

AYÇİÇEĞİ BİYOTEKNOLOJİSİNDE SON GELİŞMELER VE ISLAHINDA KULLANIM OLANAKLARI

Yalçın KAYA

Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü. PK : 16, 22100 EDİRNE, Tel: 284 2358182, Fax: 284 2358210,
e-mail: yalcinkaya@ttae.gov.tr,

Alınış : 01.03.2004
Kabul edildiği : 10.05.2004

Özet: Ayçiçeği ülkemizde ve dünyada en önemli bitkisel yağ bitkilerinden olup, aynı kaynaktan gelen CMS (Sitoplazmik Erkek Kısırlık) kullanımı nedeniyle, son yıllarda klasik ıslah metodlarıyla geliştirilen ayçiçeği hibritlerde beklenen verim artmamaktadır. Yüksek verim için mutlaka moleküler ıslah metodlarını kullanarak yapılacak türler arası melezlemeler ile, yabancı türlerden yeni genotip kaynaklara ihtiyaç vardır. Yeni geliştirilen moleküler ıslah metodlarından in vitro kültürü, genetik transformasyon ve PCR (Polymerase Chain Reaction) (Polimeraz Zincir Reaksiyon), RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) vb. moleküler markır teknikleri, ayçiçeğinde başarıyla kullanılmaktadır. Yapılan moleküler ve biyoteknolojik çalışmalar ile, ayçiçeğinin genetik soy ağacı ve haritası çıkarılmış, kültürü yapılan ayçiçeğinin orijini belirlenmiş, diğer türlerden ayçiçeğine yabancı genlerin aktarılması ve anter veya mikrospor kültürüyle double haploidlerin elde edilmesi son yıllardaki ayçiçeği moleküler ıslahındaki önemli başarılarıdır.

Anahtar kelimeler: Ayçiçeği, Moleküler Islah, Moleküler Markır, Biyoteknoloji

The Last Progresses in Sunflower Biotechnology and the Possible Usages in Sunflower Breeding

Abstract: Sunflower is one of the important oil crops in Turkey and the world. Sunflower seed yield does not increase in the hybrids obtained using classical breeding methods due to the same CMS sources in last years. To get high yield in sunflower, new gene sources should be obtained from wild types via interspecific hybridization using molecular breeding methods. In vitro culture, genetic transformation and molecular marker techniques such as PCR, RFLP etc. have been used successfully until today in sunflower. Developing genetic maps and family trees, determining the origin of cultivated sunflower, new genes obtained from other species, double haploids using anther or microspore cultures are succeeded important developments in sunflower molecular breeding and biotechnology in the last years.

Key words: Sunflower, Molecular Breeding, Molecular Markers, Biotechnology

Giriş

Ayçiçeği dünyada ve ülkemizde en önemli bitkisel yağ kaynaklarından biridir. Artan nüfusa paralel olarak ülkemizin bitkisel yağ ihtiyacı giderek artmaktadır. Ülkemiz insanının bitkisel yağ tüketiminde çoğunlukla ayçiçeği yağını tercihi ve gerekli bitkisel yağın yarısını dışarıdan ithal etmek zorunda olmamız, son yıllarda ayçiçeğinin önemini giderek arttırmaktadır.

Ayçiçeği gerek dünyada, gerekse ülkemizde genelde kurak şartlarda yetiştirilmektedir. Çok geniş bir adaptasyon kabiliyeti olmasına rağmen, ekim alanlarının fazla olmaması, birim alandan elde edilen gelirin az olmasından kaynaklanmaktadır (Kaya, 2003). Sulu alanlarda ise, aynı nedenden dolayı pamuk, mısır, şeker pancarı ve soya gibi bitkiler ile rekabet edememektedir. Bu suretle, ayçiçeğinde geniş alanlarda ekiminin yayılması için, birim alandan elde edilen verimi arttırıcı çalışmalara hız verilmelidir.

Halen ayçiçeği tarımında genelde hibrit çeşitler üretimde kullanılmasına rağmen, aynı CMS gen kaynakları kullanılması nedeniyle, geleneksel ıslah metodları kullanılarak elde edilen çeşitlerde, genetik verimlilik kapasitesinin üst sınırına yaklaşmıştır. Gerek ayçiçeğinde, gerekse hibrit ıslahının uygulandığı diğer türlerdeki yüksek verimin elde edildiği hibritlerde, kullanılan ebeveynler arasındaki akrabalık derecesi ne kadar düşük, yani

birbirileri arasında genetik uzaklık ne kadar fazla ise, özellikle tane veriminde heterosis olarak adlandırdığımız melez azmanlığı o kadar yüksek olmaktadır (Miller ve Fick, 1997).

Bugün ayçiçeğinde yüksek verim için mutlaka farklı genetik kaynaklara sahip kendilenmiş ebeveyn hatlara ihtiyaç vardır. Bu farklı genler, ayçiçeğinde çok sayıdaki tek veya çok yıllık yabancı ayçiçeği türlerinde mevcut olup, bu yeni genotip kaynakların kültürü yapılan tek yıllık *Helianthus annuus L.* türüne bir an önce aktarılması gerekmektedir. Ancak bu gen kaynaklarının kullanılması, türler arası melezlemeler ile mümkün olup, bunların klasik ıslah metodlarını kullanarak elde edilmesine olanak yoktur (Bidney ve Scelonge, 1997). Bu genlerin, yabancı türlerden tarımı yapılan kültür bitkilerine aktarılması, ancak biyoteknolojik metodların kullanılmasıyla mümkündür. Bu nedenle, son on yılda bu çerçevede yapılan çalışmalar gün geçtikçe önem kazanmakta ve her yıl yeni başarılar elde edilmektedir.

Ayçiçeğinde Kullanılan Moleküler Yöntemler

Yapılan çalışmalar çerçevesinde, ayçiçeğinde başarı ile uygulanabilen biyoteknolojik ve moleküler metodlar şunlardır:

I. In vitro kültürü teknikleri

Ayçiçeğinde son on yıldır hızlı çoğaltım (propagation), *in vitro* ve gen transferi ayrıştırılmasına uygun doku kültürü tekniklerini belirlemek amacıyla birçok çalışma yapılmıştır (Hosoki ve Ark., 1995; Nestares ve Ark., 1996; Fisher ve Ark., 1996; Sarrafi ve Ark., 1996; Vasic ve Ark., 2001; Faure ve Ark., 2002a). Ancak yapılan tüm bu testlerden sadece üç doku kültürü yönteminin uygulamada kullanımı mümkün olabilmiştir: Bunlar, genç fidelerin kotiledon yaprakları, olgunlaşmamış zigotik embriyo (ZE), genç fidelerin apikal meristemleri.

a) Protoplast ile çoğaltım:

Yapılan birçok araştırma, ayçiçeğinin yabancı türlerinin gerçekten kök oluşturma ve çimlenme yeteneklerinin tahmin edilenden daha fazla olduğunu ortaya koymuştur (Alibert ve Ark., 1994). Bu geniş potansiyel, türler arası melezlemeler yoluyla kültür yapılan ayçiçeğinin bazı karakterler açısından iyileştirme ve geliştirmesinde kullanılabilir. Olgunlaşmış zigotik embriyo, biyoteknoloji açısından kullanılması oldukça zahmetli olmasına rağmen, transformasyon dahil bir çok değişik uygulama için geniş bir potansiyele sahiptir (Fiore ve Ark., 1997).

b) Protoplast Kültürü:

İzole edilmiş protoplast kültürü; tek bir gen seviyesinde çalışmayı hedefleyen gen transferi, türler arası melezlemeler, çok hücreli bitkilerden hızlı çoğaltmayı temel alan yeniden üreme sistemlerine göre bir çok avantajı sahiptir. Bununla birlikte, protoplast ile yeniden üreme, ayçiçeğinde oldukça zor olup, ayrıca yüksek oranda kullanılan genotipe bağlıdır (Fischer ve Ark., 1997). Protoplast kültürü günümüzde ayçiçeğinde pratik olarak kullanımından halen uzak olsa da, son beş yılda yapılan çalışmalar, bu sistemin yakın gelecekte en azından türler arası melezlemeler kadar yararlı ve gerekli olacağını göstermektedir (Bolandi ve Ark., 1999). Yabancı türlerdeki bazı önemli genlerin genom transferi ile kültürü yapılan türlere aktarılması imkanlarının artmasıyla gelecekteki araştırmaların bu alana yönelik olarak yapılması, ayçiçeğinin geleceği açısından oldukça büyük önem arz etmektedir. Yeniden üreme işleminin mekanizmasının belirlenmesi ve burada etkili olan faktörlerin ortaya konulması, fazla miktarda genotipler için olası bir uygun protokol geliştirmeye imkan verecektir.

c) Double Haploidlerin Üretilmesi:

Ayçiçeğinde en son ümit veren gelişme, *H. tuberosus*, *H. laetiflorus* ve *H. resinosus* gibi yabancı ayçiçeği türlerinden anter kültürü kullanarak, türler arası melezlerin elde edilmesidir. Direk embriyogenez (embriyogenesis) yoluyla kallus oluşturulmasından sonra, kısa sürede çok sayıda bitkinin çoğaltılarak elde edilmesi mümkün olmuştur. Todorova ve Ark., (1997), yirmi adet tek ve çok yıllık *Helianthus* türünü incelemişler ve *H. mollis*, *H. salicifolius* ve *H. smithii* türlerinden anter kültürü yoluyla köklerini çoğaltmayı başarmışlardır. Aynı zamanda, özellikle diploid türlerde, kallus oluşumunda yüksek oranda varyasyon gözlemlenmiştir. Araştırmacılar ayrıca, ışınlanmış polen yardımıyla partogenez (partogenesis) oluşturularak geliştirilen gynogenic metod ile bir çok embriyo ve double haploid elde etmişler ve bunları ana olarak kullanarak restorer (baba) hat ile kombinasyonuyla melezleme yaparak ticari hibritler elde etmişlerdir. Özetle, yapılan araştırmalar haploid tekniğinin, ayçiçeğinde orta vadede kullanılmasının mümkün olduğunu ortaya koymuştur. Double haploid üretmek için kullanılan *in vitro* anter kültürü metodların, genotiplerin güçlü oranda olmasına ihtiyaç

duyması veya bu kültürü kullanmayıp, sadece özel genotipler için oluşturulan (örn. türler arası melezler) ışınlanmış polen kullanılarak, partogenez yoluyla double haploidlerin üretimi mümkün olmuştur (Bidney ve Scelonge, 1997). Ancak bu yaklaşımın, ayçiçeği ıslahında kullanımını için daha da iyileştirilmesi gerekir.

II. Genetik Transformasyon

Double haploidlerin androgenetik veya gynogenetik yoluyla üretiminde önemli ilerlemeler kaydedilmesine rağmen, ayçiçeğinin genetik transformasyonu alanında ilginç gelişmeler ortaya çıkmıştır. Tüm transformasyon protokollarında en büyük problemin ayçiçeğinde rejenerasyon oranlarının düşüklüğü olarak belirlenmiştir (Bidney ve Scelonge, 1997; Alibert ve Ark., 1999). Yapılan araştırmalar yabancı türlerde bu oranın, kültürü yapılan türlere göre, daha yüksek olduğunu ortaya koymuştur. Bu nedenle, türler arası melezlerin kök meristem hücrelerinden elde edilen kökçüklerin rejenerasyon kabiliyetleri araştırılmıştır. Yapılan bir araştırmada, ticari hibritlerin ana hattından, *H. mollis*, *H. giganteus* ve *H. strumosus* türlerinden elde edilen türler arası melezlerin, belirgin biçimde daha fazla sayıda kökçük elde edildiği vurgulanmıştır (Müller ve Ark., 1998). Bu alışılmışın dışında türler arası melezler ve kendilenmiş hatlar, ayçiçeğinde bu protokollarının iyileştirilmesiyle elde edilmiştir. *Agrobacterium tumefaciens* yoluyla ayçiçeğinde gen transferini normalde az miktarda, fakat GUS raporör gen kullanılarak yapılan çalışmada ise, üretilebilir oranda olduğu gözlemlenmiştir (Weber ve Ark., 1998). Tüm bu gelişmelere rağmen, ayçiçeğinde transformasyonun pratik olarak kullanımının henüz mümkün olmadığı görülmektedir.

III. Molekular metotların uygulaması

a) PCR Markır Sistemleri:

PCR uygulamasını temel alan moleküler markır sistemleri, stres koşullarına ve hastalıklara dayanıklılık, yağ kalitesi, CMS gibi ayçiçeğinde önemli bazı karakterleri ile ilişkili markır genlerin izolasyonu ve belirlenmesinde oldukça önemli potansiyel arz etmektedir. Bu sistemler arasında RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA), laboratuvarında kolaylıkla uygulanması ve basit olması nedeniyle, ayçiçeğinde oldukça kullanışlı bir metot olarak tespit edilmiştir (Bidney ve Scelonge, 1997). Ayçiçeğinde özellikle hastalıklara dayanıklılık genlerinin tespiti ve kalıtımı üzerine, RAPD markır kullanılarak bir çok çalışma yapılmıştır (Brahm ve Ark., 2000; Roeckel-Drevet ve Ark., 2003; Tang ve Ark., 2003). Bunun yanında RAPD ve PCR kullanılarak, türler arası melezlemelerden sonra genetik uzaklığın tahmini, introgression un kanıtlanması ve geriye melezleme sırasında ayçiçeği içerisindeki yabancı türlerden kalan genom kısımlarının ortaya çıkarılması sağlanmıştır (Pankovic ve Ark., 1997; Horn ve Ark., 2003). Ayrıca direk olarak türler arası döller ve yinelenen ayçiçeği ebeveynleri arasında genetik benzerlikler, yine bu teknikler yardımıyla karşılaştırılıp farklı gen havuzlarının seçilerek, yüksek oranda genetik farklılığın ortaya çıkarılabileceği tespit edilmiştir (Sossey-Alaoui ve Ark., 1999; Iuoras ve Ark., 1999; Vasic ve Ark., 2000; Faure ve Ark., 1998 ve 2002b).

Bu konudaki yoğun araştırmalar, PCR markır sistemlerinin ayçiçeğinde bir çok özelliğin genetiğini ve kalıtımını incelemede, oldukça yararlı bir araç olduğunu kanıtlamıştır (Madjidian ve Ark., 1998; Bouzidi ve Ark., 2002; Burke ve Ark., 2002; Radwan ve Ark., 2003). Bununla birlikte, özellikle RAPD marker sistemlerinin, yakın bir gelecekte ayçiçeği ıslahında pratik olarak uygulanmasının mümkün olacağı sanılmaktadır. Çünkü, markır yardımıyla seleksiyonun başlayabilmesi için, şu anda yeteri sayıda olmayan RAPD markır sayısının, yakın gelecekte artacak olması ve RAPD analizinin diğer moleküler metotlar ile karşılaştırıldığında, uygulaması en kolay ve en ucuz metot olması, bu kanıyı güçlendirmektedir.

b) RFLP ve AFLP:

RFLP ve AFLP (Amplified fragment length polymorphisms) metotları moleküler aşamada genom analizi için mutlak gerekli araçlardır. Özellikle dominant kalıtımı nedeniyle, RFLP birçok türün genom haritalarının çıkarılmasında yoğun olarak kullanılmıştır. RFLP markır analizi ile ortaya çıkan genom setindeki bağları temel alarak, bu haritalar, yüksek oranda polimorfizm nedeniyle, AFLP's ile doyurularak *Helianthus* cinsinde 4 adet RFLP haritası oluşturulmuştur. Bunlardan üçü kültürü yapılan türler olup, diğeri de *H. anomalus* türüdür (Berry ve Ark., 1995; Jan ve Ark., 1998).

Ayçiçeğinde RFLP kullanılarak elde edilen QTL ve diğer genomik haritaların başarılı bir şekilde oluşturulması, ortaya çıkan bu sonuçları desteklemektedir (Lu ve Ark., 1999; Faure ve Ark., 2000; Gedil ve Ark., 2001). Ayrıca son zamanlarda geliştirilen AFLP tekniği, co dominant RFLP kullanımında ve özellikle de ge-

nom haritalarının çıkarılmasında oldukça önemli bir araç olarak görünmektedir (Röcher ve Ark., 1998; Kim ve Ark., 1999; Berrios ve Ark., 2000; Mokrani ve Ark., 2002; Langar ve Ark., 2003). Bunun yanında, dominant markırlar olarak AFLP'ler, hastalığa dayanıklılık gibi özelliklerde ve genetik farklılıkların belirlenmesindeki haritaların çıkarılmasında da başarılı şekilde kullanılmaktadır.

c) Mikrosatelit:

Ayçiçeğindeki genetik ilişkilerin incelenmesinde, mikrosatelite kullanımının oldukça başarılı olduğu görülmüştür (Jung ve Ark., 1995; Paniego ve Ark., 2002). Ancak bu tekniğin uygulaması, oldukça fazla işçilik ve maliyet gerektirmektedir (Dehmer ve Friedt, 1998). Kullanımı çok az olmasına rağmen, mikro satelite uygulamalarının hızlı uygulama ve çoğaltma işlemleri imkanı vermesi nedeniyle, hibrit ıslahı yoluyla melez azmanlığının fazla miktarda ortaya çıkmasına yardımcı olacak farklı genetik havuzların oluşturulması ve karakterizasyonu için en önemli moleküler araçlardan biri olarak gün geçtikçe önem kazanmaktadır.

d) Moleküler Klonlama:

PFGE (Pulsed-Field Gel Electrophoresis) ve YAC (Yeast artificial cloning) veya BAC (Bacterial Artificial Cloning) (bakteriyel yapay kromozom) teknikleri kullanılarak oluşturulan genomik kitaplık oluşumları ışığında, son zamanlarda 1 megabase büyüklüğünde DNA fragmentleri (parçaları) elde edilmiş ve daha geniş alanda çalışma imkanı sağlanmıştır (Bidney ve Scelonge, 1997). Ayçiçeğinde BAC kitaplık oluşturulması, genom haritaları kullanılarak genlerin daha kolay klonlanmasına imkan vermektedir (Gentzittel ve Ark., 2002). Ancak YAC ve BAC genomik kitaplık oluşturulması ve için, yüksek moleküler ağırlıklı DNA ların mutlaka hazırlanması gereklidir (Köhler ve Ark., 1998; Özdemir ve Ark., 2002).

Ayçiçeği Islahında Biyoteknolojinin Kullanımı

Ayçiçeğinde bugüne kadar yapılan gerek klasik ıslah, gerekse biyoteknolojik metotlar ile üstün verim ve kalite özelliklerine sahip birçok hat ve çeşitler geliştirilmiş, hastalıklara, orobanşa ve zararlılara dayanıklı, yabancı ot ilaçlarına dominant olan hibritler elde edilmiştir.

Yüksek yağ oranı, orobanşa, herbisitlere, hastalık ve zararlılara dayanıklılık gibi önemli verim öğelerinde, moleküler marker metotları yardımıyla ayçiçeği ıslahında istenilen karakterlerin elde edilmesi, biyoteknolojinin ıslaha en önemli katkılarından biridir. Moleküler marker yöntemlerinin ayçiçeği ıslahında ilk kullanımı ayçiçeği kendilenmiş hatlarının erken devrelerde izozim çeşitliliği (isozyme polymorphism) yoluyla tanımlanması ile başlamıştır (Quilet ve Ark., 1992; Kirichenko ve Ark., 1999). Yine bu genetik tanımlamada daha sonraları DNA markırları kullanılmıştır (Tang ve Ark., 2002; Yu ve Ark., 2002). Bu çerçevede yapılan çalışmalar sonucunda: öncelikle ayçiçeğinde RLFP analiziyle, Gentzittel ve Ark. (1992) 44 *Helianthus* cinsini inceleyerek ayçiçeği cinsinin soy ağacı çıkarmışlar, Riseberg ve Seiler (1990), ribozomal RNA ve kloroplast moleküler markırları kullanarak, kültürü yapılan ayçiçeğinin orijinini belirlemişlerdir. Bu çalışmaları takiben, öncelikle yabancı türler incelenerek basit bir ayçiçeği genomik RFLP haritası hazırlanmış, daha sonra bu harita genişletilmiştir. Yine RAPD teknikleriyle ayçiçeği çeşit ve hatların, ve yabancı türlerinin genetik farklılıkları ortaya çıkarılarak, ıslahta istenilen özelliklerin moleküler marker kullanılarak yapılan seleksiyon yoluyla belirlenmesine yönelik çalışmalara da olanak sağlanmaktadır.

Özellikle Avrupa Topluluğu ve ülkemizin halen karşı olduğu transgenik bitkiler, yani soya, mısır, pamukta olduğu gibi, başka bir organizmadaki genlerin ayçiçeğine aktarılmasıyla elde edilen çeşitler ABD de ıslah edilmesine rağmen, henüz ticari olarak satışa sunulmamıştır. Ancak ayçiçeğinde özellikle yabancı ot ve orobanşı kontrol eden IMI (*Imidazolinone*) herbisit grubuna dayanıklı genler, klasik geriye melezleme yoluyla ve embriyo kültürü uygulanıp generasyon süresi kısaltılarak, yabancı türlerden elde edilip ticari çeşitlere aktarılmış, bu yıl içerisinde ülkemizde ve dünyada piyasaya sürülmüştür (Kaya ve Ark., 2003).

Gelecekte Yapılması Gereken Çalışmalar

Geniş bir genetik çeşitliliğe sahip yabancı ayçiçeği türlerinden, embriyo ve doku kültürü vb. metotlar yardımıyla istenilen karakterlerdeki bu geniş varyasyonun kültür yapılan türlere aktarılması sağlanmış, bu yöndeki çalışmalar yoğun olarak devam etmektedir. Halen *in vitro* kültürüyle hastalıklara ve kurağa dayanıklılık genlerinin tespiti; *Agrobacterium tumefaciens* kullanarak, fasulye ve mısır gibi diğer türlerden ayçiçeğine yabancı genlerin aktarılması; anter veya mikrospor kültürüyle double haploidlerin elde edilmesi; RFLP, RAPD ve PCR

gibi yöntemler kullanılarak ayçiçeğinde önemli özelliklerin genetik haritalarının çıkarılması, ayçiçeği biyoteknolojisinde elde edilmiş başarılarıdır.

Gelecekteki çalışmalar öncelikle, daha çok ayçiçeğinde önemli problem olan hastalık ve zararlılara dayanıklılığın belirlenmesine yönelik gen haritalarının çıkarılması ve geniş alanlarda ekilen ayçiçeğinde oluşan kuraklığa dayanıklı genlerin belirlenmesine yönelik olacaktır. Yine herbisitlere ve orobanşa dayanıklı genlerin ticari çeşitlere aktarılmasında önemli aşama kaydedilmesine rağmen, ayçiçeğinde kullanılan IMI grubu herbisitlerin kontrol ettiği ot türlerinin adedinin artırılmasına yönelik araştırmalar da kısa vade de yapılacak ve başarılabacak çalışmalardır. Bu daha çok az genle belirlenen kalite ve hastalıklara dayanıklılık gibi kalitatif özelliklerden sonra, ayçiçeğinde biyoteknolojik araştırmalar tane ve yağ verimi gibi kantitatif karakterlere yönelik olacaktır.

Ayçiçeğinde genomik kütüphanelerin oluşturulması, istenilen bilimsel ve ıslah amaçlarının gerçekleşmesi için bir çok moleküler metodun uygulanmasına imkân sağlayacaktır. Bu konudaki araştırmalar henüz oldukça başlangıç aşamasında olmasına rağmen, alınan ilk sonuçlar, ayçiçeğinde genomik kütüphane oluşturulmasının kısa zamanda hazır olacağını göstermektedir.

Sonuç

Ayçiçeği ile yapılmakta biyoteknolojik çalışmalar günden güne artmaktadır. Mısır, çeltik, şeker pancarı, patates, soya, buğday vb. birim alandan daha fazla gelir getiren ve daha geniş alanlarda ekilen bitkilerde uygulanan bazı moleküler ıslah yöntemleri de, pratik olarak ayçiçeğinde kullanılmaya da başlanmıştır. Sonuç olarak, ayçiçeğinde klasik ıslah metodlarında, biyoteknolojinin tüm yöntemlerini tam anlamıyla kullanmak bugün için henüz erken olmasına rağmen, gelecekteki ıslah çalışmalarında biyoteknolojinin en önemli araç olacağı açıkça görülmektedir.

Kaynaklar

- 1 ALIBERT G C, ASLANE-CHANABE C, BURRUS M. Sunflower tissue and cell cultures and their use in biotechnology. *Plant Physio. Biochem.*, 32: 31-44. 1994.
- 2 ALIBERT B, LUCAS O, MENTEWAB A, LETELLIER V, MARQUE C, SARRAFI A. Genetic transformation of sunflower (*H. annuus* L.) by *Agrobacterium tumefaciens* infection of pectolyase treated explants. *Helia*, 22 : 223. 1999.
- 3 BERRIOS E F, GENTZBITTEL L, KAYYAL H, ALIBERT G. AFLP mapping of QTLs for in vitro organogenesis traits using recombinant inbred lines in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Theor. Appl. Genet.*, 101: 1299-1306. 2000.
- 4 BERRY, S T, LEON A J, HANFREY C C, CHALLIS P, BURKHOLZ A, BARNES S, RUFENER G K, LEE M, CALIGARI P D S. Molecular marker analysis of *Helianthus annuus* L: 2. Construction of an RFLP linkage map for cultivated sunflower. *Theor. Appl. Genet.* 91:195-199. 1995.
- 5 BIDNEY, D L, SCELONGE C J. Sunflower Biotechnology. In A. A. SCHNEITER (ed.) *Sunflower Technology and Production*. Agron. Monogr. 35. ASA, CSSA and SSSA, Madison, WI, USA. 559-593. 1997.
- 6 BOLANDI A. R., BRANCHARD M., ALIBERT G., SERIEYS H., SARRAFI A. Cytoplasmic-nuclear interaction and medium effect for protoplast culture in sunflower. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 57: 189-193. 1999.
- 7 BOUZIDI, M F, BADAOU S, CAMBON F, VEAR F, LABROUHE ST, NICOLAS P, MOUZEYAR S. Molecular analysis of a major locus for resistance to downy mildew in sunflower with specific PCR-based markers. *Theor. Appl. Gen.* 104:592-600.2002.
- 8 BRAHM L, RÖCHER T, FRIEDT W. PCR-Based markers facilitating marker assisted selection in sunflower for resistance to downy mildew. *Crop Sci.* 40: 676-682. 2000.
- 9 BURKE J M, TANG S, KNAPP S J, RIESEBERG L H. Genetic Analysis of Sunflower Domestication. *Genetics*. 161: 1257-1267. 2002.
- 10 DEHMER K J, FRIEDT W. Evaluation of different microsatellite motifs for analyzing genetic relationships in cultivated sunflower. *Plant Breed.* 117: 45-48. 1998.
- 11 FAURE N, SERIEYS H, QUILLET M C, BERVILLÉ A, KAAAN F. Using RAPD bulk analysis for the study of wild *H. annuus* populations. 4th Europ. Conf. on Sunflower Biotechnology. Montpellier, October 20-23. *Helia*, 22: 214. 1998.
- 12 FAURE N, SERIEYS H, GRIVEAU G, KAAAN F, BERVILLE A. RFLP applied to interspecific progenies revealed cross failure and true hybridization between sunflower and *Helianthus* perennial species. XVth International Sunflower Conference. Toulouse, France. Proceedings of ISC Conference. T2: O13-018. 2000.

- 13 FAURE N, SERIEYS H, KAAAN F, BERVILLÉ A. Partial hybridization in wide crosses
- 14 between cultivated sunflower and the perennial *Helianthus mollis*: Effect of in vitro culture compared to natural crosses. *Plant Cell Rep* 20 : 943-947. 2002a.
- 15 FAURE N, SERIEYS H, BERVILLE A, CAZAUX E, KAAAN F. Occurrence of partial hybrids in wide crosses between sunflower (*H. annuus*) and perennial species *H. mollis* and *H. orgyalis*. *Theor Appl Genet.*104 (4):652-660. 2002b.
- 16 FIORE M C, TRABACE T, SUNSERI F. High frequency of plant regeneration in sunflower from cotyledons via somatic embryogenesis. *Plant Cell Rep* 16: 295-298. 1997.
- 17 FISCHER C, KLETHI P, HAHNE G. Protoplast from cotyledon and hypocotyl of sunflower shoot regeneration and seed production. *Plant Cell Rep.*11: 632-636. 1997.
- 18 FISCHER C, LAPARRA H, CHARRIÈRE F, JUNG J L, ET HAHNE G. Regeneration of plants from protoplasts of *H. annuus* L. In BAJAJ Y. (Ed.), *Plant Protoplasts and Genetic Engineering VII*. Berlin/New York: Springer Verlag. 38:48-63.1996.
- 19 GEDIL, M A, WYE C, BERRY S T, SEGERS B, PELEMAN J, JONES R, LEON A, SLABAUGH M B, KNAPP S J. An integrated RFLP-AFLP linkage map for cultivated sunflower. *Genome* 44 : 213-221. 2001.
- 20 GENTZBITTEL L, PERRAULT A, NICOLAS P. Molecular phylogeny of the *Helianthus* genus based on nuclear restriction-fragment-length polymorphism (RFLP). *Mol. Biol. Evol.* 9: 872-892. 1992.
- 21 GENTZBITTEL L, ABBOTT A, GALAUD J P, GEORGI L, FABRE F. A bacterial artificial chromosome (BAC) library for sunflower, and identification of clones containing genes for putative transmembrane receptors. *Mol Genet Genomics* 266: 979-987. 2002.
- 22 HORN R, KUSTERER B, LAZARESCU E, PRUFE M, FRIEDT W. Molecular mapping of the *Rf1* gene restoring pollen fertility in PET1-based F1 hybrids in sunflower (*H. annuus* L.). *Theor Appl Genet.* 106(4):599-606. 2003.
- 23 HOSOKI, T, OHTA K, INABA K, HARISAKI, M. In Vitro propagation of thin-leaf sunflower (*Helianthus decapetalus* L.). *Acta Hort. (ISHS)* 397:125-128. 1995.
- 24 IUORAS M, PATRASCU M, VASILE C, SOARE G, BERVILLE A, TERSAC M. A marker genes collection and RAPD markers for recessive branching in sunflower. *Helia*, 22 : 29-35. 1999.
- 25 JAN C C, VICK B A, MILLER J F, KAHLER A L, BUTTLER E T. Construction of an RLFP linkage map for cultivated sunflower. *Theor. Appl. Genet.* 96: 15-22. 1998.
- 26 JUNG JL, CHARRIÈRE F, LAPARRA H, ET HAHNE G. Genetic fingerprints in sunflower (*H. annuus* L.) using microsatellite sequences. *Techniques et utilisations des marqueurs moléculaires*, Paris: Les Colloques de l'INRA. 72:127-133. 1995.
- 27 KAYA Y. Türkiye'deki yağlık ayçiçeği üretiminin mevcut durumu, sorunları ve çözüm önerileri. *CINE TARIM Dergisi.* 5: (43). 34-35. 2003.
- 28 KAYA Y, EVCI G, DEMIRCI M. Broomrape (*O. cernua* Loeffl.) and Herbicide Resistance Breeding in Sunflower (*H. annuus* L.) in Turkey. *The Proc. Abstracts of 6th European Sunflower Biotechnology Conf.* October 6-10. Sevilla, Spain. 13. 2003.
- 29 KIM S C, RIESEBERG L H. Genetic Architecture of Species Differences in Annual Sunflowers: Implications for Adaptive Trait Introgression. *Genetics.*153:965-77.1999.
- 30 KÖHLER H, ÖZDEMİR N, KRAMER M, FREIDT W. Preparation of high molecular weight DNA from sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Abstr. 4th Eur. Conf. on Sunflower Biotech.* Montpellier, France. 20-23 September. 47. 1998.
- 31 KIRICHENKO V V, SHAROPOVA N R, POPOV V N, MAKLYAK E N, BERVILLE A, TERSAC M. Potential use of polymorphism of isoenzymes in selective-genetical programs for sunflower (*H annuus* L.). *Helia*, 22:149-154. 1999.
- 32 LANGAR K, LORIEUX M, DESMARAIS E, GRIVEAU Y, GENTZBITTEL L, BERVILLE A. Combined mapping of DALP and AFLP markers in cultivated sunflower using F9 recombinant inbred lines. *Theor. Appl. Gen.*106:1068-1074.2003.
- 33 LU Y H, GAGNE G, GREZES-BESSET B, BLANCHARD P. Integration of a molecular linkage group containing broomrape resistance gene *Or5* in to an RFLP in sunflower. *Genome* 42 : 453-456. 1999.
- 34 MADJIDIAN N, LAMBERT P, QUILLET M C, SERIEYS H, BERVILLÉ A. Molecular markers inheritance in *H. argophyllus* x sunflower progenies. *4th Europ. Conf. on Sunf. Biotech.* Montpellier, France. October 20-23. *Helia*, 22:193. 1998.
- 35 MILLER, J F, FICK G N. Sunflower Genetics. In A. A. SCHNEITER (ed.) *Sunflower Technology and Production*. Agronomy Monogram. 35. ASA, CSSA and SSSA, Madison, WI, USA. 441-495. 1997.

- 36 MOKRANI L, GENTZBITTEL L, AZANZA F, AL-CHAARANI G, SARRAFI A. Mapping and analysis of quantitative trait loci for grain oil content and agronomic traits using AFLP and SSR in sunflower. *Theor Appl Genet* 106: 149-156. 2002.
- 37 MÜLLER A, SHUSTER C, ISER M, FÜRST S, JACH M, HESS D. Regeneration from different explants of sunflower and first transformation experiment.. Abstr. 4th Europ. Conf. on Sunflower Biotech. Montpellier, France. September 20-23. 63. 1998.
- 38 NESTARES G, ZORZOLI R, MROGINSKI L, PICARDI L. Plant regeneration from cotyledons derived from mature sunflower seeds. *Helia*, 19, 107-112. 1996.
- 39 ÖZDEMİR N, HORN R, FRIEDT W. Isolation of HMW DNA from sunflower (*Helianthus annuus* L.) for BAC cloning. *Plant Mol Biol Rep* 20:239-250. 2002
- 40 PANIEGO N, ECHAIDE M, MUNOZ M, FERNANDEZ L, TORALES S, FACCIO P, FUXAN I, CARRERA M, ZANDOMENI R, SUAREZ E Y, HOPP H E. Microsatellite isolation and characterization in sunflower. *Genome* 45:34-43. 2002.
- 41 PANKOVIC D, MIHALICEVIC M, SKORIC D. Determination of genetic distance between different sunflower lines with RAPD markers. In: B. VASILJEVIC (ed.) Book of Abs. 1st Symp. on molecular genetics. Yugoslavia. 15-18 Sept. 34. 1997.
- 42 QUILET M C, VEAR F, BRANLARD G. The use of polymorphism for identification of sunflower (*H. annuus* L.) inbred lines. *J. Genet. Breed.* 46: 295-304. 1992.
- 43 RADWAN O, BOUZIDI M F, VEAR F, PHILIPPON J, LABROUHE T, NICOLAS P, MOUZEYAR S. Identification of non-TIR-NBS-LRR markers linked to the P15/ P18 locus for resistance to downy mildew in sunflower. *Theor. Apl. Gn.* 06:1438-46. 2003.
- 44 RIESEBERG L H, SEILER G. Molecular evidence and the origin and development the domesticated sunflower (*H. annuus* L.). *Econ. Bot.* 44 (3) : 79-91. 1990.
- 45 ROECKEL-DREVET P, TOURVIEILLE J, GULYA T J, CHARMET G, NICOLAS P, TOURVIEILLE DE LABROUHE D. Molecular variability of sunflower downy mildew from different continents. *Can. J. Microbiol.* 49 (8): 492-502. 2003.
- 46 RÖCHER T, BRAHM L, FRIEDT W. The genetics of different sources of sunflower downy mildew resistance. Abstr. 4th Eur. Conf. on Sunflower Biotech. Montpellier, France. 20-23 September. 45. 1998.
- 47 SOSSEY-ALAOUI K, SERIEYS H, TERSAC M, LAMBERT P, SCHILLING E, GRIVEAU Y, KAAAN F, BERVILLE A. Molecular relationships of *Helianthus* based on RAPD markers. *Helia*. 22 : 1-17. 1999.
- 48 SARRAFI A, ROUSTAN J P, FALLOT J, ALIBERT G. Genetic analysis of organogenesis in the cotyledons of zygotic embryos of sunflower (*Helianthus annuus* L.) . *Theor. Appl. Genet.* 92: 225 229. 1996.
- 49 TANG S, YU J K, SLABAUGH M B, SHINTANI D K, KNAPP S J. Simple sequence repeat map of the sunflower genome. *Theor. Appl. Genet.* 105 (8) : 1124-1136. 2002.
- 50 TANG S, HEESACKER A, KISHORE VK , FERNANDEZ A, SADIK S, COLE G, KNAPP S J. Genetic Mapping of the Or5 Gene for Resistance to Orobanche Race E in Sunflower. *Crop Science* 43:1021-1028. 2003.
- 51 TODOROVA M, IVANOV P, SHINDROVA P, CHRISTOV M, IVANOVA I. Doubled haploid production of sunflower (*Helianthus annuus* L.) through irradiated pollen-induced parthenogenesis. *Euphytica* (3): 249-254, 1997
- 52 VASIC D, ALIBERT G, BERVILLÉ A, SKORIC D. RAPD analysis of sunflower somatic hybrid calli. XVth International Sunflower Conference. Toulouse, France. Proceedings of ISC Conference. T2: L42-45. 2000.
- 53 VASIC D, ALIBERT G, CARON S, SKORIC D. Protocols for efficient repetitive secondary somatic embryogenesis in *Helianthus maximiliani* (Schrader). *Plant Cell Rep* 20: 121-125. 2001.
- 54 WEBER S, HORN R, FRIEDT W. Improvement of sunflower transformation: the use macerating enzymes. Abstr. 4th Europ. Conf. on Sunflower Biotech. Montpellier, France 20-23 September. 34. 1998.
- 55 YU, J K, MANGOR J, THOMPSON L, EDWARDS K J, SLABAUGH M B, KNAPP S J. Allelic diversity of simple sequence repeat markers among elite inbred lines in cultivated sunflower. *Genome* 45:652-660. 2002.