

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



**YÜKSEK OLEİK ASİT İÇERİĞİNE SAHİP YERFISTIĞI (*Arachis hypogaea* L.)
HATLARININ GELİŞTİRİLMESİ VE MOLEKÜLER ISLAHI**

Mustafa POLAT

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TARLA BİTKİLERİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KASIM 2018

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



**YÜKSEK OLEİK ASİT İÇERİĞİNE SAHİP YERFISTIĞI (*Arachis hypogaea* L.)
HATLARININ GELİŞTİRİLMESİ VE MOLEKÜLER ISLAHI**

Mustafa POLAT

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TARLA BİTKİLERİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KASIM 2018

ANTALYA

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

**YÜKSEK OLEİK ASİT İÇERİĞİNE SAHİP YERFISTIĞI (*Arachis hypogaea* L.)
HATLARININ GELİŞTİRİLMESİ VE MOLEKÜLER ISLAHI**

**Mustafa POLAT
TARLA BİTKİLERİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Bu tez Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından FYL-2016-
2079 nolu proje ile desteklenmiştir.**

KASIM 2018

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**YÜKSEK OLEİK ASİT İÇERİĞİNE SAHİP YERFISTIĞI (*Arachis hypogaea* L.)
HATLARININ GELİŞTİRİLMESİ VE MOLEKÜLER ISLAHI**

Mustafa POLAT
TARLA BİTKİLERİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez 30/11/2018 tarihinde jüri tarafından Oybirliği/Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Bülent UZUN

Prof. Dr. Mehmet SİNCİK

Dr. Öğr. Üyesi Engin YOL

ÖZET

Yüksek oleik asit içeriğine sahip yerfıstığı (*Arachis hypogaea* L.) hatlarının geliştirilmesi ve moleküler ıslahı

Mustafa POLAT

Yüksek Lisans, Tarla Bitkileri

Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Bülent UZUN

Kasım 2018; 29 Sayfa

Yerfıstığı, yüksek oranda yağ, yağ asitleri ve protein içeren ve tüm dünyada talep gören önemli bir yağ bitkisidir. Genellikle tropik ve yarı tropik bölgelerde yoğun olarak yetiştirilen yerfıstığında yağ içeriğinin ve kalitesinin artırılması önemli ıslah amaçlarından biri olmuştur. Geleneksel ıslah çalışmaları ile ulaşılmak istenen bu amaca günümüzde yeni teknolojilerin entegrasyonu ile daha kısa sürede ve daha az iş gücü ve girdi ile ulaşabilmek mümkün hale gelmiştir. Bu çalışmada yüksek tohum verimine sahip olan NC-7 ve Florunner çeşitleri ile yüksek oleik asit içeriğine sahip HOG genotipinin karşılıklı (resiprokal) melezlemesi yapılmıştır. Melezleme sonrasında elde edilen generasyonlarda yüksek oleik asidi kontrol eden *ahFAD2A* ve *ahFAD2B* genlerindeki nokta mutasyonlar moleküler olarak takip edilmiştir. Melez materyallerde CAPS ve allel spesifik markerler olmak üzere iki farklı PCR temelli yöntem kullanılmıştır. Moleküler analizler sonucunda beklenen bant uzunluklarını veren F₁ melez aileleri seçilmiş ve bir sonraki generasyona iletirilmiştir. F₁ aşamasında yapılan marker analizi ile hangi kombinasyonların gerçek melez olduğu belirlenebilmiştir. F₂ generasyonunda seçilen bazı genotiplerin tohumlarından yağ eldesi sokselet kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ham yağ esterleştirildikten sonra gaz kromatografisinde kullanılmış ve seçilen F₂ bireylerinin yağ asitleri profili ortaya çıkarılmıştır. Seçilen F₂ bireylerinde oleik asit içeriği %44.0 ile 80.4 aralığında bulunmuştur. Ebeveynler hariç yağ asitleri analizi yapılan 14 F₂ bireyi içerisinden; 2-1 (%70.5), 2-31 (%78.8), 3-6 (%80.3) ve en yüksek oleik asit miktarına sahip 3-7 (%80.4) genotipleri elde edilmiştir.

ANAHTAR KELİMELER: *Arachis hypogaea* L., *ahFAD2A*, *ahFAD2B*, moleküler ıslah, Moleküler marker

JÜRİ: Prof. Dr.Bülent UZUN

Prof. Dr. Mehmet SİNCİK

Dr. Öğr. Üyesi Engin YOL

ABSTRACT

Development and molecular breeding of high oleic acid groundnut (*Arachis hypogaea* L.) lines

Mustafa POLAT

MSc Thesis in Department of Field Crops

Supervisor: Prof. Dr. Bülent UZUN

November 2018; 29 pages

Groundnut is an important oilseed crop worldwide with high oil and protein content and fatty acids. It is usually grown throughout tropical and sub-tropical regions. Oil content and quality improvement of groundnut is one of the most important breeding targets. Integration of new technologies into conventional breeding makes the breeding process shorter, reduces the labour and the inputs. In this study, the genotype HOG with high oleic acid was crossed with high yielding varieties NC-7 and Florunner reciprocally. The genes controlling high oleic acid (*ahFAD2A* and *ahFAD2B*) were screened in hybrids with molecular markers after hybridization. Analyses were conducted using two different PCR based approach, CAPS marker with restriction enzymes and AS-PCR. Hybrids showing the expected bands were selected and advanced to F₂ generation. The true hybrids could be determined by the use of these molecular markers. Genotypes with high oleic acid character were selected among 95 progenies in F₂. Selected F₂ seeds were also subjected to oil content and fatty acid analyses to display their values. Oil content and fatty acid analyses were done by using soxhelet apparatus and gas chromatography, respectively. The results indicated that several F₂ individuals were of 70% or higher oleic acid ratio such as 2-1 (70.5%), 2-31 (78.8%), 3-6 (80.3%) and 3-7 (80.4%).

KEYWORDS: *Arachis hypogaea* L., *ahFAD2A*, *ahFAD2B*, Molecular breeding, Molecular markers

COMMITTEE: Prof. Dr. Bülent UZUN

Prof. Dr. Mehmet SİNCİK

Asst. Prof. Dr. Engin YOL

ÖNSÖZ

Yerfıstığı, gerek zengin besin içeriği, gerekse toprak üstü aksamın hayvan yemi olarak kullanılabilmesi ve köklerindeki bakterilerden dolayı toprağa azot kazandırması açısından önemli bir yağ bitkisidir. Tohumlarından elde edilen yağ çok yüksek sıcaklıklara dayanabildiğinden dolayı dünya hazır yemek sanayinde kızartmalarda tercih edilebilmektedir. Ülkemizde ise yağ üretim maliyetinin yüksek olması nedeniyle yerfıstığı yağlık olarak üretilmemektedir. Yerfıstığı tohumları çoğunlukla çerezlik olarak tüketilmekte olup çikolata endüstrisinden de talep görmektedir. Ülkemizde her sene yapılan milyarlarca dolar yağ ve yağlı tohum ithalatı göz önüne alındığında yenilebilir her türlü yağlı tohuma gereksinim duyulmaktadır. Bu nedenle yerfıstığından yağ elde edilmesi ve kullanılması adına yüksek verimli ve kaliteli yağ içeriğine sahip yerfıstığı çeşitlerinin ıslah edilmesi gerekmektedir. Geliştirilen bu çeşitlerin içerdiği yağ miktarı ve yağda bulunan doymamış yağ asitleri (özellikle oleik asit) yönünden yüksek olması beklenmektedir. Son yıllara baktığımızda ülkemizde yerfıstığı üretiminde iyi bir ivme kazandıığımız görölmektedir. Bu ivme ile birlikte oleik asidi yüksek yerfıstığı üretimi de oluşturulmalı, yaygınlaştırılmalı ve artırılmalıdır. Bu çalışmada özellikle ülkemiz gıda endüstrisinin talep ettiği ve halen ithal ettiği yüksek oleik asitli yerfıstığı çeşit(ler)inin geliştirilmesine yönelik ıslah programı başlatılmış olup ve önemli düzeyde mesafe alınmıştır.

Lisans eğitimime başladığım andan itibaren bu noktaya gelmemde büyük katkısı olan ve çalışmamda yardımlarını ve desteğini esirgemeyen, bilgi ve tecrübelerini paylaşan ve bana örnek bir bilim insanı olan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Bülent UZUN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez savunma sınavımda yer alarak beni destekleyen, değerli paylaşımları ve önerileri ile tezime değer katan sayın Prof. Dr. Mehmet SİNCİK'e en içten dileklerle teşekkür ederim.

Gerek yerfıstığı konusunda gerekse moleküler konularda bilgi ve tecrübesiyle tezime büyük katkı sağlayan ve tez jürisinde yer alarak beni onurlandıran sayın Dr. Öğr. Üye. Engin YOL'a teşekkürü bir borç bilir ayrıca laboratuvar kapılarını bizlere sonuna kadar açan ve tüm moleküler bilgisini tereddüt etmeden bizlerle paylaşan çok değerli Sayın Dr. Öğr. Üye. Cengiz İKTEN'e teşekkür ederim.

Ayrıca birim imkânlarından yararlandığım Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü ile Tohumculuk ve Tarımsal Biyoteknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezine, bu çalışmayı maddi olarak destekleyen Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Koordinasyon Birimine ve desteklerini esirgemeyen Arş. Gör. Rüstem ÜSTÜN'e, Arş. Gör. Birgül GÜDEN'e ve Ziraat Yüksek Mühendisi Volkan GÜÇLÜ'ye teşekkürlerimi sunarım. Her daim arkamda olan annem, babam ve kardeşlerime çok teşekkür ederim.

Bu tezi destekleyen Antalya Ticaret ve Sanayi Odasına (ATSO) ayrıca teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ.....	iii
AKADEMİK BEYAN.....	v
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK TARAMASI.....	4
3. MATERYAL VE METOT.....	8
3.1. Materyal.....	8
3.1.1. Deneme yeri.....	8
3.1.2. Denemede kullanılan toprağın yapısı.....	8
3.1.3. Genetik materyal.....	8
3.2. Metot.....	9
3.2.1. Tohumların ekilmesi ve bakım işlemleri.....	9
3.2.2 Melezlemeler.....	10
3.2.3. Elde edilen melezlerin hasadı ve ekilmesi.....	13
3.2.4. DNA izolasyonu.....	13
3.2.5. Markerlerin belirlenmesi.....	15
3.2.6. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) analizleri.....	15
3.2.7. PCR programı.....	16
3.2.8. Elektroferez çözeltisi.....	17
3.2.9. Jelin hazırlanması.....	17
3.2.10. PCR ürünlerinin jele yüklenmesi ve elektroferez işlemi.....	18
3.2.11. Yağ ekstraksiyonu.....	18
4.BULGULAR VE TARTIŞMA.....	21
5.SONUÇLAR.....	29
6.KAYNAKLAR.....	30
ÖZGEÇMİŞ.....	35

AKADEMİK BEYAN

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Yüksek Oleik Asit İçeriğine Sahip Yerfıstığı (*Arachis hypogaea* L.) Hatlarının Geliştirilmesi ve Moleküler Islahı” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

30/11/2018

Mustafa POLAT



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

bp	Baz çifti
cm	Santimetre
°C	Santigrat derece
g	Gram
ha	Hektar
HCl	Hidrojen klorür
kg	Kilogram
L	Litre
ml	Mililitre
mM	Milimolar
µl	Mikrolitre
m	Metre
NaOCl	Sodyum hipoklorit
NaCl	Sodyum klorür
pH	Hidrojen gücü
ppm	Parts per million
µM	Mikromolar
RILs	Rekombinant inbred lines

Kısaltmalar

AS-PCR	Allel specific PCR- Allel özel polimeraz zincirleme tepkimesi
CTAB	Cetyl trimethylammonium bromide
DNA	Deoksiribonükleik asit
ahFAD2	Fatty acid desaturase 2
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations- Dünya Tarım Örgütü
GC	Gas chromatography
ISSR	Inter-simple sequence repeat- Basit dizi tekrarları arası
KASP	Kompetitive allele specific PCR
PCR	Polymerase chain reaction- Polimeraz zincirleme tepkimesi
QTL	Quantitative trait locus- Kantitatif karakter lokusu
RPM	Revolutions per minute- Dakikada devir sayısı
RAPD	Random amplified polymorphic DNA- Rastgele çoğaltılan DNA farklılığı
RT-PCR	Reverse Transcription PCR
SNP	Single nucleotide polymorphism – Tek nükleotid polimorfizmi
SSR	Simple sequence repeats- Basit dizi tekrarları
TBE	Tris Borate EDTA

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. 1. Alt türler ve pazar tipleri.....	1
Şekil 3. 1. (a) Sera denemelerinin yürütüldüğü alan, (b) moleküler analizlerin yapıldığı Moleküler Bitki Islahı Laboratuvarı	8
Şekil 3. 2. (a) Ekim işlemine ait görüntüler, (b,c) kırmızı örümcek ve zararı	10
Şekil 3. 3. (a) Emaskülasyon, (b) toz verilmiş çiçek, (c) ginefor oluşumu, (d) hasada gelmiş melez	12
Şekil 3. 4. (a) Melezlerin hasadı, (b) kurutulmuş melezler, (c) melezlerin viyole ekimi, (d) fidelerin şaşırtılması	13
Şekil 3. 5. (a) Genotiplerin bir bölümüne ait izolasyon ve (b) izolasyon sonrası agaroz jel görüntüsü	15
Şekil 3. 6. Çalışmada kullanılan PCR cihaz modelleri	16
Şekil 3. 7. Kullanılan elektroforez tankları	18
Şekil 3. 8. Kullanılan görüntüleme cihazı ve mikrodalga.....	18
Şekil 3. 9. Yağ ekstraksiyon cihazı (soксаlet)	19
Şekil 4. 1. FLORUNNER X HOG ve NC-7 X HOG F1lerinden kurulu PCR	25
Şekil 4. 2. NC-7 X HOG melezlemesinden elde edilen F ₁ genotiplerinin agaroz jeldeki görüntüsü.....	26
Şekil 4. 3. F ₂ generasyonundaki genotiplerin <i>ahFAD2B</i> markeri ile yapılan PCR analiz görüntüsü.....	27
Şekil 4. 4. Allel spesifik primerleri ile kurulan PCR'ın jel görüntüsü.....	27

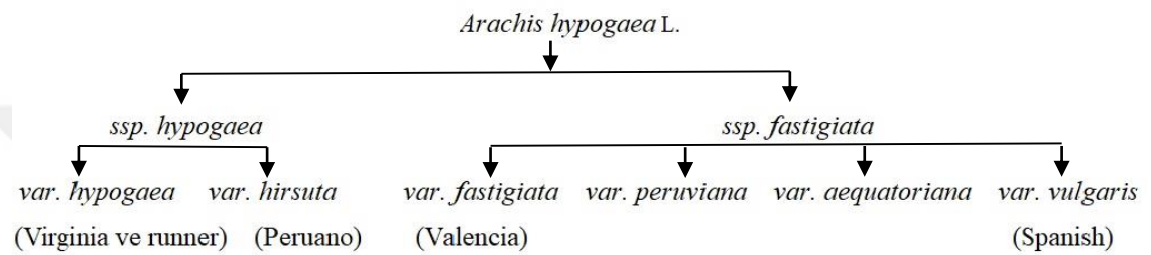
ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3. 1. Tez çalışmasında kullanılan genotipler ve özellikleri	9
Çizelge 3. 2. Kullanılan melezleme kombinasyonları	10
Çizelge 3. 3. Kullanılan moleküler markerler	15
Çizelge 3. 4. PCR karışımı için kullanılan kimyasallar ve oranları	16
Çizelge 3. 5. Yüksek oleik asit karakteri analizi için PCR programı	17
Çizelge 3. 6. Elektroferez çözeltisi kimyasalları	17
Çizelge 4. 1. İki numaralı hattan elde edilen F ₂ genotiplerinin yağ analizi	21
Çizelge 4. 2. Üç numaralı hattan elde edilen F ₂ genotiplerinin yağ analizi	22
Çizelge 4. 3. Yağ asidi(%) analizi yapılan örnekler (NC-7XHOG, yüksek oleik asit içerikleri koyu renk ile gösterilmiştir.)	24



1. GİRİŞ

Yerfıstığı (*Arachis hypogaea* L.) ($2n=4x=40$), baklagiller familyasında yer alan, tek yıllık, tetraploid bir kültür bitkisidir. Türün yer aldığı *Arachis* cinsi ayrıca içerisinde diploid, tetraploid ve anoploid diğer türleride barındırmaktadır (Holbrook ve Stalker 2003). Yerfıstığını diğer bitkilerden ayıran en büyük özellik çiçeklerini toprak üzerinde oluşturup, meyvelerini toprak altında oluşturmasıdır (Liao ve Holbrook 2007). *Arachis* cinsine ait birçok tür yenilebilir tohumları için yetiştirilmesine rağmen sadece kültürü yapılan yerfıstığı (*A. hypogaea* L.) tüm dünyada yayılmıştır. *A. hypogaea* L., taksonomik olarak ise dallanma biçimi ve baklaların ana dal ve yan dallarda dağılması durumuna göre iki alt türe ayrılmaktadır (Krapovickas ve Gregory 1994) (Şekil 1.1)



Şekil 1. 1. Alt türler ve pazar tipleri.

Yerfıstığı (*Arachis hypogaea* L.), dünyada 40° Kuzey ve 40° Güney enlemleri arasında, 100'den fazla ülkede tarımı yapılan önemli bir yağ ve protein bitkisidir (Liao ve Holbrook 2007). Yere dik olarak 30-60 cm boylanabilen yerfıstığı yere paralel olarak ise 40-50 cm uzayabilir (Kadiroğlu 2013). Yerfıstığı kazık köklü bir bitkidir ve kökün etrafında ana köke bağlı olarak çok sayıda yan kökler bulunur. Bu ana ve yan kökler üzerinde ise havanın serbest azotunu bağlayan *Rhizobium* bakterileri (nodül) bulunur. Bu nodüller baklagiller familyasındaki diğer bitkilerde olduğu gibi bitkinin azot ihtiyacını karşılarlar. Pinnat yaprak yapısına sahip olan yerfıstığı 2-5 cm uzunluğunda karşılıklı olarak yer alan iki çift yaprakçıktan oluşur (Porter 1997). Yaprakların şekilleri uzun ve oval olup yaprak renkleri açık yeşilden koyu yeşile doğru değişmektedir. Yaprakların üzeri ise hafif tüylüdür. Güneşe ve susuzluğa karşı duyarlı olan bu bitkiler, güneş battığında veya susuz kaldıklarında yaprakçıkları karşılıklı olarak kapanırlar. Tipik bir baklagil çiçeği yapısında olan yerfıstığının çiçekleri, yaprak koltuğundan çıkar ve her bir çiçekte de en dışta 5 adet çanak yaprağı, bunun içerisinde de 2 kayıkçık, 2 kanatçık ve 1 bayrak yaprağı bulunur. Taç yapraklarının ortasında ise 10 adet erkek organ ile 1 adet dişi organ vardır. Genellikle portakal sarısı renkte olan çiçekleri çeşitlere göre sarı, beyaz ve erguvan renkte de olabilirler. Çiçekler döllendikten sonra taç yaprakları dökülür. 10-12 gün sonra yumurtalığın altındaki doku hızla çoğalmaya başlar ve zamanla yumurtalığı çevreleyen doku ile birleşerek bir uzantı meydana gelir ve bu uzantıya ginofor adı verilir. Ginofor, anatomik olarak gövdeye benzemekle birlikte fonksiyonel olarak köke benzemektedir. Ginoforlar toprağa girdikten sonra 10 gün içerisinde embriyolar gelişerek kapsüller (meyve) oluşturmaya başlar ve çiçeklenmeden itibaren 60 gün içerisinde yerfıstığı kapsülleri olgunlaşır (Kadiroğlu 2013). Yerfıstığı bitkisinde 600-1000 adet arası

çiçek oluşur ve bunun sadece %60-75'i ginofor oluşturur. Oluşan bu ginoforların ise %8-23'ü kapsül meydana getirir ve her bir kapsülde de ortalama 1-4 arasında yerfıstığı tohumu bulunur. Çiçeklerin tozlanmasıyla oluşan ve uzayarak toprağa giren ginoforların uçlarında bulunan embriyolar, toprakta gelişerek meyveye dönüşür ve her meyve kabuğu içerisinde de tohumlar oluşmaya başlar. Kapsül adı verilen bu meyvelerde genellikle 2 adet tohum bulunur. Her tohumda da iki etli kotiledon ve kotiledonların iç ve alt orta noktasında embriyo bulunur. Embriyo, 4-5 adet yaprak taslaklarından (plumul), hipokotilden ve birincil kök taslağından (kökçük) oluşur. Çimlenmeyle birlikte embriyodaki yaprak taslaklarının gelişmesi sonucunda sap ve yapraklar meydana gelir. Hipokotil çimlenmeyle birlikte kök ile saplar arasındaki beyaz ve etli gövdeyi oluşturur. Çeşitlere göre yerfıstığı tohumlarının rengi, şekli ve iriliği gibi morfolojik özellikleri ile kimyasal içerikleri değişiklik gösterebilir. Tohum renkleri açık pembe, pembe, açık kırmızı, kırmızı, beyaz, mor, kahverengi renklerinde veya bunların farklı tonlarında olabilirler. Genellikle açık pembe veya açık kırmızı rengindedirler. Tohum şekilleri ise silindirik veya yuvarlak olabilir. Tohum uzunluğu 9-24 mm ve eni ise 6-14 mm arasındadır. Genellikle koyu renkli tohumlar proteince daha zengin olup, açık renkli tohumlar ise yağca daha zengindir. İçerik bakımından ise tohumlar yapılarında %45-56 oranında yağ ve %22-30 oranında protein (Savage ve Keenan 1994) ile birlikte mineraller, vitaminler, antioksidanlar (Bishi vd. 2015) ve birçok biyoaktif bileşen (Francisco ve Resurreccion 2008) gibi sağlıklı besinler içerir. Bu nedenle yerfıstığı tohumları çoğunlukla fıstık yağı ve fıstık ezmesi üretiminde değerlendirilen bir üründür (Norden 1980). Dünyada kızartma yağı olarak tercih edilmesinin sebebi ise yağının yüksek tutuşma ve yanma sıcaklığına sahip olmasıdır. Yerfıstığı yağı aynı zamanda yüksek oranda doymamış yağ asitlerini içermekte (oleik asit %40-65 arasında ve linoleik asit %20-40) ve yağında bulundurduğu antioksidanlar uzun raf ömrüne sahip olmasını sağlamaktadır. Yağı çıkarıldıktan sonra geriye kalan küspe ise çok değerli bir yem katkı maddesidir ve yapısında %45 ham protein, %24 azotsuz öz maddeler ve %5,5 madensel maddeler bulundurmaktadır. Ayrıca bazı ülkelerde yerfıstığının toprak üstü aksamı yeşil yem olarak hayvanlara yedirilir (Wan 2003). Kurutularak balya yapıp kışın hayvan yemi olarak da kullanılır. Yerfıstığından elde edilen ürünün 2-2,5 katı kadar kuru ot verimi elde edilir. Bu kuru otta %11 protein, %5 yağ, %22 ham selüloz, %42 azotsuz öz maddeler, %10 kül ve %10 su bulundurur. Bu özellikleri yerfıstığının hem ulusal hem de küresel pazarlarda ciddi değer görmesine neden olmaktadır (Pandey vd. 2012).

Tropikal ve subtropikal bölgelerde yetiştirilen yerfıstığı bitkisinin üretiminin %53'ü yemeklik yağ, %32'si yerfıstığı ezmesi ve çerez gibi gıda amaçlı, geri kalan %15'i ise hayvan yemi olarak kullanılmaktadır (Liao ve Holbrook 2007). Yerfıstığı, 2016 yılında dünyada tek yıllık yağ bitkileri arasında soya, kolza ve ayçiçeğinden sonra 27.66 milyon ha alanda 43.9 milyon tonluk üretim değeri ile en fazla ekiliş alanına sahip dördüncü yağlı tohum bitkidir (FAO 2016). Bu üretimin %90'dan fazlasını Asya ve Afrika ülkeleri gerçekleştirmektedir. Hindistan alan bakımından en fazla yerfıstığı ekilen ülke olmasına rağmen, Çin yaklaşık 17 milyon tonluk üretim ile dünya lideridir (FAO 2016). Bunun nedeni ise Çin'de polietilen film malçlama yöntemiyle yerfıstığı üretiminin yapılmasıdır (Wan 2003). Afrika kıtası yerfıstığı üretiminde önemli bir yere sahip olmasına rağmen, çeşitli nedenlerden dolayı birçok ülkede verim miktarları dekara yaklaşık 90 kg'dır (FAO 2016). Orta ve Güney Amerika bölgeleri ise toplam üretimin yaklaşık %3-4'ünü oluşturmaktadır ancak bu bölgelerde dekara alınan verim miktarı 200 kg'ın üzerindedir (Liao ve Holbrook 2007). Türkiye ise 33.32 bin ha alanda 164 bin

tonluk üretim değeri ile dünya yerfıstığı üretiminin ancak %0.37 gibi küçük bir dilimini karşılamaktadır (FAO 2016).

Tüketim amacına göre yerfıstığı çerezlik ve yağlık olmak üzere ikiye ayrılır. Çerezlik tiplerin iri taneli ve yüksek verimli olması ön plana çıkarken yağlık tipler ise içerdiği yağ miktarı ve yağ asidiyle ön plana çıkmaktadır. Yemeklik yağların kalitesi bakımından oleik (omega 9), linoleik (omega 6) ve linolenik (omega 3) yağ asitlerinin kompozisyonu oldukça önemlidir. Oleik ve linoleik asit bitkisel yağlarda çoğunlukla yüksek miktarlarda bulunmakla birlikte oksidatif stabilite özelliğine sahiptirler. Yüksek oleik/linoleik asit oranı bitkisel yağların oksidasyona daha dirençli, raf ömrü daha uzun ve tat gelişiminin daha olumlu olmasını sağlamaktadır (Baydar 2000). Bunun nedeni oleik asidin (C18:1) linoleik aside göre 10 kat (C18:2) linolenik aside (C18:3) göre ise 15 kat daha fazla oksidasyona dirençli olmasıdır. Bundan dolayı son yıllarda yağların oksidasyon ve termal kararlılıklarını artırmak için linoleik asit miktarı azaltılmakta, oleik asit miktarı ise arttırılmaktadır. Yağlı tohumların yağ asitleri kompozisyonu sürekli sabit olmayıp türlere özgü karakteristik farklılıklar gösterdiği gibi genetik, ekolojik, morfolojik, fizyolojik ve kültürel faktörlere bağlı olarak da değişebilmektedir. Yerfıstığında iki farklı gende (*ahFAD2A* ve *ahFAD2B*) meydana gelen nokta mutasyonlar yüksek oleik asit oluşumuna neden olmaktadır (Wang vd. 2011).

Yerfıstığında yağ asidi sentezi *ahFAD2A* ve *ahFAD2B* olmak üzere iki homolog gen tarafından kontrol edilmekte olup (Jung vd. 2000) delta-12-desaturaz enzimi oleik asit yapısında bulunan hidrokarbon zincirini çift bağ yaparak oleik asiti linoleik asite dönüştürmektedir. Yapılan çalışmalarda yerfıstığında yüksek oleik asit karakterinin bu iki gen bölgesinde yer alan nokta mutasyonlardan kaynaklandığı ifade edilmiştir (Chu vd. 2009). *ahFAD2A* gen bölgesinde 448G>A değişimi *ahFAD2B* gen bölgesinde 441. baza A bazının eklenmesiyle stop kodonun ortaya çıkması yüksek oleik asit karakterine neden olmaktadır (Bruner vd. 2001; Yu vd. 2008). Her iki FAD2 geninin moleküler teknolojiler yardımıyla belirlenebilmesi yüksek oleik asitli yerfıstığı geliştirme programlarında marker destekli seleksiyonun kullanımına olanak sağlamıştır. İstenilen bu özelliği aktarmada klasik metotların yanında moleküler teknikleri de dahil ederek yüksek oleik asitli çeşitlerin geliştirilmesi süreci oldukça kısaltmıştır.

Türkiye'nin artan yağ açığını kapatmak adına, birim alandan alınan yerfıstığı miktarını ve elde edilen ürünlerin yağ kalitesini ve yağ verimini artırılması gerekmektedir. Ürün miktarını arttırdığımız takdirde fiyatlar düşebilecek ve bu düşüş doğrultusunda bu ürünün yağlık özelliğini kullanmak söz konusu olacaktır. Bu nedenle yüksek tohum verimi ve yüksek yağ içeriğine sahip yerfıstığı tiplerinin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Yapılan bu çalışma ile birlikte sahip olduğumuz yüksek verimli ve dayanıklı çeşitlere yüksek oleik asit özelliğinin kazandırılması hedeflenmiştir.

2. KAYNAK TARAMASI

Yerfıstığı yağı içerdiği zengin yağ asitlerinden dolayı oksitlenmeyi ve bozulmayı önlediği için sanayi açısından çok değerlidir (Arıoğlu 1999). Yerfıstığı yağının içerdiği başlıca yağ asitleri; doymamış tekli yağ asitlerinden omega-9 ve çoklu doymamış yağ asitlerinden omega-6 ile palmitik asit (16:0), oleik asit (18:1) ve linoleik asit (18:2) olarak bilinir (Norden vd. 1987; Dean vd. 2009). Bu yağ asitlerinden en önemlisi oleik asittir. Yerfıstığı tohumlarından elde edilen yağın kalitesi, tadı ve oksidatif kararlılığı içerdiği yağ asitlerinin kompozisyonuna bağlıdır (López vd. 2000; Andersen ve Gorbet 2002). Yağlı tohumların yağ asitleri kompozisyonu hidrojenlenmeden dolayı sabit değildir (Chu vd. 2007b). Oleik asit, linoleik aside göre oldukça kararlıdır. Bundan dolayı yüksek oleik asit/linoleik asit oranı genellikle tercih edilir. Yüksek oleik asit içeren besinleri tüketen kişiler damar tıkanıklığında azalma (Yu vd. 2008) ve LDL kolesterol seviyesinde düşüş görülür (O'Byrne vd. 1997).

Yerfıstığı ıslah programlarında oleik asidi arttırmak adına oleik asidi kontrol eden genlerin bilinmesi oldukça önemlidir. Ve bu yağ asidi sentezi homolog iki gen olan *ahFAD2A* ve *ahFAD2B* tarafından sentezlenmektedir (Jung vd. 2000). Çalışmaların çoğu bu özelliğin iki genin basit kalıtımıyla kontrol edildiği bilinerek yapılmaktadır (Moore ve Knauff 1989). Yapılan çalışmalarda desaturaz enziminin oleik asidi linoleik aside dönüştürdüğü, *ahFAD2A* ve *ahFAD2B* homolog iki gen tarafından sentezlenip ve bu genlerin sırası ile A ve B genomu üzerinde bulunduğu belirlenmiştir. *ahFAD2A* ve *ahFAD2B* genleri doğal ve yapay mutasyonlar ile susturulabilen çekinik genler olduğu rapor edilmiştir (Patel vd. 2004).

Zhao vd. (2016) KASP markeri kullanarak yüksek oleik asitli Kainong176'dan yüksek verimli Huayu31'e bu özelliği kontrol eden homolog iki gen olan *ahFAD2A* ve *ahFAD2B* genlerindeki mutasyonları aktarmaya çalışmışlardır. KASP kullanılarak her iki mutant geninin varlığı tek işlemle tespit edilebilir. Araştırmacılar yapmış oldukları melezlemeler ile elde ettikleri çok sayıda ıslah materyali içerisinde aktarılmak istenen genlerdeki mutasyonların aktarılıp aktarılmadığını bu metodu kullanarak belirlemişlerdir. Elde edilen 179 BC₄F₂ genotipi içerisinde 18 genotipin aabb olduğu rapor edilmiştir. AAB normal yerfıstığı iken aabb yüksek oleik asitli yerfıstığı genotipidir.

Nawade vd. (2016) yapmış oldukları çalışmada materyal olarak Hindistan kökenli 167 genotip, 22 yabancı tip, 6 ileri ıslah hattı ve yüksek oleik asit içeriğine sahip SunOleic95R'i kullanmışlardır. Moleküler olarak AS-PCR, CAPS ve dizileme teknolojilerinin yer aldığı çalışmada *ahFAD2* allellerindeki polimorfizmi tespit etmek için 196 genotipin DNA'sını izole edip, PCR analizleri yaparak tüm materyalleri taramışlardır. Bu taramaya göre 30 genotipten oluşan set içerisinde 17 mutant ve 13 mutant olmayan genotip tespit edilmiş ve genotiplere özgü primer dizayn edilmiştir.

Janila vd. (2015) yağ kalitesini arttırmak için *ahFAD2A* ve *ahFAD2B* genlerindeki nokta mutasyonları SunOleic95R'den ICGV 06110, ICGV 06142 ve ICGV 06420 adlı üç genotipe aktarmaya çalışmışlardır. Bu aktarma için ICGV 06110 X SunOleic95R, ICGV 06142 X SunOleic95R ve ICGV 06420 X SunOleic95R olacak şekilde üç ayrı melezleme yapılmıştır. Elit genotipler ile yapmış oldukları geri melezlemeler ile 82 yakın izogenik hat elde etmişler ve bunları moleküler markerler ile taramışlardır. Üçlü melezlemeler sonucu toplamda 103 F₁ elde etmişlerdir. 103 F₁'i allellere özel primerlerle taramaları

sonucu aradıkları nokta mutasyonlarını 55 bireyde bulmuşlardır. Yapılan geri melezlemeler ve taramalar sonucunda oleik asit miktarının %62'den %82'ye çıktığı araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir.

Wang vd. (2014) yapmış oldukları çalışmada Rihua 1 ve Rosy Red adlı genotipleri melezleyerek elde ettikleri 180 adet F₂ ve ebeveynlerini NIRS kullanarak yağ asitlerini; genlere özel primer (aF19/R1 ve bF19/R2) kullanarak ise mutasyon varlığını belirlemişlerdir. Bu melezler içerisinde rastgele seçtikleri 20 genotipin PCR ve NIRS sonuçlarına göre 12 tanesinin oleik asit miktarının %72 ile %80.8 arasında olduğunu belirlenmiştir.

Yu vd. (2013) yapmış oldukları çalışmada daha önceden kendileri tarafından geliştirilen yüksek oleik asit karakterini kontrol eden genleri taşıyan FB4 ve CTWE genotipleri ile yüksek verimli bir çeşit olan Huayu-40 genotipini genetik materyal olarak kullanmışlardır. Huayu-40 X FB4 ve Huayu-40 X CTWE olacak şekilde yapılan melezlemeler sonucu rastgele seçilen (normal oleik X yüksek oleik asit) genotiplerden istenilen özelliğin aktarılıp aktarılmadığını kontrol etmek amacıyla AS-PCR yöntemi kullanılmıştır. Toplamda rastgele seçilen 86 genotipten AS-PCR ile 9 genotipin oleik asit miktarında yükselme olduğunu belirlemişlerdir.

Mienie vd. (2013) yapmış oldukları çalışmada Güney Afrika'da yetiştirilen yerfıstıklarının en büyük sıkıntısının üretilen yerfıstıklarının yağ oranı ve yağ kalitesi yönünden eksik olduğunu tespit etmişler ve bu eksikliği gidermeye yönelik bir çalışma yapmışlardır. Yerfıstığında yüksek oleik asit karakteri iki homolog (*ahFAD2A* ve *ahFAD2B*) oleo-pc desaturaz genine bağlı olduğu rapor edilmiştir. Bu karakteristiğe sahip yeni çeşitlerin ıslahı zaman alıcı ve pahalıdır. Çünkü her generasyon için yağ ve yüksek oleik/linoleik asit analizi yapmak gerekmektedir. Bu ıslah programında PCR kullanmak ve bu programa marker destekli seleksiyon (MAS) uygulamak zamanı ve maliyeti oldukça düşürmektedir. Mienie ve arkadaşları bu çalışmada yüksek oleik asit özelliğini taşıyan UF-85, Guat ve Atete, Güney Afrika çeşidi olan Akwa, Kwarts and Harts çeşitlerini kullanmışlardır. Yüksek oleik asit özelliğinin kalıtımı 4. döllere kadar izlenmiş ve tüm kombinasyonlar içerisinde homolog *ol2ol2* mutanları hariç iki gen bulunmuştur. En yüksek oleik asit yüzdesi bütün dördü mutan allellerde bulunmuştur (*ol1ol1ol2ol2*).

Singkham vd. (2012) yapmış oldukları çalışmada oleik asitçe zengin Georgia-02C ve Sunoleic-97R çeşitleri ile oleik asitçe düşük olan Kku1 çeşidini ebeveyn olarak kullanmışlardır. Virginia tipi yerfıstıklarında oleik asidi kontrol eden genler için olası genotip *O11O11ol2ol2*, *ol1ol1O12O12* ve *O11O11O12O12* (Isleib vd. 1996) olup, düşük orta seviyeli spanish tipi yerfıstıklarının genotipleri ise *O11O11ol2ol2* ve *ol1ol1O12O12*'dir (Lopez vd. 2001). Kendi aralarında yapılan melezlemeler ile P1, P2, F2, F3, BC11S ve BC12S kadar devam ettirmişlerdir. Bitkiler yeterli olgunluğa ulaşıncaya yağ asitleri analizi için hasat edilmiştir (Boote 1982). Yağ asitleri analizi için Bannon vd. (1982) tarafından belirlenen protokolü kullanmışlardır.

Mukri vd. (2012) ICRISAT mini koleksiyonunda (184 genotip, 85'i *hypogaea*, 1 *hirsuta*, 37 *fastigata*, 58 *vulgaris*, 1 *aequetorina* ve 2 *peruviana*) yüksek oleik asit karakterini belirleyebilmek için moleküler analizler yapmışlardır. Bu analizlerde FAD2

genleri için Chu vd. (2007) tarafından geliştirilen CAPS markerlerini kullanmışlardır. Bu koleksiyon içerisindeki genotiplerin oleik asit miktarı %33,60 ile %73,54 arasında çalışma sonucunda belirlenmiştir. 95 genotip daha önce bulunan bu markerla test edilip ve 30 tanesinde mutant alleler tespit etmişlerdir. Yapılan bu çalışma ile ICG 2381 isimli genotipin oleik asit miktarı %73.54'lük bir oranla en yüksek olarak bulunmuştur.

Fang vd. (2012) yüksek verimli Virginia tipi yerfıstığı tohumlarına EMS (Ethyl methanesulfonate) uygulayarak yüksek oleik asitli tohumlar elde etmeye çalışmışlardır. Elde edilen yerfıstığı tohumlarının yağ miktarı Wang vd. (2011) tarafından geliştirilen NIRS yöntemi ile belirlenirken yağ asidi miktarı (GC) gaz kromatografisi (Zeile vd. 1993) ile belirlenmiştir. Yapılan çalışma sonucunda %59'dan fazla oleik asit içeriği tespit edilmiştir. Yürütülen moleküler analizler ile *ahFAD2A* ve *ahFAD2B* gen bölgelerindeki nokta mutasyonlar ortaya konmuştur.

Sarvamangala vd. (2011) yapmış oldukları çalışmada; F9:F10 generasyonlarında TG26 X GPBD4' ün melezlenmesinden elde edilen 146 rekombinant kendilenmiş hattı (RILs) genetik materyal olarak kullanmışlardır. Bu çalışmada kullanılan TG26 spanish grubundan ve bu çeşit yarı cücelik, dik ve yüksek pod büyüme, oranı hasat indeksi yüksek, kapsüllerde daha fazla bölme oluşturma ve yüksek oleik asit gibi önemli özelliklere sahip iken pas ve geç yaprak lekesine hassastır (Kale vd. 1997; Badigannavar vd. 2002). GPBD4, UAS Dharwad da geliştirilmiş bir spanish yerfıstığı ve bu çeşit Karnataka ve Hindistan'ın güneyinde popüler olarak yetiştirilmektedir (Gowda vd. 2002). Erken olgunlaşma yüksek verim yüksek yağ ve protein içeriği ve optimum oleik asit / linoleik asit oranı ve geç yaprak lekesine ve pasa karşı dayanıklıdır. TG26 X GPBD4'dan elde 146 RIL üzerinde yapılan analizde genotip x çevre etkileşimi ile tüm özellikler için yüksek kalıtsallık gözlemlenmiştir.

Wang vd. (2011) yapmış oldukları bir çalışmada 55 adet yerfıstığı hattını yağ asitleri içeriği bakımından analiz etmişlerdir. Bu genotipleri FAD2 genlerindeki nokta mutasyonları belirleyebilmek için real-time PCR cihazını kullanmışlardır. Bu genotipler içerisinde 1,23 ila 56,45 arasında oleik asit/linoleik asit oranlarını bulmuşlardır. FAD2 geni mutasyonu açısından yabancı tip (*O11O11O12O12*), A genomunda homozigot mutasyon (*o11o11O12O12*), B genomunda homozigot mutasyon (*O11O11o12o12*), A ve B genomları duble mutasyon (*o11o11o12o12*) olan 4 genotip belirlemiştir.

Chen vd. (2010) yerfıstığında A ve B genomlarında yüksek oleik asiti kontrol eden genlerdeki mutasyonları belirleyebilmek için allel spesifik primer geliştirme çalışmasını ele almışlardır. Analizler için 4 grup ve her grupta ise 4 genotipten oluşan bir varyasyon kullanmışlardır. Bu gruplar; yabancı tip, sadece A ve sadece B genomunda mutasyon taşıyanlar ve dördüncü grupta ise hem A hem de B genomunda mutasyon içeren genotipleri kullanılmıştır. Yapılan çalışma sonrası F435-Forward ve 5F435IC-Reverse, F435WT-Reverse, F435SUB-Reverse ve F435INS-Reverse primerleri yüksek oleik asitli genotipleri belirleme de kullanılabilirliği ifade edilmiştir.

Jung vd. (2000) yapmış oldukları çalışmada normal oleik asit içeriğine sahip F78-1339, AT108 ve GK7 genotipleri ile yüksek oleik asit içeriğine sahip M2-225 ve 8-2122 genotiplerini genetik materyal olarak kullanmışlardır. RT-PCR kullanılarak *ahFAD2A* geninde nokta mutasyonlar taranmış ve tüm genotipler içerisinde bu gendeki nokta mutasyonun olduğunu belirlemiştir. *ahFAD2B* geni için yapılan moleküler analizlerin

sonucuna göre ise sadece yüksek oleik asit içeriğine sahip genotiplerde nokta mutasyona rastlanmıştır.

López vd. (2000a) yerfıstığında yüksek oleik asit ile ilgili yapmış oldukları çalışmada T-90'ı (Tampsman 90) (Smith vd.1991) ve F435'i (Norden vd. 1987) ebeveyn olarak kullanmışlardır. Düşük veya yüksek oleik asit içeriğine sahip Tamspan 90 ve F435-2-2'den delta-12 desaturaz geni izole edilmiş ve yaklaşık olarak her iki genotipten 3225 bp uzunluğunda bir bölge elde edilmiştir. Araştırmacılar dizileme sonrası yüksek ve düşük oleik asidi kontrol eden iki (SNP) polimorfizm bulmuşlardır.

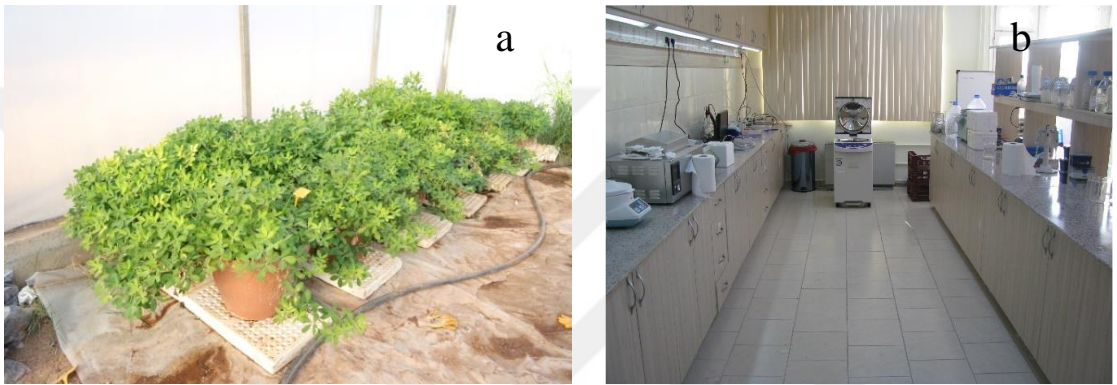
Chu vd. (2009) yapmış oldukları çalışmada (Georgia-02C'_2006_19G, Georgia-02C_2006_88LS, Georgia-02C_2006_Border, Georgia-02C_2007_12, Georgia-02C_2007_Brenneman, Georgia-02C_Plains, Georgia Hi-O/L, Georgia-05E, Florida-07, SunOleic 97R, Hull, Andru II, C458, Georgia Green) çeşitlerini genetik materyal olarak ele almışlardır. Her bir çeşitten elde edilen DNA örnekleri kullanılarak moleküler analizler yürütülmüştür. CAPS markerlerinin yer aldığı PCR sonrası klonlama ve sekanslama işlemleri yürütülmüş ve *ahFAD2A* bölgesinde Hpy99I restriksiyon enzimi kullanılarak nokta mutasyonunun belirlenebileceği ifade edilmiştir. *ahFAD2B* gen bölgesindeki mutasyon ise Hpy188I restriksiyon enzimi ile kesim sonrası belirlenebileceği ifade edilmiştir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Deneme yeri

Melezleme çalışmaları Akdeniz Üniversitesi Tohumculuk ve Tarımsal Biyoteknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi seralarında 35x52 cm ebatlarındaki saksılarda yürütülmüştür (Şekil 3.1.(a)). Moleküler analizler ise Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Moleküler Bitki Islahı Laboratuvarında yapılmıştır (Şekil 3.1.(b)).



Şekil 3. 1. (a) Sera denemelerinin yürütüldüğü alan, (b) moleküler analizlerin yapıldığı Moleküler Bitki Islahı Laboratuvarı

3.1.2. Denemede kullanılan toprağın yapısı

Denemede 1/1 oranında kırmızı tarla toprağı ve torf ile 1/4 oranında perlit karışımı kullanılmıştır. Kırmızı toprak Tohumculuk ve Tarımsal Biyoteknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi seralarının bulunduğu araziden alınmıştır. Saksılara hacimce eşit seviyelerde bu toprak karışımı eklenmiştir.

3.1.3. Genetik materyal

Yüksek oleik asit karakterini taşıyan (oleik asit içeriğı %80-85) ve yüksek verime sahip olan genotipler bu çalışmada genetik materyal olarak kullanılmıştır. Kullanılan genetik materyaller hakkında ayrıntılı bilgiye Çizelge 3.1’de yer verilmiştir.

Çizelge 3. 1. Tez çalışmasında kullanılan genotipler ve özellikleri

Hat/Çeşit	Pazar Tipi	Büyüme şekli	Yağ	Oleik Asit
NC-7	Virginia	Yarı yatık	%50	%50-55
HOG	Yüksek oleik asitli	Dik	%55	%80-85
FLORUNNER	Runner	Tam yatık	%50	%50-55

3.1.3.1 NC-7

Virginia pazar grubundan olan NC-7 yarı yatık büyüme formunda ve orta erkenci bir çeşittir. Kuzey Carolina üniversitesi (North Carolina State University (ABD) tarafından, 'Fla 393 x NC-5' in melezlenmesi sonucu olarak 1979 yılında tescil ettirilmiştir (Wynne vd., 1979). Türkiye'de ise Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü (BATEM) tarafından introdüksiyon ıslahı ile 1991 yılında tescil ettirilmiştir. Tohumları ortalama %50 yağ oranına sahip ve iri, açık pembe. Ülkemizde en yaygın ekilen çeşit olan NC-7, çerezlik olarak tüketilmektedir.

3.1.3.2. FLORUNNER

Runner pazar gurubundan olan bu çeşit tam yatık ve orta sap (dalda) meyve yoktur. Dallanma çok fazla ve bu dallar incedir. Boğum araları kısa, yaprakları yeşil ve koyu renktedir.

3.1.3.3. HOG

Küçük tohumları ve dik büyüme formuna sahip olan bu genotipin yağ miktarı %55 ve bu yağın %80-85'i oleik asittir. Bu özelliğinden dolayı yağlık bir çeşittir.

3.2. Metot**3.2.1. Tohumların ekilmesi ve bakım işlemleri**

Ekim işlemi 15-18 Mayıs 2015 tarihleri arasında hazırlanan toprak karışımlarının saksılara doldurulmasının ardından etiketlenip, her saksıya üçer tohum ekilmesiyle yapılmıştır (Şekil 3.2.(a)). Ekilen tohumlar 6-8 gün içerisinde çıkışlarını tamamladığı gözlemlenmiştir. Toprak devamlı nemli olacak şekilde günlük sulama yapılmıştır. Bitkilerin büyümesi ve havaların ısınmasıyla yapraklar üzerinde kırmızı örümcek zararı tespit edilmiştir (Şekil 3.2.(b,c)). Ticari ismi Arotork ve fenbutatin oxide (550g/l) etken maddeli ilaç ile uygulama yapılmıştır.



Şekil 3. 2. (a) Ekim işlemine ait görüntüler, (b,c) kırmızı örümcek ve zararı

3.2.2 Melezlemeler

Ülkemizin sahip olduğu yerfıstığı gen kaynaklarında şu ana kadar yüksek oleik asit karakterini taşıyan genotip bulunmamaktadır. Yurtdışından getirilen genotiplerle ülkemizde değer gören çeşitler melezlenmiş ve yüksek oleik içeriğine sahip genetik materyal oluşturma amacıyla bir melezlenme programı oluşturulmuştur. Ülkemizde en çok ekilen NC-7 (Virginia tipi) çeşidi ile Runner tip olan Florunner çeşidi melezlemelerde yer almıştır (Çizelge 3. 2).

Çizelge 3. 2. Kullanılan melezleme kombinasyonları

1.	NC-7	HOG
2.	HOG	NC-7
3.	Florunner	HOG
4.	HOG	Florunner

Melezlemeler Akdeniz Üniversitesi Tohumculuk ve Tarımsal Biyoteknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi seralarında 35x52 ebatlarındaki saksılarda yürütülmüştür. Toprak olarak torf perlit-vermikülit karışımı 3:1:1 oranında hazırlanmış ve kırmızı toprakla 1:1 oranında karıştırılarak kullanılmıştır. Ekim işlemi ise 15-18 Mayıs 2015 tarihlerinde yapılmıştır. Ekimden sonra yabancı ot çıkışlarına göre yabancı otların temizlenmesi için kültürel işlem gerçekleştirilmiştir.

Ekimden 6-8 gün sonra bitki çıkışları görülmüş, yaklaşık 30-35 gün sonra ise genotiplerde çiçeklenmeler başlamıştır. Tüm genotiplerde çiçeklenmenin ardından Nigam vd. (1990) tarafından uygulanan melezleme tekniği kullanılarak melezlemelere başlanmıştır. Yerfıstığına, çiçekler açılmadan önce tozlaşma başladığı için bitki çoğunlukla kendine tozlanır. Bunu önlemek amacıyla akşamüzeri çiçeklerdeki anterler pens yardımıyla alınarak bitkiler emasküle edilmiştir. Emaskülasyon işleminin ardından çiçekleri takip etmek amacıyla sert bir kablo ile etiketleme yapılmıştır. Tozlama işlemi ertesi gün sonra sabah erken saatlerde yapılmış olup anterler topluca çekilerek, tozlanacak çiçeğin stıgması üzerine sürülmüştür. Bu işlemin ardından yapılan her bir melez her gün takip edilmiş ve aynı bölgeden çiçek veya ginefor çıkmamasına dikkat edilmiştir. Yapılan melez eğer tutmuş yani çiçeklerde döllenme başarılı olmuş ise döllenmeden 10-12 gün sonra yumurtalığın altındaki doku hızla çoğalır ve zamanla yumurtalığı çevreleyen doku ile birleşerek bir uzantı (ginefor) meydana getirir. Eğer döllenme olmamışsa melezleme yapılan çiçek kurur ve kopar. Yapmış olduğumuz melezlemelerde genellikle başarılı sonuçlar sağlanmış ve gineforlar oluşmuştur (Şekil 3. 3.(d)). Gineforlar uzayarak toprağa girmişler ve 8-10 gün sonra kapsülleri oluşturmaya başlamışlardır.

Temmuz ayı sonlarına doğru bitkilerde çiçeklenme yavaşlamış ve böylelikle melezleme işlemi sona ermiştir. Eylül ayının sonlarına doğru bitkilerin yapraklarında sararmalar meydana gelmiş ve yapraklar dökülmeye başlamıştır. Ekim ayının başında ise hasat işlemi gerçekleştirilmiştir. Hasat için her saksı tek tek önce ters çevrilmiş ve ardından basınçlı su ile bitki kökü topraktan ayrılmıştır (Şekil 3. 4. (a)). Burada amaç tutan melezlerin etiketlerinin çıkmasını önlemektir.



Şekil 3. 3. (a) Emaskülasyon, (b) toz verilmiş çiçek, (c) ginefor oluşumu, (d) hasada gelmiş melez

3.2.3. Elde edilen melezlerin hasadı ve ekilmesi

Hasat olgunluğuna erişen tohumlar basınçlı su yardımı ile yıkanarak topraktan ayrıştırılmıştır (Şekil 3.4. (a)). Üzerine ebeveyn isimleri yazılan kese kağıtlarına konulup ardından kurutma fırınında kurutulup viyollere tohumların ekimi yapılmıştır (Şekil 3.4. (b),(c)). Yapılan moleküler analizler sonrasında arandılan bant uzunluklarına sahip olanlar (kendilemenin olmadığı başarılı melezler) saksılara ışırtılmıştır (Şekil 3.4. (d)).



Şekil 3. 4. (a) Melezlerin hasadı, (b) kurutulmuş melezler, (c) melezlerin viyole ekimi, (d) fidelerin ışırtılması

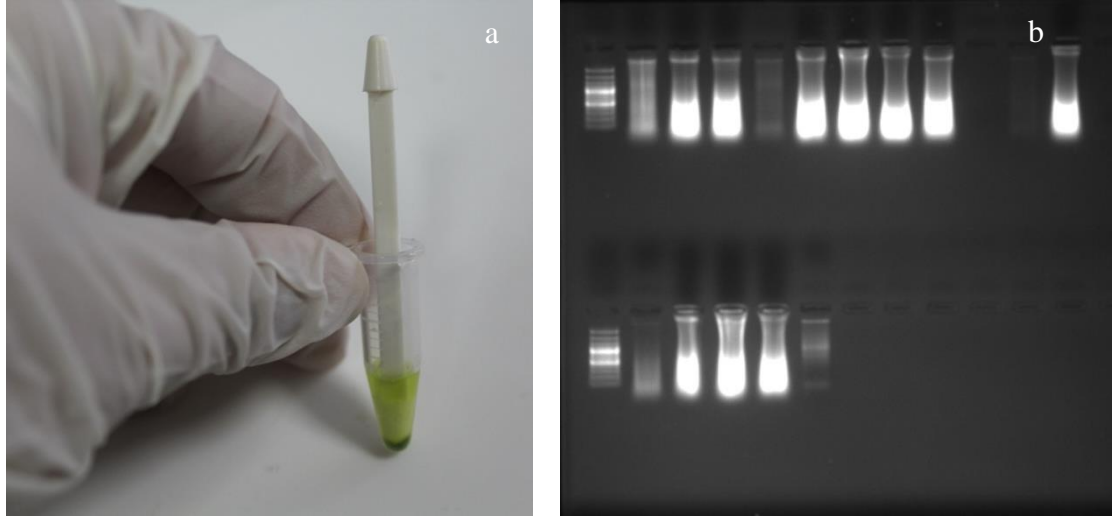
3.2.4. DNA izolasyonu

Ekilen melezlerden elde edilen fideler yeterli olgunluğa erişmesinin ardından her bir genotipten alınan genç yaprak örneklerinin Doyle ve Doyle (1990) tarafından geliştirilen CTAB metodu ile DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

CTAB metoduna göre (Doyle ve Doyle 1990);

1. Bulk olarak alınan eşit ağırlıktaki (Her bir bitki için ortalama 0.1 g) yaprak örnekleri 1.5 ml'lik ependorf tüplerin içerisine konulmuş ve üzerine 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. Daha sonra yapraklar ependorf tüp içerisinde rahatça hareket ettirilebilen plastik ezme çubukları (pestil) ile her tüp için farklı bir tane kullanılarak iyice ezilmiştir.
3. Ezme işleminin ardından DNA'larının sıvıya geçmesini sağlamak amacıyla önceden sıcaklığı 65 °C'ye ayarlanmış olan su banyosunda örnekler 3 saat inkübasyona bırakılmış ve her 15 dakikada bir hafifçe çalkalanmıştır.
4. İnkübasyondan sonra örneklerden proteinin uzaklaştırılması için 600 µl kloroform-izoamil alkol (24:1) çözeltisi ependorflara konularak 10 saniye kadar hafifçe ters düz edilerek çalkalanmıştır.
5. Bu işlemin ardından örnekler 20 dakika boyunca 14000 rpm hızında santrifüj edilmiştir. Santrifüj edilen örneklerde tüpün alt kısmında kloroform, orta tabakasında protein ve üst fazında ise DNA'nın bulunduğu sıvı olmak üzere üç ayrı faz görülmüştür. Tüpün içerisinde bulunan süpernatant kısım (üst faz) 1.5 ml'lik temiz tüplere alınmıştır (yaklaşık 300 µl). Bu safha daha temiz DNA izolasyonu için bir kez daha tekrarlanmış ve ikinci tekrarda yeni tüplere yaklaşık 150 µl üst faz çekilmiştir.
6. Bu faz içerisindeki DNA'nın çökmesi için üzerine 500 µl hacimde -20 °C'de bulunan soğuk izopropanol konulup 10 saniye kadar hafifçe ters düz edilerek çalkalanmış ve DNA'nın daha iyi çökmesini sağlamak için 1 gece -20 °C'de bekletilmiştir.
7. -20 °C'den alınan örnekler 14000 rpm'de 10 dakika boyunca santrifüj edilmiştir.
8. Bu işlemin sonunda tüplerin dibinde pelet olduğu gözlenmiştir. Pelet yerinden oynatılmadan tüpün içerisindeki sıvı boşaltılmış ve pelet üzerine -20 °C'de bulunan %70'lik etanolden 300 µl konularak 14000 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj yapılmıştır. Bu işlem bir kez daha tekrarlandıktan sonra santrifüj edilen tüplerin dibindeki pelete zarar vermeden sıvılar dikkatlice boşaltılmıştır.
9. Boş tüpler ters çevrilmiş ve 30- 40 dakika boyunca ağzı açık vaziyette kurumaya bırakılmıştır.
10. Kuruma işleminin sonunda tüplerin içerisine 150 µl saf su ilave edilmiş ve DNA'ların sıvıya geçmesi için örnekler +4 °C'de bir gece bekletilmiştir. Daha sonrasında ise bozulmamaları için -20 °C'de saklanmıştır.

DNA izolasyonu yapılan örneklerin DNA kalitelerine bakmak amacı ile her bir bitkiden elde edilen 1 µl hacminde DNA 1 µl yükleme boyası ile karıştırılarak %1'lik agaroz jele yüklenmiştir. Elektroforez cihazında 65 voltta 30 dakika koşan örnekler ultraviyole ışık altında görüntülenmiştir (Şekil 3.5 (a)).



Şekil 3. 5. (a) Genotiplerin bir bölümüne ait izolasyon ve (b) izolasyon sonrası agaroz jel görüntüsü

3.2.5. Markerlerin belirlenmesi

Yüksek oleik asit karakterini taşıyan genlerdeki mutasyonları yüksek verimli çeşitlere aktarmak amacıyla önceden geliştirilen moleküler markerler PCR analizlerinde kullanılmıştır. Yüksek oleik asit karakteri için (Chu vd. 2007) geliştirilen markerler bu tez çalışmasında kullanılmıştır (Çizelge 3.3).

Çizelge 3. 3. Kullanılan moleküler markerler

Chu vd. 2007		
Marker adı	Forward sekans	Reverse sekans
<i>ahFAD2A</i>	GATTACTGATTATTGAC	CCAACCCAAACCTTTCAGAG
<i>ahFAD2B</i>	GGAGCTTTAACAACAC	ATATGGGAGCATAAGGGT
<i>ahFAD2B</i>	CAGAACCATTAGCTTTG	CTCTGACTATGCATCAG

3.2.6. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) analizleri

PCR, ayrılma (denaturasyon: DNA iplikçiklerinin ayrılması), yapışma (annealing: primerlerin DNA zincirindeki komplementer olan bölgelere yapışması) ve uzama veya sentez (extention: DNA' ya yapışmış olan primer ile Taq polimeraz yardımıyla DNA zincirinin sentezlenmesi) aşamalarından oluşmaktadır.

Genel olarak denaturasyon sıcaklığı 90-95 °C, annealing sıcaklığı 30-60 °C ve extention sıcaklığı 70-75 °C arasında değişmektedir. Belirlenen koşullar, miktar ve oranlar her çalışmaya göre farklılaşmaktadır.

Bu tez çalışmasında daha önceden geliştirilen markerler kullanılarak istenen gen bölgelerinde amplifikasyonu sağlamak amacıyla PCR analizleri yapılmıştır. Daha önceki araştırmalarda uygulanmış olan PCR protokolleri (Chu vd. 2007) bu çalışmada optimize edilerek en iyi sonucu veren solüsyon miktar ve oranları belirlenmiştir (Çizelge 3.4). PCR uygulamaları için MyGenie-96 Gradient Thermal Cycler ve Thermo marka cihaz kullanılmıştır (Şekil 3.6).



Şekil 3. 6. Çalışmada kullanılan PCR cihaz modelleri

Çizelge 3. 4. PCR karışımı için kullanılan kimyasallar ve oranları

PCR Karışımı	Miktar (µl)	Oran
MgCl ₂	2	25 mM
10X buffer	2	1/10
Forward primer	1	10 pmol
Reverse primer	1	10 pmol
Taq DNA polimeraz	0,4	5 Unite
dNTP	1	2 mM
Kalıp DNA	2	50 ng
ddH ₂ O	10,6	-
Toplam	20	

3.2.7. PCR programı

Yapılan çalışmada kullanılan PCR için geliştirilen program Çizelge 3.5'de gösterilmiştir.

Çizelge 3. 5. Yüksek oleik asit karakteri analizi için PCR programı

1.	Sıcaklık: 94 °C	05dakika	
2.	Sıcaklık 94 °C	30 saniye	} 35 döngü
3.	Sıcaklık 48,5 °C	30 saniye	
4.	Sıcaklık 72 °C	01 dakika	
5.	Sıcaklık 72 °C	07 dakika	

3.2.8. Elektroferez çözeltisi

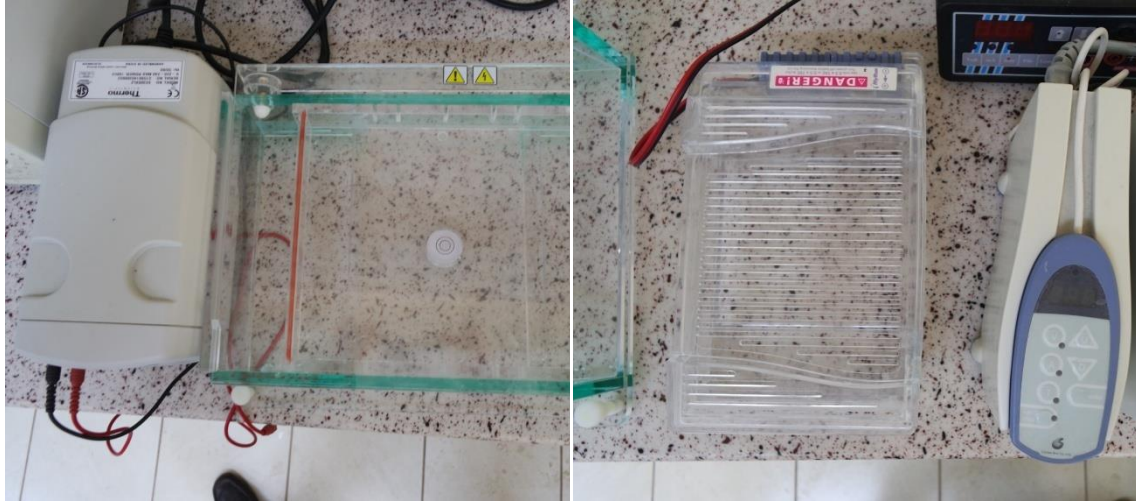
Elektroferezde tampon çözeltisi olarak Tris/Borate/EDTA (TBE) kullanılmıştır. Bu çözelti pH 8.3 olacak şekilde ve 10x yoğunluğunda hazırlanarak 1 lt suda çözdürülmüştür. Bu stok çözeltiden 50 ml alıp 950 ml saf su ile tamamlanmış ve böylece elektroferez için 0,5 x'lik TBE tamponu hazırlanmıştır. Aşağıda bu çözeltinin hazırlanmasında kullanılan kimyasallar ve miktarları verilmiştir;

Çizelge 3. 6. Elektroferez çözeltisi kimyasalları

✓	54 g Tris base
✓	27.5 g borik asit
✓	40 ml EDTA (0.5 M, pH: 8.3)

3.2.9. Jelin hazırlanması

PCR'da elde edilen DNA parçalarının birbirlerinden ayırt edilebilmesi ve görsel olarak incelenebilmesi amacıyla agaroz jel elektroferezinden yararlanılmıştır. %2'lik kullanılan agaroz jel, TBE tampon çözeltisi ile bir erlen mayerde mikrodalgada 3-5 dakika ısıtılarak homojen bir karışım olacak şekilde hazırlanmıştır. Soğutulan 100 ml jel içine bantların UV ışık altında görülebilmesini sağlayan 3.5 µl Ethidium Bromide (10 mg/ml) eklenmiş ve jel kalıbında hava kabarcıklarının oluşmasına imkan vermeden hazırlanan jel dökülmüştür. Jel kalıbına DNA veya PCR örneklerinin yüklenebilmesi için ise gerekli olan kuyucuklar tarakların yerleştirilmesiyle oluşturulmuştur. Jel tamamen donduktan sonra tarak yavaşça çıkarılmış ve elektroferez tankının (Şekil 3.7) içine, jelin üst kısmını kapatacak kadar elektrolit çözeltisi (0,5 x TBE) dökülmüştür.



Şekil 3. 7. Kullanılan elektroforez tankları

3.2.10. PCR ürünlerinin jele yüklenmesi ve elektroforez işlemi

10 µl PCR ürünlerine 2 µl yükleme boyası eklenerek (bromophenylblue) toplamda 12 µl'lik karışımı %2' lik agaroz jele yüklenmiş ve 45 dakika boyunca 75 voltta koşurulmuştur. Elde edilen bantların molekül ağırlıklarının belirlenmesinde marker olarak GeneRuler 100 bp kullanılmıştır Oluşan bantlar UV ışık altında DNR-Minilumi cihazıyla görüntülenmiştir (Şekil 3.8).



Şekil 3. 8. Kullanılan görüntüleme cihazı ve mikrodalga

3.2.11. Yağ ekstraksiyonu

Lipitler (yağlar), bitki ve hayvanlarda bulunan ve çözünürlük özellikleri ile sınıflandırılan maddelerdir. Lipitler suda çözünmezler ama dietil eter, kloroform, karbon

tetraklorür, petrolyum eteri gibi organik çözücülerde çözünürler. Sokslet ekstraktörü, 1879 yılında Franz Von Soxhlet tarafından icat edilen bir cihazdır. Ekstraksiyon cihazı temelde dört bölümden meydana gelir:

1. Silifli cam balon
2. Sokslet ekstraktörü (gövde)
3. Yoğunlaştırıcı (geri soğutucu)
4. Isıtıcı plaka (ısıtıcılı tabla)

Gerekli ön işlemlerden geçirilmiş örnek ekstraktöre alınır ve yeterli miktarda çözen ilave edilir. Burada kullanılacak çözenin kendisi ve buharları zehirli, yanıcı ve patlayıcı olmamalı, hammaddeye kolay nüfuz etmeli, kolay buharlaşmalı, özgül ısısı, buharlaşma sıcaklığı ve viskozitesi düşük olmalı, kolay ve sürekli sağlanabilmeli ve ucuz olmalıdır. Kaynama noktasının hemen altındaki sıcaklığa kadar ısıtılır. Çözücü buharları yoğunlaştırıcıya ulaştığında damlalar halinde kartuşun üzerine düşmeye baslar. Ekstraktördeki çözen miktarı sifon seviyesine ulaştığında, çözen çözdüğü yağ ile birlikte balona geçer. Numunedeki yağın tamamı alınıncaya kadar sifon yapmaya devam ettirilmelidir.



Şekil 3. 9. Yağ ekstraksiyon cihazı (sokslet)

3.2.11.1. Yağ ekstraksiyonunda kullanılan araç ve kimyasallar

- Soxhlet ekstraksiyon düzenegi yada cihazı
- Kartuş
- Çözücü (Petrol Eteri v.b.)
- Hassas Terazi
- Desikatör
- Etüv

3.2.11.2. Numune hazırlanması

Yağ analizi yapılacak olan yarfıstığı örneklerinin nem içermemesi gerekmektedir. Bu nedenle örnekler etüvde 105 °C de 1-2 saat kurutulur. Örnek içerisinde bulunan tüm yağı alabilmek için yüzey alanının olabildiğince geniş tutulması gerekmektedir. Dolayısıyla örnekler çok iyi derecede öğütülmelidir.

3.2.11.3. İşlem basamakları

1. Hazırlanan örneklerden beklenen yağ içeriğine göre pamuk veya süzgeç kağıdına konulan 5 gramlık örnekler katlanarak kartuşa yerleştirilir.
2. Kartuş ekstraktöre yerleştirilir.
3. Analizlerde kullanılacak olan cam balonlar etüvde kurutulularak tara tartımı yapılır.
4. Cam balona yeterli miktarda hekzan, petrol eteri veya çözgen madde eklenir.
5. Balonlar ve geri soğutucu birbirine bağlanır ve ısıtıcı üzerine yerleştirilir.
6. Çözücü yavaş yavaş kaynayacak şekilde sıcaklık ayarlanır geri damıtma hızı ise yavaş olacak ayarlanır.
7. Örnek miktarı ve örneklerden beklenen yağ miktarına göre ekstraksiyon uygulanır.
8. Balon içersinde bulunan çözücünün çoğu damıtılarak geri alınır. Damıtma sırasında dikkatli olunmalıdır.
9. Cam balonlarda kalan çok az miktardaki çözücüyü etüvde buharlaştırarak sabit tartıma getirilir.
10. Cam balonun son ağırlığı kaydedildikten sonra içerisindeki yağ miktarı aşağıdaki formülden hesaplanır.

3.2.11.4. hesaplama

Kuru madde üzerinden kütlece %Yağ Miktarı:

$$= 100 \times (X2 - X1) / X0$$

X0:Deney numunesinin kütlesi

X1:Ekstraksiyon balonunun darası, g

X2:Ekstraksiyondan sonra yağ ve balonun birlikte kütlesi, g

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Yapılan melezleme programına göre elde edilen F₂ genotiplerine ve ebeveynlerine ait yağ analizi sonuçları Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2 gösterilmiştir. Yağ asitleri analizi sonuçları ve ortalamaları ise Çizelge 4.3' de gösterilmiştir.

Çizelge 4. 1. İki numaralı hattan elde edilen F₂ genotiplerinin yağ analizi

Hat 2					
Sıra	Fıstık Ağırlık	Jalon	Toplam ağırlık	Yağ ağırlık	Yüzde (%)
1	5,04	129,8	132,35	2,55	50,6
2	5,11	134,12	136,75	2,63	49,9
3	3,11	148,04	149,46	1,42	45,7
4	5,17	134,24	136,82	2,58	49,9
5	5,09	161,23	163,7	2,47	48,5
6	5,24	149,33	151,85	2,52	48,1
7	5,01	129,8	132,43	2,63	52,5
8	5,1	134,12	136,73	2,61	51,2
9	5,11	129,82	132,5	2,68	52,4
10	5,02	129,86	132,4	2,54	50,6
11	5,07	134,1	136,45	2,35	46,4
12	2,5	148,08	149,29	1,21	48,4
13	4,6	134,12	136,42	2,3	50,0
14	5,00	134,12	136,65	2,53	50,6
15	5,06	148,04	150,59	2,55	50,4
16	5,08	134,24	136,72	2,48	48,8
17	5,03	161,23	163,73	2,5	49,7
18	5,01	134,26	136,62	2,36	47,1
19	5,05	148,08	150,52	2,44	48,3
20	5,00	156,37	158,93	2,56	51,2
21	5,00	162,92	165,3	2,38	47,6
22	5,00	146,23	148,54	2,31	46,2
23	5,05	172,33	174,65	2,32	45,9
24	5,00	140,56	143,04	2,48	49,6
25	5,08	129,8	132,39	2,59	51,0
26	4,58	134,35	136,49	2,14	46,7
27	5,01	148,04	150,53	2,49	49,7
28	5,01	134,3	136,89	2,59	51,7
29	5,00	161,4	163,87	24,87	49,4
30	5,06	161,25	163,77	2,52	49,8
31	5,00	148,35	150,62	2,27	45,4
33	5,02	149,33	151,86	2,53	50,4
34	5,15	134,24	136,92	2,68	52,0
35	5,12	161,23	163,5	2,27	44,3
36	5,09	172,5	175,07	2,57	50,5
37	5,00	140,63	143,12	2,49	49,8

Çizelge 4.1'in devamı

NC7	5,07	148,32	150,55	2,23	44,0
HOG	3,63	134,25	136,11	1,86	51,2

Çizelge 4. 2. Üç numaralı hattan elde edilen F₂ genotiplerinin yağ analizi

Hat 3					
Sıra	Fıstık Ağırlık	Jalon	Toplam ağırlık	Yağ ağırlık	Yüzde(%)
1	5	129,83	132,38	2,55	51,0
2	5	134,22	136,34	2,12	42,4
3	1,47	148,1	148,84	0,74	50,3
4	4,12	134,31	136,33	2,02	49,0
5	5,08	161,32	163,51	2,19	43,1
6	5,1	149,42	151,95	2,53	49,6
7	5,06	129,8	132,25	2,45	48,4
8	5,05	148,39	151,06	2,67	52,9
9	5,05	156,62	159,12	2,5	49,5
10	5,03	163,2	165,72	2,52	50,1
11	5,13	146,84	149,1	2,26	44,1
12	5,06	172,86	174,98	2,12	41,9
13	5,04	141,23	143,63	2,4	47,6
14	5,05	129,85	132,45	2,6	51,5
15	5,05	134,15	136,6	2,45	48,5
16	5,09	129,85	132,58	2,73	53,6
17	5,03	134,35	136,66	2,31	45,9
18	5,08	129,85	132,58	2,73	53,7
19	5,05	148,12	150,59	2,47	48,9
20	5,05	148,4	150,93	2,53	50,1
21	5	156,46	158,99	2,53	50,6
22	5,05	162,93	165,52	2,59	51,3
23	4,2	148,39	150,43	2,04	48,6
24	5,05	172,39	175,05	2,66	52,7
25	3,6	140,62	142,13	1,51	41,9
26	5,02	130,14	132,42	2,28	45,4
27	5,03	134,15	136,73	2,58	51,3
28	5,03	148,19	150,74	2,55	50,7
29	5,01	162,96	165,25	2,29	45,7
30	5,05	161,32	163,57	2,25	44,6
31	5,04	149,5	151,8	2,3	45,6
32	5,07	148,3	150,84	2,54	50,1
33	5,02	156,86	159,06	2,2	43,8
34	5,05	162,9	165,52	2,62	51,9
35	5,09	146,25	148,42	2,17	42,6

Cizelge 4.2' nin devamı

...					
36	5,07	134,34	137,02	2,68	52,9
37	5,08	140,55	142,69	2,14	42,1
38	5,02	129,9	132,35	2,45	48,8
39	5,09	134,12	136,51	2,39	47,0
40	5,11	148,07	150,58	2,51	49,1
41	5	134,3	136,64	2,34	46,8
42	5,02	161,3	163,69	2,39	47,6
43	5,09	149,36	152,02	2,66	52,3
44	5,03	148,42	150,98	2,56	50,9
45	5,09	172,5	174,77	2,27	44,6
46	2,2	162,99	164,06	1,07	48,6
47	5,1	140,7	142,95	2,25	44,1
48	5,09	172,4	175,01	2,61	51,3
49	5,08	140,72	142,94	2,22	43,7
50	5,02	129,88	132,5	2,62	52,2
51	5,01	134,13	136,73	2,6	51,9
52	5,04	148,16	150,5	2,34	46,4
53	5,1	134,3	136,95	2,65	52,0
54	5,04	161,33	163,87	2,54	50,4
55	5,05	149,41	152	2,59	51,3
56	5,01	148,3	150,63	2,33	46,5
57	5,04	156,34	158,87	2,53	50,2
58	5,02	162,99	165,12	2,13	42,4
NC7	5,07	148,32	150,55	2,23	44,0
HOG	3,63	134,25	136,11	1,86	55,6

Çizelge 4. 3. Yağ asidi(%) analizi yapılan örnekler (NC-7XHOG, yüksek oleik asit içerikleri koyu renk ile gösterilmiştir.)

Genotipler	C16:0	C18:0	C18:1n9c	C18:2n6c	C20:4n6	C20:1n9	C22:0
	Palmitik asit	Stearik asit	Oleik asit	Linoleik asit	Araşidonic asit	cis-11-Eykosenoik asit	Behenik asit
2-1	7,4	2,9	70,5	11,2	3,4	1,6	3,0
2-4	8,4	2,6	55,4	25,4	3,4	1,8	3,1
2-5	8,9	2,4	48,4	33,3	3,0	1,7	2,4
2-7	8,5	3,5	56,6	24,4	3,7	1,2	2,1
2-8	9,2	2,8	46,7	34,6	3,3	1,3	2,1
2-9	7,9	3,0	58,4	23,2	3,5	1,6	2,5
2-14	8,6	2,8	56,8	24,7	3,3	1,4	2,5
2-17	9,3	2,8	44,2	37,0	3,3	1,3	2,2
2-29	8,0	3,4	61,5	20,2	3,5	1,4	2,0
2-31	6,2	3,2	78,8	4,9	3,5	1,4	2,0
3-6	6,5	2,4	80,3	4,9	1,2	2,0	2,8
3-7	6,2	2,3	80,4	5,0	1,3	2,0	2,9
3-11	9,3	2,7	60,1	22,5	1,4	1,3	2,7
HOG	6,8	2,6	79,7	4,6	1,3	2,1	3,0
NC7	8,9	5,3	65,3	15,8	1,8	0,9	2,1
Ebeveyn ort	7,9 ±1,1	3,9 ±1,4	72,5 ±7,2	10,2 ±5,6	1,5 ±0,2	1,5 ±0,6	2,5 ±0,4
Melez ort	8,0 ± 0,3	2,8 ±0,1	61,4 ±3,5	20,9 ±3,1	2,9 ±0,3	1,5 ±0,1	2,5 ±0,1

F₂ generasyonunda hasat işleminden sonra genotiplere ait tohumlardan örnekler alınmış ve yağ ve yağ asidi analizleri gerçekleştirilmiştir. Bu genotipler içerisinde oleik asit miktarı yüksek çıkan genotiplerin diğer yağ asitleri sırası ile incelenmiştir.

Oleik asit açısından 3 numaralı hatta yer alan 7 numaralı genotip %80,4 ile en yüksek değere sahip olarak kaydedilmiştir. Bu genotipin diğer yağ asitleri açısından incelediğimizde; en düşük palmitik asit (%6,2) miktarını taşıyan iki genotipten biri olan ve en düşük stearik asit (%2,3) ile en düşük iki genotipten biri iken, linoleik asit (%5), araşidonik asit (%1,3), cis-11-eykosenoik asit (%2), behenik asit (%2,9) oranları ile diğer genotiplerin yağ asitlerine yakın değerler göstermektedir. Başka bir deyişle 7 numaralı genotip oleik asit (%80,4) açısından en yüksek oranı gösterirken, palmitik asit (%6,2) açısından en düşük genotip olarak ön plana çıkmaktadır.

7 numaralı genotipi oleik asit bakımından %80,3 ile 3 numaralı hatta yer alan 6 nolu genotip takip etmektedir ve bu genotipi diğer yağ asitleri yönünden incelediğimizde ise; araşidonik asit (%1,2) bakımından en düşük değere sahip genotip olarak karşımıza çıkmakta ve palmitik asit (%6,5), stearik asit (%2,4) linoleik asit (%4,9), cis-11-

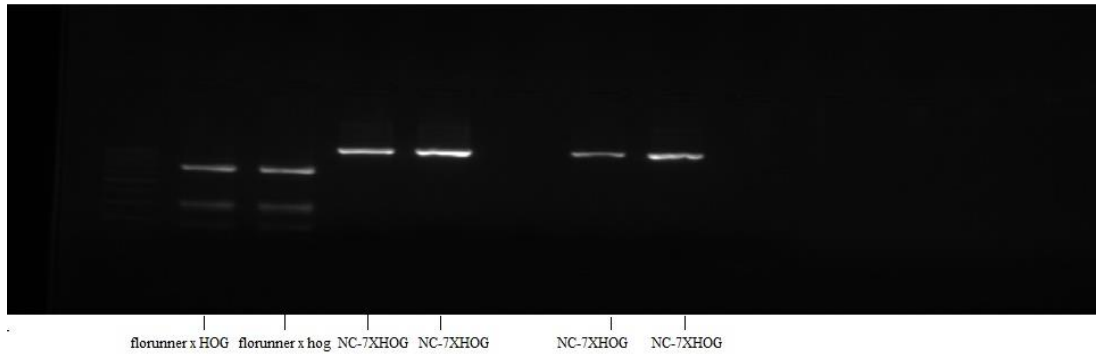
eykosenoik asit (%2), behenik asit (%2) oranları ile de diğer genotiplerin yağ asitlerine yakın değerler göstermektedir.

3 numaralı hattan elde edilen 6 numaralı genotipi oleik asit bakımından %78,8 ile 2 numaralı hatta yer alan 31 numaralı genotipin takip ettiği görülmektedir. Bu genotipi diğer yağ asitleri yönünden incelediğimizde ise; palmitik (%6,2) ve linoleik (%4,9) asit en düşük miktara sahip genotip olmakta ve stearik asit (%3,2), araşidonik asit (%3,5), cis-11-eykosenoik asit (%1,4), behenik asit (%2) oranları ile diğer genotiplerin yağ asitlerine yakın değerler göstermektedir.

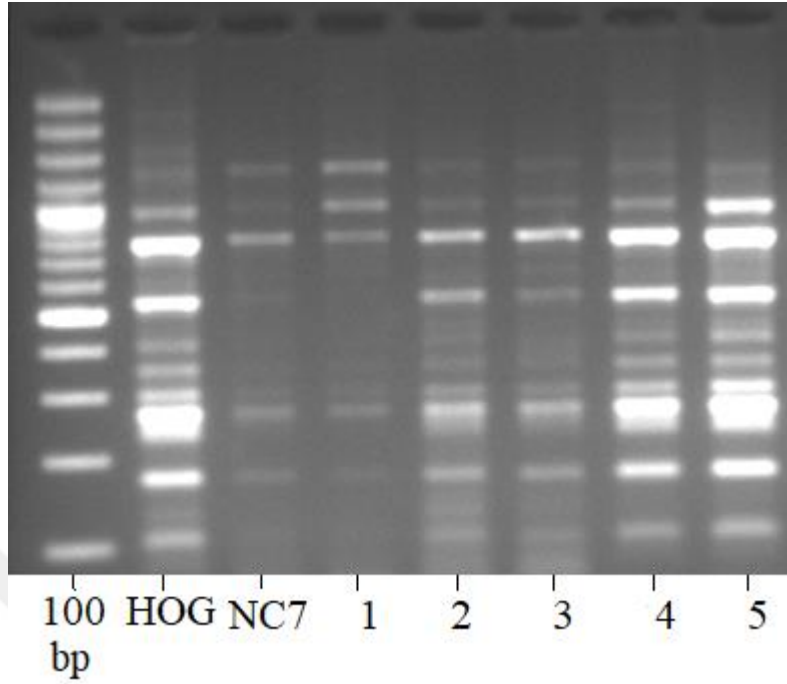
2 numaralı hattan elde edilen 31 numaralı genotip ise %70,5 oleik asit yüzdesi ile 2 numaralı hattın 1 numaralı genotipi takip etmektedir. Diğer yağ asitleri açısından incelendiğinde behenik asit (%3), linoleik asit (%11,2) en yüksek ve bunların yanı sıra palmitik asit (%7,1), stearik asit (%2,9), araşidonik asit (%3,4), cis-11-eykosenoik asit (%1,6) oranları ile diğer genotiplerin yağ asitlerine yakın değerler göstermektedir.

Oleik asit miktarı en yüksek olan genotipte stearik asit (%2,3) miktarı analiz yapılan genotipler içerisinde en düşük olarak belirlenmiştir. Bunların yanı sıra ebeveynlerin oleik asit miktarı ise sırasıyla NC-7 ve HOG için %65,3 ve %79,7'dir. Oleik asit miktarı en yüksek olan genotipin linoleik asit miktarının en az olmadığını ve bu da oleik asit seviyesinin halen arttırılabileceğini göstermektedir.

Yürütülen bu tez çalışmasında kullanmış olduğumuz yarfıstığı tohumları sera koşullarında ekilmiş (Şekil 1. (a)) ve resiprokal melezleme sonrası birçok F₁ elde edilmiştir. Melezlerin gerçek melez olup olmadığını anlamak için henüz iki haftalık F₁ bitkilerinden yaprak örneği alınmıştır. Her mezele ait yaprak örneklerinden izole edilen DNA'lar CAPS markeri ile analiz edilmiş ve yüksek oleik asiti kontrol eden genlerdeki (*ahFAD2A* ve *ahFAD2B*) mutasyonların aktarılıp aktarılmadığı kontrol edilmiştir. Eğer yüksek oleik asit allelini içeren bantlar elde edildi ise o melezin gerçek olduğu, eğer ilgili bant elde edilmedi ise melez yerine kendilemenin gerçekleştiği belirlenmiştir. Buna göre F₂ genrasyonuna ilerletilecek F₁ genotipleri belirlenmiştir. F₁ genotipleri, Şekil 4.1' deki jel analizinden görüleceği üzere Chu vd. (2007) tarafından geliştirilen CAPS primerleri kullanılarak analiz edilmiştir.

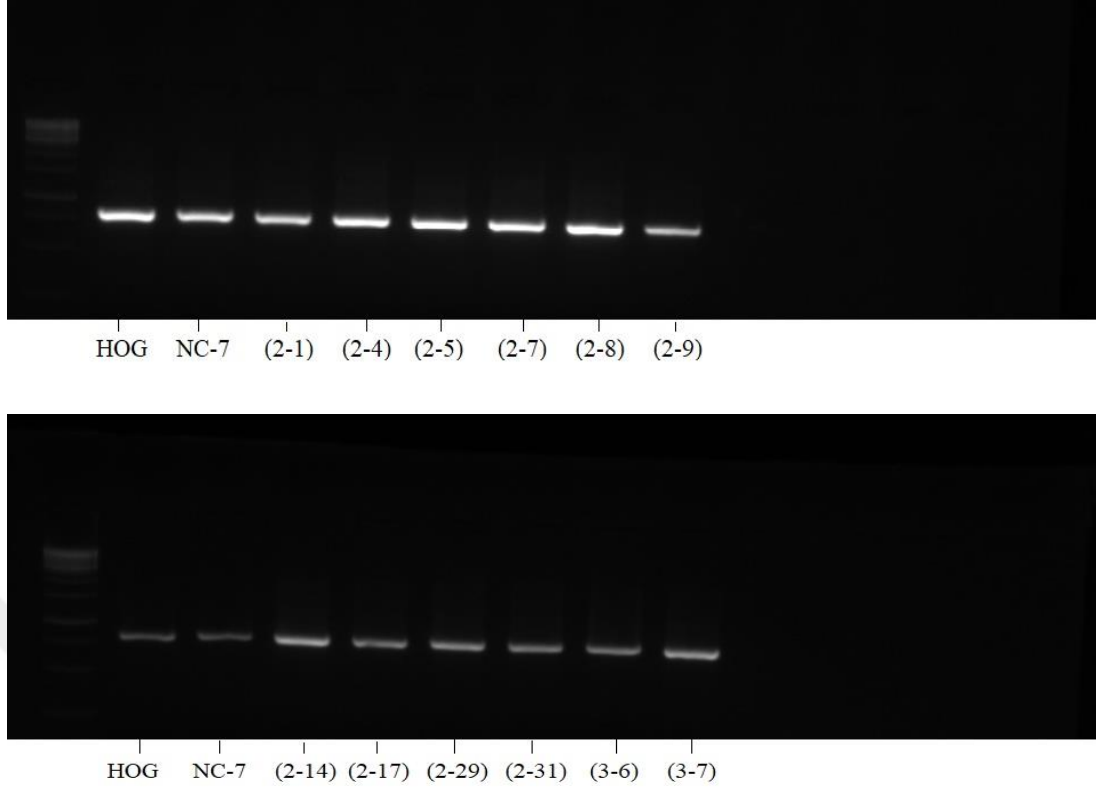


Şekil 4. 1. FLORUNNER X HOG ve NC-7 X HOG F₁lerinden kurulu PCR



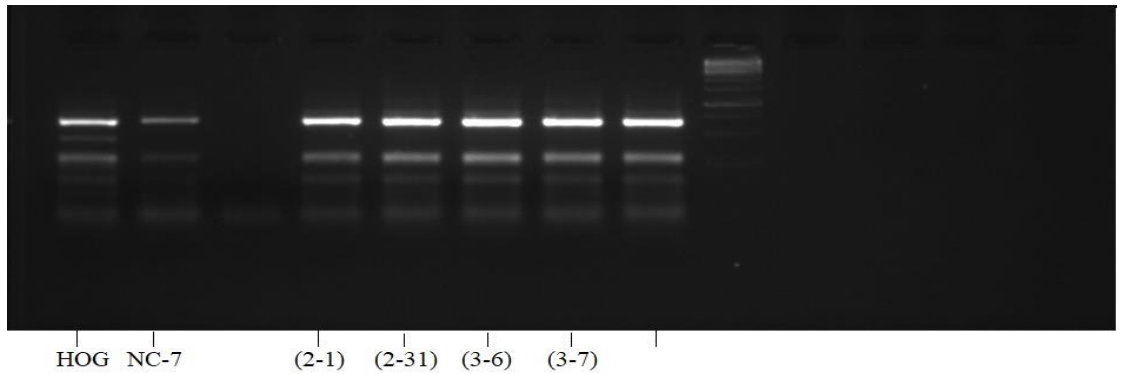
Şekil 4. 2. NC-7 X HOG melezlemesinden elde edilen F₁ genotiplerinin agaroz jeldeki görüntüsü

Chu vd. (2007) tarafından geliştirilen CAPS markerlerden *ahFAD2A* ve *ahFAD2B* ile gerçekleştirilen PCR'lardan elde edilen ürünler sırasıyla Hpy99I ve Hpy188I restriksiyon enzimleri ile kesim işlemine tabi tutulmuştur. Elde edilen ürün %2'lik agaroz jelde görüntülenmiş ve *ahFAD2A* için 816 bp ve *ahFAD2B* için 550 bp uzunluklarında bant vermesi beklenmekle birlikte kullanılan primerle uyumlu sonuçlar elde edilememiştir. Moleküler analiz çalışmalarında çok iyi bilindiği üzere, moleküler markerler çoğu zaman geliştirildikleri popülasyona özgü olabilmektedirler. Chu vd. (2007) tarafından CAPS markerlerinin geliştirildiği popülasyon (SunOleic 97R ve bazı diğer mutantlar) ile bu çalışmada kullandığımız yüksek oleik asit (HOG) materyalinin büyük olasılıkla farklı kökenlerden temel alması nedeniyle primer analizlerinden anlamlı sonuçlar çıkarmak tek başına bu markerin kullanımı ile mümkün olamamıştır. Bu nedenle Chen vd. (2010) tarafından geliştirilen allel spesifik (F435F, F435INSR) markerler hem F₁ genotiplerinde melezlerin doğruluğu için hem de F₂ genotiplerinde yüksek oleik asitli bireylerin tespitinde kullanılmıştır.



Şekil 4. 3. F₂ generasyonundaki genotiplerin *ahFAD2B* markeri ile yapılan PCR analiz görüntüsü

F₂ genotipleri için yapılan moleküler analizlerde kullanılan bir başka primer grubu olan ve Chen vd. (2010) tarafından geliştirilen allel spesifik (F435F, F435INSR) primerler ile yapılan analizler sonucunda ise sırasıyla 193 ve 205 bp bant uzunluklarına sahip genotipler belirlenmiştir (Şekil 4.4.).



Şekil 4. 4. Allel spesifik primerleri ile kurulan PCR'ın jel görüntüsü

Yapılan moleküler analizler sonrasında elde edilen agaroz jel, soksalet ve (GC) gaz kromatografisi sonuçlarında 2 ve 3 numaralı hatlardan elde edilen 95 genotip içerisinde hangilerinin yüksek oleik asit içeriğine sahip olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.3.). Chu vd. (2007) tarafından geliştirilen markerlar ile yapılan PCR analizleri sonucunda bazı genotiplerin bant verdiği bazı genotiplerin ise açılım gösterdiğinden dolayı bant vermediği gözlemlenmiştir. Buna benzer yapılan çalışmada Janila vd. (2016) dört genotipten elde ettikleri 103 F₁ içerisinde 55 bireyde aynı bantların olduğunu gözlemlenmişlerdir. Ve bu örnekler içerisinde oleik asit miktarını %82'ye çıkarmışlardır. Yapmış olduğumuz çalışmada 95 genotip içerisinde yağ asitleri analizi yapılan 15 genotipin ebeveynler dahil bazılarının oleik asit miktarı yaklaşık %81'e çıktığı gözlemlenmiştir.

Oleik asit miktarını arttırmaya yönelik yapılan benzer çalışmalardan biri; Zhao vd. (2016) tarafından ele alınmış olup yüksek oleik asitli hat ile yüksek verimli hattın melezlenmesi sonucu elde ettikleri 179 genotip içerisinde 18 genotipin yüksek oleik asitli olduğu ortaya konmuştur. Bu işlemde moleküler olarak yüksek oleik asit içeriğine sahip genotipler KASP (Kompetitive Allele Specific PCR) markeri kullanarak belirlenmiştir.

Janila vd. (2015) ele aldıkları çalışmada yapmış oldukları melezlemeler (ICGV06110 X SunOleic95R, ICGV06142 X SunOleic95R ve ICGV06420 X SunOleic95R) ile oleik asit karakterini kontrol eden nokta mutasyonları yüksek verimli çeşitlere aktarmayı hedeflemişler ve açılan populasyonlarda oleik asit miktarını %81,3'e çıkarmışlardır. Yürütmüş olduğumuz çalışmada ise buna paralel olarak oleik asit miktarı benzer oranlara çıkarılmıştır.

Chen vd. (2010) yapmış oldukları çalışmada yaptıkları melezlemeler ile elde edilen 16 genotip içerisinde 4 genotipin oleik asit miktarını %74,8-81,3-80,3 ve 80,5'e çıkarmışlardır.

Wang vd. (2014) yapmış oldukları çalışmada Rihua 1 ve Rosy Red adlı genotiplerden elde ettikleri 180 adet F₂ ve ebeveynlerini yağ asitleri açısından NIRS kullanarak kıyaslamışlardır. Bu melezler içerisinde seçtikleri 20 genotip içerisinde 12 tanesinin oleik asit miktarının %72'nin altında olmadığını en yüksek olanın %80,7 olduğunu tespit etmişlerdir. Sunmuş olduğumuz bu çalışmada ise yapmış olduğumuz melezlemeler neticesinde ulaşılan F₂ bitkileri içerisinde çok sayıda yüksek oleik asitli genotipin elde edildiği ve yağ asitleri analizine tabii tuttuğumuz 13 genotip içerisinde 5 tanesinin oleik asit miktarının en düşük %70,5 ve en yüksek %80,3 olduğu görülmüştür.

5. SONUÇLAR

Bu yüksek lisans tez çalışmasında 3 genotipten (NC-7, HOG ve Florunner) oluşan genetik materyalin önceden bilinen özelliklerine göre melezlemeler yapılmış ve elde edilen F₁'ler yüksek oleik asit karakterini takibini mümkün kılan markerler ile taranarak ilgili allel varlığına göre melezlerin doğrulaması yapılmıştır. F₂ generasyonundaki döller tekrardan moleküler olarak analiz edilmiş ve yüksek oleik asit allellerini içeren bireyler tespit edilmiştir. Bazı F₂ döllerinde yapılan yağ asitleri analizi ile marker analiz sonuçları doğrulanmıştır.

Bu çalışmada tutturulan ve yetiştirilebilen melez kombinasyonlarından olan NC-7 X HOG' a ait F₁ ve F₂ dölleri *ahFAD2A* ve *ahFAD2B* primerleri ve F435F, F435INSR ve F435SUBR allel spesifik primerler ile analiz edilmiştir. Protokol gereği PCR sonrası yapılan restriksiyon enzimleri kesim neticesinde *ahFAD2A* ve *ahFAD2B* markerlerinden tutarlı sonuç alınamazken, F435F, F435R ve F435SUBR allel spesifik markerlerinden anlamlı sonuçlar elde edilebilmiştir.

NC-7, HOG ve Florunner genotiplerinin farklı kombinasyonlarındaki melezlerinden bu yüksek lisans tez çalışmasının amacına uygun olarak 2 (NC-7 X HOG 1 Kombinasyon) ve 3 (NC-7 X HOG 2 Kombinasyon) numaralı gerçek melez F₂ popülasyonları elde edilmiştir. Bitkinin toprak üstünde çiçek üretirken meyvelerini toprak altında üretmesi melezlemelerin çok aşırı hassasiyet ve özende yapılmasını gerektirmiştir. Buna rağmen melez tutturma oranı çok düşük olduğundan çok sayıda melez kombinasyonu içerisinde amaca uygun 2 nitelikli melez popülasyonu elde edilebilmiştir. Bu iki kombinasyondan toplamda 95 F₂ bireyi elde edilmiş ve tamamı yüksek oleik asit karakteri bakımından ilgili markerlerle analiz edilmiştir.

Moleküler analizlerden elde edilen sonuçlara göre; 37 genotipten oluşan 2 numaralı hat içerisinde tohum iriliğine göre rastgele seçilen 10 genotipin 2 tanesi ve 58 genotipten oluşan 3 numaralı hat içerisinde rastgele seçilen iri daneli 3 genotipten 2 tanesinin yüksek oleik asit karakterini taşıdıkları görülmüştür. Teyit amaçlı yapılan yağ asidi analizleri neticesinde de oleik asit miktarının %40-50 (NC-7 düzeyi) seviyesinden %70-80 (HOG düzeyi) seviyesine çıktığı tespit edilmiştir.

Ülkemizde yüksek oleik asit karakterine sahip yerfıstığı çeşidimiz bulunmamaktadır. Yüksek oleik asitli yerfıstığı ürünlerine özellikle çikolata ve bisküvi endüstrisi tarafından yoğun talep olmasına rağmen mevcut eksiklik yapılan ithalat ile giderilmeye çalışılmaktadır. Bu tez çalışması ile yüksek oleik asitli yerfıstığı çeşidi geliştirilmesi konusunda ilk adımlar atılmış bulunmaktadır. Bu amaç için bir popülasyon oluşturulmuş ve moleküler olarak yüksek oleik asitli bireyler tespit edilmiştir. Rutin olarak takip edilecek geri melezlemeler ve diğer koldan takip edilecek kendilemeler ile saf ve yüksek oleik asitli yerli bir çeşide ulaşmak söz konusu olabilecektir.

6. KAYNAKLAR

- Andersen, P.C. and Gorbet, D.W. 2002. Influence of year and planting date on fatty acid chemistry of high oleic acid and normal peanut genotypes. *J. of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 1298– 1305.
- Arıoğlu, H. 1999. Yerfıstığı Yetiştirme Islahı. ukurova niversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları: 220, Yağ Bitkileri Ders Kitabı, 70-74 s. Adana.
- Badıgannavar A.M., Kale D.M., Murthy G.S.S. 2002. Assessment of yielding ability of Trombay groundnut varieties through growth analysis. *J. of Oilseeds Research*, 19: 38-43.
- Bannon, C.D., Breen, G.J., Craske, J.D., Hai, N., Harper, N.L., O'Rourke, K.L. 1982. Analysis of fatty acid methyl esters with high accuracy and reliability III Literature review of an investigation into the development of rapid procedures for the methoxide-catalysed methanolysis of fats and oils. *J. of Chromatography*, 247: 71-89.
- Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Mdrlğ. 2000. Yerfıstığı Tarımı BATEM Yayınları. 13s, Antalya.
- Baydar, H. 2008. Yerfıstığı Bilimi ve Teknolojisi Sleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Ders Notları, Isparta.
- Bishi, S.K., Lokesh, K., Mahatma, M.K., Khatediya, N., Chauhan, S.M. and Misra, J.B. 2015. Quality traits of Indian peanut cultivars and their utility as nutritional and functional food. *Food Chemistry*, 167: 107-114.
- Boote, K.J. 1982. Growth stage of peanut (*Arachis hypogaea* L.) *Peanut Science*, 9:35-40.
- Brooks, G.E., 1975. Peanuts and colonialism: consequences of the commercialization of peanuts (*Arachis hypogaea* L) in West Africa. *The Journal of African History*, 16: 29-54.
- Bruner, A.C., Jung, S., Abbott, A.G. and Powell, G.L. 2001. The naturally occurring high oleate oil character in some peanut varieties results from reduced oleoyl-PC desaturase activity from mutation of aspartate 150 to asparagine. *Crop Science*, 41(2): 522-526.
- Chen, Z., Wang M.L., Barkley, N.A. ve Pittman, R.N. 2010. A Simple Allele-Specific PCR assay for detecting FAD2 alleles in both A and B genomes of the cultivated peanut for high-oleate trait selection. *Plant Molecular Biology*, 28: 542-548.
- Chu, Y., Holbrook, C.C., Timper, P., Ozias-Akins, P. 2007. Development of a PCR-based molecular marker to select for nematode resistance in peanut. *Crop Science*, 47: 841-847.
- Chu, Y., Ramos, M.L., Holbrook, C.C., Ozias-Akins, P. 2007. Frequency of a loss-of-function mutation in oleoyl-PC desaturase (FAD2A) in the mini-core of the US Peanut germplasm collection. *Crop Science*, 47: 2372–2378.
- Chu, Y., Holbrook, C.C., Ozias-Akins, P. 2009. Two alleles of FAD2B control the high oleic acid trait in cultivated peanut. *Crop Science*, 49: 2029–2036.

- Dean, L.L., Hendrix, K.W., Holbrook, C.C. and Sanders, T.H. 2009. Content of some nutrients in the core of the core of the peanut germplasm collection. *Peanut Science*, 36 (2): 104-120.
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L. 1990. A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue. *Focus*, 12: 13-15.
- Fang, C.Q., Wang, C.T., Wang, P.W., Tang, Y.Y., Wang, X.Z., Cui, F.G. and Yu, S.L. 2012. Identification of a novel mutation in FAD2B from peanut (*Arachis hypogaea* L.) EMS mutant with elevated oleate content. *Journal of Oleo Science*, 61 (3): 143-148.
- FAO 2016. <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx>. [Son erişim tarihi: 28/05/2018].
- Francisco, M.L. and Resurreccion, A.V.A. 2008. Functional components in Peanuts. *Journal Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, pp. 715-746.
- Gowda, M.V.C., Motagi, B.N., Naidu, G.K., Diddimani, S.B. and Sheshagiri, R. 2002. GPBD 4: A Spanish bunch groundnut genotype resistant to rust and late leaf spot. *International Arachis Newsletter*, 22: 29-32.
- Holbrook, C.C. and Stalker, H.T. 2003. Peanut breeding and genetic resources. *Plant Breeding Reviews*, 22: 297-456.
- Isleib, T.G., Young, C.T., Knauff, D.A. 1996. Fatty acid genotypes of five Virginia-type peanut cultivars. *Crop Science*, 36: 556-558.
- Janila, P., Pandey, M.K., Shasidhar, Y., Variath, M.T., Sriswathi, M., Khera, P., Manohar, S.S., Nagesh, P., Vishwakarma, M.K., Mishra, G.P., Radhakrishngoan, T., Manivannanc, N., Dobariya, K.L., Vasanthi, R.P., Rajeev K. Varshney. 2015. 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.
- Junk, S., Swift, D., Sengoku, E., Patel, M., Teule, F., Powell, G., Moore, K., Abbott, K., 2000. The high oleate trait in the cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.) Isolation and characterization of two genes encoding microsomal oleoyl-PC desaturases, *Molecular Genetics and Genomics-Springer*, (263): 796-805.
- Kadiroğlu, A. 2013. Yerfistiği yetiştiriciliği Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Antalya, 47 s.
- Kale, D.M., Mouli, C., Murthy, G.S.S., Rao, M.V.P., 1997. Development of a new groundnut variety TG26 by using induced mutations in cross breeding. *Mutation Breeding Newsletter*, 43, 25-27.
- Krapovickas, A. and Gregory, W.C. 1994. Taxonomia del genero *Arachis* (Leguminosae). *Bonplandia*, 8: 1-186.
- Liao, B., Holbrook, C. 2007. Groundnut: In Genetic Researches, Chromosome Engineering, and Crop Improvement Vol 4 (Oilseed Crops), RJ Singh Ed, CRC Pres, New York, USA Pages 51-87.
- Linnaeus, C. (Linne, C von) 1753. *Species Plantarum*, Laurentii Salviae, Holmiae 2, 741.

- López, Y., Nadaf, H.L., Smith, O.D., Connell, J.P., Reddy, A.S. and Fritz, A.K. 2000 (a). Isolation and characterization of the delta 12-fatty acid desaturase in peanut (*Arachis hypogaea* L) and search for polymorphisms for the high oleate trait in Spanish market-type lines. *Theoretical and Applied Genetics*, 101: 1131-1138.
- López, Y., Smith, O.D., Senseman, S.A., Rooney, W.L. 2001. Genetic factor in fluencing high oleic acid content in Spanish market-type peanut cultivars. *Crop Science*, 41: 51-56.
- Mienni, C.M.S. and Pretorius, A.E. 2013. Application of marker-assisted selection for *ahFAD2A* and *ahFAD2B* genes governing the high-oleic acid trait in South African groundnut cultivars (*Arachis hypogaea* L). *African Journal of Biotechnology*, 12(27), pp. 4283-4289.
- Moore, K.M., Knauff, D.A. 1989. The inheritance of high oleic acid in peanut. *Journal of Heredity*, 80: 252-253.
- Mukri, G., Nadaf, H.L., Bhat, R.S., Gowda, M.V.C., Upadhyaya, H.D. and Sujay, V. 2012. Phenotypic and molecular dissection of ICRISAT mini core collection of peanut (*Arachis hypogaea* L) for high oleic acid. *Plant Breeding*, 131: 418-422.
- Nawade, B., Bosamia, T.C., Thankappan, R., Rathnakumar, A.L., Kumar, A., Dobaria, J.R., Kundu, R. and Mishra, G.P. 2016. Insights into the Indian peanut genotypes for *ahFAD2* gene polymorphism regulating its oleic and linoleic acid fluxes. *Frontiers in Plant Science*, 7:1271.
- Nigam, S.N., Rao, V.M.J. and Gibbons, R.W. 1990. Artificial hybridization in groundnut. *International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics Information Bulletin*, 29: 1-27.
- Norden, A.J. 1980. Peanut. American Society of Agronomy, pp. 443-454, Madison.
- Norden, A.J., Gorbet, D.W., Knauff, D.A., Young, C.T. 1987. Variability in oil quality among peanut genotypes in the Florida breeding program. *Peanut Science*, 14: 7-11.
- Norden, A.J. 1980. Peanut. American Society of Agronomy, pp. 443-454, Madison.
- O'Byrne, D.J., Knauff, D.A. and Shireman, R.B. 1997. Low fat monounsaturated rich diets containing high-oleic peanuts improve serum lipoprotein profiles. *Lipids*, 32(7): 687-695.
- Pandey, M.K., Monyo, E., Peggy, Ozias-Akins, Liang, X., Guimaraes, P., Nigam, S.N., Upadhyaya, H.D., Janila, P., Zhang, X., Guo, B., Cook, D.R., Bertoli, D.J., Michelmore, R. and Varshney, R.K. 2012. Advances in *Arachis* genomics for peanut improvement. *Biotechnology Advances*, 30: 639-651.
- Patel, M., Jung, S., Moore, K., Powell, G., Ainsworth, C., Abbott, A. 2004. High-oleate peanut mutants result from a MITE insertion into the *FAD2* gene. *Theoretical Applied Genetics*, 108(8): 1492-1502.
- Porter, D.M. 1997. The peanut plant *The American Phytopathological Society*, pp 1-2, Minnesota.

- Sarvamangala, C., Gowda, M.V.C., Varshey, R.K. 2011. Identification of quantitative trait loci for protein content, oil content and oil quality for groundnut (*Arachis hypogaea* L). *Field Crops Research*, 122: 49-59.
- Savage, G.P. and Keenan, J.I. 1994. The composition and nutritive value of groundnut kernels. In Smart, J. (Ed.), *The Groundnut Crop: Scientific basis for improvement*, London, Chapman and Hall. Pp. 173-213.
- Sharma, A.D., Gill, P.K., and Singh, P. 2002. DNA isolation from dry and fresh samples of polysaccharide-rich plants. *Plant Molecular Biology*, 20:415a-415f.
- Smith, F.D., Phipps, P.M. and Stipes, R.J. 1991. Agar plate, soil plate, and field evaluation of fluazinam and other fungicides for control of sclerotinia minor on peanut. *Plant Disease*, 77: 1138-1143.
- Stalker, H.T., Wynne, J.C. 1979. Cytology of interspecific hybrids in section *Arachis* of peanuts. *Peanut Science*, 6: 110-114.
- Singkhom, N., Jogloy, S., Suriharn, B., Kesmala, T., Swatsitang, P., Jaisil, P., Puppala, N. And Patanothai, A. 2012. Types of gene effects governing the inheritance of oleic and linoleic acids in peanut (*Arachis hypogaea* L). *African Journal of Biotechnology*, 11(67):13147-13152.
- Singsit, C., Adang, M.J., Lynch, R.E., Anderson, W.F., Cardineau, G. and Ozias-Akins, P. 1997. Expression of a *Bacillus thuringiensis* cryIA(c) gene in transgenic peanut plants and its efficiency against lesser cornstalk borer. *Transgenic Research*, 6: 169–176.
- Squier, E.G. 1877. *Peru: Incidents of Travel and Exploration in the Land of the Incas*, Macmillan, New York and London.
- Jung, S., Swift, D., Sengoku, E., Patel M., Teule, F., Powell, G., Moore, K., Abbott A. 2000a. The high oleate trait in the cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L). I. Isolation and characterization of two genes encoding microsomal oleoyl-PC desaturases. *Molecular Genetics*, 263(5): 796–805.
- Jung, S., Powell, G., Moore, K., Abbott, A. 2000b. The high oleate trait in the cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L). II. Molecular basis and genetics of the trait. *Molecular Genetics*, 263(5): 806–811.
- Towle, M.A. 1961. *The Ethnobotany of Pre-Columbian Peru*, Aldine Publishing Company, Chicago.
- Upadhyaya, H.D., Sharma, S. and Dwivedi, S.L. 2011. *Arachis*. Springer, pp. 1-19, Heidelberg.
- Vollmann, J., Rajcan, I. 2009. Oil Crops Agronomy department, University of Florida, North Florida Research and Education Center, USA, 9: 287-307.
- Wan, S.B. 2003. *Science of peanut cultivation in China* Shanghai Press for Science and Technology, Shanghai, China.
- Wang, L., Liu, H., Liu, L., Wang, Q., Li, Q., Du, Y., Zhang, J. 2014. Protein contents in different peanut varieties and their relationship to gel property. *International Journal of Food Properties*, 17: 1560-1576.

- Wang, M.L., Barkley, N.A., Chen, Z., and Pittman, R.N. 2011. FAD2 gene mutations significantly alter fatty acid profiles in cultivated peanuts (*Arachis hypogaea* L.). *Biochem Genetics*, 49: 748-759.
- Yu, S., Pan, L., Yang, Q., Min, P., Ren, Z., Zhang, H., 2008. Comparison of the 12 fatty acid desaturase gene between high-oleic and normal-oleic peanut genotypes. *Journal Genetics and Genomics*, 11: 679-685.
- Yu, S.T., Wang, C.T., Yu, S.L., Wang, X.Z., Tang, Y.Y., Chen, D.X., Zhang, J.C. 2010. Simple method to prepare DNA templates from a slice of peanut (*Arachis hypogaea* L.) cotyledonary tissue for polymerase chain reaction. *Journal of Biotechnology*, doi: 10.2225/vol13-issue4-fulltext-9
- Yua, H.T., Yanga, W.Q., Tanga, Y.Y., Wanga, X.Z., Wua, Q., Hub, D.Q., Wanga, C.T., and Yua, S.L. 2013. An AS-PCR assay for accurate genotyping of FAD2A/FAD2B genes in peanuts (*Arachis hypogaea* L.). *Grasas y Aceites*, 64: 395-399.
- Zeile, W.L., Knauft, D.A. and Kelly, C.B. 1993. A rapid non-destructive technique for fatty acid determination in individual peanut seed. *Peanut Science*, 20: 9-11.
- Zhao, S., Li, A., Li, C., Xia, H., Zhao, C., Zhang, Y., Hou, L., and Wang, X. 2016. Development and application of KASP marker for high throughput detection of AhFAD2 mutation in peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Electronic journal of Biotechnology*, 25: 9-12.

ÖZGEÇMİŞ

MUSTAFAPOLAT
mustafapolat1003@gmail.com
m.polat@Enzaden.com.tr



ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans 2014-	Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, Antalya
Lisans 2009-2014	Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, Antalya

MESLEKİ VE İDARİ GÖREVLER

İslahçı Asistanı 15/11/2018-Halen	Enza-Zaden, Antalya
İslahçı Asistanı 01/03/2018-30/10/2018	ARGETO vegetable seeds, Antalya

ESERLER

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

1. Polat, M., Üstün, R., Güden, B., Yol, E., Uzun, B. Identification of chlorophyll content in soybean (*Glycine max* L. Merrill) by using soil plant analytical development (Spad-502 meter), II. International Plant Breeding Congress and EUCARPIA-Oil and Protein Crops Section Conference, 1-6 November 2015, pp 220-220, Antalya, Turkey.

2. Uzun, B., Polat, M., Yol, E., İkten, C. 2017. Molecular detection and characterization of 16Sr-VI group phytoplasma associated with sesame phyllody disease in southern Turkey. *Journal of Biotechnology*, 256: 17-43.

