuştur. Kimerik olan bu M₁ popülasyonundan beklenen mutasyonların fikse edilebilmesi için M₂ popülasyonu oluşturulmuş ve alerjen proteinlerin sentezinden sorumlu *ara h 1.01*, *ara h 1.02* genler ile oleik/linoleik asit oranını belirlemede rol alan *ah FAD2A* ve *ah FAD2B* genleri için TILLING metodu uygulanmıştır.

TILLING çalışmasında 384 adet %0,4 EMS popülasyonu ve 384 adet %1,2 EMS popülasyonu taranmıştır. Tarama sonuçlarına göre 32 adet genotip için taranan tüm gen bölgelerinde kesilmiş PCR ürünleri tespit edilmiştir. Mutasyonların teyidi için bu 32 adet genotip sekanslamaya gönderilmiştir. Alerjen genlerinde her iki popülasyon için beklenen mutasyon yakalanamamıştır. Ancak %0,4 EMS popülasyonundaki 547 numaralı genotip için *ah FAD2A*'da 1/317 kb mutasyon frekansında, %1,2 EMS popülasyonundaki 339 numaralı genotip için *ah FAD2B*'de ise 1/466 mutasyon frekansında beklenen mutasyonlar yakalanmıştır.

Oleik/linoleik (O/L) asit oranı kontrol eden bu homolog *ah FAD2* genlerinde nokta mutasyonların varlığı tekli doymamış yağ asidi olan oleik asidi artırmakta, çoklu doymamış yağ asidi olan linoleik asidi ise düşürmektedir (O/L oranını artırmaktadır). Tekli doymamış yağ asitleri hem kardiyovasküler açıdan daha sağlıklı hem de çoklu doymamış yağ asitlerine kıyasla oksidasyona daha dayanıklıdır. Böylece yerfıstığından elde edilen yağlar daha uzun ömürlü olmaktadır. Kültürü yapılan yerfıstığının "Virginia" ve "Runner" agronomik tiplerinde *ah FAD2A* geni mutant yapıya sahiptir (Chu vd. 2007). Yürütülen tez çalışmasında kullanılan NC-7 isimli çeşit de "Virginia" agronomik tipi olup *ah FAD2A* geninde doğal mutasyon mevcuttur. Bu amaçla 339 numaralı genotip, ileri nesillere taşınarak takip edilecektir. Ayrıca Janilaa vd. (2016) yaptıkları çalışmada elde ettikleri benzer bir mutasyonu marker destekli geri melezleme ve marker destekli seleksiyon ile başarılı bir şekilde koleksiyonlarındaki diğer hatlara aktarabilmiştir. Benzer şekilde Chu vd. (2011) yaptıkları çalışmada yüksek oleik asit özelliğini marker destekli seleksiyon ile aktarımlarını gerçekleştirdiklerini bildirmişlerdir. Bu tez çalışmasında da elde edilen bu mutasyonlar anlamlı olmaları durumunda yerfıstığı ıslah çalışmalarında kullanılmak üzere değerlendirilebilecektir. Özellikle ülkemizdeki mevcut bitkisel yağ açığı düşünüldüğünde bu alanda oksidasyona dayanıklı, uzun raf ömrüne sahip yağlı bitkiler geliştirilmesi oldukça önemlidir. Yürütülen tez çalışmasının çıktılarının bu alanda katkı yapması beklenmektedir.

Bu tez çalışmasında oluşturulan M₂ popülasyonu ise daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere tohum stokunda saklanmıştır. Böylece bir sonraki M₃ jenerasyonu zaman kaybı olmadan oluşturulabilecektir.

7. KAYNAKLAR

- Bagnall, D.J., and King, R.W. 1991. Response of peanut (*Arachis hypogaea*) to temperature, photoperiod and irradiance 1. Effect on flowering. *Field Crops Res.*, 26:263–277.
- Bharathi, M. et al. 1983. Pachytene chromosome pairing in triploid hybrids *Arachishypogaea* × *A. villosa* and *A. hypogaea*. *Cytologia*, 48: 527–538.
- Bajaj, D., Srivastava, R., Nath, M., Tripathi, S., Bharadwaj, C., Upadhyaya, H.D., Tyagi, A.K. and Parida, S.K. 2016. EcoTILLING-Based Association Mapping Efficiently Delineates Functionally Relevant Natural Allelic Variants of Candidate Genes Governing Agronomic Traits in Chickpea. *Front. PlantSci.*, 7:450.
- Briend, A. 2001. Highly nutrient-dense spreads: a new approach to delivering multiple micronutrients to high-risk groups. *Br J Nutr*, 85:175.
- Burow, M.D. et al. 1996. Identification of peanut (*Arachis hypogaea* L.) RAPD markers diagnostic of rootknot nematode (*Meloidogyne arenaria* (Neal) Chitwood) resistance. *Mol. Breed.*, 2: 369–379.
- Cahaner, A. and Ashri, A. 1974. Vegetative and reproductive development of Virginia type peanut varieties in different stand densities. *Crop Sci.*, 14:412–416.
- Chawade, A., Sikora, P., Bräutigam, M., Larsson, M., Vivekanand, V., Nakash, M.A., Chen, T. and Olsson O. 2010. Development and characterization of an oat TILLING-population and identification of mutations in lignin and β -glucan biosynthesis genes. *BMC Plant Biology*, 10:86.
- Chen, L., Huang, L., Min, D., Phillips, A., Wang, S., Pippa J. Madgwick, Parry, M.A.J. and Hu, Y.G. 2012. Development and Characterization of a New TILLING Population of Common Bread Wheat (*Triticum aestivum* L.). *PLoS ONE*, 7(7): e41570.
- Cho, Y.D., Park, S.J., Kim, D.S. and Jang, C.S. 2010. A TILLING Rice Population Induced by Gamma-ray Irradiation and its Genetic Diversity. *Korean J. Breed., Sci.* 42(4) : 365-373.
- Chu, Y., Wu, C.L., Holbrook, C.C., Tillman, B.L., Person, G. and Ozias-Akins, P. 2011. Marker-assisted selection to pyramid nematode resistance and the high oleic trait in peanut. *The Plant Genome*, 4: 110-117.
- Cooper, J.L., Till, B.J., Laport, R.G., Darlow, M.C., Kleffner, J.M., Jamai, A., El-Mellouki, T., Liu, S., Ritchie, R., Nielsen, N., Bilyeu, K.D., Meksem, K., Comai, L. and Henikoff S. 2008. TILLING to detect induced mutations in soybean. *BMC Plant Biology*, 8:9 doi:10.1186/1471-2229-8-9.
- Dahmani-Mardas, F., Troadec, C., Boualem, A., Le've`que, S., Alsadon, A.A., CDogimont, C., Bendahmane, A. 2010 Engineering Melon Plants with Improved Fruit Shelf Life Using the TILLING Approach. *PLoS ONE*, 5(12): e15776.
- Dierking, E.C. and Bilyeu, K.D. 2009. New sources of soybean seed meal and oil composition traits identified through TILLING. *BMC Plant Biology*, 9:89.
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L. 1990. A rapid total DNA preparation procedure for fresh

- plant tissue. *Focus*, 12: 13-15.
- Dwivedi, S.L., Crouch, J.H., Nigam, S.N., Ferguson, M.E. and Paterson, A.H. 2003. Molecular breeding of groundnut for enhanced productivity and food security in the semi-arid tropics: opportunities and challenges. *Advances in Agronomy*, 80: 153-221.
- FAO, 2019. FAO statistics. <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx>. [Son erişim tarihi: 01.05.2019].
- Frankel, E. N. 1991, Recent advances in lipid oxidation. *J. Sci. Food Agri.*, 54:495-511.
- Frerichmann, S.L.M., Kirchhoff, M., Müller, A.E., Scheidig, A.J., Jung, C. And Kopisch-Obuch, F.J. 2013. EcoTILLING in *Beta vulgaris* reveals polymorphism in the FLC-like gene *BvFL1* that are associated with annuality and winter hardiness. *BMC Plant Biology*, 13:52.
- Gilchrist, E.J. and Haughn G.W. 2005. TILLING without a plough: a new method with applications for reverse genetics. *Curr Opin Plant Biol*, 8:211–215.
- Gilchrist, E.J., Sidebottom, C.H.D., Koh, C.S., MacInnes, T., Sharpe, .A.G. and Haughn G.W. 2013. A Mutant *Brassica napus* (Canola) Population for the Identification of New Genetic Diversity via TILLING and Next Generation Sequencing. *PLoS ONE*, 8(12): e84303.
- Gregory, W.C., Smith, B.W. and Yarbrough, Y.A. 1951. Morphology, genetics, and breeding. In: The peanut: The unpredictable legume. National Fertilizers Assoc., Washington, DC., pp. 28–88.
- Gunasekaran, A. and Pavadai, P. 2015. Studies on induced physical and chemical mutagenesis in groundnut (*Arachis hypogea*). *International Letters of Natural Sciences*, 8 (2015) 25-35.
- Guo, Y., Abernathy, B., Zeng, Y. and Ozias-Akins, P. 2015. TILLING by sequencing to identify induced mutations in stress resistance genes of peanut (*Arachis hypogaea*). *BMC Genomics*, 16:157.
- Hammons, R.O. 1982. Origin and early history of the peanut. In *Peanut Science and Technology* (eds. H.E. Patte and C.T. Young, Ed.) American Peanut Research and Education Society, Yoakum, Texas, pp. 1–20.
- Hilu, K.W., Stalker, H.T. 1995. Genetic relationships between peanut and wild species of *Arachis* sect. *Arachis* (Fabaceae): evidence from RAPDs. *Plant Syst Evol*, 198:167–178.
- Hoshino, T., Watanabe, S., Takagi Y. and Anai T. 2014. A novel GmFAD3-2a mutant allele developed through TILLING reduces α -linolenic acid content in soybean seed oil. *Breeding Science*, 64: 371–377.
- Husted, L. 1936. Cytological studies on the peanut, *Arachis*. II. Chromosome number, morphology and behavior, and their application to the problem of the origin of the cultivated forms. *Cytologia*, 7:396–422
- Jadhav, M.V., Zote R.K. and Sable A.D. 2018. Studies on induced chemical mutagenesis in groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci*, 7(10): 1662-1669.

- Jahnavi, M.R. and Murty, U.R. 1985. Chromosome morphology in species of the sections *Erectoides* and *Extranervosae* of the genus *Arachis* L. *Cytologia*, 50: 747–758.
- Janilaa, P., Pandeya, M.K., Shasidhara, Y., Variatha, M.T., Sriswathia, M., Kheraa, P., Manohara, S.S., Nagesha, P., Vishwakarma, M.K., Mishrab, G.P., et al. 2016. Molecular breeding for introgression of fatty acid desaturase mutant alleles (*ahFAD2A* and *ahFAD2B*) enhances oil quality in high and low oil containing peanut genotypes. *Plant Science*, 242:203–213.
- Kadiroğlu, A. 2008. Yerfıstığı yetiştiriciliği. Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Antalya, 53 s.
- Kadiroğlu, A. 2018. Yerfıstığı yetiştiriciliği. Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Antalya, 77 s.
- Kadiroğlu, A., Baydar, H. ve Kocatürk, M. 2011. Yerfıstığında (*Arachis hypogaea* L.) jips uygulamasının verim ve kalite özellikleri üzerine etkisi. *Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Derim Dergisi*, 28: 42-54.
- Kharade, M.R., Yamgar, S.V. and Phadtare, A.R. 2015. Studied on Effect of Mutagenesis in Groundnut to Induce Variability in Seed Quality Parameters (*Arachis Hypogaea* L.). *IOSR-JAVS*, e-ISSN: 2319-2380, p-ISSN: 2319-2372.
- Kim, S. and Tai, T.H. 2014. Identification of novel rice low phytic acid mutations via TILLING by Sequencing. *Mol Breeding*, 34:1717–1729.
- Kirti, P.B. et al. 1983. Chromosome morphology in three diploid species of *Arachis* and its bearing on the genomes of groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Cytologia*, 48: 139–151.
- Knoll, J.E., Ramos, M.L., Zeng, Y., Holbrook, C.C., Chow, M., Chen, S., Maleki, S., Bhattacharya, A., Ozias-Akins, P. 2011. TILLING for allergen reduction and improvement of quality traits in peanut (*Arachis hypogaea* L.). *BMC Plant Biol.*, 11:81.
- Kochert, G., Stalker, H.T., Gimenes, M., Galgaro, L., Lopes, C.R. and Moore, K. 1996. RFLP and cytogenetic evidence on the origin and evolution of allotetraploid domesticated peanut (*Arachis hypogaea*) (Leguminosae). *Am J Bot*, 83:1282–1291.
- Krapovickas, A. and Gregory, W.C. 1994. Taxonomia del genero *Arachis* (Leguminosae). *Bonplandia*, 8: 1-186.
- Lands, W.E.M. 1997. The two faces of essential fatty acids. *Inform*, 8: 1141- 1147.
- Lavia, G.I. 1996. Estudios cromosomicos en *Arachis* (Leguminosae). *Bonplandia*, 9: 111–120.
- Lavia, G.I. 1998. Karyotypes of *Arachis palustris* and *A. praecox* (section *Arachis*), two species with basic chromosome number $x = 9$. *Cytologia*, 63: 177–181.
- Li, X.M. et al. 2000. A murine model of peanut anaphylaxis: T- and B-cell responses to a major peanut allergen mimic human responses. *J. Allergy Immun.*, 106: 150–158.
- Liao, B. 2001. Economic aspects of groundnut in food security and agricultural

- development in China. *Cereals Oils*, 10: 28–29.
- Liao, B. 2014. Peanut Breeding. CRC Press, Florida, pp. 61-78.
- Liao, B. and Holbrook, C. 2007. Groundnut. CRC Press, Florida, pp. 231-289.
- Lightner, J. and Caspar, T. 1998. Seed mutagenesis of *Arabidopsis*. *Methods Mol Biol*, 82:91-103.
- Maleki, S.J. et al. 2000. The effects of roasting on the allergenic properties of peanut proteins. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 106: 763–768.
- Martin, B., Ramiro, M., Zapater, J.M.M. and Blanco C. 2009. A high-density collection of EMS-induced mutations for TILLING in Landsberg erecta genetic background of *Arabidopsis*. *BMC Plant Biology* 2009, 9:147.
- Moretzsohn, M., Hopkins, M., Mitchell, S., Kresovich, S., Valls, J.F.M. and Ferreira, M. 2004. Genetic diversity of peanut (*Arachis hypogaea* L.) and its wild relatives based on the analysis of hypervariable regions of the genome. *BMC Plant Biol*, 4:11.
- Nigam, S. N. and Aruna, R. 2008. Plant Breeding Reviews. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, pp. 295-316.
- Ory, R. L., Crippen, K. L. and Lovegren, N. V. 1992. Off flavors in foods and beverages, Elsevier Science Publishers, New York.
- Pattee, H.E. and Mohapatra, S.C. 1987. Anatomical changes during ontogeny of the peanut (*Arachis hypogaea* L.) fruit: Mature megagametophyte through heart shaped embryo. *Bot. Gaz.*, 148:156–164.
- Perry, J., Brachmann, A., Welham, T., Binder, A., Charpentier, M., Groth, M., Haage, K., Markmann, K., Wang, T.L. and Parniske, M. 2009. TILLING in *Lotus japonicus* identified large allelic series for symbiosis genes and revealed a bias in functionally defective ethyl methanesulfonate alleles toward glycine replacements. *Plant Physiol.* 151: 1281-1291.
- Raina, S.N. and Mukai, Y. 1999. Genomic in situ hybridization in *Arachis* (Fabaceae) identifies the diploid wild progenitors of cultivated (*A. hypogaea*) and related wild (*A. monticola*) peanut species. *Plant Syst. Evol.*, 214: 251–262.
- Rami, J.F., Leal-Bertioli, S.C.M., Foncéka, D., Moretzsohn, M.C., and Bertioli, D.J. 2014. Alien Gene Transfer in Crop Plants, Volume 2: Achievements and Impacts, Pratap A. and Kumar J. (eds.). Springer Science Business Media, New York, pp. 253-279.
- Reddy, T.V., Dwivedi, S. and Sharma, N.K. 2012. Development of TILLING by sequencing platform towards enhanced leaf yield in tobacco. *Industrial Crops and Products*, 40 (2012) 324– 335.
- Reddy T.V. and Saiprasad G.V.S. 2015. Identification of SNPs in nicotine biosynthesis related genes by targeted re-sequencing of TILLING population and germplasm with varying nicotine levels in tobacco. *Euphytica*, 203:659–671.
- Robledo, G. and Seijo, G. 2010. Species relationships among the wild B genome of *Arachis* species section *Arachis* based on FISH mapping of rDNA loci and heterochromatin detection: a new proposal for genome arrangement. *Theor Appl*

Genet, 121:1033–1046.

- Sabetta, W., Alba, V., Blanco, A. and Montemurro, C. 2011. sunTILL: a TILLING resource for gene function analysis in sunflower. *Plant Methods*, 7:20 10.1186/1746-4811-7-20.
- Sagel, Z., Tutluer, M., Peskircioglu, H., Kantoglu, Y. and Kunter, B. 2016. Determination of effect of chemical mutagen EMS on TAEK A-3 and TAEK C-10 mutant soybean varieties in M1 generation. *Ekin Journal of Crop Breeding and Genetics*, 3 (1):19-24.
- Sastry, K.K.S., Chari, M., Prasad, T.G., Udayakumar, M. And Sashidhar, V.R. 1985. Flowering pattern and pod development in bunch types of groundnut: Is there a relationship between synchrony in flowering and pod development. *Indian J. Plant Physiol.*, 28:64–71.
- Schenk, R.U. 1961. Development of the peanut fruit. GeorgiaAgr. Expt. Sta. Tech. Bul.N.S. 22.
- Seijo J.G., Lavia G.I., Fernandez A., Krapovickas A., Ducasse D. and Moscone E.A. 2004. Physical mapping of the 5S and 18S–25S rRNA genes by FISH as evidence that *Arachis duranensis* and *A. ipaensis* are the wild diploid progenitors of *A. hypogaea* (Leguminosae). *Am J Bot*, 91:1294–1303.
- Seshadri, C.R. 1962. Groundnut. Hyderabad, Andhra Pradesh, India: Indian Central Oilseeds Committee, Hyderabad, Andhra Pradesh, India. p. 47.
- Sestili, F., Palombieri, S., Botticella, E., Mantovani, P., Bovina, R. and Lafiandra, D. 2015. TILLING mutants of durum wheat result in a high amylose phenotype and provide information on alternative splicing mechanisms. *Plant Si.*, 233:127–133.
- Singh, A.K. and Moss. J.P. 1984. Utilization of wild relatives in genetic improvement of *Arachis hypogaea* L. VI. Fertility in triploids: cytological basis and breeding implications. *Peanut Sci.*, 11: 17–21.
- Slade, A.J., McGuire, C., Loeffler, D., Mullenberg, J., Skinner, W., Fazio, G.i Holm, A., Brandt, K.M., Steine, M.N., Goodstal J.F. and Knauf V.C. 2012. Development of high amylose wheat through TILLING. *BMC Plant Biology*, 12:69.
- Smartt, J. and Stalker H.T. 1982. Speciation and cytogenetics in *Arachis*. In Peanut Science and Technology. H.E. Pattee and C.E. Young, Eds. Am. Peanut Res. Ed. Soc., Yoakum, Texas, pp. 21–49.
- Smith, B.W. 1954. *Arachis hypogaea* reproductive efficiency. *Am. J. Bot.*, 41:607–616.
- Smith, B.W. 1956. *Arachis hypogaea*. Normal megasporogenesis and syngamy with occasional single fertilization. *Am. J. Bot.*, 43:81–89.
- Sparla, F., Falini, G., Botticella, E., Pirone, C., Talame, V., Bovina, R., Salvi, S., Tuberosa, R., Sestili, F., and Trost, P. 2014. New Starch Phenotypes Produced by TILLING in Barley. *PLoS ONE*, 9(10): e107779.
- Stalker, H.T. 1981. Cytogenetics of *Arachis*. In Proceedings of the Peanut Breeding Symposium. J.C. Wynne and T.A. Coffelt, Eds. Am. Peanut Res. Educ. Soc., Richmond, Virginia, pp. 22–29.

- Stalker, H.T. 1985. Cytotaxonomy of *Arachis*. In Proceedings of the International Workshop on Cytogenetics of *Arachis*. J.P. Moss, Ed. International Crops Research Institute for the Semiarid Tropics, Patancheru, A.P., India, pp. 65–79.
- Stalker, H.T. 1991. A new species in section *Arachis* of peanuts with a D genome. *Am. J. Bot.* 78: 630–637.
- Stalker, H.T. and Dalmacio R.D. 1981. Chromosomes of *Arachis* species, section *Arachis* (Leguminosae). *J. Hered.* 72: 403–408.
- Stalker, H.T. and Simpson C.E., 1995. Genetic resources in *Arachis*. In Advances in Peanut Science. H.E. Pattee and H.T. Stalker, Eds. Am. Peanut Res. Educ. Soc., Stillwater, Oklahoma, pp. 14–53.
- Stephenson, P., Baker, D., Girin, T., Perez, A., Amoah, S., King, G.J. and Ostergaard, L. 2010. A rich TILLING resource for studying gene function in *Brassica rapa*. *BMC Plant Biol*, 10: 62.
- Tallury, S.P. et al. 2001. Genome donors of *Arachis hypogaea* L. *Am. Peanut Res. Educ. Soc.*, 33: 60.
- Till, B.J., Cooper, J., Tai, T.H., Colowit, P., Greene E.A., Henikoff, S. And Comai, L. 2007. Discovery of chemically induced mutations in rice by TILLING. *BMC Plant Biology*, 7:19 doi:10.1186/1471-2229-7-19.
- Till, B.J., Renolds, S.H., Weil, C., Springer, N., Burtner. C., Young, K., Bowers, E., Codomo, C.A., Enns, L.C., Odden, A.R., Greene, E.A., Comai, L. and Henikoff, S. 2004. Discovery of induced point mutations in maize genes by TILLING. *BMC Plant Biol*, 4, 12.
- TUIK, 2013. Bitkisel üretim istatistikleri. www.TÜİK.gov.tr/PreTablo.do?alt_id=1001. [Son erişim tarihi: 01.05.2019].
- Uauy, C., Paraiso, F., Colasuonno, P., Tran, R.K., Tsai, H., Berardi, S., Comai L. and Dubcovsky J. 2009. A modified TILLING approach to detect induced mutations in tetraploid and hexaploid wheat. *BMC Plant Biology*, 9:115.
- Wang, N., Wang, Y., Tian, F., King, G.J., Zhang, C., Long, Y., Shi, L. and Meng, J. 2008. A functional genomics resource for *Brassica napus*: development of an EMS mutagenized population and discovery of *FAE1* point mutations by TILLING. *New Phytologist*, 180: 751–765.
- Vivekanand, V., Chawade, A., Larsson, M., Larsson, A. and Olsson, O. 2014. Identification and qualitative characterization of high and low lignin lines from an oat TILLING population. *Industrial Crops and Products*, 59:1–8.
- Williams, J.H. 1979. The physiology of groundnut (*Arachis hypogaea* L. cv. Egret). 4. The growth of groundnut fruit set at the start and end of pod setting. *Rhodesian J. Agri. Res.*, 17:63–66.
- Xin, Z., Wang, M.L., Barkley, N.A., Burow, G., Franks, C., Pederson, G. and Burke, J. 2008. Applying genotyping (TILLING) and phenotyping analyses to elucidate gene function in a chemically induced sorghum mutant population. *BMC Plant Biology*, 8:103 doi:10.1186/1471-2229-8-103.
- Zamski, E. and Ziv, M. 1976. Pod formation and its geotropic orientation in the peanut,

A. hypogaea, in relation to light and mechanical stimulus. *Ann. Bot.*, 40:631–636.



ÖZGEÇMİŞ

Kürşat KARAMAN

kursat.karaman@outlook.com



ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi
2016-2019	Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, Antalya
Lisans	Akdeniz Üniversitesi
2004-2011	Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, Antalya

MESLEKİ VE İDARİ GÖREVLER

Ziraat Mühendisi	Sakata Tarım Ürünleri ve Tohumculuk San. Ltd. Şti., Aksu, Antalya
2019-Devam Ediyor	
Ziraat Mühendisi	Anadolu Efes Biracılık Malt. San. A.Ş., Çumra, Konya
2012-2019	