



MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**AYÇİÇEĞİ (*Helianthus annuus* L.)'NDE
OLEİK ASİT İÇERİĞİNİN KASP
MARKÖRLERİ İLE BELİRLENMESİ**

MUHAMMED BİLALOĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Biyoloji Programı

DANIŞMAN

Prof. Dr. Yıldız AYDIN

EŞ-DANIŞMAN

Prof. Dr. Ahu ALTINKUT UNCUOĞLU

İSTANBUL, 2021



MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**AYÇİÇEĞİ (*Helianthus annuus* L.)'NDE
OLEİK ASİT İÇERİĞİNİN KASP
MARKÖRLERİ İLE BELİRLENMESİ**

MUHAMMED BİLALOĞLU

520117020

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Biyoloji Programı

DANIŞMAN

Prof. Dr. Yıldız AYDIN

EŞ-DANIŞMAN

Prof. Dr. Ahu ALTINKUT UNCUOĞLU

İSTANBUL, 2021

TEŞEKKÜR

Lisans ve yüksek lisans eğitimlerim boyunca beni destekleyen, bana bu tezde çalışma fırsatı sunan çok değerli danışmanım sayın Prof. Dr. Yıldız AYDIN'a ve çok değerli eş danışmanım sayın Prof. Dr. Ahu ALTINKUT UNCULOĞLU'na sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimim, tez deney ve yazım sürecinde yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen Dr. Ezgi ÇABUK ŞAHİN hocama çok teşekkür ederim.

Eğitim hayatım ve laboratuvar süreci boyunca dostluğunu ve yardımlarını esirgemeyen değerli arkadaşım Elif Gökçe TAŞKARA'ya teşekkür ederim.

Tez çalışması; T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü (TAGEM) Ar-Ge Destek Programı tarafından desteklenen "TAGEM-18/AR-GE/37" numaralı proje kapsamında gerçekleşmiştir. Bu vesileyle bakanlığımıza ve proje yürütücüsü kuruluş Beta Ziraat ve Ticaret A.Ş.'ye ve proje ortaklarından Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'ne teşekkür ederim.

2210-C Yurt İçi Öncelikli Alanlar Yüksek Lisans Burs Programı 2019/1 kapsamında beni destekleyen TÜBİTAK Bilim İnsanı Destek Programları Başkanlığı (BİDEB)'na ayrıca teşekkür ederim.

Temmuz, 2021

Muhammed BİLALOĞLU

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
SEMBOLLER.....	v
KISALTMALAR.....	vi
ŞEKİL LİSTESİ	viii
TABLO LİSTESİ.....	ix
1. GİRİŞ	1
1.1. <i>Helianthus annuus</i> L.....	1
1.2. <i>Helianthus annuus</i> L.'un Önemi ve Kullanım Alanları.....	2
1.3. Ayçiçeğinde Oleik Asit İçeriği ve Kalıtımı	2
1.4. Ayçiçeği Islahında Markör Destekli Seleksiyon	3
1.4.1. KASP (Kompetitif Allel Spesifik Polimeraz Zincir Reaksiyonu)	5
2. MATERYAL ve YÖNTEM.....	9
2.1. Bitki Materyalinin Eldesi.....	9
2.2. Genomik DNA İzolasyonu	9
2.3. Genomik DNA Miktarının ve Kalitesinin Ölçümü.....	12
2.4. KASP (Kompetitif Allel Spesifik Polimeraz Zincir Reaksiyonu) Analizi	12
3. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	15
3.1. Bitki Materyali	15
3.2. Genomik DNA Miktarının ve Kalitesinin Analizi.....	16
3.3. KASP (Kompetitif Allel Spesifik Polimeraz Zincir Reaksiyonu)	19
4. SONUÇLAR	34
KAYNAKLAR.....	35
ÖZGEÇMİŞ	

ÖZET

AYÇİÇEĞİ (*Helianthus annuus* L.)'NDE OLEİK ASİT İÇERİĞİNİN KASP MARKÖRLERİ İLE BELİRLENMESİ

Ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.), her türlü toprak ve çevre koşuluna kolay uyum sağlayan bir bitki olması sebebiyle ülkemizde ekimi yapılan yağlı tohumlu bitkiler içerisinde ekim alanı ve üretim bakımından ilk sırada yer almaktadır. Yüksek oleik asit içeriğine sahip ayçiçeği yağı, özellikle kalp sağlığı üzerine olan faydaları ve standart ayçiçeği yağından daha stabil olmasını sağlayan tekli doymamış yağ asitlerince zenginliği nedeniyle yüksek talep görmektedir. Yağ asidi bileşimi büyük ölçüde ayçiçeğinin genotipik özelliklerine bağlı olmakla birlikte, ekolojik özellikler ve iklimsel değişiklikler de yağ asidi bileşimi üzerinde etkili olmaktadır. Bu nedenle ayçiçeği yetiştiriciliğinde, yüksek oleik asit içeriğine sahip ayçiçeği genotiplerinin geliştirilmesi oldukça önemlidir. Kültür bitkilerinde çeşit geliştirilmesine yönelik yapılan ıslah çalışmalarındaki başarıda, ilgilenilen özellikler açısından iyi ebeveynlerin etkin seçimi, dolayısıyla bitki popülasyon yapısının ve heterogenik grupların tanımlanması kritiktir. Bu seçimde yüksek oleik asit özelliğiyle ilişkili moleküler markörlerin kullanılması, zahmetli ve zaman alıcı geleneksel yöntemlere göre ayçiçeği ıslah programını kolaylaştırmak için kullanışlı ve hızlı bir araçtır. Bu tez çalışmasında, ayçiçeğinde yüksek oleik asit içeriği genleriyle ilişkili SNP (Single Nucleotid Polymorphism, Tek Nükleotit Polimorfizmi) markörleri kullanılarak yüksek oleik içeriğine sahip bireylerin diğer düşük oleik asit içeriğine sahip bireylerden KASP (Kompetitive Allele Specific Polymerase Chain Reaction, Kompetitif Allel Spesifik Polimeraz Zincir Reaksiyonu) analiziyle ayırt edilebilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla yüksek oleik asit ile bağlantılı olduğu saptanan *FAD2* gen bölgesindeki varyasyona dayalı OL2 KASP primeri ilk defa bu tez çalışmasında kullanılarak 9 farklı ebeveyn kombinasyonu ve bu kombinasyonlara ait toplam 248 F₂ bireyinin oleik asit durumu etkin bir şekilde taranmıştır. Elde edilen allelik ayırım sonuçları değerlendirildiğinde, bu primerin bütün kombinasyonlarda yüksek ve düşük oleik bireyleri ayırma gücüne sahip olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak; bu çalışma, yüksek oleik asit özelliği gösteren ayçiçeği hibritlerinin SNP tabanlı KASP markör sistemlerinin kullanımıyla hızlı ve etkin biçimde tanımlanabilme, böylelikle de ayçiçeği ıslah programlarında kullanılma potansiyelini göstermektedir.

ABSTRACT

DETERMINATION OF OLEIC ACID CONTENT IN SUNFLOWER (*Helianthus annuus* L.) BY KASP MARKERS

Sunflower (*Helianthus annuus* L.) is a plant that adapts easily to all kinds of soil and environmental conditions, so its cultivation area and production are among the oilseed plants cultivated in our country. Sunflower oil, with its high oleic acid content, is in high demand in the market, especially because of its benefits on heart health and its richness in monounsaturated fatty acids that make it more stable than standard sunflower oil. While the fatty acid composition largely depends on the genotypic characteristics of sunflower, ecological characteristics and climatic changes also affect the fatty acid composition. Therefore, it is very important to develop sunflower genotypes with high oleic acid content in sunflower cultivation. Effective selection of good parents in terms of traits of interest, and therefore, identification of plant population structure and heterogenic groups is critical in the success of breeding studies for cultivating cultivars. The use of molecular markers associated with high oleic acid trait in this selection is a useful and quick tool to facilitate sunflower breeding program compared to the laborious and time-consuming traditional methods. In this thesis, it is aimed to distinguish individuals with high oleic content from other individuals with low oleic acid content by KASP (Kompetitive Allele Specific Polymerase Chain Reaction) analysis by using SNP (Single Nucleotide Polymorphism) markers associated with high oleic acid content genes in sunflower. For this purpose, the OL2 KASP primer based on the variation in the *FAD2* gene region, which was found to be associated with high oleic acid, was used for the first time in this thesis study, and the oleic acid status of 9 different parent combinations and a total of 248 F₂ individuals belonging to these combinations were effectively screened. When the obtained allelic discrimination results were evaluated, it was determined that this primer had the power to discriminate high and low oleic individuals in all combinations. As a result, this study demonstrates the potential for rapid and efficient identification of high oleic acid sunflower hybrids using SNP-based KASP marker system, thus their use in sunflower breeding programs.

SEMBOLLER

β	: Beta
cm	: Centimeter (Santimetre)
C	: Concentration (Konsantrasyon)
°C	: Degrees Celsius (Santigrat Derece)
EtOH	: Etanol
HCl	: Hidroklorik asit
m	: Metre
μL	: Mikrolitre
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
mM	: Milimolar
ng	: Nanogram
Na	: Sodyum
NaCl	: Sodyum Klorür
∞	: Sonsuz
U	: Unit (Ünite)
v	: Volume (Hacim)
w	: Weight (Ağırlık)
%	: Yüzde

KISALTMALAR

AFLP	: Amplified Fragment Length Polymorphism (Çoğaltılmış Fragment Uzunluk Polimorfizmi)
ASP	: Allele-specific primer (Allel-spesifik primer)
bp	: Base pair (Baz çifti)
CTAB	: Cetrimonium bromide (Setrimonyum bromür)
dk.	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deoksiribonükleozit Trifosfat
EDTA	: Ethylenediaminetetraacetic acid (Etilendiamintetraasetik asit)
FAM	: Fluorescein amidite (Floresin amidit)
FAO	: Food and Agriculture Organization of the United Nations (Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü)
FRET	: Fluorescence Resonance Energy Transfer (Floresans Rezonans Enerji Transferi)
HEX	: Hexachloro fluorescein (Heksakloro floresin)
HO	: High Oleic Acid (Yüksek Oleik Asit)
ITIS	: Integrated Taxonomic Information System (Bütünleştirilmiş Taksonomik Bilgi Sistemi)
KASP	: Kompetitive Allele Specific Polymerase Chain Reaction (Kompetitif Allel Spesifik Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
kb	: Kilobase (Kilobaz)
LO	: Low Oleic Acid (Düşük Oleik Asit)
MAS	: Marker Assisted Selection (Markör Destekli Seleksiyon)
PvP	: Polyvinyl Pyrrolidone (Polivinil Prolidon)
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

RAPD	: Random Amplified Polymorphic DNA (Rastgele oğaltılmış Polimorfik DNA)
RFLP	: Restriction Fragment Length Polymorphism (Restriksiyon Fragmenti Uzunluk Polimorfizmi)
RNA	: Ribonükleik asit
RNase	: Ribonuclease (Ribonükleaz)
rpm	: Rotation per minute (Dakikadaki devir sayısı)
SNP	: Single Nucleotid Polymorphism (Tek Nükleotit Polimorfizmi)
SSR	: Simple Sequence Repeat (Basit Dizi Tekrarları)
T.C.	: Türkiye Cumhuriyeti
yy.	: Yüzyıl

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1 <i>Helianthus annuus</i> L. (Raw Earth Colors, 2020).....	1
Şekil 1.2 KASP analizine dayalı teknolojinin sinyal üretimi aşamasını gösteren diyagram (Şahin, 2018)	7
Şekil 2.1 Genomik DNA izolasyonu için örnek alımı: Yaprak dokusunun kesilmesi (solda) ve paketlenmesi (sağda)	10
Şekil 3.1 KASP analizlerinde kullanılan ebeveyn genotiplerine ait genomik DNA'lar; 1: RHA437; 2: COLOMBI; 3: P64G46; 4: HA458; 5: HA442; 6: OLIVA; 7: VINIIMK; 8: RHA419; 9: P64LC53; 10: P64LC108; M: 1kb.....	16
Şekil 3.2 KASP sonucunda elde edilen RHA419 x COLOMBI kombinasyonuna ait grafikler	21
Şekil 3.3 KASP sonucunda elde edilen RHA419 x OLIVA kombinasyonuna ait grafik	22
Şekil 3.4 KASP sonucunda elde edilen HA442 x COLOMBI kombinasyonuna ait grafik	23
Şekil 3.5 KASP sonucunda elde edilen VINIIMK x OLIVA kombinasyonuna ait grafikler	24
Şekil 3.6 KASP sonucunda elde edilen VINIIMK x COLOMBI kombinasyonuna ait grafik.....	26
Şekil 3.7 KASP sonucunda elde edilen HA458 x P64LC108 kombinasyonuna ait grafik	27
Şekil 3.8 KASP sonucunda elde edilen RHA419 x P64G46 kombinasyonuna ait grafik	28
Şekil 3.9 KASP sonucunda elde edilen RHA437 x COLOMBI kombinasyonuna ait grafikler	29
Şekil 3.10 KASP sonucunda elde edilen RHA419 x P64LC53 kombinasyonuna ait grafik	31

TABLO LİSTESİ

Tablo 1.1 Ayçiçeği bitkisinin taksonomik sınıflandırılması (ITIS, 2020).....	1
Tablo 2.1 Bitki materyali olarak kullanılan <i>Helianthus annuus</i> L. hatlarına ait ebeveynlerin oleik asit içeriği durumları ve oluşturulan ebeveyn kombinasyonları	9
Tablo 2.2 Genomik DNA izolasyonunda kullanılan kimyasal solüsyonların isimleri, içerikleri, miktarları ve hazırlanışları	10
Tablo 2.3 KASP analizinde kullanılan SNP primerleri ve dizileri	13
Tablo 2.4 KASP reaksiyon bileşenleri ve miktarları	13
Tablo 2.5 Uygulanan KASP protokolünün adımları.....	14
Tablo 3.1 Tarladan toplanıp bitki materyali olarak kullanılan ebeveyn kombinasyonları ve bu kombinasyonlara ait F ₂ bireyleri.....	15
Tablo 3.2 CTAB protokolü ile DNA izolasyonu gerçekleştirilen <i>Helianthus annuus</i> L. ebeveynlerine ait “Qubit®2.0 fluorometer” cihazıyla ölçülen DNA konsantrasyon (ng/μL) değerleri	16
Tablo 3.3 CTAB protokolü ile DNA izolasyonu gerçekleştirilen <i>Helianthus annuus</i> L. ebeveyn kombinasyonlarının F ₂ bireyelerine ait “Qubit®2.0 fluorometer” cihazıyla ölçülen DNA konsantrasyon (ng/μL) değerleri.....	17
Tablo 3.4 Ebeveyn kombinasyonları ve bu kombinasyonlara ait F ₂ bireyelerinin oleik asit durumları ve bu bireylere ait allelik frekans verileri	19
Tablo 3.5 RHA419 x COLOMBI kombinasyonuna ait F ₂ bireyelerinin oleik asit durumlarını (OAD) gösteren KASP analiz sonuçları	22
Tablo 3.6 RHA419 x OLIVA kombinasyonuna ait F ₂ bireyelerinin oleik asit durumlarını (OAD) gösteren KASP analiz sonuçları	22
Tablo 3.7 HA442 x COLOMBI kombinasyonuna ait F ₂ bireyelerinin oleik asit durumlarını (OAD) gösteren KASP analiz sonuçları.....	23
Tablo 3.8 VINIIMK x OLIVA kombinasyonuna ait F ₂ bireyelerinin oleik asit durumlarını (OAD) gösteren KASP analiz sonuçları.....	25

Tablo 3.9 VINIIMK x COLOMBI kombinasyonuna ait F ₂ bireylerinin oleik asit durumlarını (OAD) gösteren KASP analiz sonuçları	26
Tablo 3.10 HA458 x P64LC108 kombinasyonuna ait F ₂ bireylerinin oleik asit durumlarını (OAD) gösteren KASP analiz sonuçları	27
Tablo 3.11 RHA419 x P64G46 kombinasyonuna ait F ₂ bireylerinin oleik asit durumlarını gösteren KASP analiz sonuçları	28
Tablo 3.12 RHA437 x COLOMBI kombinasyonuna ait F ₂ bireylerinin oleik asit durumlarını (OAD) gösteren KASP analiz sonuçları	30
Tablo 3.13 RHA419 x P64LC53 kombinasyonuna ait F ₂ bireylerinin oleik asit durumlarını (OAD) gösteren KASP analiz sonuçları	31
Tablo 3.14 Tüm ebeveyn kombinasyonları ve bu kombinasyonlara ait F ₂ bireylerinin oleik asit durumları (OAD)	32

1. GİRİŞ

1.1. *Helianthus annuus* L.

Ayçiçeği olarak bilinen *Helianthus annuus* L., çeşitli kullanım alanlarıyla dünyanın en önemli yağlı tohum bitkilerinden biridir. Ayçiçeği, Latin dilinde *Helianthus* olarak bilinir ve Eski Yunancada güneş anlamına gelen “*helios*” ve çiçek anlamına gelen “*anthos*” kelimelerinden türemiştir. Kuzey Amerika orijinli olarak bilinen ayçiçeği, Asteraceae familyası *Helianthus* cinsi içinde olup (**Tablo 1.1**) bu cins yaklaşık 70 türden oluşmaktadır. *Helianthus* cinsinin temel kromozom sayısı 17 olmakla birlikte bu sayı diploidi, tetraploidi ve heksaploidi olmasına göre farklılık gösterir (Hu ve ark., 2010).

Tablo 1.1 Ayçiçeği bitkisinin taksonomik sınıflandırılması (ITIS, 2020)



Alem	Plantae (Bitkiler)
Alt Alem	Viridiplantae (Yeşil Bitkiler)
Aşağı Alem	Streptophyta (Kara Bitkileri)
Süper Bölüm	Embryophyta
Bölüm	Tracheophyta (Vasküler Bitkiler)
Alt Bölüm	Spermatophytina (Tohumlu Bitkiler)
Sınıf	Magnoliopsida
Süper Takım	Asteranae
Takım	Asterales
Familya	Asteraceae (Papatyagiller)
Cins	<i>Helianthus</i> L. (Ayçiçeği)
Tür	<i>Helianthus annuus</i> L. (Ayçiçeği)

Şekil 1.1 *Helianthus annuus* L. (Raw Earth Colors, 2020)

Ayçiçeği, 3 m'ye kadar, sarı yapraklı çiçekleri ise 4 cm'ye kadar uzayabilir (**Şekil 1.1**). Kökleri liflidir. Meyveleri 3-6 mm uzunluğunda gri-kahverengi renkli “*achen*” tiptedir. Yıllık ortalama 6°C - 28°C aralığında yaşayabilir (Dwivedi ve Sharma, 2014). Bir yıllık, sarı çiçekli, otsu bir kültür bitkisi olan ayçiçeği gölgeleri sevmez; geçirgen ve nemli ya da kuru toprağı ve güneşli ya da yarı gölgeli bölgeleri tercih eder. Donlara ve kuraklığa karşı dayanıklıdır. Çayır ve tarlalarda görülür. Kumlu ve tınlı topraklarda yetişir. Gövdesi dik ve tüylüdür; yapraklar geniş, tırtıklı, kaba ve genellikle alternattır; çok sayıda beş petalli çiçek görülür. Dışarıdaki çiçekler petalleri andırır ve bunlara ray çiçekçikleri denir.

Merkezdeki çiçeklere disk çiçekleri denir, meyveleri bunlar oluşturur. Disk çiçekler spiral biçimde dizilmiştir. Çiçekler hermafrodittir (FAO, 2020).

1.2. *Helianthus annuus* L.'un Önemi ve Kullanım Alanları

Yaklaşık 5000 yıldır tarım bitkisi olarak yetiştirilen ayçiçeği, ilk olarak Meksika'da daha sonra Güney ve Kuzey Amerika kıtalarında yetiştirilmeye başlanmıştır. Amerika kıtalarının keşfinden sonra İspanyollar ayçiçeği tohumlarını Avrupa'ya taşımıştır. 18.yy.'da Ruslar ayçiçeği yağının kullanımını yaygınlaştırmış, 19.yy. başlarından itibaren Rusya'da ayçiçeği yağı sektörüne büyük önem verilmiştir. Böylece yağ elde etme amaçlı yetiştirilen ayçiçeği, bir endüstri bitkisi olarak bütün dünyaya yayılmıştır (FAO, 2020).

Ayçiçeği, yüksek miktarda yağ içerdiğinden çok önemli bir yağ ve protein kaynağıdır (Hu ve ark., 2010). Dünya bitkisel yağ üretiminde önemli bir paya sahip olan ayçiçeği ülkemizde en fazla tarımı yapılan yağ bitkisi ve yağ sanayimizin ana hammaddesidir. Dünya genelinde yağlı tohumun %11'ini temsil ederken, 2014'te yayımlanan Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü'nün raporuna göre, Türkiye'de bitkisel yağ üretiminin %47'sini sağlar (Kösoğlu ve ark., 2017).

Yağ ve yağ asitlerinin insan sağlığı ve yağ kalitesi üzerindeki etkileri giderek önemli hale gelmiş ve son yıllarda yağ asitleri üzerindeki çalışmalar hız kazanmıştır. Bitkisel yağlarda oleik asit oranının artmasıyla birçok kalp ve damar hastalıklarının önlendiği, oksidasyona karşı direncin arttığı ve buna bağlı olarak kalitenin yükseldiği tespit edilmiştir. Bitkisel yağlarda oleik asit miktarı artışı, yağ kalitesini yükseltmek için önemli bir hedef haline gelmiştir.

1.3. Ayçiçeğinde Oleik Asit İçeriği ve Kalıtımı

Çeşitli hayvansal ve bitkisel yağlarda doğal olarak bulunan bir yağ asidi olan oleik asit; kimyasal olarak, tekli doymamış omega-9 yağ asidi olarak sınıflandırılır. Oleik asit ismi yağ anlamına gelen Latince "*oleum*" kelimesinden türemiştir (Bailey ve Bailey, 1929).

Bitkisel yağlarda, yağ asit içeriğinin genetik etmenlerle arasındaki ilişki konusunda birçok çalışma yapılmıştır. Ayçiçeği yağındaki yüksek oleik asit içeriğinin *OL1*, *OL2* ve *OL3* adlı 3 gen ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (Haddadi ve ark., 2010).

Oleik/linoleik asit oranı yüksek olan bitkisel yağlar oksidasyona daha dirençli, raf ömrü daha uzun ve tat gelişimi daha olumlu olduğu için oleik/linoleik asit oranı yüksek olan

bitkisel yağlar kızartmalarda tercih edilmektedir (Petros ve ark., 2009; Barkley ve ark., 2011). Bitkisel yemeklik yağların kalitesi oleik (omega-9), linoleik (omega-6) ve linolenik (omega-3) yağ asitlerinin kompozisyonuyla ilişkilidir (Mohsennia ve Jalilian, 2012). Oleik ve linoleik asit bitkisel yağlarda önemli yağ asitleri olmakla birlikte oksidatif stabilite gibi özelliği etkilemektedir (Suresha ve ark, 2012).

Oleik asit oranı yüksek olan bitkisel yağ elde etmek için *FAD2* geninin mutasyona (Pervenet mutasyonu) uğramış allel seçimli yağlı tohum yetiştirilmesi basit bir stratejidir (Shirasawa ve ark., 2012). *FAD2* geninin allellenmesi sonucunda ayçiçeği tohumunun oleik asit oranı %29'dan %84'e, kanola tohumunun oleik asit oranı %57'den %89'a, soya tohumunun oleik asit oranı %24'ten %84'e ve yer fıstığı tohumunun oleik asit oranı ise %55'ten %76'ya kadar yükseltilmiştir (Wilson, 2012).

1.4. Ayçiçeği İslahında Markör Destekli Seleksiyon

İslah, tarımda birey kontrolü için onay alan baskın direnç genlerinin oluşturulmasına dayanmakta olup tercih edilen niteliklere sahip melezleri elde etmek için bitkileri çaprazlama yoluyla yapılır. Moleküler ıslah teknikleri, gelişen teknolojinin yardımıyla geleneksel ıslahı desteklemek için gelişmiştir, bu da bütçe ve zaman kazanımını sağlamaktadır. Moleküler ıslah, genetik olarak bağışık hibritlerin tanımlanmasını ve kayda değer neslin belirlenmesini mümkün kılar. Bu sayede tarım endüstrisinde istenilen niteliklere sahip hibrit bitkiler yaygınlaşmaktadır (Gascuel ve ark., 2017).

Geleneksel yöntemlerle karşılaştırıldığında, MAS (Marker Assisted Selection, Markör Destekli Seleksiyon)'ın moleküler ıslahta umut verici bir uygulama olduğu ve bitki ıslahının etkinliğini arttırmak için moleküler markörlerin kullanılabileceği belirtilmiştir (Kim ve ark., 2016).

Moleküler markörler, genomda herhangi bir gen bölgesi veya gen bölgesiyle ilişkili DNA parçasıdır (Devran, 2003). Bu markörler, familyaların genetik ve karakter haritalarının oluşturulmasından, tür ayrımı ve teşhislerine kadar birçok farklı amaçla kullanılabilmektedir (Rafalski, 2002).

Moleküler markörlerin başlıcaları şunlardır; RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism, Restriksiyon Fragmenti Uzunluk Polimorfizmi), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA, Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism, Çoğaltılmış Fragment Uzunluk Polimorfizmi), SSR

(Simple Sequence Repeat, Basit Dizi Tekrarları) ve SNP (Single Nucleotide Polymorphism, Tek Nükleotit Polimorfizmi) (Staub ve ark., 1996).

Her birinin avantajları ve dezavantajları bulunmaktadır. Örneğin, RFLP yöntemi için çok fazla miktarda DNA'ya ihtiyaç duyulur, pahalı ve zaman gerektiren bir markör sistemidir. Diğer yandan sonuçlarıysa oldukça güvenilirdir ve genetik açıdan heterozigot/homozigot ayrımını (kodominant markör) yapabilir (Ahn ve Tanksley, 1993). RAPD, temelde PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)'ye dayanır. Tekniği uygulamak basit ve hızlıdır. Ayrıca tekniği kullanmak için dizi analizine ihtiyaç yoktur. Fakat yalnızca dominant markörler oluşturulması ve PZR reaksiyonundaki küçük değişikliklerde bile sonuçların etkilenmesi buna bağlı olarak sonuçların tekrarlanabilir olmaması dezavantajlarından (Williams ve ark., 1990).

Bu bakımdan amacımız doğrultusunda en avantajlı olduğunu düşündüğümüz markör sistemi SNP markörüdür. Bu markör türü öncelikle yüksek çıktılı (high-throughput) dizileme tabanlı markör olması dolayısıyla sonrasında tek nükleotit dizi farklılığının genomda en çok gözlemleyebildiğimiz polimorfizm türü olması dolayısıyla, daha detaylı bir çalışma elde etmemize zemin hazırlamaktadır. SNP'ye bağlı belirteçler, moleküler genetikteki bilgilerin artışıyla ve beraberinde gelen karmaşık veri tabanlarıyla birlikte en cazip markör sistemlerinden biridir (Mammadov ve ark., 2012).

SNP'ler bir genomda insersiyonlar, delesyonlar veya baz çifti değişikliği olarak bulunan nokta mutasyonlarıdır. SNP'ler, diğer DNA markörleriyle karşılaştırıldığında çok avantajlıdır. Bir genomda SNP'lerin bolluğu, istenen lokusta SNP'lerin seçiminde esneklik sağlar. SNP'lerin bir başka avantajı, jel bazlı markörlere kıyasla, büyük popülasyonların yoğun emek gerektirmeden hızlı bir şekilde taranmasıdır (Lai ve ark., 2005; Thomson, 2014).

HO (High Oleic Acid, Yüksek Oleik Asit) genotiplerini LO (Low Oleic Acid, Düşük Oleik Asit) genotiplerinden ayırmak için RAPD veya SSR gibi moleküler markör tipleriyle çeşitli ayçiçeği hatları ve melezleri çalışılmıştır.

Dehmer ve Friedt (1998), HO ve LO genotiplerini ayırt etmek için RAPD markörlerini (OP-AC10 ve OP-F15) kullanmışlardır. Nagarathna ve arkadaşları (2011), yüksek oleik asit taramasına RHA hatları, cms hatları, inbred'ler ve germplazm hatları dahil olmak üzere 350 civarında ayçiçeği genotipi seçmişler ve bu ayçiçeği hatlarını HO içeriği

açısından genotipleme amacıyla HO PZR spesifik fragmentini (N1-3F / N2-1R) belirlemişlerdir. Çalışma sonucunda, spesifik bir banda (800-900 bp) sahip olan genotiplerin yüksek oleik içerik gösterdiğini bildirmişlerdir. Singchai ve arkadaşları (2013), düşük ve yüksek oleik içeren ayçiçeklerini tanımlamak için 34 ORS primer seti, 2 HA primer seti ve N1-3F / N2-1R primer içeren 37 SSR primeri taramışlardır. 37 SSR primerinden, N1-3F / N2-1R içeren 10 SSR primeri, yüksek ve düşük oleik içeren hatlar arasında farklılaşan bantlar belirlemişler ve ayçiçeği ıslah programı için faydalı olabilecek yüksek oleik asit özelliğine bağlı daha fazla genetik markörlerin tanımlanmasının mümkün olduğunu bildirmişlerdir.

Rauf ve arkadaşları derlemelerinde (2017), ayçiçeği çekirdeği yağı içeriğinin iyileştirilmesi ve ampirik ve ileri moleküler ıslah yöntemleri ile kalitesini değiştirmedeki ilerlemenin belirlenmesine odaklanmıştır. Ayçiçeği yağı içeriğinin ve kalitesinin, dünyanın çeşitli yerlerinde ampirik seçim yöntemleri ve mutasyon ıslah programlarıyla değiştirildiği bilinmektedir. Biyoteknolojik yöntemlerle ortaya çıkan farklı transgenler, ayçiçeği yağı içinde yeni uzun zincirli yağ asitleri üretebilir. Ayçiçeği yağının biyomühendisliği, biyodizel veya biyoplastikler gibi çeşitli endüstriyel ürünlerde kullanılmasına izin verebilir. Bu sonuçlar, geçmiş ve mevcut ayçiçeği yağı kalitesini değiştirme eğilimlerinin, yağlı tohumlu bir mahsul olarak daha da genişlemesi için gerekli olduğunu göstermiştir.

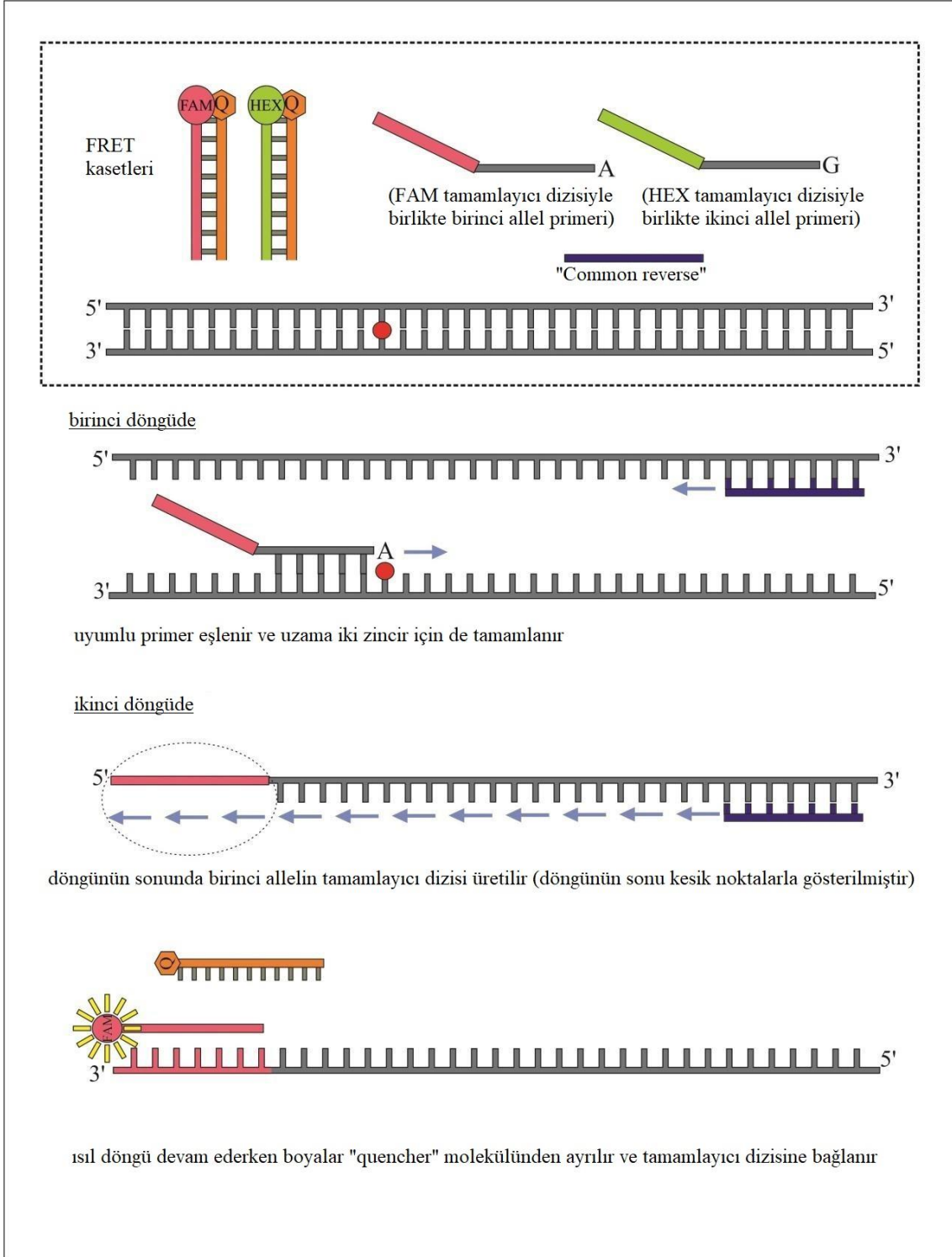
Bu tez çalışması, ayçiçeğinde HO ve LO genotiplerini ayırt etmek için daha güvenilir ve hızlı bir yöntem olan KASP (Kompetitive Allele Specific Polymerase Chain Reaction, Kompetitif Allel Spesifik Polimeraz Zincir Reaksiyonu) analiziyle gerçekleştirildi.

1.4.1. KASP (Kompetitif Allel Spesifik Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

MAS çalışmalarında, yüksek verimli analiz için çeşitli mikroarray temelli analizler kullanılmıştır. Floresan işaretli markör gerçek zamanlı (real time) olarak “plate reader” tarafından taranabilir.

KASP genotipleme yöntemi, insersiyon ve delesyon gibi SNP'lerin tanımlanmasını ve hesaplanmasını sağlayan yeni, homojen ve floresans bazlı bir uygulamadır (He ve ark., 2014).

KASP analizine dayalı teknoloji (**Şekil 1.2**), PZR sistemiyle ve bu sistemin FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer, Floresans Rezonans Enerji Transferi) kasetlerinin kombinasyonu ile ilişkilidir. FRET kasetleri, eşleşmeden önce sinyal oluşumunu durdurmak için spesifik oligo kuyrukları ve “complementary quencher molecules” olan FAM (Fluorescein amidite, Floresin amidit) ve HEX (Hexachloro fluorescein, Heksakloro floresin) floresan etiketli boyalardan oluşmuştur. İki işaretlenmemiş ASP (allele-specific primer, allel-spesifik primer), reaksiyonun diğer kilit noktasıdır. Primerlerin uzama kısmı birebir aynı olup, “quencher” molekül bu uzamaların tamamlayıcı dizisine sahiptir. PZR döngülerinin sonunda, kullanılan primerler sinyal frekansı üzerinden tanımlanır. PZR'nin ilk döngüsünden sonra, primerlerin uzama kısımları ikiye katlanır ve FRET boyasına tamamlayıcı olan dizi oluşur. İkinci döngüde, floresan etiketli boyalar amplifiye edilmiş primer uzatma dizisi ve floresan sinyal formlarıyla bir araya gelmek için “quencher” moleküller salınır. Bu sinyaller, gerçek zamanlı PZR cihazı veya “plate reader” kullanılarak tespit edilir.



Şekil 1.2 KASP analizine dayalı teknolojinin sinyal üretimi aşamasını gösteren diyagram (Şahin, 2018)

KASP, SNP genotipleme için %90 uygundur ve diğer yaklaşımlardan daha güçlü ve düşük maliyetlidir. Ayrıca, örnek sayısı ve SNP sayısı açısından da güvenilir, tekrarlanabilir ve esnektir (LGC group, 2020).

Son zamanlarda KASP analiziyle, buğday (Chhetri ve ark., 2017; Tan ve ark., 2017), soya fasulyesi (Shi ve ark., 2015), mısır (Semagn ve ark., 2014), pirinç (Thomson ve ark., 2014) ve yer fıstığı (Khera ve ark., 2013) MAS araştırmalarında SNP markörleri kullanılarak çalışmalarda bulunulmuştur (Kösoğlu ve ark., 2017).

Bu tez çalışmasında, KASP analiziyle ayçiçeğinde yüksek oleik asit içeriği genleriyle ilişkili SNP markörleri kullanılarak yüksek oleik içeriğine sahip bireylerin diğer düşük oleik asit içeriğine sahip bireylerden ayırt edilebilmesi amaçlanmıştır. Bu çalışmayla kullanılan SNP markörlerinin KASP analizi için optimizasyonu sağlanıp ayçiçeği ıslah programlarına destek olacak veriler elde edilmiştir. HO gen bölgelerine ait SNP markörleri kullanılarak gerçekleştirilen KASP analizi sonucunda HO ve LO içeriğine sahip ebeveynlere ait F₂'lerin oleik asit durumları değerlendirilmiş ve tüm ebeveynlerin kombinasyonlarına ait F₂'lerin oleik asit durumları belirlenmiştir. Oleik asit ile bağlantılı olduğu saptanan *FAD2* gen bölgesindeki varyasyona dayalı OL2 KASP primeri ilk defa bu tez çalışmasında kullanılarak 9 farklı ebeveyn kombinasyonu ve bu kombinasyonlara ait toplam 248 F₂ bireyinin oleik asit durumu etkin bir şekilde taranmıştır.

2. MATERYAL ve YÖNTEM

2.1. Bitki Materyalinin Eldesi

Bu tezde, bitki materyali olarak Edirne’de bulunan T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü bünyesinde tarlaya ekilen farklı *Helianthus annuus* L. hatlarının 2 haftalık yaprakları kullanıldı ve genomik DNA izolasyonu gerçekleştirilinceye kadar -80 °C’de muhafaza edildi.

Bitki materyali olarak kullanılan *Helianthus annuus* L. hatları oleik asit içeriği yönüyle düşük ve yüksek oleik içeriğine sahip hatlar olarak seçildi. Daha sonra bu hatlar kullanılarak kombinasyonlar oluşturuldu (**Tablo 2.1**).

Tablo 2.1 Bitki materyali olarak kullanılan *Helianthus annuus* L. hatlarına ait ebeveynlerin oleik asit içeriği durumları ve oluşturulan ebeveyn kombinasyonları

Yüksek Oleik Asit İçeriğine Sahip Ebeveynler	Düşük Oleik Asit İçeriğine Sahip Ebeveynler	Kombinasyonlar
		RHA419 x COLOMBI
		RHA419 x OLIVA
		HA442 x COLOMBI
RHA419	VINIIMK	VINIIMK x OLIVA
COLOMBI	P64LC108	VINIIMK x COLOMBI
OLIVA	P64G46	HA458 x P64LC108
HA442	P64LC53	RHA419 x P64G46
RHA437	HA458	RHA437 x COLOMBI
		RHA419 x P64LC53

2.2. Genomik DNA İzolasyonu

Tarlardan kesilerek toplanan ve paketlenen (**Şekil 2.2**) *Helianthus annuus* L. bitkisinin taze yaprak dokuları genomik DNA izolasyonu işleminde kullanılıncaya kadar -80°C derin dondurucuda saklandı.



Şekil 2.1 Genomik DNA izolasyonu için örnek alımı: Yaprak dokusunun kesilmesi (solda) ve paketlenmesi (sağda)

Helianthus annuus L. bitkisinin yaprakları kullanılarak gerçekleştirilen genomik DNA izolasyonu CTAB (Doyle ve Doyle, 1987) yöntemi modifiye edilerek kullanıldı. Buna göre gerekli solüsyonlar (**Tablo 2.2**)’de verilmiştir.

Tablo 2.2 Genomik DNA izolasyonunda kullanılan kimyasal solüsyonların isimleri, içerikleri, miktarları ve hazırlanışları

Solüsyon	İçerik ve Miktarları	Hazırlanışı
Ekstraksiyon Tamponu (CTAB)	20 mM Na-EDTA (pH: 8) 100 mM Tris-HCl (pH: 8) 1.4 M NaCl %2 (w/v) CTAB	Tüm malzemeler karıştırıldıktan sonra, elde edilen solüsyon, CTAB’ın çözülmesi için 60 °C’de karıştırıldı ve 37 °C’de inkübe edildi. Kullanılmadan önce, içine konsantrasyonu %0,2 olacak şekilde β-merkaptoetanol eklendi.
Kloroform:Oktanöl 24:1 (v/v)	Kloroform Oktanöl	Kloroform ve oktanöl 24:1 oranında hazırlandı.
RNase A	10 mg/ml	Kullanım için hazır olarak temin edildi.

Uygulanan yöntemin basamakları aşağıdaki gibidir:

- Her örnekten yaprak dokusu (100 mg) tartıldı.
- Tartılan yapraklar 2 ml’lik santrifüj tüplerine aktarıldı.
- “Retsch® MM 400” vibrasyonlu öğütücü kullanılarak sıvı nitrojen ve metal topların yardımı eşliğinde fiziksel parçalamayla toz haline getirildi.

- Her örnek için, 750 µL CTAB (Cetyltrimethylammonium Bromide) solüsyonu ve 10 mg toz PvP (Polyvinyl pyrrolidone) karıştırılarak eklendi ve iyice karıştırılarak çözülmesi için 60 °C'ye ısıtıldı ve aynı sıcaklıkta 25 dk. süreyle inkübe edildi.
- CTAB-PvP solüsyonuna %0,2 β-merkaptotanol eklendi ve 60 °C'de 40 dk. süreyle inkübe edildi. Tüpler 5 dk. aralıklarla alt-üst edildi.
- İnkübasyon sonrası örnekler oda sıcaklığına soğutulup üzerine 450 µl kloroform:oktanol karışımı eklenip 20-25 defa alt-üst edilerek karıştırıldı.
- Örnekler 13.000 rpm'de oda sıcaklığında 15 dk. süreyle "Sigma 3-30KS" santrifüj cihazı kullanılarak santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası üst faz (süpernatant) temiz bir santrifüj tüpüne transfer edildi.
- Toplanan üst fazın (süpernatant) üzerine ½ hacim oranında 5 M NaCl eklenip karıştırıldıktan sonra 2 hacim oranında %95'lik EtOH eklenip 4-6 °C'de genomik DNA'nın çökmesi sağlandı.
- Çöken genomik DNA örnekleri 5 dk. süreyle "Sigma 3-30KS" santrifüj cihazı kullanılarak santrifüj edildi ve üst faz (süpernatant) atıldı ve pellet üzerine 500 µl %75'lik EtOH eklenerek yıkama gerçekleştirildi.
- Genomik DNA örnekleri 13.000 rpm'de "Sigma 3-30KS" santrifüj cihazı kullanılarak 10 dk. süreyle santrifüj edilerek elde edilen pelletler oda sıcaklığında "Eppendorf AG Concentrator Plus 5301" cihazı kullanılarak kurutuldu.
- Genomik DNA örnekleri 150-200 µl nükleazsız su içerisinde çözülüp içerisine 2-3 µl RNase (2U) eklenip 30 °C'de 30 dk., 60 °C'de 10 dk. süreyle inkübe edildi.
- İzole edilen genomik DNA'lar kalitatif ve kantitatif analiz edilinceye kadar -20 °C'de tutuldu.

2.3. Genomik DNA Miktarının ve Kalitesinin Ölçümü

Genomik DNA miktarı, saflığı ve KASP analizinde kullanılacak sulandırma oranlarının hesaplanması için spektrofotometre prensibiyle çalışan “Qubit® 2.0 Fluorometer” cihazında “Qubit™ dsDNA (double stranded) BR Assay Kit” içeriğindeki “Buffer” ve “Reagent” yardımıyla gerçekleştirildi.

Her bir örnek için 199 µL “Buffer” ve 1 µL “Reagent” kullanıldı ve 200 µL’lik karışım bir tüpte hazırlandı. Başka bir tüpe bu karışımdan 198 µL alınarak üzerine daha önce genomik DNA izolasyonu gerçekleştirilip 4 °C’de bekletilen stok DNA’dan 2 µL eklendi.

Hazırlanan solüsyon oda sıcaklığında 10-15 dk. karanlıkta bekletildikten sonra cihazda miktar ve kalite ölçümleri yapıldı. Sonuçlar ng/µL olacak şekilde tablolar oluşturuldu ve her bir örnek için bu tablo sonuçları esas alınarak $C1.V1=C2.V2$ formülüyle stok DNA’ların sulandırılma oranları hesaplandı.

Miktarı, saflığı ve KASP analizinde kullanılacak sulandırma oranlarının hesaplanması için “Qubit® 2.0 Fluorometer” cihazı kullanılarak ölçülen genomik DNA örnekleri 2 ng/µL olacak şekilde sulandırıldı, %0,8’lik agaroz jele yüklendi ve görüntülendi. Daha sonra KASP analizinde kullanılmak üzere -20°C’de muhafaza edildi.

2.4. KASP (Kompetitif Allel Spesifik Polimeraz Zincir Reaksiyonu) Analizi

Genomik DNA örnekleri, KASP analizinde kullanılmak üzere DNA konsantrasyonları sulandırılarak -20 °C’de muhafaza edildi.

KASP analizlerinin başarıyla gerçekleşebilmesi için SNP primerleri kullanıldı. Bu primerlerden “SNP_OL_1C1”, “SNP_OL_1F1” ve “SNP_OL_1F2” primerleri pozitif kontrol olarak PZR’nin çalışıp çalışmadığını gösterirken “SNP_OL_2C1”, “SNP_OL_2N_F1” ve “SNP_OL_2N_F2” primerleri ise HO geninin varlığını göstermektedir. Böylelikle bu geni taşıyan örnekler PZR’de ışımaya yapıp gen varlığını gösterirken, bu geni taşımayan örnekler PZR olmayacak ve sonucunda da ışımaya yapmayacaktır. Bu kurguyla planlanan SNP primerlerinin dizileri **Tablo 2.3**’teki gibidir.

Tablo 2.3 KASP analizinde kullanılan SNP primerleri ve dizileri

SNP Primerleri	Nükleotit Dizileri
SNP_OL_1C1	GTTGCAGGATTGGGGTCTTGTGTTT
SNP_OL_1F1	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTTTCTGGTTTCGTAA ATATAAATAAAGCAAA
SNP_OL_1F2	GAAGGTCCGAGTCAACGGATTTCTGGTTTCGTAAA TATAAATAAAGCAAG
SNP_OL_2C1	CTGTCCATTCCGTTCTTTCTGGTT
SNP_OL_2N_F1	GAAGGTCCGAGTCAACGGATTATTGTAAACACTTT TATGCTTAGACCAC
SNP_OL_2N_F2	GAAGGTGACCAAGTTCATGCTATATATTGTAAACA CATTTTATGCTTAGACCAT

Her bir KASP analizi için “MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate” (96 kuyucuklu reaksiyon plakaları) ve örneklerin yüzeyini kapatmak için “MicroAmp™ Optical Adhesive Film” (optik yapışkan filmler) kullanıldı. “StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems” cihazı kullanılarak KASP analizi gerçekleştirildi. “Assay Mix”, iki allele özgü ileri primerleri ve bir yaygın (geri) primer içerir. “Master Mix”in içinde reaksiyon tamponu, Taq polimeraz enzimi ve dNTP’ler gibi PZR bileşenlerinin yanı sıra FAM ve HEX gibi floresan boyaları da bulunduran FRET kasetleri de yer almaktadır.

Çalışılan örnek sayısına göre **Tablo 2.4**’teki miktarlar göz önünde bulundurularak reaksiyon bileşen miktarları hesaplandı.

Tablo 2.4 KASP reaksiyon bileşenleri ve miktarları

Bileşenler	Hacimler (µL)
Master Mix	10
Assay Mix	0,28
DNA örneği (2 ng/µL)	10

Hazırlanan “Master Mix” ve “Assay Mix” karışımı 10,28 µL, DNA örnekleri ise 10 µL olacak şekilde kuyucuklara dağıtıldı. Plaka, optik yapışkan film ile kapatılıp örneklerin kuyucukların dibine inmesi için 1000 rpm hızda 30 saniye boyunca santrifüj yapıldı.

Daha sonra, KASP cihazında **Tablo 2.5**’teki protokol uygulandı ve PZR gerçekleştirildi.

Tablo 2.5 Uygulanan KASP protokolünün adımları.

Adımlar		Sıcaklık	Zaman
1	PZR öncesi okuma	30°C	1 dk.
2	Bekleme evresi	94°C	15 dk.
3	10 tekrar	89,2°C	20 sn.
		61°C	1 dk.
4	26 tekrar	94°C	20 sn.
		57°C	1 dk.
5	PZR sonrası okuma	30°C	1 dk.
6	Son sıcaklık	4°C	∞

PZR sonucunda, “StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems” cihazının bağlı olduğu bilgisayarda “Applied Biosystems’ StepOne™ Software” programı kullanılarak allelik ayırım grafikleri elde edildi ve grafikler değerlendirildi.

3. BULGULAR ve TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında, KASP analiziyle *Helianthus annuus* L. bitkisinde yüksek oleik asit genleriyle ilişkili SNP markörleri kullanılarak, yüksek oleik asit içeriğine sahip bireylerin diğer bireylerden ayırt edilebilmesi amaçlandı. Bu çalışma sonucunda, kullanılan SNP markörlerin KASP analizi için optimizasyonu sağlandı.

3.1. Bitki Materyali

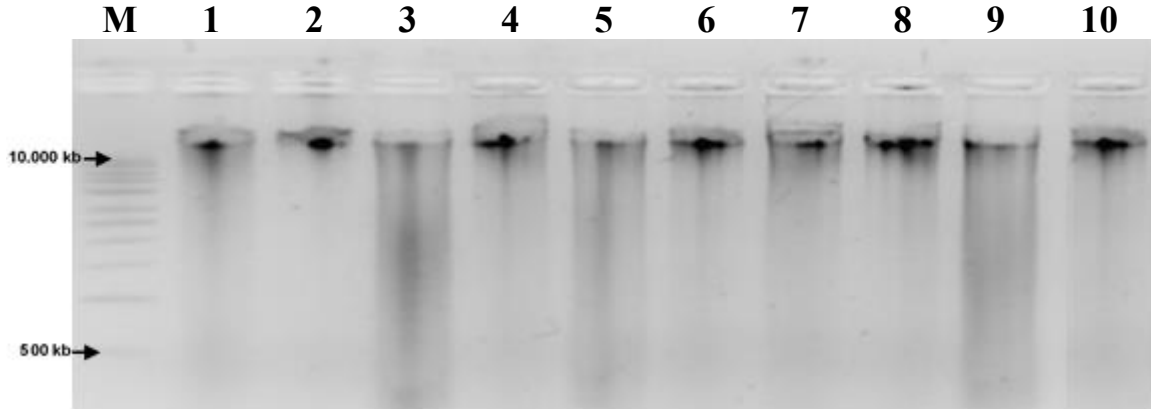
Bu çalışmada Edirne’de bulunan T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü bünyesinde tarlaya ekilen farklı *Helianthus annuus* L. hatları materyal olarak kullanıldı. Bu hatlar, ilgili karakter yönüyle düşük ve yüksek oleik asit içeriğine sahip ebeveyn kombinasyonlarını ve bu kombinasyonlara ait F₂ bireylerini (Tablo 3.1) içermektedir.

Tablo 3.1 Tarladan toplanıp bitki materyali olarak kullanılan ebeveyn kombinasyonları ve bu kombinasyonlara ait F₂ bireyleri

Ebeveyn Kombinasyonları	Toplam F ₂ Birey Sayısı	F ₂ Bireyleri
RHA419 x COLOMBI	15	71, 72, 73, 74, 75, 81, 82, 83, 84, 85, 151, 152, 153, 154, 155
RHA419 x OLIVA	5	76, 77, 78, 79, 80
HA442 x COLOMBI	15	86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100
VINIIMK x OLIVA	95	101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 156, 157, 158, 159, 160, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210
VINIIMK x COLOMBI	10	161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170
HA458 x P64LC108	10	21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30
RHA419 x P64G46	19	61, 66, 67, 68, 69, 70, 76, 77, 78, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190
RHA437 x COLOMBI	54	91, 92, 93, 94, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 241, 242, 243, 244, 245
RHA419 x P64LC53	25	126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150
Toplam	248	

3.2. Genomik DNA Miktarının ve Kalitesinin Analizi

DNA izolasyonu sonrasında ebeveyn örnekleri %0,8'lik agaroz jele yüklenerek görüntülendi (Şekil 3.1) ve KASP analizinde kullanılmak üzere 2 ng/μL olacak şekilde sulandırılarak -20°C'de muhafaza edildi.



Şekil 3.1 KASP analizlerinde kullanılan ebeveyn genotiplerine ait genomik DNA'lar; 1: RHA437; 2: COLOMBI; 3: P64G46; 4: HA458; 5: HA442; 6: OLIVA; 7: VINIIMK; 8: RHA419; 9: P64LC53; 10: P64LC108; M: 1kb.

“Qubit®2.0 fluorometer” cihazı kullanılarak konsantrasyonları ölçülen ebeveyn örneklerinin DNA miktarları **Tablo 3.2**'de verilmiştir.

Tablo 3.2 CTAB protokolü ile DNA izolasyonu gerçekleştirilen *Helianthus annuus* L. ebeveynlerine ait “Qubit®2.0 fluorometer” cihazıyla ölçülen DNA konsantrasyon (ng/μL) değerleri

Örnek	Kon. ng/μL	Örnek	Kon. ng/μL	Örnek	Kon. ng/μL	Örnek	Kon. ng/μL
RHA419	224	HA458	56,3	COLOMBI	170	P64LC108	86,1
OLIVA	151	P64G46	600	HA442	287	RHA437	318
VINIIMK	510	P64LC53	610				

“Qubit®2.0 fluorometer” cihazı kullanılarak konsantrasyonları ölçülen ebeveyn kombinasyonlarına ait F₂ örneklerinin DNA miktarları **Tablo 3.3**'te verilmiştir.

Tablo 3.3 CTAB protokolü ile DNA izolasyonu gerçekleştirilen *Helianthus annuus* L. ebeveyn kombinasyonlarının F₂ bireylerine ait “Qubit®2.0 fluorometer” cihazıyla ölçülen DNA konsantrasyon (ng/μL) değerleri

Kombinasyon	F ₂ Bireyi	Kon. ng/μL	F ₂ Bireyi	Kons. ng/μL	F ₂ Bireyi	Kons. ng/μL	F ₂ Bireyi	Kons. ng/μL	F ₂ Bireyi	Kons. ng/μL
RHA419 x COLOMBI	71	122	72	79	73	52	74	98	75	407
	81	13	82	45	83	72	84	19	85	109
	151	138	152	126	153	284	154	174	155	32,4
RHA419 x OLIVA	76	64	77	64	78	116	79	202	80	282
HA442 x COLOMBI	86	69	87	282	88	105	89	209	90	198
	91	117	92	184	93	111	94	111	95	39
	96	88	97	300	98	359	99	250	100	960
VINIIMK x OLIVA	101	118	102	690	103	194	104	129	105	156
	106	48	107	274	108	52	109	201	110	87
	111	61	112	52	113	143	114	850	115	99
	116	560	117	191	118	210	119	64	120	590
	121	23	122	78	123	530	124	259	125	80
	126	73	127	30	128	78	129	50	130	224
	131	91	132	77	133	254	134	203	135	54
	136	84	141	50	142	48	143	63	144	247
	145	166	146	58	147	79	148	59	149	308
	150	155	151	142	152	73	153	900	154	73
	156	219	157	204	158	209	159	173	160	193
	171	76	172	164	173	129	174	131	175	67
	176	44	177	101	178	100	179	32	180	132
	181	76	182	168	183	85	184	62	185	510
	186	151	187	148	188	840	189	96	190	103
	191	87	192	130	193	70	194	740	195	780
196	115	197	374	198	520	199	180	200	47	
201	159	202	71	203	63	204	57	205	242	
206	276	207	309	208	247	209	348	210	245	
VINIIMK x COLOMBI	161	278	162	365	163	279	164	86	165	275
	166	449	167	63	168	160	169	540	170	700
HA458 x P64LC108	21	123	22	111	23	200	24	231	25	261
	26	88,9	27	60,7	28	406	29	227	30	139
RHA419 x P64G46	61	104	66	144	67	123	68	30,6	69	66,1
	70	117	76	60,1	77	119	78	16,4	181	495
	182	237	183	307	184	510	185	840	186	62,9
	187	131	188	108	189	129	190	207		

Tablo 3.3 (Devamı) CTAB protokolü ile DNA izolasyonu gerçekleştirilen *Helianthus annuus* L. ebeveyn kombinasyonlarının F₂ bireylerine ait “Qubit®2.0 fluorometer” cihazıyla ölçülen DNA konsantrasyonu (ng/μL) değerleri

Kombinasyon	F ₂ Bireyi	Kon. ng/μL	F ₂ Bireyi	Kons. ng/μL	F ₂ Bireyi	Kons. ng/μL	F ₂ Bireyi	Kons. ng/μL	F ₂ Bireyi	Kons. ng/μL
RHA437 x COLOMBI	91	252	92	44,7	93	102	94	59,5	96	27,6
	97	123	98	217	99	137	100	159	101	78,8
	102	77,9	103	202	104	25,9	105	27,8	106	56,4
	107	29,7	108	95,1	109	83,3	110	275	111	97,2
	112	111	113	424	114	279	115	152	211	50,8
	212	281	213	277	214	128	215	208	216	138
	217	610	218	252	219	780	220	64,6	221	153
	222	97	223	460	224	140	225	119	226	299
	227	113	228	224	229	201	230	35,5	231	183
	232	322	233	66,3	234	125	235	86,5	241	126
RHA419 x P64LC53	242	85,5	243	133	244	313	245	153		
	126	22,7	127	133	128	154	129	163	130	115
	131	54,1	132	180	133	183	134	170	135	289
	136	317	137	281	138	67,1	139	17,9	140	236
	141	466	142	219	143	382	144	135	145	341
	146	135	147	237	148	10,4	149	128	150	256

3.3. KASP (Kompetitif Allel Spesifik Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

10 farklı ebeveyn ile oluşturulan 9 farklı kombinasyona ait toplam 248 adet F₂ bireyi analiz edildi. KASP analizinin gerçekleştiği “StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems” cihazının bağlı olduğu bilgisayarda “Applied Biosystems’ StepOne™ Software” yazılım programı kullanılarak allelik ayırım grafikleri ve allelik frekanslar (**Tablo 3.4**) elde edildi ve grafikler bu frekans verileri doğrultusunda değerlendirildi.

Grafiklerin tamamında kırmızı ve mavi noktalar ebeveynleri sembolize ederken; yeşil noktalar o ebeveynlere ait HO F₂ bireylerini, çarpı işaretleri yine o ebeveynlere ait LO F₂ bireylerini, siyah kareler ise negatif kontrolleri temsil etmektedir.

Tablo 3.4 Ebeveyn kombinasyonları ve bu kombinasyonlara ait F₂ bireylerinin oleik asit durumları ve bu bireylere ait allelik frekans verileri

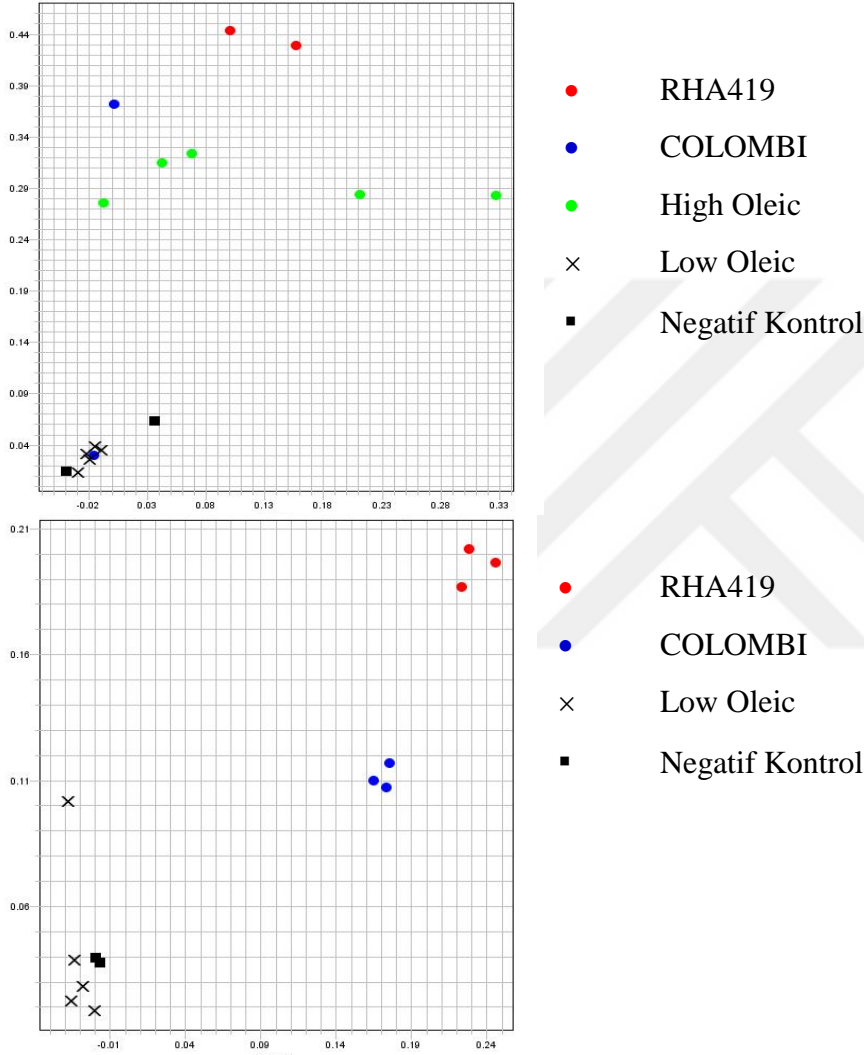
Kombinasyon	Ebeveynlerin ve F ₂ bireylerinin durumları	Allel 1 Frekansı	Allel 2 Frekansı
RHA419 x COLOMBI	RHA419 High-Oleic	0.1242	0.4407
	COLOMBI High-Oleic	-0.0109	0.2051
	5 F ₂ High-Oleic	-0.0117 – 0.3227	0.2798 – 0.3277
	10 F ₂ Low-Oleic	-0.0340 – -0.0142	0.0175 – 0.0430
RHA419 x OLIVA	RHA419 High-Oleic	0.7316	0.0568
	OLIVA High-Oleic	0.4871	0.0373
	5 F ₂ Low-Oleic	0.0486 – 0,6124	-0.0725 – 0.0131
HA442 x COLOMBI	HA442 High-Oleic	1.1123	0.2315
	COLOMBI High-Oleic	1.2378	0.1937
	14 F ₂ High-Oleic	-0.0156 – 1.2945	0.0223 – 0.2227
	1 F ₂ Low-Oleic	-0.0160	0.0278
VINIIMK x OLIVA	VINIIMK Low-Oleic	-0.1316	-0.0350
	OLIVA High-Oleic	-0.0691	0.0031
	14 F ₂ High-Oleic	-0.0850 – 0.1113	-0.0287 – 0.5227
	81 F ₂ Low-Oleic	-0.1433 – 0.7446	-0.0609 – 0.3020
VINIIMK x COLOMBI	VINIIMK Low-Oleic	1.1568	0.2191
	COLOMBI High-Oleic	1.2378	0.937
	5 F ₂ High-Oleic	0,0473 – 1,2768	0,034 – 0,2151
	5 F ₂ Low-Oleic	0,9109 – 1,2190	0,2066 – 0,2324

Tablo 3.4 (Devamı) Ebeveyn kombinasyonları ve bu kombinasyonlara ait F₂ bireylerinin oleik asit durumları ve bu bireylere ait allelik frekans verileri

Kombinasyon	Ebeveynlerin ve F ₂ bireylerinin durumları	Allel 1 Frekansı	Allel 2 Frekansı
HA458 x P64LC108	HA458 Low-Oleic	1.9392	0.1929
	P64LC108 Low-Oleic	1.8384	0.1178
	10 F ₂ Low-Oleic	0.9307 – 2.2195	0.0574 – 0.1706
RHA419 x P64G46	RHA419 High-Oleic	1.4887	0.1167
	P64G46 Low-Oleic	1.4444	0.1161
	19 F ₂ Low-Oleic	0.1828 – 2.2846	0.0374 – 0.3537
RHA437 x COLOMBI	RHA437 High-Oleic	-0.0194	0.4921
	COLOMBI High-Oleic	-0.0352	0.3688
	33 F ₂ High-Oleic	-0.0801 – 0.4172	0.0963 – 1.0007
	21 F ₂ Low-Oleic	-0.1419 – 0.0018	-0.0431 – 0.0001
RHA419 x P64LC53	RHA419 High-Oleic	-0.0564	0.1703
	P64LC53 Low-Oleic	-0.0560	-0.0044
	25 F ₂ Low-Oleic	-0.0995 – 0.1045	-0.0326 – 0.0310

Analiz edilen kombinasyon: RHA419 x COLOMBI

Bu kombinasyona ait 15 F₂ bireyinden 5 tanesinin HO, 10 tanesinin ise LO içeriğine sahip olduğu KASP cihazının bağlı olduğu bilgisayarda görüntülenen aşağıdaki grafiklere (Şekil 3.2) göre belirlenmiş olup bu bireylerin oleik asit durumları **Tablo 3.5**'te ayrıca verilmiştir.



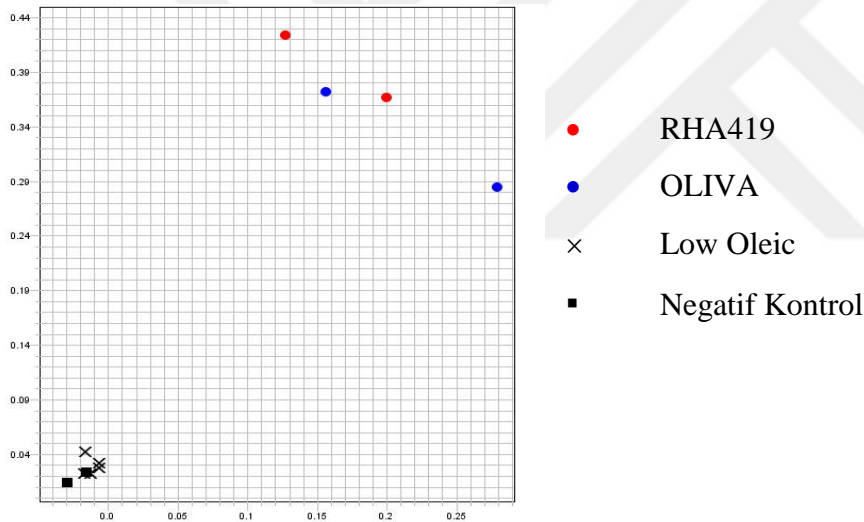
Şekil 3.2 KASP sonucunda elde edilen RHA419 x COLOMBI kombinasyonuna ait grafikler

Tablo 3.5 RHA419 x COLOMBI kombinasyonuna ait F₂ bireylerinin oleik asit durumlarını (OAD) gösteren KASP analiz sonuçları

Örnek	OAD	Örnek	OAD	Örnek	OAD
RHA419	Yüksek (High)	COLOMBI	Yüksek (High)	71	Yüksek (High)
72	Yüksek (High)	73	Yüksek (High)	74	Yüksek (High)
75	Yüksek (High)	81	Düşük (Low)	82	Düşük (Low)
83	Düşük (Low)	84	Düşük (Low)	85	Düşük (Low)
151	Düşük (Low)	152	Düşük (Low)	153	Düşük (Low)
154	Düşük (Low)	155	Düşük (Low)		

Analiz edilen kombinasyon: RHA419 x OLIVA

Bu kombinasyona ait 5 F₂ bireyinden 5 tanesinin de LO içeriğine sahip olduğu KASP cihazının bağlı olduğu bilgisayarda görüntülenen aşağıdaki grafiğe (Şekil 3.3) göre belirlenmiş olup bu bireylerin oleik asit durumları **Tablo 3.6**'da ayrıca verilmiştir.



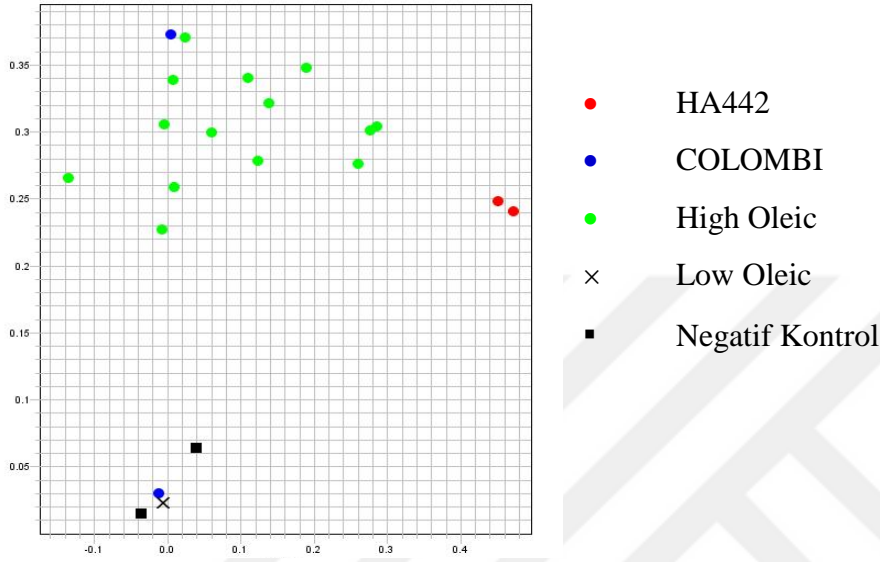
Şekil 3.3 KASP sonucunda elde edilen RHA419 x OLIVA kombinasyonuna ait grafik

Tablo 3.6 RHA419 x OLIVA kombinasyonuna ait F₂ bireylerinin oleik asit durumlarını (OAD) gösteren KASP analiz sonuçları

Örnek	OAD	Örnek	OAD	Örnek	OAD
RHA419	Yüksek (High)	OLIVA	Yüksek (High)	76	Düşük (Low)
77	Düşük (Low)	78	Düşük (Low)	79	Düşük (Low)
80	Düşük (Low)				

Analiz edilen kombinasyon: HA442 x COLOMBI

Bu kombinasyona ait 15 F₂ bireyinden 14 tanesinin HO, 1 tanesinin ise LO içeriğine sahip olduğu KASP cihazının bağlı olduğu bilgisayarda görüntülenen aşağıdaki grafiğe (Şekil 3.4) göre belirlenmiş olup bu bireylerin oleik asit durumları **Tablo 3.7**'de ayrıca verilmiştir.



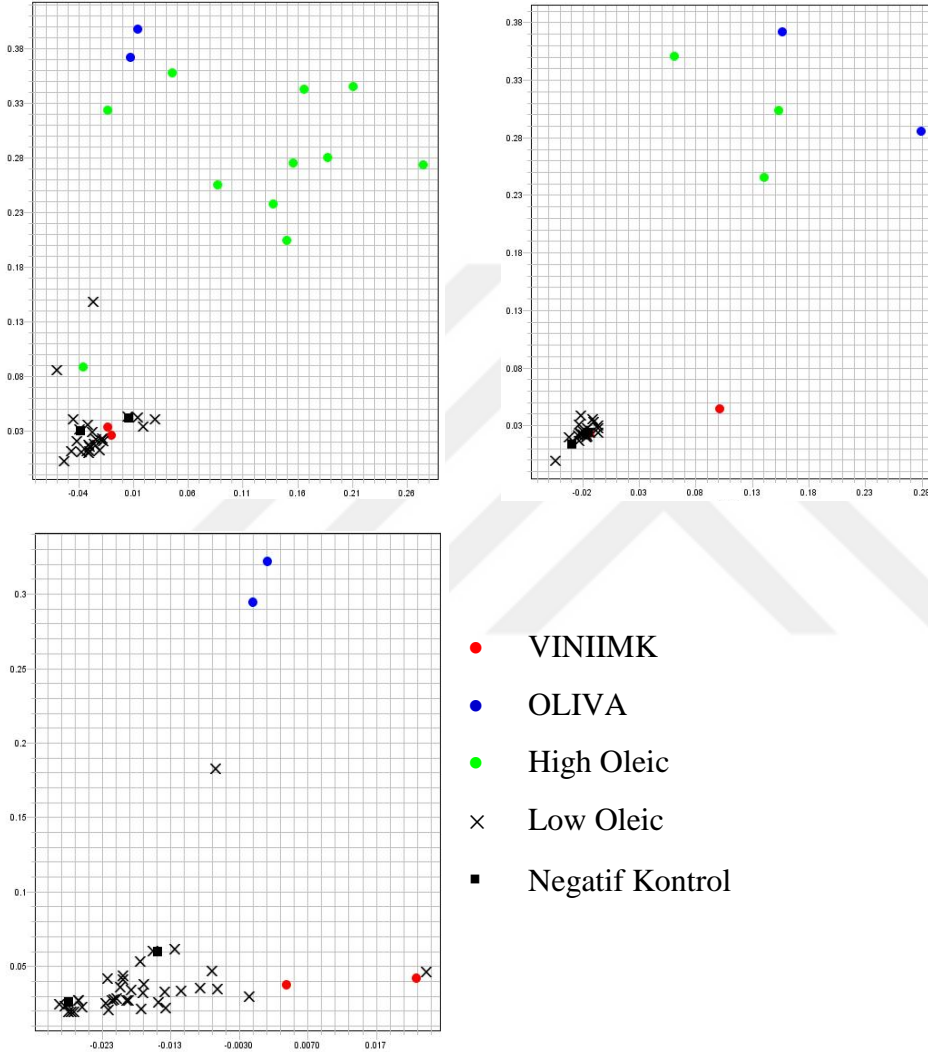
Şekil 3.4 KASP sonucunda elde edilen HA442 x COLOMBI kombinasyonuna ait grafik

Tablo 3.7 HA442 x COLOMBI kombinasyonuna ait F₂ bireylerinin oleik asit durumlarını (OAD) gösteren KASP analiz sonuçları

Örnek	OAD	Örnek	OAD	Örnek	OAD
HA442	Yüksek (High)	COLOMBI	Yüksek (High)	86	Yüksek (High)
87	Yüksek (High)	88	Yüksek (High)	89	Yüksek (High)
90	Yüksek (High)	91	Yüksek (High)	92	Yüksek (High)
93	Yüksek (High)	94	Yüksek (High)	95	Düşük (Low)
96	Yüksek (High)	97	Yüksek (High)	98	Yüksek (High)
99	Yüksek (High)	100	Yüksek (High)		

Analiz edilen kombinasyon: VINIIMK x OLIVA

Bu kombinasyona ait 95 F₂ bireyinden 81 tanesinin LO, 14 tanesinin ise HO içeriğine sahip olduğu KASP cihazının bağlı olduğu bilgisayarda görüntülenen aşağıdaki grafiklere (Şekil 3.5) göre belirlenmiş olup bu bireylerin oleik asit durumları **Tablo 3.8**'de ayrıca verilmiştir.



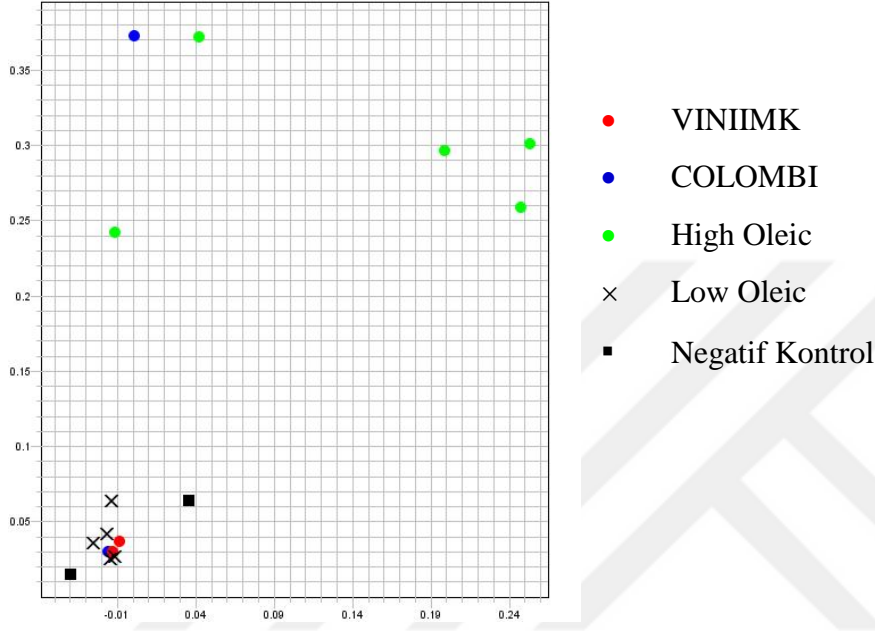
Şekil 3.5 KASP sonucunda elde edilen VINIIMK x OLIVA kombinasyonuna ait grafikler

Tablo 3.8 VINIIMK x OLIVA kombinasyonuna ait F₂ bireylerinin oleik asit durumlarını (OAD) gösteren KASP analiz sonuçları

Örnek	OAD	Örnek	OAD	Örnek	OAD
VINIIMK	Düşük (Low)	OLIVA	Yüksek (High)	101	Düşük (Low)
102	Düşük (Low)	103	Düşük (Low)	104	Düşük (Low)
105	Düşük (Low)	106	Düşük (Low)	107	Düşük (Low)
108	Düşük (Low)	109	Düşük (Low)	110	Düşük (Low)
111	Yüksek (High)	112	Düşük (Low)	113	Yüksek (High)
114	Yüksek (High)	115	Yüksek (High)	116	Düşük (Low)
117	Düşük (Low)	118	Düşük (Low)	119	Düşük (Low)
120	Düşük (Low)	121	Düşük (Low)	122	Düşük (Low)
123	Yüksek (High)	124	Yüksek (High)	125	Yüksek (High)
126	Düşük (Low)	127	Düşük (Low)	128	Düşük (Low)
129	Düşük (Low)	130	Düşük (Low)	131	Düşük (Low)
132	Yüksek (High)	133	Yüksek (High)	134	Yüksek (High)
135	Düşük (Low)	136	Yüksek (High)	141	Düşük (Low)
142	Düşük (Low)	143	Düşük (Low)	144	Düşük (Low)
145	Düşük (Low)	146	Düşük (Low)	147	Düşük (Low)
148	Düşük (Low)	149	Düşük (Low)	150	Düşük (Low)
151	Düşük (Low)	152	Düşük (Low)	153	Düşük (Low)
154	Düşük (Low)	156	Düşük (Low)	157	Düşük (Low)
158	Düşük (Low)	159	Düşük (Low)	160	Düşük (Low)
170	Düşük (Low)	171	Düşük (Low)	172	Düşük (Low)
173	Düşük (Low)	174	Düşük (Low)	175	Düşük (Low)
176	Düşük (Low)	177	Düşük (Low)	178	Düşük (Low)
179	Düşük (Low)	180	Düşük (Low)	181	Düşük (Low)
182	Düşük (Low)	183	Düşük (Low)	184	Düşük (Low)
185	Düşük (Low)	186	Düşük (Low)	187	Düşük (Low)
188	Düşük (Low)	189	Düşük (Low)	190	Düşük (Low)
191	Düşük (Low)	192	Düşük (Low)	193	Düşük (Low)
194	Düşük (Low)	195	Düşük (Low)	196	Düşük (Low)
197	Düşük (Low)	198	Düşük (Low)	199	Düşük (Low)
200	Düşük (Low)	201	Düşük (Low)	202	Düşük (Low)
203	Düşük (Low)	204	Düşük (Low)	205	Düşük (Low)
206	Düşük (Low)	207	Yüksek (High)	208	Yüksek (High)
209	Yüksek (High)	210	Düşük (Low)		

Analiz edilen kombinasyon: VINIIMK x COLOMBI

Bu kombinasyona ait 10 F₂ bireyinden 5 tanesinin HO, 5 tanesinin ise LO içeriğine sahip olduğu KASP cihazının bağlı olduğu bilgisayarda görüntülenen aşağıdaki grafiğe (Şekil 3.6) göre belirlenmiş olup bu bireylerin oleik asit durumları **Tablo 3.9**'da ayrıca verilmiştir.



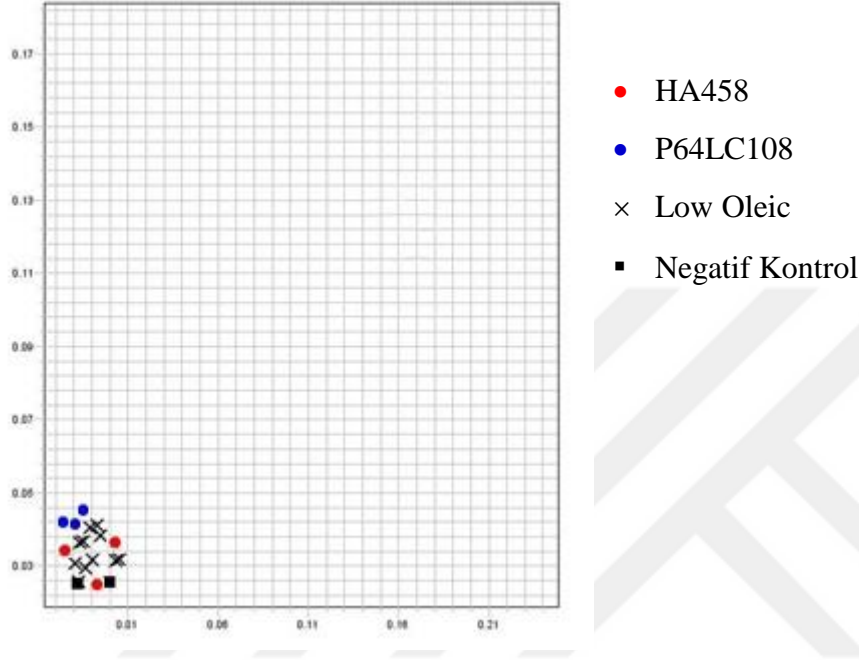
Şekil 3.6 KASP sonucunda elde edilen VINIIMK x COLOMBI kombinasyonuna ait grafik

Tablo 3.9 VINIIMK x COLOMBI kombinasyonuna ait F₂ bireylerinin oleik asit durumlarını (OAD) gösteren KASP analiz sonuçları

Örnek	OAD	Örnek	OAD	Örnek	OAD
VINIIMK	Düşük (Low)	COLOMBI	Yüksek (High)	161	Düşük (Low)
162	Düşük (Low)	163	Düşük (Low)	164	Düşük (Low)
165	Düşük (Low)	166	Yüksek (High)	167	Yüksek (High)
168	Yüksek (High)	169	Yüksek (High)	170	Yüksek (High)

Analiz edilen kombinasyon: HA458 x P64LC108

Bu kombinasyona ait 10 F₂ bireyinden 10 tanesinin de LO içeriğine sahip olduğu KASP cihazının bağlı olduğu bilgisayarda görüntülenen aşağıdaki grafiğe (Şekil 3.7) göre belirlenmiş olup bu bireylerin oleik asit durumları **Tablo 3.10**'da ayrıca verilmiştir.



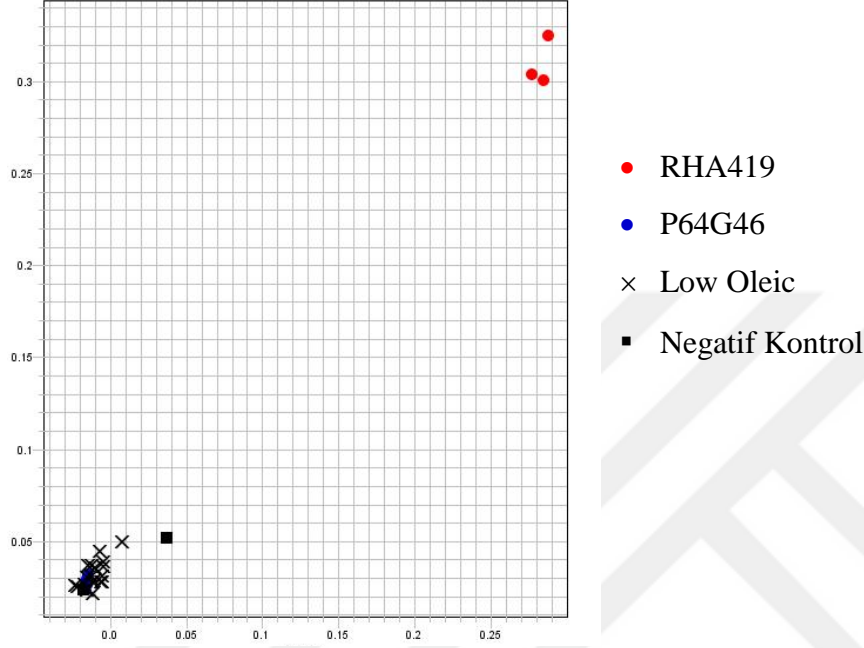
Şekil 3.7 KASP sonucunda elde edilen HA458 x P64LC108 kombinasyonuna ait grafik

Tablo 3.10 HA458 x P64LC108 kombinasyonuna ait F₂ bireylerinin oleik asit durumlarını (OAD) gösteren KASP analiz sonuçları

Örnek	OAD	Örnek	OAD	Örnek	OAD
HA458	Düşük (Low)	P64LC108	Düşük (Low)	21	Düşük (Low)
22	Düşük (Low)	23	Düşük (Low)	24	Düşük (Low)
25	Düşük (Low)	26	Düşük (Low)	27	Düşük (Low)
28	Düşük (Low)	29	Düşük (Low)	30	Düşük (Low)

Analiz edilen kombinasyon: RHA419 x P64G46

Bu kombinasyona ait 19 F₂ bireyinden 19 tanesinin de LO içeriğine sahip olduğu KASP cihazının bağlı olduğu bilgisayarda görüntülenen aşağıdaki grafiğe (Şekil 3.8) göre belirlenmiş olup bu bireylerin oleik asit durumları **Tablo 3.11**'de ayrıca verilmiştir.



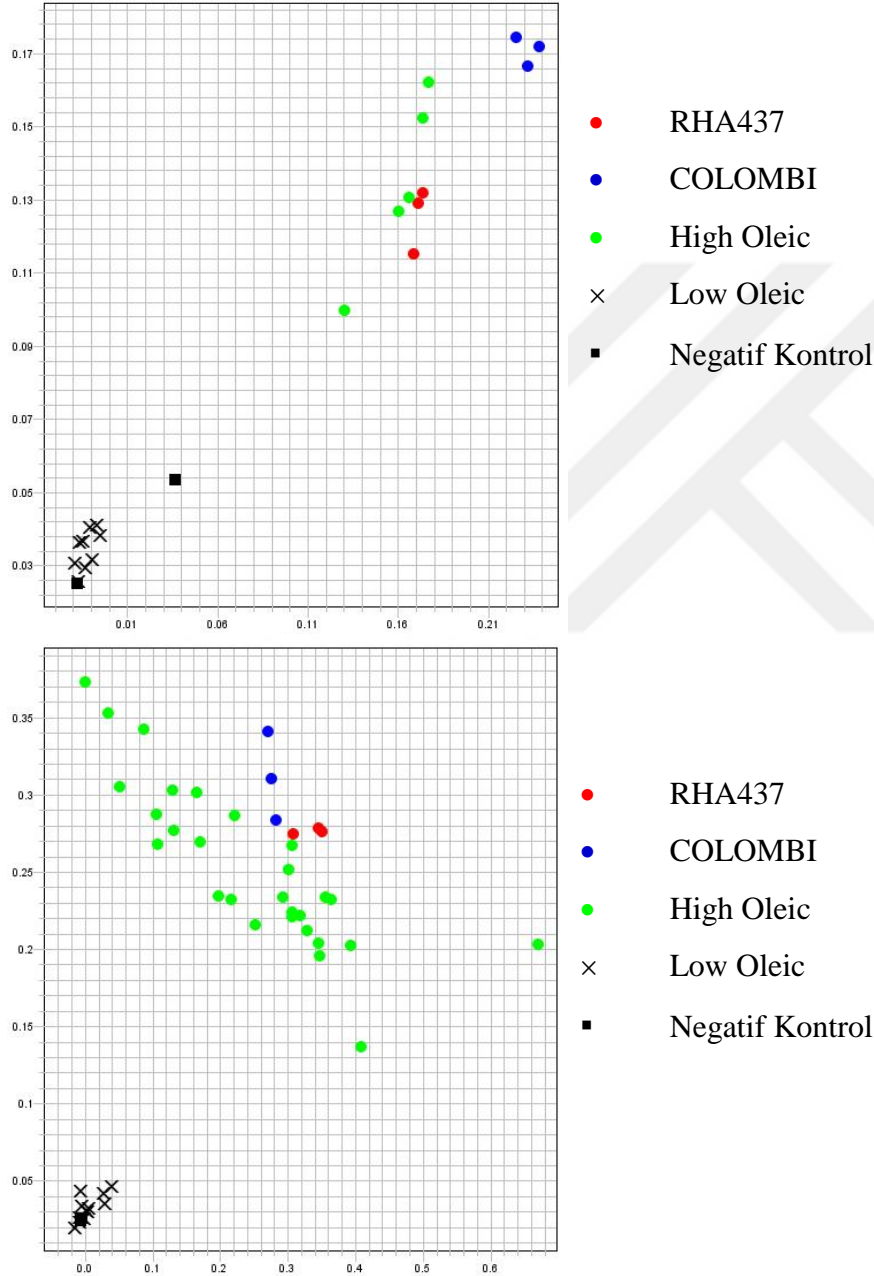
Şekil 3.8 KASP sonucunda elde edilen RHA419 x P64G46 kombinasyonuna ait grafik

Tablo 3.11 RHA419 x P64G46 kombinasyonuna ait F₂ bireylerinin oleik asit durumlarını gösteren KASP analiz sonuçları

Örnek	OAD	Örnek	OAD	Örnek	OAD
RHA419	Yüksek (High)	P64G46	Düşük (Low)	61	Düşük (Low)
66	Düşük (Low)	67	Düşük (Low)	68	Düşük (Low)
69	Düşük (Low)	70	Düşük (Low)	76	Düşük (Low)
77	Düşük (Low)	78	Düşük (Low)	181	Düşük (Low)
182	Düşük (Low)	183	Düşük (Low)	184	Düşük (Low)
185	Düşük (Low)	186	Düşük (Low)	187	Düşük (Low)
188	Düşük (Low)	189	Düşük (Low)	190	Düşük (Low)

Analiz edilen kombinasyon: RHA437 x COLOMBI

Bu kombinasyona ait 54 F₂ bireyinden 33 tanesinin HO, 21 tanesinin ise LO içeriğine sahip olduğu KASP cihazının bağlı olduğu bilgisayarda görüntülenen aşağıdaki grafiklere (Şekil 3.9) göre belirlenmiş olup bu bireylerin oleik asit durumları **Tablo 3.12**'de ayrıca verilmiştir.



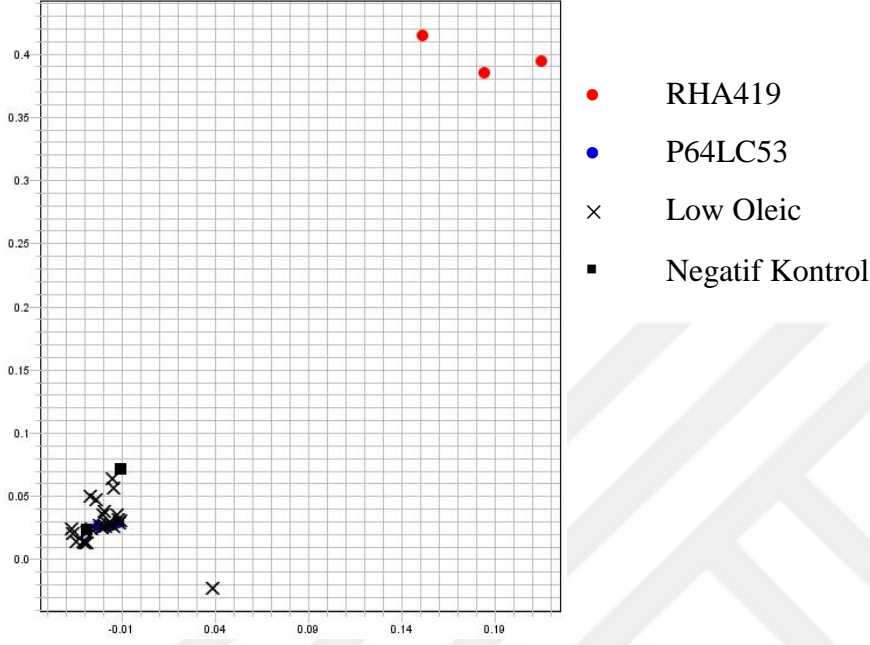
Şekil 3.9 KASP sonucunda elde edilen RHA437 x COLOMBI kombinasyonuna ait grafikler

Tablo 3.12 RHA437 x COLOMBI kombinasyonuna ait F₂ bireylerinin oleik asit durumlarını (OAD) gösteren KASP analiz sonuçları

Örnek	OAD	Örnek	OAD	Örnek	OAD
RHA437	Yüksek (High)	COLOMBI	Yüksek (High)	91	Yüksek (High)
92	Yüksek (High)	93	Yüksek (High)	94	Yüksek (High)
96	Yüksek (High)	97	Yüksek (High)	98	Yüksek (High)
99	Yüksek (High)	100	Yüksek (High)	101	Yüksek (High)
102	Yüksek (High)	103	Yüksek (High)	104	Yüksek (High)
105	Yüksek (High)	106	Yüksek (High)	107	Yüksek (High)
108	Yüksek (High)	109	Yüksek (High)	110	Yüksek (High)
111	Yüksek (High)	112	Yüksek (High)	113	Yüksek (High)
114	Yüksek (High)	115	Yüksek (High)	211	Düşük (Low)
212	Düşük (Low)	213	Düşük (Low)	214	Düşük (Low)
215	Düşük (Low)	216	Düşük (Low)	217	Düşük (Low)
218	Düşük (Low)	219	Düşük (Low)	220	Düşük (Low)
221	Yüksek (High)	222	Yüksek (High)	223	Düşük (Low)
224	Yüksek (High)	225	Yüksek (High)	226	Düşük (Low)
227	Düşük (Low)	228	Düşük (Low)	229	Düşük (Low)
230	Düşük (Low)	231	Düşük (Low)	232	Düşük (Low)
233	Düşük (Low)	234	Düşük (Low)	235	Düşük (Low)
241	Yüksek (High)	242	Yüksek (High)	243	Yüksek (High)
244	Yüksek (High)	245	Yüksek (High)		

Analiz edilen kombinasyon: RHA419 x P64LC53

Bu kombinasyona ait 25 F₂ bireyinden 25 tanesinin de LO içeriğine sahip olduğu KASP cihazının bağlı olduğu bilgisayarda görüntülenen aşağıdaki grafiğe (Şekil 3.10) göre belirlenmiş olup bu bireylerin oleik asit durumları **Tablo 3.13**'te ayrıca verilmiştir.



Şekil 3.10 KASP sonucunda elde edilen RHA419 x P64LC53 kombinasyonuna ait grafik

Tablo 3.13 RHA419 x P64LC53 kombinasyonuna ait F₂ bireylerinin oleik asit durumlarını (OAD) gösteren KASP analiz sonuçları

Örnek	OAD	Örnek	OAD	Örnek	OAD
RHA419	Yüksek (High)	P64LC53	Düşük (Low)	126	Düşük (Low)
127	Düşük (Low)	128	Düşük (Low)	129	Düşük (Low)
130	Düşük (Low)	131	Düşük (Low)	132	Düşük (Low)
133	Düşük (Low)	134	Düşük (Low)	135	Düşük (Low)
136	Düşük (Low)	137	Düşük (Low)	138	Düşük (Low)
139	Düşük (Low)	140	Düşük (Low)	141	Düşük (Low)
142	Düşük (Low)	143	Düşük (Low)	144	Düşük (Low)
145	Düşük (Low)	146	Düşük (Low)	147	Düşük (Low)
148	Düşük (Low)	149	Düşük (Low)	150	Düşük (Low)

9 farklı ebeveyn kombinasyonu ve bu kombinasyonlara ait toplam 248 F₂ bireyinin oleik asit durumlarına ait tüm bulgular değerlendirildiğinde OL2 primerinin 9 kombinasyondan 5'inde yüksek oleik asit içeriği için ayırt edici olduğu belirlenmiş olup bireylerinin oleik asit durumlarını (OAD) gösteren genel dağılım tablodaki gibidir.

Tablo 3.14 Tüm ebeveyn kombinasyonları ve bu kombinasyonlara ait F₂ bireylerinin oleik asit durumları (OAD)

Ebeveyn Kombinasyonları	F ₂ Sayısı	OAD (HO)	OAD (LO)
RHA419 x COLOMBI	15	5	10
RHA419 x OLIVA	5	0	5
HA442 x COLOMBI	15	14	1
VINIIMK x OLIVA	95	14	81
VINIIMK x COLOMBI	10	5	5
HA458 x P64LC108	10	0	10
RHA419 x P64G46	19	0	19
RHA437 x COLOMBI	54	33	21
RHA419 x P64LC53	25	0	25
Toplam	248	71	177

RHA419 x COLOMBI kombinasyonuna ait **15** adet F₂ bireyinden **5** tanesi yüksek, **10** tanesi düşük, **RHA419 x OLIVA** kombinasyonuna ait **5** adet F₂ bireyinden **5** tanesi düşük, **HA442 x COLOMBI** kombinasyonuna ait **15** adet F₂ bireyinden **14** tanesi yüksek, **1** tanesi düşük, **VINIIMK x OLIVA** kombinasyonuna ait **95** adet F₂ bireyinden **14** tanesi yüksek, **81** tanesi düşük, **VINIIMK x COLOMBI** kombinasyonuna ait **10** adet F₂ bireyinden **5** tanesi yüksek, **5** tanesi düşük, **HA458 x P64LC108** kombinasyonuna ait **10** adet F₂ bireyinden **10** tanesi düşük, **RHA419 x P64G46** kombinasyonuna ait **19** adet F₂ bireyinden **19** tanesi düşük, **RHA437 x COLOMBI** kombinasyonuna ait **54** adet F₂ bireyinden **33** tanesi yüksek, **21** tanesi düşük, **RHA419 x P64LC53** kombinasyonuna ait **25** adet F₂ bireyinden **25** tanesi düşük oleik asit içeriğine sahip olduğu gözlenmiştir.

Tilak ve arkadaşları çalışmalarında (2017), oleik asit ile bağlantılı olduğu bilinen *FAD2* gen bölgesindeki varyasyona dayalı 6 INDEL markörüyle ve literatürde yüksek oleik karakteriyle bağlantılı olduğu belirtilen 5 SSR markörüyle çalışmışlar ve çalışmalarının sonucunda (N1-3F/N1-3R) SSR'ı ile (F4/R1 ve F4/R2) INDEL DNA markörlerinin ayçiçeği genotiplerinde oleik asit için ayırt edici olduğunu bildirmişlerdir.

Bilgen ve arkadaşları (2018) yüksek oleik içerikli ayçiçeği genotiplerini belirlemek amacıyla dört SSR markörü kullanmışlar ve çalışmanın sonucunda üç SSR markörün yüksek oleik asit özellikli bireyleri ayırmada başarılı olduklarını göstermişlerdir. Ancak, Pervenet mutasyonu ile ilişkili insersiyon bölgesine özgü PZR primerlerinin SSR markörlerinden seçim için daha güvenilir olduğunu bildirmişlerdir.

Çolak ve arkadaşları çalışmalarında (2020), 6 INDEL markörüyle ve 3 SSR markörünü kullanmışlar ve çalışmalarının sonucunda yüksek oleik asit karakterini ayırt edebilen ve MAS için kullanılabilir 3 adet markör tespit etmişlerdir.

Ayçiçeği bitkisinde oleik asit içeriği durumlarının belirlenmesinin amaçlandığı bu çalışmada ise; SNP_OL_1C1, SNP_OL_1F1, SNP_OL_1F2, SNP_OL_2C1, SNP_OL_2N_F1, SNP_OL_2N_F2 primerleri kullanılarak KASP analizleri gerçekleştirildi ve kullanılan bu markörler sayesinde hangi bireylerin HO geni taşıyıp taşımadığı ve buna bağlı olarak da bireylerin yüksek oleik asit içerip içermediği SNP temelli KASP analiziyle başarılı bir şekilde belirlenerek ayırt edildi ve *FAD2* geninin mutasyonuna yani Pervenet mutasyonuna dayalı OL2 KASP primerleri ilk defa bu tez çalışmasında kullanıldı ve tohumculuk sektöründe kullanılacak ve *Helianthus annuus* L. ıslah programlarına fayda sağlayacak somut veriler elde edildi.

Bundan sonraki çalışmalarda da bu tezde kullanılan primerler kullanılarak oleik asit içeriğini belirlemek KASP analiziyle güvenilir ve hızlı bir şekilde mümkün olacaktır.

4. SONUÇLAR

Ayçiçeği, günümüzün en önemli yağ bitkilerinden birisidir. Ayçiçeği yağı yemeklik kalitesi ile tercih edilen bitkisel yağlar arasında ilk sıradadır. Ülkemizde ayçiçeği üretiminde genelde hibrit tohumluklar kullanılmakta olup, hibrit çeşitler, yüksek verim performansı, üstün kalite özellikleri, homojen görünümü, bazı hastalıklara ve orobanşa dayanıklı olmaları nedeniyle, üreticiler tarafından tercih edilmektedir. Bu nedenle ülkemizde ve dünyada ayçiçeğinde ıslah programları genelde, hibrit ıslahına yöneliktir. Bu ıslah programlarının hedefleri arasında yüksek tane verimi ve yağ oranı, dolayısıyla yüksek yağ verimi gibi arzulanan performansa sahip hibritlerin elde edilmesi yer almaktadır. Bu tez çalışmasında elde edilen veriler ışığında oleik asit içeriği yüksek yerli tohum üretimi için hayati öneme sahip anaçların KASP markörleri yardımıyla etkin seçimi, dolayısıyla hibrit çeşit eldesinde istenen tarımsal özellikler yönüyle doğru anaçların seçimine katkı sağlayacak nitelikte olması beklenmektedir.

Bu tezde, KASP analiziyle ayçiçeğinde yüksek oleik asit içeriği genleriyle ilişkili SNP markörleri kullanılarak yüksek oleik içeriğine sahip bireylerin diğer düşük oleik asit içeriğine sahip bireylerden ayırt edilebilmesi amaçlandı. Bu çalışmayla, kullanılan SNP markörlerinin KASP analizi için optimizasyonu sağlanmış olup tohumculuk sektöründe kullanabilecek ve ayçiçeği ıslah programlarına fayda sağlayacak somut veriler elde edildi. Yüksek oleik asit gen bölgelerine ait SNP markörleri kullanılarak gerçekleştirilen KASP analizi sonucunda yüksek oleik ve düşük oleik içeriğine sahip ebeveynlere ait F₂'ler oleik asit durum grafiklerinde değerlendirildi ve tüm ebeveynlerin kombinasyonlarına ait F₂'lerin oleik asit durumları tespit edildi. Ayçiçeğinde yüksek oleik asit içeriğine sahip bireylerin seçilmesi yıllar alan geleneksel yöntemlere kıyasla, bu tezde kullanılan KASP analizi sayesinde bu bireylerin seçilmesi daha hızlı ve daha güvenilir olarak gerçekleştirildi.

Ayçiçeği bitkisinde oleik asit içeriğinin KASP yöntemiyle belirlenmesi ilk defa gerçekleştirilerek elde edilen veriler ışığında yerli tohum üretimi için hayati öneme sahip anaç yetiştirme sürecini hızlandırıp ıslah çalışmalarını daha verimli hale getirmesi, moleküler markör kullanımını yaygın hale getirerek başka çalışmalara öncü olması ve ülkemizdeki buna bağlı olarak yapılan bitki ıslahı çalışmalarına kaliteli bir veri sunarak ülke ekonomisine katkıda bulunacağı öngörüldü.

KAYNAKLAR

1. Ahn S and Tanksley SD (1993), Comparative linkage maps of the rice and maize genomes Proceedings of the National Academy of Sciences, 90(17), 7980-7984.
2. Bailey D., Bailey K. (1929). An Etymological Dictionary of Chemistry and Mineralogy. Nature 124, 789–790
3. Barkley, N. A., Wang, M. L., & Pittman, R. N. (2011). A real-time PCR genotyping assay to detect FAD2A SNPs in peanuts (*Arachis hypogaea* L.). Electronic journal of biotechnology, 14(1), 9-10.
4. Bilgen, B. B., Evci, G., & Kaya, Y. (2018). Comparison of Different DNA Markers for Selection of High Oleic Type Sunflower Genotypes. In: Science Conference (p. 146).
5. Chhetri M, Bariana H, Wong D, Sohail Y, Hayden M, Bansal U (2017), Development of robust molecular markers for marker-assisted selection of leaf rust resistance gene Lr23 in common and durum wheat breeding programs, Mol Breeding 37: 21.
6. Çolak Ç., Hasançebi S., & Kaya Y. (2020). Ayçiçeğinde Yüksek Oleik Yağ Asidi Özelliğinin Moleküler Markörler Kullanılarak Belirlenmesi. ANADOLU Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Dergisi, 30(1), 57-68.
7. Dehmer, K.J. and Friedt, W. (1998). Development of molecular markers for high oleic acid content in sunflower (*Helianthus annuus* L.). Ind. Crop. Prod., 7, 311-315.
8. Devran, Z. (2003). Moleküler işaretleyicilerin dayanıklılık ıslahında kullanılması. Derim, 20(1), 1-6.
9. Doyle JJ, Doyle JL (1987). A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissues. Phytochem Bull 19: 11-15.
10. Dwivedi A, Sharma GN (2014). A Review on Heliotropism Plant: *Helianthus annuus* L.. The Journal of Phytopharmacology. 3(2): 149-155
11. Gascuel, Q., Diretto, G., Monforte, A. J., Fortes, A. M., & Granell, A. (2017). Use of Natural Diversity and Biotechnology to Increase the Quality and Nutritional Content of Tomato and Grape. Frontiers in Plant Science, 8.
12. Haddadi, P., Yazdi-Samadi, B., Langlade, N. B., Naghavi, M. R., Berger, M., Kalantari, A., ... & Sarrafi, A. (2010). Genetic control of protein, oil and fatty

- acids content under partial drought stress and late sowing conditions in sunflower (*Helianthus annuus*). African Journal of Biotechnology, 9(40), 6768-6782.
13. He C, Holme J, Anthony J (2014). SNP genotyping: the KASP assay. Methods Mol Biol 1145: 75-86.
 14. Hu J, Seiler G, Kole C (2010). Genetics, Genomics and Breeding of Sunflower. Boca Raton, FL, USA: CRC Press.
 15. Kim C, Guo H, Kong W, Chandnani R, Shuang LS, Paterson AH (2016). Application of genotyping by sequencing technology to a variety of crop breeding programs. Plant Sci 242: 14-22.
 16. Khera P, Upadhyaya HD, Pandey MK, Roorkiwal M, Sriswathi M, Janila P, Guo Y, McKain MR, Nagy ED, ... and Knapp SJ (2013), Single nucleotide polymorphism–based genetic diversity in the reference set of peanut (*Arachis spp.*) by developing and applying cost-effective competitive allele-specific polymerase chain reaction genotyping assays, Plant Genome 6. doi: 10.3835/plantgenome2013.06.0019.
 17. Kösoğlu K, Yumuk S, Aydın Y, Evci G, Altinkut Uncuoğlu A (2017) Turk J Agric For, 41: 480-489.
 18. Lai Z, Livingstone K, Zou Y, Church SA, Knapp SJ, Andrews J, Rieseberg LH (2005), Identification and mapping of SNPs from ESTs in sunflower, Theor Appl Genet 111: 1532-1544.
 19. Mammadov, J., Aggarwal, R., Buyyarapu, R., & Kumpatla, S. (2012). SNP markers and their impact on plant breeding. International journal of plant genomics, 2012.
 20. Mohsennia, O., & Jalilian, J. (2012). Response of safflower seed quality characteristics to different soil fertility systems and irrigation disruption. International Research Journal of Applied and Basic Sciences, 3(5), 968-976.
 21. Nagarathna TK, Shadakshari YG and Ramanappa TM (2011), Molecular analysis of sunflower (*Helianthus annuus* L.) genotypes for high oleic acid using microsatellite markers, Helia, 34: 63-68.
 22. Petros, Y., Carlsson, A. S., Stymne, S., Zeleke, H., Fält, A. S., & Merker, A. (2009). Developing high oleic acid in *Guizotia abyssinica* (Lf) Cass. by plant breeding. Plant breeding, 128(6), 691-695.

23. Rafalski JA (2002), Novel genetic mapping tools in plants: SNPs and LD-based approaches, *Plant science*, 162(3), 329-333.
24. Rauf S, Jamil N, Tariq SA, Khan M, Kausar M, Kaya Y (2017), Progress in modification of sunflower oil to expand its industrial value, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(7), 1997-2006.
25. Semagn K, Babu R, Hearne S, Olsen M (2014), Single nucleotide polymorphism genotyping using kompetitive allele-specific PCR (KASP): overview of the technology and its application in crop improvement, *Mol Breeding*, 33: 1-14.
26. Shi Z, Liu S, Noe J, Arelli P, Meksem K and Li Z (2015), SNP identification and marker assay development for high-throughput selection of soybean cyst nematode resistance, *BMC Genomics*, 16: 314.
27. Shirasawa, K., Koilkonda, P., Aoki, K., Hirakawa, H., Tabata, S., Watanabe, M., ... & Naito, Y. (2012). In silico polymorphism analysis for the development of simple sequence repeat and transposon markers and construction of linkage map in cultivated peanut. *BMC plant biology*, 12(1), 80.
28. Singchai A, Muangsan N and Machikowa T (2013), Evaluation of SSR markers associated with high oleic acid in sunflower, *Int. J. Biol. Food Vet. Agric. Eng.*, 7: 631-634.
29. Staub JE, Serquen FC and Gupta M (1996), Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding, *HortScience*, 31(5), 729-741.
30. Suresha, G. S., Rai, R. D., & Santha, I. M. (2012). Molecular cloning, expression analysis and growth temperature dependent regulation of a novel oleate desaturase gene ('fad2') homologue from 'Brassica juncea'. *Australian Journal of Crop Science*, 6(2), 296.
31. Şahin Z. N., Use of Kaspasay in Sex Determination of Pistacia (Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi, 2018; 15.)
32. Tan C-T, Assanga S, Zhang G, Rudd JC, Haley SD, Xue Q, Ibrahim A, Bai G, Zhang X, Byrne P, Fuentealba MP, Liu S (2017), Development and validation of KASP markers for wheat streak mosaic virus resistance gene *Wsm2*, *Crop Sci*, 57: 340-349.
33. Thomson MJ (2014). High-throughput SNP genotyping to accelerate crop improvement. *Plant Breed Biotechnol* 2: 195-212.

34. Tilak, I. S., Kisan, B., & Goud, I. S. (2017). Evaluation of SSR and INDEL markers associated with high and low oleic acid content in sunflower (*Helianthus annuus* L.) genotypes. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 6(5), 1560-1563.
35. Williams, J. G., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., & Tingey, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic acids research*, 18(22), 6531-6535.
36. Wilson, R. F. (2012). The role of genomics and biotechnology in achieving global food security for high-oleic vegetable oil. *Journal of oleo science*, 61(7), 357-367.

Web Siteleri

1. FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations data for 28.11.2020, www.fao.org
2. ITIS, Integrated Taxonomic Information System data for 23.12.2020, www.itis.gov
3. LGC Group data for 21.12.2020, www.lgcgroup.com
4. Raw Earth Colors data for 23.11.2020, www.rawearthcolors.com

ÖZGEÇMİŞ

1. **ADI SOYADI** : Muhammed BİLALOĞLU
2. **YABANCI DİL** : İngilizce
3. **EĞİTİM**

Derece	Alan / Program	Kurum	Mezuniyet Yılı	Diploma Notu
Yüksek Lisans	Biyoloji	Marmara Üniversitesi	2021	96.5
Lisans	Biyoloji	Marmara Üniversitesi	2018	80.1
Ortaöğretim	Fen Bilimleri	Şehremini Anadolu Lisesi	2010	71.56

4. YURT DIŞI DENEYİMİ

Erasmus

- Bölüm:** Biological Sciences and Biotechnologies
Kurum: Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia (İtalya)
Dersler: Biyokimya, Diyet Ürünleri, Genetik, Mikrobiyoloji
Dönem: Eylül 2015 – Şubat 2016

Youth Exchange

- Program:** Youth in Action
Proje: C.R.A.C.O.- Cool Rural Area, Centre of Opportunity (İtalya)
Kurum: European Commission (Avrupa Komisyonu)
Dönem: Eylül 2013

5. SERTİFİKALAR

Youthpass (Craco, Italy)

- Program:** Youth Exchanges
Proje Adı: “C.R.A.C.O.- Cool Rural Area, Centre of Opportunity”
Dönem: 20 Eylül 2013 - 29 Eylül 2013
Certificate ID: 6WBY-CFRR-FV5T-LQR4
<http://youthpass.eu/qualitycontrol/>

ZEISS İleri Mikroskopi Teknikleri Eğitimi, 25 Kasım 2019. Marmara Üniversitesi, İstanbul.

Marmara University Faculty of Engineering II. International Green Biotechnology Congress, 9-11 September 2019. Republic of Turkey, Presidency of State Archives, Ottoman Archives Congress Hallon. İstanbul.

XVI. Molecular Biology and Genetics Students' Winter School, 1-3 March 2019. İstanbul Üniversitesi, İstanbul.

III. Çevre ve Ekoloji Çalıştay, 11-13 Nisan 2017. Marmara Üniversitesi Biyoloji Bölümü, İstanbul.

Biyopolimerler ve Kullanım Alanları, Doç. Dr. Özkan DANIŞ, 10 Aralık 2016. Türkiye Kimya Derneği Genç Kimyacılar Platformu, İstanbul.

Biyogüvenlik ve Genetiği Değiştirilmiş Organizmalar, Doç. Dr. İbrahim İlker ÖZYİĞİT, 30 Nisan 2016. Türkiye Kimya Derneği Genç Kimyacılar Platformu, İstanbul.

6. YAYINLAR

6.1. Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitabında Basılan Bildiriler

Deniz Yeliz AKBAŞ, Ülgen SEVER, Buse DURSUN, Elif Gökçe TAŞKARA, **Muhammed BİLALOĞLU**, Yıldız AYDIN, Ahu ALTINKUT UNCUOĞLU. Comparative Analysis of Different in vitro Heavy Metal Contamination in Sunflower, International Agricultural, Biological and Life Science Conference, September 2-5, 2018, 552-557, Trakya Üniversitesi, Edirne, Türkiye. (Tam Metin Bildiri/Sözlü Sunum) (Yayın No:4754064)

Muhammed BİLALOĞLU, Ezgi ÇABUK ŞAHİN, Ahu ALTINKUT UNCUOĞLU, Yıldız AYDIN. Determination of Oleic Acid Content in Sunflower (*Helianthus annuus* L.) by KASP Markers, II. International Green Biotechnology Congress, Abstract Book, September 09-11, 2019, 29, Marmara Üniversitesi, İstanbul, Türkiye. (Poster)

7. BURSLAR

TÜBİTAK Bilim İnsanı Destek Programları Başkanlığı (BİDEB) 2210-C Yurt İçi Öncelikli Alanlar Yüksek Lisans Burs Programı 2019/1

8. İŞ DENEYİMLERİ

Üniversite-Sanayi İş Birliği Uzmanı (Haziran 2020 - Aralık 2020)

MİTTO (Marmara Üniversitesi İnovasyon ve Teknoloji Transfer Uygulama ve Araştırma Merkezi) bünyesinde yürütülen 1513 kodlu "TÜBİTAK Teknoloji Transfer Ofisleri Destekleme Programı Teknoloji Transfer Ofislerinin Hedef ve Performans Odaklı Desteklenmesi" projesinde Üniversite-Sanayi İş Birliği Uzmanı pozisyonunda görev aldım.

Üniversite-Sanayi İş Birliği Uzmanı (Aralık 2019)

MİTTO (Marmara Üniversitesi İnovasyon ve Teknoloji Transfer Uygulama ve Araştırma Merkezi) bünyesinde yürütülen 1601 kodlu "TÜBİTAK Yenilikçilik ve Girişimcilik Alanlarında Kapasite Artırılmasına Yönelik Destek Programı" kapsamında "Marmara Üniversitesi İnovasyon ve Teknoloji Transfer Uygulama ve Araştırma Merkezi Faaliyet Kapasitesinin Artırılması ve Uygulanması" projesinde Üniversite-Sanayi İş Birliği Uzmanı pozisyonunda görev aldım.

Face to Face Fundraiser (Temmuz 2015 - Eylül 2015)

Birleşmiş Milletler Genel Kurulu tarafından, çocuk haklarını korumak, çocukların temel gereksinimlerini karşılamak ve tam potansiyellerine ulaşmalarını sağlamak üzere görevlendirilmiş bir kuruluş olan UNICEF bünyesinde Face to Face Fundraiser pozisyonunda görev aldım.

9. GÖNÜLLÜ DENEYİMLER

YÜTİK - Yalova Üniversitesi Tiyatro Kulübü (2011 – 2014)

Yönetim kurulu üyesi ve oyuncu olarak görev aldım.

TEGV - Türkiye Eğitim Gönüllüleri Vakfı (2010 – 2011)

Çocukların kişisel gelişimine katkı sağlarken yaratıcılıklarına ve araştırmacı kişiliklerine destek olmayı amaçlayan Ateşböceği Gezici Öğrenim Birimi'nde gönüllü olarak bulundum.