

**T.C.  
ISPARTA UYGULAMALI BİLİMLER ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
TARLA BİTKİLERİ ANABİLİM DALI**

**ASPIR (*Carthamus tinctorius* L.) ÇEŞİT VE HATLARINDA  
GENETİK AKRABALIK DERECELERİNİN PEROKSİDAZ  
GENLERİ KULLANILARAK BELİRLENMESİ**

**Ayşe ÖZNUR ÇANKAYA**

**Danışman  
Doç. Dr. Muhammet TONGUÇ**

**ISPARTA - 2019**



© 2019 [Ayşe ÖZNUR ÇANKAYA]

TEZ ONAYI

**ASPIR (*Carthamus tinctorius* L.) ÇEŞİT VE HATLARINDA  
GENETİK AKRABALIK DERECELERİNİN PEROKSİDAZ  
GENLERİ KULLANILARAK BELİRLENMESİ**

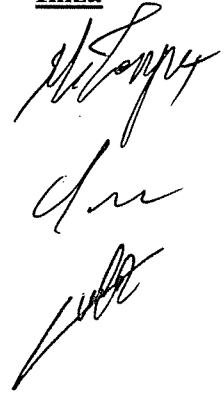
Ayşe ÖZNUR ÇANKAYA tarafından hazırlanan bu tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Tarla Bitkileri Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

İmza

**Danışman** Doç. Dr. Muhammet TONGUÇ  
Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi

**Üye** Doç. Dr. Sabri ERBAŞ  
Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi

**Üye** Prof. Dr. Cafer EKEN  
Aydın Adnan Menderes Üniversitesi



Yukarıdaki Jüri kararı Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun ....../...../..... tarih ve ...../..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

**Prof. Dr. Yusuf UÇAR**  
Enstitü Müdürü

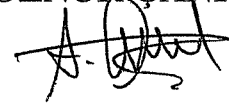
## ETİK BEYANI

Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak ve bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yol ve yardıma başvurmaksızın hazırladığım bu tez çalışmasında;

Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, kullanılan verilerde ve ortaya çıkan sonuçlarda herhangi bir değişiklik yapmadığımı, bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu, tezimle ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara katlanacağımı bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

25/07/2019

Ayşe ÖZNUR ÇANKAYA



## İÇİNDEKİLER

	<b>Sayfa</b>
İÇİNDEKİLER .....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	v
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	vii
1. GİRİŞ .....	1
1.1. Aspir Hakkında Genel Bilgiler .....	1
1.2. Moleküler Markırlar.....	4
1.3. Peroksidaz Gen Ailesi .....	6
2. KAYNAK ÖZETLERİ .....	10
2.1. Aspir Bitkisinin Genel Özellikleri .....	10
2.2. Aspir İle İlgili Yapılan Moleküler Çalışmalar .....	13
2.3. Peroksidaz Genleri Kullanılarak Yapılan Genetik Çalışmalar.....	16
3. MATERYAL VE YÖNTEM .....	19
3.1. Bitki Materyali .....	19
3.2. DNA İzolasyonu.....	19
3.3. PCR Reaksiyonları Ve Jel Analizi .....	21
3.4. Data Analizi .....	22
4. BULGULAR VE TARTIŞMA .....	24
5. SONUÇ VE ÖNERİLER .....	32
KAYNAKLAR .....	33
ÖZGEÇMİŞ .....	39

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### ASPİR (*Carthamus tinctorius* L.) ÇEŞİT VE HATLARINDA GENETİK AKRABALIK DERECELERİNİN PEROKSİDAZ GENLERİ KULLANILARAK BELİRLENMESİ

Ayşe ÖZNUR ÇANKAYA

Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi  
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü  
Tarla Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Muhammet TONGUÇ

Aspir (*Carthamus tinctorius* L.); önemli bir yağ bitkisidir. Bu çalışmada bitki materyali olarak 39 aspir çeşit ve ıslah hattı kullanılmıştır. Mevcut materyallerin 33 tanesi tescilli aspir çeşitleri iken 6 tanesi ise ıslah materyalidir.

Aspirde genetik akrabalık derecelerini belirlemek için peroksidaz gen polimorfizmleri kullanılmıştır. Toplamda 15 peroksidaz markırı kullanılarak 71 bant üretilmiş ve bunlardan 50 tanesi polimorfik olarak bulunmuştur. Markır başına üretilen bant sayısı 1-9 arasında değişim göstermiştir. Markır başına üretilen ortalama bant sayısı 4.7 olarak bulunurken, polimorfik bant sayısı 3.3 olarak bulunmuştur. Gruplandırma çalışmalarında kullanılmak üzere genotiplerin benzerlik katsayıları hesaplanmıştır. Aspir genotipleri arasındaki benzerlik katsayıları genellikle yüksek olmuştur ve benzerlik katsayılarının ortalaması 0.80 olarak bulunmuştur. Gruplandırma analizi sonucunda aspir genotiplerinin 2 ana grup altında toplandığı görülmüştür. Gruplandırmada genotiplerin ülke orjini olarak gruplanmadığı bulunmuştur. Çalışmada gruplandırmaya ilaveten principal koordinat analizi de (PCA) yapılmıştır. PCA analizine göre Shufu, Ziyang, Enana ve Dinçer diğer genotiplerden farklı olarak bulunmuştur.

Sonuç olarak yapılan gruplandırma çalışmaları aspir genotiplerini birbirinden ayırmış fakat genetik benzerlikler yüksek olarak bulunmuştur. Bu durum kullanılan aspir genotiplerinde yüksek oranda benzerlik olduğunu ve ıslah çalışmalarında genetik çeşitliliğin artırılması gerektiğini ortaya çıkarmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Aspir, *Carthamus tinctorius*, Moleküler markır, Peroksidaz

2019, 39 sayfa

## ABSTRACT

M.Sc. Thesis

### DETERMINATION OF GENETIC RELATIONSHIPS BETWEEN SAFFLOWER (*Carthamus tinctorius* L.) CULTIVARS AND LINES VIA PEROXIDASE GENE POLYMORPHISMS

Ayşe ÖZNR ÇANKAYA

Isparta University of Applied Sciences  
The Institute of Graduate Education  
Department of Field Crops

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Muhammet TONGUÇ

Safflower (*Carthamus tinctorius* L.) is an important oil seed crop species. In the present study, total of 39 safflower cultivars and breeding lines were used as plant material. Thirty three of the plant material was registered safflower cultivars and 6 was breeding lines.

Peroxidase gen polymorphisms were used to asses genetic diversity of safflower genotypes. A total of 15 peroxidase markers were used and these markers produced 71 bants and 50 of them was found to be polymorphic among the safflwer genotypes. Markers produced 1-9 bants per assay and average number of bands produced per marker was 4.7, of which 3.3 was polimorphic among the safflower genotypes. Similarity coefficients was calculated and used to produce dendrograms. Similarity coefficients were high among the safflower genotypes and average coefficient value was 0.80. Cluster analysis placed all safflower genotypes under 2 main clusters, and genotypes were not clustered based on their country of origin. Principal coordinate analysis (PCA) placed Shufu, Ziyang, Enana and Dinçer differently than the other genotypes.

Safflower genotypes could be distinguished from each other based on cluster analysis, however; genetic similarity was found to be high among the studied genotypes. Results Show that safflower cultivars are higly similar and it is necessary to increase genetic diversity of safflower germplasm used in breeding studies.

**Key Words:** Safflower, *Carthamus tinctorius*, Molecular marker, Peroxidase

**2019, 39 pages**

## TEŞEKKÜR

Tezimin y¼r¼t¼lmesinde desteğini ve emeğini hiğbir zaman esirgemeyen tez danıŐmanım sayın Doç. Dr. Muhammet TONGUÇ'a, sayın hocalarım Doç. Dr. Arif ŐANLI ve Doç.Dr. Sabri ERBAŞ'a ęalıŐma s¼resince bana desteklerinden dolayı teŐekk¼rlerimi sunarım.

2485-YL-10 No'lu Proje ile tezimi maddi olarak destekleyen S¼leyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Y¼netim Birimi BaŐkanlıęı'na teŐekk¼r ederim.

Tezimin her aŐamasında beni yalnız bırakmayan eŐim Adnan ÇANKAYA, babam Nurettin ÖZNUR, annem Muazzez ÖZNUR ve kardeŐim G¼lg¼n YANDIM' a sonsuz sevgi ve saygılarımı sunarım.

Ayşe ÖZNUR ŐANKAYA  
ISPARTA, 2019



## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
Şekil 1.1. Peroksidaz katalizörlüğünde, hidrojen peroksidin oksidasyon reaksiyonu.....	7
Şekil 4.1. POX11 markırları kullanılarak aspirde 1-23 numaralı genotiplerin jel görüntüleri .....	25
Şekil 4.2. POX12a markırları kullanılarak aspirde 1-23 numaralı genotiplerin jel görüntüleri .....	25
Şekil 4.3. Aspir çeşit ve hatlarının peroksidaz gen polimorfizmleri kullanılarak elde edilen dendogram .....	30
Şekil 4.4. Aspir çeşit ve hatları arasındaki genetik ilişkileri ilk üç faktör bakımından gösteren 2 boyutlu PCA grafiği .....	31
Şekil 4.5. Aspir çeşit ve hatları arasındaki genetik ilişkileri ilk üç faktör bakımından gösteren 3 boyutlu PCA grafiği .....	31



## ÇİZELGELER DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılacak çeşit ve hatların isimleri, gen bankası numaraları, orijin ve tescil durumları .....	20
Çizelge 3.2. Aspir genotiplerinin DNA'larını amplifiye etmek için kullanılan peroksidaz genlerine ait primer sekansları.....	21
Çizelge 3.3. PCR reaksiyonlarının hazırlanmasında kullanılan kimyasallar ve kullanım miktarları .....	22
Çizelge 4.1. Çalışmada kullanılan peroksidaz markırları ve bu markırların ürettikleri bant sayıları .....	24
Çizelge 4.2. Aspir çeşit ve hatlarının Dice koefficient formülüne göre hesaplanan benzerlik değerleri.....	27



## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AFLP	Amplified fragment length polymorphisms
bp	Baz çifti
cm	Santimetre
dk	Dakika
DNA	Deoksiribo nükleik asit
EST	Expressed sequence tags
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hidrojen peroksit
IAA	İndol asetik asit
ISSR	Inter simple sequence repeats
m	Metre
mg	Miligram
mm	Milimetre
M	Molar
mM	Milimolar
nM	Nanometre
pg	Pikogram
PCA	Principal coordinate analysis
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PIC	Polimorfizm information content
POX	Peroksidaz
RAPD	Randomly amplified polymorphic DNA
RFLP	Restriction fragment length polymorphisms
rpm	Revolutions per minute
SNP	Single nucleotide polymorphism
SSR	Simple sequence repeats
USDA	United States Department of Agriculture
°C	Santigrat derece
V	Volt
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre

# 1. GİRİŞ

## 1.1. Aspir Hakkında Genel Bilgiler

Aspir (*Carthamus tinctorius* L.); yalancı safran, Amerikan safranı ve boyacı safranı gibi isimlerle de bilinen, tek yıllık, geniş yapraklı, sarı, kırmızı, turuncu, beyaz ve krem renklerinde çiçeklere sahip, dikenli ve dikensiz çeşitleri bulunan, kurağa dayanıklı ve ticari çeşitlerindeki ortalama yağ oranı % 30-45 arasında değişebilen bir yağ bitkisidir. İlk olarak Asya kıtasının güneyinde, Ortadoğu bölgesinde ve Akdeniz ülkelerinde ekildiği bilinmekte ve tüm dünyaya buradan yayılmış olabileceği kabul edilmektedir.

Asteraceae (Compositae, Papatyagiller) familyası tüm çiçekli bitki familyaları içinde en çok türe sahip olan familyadır. Asteraceae familyası dünya çapında 1100 cinse ve 20 binden fazla türe sahiptir (Cronquist, 1988). Ülkemizde Asteraceae familyası 133 cins ve 1100'den fazla tür ile temsil edilmektedir. Asteraceae familyasından olan *Carthamus* cinsi 25 tür içermektedir ve bu türlerden birçoğu Akdeniz havzasına özgü türlerdir. Aspir (*Carthamus tinctorius* L.) bitkisi *Carthamus* cinsinin kültürü yapılan tek türüdür ve 3000 yıldan beri Ortadoğu'da yağ, baharat ve boya bitkisi olarak kullanılmaktadır (Knowles, 1980). Aspir bitkisinin genetik çeşitlilik merkezinin Uzakdoğu, Ortadoğu, Hindistan-Pakistan, Habeşistan ve Avrupa kıtası olduğu kabul edilmektedir (Knowles, 1969).

Uzakdoğu'da aspir bitkisi sadece çiçekleri için yetiştirilen bir bitkidir. Aspir bitkisinin çiçekleri pek çok hastalığın tedavisinde kullanıldığı gibi, bitkisel çay olarak da tüketilebilmektedir. Çay olarak tüketilmesinin nedeni, çiçeğinde amino asitler, mineral maddeler ve bazı vitaminlerin (B1, B2, B12, C ve E) bulunmasıdır (Wang, 1999; Rahamatalla, 1998). Aspir bitkisi tıbbi olarak, kadınların aybaşı dönemlerinde, kalp-damar rahatsızlıklarında (Hotta, 2002) ve travma sonucu oluşan şişliklerin ve ağrıların tedavisinde ağrı kesici ve ateş düşürücü olarak kullanılabilir (Bocheva, 2003). Bu kullanımların doğruluğu, yapılan klinik ve laboratuvar çalışmaları ile desteklenmiştir. Klinik çalışmalarda, yüksek tansiyonu düşürdüğü (Lin, 1992; Zhang ve Cheng, 2005; Kono, 2002), damarlardaki kan akışını arttırarak dokuların daha fazla oksijen almalarını sağladığı gözlenmiştir. Afganistan ve Hindistan'da aspir

yapraklarından yapılan çay, kadınların düşük yapmasını önlemek için tedavilerde kullanılmıştır. Ortadoğu ülkelerinde, Hindistan'da ve Afrika'da, zehirlenmelerde panzehir olarak (Kneusel, 1994) ve kabızlığı tedavide kullanılmıştır.

Aspir tohumlarından elde edilen yağ, kaliteli yemeklik yağ olarak kullanılmaktadır. Aspir yağı özellikle oleik asit (omega-9) bakımından zengin olup günümüzde oleik asit oranı % 70'in üzerinde olan çeşitleri geliştirilmiştir. Zeytinyağındaki oleik asit oranının % 65-85 oranında olduğu bilinmektedir. İnsan sağlığı açısından önemli olan yemeklik yağın doymamış yağ asidi oranı göz önüne alındığında, aspir yağında doymamış yağ oranı % 80'nin üzerine çıkmaktadır. Zeytinyağında ise bu oran % 81'dir. Özellikle insanlar açısından çok gerekli yağ asidi olan linoleik asit (C18:2) oranı % 75'e kadar ulaştığından önemli bir besin kaynağıdır (Sales, 2005; Vogel ve Browse, 1996).

Aspir tohumlarından yağı alındıktan sonra geriye kalan küspe, içerdiği % 25'e varan ham protein oranıyla hayvancılıkta kullanılabilir iyi bir yem kaynağıdır. Tohum kabukları sanayide pek çok alanda kullanılabilir. Örneğin, daha yoğun ve sert yüzeyli tohumlar kağıt yapımında, hafif ve gözenekli tohumlar fırınlanmış tuğla ve seramik yapımında, yalıtım işlerinde dolgu maddesi olarak, kolay kırılabilir hassas eşyalar için ambalaj paketi yapımında kullanılmaktadır (Anonim, 2005).

Aspir bitkisinin Anadolu'ya gelişinin Orta Asya'dan göç eden Türkler vasıtasıyla olduğu sanılmaktadır. Bulgaristan'dan gelen göçmenlerle bazı dikenli çeşitler Marmara bölgesine 1940-1945 yıllarında getirilerek tarımı yapılmıştır. Ülkemize girişi bu kadar eski olmasına rağmen, maalesef bugüne kadar gerekli önem verilmediğinden Türk tarımındaki yerini bulamamıştır. Ülkemizde, bazı yörelerde dikenli ayçiçeği ve zerdeçal olarak da bilinmektedir.

İlk defa, 1929-1930 yıllarında Eskişehir'de bulunan Sazova Tohum Islah İstasyonunda, aspir bitkisinin yetiştirme teknikleri ve ıslahı üzerine bir çalışma başlatılmıştır. Yaklaşık 10 yıl kadar süren bu çalışmalar, 1939 yılında başlayan II. Dünya Savaşı nedeniyle durma noktasına gelmiştir. Bu süre içerisinde, elde bulunan mevcut yerli popülasyonlarla yapılan çalışmaların sonucunda, 1935-1936 yıllarında,

en iyi verimi gösteren ve aynı özelliklere sahip 5 bitkinin karışımıyla kompozit bir çeşit elde edilmiştir. Elde edilen bu ilk dikensiz kompozit çeşit "Yenice 1813" ismiyle bölge çiftçisine dağıtılmıştır (Anonim, 2005).

Nüfusumuzun artması ve ayçiçeği tarımındaki yaşanan güçlüklerin (yabancı ot olan canavar otunun ayçiçeğinde yaygınlaşması) sonucu ortaya çıkan üretim düşüklüğü, yıllık yağ ihtiyacımızı arttırmıştır. Meydana gelen bu yağ açığının bir dereceye kadar kapatılması için, yaklaşık 19-20 yıllık bir aradan sonra, T.C. Tarım ve Orman Bakanlığının talimatları doğrultusunda, aspir konusundaki çalışmalar, 1958 yılında tekrar başlatılmıştır. Ancak gerekli önem verilmediği için önemli bir gelişme kaydedilememiştir. Bugün sadece Isparta, Eskişehir ve Balıkesir gibi geçit yörelerinde çiftçiler tarafından belirli miktarlarda ekilen, el preslerinde veya diğer yöntemlerle yağı çıkarılarak bölgesel olarak tüketilen, piyasaya arz edilmeyen bir yağ bitkisi konumuna düşmüştür.

Ülkemizde her yıl toplam 1.000.000-1.200.000 ton civarı bitkisel kaynaklı yemeklik yağ tüketilmektedir. Ülkemiz genelinde yetiştirilen değişik yağ bitkilerinden elde edilen yağ miktarı yaklaşık 600.000 tondur. Geri kalan ihtiyacımız ise, her yıl yüz milyonlarca dolar döviz ödenerek dışarıdan ithal yolu ile karşılanmaktadır (Anonim, 2005).

Ülkemiz aspirin genetik çeşitlilik içeren bir bölgesinde olmasına karşın bu çeşitliliğin ortaya çıkarılması için yapılan çalışmalar yetersizdir. Moleküler markırların genetik haritalama, genlere bağlı markır geliştirme, genetik çeşitliliği tespit etmede başarı ile kullanılmalarına karşın aspride kullanım alanları sınırlı olmuştur. Aspride izoenzimler (Zhang, 2001; Carapetian ve Estilai, 1997), RAPD (Yazdi-Samadi vd., 2001; Ravikumar vd., 2005), AFLP (Johnson vd., 2005) markır sistemleri kullanılarak genetik karakterizasyon çalışmaları yapılmış fakat spesifik gen sekansları ile dizayn edilen markırlar kullanılarak aspride genetik karakterizasyon çalışması yapılmamıştır. Ayrıca çok sayıda tescilli çeşit ve ıslah hattını kendi içerisinde karşılaştıran bir çalışmada şu an literatürlerde bulunmamaktadır. Yapılan çalışma ile farklı ülkelerde üretilen aspir çeşit ve hatları genik markırlar kullanılarak karakterize edilmiş ve böylece bu alandaki eksikliğin giderilmesi için bir çalışma yapılmıştır.

## 1.2. Moleküler Markırlar

1960'lı yıllardan sonra DNA'nın yapı ve işleyişinin ortaya çıkarılmasıyla hızla gelişmeye başlayan moleküler biyoloji ve moleküler markır teknolojileri ile bitkilerin genetik yapılarının aydınlatılması, moleküler karakterizasyon, filogenetik çalışmalar, gen haritalamaları ve markır destekli seleksiyon teknikleriyle, diğer alanlarda olduğu gibi tarımda da yeni bir dönem başlatılmıştır. Ayrıca DNA'nın yapısının anlaşılması ve DNA'yı kullanabilecek tekniklerin geliştirilmesi ile canlıların genetik yapısında, geleneksel ıslah metotlarıyla ve doğal üreme-çoğalma süreçleriyle elde edilemeyen değişiklikler yapılması da mümkün hale gelmiştir.

Moleküler biyoloji tekniklerinin geliştirilmesi birçok DNA markır tipinin ortaya çıkmasında büyük rol oynamıştır. Morfolojik markırlar bazı durumlarda genotipik tanımlama amacıyla kullanılabilir. Fakat bu tip markırların kolay elde edilebilmelerine karşın sayılarının yetersiz olması, bazı durumlarda çevresel faktörlerden etkilendikleri için kullanımlarında çeşitli sıkıntılar ortaya çıkabilmektedir. Fenotipik özelliklerin genetik kontrol mekanizmasının tam bilinmemesi, yetersiz varyasyon ve bitkilerde aranılan bazı fenotipik özelliklerin ortaya çıkışının uzun zaman alması; bitki ıslahçıları daha hızlı ve doğru karar vermekte yardımcı olan, DNA markır sistemlerine yönelten diğer sınırlayıcı etkenlerdir.

Morfolojik karakterler, teknolojik özellikler ve türün moleküler biyolojisine ait bilgiler kullanılarak genetik parametreler hesaplanabilir (Tanksley ve McCouch, 1997). Her yöntemin kendine ait özellikleri ve üstünlükleri olmasına karşın genetik çeşitliliği karakterize etmenin en iyi yolu her üç yöntemin birlikte kullanılmasıdır. Bitki genetiği ve ıslahında kullanılabilen pek çok kimyasal ve moleküler markır sistemi günümüzde geliştirilmiş ve düzenli olarak kullanılabilir. Bu markır tiplerine örnek olarak; izoenzimler, RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms) (Botstein vd., 1980), RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) (Williams vd., 1990), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphisms) (Vos vd., 1995), ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) (Zietkiewicz vd., 1994) ve SSR (Simple Sequence Repeats) markırları verilebilir (Tautz vd., 1989).

Moleküler markırlar genetik harita geliştirme, genlerin bağlantı haritaları üzerinde yerini belirleme, genetik çeşitliliği tespit etmede başarı ile kullanılmalarına karşın, asperde kullanım alanları son zamanlara kadar sınırlı olmuştur. Son yıllarda ise moleküler teknikler aspir bitkisinde de kullanılmaya başlanmışlardır. Bitki ıslahında melezlemeler yoluyla genetik işlemlerin ve seleksiyonun etkinliği arttırılmaya çalışılmaktadır. Bunlar çok uzun zaman alan, zahmetli ve yüksek maliyet isteyen işlemlerdir. Bitkilerin genetik potansiyellerinin amaca uygun biçimde yönlendirilmesi açısından son yıllarda protein, izoenzim ve DNA markırları gibi moleküler markırların gerek araştırma gerekse uygulamada kullanımı büyük önem kazanmakta ve bitki ıslahında bunlardan yararlanma olanakları araştırılmaktadır (Halward vd., 1992). Moleküler markırlardan genel olarak kalitatif ve kantitatif özelliklerin ıslahında, seleksiyonda, genetik ve linkage haritalamalarında, çeşit tanımlaması ve korunmasında, genotipler arası genetik uzaklığın belirlenmesinde yararlanılmaktadır. Moleküler markırlar ıslah projelerinin sürelerini kısaltarak maliyetlerini düşürmektedirler.

İlk kullanılan moleküler yöntemlerden olan izoenzimler, protein temelli markırlardır ve yeterli miktarda polimorfizm üretmemektedirler. Daha sonra kullanılmaya başlayan RFLP yöntemi yüksek beceri, donanım isteyen çalışanlar ve ortam gerektirmekte ve bunlardan dolayı pahalı ve zaman alıcı olmaktadır. Ayrıca PCR temelli yöntemlere göre yeterli sayıda polimorfizm üretmek mümkün olmamakta ve yeterli veri üretmek zaman almaktadır (Ragot ve Hoisington, 1993). Daha sonra geliştirilen RAPD yöntemi herhangi bir organizmadan alınan DNA'yı 10 nükleotid uzunluğundaki tesadüfi DNA bazları kullanarak çoğaltmakta bitki ıslahı, ekoloji ve genetik alanında kullanılabilir yeterli miktarda polimorfizmler çalışılan türe bağlı olarak üretilebilmektedir (Welsh ve McClelland, 1990). Fakat RAPD yöntemi ile elde edilen sonuçların farklı gruplar tarafından tekrarlanmasında sorunlar ortaya çıkabilmektedir ve bundan dolayı RAPD markır sisteminin kullanımı azalmıştır. AFLP yönteminde yüksek oranda polimorfizm üretilmesine karşın bu yöntemi kullanacak laboratuvar ve personele ihtiyaç vardır ve yukarıda değinilen diğer yöntemler gibi AFLP yönteminde de üretilen polimorfizmler kodlama yapmayan bölgelerden üretilmektedir.

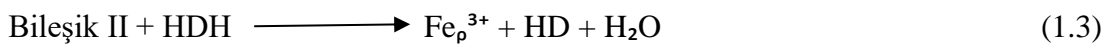
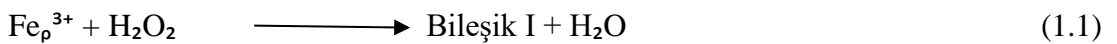


Bununla birlikte, Dünya’da ve ülkemizde yapılan ıslah çalışmalarıyla geliştirilen çeşitlerin üreticiye aktarılmasında ve üreticinin çeşit seçiminde zorluklar yaşanmaktadır. Çeşit, tescil ve sertifikasyonun da stabil, yüksek verimli ve kaliteli çeşitlerin belirlenmesinde, tarla denemeleri ve laboratuvar testleri yanında moleküler markırlar özellikle DNA markırlarının kullanılması ile bu sorunları aşmak olasıdır.

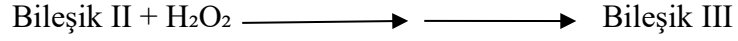
### 1.3. Peroksidaz Gen Ailesi

Peroksidazlar, bitkilerde yaygın olarak bulunan, prostetik grup olarak demir-porfirin ihtiva eden oksidaz grubu enzimlerdir. Bitki organ ve hücrelerinden kolayca izole edilebilirler. Peroksidazların birçok fizyolojik olayla ilişkisinin bulunduğu ve metabolizmada aktif rol oynadığı tespit edilmiştir. Bitkilerde peroksidazların önemli bir fonksiyonu lignin sentezidir. Bunun dışında peroksidazlar endojen IAA (indol asetik asit) sentezinin düzenlenmesi, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detoksifikasyonu, etilen üretimi, krolofil yıkımı ve fenolikler gibi çeşitli organik bileşiklerin oksidasyonu ile de ilişkisi olduğu belirlenmiştir. Her bitki, substrat spesifikliğı ve bitkideki yerleşimi farklı olan çok sayıda peroksidaz izoenzimlerine sahiptir. İzoenzimlerin moleküler ağırlıkları 30.000 ile 50.000 dalton arasında farklılık göstermektedir.

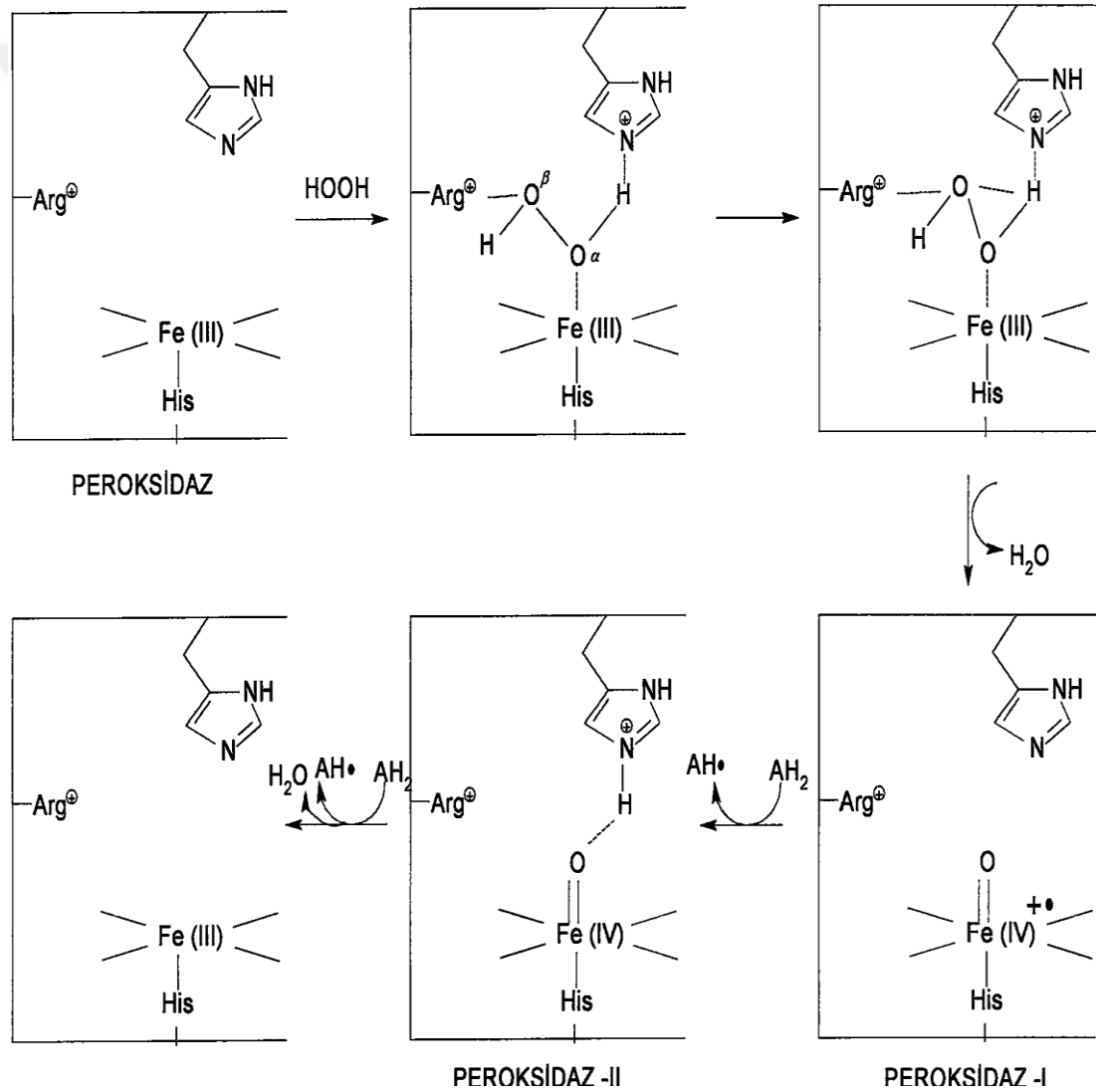
Peroksidazlar çeşitli organik substratların bir elektron oksidasyonunu katalizlerler. İlk adım H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> veya bir organik hidroperoksit tarafından enzimin demir prostetik grubunun iki elektron oksidasyonu ile ilgilidir. Ferriperoksidaz enziminin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile interaksyonu bir kararsız bileşiğin oluşmasıyla sonuçlanır (Reaksiyon 1). Bileşik I olarak adlandırılan bu ara ürün bir elektron vericisiyle (HDH) reaksiyona girerek oksitlenir ve bileşik II oluşur (Reaksiyon 2). Bileşik II bir elektron kaybederek tekrardan enzimin dinlenme formuna (Fe<sub>p</sub><sup>3+</sup>) dönüşür (Reaksiyon 3). Fe<sub>p</sub><sup>3+</sup>, bileşik I ve bileşik II ile ilgili siklus çoğu peroksidaz reaksiyonları için geneldir.



Elektron verici moleküllerin peroksidatif oksidasyonuna ek olarak, çeşitli oksidaz reaksiyonlarının  $H_2O_2$  yokluğunda peroksidaz tarafından katalizlendiği belirlenmiştir. Bu oksidaz reaksiyonuna bileşik I ve bileşik II katılmaz.  $O_2$  süperoksit radikaline ( $O_2^-$ ) indirgenir. Bu oksidaz siklusu ferropersidaz ( $Fe_p^{2+}$ ) ve bileşik III ile ilgilidir.



Peroksidaz enziminin katalizörlüğünde gerçekleşen hidrojen peroksidin oksidasyon reaksiyonu Şekil 1.1’de gösterilmektedir.



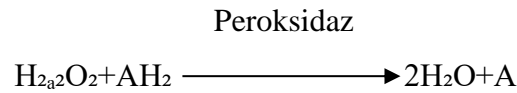
Şekil 1.1. Peroksidaz katalizörlüğünde, hidrojen peroksidin oksidasyon reaksiyonu (Wong, 1995)

Peroksidazlar ve katalazlar, bitkilerde ve hayvanlarda bulunan hidroperoksidazlardır. Hidroperoksidazlar, substrat olarak hidrojen peroksit veya organik peroksit kullanan oksidoredüktazlardır. Hidroperoksidazlar, zararlı peroksitlere karşı vücudu korurlar.

Bitki hücrelerinde peroksidaz esas olarak hücre duvarında, vakuollerde, transport organellerinde ve membrana bağlı ribozomlarda bulunur. Bitkilerdeki peroksidazların çalışması, hücrelerdeki buldukları yer, doku spesifikliği ve bazı izoperoksidazların fonksiyonlarıyla alakalıdır. Farklı izoperoksidazlar farklı substrat spesifikliğine, ısı kararlılığına ve hücresel birimlerde dağılıma özelliğine sahiptirler.

Bundan dolayı farklı amaç için meydana gelen reaksiyonları katalizlerler ve gelişme ile ilgili spesifik olaylara katılırlar. *Nicotiana tabacum*'un kallus, vejetatif form ve çiçek tomurcuklarında, 47 izoperoksidaz bulunmuş ve bunların yarısından çoğunun gelişme ile ilgili spesifik olaylarda rol oynadığı belirlenmiştir (Everse vd., 1991).

Peroksidazlar, birkaç maddeyi elektron akseptörü olarak kullanıp peroksitleri indirgerler. Her ne kadar başlangıçta bitki enzimleri olarak kabul edilmişlerse de peroksidazlar, sütte, lökositlerde, trombositlerde ve eikozanoid metabolizması ile ilgili diğer dokularda bulunmuşlardır. Peroksidazların prostetik grupları protohemdir ki bu, apoprotein gevşek bir şekilde bağlıdır. Peroksidazlar tarafından katalizlenen reaksiyonlarda hidrojen peroksit, elektron akseptörleri olarak görev yapan askorbat, kinonlar ve sitokrom c gibi birçok maddenin zararına olacak şekilde suya indirgenir:



Eritrositlerde ve diğer dokularda, prostetik grup olarak selenyum içeren glutatyon peroksidaz enzimi, indirgenmiş glutatyon tarafından hidrojen peroksit ve lipid peroksitlerinin parçalanmasını katalize eder; böylelikle membran lipidlerini ve hemoglobini, peroksitler tarafından oksidasyona karşı korur.

Son yıllarda genom sekans projelerinin başlatılması ve sekanslama işlemlerinin hız kazanması sonucu birçok bitkiye ait genom ve genlerin sekanslarına ulaşılabilmektedir. Bu genlerden biri olan peroksidaz gen ailesi bitkilerde biyotik ve abiyotik stres koşullarına bağlı olarak ifade edilmektedir (Passardi vd., 2005). Peroksidaz genlerinin diğer gen ailelerine mensup genlerden daha düşük miktarda sekans benzerliğine sahip olduğu bildirilmiştir (Zhang vd., 2001) ve bundan dolayı peroksidaz gen sekansları kullanılarak dizayn edilen primerlerin polimorfizm üretme oranı daha yüksektir. Bu çalışma ile daha önceki çalışmalarda kullanılan peroksidaz gen sekanslarını amplifiye eden primerler kullanılarak aspir çeşit ve hatlarının genetik akrabalık dereceleri belirlenmiştir.



## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

### 2.1. Aspir Bitkisinin Genel Özellikleri

Cronquist (1988) Asteraceae (Compositae, Papatyagiller) ailesi tüm çiçekli bitki aileleri içinde en çok türe sahip olan bir familya olduğunu ortaya koymuştur. Asteraceae ailesinin dünya çapında 1100 cinse ve 20 binden fazla türe sahip olduğunu belirtmiştir.

Asteraceae türlerinde çiçek durumu genel olarak kapitulumdur. Kapitulum çevresi bir veya birden çok brakte ile çevrilidir. Çiçekler genel olarak hermafrodit, ışınsal veya zigamorf simetridir. Kaliks pappus halinde veya yoktur. Petaller 4-5 tane veya birleşik olabilir. Korolla tüpsü veya dilsidir, tüpsü korolla 5 dişlidir. Stamenler petallere bağlıdır ve 5 tanedir. Her çiçek 1 pistil taşır ve ovaryum alt durumlu, tek lokuslu ve plasentasyon bazaldır. Meyve akendir ve ucunda genellikle pappusa sahip veya çıplaktır.

Aspirin yabani atasının *C. palaestinus*, *C. persicus* veya *C. oxychantus* olduğu yapılan sitogenetik, morfolojik ve taksonomik çalışmaların sonucu ileri sürülmüştür (Ashri ve Knowles, 1960). Bu çalışmalara ilave olarak son yıllarda aspirin orijini ve yabani atalarını bulmak için moleküler çalışmalarda yapılmıştır. Sehgal vd. (2008) aspirin kloroplast DNA filojenisi ile yabani atalarının *C. palaestinus* ve *C. oxychantus* olduğunu bildirmişlerdir ve bu iki tür doğal yollarla aspirin ile melezlenebilmektedirler. Fakat çekirdek genlerinin DNA sekansları kullanılarak yapılan başka bir çalışmada ise aspirin yabani atasının *C. palaestinus* olduğu bildirilmiştir (Chapman ve Burke, 2007).

Aspirin DNA miktarı ploidi seviyesine bağlı olarak değişim göstermektedir. Aspirin türlerindeki çekirdek DNA miktarı 2.58 ile 7.46 pg arasında değişmektedir. Aspirin DNA miktarı 2.78 pg iken *C. palaestinus*'un DNA miktarı 2.82 pg ve *C. oxychantus*'un DNA miktarı 2.58 pg'dir (Garnatje vd., 2006).

Aspir çeşit ve hatlarının birçoğunda tohum dormansisi bulunmamaktadır. Dormansinin yokluğunda tohumlar çevre şartları uygun olursa tabla içinde çimlenmektedirler. İnterspesifik çaprazlamalar (*C. tinctorius* x *C. palaestinus*) ile yapılan bir çalışmada tohum dormansisini kontrol eden en az dört genin mevcut olması gerektiği ve genlerin additif olmayan bir çalışma şeklinin olduğu bildirilmiştir (Kotecha ve Zimmerman, 1978).

Dajue vd. (1993) tarafından yapılan bir çalışmada, tarladan hasat edilen tohumlar 20 °C'de çimlenme testlerine tabi tutulmuşlar ve tohumların en az %60'ının çimlenmesi için gereken sürenin 60 saat olduğunu bulmuşlardır. Bununla beraber Türkiye ve Çin'den toplanan bazı ekotiplerin çimlenme için en az 120 saate ihtiyaç duyduğu bildirilmiştir.

Baydar (2000) *C. tinctorius* türünde giberellik asidin bitkilerde tohum verimi, yağ ve yağ asidi sentezi üzerine etkisini araştırdığı bir çalışmada, giberellik asidin kısırlığa neden olduğu böylece hibrit tohum üretiminde giberellik asitten pratik olarak faydalanılabileceğini belirtmiştir. Bunun yanında tohum verimini önemli oranda düşürdüğü fakat yağ asidi sentezi üzerine önemli bir etkisinin olmadığı görülmüştür.

Aspir, tohumundaki yağı için yetiştirilen bir bitkidir ve tohumdaki yağ miktarı en önemli agronomik ve kalite özelliklerinden birisidir. Aspir tohumundaki ana yağ asitleri palmitik (C16:0), stearik (C18:0), oleik (C18:1), ve linoleik (C18:2) asitlerdir. Bunların haricinde laurik (C12:0), myristik (C14:0), palmitoleik (C16:1), linolenik (C18:3), ve arakidik (C20:0) yağ asitleri de düşük oranlarda bulunmaktadır.

Samancı ve Özkaynak (2003) Türkiye'de Akdeniz Üniversitesi deneme çiftliğinde *C. tinctorius* türünün farklı varyetelerinde ekim tarihinin tohum verimi, yağ miktarı ve yağ asidi bileşimi üzerine etkilerini incelemişlerdir. Dikim tarihinin gecikmesiyle palmitik, stearik, oleik asit miktarının azaldığı, linoleik asit oranının arttığı gözlemlenmiştir. Dikim tarihinin gecikmesiyle tohum miktarı ve yağ oranında da düşüş olduğu saptanmıştır.

Knowles ve Hill (1964) aspirde oleik ve linoleik yağ asitleri miktarının bir lokustaki üç allel (*Ol*, *ol<sup>l</sup>* ve *ol*) tarafından kontrol edildiğini ve bu allelerin kombinasyonu ile yağ asitleri farklı 6 tip elde edildiğini bildirmişlerdir. Bu sonuçlara göre; *OlOl* allel çiftinin yüksek linoleik asit (%75-80) ve düşük oleik asit (%10-15) içeriğinden, *ol<sup>l</sup>ol<sup>l</sup>* allel çiftinin orta seviyede oleik asit (%35-50) ve orta seviyede linoleik asit (%42-54) içerdiğinden, buna karşılık *olol* allel çiftinin düşük linoleik asit (%12-30) ve yüksek oleik asit (%64-83) içeriğinden sorumlu olduğunu saptamışlardır. Aynı araştırmacılar, *Olol<sup>l</sup>* allellerini taşıyan genotiplerin %10-15 oleik asit ve %70-75 linoleik asit, *Olol* allellerini taşıyan genotiplerin %18-35 oleik asit ve %60-75 linoleik asit ve *ol<sup>l</sup>ol* allellerini taşıyan genotiplerin ise %55-63 oleik asit ve %30-40 linoleik asit içerdiğini belirtmişlerdir.

Yirmi üç aspir çeşidi kullanılarak İspanya'da yapılan bir çalışmada, çeşitlerin ortalama yağ miktarlarının %28 olduğu ve çeşitlerin yağ miktarlarının %19.5-40 arasında değiştiği bildirilmiştir (Pascaul-Villalobos ve Alburquerque, 1996). Aynı çalışmada çeşitlerin genel olarak yüksek linoleik asit içeren çeşitler olduğu ve sadece bir tanesinin yüksek oleik asit içeren bir çeşit olduğu bulunmuştur. Linoleik asit miktarı yüksek çeşitlerde linoleik asit içeriği %78-82 arasında değişim göstermiştir.

Yağ asitleri içeriği farklı olan genotipleri bulmak için yapılan bir çalışmada (Valesco ve Fernandez-Martinez, 2000); 31 aspir ekotipi yağ asitleri kompozisyonlarını belirlemek amacıyla 2 yıl boyunca incelenmiştir. Bu amaçla yaptıkları araştırmada, ilk yıl sonunda yağ asitleri kompozisyonları farklı 9 aspir ekotipi belirlemişlerdir. Bu ekotipler içinde; yüksek seviyede palmitik asit içeriğine (>%9), orta seviyede stearik asit içeriğine (>%4), yüksek seviyede stearik asit içeriğine (>%5.5), yüksek seviyede oleik asit içeriğine (>%75-81), doymamış yağ asitleri seviyesi çok düşük (<%5.5) olan çok yüksek seviyede oleik asit içeriğine (>%85), doymamış yağ asitleri seviyesi çok düşük (<%6.5) olan çok yüksek seviyede linoleik asit içeriğine (>%85) sahip ekotipler bulunmuştur.

Aspirde tohum verimini etkileyen faktörlerin etkilerinin incelenmesinde her bir faktörün direkt ve dolaylı etkisi path analizi kullanılarak yapılabilir. Path analizinde tohum verimi bağımlı değişken olarak kullanıldığında bitki boyunun, tabla sayısının,

ilk yan dalın yüksekliğinin, gövde çapının, tabla çapının, bir tabladaki tohum sayısının ve 1000 tane ağırlığının verim üzerine direkt pozitif etkilerinin olduğu ve bitki başına düşen yan dalların sayısının ve yağ miktarının ise direkt negatif etkilerinin olduğu gözlenmiştir (Arslan, 2007). Başka bir çalışmada ise biyolojik verim, tabla başına tohum ağırlığı, bitki boyu, 1000 tane ağırlığı ve çiçeklenme süresi uzunluğunun tohum verimi üzerine direkt önemli etkilerinin olduğu bildirilmiştir (Bidgoli vd., 2006). İlk yan dalın yerden yüksekliği ise tohum verimi üzerine direkt olarak negatif etki ettiği bildirilmiştir.

## 2.2. Aspir İle İlgili Yapılan Moleküler Çalışmalar

Bassiri (1977) asit fosfotaz izoenzimini kullanarak 14 aspir kültüvarı ile 9 *C. oxyacanthus* ekotipini ayırt etmeyi başarmıştır. Carapetian ve Estilai (1997) 9 izoenzim kullanarak 20 aspir kültüvarını incelemiştir. Çalışmada 5 enzim monomorfik iken 4 tanesi kültüvarlar arasında polimorfizm üretmiştir. Ayrıca Zhang (2001) 17 farklı ülkeden 89 aspir ekotipinde izoenzim çalışmaları yapmıştır. Analizler sonucunda 7 izoenzim 15 polimorfizm üretmiştir ve aspir ekotipleri 4 grup altında toplanmıştır.

Sehgal ve Raina (2005) Hindistan'da yetiştirilen 14 aspir kültüvarı kullanarak RAPD, ISSR ve AFLP markırları ile genetik benzerlik çalışması yapmışlardır. Çalışma sonunda ortalama polimorfik bant sayısı RAPD markırları için 2.4, ISSR markırları için 1.3 iken AFLP markırları için 20.5 olarak bulunmuştur ve 2 AFLP markırınının 14 kültüvarı ayırt etmek için yeterli olduğunu bildirmişlerdir.

Yang vd. (2007) 32 farklı ülkeden 48 aspir genotipi kullanarak ISSR markırları ile moleküler karakterizasyon çalışması yapmıştır. Çalışma sonunda 22 ISSR primeri ile 355 polimorfik bant üretilmiş ve tüm genotipler birbirlerinden ayırt edilebilmişlerdir.

Johnson vd. (2007) USDA (United States Department of Agriculture) koleksiyonunda bulunan sekiz coğrafi bölgeden gelen aspir bitkileri ile coğrafi bölgeler içinde bulunan genetik çeşitliliği ve 93 ekotip ile de ekotipler arası genetik ilişkileri AFLP markerleri ile incelemiştir. Çalışmada çeşitlerin genetik çeşitliliğinin en düşük ve doğal



popülasyonlar içindeki genetik çeşitliliğin en yüksek olduğu bulunmuş fakat genel olarak da ekotiplerin içerdikleri çeşitliliğin düşük olduğu görülmüştür.

36 aspir genotipi 14 RAPD primeri kullanılarak moleküler karakterizasyon çalışmasına tabi tutulmuştur (Wachira vd., 2009). Çalışma sonunda 36 genotip 8 farklı gruba ayrılmıştır.

Yirmi dört farklı ülkeden toplanan 85 genotipin kullanıldığı genetik çeşitlilik çalışmasında en yüksek polimorfizm üreten markır sisteminin AFLP olduğu, bu markır sistemini sırasıyla SSR ve RAPD markır sistemlerinin takip ettiği bulunmuştur. Türkiye, İran, Afganistan gen havuzlarının en yüksek genetik çeşitliliğe, Uzakdoğu gen havuzlarının ise en düşük genetik çeşitliliğe sahip oldukları bulunmuştur (Sehgal vd., 2009).

Chapman vd. (2009) EST (Expressed Sequence Tags) sekansları geliştirerek aspride 384 EST-SSR bulmuşlar fakat bunlardan sadece 104 tanesi test edilen aspir genotiplerinde polimorfizm üretmiştir. Elde edilen SSR primerleri *C. palaestinus* ve *C. oxyacanthus* türlerinde de test edilmiş ve her üç türde üretilen allel sayısı 2-15 arasında değişmiştir.

EST kataloglarından aspir için farklı araştırmacılar tarafından 74 adet SSR markırı daha üretilmiş ve bunlardan 5 tanesinin polimorfik olduğu bildirilmiştir. Polimorfik markırlar Hindistan'da üretilen hibrit aspir tohumlarının genetik saflığını ayırt etmek için kullanılmışlardır (Naresh vd., 2009).

Aspirin Mezapotamya'da 10.000 yıl önce kültüre alındığı bilinmektedir. Fakat aspirin morfolojiye bağlı sınıflandırılmalar kullanılarak 10 farklı çeşitlilik merkezi olduğu belirtilmiştir. SSR markır ve kloroplast DNA polimorfizmleri Orta Doğu'nun aspirin genetik çeşitliliğinin merkezi olduğu ve aspirin 5 farklı çeşitlilik merkezine daha sahip olduğunu ortaya çıkarmıştır (Chapman vd., 2010).

Hindistan orjinli 148 aspir genotipi ile SSR markırları kullanılarak yapılan bir çalışmada; SSR başına üretilen allel sayısının 3.6, PIC değerinin 0.284 olduğu

bulunmuştur. Gruplandırma analizi ile genotiplerin %52'si 4 gruba dağılırken; %48'i dağınık olarak gruplandırılmıştır ve popülasyonların arasındaki genetik çeşitlilik değerlerinin yüksek çıkması popülasyonların birbirinden oldukça farklı olduğunu ortaya çıkarmıştır (Kiran vd., 2017).

Amerika'da aspirin genetik çeşitliliğini belirlemek üzere SNP (single nucleotide polymorphism) markırları ile yapılan bir çalışmada 134 genotip, 48 ıslah hattı ve 8 yabani aspir kullanılmıştır. Yapılan karşılaştırmalarda ıslah hatlarında gözlenen genetik çeşitlilikteki azalmanın çok az olduğu, fakat aspir ehlileştirmesinde allelik çeşitliliğin çok azaldığı bulunmuştur. Tüm aspir genotiplerinin ortak bir atadan türetildiği açığa çıkmıştır (Pearl ve Burke, 2014).

Lee ve Chow (2014) SSR markırları geliştirmek için 509 primer geliştirmişler ve bunlardan 30 polimorfik SSR markırı kullanarak 100 genotipi taramışlardır. Ortalama allel sayısı 2.8 ve PIC değeri 0.386 olarak bulunmuştur.

Database kullanılarak bulunan 109 EST-SSR primerinden 42 tanesinin, *C. lanatus*, *C. oxycanthus* ve *C. tinctorius* genotipleri üzerinde polimorfizm ürettikleri tespit edilmiştir. Primer başına üretilen bant sayısı 2-8 arasında değişmiş ve PIC değerleri 0.04-0.695 arasında bulunmuştur. Gruplandırma analizi ile türler birbirlerinden ayrılmışlardır (Barati ve Arzani, 2012).

Aspirde genetik haritalama çalışmalarını yapmak üzere popülasyonlar geliştirilmeye başlanmıştır (Mayerhofer vd., 2008). 138 bireyden oluşan F<sub>2</sub> haritalama popülasyonu Centennial ve NP-12 anaçlarının melezlenmesinden, 120 bireyden oluşan interspesifik BC<sub>1</sub> popülasyonu *C. oxycanthus* ve Centennial'ın melezlemesinden üretilmiştir. Haritalama için ko-dominant RFLP ve SSR markırları kullanılmış ve her iki haritalama popülasyonunda 12 bağlantı grubu oluşturulmuştur. F<sub>2</sub> popülasyonunda bağlantı grupları 9-379 cm, BC<sub>1</sub> popülasyonunda ise 3-44 cm uzunluğunda değişmiştir.

Dinçer 5-118 ile Remzibey-05 çeşitlerinin çaprazlanması ile geliştirilen ve F<sub>6</sub> seviyesine kadar ilerletilen rekombinant saf hatların (RIL) aspirde genetik haritalama popülasyonu olarak kullanılıp kullanılmayacağı incelenmiştir. Çalışmada toplam 16

RIL hattı ve anaçlar arasındaki polimorfizmler 10 AFLP primer kombinasyonu kullanılarak incelenmiştir. AFLP primerleri ile toplam 439 bant üretilmiş ve bu bantlardan 20 tanesi anaçlar ve hatlar arasında polimorfizm üretmiştir. Primer kombinasyonu başına üretilen polimorfizm sayısı 0-4 arasında değişmiştir. Elde edilen polimorfik bantlardan 9 tanesi beklenen orandan sapma göstermiştir (Tonguç vd., 2011).

Aspir ve yabancı türü olan *C. palaestinus* arasında oluşturulan RIL popülasyonu kullanılarak 2 milyondan fazla SNP haritalanmıştır (Bowers vd., 2016). Genetik harita ile her bir aspir kromozomu üzerine 75 bin-339 bin arasında SNP haritalanmıştır. Aspir genetik haritasının toplam uzunluğu 959 cm olarak hesaplanmış ve bağlantı gruplarının uzunlukları 42-102 cm arasında değişmiştir.

### **2.3. Peroksidaz Genleri Kullanılarak Yapılan Genetik Çalışmalar**

Köksal vd. (2005) Türkiye'nin çeşitli bölgelerinden toplanan 20 adet taze fasulye genotipi arasındaki akrabalık ilişkilerini fenotipik karakterlere ek olarak moleküler markırlardan peroksidaz izoenzim profili kullanarak belirlemişlerdir. Çalışmada peroksidaz izoenzim markırları aktif poliakrilamid jel elektroforez (PAGE) tekniği kullanılarak belirlenirken, fenotipik markırlar olarak tohum karakterlerinden yararlanmışlardır. Bir dendogram fenotipik markırlara göre, diğer dendogram ise izoenzim profiline göre oluşturulmuş ve her iki dendogram Mantel testi kullanılarak karşılaştırılmış ve sonuç olarak incelenen genotipleri 4 grup altında toplamışlardır.

Manda otu (*Buchloe dactyloides*) ve 8 farklı monocot türünde peroksidaz genleri kullanılarak genetik çeşitlilik çalışılmıştır. Yirmi sekiz manda otu genotipinde 14 peroksidaz primeri toplamda 64 band üretmiş ve bunlardan 52 tanesi (%79) polimorfik olarak bulunmuştur. Gruplandırma analizinde manda otu benzerlik değerleri 0.66-0.90 arasında değişmiştir ve peroksidaz genlerinin genetik çeşitliliği belirlemek için SRAP markırları kadar kullanışlı olduğu bildirilmiştir (Gülşen vd., 2007).

Gülşen vd. (2010) tarafından 192 elma genotipi kullanılarak yapılan bir çalışmada 14 peroksidaz markırı kullanılmış ve 15 markır polimorfik olarak bulunmuştur. Markır

başına 1-5 arasında bant üretilmiş ve ortalama bant sayısı 3.5 olarak bulunmuştur. Gruplandırma sonucunda benzerlik değerleri 0.56-0.98 olarak bulunmuştur. 192 elma genotipi 4 farklı grup altında toplanmıştır. Moleküler markırlar ve genotiplerin külleme skorları arasında ve gruplandırmalarda istatistiki olarak önemli bağlantılar bulunmuştur.

Farklı turunç türlerine ait 80 genotiple yapılan bir çalışmada turunç türlerinde peroksidaz markırları toplamda 148 bant üretmiştir. Üretilen bantlardan biri hariç diğer hepsi polimorfik olarak bulunmuş ve polimorfizm oranı %99 olarak tespit edilmiştir. Markır başına üretilen bant sayısı 6-16 arasında değişim göstermiş ve markır başına üretilen ortalama bant sayısı 10.6 olmuştur. Ortalama PIC değeri 0.82 olarak bulunmuştur. Gruplandırma analizi ile kullanılan *Citrus* genotiplerinin 6 gruba ayrıldıkları bulunmuştur (Uzun vd., 2014).

Karpuzda peroksidaz markırları kullanılarak yapılan bir çalışmada, peroksidaz genlerinin 258 karpuz genotipinde 150 bant ürettiği ve bunların 147'sinin polimorfik olduğu bildirilmiştir (Öcal vd., 2014). Primerler 6-18 arasında değişen sayıda bant üretmiş ve ortalama bant sayısı markır başına 12.5 olarak bulunmuştur. İki primer çifti ise herhangi bir bant üretmemiştir. Moleküler varyans analizi açığa çıkarılan polimorfizmin %54'ünün popülasyonlar içinden, %39'unun coğrafi orjinlerden ve %7'sinin popülasyonlar arasından kaynaklandığını ortaya çıkarmıştır.

Mercimek türlerinde direnç genleri analogları (RGA), WRKY gen polimorfizmleri ve peroksidaz genleri ile genetik çeşitliliği araştırmışlardır. Çalışmada 7 peroksidaz markırını toplamda 66 bant üretmiş bunlardan 59 tanesi mercimek türleri arasında polimorfik olarak bulunmuştur. RGA markırları toplam 103 bant üretmiş, 81 tanesi polimorfik olarak bulunurken, WRKY markırları 52 bant üretmiş ve 47 tanesi polimorfik olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara göre polimorfizm oranı en yüksek markırlar WRKY ve peroksidaz markırları olmuştur (Sarı vd., 2016).

Biber önemli bir kültür bitkisidir. Biberde peroksidaz genleri kullanılarak yapılmış moleküler karakterizasyon çalışmasında, 3 türe ait 71 biber genotipi kullanılmıştır. 14 peroksidaz markırını toplamda 139 bant üretmiştir ve markır başına üretilen bant sayısı

9.9 olarak bulunmuştur. PIC değeri 0.09-0.22 arasında değişmiştir. Yapılan gruplandırma çalışmalarında *Capsicum annuum*, *C. frutescens* ve *C. chinense* türlerine ait genotipler birbirlerinden ayrılmışlardır. Gruplandırma analizinde coğrafi konum ve gruplar arasında bir bağ bulunamamıştır (Akyavuz vd., 2018).



### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Bitki Materyali

Çalışmada bitki materyali olarak aspir çeşit ve ıslah hatları kullanılmıştır. Türkiye orijinli çeşitler Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü (Menemen, İzmir) ve diğer çeşit, ıslah hatları USDA Western Regional Plant Introduction Station (Pullman, WA)'dan temin edilmiştir. Çalışmada toplam 39 aspir çeşit ve ıslah hattı kullanılmıştır. Bu çeşitlerden üç tanesi Türkiye'de tescil edilmiştir (Remzibey-05, Dinçer 5-118, Yenice 5-38). Diğer çeşit ve hatlar ise Çin (Ziyang, Yuyao, FO-2, Shufu, Huaxian), Meksika (San Jose 89, Sahuaripa 88, Quiriego 88), Kanada (AC Sunset, AC Sterling, Lesaf 414, Saffire), İspanya (Enana, CH 353, Rinconada) ve ABD (21) orijinli bitki materyalidir. Bu materyallerin 33 tanesi tescilli aspir çeşitleri iken 6 tanesi ise ıslah materyalidir (CH 353, Arizona Safflower Composite III, Lesaf 414, 4022, PCA, Enana) (Çizelge 3.1).

#### 3.2. DNA İzolasyonu

Örneklerin DNA'ları CTAB metodu kullanılarak Doyle ve Doyle (1990) protokolüne göre çıkarılmıştır. DNA çıkarmak için yaklaşık 1 cm<sup>2</sup>'lik yaprak kullanılmıştır. Yaprak örnekleri havan ile ezilmiş ve üzerlerine %1'lik β-mercaptoethanol içeren 750 µl CTAB çözeltisi eklenmiş ve 1.5 ml'lik eppendorf tüpler içerisine aktarılmışlardır. Tüpler ısıtıcı blok içinde 65°C'de 30 dk inkübe edilmiş ve soğutulduktan sonra üzerlerine 750 µl fenol:kloroform:izoamiloalkol (25:24:1) ilave edilmiş ve karıştırılmıştır. Daha sonra oda sıcaklığında mikro santrifüj ile 15000 rpm'de 7 dk santrifüj edilmiş ve supernatant pipet yardımı ile yeni eppendorf tüplere aktarılmıştır. Aktarılan supernatantın üzerine 0.08 hacminde 7.5 M soğuk amonyum asetat ve 0.54 hacminde soğuk isopropanol ilave edilerek tüpler karıştırılmış ve 1 saat süre ile -20 °C'de inkübe edilmişlerdir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan çeşit ve hatların isimleri, gen bankası numaraları, orijin ve tescil durumları

Sıra No	Gen Bankası No	Çeşit Adı	Orijin	Tescil Durumu
1	PI 537110	Quiriego 88	Meksika	Çeşit
2	PI 537111	Sahuaripa 88	Meksika	Çeşit
3	PI 561703	San Jose 89	Meksika	Çeşit
4	PI 572475	Saffire	Kanada	Çeşit
5	PI 592391	AC Sunset	Kanada	Çeşit
6	PI 559909	AC Stirling	Kanada	Çeşit
7	PI 603206	Lesaf 414	Kanada	Islah hattı
8	PI 610263	Enana	İspanya	Islah hattı
9	W6 16828	Rinconada	İspanya	Çeşit
10	W6 16833	CH-353	İspanya	Islah hattı
11	TR 69497	Dinçer 5-118	Türkiye	Çeşit
12	TR 69498	Yenice 5-38	Türkiye	Çeşit
13	TR 69499	Remzibey-05	Türkiye	Çeşit
14	PI 538025	Montola 2000	ABD	Çeşit
15	PI 601166	Oker	ABD	Çeşit
16	PI 572465	4022	ABD	Islah hattı
17	PI 572439	PCA	ABD	Islah hattı
18	PI 572418	Arizona Safflower Comp III	ABD	Islah hattı
19	PI 572421	Frio	ABD	Çeşit
20	PI 560177	Oleic Leed	ABD	Çeşit
21	PI 538779	Centennial	ABD	Çeşit
22	PI 601506	S-517	ABD	Çeşit
23	PI 572472	Rehbein	ABD	Çeşit
24	PI 525458	Finch	ABD	Çeşit
25	PI 572436	Leed	ABD	Çeşit
26	PI 572415	55-633	ABD	Çeşit
27	PI 508098	Hartman	ABD	Çeşit
28	PI 537695	Ole	ABD	Çeşit
29	PI 572434	UC-1	ABD	Çeşit
30	PI 572414	US-10	ABD	Çeşit
31	PI 572471	Sidwill	ABD	Çeşit
32	PI 537694	Royal	ABD	Çeşit
33	PI 537692	Gila	Çin	Çeşit
34	PI 514632	Ziyang	Çin	Çeşit
35	PI 514631	Yuyao	Çin	Çeşit
36	PI 514624	Shufu	Çin	Çeşit
37	PI 514620	Huaxian	Çin	Çeşit
38	PI 506426	FO-2	ABD	Çeşit
39	PI 525457	Girard	ABD	Çeşit

Daha sonra 16000 rpm'de 3 dk santrifüj edilmiş ve supernatant atık olarak boşaltılmıştır. Tüplerin dibinde kalan DNA üzerine 750 µl %70'lik etanol ilave edilerek DNA yıkanmış ve 16000 rpm'de 1 dk santrifüj edilmiştir. DNA tekrar 750 µl

%95'lik etanol ile yıkanmış ve supernatant boşaltıldıktan sonra tüpler oda sıcaklığında ağızları açık şekilde 1 saat bekletilmiştir. Kuruyan DNA'nın üzerinde 100 µl TE (1 mm Na<sub>2</sub>EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 8.0) çözeltisi ilave edilmiştir. Elde edilen DNA'ların kalitesi ve miktarı spektrofotometrede OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> dalga boylarında okunarak tespit edilmiş ve tüm DNA'lar kullanıncaya kadar -20 °C muhafaza edilmiştir.

### 3.3. PCR Reaksiyonları Ve Jel Analizi

Çalışmada kullanılan primer sekansları daha önce yayınlamış primer sekanslarıdır (Gülşen vd., 2007). Çalışmada kullanılan peroksidaz primer sekansları Çizelge 3.2.'te verilmiştir.

Çizelge 3.2. Aspir genotiplerinin DNA'larını amplifiye etmek için kullanılan peroksidaz genlerine ait primer sekansları

Primer	Forward sekans (5'-3')	Primer	Reverse sekans (5'-3')
POX1F	CTCGACCTACAAGGAC	POX1R	ATGTAGGCGCTGGTGA
POX2F	CTCGACGTCAAGGACCTC	POX2R	GCCCATCTTCACCATGG
POX3F	CAACGAGACCAACATCGA	POX3R	CCTGATCTGTCCCTGCG
POX4F	TTACGCTACATACAATTCAA	POX4R	ACTCGACTGCGACCAG
POX5F	CACACGATCGGGGCGATC	POX5R	AATCTGCCGGCAGAGCC
POX6F	TACCCGACGGTGAGC	POX6R	CTTGATCGTACTGACTCTA
POX7F	CTCGACACAACCGATGTTG	POX7R	TTCACAACTAGTCACAAATCACA
POX8F	CACCATCAAGAGCGTCATAAC	POX8Ra	TTGGGCGTCGTCGTCT
POX9F	GGCGTCGGCGTCG	POX9R	ATCGGGAAGCTTCCCCTC
POX10Fa	CCACGCCCTCATCGC	POX10Ra	CATCTGGCCGTGCGTC
POX11F	CCTTCTTCTTGCCATCTTGC	POX11R	CATATCGCTCCACGACCTTT
POX12Fa	CGAGCTGAGAGTGAATCGATC	POX12Ra	CTTGAACGCCTGGATGAGC
POX12Fb	CTCTCTCCTGGGGTTCTATGC	POX12Rb	GCGAGCGTGGTGTATGTC
POX12Fc	CGTGAGGTGGCACCTCAC	POX12Rb	GCGAGCGTGGTGTATGTC
POX13F	GACGGTCTATTGGGAAGAAG	POX13R	CATGAAAGTGATGAGATGGC
POX14F	CTCATCGTTAACGTCGCATC	POX14R	GATGCAAGGAGTATAGTGCAAATG



PCR reaksiyonları 15 µl toplam hacimde olacak şekilde hazırlanmıştır. PCR reaksiyonlarının hazırlanmasına ait bilgiler Çizelge 3.3.'te verilmiştir.

Çizelge 3.3. PCR reaksiyonlarının hazırlanmasında kullanılan kimyasallar ve kullanım miktarları

PCR bileşeni	Miktar (µl)
Distile saf su (ddH <sub>2</sub> O)	5.8
10X PCR buffer	1.5
Bovine Serum Albumin (0.8 µg/µl)	1.2
MgCl <sub>2</sub> (2.5 mm)	1.2
dNTP karışımı (20 mm)	0.5
Taq polimeraz	0.2
Primer (40 mm)	3.0
DNA	2.0

PCR karışımları MyCycler PCR cihazında amplifiye edilmişlerdir. PCR reaksiyonu toplam 34 döngüden meydana gelmiştir. Her bir döngü 1 dk 94 °C'de eritme, 1 dk 48-54 °C'de bağlanma (primerlerin erime derecelerine bağlı olarak) ve 1 dk 72 °C'de uzatmadan meydana gelmiştir. PCR işleminin başında 2 dk 94 °C'de başlangıç eritmesi ve sonunda ise 5 dk 72 °C'de son uzatma işlemi de yapılmıştır.

Elde edilen PCR ürünleri 1X TBE tamponu ile hazırlanan %2.5 agaroz jeller üzerinde 100 V'da 4 saat koşturularak ayrıştırılmıştır. Jeller etidyum bromit (10 mg/ml) ile boyanıp Kodak jel görüntüleme sistemi ile UV ışığı altında fotoğrafları çekilmiştir. 100 bp moleküler weight markır elde edilen ürünlerin uzunluklarını karşılaştırmak için PCR ürünleri ile birlikte koşturulmuştur.

#### 3.4. Data Analizi

Jeller üzerinde açıkça seçilebilen ve kolaylıkla sayılabilen bantlar var ve yok (1/0) olarak kaydedilmiştir. Oluşturulan veri matrisi Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System (NTSYS-pc ver. 2.2, ROHLF, 1990) programı kullanılarak incelenmiştir. Benzerlik matrisi SIMQUAL alt programı ve Jaccard's

$[a/(a+b+c)]$  benzerlik koefficient katsayısı kullanılarak hesaplanmıştır. Formülde  $a =$  x ve y çeşitleri arasındaki ortak bant sayısı,  $b =$  x çeşidinde olan fakat y çeşidinde olmayan bantların sayısı ve  $c =$  y çeşidinde olan fakat x çeşidinde olmayan bantların sayısıdır. Gruplandırma SAHN alt programı ve unweighted paired group method using arithmetic averages (UPGMA) metodu kullanılarak yapılmıştır. Moleküler verilere ait principal component analizi (PCA) için ORDINATION alt programından eigen değerleri ve vektör değerleri hesaplanmıştır. UPGMA metodu ile oluşturulan gruplandırmanın benzerlik matrisi ile olan uyumluluk derecesini tespit etmek için Mantel's z test değerleri NTSYS-pc programı içindeki MX COMP alt programı kullanılarak hesaplanmıştır. Markırlara ait PIC değerleri GDDOM programı kullanılarak hesaplanmıştır (Abuzayed vd., 2016).

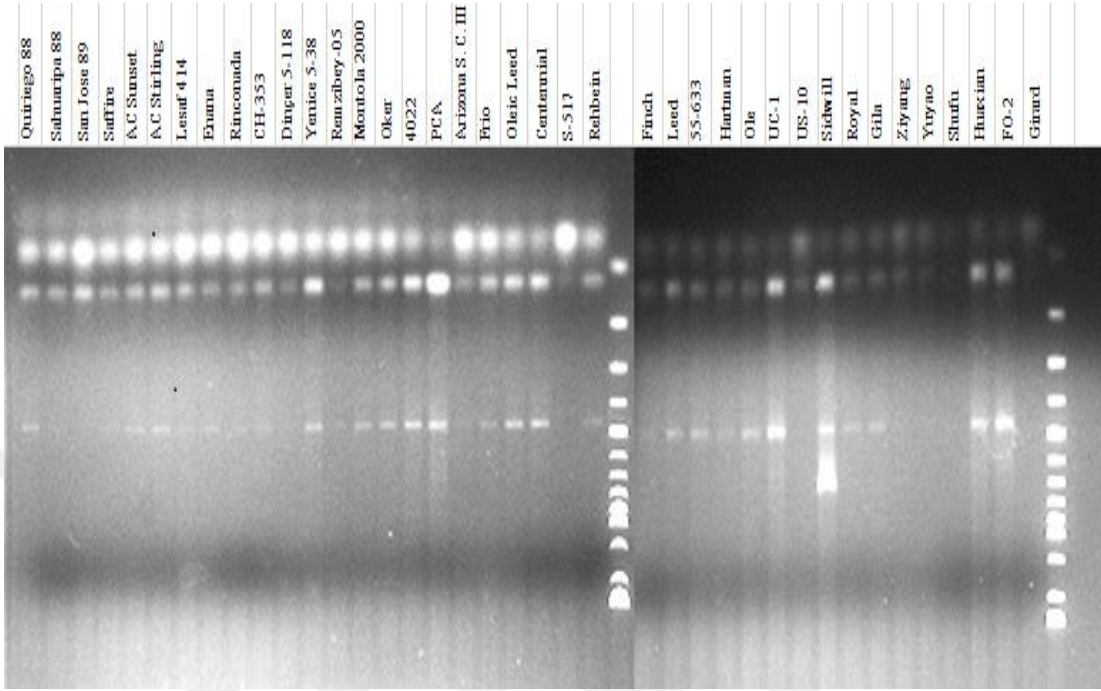
#### 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Çalışmada 39 aspir genotipi içerisinde peroksidaz gen polimorfizmlerini tespit etmek için toplam 15 peroksidaz markırı kullanılmıştır. Kullanılan markırların tümü aspir genotiplerinde bant üretmiştir. POX8 markırı toplam 2 bant üretmiş fakat üretilen bantlar tüm aspir genotiplerinde monomorfik olarak bulunmuştur (Çizelge 4.1). Diğer tüm bantlar genotipler arasında polimorfizm üretmişlerdir. Markır başına üretilen bant sayısı 1-9 arasında değişmiştir. Aspir genotiplerinde üretilen toplam bant sayısı 71 olur iken polimorfik bant sayısı 50 olarak bulunmuştur. Markır başına üretilen ortalama bant sayısı 4.7 olarak bulunurken, polimorfik bant sayısı 3.3 olarak bulunmuştur. Polimorfizm oranı %0-100 arasında değişmiştir ve ortalama polimorfizm oranı %70.9 olarak bulunmuştur. PIC değerleri her bir markır için hesaplanmıştır. POX8 markırı polimorfik olmadığı için PIC değeri 0.0 olarak bulunmuştur. Diğer polimorfik markırların PIC değerleri 0.17-0.48 arasında değişim göstermiştir.

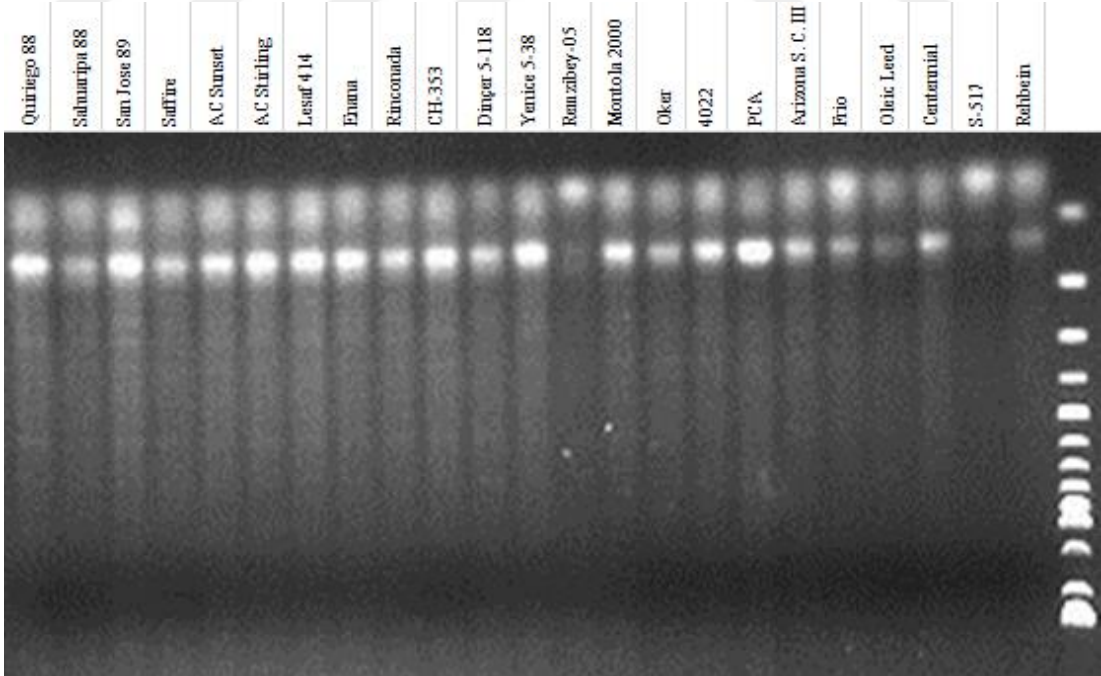
Çizelge 4.1. Çalışmada kullanılan peroksidaz markırları ve bu markırların ürettikleri bant sayıları

Markır	Toplam allel sayısı	Polimorfik allel sayısı	Polimorfizm oranı (%)	PIC
POX1	6	5	83.3	0.18
POX2	3	3	100	0.48
POX3	9	5	55.5	0.25
POX4	7	5	71.4	0.25
POX5	6	5	83.3	0.27
POX6	9	6	66.6	0.28
POX7	4	3	75.0	0.19
POX8	2	0	0.0	0.0
POX9	5	3	60.0	0.29
POX10c	5	4	80.0	0.28
POX10d	4	2	50.0	0.17
POX11	3	2	66.6	0.28
POX12a	1	1	100	0.26
POX12b	4	3	75.0	0.19
POX12c	3	3	100	0.43

Aspirde peroksidaz genleri kullanılarak üretilen bantlara ait örnekler Şekil 4.1. ve Şekil 4.2. de verilmiştir.



Şekil 4.1. POX11 markırları kullanılarak aspirde 1-23 ve 24-39 numaralı genotiplerin jel görüntüleri



Şekil 4.2. POX12a markırları kullanılarak aspirde 1-23 numaralı genotiplerin jel görüntüleri

Aspir genotiplerinde peroksidaz gen polimorfizmleri ve UPGMA metodu kullanılarak gruplandırma çalışmaları yapılmıştır. Gruplandırma çalışmalarında kullanılmak üzere genotiplerin benzerlik katsayıları Dice yöntemine göre NTYSC-pc programı kullanılarak hesaplanmıştır. En düşük benzerlik katsayısı Shufu ve UC-1 arasında bulunmuştur (0.56). En yüksek benzerlik katsayıları ise Frio, AC Sterling ve Montola 2000 arasında bulunmuştur (0.91). Aspir genotipleri arasındaki benzerlik katsayıları genellikle yüksek olmuştur ve benzerlik katsayılarının ortalaması 0.80 olarak bulunmuştur (Çizelge 4.2).

Gruplandırma analizi ile aspir genotipleri 2 ana grup altında toplanmıştır. Frio ve AC Sterling arasında yüksek benzerlik katsayısından dolayı bir fark gözlenememiş ve bu iki genotip birbirlerinden ayıramamıştır (Şekil 4.3.). Diğer tüm genotipler birbirlerinden ayrı olarak gruplandırılmıştır. Gruplandırma sonucunda genotiplerin ülke orijini olarak gruplanmadığı bulunmuştur. Örneğin Türkiye orijinli olan 3 çeşit yapılan gruplandırma çalışması ile birbirlerinden farklı gruplarda yer almıştır.

Aspirde peroksidaz gen polimorfizmleri kullanılarak yapılan gruplandırma çalışmalarına ilaveten principal koordinat analizi de (PCA) yapılmıştır. PCA analizi 4 faktör üzerinden yapılmış ve birinci faktör gözlenen değişimin %46.3'ünü açıklamıştır. İkinci faktör değişimin %7.8'mi ve üçüncü faktör ise %4.7'sini açıklamıştır (Şekil 4.4.). PCA analizine göre Shufu, Ziyang, Enana ve Dinçer diğer genotiplerden farklı olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.2. Aspir çeşit ve hatlarının Dice coefficient formülüne göre hesaplanan benzerlik değerleri. (Devam)

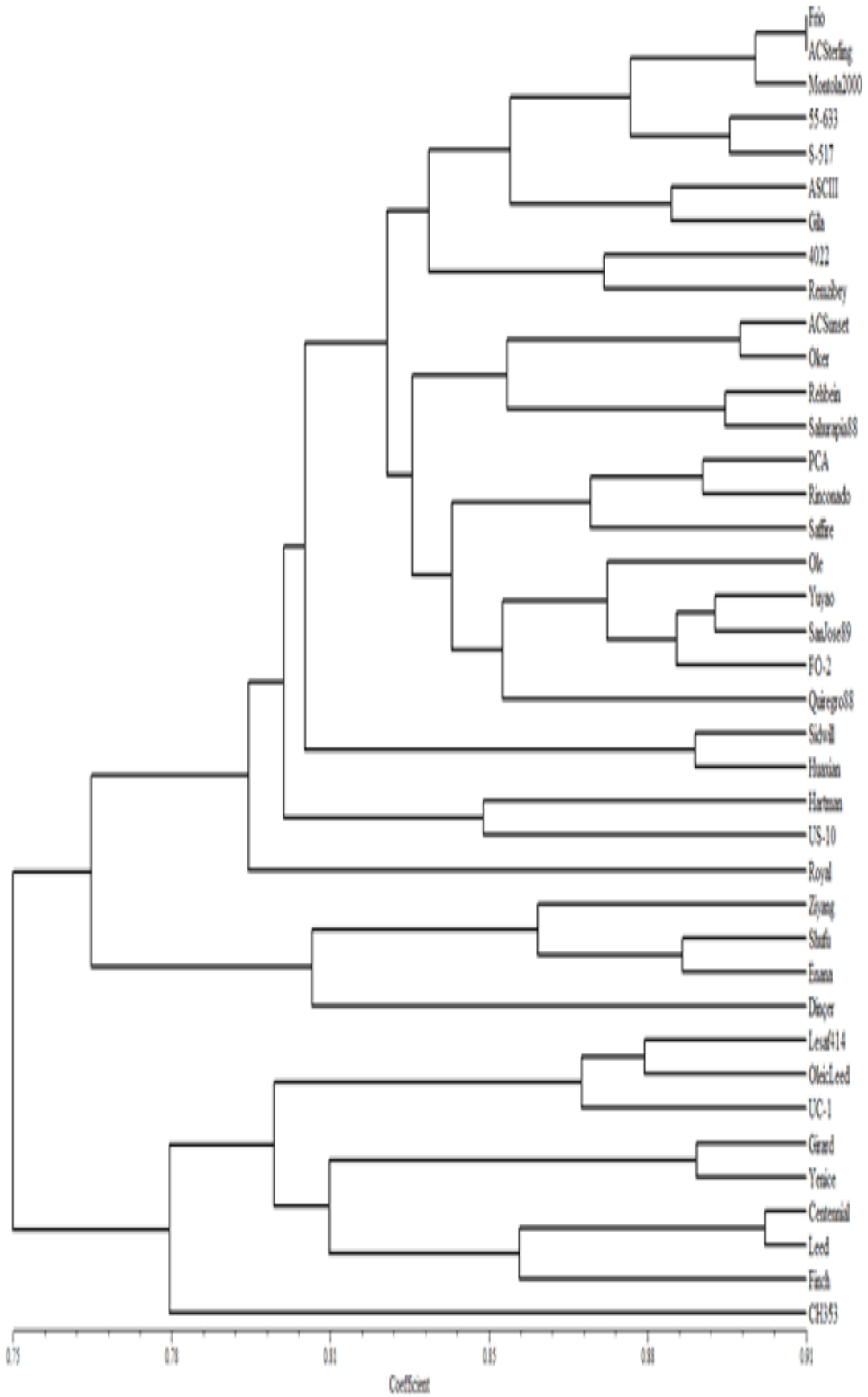
1	Frio	1.00																			
2	Lesaf414	0.88	1.00																		
3	55-633	0.90	0.84	1.00																	
4	Oleic Leed	0.89	0.88	0.85	1.00																
5	S-517	0.91	0.83	0.89	0.84	1.00															
6	AC Sterling	0.91	0.89	0.85	0.84	0.84	1.00														
7	AC Sunset	0.81	0.77	0.86	0.76	0.81	0.81	1.00													
8	ASCIII	0.85	0.78	0.81	0.84	0.84	0.82	0.79	1.00												
9	Montola2000	0.91	0.82	0.87	0.84	0.86	0.89	0.83	0.87	1.00											
10	Rehbein	0.83	0.82	0.82	0.85	0.81	0ç81	0.84	0.81	0.83	1.00										
11	Sahurapia88	0.85	0.86	0.85	0.84	0.84	0.84	0.83	0.84	0.84	0.89	1.00									
12	4022	0.84	0.77	0.85	0.80	0.86	0.82	0.79	0.80	0.82	0.83	0.84	1.00								
13	UC-1	0.82	0.86	0.76	0.86	0.80	0.80	0.70	0.77	0.77	0.80	0.78	0.77	1.00							
14	Oker	0.84	0.78	0.89	0.77	0.86	0.80	0.90	0.78	0.82	0.85	0.86	0.82	0.73	1.00						
15	Hartman	0.80	0.79	0.82	0.75	0.84	0.80	0.80	0.82	0.80	0.78	0.82	0.86	0.70	0.84	1.00					
16	Gila	0.84	0.77	0.87	0.82	0.86	0.84	0.83	0.88	0.88	0.79	0.81	0.84	0.72	0.84	0.86	1.00				
17	Ziyang	0.75	0.70	0.71	0.68	0.74	0.75	0.72	0.77	0.77	0.74	0.77	0.72	0.62	0.72	0.80	1.00				
18	US-10	0.80	0.76	0.83	0.78	0.87	0.76	0.79	0.80	0.76	0.75	0.83	0.78	0.71	0.82	0.84	0.82	0.70	1.00		
19	Sidwill	0.82	0.79	0.80	0.86	0.79	0.82	0.78	0.82	0.82	0.87	0.81	0.81	0.75	0.77	0.79	0.83	0.72	0.80	1.00	
20	PCA	0.83	0.72	0.83	0.80	0.87	0.79	0.82	0.85	0.83	0.84	0.83	0.80	0.72	0.82	0.80	0.84	0.73	0.83	0.82	1.00

Çizelge 4.2. Aspir çeşit ve hatlarının Dice koefficient formülüne göre hesaplanan benzerlik değerleri. (Devam)

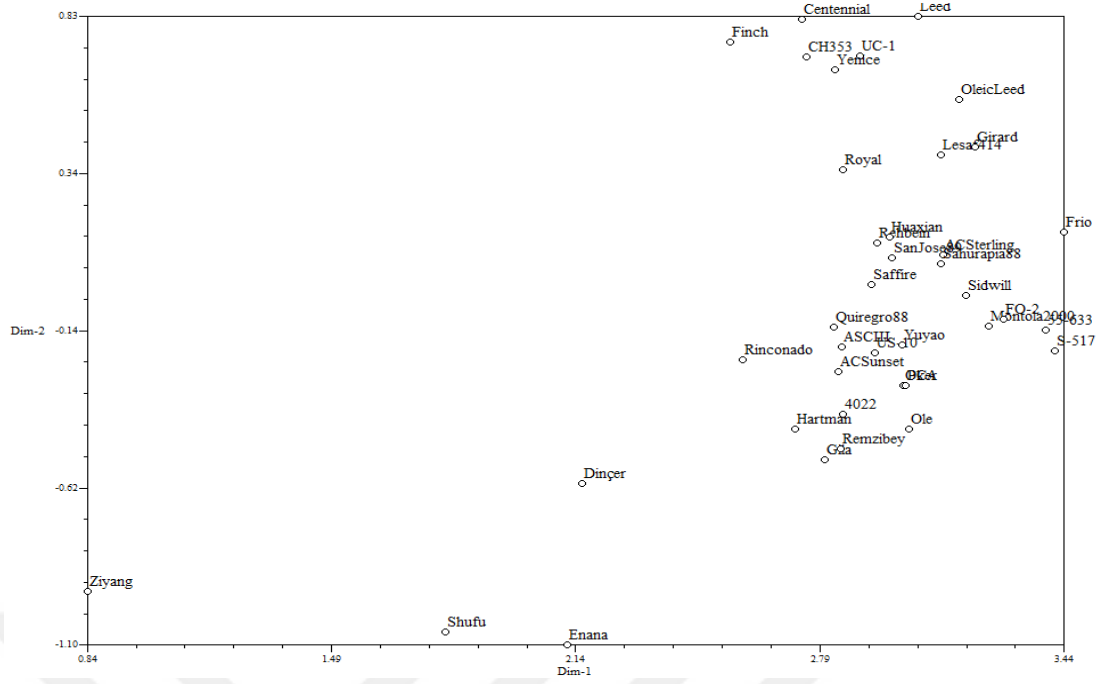
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
21	Rinconado	0.83	0.73	0.79	0.82	0.82	0.79	0.80	0.85	0.85	0.83	0.80	0.72	0.78	0.76	0.84	0.75	0.83	0.84	0.89	
22	CH353	0.79	0.77	0.76	0.80	0.74	0.77	0.72	0.73	0.77	0.81	0.69	0.77	0.76	0.70	0.72	0.60	0.74	0.75	0.72	
23	Ole	0.82	0.76	0.80	0.75	0.84	0.80	0.83	0.78	0.82	0.79	0.83	0.77	0.67	0.80	0.77	0.75	0.76	0.80	0.77	0.87
24	Royal	0.84	0.80	0.80	0.80	0.82	0.84	0.81	0.80	0.84	0.79	0.81	0.77	0.76	0.75	0.72	0.75	0.72	0.80	0.77	0.80
25	Yuyao	0.82	0.76	0.80	0.77	0.86	0.82	0.81	0.80	0.80	0.79	0.80	0.75	0.68	0.80	0.75	0.77	0.74	0.78	0.77	0.85
26	San Jose89	0.80	0.76	0.80	0.84	0.84	0.80	0.83	0.84	0.80	0.87	0.84	0.75	0.73	0.82	0.77	0.82	0.73	0.84	0.88	0.88
27	FO-2	0.87	0.82	0.84	0.80	0.88	0.87	0.82	0.78	0.84	0.86	0.87	0.80	0.86	0.81	0.80	0.73	0.80	0.79	0.85	0.85
28	Quiregro88	0.84	0.78	0.82	0.77	0.83	0.86	0.80	0.73	0.82	0.84	0.81	0.69	0.83	0.74	0.79	0.76	0.75	0.81	0.82	0.82
29	Remzibey	0.85	0.77	0.81	0.80	0.85	0.83	0.77	0.81	0.83	0.84	0.86	0.87	0.72	0.80	0.82	0.79	0.79	0.80	0.83	0.83
30	Huaxian	0.81	0.81	0.87	0.87	0.80	0.79	0.78	0.75	0.79	0.86	0.84	0.74	0.73	0.82	0.75	0.80	0.71	0.79	0.90	0.83
31	Dinçer	0.75	0.71	0.76	0.73	0.73	0.73	0.76	0.80	0.80	0.84	0.77	0.63	0.75	0.74	0.77	0.78	0.73	0.79	0.80	0.80
32	Saffire	0.85	0.77	0.82	0.82	0.82	0.84	0.85	0.83	0.84	0.82	0.77	0.68	0.85	0.82	0.86	0.72	0.83	0.86	0.87	0.87
33	Girard	0.88	0.82	0.82	0.81	0.85	0.86	0.78	0.79	0.86	0.84	0.83	0.83	0.81	0.76	0.78	0.79	0.70	0.77	0.80	0.82
34	Yenice	0.80	0.77	0.76	0.81	0.75	0.73	0.73	0.70	0.78	0.82	0.72	0.80	0.76	0.72	0.71	0.64	0.72	0.79	0.77	0.77
35	Centennial	0.79	0.82	0.77	0.81	0.71	0.77	0.75	0.69	0.74	0.73	0.74	0.64	0.77	0.65	0.69	0.62	0.66	0.75	0.70	0.70
36	Leed	0.77	0.80	0.73	0.84	0.74	0.75	0.70	0.74	0.72	0.72	0.73	0.69	0.86	0.67	0.70	0.59	0.75	0.78	0.70	0.70
37	Shufu	0.70	0.66	0.72	0.65	0.69	0.72	0.75	0.70	0.75	0.69	0.65	0.72	0.56	0.74	0.71	0.79	0.84	0.67	0.73	0.73
38	Enana	0.75	0.68	0.78	0.73	0.79	0.75	0.76	0.77	0.77	0.78	0.76	0.79	0.62	0.77	0.76	0.83	0.86	0.75	0.79	0.82
39	Finch	0.72	0.69	0.71	0.77	0.70	0.69	0.66	0.72	0.72	0.70	0.66	0.65	0.80	0.67	0.66	0.68	0.59	0.68	0.75	0.75



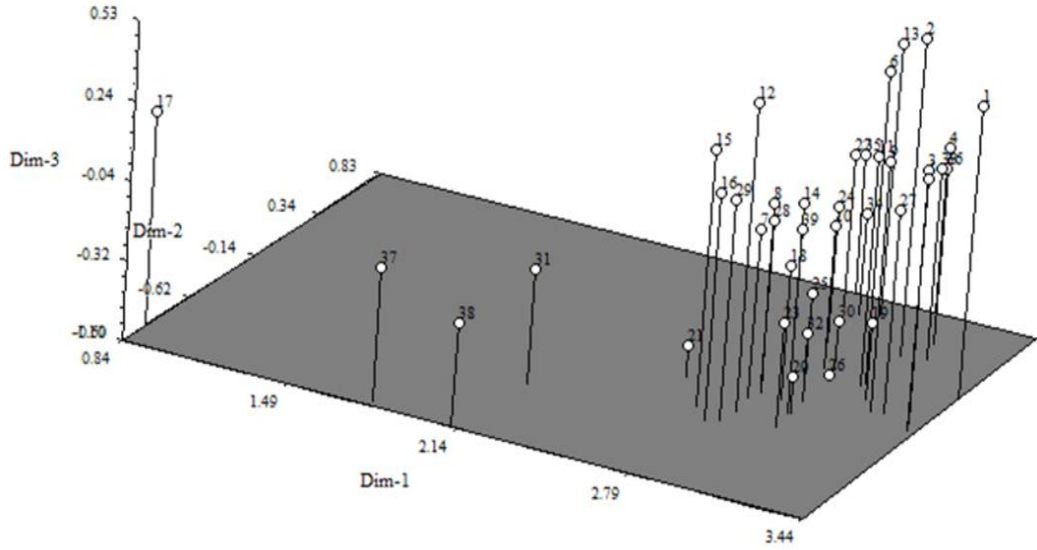




Şekil 4.3. Aspirin çeşit ve hatlarının peroksidaz gen polimorfizmleri kullanılarak elde edilen dendrogram



Şekil 4.4. Aspirin çeşit ve hatları arasındaki genetik ilişkileri ilk üç faktör bakımından gösteren 2 boyutlu PCA grafiği



Şekil 4.5. Aspirin çeşit ve hatları arasındaki genetik ilişkileri ilk üç faktör bakımından gösteren 3 boyutlu PCA grafiği

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Mevcut çalışmada 39 aspir genotipi içerisinde peroksidaz gen polimorfizmlerini tespit etmek için toplam 15 peroksidaz markırı kullanılmıştır. Kullanılan markırların tümü aspir genotiplerinde bant üretmiştir. POX8 markırı toplam 2 bant üretmiş fakat üretilen bantlar tüm aspir genotiplerinde monomorfik olarak bulunmuştur (Çizelge 4.1.). Diğer tüm bantlar genotipler arasında polimorfizm üretmişlerdir. Markır başına üretilen bant sayısı 1-9 arasında değişmiştir. Aspir genotiplerinde üretilen toplam bant sayısı 71 olur iken polimorfik bant sayısı 50 olarak bulunmuştur. Markır başına üretilen ortalama bant sayısı 4.7 olarak bulunurken, polimorfik bant sayısı 3.3 olarak bulunmuştur.

Markır başına üretilen polimorfizm oranı %0-100 arasında değişmiştir ve ortalama polimorfizm oranı %70.9 olarak bulunmuştur. PIC değerleri her bir markır için hesaplanmıştır. POX8 markırı polimorfik olmadığı için PIC değeri 0.0 olarak bulunmuştur. Diğer polimorfik markırların PIC değerleri 0.17-0.48 arasında değişim göstermiştir.

Yapılan gruplandırma çalışmaları aspir genotiplerini birbirinden ayırmış fakat genetik benzerlik yüksek olarak bulunmuştur. Bu durum kullanılan aspir genotiplerinde yüksek oranda benzerlik olduğunu ve ıslah çalışmalarında genetik çeşitliliğin artırılması gerektiğini ortaya çıkarmaktadır.

## KAYNAKLAR

- Abuzayed, M., El-Dabba, N., Frary, A. & Doğanlar, S. (2016). An online tool for calculation of dominant marker gene diversity. *Biochemical Genetics*, 55, 155-157. doi:10.1007/s10528-016-9779-0
- Akyavuz, R., Taskin, B., Koçak, M. & Yıldız M. (2018). Exploring the genetic variations and population structure of Turkish pepper (*Capsicum annuum* L.) genotypes based on peroxidase gene markers. *3 Biotech*, 8, 355. doi:10.1007/s13205-018-1380-2
- Anonim (2005). <https://arastirma.tarimorman.gov.tr/ttae> (Son erişim tarihi: 10.06.2019)
- Arslan, N. (2007). Şimdi Safran Zamanı. *Gıda Hattı*, 10, 66- 69.
- Ashri, A. & Knowles, P.F. (1960). Cytogenetics of safflower (*Carthamus* L.) species and their hybrids. *Argonomy Journal*, 52, 11-17.
- Barati, M. & Arzani, A. (2012). Genetic diversity revealed by EST-SSR markers in cultivated and wild safflower. *Biochemical Systematics and Ecology*, 44, 117-123. doi:10.1016/j.bse.2012.04.013
- Bassiri, A. (1977). Identification and polymorphism of cultivars and wild ecotypes of safflower based on isozyme patterns. *Euphytica*, 26, 709-719. doi:10.1007/BF00021696
- Baydar, H. (2000). Gibberellik asitin aspir'de (*Carthamus tinctorius*) erkek kısırlık, tohum verimi ile yağ ve yağ asitleri sentezi üzerine etkisi. *Turkish Journal of Biology*, 24, 159-168.
- Bocheva, A. Mikhova, B., Taskova, R., Mitova, M. & Duddeck, H. (2003). Antiinflammatory and analgesic effects of *Carthamus lanatus* aerial parts. *Fitoterapia*, 74, 559-63. doi:10.1016/S0367-326X(03)00150-3
- Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M. & Davis, R.W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, 32, 314-331.
- Bowers, J.E., Pearl, S.A. & Burke, J.M. (2016). Genetic mapping of Millions of SNPs in safflower (*Carthamus tinctorius* L.) via whole-genome Resequencing. *G3(Genes, Genomes, Genetics)*, 6, 2203-2211. doi:10.1534/g3.115.026690
- Carapetian, J. & Estilai, A. (1997). *Genetics of isozyme coding genes in safflower*. IV<sup>th</sup> International Safflower Conference. June 2-7, Bari, Italy.
- Chapman, M. A. & Burke, J. M. (2007). DNA sequence diversity and the origin of cultivated safflower (*Carthamus tinctorius* L.; Asteraceae). *BMC Plant Biology*, 7, 60. doi: 10.1186/1471-2229-7-60

- Chapman, M.A., Hvala, J., Strever, J., Matvienko, M., Kozik, A., Michelmore R.W., Tang, S., Knaap, S.J. & Burke, J.M. (2009). Development, polymorphism, and cross-taxon utility of EST-SSR markers from safflower (*Carthamus tinctorius* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 120, 85-91. doi:10.1007/s00122-009-1161-8
- Chapman, M.A., Hvala, J., Strever, J. & Burke, J.M. (2010). Population genetic analysis of safflower (*Carthamus tinctorius*; Asteraceae) reveals a near eastern origin and five centers of diversity. *American Journal of Botany*, 97, 831–840. doi:10.3732/ajb.0900137
- Cronquist, A. (1988). *The evolution and classification of flowering plants*. Allen Press, New York Botanical Garden Basimevi.
- Dajue, L., Mingde, Z. & Rao, V.R. (1993). *Characterization and evaluation of safflower germplasm*. Geological Publishing House.
- Doyle, J.J. & Doyle, J.J. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12, 13-15.
- Everse, J., Everse, K.E. & Grisham, M.B. (1991). *Peroxidases in chemistry and biology*. CRC press.
- Garnatje, T., Susanna, A., Garcia-Jacas, N., Hidalgo, O. & Vilatersana R. (2006). The *Cardueae* (Compositae) revisited: insights from ITS, *trnL-trnF*, and *matK* nuclear and chloroplast DNA analysis. *Annals of Missouri Botanical Gardens*, 93, 150–171. doi:10.3417/0026-6493(2006)93[150:TCCRIF]2.0.CO;2
- Gülşen, O., Shearman, R.C., Heng-Moss, T.M., Mutlu, N., Lee, D.J. & Sarath, G. (2007). Peroxidase gene polymorphism in buffalograss and other grasses. *Crop Science*, 47, 767-774. doi: 10.2135/cropsci2006.07.0496
- Gülşen, O., Kaymak, S., Özongun, S. & Uzun, A., (2010). Genetic analysis of Turkish apple germplasm using peroxidase gene based markers. *Scientia Horticulturae*, 125, 368-373. doi:10.1016/j.scienta.2010.04.023
- Halward, T., Stalker, T., Larue, E. & Kochert, G. (1992). Use of single-primer DNA amplification in genetic studies of peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Plant Molecular Biology*, 18, 315-325.
- Hotta, Y., Nagatsu, A., Liu, W., Muto, T., Narumiya, C., Lu, X., Yajima, M., Ishikawa, N., Miyazeki, K., Kawai, N., Mizukami, H. & Sakakibara, J. (2002). Protective effects of antioxidative serotonin derivatives isolated from safflower against postischemic myocardial dysfunction. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 238, 151-162.
- Johnson, R.C., Kisha, T., Foiles, C. & Bradley, V. (2005). *Characterizing safflower germplasm with AFLP molecular markers*. VI<sup>th</sup> International Safflower Conference. June 6-10 İstanbul, Turkey.

- Kiran, B.U., Mukta, N., Kadirvel, P. & Alivelu, K. (2017). Genetic diversity of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) germplasm as revealed by SSR markers. *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization*, 15, 1-11. doi:10.1017/S1479262115000295
- Kneusel, R.E. Schiltz, E. & Matern, U. (1994). Molecular characterization and cloning of an esterase which inactivates the macrolide toxin brefeldin. *Journal of Biological Chemistry*, 269, 3449-56.
- Knowles, P.F. & Hill, A.B. (1964). Inheritance of fatty acid content in the seed oil of a safflower introduction from Iran. *Crop Science*, 4, 406-409.
- Knowles, P.F. (1969). Centers of plant diversity and conservation of crop germplasm: safflower. *Economic Botany*, 23, 324-329. doi:10.1007/BF02860678
- Knowles, P.K. (1980). *Safflower, hybridization of crop plants*. American Society of Agronomy Press.
- Iwamoto, M., Kono, M., Kawamoto, D., Tomoyori, H., Sato, M. & Imaizumi, K. (2002). Differential effect of walnut oil and safflower oil on the serum cholesterol level and lesion area in the aortic root of apolipoprotein e-deficient mice. *Biosci, Biotechnol, Biochem*, 66, 141-146.
- Kotecha, A. & Zimmerman, L.H. (1978). Genetics of seed dormancy and its association with other traits in safflower. *Crop Science*, 18, 1003-1007. doi: 10.2135/cropsci1978.0011183X001800060025x
- Köksal, N., Cansev, A., Gülen, H., İpek, A. & Eriş, A. (2005). *Bazı yerel fasulye genotiplerinin arasındaki akrabalık ilişkilerinin belirlenmesi*. XIV. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi Eskişehir. 31 Ağustos-2 Eylül, 304-308.
- Lee, J.J. & Chow, C.C. (2014). Conditions for the validity of SNP-based heritability estimation. *Human Genetics*, 133, 1011–1022. doi:10.1007/s00439-014-1441-5
- Liu, F., Wei, Y., Yang, X.Z., Li, F.G., Hu, J. & Cheng, R.F. (1992). Hypotensive effects of safflower yellow in spontaneously hypertensive rats and influence on plasma renin activity and angiotensin. *Yao Xue Xue Bao*, 27(10), 785-787.
- Mayerhofer, R., Bowles, V., Mayerhofer, M. & Good, A.G. (2008). *Genetic linkage maps of Carthamus species based on SSR and RFLP markers*. 7<sup>th</sup> International Safflower Conference. November 3-6, Wagga-Australia, 89-94.
- Naresh, V., Yamini, K.M., Rajendrakumar, P. & Kumar, V.D. (2009). EST-SSR marker-based assay for the genetic purity assessment of safflower hybrids. *Euphytica*, 170, 347-353. doi: 10.1007/s10681-009-9995-3
- Öcal, N., Akbulut, M., Gülşen, O., Yetişir, H., Solmaz, I. & Sarı, N. (2014). Genetic diversity, population structure and linkage disequilibrium among watermelons

based on peroxidase gene markers. *Scientia Horticulturae*, 176, 151-161. doi:10.1016/j.scienta.2014.07.001

- Pascual-Villalobos, M.J. & Albuquerque, N. (1995). Genetic variation of a safflower germplasm collection grown as a winter crop in southern Spain. *Euphytica*, 92, 327-332. doi:10.1007/BF00037116
- Passardi, F., Cosio, C., Penel, C. & Dunand, C. (2005). Peroxidases have more function than a Swiss army knife. *Plant Cell Reports*, 24, 255-265.
- Pearl, S.A. & Burke, J.M. (2014). Genetic diversity in *Carthamus tinctorius* (Asteraceae; safflower), an underutilized oilseed crop. *American Journal of Botany*, 101, 1640-1650. doi:10.3732/ajb.1400079
- Ragot, M. & Hoisington, D.A. (1993). Molecular markers for plant breeding: Comparison of RFLP and RAPD genotyping costs. *Theoretical and Applied Genetics*, 86, 975-984. doi: 10.1007/BF00211050.
- Rahamatalla, A.B., Babiker, E.E., Krishna, A.G. & El-Tinay, A.H. (1998). Changes in chemical composition, minerals and amino acids during seed growth and development of four safflower cultivars. *Plant Foods for Human Nutrition*, 52, 161-170.
- Ravikumar, R.L., Priya, M.S., Patil, B.S. & Satish, D. (2005). *DNA profiling and fingerprinting of selected mutants for marker analysis in safflower (Carthamus tinctorius L.)*. VI<sup>th</sup> International Safflower Conference, June 6-10, İstanbul, Turkey.
- Sales, R.L. (2005). The effects of peanut safflower and olive oil on body composition, energy metabolism, lipid profile and food intake of eutrophic, normolipidemic subjects. *Revista de Nutrição*, 18(4), 499-511.
- Samancı, B. & Özkaynak, E. (2003). Effect of planting date on seed yield oil content and fatty acid composition of safflower (*Carthamus tinctorius*) cultivars grown in the mediterranean region of Turkey. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 189, 359-360. doi:10.1046/j.1439-037X.2003.00053.x
- Sarı, N., Solmaz, İ., Tarım, G., Göçmen, M. & Şimşek, İ. (2016). Characterization and agronomic traits of some mini watermelon lines. *Acta Horticulturae*, 1127, 479-484. doi:10.17660/ActaHortic.2016.1127.75
- Sehgal, D. & Raina, S.N. (2005). Genotyping safflower (*Carthamus tinctorius* L.) cultivars by DNA fingerprinting. *Euphytica*, 146, 67-76. doi:10.1007/s10681-005-8496-2
- Sehgal, D., Rajpal, V.R. & Raina, S.N. (2008). Chloroplast DNA diversity reveals the contribution of two wild species to the origin and evolution of diploid safflower (*Carthamus tinctorius* L.). *Genome*, 51, 638-643. doi: 10.1139/G08-049

- Sehgal, D., Raina, S. N., Devarumath, R. M. & Sasanuma, T. (2009). Nuclear DNA assay in solving issues related to ancestry of the domesticated diploid safflower (*Carthamus tinctorius* L.) and the polyploid (*Carthamus*) taxa, and phylogenetic and genomic relationships in the genus *Carthamus* L. (Asteraceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 53, 631–644. doi:10.1016/j.ympev.2009.07.012
- Tanksley, S.D. & McCouch, S.R. (1997). Seed banks and molecular maps: Unlocking genetic potential from the wild. *Science*, 277, 1063-1066. doi:10.1126/science.277.5329.1063
- Tautz, D., Trick M. & Dover, G.A. (1986). Cryptic simplicity in DNA is a major source of variation. *Nature*, 322, 652-656.
- Tonguç, M., Erbaş, S. & Baydar, H. (2011). Aspirde geliştirilen rekombinant saf hat populasyonunun genetik harita popülasyonu olarak kullanma imkânlarının araştırılması. *Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 6, 1-7.
- Uzun, A., Gülşen, O., Seday, U., Yesiloğlu, T. & Aka Kaçar, Y. (2014). Peroxidase gene based estimation of genetic relationships and population structure among *Citrus* spp. and their relatives. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 61, 1307-1318. doi: 10.1007/s10722-014-0112-7
- Valesco, L. & Fernandez-Martinez, J.M. (2000). Isolation of lines with contrasting seed oil fatty acid profiles from safflower germplasm. *Sesame and Safflower Newsletter*, 15, 104-108.
- Vogel, G. & Browse, J. (1996). Choline phosphotransferase and diacylglycerol acyltransferase (Substrate Specificity at a Key Branch Point in Seed Lipid Metabolism). *Plant Physiology*, 110, 923-931.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. & Zabeau, M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23, 4407-4414.
- Wachira, F.N., Mahasi, M.J., Pathak, R.S. & Riungu T.C. (2009). Genetic polymorphism in exotic safflower (*Carthamus tinctorios* L.) using RAPD markers. *Journal of Plant Breeding and Crop Science*, 1, 8-12.
- Wang, P. (1999). Optimization of condition for safflower cell culture and accumulation of cellicolous product tocopherols. *Chinese Journal of Biotechnology*, 15, 231-237.
- Welsh, J. & McClelland, M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*, 18, 7213-7218.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Libak, K.J., Rafalski, J.A. & Tingey, S.V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18, 6531–6535.



- Wong, D.S. (1995). Horseradish peroxidase. In *food enzymes* (pp. 321-345).
- Yang, Y., Wu, W., Zheng, Y., Chen, L., Liu, R. & Huang, C. (2007). Genetic diversity and relationships among safflower (*Carthamus tinctorius* L.) analyzed by inter-simple sequence repeats (ISSRs). *Genetic Resources and Crop Evolution*, 54, 1043–1051. doi: 10.1007/s10722-006-9192-3
- Yazdi-Samadi, B., Amiri, R.M., Ghannadha, R.M. & Abd-Mishani, C. (2001). *Detection of DNA polymorphism in landrace populations of safflower in Iran using RAPD-PCR technique*. V<sup>th</sup> International Safflower Conference. July 23-27, Montana, USA.
- Zhang, L., Pong, S.K. & Gaut, B.S. (2001). A survey of the molecular evolutionary dynamics of twenty five multigene families from four taxa. *Journal of Molecular Evolution*, 52, 144-156. doi:10.1007/s002390010143
- Zhang, Z. (2001). *Genetic diversity and classification of safflower (Carthamus tinctorius L.) germplasm by isozyme techniques*. V<sup>th</sup> International Safflower Conference. July 23-27, Montana, USA.
- Zhang, H.J. & Cheng, Y.Y. (2005). An HPLC/MS method for identifying major constituents in the hypocholesterolemic extracts of Chinese medicine formula 'Xue-Fu-Zhu-Yu Decoction'. *Biomedical Chromatography*, 20, 821-826. doi:10.1002/bmc.607
- Zietkiwicz, E., Rafaliski A. & Labuda, D. (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20, 176-183.

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Ayşe ÖZNUR ÇANKAYA

Doğum Yeri ve Yılı : Burdur, 1984

Medeni Hali : Evli

Yabancı Dili : İngilizce

E-posta : ayseoznur@hotmail.com



## Eğitim Durumu

Lise : Burdur Cumhuriyet Lisesi (Y.D.A.L.), 2002

Lisans : SDÜ, Ziraat Fakültesi, Ziraat Mühendisliği, Tarla Bitkileri,

## Mesleki Deneyim

Tarım ve Kırsal Kalkınmayı Destekle Kurumu 2012- Halen