T.C.

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

AYÇİÇEĞİNDE MİLDİYÖ (KÖSE) HASTALIĞINA DAYANIKLI GENOTİPLERİN MOLEKÜLER MARKIRLAR KULLANILARAK BELİRLENMESİ

EMRAH AKPINAR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOTEKNOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı: PROF. DR. YALÇIN KAYA

EDİRNE-2017

T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü onayı

Prof. Dr. Murat YURTCAN
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylarım.

Prof. Dr. Figen ERTAN
Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımca okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Yalçın KAYA
Tez Danışmanı

Bu tez, tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalında bir Yüksek Lisans tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri	İmza
Prof. Dr. Yalçın KAYA	
Doç. Dr. Semra HASANÇEBİ	
Yrd. Doç. Dr. Orhan Onur AŞKIN	

Tarih: 01/08/2017

T.Ü. FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOTEKNOLOJİ VE GENETİKYÜKSEK LİSANS PROGRAMI

DOĞRULUK BEYANI

İlgili tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin kaynak gösterilerek ilgili tezde yer aldığını beyan ederim.

31/07/2017

Emrah AKPINAR

Yüksek Lisans Tezi

Ayçiçeği'nde Mildiyö (Köse) Hastalığına Dayanıklı Genotiplerin Moleküler Markırlar Kullanılarak Belirlenmesi

T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoteknoloji ve Genetik Anabilim Dalı

ÖZET

Ayçiçeği (*Helianthus annuus L.*), dünyada ve ülkemizde en önemli bitkisel yağ kaynaklarından biridir. Ülkemiz insanının bitkisel yağ tüketiminde çoğunlukla ayçiçeği yağını tercih etmesi ve son yıllarda artan yağ açığımız, ayçiçeğinin önemini giderek arttırmaktadır. Ayçiçeği yetiştiriciliğinde tohum verimini ve yağ oranını düşüren en önemli sınırlayıcı faktör mantari hastalıklar olup, etmeni *Plasmopara halstedii* olan mildiyö hastalığı ayçiçeği üretiminde %100'lere varan kayıplara neden olmaktadır. Ayçiçeği üretimini kısıtlayan mildiyö hastalığına karşı dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesi ve kullanılması, ekonomik açıdan ülkesel ayçiçeği üretim kaybını önemli derecede önleyecektir. Mildiyö hastalığına dayanıklı çeşitlerin klasik ıslah yöntemleri ile geliştirilmesi hem masraflı hem de uzun bir süreçtir. Dayanıklı çeşit geliştirme çalışmalarında, biyoteknolojik yöntemlerle moleküler markır destekli seleksiyon (MAS) kullanılarak hızlı, etkili ve kesin seleksiyon yapılabilmektedir. Bu nedenle yapılan bu çalışmadaTrakya Bölgesindeki tüm mildiyö ırklarına dayanıklılık sağlayan Pl_6 ve Pl_{Arg} dayanıklılık genlerinin seleksiyonunda kullanılabilecek moleküler markırların belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmada Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nden temin edilen, Pl_6 ve Pl_{Arg}genlerini taşıyan dayanıklı çeşitlerin hassas çeşitler ile melezlenmesi sonucu elde edilen farklı kademedeki 120'şer genotipte mildiyö hastalığına dayanıklılık testleri yapılmış ve aynı örneklerde Pl_6 ve Pl_{Arg} dayanıklılık genlerinin varlığı moleküler markırlar ile tespit edilmeye çalışılmıştır. Çalışma sonucunda iki markırın Pl_6geni ile yakın bağlantılı olduğu ve ıslah çalışmalarında seleksiyon amaçlı kullanılabileceği tespit edilmiştir.Pl_{Arg} geni için ise bu çalışmada kullanılan ve literatürde sunulan markırların hiç biri yeterince ayırıcı bulunmamıştır.

Yıl : 2017

Sayfa Sayısı : 59

Anahtar Kelimeler : Ayçiçeği, MAS, Mildiyö, *Pl*$_6$, *Pl*$_{Arg}$,*Plasmopara halstedii*

Master's Thesis

Determination of Mildew Disase (*Plasmopara halstedii*) Resistant Genotypes by Using Molecular Markers in Sunflower

Trakya University Institute of Natural Sciences

Biotechnology and Genetics

ABSTRACT

Sunflower (*Helianthus annuus L.*) is one of the most important vegetable oil sources in the world and in our country. The preference of sunflower oil in the consumption of vegetable oil increases the importance of sunflower in our country. Sixty percent of the total sunflower is produced in Trakya Region. Therefore each factor for limiting sunflower yield is serious problem for regional economy. Fungal disease, downy mildew, is one of them caused by the *Plasmopara halstedii*. Development and use of resistant varieties are safe and economic way for long term controlling of the disease. Several downy mildew resistance genes (*Pl*) have been identified and used in breeding for resistance cultivars. In Trakya region *Pl*$_6$ and Pl$_{Arg}$ genes confer effective resistance against to regional virulent strains. In thisthesis, reported molecular markers related to *Pl*$_6$ and Plarg genes were investigated for their selection properties for MAS. For this, *Pl*$_6$ and *Pl*$_{Arg}$ genes source cultivars were crossed with susceptible sunflower varieties. Parents and their BC_4 level 120 individuals were used for molecular marker studies. All plant materials were also screened phenotypically by inoculation with pathogen spores. Produced DNA fragments by each markers were analysed by AATI capillary electrophoresis system. Two markers for *Pl*$_6$ gene were detected as useful for MAS.

Year : 2017

Number of Pages : 59

Keywords : Sunflower, MAS, Mildew, *Pl*$_6$, *Pl*$_{Arg}$, *Plasmopara halstedii*

ÖNSÖZ

Dünya nüfusu hızla artarken, nüfusun temel ihtiyacı olan tarımsal ürünlerin üretildiği tarım alanları farklı amaçlarla kullanıldığı için azalmaktadır. Tarım alanlarının arttırılamaması nedeniyle artan tarımsal ürün ihtiyacını karşılamak için tarımsal ürünlerin kalitesini ve verimini arttırmak hayati önem arz etmektedir. Özellikle kültür bitkilerinde verimi ve kaliteyi etkileyen başlıca faktörlerden biri olan fungal hastalıklar, mücadele etmesi zor masraflı ve emek isteyen bir süreçtir. Hastalıklarla savaş kimyasal yöntemlerle olabildiği gibi son yıllarda etkisini ve sürdürülebilirliğini kanıtlayan en önemli yöntem hastalığa karşı dayanıklı çeşitlerin kullanımıdır.

Ülkemiz ayçiçeği üretiminde dünyada 8. Sırada yer almasına karşın üretimi ihtiyacı karşılayamamakta, her yıl milyonlarca dolarlık ayçiçeği tohumu ve yağı ithal edilmektedir. Ayçiçeği verimini ve kalitesini düşüren başlıca hastalık olan mildiyö ile mücadele için hastalığa dayanıklı çeşit geliştirme çalışmaları Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nde (TTAE) yapılmakta olup klasik ıslah yöntemleri ile uzun yıllar almaktadır.

Bu yüksek lisans tezi çalışması kapsamında klasik ıslah yöntemlerinden çok daha etkili ve hızlı tespit sağlayan markır destekli ıslah çalışmalarına yardımcı olmak amaçlı TTAE'nün halihazırda yürüttüğü ıslah çalışmaları baz alınarak mildiyö dayanıklılığı için Pl_6 ve Pl_{Arg} genleri için moleküler çalışmalar yapılmıştır.

Bu yüksek lisans tezinin gerçekleşmesinde, iki yıl süreyle her türlü desteklerini esirgemeyen başta akademik danışmanım ve dünyadaki sayılı ayçiçeği uzmanlarından Prof. Dr. Yalçın KAYA'ya (Trakya Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Genetik ve Biyomühendislik Bölüm Başkanı), iki yıl boyunca günün 12 saati laboratuvarda beraber çalıştığım, hem bilimsel hem de hayata dair bana katkılarını ömür boyu unutamayacağım Doç. Dr. Semra HASANÇEBİ'ye (Trakya Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümü), ıslahçılık anlamda bir bilgi bankası olan Yrd. Doç. Dr. Necmi BEŞER'e (Trakya Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümü) ve ayçiçeği ıslahında tüm bilgi ve tecrübelerini

paylaşan Dr. Göksel EVCİ'ye (Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü) teşekkürlerimi borç bilirim. Ayrıca çalışmalarımızı beraber yürüttüğümüz değerli arkadaşlarım Çağlar ÇOLAK, Z. Çisem MUTAFÇILAR, Gülçiçek KILIÇ ve Burak TATLISES'e tüm yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

Emrah AKPINAR 2017

İÇİNDEKİLER

ÖZET i
ABSTRACT ii
ÖNSÖZ iii
İÇİNDEKİLER v
SİMGELER VE KISALTMALAR vii
ÇİZELGELER LİSTESİ x
ŞEKİLLER LİSTESİ xi
BÖLÜM 1 1
1. GİRİŞ 1
1.1. Ayçiçeğinin Dünya ve Türkiye Açısından Önemi 1
1.2. Ayçiçeği Tarımını Sınırlayan Hastalık Faktörleri 2
i) Ayçiçeği Pası 3
ii) Orobanş (Canavar Otu): 3
iii) Ayçiçeği Mildiyösü: 3
1.3. Bitkilerde Hastalıklara Karşı Dayanıklılık 4
1.4. Ayçiçeğinde *Plasmopara halstedii* Dayanıklılığı 6
1.5. *Pl* Genlerinin İstenen Kültür Çeşitlerine Aktarılmasının Önemi 7
1.6. Moleküler Markırlar ve MAS'ın Avantajları 8
1.7. Ülkemizdeki Islah Programlarında Moleküler Markırlara Duyulan İhtiyaç 9
1.8. *Pl* Genleri için Mevcut Moleküler Markırlar 10
BÖLÜM 2 11
2. MATERYAL ve YÖNTEM 11
2.1. Bitki materyali 11
2.2. Patojen Materyali 12
2.3. Hastalık Testleri 13
2.4. Moleküler Analizler 15
2.4.1. DNA İzolasyonu 15
2.4.2. DNA Miktar ve Kalite Tayini 18
2.4.3. *Pl6* Geni İçin Markır Çalışmaları 19

2.4.4. *Plarg* geni için markır çalışmaları 22
3. BULGULAR 25
3.1. Pl_6 İçin Kullanılan Markırların Sonuçları 25
3.1.1. ORS166 Markırı 25
3.1.2. ORS1043 Markırı 27
3.1.3. HAP2 Markırı 30
3.1.4. HAP3 Markırı 31
3.2. Pl_{Arg} İçin Kullanılan Markırların Sonuçları 35
3.2.1. ORS716 Markırı 35
3.2.2. ORS662 Markırı 36
3.2.3. ORS552 Markırı 38
3.2.4. ORS675 Markırı 40
BÖLÜM 3 42
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA 42
KAYNAKLAR 47
ÖZGEÇMİŞ 58
TEZ ÖĞRENCİSİNE AİT TEZ İLE İLGİLİ BİLİMSEL FAALİYETLER 59

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

cM :	Santimorgan
da :	Dekar
dk :	Dakika
g :	Gram
kg :	Kilogram
l :	litre
M :	Molarite
mg :	Miligram
ml :	Mililitre
µl :	Mikrolitre
mm :	Milimetre
mM :	Milimolar
ng :	Nanogram
nmol :	Nanomol
rpm :	Rounds Per Minute (Dakikadaki devir sayısı)
s :	Saniye
U :	Ünite
Volt :	Voltaj
% :	Yüzde
°C :	Santigrat derece

Kısaltmalar

AFLP : Amplified Fragment Length Polymorphism(Artırılmış Fragmentlerin Uzunluk Polimorfizmi)

ark. : arkadaşları

CTAB : Cetyl trimethylammonium bromide

DNA : Deoksiribo Nükleik Asit

dNTP : Deoksi Nükleotid Tri Fosfat

EDTA : Etilendiamin tetraasetik asit

HCl : Hidroklorik Asit

Helianthus annuus: Ayçiçeği

$MgCl_2$: Magnezyum Klorür

NaCl : Sodyum Klorür

PCR : Polimeraz Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

RAPD : Random Amplification of Polymorphic DNA(Değişken DNA Dizilerinin Tesedüfen Çoğaltılması)

RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism(Kesilen Fragmentlerin Uzunluk Polimorfizmi)

RNA : Ribo Nükleik Asit

RNase : Ribonükleaz

SDS : Sodyum Dodesil Sülfat

SSR : Simple Sequence Repeats (Basit Dizi Tekrarları)

Taq : Tag polimeraz

TBE : Tris-Borat-EDTA Tamponu

TE Tamponu : Tris-EDTA Tamponu

Tm : DNA'nın erime sıcaklığı

TTAE : Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü

TÜBİTAK : Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu

UV :	Ultraviole Işığı
PAMPs :	Pathogen Associated Molleculer Patterns(Patojen ile İlgili Moleküler Yapılar)
MAMPs :	Microbe Associated Molleculer Patterns (Mikropla İlgili Moleküler Yapılar)
R :	Dayanıklılık (Resistance)
S :	Hassaslık (Suseptible)
Avr :	Avirülens
HR :	Hipersensetive Reaction (Hipersensetif Tepki)
ROS :	Reaktif Oksijen Türleri
SAR :	Sistemik Kazanılmış Direnç
ISR :	Uyarılmış Sistemik Direnç
***Pl* :**	Plasmopara halstedii Dayanıklılık Genleri
LG :	Linkage Group
MAS :	Markır Destekli Seleksiyon
TAGEM :	Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü
SNP :	Single Nucleotide Polymorphism(Tek Nükleotid Polimorfizmi)
Indel :	İnsertion/Deletion
NaOCl :	Sodyum Hipoklorit
EtBr :	Etidyum Bromür
Bp :	Base Pair (Baz Çifti)

ÇİZELGELER LİSTESİ

Çizelge 1.1: 2002-2016 yılları arası Türkiye ayçiçeği ekim alanı ve üretim miktarı (TUİK, 2017).....2

Çizelge 1.2: Ayçiçeğinde bilinen *Pl* genleri, LG bölgeleri, kaynakları ve etkili olduğu patojen ırkları (Wieckhorst, 2011 ve Trojanova, 2016'dan güncellenmiştir).....7

Çizelge 2.1: Çalışmada kullanılan bitki genetik materyali listesi.....11

Çizelge 2.2: TTAE tarafından, çalışmada hastalık patojeni olarak kullanılan materyalin toplandığı lokasyonlar ve örnek sayıları 13

Çizelge 2.3: Pl_6dayanıklılık geninin tespitinde kullanılan markırlar.....21

Çizelge 2.4: Pl_6 geninin tespiti için kullanılan primerlerin PCR içerikleri 21

Çizelge 2.5: Pl_6 Hap grubu primerler için kullanılan PCR koşulları.....22

Çizelge 2.6: Pl_6 ORS grubu primerler için kullanılan PCR koşulları.....22

Çizelge 2.7: Pl_{Arg} dayanıklılık geninin tespitinde kullanılan markırlar.....23

Çizelge 2.8: Pl_{Arg} geninin tespiti için kullanılan primerlerin PCR içerikleri.....24

Çizelge 2.9: Pl_{Arg} primerleri için kullanılan PCR koşulları.....24

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1:1994-2014 yılları arası dünyada en çok ayçiçeği üreten ülkeler (FAOSTATS, 2017) 1

Şekil 1.2: 1) Tarlada *Plasmopara halstedii* bulaşık ayçiçeği 2) *Plasmopara halstedii* sporu yaprak stomasında 3) Ayçiçeği hücresinde protein işaretleyici ile görülen *plasmopara halstedii* 4) *Plasmopara halstedii* için ayçiçeğinin gösterdiği yüksek hassasiyet 4

Şekil 2.1: Hastalık testleri yapılmış örneklerin toplanması 12

Şekil 2.2: TTAE'de hastalık inokülasyonu çalışmaları 14

Şekil 2.3: Trakya Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarları 15

Şekil 2.4: Ayçiçeği örnekleri DNA izolasyonu 18

Şekil 2.5: Ayçiçeği örneklerinden izole edilen genomik DNA'ların jel elektroforez görüntüsü 19

Şekil 2.6: Ayçiçeği Pl_6 gen bölgesi genetik haritalamasında dayanıklılık markırları ve uzaklıkları (Pankovic 2014) 20

Şekil 2.7: Ayçiçeği Pl_{Arg} gen bölgesi genetik haritalamasında markırlar ve uzaklıkları (Imerovski 2014, Livaja 2013) 23

Şekil 3.1:*Pl*$_6$ORS166 markırı kullanılarak yapılan PCR sonucu kapiller elektroforez görüntüsü, ebeveynler ve F_5 bireyleri 25

Şekil 3.2:*Pl*$_6$ ORS1043 markırı kullanılarak yapılan PCR sonucu kapiller elektroforez görüntüsü, ebeveynler ve dayanıklılık profiline sahip F_5 bireyler 27

Şekil 3.3: *Pl_6* ORS1043 markırı kullanılarak yapılan PCR sonucu kapiller elektroforez görüntüsü, ebeveynler ve hassas profile sahip F_5 bireyler 28

Şekil 3.4: *Pl_6* HAP2 markırı kullanılarak yapılan PCR sonucu kapiller elektroforez görüntüsü, ebeveynler ve F_5 bireyleri 30

Şekil 3.5: *Pl_6* HAP3 markırı kullanılarak yapılan PCR sonucu kapiller elektroforez görüntüsü, ebeveynler ve dayanıklılık profiline sahip F_5 bireyler 32

Şekil 3.6: *Pl_6* HAP3 markırı kullanılarak yapılan PCR sonucu kapiller elektroforez görüntüsü, ebeveynler ve hassas profilesahip F_5bireyler 33

Şekil 3.7: *Pl_{Arg}* ORS716 markırı kullanılarak yapılan PCR sonucu kapiller elektroforez görüntüsü, ebeveynler ve F_5 bireyleri 35

Şekil 3.8: *Pl_{Arg}* ORS662 markırı kullanılarak yapılan PCR sonucu kapiller elektroforez görüntüsü, ebeveynler ve F_5 bireyleri 36

Şekil 3.9: *Pl_{Arg}* ORS552 markırı kullanılarak yapılan PCR sonucu kapiller elektroforez görüntüsü, ebeveynler ve F_5 bireyleri 38

Şekil 3.10: *Pl_{Arg}* ORS675 markırı kullanılarak yapılan PCR sonucu kapiller elektroforez görüntüsü, ebeveynler ve F_5 bireyleri 40

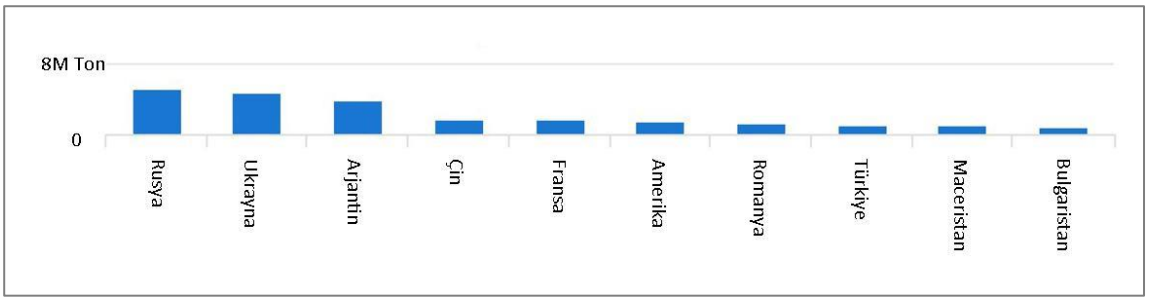
Bu tez çalışması Trakya Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TUBAP 2016/300 numaralı proje ile desteklenmiştir.

BÖLÜM 1

1. GİRİŞ

1.1. Ayçiçeğinin Dünya ve Türkiye Açısından Önemi

Ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.); Papatyagiller familyasına ait, 2n=34 kromozomlu, gen merkezi Kuzey Amerika olan önemli bir endüstri bitkisidir. Ülkemizde ve dünyada ağırlıklı olarak bitkisel yağ elde etmek amacıyla üretilmesinin yanında, çerezlik tüketim amacıyla da üretilmektedir. Dünyada en çok ayçiçeği üreten ülkeler arasında Türkiye, 8. sırada yer almaktadır.



Şekil 1.1: 1994-2014 yılları arası dünyada en çok ayçiçeği üreten ülkeler [10]

Tablo 1.1: 2002-2016 yılları arası Türkiye ayçiçeği ekim alanı ve üretim miktarları [64]

Yıl	Ekilen Alan(da)	Üretim(ton)
2002	5.500.000	850.000
2003	5.450.000	800.000
2004	4.800.000	800.000
2005	4.900.000	865.000
2006	5.100.000	1.010.000
2007	4.857.000	770.000
2008	5.100.000	900.387
2009	5.150.000	960.300
2010	5.514.000	1.170.000
2011	5.560.000	1.170.000
2012	5.046.160	1.200.000
2013	5.202.600	1.380.000
2014	5.524.651	1.480.000
2015	5.689.950	1.500.000
2016	6.167.800	1.500.000

Ülkemizin bitkisel yağ tüketiminin %60 kadarını ayçiçeği yağı oluşturmakta olup son yıllarda artan nüfus ve ayçiçeği tarım alanlarının arttırılamaması nedenleri ile ayçiçeği yağı ihtiyacı üretim ile karşılanamamaktadır. Türkiye, her ne kadarayçiçeği üretimi açısından dünyada ilk on sırada yer alsa da, 2014 yılında yaklaşık 556 bin ton ayçiçeği tohumu ve 812 bin ton ayçiçeğiyağı ithal etmiştir [21].

Tarım alanlarının arttırılamaması nedeniyle üretimi arttırmanın yolu verimi arttırmak ve kayıpları azaltmaktan geçmektedir. Özellikle hastalıkların yarattığı kayıplar bölgesel olarak ekili alanları bozup tekrar ekime kadar varabilmektedir.

1.2. Ayçiçeği Tarımını Sınırlayan Hastalık Faktörleri

Yabani ve kültüre alınmış ayçiçeğini olumsuz etkileyen en az 30 adet fungus, bakteri, virüs ve yabancı ot kaynaklı hastalık bilinmektedir. Bunlardan sadece birkaç tanesi Trakya Bölgesi'nde ekonomik zarara yol açmakla birlikte üretim açısından %100 oranında kayıplara neden olabilmektedirler. Bu hastalıklardan en önemlileri;

i) **Ayçiçeği Pası:***Puccinia helianthi*kaynaklı, bitkinin tüm toprak üstü kısımlarında görülebilen fungal bir hastalıktır. Ayçiçeği pası, ayçiçeğinde %70 oranında verim kayıplarına neden olabilmektedir. Hastalık belirtisi bitkinin çiçeklenme döneminde özellikle yaprak ve yaprak sapında, önce kahverengi sonra siyah lekeler halinde görülebilir. Enfekte bitkiler erken tohuma kalkar ve tohum kalitesi düşük olur. Sistematik enfeksiyonlarda bitki yoğun bulaşıklık barındıran yapraklarını kaybeder. Toprakta 10-12 yıl varlığını koruyabilen bir fungus olduğu için en etkin mücadelesi hastalığa dayanıklı ayçiçeği çeşitleri kullanılmasıdır.

ii) **Orobanş (Canavar Otu):***Orobanche cumana*, Trakya'da yüksek verim kayıplarına neden olabilen bir kök parazitidir. Tohumları kahverengi renkte kapsüller içerisinde ve her kapsülde binlerce tohum barındırabilecek şekilde ayçiçeği köklerinde tutunur. Ayçiçeği ekiminden kısa süre sonra ayçiçeği köklerinde orabanş görülebilir, ayçiçeğinin çiçeklenme döneminde toprak üstüne çıkar. Her bir kökte 50'nin üstünde orobanş sapı görülebilir. 50-60cm boylanan orabanş tüm besin maddelerini ve suyunu ayçiçeği köklerinden çektiği için ayçiçeğinin boyu kısalır, tablası küçük kalır, verimi ve tohumda yağ oranı düşer. Mücadelesi, bu parazite dayanıklı çeşitlerin kullanımı ya da IMI grubu ayçiçeği çeşidi kullanılarak ve ilaçlama ile sağlanabilir.

iii) **Ayçiçeği Mildiyösü:***Plasmopara halstedii*,ayçiçeği tarımında görülen en önemli fungal hastalıktır, %100'e varan ekonomik kayıplara neden olabilir.Oomycetes ailesine aittir. Fide halindeyken enfekte olan ayçiçeği büyürken, patojen de dokularda gelişir. Enfekte olan bitkiler bodur kalırlar, yaprakların birbirine yaklaşması sonucu rozetleşme görülür. Enfekte bitkilerde tablaların içi tam dolmaz. Sistematik olmayanenfeksiyonlarda bitki normal gelişim gösterebilir, yapraklarda sadece lekeler görülür. Bitkinin 2-6 yapraklı dönemi sistemik enfeksiyonlarakarşı hassastır. Bu dönemi sorunsuz atlatan bitkilerde daha çok lokal yaprak lezyonları görülür. Tohum ekiminden 15 gün sonrasına kadar bol yağışlı giden iklim şartlarında sistemik enfeksiyonolasılığı oldukça yüksektir. Enfeksiyon için uygun sıcaklık 15-20 °C'dir. Oosporları toprakta 10 yıl varlığını

sürdürebileceğinden ve Türkiye topraklarının yaklaşık %90'nında görüldüğü için en etkili mücadele yöntemi hastalığa dayanıklı ayçiçeği çeşitlerinin kullanımıdır [57].



Şekil 1.2: 1) Tarlada *Plasmopara halstedii* bulaşık ayçiçeği 2) *Plasmopara halstedii* sporu yaprak stomasında 3) Ayçiçeği hücresinde protein işaretleyici ile görülen *plasmopara halstedii* 4) *Plasmopara halstedii* için ayçiçeğinin gösterdiği yüksek hassasiyet [49]

1.3. Bitkilerde Hastalıklara Karşı Dayanıklılık

Doğada bitkiler biyotik stres faktörlerini tanıma ve onlara karşı tepki vermemekanizması geliştirmişlerdir. Bitkiler patojen istilasını etkili bir şekilde durdurabilmek içinyapılarında bulunan fiziksel ve kimyasal engeller kadar, patojen saldırısı ile aktive olan uyarılabilir savunma mekanizmalarını da kullanırlar.

Bitkilerde bağışıklık sistemini uyaran mikrobiyal patojenlerin sahip olduğu yapılara, patojen ile ilgili moleküler yapılar (Pathogen Associated Molleculer Patterns-PAMPs)veya mikropla ilgili moleküler yapılar (Microbe Associated Molleculer Patterns-MAMPs) denir [22].Bitkiler, hücre yüzeyindeki reseptörler yardımıyla PAMP'ları ve MAMP'ları tanıyarak patojene karşı sahip oldukları savunma sinyallerini harekete geçirirler.Bu sinyal iletimi sonucunda hücre duvarının sağlamlaştırılması, reaktif oksijen türevlerinin ve etilen miktarının arttırılması ve hastalık gelişimi ile ilgili dayanıklılık genlerinin büyük bir bölümünün harekete geçirilmesi gibi dayanıklılık reaksiyonları hızlı ve etkin biçimdebaşlatılır [20].

Bitkiler, patojen saldırısının ardından, dominant dayanıklılık genleri ® tarafından geliştirilen, patojeni direkt veya indirekt yollarla tanımaya yarayan dayanıklılık mekanizmasını harekete geçirirler. R-proteinlerinin tetiklemesi ile meydanagelen dayanıklılık (gen-için-gen direnci) genellikle ırk-spesifiktir ve sadece R-proteinleri tarafından tanınanspesifik proteinleri (avr proteinleri) salgılayan patojenlere karşı etkilidir.R-genleri ile oluşturulan savunma tepkisi, saldırı bölgesinde bulunan enfekte ve komşu hücrelerde hızlı programlanmış ölümlerin (hipersensitif tepki, veya HR) ortaya çıkmasına neden olur. Özellikle mildiyö gibi biyotrofik patojenlerin o bölgede etkin şekilde sınırlandırılmasında son derece etkili bir savunma stratejisidir.Şimdiye kadar çok sayıda dayanıklılık R-geni karakterize edilmiş ve bazıları ıslah çalışmaları ile başarılı biçimde kültür bitkilerine aktarılmıştır [20]. R-genlerinin belirlenmesi veya bu genler ile ilişkili moleküler markırların tespiti dayanıklı çeşit geliştirme kapsamındaki en önemli ihtiyaçlardandır. Bu nedenle tarımsal biyoteknoloji çalışmalarının oldukça önemli bir kısmını bu tip çalışmalar oluşturmaktadır.

Diğer savunma tepkileri, reaktif oksijen türleri (ROS) üretmek, hücre çeperini mekanik olarak güçlendirmek ve antimikrobiyal bileşiklerin sentezi gibi reaksiyonları kapsamaktadır. Bu lokal reaksiyonlar dışında, saldırıya uğrayan bitki, enfeksiyon bölgesinden uzak dokularda savunma kapasitesini artırmak üzere sistemik tepkiler de oluşturmaktadır. Sistemik olarak uyarılmış bu tepki; bitkiyi ardıl patojen istilacılarına karşı, birkaç haftadan birkaç aya kadar değişebilen bir süre için, oldukça geniş ölçekteki pek çok patojene karşı koruyacak potansiyeldedir. Biyolojik olarak, birkaç uyarılmış sistemik savunma sistemi detaylı olarak tanımlanmıştır. Bunlar, nekrotik patojenler

tarafındantetiklenen “sistemik kazanılmış direnç” (SAR), patojen olmayan rizobakter strainlerinin köklerde kolonize olmasıyla aktive olan “uyarılmış sistemik direnç”(ISR)ve böceklerin beslenmesine bağlı olarak ortaya çıkan doku hasarlarıyla uyarılan “yara uyarımlı savunma”sistemlerini kapsamaktadır. Uyarılmış savunma tepkileri, iç bağlantıları olan sinyal iletim yolları ağı ile düzenlenir ve bu yolda hormonal sinyaller olan salisilik asit, jasmonik asit ve etilen etkilidir [27].

1.4. Ayçiçeğinde *Plasmopara halstedii* Dayanıklılığı

Mildiyö patojeninin 1888 yılında *Plasmopara halstedii* olarak isimlendirilmesinden sonra Avustralya hariç tüm dünyada gözlemlenmiş ve kıtalar arasında benzer ve farklı patojen ırkları tespit edilmiştir.Bugüne kadar yapılan çalışmalarda 44 *Plasmopara halstedii* ırkı tespit edilmiştir [75].Gulya[13,60] yaptığı karşılaştırmalı çalışmalarda;mildiyö patojenin yeni patojen ırklarının ortaya çıkması konusundasürekli ve sabit olmayan bir değişim içerisinde olduğunu vurgulamıştır.

Ayçiçeğinde*Pl* genleri tarafından sağlanan mildiyö dayanıklılığı, patojen ırkına karşı spesifik olmakla beraber bazı *Pl* genleri birden çok ırka karşı dayanıklılık sağlayabilmektedir. Bugüne kadar yapılan çalışmalar göstermiştir ki; bu dayanıklılık genleri kromozomlar üzerinde belli lokasyonlarda (LG-linkage group) kümelenmiş şekilde bulunmaktadır.

Çizelge1.2: Ayçiçeğinde bilinen *Pl* genleri, LG bölgeleri, kaynakları ve etkili olduğu patojen ırkları [54,75]

Gen	Gen Kaynağı	Gen Bölgesi	Kaynak	Etkili Olduğu Patojen Irkları
Pl_1	*H. annuus*	LG 8	(Wieckhorst, 2011)	100
Pl_2	*H. annuus*	LG 8	(Wieckhorst, 2011)	100,3xx
Pl_3	*H. annuus*		(Wieckhorst, 2011)	
Pl_4	*H. tuberosus*		(Wieckhorst, 2011)	
Pl_5	*H. tuberosus*	LG 13	(Wieckhorst, 2011)	1xx,31x,32x,33x,7xx
Pl_6	*H. annuus*	LG 8	(Wieckhorst, 2011)	1xx,3xx,7x1,7x2,7x3
Pl_7	*H. praecox*	LG 8	(Wieckhorst, 2011)	1xx,3xx,7x1,7x2,7x3
Pl_8	*H. argophyllus*	LG 13	(Wieckhorst, 2011)	Avrupa'da Bilinen Tüm Irklar
Pl_9	*H. annuus*		(Wieckhorst, 2011)	
Pl_{10}	*H. annuus*		(Wieckhorst, 2011)	
Pl_{11}	*H. annuus*		(Wieckhorst, 2011)	
Pl_{12}	*H. annuus*		(Wieckhorst, 2011)	
Pl_{13}	*H. annuus*	LG 1	(Wieckhorst, 2011)	100,300,310,330,700 710,730,731,770
Pl_{14}	*H. annuus*	LG 1	(Wieckhorst, 2011)	
Pl_{15}	*H. annuus*	LG 8	(Wieckhorst, 2011)	Avrupa ve Kuzey Amerika'da bilinen Tüm Irklar
Pl_{16}	*H. annuus*	LG 1	(Liu ve ark., 2012)	
Pl_{17}	*H. annuus*	LG 4	(Qi ve ark., 2015)	Bilinen Tüm Irklar
Pl_{18}	*H. argophyllus*	LG 2	(Qi ve ark., 2016)	Bilinen Tüm Irklar
Pl_{19}	*H. annuus*	LG 4	(Zhang ve ark., 2017)	Bilinen Tüm Irklar
Pl_{20}	*H. argophyllus*	LG 8	(Ma ve ark., 2017)	Bilinen Tüm Irklar
Pl_{Arg}	*H. argophyllus*	LG 1	(Wieckhorst, 2011)	Bilinen Tüm Irklar
Pl_v-Pl_z	*H. annuus*		(Wieckhorst, 2011)	

Mouzeyar ve ark.(1995) ilk *Pl* genini (Pl_1) tanımladıklarından sonra birçok farklı araştırmacı özellikle yabani ayçiçeği çeşitlerinde yeni dayanıklılık genleri tespit etmek ve bunları kültür çeşitlerine aktarmak için çalışmışlardır.

1.5. *Pl* Genlerinin İstenen Kültür Çeşitlerine Aktarılmasının Önemi

Plasmopara halstedii patojeninin yol açtığı zarar ülkemizde ve özellikle ayçiçeğinin yoğun olarak ekiminin yapıldığı Trakya Bölgesinde önemli boyutlardadır. Türkiye'nin tüm ayçiçeği ekimi yapıldığı bölgelerinde rastlanan patojen, iklim şartları ve benzeri

birçok etmene dayalı olarak yıldan yıla değişen, fakat ekonomik anlamda yüksek miktarda zararlara neden olmaktadır. Hastalıkla mücadele yöntemlerinden biri olarak Metalaxyl etken maddeli kimyasalların kullanımı; ekonomik olmaması, kullanım zamanındaki iklim koşullarına göre etkisinin azalması, bazı *Plasmopara halstedii* ırklarının ilaca dayanıklılık geliştirdiğinin raporlanması[38] ve çevreye verdiği zarar nedenleriyle tercih edilmemektedir. Hastalığa dayanıklı kültür çeşidi kullanmak,*Plasmopara halstedii* patojenine karşı en başarılı ve sürdürülebilir mücadele olup, hassas fakat elit çeşitleri dayanıklılık barındıran çeşitlerle melezleyerek, istenilen dayanıklılık genine sahip geri melez jenerasyonları elde edilebilir.

Araştırılan *Pl* genlerinin bazıları ırk spesifik olmakla beraber bazı *Pl* genleri bilinen tüm ırklara karşı dayanıklılık göstermektedir. Kültürü yapılan ayçiçeği çeşitlerine bu genlerin aktarılması patojen zararının engellenmesinin yanı sıra zamanla gen piramitleme yöntemiyle de çeşidin uzun yıllar bu dayanıklılığın üstesinden gelebilecek yeni ırklara karşı da korunma şansını arttıracaktır.

İstenilen *Pl* dayanıklılık genlerinin kültür çeşitlerine aktarılması klasik ıslah yöntemleri ya da moleküler markırlar yardımıyla seleksiyon (MAS) ile sağlanabilir. Klasik ıslah yöntemleri ile dayanıklılık genlerinin aktarılmasında bazı dezavantajlar mevcuttur. Çok sayıda bitki örneği ile çalışılmak zorunda olunması, dayanıklılı bireylerin tespit edilebilmesi için sağlıklı patojenler ile birçok kez başarılı inokülasyonlar yapma zorunluluğu, çok zaman alması ve ekonomik olmaması bu dezavantajlardan birkaçıdır.

1.6. Moleküler Markırlar ve MAS'ın Avantajları

Moleküler markır, genom içinde bir DNA parçasının farklılıklarını temsil eder ve bu farklılıklar eklenmeler, silinmeler, yer değiştirmeler, duplikasyonlar gibi olaylardan meydana gelebilir. DNA temelli moleküler markırlar taksonomi, fizyoloji, embriyoloji, genetik mühendisliği vb. alanlarda kullanılan çok yönlü araçlardır. Polimer zincir reaksiyonun (PCR) bulunmasından sonra, DNA markırları kullanılarak gen etiketleme, genetik haritalama, harita temelli tarımsal açıdan önemli genlerin belirlenmesi, genetik çeşitlilik çalışmaları, filogenetik analizler ve markırlar yardımıyla seleksiyon (MAS) çalışmaları kolaylaşmıştır [9].Yüksek yağ oranı, orobanşa, herbisitlere, hastalık ve

zararlılara dayanıklılık gibi önemli verim öğelerinde,ayçiçeği ıslahında istenilen karakterlerin elde edilmesi,moleküler marker metotları yardımıyla çalışılan araştırmalardır [66].

MAS için kullanılan moleküler markırlar, çevresel faktörlerden etkilenmez, her zaman her koşulda stabil olup, doku tipi ya da yaşam evrelerine göre farklılık göstermezler. Epistatik ve pleiotropik etkilere hassas olmayıp, dominant veya kodominant özellikte olabilirler ve kalıtımları basit ilkelere dayanmaktadır. Özellikle çevresel koşullardan çok etkilenen dolayısıyla fenotipik olarak gözlenmeleri zor olan karakterlerin seleksiyonunda son derece başarılı olup, doğru bir şekilde seçilmelerine olanak tanırlar. Ayrıca farklı karakterlere etki eden birden fazla genin eş zamanlı aktarımında, gen piramitlerinin oluşturulmasında, resesif genlerin seleksiyonunda, çevre faktörlerinin aşırı olduğu veya bitki gelişiminin geç dönemlerinde gözlemlenebilen karakterlerin seçiliminde de çok önemli avantajlar sunmaktadır. Herhangi bir çeşit karışıklığı durumunda kolaylıkla ayrım yapılmasında ve ticari hakların korunmasında hızlı ve etkili bir yöntemdir[48].

1.7. Ülkemizdeki Islah Programlarında Moleküler Markırlara Duyulan İhtiyaç

Dünyanın sayılı tarımsal ürün üreticilerinden olan Türkiye, tarımsal teknolojide yeterince gelişemediği için her yıl gittikçe artan oranlarda tohum ithal etmek zorunda kalmaktadır. Ülkemizde devlet destekli planlı ıslah çalışması 1891 yılında Halkalı Yüksek Ziraat Okulu'nun açılmasıyla başlamış, klasik ıslah çalışmalarına son yıllarda yaşanan teknolojik gelişmeler ve teknolojiye ulaşmanın kolaylaşması sayesinde biyoteknolojik destek ile devam etmektedir. Tarımsal teknolojinin yardımıyla klasik ıslah yöntemlerine göre daha hızlı ve kolay sonuçlar elde edilmesini sağlayan moleküler markır destekli seleksiyon sayesinde son yıllarda yerli çeşitlerin tescili ve piyasaya girişi hızlanmış fakat halen istenen seviyeye ulaşamamıştır. Ülkemizdeki ıslahçıların yurtdışından ithal ticari çeşitler ile rekabet edebilmesi için özellikle zamandan ve işgücünden tasarruf sağlayan moleküler markır destekli seleksiyon konusunda araştırmacılar ile birlikte çalışması için gerek TAGEM, gerekse TUBİTAK proje desteği sağlamaktadır.

1.8. *Pl* Genleri için Mevcut Moleküler Markırlar

Araştırmacılar tarafından yıllar içerisinde moleküler markır destekli seleksiyonda kullanılmak amacıyla çok sayıda markır çeşidi geliştirilmiştir. Perez ve ark. (2010) ayçiçeği için üç farklı jenerasyon moleküler markır tanımlamışlardır. Birinci jenerasyonolarak RFLP (Restiction Fragment Length Polymorphism - Kesilen Fragmentlerin Uzunluk Polimorfizmi), RAPD (Random Amplification of Polymorhic DNA - Değişken DNA Dizilerinin Tesedüfen Çoğaltılması), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism - Çoğaltılan Fragment Uzunluk Polimorfizmi) ve genomik SSR'lar (Simple Sequence Repeats - Basit Tekrar Dizileri) geliştirilmiştir. İkinci jenerasyon markırlar gen hedefli çalışacak şekilde ayçiçeğinde EST'lerden (Expressed Squence Tags – İfade Edilen Gen Segmenti) geliştirilen cDNA-RFLP probları, SNP (Single Nucleotide Polymorphism - Tek Nükleotid Polimorfizmi), Indel (Insertion/Deletion - Ekleme/Silinme) ve SSR markırlarıdır. Üçüncü jenerasyon markırlar, belirli bir yönde fenotipi etkileyen, alleller arasında rastgele DNA dizilim değişimlerini tespit eden markırlardır. Ayçiçeğinde son yıllarda genotipik haritalama çalışmalarının artması sayesinde *Pl* genlerinin tespiti ve MAS çalışmaları için ağırlıklı olarak SSR ve SNP markırları kullanılmaktadır.

Bertrand ve ark. yaptığı araştırmada, kullanılan markırların güvenliğininseçilen markırların gen bölgesine olan uzaklığı ile doğrudan bağlantılı olduğu vurgulanmıştır [23]. Örneğin; gen bölgesine upstreamde 5cM uzaklıktaki markırın tespiti ve bu markıra uygun primerin kullanılmasıyla gen bölgesinin tespiti %95 başarı oranıyla gerçekleşmektedir. Aynı şekilde gen bölgesine downstreamde 4 cM uzaklıktaki markırın tespiti ve bu markıra uygun primerin kullanılmasıyla gen bölgesinin tespiti %96 başarı oranıyla gerçekleşmektedir. Her iki yöndeki markıra uygun primerlerin beraber kullanımı %99,6 oranda başarı sağlamaktadır.

Bu çalışmada kullanılacak markırların seçimi, bölgedeki *Plasmopara halstedii* ırkları için herhangi bir ırk ayrımı çalışması yapılmadığı için halihazırda TTAE tarafından klasik ıslah çalışmalarında kullanılan mevcut ebeveyn hatlarının sahip olduğu bilinen *Pl* genleri baz alınarak literatür taraması sonucu yapılmıştır.

BÖLÜM 2

2. MATERYAL ve YÖNTEM

2.1. Bitki materyali

Bu tez çalışmasında kullanılan bitki materyali; Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü (TTAE) tarafından ayçiçeği ıslah programlarında kullanılan materyaller içerisinden seçilmiştir. Pl_6 ve Pl_{Arg} dayanıklılık geni içeren hatların hassas hatlar ile melezlenmesi ve kendilenmesi sonucu elde edilen materyal ile ebeveyn hatları çalışma için kullanılmıştır. Hastalık testleri sonucu 30 birey dayanıklı F_5, 30 birey hassas F_5olarak belirlenmiştir ve bu bireyler markırın seçiciliğinin belirlenmesinde kullanılmıştır. Ayrıca 60 birey ise guruplandırılmadan ayırıcı olarak tespit edilen markırın doğrulanması amacıyla taramalarda kullanılmıştır. Toplamda Pl_6 için 120 adet F_5kademesindeki genotipler ve Pl_{Arg} için 120 adet F_4 kademesindeki genotipler, hastalık testleri yapılarak bitki materyali olarak kullanılmıştır.

Çizelge2.1: Çalışmada kullanılan bitki genetik materyali listesi

Dayanıklılık Kaynağı Gen	Dayanıklı Ebeveyn	Hassas Ebeveyn	Melez
Pl_6	TT322	9702-R	K4-R-SN-28 9702-R-SN-6
Pl_{Arg}	RHA-419	9758-R	K3-R-SN-14 K3-R-SN-39



Şekil 2.1: Hastalık testleri yapılmış örneklerin toplanması

2.2. Patojen Materyali

Hastalık testinde kullanmak üzere inokülasyon için gerekli olan patojen materyali TTAE tarafından Trakya Bölgesindeki mildiyö epidemisi görülen ayçiçeği ekiliş alanlarından, ayçiçeğinin 8-10 yapraklı döneminde Çizelge 2.2'dekilokasyonlardan toplanmıştır. Toplanan patojen örnekleri inokülasyon hazırlığına kadar -80 °C 'de muhafaza edilmiştir.

Çizelge2.2: TTAE tarafından, çalışmada hastalık patojeni olarak kullanılan materyalin toplandığı lokasyonlar ve örnek sayıları [18]

Lokasyon adı	Lokasyonda örnek toplanan tarla sayısı	Tarla başına toplanan örnek sayısı
Edirne Merkez (Enstitü arazisi)	2	20
Kemal köy - Edirne	2	20
Budakdoğanca - Edirne	2	20
Karabulut - Edirne	2	20
Turnacı - Uzunköprü	2	20
Kurduköy – Uzunköprü	2	20
Çaliköy - Uzunköprü	2	20
Faraş - Hayrabolu	2	20
Aydinlar - Hayrabolu	2	20
Şahinköy - Malkara	2	20
Doluköy - Malkara	2	20
Eskibedir - Kırklareli	2	20
Değirmenköy –Silivri	2	20
Kırklareli - Merkez	2	20

2.3. Hastalık Testleri

Hastalık testleri TTAE tarafından enstitü bünyesinde yapılmıştır. Test edilecek ayçiçeği materyaline ait tohumların yüzeyi %1'lik NaOCl kullanılarak steril edilmiş ve saf su ile durulanarak çimlendirilmek üzere oda sıcaklığında karanlık bir ortamda 3-4 gün bekletilmiştir. Çimlenen tohumların kökçükleri 0,5-1cm uzunluğa eriştiğinde hastalığın bulaştırılması için petriler içerisine konarak hazırlanan spor solüsyonuna bırakılmıştır. Spor solüsyonu hazırlığı için toplanan hastalıklı bitki örnekleri kullanılmadan önce saf su içerisine bitki yapraklarından fırça ile süpürülen patojen sporları yoğunluğu mikroskop altında thoma lamı yardımıyla belirlenmiş, 30000-50000 sporangium/ml yoğunlukta spor solüsyonu oluşturulmuştur. Çimlendirilmiş bitkicikler spor solüsyonu içerisinde 16°C'de 4-5 saat bekletilmesinin ardından kum+perlit karışımından oluşan plastik bardaklara ekilmiş ve ortam sıcaklığı 24°C ayarlanarak, 12 saat aydınlık-12 saat karanlık olacak şekilde ayarlanan kontrollü iklim odasında büyümeye bırakılmıştır. Bitkilerin ilk gerçek yaprakları 2-3mm büyüklüğe ulaştığında bardakların üstü %100 nem ortamı sağlayabilmek için plastik poşetler ile hava

almayacak şekilde kapatılmış, 16°C de 24-48 saat bekletilerek hassas bitkilerde beyaz renkte gözle görülebilir spor oluşması sağlanmıştır. Dayanıklı bireylerde bu spor oluşumu gözlemlenmemiş olup hassas ve dayanıklı bireylerbelirlenerek numaralandırılmış ve moleküler çalışma sonuçları ile karşılaştırma amaçlı kayıt altına alınmıştır.



Şekil 2.2: TTAE'de hastalık inokülasyonu çalışmaları

2.4. Moleküler Analizler

Bu tez çalışması için yapılan tüm moleküler çalışmalar, Trakya Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.



Şekil 2.3: Trakya Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümü Biyoteknoloji Laboratuvarı

2.4.1. DNA İzolasyonu

TTAE tarafından hastalık testleri yapılan materyallerin ilk gerçek yapraklarından, örnek başına 150-200mg bitki dokusu olacak şekilde 2ml'lik tüplerin içerisine alınmıştır. Örnekler toplandıktan sonra -196°C'lik sıvı azot içerisine atılarak dondurulmuş ve -20°C'de DNA izolasyonusafhasına kadar muhafaza edilmiştir.

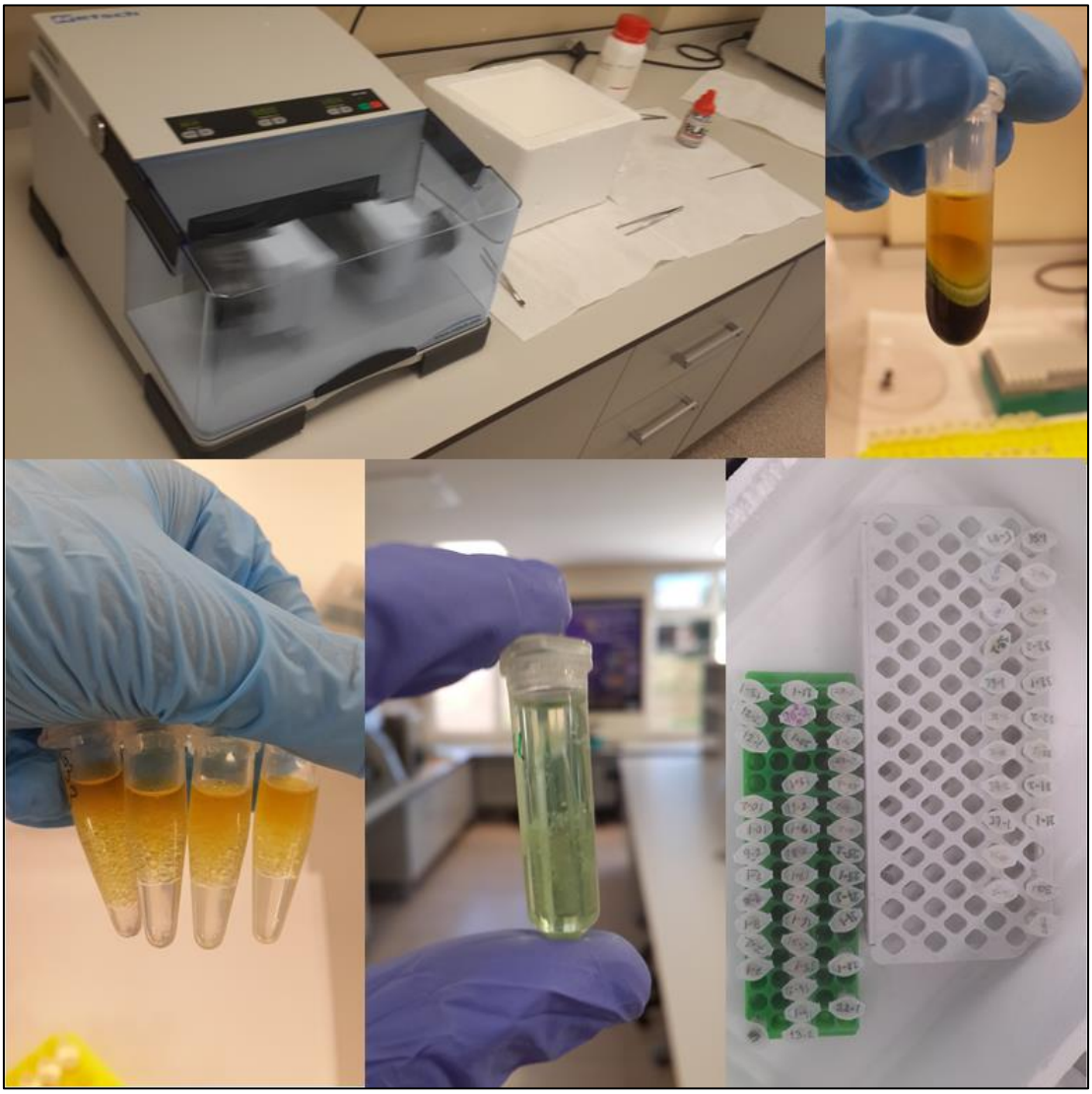
Bitki materyaline ait yapraklardan alınan örneklerin DNA'ları aşağıda detayları verilen Doyle&Doyle [23]'un CTAB yöntemleri modifiye edilerek izole edilmiştir.

1) 2ml'lik tüpler içerisine alınan 150-200mg yaprak örneği sıvı azot içerisinde dondurulan ve her bir örneğe 10mg PVP ve ikişer adet 3mm metal bilye ilave edilmiştir.

2) Metal bilye ilave edilmiş örnekler doku parçalayıcısında (RETSCH MM400) saniyede 30 devir hızında 90 saniye süreyle parçalanarak dokuların homojen toz haline gelmesi sağlanmıştır.
3) Örneklere 65°C'ye ısıtılmış ve kullanmadan hemen önce %0,2 β-mercaptoethanol ilave edilen, %2 CTAB Extraction Buffer'dan 750µl ilave edilmiştir. (%2 CTAB, 20mM EDTA, 100mM Tris, 1,4M NaCl, pH:8,1)
4) 65°C'de 25 dakika, dakikada 500 devir ısıtıcılı çalkalayıcıda inkübasyona bırakılmıştır.
5) Oda sıcaklığına soğutulan örneklere 750µl fenol:kloroform:izoamilalkol (25:24:1) ilave edilerek 20-25 defa ters-düz edilmiştir.
6) Örnekler 13000rpm'de oda sıcaklığında 15 dakika santrifüj edilmiştir.
7) Santrifüj sonrası oluşan üst faz(süpernatant) dikkatlice 1,5ml'lik tüplere alınmış ve oda ısısında 750µl kloroform ilave edilmiştir.
8) Örnekler 13000rpm'de oda sıcaklığında 15 dakika santrifüj edilmiştir.
9) Santrifüj sonrası oluşan üst faz tekrar 1,5ml'lik tüplere alınarak, alınan hacmin 0,5 katı oda sıcaklığında 5M NaCl ve 2 katı -20°C'de soğutulmuş %99,8 Etanol ilave edilerek 5-10 defa ters-düz edilmiştir.
10) Örnekler +4°C'de 20 dakika bekletilmiştir.
11) Örnekler soğutmalı santrifüjde 13000rpm'de +4°C'de 10 dakika santrifüj edilerek DNA pelletlerinin dibe çökmesi sağlanmıştır.
12) Santrifüj sonrası DNA pelletlerinin düşmediğinden emin olunarak üst sıvı atılmış ve 1ml %75 etanol ilave edilerek pelletlerin serbest hale geçmeleri sağlanmıştır.
13) 13000rpm de 5 dk santrifüj yapılmış ve üst sıvı tekrar atılarak DNA pelletleri kurumaya bırakılmıştır.
14) Kurutulan pelletlere 200µl TE Buffer (10mM Tris, 1mM EDTA, pH:8) eklenmiş ve pelletlerin çözünmeleri sağlanmıştır.
15) Örneklere 2'şer µl RNase A (10mg/ml) ilave edilmiş 37°C'de 30 dakika enzim aktivasyonu için inkübasyon sağlanmış ve ardından 65°C'de 10 dakika enzim inaktivasyonu için bekletilmiştir.
16) Örneklere 300µl TE Buffer ilave edilerek hacim 500µl'ye tamamlanmıştır

17) Örneklere 500µl fenol:kloroform:izoamilalkol ilave edilerek 10-15 defa ters-düz edilmiştir.
18) 13000rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir.
19) Üst faz yeni 1,5ml'lik tüplere alınır ve alınan örnek hacminin 0,1 katı kadar +4°C'de 3M Na-asetat (pH:4,8) ve 2 katı kadar -20°C'de %99,8 Etanol ilave edilerek 5-10 defa ters-yüz edilmiştir.
20) Örnekler -20°C'de 1 saat beklemeye bırakılmıştır..
21) +4°C'ye ayarlanmış soğutmalı santrifüjde 13000rpm'de 15 dakika santrifüj edilmiştir.
22) Üst sıvı atılmış ve 1ml -20°C'de soğutulmuş %70 Etanol ilave edilerek pelletlerin serbet hale geçmesi sağlanmıştır.
23) Örnekler +4°C'ye ayarlanmış soğutmalı santrifüjde 13000rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir.
24) Üst sıvı atılarak pelletlerin kurutulması sağlanmıştır.
25) Kurutulan pelletlere 200µl TE ilave edilerek çözündürülmüştür.

Miktar ve kalite tayini yapıldıktan sonra DNA ana stokları olarak, sulandırma işlemine kadar +4°C'ye, sulandırma işleminden sonra uzun süreli muhafaza için -20°C'ye kaldırılmıştır.



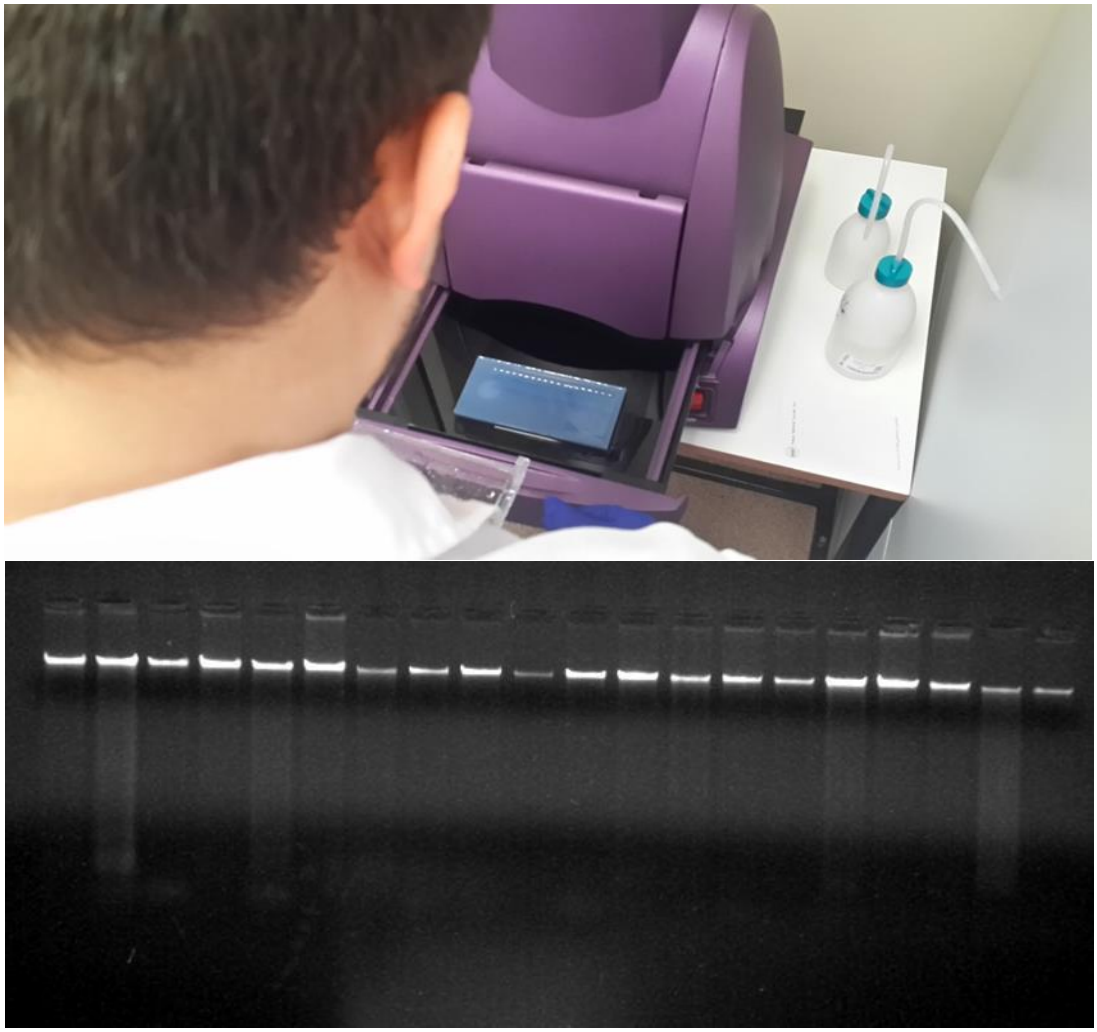
Şekil 2.4: Ayçiçeği örnekleri DNA izolasyonu

2.4.2. DNA Miktar ve Kalite Tayini

DNA miktar tayini için OPTİZEN NanoQ Spektrofotometresi kullanılmış ve örnekler için DNA miktarı ng/µl cinsinden OD260/OD280 (nükleik asit saflığı için) oranına dikkat edilerek kaydedilmiştir.

DNA miktarları dikkate alınarak DNA kalitesini tespit etmek ve DNA kırıkları olup olmadığını görebilmek için her örnekten yaklaşık 800ng olacak şekilde %0,8 konsantrasyonlu, EtBr (30µl/L) (Etidyum bromür) içeren jeleyüklemeler yapılmış ve

120V 80mA akımda 1 saat yürütülmüştür. Elektroforezin ardından jel görüntüleme cihazında UV ışık altında örneklerin DNA kalitesine bakılmıştır.



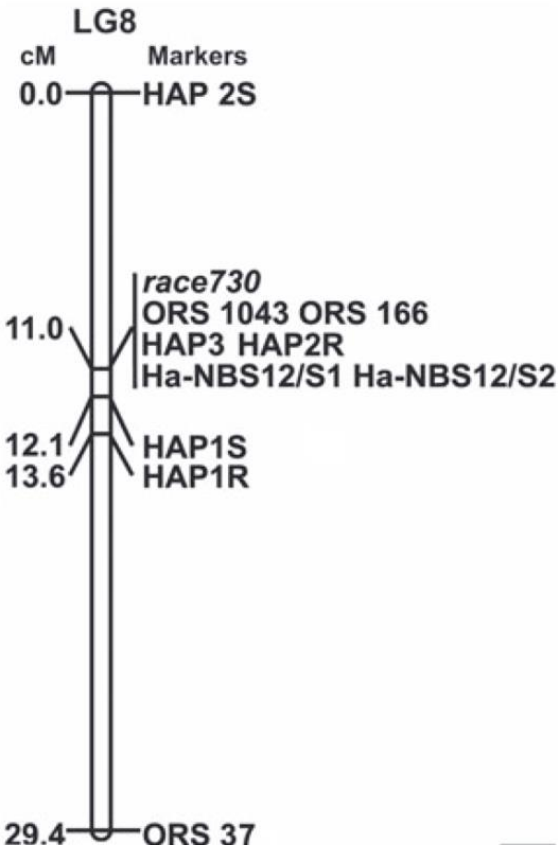
Şekil 2.5: Ayçiçeği örneklerinden izole edilen genomik DNA'ların jel elektroforez görüntüsü

2.4.3. *Pl6* Geni İçin Markır Çalışmaları

Tez çalışması için seçilen Pl_6 dayanıklılık geninin belirlenmesinde kullanılan markırlar litaratür taraması sonucunda belirlenmiş olup [7,31,35]baz dizileri verilerek Sentromer DNA Teknolojileri firmasına sentezlettirilmiştir.

Çalışmaya alınan markırların seçiminde, Pl genlerinin haritalandığı makalelerden yararlanılmış ve markırın gen bölgesine yakınlığına dikkat

edilmiştir.Markırın gen bölgesine uzaklığına bağlı olarak rekombinasyon oranı değişmektedir. Bu oranı en aza indirmek için en yakın markırların kullanılması önemlidir. Bu nedenle genin <5 cM uzağında yer alan markırlar çalışmaya dahil edilmiştir.



Şekil 2.6: Ayçiçeği *Pl*$_6$ gen bölgesi genetik haritalamasında dayanıklılık markırları ve uzaklıkları [7]

Çizelge2.3: *Pl_6*dayanıklılık geninin tespitinde kullanılan markırlar

Oligonükleotid Adı	**Baz Dizisi 5'- 3'**	**T_m Değeri (°C)**	**GC Oranı (%)**
Hap2-F	GTCTACTACATGGTTTCCGTTTTC	70	42
Hap2-R	TGCTTCTTCCTTCTATCTCACTC	70	43
Hap3-F	GTTTGTGGATCATCTCTATGCG	69	45
Hap3-R	TGCTTCTTCCTTCTATCTCACTC	70	43
ORS 166-F	CAGCCACATGCCCTCTGAC	72	63
ORS 166-R	TGTTAAGAACCGCGACAACTGC	71	50
ORS 1043-F	CCAAACCGTCATGTTCTATGTTC	70	43
ORS 1043-R	AGTGTGATTGCGAATTGTAGTGC	70	43

Çizelge2.3'teki Forward ve Reverse primerler kullanılarak Pankovic ve ark. [7] kullandığı PCR içeriği(Çizelge2.4) ve koşulları optimize edilmiş (Çizelge 2.5 ve Çizelge 2.6) PCR denemeleri yapılarak sonuçlar elde edilmiştir.

Çizelge2.4: *Pl_6* geninin tespiti için kullanılan primerlerin PCR içerikleri

PCR İçeriği (25 µl)	**Final Konsantrasyon (Hap Grubu)**	**Final Konsantrasyon (ORS Grubu)**
10x PCR Buffer	1X	1X
$MgCl_2$	3mM	3mM
dNTPs	0,4mM	0,2mM
Forward Primer	0,6mM	0,3mM
Reverse Primer	0,6mM	0,3mM
Taq DNA Polimeraz	1U	1U
BSA	250µg	250µg
DNA	40 ng	40 ng

Çizelge2.5: *Pl_6* Hap grubu primerler için kullanılan PCR koşulları

Basamak	**Sıcaklık (°C)**	**Süre**	**Döngü (Cycle)**
1	95	4 dakika	1
2	95	10 saniye	30
3	59	30 saniye	
4	67	30 saniye	
5	67	5 dakika	1

Çizelge2.6: *Pl_6* ORS grubu primerler için kullanılan PCR koşulları

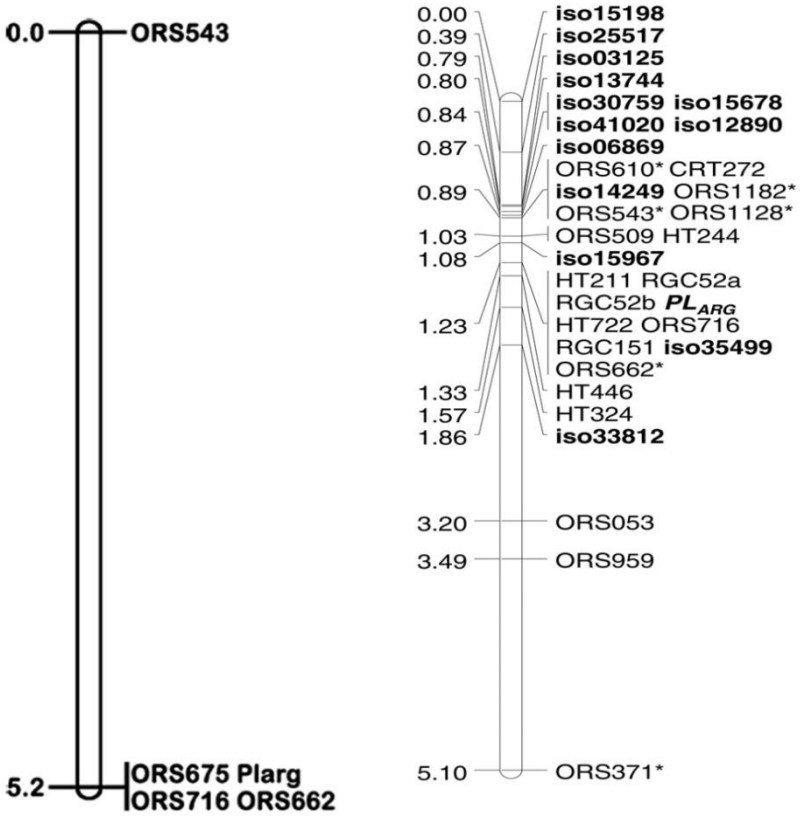
Basamak	**Sıcaklık (°C)**	**Süre**	**Döngü (Cycle)**
1	**95**	**3 dakika**	**1**
2	95	30 saniye	7 (Her döngüde -1°C)
3	64	30 saniye	
4	67	30 saniye	
5	94	30 saniye	33
6	58	30 saniye	
7	67	30 saniye	
8	67	20 dakika	1

Elde edilen PCR ürünlerinden bazıları PCR çalışmasının başarılı olup olmadığını görmek için kapiller elektroforeze yüklenmeden önce jel elektroforezde yürütülerek görüntülenmiş ve başarılı olanlar kapiller elektroforeze yüklenmiştir. Başarılı PCR ürünleri Advance Analytical Fragment Analyzer kapiller elektroforeze yüklenerek fragment boyutları ölçülmüş ve fragment boyutlarına göre karşılaştırmalar yapılarak seleksiyonda kullanılabilirlikleri test edilmiştir.

2.4.4. *Plarg* geni için markır çalışmaları

Tez çalışması için seçilen Pl_{Arg} dayanıklılık geninin belirlenmesinde kullanılan markırlar litaratür taraması sonucunda belirlenmiş olup [6,23,31,55]baz dizileri verilerek Sentromer DNA Teknolojileri firmasına sentezlettirilmiştir.

Seçilen markırlar için; *Pl*$_6$'daki gibi, gen haritalama çalışmalarında markırın gen bölgesine yakınlığına dikkat edilmiş, genin varlığının tespiti için markırın kaç cM uzaklıkta olduğuna bakılarak çalışmaya dahil edilip edilmeyeceğine karar verilmiştir.



Şekil 2.7: Ayçiçeği Pl_{Arg} gen bölgesi genetik haritalamasında markırlar ve uzaklıkları[6,23,31,55]

Çizelge2.7: Pl_{Arg} dayanıklılık geninin tespitinde kullanılan markırlar

Oligonükleotid Adı	Baz Dizisi 5'- 3'	T_m Değeri (°C)	GC Oranı (%)
ORS 552-F	CCATCCCTTCCCTCTCTTTC	70	55
ORS 552-R	GTGGCTGGAATCTCATCACC	70	55
ORS 662-F	CGGGTTGGATATGGAGTCAA	68	50
ORS 662-R	CCTTTACAAACGAAGCACAATTC	70	43
ORS 675-F	CGGCTAAGAGAAAGGGAGAGA	71	52
ORS 675-R	CGTCGCTGAACCAACAGTTAT	69	48
ORS 716-F	CCCCACAACCCATAGCCTAA	70	49
ORS 716-R	CGTCGCTGAACCAACAGTTAT	70	48

Çizelge2.7'deki Forward ve Reverse primerler kullanılarak Imerovski ve arkadaşlarının (2014) kullandığı PCR içeriği(Çizelge 2.8) ve koşulları optimize edilerek(Çizelge 2.9) PCR denemeleri yapılmış ve sonuçlar elde edilmiştir.

Çizelge2.8: *Pl_{Arg}* geninin tespiti için kullanılan primerlerin PCR içerikleri

PCR İçeriği (15 µl)	**Final Konsantrasyon**
10x PCR Buffer	1X
$MgCl_2$	3mM
dNTPs	0,2mM
Forward Primer	0,3mM
Reverse Primer	0,3mM
Taq DNA Polimeraz	1U
BSA	25µg
DNA	40 ng

Çizelge2.9: *Pl_{Arg}* primerleri için kullanılan PCR koşulları

Basamak	**Sıcaklık (°C)**	**Süre**	**Döngü (Cycle)**
1	95	2 dakika	1
2	95	30 saniye	7 (Her döngüde -1°C)
3	64	40 saniye	
4	72	45 saniye	
5	94	30 saniye	32
6	58	30 saniye	
7	72	45 saniye	
8	72	20 dakika	1

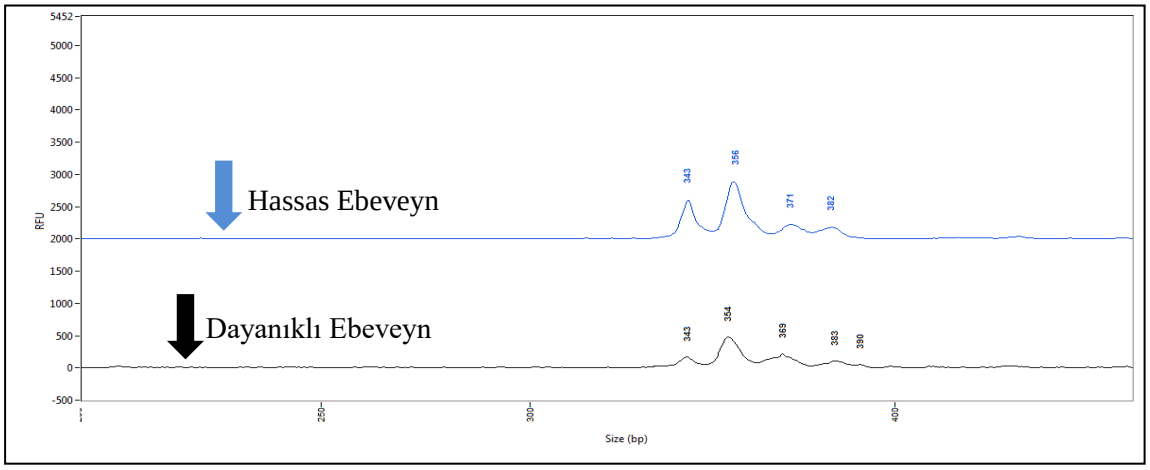
Elde edilen PCR ürünlerinden bazıları PCR çalışmasının başarılı olup olmadığını görmek için kapiller elektroforeze yüklenmeden önce jel elektroforezde görüntülendi ve başarılı görülenler kapiller elektroforeze yüklenmiştir. Başarılı PCR ürünleri Advance Analytical Fragment Analyzer kapiller elektroforeze yüklenerek fragment boyutları ölçülerek ve fragment boyutlarına göre karşılaştırmalar yapılarak *Pl_{Arg}* için seçici olup olmadıkları tespit edilmiştir.

3. BULGULAR

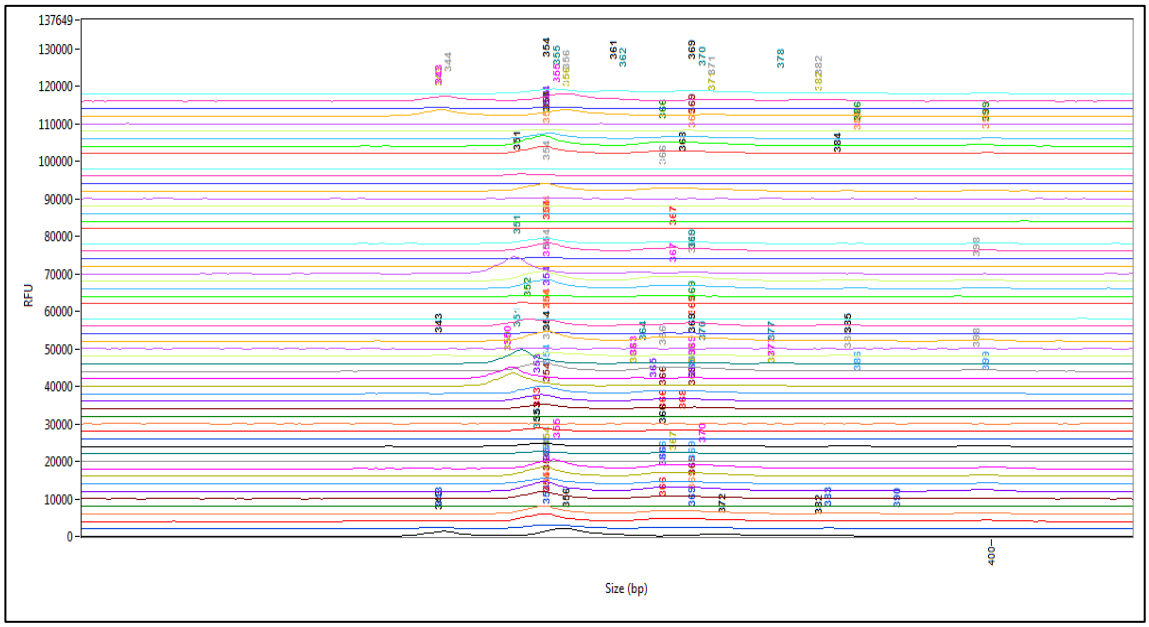
3.1. *Pl*$_6$ İçin Kullanılan Markırların Sonuçları

3.1.1. ORS166 Markırı

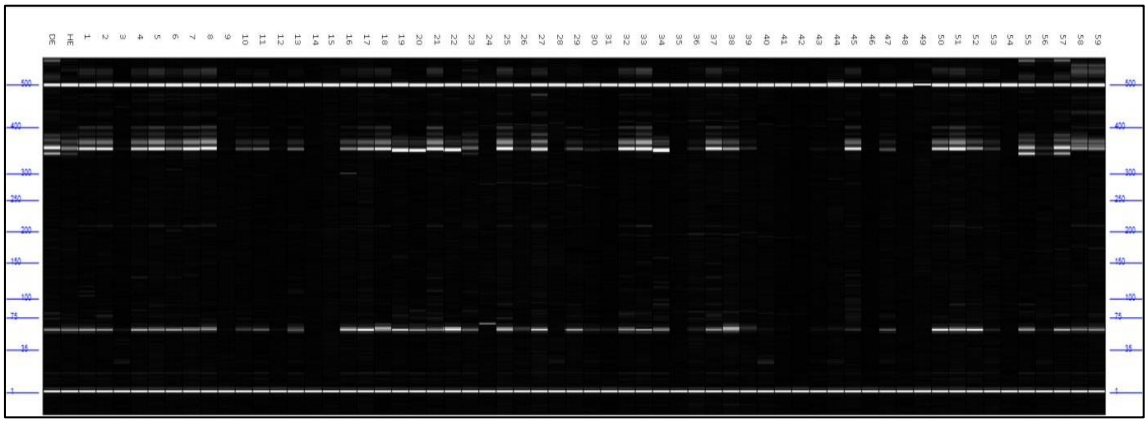
Yapılan çalışma sonucu ORS166 markırı ile, ebeveyn ve F5 popülasyonuna ait 30 dayanıklı ve 30 hassas bireyde 343bp, 354bp, 369bp ve 383bp bantları çoğaltılmış olup(Şekil 3.1) herhangi bir ayırt edici DNA fragmenti gözlenmemiştir.



Şekil 3.1.A: *Pl*$_6$ ORS166 markırı kullanılarak yapılan PCR sonucu kapiller elektroforez görüntüsü,ebeveynler



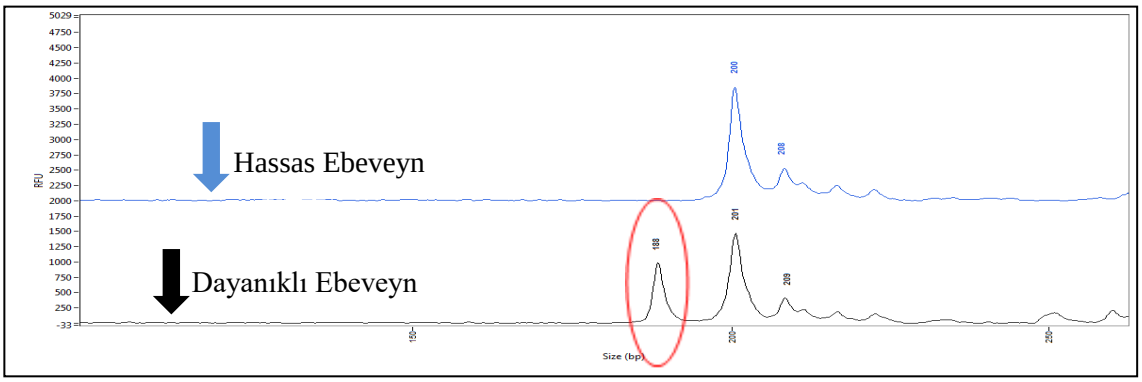
Şekil 3.1.B: *Pl*$_6$ORS166 markırı kullanılarak yapılan PCR sonucu kapiller elektroforez görüntüsü,ebeveynler ve F_5bireyler



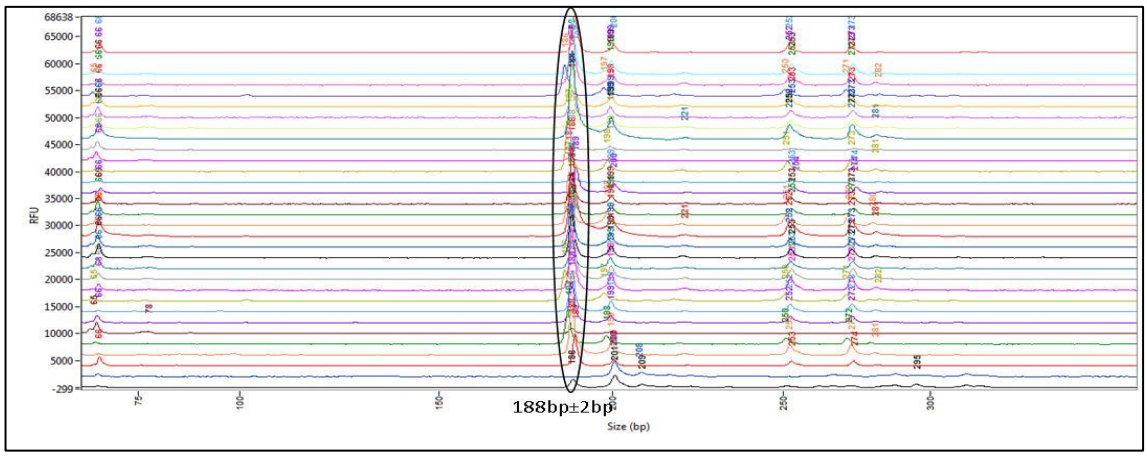
Şekil 3.1.C: *Pl*$_6$ORS166 markırı kullanılarak yapılan PCR sonucu kapiller elektroforez görüntüsü,ebeveynler ve F_5bireyler(DE:Dayanıklı Ebeveyn, HE: Hassas Ebeveyn)

3.1.2. ORS1043 Markırı

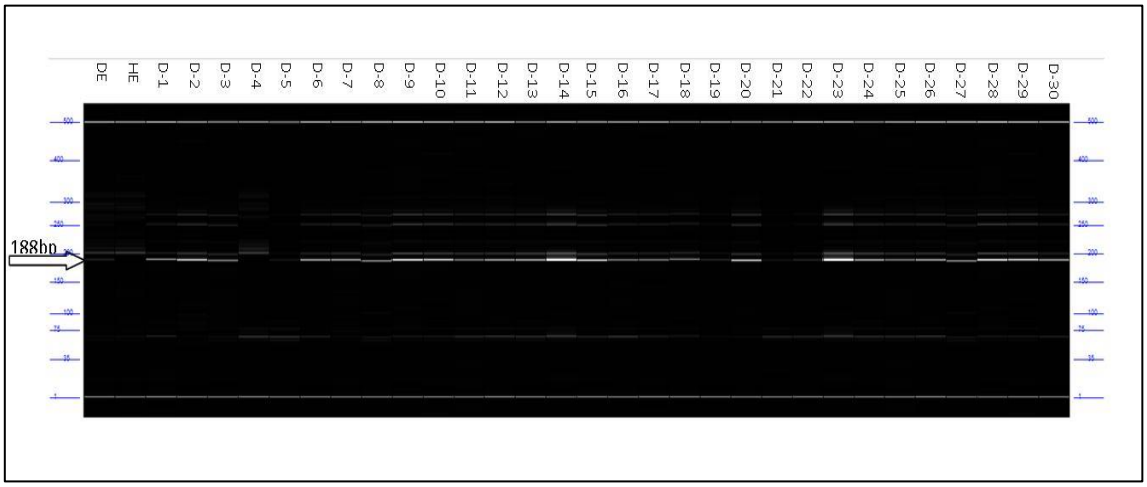
Yapılan çalışma sonucu ORS1043 markırı ile, ebeveyn ve F5 popülasyonuna ait 30 dayanıklı ve 30 hassas bireyde 188bp, 200bp, 209bp, 253bp ve 273bp boyutunda DNA fragmentleri çoğaltılmıştır. (Şekil 3.2 ve Şekil 3.3) Bunlardan 188bp büyüklüğündeki fragmentin sadece dayanıklı bireylerde bulunduğu gözlenmiştir. Bu durum ORS1043 markırının *Pl*$_6$ dayanıklılık geninin belirlenmesinde seçici olarak kullanılabileceğini ortaya koymaktadır. ORS1043 primerine göre dayanıklılık profili gösteren F5 örnekleri D(Dayanıklı) ve göstermeyen örnekler H(Hassas) hastalık testleri ile de uyumlu sonuçlar ortaya koymuştur.



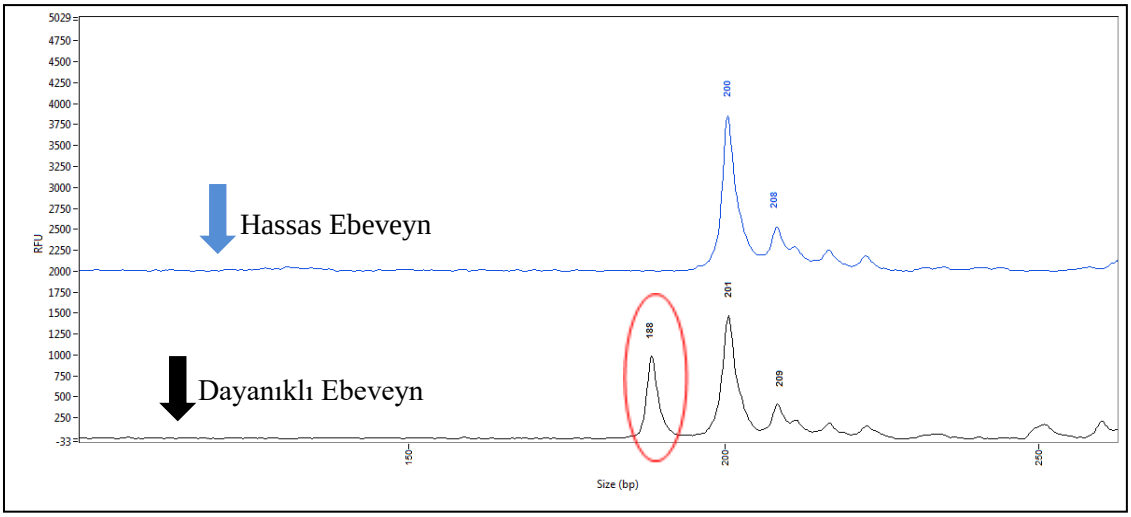
Şekil 3.2.A: *Pl*$_6$ ORS1043 markırı kullanılarak yapılan PCR sonucu kapiller elektroforez görüntüsü.Kırmızı halka ile işaretlenmiş 188 bp DNA fragmenti ayırıcı özelliktedir.



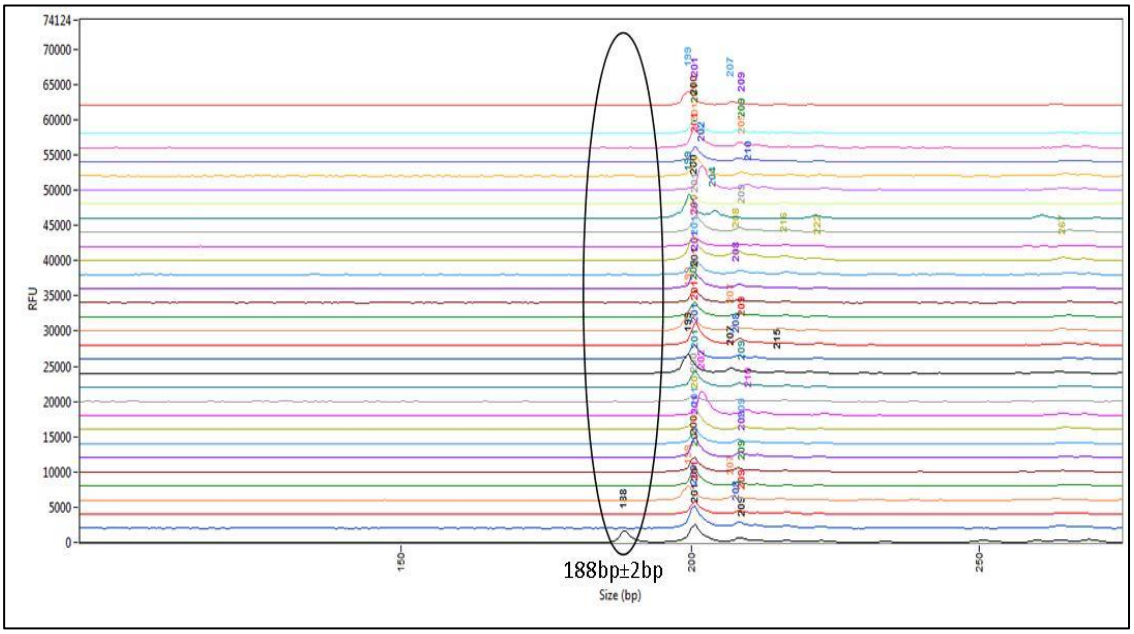
Şekil 3.2.B: *Pl*$_6$ ORS1043 markırı kullanılarak yapılan PCR sonucu kapiller elektroforez görüntüsü,ebeveynler ve dayanıklılık profiline sahip F_5bireyler



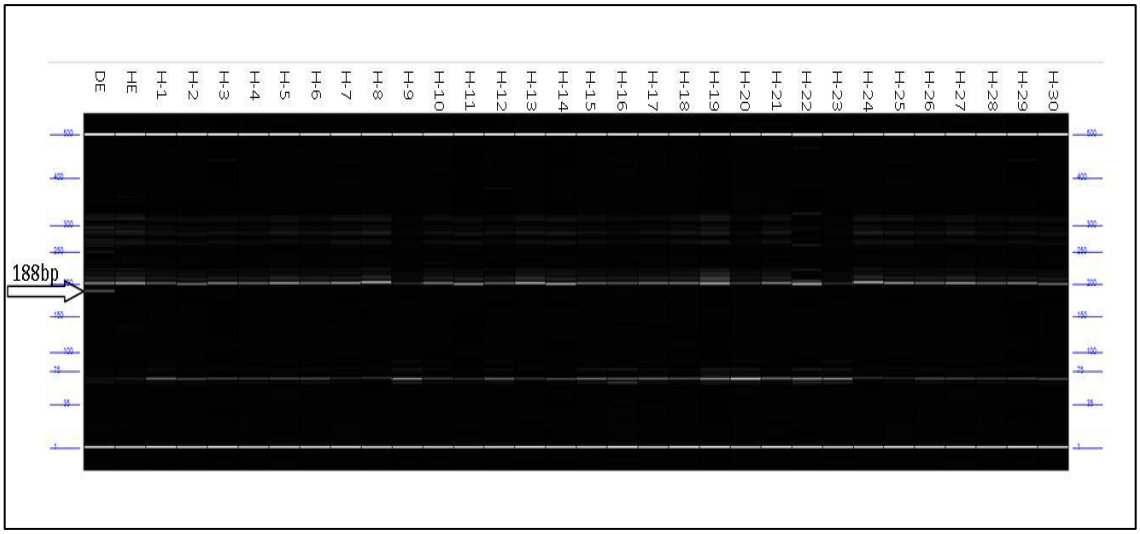
Şekil 3.2.C: *Pl*$_6$ ORS1043 markırı kullanılarak yapılan PCR sonucu kapiller elektroforez görüntüsü ebeveynler ve dayanıklılık profiline sahip F_5bireyler (DE:Dayanıklı Ebeveyn, HE: Hassas Ebeveyn)



Şekil 3.3.A: *Pl*$_6$ ORS1043 markırı kullanılarak yapılan PCR sonucu kapiller elektroforez görüntüsü, ebeveynler



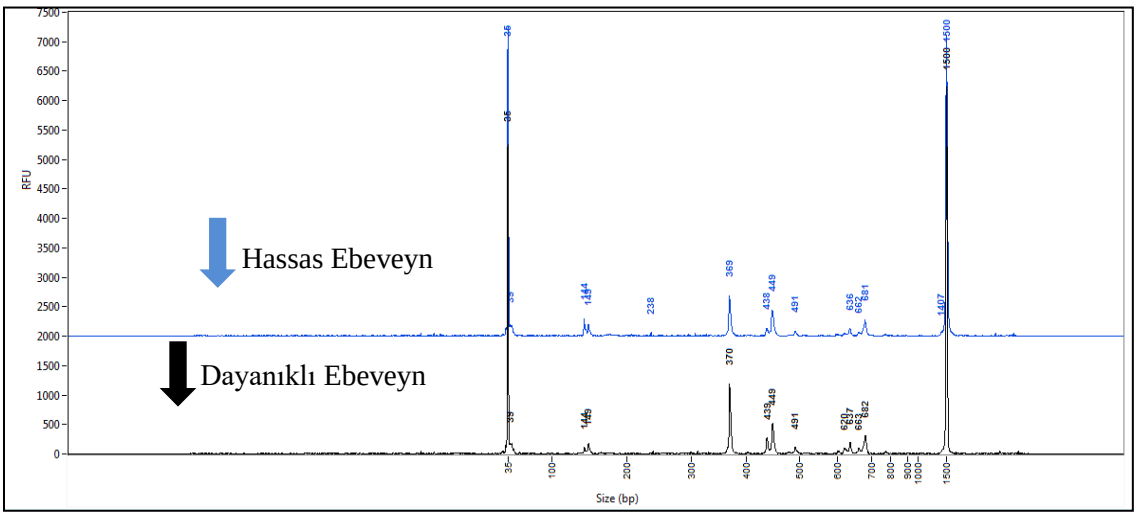
Şekil 3.3.B: *Pl*$_6$ ORS1043 markırı kullanılarak yapılan PCR sonucu kapiller elektroforez görüntüsü, ebeveynler ve hassas profile sahip F_5 bireyler



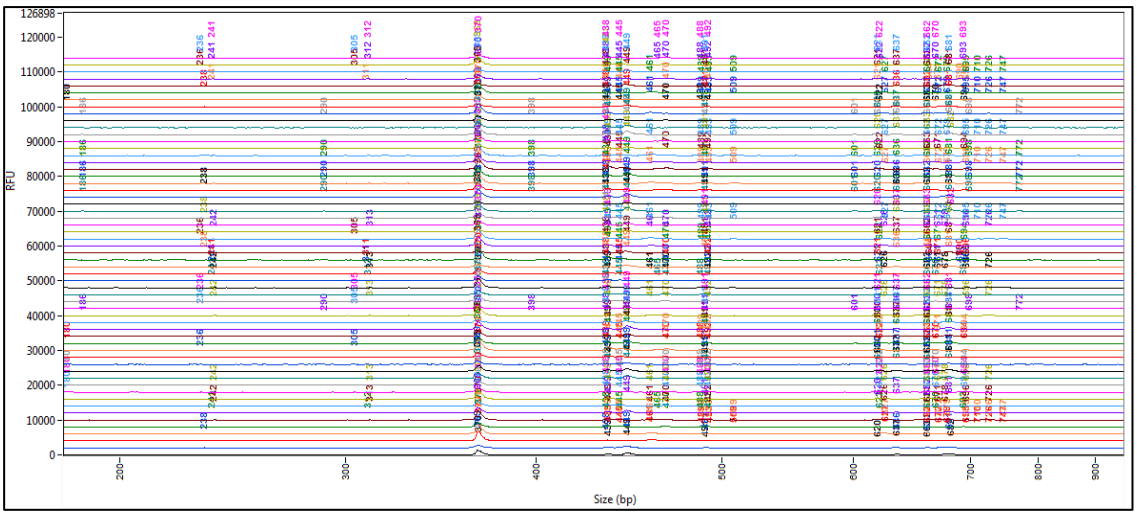
Şekil 3.3.C: *Pl*$_6$ ORS1043 markırı kullanılarak yapılan PCR sonucu kapiller elektroforez görüntüsü, ebeveynler ve hassas profile sahip F_5 bireyler (DE:Dayanıklı Ebeveyn, HE: Hassas Ebeveyn)

3.1.3. HAP2 Markırı

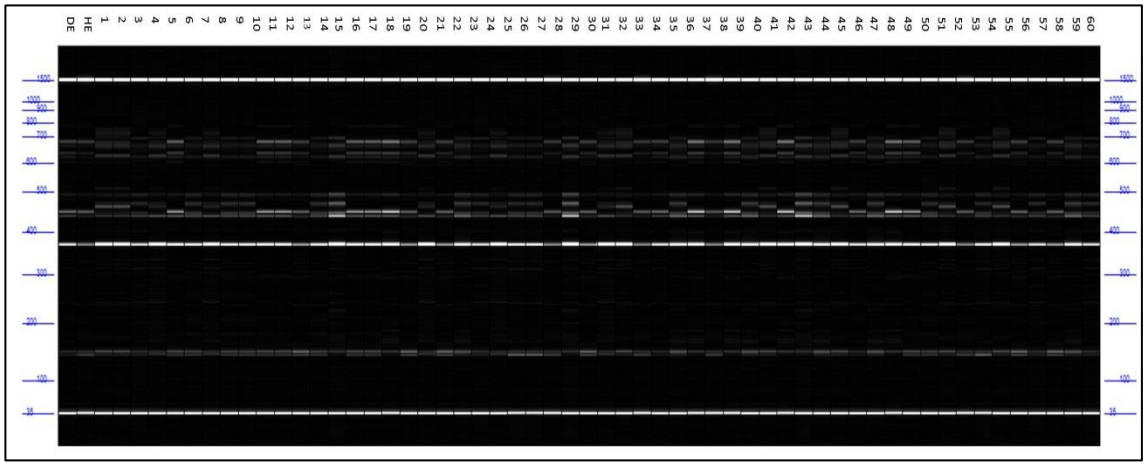
Yapılan çalışma sonucu HAP2 markırı ile, ebeveyn ve F5 popülasyonuna ait 30 dayanıklı ve 30 hassas bireyde 370bp, 439bp, 449bp ve 682bp DNA fragmentleri çoğaltılmış olup (Şekil 3.4) herhangi bir ayırt edicilik gözlenmemiştir.



Şekil 3.4.A: *Pl*$_6$ HAP2 markırı kullanılarak yapılan PCR sonucu kapiller elektroforez görüntüsü, ebeveynler



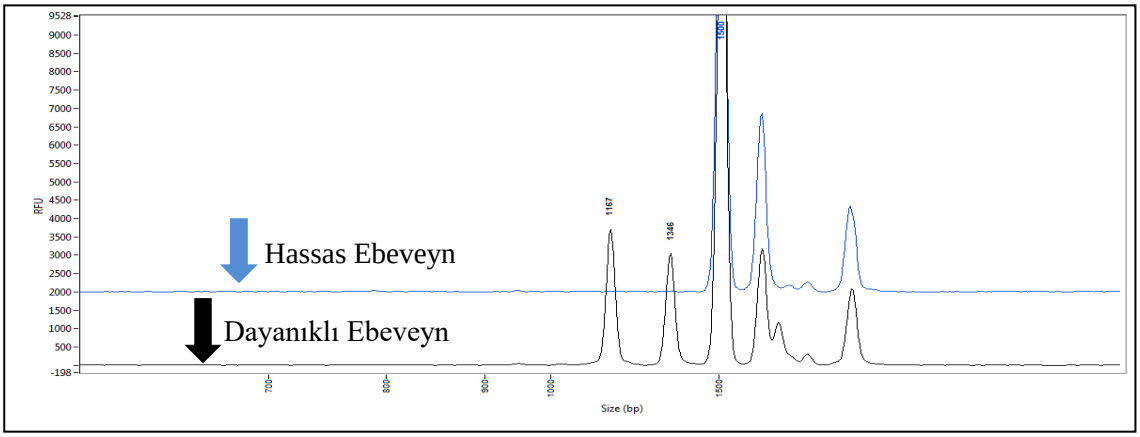
Şekil 3.4.B: *Pl*$_6$HAP2markırı kullanılarak yapılan PCR sonucu kapiller elektroforez görüntüsü, ebeveynler ve F_5 bireyler



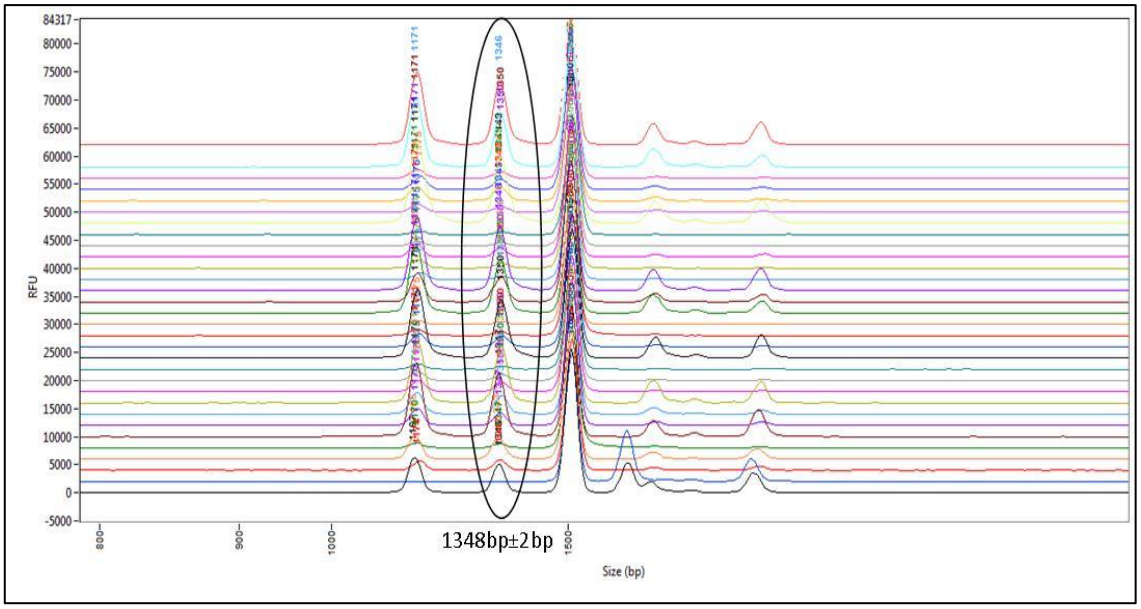
Şekil 3.4.C: *Pl*$_6$HAP2markırı kullanılarak yapılan PCR sonucu kapiller elektroforez görüntüsü, ebeveynler ve F_5 bireyler (DE:Dayanıklı Ebeveyn, HE: Hassas Ebeveyn)

3.1.4. HAP3 Markırı

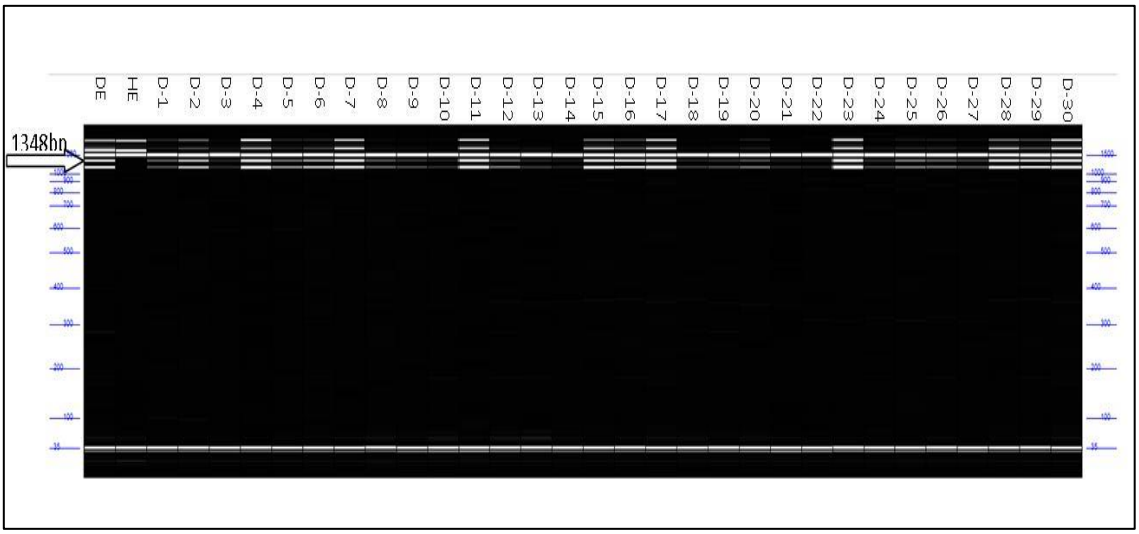
HAP3 markırı ile yapılan çalışma sonucu, ebeveyn ve bu ebeveynlerin F5 kademesindeki popülasyonuna ait 30 dayanıklı ve 30 hassas bireyde 1165 bp, 1348 bp, 1610 bp, 1725 bp ve 2100 bp büyüklüğünde DNA fragmentleri çoğaltılmıştır (Şekil 3.5, Şekil 3.6). Bunlardan 1348 bp büyüklüğündeki DNA fragmentinin dayanıklılık karakteri ile birlikte döllerde segrege olduğu hassas bireylerde ise bu fragmentin bulunmadığı tespit edilmiştir. 1348 bp'lik DNA fragmentinin *Pl*$_6$ geni taşıyan bireylerin belirlenmesinde uygun bir markır olduğu ve MAS amaçlı kullanılabilir nitelikte olduğu tespit edilmiştir.



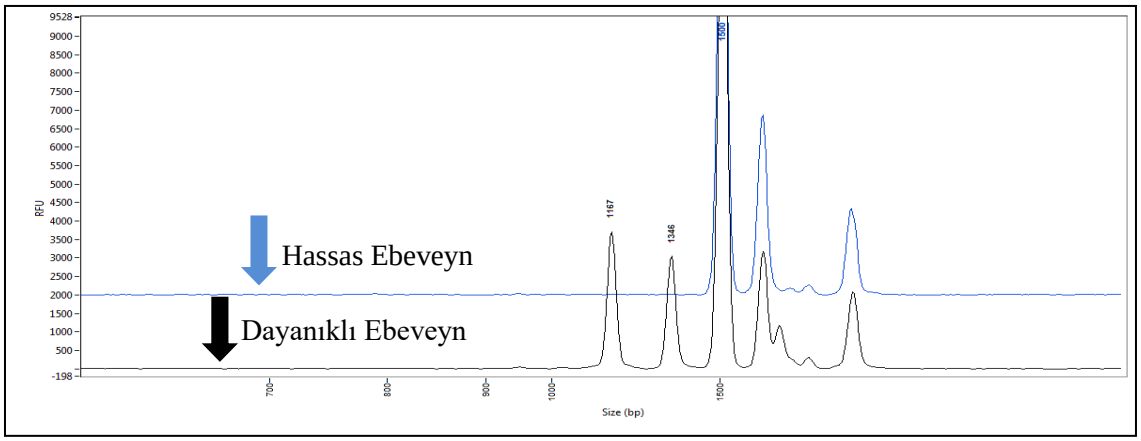
Şekil 3.5.A: *Pl_6* HAP3 markırı kullanılarak yapılan PCR sonucu kapiller elektroforez görüntüsü, ebeveynler



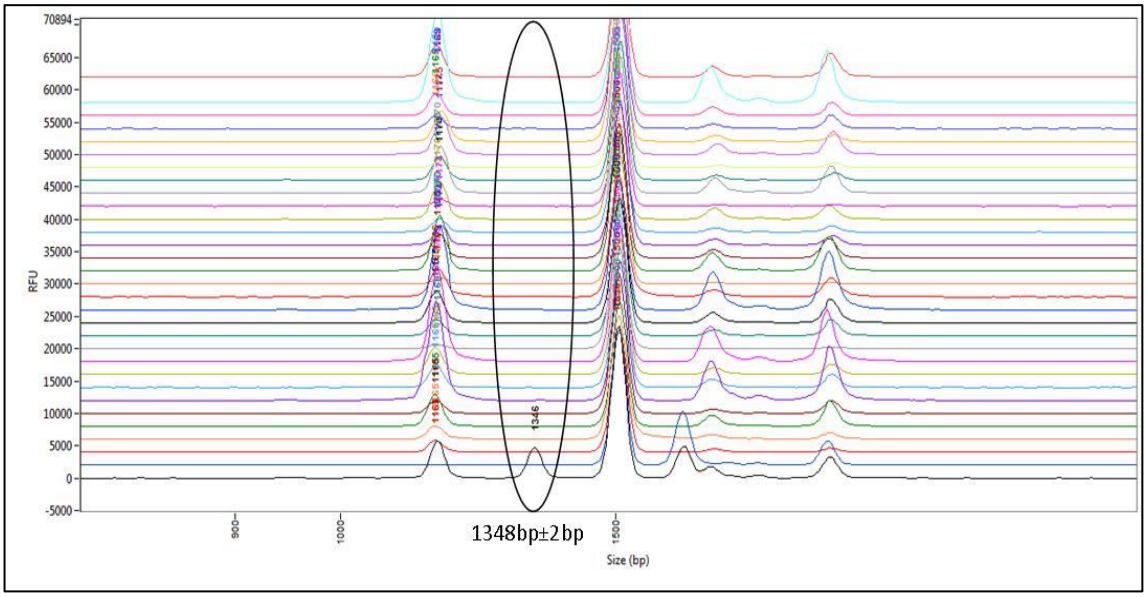
Şekil 3.5.B: ***Pl_6***HAP3markırı kullanılarak yapılan PCR sonucu kapiller elektroforez görüntüsü, ebeveynler ve dayanıklılık profiline sahip F_5 bireyler



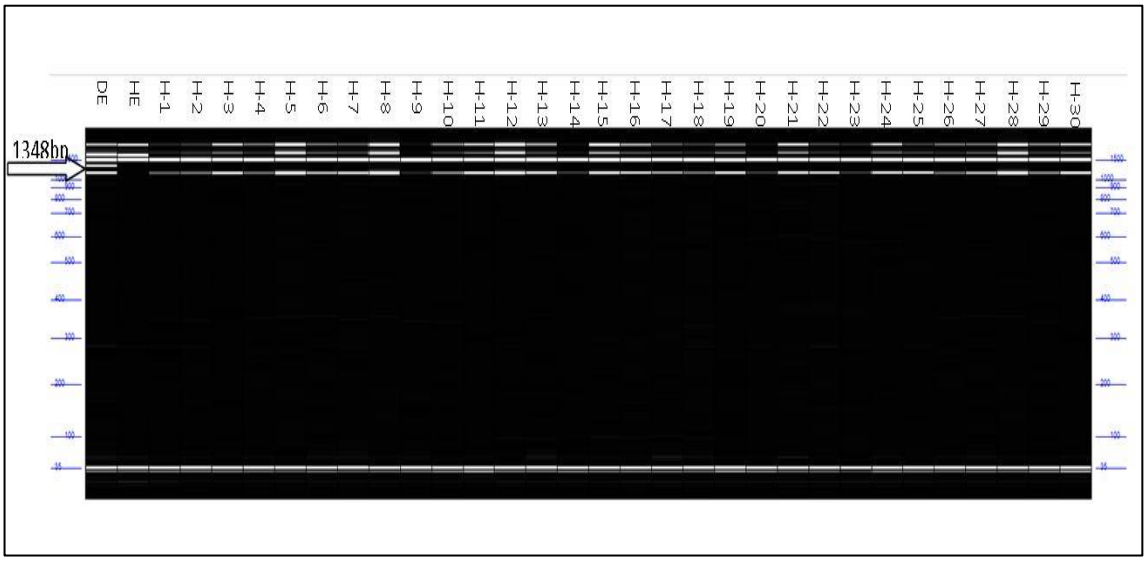
Şekil 3.5.C: ***Pl*$_6$**HAP3markırı kullanılarak yapılan PCR sonucu kapiller elektroforez görüntüsü, ebeveynler ve dayanıklılık profiline sahip F_5 bireyler(DE:Dayanıklı Ebeveyn, HE: Hassas Ebeveyn)



Şekil 3.6.A: *Pl*$_6$ HAP3 markırı kullanılarak yapılan PCR sonucu kapiller elektroforez görüntüsü, ebeveynler



Şekil 3.6.B: ***Pl*$_6$**HAP3markırı kullanılarak yapılan PCR sonucu kapiller elektroforez görüntüsü, ebeveynler ve hassas profile sahip F_5 bireyler

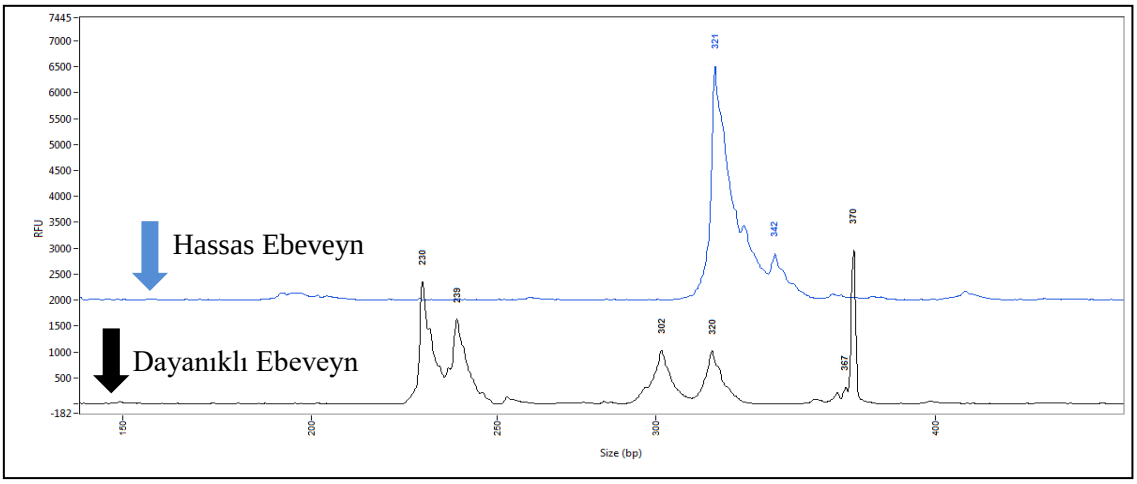


Şekil 3.6.C: *Pl*$_6$ HAP3 markırı kullanılarak yapılan PCR sonucu kapiller elektroforez görüntüsü ebeveynler ve hassasprofilesahip F_5bireyler (DE:Dayanıklı Ebeveyn, HE: Hassas Ebeveyn)

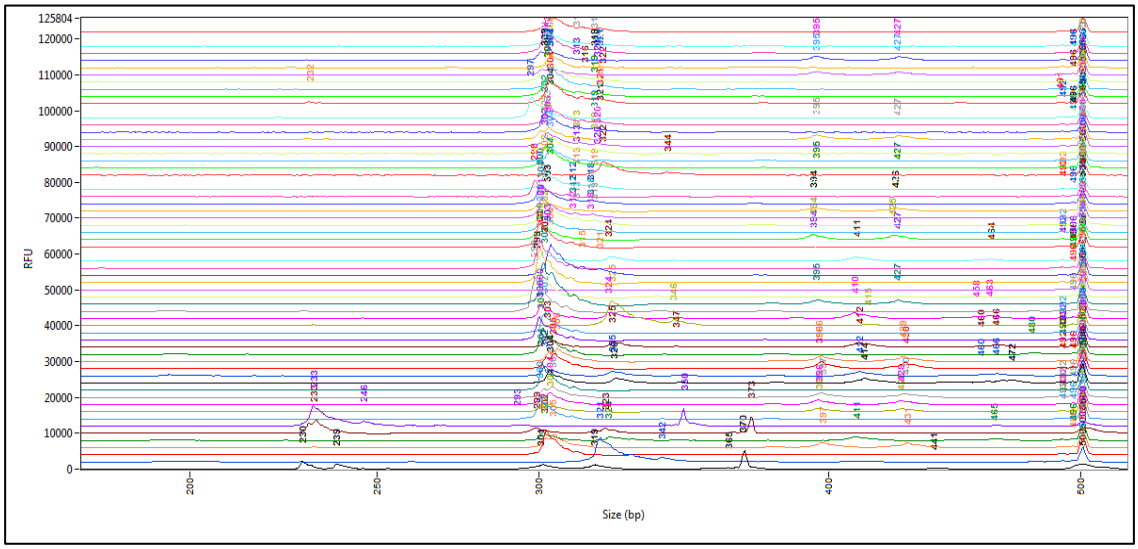
3.2. *Pl*$_{Arg}$ İçin Kullanılan Markırların Sonuçları

3.2.1. ORS716 Markırı

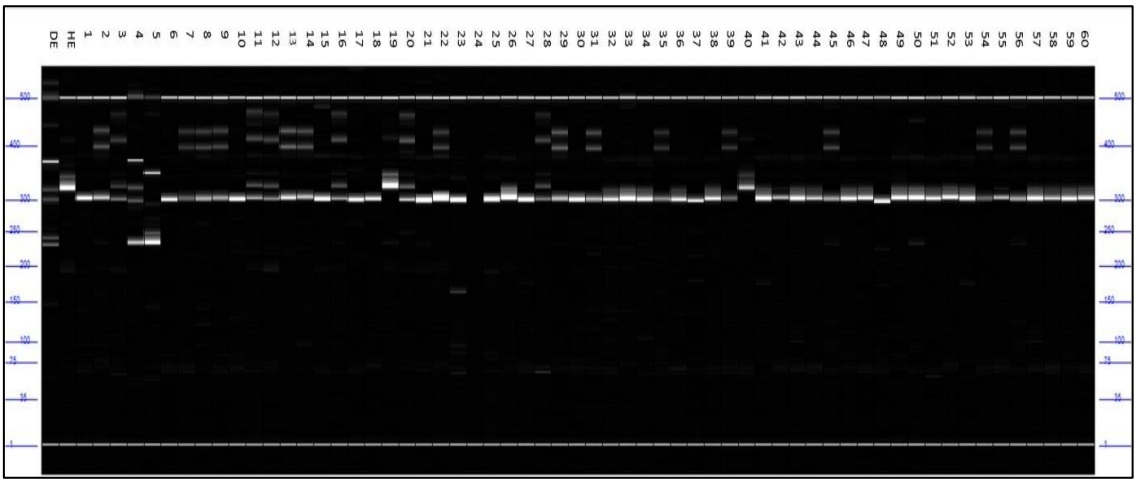
Yapılan çalışma sonucu ORS716 markırı ile, ebeveyn ve F5 popülasyonuna ait 30 dayanıklı ve 30 hassas bireyde 302bp, 321bp, 342bp, 350bp ve 371bp DNA fragmentleri çoğaltılmış olup (Şekil 3.7) herhangi bir ayırt edicilik gözlenmemiştir.



Şekil 3.7.A: *Pl*$_{Arg}$ ORS716 markırı kullanılarak yapılan PCR sonucu kapiller elektroforez görüntüsü ebeveynler



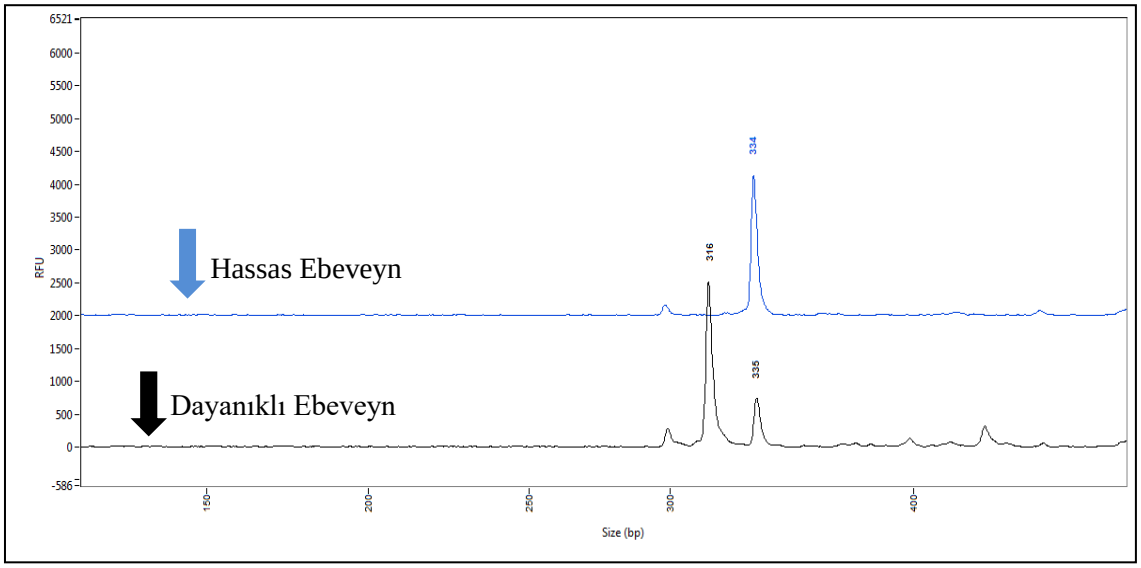
Şekil 3.7.B: *Pl*$_{Arg}$ ORS716 markırı kullanılarak yapılan PCR sonucu kapiller elektroforez görüntüsü ebeveynler ve F_5 bireyler



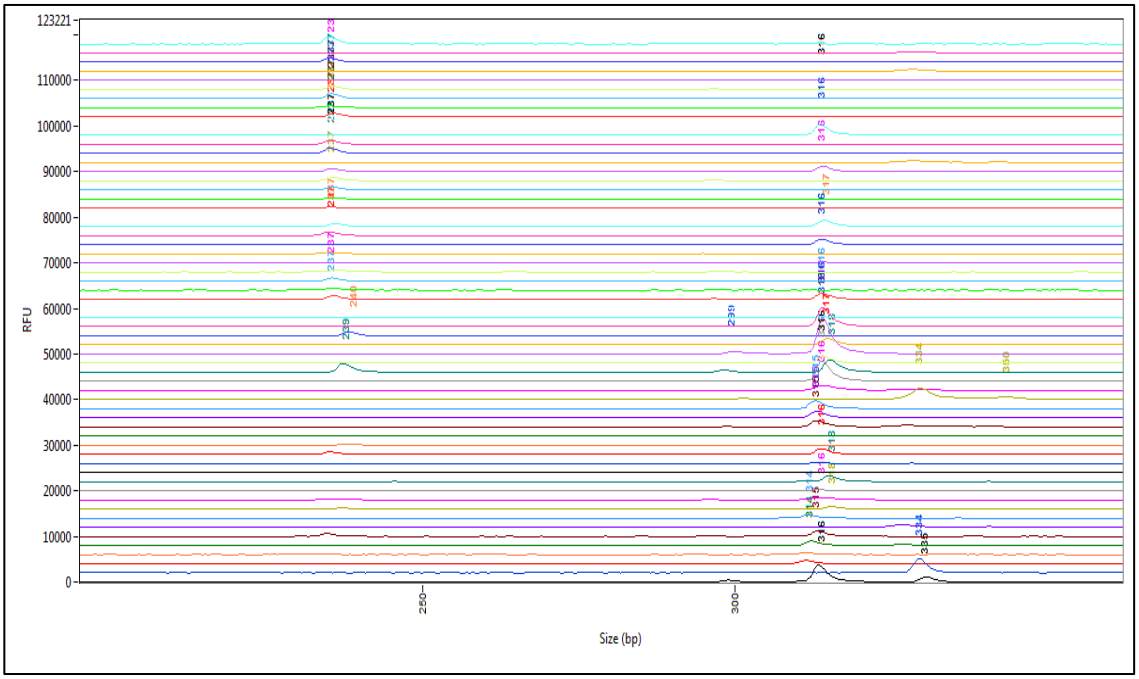
Şekil 3.7.C: *Pl_{Arg}* ORS716 markırı kullanılarak yapılan PCR sonucu kapiller elektroforez görüntüsü ebeveynler ve F_5 bireyler (DE: Dayanıklı Ebeveyn, HE: Hassas Ebeveyn)

3.2.2. ORS662 Markırı

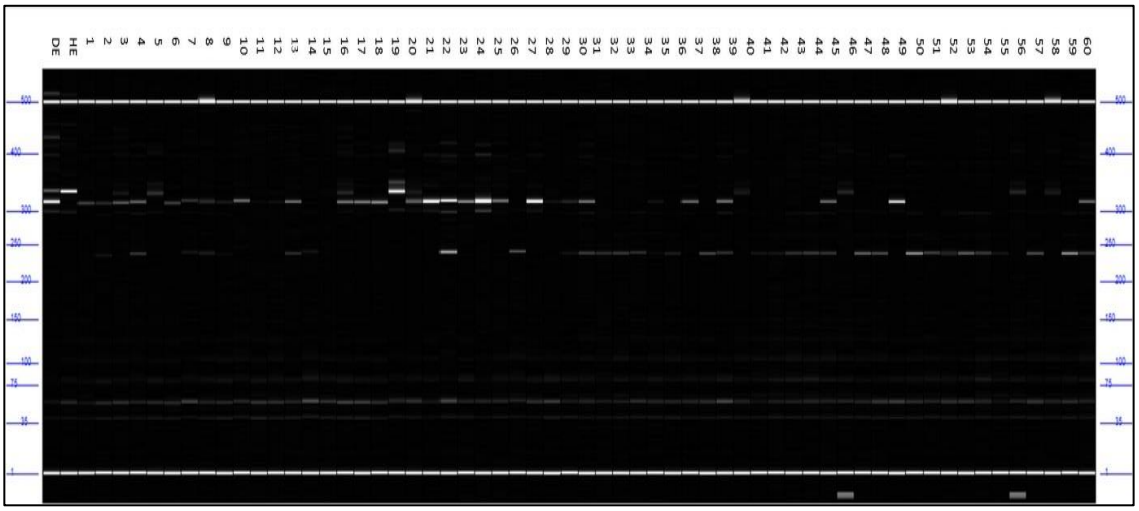
Yapılan çalışma sonucu ORS662 markırı ile, ebeveyn ve F_5 popülasyonuna ait bireylerde 316bp ve 335bp bantları çoğaltılmış olup(Şekil 3.8) herhangi bir ayırt edici özellik gözlenmemiştir.



Şekil 3.8.A: *Pl_{Arg}* ORS662 markırı kullanılarak yapılan PCR sonucu kapiller elektroforez görüntüsü ebeveynler



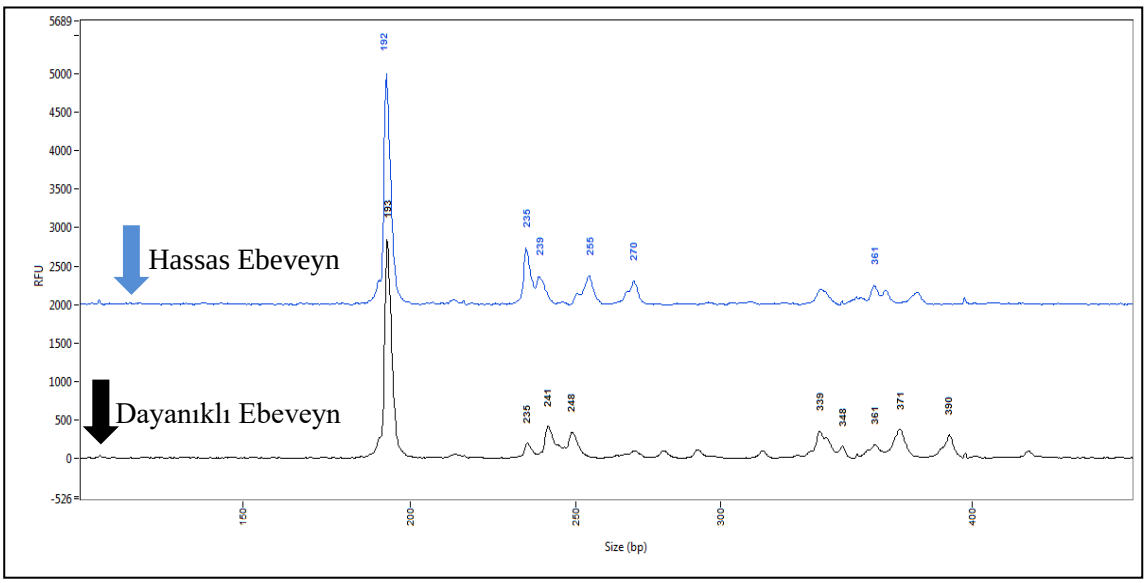
Şekil 3.8.B: *Pl_{Arg}* ORS662 markırı kullanılarak yapılan PCR sonucu kapiller elektroforez görüntüsü ebeveynler ve F_5bireyler



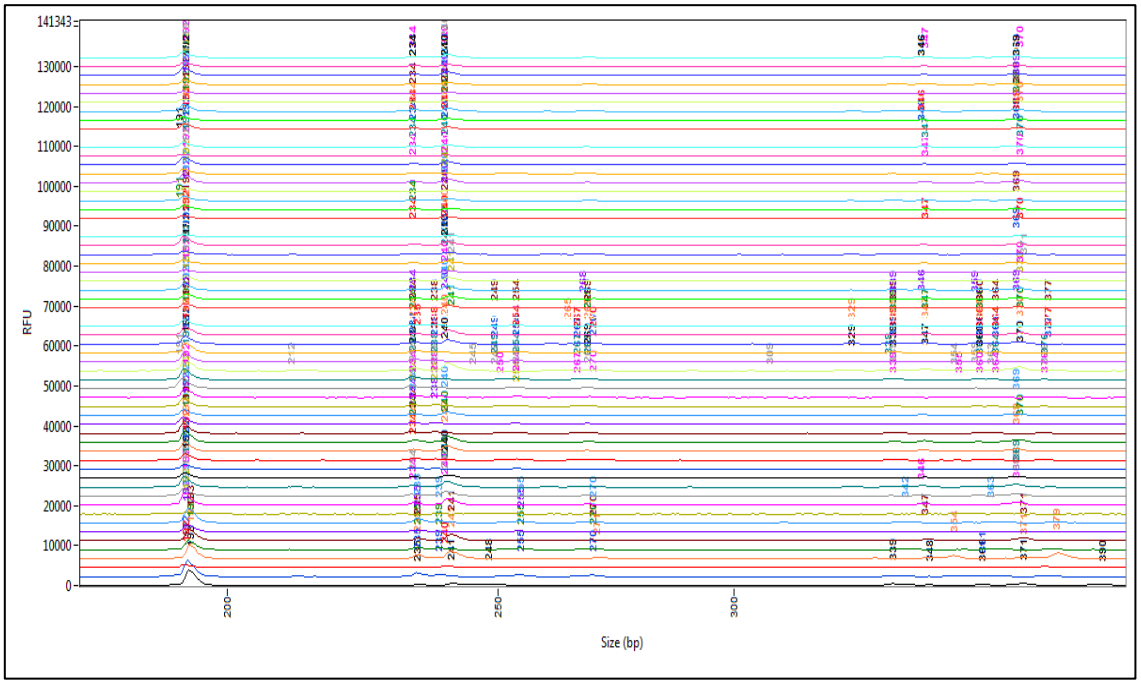
Şekil 3.8.B: *Pl_{Arg}* ORS662 markırı kullanılarak yapılan PCR sonucu kapiller elektroforez görüntüsü ebeveynler ve F_5bireyler (DE: Dayanıklı Ebeveyn, HE: Hassas Ebeveyn)

3.2.3. ORS552 Markırı

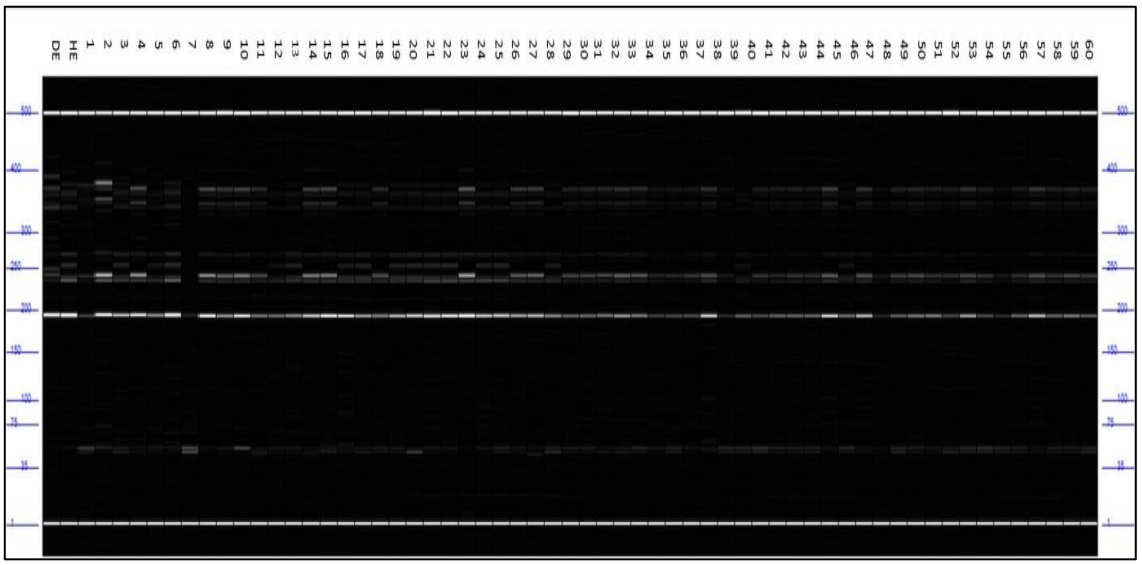
Yapılan çalışma sonucu ORS552 markırı ile, ebeveyn ve F_5 popülasyonuna ait dayanıklı ve hassas bireylerde 192bp, 235bp ve 240bp büyüklüğünde DNA fragmentleri çoğaltılmış olup (Şekil 3.9) herhangi bir ayırt edici bant gözlenmemiştir.



Şekil 3.9.A: *Pl_{Arg}* ORS552 markırı kullanılarak yapılan PCR sonucu kapiller elektroforez görüntüsü ebeveynler



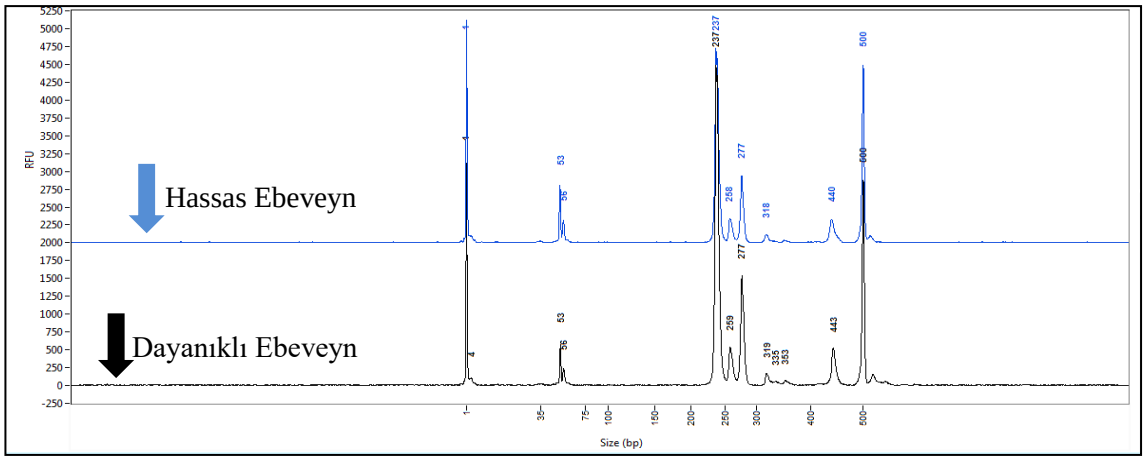
Şekil 3.9.B: *Pl_{Arg}* ORS552 markırı kullanılarak yapılan PCR sonucu kapiller elektroforez görüntüsü ebeveynler ve F_5 bireyler



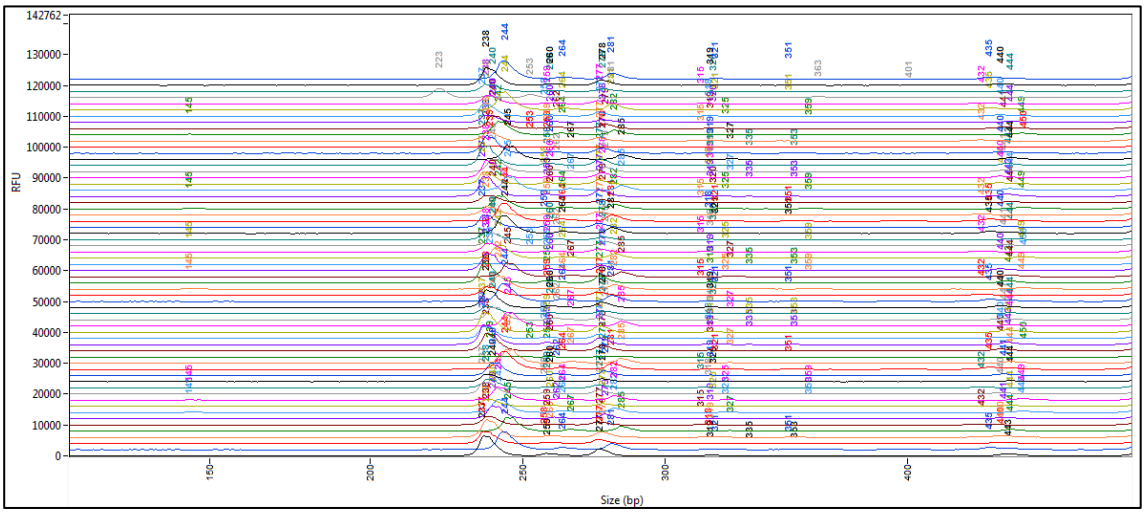
Şekil 3.9.C: *Pl_{Arg}* ORS552 markırı kullanılarak yapılan PCR sonucu kapiller elektroforez görüntüsü ebeveynler ve F_5 bireyler (DE: Dayanıklı Ebeveyn, HE: Hassas Ebeveyn)

3.2.4. ORS675 Markırı

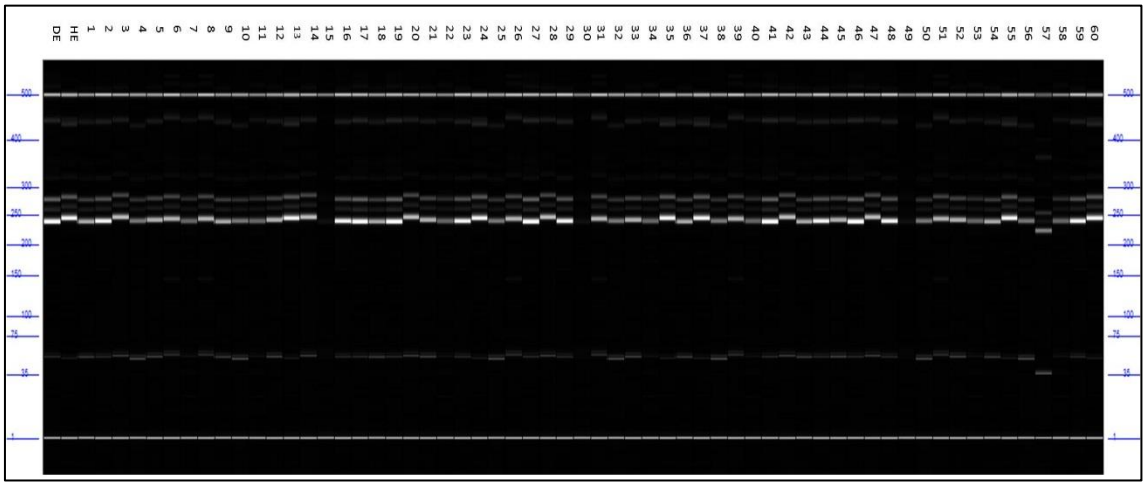
Yapılan çalışma sonucu ORS675 markırı ile, ebeveyn ve F5 popülasyonuna ait dayanıklı ve hassas bireylerde 237bp, 277 bp DNA bantları çoğaltılmış olup(Şekil 3.10) herhangi bir ayırt edici bant gözlemlenmemiştir.



Şekil 3.10.A: *Pl_{Arg}* ORS675 markırı kullanılarak yapılan PCR sonucu kapiller elektroforez görüntüsü ebeveynler



Şekil 3.10.B: *Pl_{Arg}* ORS675 markırı kullanılarak yapılan PCR sonucu kapiller elektroforez görüntüsü ebeveynler ve F_5 bireyler



Şekil 3.10.C: *Pl_{Arg}* ORS675 markırı kullanılarak yapılan PCR sonucu kapiller elektroforez görüntüsü ebeveynler ve F_5 bireyler (DE: Dayanıklı Ebeveyn, HE: Hassas Ebeveyn)

BÖLÜM 3

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Ayçiçeği, genellikle yağı için üretilen; dünyada, ülkemizde ve özellikle Trakya Bölgesinde ekimi yapılan önemli bir endüstri bitkisidir. Tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de ayçiçeği verimini önemli ölçüde etkileyen hastalıklardan biri olan *Plasmopara halstedii* patojeninin neden olduğu mildiyö hastalığı sebebiyle, bölgesel olarak %100'lere varabilen verim kayıpları yaşanabilmektedir. Hastalığın neden olduğu verim kayıpları iklim ve çevre şartlarına doğrudan bağlı olması nedeniyle yıldan yıla farklı oranlarda kayıplarına neden olmaktadır. Hastalık patojeninin toprakta varlığını yıllarca sürdürebilmesi nedeniyle kültürel mücadelesi zordur. Hastalıkla mücadele yöntemlerinden biri olarak kullanılan kimyasal mücadelede, Metalaxyl etken maddeli kimyasalların kullanımı dünya genelinde ve bölgemizde yaygındır. Kimyasal ilaç kullanımının ise uzun vadede bilinen zararları; olumsuz ekolojik etkileri, çevre kirliliği ve yıllar içerisinde ilaca karşı dayanıklı patojen ırkları gelişmesi gibi sebepler nedeniyle sürdürülebilir değildir. Ayçiçeğinde *Plasmopara hastedii* nedenli mildiyö hastalığına karşı en etkili ve sürdürülebilir yöntem, hastalığa karşı dayanıklılık geni içeren bitki çeşitlerinin geliştirilmesi ve ıslah çalışmalarında kullanılması ile mümkündür.Özellikle son yıllarda, kültürü yapılan *Helianthus annus* ve yabani ayçiçeği türlerinden hastalığa karşı dayanıklılık genlerinin tespitinde kullanılabilecek moleküler markırlar ile ilgili çalışmalar tüm dünyada yapılmaktadır. Çalışmalar sonucu elde edilen aday markırlar test edilerek hastalığa karşı dayanıklı ayçiçeği çeşitleri geliştirilmesi markır destekli seleksiyon yöntemleri ile yapılmaktadır. Markır destekli seleksiyon yardımıyla ıslahçılar; dayanıklılık genlerinin seleksiyonunda, gen piramitlemede, resesif genlerin seleksiyonunda, geri melezlemede, çevre şartlarının ıslahı kısıtladığı durumlarda, aranan karakterin bitki gelişiminin geç safhalarında görüldüğü durumlarda ve bitki genetik

orijininin saptanmasındadaha kısa zamanda, daha doğru ve daha ekonomik ıslah çalışmaları yürütebilmektedirler.

Son yıllarda mildiyö hastalığına karşı dayanıklı ıslah hatları geliştirme çalışmaları çerçevesinde tüm patojen ırklarına karşı dayanıklılık sağlayan genlerin tespiti ve haritalama sonrası moleküler destekli seleksiyon amacıyla kullanılabilecek aday markırların tespiti üzerine çalışmalar yapılmaktadır. 2015-2017 yılları arasında USDA'da yapılan çalışmalar sonucunda, *Helianthus annus* ve *Helianthusargophyllus*'tanPl_{17}, Pl_{18}, Pl_{19} *ve* Pl_{20} dayanıklılık genleri ve bu genlerin tespiti için kullanılabilecek SSR ve SNP markırları tespit edilmiş olup yapılan testlerde bu genlerin mevcut tüm *Plasmopara halstedii* ırklarına karşı dayanıklı oldukları raporlanmıştır.

Bu çalışmada TTAE'den elde edilen bitki materyalleri ile yine TTAE'nün yıllar içerisinde topladığı *Plasmopara halstedii* patojenleri kullanılarak bitki materyalleri üstünde hastalık testleri yapılmıştır. Hastalık testi uygulanmasının nedeni çalışma sonunda moleküler düzeyde ayrım yapabildiği tespit edilen markırların test edililerek doğruluğunun onaylanması amacıyla kullanılmasından kaynaklanmaktadır. Bu nedenle aday markırların test edilmesi için hastalık testi sonrası dayanıklı ve hassas olarak sınıflandırılan 60'şar genotip kullanılmış, dayanıklılık profilini başarıyla tespit ettiği düşünülen markırlar ayrıca hastalık testi yapılmış 60'şar farklı genotipte daha test edilerek sağlaması yapılmıştır. Moleküler çalışmaları yapılacak *Pl* genlerinin seçimi, bölgedeki *Plasmopara halstedii* ırkları için herhangi bir ırk ayrımı çalışması yapılmadığından dolayı,halihazırda TTAE tarafından klasik ıslah çalışmalarında kullanılan mevcut ebeveyn hatlarının sahip olduğu bilinen Pl_6 ve Pl_{Arg} genleri tercih edilmiştir.

Kullanılan bitki metaryeli için litaratür taraması yapılarak moleküler destekli ıslah çalışmalarında *Plasmopara halstedii* patojeninin neden olduğu mildiyö hastalığına dayanıklılık sağlayan Pl_6 ve Pl_{Arg} genleri taşıyan çeşitlerin geliştirilmesinde kullanılabilecek aday markırlar belirlenmiştir. Dayanıklılık ıslahında kullanılmaya aday markırların ve yöntemin belirlenmesi için eldeki metaryel ile ilgili bilgi,araştırmanın amacı, sahip olunan laboratuvar kaynakları, maliyet, zaman ve günümüzde tercih edilen yöntemler ve markırlar gibi ölçütler göz önünde tutularak karar verilmiştir.

Usatov ve ark. [65]*Pl*$_6$ dayanıklılık geni için 16 ayçiçeği hattında *Plasmopara halstedii* ırk 330 ve ırk 710 için 9 STS markırı test etmiş ve HAP2 markırı için 1200bp, HAP3 markırı için 1800 bp boyutlarında, dayanıklılık için ayırt edici DNA fragmentleri raporlamışlardır. Aynı markırlar için Bozudi ve ark. [35] ayçiçeği hattı HA335 için yaptıkları çalışmada 13 STS markırı test etmiş, HAP3 markırı için 700 bp boyutunda dayanıklılık için ayırıcı DNA fragmenti tespit ettiklerini raporlarken, HAP2 için ise ayırt edici bir fragment raporlamamışlardır. Pankovic ve ark. [7] yaptıkları çalışmada *Plasmopara halstedii* ırk 730 patojeni için HAP3 markırının 1720 bp büyüklüğündeki DNA fragmenti ile dayanıklı genotipleri ayırt edebildiğini ve MAS için kullanılabileceğini raporlamıştır. Yapılan farklı haritalama çalışmalarında HAP2 ve HAP3 markırlarının gen bölgesine olan uzaklıklarının 3.3 cM ile 11 cM arasında oldukları görülmüştür. Bu çalımada elde edilen sonuç ile HAP2 markırı için Bozudi ve ark. [35] ve Pankovic ve ark.'nın [7] sonuçlarına benzer şekilde genotipler arasında dayanıklılık ayırıcı bir DNA fragmentine rastlanamamıştır. HAP3 markırı için ise, Pankovic ve ark.'nın [7] çalışmasına paralel olarak 1448 bp büyüklüğünde DNA fragmenti *Pl*$_6$ geninden kaynaklanan dayanıklılık için ayırt edici bulunmuştur. Bu araştıramda ve diğer araştırmalarda bulunan dayanıklılık ayırıcı fragment büyüklüğü, kullanılan dayanıklılık kaynağı ebeveyn hatlarının farklı olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Yine Pankovic ve ark.'nın[7] çalışmasında*Pl*$_6$ dayanıklılık geni ile ilgili ORS166 ve ORS1043 SSR primerlerinin dayanıklılık tespitinde kullanılabileceğini belirtmiş, fakat dayanıklılık için ayırt edici fragmentlerin boyutundan bahsedilmemiştir. Bizim çalışmamız sonucu ORS166 için ayırt edici bir fragment gözlenememesine rağmen ORS1043 için 188 bp büyüklüğünde DNA fragmentinin *Pl*$_6$ geninden kaynaklı dayanıklılığın tespitinde başarılı olduğu görülmüştür.

Pl$_6$ geninden kaynaklı dayanıklılığın tespiti için moleküler markır destekli seleksiyonda kullanılabilecek 2 adet markır (HAP3 ve ORS1043) bu çalışma sonucunda belirlenmiştir. HAP2 ve ORS166 markırlarının dayanıklılık tespitinde başarısız olmalarının nedeni, diğer çalışmalarda kullanılan ebeveyn hatları ile bu çalışmada kullanılan ebeveyn hatlarının farklılığı olabilir.

Dussle ve ark. [6], yabani ayçiçeği *Helianthus argophyllus1575-2* hattını dayanıklılık kaynağı olarak kullanarakPl_{Arg} geni için ORS662 markırını gen bölgesine en yakın SSR olarak 1.9 cM uzaklıkta haritalandırmışlardır. Aynı dayanıklılık kaynağını kullanarak Wieckhorst ve ark. [55] ORS662ve ORS716 markırlarını 0.3cM uzaklıkta raporlamışlardır. Imerovski ve ark. [23] Pl_{Arg} dayanıklılık geninin *Helianthus argophyllus* 1575-2'den kültür türüne aktarılması ile elde edilen RHA419 hattında yaptığı çalışmalar ile ORS716 markırının 5.2cM uzaklıkta olduğunu ve 303 bp boyutunda ayırt edici fragment gözlemlendiğini, ORS675 markırı ile ise hassas genotiplerde 275 bp boyutunda fragment gözlenirken dayanıklı genotiplerde DNA fragmenti gözlenmediği belirtilmiştir.

Bu çalışmada kullanılan dayanıklılık kaynağı RHA419 ile Pl_{Arg} için seçilen aday markırların hiçbirinde dayanıklılığı ayırt edecek DNA fragmenti gözlenememiştir. Imerovski ve ark.'nın[23] çalışmasında ORS716 markırı ile çoğaltılan 303 bp boyutundaki fragment bizim çalışmamızda da aynı fragment büyüklüğü dayanıklılık kaynağında gözlemlenmesine rağmen, hastalık testleri yapılan tüm hassas ve dayanıklı genotiplerde aynı fragment çoğaltılmış, bu nedenle bir ayırt edicilik gözlemlenememiştir. Yine Imerovski ve ark.'nın [23] ORS675 için belirttikleri hassas genotipi ayırt edici 275 bp büyüklüğündeki fragment dayanıklı genotipler dahil tüm genotiplerde görülmüş, hassas ve dayanıklı ebeveynlerde de aynı fragmentlerin çoğaltıldığı gözlemlenmiştir.

Pl_{Arg} için kullanılan diğer markırlardan ORS 662 dayanıklı ebeveynde 316 bp ve 335 bp boyutundaki fragmentler gözlemlenirken hassas ebeveynde sadece 335 bp büyüklüğündeki fragmet çoğaltılmıştır. Hastalık testleri yapılmış melezlerde ORS662 markırı hem hassas genotipteki bireylerde hem de dayanıklı genotipteki bireylerde anlamlı olmayan oranda görüldüğü için dayanıklılık ayırt edici markır olarak görülmemiştir. Test edilen diğer ORS552 markırı çoğaltılan DNA fragmentleri dikkate alınıp hassas ve dayanıklı genotiplerde kontrol edildiğinde dayanıklılık ayırt edici gözükmemektedir.

Yapılan çalışmada Pl_{Arg} için denenen markırların, literatürde sıkça kullanılan RHA419 dayanıklılık kaynağı ile denenmesine rağmen test edilen markırların dayanıklılığı ayırt edememesinin başlıca nedeninin ebeveyn kaynaklı olmadığı

düşünülmektedir. Bu durumda RHA419 melezlerinde seçiciliği birden çok kez kanıtlanan özellikle ORS716 markırının bu çalışmada başarısız olması, muhtemelen ilk melezleme sırasında markır ile gen arasındaki bölgede rekombinasyon kaynaklı ayrılma yaşanması olduğu düşünülmektedir.

Yapılan çalışmalar sonucunda Pl_6 için ıslah çalışmalarında kullanılabilecek 2 adet markır başarıyla tespit edilmiş olup, bu markırlar kullanılarak ileride ıslah çalışmalarında seleksiyon ve gen piramitleme çalışmalarının daha hızlı ve güvenilir olmasını sağlayabilecektir.

Pl_{Arg}için yapılan çalışmalar sonucunda tarama yapılan bitki metaryali için çalışmada kullanılan dört markırın dayanıklılık profilinin tespitinde ayırıcı olmadığı görülmüştür. Ayırıcı dayanıklılık profilinin tespiti için daha fazla markır ile araştırma yapılması gerekmektedir.

Dayanıklılık ıslahında klasik ıslah çalışmalarına kıyasla moleküler destekli ıslah yöntemi daha ekonomik, doğru ve hızlı ıslah yapılmasına yardımcı olacaktır. Bunun gerçekleştirilebilmesi için ıslah programlarını yürüten kurumların moleküler çalışmalar için yatırım yapması ya da bu bilgi ve donanıma sahip kurumlardan destek alması gerekmektedir. Mildiyö için ise, dayanıklılık testlerinin ve markır çalışmalarının daha sağlıklı yapılabilmesi için ülkemizdeki patojen ırklarının mutlaka ayırt edilmesi gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1.Aleksandra Dimitrijević, Ivana Imerovski, Dragana Miladinović, Sonja Tančić Živanov, Nenad Dušanić, Siniša Jocić, Vladimir Miklic,***Use of SSR markers in identification of sunflower isogenic lines in late generations of backcrossing***, Helia 33:191–198, (2010).

2. Arif Semerci, Yalçın Kaya, Sezgin Durak,***Economic Analysis of Sunflower Production in Turkey***, Helia. 30: 47. 105-113, (2007).

3. Berry ST, Alberto Leon, Hanfrey CC, Peter Challis, Burkholz A, Stephen Barnes, Rufener GK, Michael Lee, Caligari PDS,***Molecular marker analysis of Helianthus annuus L. 2. Construction of an RFLP linkage map for cultivated sunflower***, Theor Appl Genet 91:195-199, (1995).

4. Bertero de Romano A., Romano C., Bulos M., Altieri E., Sala C. ***A new gene for resistance to downy mildew in sunflower***. Proceedings of the International Symposium "Sunflower Breeding on Resistance to Diseases". Krasnodar, Russia. 141–146, (2010).

5. Cemal Ün, Klaus Wimmers, Siriluck Ponsuksili, Friedrich Schmoll, Karl Schellander,***Mikrosatellitler ve Kullanım Alanları,*** Institute of Animal Science, University of Bonn, Germany Hayvansal Üretim 41: 9-14,(2000).

6. Christina M. Dussle, Volker Hahn, Steven J. Knapp, Eva Bauer,***Pl_{Arg} from Helianthus argophyllus is unlinked to other known downy mildew resistance genes in sunflower***,Theor Appl Genet 109, 1083-1086,(2004).

7. Dejana Pankovic, Natasa Radovanovic, Sinisa Jocic, Zlatko Satovic, Dragan Skoric,***Development of Co-Dominant Amplified Polymorphic Sequence Markers for Resistance to Sunflower Downy Mildew Race 730,*** Plant Breeding

126 440-444, Blackwell Verlag, Berlin, doi:10.1111/j.1439-0523.2007.01376.x, (2007).

8. Eleni Bachlava, Osman Radwan, Gustava Abratti, Shunxue Tang, Wenxiang Gao, Adam F. Heesacker, Maria E. Bazzalo, Andres Zambelli, Alberto J. Leon, Steven J. Knapp,***Downy mildew (Pl_8 and Pl_{14}) and rust (R_{Adv}) resistance genes reside in close proximity to tandemly duplicated clusters of non-TIR-like NBS-LRR-encoding genes on sunflower chromosomes 1 and 13***, Theor Appl Genet, 122: 1211–1221,(2011).

9. Ertuğrul Filiz, Bahar S. Özdemir, Metin Tuna, Hikmet Budak,***Diploid Brachypodium distachyon of Turkey: Molekuler and Morphological Analysis***, Moleculer Breedinf of Forage and Turf, ed:Yamada T. and Spangenberg G., Springer Science, doi: 10.1007/978-0-387-79144-9,(2009).

10. FAOSTATS. 06 17, 2017 tarihinde FAO: http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize adresinden (2017, 06 17).

11. Felicity Vear,***Breeding for durable resistance to the main diseases of sunflower,*** Proc 16th Int Sunflower Conf, Fargo, USA pp 15-28, (2004).

12. Felicity Vear, Denis Tourvieille de Labrouhe, Miller J,***Inheritance of the wild-range downy mildew resistance in the sunflower line RHA419***. Helia 26:19-24, (2003).

13. Ferenc Viranyi, Thomas Gulya, Denis Tourvieille de Labrouhe,***Recent changes in the pathogenic variability of Plasmopara halstedii (sunflower downy mildew) populations from different continents,*** Helia, DOI 10.1515/helia-2015-0009,(2015).

14. François Delmotte, Xavier Giresse, Richard-Cervera Sylve, Jessica M'baya, Felicity Vear, Jeanne Tourvieille, Pascal Walser, Denis Tourvieille de Labrouhe,***Single nucleotide polymorphisms reveal multiple introductions into***

France of Plasmopara halstedii, the plant pathogen causing sunflower downy mildew, Infect Genet Evol 8:534-540, (2008).

15. Gerald J Seiler,***Utilization of wild sunflower species for the improvement of cultivated sunflower,*** Field Crop Res 30:195-230, (1992).

16. Göksel Evci, Veli Pekcan, İbrahim Yılmaz, Yalçın Kaya,***The Resistance breeding to IMI and SU herbicides in sunflower***, Plant Science, 49, 6-11.,(2012).

17. Göksel Evci, Veli Pekcan, İbrahim Yılmaz, Yalçın Kaya,***Determination of yield performances of oleic type sunflower hybrids resistant to broomrape and downy mildew***, Proc. of Abstracts of International Plant Breeding Congress, November 10-14. Antalya, Turkey. 396,(2013).

18. Göksel Evci, Veli Pekcan, İbrahim Yilmaz, K. Akın, Yalçın Kaya,***Bazı Ayçiçeği Hatlarının Trakya Bölgesindeki Ayçiçeği Mildiyösüne (Plasmopara Halstedii (Farl.) Berl. & De Toni.) Dayanıklılıklarının Belirlenmesi,***Anadolu, 21(1): 36-43, (2011).

19. Guojia Ma, S. G. Markell, Q. J. Song, Lili Qi,***Genotyping-by-sequencing targeting of a novel downy mildew resistance gene Pl_{20} from wild Helianthus argophyllus for sunflower (Helianthus annuus L.)***, Teorical and Applied Genetics DOI 10.1007/s00122-017-2906-4 April,(2017).

20. Gül İmraz, Fatih Özdemir, Murat Nadi Taş, Birol Ercan, İlker Topal, Mehmet S. Karaca,***Bitkilerde Fungal ve Bakteriyel Hastalıklara Karşı Dayanıklılık Genleri ve Sinyal İletimi***, Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi, 12-27.,(2015).

21. Gümrük ve Ticaret Bakanlığı, ***Ayçiçeği Raporu***,Kooperatifçilik Genel Müdürlüğü,(2014).

22. Hasan Murat Aksoy, Armağan Öz,***Bakteriyel Patojenlere Karşı Bitkilerdeki Dayanıklılık Mekanizmaları***, Anadolu Tarım Bilim Dergisi, 165-173,(2012).

23. Ivana Imerovski, Aleksandra Dimitrijević, Dragana Miladinović, Siniša Jocić, Bosko Dedic, Sandra Cvejić, Gordana Surlan-Momirovic,***Identification and validation of breeder-friendly DNA markers for Plarg gene in sunflower Mol Breeding***, 34:779–788,(2014).

24. Jeff J. Doyle, Jane L. Doyle,***Isolation of plant DNA from fresh tissue***, Focus 12:13 – 15,(1990).

25. John Edward Bowers, Eleni Bachlava, Robert L. Brunick, Loren H. Rieseberg, Steven J. Knapp, John M. Burke,***Development of a 10,000 locus genetic map of the sunflower genome based on multiplecrosses***, Genes Genomes Genetics, 2: 721–729,(2012).

26. John M. Burke, Zhao Lai, Marzia Salmaso, Takuya Nakazato, Shunxue Tang, Adam Heesacker, Steven Knapp, Loren H. Rieseberg, ***Comparative mapping and rapid karyotypic evolution in the genus Helianthus***, Genetics 167:449-457, (2004).

27. Lale Yıldız Aktaş, Avni Güven,***Bitki Savunma Sistemlerinde Hormanal Sinyal Moleküller ve Çapraz-İletişimleri***, Journal of arts and Sciences,(2005).

28. Lili Qi, Michael Foley, Cai X.W., Thomas Gulya,***Genetics and mapping of a novel downy mildew resistance gene, Pl_{18}, introgressed from wild Helianthus argophyllus into cultivated sunflower (H. annuus L.)***,Theor Appl Genet 129:741-752,(2016a).

29. Lili Qi, Talukder Z.I., Brent Hulke, Michael Foley,***Development of SNP markers linked to the downy mildew resistancegene Pl_{18} in sunflower***,In: Proceeding 38th Sunflower Research Forum. Fargo ND, January 12-13, http://www.sunflowernsa.com/uploads/resources/881/snp.markers_qi.2016.pdf,(2016b).

30. Lili Qi, Yunming Long, Chao-ChienJan,Guajima Ma, Thomas Gulya,***Pl_{17} is a novel gene independent of known downy mildew resistance genes in the cultivated sunflower (Helianthus annuus L.),*** Theor Appl Genet, *128:* 757–767,(2015)

31. Lutz Brahm, Thomas Rocher, Wolfgang Friedt,***PCR-based markers facilitating marker assisted selection in sunflower for resistance to downy mildew***, Crop Sci 40:676-682, (2000).

32. Mary B. Slabaugh, Ju-Kyung Yu, Shunxue Tang, Adam Heesacker, Xu Hu, Guihua Lu, Dennis Bidney, Feng Han, Steven J. Knapp,***Haplotyping and mapping a large cluster of downy mildew resistance gene candidates in sunflower using multilocus intron fragment length polymorphisms***, Plant Biotechnol J 1:167-185, (2003).

33. Melaku Ayele Gedil, Mary B Slabaugh, Simon Berry, Richard Johnson, Richard Michelmore, Jerry Miller, Tom Gulya, Steven J Knapp,***Candidate disease resistance genes in sunflower cloned using conserved nucleotide-binding site motifs: Genetic mapping and linkage to the downy mildew resistance gene Pl_1,*** Genome 44, 205-212,(2001).

34. Michelmore R.W., Paran I., Kesseli R.V.,***Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations***, Proc Natl Acad Sci USA, *88:* 9828–9832,(1991).

35. Mohamed Fouad Bouzidi,Badaoui, S.,Cambon, F., Vear, F., De Labrouhe, D.T., Pereira Nicolas, Said Mouzeyar,***Molecular analysis of a major locus for resistance to downy mildew in sunflower with specific PCR-based markers***,*Theor. Appl. Genet.* 104: 592–600,(2002).

36. Mohamed Fouad Bouzidi, Franchel J, Tao Q, Stormo K, Mraz A, Pereira Nicolas, Said Mouzeyar,***A sunflower BAC library suitable for PCR screening***

and physical mapping of targeted genomic regions, Theor Appl Genet 113:81-89,(2006).

37. Mohamed Fouad Bouzidi, Saloua Badaoui, Florence Cambon, Felicity Vear, Denis Tourvieille de Labrouhe D, Pereira Nicolas, Said Mouzeyar,***Molecular analysis of a major locus for resistance to downy mildew in sunflower with specific PCR-based markers***, Theor Appl Genet 104:592-600, (2002).

38. MolineroRuiz L., J. Dominguez, Melero Vara,***Evaluation of Spanish Isolates of Plasmopara Halstedii for Tolarance to Metalaxyl,*** Helia 23, 33-38,(2000).

39. Molinero-Ruiz ML, Dominguez J, Melero-Vara JM,***Races of isolates of Plasmopara halstedii from Spain and studies on their virulence,*** Plant Dis 86:736-740, (2002a).

40. Molinero-Ruiz ML, Melero-Vara JM,***First report of resistance to metalaxyl in downy mildew of sunflower caused by Plasmopara halstedii in Spain***, Plant Dis 87:749, (2003).

41. Molinero-Ruiz ML, Melero-Vara JM, Dominguez J,***Inheritance of resistance to race 330 of Plasmopara halstedii in three sunflower lines***, Plant Breeding 121:61-65, (2002b).

42. Molinero-Ruiz ML, Melero-Vara JM, Domínguez J,***Inheritance of resistance to two races of sunflower downy mildew (Plasmopara halstedii) in two Helianthus annuus L. Lines***,Euphytica 131:47-51, (2003).

43. Nachaat Sakr,***Can we enhance durable resistance against Plasmopara halstedii (sunflower downy mildew)?*** J Plant Protection Res 50:15-21, (2010).

44. Osman Radwan, Mohamed Faud Bouzidi, Said Mouzeyar,***Molecular characterization of two types of resistance in sunflower to Plasmopara halstedii, the causal agent of downy mildew***, Phytopathology 101:970-979, (2011).

45. Osman Radwan, Mohamed Fouad Bouzidi, Pereira Nicolas, Said Mouzeyar,***Development of PCR markers for Pl5/Pl8 locus for resistance to Plasmopara halstedii in sunflower, Helianthus annuus L. from complete CC–NBS–LRR sequence***, Theor Appl Genet 109:176–185, (2004).

46. Osman Radwan, Sonali Gandhi, Adam Heesacker, Brett Whitaker, Chris Taylor, Alex Plocik, Richard Kesseli, Alexander Kozik, Richard W. Michelmore, Steven J. Knapp,***Genetic diversity and genomic distribution of homologs encoding NBS-LRR disease resistance proteins in sunflower***. Mol Genet Genomics 280:111-125, (2008).

47. Otmar Spring, Reinhard Zipper, Marion Heller-Dohmen,***First report of metalaxyl resistant isolates of Plasmopara halstedii on cultivated sunflower in Germany***. J Plant Dis Protect 113:224, (2006).

48. Özlem Ateş Sönmezoğlu, Ahmet Yıldırım, Tuğba Eserkaya Güleç, Nejdet Kandemir,***Markör Destekli Seleksiyonun Buğday Islahında Kullanımı***, GOÜ Ziraat Fakültesi Dergisi, 27-1, 105-112,(2010).

49. Quentin Gascuel, Luis Buendia, Yann Pecrix, Nicolas Blanchet, Stéphane Muños, Felicity Vear, Laurence Godiard,***RXLR and CRN Effectors from the Sunflower Downy Mildew Pathogen Plasmopara halstedii Induce Hypersensitive-Like Responses in Resistant Sunflower Lines***, Frontiers in Plant Science, 19 December 2016,(2016).

50. Quentin Gascuel, Yves Martinez, Marie-Claude Boniface, Felicity Vear, Magalie Pichon, Laurence Godiard,***The sunflower downy mildew pathogen Plasmopara halstedii,***Molecular Plant Pathology.16(2): 109–122, (2015).

51. Semra Hasançebi, Emrah Akpınar, Gülçiçek Kılıç, Necmi Beşer, Burak Tatlıses, Göksel Evci, Veli Pekcan, Ibrahim Yılmaz, Yalçın Kaya,***The DeterminingofResistance to Downy Mildew in Sunflower with Pl8 Gene by***

MolecularMarkers, International Conference on Advances in Engineering Sciences,Phuket, Thailand, 58, (2017).

52. Semra Hasançebi, Zafer Mert, Ertugrul F., Akan K., Yıldız Aydin, FundaŞentürk Akfırat, Ahu Altinkut Uncuoglu,***An EST-SSR marker, bu099658, and its potential use in breeding for yellow rust resistance in wheat***, Czech J. Genet. Plant Breed., 2014 , 50: 11–18, (2014).

53. Shunxue Tang, Ju-Kyung Yu, Mary Slabaugh, David K Shintani, Steven J. Knapp,***Simple sequence repeat map of the sunflower genome***. Theor Appl Genet 105:1124-1136, (2002).

54. Silke Wieckhorst,***Characterization of the Pl_{arg} Locus Mediating resistance against Plasmopara Halstedii in Sunflower***, Technische Universität München,(2011).

55. Silke Wieckhorst, Eleni Backlava, Chiristina M. Dussle, Shunxue Tang, Volker Hahn, Eva Bauer,***Fine mapping of the sunflower resistance locus Pl_{ARG} introduced from the wild species Helianthus argophyllus***,*Theor. Appl. Genet.* 121, 1633–1644,(2010).

56. Sujatha Mulpuri, Zhao Liu, Jiuhuan Feng, Thomas J. Gulya, Chao-Chien Jan,***Inheritance and molecular mapping of a downy mildew resistance gene, Pl13 in cultivated sunflower (Helianthus annuus L.)***, Theor Appl Genet 119:795-803, (2009).

57. TAGEM,***Zirai Mücadele Teknik Talimatı***, T. A. Müdürlüğü, Endüstri Bitkileri Hastalıkları (s. 8-12),(2008).

58. Thomas J. Gulya,***Registration of five disease-resistant sunflower germplasms***. Crop Sci 25:719–720, (1985).

59. Thomas J. Gulya,***Everything you should know about downy mildew testing but were afraid to ask,*** Proc 18th Sunflower Research Workshop, Fargo, ND, USA, pp 39-48, (1996).

60. Thomas J. Gulya,***Distribution of Plasmopara halstedii races from sunflower around the world,*** Proc 2nd Int Downy Mildew Symp "Advances in Downy Mildew Research", Olomouc, Czech Republic, pp 121-134, (2007).

61. Thomas J. Gulya, Markell S., McMullen M., Harveson B., Osborne L.,***New virulent races of downy mildew: distribution, status of DM resistant hybrids, and USDA sources of resistance***,In: Proc. of 33th Sunflower Research Forum. Fargo ND, January 12-13, 2011 http://www.sunflowernsa.com/uploads/resources/575/gulya_virulentracesdowny mildew.pdf, (2011).

62. Thomas J. Gulya, Miller J.F., Viranyi F., Sackston W.E.,***Proposed internationally standardized methods for race identification of Plasmopara halstedii***, Helia, *14 (15):* 11–20,(1991).

63. Thomas J. Gulya, Sackston WE, Ferenc Viranyi, Masirevic S, Rashid KY,***New races of the sunflower downy mildew pathogen (Plasmopara halstedii) in Europe and North and South America,*** J Phytopathol 132:303-311, (1991).

64. TUİK. ***TUİK***. 06 17, 2017 tarihinde tuik.gov.tr: https://biruni.tuik.gov.tr/bitkiselapp/bitkisel.zul adresinden, (2017, 06 17).

65. Usatov, A.V., A.I. Klimenko, K.V. Azarin, O.F. Gorbachenko, N.V. Markin, V.E. Tikhobaeva, Y. A. Kolosov, O.A. Usatova, S. Y. Bakoev, M.Y. Bibov, L.V. Getmantseva.,***DNA Markers of Sunflower Resistance to the Downy Mildew (Plasmopara halstedii)***,American Journal of Biochemistry and Biotechnology 10 (2): 125-129, 2014,(2014).

66. Yalçın Kaya,***Ayçiçeği Biyoteknolojisinde Son Gelişmeler ve Islahında Kullanım Olanakları***,Trakya Universitesi Fen Bilimleri Dergisi 5(2) ISSN 1302 647X, 141-147,(2004).

67. Yalçın Kaya,***Public Sunflower Breeding in Turkey and Future Directions***, Plant Science (Rastenievudni Naouki), 47 (1): 7-13,(2010).

68. Yalçın Kaya,***Ülkemizde Stratejik bir Bitki: Ayçiçeği***. Agrotime Uluslararası Bitkisel Üretim ve Hayvancılık Dergisi. 2 (8): 34-40,(2014).

69. Yalçın Kaya, Göksel Evci, Veli Pekcan, İbrahim Yilmaz,***Clearfield Technology in Sunflower and Developing Herbicide Resistance Sunflower Hybrids***, Soil-Water Journal. 2(2): 1713-1720,(2013).

70. Yalçın Kaya, Suna Balkan Nalcaiyi, Sekure Çulha Erdal, Özlem Arslan, Nuran Çiçek, Veli Pekcan, Göksel Evci, İbrahim Yilmaz, Yasemin Ekmekçi,***Evaluation of Male Inbred Lines of Sunflower (Helianthus annuus L.) for Resistance to Drought via Chlorophyll Fluorescence***, Turkish Journal of Field Crops. 21 (2): 162-173, (2016).

71. Zahirul Talukder, Brent S. Hulke, Laura Fredrick Marek, Thomas J. Gulya,***Sources of resistance to sunflower diseases in a global collection of domesticated USDA plant introductions***, Crop Sci, 5*4:* 694–705,(2014).

72. Zhang Z. W., Guojia Ma, J. Zhao, S. G. Markell, Lili Qi,***Discovery and introgression of the wild sunflower-derived novel downy mildew resistance gene Pl19 in confection sunflower (Helianthus annuus L.)***, Teorical and Applied Genetics Vol:130, 29-39,(2017).

73. Zhao Liu, Thomas Gulya, G.J. Seiler, Brady A Vick, Chao-Chien Jan,***Moleculer mapping of the Pl16 downy mildew resistance gene from HA-R4 to facilitate marker-asisted selection in sunflower***, Teoretical and Applied Genetics Vol:125 June, 121-131,(2012).

74. Zhao Liu, Thomas J. Gulya, Gerald J. Seiler, Brady A. Vick, Chao-Chien Jan,***Molecular mapping of the Pl(16) downy mildew resistance gene from HA-R4 to facilitate marker-assisted selection in sunflower,****Theor*. *Appl. Genet.* 125, 121–131.(2012).

75. Zuzana Trojanová, Michaela Sedlarova, Thomas Gulya, A. Lebeda,***Methodology of Virulence Screening and Race Characterization of Plasmopara halstedii, and Resistance Evaluation in Sunflower-a Review***, Plant Pathology 10.1111/ppa.12593, 125-140,(2016).

ÖZGEÇMİŞ

Emrah AKPINAR 1985 yılında Aydın Söke'de doğdu. İlköğretimini Söke'de, ortaokul ve lise öğretimini Edirne'de tamamladı. 2010 yılında Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ziraat Mühendisliği bölümünden mezun oldu. 2016 yılında Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoteknoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı.2016 yılında 19. Uluslararası Dünya Ayçiçeği Konferansında organizasyon komitesinde yer aldı. İyi seviyede İngilizce bilgisine sahiptir.

TEZ ÖĞRENCİSİNE AİT TEZ İLE İLGİLİ BİLİMSEL FAALİYETLER

Tez çalışması kapsamında Trakya Üniversitesi tarafından 15-16 Mayıs 2017 tarihleri arasında Edirne'de düzenlenmiş olan "Trakya Üniversiteler Birliği II. Lisansüstü Öğrenci Kongresi" ne sözlü bildirim ile katılmıştır.

Emrah Akpınar, Semra Hasançebi, Yalçın Kaya.***Ayçiçeğinde Mildiyö (Köse) Hastalığına Dayanıklı Genotiplerin Moleküler Markırlar Kullanılarak Belirlenmesi.***Trakya Üniversiteler Birliği İkinci Lisansüstü Öğrenci Kongresi, 15-16 Mayıs 2017, Edirne. 35. (2017)