

Ayçiçeğinde Yüksek Oleik Yağ Asidi Özelliğinin Moleküler Markörler Kullanılarak Belirlenmesi

Çağlar ÇOLAK¹ 

Semra HASANÇEBİ² 

Yalcın KAYA^{3*} 

^{1, 2, 3} Trakya Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Genetik ve Biyomühendislik Bölümü, Edirne/TURKEY

¹ <https://orcid.org/0000-0002-0415-5355>

² <https://orcid.org/0000-0003-3898-7413>

³ <https://orcid.org/0000-0002-9297-8633>

* Corresponding author (Sorumlu yazar): yalcinkaya22@gmail.com

Received (Geliş tarihi): 23.10.2019 Accepted (Kabul tarihi): 17.02.2020

ÖZ: Ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.), Compositae (Asteraceae), dünyada yenilebilir bitkisel yağ bakımından 4. sırada yer almakta olup, dünyadaki ayçiçeği ekim alanlarının yaklaşık %60'ı Karadeniz Bölgesi ülkelerinde bulunmaktadır. Ayçiçeğinin ülkemizde önemli olmasının nedeni ülkemizin birçok bölgesinde yetiştirilebilir olmasıdır. Ülkemizde üretilen bitkisel yağ, artan nüfusa yetmemekte ve mevcut yağ açığımız yıldan yıla artmaktadır. Bu yağ açığı, verim artışına alternatif olarak yağ kalitesi iyileştirme çalışmalarısıyla azaltılabilir. Oleik asit içerikli ayçiçeği yağı üreterek özellikle kızartma sanayinde yağ tüketimini azaltmak mümkündür. Yüksek oleik asit içeren çeşitler geliştirmek için kullanılan klasik ıslah yöntemleri hem zor hem de biyotik ve abiyotik stres koşullarından etkilendiği için doğruluk derecesi düşük olmaktadır. Ancak yüksek oleik asit içeriğine yönelik yapılacak bitki ıslahında, biyoteknolojik yöntemler ile moleküler markör destekli seleksiyon (MAS) kullanılarak daha hızlı ve daha tutarlı sonuçlar elde etmek mümkündür. Bu çalışmada; yüksek oleik karakterinin tespiti için F₃ kademesindeki 40 bireyin ve 55 adet yüksek oleik, orta oleik ve linoleik tip çeşidin, yağ asidi analizleri ve moleküler markör analizleri yapılmıştır. Oleik asit ile bağlantılı olduğu saptanan FAD2 gen bölgesindeki varyasyona dayalı 6 INDEL markörü ile literatürde yüksek oleik karakteri ile bağlantılı olduğu belirtilen 3 SSR markörü kullanılmıştır. Tüm örneklerin gaz kromatografisi (GC) cihazında yağ asitleri içerik analizi yapılmış ve moleküler markör analizleri ile karşılaştırılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda yüksek oleik asit karakterini selekte edebilen ve MAS için kullanılabilir 3 adet markör tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Ayçiçeği, *Helianthus annuus* L., oleik asit, moleküler markör, MAS, SSR, INDEL, gaz kromatografisi.

Determination of High Oleic Acid Property in Sunflower by Using Molecular Markers

ABSTRACT: Sunflower (*Helianthus annuus* L.), is oil crop plant belonging to Compositae (Asteraceae) family and is the fourth in the world in terms of the largest consuming edible oil and approximately 60% of the sunflower cultivation areas in the world are in the Black Sea Region countries. Sunflower is growing almost all parts of Turkey due to higher adaptation capability. The amount of vegetable oil produced in Turkey is not enough for our domestic consumption and this existing deficit is increasing due to increasing population year by year. This deficit could be reduced by improving of oil quality and the use of higher oleic acid could decrease the consumption of frying oil. The selection utilizing with classical breeding methods to develop varieties containing high oleic acid is both hard and less precision because it is affected more by biotic and abiotic stress conditions. However, it is possible to obtain faster and more consistent results in plant breeding containing high oleic acid by using biotechnological methods and selections supported by molecular marker selection (MAS). In this study, the screening of 40 F₃ individuals and also 55 higher, mid and linoleic acid content type cultivars have been screened by molecular markers and analyzed for fatty acid contents. Six INDEL markers based on the variations of FAD2 gene region that is related to high oleic acid trait and 3 SSR markers that were reported as high oleic linked markers in the literatures were used in this study. All of the samples were analyzed by gas chromatography for detection of their fatty acid contents and compared to molecular marker results. As a result of this study, 3 markers which can be used for selection of the high oleic trait were detected.

Keywords: Sunflower, *Helianthus annuus* L., oleic acid, molecular marker, MAS, SSR, INDEL, gas chromatography.

GİRİŞ

Ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.); Papatyagillere ait, $2n=34$ kromozomlu, Kuzey Amerika orjinli önemli bir yağ bitkisi olup, dünyadaki tüketilebilir bitkisel yağ üretiminde palm yağı, soya fasulyesi ve kanola yağından sonra 4. sırada yer almaktadır. İlk olarak Kuzey Amerika'daki yerliler tarafından boya maddesi olarak ve ekmeklere katkı maddesi olarak kullanılmıştır. İspanyol gezginler 1850'lerde Kuzey Amerika'dan topladıkları tohumları önce süs bitkisi olarak yetiştirmişlerdir. Sonra deniz yoluyla İspanya'dan İtalya, Mısır, Afganistan, Çin ve Hindistan'a kadar yayılmıştır. 18. yüzyılda Rusya'ya getirilen ayçiçeği ilk kez burada yağ bitkisi olarak kullanılmıştır. Genel olarak her türlü toprak ve çevre koşullarına adapte olması nedeniyle tarımı yaygınlaşmıştır. Ülkemize ilk defa 2. Dünya Savaşı'ndan sonra 1945-1950'li yıllarda, Bulgaristan'dan gelen vatandaşlarımız ile ülkemize giriş yapmıştır. Ancak yoğun olarak üretilmeye başlanması 1980'li yıllardan sonra ülkemize hibrit çeşitlerin girmesiyle mümkün olmuştur. Dünyada üretilen tüketilebilir bitkisel yağın %12'sini ayçiçeği yağı oluşturur (Güzel ve Kaya, 2015; Kaya, 2017; Rauf ve ark., 2017).

Özellikle, 1950'li yıllardan günümüze kadar hızla artan dünya nüfusunun bitkisel yağ ve protein ihtiyacını karşılayabilmek için yüksek adaptasyon yeteneğine sahip olan ayçiçeğinin dünyada üretiminde hızlı bir artış meydana gelmiştir. 1955-59 yılları arasında dünyada ayçiçeği ekimi yapılan alanların ortalaması 7,4 milyon hektar alan iken, günümüzde bu alan üç misli bir artış göstererek 25 milyon hektara ulaşmıştır. Aynı süre içerisinde dünya ayçiçeği üretimi ise yaklaşık olarak 3,9 misli bir artış göstererek 40 milyon tonu geçmiştir. Ayçiçeği üretiminde en hızlı artışlar Arjantin, Çin, Hindistan, Fransa, ABD, İspanya, Bulgaristan ve Türkiye gibi ülkelerde gerçekleşmiştir (Kaya ve ark., 2015; Kaya, 2017). Ayçiçeği yağı, kaliteli bir bitkisel yağ olmasının yanında, E vitamini açısından da birçok yağ bitkisinden daha zengin bir yağdır. Ayrıca sahip olduğu tekli ve çoklu doymamış yağ asitleri sayesinde gıda üretim alanında olduğu kadar endüstriyel alanda da kendisine birçok

kullanım alanı bulabilmiştir. Tüm bitkisel organlarının değerlendirilebilmesi ve yağı çıkarıldıktan sonra geri kalan küspe, sap ve tabla artıklarından yakacak maddesi olarak yararlanılması nedeniyle, gerek ülkemizde, gerekse dünyada ekim ve üretim alanlarında son yıllarda bir artış yaşanmaktadır. Ülkemizde tüketilen bitkisel yağın yaklaşık % 60'ını ayçiçeği yağı oluşturmaktadır. Son yıllarda artan nüfus ile orantılı şekilde artmayan üretim nedeniyle ayçiçeği yağı ihtiyacı ülkemizde üretilen yağ ile karşılanamamaktadır (Anonim, 2014; Kaya ve ark., 2015; 2017).

Dünyadaki büyüme hızı, nüfus artışının yanında gıda maddelerinin tüketimini de arttırmıştır. Bu gıda maddeleri içinde bitkisel yağlar da yer almaktadır. Ayrıca endüstriyel ölçekte üretilen ürünler, bitkisel yağ ihtiyacını arttırmış ve yağ açığının artmasına neden olmuştur. Ayrıca biyodizel üretiminde bitkisel yağların kullanılmaya başlanması ile beraber enerji sektöründe de yer bulmuş ve üretime olan ihtiyaç daha da artmıştır. Bu sayede bitkisel yağlar; gıda sektörü, enerji sektörü ve kimya sektöründe stratejik bir ürün haline gelmiştir. (Anonim, 2014; Kaya ve ark., 2015).

Türkiye'de ayçiçeği üretimi, Trakya Bölgesi dışında Konya ve Adana gibi bölgelerde ekime başlanmasıyla artmıştır. Ancak ülkemizde üretilen ayçiçeği iç tüketime yeterli değildir. Son yıllarda ülkemize gelen sığınmacılar ile nüfusumuz artarken zaten ülkemizde olan yağ açığı giderek daha da artmaktadır. Yeni çeşitlerin ülkemize gelmesiyle canavar otu (*Orobanche spp.*) ve mildiyö (*Plasmopara halstedii*) gibi verimi sınırlayıcı ve düşürücü etmenler, verimi daha az etkileyerek üretimi daha stabil hale getirmiştir. Ayrıca orta oleik ve yüksek oleik çeşitlerin ülkemize gelmesi ve kullanımının yaygınlaşmaya başlanmasıyla birlikte daha sağlıklı ve ekonomik çeşitler geliştirilerek yağ açığı az da olsa kapatılmaya başlanmıştır (Kaya, 2017).

Ülkemizdeki bitkisel yağ tüketimi, talebi doğrultusunda artış göstermiştir. Ancak Türkiye toprakları, iklim yapısı dikkate alındığında, yağlı tohumlu bitkilerin üretilmesi açısından yüksek

potansiyele sahiptir, fakat ekim alanlarının artış gösterdiği yıllarda dahi, ülkemizdeki tüketilen bitkisel yağı karşılayacak oranda üretim gerçekleştirilememektedir. Dolayısıyla artan yağ açığı ithalat yoluyla gidermeye çalışılmaktadır. Bölgeler açısından bakıldığında farklı iklim koşulları nedeniyle ülkemizde palm haricindeki yağlı tohumlar (ayçiçeği, çığıt, kanola, soya, yerbıstığı, susam, haşhaş, keten ve kenevir) başarılı bir şekilde yetiştirilebilmektedir. Bu bitkiler içerisinde tohumunda yüksek oranda yağ barındıran (%38-50) ayçiçeği, ülkemiz için oldukça önemli bir yağ bitkisidir. Türkiye’de en fazla üretilen yağ bitkisi olan ayçiçeğinin tohumları %40-50 arasında yağ içeriğine sahiptir (Kaya ve ark., 2009).

Ancak Soldatov (1976), yaptığı araştırmada VNIMK 8931 çeşidine %0,5 oranında etil metan sülfonat (EMS) uygulaması ile M₃ generasyonunda %70’in üzerinde oleik asit içeren bireyler saptamıştır. 1976’da bu bitkilerin içinden %80-90 oranında oleik asit içeren bireyleri toplamış ve bunlara “Pervenent popülasyonu” adını vermiştir. Pervenent popülasyonundan birçok oleik çeşit geliştirilmiştir (Andrich ve ark., 1992). Şu anda piyasada olan tüm yüksek oleik ve orta oleik çeşitlerin kökeni Pervenent çeşidine dayanmaktadır (Kaya ve ark., 2012). Bu genotiplerde, *Ol* geni kimyasal yolla elde edilmiş tam dominant olmayan bir mutasyon olup, ayçiçeğinde oleik asit oranını büyük miktarda arttırmaktadır. Tohuma özgü olan oeoyl-fosfatidil kolin desaturazın (FAD2-1) ekspresyonunun azaltılmasıyla ilişkilendirilir. FAD2-1 yüksek oleik içeren mutant ırklarda duplike olmakta ve *Ol* ile birlikte döllere aktarılmaktadır. Oleik tip ayçiçeği, düşük (%10-29), orta (%30-59) ve yüksek oleik asit (% 60-90) olarak 3 grup olarak sınıflandırılmıştır (Pacureanu-Joita ve ark., 2005).

Ayçiçeği yağında ortalama olarak; % 69-70 linoleik asit, %20 oleik asit, % 10-11 palmitik ve stearik asit bulunmaktadır (Anonymous, 2019a). ABD’de NuSun ismiyle oleik asidi yüksek (550-750 g/kg) çeşitler geliştirilmiş olup, bu tür orta oleik tiplerin tarımı ABD’ de (Anonymous, 2019b), yüksek oleik asit tip çeşitlerin ekimi ise

Avrupa’da giderek artmaktadır (Anonymous, 2019c). Oleik asit içeriği orta ve yüksek içerikte olan ayçiçeği çeşitlerinin yağından üretilen kızartma ve margarin yağlarının, trans yağ asit miktarları düşük olduğu için daha sağlıklı oldukları saptanmıştır. Ayrıca bu tipteki yağların bozulması daha uzun sürmekte ve raf ömürleri de uzun olmaktadır (Dobarganes ve ark., 1993). Ayçiçeğinde yağ asitleri biyotik ve abiyotik koşullarından doğrudan etkilenmekte olup, serin kuzey iklim bölgelerinden sıcak güneye doğru gidildikçe yağda linoleik asit oranı düşmekte, oleik asit oranı artmaktadır (Baydar ve Turgut, 1999; Baydar, 2000; Karaca ve Aytaç, 2007; Kaya ve ark., 2007; Zheljaskov ve ark., 2011).

Linoleik asit, en fazla aspirde daha sonra da ayçiçeğinde bulunmakta olup, insan vücudundan üretilmediği için gıda kaynaklarından temin edilmesi gereken bir yağ asididir. Oleik asit ise; zeytinyağında bulunan, 18 karbonlu, 1 çift bağlı C₁₈H₃₄O₂ formüllü tekli doymamış yağ asididir. Dünya geneline bakıldığında çoğunlukla linoleik asit içeriği yüksek olan ayçiçeği yağının üretildiği görülmektedir. Linoleik tipteki ayçiçeği yağında linoleik asit oranı %60-75, oleik asit oranı %10-30 seviyelerindedir. Doymuş yağ asitleri (palmitik, stearik, araşidik) oranı ise %11-12 civarındadır. Kısaca ayçiçeği yağı, yüksek çoklu-doymamış ve düşük miktarda doymuş yağ asidi içerikli bir bitkisel yağ olarak tanımlanabilir. Tadı hafif olup, yüksek oranda E vitaminine sahiptir. Salatalarda, yemeklerde, margarin ve shortening uygulamalarında kullanılmaktadır (Carvalho ve ark., 2019).

İnsan sağlığı açısından çok daha sağlıklı olması nedeniyle ve kötü kolesterolü düşürmesi gibi birçok özelliği sayesinde oleik asit içeriği yüksek yağlara talep oluşmuştur. Oleik içeriği yüksek yağların standart linoleik içerikli yağlara göre yanma derecesi daha yüksek olduğu için pişirme işleminde yanmadan daha uzun süre kullanılabilirler. Bu sayede yağın değiştirilmesine gerek kalmadan linoleik yağlara oranla daha çok pişirme işlemi yapabilmektedirler (Cuesta ve ark., 2001; Warner, 2002). Bitkisel yenilebilir yağların kalitesi; içerdiği oleik, linoleik, linolenik yağ

asitlerinin oranlarıyla ilgilidir (Mohsennia ve Jalilian, 2012). Oleik asit içeriği yüksek olan yağların raf ömrünün daha uzun olduğu yapılan araştırmalarda ortaya konmuştur (Petros ve ark., 2009; Barkley ve ark., 2011; Salem ve ark., 2012).

Yüksek oleikli ayçiçeği yağı raf ömrü diğer yağlara oranla daha uzun olup, kullanıldığı ürünlerin raf ömrünü arttırarak ekonomik değer kaybını önler. Zeytinyağı gibi daha doğal bir koku ve aromaya sahiptir. Doğal bir ürün olup, transgenik (genleri modifiye edilmiş) bir ürün değildir. Fiyatı linoleik asit içerikli yağlara oranla daha yüksektir (Kaya ve ark., 2007). Yüksek oleik asit içeren yağların kullanımı daha stabil olmaları ve uygun oksidatif özellikleri sebebiyle Avrupa'da giderek artmaktadır (Vannozzi, 2006). Bunun yanında, oleik asidi yüksek ayçiçeğinin gerek biyodizel gerekse lubrikant (makine ve motor yağı) olarak kullanma potansiyeli, diğer yağlı tohumlara göre daha fazladır (Rauf ve ark., 2017).

Santalla ve Mascheroni (2003), yaptıkları çalışmada, yüksek oleik asit tiplerin tane yapısı ve yağ asitleri haricindeki diğer kalite özelliklerinin, standart linoleik asit içeren ayçiçeğine benzediğini saptamışlardır. Genel olarak kızartma yağı olarak kullanılacak bitkisel yağlar, oleik asit içeriği zengin olan yağlardır. Bu amaçla en fazla zeytinyağı, kanola yağı, yerfıstığı yağı ve oleik asidi yüksek ayçiçeği yağı kullanılmaktadır. Özellikle patates jipsi ve pomfirit üretiminde kızartma yağı olarak bu yağlar kullanılmaktadır. Salata için daha çok omega yağ asitlerince zengin olan ve vintelize edilmiş olan yağlar tercih edilir (Cuesta ve ark., 2001; Kaya, 2016). Roche (2001), zeytinyağı gibi oleik asitli içeriği fazla olan yağların çok daha sağlıklı olduğu için diyetlerde kullanılmasını önermiş, bununla beraber yüksek oleik asit içerikli ayçiçeği yağının da diyetlerde çok önemli olduğunu belirtmiştir.

Oleik asit içeriği yüksek ayçiçeği çeşitlerinin tavuk beslemesinde rasyonlara katıldığında piliçlerin yağ oranını azalttığı ve et kalitesini arttırdığı saptanmıştır (Ortiz ve ark., 2006). Başka bir araştırmada ise, yüksek ve orta oleik asit içeren ayçiçeği yağının

kullanımının insanlarda kolesterol riskini azaltıp, kalp ve damarlarda yağ birikmesinin önüne geçtiği belirtilmiştir (Nicolosi ve ark., 2004).

Ayçiçeği tohumunda tohumun olgunlaşma süresince yağ içeriklerinin incelendiği bir çalışmada, yağ içeriği, yüksek durumda oleik asitten olgunlaşmaya doğru yüksek linoleik içeriğine geçmektedir. Steraik ve palmitik asidin ise yıllardan yıllara değişiklik gösterdiği ancak olgunlaşma dönemiyle bir ilgisi olmadığı sonucuna varılmıştır (Baydar ve Erbaş, 2005). Yine aynı çalışmada, E vitamini yani tokoferol oranının ise çiçeklenmeden sonraki 10. günden 35. güne kadar azalış, daha sonra da artış gösterdiği saptanmıştır. Ayçiçeği tablasının dışından içe doğru inildikçe tohumlardaki linoleik asit içeriğinin azaldığı, oleik asit içeriğinin ise arttığı ve en yüksek tokoferol içeriğinin ise tablanın en dışındaki tohumlarda bulunduğu dolayısıyla en dıştaki tohumlarda E vitamini içeriğinin daha fazla olduğu vurgulanmıştır.

Yağlı tohumların yetiştirilmesi sırasında çevre faktörlerinden biri olan sıcaklık faktörünün yağ asitleri (özellikle oleik ve linoleik asit) oranını etkilediğine dair birçok araştırma yapılmıştır. Demurin ve ark. (2000), ayçiçeği bitkisinin yetiştirilmesi sırasında çevre etkisinin ayçiçeği yağı kompozisyonu üzerine etkisini inceledikleri çalışmada, soğuk iklimde yetiştirilen ayçiçeğindeki linoleik asit oranının %70'lere çıktığını, ılıman ve sıcak iklimlerde yetiştirilen ayçiçeğinde ise bu oranın %30'lara kadar indiğini saptamışlardır. Ayrıca ayçiçeği tohumunun yetiştirilmesi sırasında sıcaklığın 1°C artışı ile oleik asit miktarının %2 oranında arttığını belirlemişlerdir. Ayçiçeği ve soya tohumlarının yetiştirilmesi sırasında, sıcaklık ve CO₂ etkisinin araştırıldığı iki ayrı çalışmada sıcaklık artışının oleik asit miktarlarını arttırdığı ve linoleik asit oranlarını ise azalttığı belirtilmiştir (DaMatta ve ark., 2010; Carvalho ve ark., 2019).

Ayçiçeğinde tane verimi; çevre koşullarından fazla miktarda etkilenen kantitatif bir karakterdir (Fick ve Miller, 1997). Ayçiçeğinin temel üretim amacı, bitkisel yağ elde etmek olup, ekilen çeşitlerin yağ oranlarının yüksek ve birim alandan elde edilecek yağ veriminin fazla miktarda olması en önemli

ıslah önceliklerindedir (Kaya, 2017). Edirne koşullarında 2000 ve 2001 yıllarında yapılan çalışmada; tane ve yağ performansına en büyük etkinin, bitki boyu ve bin tane ağırlığı, yine yağ oranının da yağ verimini oluşturan iki öğeden biri olması sebebiyle, yağ verimine yüksek oranda ve direkt katkı sağladığı belirlenmiştir (Kaya ve ark., 2003). Ancak, ayçiçeğinde önemli verim öğelerinin, tane ve yağ verimi üzerine direkt ve dolaylı katkıları birlikte incelendiğinde, en önemli katkının, çiçeklenme süresinin negatif yöndeki etkisi, dolayısıyla çeşit erkenciliği olduğu görülmüştür.

Moleküler markörler, genom içinde bir veya birden fazla DNA bölgesindeki farklılığı ortaya koyan belirteçlerdir. Bu farklar; eklemeler, silinmeler, yer değiştirmeler ve duplikasyonlar gibi olaylardan meydana gelebilir. DNA tabanlı bu moleküler markörler; fizyoloji, genetik mühendisliği, taksonomi, haritalama gibi birçok farklı alanda kullanılmaktadır. Polimeraz Zincir Reaksiyonunda (PCR) DNA markörlerinin kullanımı; gen etiketleme, genetik haritalama, tarımsal olarak önemli genlerin saptanması, genetik çeşitliliği belirleme çalışmaları, filogenetik analizlerde ve MAS çalışmalarında kolaylık sağlamıştır. Ayçiçeği ıslahında, yağ içeriği ve oranı, hastalık ve zararlı dayanımı ve herbisit dayanımı gibi önemli agronomik özellikler bakımından istenilen karaktere sahip genotiplerin elde edilmesinde, moleküler markörler yaygın olarak kullanılmaktadır (Bilgen ve ark., 2018). MAS amaçlı kullanılan DNA tabanlı markörler, çevresel faktörlerden etkilenmez ve her koşulda stabil olup, dokunun nerden alındığına veya yaşam dönemine göre farklılık göstermez. Özellikle çevre koşullarından çok etkilenen ya da fenotipik olarak gözlenmesi güç karakterlerin seleksiyonunu önemli ölçüde kolaylaştırmaktadırlar. Ayrıca farklı karakterdeki genlerin bir bitkiye eş zamanlı olarak aktarılmasında, gen piramitlemesi ve resesif gen seleksiyonu gibi durumlarda da kullanılmaktadır (Bilgen ve ark., 2018).

FAD2 genin kodladığı enzim (fatty acid desaturase); oleik asitten linoleik asit sentezi aşamasından sorumlu olup, üç FAD2 geni (FAD2-1, FAD2-2,

FAD2-3) ayçiçeğinde bulunmuştur. FAD2-1 tohuma özel olup, gelişen tohumlarda çok miktarda, buna karşın FAD2-2 ve FAD2-3 ise, az miktarda görülür. FAD2 geni gelişen tohumda yüksek miktarda bulunan oleik asidi linoleik aside çevirerek oleik asit miktarının azaltılmasında görevlidir. Ancak duplike olan FAD2 gen bölgesi oleik asidi linoleik aside çeviremez ve yüksek oleik asit içeren bitkiler meydana gelir. (Martinez-Rivas ve ark., 2001). FAD2-1 duplikasyonu *OI* mutasyonu olarak adlandırılmıştır ve FAD2-1 geninin dupliasyonu sırasında bazı dizilerin insersiyon/delesiyona uğradığı keşfedilmiştir. Duplike FAD2-1 genini homozigot halde taşıyan genotiplerde, genin çok az ekprese olduğu belirlenmiştir. Dolayısıyla bu genotipler yüksek oleik karaktere sahiptir. Oysa normal FAD2-1 aleline sahip genotiplerde, bu genin ekspresyonu düşük oleik karakterin ortaya çıkmasına neden olmaktadır (Schuppert ve ark., 2006).

Yüksek oleik asit içeren *Pervenent* populasyonun kimyasal mutasyon ile bulunmasının ardından yüksek oleik asit karakterli birçok çeşit geliştirilmiştir (Soldatov, 1976). Yoğun çeşit geliştirme çalışmalarına rağmen oleik asit karakterinin aktarılmasında hala yaygın olarak bu çeşitler kullanılmaktadır (Fernandez-Martinez ve ark., 1989; Andrich ve ark., 1992; Osorio ve ark., 1995; Škorić ve ark., 2007; Alberio ve ark., 2016; Cvejić ve ark., 2016). Ferfuia ve ark. (2015), yaptıkları çalışmada, yüksek oleik kalıtımının en az 3 gen bölgesinden etkilendiğini ve yüksek oleik asit kalıtımı üzerinde önemli bir maternal etki bıraktıklarını savunmuşlardır. Aynı zamanda yüksek oleik asit karakterinin çok karmaşık olmasından dolayı bu özelliği kontrol eden genetik sistemin daha iyi anlaşılabilmesi adına farklı ayçiçeği genotiplerinde ve farklı yetiştirme koşullarında daha ileri testler ile incelenmesi gerektiğini bildirmişlerdir. Yine Tilak ve ark. (2017), *OI* mutasyonun FAD2-1 gen bölgesinin mutasyonu ile meydana geldiğini savunmuştur. Bu mutasyonla ilişkili olarak N1-F3/N1-3R INDEL markörünü geliştirmiş, markörü oleik, orta oleik ve linoleik çeşitlerde çalışmış ve bu markörün oleik

asidi selekte edebilen bir DNA fragmenti oluşturduğu sonucuna varmışlardır. Ebrahmini ve ark. (2008), oleik asit özelliğini saptamak amacıyla 37 SSR markörü kullanmış ve 10 tanesinin oleik asit karakterini seçebilen selektif bir DNA fragmenti çoğalttığını bildirmişlerdir. Dimitrijević ve ark. (2017), daha önce kullandıkları ve selektif bir bant verdiğini bildikleri F4-R1 INDEL markörünü F₂ generasyonunda da çalışmışlardır. Ayrıca F4-R1 markörünün de oleik asit karakterini seçebilen selektif bir DNA bant profili oluşturduğunu bildirmişlerdir. Bilgen (2016), yaptığı çalışmada, yüksek oleik ve linoleik karakterindeki genotipleri ayırabilen markör belirlediğini bildirmiştir. Yüksek oleik asit içeren bitkinin *Ol* gen bölgesinde 16 TTA nükleotit tekrarı olduğunu ve linoleik asit içeren bitkide ise 17 TTA nükleotit tekrarı olduğunu bildirmiştir. Farklı araştırmacılar ayçiçeğinde yüksek oleik asit özelliğini ayırabilen markör saptamak için çalışmışlardır. Ancak elde edilen yöntemler ve sonuçlara bakıldığında farklı genotiplerde farklı sonuçlar elde edildiği ve daha fazla doğrulama yapılması gerektiği için genetik populasyonun genişletilerek taranması gerektiğini savunmuşlardır. (Nagarathna ve ark., 2011; Singchai ve ark., 2013; Dimitrijević ve ark., 2017; Bilgen ve ark., 2018).

Çalışmanın amacı, ayçiçeği ıslahı programında bazı ayçiçeği genotiplerinde de yüksek oleik bireylerin moleküler markörlerle seleksiyonunun sağlanıp sağlanmadığını belirlemektir.

MATERYAL ve METOT

Bitki materyali

Bu çalışmada, Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsünce yürütülen Ülkesel Ayçiçeği Projesinde geliştirilen, anne hattı yüksek oleik asit, baba hattı linoleik karaktere sahip ayçiçeği hatlarının melezlenmesi ile elde edilmiş F₃ kademesindeki 40 adet bitki kullanılmıştır. Ayrıca kullanılacak markörlerin piyasadaki yüksek oleik, orta oleik ve linoleik karakterdeki bireyleri belirleyebilme kabiliyetini saptamak içinde piyasadaki çeşitlerden yüksek oleik, orta oleik ve linoleik karaktere sahip 55 adet tescilli çeşit de yapılan çalışmaya ilave edilmiştir.

Yağ asidi analizleri

Çalışmada kullanılan tüm bitki materyaline, MAS sonuçlarının doğruluğunun karşılaştırılabilir olması için yağ analizi yapılmıştır. Yağ analizi, Trakya Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü laboratuvarında bulunan Agilent 6850 marka gaz kromatografi (GC) cihazında HT-88 tipi kolon kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Böylece kullanılan bitki materyalinin oleik, linoleik, steraik ve palmitik olmak üzere 4 yağ asidi açısından içeriği saptanmıştır. Yağ asidi analizleri için daha önce örnek alınan ve polen izolasyonu yapılan bitkilerden 5'er gr tohum alınarak hidrolik destekli soğuk preste yağı çıkarılmıştır. Yağı çıkarılan örneklerden 2 damla yağ 13 ml'lik şişeye koyulmuş ve üzerine 10 ml metanol ve 0,5 ml (2 mol) metanollü KOH ilave edilmiştir. Daha sonra 2-3 dk. vorteks ile iyice karıştırıldıktan sonra en az 1 saat olmak üzere oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası tüplerin üst tarafından yavaşça ve dikkatlice 2 ml yağ alınıp 2 ml'lik GC için özel tüplere alınmıştır ve ardından GC cihazına yerleştirilerek ölçüm yapılmıştır (Kaya ve ark., 2017; Bilgen ve ark., 2018).

DNA izolasyonu

Soğuk preste yağı çıkarıldıktan sonra GC'de yağ analizi yapılan materyallerin ilk yapraklarından, örnek başına 150-200 mg bitki dokusu 2ml'lik tüplerin içerisine alınmıştır. Örnekler tüplere alındıktan sonra -196 °C'lik sıvı azot içerisinde dondurulmuş ve ardından -20°C'de DNA izolasyon işlemine kadar muhafaza edilmiştir. Yaprak örneklerinin DNA'ları Doyle ve Doyle (1990)'un CTAB yöntemi modifiye edilerek izole edilmiştir (Porebski ve ark., 1997; Bilgen ve ark., 2018). DNA miktar ölçümü için OPTİZEN NanoQ Spektrofotometresi kullanılmış, örneklerin DNA miktarı ng/µl cinsinden kayda alınmıştır. DNA kalitesini ve DNA kırıkları olup olmadığını saptayabilmek için agoroz jel elektroforezi yapılmıştır. Bunun için, örnek başına 800 ng DNA % 0,8 konsantrasyonlu, EtBr (30 µl/L) (Etidyum bromür) içeren jele yüklenmiş ve 120V ve 80 mA akımda 1 saat yürütülmüştür. Elektroforezin

ardından jel görüntüleme cihazında UV ışık altında örneklerin DNA kalitesine bakılmıştır.

Markör çalışmaları

Bu çalışmada, 3 SSR, 6 INDEL olmak üzere 9 adet markör seçilmiş olup, seçilen özelliğin belirlenmesinde kullanılan markörler literatür taraması sonucunda belirlenmiştir (Schuppert ve ark., 2006; Ebrahmi ve ark., 2008; Berville ve ark., 2009; Bilgen, 2016; Tilak ve ark., 2017; Dimitrijević ve ark., 2017; Bilgen ve ark., 2018). Literatür çalışması sonucunda Çizelge 1’de sunulan markörler seçilmiştir.

Çizelge 1. Moleküler analizler için kullanılan markörler.
Table 1. Markers used for molecular analysis.

No.	Markörler Markers	Markör tipi Marker type
1	ORS832	SSR
2	ORS1180	SSR
3	N1-3F / N2-1R	SSR
4	N1-1F / N2.1R	INDEL
5	HO.F3 / HO.R1	INDEL
6	HO.F4 / HO.R1	INDEL
7	HO.F4 / HO.R2	INDEL
8	HO.F4 / HO.R3	INDEL
9	HO.F4 / HO.R9	INDEL

Seçilen markörlere ait DNA bölgeleri, farklı PCR içerikleri ve koşulları kullanılarak çoğaltılmıştır. PCR içeriği olarak 1X PCR Buffer, 2 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, 0,6 mM Primer F, 0,6 mM Primer R, 1U Taq, 250 µg BSA, 90 ng DNA kullanılmıştır. PCR koşulları primer TM sıcaklıklarına uygun 35 döngü olacak şekilde uygulanmıştır. Elde edilen PCR ürünleri % 2’lik agaroz jelde ve kapiler elektroforez cihazında 120 volt ve 50 ma akımda 90 dk. yürütülerek analiz edilmiştir. Çalışmada kullanılan 3 SSR ve 6 INDEL markörü için PCR yapılmış ve sonuçları değerlendirilmiştir. Elde edilen bant profilleri, GC’den elde edilen yağ asidi

sonuçları ile karşılaştırılarak; Moleküler markör sonuçları ile GC sonuçlarının 95 genotipteki uyumu % olarak değerlendirilmiştir.

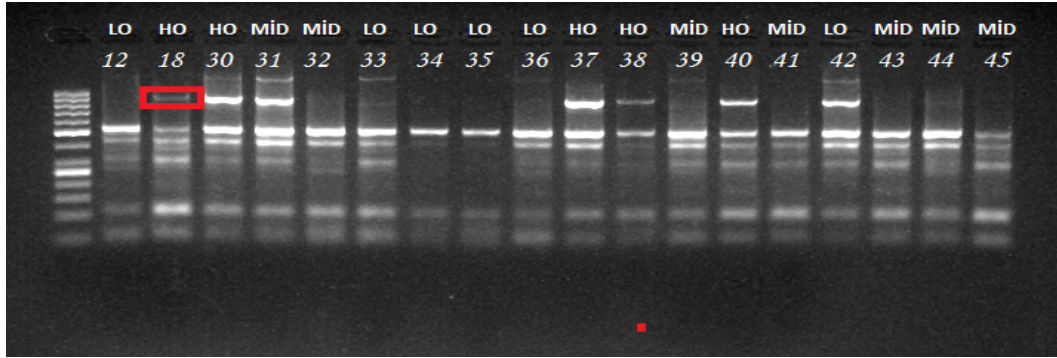
BULGULAR ve TARTIŞMA

N1-3F/N2-1R markörü ile yapılan PCR sonucunda 40 adet F₃ kademesindeki materyalde ve 55 adet tescilli yüksek oleik, orta oleik ve linoleik çeşitinde DNA fragmentleri çoğaltılmıştır. Elde edilen DNA bant profillerinden 870 bç boyutundaki bandın GC sonuçları ile uyumu değerlendirilmiş ve selektif bant olduğu saptanmıştır (Şekil 1). Taranan 95 adet örneğin GC cihazı ile yapılan yağ asidi sonuçlarıyla karşılaştırıldığında N1-3F/N2-1R markörünün %69 doğruluk düzeyinde seleksiyon yapabildiği sonucuna varılmıştır (Şekil 1).

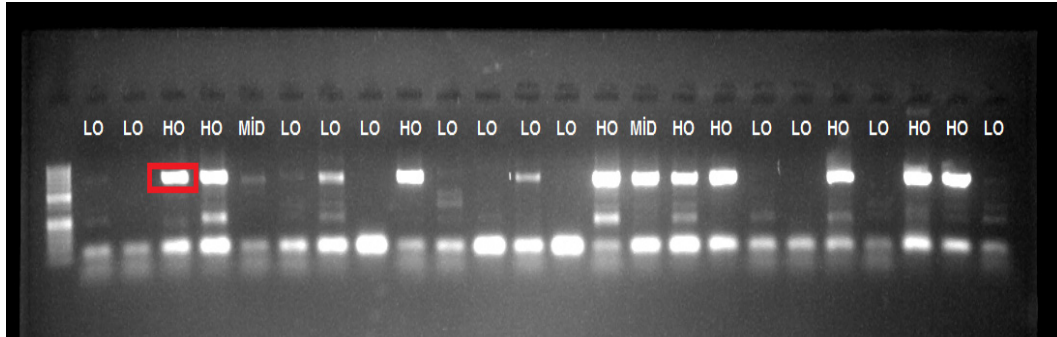
INDEL HO.F4 / HO.R1 markörü ile yapılan PCR çalışmaları sonucunda bu markörün 653 bç boyutunda selektif bir bant ürettiği görülmüştür (Şekil 2). Bu bandın, GC cihazı ile yapılan yağ asidi sonuçları ile karşılaştırıldığında % 89 gibi yüksek bir oranda seleksiyon yapabildiği sonucuna varılmıştır.

INDEL HO.F4 / HO.R2 markörü ile yapılan PCR sonucunda bu markörün 1259 bç boyutunda selektif bir bant ürettiği saptanmıştır (Şekil 3). Bu bandın, GC cihazı ile yapılan yağ asidi sonuçları ile karşılaştırıldığında yaklaşık % 87 gibi yüksek bir oranda seleksiyon yapabildiği sonucuna varılmıştır.

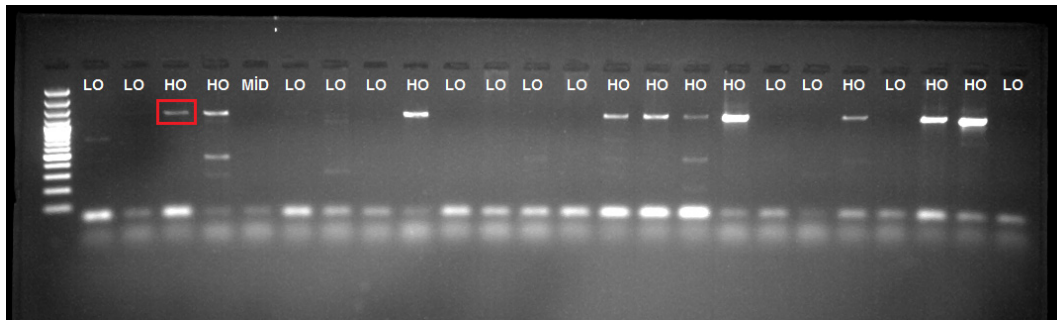
INDEL HO.F4 / HO.R3 markörü ile yapılan PCR sonucunda bu markörün 1782 bç boyutunda selektif bir bant ürettiği saptanmıştır (Şekil 4). GC cihazı ile yapılan yağ asidi sonuçları ile karşılaştırıldığında bu bandın yaklaşık % 86 gibi yüksek bir oranda seleksiyon yapabildiği sonucuna varılmıştır.



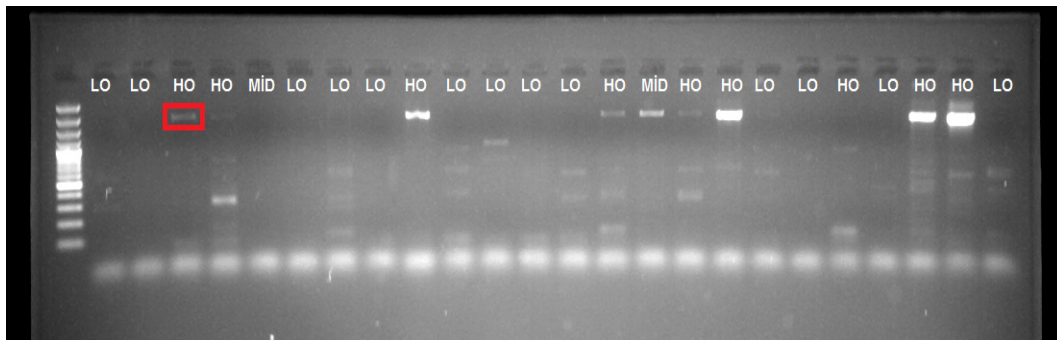
Şekil 1. N1-3F/N2-1R primer kombinasyonu PCR sonucu.
Figure 1. PCR amplification with N1-3F/N2-1R primer pair.



Şekil 2. INDEL HO.F4/HO.R1 primer kombinasyonu ile PCR sonucu.
Figure 2. PCR amplification with INDEL HO.F4/HO.R1 primer pair.



Şekil 3. INDEL HO.F4/HO.R2 primer kombinasyonu ile PCR sonucu.
Figure 3. PCR amplification with INDEL HO.F4/HO.R2 primer pair.



Şekil 4. INDEL HO.F4/HO.R3 primer kombinasyonu ile PCR sonucu.
Figure 4. PCR amplification with INDEL HO.F4/HO.R3 primer pair.

INDEL HO.F3/HO.R1, INDEL HO.F4/HO.R9, ORS832, ORS1180 ve N1-1F/N2.1R markörleri için farklı PCR içeriği ve sıcaklık/döğü sayısı değerleri denenmiş ancak bu primer çiftlerinde DNA çoğaltımı başarısız olmuştur. Bu çalışmada, yüksek ve düşük oleik yağ asidi içeriğine sahip ayçiçeği genotiplerini birbirinden ayırt edebilecek moleküler markörlerin belirlenmesi amacıyla yapılmıştır. Çalışmada; yüksek oleik ve düşük oleik genotiplerin melezlerinin F₃ kademesine ait 40 adet ve piyasada bulunan yüksek oleik, orta oleik ve linoleik karakterdeki çeşitlerden 55 adet örnek kullanılmıştır. Literatürde yağ asidi içeriğini kontrol eden FAD2 gen bölgesindeki insersiyon ve delesyon mutasyonlarını belirlemede kullanılan primerler, 2 SSR markörü ve Bilgen (2016)'in çalışmasında kullandığı 2 adet markör seçilmiş ve bu markörler ile çalışma yapılmıştır. Markörlerin doğru seleksiyon etkinliğini ortaya koymak için tüm örneklerin GC'de yağ asidi analizleri yapılmıştır. Yağ asidi sonuçları ve bant profilleri eşleştirilerek değerlendirilmiş ve ıslahta seleksiyon amaçlı kullanılabilir bir markör belirlenmeye çalışılmıştır.

Kullanılan 9 adet markörün 3 tanesinin %80'in üzerinde bir doğruluk derecesinde seleksiyon yapabildiği saptanmıştır. Dolayısıyla HO.F4/HO.R1, HO.F4/HO.R2 ve HO.F4/HO.R3 markörleri oleik asit içeren genotipleri seçme konusunda başarılı bulunmuştur. Ayrıca N1-3F/N2-1R markörü de yağ asidi sonuçlarıyla eşleştirildiğinde % 69 oranında yüksek/orta oleik asit içeren genotipleri selekte edebildiği ancak bu değerlerin ıslah için kullanılabilir olmadığı sonucuna varılmıştır.

Çalışmadaki sonuçlar % 0-29 arası oleik asit içeriğine sahip bireylerin düşük oleik ya da diğer adıyla linoleik, % 30-69 arası oleik asit içeriğine sahip bireylerin orta oleik, % 70'in üzerinde oleik asit içeriğine sahip bireylerin ise yüksek oleik asit olarak değerlendirilmiştir.

HO.F4/HO.R1 markörünün 653 bç boyutunda bant oluşturduğu ve bu bantın yağ asidi sonuçlarıyla eşleştirildiğinde F₃ generasyonundaki 40 adet örnekte 4 adet yanlış seleksiyon yaptığı ve toplamda 95 örnekte karşılaştırıldığında 11 yanlış

seleksiyon yaptığı sonucuna varılmıştır. HO.F4/HO.R1 markörünün % 89 gibi çok yüksek bir doğruluk derecesinde oleik asit karakterini selekte edebilen bir markör olduğu belirlenmiştir. HO.F4/HO.R2 markörü ise 1259 bç büyüklüğünde bant oluşturmuş ve bu bantın yağ asidi sonuçlarıyla eşleştirildiğinde F₃ generasyonundaki 40 adet örnekte 7sinde yanlış seleksiyon yaptığı ve toplam 95 adet örnekte ise 13 adet yanlış seleksiyon yaparak % 87 doğruluk derecesinde seleksiyon kabiliyetine sahip olduğu sonucuna varılmıştır. HO.F4/HO.R3 markörü ise 1782 bç boyutunda bant oluşturmuştur. Bu bantın yağ asidi sonuçlarıyla eşleştirildiğinde F₃ generasyonundaki 40 bitkiden 7 adet yanlış seleksiyon yaptığı ve toplamda 95 örnekte 15 yanlış seleksiyon yaparak %86 doğruluk derecesinde seleksiyon kabiliyetine sahip olduğu sonucuna varılmıştır.

Bu sonuçlar doğrultusunda yüksek ya da orta oleik asit karakterli genotipleri yüksek doğruluk derecesinde ve ıslahta aktif şekilde kullanılabilir olarak selekte edebilen HO.F4/HO.R1, HO.F4/HO.R2 ve HO.F4/HO.R3 olarak adlandırılan 3 adet markör bulunmuştur.

MAS kullanarak biyotik ve abiyotik stres koşullarından etkilenmeden yağ asidi kompozisyonu değişikliği için daha doğru bir seleksiyon yapılabilir. Moleküler yöntemde tohumdan değil de fide dönemindeki yaprak dokusundan bitkinin oleik karaktere sahip olup olmadığı anlaşıldığı için bitki yetiştirme, polen izolasyonu gibi işlemler sadece oleik karakterdeki bitkilere yapılarak iş gücü azaltılmış olur. Ayrıca yağ çıkarılırken preste harcanan tohumlar moleküler yöntemde harcanmadığı için oleik karakterdeki populasyonlar daha geniş tutulabilir ve bitkiye spesifik olarak oleik asit içeriği saptanabilir. Klasik yöntemlerde yağ çıkarılması için azami 5 gr tohum gerekmekte olup tohumlar karışık olduğu için, içerdiği toplam yağ asidi kompozisyonunun ortalaması bulunabilecektir. MAS yönteminin, oleik asit karakteri için yapılacak ıslah çalışmalarına entegrasyonu oldukça gereklidir. Bu çalışma kapsamında bulunan bu 3 markörün ayçiçeği ıslahında oleik asit karakterinin seleksiyonu için yaygın ve etkin biçimde kullanılabilir olması bu çalışmanın en önemli çıktısıdır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nde yürütülen yüksek lisans tezinin bir

kisımını kapsamakta olup, Yazarlar desteklerinden dolayı T.C. Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü ve TÜBİTAK 1003-1140971 numaralı proje çerçevesinde, TÜBİTAK'a teşekkür etmektedir.

LİTERATÜR LİSTESİ

- Alberio, C., N. G. Izquierdo, T. Galella, S. Zuil, R. Reid, A. Zambelli, and L. A. Aguirrezábal. 2016. A new sunflower high oleic mutation confers stable oil grain fatty acid composition across environments. *European Journal of Agronomy* 73: 25-33.
- Andrich, G., S. Balzini, A. Zinnai, R. Fiorentini, S. Baroncelli, and C. Pugliesi. 1992. The oleic/linoleic ratio in achenes coming from sunflower lines treated with hard X-rays. pp.1544-1549. *In: Proceedings of the 13th International Sunflower Conference*. Pisa, Italy.
- Anonim. 2014. Gümrük ve Ticaret Bakanlığı. Ayçiçeği Raporu 2014. Kooperatifçilik Genel Müdürlüğü.
- Anonymous. 2019a. Sunflower oil fatty acid profiles. National Sunflower Association. <https://www.sunflowernsa.com/health/sunflower-oil-fatty-acid-profiles/>.
- Anonymous. 2019b. NuSun. National Sunflower Association. <https://www.sunflowernsa.com/oil/nusun/>.
- Anonymous. 2019c. High-oleic sunflower shows a rising trend. http://ucab.ua/en/pres_sluzhba/novosti/visokooleinovi_sonyashnik_na_viskhidnomu_trendi.
- Barkley, N. A., M. L. Wang, and R. N. Pittman. 2011. A real-time PCR genotyping assay to detect FAD2A SNPs in peanuts (*Arachis hypogaea* L.). *Electronic Journal of Biotechnology* 14 (1): 9-10.
- Baydar, H. 2000. Bitkilerde yağ sentezi, kalitesi ve kaliteyi artırmada ıslahın önemi. *Ekin Dergisi* 11: 50-57.
- Baydar, H. ve İ. Turgut. 1999. Yağlı tohumlu bitkilerde yağ asitleri kompozisyonunun bazı morfolojik ve fizyolojik özelliklere ve ekolojik bölgelere göre değişimi. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 23 (1): 81-86.
- Baydar, H., and S. Erbaş. 2005. Influence of seed development and seed position on oil, fatty acids and total tocopherol contents in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Turkish journal of Agriculture and Forestry* 29 (3): 179-186.
- Berville, A., S. Lacombe, S. Veillet, C. Granier, S. Leger, and P. Jouve. 2009. Method of selecting sunflower genotypes with high oleic acid content in seed oil. The Patent Cooperation Treaty (PCT), WO 2005/106022 A2.
- Bilgen, B. B. 2016. Characterization of sunflower inbred lines with high oleic acid content by DNA markers. pp.662-668. *In: Proceedings of the 19th International Sunflower Conference*. ISA, 29 May - 3June, Edirne, Turkey.
- Bilgen, B. B., S. Daneshvar, G. Evcı, V. Pekcan, M. I. Yılmaz, and Y. Kaya. 2018. Determination of high oleic type and broomrape resistant sunflower hybrids by DNA markers. *Ekin Journal of Crop Breeding and Genetics* 4 (1): 22-30.
- Carvalho, C. G. P., L. F. Mazzola, J. M. G. Mandarino, F. C. Dalchivon, J. L. Ribeiro, A. B. B. Filho, and A. D. Alves. 2019. Fatty acid profiles of oil obtained from midoleic sunflowers grown in Tropical Region. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 96 (9): 1019-1025.
- Cuesta, C., A. Romero, and F. Sánchez-Muniz. 2001. Fatty acid changes in high oleic acid sunflower oil during successive deep-fat fryings of frozen foods. *Revista de Agaroquímica y Tecnología de Alimentos* 7 (4): 317-328.
- Cvejić, S., S. Jocić, A. Dimitrijević, I. Imerovski, D. Miladinović, M. Jocković, and V. Miklič. 2016. An EMS mutation altering oil quality in sunflower inbred line. pp. 414-421. *In: Proceedings of the 19th International Sunflower Conference*. ISA, Edirne.
- DaMatta, F. M., A. Grandis, B. C. Arenque, and M. S. Buckeridge. 2010. Impacts of climate changes on crop physiology and food quality. *Food Research International* 43 (7): 1814-1823.
- Demurin, Y., D. Skorić, I. Verešbaranji, and S. Jocić. 2000. Inheritance of increased oleic acid content in sunflower seed oil. *Helia* 23 (32): 87-92.
- Dimitrijević, A., I. Imerovski, D. Miladinović, S. Cvejić, S. Jocić, T. Zeremski, and Z. Sakac. 2017. Oleic acid variation and marker-assisted detection of Pervenets mutation in high-and low-oleic sunflower cross. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 17 (3): 235-241.
- Dobarganes, M. C., G. Marquez-Ruiz, and M. C. Perez-Camino. 1993. Thermal stability and frying performance of genetically modified sunflower seed (*Helianthus annuus* L.) oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 41 (4): 678-681.
- Doyle, J. J., and J. L. Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12 (1): 13-15.
- Ebrahimi, A., P. Maury, M. Berger, S. P. Kiani, A. Nabipour, F. Shariati, and A. Sarrafi. 2008. QTL mapping of seed-quality traits in sunflower recombinant inbred lines under different water regimes. *Genome* 51 (8): 599-615. <http://doi.org/10.1139/G08-038>.
- Ferfuaia, C., M. Turi, G. P. Vannozzi. 2015. Variability of seed fatty acid composition to growing degree-days in high oleic acid sunflower genotypes. *Helia* 38 (62): 61-78.

- Fernandez-Martinez, J., A. Jimenez, J. Dominguez, J. Garcia, R. Garces, and M. Mancha. 1989. Genetic analysis of the high oleic acid content in cultivated sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Euphytica* 41 (1): 39-51.
- Fick, G. N., and J. F. Miller. 1997. Sunflower Breeding. pp. 395-439. In: A.A. Schneiter (Ed.) Sunflower Technology and Production. ASA, SCSA, and SSSA Monograph. No: 35. Madison, WI, USA.
- Güzel, M. ve Y. Kaya. 2015. Yağ bitkilerinde oleik asit: önemi ve oluşumunu belirleyen etmenler. 2. Ulusal Tarım Kongresi. 29-31 Ekim, Afyon. s.199.
- Karaca, E. ve S. Aytaç. 2007. Yağ bitkilerinde yağ asitleri kompozisyonu üzerine etki eden faktörler. *Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi* 22 (1): 123-131.
- Kaya, Y. 2016. Sunflower. Surinder Gupta (Ed.). Breeding Oilseed Crops for Sustainable Production, 1st Edition. 570 pages. Elsevier Press. pp.55-88.
- Kaya, Y. 2017. Türkiye’de ayçiçeği tarımı ve ekonomiye katkısı. *Agrotime Uluslar arası Bitkisel Üretim ve Hayvancılık Dergisi* 28: 16-20.
- Kaya, Y., I. Balalic, and V. Miklic. 2015. Eastern Europe Perspectives on Sunflower Production and Processing. pp. 575-638. In: N. Dunford, E. M. Force (ed.) Sunflower: Chemistry, Production, Processing, and Utilization. 710 pages. AOCS (American Oil Chemistry Society).
- Kaya, Y., S. Jovic, and D. Miladinovic. 2012. Sunflower. pp. 85-129. In: S. K. Gupta. (Ed.) Technological Innovations in Major World Oil Crops, Vol. 1. Springer Press.
- Kaya, Y., G. Evcı, V. Kaya ve M. Kaya. 2007. Oleik Tıp Ayçiçeği Tarımı ve Gelecekteki Yönü. 1. Ulusal Yağlı Tohumlu Bitkiler ve Biyodizel Sempozyumu, 28-31 Mayıs. Samsun. s.134-140.
- Kaya, Y., G. Evcı, V. Pekcan ve T. Gücer. 2003. Ayçiçeğinde tane ve yağ veriminin oluşumunda etkili verim öğelerinin katkı oranlarının belirlenmesi. Türkiye 5. Tarla Bitkileri Kongresi. 13-17 Ekim, Diyarbakır. s.120-125.
- Kaya, Y., C. Colak, V. Pekcan, M. I. Yılmaz, and G. Evcı. 2017. The determination of oleic acid contents in sunflower hybrids. pp. 23-24. In: Proc. 8th International Scientific Conference: Rural Development. Bioeconomy Challenges. November, 2017, Kaunas, Lithuania.
- Kaya, Y., G. Evcı, V. Pekcan, T. Gücer, I. M. Yılmaz, I. Şahin, S. Gencer ve N. Çıtak. 2009. Farklı çevrelerde ayçiçeğinde oleik asit oranlarının belirlenmesi. Türkiye 8. Tarla Bitkileri Kongresi, Hatay 19-22 Ekim. 1: 159-163.
- Martinez-Rivas, J. M., P. Sperling, W. Lühs, and E. Heinz. 2001. Spatial and temporal regulation of three different microsomal oleate desaturase genes (FAD2) from normal-type and high-oleic varieties of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Molecular Breeding* 8 (2): 159-168.
- Mohsennia, O., and J. Jalilian. 2012. Response of safflower seed quality characteristics to different soil fertility systems and irrigation disruption. *International Research Journal of Applied and Basic Sciences* 3 (5): 968-976.
- Nagarathna, T., Y. Shadakshari, and T. Ramanappa. 2011. Molecular analysis of sunflower (*Helianthus annuus* L.) genotypes for high oleic acid using microsatellite markers. *Helia* 34 (55): 63-68.
- Nicolosi, R. J., B. Woolfrey, T. A. Wilson, P. Scollin, G. Handelman, and R. Fisher. 2004. Decreased aortic early atherosclerosis and associated risk factors in hypercholesterolemic hamsters fed a high-or mid-oleic acid oil compared to a high-linoleic acid oil. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 15 (9): 540-547.
- Ortiz, L. T., C. Alzueta, A. Rebole, M. L. Rodriguez, I. Arija, and A. Brenes. 2006. Effect of dietary high-oleic acid and conventional sunflower seeds and their refined oils on fatty acid composition of adipose tissue and meat in broiler chickens. *Journal of Animal and Feed Sciences* 15 (1): 83-95.
- Osorio, J., J. Fernández-Martínez, M. Mancha, and R. Garcés. 1995. Mutant sunflowers with high concentration of saturated fatty acids in the oil. *Crop Science* 35 (3): 739-742.
- Pacureanu-Joita, M., D. Stanciu, E. Petcu, S. Raranciuc, and I. Sorega. 2005. Sunflower genotypes with high oleic acid content. *Romanian Agricultural Research* 22: 23-26.
- Petros, Y., A. Carlsson, S. Stymne, H. Zeleke, A. S. Fält, and A. Merker. 2009. Developing high oleic acid in *Guizotia abyssinica* (Lf) Cass. by plant breeding. *Plant Breeding* 128 (6): 691-695.
- Porebski, S., L. G. Bailey, and B. R. Baum. 1997. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Mol Biol Rep.* 15: 8-15.
- Rauf, S., N. Jamil, S. Ali Tariq, M. Khan, M. Kausar, and Y. Kaya. 2017. Progress in modification of sunflower oil to expand its industrial value. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 97 (7): 1997-2006.
- Roche, H. M. 2001. Invited Commentary-olive oil, high-oleic acid sunflower oil and CHD. *British Journal of Nutrition* 85 (1): 3-4.
- Salem, E., N. Hamed, and O. Awlya. 2012. Implementation of the sunflower seeds in enhancing the nutritional values of cake. *J Appl. Sci. Res.* 8 (5): 2626-2631.
- Santalla, E., and R. Mascheroni. 2003. Note: Physical properties of high oleic sunflower seeds. *Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos* 9 (6): 435-442.
- Schuppert, G. F., S. Tang, M. B. Slabaugh, and S. J. Knapp. 2006. The sunflower high-oleic mutant Ol carries variable tandem repeats of FAD2-1, a seed-specific oleoyl-phosphatidyl choline desaturase. *Molecular Breeding* 17 (3): 241-256.

- Singchai, A., N. Muangsan, and T. Machikowa. 2013. Evaluation of SSR markers associated with high oleic acid in sunflower. *World Academy of Science, Engineering and Technology, International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering* 7 (10): 978-981.
- Škorić, D., S. Jocić, N. Lecić, and Z. Sakac. 2007. Development of sunflower hybrids with different oil quality. *Helia* 30 (47): 205-212.
- Soldatov, K. I. 1976. Chemical mutagenesis in sunflower breeding. pp. 352-357. *In: Proc. 7th Int. Sunflower Conf., 27 June - 3 July, Krasnodar, Russia.*
- Tilak, I., B. Kisan, and I. Shanker Goud. 2017. Evaluation of SSR and INDEL markers associated with high and low oleic acid content in sunflower (*Helianthus annuus* L.) genotypes. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 6 (5): 1560-1563.
- Vannozzi, G. P. 2006. The perspectives of use high oleic sunflower for oleochemistry and energy raws. *Helia*; 29 (44): 1-24.
- Warner, K. A. 2002. Optimizing the frying quality, flavor, and stability of sunflower oil. *Journal of the American Oil Chemists Society* 79 (2): 94-99.
- Zheljazkov, V. D., B. A. Vick, B. S. Baldwin, N. Buehring, C. Coker, T. Astatkie, and B. Johnson. 2011. Oil productivity and composition of sunflower as a function of hybrid and planting date. *Industrial Crops and Products* 33 (2): 537-543.