



**EK-1**

**Haşhaş (*Papaver somniferum*)'ta Moleküler Genetik  
Analizler**

Proje No: 109O797

Prof.Dr. Anne FRARY  
Dr. Hüseyin CAMCI  
Dr. Arzu KÖSE  
Dr. Ferda Çelikoğlu KOŞAR

MAYIS 2013  
İZMİR

## ÖNSÖZ

Birçok yönden ilgi çekici bir bitki olan haşhaş (*Papaver somniferum*) yüzyıllar boyunca insanoğlu tarafından bilinen en eski ve önemli tıbbi bitkilerden birisidir. Haşhaştan elde edilen bazı ekstratlar en az 3500 yıldır ağrı dindirici ilaç olarak kullanılmaktadır. Kapsül farmasotik endüstrisinde ekonomik ve tıbbi kullanımı olan fizyolojik olarak aktif morfin, kodein, tebain, narkotine ve papaverine gibi bir çok major öneme sahip alkaloid içermektedir. Bu alkaloidler narkotik, analjezik, sadative gibi ağrı kesici ilaçların hazırlanmasında yoğun bir şekilde kullanılmaktadır. Dolayısıyla, haşhaş ilaç sanayinde kullanılacak alkaloidler için en önemli yenilenebilir kaynak ham madde sağlayan ve fazla alternatifi olmayan bir ürün konumundadır. Bu özelliklerine rağmen, haşhaş üzerinde çok çalışılmayan ve ihmal edilmiş bir bitki türüdür. Önerilen bu proje ile haşhaş bitkisi için genomik araçların geliştirilmesi esas olarak amaçlanmıştır. Bu amaç için bir Türk haşhaş çeşiti (Kemer kaya 97) kullanılarak genomik dizileme (sekanz) yapılmıştır. Bu diziler kullanılarak susam için genomik SSR markörleri geliştirilmiştir. Ayrıca, halka açık gen veritabanlarından haşhaş için depolanmış diziler kullanılarak EST-SSR markörleri geliştirilmiştir. Geliştirilen bu markörler proje kapsamında Türk ve dünya susam germplazmaları için genetik çeşitlilik analizlerinin yapılmasında, ürün için bir moleküler genetik bağlantı haritasının oluşturulmasında ve ilişkilendirme analizlerinde kullanılmıştır. Bu proje TÜBİTAK tarafından Prof. Dr. Anne FRARY'ye sağlanan destekle tamamlanmıştır (TÜBİTAK 109O797).

# İÇİNDEKİLER

ÖZET	6
ABSTRACT	7
1. GİRİŞ	8
2. GENEL BİLGİLER	9
3. GEREÇ VE YÖNTEM	13
3.1. Çalışmada Kullanılan Bitkisel Materyaller	13
3.2. Morfolojik Karakterizasyon	13
3.2.1. Çiçek Rengi	13
3.2.2. Pusululuk	14
3.2.3. Tohum Rengi	14
3.2.4. Bitki Boyu	14
3.2.5. Bitki Başına Kapsül Sayısı	14
3.2.6. Kapsülde Tepecik Sayısı	14
3.2.7. Kapsül Uzunluğu	14
3.2.8. Kapsül genişliği	14
3.2.9. Kapsül İndeksi	14
3.2.10. Dekara Kapsül ve Tohum Verimi	14
3.2.11. Alkaloid Analizleri	14
3.3. Moleküler Genetik Analizler	15
3.3.1. EST Dizilerinden SSR Markörlerinin Geliştirilmesi	15
3.3.2. Genomik Dizilerden SSR Markörlerinin Geliştirilmesi	16
3.3.3. AFLP Analizleri	17
3.3.4. Veri Analizleri	17
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	18
4.1. Morfolojik Karakterizasyon	18
4.2. Moleküler Karakterizasyon	35
4.2.1. Haşhaş Çeşitleri Arasındaki Genetik Çeşitlilik Analizleri	35
4.2.2. EST-SSR Markörlerinin Geliştirilmesi	39
4.2.3. Genomik-SSR Markörlerinin Geliştirilmesi	49
4.2.4. Moleküler Genetik Bağlantı Haritasının Oluşturulması	54
4.2.5. Haşhaş'ta İlişkilendirme Analizleri	65
4.2.5.1. İlişkilendirme Haritalaması için AFLP Analizleri	65
4.2.5.2. İlişkilendirme Haritalaması için EST-SSR ve gSSR Analizleri	66
4.2.5.3. İlişkilendirme Haritalaması için MLM Analizleri	69
4.2.5.4. Haşhaş Populasyon Yapısının Analizi	74
4.2.5.5. Çekirdek Koleksiyonunun Oluşturulması	78
5. SONUÇLAR	80
REFERANSLAR	82
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU	89

## TABLO LİSTELERİ

Tablo 1. Genetik çeşitlilik analizlerinde kullanılacak tohumörneklerinin listesi	19
Tablo 2. Türk haşhaş çeşitlerinin agro-morfolojik özellikleri ve alkaloid içerikleri (2010-2011)	22
Tablo 3. Türk haşhaş çeşitlerinin agro-morfolojik özellikleri ve alkaloid içerikleri (2011-2012)	25
Tablo 4. Haşhaş agro-morfolojik karakterler ve morfin içerikleri ortalama değerleri	28
Tablo 5. Haşhaş agronomik karakterlerinin korelasyon değerleri	35
Tablo 6. Çalışmada kullanılacak genetik materyallerin DNA miktarları	35
Tablo 7. Dizi önişlemesi ve montajlama istatistikleri	39
Tablo 8. Haşhaş SSR motif tipleri ve sıklığı	40
Tablo 9. Haşhaş EST en yoğun gözlenen SSR motifleri	41
Tablo 10. EST dizilerinden geliştirilen SSR dizileri	41
Tablo 11. SSR markörlerinin değişik türlerdeki etkinliğini testlemek için kullanılan genotipler	46
Tablo 12. SSR markörleri ile üretilen parçacık sayıları	47
Tablo 13. Dizi analizi sonucu elde edilen verilerin istatistiksel analizleri	50
Tablo 14. SSR tekrar çeşitleri	50
Tablo 15. Genomik dizilerde en fazla bulunan SSR motifleri	51
Tablo 16. Çalışmada kullanılan bitki materyalleri	52
Tablo 17. F2 populasyonuna ait bazı morfolojik ve morfin içerikleri	54
Tablo 18. F2 populasyonuna ait bitkilerden elde edilen DNA miktarları	59
Tablo 19. AFLP kombinasyonları ve vermiş olduğu polimorfik fragment sayısı	65
Tablo 20. Türk haşhaş çeşitlerinin genotiplendirilmesinde kullanılan SSR markörleri	67
Tablo 21. Haşhaş bitki boyu karakteri için MLM sonucu	69
Tablo 22. Haşhaş dal ve kapsül tepcecik sayısı karakteri için MLM sonucu	70
Tablo 23. Haşhaş kapsül boyu karakteri için MLM sonucu	71
Tablo 24. Haşhaş kapsül eni karakteri için MLM sonucu	72
Tablo 25. Haşhaş kapsül verimi karakteri için MLM sonucu	73
Tablo 26. Haşhaş tohum verimi karakteri için MLM sonucu	73
Tablo 27. Haşhaş morfin oranı karakteri için MLM sonucu	74
Tablo 28. Haşhaş çeşitlerinin iki farklı kümede bulunma olasılıkları	76
Tablo 29. Haşhaş çekirdek koleksiyonu	79

## ŞEKİL LİSTELERİ

Şekil 1. ATAE tarlalarında ekilen haşhaş genotiplerinin homojen hale getirilmesi	18
Şekil 2. Genetik çeşitlilik analizinde kullanılacak haşhaş genotiplerinin tarla çalışmaları.	21
Şekil 3. Türk haşhaş genotiplerinin bitki boyu karakteri için histogram grafiği	32
Şekil 4. Türk haşhaş genotiplerinin dal sayısı karakteri için histogram grafiği	32
Şekil 5. Türk haşhaş genotiplerinin kapsül tepecik sayısı karakteri için histogram grafiği	32
Şekil 6. Türk haşhaş genotiplerinin kapsül eni karakteri için histogram grafiği	33
Şekil 7. Türk haşhaş genotiplerinin kapsül boyu karakteri için histogram grafiği	33
Şekil 8. Türk haşhaş genotiplerinin kapsül indeksi karakteri için histogram grafiği	33
Şekil 9. Türk haşhaş genotiplerinin tohum verimi karakteri için histogram grafiği	34
Şekil 10. Türk haşhaş genotiplerinin kapsül verimi karakteri için histogram grafiği	34
Şekil 11. Türk haşhaş genotiplerinin morfin içeriği karakteri için histogram grafiği	34
Şekil 12. Biraraya getirilen EST unigene dizilerinden elde edilen SSR motiflerinin dağılımı	39
Şekil 13. Haşhaş genlerinin veribankalarından elde edilen fonksiyonel sınıfları	40
Şekil 14. EST-SSR markör ile UPGMA analizi sonucu elde edilen dendogram.	49
Şekil 15. Genomik SSR işaretleyicilerinin oluşturduğu dendogram	54
Şekil 16. İyi amplifikasyon veren bazı SSR markörleri	62
Şekil 17. Yakın akraba türlerde iyi amplifikasyon veren SSR markörleri	63
Şekil 18. SSR primerlerinin PCR ürünlerinin kapillar elektroforez görüntüleri	63
Şekil 19. Haşhaş genomu için geliştirilen moleküler genetik bağlantı haritası	64
Şekil 20. Seçici AFLP amplifikasyonlarının görüntüleri	66
Şekil 21. gSSR588 markörünün haşhaş çeşitlerinde vermiş olduğu açılım görülmektedir	68
Şekil 22. Farklı küme sayılarının (K=2-6) $\Delta K$ değerleri	75
Şekil 23. Farklı küme sayılarının (K=3-6) $\Delta K$ değerleri	75
Şekil 24. Haşhaş çeşitlerinin (K=2 için) populasyon yapısı	76
Şekil 25. Haşhaş çeşitlerinin (K=4 için) populasyon yapısı	76

## ÖZET

Haşhaş (*Papaver somniferum* L.) eski çağlardan beri kapsüllerindeki alkaloidler ve tohumlarındaki besin içerikleri açısından ilgi çeken bir üründür. Esas itibarıyla kapsüllerindeki fizyolojik olarak aktif alkaloidleri için üretilmektedir. Haşhaş uluslararası anlaşmalar çerçevesinde sadece 20 civarında Avrupa ve Asya ülkelerinde yetiştirilmektedir. Türkiye’de haşhaş bitkisinin üretimine ve ticaretine izin verilen ülkelerden birisidir. Haşhaş kapsüllerinde içerdiği ve esas olarak narkotik, analjezik, sedative gibi ağrı kesici ilaçların hazırlanmasında kullanılan morfin, kodein, tebain, narkotine, papaverine gibi major öneme sahip alkaloidlerin sağlandığı tek ürün olma özelliği taşımaktadır. Bu nedenle farmasotik endüstrisinde hammadde sağlayan önemli üründür. Dünya’da yaklaşık 103.000 ha. alanda yetiştirilmektedir. Türkiye’de ise 19.000 ha. da tarımı yapılmaktadır. Avustralya, Fransa, Hindistan, İspanya ve Türkiye en önemli haşhaş üreten ülkelerdir. Son zamanlarda Çin’de de bu konuda önemli çalışmalar yapılmaktadır. Sadece Çin ve Hindistan’da afyon sakızı üretilmekte ve ticareti yapılmaktadır. Hindistan afyon sakızı ithalatında tekel durumundadır. Türkiye hem sahip olduğu genetik kaynakları ve hem de yetiştirme ekolojisi bakımından haşhaş için tüm imkanlara sahip bulunmaktadır. Bu özellikleri ile Türkiye haşhaş üretiminde ve ticaretinde rekabet gücünü koruyabileceği gibi haşhaş ve ürünleri pazarından daha fazla miktarda kazançlar elde etme kapasitesindedir. Ekim alanı sınırlı olduğu için Türkiye’nin haşhaş üretimini artırabilmesi için tek yol ihtiyaçlara cevap verebilecek nitelikte yeni haşhaş çeşitlerinin geliştirilmesine bağlıdır. Klasik yöntemler kullanılarak geliştirilen çeşitler olmasına rağmen günümüz çiftçisinin ve ilaç endüstrisinin ihtiyaç duyduğu kalitede çeşitler olma konusunda yeterli bulunmamaktadır. Moleküler teknolojilerin haşhaş ıslahında kullanımı günümüze kadar yapılmamıştır. Türkiye zengin haşhaş gen kaynaklarına sahip bulunmaktadır. Bu gen kaynaklarının karakterizasyonu ve ıslah çalışmalarında daha etkili kullanımı önemlidir. Önerilen projede Ulusal Gen Bankasından temin edilecek bir grup haşhaş germplazmında genetik analizler yapılacak ve çekirdek kolleksiyonların oluşturulması için markörler belirlenecektir. Yine, proje kapsamında ilk kez SSR markörleri geliştirilecek ve bu markörler haşhaş için yüksek çözünürlükte moleküler genetik bağlantı haritasının oluşturulmasında kullanılacaktır. Oluşturulan bağlantı haritası kullanılarak ilk kez haşhaş için önemli agronomik ve alkaloid içerikler için kantitatif karakter analizleri (QTL) yapılacaktır. Ayrıca, haşhaş doğal populasyonları kullanılarak ilişkilendirme haritalaması ile agronomik ve alkaloid içeriklerin genetik esasları belirlenecektir. Moleküler teknolojilerin de kullanımı ile geliştirilecek yeni haşhaş çeşitleri ile haşhaş tarımına yön vermek ve üretim, ihracat, gelir düzeyinde makro artışları sağlamak ve en önemlisi Türkiye’nin bu üründe rekabet gücünü artırmak mümkün olacaktır.

### Anahtar Kelimeler:

Haşhaş, Alkaloid, Genetik Çeşitlilik, SSR, Haritalama, QTL, İlişkilendirme Haritalaması

## ABSTRACT

Since ancient times, opium poppy (*Papaver somniferum* L.) has been of interest because of the alkaloids found in its capsules and the nutritional quality of its seeds. Poppy is mainly produced for the physiologically active alkaloids found in the capsule. Within the confines of an international agreement, opium poppy is only grown in approximately 20 countries in Europe and Asia. Turkey is one of the countries with permission to grow and trade opium poppy. Poppy is the only natural source of the important alkaloids morphine, codeine, thebaine, narcotine and papaverine. These alkaloids are of pharmaceutical importance and are used as narcotic, analgesic, and sedative pain relievers. For this reason, it is a crop that provides an essential raw material for the pharmaceutical industry. Opium poppy is grown on approximately 103,000 hectares worldwide with 19,000 hectares grown in Turkey in 2007 according to FAO statistics. Australia, France, India, Spain and Turkey are the most important opium poppy-producing countries. More recently, China has made important progress in this area. Raw opium is only produced and traded in China and India. India is the only country that exports raw opium. In terms of genetic resources and an appropriate ecology for poppy cultivation, Turkey has the potential to produce high quality poppy products. With this potential, Turkey can sustain its competitiveness in opium poppy trade and should be able to gain a more important place in the worldwide poppy business. Because poppy production is limited to certain areas, the only way to increase production, is to develop new cultivars with increased yield. Despite the development of cultivars by classic breeding methods, these cultivars are not enough because today's farmers and pharmaceutical industry require higher quality varieties. To date, molecular breeding techniques have not been used for opium poppy improvement. Turkey has rich genetic resources for this crop but these resources must be characterized so that they can be used more effectively. In the proposed research, a subset of opium poppy germplasm from the National Genebank will be genetically analyzed and markers identified for core collection determination. For the first time and in this project, SSR markers will be developed for opium poppy and used to construct a high density genetic linkage map. The SSR marker and map will then be used to do quantitative trait locus (QTL) analysis to identify genes for important agronomic and alkaloid-content traits. In addition, natural opium poppy populations will be used to map the same traits using association mapping techniques. New varieties developed using molecular techniques will give new directions to poppy production and will help to increase production, export and the income generated by this crop. Most importantly, with such new cultivars, it will be possible to strengthen Turkey's competitiveness in opium poppy trade.

### Keywords

Poppy, Alkaloid, Genetic Diversity, SSR, Molecular Mapping, QTL, Association Mapping

# 1. GİRİŞ

Türkiye sahip olduğu coğrafyası ile pek çok üründe birinci dereceden gen merkezi durumundadır. Papaver cinsi içerisinde yer alan 28 cins ve 250 türün 70'si Papaver genusuna aittir. Bu aile içerisindeki 5 cinse ait yaklaşık 39 tür ülkemizde belirlenmiştir ve Türkiye haşhaş bitkisi için de birincil dereceden gen merkezi olarak değerlendirilmektedir. Bitki çeşitliliğinin sürdürülebilmesi ve çalışılması için ıslahçıların ve gen bankalarının elinde bulunan germplazm koleksiyonlarının karakterizasyonu gerekmektedir. Bu işlem için klasik olarak bazı agro-morfolojik özellikler incelenmiştir. Ancak, son zamanlarda büyük popülarite kazanan ve bitki bilimlerinde yoğun kullanım alanı bulan moleküler markörler germplazm koleksiyonlarının karakterizasyonu ve idaresine yardımcı olmak üzere geniş bir şekilde kullanılmaktadır. Bu tip analizler ile genetik olarak farklı materyallerin belirlenmesi ve çekirdek koleksiyonların oluşturulmasına imkan sağlanmıştır. Çekirdek koleksiyonlar küçük, idaresi nispeten kolay ve daha ekonomik oldukları için bütün koleksiyona göre daha iyi düzeyde ve tam anlamıyla karakterize edilebilmektedir. Ülkemizde de haşhaş bitkisi için çekirdek koleksiyonların oluşturulması gerekmektedir. Önerilen projede Anadolu Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nden temin edilen bir grup materyalde genetik çeşitlilik analizleri yapılmıştır.

Moleküler markör teknolojileri ve genetik bağlantı haritaları modern bitki ıslahında son derece güçlü bir teknik olan marköre dayalı seleksiyon yapılmasına imkan sağlamıştır. Bu tür haritalar birçok majör ve minör bitkilerde geliştirilmiştir. Fakat, haşhaş'ta ıslah ve genetik çalışmalarda kullanılabilecek çözünürlükte geliştirilmiş bir moleküler genetik bağlantı haritası bulunmamaktadır. Haşhaş için oluşturulacak bir moleküler genetik bağlantı haritası marköre dayalı seleksiyon ile ıslah programlarını hızlandıracak ve bir çok karakterin seçici olarak manipülasyonuna imkan sağlayacaktır. Son zamanlarda, kompleks karakterlerin incelenmesi amacıyla kullanılan doğal bitki popülasyonlarının genetik analizinde klasik bağlantı analizlerinin yanısıra ilişkilendirme haritalama metoduda (association mapping) yoğun bir şekilde kullanılmaya başlanmıştır. Bağlantı disequilibriumu (LD) olarak bilinen ilişkilendirme haritalaması kantitatif karakter lokuslarının (QTL) belirlenmesinde kullanılabilmektedir. Bağlantı disequilibrium konsepti (LD) üzerine dayanan ilişkilendirme haritalama yöntemi ile bir popülasyon içerisindeki atasal rekombinasyonları ve doğal genetik varyasyonu kullanarak kantitatif karakter lokuslarını belirlemek mümkündür. Önerilen proje kapsamında Türk doğal haşhaş popülasyonları için LD analizleri yapılmıştır. Bu proje hem genetik kaynaklar ve hem de yetiştirme ekolojisi bakımından tüm imkanlara sahip olan ülkemizde, haşhaşın günümüz ihtiyaçlarına cevap veren bir bitki olarak değerlendirilmesine olanak sağlayacak altyapıyı oluşturmak, geliştirilecek yeni çeşitlerle haşhaş tarımına yön vermek ve üretim, ihracat, gelir düzeyinde makro artışları sağlayacaktır.



## 2. GENEL BİLGİLER

Haşhaş (*Papaver somniferum* L., 2n=22) Papavereceae familyası içerisinde yer almaktadır. Papavereceae 28 cins ve 250 tür içeren büyük bir familyadır (KAPOO 1997). 250 türün 70'si *Papaver* genusuna aittir (KADEREIT ve ark. 1993). Bu aileye ait 5 cins Türkiye'de bulunmuştur (SEÇMEN ve ark. 1995). Haşhaş (*Papaver somniferum*) yüzyıllar boyunca insanoğlu tarafından bilinen en eski ve önemli tıbbi bitkilerden birisidir (WHITE 1985; SCHIFF 2002). Haşhaştan elde edilen bazı ekstratlar en az 3500 yıldır ağrı dindirici olarak kullanılmaktadır (BERNATH 1998). Afyon olgunlaşmamış kapsülün çizilmesiyle lateks (süt) formunda elde edilir. Kapsül farmasotik endüstrisinde ekonomik ve tıbbi kullanımı olan fizyolojik olarak aktif bir çok major alkaloidin ana kaynağını oluşturmaktadır. Bu önemli alkaloidler arasında morfin, kodein, tebain, narkotine ve papaverine yer almaktadır ve esas olarak bu alkaloidler narkotik, analjezik, sadative gibi ağır kesici ilaçların hazırlanmasında kullanılmaktadır. Haşhaş ilaç sanayinde kullanılacak alkaloidler için en önemli yenilenebilir kaynak ham madde sağlamaktadır (YADAV ve ark. 2006). Ayrıca, Haşhaş yetiştirilen bölgelerde günlük diyet içerisinde özellikle afyon içermeyen tohumlar ekmek ve diğer hamur ürünlerinde yoğun bir şekilde kullanılmaktadır (GÜMÜŞÇÜ ve ark. 2008). Haşhaş tohumlarından çıkarılan yağın narkotik bir özelliği yoktur ve eski çağlardan beri yemek yağı olarak kullanılmaktadır. İlave olarak, haşhaş tohumu yağı ten nemlendiricisi olarak ve ayrıca sabun, boya, parlaticı yapımında kullanılmaktadır. Dünya da yaklaşık 84.000 ton haşhaş tohumu üretilmektedir. Türkiye yıllık 30.187 (%36) ton üretimi ile Çek Cumhuriyeti'nden (31.591 ton/yıl, %38) sonra ikinci sırada yer almaktadır (FAO 2006).

Dünya da uyuşturucu maddelerin ekimi, üretimi, ithali ve ihracatını, ülkemizin de imza koyduğu uluslararası 1961 TEK Sözleşmesi (Single Convention on Narcotic Drugs) ve tadiline ilişkin 1972 protokolü düzenlemektedir. 1961 TEK Sözleşmesi, dünyadaki uyuşturucu madde işlerinin tek elden yürütülmesi hükümünü getirmekte ve Birleşmiş Milletler Teşkilatının uyuşturucu maddelerin kontrolü hususundaki yetkisini kabul etmektedir. Dünyanın, tıbbi ve bilimsel uyuşturucu madde ihtiyaçlarının karşılanması için; Birleşmiş Milletler Teşkilatı denetiminde yasal olarak aralarında Türkiye, Hindistan, Avustralya, Fransa, İspanya, Macaristan ve Slovakya ile son yıllarda Çin'inde bulunduğu yaklaşık 20 ülkede haşhaş ekimi yapılmaktadır. Bu ülkelerden Hindistan ve Çin'de haşhaş kapsülü çizilerek afyon sakızı üretilmektedir ve sadece Hindistan ham afyon sakızı ticareti yapmaktadır (BERNATH 1998). Hindistan başta USA olmak üzere çok sayıda avrupa ülkesine yılda 600 mt civarında ham afyon satışı yapmaktadır. Diğer ülkeler sadece kendi iç tüketimleri için ham afyon üretmektedirler. Aralarında Türkiye'nin de bulunduğu diğer ülkelerde üretim çizilmemiş haşhaş kapsülü şeklinde haşhaş sapı, tohumları ve yağı için değerlendirilmektedir. Avustralya, Fransa, İspanya, Suriye ve Türkiye uyutucu ham materyali ithal eden en önemli ülkeler arasında yer almaktadır (MANSFIELD 2002). Ancak, Hindistan dünyadaki en büyük afyon sakızı üreten ülkedir (BERNATH 1998). Ülkemiz Dünyada önemli haşhaş üretimi yapan ülkelerden birisidir. Toplam 30.000 ha. ekim yapılmakta olup morfin eşdeğerine göre uyuşturucu madde üretimi 52 tondur. Avustralya, Fransa, Hindistan, İspanya'dan sonra beşinci sırada yer almaktadır (INCB BM 2003).

Haşhaş, uzun yıllardır ülkemizde geleneksel olarak ekilmektedir. Tohumu iç piyasada yağ ve gıda olarak tüketilmekte olup ihraç edilen türleri pastacılıkta ve özel boya sanayisinde kullanılmaktadır. Kapsülleri TMO kontrolünde Afyon Bolvadin'deki fabrikada morfin elde edilmek üzere işlenmektedir. Ülkemiz, birçok kültür bitkisinin gen kaynağı olması ile birlikte, haşhaş bitkisinin de anavatanıdır. Bu bitkinin önemi özellikle 18. yüzyıldan itibaren hızla artmış, bugün endüstriyel ve stratejik bir bitki haline dönüşmüştür. Ülkemiz haşhaş tohumu ve haşhaş kapsülünden elde edilen alkaloidlerin ihracatında dünya ticaretinde önemli bir paya sahiptir. Ülkemizde 1971 yılına kadar haşhaş kapsülleri çizilerek afyon elde edilmiş ve afyon sakızı olarak ticareti yapılmıştır. 1974 yılından itibaren çizim yasağı ile birlikte kapsüllerden fabrika işlemesi ile alkaloid elde edilmesi yoluna gidilmiştir. 1981 yılından itibaren Afyon Alkaloidleri Fabrikası morfin üretimine başlamıştır (Arslan ve ark. 1986). Afyon Alkaloidleri Fabrikası yılda 20.000 ton haşhaş kapsülü işleyebilecek kapasitededir.

Ülkemizde haşhaş tohumu uyuşturucu madde içermediği için serbest piyasa şartlarında işlem görmektedir. Çiftçi için geleneksel değerini koruyan bu bitkinin tohumlarının serbest piyasa şartlarında yüksek fiyatlarla satılması ve ihracat olanağının olması haşhaş tohum üretimini vazgeçilmez kılmaktadır. Ülkemizde yıllara göre değişmekle beraber yılda 25.000 ton civarında haşhaş tohumu ihracatı gerçekleşmekte olup, bu ihracattan yılda 30 milyon \$ civarında döviz girdisi sağlanmaktadır (EKEN 2004). Dünya haşhaş tohum piyasasında özellikle beyaz ve gri haşhaş tohumları tercih edilirken, iç tüketimde sarı renkli haşhaş tohumları tercih edilmektedir. Genel olarak hem iç hem de dış piyasada yıllara göre değişmek ile beraber tohum rengi bakımından fiyat dalgalanmaları yaşanmaktadır. Ülkemizde haşhaş tarımı, Uluslararası 1961 TEK Sözleşmesine uygun olarak

hazırlanan Uyuşturucu Maddelerle ilgili 3298 sayılı Kanun ve Yönetmeliği çerçevesinde; lisansa tabii, kontrollü ve çizilmemiş haşhaş kapsülü üretimi şeklinde yapılmaktadır. Birleşmiş Milletler Teşkilatınca ülkemize verilen 700.000 dekar limit dahilinde haşhaş ekimi ve çizilmemiş haşhaş kapsülü üretimi yaptırılmaktadır. Haşhaş ekiminin kontrolü, haşhaş kapsülü, ham afyon ve tıbbi afyon üretimi, satın alınması, bunlardan uyuşturucu madde imalatı, yurt içinde satışı ve ihracı konularında, Bakanlar Kurulunun 13/04/1987 tarih, 87/11703 sayılı kararıyla Toprak Mahsulleri Ofisi Genel Müdürlüğü görevlendirilmiş olup, halen bu görev söz konusu kurumca yürütülmektedir. Haşhaş ekimi yapılacak il ve ilçeler ülkenin tarımsal ve ekonomik durumu, yurtiçi uyuşturucu madde ihtiyacı, mevcut stok durumu, Afyon Alkaloidleri Fabrikasının kapsül ihtiyacı, ihraç imkanları dikkate alınarak yapılan planlama çerçevesinde her yıl Bakanlar Kurulu Kararıyla belirlenmektedir. Tarih, 2004/7679 sayılı kararname ile 2004 yılı sonbaharından itibaren Afyon, Amasya, Burdur, Çorum, Denizli, Isparta, Kütahya, Tokat ve Uşak illerinin tamamı ile Balıkesir İli'nin Balya, Bigadiç, Dursunbey, İvrindi, Kepsut, Savaştepe ve Sındırgı İlçeleri, Eskişehir İli'nin Alpu, Beylikova, Çifteler, Günyüzü, Han, Mahmudiye, Mihaliççik, Seyitgazi, Sivrihisar ilçeleri, Konya ilinin Ahırılı, Akören, Akşehir, Beyşehir, Derbent, Doğanhisar, Hüyük, Ilgın, Kadınhanı, Seydişehir, Tuzlukçu, Yalınhüyük ve Yunak İlçeleri, Manisa İli'nin Merkez, Demirci, Gördes, Köprübaşı, Kula, Sarıgöl ve Selendi ilçelerinde izin belgesi karşılığında haşhaş ekimi ve çizilmemiş haşhaş kapsülü üretimine müsaade edilmektedir (ANONİM 2005). Üretilen haşhaş kapsülleri Bolvadin'de kurulu bulunan ve yıllık işleme kapasitesi 20.000 ton olan Afyon Alkaloidleri Fabrikasında işlenmektedir.

Halen ülkemizde ekilen haşhaş çeşitlerinin morfin oranları üretici şartlarında genellikle % 0.5-0.6 oranını geçememekte, bu da haşhaşta istenen bazı kalite özelliklerinin eksik olması anlamına gelmektedir. Mevcut kapsül üretiminin genelde az olduğu, üretilen kapsüllerdeki morfin oranı düşüklüğü nedeniyle fabrika randımanının düştüğü söylenmektedir. Bu nedenle kapsül ve tohum verimi yüksek olan, morfin oranı da %0.8-0.9'lar seviyesinde olan yeni hat ve çeşitlerin geliştirilmesi kaçınılmazdır (GÜMÜŞÇÜ 2001). Alkaloid üretimi; bitkinin genotipi ve çevre şartları tarafından kontrol edilmektedir. Alkaloid spektrumunda, bitki gelişimi süresince iklim faktörlerinin önemli etkisi bir çok araştırmacı tarafından kaydedilmiştir (BERNATH ve ark. 1988; GHIORGHITA ve ark. 1990). Agronomik karakterler olarak; morfin oranı için kalıtım tahminleri değişkendir ve çalışma şartlarında popülasyona bağlıdır. Hint (KHANNA ve SHUKLA 1986) ve Avrupa (MORICE ve LOUARN 1971; DUBEDOUT 1993) varyetelerinin morfin oranı bakımından orta derecede kalıtım tahminleri kaydedilmiştir. Haşhaş'ta iklim olaylarının morfin oluşumu üzerine ilişkileri araştırılmış; yüksek mıntıklarda Nisan-Ağustos periyodunda sıcaklığın düşmesiyle morfin oranının düştüğü, temmuz ayındaki fazla yağışın morfini minimuma düşürdüğü tespit edilmiştir. Morfin oranı kalıtımının intermediyer özellik gösterdiği belirlenmektedir. Tohum verimi ile morfin oranı, yağ verimi arasında önemli ve pozitif, tohum verimi ile yağ oranı arasında önemsiz, yağ verimi ve yağ oranı arasında önemsiz, yağ verimi ile morfin muhtevası arasında önemli ve pozitif ilişkilerin mevcut olduğunu bildirmektedir (VOSKERUSE 1960). Haşhaşta yağ içeriği için eklemeli gen etkisinin olduğu, morfin içeriği için eklemeli gen etkisinin olmadığı belirtilmektedir. Kalıtımın yağ içeriği için yüksek, morfin için düşük olduğu gerek yağ gerekse morfin için seleksiyonu sürdürmenin faydalı olacağı ifade edilmektedir (HLAVACKOVA 1973). Ekim sıklığı ve bitki başına kabuk veriminin, morfin verimiyle negatif korelasyon gösterdiği belirtilmektedir. Morfin oranıyla tohum veriminin genetik kontrolleri arasında bir ilişki bulunmadığı, morfin ve tohum yönünden Seleksiyon imkanının olduğunu kaydetmişlerdir (SIP ve SKORPIK 1981). Değişik gelişim devrelerinde hasat edilen haşhaş bitkilerinin muhtelif kısımlarındaki morfin oranı farklılık göstermektedir. Tam olum döneminde kapsüldeki; tepecikte % 0.8 ve kabukta % 0.58 morfin biriktiği kaydedilmiştir. Tohum renklerine göre morfin oranı bakımından sıralamanın; gri, kahve, pembe, sarı, beyaz şeklinde olduğu ifade edilmektedir (ARSLAN 1982). Haşhaşta verim ve verim potansiyelini belirleyen unsurlar üzerinde yapılan bir çok çalışmada karakterlerin kontrollerinin kompleks olduğu ve bazı karakterlerin eklemeli gen etkisi ile ortaya çıktığı gözlenmiştir. SAINI ve KAICHER (1987) farklı popülasyonlarda, bitki boyu, çiçeklenme gün sayısı, kapsül sayısı ve ağırlığı, tohum ve afyon verimi gibi ekonomik öneme sahip agro morfolojik karakterlerin genetik varyasyonlarını çalışmışlardır. Birçok araştırmacı bitkinin bir çok karakterinin genetik kontrolünde eklemeli varyansın etkin olduğunu belirtmişlerdir (KANDALKAR ve ark. 1992; SHUKLA 1992). KHANNA ve SHUKLA (1988) ayrıca haşhaşta 10 seçilmiş varyete arasında yapılan diallel melezlerde agro-morfolojik karakterlerin eklemeli etkiler tarafından kontrol edildiğini bulmuştur. Çalışılan popülasyona bağlı olmakla birlikte, bitki boyu ve tohum ağırlığının kalıtımında dominans ve yüksek dominans görülmüştür (HLAVACKOVA 1978). SHUKLA ve KHANNA (1992) erkencilik için eklemeli olmayan bir gen etkisi bulmuşlardır. Haşhaşın kapsül büyüklüğü ve şekli, çeşit ve orijine bağlı olarak geniş varyasyon gösterir. Genişliğinin boyuna oranına göre (kapsül indeksi) 5 farklı grup karakterize edilmiştir. Bunlar oval, geniş oval, fıçimsı, düz ve konik'dir. İlk iki çeşit daha çok Hint varyetelerinde, son üçü de genelde Avrupa haşhaş çeşitlerinde görülmektedir. Kapsül şeklinin coğrafi dağılışı ve tohum verimiyle de ilgili olduğu görülmektedir (VESELOVSKAYA 1976). Anadolu haşhaş varyetelerinde tohum ve afyon verimleri, morfin ve yağ

muhtevası üzerinde yapılan çalışmada da tohum verimiyle; kapsül çapı, kapsül uzunluğu arasında pozitif, kapsül indeksi arasında negatif korelasyon tespit edilmiştir. Pussuz ve az puslu kapsüle sahip çeşitlerin afyonlarında morfin oranının daha yüksek olduğu, pussuzluğa daha ziyade beyaz çiçekli çeşitlerde rastlandığı, bu karakterlerin kalıtsal olduğunu belirtilmektedir (İNCEKARA 1949).

Ülkemizde haşhaş ıslah çalışmaları Anadolu Tarımsal Araştırma Enstitüsü (ATAE) ve Toprak Mahsulleri Ofisi tarafından yürütülmektedir. Ayrıca, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi'nde de Prof. Dr. Neşet ARSLAN önderliğinde haşhaş ıslah çalışmaları yapılmaktadır. Bu çalışmalarda kapsül ve tohum verimi, morfin ve tebain içeriği yüksek, hastalık, zararlılara ve soğuğa dayanıklı çeşitleri geliştirmek hedeflenmiştir. ATAEE başlangıçta; yurt içinde haşhaş ekimi yapılan yerlerden, Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Gen Bankası gibi kaynaklarla uluslararası kaynaklardan materyal toplanarak germplazm oluşturulmuştur. Bu aşamadan sonra ıslah amaçları doğrultusunda materyal gözden geçirilmiş ve değerlendirilmiştir. 2500'den fazla değişik düzeylerde (gözlem bahçeleri, ön verim ve verim denemeleri ) materyal test edilmiştir. Bu çalışmalar sonucunda 1985–1990 yılları arasında yapılan ıslah çalışmalarının hedefi olan % 0.5 morfin oranı yakalanmış ve 1995 yılında %0.5'in üzerinde morfin ihtiva eden iki çeşit Kemer kaya-95 ve Anayurt-95 isimleriyle tescil ettirilmiştir. Geçmiş yıllarda yürütülen çalışmalara ilave olarak, enstitüde 1992 yılında melezleme çalışmalarına başlanmış olup, deneme materyali olarak 1985–1990 yılları arasında yurt içi, yurt dışı kaynaklardan temin edilen 3000 civarındaki hat kullanılmıştır. Islah Metodu olarak ise modifiye bulk metodu kullanılmıştır. 2000 yılında kuruluş mevcut genetik varyasyonu artırmak üzere mutasyon ıslah çalışmalarına başlamıştır. Enstitü, 2003 yılında mevcut tescilli standart çeşitlerden morfin içeriği bakımından yüksek iki çeşit adayını (85014.3.1 ve 85072.3.4) ve 2 tane morfin ve tebain bakımından yüksek olan hatlar Tohumluk Tescil ve Sertifikasyon Merkezi Müdürlüğüne göndermiştir. Ankara Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü haşhaş ıslah çalışmalarını 1986–1997 yılları arasında yürütmüş olup bu kuruluş tarafından Ankara-94, Şuhut-94, Afyon Kalesi-95, Camcı-95, Kocatepe-96, Karahisar-96 çeşitleri tescil edilmiştir. Bu çeşitlerin tohumluklarının üretimi ve muhafazası Anadolu Tarımsal Araştırma Enstitüsünde sürdürülmektedir. 1997-2004 yılları arasında Ankara Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsündeki mevcut çalışmalar ve materyal Afyon Kocatepe Araştırma Enstitüsüne devredilmiştir. Bu kuruluşta yıllara göre alkaloidlere gösterilen talep göz önüne alınarak 1996 yılından itibaren kültür haşhaşlarında tebain içeriğini belirlemeye yönelik ıslah çalışmaları başlatılmıştır. 2004 yılında bu enstitünün kapatılması ile tüm genetik materyal Anadolu Tarımsal Araştırma Enstitüsünde değerlendirilmeye alınmıştır.

Haşhaş bitkisi ile yapılan moleküler düzeydeki çalışmalar diğer ürünlerle kıyaslandığında oldukça sınırlıdır ve bu ürün için geliştirilen genomik araçlar oldukça az düzeydedir. Bu ürün için şu ana kadar geliştirilen ve RAPD ve AFLP işaretleyicilerine dayalı tek bir moleküler genetik bağlantı haritası vardır. Bu çalışmada yüksek morfinli bir macar çeşiti olan *Papaver somniferum* var. Cosmos ile düşük morfinli bir hat melezlenmiş ve türü bir F2 populasyonu oluşturulmuştur. Altı morfolojik özelliğin açılımı bitkisel gelişiminin vegetatif aşamasında ve hatta hasat edilmiş kapsüllerde tespit edilmiştir. 77'si AFLP ve 48'i RAPD işaretleyicisi olmak üzere toplam 125 moleküler işaretleyici belirlenmiştir. Polimorfik bulunan 87 işaretleyici (%66) populasyonda uygulanmış ve 16 bağlantı grubu oluşturulmuştur (STRAKA ve NOTHNOPEL 2002). Şimdiye kadar sadece bir morfolojik işaretleyici (NS) bağlantı gruplarında lokalize edilmiştir. Haşhaş bitkisinin haploid kromozom sayısının 11 (n=11) olduğu göz önünde bulundurulduğunda mevcut haritanın haşhaş genomunu tam olarak yansıtmadığı ve düşük çözünürlükte bir harita olduğu anlaşılmaktadır. Bu çalışmaya ilaveten haşhaş germplazmlarında genetik çeşitlilik ile ilgili çalışmalar mevcuttur. CAROLAN ve ark. (2006) tarafından yapılan çalışmada plastid ve nuclear ribosomal sekanzlar'ından elde edilen nükleotid sekanzlar kıyaslanarak *Papaver* ve yakın akraba genera'lar içerisindeki filogenetik ilişkiler incelenmiştir. Bu çalışma için iki moleküler bölge kullanılmıştır. Bu bölgeler arasında (1) hücre içi transkript edilmiş ara bölge (ITS) 18S-26S nükleer ribosomal DNA (BALDWIN ve ark. 1995) ve (2) plastid *trnL* intronu ve *trnF* intergenik ara bölge DNA (TABERLET ve ark. 1991) yer almaktadır. Nükleer ve plastid sekanzlarının yanısıra RFLP, RAPD ve AFLP gibi diğer moleküler işaretleyicilerde genetik çeşitlilik belirleme çalışmalarında kullanılmıştır. KADEREIT ve ark. (1997) dört cinse (*Papaver*, *Roemeria*, *Stylomecon* ve *Meconopsis*) ait 32 tür kullanarak kloroplast *trnK* ve *matK* genleri ile yaptıkları RFLP analizinde *Papaveraceae* ailesi içerisinde çoğunluğu eski dünya (asya ve avrupa) ülkelerinde geniş yayılım gösteren bu cinslerin monofiletik bir clade oluşturduklarını belirlemişlerdir. SHOYAMA ve ark. (1998) *Papaver* türleri arasındaki genetik analizlerin belirlenmesinde RAPD işaretleyicilerini kullanmışlardır. Bu çalışmada *P. pseudo-orientale* ve *P. bracteatum* arasında yapılan melezlemede elde edilen F1'in gerçek hibrit olduğu gösterilmiştir. RAPD işaretleyicileri kullanılarak yapılan diğer bir çalışmada PARMAKSIZ ve ark. (2004) *Papaver* cinsi *oxytona* seksiyonunun Türkiye'de yetişen türlerinde genetik çeşitliliği belirlemişlerdir. CAROLAN ve ark. (2002) AFLP tekniğini kullanarak *Papaver Oxytona* seksiyonu içerisinde yer alan türler arasındaki

genetik varyasyonu belirlemişlerdir. Benzer şekilde SAUNDERS ve ark. (2001) değişik bölgelerden temin ettikleri 40 adet *Papaver somniferum* tohum örnekleri içerisindeki gene havuzlarını ayırt etmek amacıyla AFLP analizi yapmışlardır ve bu tekniğin haşhaş çeşitlerini ayırt etmede kullanılabilecek potansiyel bir genetik işaretleyici sistemi olduğunu belirtmişlerdir. Haşhaş bitkisinde bu çalışmalar dışında herhangi bir karakterin haritalanmasına yönelik bir çalışma bulunmamaktadır. Halbuki ekonomik öneme sahip diğer bitkilerde değişik moleküler teknolojiler genetik haritalama ve moleküler islah çalışmalarında rutin olarak kullanılmaktadır.

Agronomik ve evcilleştirmede rol oynayan çoğu kompleks karakterler için yapılan önceki çalışmalarda fenotipik varyasyonun çok sayıda kantitatif karakter lokuslarından (QTL), bu lokusların birbirleriyle olan ilişkilerinden, çevresel faktörlerden ve QTL x çevre ilişkilerinden etkilendiği gösterilmiştir. Bağlantı analizleri (linkage analysis) ve ilişkilendirme haritalaması (association mapping) kompleks karakterlerin ortaya çıkarılmasında en genel olarak kullanılan genomik araçlardır (ZHU ve ark. 2008). Haritalama popülasyonunu oluştururken meydana gelen rekombinasyon sayısının sınırlı sayıda olmasından dolayı klasik bağlantı analizleri ile tipik olarak bir kantitatif karakter lokusu (QTL) 10-20 cM aralarda lokalize edilebilmektedir (DOERGE 2002; HOLLAND 2007). Geçen son 20 yıl içerisinde çok sayıda bitki türünde yüzlerce bağlantı analizi çalışmaları yürütülmüş olmasına rağmen belirlenmiş QTL lokuslarından sadece çok sınırlı sayıda klonlanabilmiştir (PRICE 2006). Son zamanlarda, ilişkilendirme haritalama metodu (association mapping) ile doğal popülasyonlar kompleks karakterlerin incelenmesinde yoğun bir şekilde kullanılmaya başlanmıştır (ERSOZ ve ark. 2008). İlişkilendirme haritalaması (LD = Bağlantı disequilibrium olarakta bilinmektedir) kantitatif karakter lokuslarının belirlenmesinde kullanılabilecek oldukça yeni ve ümitvar bir genetik yöntem olarak ortaya çıkmıştır. İlişkilendirme haritalama metodu (LD haritalaması) popülasyon seviyesinde tarihsel rekombinasyon olaylarını ortaya koyarak daha yüksek çözünürlükte haritalama imkanı sağlamaktadır (NORDBORG ve TAVARE 2002). Bağlantı disequilibrium konsepti (LD) üzerine dayanan ilişkilendirme haritalama yöntemi ile bir popülasyon içerisindeki atasal rekombinasyonları ve doğal genetik varyasyonu kullanarak kantitatif karakter lokuslarını belirlenebilmek mümkündür (GEIRINGER 1944; LEWONTIN ve KOJIMA 1960). Klasik bağlantı analizlerine yeni bir alternatif olarak, ilişkilendirme haritalaması artan haritalama çözünürlüğü, daha kısa sürede araştırma imkanı ve daha çok sayıda allel ile çalışma imkanı gibi üç avantaj sunmaktadır (YU ve BUCKLER 2006). Klasik bağlantı analizlerine dayalı haritalama çalışmaları çok iyi karakterize edilmiş pedigrilerde ( $F_2$ ,  $BC_1$ , Double Haploid, RIL) bir fenotip ve bir genotip arasındaki tesadüf olmayan ilişkileri belirlemeye çalışırken, ilişkilendirme haritalaması (LD) popülasyon içerisinde birbiriyle genetik bir geçmişi olmayan bireyler içerisindeki ilişkilere odaklanır ve daha geniş kapsamlı germlazm içeriğindeki fonksiyonel varyasyonu araştırır (ZHU ve ark. 2008). Genelde, bir popülasyon içerisinde ilişkisi olmayan bireylerden örneklenen kromozomlarda klasik pedigril üyelerinden örneklenen kromozomlara göre çok daha uzak akraba ilişkileri bulunacaktır. Bu durum LD haritalamasını yüksek ölçek haritalama çalışmaları için daha uygun kılmaktadır. Bu şekilde bir kaç generasyon boyunca çok sayıda allel arasında rekombinasyonun gerçekleşmesi için daha fazla fırsatlar oluşacaktır. Buna karşın pedigrilli popülasyonlarda sadece bir kaç generasyonluk rekombinasyonlar mevcut bulunacaktır. Rekombinasyon oranındaki artış kromozom segmentlerini karıştırıp yeniden karacağı için çok küçük parçalara bölünmesine sebep olacaktır. Bu durum lokus etrafındaki kısa mesafede LD'nin azalmasına ve lokusla fiziki olarak yaklaşmasına ve bunun bir sonucu olarak yüksek çözünürlüğe sebep olacaktır (ERSOZ ve ark. 2008). Bağlantı disequilibriumun (LD) tahmininde genel olarak  $r^2$  türünden istatistikler kullanılmaktadır (HEDRICK 1987) ve  $r^2$  değeri bir çift lokus arasındaki tesadüf olmayan ilişkilerin derecesini veya iki lokustaki allellerin birlikte bulunma seviyelerini açıklamaktadır (HILL ve ROBERTSON 1968).  $r^2$  sıfır olduğunda, iki lokustaki alleller tesadüf örneklenmeden beklenen seviyeden daha sıklıkta birlikte bulunmazlar. İki lokus arasındaki alleller popülasyon içerisinde daha sıklıkta birlikte bulunmaları durumunda  $r^2$  maksimum değeri olan 1'e ulaşır. İlişkilendirme haritalaması LD istatistiğinin ikili ölçümleme özelliklerini bir marker lokusun lokalize olduğu kromozom bölgesinde yer alan bir fenotiple ilişkisinin tahmini değerini yorumlamada kullanır. Bir işaretleyici etrafında yer alan yüksel LD'li kromozom bölgesi belirgin bir genetik işaretleyicinin tahmini uzaklığını tanımlamaktadır. Bu genomik sınır içerisindeki LD tam ise, bu genomik sınır içerisinde herhangi bir polimorfizm bir fenotiple ilişkili olmak için aynı tahmini değere sahiptir. Dolayısıyla, önemli işaretleyici-fenotip ilişkisinin bir sonucu olarak, ortaya çıkan polimorfizm, işaretleyici lokus etrafında yüksek LD'li bölge ile aynı yerde lokalize olduğu sonucuna varılmaktadır. Son zamanlarda, çok sayıda karakter için LD ve ilişkilendirme haritalaması ile ilgili çalışmalar değişik bitki türlerinde yapılmıştır. Bu ürünler arasında mısır (çiçeklenme zamanı için THORNSBERRY ve ark. 2001; ANDERSEN ve ark. 2005; SALVI 2007; dane içeriği için WILSON ve ark. 2004; Maysin sentezlenmesi için SZALMA ve ark. 2005; Dane rengi için PALAISA ve ark. 2004; Dane tadı için TRACY ve ark. 2006; Oleik asit içeriği için BELO ve ark. 2008; Karotenoid içeriği için HARJES ve ark. 2008), Arabidopsis (çiçeklenme zamanı için OLSEN ve ark. 2004; hastalığa dayanıklılık için ARANZANA ve ark. 2005; sürgün dallanması için EHRENREICH ve ark. 2007), sorgum (dane

büyüklüğü ve kalitesi için CASO ve ark. 2008; hastalığa dayanıklılık için KRAAKMAN ve ark. 2006), buğday (dane büyüklüğü ve hamur kalitesi için BRESEGHETTO ve SORRELS 2006), arpa (başaklanma gün sayısı, hastalıklara dayanıklılık için KRAAKMAN ve ark. 2006), patates (geç yanıklık hastalığı için MALOSETTI ve ark. 2007), çeltik (verim ve verim komponentleri için AGRAMA ve ark. 2007; nişasta kalitesi için BAO ve ark. 2006), Şeker kamışı (hastalığa dayanıklılık için WEI ve ark. 2006), domates (meyve kalite karakterleri için CAUSSE ve ark. 2008) yer almaktadır. Bu bilinen örnek çalışmaların yanısıra yine aynı türlerde diğer önemli biyolojik ve agronomik karakterler için LD haritalama çalışmaları yürütülmektedir. Şuana kadar, bilgimiz dahilinde, haşhaş türlerini konu alan herhangi bir karakter için LD çalışması yayınlanmamıştır. Önerilen bu projede haşhaş (*Papaver somniferum*) için çok geniş boyutlu LD haritalaması yapılmasında planlanmaktadır.

Haşhaş bitkisinin kapsüllerinden başlıca morfin ve diğer alkaloidler elde edilmektedir. Dünyada önemli Haşhaş üreticisi ülkelerde yapılan ıslah çalışmaları ile kapsüldeki morfin ve diğer alkaloidlerin oranı önemli derecede artırılmış durumdadır. Ülkemizde diğer ülkeler ile rekabet edebilmesi için haşhaştaki morfin, tebain, noskabin ve diğer alkaloidlerin oranının artırılması gerekmektedir. Melezleme ve mutasyon ıslah metotları ile yapılan çalışmaların, moleküler genetik analizler ile desteklenmesi sonucunda daha etkili sonuçlar alınabilecektir. Ayrıca Haşhaş tohumunun ekonomik değeri kapsül geliri ile başa baş olmakta, çoğu zaman da kapsüldeki alkaloid gelirlerinden daha önemli duruma geçmektedir. Aynı şekilde Haşhaş tohumunun verim ve kalitesini arttırmak için yapılmakta olan melezleme ve mutasyon ıslahı çalışmalarının moleküler genetik analizler ile desteklenmesi ayrıca önem arz etmektedir.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Bitkisel Materyaller

Bu çalışmada, Türkiye'de geniş ölçüde yetiştirilen başlıca haşhaş çeşitleri ve değişik bölgelerimizden toplanmış bulunan haşhaş gen kaynakları Anadolu Tarımsal Araştırma Enstitüsü tarafından temin edilmiştir ve 125 adet haşhaş tohum örneğinden meydana gelen bu doğal populasyonlar genetik çeşitlilik analizlerinin yapılmasında kullanılmıştır. Ayrıca, çalışmada kullanılacak *Papaver somniferum* türü yanısıra birkaç yabancı türe ait tohum örnekleri USDA Gen Bankasından temin edilmiş olup grup dışı örnekleri temsil etmek üzere incelenmiştir. Bu yabancı türler arasında *Papaver bracteatum* ve *Papaver somniferum* ssp. *setigerum* yer alacaktır. Moleküler genetik haritalama populasyonu olarak Anadolu Tarımsal Araştırma Enstitüsü tarafından geliştirilen *Papaver somniferum* var. Kemer kaya 95 x *Papaver somniferum* var. 1061 hatlarının melezlenmesiyle elde edilmiş ve 100 adet bitkiden oluşan bir F<sub>2</sub> populasyonu kullanılmıştır. Bu populasyonun oluşturulmasında Kemer kaya 95 çeşiti ana ebeveyn olarak kullanılmıştır. Kemer kaya 95 çeşiti Türkiye yerel haşhaş populasyonundan seleksiyon metodu ile geliştirilmiştir ve 1995 yılında Anadolu Tarımsal Araştırma Enstitüsü tarafından tescil ettirilmiştir. Kemer kaya 95 çeşiti tohum rengi sarı, iri kapsüllü, tohum ve kapsül verimi yüksek, kapsüldeki morfin oranı %0,4-0,5 düzeyinde ve soğuğa mukavemeti iyi olan bir çeşittir. Haritalama populasyonunun oluşturulmasında baba ebeveyn olarak kullanılan 1061 nolu hat sarı tohum renkli, kapsülleri orta büyüklükte, tohum ve kapsül verimi orta düzeyde, kapsüldeki morfin oranı % 0,7-0,8 düzeyinde ve soğuğa mukavemeti iyi olan bir hattır. Bu hat Ankara Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü tarafından melezleme metodu ile geliştirilmiş olup morfin düzeyi yüksek bir hattır.

#### 3.2. Morfolojik Karakterizasyon

##### 3.2.1. Çiçek rengi

Haşhaş bitkisinde genelde beyaz ve viyole çiçek renkleri görülmektedir. Ancak, yabancı dölleme sonucunda özellikle viyole renkli çiçeklerde ton farklılıkları olabilmektedir ve taç yaprakların taban kısmında koyu bir benek bulunmaktadır. Beyaz çiçeklerde de viyole çiçeklerden toz aldıktan sonra taç yapraklarının taban kısmında viyole benekler gözlenmektedir. Bu çalışmada, tüm çiçek renkleri her bir parsel için belirlenmiştir. Böylece denemeler sırasında yabancı tozlanma nedeni ile hatlarda bozulmaların olup olmadığı kontrol edilmiştir.

### **3.2.2. Pusululuk**

Kapsüllerin üzerinde bir mumsu tabakanın olup olmayışı genotipe bağlı bir özelliktir ve pusululuk özelliği kapsül yeşilken ve olgunlaştıktan sonra rahatça görülmektedir. Pusululuk özellikleri kapsüller çizim olgunluğuna geldikleri dönemde kaydedilmiştir.

### **3.2.3. Tohum Rengi**

Tohum rengi genotipe bağlıdır ve çevre etkilerine göre değişiklik göstermesi nedeni ile çalışmada kullanılmış ve bu özellikleri daha önceden belirlenmiş olan hatlarda açılma olup olmadığı kontrol edilmiştir.

### **3.2.4. Bitki Boyu (cm)**

Parselden tesadüfi olarak seçilen 10 bitkide kök boğazından ana kapsülün bağlandığı yere kadar olan mesafe metre ile ölçülerek tespit edilmiştir.

### **3.2.5. Bitki Başına Kapsül Sayısı (adet)**

Parsellerden tesadüfi olarak seçilmiş olan 10 bitkinin kapsülleri sayılarak bitki sayısına bölünerek bulunmuştur.

### **3.2.6. Kapsülde Tepecik Sayısı (adet)**

Haşhaş kapsüllerinin stigma parçalı bir durumda olup, stigma ışınlarının her biri kapsül içerisindeki plasentaya karşılık gelmektedir. Kapsül plasenta sayısını belirlemek için kapsüldeki tepecik sayısının sayılması ile belirlenmiştir.

### **3.2.7. Kapsül uzunluğu (cm)**

Her parselden tesadüfi olarak seçilen 10 bitkinin ana kapsüllerinde, sapın sona erdiği en üst boğum ile stiğmanın en üst noktası arası kumpas ile ölçülerek bulunmuştur.

### **3.2.8. Kapsül Genişliği (cm)**

Parsellerden seçilmiş olan bitkilerin ana kapsüllerindeki kapsülün en geniş kısmı kumpas ile ölçülerek hesaplanacaktır.

### **3.2.9. Kapsül İndeksi**

Parsellerden seçilmiş olan 10 bitkinin ana kapsüllerinde ölçülen kapsül uzunluğu değerinin kapsül genişliğini değerine bölünmesi ile bulunmuştur.

### **3.2.10. Dekara Kapsül ve Tohum Verimi (kg/da)**

Parsellerdeki tüm bitkilere ait kapsüller toplanarak tartılmıştır. Bu kapsüllerin tohumları çıkarıldıktan sonra tohum ve kapsülleri ayrı ayrı tartılarak parsel verimleri bulunmuştur. Bu değerden yararlanarak ise dekara verim hesaplanmıştır.

### **3.2.11. Haşhaş'taki Alkaloidleri Analizi**

Haşhaş materyallerindeki alkaloidlerin analizi için HPLC yöntemi kullanılmıştır. Öncelikle bu analizler için örnek kapsüller parçalanmış, havanda dövülerek ve 0,5 mm elekli değirmende öğütülmüştür. 0.5 mm büyüklüğünde öğütülmüş örnekler 100 ml'ye seyreltmek için 0,5 gr tartılmıştır. Cam havanlara konulan örnekler 10-15 dakika süreyle ıslatılmış ve üzerine Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (Aliminyum Oksit) konularak karıştırılmıştır. Islatılmış olan numuneler tüpler içerisine boşaltılmış ve damlatılarak süzülmesi sağlanmıştır. Örnekler üzerine 100 ml oluncaya kadar su ilave edilmiştir. Bu işlem yaklaşık 2 saat

sürmüştür. Balon jojedeki solüsyon karıştırılarak saklama kaplarına alınmıştır. Buradan da HPLC cihazı içindeki ölçüm kaplarına konmuştur. Morfin analizi için 4,1 gr sodyum asetat tartılarak suda çözülmüştür. Daha sonra, elde edilen hacim su ile 1 lt ye tamamlanmıştır. Glasiyal asetik asit PH 3,6'ya ayarlanıp 15 ml etanol, 15 ml tetra hidrofuran, 75 ml asetonitril ilave edilmiştir. Bu şekilde hazırlanan örnekler mobil faz HPLC cihazında morfin analizinde kullanılmıştır. Tebain analizi için 775 ml su, 220 asetonitril, 5 ml triflora asetik asit ile hazırlanmış olan tampon çözeltisi kullanılmıştır.

### 3.3. Moleküler Genetik Analizler

Öncelikle ulusal haşhaş gen kaynakları Anadolu Tarımsal Araştırma Enstitüsü'nden temin edildikten sonra muhtemel tohum karışımlarından kaynaklanacak problemleri çözmek üzere ilk yıl süre ile Anadolu Tarımsal Araştırma Enstitüsü deneme tarlalarında her bir tohum örneğinden 20 tohum ekilmiş ve elde edilen her bir bitki tek tek kendilenmiştir. Tip dışı görünen bitkiler uzaklaştırılmıştır. Proje kapsamında yapılan genetik çeşitlilik belirleme çalışmalarında kendilenmiş bitkilerden elde edilen tohumlar kullanılmıştır. Dolayısıyla, çalışmada kullanılan hatlar genetik olarak homogenous hatlar olduğu için her bir hattın en az 10 bitki yetiştirilmiş ve bu hatlardan fenotipik veriler (agro-morfolojik ve alkaloid içerikleri) toplanmıştır. Ayrıca, DNA izolasyonu için yaprak örnekleri birlikte toplanarak havuz yapılmıştır. Haşhaş tohum örnekleri ve F2 haritalama populasyonundan DNA izolasyonu için Promega Wizard Genomic DNA Purification Kiti kullanılmış. Genotipik profillemeye işlemi için CAP (Parçalanmış Çoğaltılmış Polimorfizmi), SSR (Basit Dizi Tekrarları), AFLP (Çoğaltılmış Parça Uzunluğu Polimorfizmi) gibi çeşitli markör sistemleri uygulanmıştır. CAP ve SSR markörleri proje kapsamında geliştirilmiştir. Bu markör sistemleri genetik çeşitlilik analizlerinde ve bağlantı analizleri ile LD (association mapping) haritalamasında kullanılmıştır. Genotipik profillemeye analizleri için kullanılmış olan moleküler markör sistemleri PCR'a dayalı sistemlerdir. CAPs işaretleyicilerinin geliştirilmesi için NCBI (National Center for Biotechnology Information) databaselerinde mevcut bulunan haşhaş spesifik 133 nukleotid sekanzi kullanılmıştır. Bu sekanzlar SSR tekrarı taşımadığı için primer dizayn edilmesinde kullanılmamıştır. Bu diziler BatchPrimer3 (<http://probes.pw.usda.gov/cgi-bin/batchprimer3/batchprimer3.cgi>) programı kullanılarak generik primerler bakımından taranmıştır. CAPs işaretleyicilerinin PCR analizleri için toplam 25 ul reaksiyon karışımı kullanılmış olup reaksiyon karışımı içerisinde 50 ng kalıp DNA, 1 pmol ileri (forward) ve geri (reverse) primerler, 1x PCR tamponu, 0.2 mM dNTPs ve 0.5 U Taq polimerase içermiştir. PCR ürünleri belirtilen programla çoğaltılmıştır: başlangıç DNA denatürasyonu için 94°C'de 5 dakika; denatürasyon için 94°C'de 45 saniye; tavlama (annealing) reaksiyonu için 55°C'de (primerlere göre bu sıcaklık dereceleri değişiklik gösterebilmektedir) 45 saniye ve uzama için 72°C'de 45 saniye (35 döngü olmak üzere); son uzama 72°C'de 10 dakika ve 4°C'de tutmayı içermiştir. CAPs markörleri için gerekli olduğu için polimorfizmi belirlemek üzere elde edilen PCR ürünleri restriksiyon enzimleri ile kesilmiştir. DNA parçaları %2'lik agaroz jel ile elektroforezde ayrıştırılmıştır. CAPs markörleri sadece F<sub>2</sub> hatlarının haritalanmasında kullanılmıştır. Haşhaş gen kaynaklarının genotiplenmesi için CAPs markörleri uygun değildir. Bu amaç için SSR ve AFLP markörleri kullanılmıştır.

#### 3.3.1. EST-SSR Geliştirilmesi

SSR markörlerinin geliştirilmesi için NCBI (National Center for Biotechnology Information) veri bankalarında mevcut bulunan haşhaş spesifik yaklaşık 30.000 EST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=3465>) dizisi kullanılmıştır. Veri tabanından indirilen EST dizilerindeki klonlama vektörü, adaptör, linker ve primer dizilerinden kalıntılar olabileceği için öncelikle SeqClean (<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/>) bilgisayar programı kullanılarak sözü konusu potansiyel kirlilikler temizlenmiştir. SeqClean programı tarafından vektör dizilerinin temizlenmesinde kullanılan referans vektör dizileri NCBI ([http://ftp.ncbi.nih.gov/pub/ UniVec/Univec](http://ftp.ncbi.nih.gov/pub/UniVec/Univec), 11 Ağustos 2010 versiyonu) veritabanından indirilmiştir. İlâveten, Roche 454 pyro-sekanslama cihazı için kullanılan muhtemel adaptör ve linker dizileri de SeqClean programı için ek veritabanı olarak kullanılmıştır. SeqClean programının parametreleri EST dizileri içindeki faydalı olabilecek poly(A)/(T) dizilerini de uzaklaştırmamak üzere ayarlanmıştır (MORIN ve ark. 2008). NCBI BLAST (ZHANG ve ark. 2000) programı kullanılarak vektör dizilerinin ne kadar başarılı bir şekilde uzaklaştırıldığı test edilmiştir. Verilerin bir araya getirilmesi ve ontoloji analizleri için poly(A)/(T) kuyruk dizileri ön işleme tabii tutulmuştur. Bu amaç için, EST dizileri içindeki poly(A)/(T) dizileri MIRA bilgisayar programı ile bir araya getirilirken baskılanmıştır (CHEVREUX ve ark. 2004). Bir araya getirme ve birbirinin aynı olan EST dizilerinin temizlenmesinden sonra, EST dizilerinin fonksiyonların belirlenmesinde kullanılan ontolojik analizler için Blast2Go programı kullanılmıştır (CONESA ve ark. 2005). BatchPrimer3 programı bir araya getirilen ve birbirinin tekrarı olan EST dizilerinin yukarıda belirtildiği gibi ayıklanmasından sonra SSR motiflerinin belirlenmesinde ve bu bölgelerin çoğaltılması için PCR primerlerinin dizayn edilmesinde kullanılmıştır (YOU ve ark. 2008). En uygun primerleri belirlemek üzere programın

kurulum ayarlarında bazı düzeltmeler yapılmıştır. Bu düzeltmeler: ürün uzunluğu 100-300 bp, optimum 150 bp; primer uzunluğu 18-27 nt, optimum 21 nt; primer Tm 50–60°C, optimum 55°C; primer GC içeriği 40–60%, optimum 50%. Bu parametreler kullanılarak dizayn edilen EST-SSR primerlerinden 67 tanesi genetik çeşitlilik analizlerinde kullanılmıştır. EST-SSR primerleri kullanılarak yapılan PCR analizleri için hazırlanan karışım; 8 pmol ters ve M13-işaretli primer ve 2 pmol düz primer, 25 ul toplam hacimde 2.5 ul 10x PCR tamponu, 0.2 mM dNTP karışımı, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 50-100ng kalıp DNA ve 1 U Taq DNA polimeraz içerecek şekilde hazırlanmıştır. EST-SSR PCR amplifikasyonu için aşağıdaki protokol kullanılmıştır: 94 °C'de 5 dakika ön denatürasyon, 94 °C'de 30 saniye denatürasyon, tavlama (annealing) 50 °C'de 1 dakika ve uzama 72 °C'de 1 dakika (35 döngü), son uzama 72 °C de 5 dakika olarak ve 4°C' tutmayı içermiştir. Elde edilen PCR ürünleri 2 µl mavi boya ile karıştırıldıktan sonra her bir örnek TAE buffer ile hazırlanmış %3 metaphor agarose jelde 120 mA de en az 4 saat yürütülmüştür. Ethidium bromide eklenen agaroz jeller elektroforez işleminden sonra jel dokümantasyon sisteminde görüntülenmiştir. Bu yolla görüntülenemeyen PCR ürünleri için kapillar elektroforez cihazı kullanılmıştır (Qiagell, QIAGEN). Bu yolla da ayrıştırılamayan EST-SSR PCR ürünleri için DNA Analiz sistemi (BECKMAN CEQ™8800) kullanılmıştır. Bu çalışma için EST-SSR primerleri Beckman Well Red boyasıyla işaretlenmiştir. Bu amaç için SSR primer çiftinden ileri primer (forward) 5' ucuna M13 dizisi eklenmiştir (TGAAAACGACGGCCAGT). Normal uygulamada, her bir primer için işaretleme gerektirmektedir. Ancak, bu şekilde masraflar çok artacağı için her bir SSR primerine M13 dizisi eklenmiş ve böylece daha uzun forward primer sentezlenmiştir. Böylece, sadece M13 primeri işaretlendiği için diğer primerlerin işaretlenmesine gerek kalmamıştır. M13 eklenmiş ve Beckman WellRed boyasıyla işaretlenen primerler Sigma-Proligo tarafından sentezlenmiştir. Bu sistem kullanılarak yapılan PCR çalışmaları için en uygun şartlar denemelerle belirlenmiştir. Bu sistemin kullanılması için özel bir PCR amplifikasyon protokolü uygulanmıştır. PCR karışımı içerisinde: 0.75 µl ileri (0.8 µM stok solüsyonu), 0.75 µl geri (3.2 µM stok solüsyonu) ve 0.75 µl M13 primerleri ile birlikte 2 µl 10X PCR buffer, 0.4 µl dNTP (10mM), 0.2 µl Taq DNA polimeraz enzimi, 13.15 µl ddH<sub>2</sub>O ve yaklaşık olarak 50 ile 100 ng lik 2 µl kalıp DNA yer almıştır. Bu çalışmada PCR profili: ilk 27 döngü için: 94 °C de 5 dakika ön denatürasyon, 94 °C de 30 saniye denatürasyon, 56 °C de 45 saniye tavlama (annealing) ve son uzama için 72 °C de 45 saniye ve daha sonra son bir 8 döngü için: 94 °C de 30 denatürasyon, 53 °C de 45 saniye tavlama ve 72 °C de 45 saniye uzama, daha sonra ürün en son uzama için 72 °C de 10 dakika şeklinde uygulanmıştır. Örnekler Beckman-Coulter CEQ™8800 Genetic Analysis Systemine yüklenmeden önce SLS örnek yükleme solüsyonu ile 1:10 oranında seyreltilmiştir. Her bir örnek 3 µl PCR ürünü 27 µl SLS solüsyonu ve 0.5 µl 600 bp size standartı ile seyreltilmiştir. Bu şekilde hazırlanan örnekler DNA Analiz sisteminde kapillar olarak ayrıştırılmıştır.

### 3.3.2. Genomik SSR (gSSR) Geliştirilmesi

Proje kapsamında öngörülen SSR markörü geliştirilmesi için ülkemizde geniş bir ekim alanı bulan *Papaver somniferum* cv. Kemer kaya 95 çeşiti kullanılmıştır. Bu amaç için yaklaşık 30 civarında Kemer kaya 95 çeşitine ait bitki DNA'ları çıkarılmış ve pirosekans analizleri için ROCHE Firması (454 Life Sciences, Branford, CT, USA) dizileme merkezine gönderilmiştir. Dizileme çalışmasında genomik shotgun dizileme teknolojisi (Roche 454 GS-FLX sistemi) kullanılmıştır. Bu amaç için haşhaş bitkisine ait DNA'lar izole edilmiş ve saflaştırılan DNA'lar GS-FLX sistemde shotgun metodu ile dizilemeye tabi tutulmuştur. Pirosekans sonucu elde edilen dizi verilerinin uygun şekilde montajlanabilmesi için, bu dizilerde bulunan adaptör ve linker kökenli diziler belirlenerek silinmiştir. Standard Flowgram Format (SFF) formatında olan dizi verileri, bu dosya formatı genom montajlama programları tarafından kullanılamayacağından (KUMAR ve BLAXTER 2010), FASTAQ dosya formatına dönüştürülmüştür. Dönüştürme işlemi python programlama dili ile yazılan bir paket programın varsayılan parametreleri kullanılarak yapılmıştır ([http://bioinf.comav.upv.es/seq\\_crumbs/download.html](http://bioinf.comav.upv.es/seq_crumbs/download.html)). MIRA (CANCER 2005) montajlama programı montajlama parametrelerinin optimizasyonuna olanak verdiği için, genomik dizilerin montajlanması çalışmasında kullanılmıştır. Kontig uzunluklarının ortalamaları (N50), genel olarak kullanılan ölçümler (GÜLTEKİN ve ark., yayına hazırlanıyor), gibi birçok parametre genom montajlama kalitesini belirlemektedir. Bu parametreler dikkate alındığında MIRA montajlama programının optimum montajlama parametreleri şunlardır; number\_of\_passes = 6, SKIM\_each\_pass = on, spoiler\_detection\_last\_pass\_only = yes, bases\_per\_hash=18, maximum\_hit\_per\_read = 1000, percent\_required = 75, minimum\_relative\_score = 75, nasty\_repeat\_ratio = 150, possible\_vector\_leftover\_clip = on, advanced\_contig\_editing = on, minimum\_overlap = 20, minimum\_neighbor\_quality = 15, number\_of\_bases\_free\_of\_sequencing\_errors = 18, minimum\_repeat\_coverage = 300. Kontig dizileri SSR'lar bakımından İYTE biyoinformatik grubu tarafından geliştirilen SiSeeR programı kullanılarak taranmıştır (<http://bioinformatics.iyte.edu.tr/index.php?n=Softwares.SiSeeRHelp>) (GÜLTEKİN ve ALLMER, yayına hazırlanıyor). En az SSR motif tekrarı mononükleotit için 12, dinükleotit için 10, trinükleotit için 9, tetranükleotit için 7, pentanükleotit için 6,



hekzanükleotit için 5, heptanükleotit 4 için oktonükleotit için 3 tekrar olarak belirlenmiştir. SiSeeR programı, belirlenen SSR motiflerinin özelliklerini özetleyen bir sonuç dosyası vermektedir. Belirlenen SSR motiflerini çoğaltmak için Primer3 programı kullanılmıştır. Toplam 19,046 adet kontig dizisi primer çifti tasarlamada kullanılmıştır. Elde edilen gSSR primerleri aşağıdaki şekilde PCR işlemine tabi tutulmuştur. PCR reaksiyonlarında kullanılan karışımın içeriği şu şekildedir; 1X PCR tamponu, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.125 nM dNTP, 1 U Taq Polimeraz, 2 pmol ileri ve geri primerler ve 80 ng DNA. Toplam reaksiyon hacmi 25 µL olarak kullanılmıştır. PCR koşulları; 94°C/5 dakika (bir döngü); 94°C/45 saniye, primerin bağlanması için 55°C/1 dakika, 72°C/1 dakika (35 döngü); 72°C/5 dakika (bir döngü) olarak uygulanmıştır. PCR ürünlerinin CEQ 8000 (Beckman) kapiler elektroforez sistemi ile analiz edilebilmeleri için, her bir örnek için 3 µl PCR ürünü 27 µl örnek yükleme tamponu ile (sample loading buffer, Beckman) seyreltilmiştir. Tüm çalışmalarda her bir örnek için 0.5 µl, 600 bp DNA referansı kullanılmış ve tüm çeşitler Frag3 metodu kullanılarak yürütülmüştür (kapiler sıcaklığı 50 °C, denatürasyon 90 °C/120 s., enjeksiyon voltajı 2.0 Kv/3 s., ayırma voltajı 4.8 kV/ 60dak.).

### 3.3.3. AFLP Analizleri

Haşhaş gen kaynaklarının genotiplenmesi işlemlerinde AFLP markörleri de (VOS ve ark. 1995) kullanılmıştır. Bu analizler için SOUNDERS ve ark. (2001) tarafından verilen yöntem kullanılmıştır. Bu amaç için Invitrogen AFLP Core reaktif kitleri ve Starter Primer kitleri kullanılmıştır. Yaklaşık 10 primer kombinasyonu analizlerde üretici firma tarafından kullanım kılavuzunda belirtildiği gibi DNA örnekleri için kullanılmıştır. AFLP analizinde ilk adım olarak genomik DNA'lar restriksiyon enzimleri ile kesilmiştir. Kesim işlemleri için, 5 µl DNA (~250 ng), 5 µl 5x reaksiyon tampon çözeltisi, 2 µl *EcoR* I/Mse I ve 13 µl steril dH<sub>2</sub>O içeren karışım 1.5 µl mikrosantrifüj tüpü içerisine konmuş, daha sonra karıştırılmış ve 2 saat süreyle 37°C'de inkübe edilmiştir. Daha sonra, restriksiyon endonuklease aktivitesini inaktif hale getirmek için, bu karışım 15 dakika süreyle 70°C'de tutulmuştur. İkinci aşamada, 24 µl adaptör bağlama solüsyonu ve 1 µl T4 DNA ligase enzimi DNA karışımına eklenmiştir ve iki saat süreyle 20°C'de inkübe edilmiştir. Bu bağlama karışımı 1:10 oranında TE tampon çözeltisi (10 µl mixture + 90 µl TE tampon çözeltisi) ile dilüsyon edilmiştir. Üçüncü aşamada, ön amplifikasyon reaksiyonu hazırlanmıştır. Bu aşamada, 40 µl ön amplifikasyon primer karışımı, ön aşamada hazırlanmış olan 5 µl dilüsyon edilmiş kalıp DNA, 5 µl 10x PCR tampon çözeltisi + Mg ve 1 µl *Taq* DNA polimerase enzimi içeren karışım 0.5 ml. mikrosantrifüj tübü içerisine eklenmiş ve iyice karıştırılmıştır. Santrifügasyondan sonra, karışım müteakip profil (94°C/30 saniye, 56°C/1 dakika, 72°C/1 dakika ve 20 döngü; 4°C'de tutulur) kullanılarak PCR ile çoğaltılmıştır. Bu reaksiyondan 3 µl PCR ürünü alınmış ve 147 µl TE tampon çözeltisi içerisine dilüsyon edilmiştir. Son aşamada, seçici AFLP amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada, iki reaksiyon karıştırılmıştır. İlk karışım (karışım 1) 2.5 µl işaretlenmiş *EcoRI* primeri, 1.5 µl *MseI* primeri (dNTP içerir) ve 1 µl steril dH<sub>2</sub>O içermiştir. İkinci karışım (karışım 2) 2 µl 10x PCR tampon çözeltisi + Mg, 0.1 µl *Taq* DNA polimerase enzimi ve 79 µl steril dH<sub>2</sub>O içermiştir. PCR reaksiyonunu başlatmak için, üçüncü aşamadan elde edilen 5 µl dilüsyon edilmiş PCR ürünü, 5 µl karışım 1 ve 10 µl karışım 2 bir PCR tüpü içerisine konulmuş ve müteakip touchdown profili kullanılarak çoğaltılmıştır (94°C/30 saniye, 65°C/30 saniye, 72°C/60 saniye; sonra 12 döngü PCR yapılmıştır. Bu işlem için her bir döngüde bağlanma sıcaklığı 0.7°C düşürülmüştür ve son olarak, 94°C/30 saniye, 56°C/30 saniye, 72°C/1 dakika profili olan 23 döngülük bir PCR daha yapılmıştır. Bütün bu PCR'lar sonrası, elde edilen ürünlerde iki dilüsyon daha yapılmıştır. İlk dilüsyon; 1:3 PCR ürünü/dH<sub>2</sub>O (7 µl PCR + 14 µl dH<sub>2</sub>O) dilüsyonudur. İkinci dilüsyon; 27 µl örnek yükleme solüsyonu (SLS), 0.5 µl işaretleyici standartı 600 bp ve ilk dilüsyondan 3 µl kullanarak 1:10 hazırlanan dilüsyondur. Bu şekilde hazırlanan örnekler dizi analizi cihazı kabına yüklenmiş ve bir damla mineral yağ ile kaplanarak Beckman-Coulter Genetic Analysis System CEQ<sup>TM</sup>8800 içerisine yerleştirilmiştir. Frag-4 metodu AFLP analizleri (ayırma 90 °C, 120 saniye. ; capillary 50 °C; injeksiyon 2.0 kV, 30 saniye; ayırma 4.8 kV, 60 dakika) için kullanılmıştır. Bu aşamadan sonra, sonuçlar istenmeyen veya düşük kaliteli örnekleri çıkarmak için filtrelenmiştir. Elde edilen veriler AFLP fragmanlarının varlığı için (1) yokluğu için (0) şeklinde değerlendirilmiştir.

### 3.3.4. Veri Analizleri

Moleküler genetik bağlantı haritasının (bağlantı gruplarının ve işaretleyici sıralarının belirlenmesi) oluşturulmasında Mapmaker v. 2 (LANDER ve ark. 1987) ve JoinMap v. 4 (STAM 1993) programları kullanılmıştır. İlişkilendirme (association) haritalaması (ERSOZ ve ark. 2008) için, veriler Tassel v. 2.0.1 (YU ve ark. 2006) bilgisayar programı ile analiz edilmiştir. İlişkilendirme analizlerinin yapılması kısaca özetlenmiştir. Haşhaş popülasyonu içerisindeki ailesel ilişkiler 11 haşhaş kromozomuna eşit bir şekilde yayılan yaklaşık 500 SSR ve AFLP lokusları kullanılarak hesaplanmıştır ve LD (linkage disequilibrium) değeri karakterize edilmiştir. LD bir çift lokus arasındaki tesadüf olmayan ilişkilerin

derecesini veya iki lokustaki allellerin birlikte bulunma seviyelerini açıklayan  $R^2$  istatistiği ile hesaplanmıştır (HILL ve ROBERTS 1968). 100 x 100 ilişki matrisi ( $K$  matris) TASSEL programındaki "kinship" katsayısı kullanılarak elde edilmiştir. AFLP ve SSR markörleri için ilişkilendirme analizi TASSEL programındaki "MLM (mixed linear model)" komutu ile yapılmıştır (YU ve ark. 2006). Burada MLM modeli eş zamanlı olarak genel populasyon yapısını ( $Q$  matris) ve iki homolog gen arasındaki nisbi akrabalık derecesini ( $K$  matris) hesaba almaktadır.  $K$  matrisi bir çift birey arasındaki genetik kovaryansın derecesini tanımlamaktadır. AFLP ve SSR işaretleyicileri kullanılarak elde edilen genotipik veriler kullanılarak akrabalık (kinship) katsayısı ( $K$  matris) değerleri SPAGeDi programı (HARDY ve VEKEMANS 2002) ile elde edilmiştir. Analiz edilen bireylerin ve tanımlanan populasyonların sayıları dikkate alınarak  $Q$  matrisi STRUCTURE programı (PRITCHARD ve ark. 2000) ile elde edilmiştir. SPAGeDi ve STRUCTURE programları ile elde edilen verilerin TASSEL (YU ve ark. 2006) programı tarafından okunması için text dosyası oluşturulmuştur. En sonunda bütün veriler TASSEL programındaki MLM modeli çalıştırılarak analiz edilmiştir. MLM modeli genetik markörleri fikslenmiş etkiler olarak poligene background etkisininide random etki olarak ele almaktadır. İkinci etki (poligen background etkisi) "kinship" katsayılarının " $K$ " matrisi ile tahmin edilmektedir.  $P$ -değeri herhangi bir QTL'in bir markör ile olan ilişkisini ve  $R^2$ -değeri ise belirlenen QTL'in fenotip üzerine etkisini göstermektedir.

## 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

### 4.1. Morfolojik Karakterizasyon

Çalışmada kullanılacak haşhaş genetik materyallerinde homogenityi ağılamak üzere kendilenmiştir. Bu çalışmada, Türkiye'de geniş ölçüde yetiştirilen haşhaş çeşitleri ve değişik bölgelerimizden toplanmış bulunan haşhaş gen kaynakları Anadolu Tarımsal Araştırma Enstitüsü (ATAE) tarafından temin edilmiş 125 adet haşhaş tohum örneğinden meydana gelen bu doğal populasyonlar genetik çeşitlilik analizlerinin yapılmasında kullanılmıştır. Ayrıca, bazı yakın akraba türlere ait tohumlar USDA Gen Bankasından temin edilmiştir. Genetik çeşitlilik düzeyinin belirlenmesi için öncelikle bütün tohum örnekleri ATAEE deneme tarlalarında yazlık dönem içim ekilmiş ve heterojen olan tohum örnekleri temizlenerek homojen hale getirilmiştir. Aşağıdaki resimlerde ATAEE'de yapılan çalışmalar gösterilmektedir (Şekil 1).

Şekil 1. ATAEE tarlalarında ekilen haşhaş genotiplerinin homojen hale getirilmesi



Genetik çeşitlilik düzeyinin belirlenmesi için yapılan bu çalışmada Anadolu Tarımsal Araştırma Enstitüsü tarafından temin edilen yaklaşık 150 civarında genotipe ait tohumlar ekilmiş ancak ekilen bu tohum örneklerinden sadece 125 adet genotipin tohumları çimlenebilmiştir. Bu nedenle, çalışmada 125

haşhaş genotipi kullanılmıştır. Tablo 1’de proje kapsamında yürütülecek genetik çeşitlilik analizleri için kullanılacak 125 adet tohum örneğinin (genotip) Enstitü pedigri numaraları, çiçek renkleri ve toplandıkları lokasyonlar verilmiştir.

Tablo 1. Genetik çeşitlilik analizlerinde kullanılacak tohumörneklerinin listesi

No	Pedigri No	Çiçek Rengi	Toplandığı Lokasyon
1	85066.3.3	PEMBE	SANDIKLI-AFYON
2	85025.6.2	BEYAZ	SANDIKLI-ALAGÖZ
3	85060.2.1	SARI	SANDIKLI ALACAMI
4	85057.1.1	MAVİ	SANDIKLI ALACAMI
5	85003.2.1	PEMBE	BURDUR-ÇELTİK
6	85024.4.2	YEŞİL	SANDIKLI-ALAGÖZ
7	85025.7.2	KAHVE	SANDIKLI-ALAGÖZ
8	85083.3.2	BEYAZ	SANDIKLI-ALACAMI
9	85052.2.3	SARI	ÇOBANLAR-AFYON
10	85043.1	SARI	BURDUR-ÇELTİK
11	86362.2.2	YEŞİL	AFYON-MERKEZ
12	85007.6.1	PEMBE	YALVAÇHÖYÜKLÜ-İSPARTA
13	85007.3.1	YEŞİL	YALVAÇHÖYÜKLÜ-İSPARTA
14	84895.2.1.3	KAHVE	SİVAS-MERKEZ
15	86004.1.1	YEŞİL	ŞUHUT-KOÇYATAĞI-AFYON
16	89004.1	SARI	ÇAMLIBEL ULUBEY-UŞAK
17	86013.4.3	YEŞİL	KOÇYATAĞI-ŞUHUT-AFYON
18	85083.3.1	YEŞİL	İSPARTA
19	86693.2.1	SARI	DİŞLİ KASABASI-AFYON
20	86774.2	SARI	BOLVADİN-AFYON
21	86013.4.2	BEYAZ	KOÇYATAĞI-ŞUHUT-AFYON
22	86750.1	SARI	ŞUHUT-ANAYURT
23	85004.1.1	YEŞİL	AFYON-MERKEZ
24	85017.6.1	SARI	SANDIKLI ALAGÖZ
25	86013.3.3	PEMBE	ŞUHUT-KOÇYATAĞI-AFYON
26	85045.1.1	MAVİ	DEREŞENEK-AFYON
27	85041.3.1	BEYAZ	BANAZ-UŞAK
28	86011.1.1	YEŞİL	KOÇYATAĞI-ŞUHUT-AFYON
29	86803.1	SARI	YUKARISÖĞÜT-ESKİŞEHİR
30	86736	SARI	İSABEY-ÇAL-DENİZLİ
31	86889.5.3	SARI	KARAYAHŞİLER-ÇİVRİL DENİZLİ
32	85004.3.1	BEYAZ	AFYON-MERKEZ
33	86012.3.2	YEŞİL	SANDIKLI-EKİNHİSAR
34	85017.3.1	SARI	SANDIKLI ALAGÖZ
35	86010.2.1	SARI	ŞUHUT KOÇYATAĞI
36	86895.2.1	YEŞİL	SİVAS-MERKEZ
37	85083.2.3	BEYAZ	YALVAÇHÖYÜKLÜ-İSPARTA
38	85043.4.2	SARI	BURDUR-ÇELTİK
39	86013.3.1	SARI	ŞUHUT KOÇYATAĞI
40	85083.2.4	SARI	İSPARTA
41	85070.1.2	BEYAZ	ŞUHUT KOÇYATAĞI
42	86014.1.1	YEŞİL	SANDIKLI ALACAMI
43	85043.5.3	PEMBE	BURDUR-ÇELTİK
44	85004.2.1	SARI	AFYON-MERKEZ
45	86115.4.2	YEŞİL	SİMAV-KÜTAHYA
46	85043.6.2	SARI	BURDUR-ÇELTİK

47	86789.1.1	MAVİ	ÇİVRİ L KARAYAHŞİLER-DENİZLİ
48	86782.1.1	KAHVE	ÇİVRİL KARAYAHŞİLER-DENİZLİ
49	86271.6	SARI	UŞAK- ÇEVREKÖYÜ
50	86473.3.1	MAVİ	ŞUHUT-MAMAT KÖYÜ
51	86889.3.1	YEŞİL	ÇİVRİL KARAYAHŞİLER-DENİZLİ
52	86803.2.1	PEMBE	YUKARISÖĞÜTÖNÜ-ESKİŞEHİR
53	86889.1.1	MAVİ	DENİZLİ-ÇİVRİL
54	86505.4.2	MAVİ	ERİCE-UŞAK
55	86468	SARI	SANDIKLI-EKİNHİSARKÖYÜ-AFYON
56	86566.2.4	SARI	DERESENEK-AFYON
57	86895.2.2	KAHVE	SİVAS-MERKEZ
58	86491.2.1	SARI	KEMERKAYA-AFYON
59	86155.1.1	SARI	SÜLÜMENLİ-AFYON
60	86625.1.3	KAHVE	KOÇYATAĞI-AFYON
61	86238.3.1	YEŞİL	ŞUHUT-AFYON
62	85004.1.2	KAHVE	SÜLÜMENLİ-AFYON
63	85007.1.2	BEYAZ	YALVAÇ HÖYÜKLÜ-İSPARTA
64	86005.1.3	KAHVE	SÜLÜMENLİ-AFYON
65	85052.2.4	KAHVE	ÇOBANLAR-AFYON
66	85052.3.2	YEŞİL	ÇOBANLAR-AFYON
67	86015.1.3	BEYAZ	ALACAMI-SANDIKLI-AFYON
68	86014.3.4	KAHVE	ALACAMI-SANDIKLI-AFYON
69	86895.2.2	KAHVE	SİVAS-MERKEZ
70	85052.2.2	SARI	ÇOBANLAR-AFYON
71	86895.2.1.2	SARI	SİVAS-MERKEZ
72	86004.1.4	SARI	KOÇYATAĞI-ŞUHUT-AFYON
73	85005.4.1	BEYAZ	SÜLÜMENLİ-AFYON
74	85005.2.2	PEMBE	SÜLÜMENLİ-AFYON
75	86714	SARI	AFYON-MERKEZ
76	85080.1.2.2	YEŞİL	UŞAK-GÖGEN
77	86807	SARI	DİŞLİ KASABASI-AFYON
78	86015.2.2	KAHVE	SANDIKLI-ALACAMI-AFYON
79	85096.4.1	YEŞİL	HİSARCIK EMET -KÜTAHYA
80	85052.5.1	KAHVE	ÇOBANLAR-AFYON
81	86008.3.1	YEŞİL	KOÇYATAĞI-ŞUHUT-AFYON
82	86692.2.1	SARI	DİŞLİ KASABASI-AFYON
83	86010.2.3	SARI	ŞUHUT-KOÇYATAĞI-AFYON
84	85052.1.4	YEŞİL	ÇOBANLAR-AFYON
85	86014.3.3	YEŞİL	SANDIKLI ALACAMI-AFYON
86	86008.2.1	YEŞİL	KOÇYATAĞI-ŞUHUT-AFYON
87	86013.4.1	SARI	KOÇYATAĞI-ŞUHUT-AFYON
88	86010.1.3	SARI	KOÇYATAĞI-ŞUHUT-AFYON
89	85014.2.4	SARI	GÜRE-UŞAK
90	85029.3.2	SARI	ÇAY-AFYON
91	86010.2.1	SARI	KOÇYATAĞI-ŞUHUT-AFYON
92	86765.1	SARI	BOLVADİN-MERKEZ
93	86173.1.8	MAVİ	ŞUHUT-AFYON
94	86158.4.8	MAVİ	ACIPAYAN-DENİZLİ
95	86140.1	SARI	ACIPAYAN-DENİZLİ
96	86117.3.2	SARI	KÜTAHYA
97	86173.5.1	SARI	ŞUHUT-AFYON



98	86102.1.2	SARI	ÇAY-KARACAÖREN-AFYON
99	86166.2.2	SARI	ŞUHUT-ANAYURT-AFYON
100	86060	SARI	ŞUHUT-ANAYURT-AFYON
101	86029.2.1	SARI	ÇAY-AFYON
102	86047.3.1	SARI	DEREŞENEK-AFYON
103	86029.2.2	KAHVE	ÇAY-AFYON
104	86173.1.1	MAVİ	ŞUHUT-MAHMUTKÖYÜ
105	86008.1.1	SARI	ŞUHUT-KOÇYATAĞI-AFYON
106	86055.1.1	SARI	ŞUHUT-ANAYURT-AFYON
107	86140.2.2	SARI	ACIPAYAN-DENİZLİ
108	86162.3.1	SARI	ŞUHUT-ANAYURT
109	86156.3.1	BEYAZ	ACIPAYAN-DENİZLİ
110	86047.4.1	KAHVE	DEREŞENEK-AFYON
111	86060	SARI	ŞUHUT-AFYON
112	86347.3.4	PEMBE	SÜLÜMENLİKÖYÜ-AFYON
113	86335.1.1	SARI	ARIZLAR KÖYÜ-SANDIKLI-AFYON
114	86347.3.1	SARI	SÜLÜMENLİ-AFYON
115	86361.1.1	YEŞİL	SÜLÜMENLİ-AFYON
116	86267.3.2	KAHVE	DEREŞENEK-AFYON
117	86047.1.1	SARI	DEREŞENEK-AFYON
118	86060.1	SARI	ŞUHUT-ANAYURT-AFYON
119	86316.2.3	MAVİ	EBER-AFYON
120	85060.5.3.3	MAVİ	ŞUHUT-ANAYURT-AFYON
121	85060.3.3.2	MAVİ	ŞUHUT-ANAYURT-AFYON
122	86050.2.1	MAVİ	DEREŞENEK-AFYON
123	86029.1.4	KAHVE	ÇAY-AFYON
124	86029.4.1	YEŞİL	ÇAY-AFYON
125	86363.5.3	MAVİ	SÜLÜMELİ-AFYON

2010-11 yılı kışlık ekim döneminde homojen hale getirilen bütün haşhaş genotipleri ATAE deneme tarlalarına her bir genotipten en az 30 bitki olacak şekilde augmented deneme desenine göre ekilmiştir ve bu çalışmada 3 adet hat ve çeşit kontrol olarak kullanılmıştır ve proje kapsamında öngörülen agro-morfolojik ve kapsül içeriği karakterleri bakımından karakterize edilmişlerdir. 2010-11 yılı kışlık ekim döneminde elde edilen bazı agro-morfolojik ve morfin değerleri Tablo 2'de verilmiştir. Gelişme dönemleri boyunca haşhaş tarımı ile ilgili gerekli tüm agronomik uygulamalar (tekleme, çapalama, gübreleme, sulama) uygun zamanlarında yerine getirilmiştir. Bu çalışmalar kapsamında kullanılan genetik materyallerin tarla resimleri Şekil 2'de verilmiştir.

Şekil 2. Genetik çeşitlilik analizinde kullanılacak ve agro-morfolojik karakterler bakımından incelenecek haşhaş genotiplerinin tarla çalışmaları.



Tablo 2'de verilen değerler incelendiğinde incelenen verim, kalite kriterleri bakımından çalışmaya konu olan materyal arasında geniş bir genetik varyasyon olduğu dikkati çekmektedir. Bu yetiştirme sezonuna ait çalışmada bitki boyu değeri 72 ile 129 cm arasında değişmekte olup ortalama 97.9 cm (SH:  $\pm 0.749$ ) olarak belirlenmiştir. Bu değer çalışmada kontrol çeşit olarak kullanılan 1257-14 hattında 105 cm, Zaferyolu çeşidinde 96.2 cm ve Tınaztepe çeşidinde ise 98.6 cm olarak belirlenmiştir. Kontrol

çeşitlere ait ortalama değer ise 99.9 cm'dir. Çalışmada dal sayısı ile yapılan incelemede bitki başına dal sayısı 2.2 ile 7.4 (ortalama değer: 4.4 SH:±0.104) arasında değişim göstermiştir. Bu özellik bakımından kontrol hat ve çeşitlere ait ortalama değer 4.2 olarak belirlenmiştir. Kapsül indeksi ile ilgili yapılan ölçüm sonuçları incelendiğinde, Kapsül indeksi 0.35 ile 1.31 arasında değişmekte olup ortalama kapsül indeksi değeri 0.97 (SH: ± 0.009) olarak belirlenmiştir. Bu özellik bakımından kontrol hat ve çeşitlere ait ortalama değer 0.9 olarak bulunmuştur. Ayrıca kapsülde tepecik sayısı 2.2 ile 7.4 arasında değişmekte olup ortalama değer 4.4 (SH: ± 0.104) olarak belirlenmiştir. Kapsül eni değeri 2.2 ile 7.4 arasında değişmekte olup 3.1 ile 6.58 (ortalama değer: 4.3 SH± 0.04) arasında değişmektedir. Kapsül boyu en düşük 0.42 en yüksek 5.98 olarak bulunmuştur. Kapsül boyuna ait ortalama değer 4.1 (SE ± 0.048) olarak belirlenmiştir. Araştırmada tohum veriminin 38-130 kg/da (SH ± 1.571) arasında, kapsül veriminin ise 35-101 kg/da (SH ± 1.237) arasında değiştiği bulunmuştur. Çalışmada kontrol olarak kullanılan 1257-14, Zaferyolu, Tınaztepe çeşitlerine ait tohum verimi ve kapsül verimi sırası ile 98.6 kg/da ve 72.2 kg/da, 81.4-52.0 kg/da ve 94.2-66.2 kg/da olarak belirlenmiştir. Projede her iki özellik bakımından kullanılan genotiplerin büyük bir kısmının kontrol çeşitlerin altında yer aldığı görülmektedir. Morfin oranı incelendiğinde bu oran % 0.17 ile % 0.68 arasında değişmekte olup ortalama %0.40 olarak belirlenmiştir. Kontrol çeşitlere ait değerler 0.7 (1257-14), 0.65 (Zaferyolu), 0.5 (Tınaztepe) olarak belirlenmiştir.

Çalışmanın yürütüldüğü 2011-2012 yılları arasında aynı genetik materyal yine Agumented deneme deseni göre ekilmiş olup incelenen karakterlere ait sonuçlar Tablo 3'te verilmiştir. Çalışmada bitki boyu, 90-120 cm (SH ± 0.579), dal sayısı 2.2-12 (SH ± 0.151) adet, kapsül indeksi 0.73-1.1(SH ± 0.004) arasında değişim göstermiştir. İncelenen bu özellikler bakımından 1257-14 hattına ait değerler sırası ile 106.2 cm, 4.12 adet, 0.89 olarak belirlenmiştir. Diğer kontrol çeşitler Zaferyolu ve Tınaztepe için bitki boyu değeri 107.5 cm ve 111.2 cm, dalsayısı için 5 adet ve 3.6 adet, kapsül indeksi ise 0.99 ve 0.93 olarak bulunmuştur. Ayrıca, kapsülde tepecik sayısı 2.2-12 (SH ± 0.139), Kapsül eni 2.8-5.44 (SH ± 0.03) ve Kapsül boyu 2.72-4.86 (SH ± 0.024) arasında değişim göstermiştir. Çalışmada üzerinde değerlendirme yapılan genotiplerin tohum verimi 70-174 kg/da (SH ± 0.265), kapsül verimi 45-139 kg/da (SH ± 1.107) arasında değişim göstermiştir. Çalışmada morfin değeri ise 0.2 ile 1.14 arasında değişim göstermekte olup ortalama değer 0.5 olarak belirlenmiştir. Bu üç özellik bakımından standartlara ait ortalama tohum verimi 119.5 kg/da kapsül verimi 87.7 kg/da ve morfin oranı ise %0.6 olarak belirlenmiştir.

Tablo 2. Türk haşhaş çeşitlerinin agro-morfolojik özellikleri ve alkaloid içerikleri (2010-2011)

Bitki No	Bitki Boyu	Dal Sayısı	Kapsül Tepecik sayısı	Kapsül Eni	Kapsül Boyu	Kapsül indeksi	Tohum Verimi (kg/da)	Kapsül Verimi (kg/da)	Morfin (%)
1	95	5.8	5.8	4.18	3.88	0.92	87	58	0.675
2	108	4.6	4.6	4.24	4.24	1	81	66	0.378
3	103	3.6	3.6	4.18	4.94	1.18	93	86	0.306
4	93	4.6	4.6	3.76	3.22	0.85	76	52	0.583
5	101	4.4	4.4	4.22	3.96	0.93	70	55	0.502
6	102	4.6	4.6	4.46	4.12	0.92	55	46	0.443
7	105	5	5	4.8	4.12	0.85	112	89	0.486
8	94	3.8	3.8	4.38	4.04	0.92	70	52	0.476
9	111	3.4	3.4	4.68	4.42	0.94	88	76	0.476
10	94	3	3	4.46	3.48	0.78	60	53	0.51
11	102	5.4	5.4	6.58	2.34	0.35	106	66	0.493
12	101	5.2	5.2	3.1	2.28	0.73	71	63	0.405
13	112	5.6	5.6	4.26	4.06	0.95	100	68	0.427
14	105	4.6	4.6	4.4	4.74	1.07	90	48	0.464
15	98	2.6	2.6	3.52	3.92	1.11	50	40	0.352
16	96	4	4	3.86	4.06	1.05	65	60	0.405
17	93	4.6	4.6	4.2	4.42	1.05	68	48	0.377
18	87	4.6	4.6	3.88	3.5	0.9	73	44	0.442

19	85	6.2	6.2	4	4.08	1.02	70	62	0.442
20	95	2.6	2.6	4.32	4.26	0.98	38	35	0.471
21	89	5	5	3.62	3.54	0.97	86	57	0.449
22	106	7	7	4.76	4.28	0.89	104	74	0.293
23	93	6.8	6.8	4.24	4.44	1.04	94	65	0.322
24	90	3	3	3.74	3.8	1.01	76	47	0.437
25	88	3.8	3.8	4.16	3.62	0.87	129	93	0.266
26	90	3.2	3.2	3.6	4.58	1.18	66	40	0.374
27	102	5.2	5.2	4.54	5.98	1.31	76	55	0.546
28	82	2.8	2.8	4.06	4.32	1.06	52	46	0.324
29	94	4.8	4.8	4.6	4.32	0.93	97	93	0.385
30	89	2.8	2.8	3.96	3.86	0.97	78	60	0.508
31	101	3.6	3.6	4.24	4.16	0.98	83	73	0.449
32	99	5.6	5.6	4.4	4.42	1.004	110	101	0.438
33	100	4.2	4.2	4.44	4.24	0.95	74	59	0.391
34	100	5.2	5.2	4.92	4.5	0.91	92	80	0.647
35	95	4	4	4.22	4.26	1.009	85	61	0.308
36	88	4.4	4.4	3.64	3.94	1.08	69	50	0.377
37	88	4.8	4.8	3.98	3.78	0.94	75	56	0.423
38	95	3.6	3.6	4.74	4.3	0.9	97	75	0.459
39	105	4.4	4.4	4.48	4.1	0.91	57	41	0.499
40	94	3.6	3.6	4.06	4.04	0.99	65	53	0.505
41	101	5	5	4.72	4.48	0.94	71	70	0.365
42	106.5	6	6	4.82	4.37	0.9	75	70	0.498
43	96	3.2	3.2	4.56	4.16	0.91	122	100	0.406
44	100	5.8	5.8	4.5	4.18	0.92	70	60	0.362
45	98	4	4	4.48	4.14	0.92	64	58	0.377
46	93	3.6	3.6	4.18	0.422	1.009	67	51	0.4
47	90	3.4	3.4	3.62	3.84	1.06	58	45	0.45
48	94	3.2	3.2	4.34	4.48	1.032	61	56	0.227
49	89	3.8	3.8	4.38	4.08	0.93	52	49	0.26
50	84	3.6	3.6	4.12	3.66	0.88	84	52	0.382
51	94	3.4	3.4	4.04	3.84	0.95	87	57	0.415
52	106	3.6	3.6	4.48	4.66	1.04	98	52	0.33
53	100	3.2	3.2	4.52	4.3	0.95	93	52	0.372
54	92	4.2	4.2	4.72	4.08	0.86	93	67	0.279
55	89	3.6	3.6	3.86	3.98	1.03	61	58	0.408
56	90	6.8	6.8	3.6	3.24	0.9	61	43	0.327
57	103	3.8	3.8	4.38	4.36	0.99	82	69	0.301
58	106	3.6	3.6	4.52	4.22	0.93	76	58	0.532
59	82	5.2	5.2	4.8	4.6	0.84	71	48	0.395
60	111	5.6	5.6	4.84	4.44	0.91	88	74	0.394
61	94	6.8	6.8	4.6	4.22	0.91	100	76	0.172
62	72	5.2	5.2	3.9	4.06	1.04	57	41	0.398

63	97	4	4	4.14	4.16	1.004	104	80	0.388
64	110	3.1	3.1	4.4	4.2	0.95	130	100	0.5
65	95	3.6	3.6	3.58	3.9	1.089	72	67	0.299
66	108	4	4	4.48	4.46	0.99	51	36	0.297
67	93	3.4	3.4	3.96	3.82	0.96	50	42	0.508
68	103	4	4	4.6	4.68	1.01	60	52	0.468
69	100	2.2	2.2	3.76	4.04	1.07	64	39	0.308
70	96	2.6	2.6	4.24	4.64	1.094	51	48	0.33
71	105	6.8	6.8	4.78	4.54	0.94	92	64	0.333
72	114	5	5	4.2	3.92	0.93	65	52	0.266
73	104	7.4	7.4	4.76	4.34	0.91	95	75	0.375
74	95	5.2	5.2	4.1	4.08	0.99	60	53	0.258
75	108	6.2	6.2	4.14	4.6	1.11	72	66	0.444
76	101	5.2	5.2	4.6	4.56	0.99	130	89	0.395
77	100	4.8	4.8	4.5	4.06	0.9	76	55	0.388
78	105	5.4	5.4	4.46	3.88	0.86	64	51	0.47
79	93	3.6	3.6	3.78	3.62	0.95	75	55	0.448
80	97	3.6	3.6	4.14	4.62	1.11	68	65	0.506
81	105	3	3	3.44	3.88	1.12	54	47	0.496
82	103	4	4	4.4	4.4	1	95	62	0.575
83	99	4	4	4.26	4.08	0.95	70	65	0.402
84	101	2.6	2.6	4.74	4.76	1.004	79	72	0.41
85	99	3.4	3.4	4.46	4.32	0.96	76	62	0.602
86	103.4	4	4	4.64	4.44	0.95	90	80	0.354
87	95	5	5	4.62	3.98	0.86	69	63	0.38
88	108	3.8	3.8	4.64	4.14	0.89	64	58	0.4
89	95	3.4	3.4	3.72	3.86	1.037	60	56	0.498
90	109	3.8	3.8	4.22	4.02	0.95	78	56	0.283
91	100	4	4	4.36	4.12	0.94	70	58	0.269
92	99	5	5	4.28	4.18	0.97	69	56	0.464
93	98	4.6	4.6	4.2	4.3	1.02	81	60	0.305
94	88	4.6	4.6	3.9	4.18	1.07	64	51	0.453
95	107	3.2	3.2	5.38	5.02	0.93	75	61	0.472
96	92	2.8	2.8	3.78	3.76	0.99	89	56	0.371
97	95	4.4	4.4	4.42	4.08	0.92	62	59	0.462
98	87	4.2	4.2	4.14	4	0.96	87	59	0.454
99	93	4.2	4.2	3.72	3.94	1.05	62	50	0.443
100	94	3.8	3.8	4.4	4.28	0.97	72	64	0.442
101	81	4.2	4.2	4.2	4	0.95	64	46	0.62
102	108	6.4	6.4	4.74	5.04	1.06	81	54	0.34
103	99	7.4	7.4	3.98	3.92	0.98	66	64	0.246
104	79	7	7	3.14	3.3	1.05	72	56	0.588
105	96	5	5	4.24	4.24	1	68	62	0.475
106	103	6	6	5.42	4.14	0.76	72	68	0.298



107	93	5.2	5.2	3.84	3.82	0.99	60	52	0.38
108	95	3.6	3.6	4.14	4.24	1.02	73	64	0.427
109	89	3	3	3.84	3.82	0.99	84	61	0.24
110	86.3	4.5	4.5	3.85	4.32	1.12	55	39	0.478
111	92	4.2	4.2	4.36	3.92	0.89	63	50	0.17
112	103	4.8	4.8	4.38	4.18	0.95	88	79	0.21
113	108	3.6	3.6	4.14	3.96	0.95	67	62	0.38
114	99	3.8	3.8	4.54	4.02	0.88	86	78	0.344
115	100	4.6	4.6	4.42	4.16	0.94	56	52	0.385
116	98	2.4	2.4	4.4	4.16	0.94	63	58	0.466
117	105	2.8	2.8	4.7	4.6	0.97	100	78	0.591
118	106	3.2	3.2	4.34	4.24	0.97	94	72	0.539
119	97	3.8	3.8	4.04	4.6	1.13	108	78	0.378
120	95	4	4	4.48	4.34	0.96	90	81	0.312
121	89	3.4	3.4	3.96	3.8	0.95	76	62	0.465
122	109	6.2	6.2	4.82	4.38	0.9	60	53	0.281
123	102	6.2	6.2	4.22	4.12	0.97	88	84	0.338
124	122	3.8	3.8	3.72	4.24	1.13	84	61	0.302
125	129	6	6	4.04	4.26	1.05	92	79	0.282

Tablo 3. Türk haşhaş çeşitlerinin agro-morfolojik özellikleri ve alkaloid içerikleri (2011-2012)

Bitki No	Bitki Boyu	Dal Sayısı	Kapsül Tepecik Sayısı	Kapsül Eni	Kapsül Boyu	Kapsül indeksi	Tohum Verimi (kg/da)	Kapsül Verimi (kg/da)	Morfin %
1	108	3.2	3.2	3.64	3.78	1.038	116	72	0.346
2	110	5.4	5.4	4.5	4.36	0.96	106	71	0.515
3	111	3.8	3.8	4.02	4.06	1	174	116	0.527
4	97.5	5.5	5.5	4.5	4.25	0.94	133	88	0.412
5	100	7	7	4.14	4.14	1	146	97	0.324
6	107	7	7	4.26	4.08	0.95	106	71	0.357
7	103	5.6	5.6	4.52	3.94	0.87	103	69	0.652
8	108	5.2	5.2	4.42	3.92	0.88	109	72	0.436
9	94	2.2	2.2	3.44	3.82	1.11	98.5	66	0.389
10	107	4.6	4.6	3.68	3.46	0.94	107	71	0.403
11	108	2.6	2.6	3.82	3.82	1	135	89	0.347
12	105	2.4	2.4	3.72	3.68	0.98	84	45	0.323
13	103	8.4	8.4	3.78	3.68	0.97	90	61	0.389
14	116	5.4	5.4	3.7	3.94	1.06	117	80	0.657
15	111	3.6	3.6	3.94	3.94	1	130	87	0.394
16	103	3.8	3.8	3.8	3.86	1.01	144	96	0.612
17	113	6	6	4.1	4.04	0.98	146	97	0.426
18	113	5.4	5.4	4.2	4.04	0.96	137	91	0.564
19	120	4	4	4.28	4.1	0.95	88	55	0.406
20	111	3.8	3.8	4.38	3.98	0.9	142	95	0.373
21	110	3.8	3.8	3.58	3.38	0.94	158	105	0.399

22	107.4	2.8	2.8	3.58	3.8	1.06	146	97	0.663
23	100	4.6	4.6	3.9	4.16	1.06	114	76	0.47
24	108	4.6	4.6	3.88	3.92	1.01	113	75	0.552
25	99	5	5	4	3.76	0.94	114	76	0.383
26	100	6.6	6.6	4.86	4.86	1	122	81	0.385
27	102.5	11.5	11.5	4.6	4.2	0.91	141	94	0.379
28	107	3.6	3.6	4.52	4.18	0.92	111	74	0.389
29	106	3.8	3.8	4.76	4.42	0.92	143	95	0.47
30	106	3	3	4.44	4.02	0.9	99	67	0.487
31	103.3	6	6	4.86	4.8	0.98	100	66	0.67
32	111	8.6	8.6	4.7	4.3	0.91	146	97	0.575
33	107	4.4	4.4	4.76	4.36	0.91	106	71	0.375
34	110	3.4	3.4	3.96	4	1.01	144	96	0.473
35	113	7.8	7.8	4.06	3.98	0.98	120	80	0.453
36	103	7.2	7.2	3.4	3.72	1.09	134	89	0.564
37	108	8.4	8.4	4.12	4	0.97	146	99	0.215
38	96	2.6	2.6	3.88	3.78	0.97	101	68	0.61
39	113	5.8	5.8	4.82	4.22	0.87	140	95	0.417
40	114	4.8	4.8	4.42	3.98	0.9	120	80	0.522
41	109	4.2	4.2	4.8	4.66	0.97	83	55	0.396
42	108	7.6	7.6	4.42	4.16	0.94	144	96	0.467
43	117	5.8	5.8	4.22	3.86	1.09	144	96	0.447
44	106	4.8	4.8	4.76	4.6	0.96	113	76	0.554
45	102	3.8	3.8	4.52	4.56	1	133	89	0.311
46	106	4.6	4.6	4.06	4.08	1	145	94	0.817
47	100	4.6	4.6	4.3	4.32	1	122	81	0.4
48	105	5.4	5.4	4.52	4.16	0.92	113	76	0.461
49	100	4.6	4.6	4.78	4.38	0.91	136	92	0.515
50	106.2	6.6	6.6	4.22	4.16	0.98	165	110	0.44
51	101	9.4	9.4	4.38	3.96	0.9	112	75	0.333
52	112	4.8	4.8	4.36	4.48	1.02	114	77	0.286
53	108.8	4.8	4.8	5.26	4.58	0.87	107	82	0.349
54	100	2.6	2.6	4.7	4.46	0.94	133	89	0.262
55	108	6.2	6.2	4.4	3.96	0.9	148	128	0.498
56	98	9	9	4.02	3.86	0.96	108	75	0.518
57	99	10.4	10.4	3.92	3.86	0.98	155	110	0.442
58	93	4.4	4.4	4.08	3.92	0.96	155	110	0.701
59	97	5.4	5.4	4.14	3.94	0.95	129	89	0.462
60	97	7.6	7.6	4.64	4.18	0.9	112	75	0.314
61	108	7	7	4.34	3.7	0.85	85	62	0.672
62	107	7.8	7.8	4.42	3.84	0.86	120	80	0.427
63	109.4	8.2	8.2	3.82	3.82	1	123	90	0.32
64	108	3.2	3.2	4.5	4.3	0.95	132	98	0.463
65	104	5.4	5.4	3.92	3.68	0.93	156	120	0.35

66	108	7	7	4.12	3.66	0.88	82	75	0.379
67	99	4.6	4.6	4.32	3.92	0.9	138	100	0.435
68	103	5.4	5.4	3.72	3.78	1.01	85	65	0.502
69	98	3.4	3.4	3.88	3.98	1.02	100	77	0.4
70	106	4.4	4.4	3.96	4.1	1.03	163	135	0.368
71	115	5.6	5.6	4.48	4	0.89	114	86	0.381
72	96	5.6	5.6	4.42	4.02	0.9	161	139	0.458
73	106.6	5.6	5.6	4.02	3.22	0.8	120	95	0.472
74	97	5.6	5.6	4.6	3.88	0.84	114	92	0.491
75	106	4.8	4.8	4.1	3.32	0.8	125	98	0.678
76	96.6	3	3	4.6	3.99	0.86	72	50	0.297
77	99	3.8	3.8	4	3.42	0.85	99	72	0.701
78	90	3.2	3.2	4.38	4.1	0.93	70	55	0.634
79	102	6.2	6.2	4.4	3.98	0.9	118	90	0.499
80	119	7.4	7.4	4.4	4.4	1	138	120	0.501
81	118	7.2	7.2	4.2	3.96	0.94	95	72	0.372
82	115	5	5	4.32	3.64	0.84	149	120	0.495
83	120	3.2	3.2	4.42	4.3	0.97	129	108	0.455
84	112	3.6	3.6	4.78	4.68	1	160	134	0.2
85	115	6.2	6.2	4.42	3.9	0.88	126	100	0.875
86	118	7	7	4.38	3.88	0.88	155	130	0.554
87	118.7	12	12	4.02	3.05	0.75	115	95	0.671
88	115	4.6	4.6	4.3	3.76	0.87	133	115	0.321
89	118	5.8	5.8	3.86	3.28	0.84	140	118	0.567
90	110	3.6	3.6	3.22	3	0.93	132	112	0.281
91	114	4.6	4.6	3.52	3.1	0.88	129	105	0.357
92	110	4.4	4.4	4.5	3.96	0.88	130	102	0.271
93	106	3.6	3.6	3.36	3.14	0.93	150	122	0.651
94	105	5.4	5.4	3.94	4.32	1.09	132	118	0.35
95	111	3.4	3.4	4.36	4.44	1.01	165	132	0.475
96	116	6	6	2.8	2.72	0.97	132	110	0.455
97	98	3	3	4.48	4.04	0.9	85	56	0.452
98	109	2.6	2.6	5.44	4	0.73	140	113	0.418
99	110	3.2	3.2	4.18	4.24	1.01	151	124	0.356
100	107	5.2	5.2	3.78	3.8	1	119	93	0.514
101	116	5.6	5.6	4.32	3.58	0.82	162	134	0.6
102	109	3.4	3.4	3.56	3.22	0.9	115	92	0.356
103	105	2.4	2.4	3.94	3.92	0.99	130	105	0.363
104	100	5.5	5.5	3.9	4	1.02	104	90	0.382
105	102	5.8	5.8	3.6	3.68	1.02	85	68	0.384
106	107	4	4	5.02	3.98	0.79	150	124	0.396
107	104	4.2	4.2	4.66	4.02	0.86	89	63	0.76
108	119	4.4	4.4	4.64	4.5	0.96	142	116	0.473
109	113	4	4	4.62	4.34	0.93	150	126	0.591

110	105	4.6	4.6	4.48	4.3	0.95	133	108	0.482
111	105	3.6	3.6	4.84	4.12	0.85	129	102	0.307
112	102	3.8	3.8	4.18	3.74	0.89	114	95	0.513
113	107	4.2	4.2	4.36	3.34	0.76	132	104	0.637
114	104	6.2	6.2	4.66	3.98	0.85	141	110	0.485
115	96	4.4	4.4	3.6	3.6	1	133	108	0.427
116	102.5	5.5	5.5	4.75	4.3	0.9	85	71	1.139
117	102	5	5	3.64	3.32	0.91	110	88	0.736
118	97	3.6	3.6	4.82	4.14	0.85	108	85	0.427
119	97	2.4	2.4	3.58	3.96	1.1	98	70	0.721
120	99	4.2	4.2	4.36	4.07	0.93	148	120	0.545
121	100	3	3	3.8	3.54	0.93	153	124	0.465
122	107	4.8	4.8	3.7	3.58	0.96	123	105	0.52
123	102	3.8	3.8	3.9	3.76	0.96	145	116	0.459
124	104	5.6	5.6	4.52	4	0.88	160	134	0.47
125	107	4.8	4.8	4.3	3.9	0.9	91	68	0.35

Tablo 4 Agro-morfolojik karakterler ve morfin içeriğine ait iki yıllık değerlerin ortalamasını vermektedir. Çalışmada yapılan bütün genetik analizler bu ortalama değerler kullanılarak yapılmıştır.

Tablo 4. Haşhaş agro-morfolojik karakterler ve morfin içerikleri ortalama değerleri

Bitki No	Bitki Boyu	Dal Sayısı	Kapsül Tepecik Sayısı	Kapsül Eni	Kapsül Boyu	Kapsül İndeksi	Tohum Verimi (kg/da)	Kapsül Verimi (kg/da)	Morfin (%)
1	108	4.5	4.5	3.91	3.83	0.98	101.50	65.00	0.51
2	110	5.0	5	4.37	4.30	0.98	93.50	68.50	0.45
3	111	3.7	3.7	4.10	4.50	1.09	133.50	101.00	0.42
4	97.5	5.1	5.1	4.13	3.74	0.90	104.50	70.00	0.50
5	100	5.7	5.7	4.18	4.05	0.97	108.00	76.00	0.41
6	107	5.8	5.8	4.36	4.10	0.94	80.50	58.50	0.40
7	103	5.3	5.3	4.66	4.03	0.86	107.50	79.00	0.57
8	108	4.5	4.5	4.40	3.98	0.90	89.50	62.00	0.46
9	94	2.8	2.8	4.06	4.12	1.03	93.25	71.00	0.43
10	107	3.8	3.8	4.07	3.47	0.86	83.50	62.00	0.46
11	108	4	4	5.20	3.08	0.68	120.50	77.50	0.42
12	105	3.8	3.8	3.41	2.98	0.86	77.50	54.00	0.36
13	103	7	7	4.02	3.87	0.96	95.00	64.50	0.41
14	116	5	5	4.05	4.34	1.07	103.50	64.00	0.56
15	111	3.1	3.1	3.73	3.93	1.06	90.00	63.50	0.37
16	103	3.9	3.9	3.83	3.96	1.03	104.50	78.00	0.51
17	113	5.3	5.3	4.15	4.23	1.02	107.00	72.50	0.40
18	113	5	5	4.04	3.77	0.93	105.00	67.50	0.50
19	120	5.1	5.1	4.14	4.09	0.99	79.00	58.50	0.42
20	111	3.2	3.2	4.35	4.12	0.94	90.00	65.00	0.42

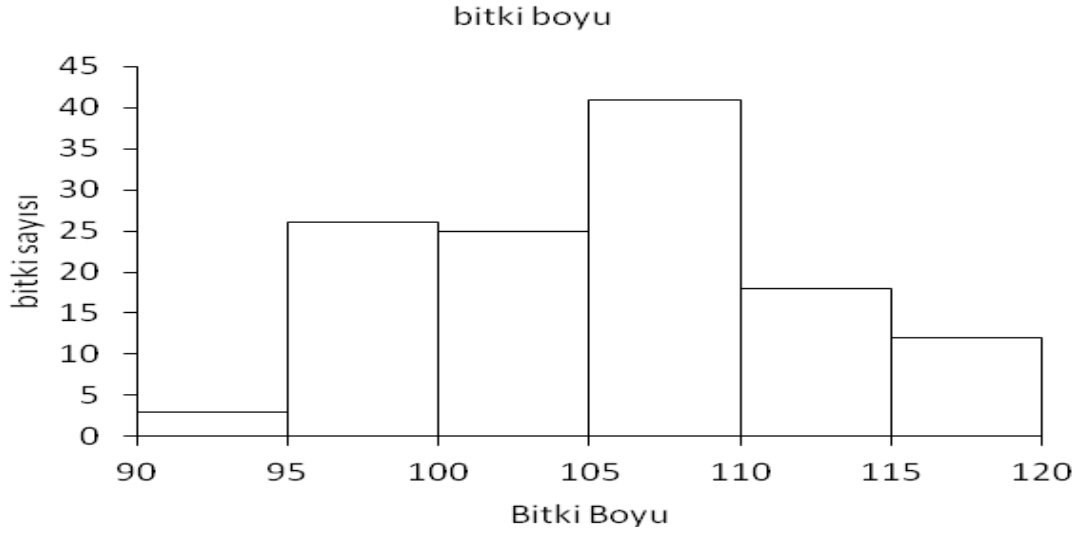
21	110	4.4	4.4	3.60	3.46	0.96	122.00	81.00	0.42
22	107	4.9	4.9	4.17	4.04	0.98	125.00	85.50	0.48
23	100	5.7	5.7	4.07	4.30	1.05	104.00	70.50	0.40
24	108	3.8	3.8	3.81	3.86	1.01	94.50	61.00	0.49
25	99	4.4	4.4	4.08	3.69	0.91	121.50	84.50	0.32
26	100	4.9	4.9	4.23	4.72	1.09	94.00	60.50	0.38
27	102.5	8.4	8.4	4.57	5.09	1.11	108.50	74.50	0.46
28	107	3.2	3.2	4.29	4.25	0.99	81.50	60.00	0.36
29	106	4.3	4.3	4.68	4.37	0.93	120.00	94.00	0.43
30	106	2.9	2.9	4.20	3.94	0.94	88.50	63.50	0.50
31	103.3	4.8	4.8	4.55	4.48	0.98	91.50	69.50	0.56
32	111	7.1	7.1	4.55	4.36	0.96	128.00	99.00	0.51
33	107	4.3	4.3	4.60	4.30	0.93	90.00	65.00	0.38
34	110	4.3	4.3	4.44	4.25	0.96	118.00	88.00	0.56
35	113	5.9	5.9	4.14	4.12	0.99	102.50	70.50	0.38
36	103	5.8	5.8	3.52	3.83	1.09	101.50	69.50	0.47
37	108	6.6	6.6	4.05	3.89	0.96	110.50	77.50	0.32
38	96	3.1	3.1	4.31	4.04	0.94	99.00	71.50	0.53
39	113	5.1	5.1	4.65	4.16	0.89	98.50	68.00	0.46
40	114	4.2	4.2	4.24	4.01	0.95	92.50	66.50	0.51
41	109	4.6	4.6	4.76	4.57	0.96	77.00	62.50	0.38
42	108	6.8	6.8	4.62	4.27	0.92	109.50	83.00	0.48
43	117	4.5	4.5	4.39	4.01	1.00	133.00	98.00	0.43
44	106	5.3	5.3	4.63	4.39	0.94	91.50	68.00	0.46
45	102	3.9	3.9	4.50	4.35	0.96	98.50	73.50	0.34
46	106	4.1	4.1	4.12	2.25	1.00	106.00	72.50	0.61
47	100	4	4	3.96	4.08	1.03	90.00	63.00	0.43
48	105	4.3	4.3	4.43	4.32	0.98	87.00	66.00	0.34
49	100	4.2	4.2	4.58	4.23	0.92	94.00	70.50	0.39
50	106.2	5.1	5.1	4.17	3.91	0.93	124.50	81.00	0.41
51	101	6.4	6.4	4.21	3.90	0.93	99.50	66.00	0.37
52	112	4.2	4.2	4.42	4.57	1.03	106.00	64.50	0.31
53	108.8	4	4	4.89	4.44	0.91	100.00	67.00	0.36
54	100	3.4	3.4	4.71	4.27	0.90	113.00	78.00	0.27
55	108	4.9	4.9	4.13	3.97	0.97	104.50	93.00	0.45
56	98	7.9	7.9	3.81	3.55	0.93	84.50	59.00	0.42
57	99	7.1	7.1	4.15	4.11	0.99	118.50	89.50	0.37
58	93	4	4	4.30	4.07	0.95	115.50	84.00	0.62
59	97	5.3	5.3	4.47	4.27	0.90	100.00	68.50	0.43
60	97	6.6	6.6	4.74	4.31	0.91	100.00	74.50	0.35
61	108	6.9	6.9	4.47	3.96	0.88	92.50	69.00	0.42

62	107	6.5	6.5	4.16	3.95	0.95	88.50	60.50	0.41
63	109.4	6.1	6.1	3.98	3.99	1.00	113.50	85.00	0.35
64	108	3.2	3.2	4.45	4.25	0.95	131.00	99.00	0.48
65	104	4.5	4.5	3.75	3.79	1.01	114.00	93.50	0.32
66	108	5.5	5.5	4.30	4.06	0.94	66.50	55.50	0.34
67	99	4	4	4.14	3.87	0.93	94.00	71.00	0.47
68	103	4.7	4.7	4.16	4.23	1.01	72.50	58.50	0.49
69	98	2.8	2.8	3.82	4.01	1.05	82.00	58.00	0.35
70	106	3.5	3.5	4.10	4.37	1.06	107.00	91.50	0.35
71	115	6.2	6.2	4.63	4.27	0.92	103.00	75.00	0.36
72	96	5.3	5.3	4.31	3.97	0.92	113.00	95.50	0.36
73	106.6	6.5	6.5	4.39	3.78	0.86	107.50	85.00	0.42
74	97	5.4	5.4	4.35	3.98	0.92	87.00	72.50	0.37
75	106	5.5	5.5	4.12	3.96	0.96	98.50	82.00	0.56
76	96.6	4.1	4.1	4.60	4.28	0.93	101.00	69.50	0.35
77	99	4.3	4.3	4.25	3.74	0.88	87.50	63.50	0.54
78	90	4.3	4.3	4.42	3.99	0.90	67.00	53.00	0.55
79	102	4.9	4.9	4.09	3.80	0.93	96.50	72.50	0.47
80	119	5.5	5.5	4.27	4.51	1.06	103.00	92.50	0.50
81	118	5.1	5.1	3.82	3.92	1.03	74.50	59.50	0.43
82	115	4.5	4.5	4.36	4.02	0.92	122.00	91.00	0.54
83	120	3.6	3.6	4.34	4.19	0.96	99.50	86.50	0.43
84	112	3.1	3.1	4.76	4.72	1.00	119.50	103.00	0.31
85	115	4.8	4.8	4.44	4.11	0.92	101.00	81.00	0.74
86	118	5.5	5.5	4.51	4.16	0.92	122.50	105.00	0.45
87	118.7	8.5	8.5	4.32	3.52	0.81	92.00	79.00	0.53
88	115	4.2	4.2	4.47	3.95	0.88	98.50	86.50	0.36
89	118	4.6	4.6	3.79	3.57	0.94	100.00	87.00	0.53
90	110	3.7	3.7	3.72	3.51	0.94	105.00	84.00	0.28
91	114	4.3	4.3	3.94	3.61	0.91	99.50	81.50	0.31
92	110	4.7	4.7	4.39	4.07	0.93	99.50	79.00	0.37
93	106	4.1	4.1	3.78	3.72	0.98	115.50	91.00	0.48
94	105	5	5	3.92	4.25	1.08	98.00	84.50	0.40
95	111	3.3	3.3	4.87	4.73	0.97	120.00	96.50	0.47
96	116	4.4	4.4	3.29	3.24	0.98	110.50	83.00	0.41
97	98	3.7	3.7	4.45	4.06	0.91	73.50	57.50	0.46
98	109	3.4	3.4	4.79	4.00	0.85	113.50	86.00	0.44
99	110	3.7	3.7	3.95	4.09	1.03	106.50	87.00	0.40
100	107	4.5	4.5	4.09	4.04	0.99	95.50	78.50	0.48
101	116	4.9	4.9	4.26	3.79	0.89	113.00	90.00	0.61
102	109	4.9	4.9	4.15	4.13	0.98	98.00	73.00	0.35

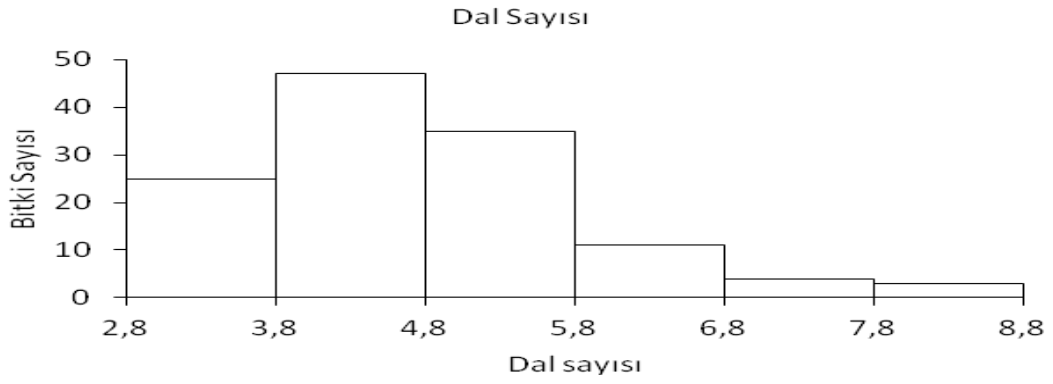
103	105	4.9	4.9	3.96	3.92	0.99	98.00	84.50	0.30
104	100	6.3	6.3	3.52	3.65	1.04	88.00	73.00	0.49
105	102	5.4	5.4	3.92	3.96	1.01	76.50	65.00	0.43
106	107	5	5	5.22	4.06	0.78	111.00	96.00	0.35
107	104	4.7	4.7	4.25	3.92	0.93	74.50	57.50	0.57
108	119	4	4	4.39	4.37	0.99	107.50	90.00	0.45
109	113	3.5	3.5	4.23	4.08	0.96	117.00	93.50	0.42
110	105	4.6	4.6	4.17	4.31	1.04	94.00	73.50	0.48
111	105	3.9	3.9	4.60	4.02	0.87	96.00	76.00	0.24
112	102	4.3	4.3	4.28	3.96	0.92	101.00	87.00	0.36
113	107	3.9	3.9	4.25	3.65	0.86	99.50	83.00	0.51
114	104	5	5	4.60	4.00	0.87	113.50	94.00	0.41
115	96	4.5	4.5	4.01	3.88	0.97	94.50	80.00	0.41
116	102.5	4	4	4.58	4.23	0.92	74.00	64.50	0.80
117	102	3.9	3.9	4.17	3.96	0.94	105.00	83.00	0.66
118	97	3.4	3.4	4.58	4.19	0.91	101.00	78.50	0.48
119	97	3.1	3.1	3.81	4.28	1.12	103.00	74.00	0.55
120	99	4.1	4.1	4.42	4.21	0.95	119.00	100.50	0.43
121	100	3.2	3.2	3.88	3.67	0.94	114.50	93.00	0.47
122	107	5.5	5.5	4.26	3.98	0.93	91.50	79.00	0.40
123	102	5	5	4.06	3.94	0.97	116.50	100.00	0.40
124	104	4.7	4.7	4.12	4.12	1.01	122.00	97.50	0.39
125	107	5.4	5.4	4.17	4.08	0.98	91.50	73.50	0.32

Ortalama değerler göz önüne alındığında, bitki boyu 90 cm ve 120 cm arasında değişmekte olup ortalama değer  $106.24 \pm 6.48$  cm olarak belirlenmiştir. Şekil 3 çalışmada kullanılan haşhaş genotiplerinin boy uzunluğuna ait histogram grafiğini göstermektedir. Bitki dal sayısı en düşük 2.8 en yüksek 8.5 olarak belirlenmiştir. Bitki dal sayısının ortalama değeri  $4.72 \pm 1.13$  olarak belirlenmiştir. Şekil 4 bitki dal sayısına ait histogram grafiğini göstermektedir. Histogram grafiğinin incelenmesinden bitki dal sayısı için genotipler arasında geniş düzeyde bir çeşitlilik olduğunu göstermektedir. Kapsül tepelik sayısı ve dal sayısı bir biriyle bağlantılı olan karakterlerdir ve benzer verilere sahiptir. Bu karakterler bakımından genotipleri 2.8 ve 8.5 arasında farklı değerler vermektedir. Bu karakterler bakımından genotiplerin ortalama değeri  $4.72 \pm 1.13$  olarak belirlenmiştir. Şekil 5 ve 6 kapsül tepelik sayısı ve dal sayısına ait histogram grafiklerini göstermektedir. Histogram grafiklerinin incelenmesinden kapsül tepelik sayısı ve dal sayısı karakterleri için genotipler arasında varyasyon olduğu gözlenmiştir. Kapsül eni, kapsül boyu ve kapsül indeksi, sırasıyla, 3.29-5.22 cm (ortalama  $4.24 \pm 0.33$ ), 2.05-5.09 cm (ortalama  $4.03 \pm 0.35$ ) ve 0.68-1.12 (ortalama  $0.95 \pm 0.07$ ) arasında değişmektedir. Şekil 7, 8 ve 9, sırasıyla, kapsül eni, kapsül boyu ve kapsül indeksi karakterlerine ait histogram grafiklerini göstermektedir. Bu grafiklerin incelenmesinden bu karakterler için genetik varyasyon olduğu saptanmıştır. Tohum verimi ve kapsül verimi sırasıyla 66.5-133.5 kg/da (ortalama  $100.99 \pm 14.27$  kg/da) ve 53-105 kg/da (ortalama  $76.71 \pm 12.7$  kg/da) arasında değişmektedir. Şekil 10 ve 11 tohum verimi ve kapsül verimi karakterlerine ait histogram grafiklerini göstermektedir. Bu grafiklerin incelenmesinden bu karakterler için de geniş düzeyde genetik varyasyon olduğu saptanmıştır. İncelenen karakterler açısından ekonomik olarak en önemlisi olan morfin oranı genotipler arasında %0.24 ve %0.8 olarak değişiklik göstermekte olup morfin oranı için ortalama değer  $0.44 \pm 0.09$  olarak belirlenmiştir. Şekil 12 çalışmada kullanılan haşhaş genotiplerinin morfin oranına ait histogram grafiğini göstermektedir. Bu karakter için histogram grafiğinin incelenmesinden bu karakter için mevcut genetik varyasyon düzeyinin dar olduğunu göstermektedir.

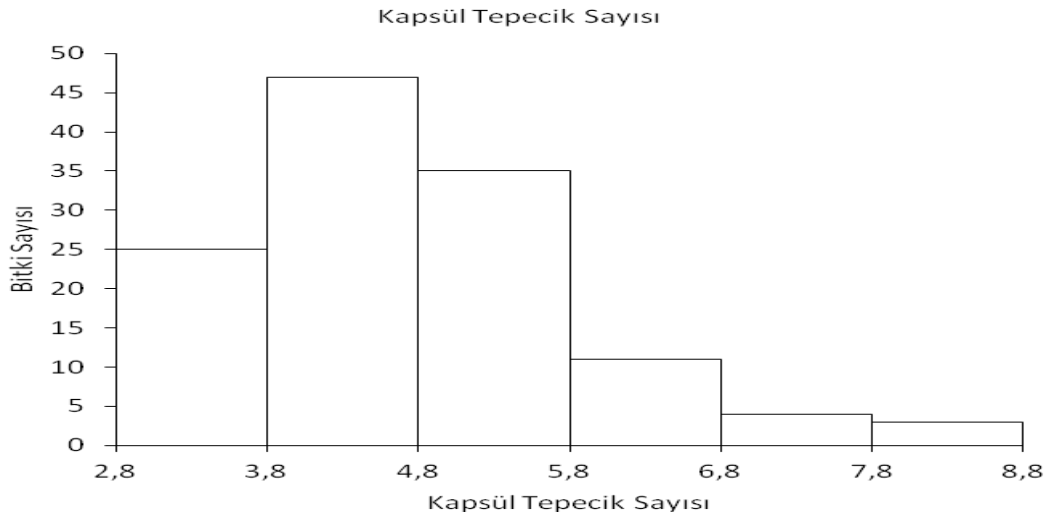
Şekil 3. Türk haşhaş genotiplerinin bitki boyu karakteri için histogram grafiği



Şekil 4. Türk haşhaş genotiplerinin dal sayısı karakteri için histogram grafiği

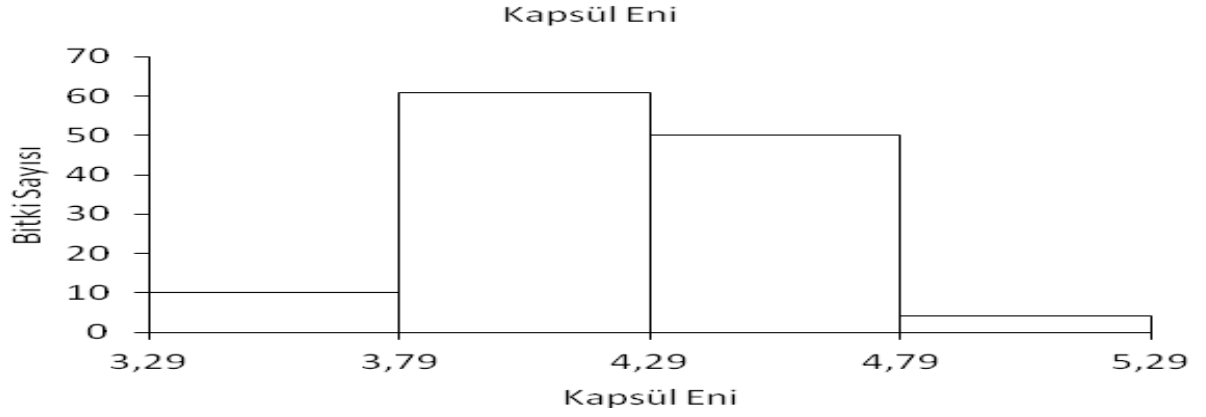


Şekil 5. Türk haşhaş genotiplerinin kapsül tepecik sayısı karakteri için histogram grafiği

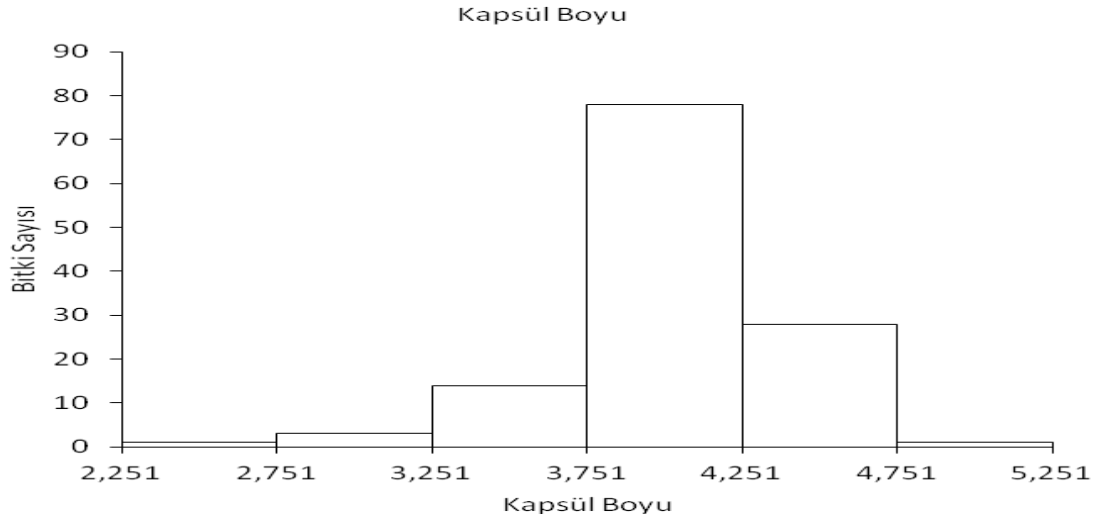




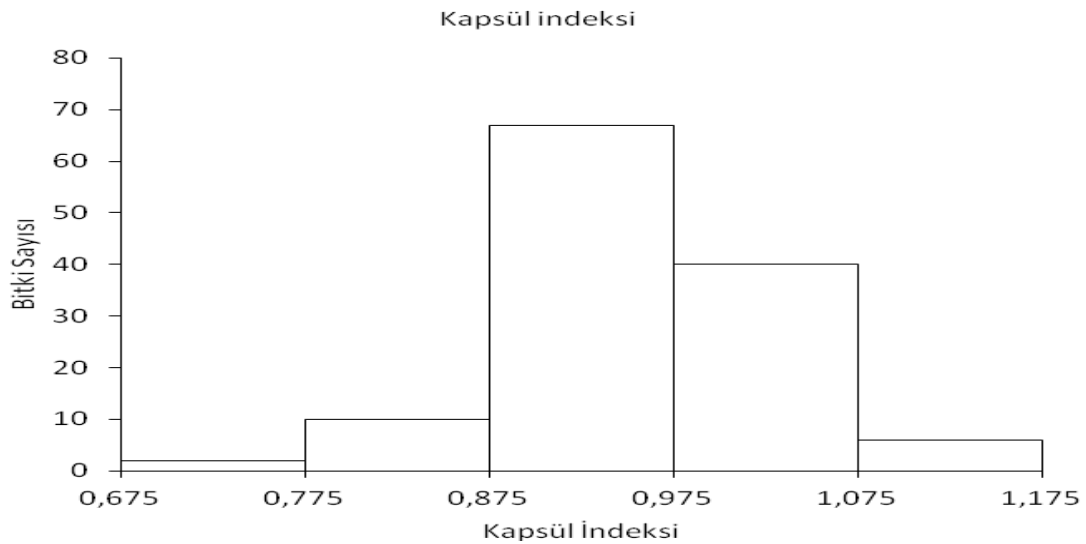
Şekil 6. Türk haşhaş genotiplerinin kapsül eni karakteri için histogram grafiği



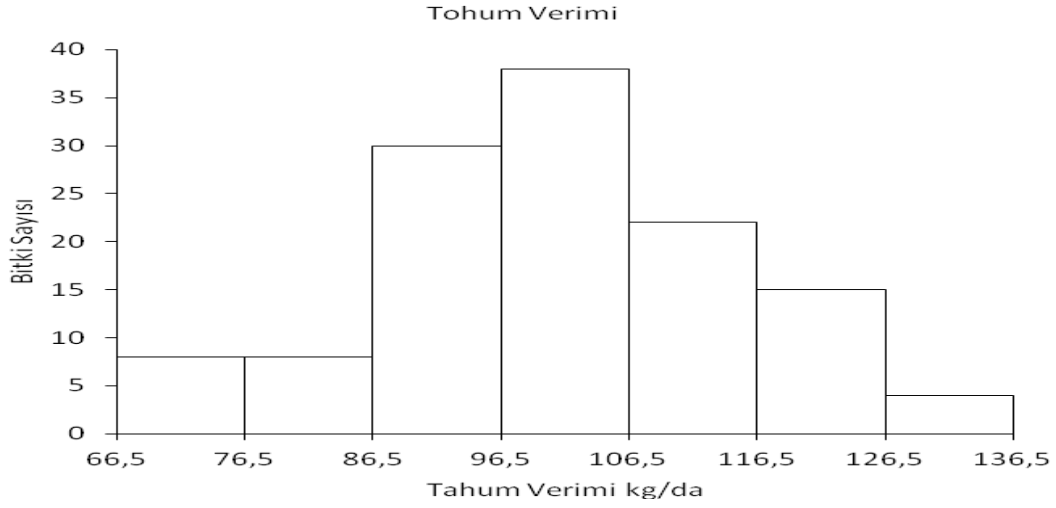
Şekil 7. Türk haşhaş genotiplerinin kapsül boyu karakteri için histogram grafiği



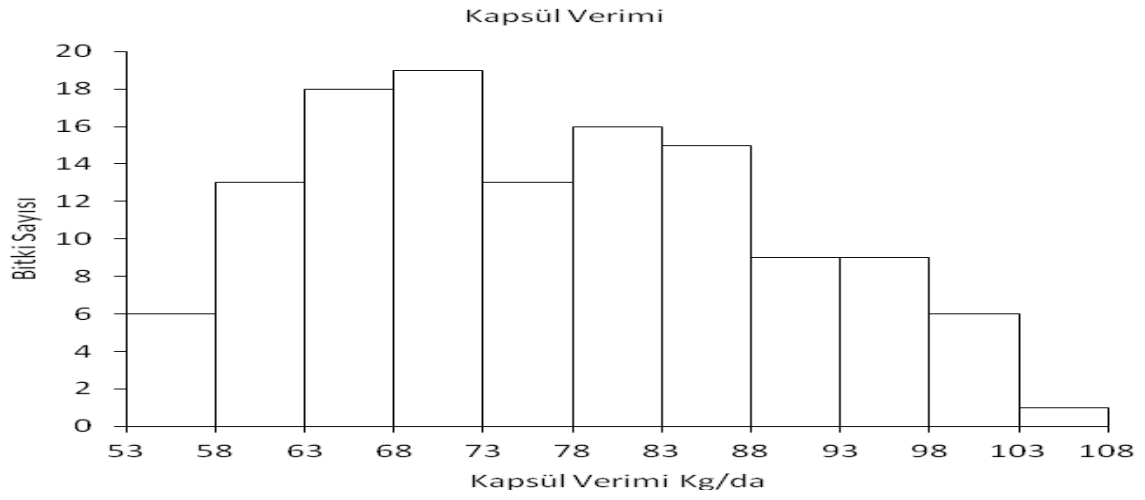
Şekil 8. Türk haşhaş genotiplerinin kapsül indeksi karakteri için histogram grafiği



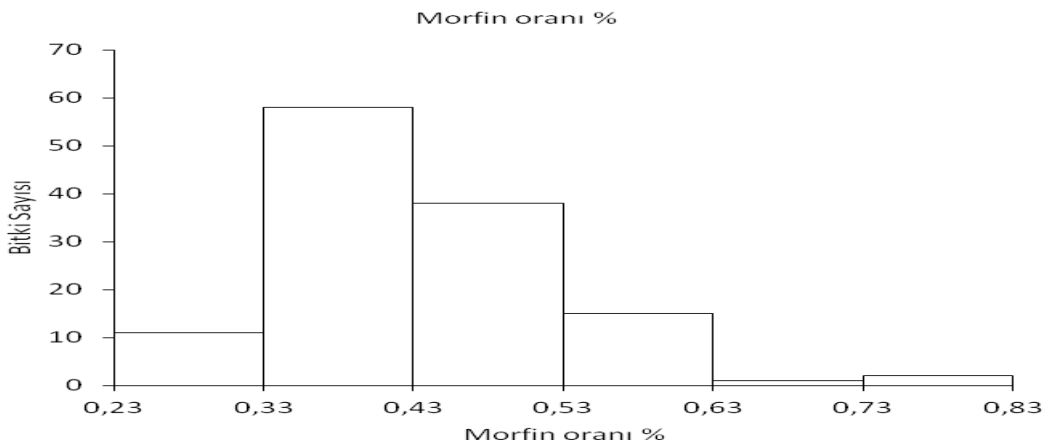
Şekil 9. Türk haşhaş genotiplerinin tohum verimi karakteri için histogram grafiği



Şekil 10. Türk haşhaş genotiplerinin kapsül verimi karakteri için histogram grafiği



Şekil 11. Türk haşhaş genotiplerinin morfin içeriği karakteri için histogram grafiği



Çalışmada kullanılan haşhaş genotiplerinin agro-morfolojik karakterleri ve morfin içerikleri için birbirleriyle olan ilişkileri SPSS istatistik programı kullanılarak hesaplanmıştır. Bitki boyu ve kapsül verimi arasında düşük düzeyde korelasyon ( $r=0.22$ ) belirlenmiştir. Buna benzer şekilde, bitki boyu ile tohum verimi arasında düşük düzeyde ( $r=0.177$ ) korelasyon belirlenmiştir. Beklenildiği gibi tohum verimi ve kapsül verimi arasında yüksek düzeyde ( $r=0.833$ ) korelasyon belirlenmiştir. Kapsül boyu ve kapsül eni arasında orta düzeyde korelasyon belirlenmiştir (Tablo 5).

Tablo 5. Haşhaş agronomik karakterlerinin korelasyon değerleri

Karakterler	Kapsül verimi	Tohum Verimi	Kapsül Boyu
Bitki Boyu	0.22	0.177	
Kapsül eni			0.463
Tohum verimi	0.833		

## 4.2. Moleküler Karakterizasyon

### 4.2.1. Türk Haşhaş Germplazmları Arasındaki Genetik Çeşitlilik Analizleri

Türk haşhaş genotipleri arasındaki genetik varyasyon düzeyini belirlemek için 125 adet haşhaş tohum örneği viyollere ekilmiştir ve bitki büyütme odasında yetiştirilerek DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. DNA izolasyonu için 2-4 gerçek yapraklı devreye ulaşan bitkilerin taze yakrak dokuları toplanmıştır. Yapraklar daha sonra homojenizatör (Tissue Lyser, QIAGEN) ile parçalanmış ve Promega kiti kullanılarak izole edilmiştir. Bazı genotiplerin DNA izolasyonunda FULTON ve ark (1995) tarafından tanımlanan mikro DNA izolasyon yöntemi kullanılmıştır. Elde edilen DNA'lar TE tampon çözeltisi içerisinde çözelti ve kalite ve miktarları Nanodrop ND-1000 spektrofotometresi ile ölçülmüş ve  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza altına alınmıştır. Tablo 6'da bu hatlara ait DNA miktarları verilmiştir.

Tablo 6. Çalışmada kullanılacak genetik materyallerin DNA miktarları

Pedigri No	Tür	Ülke	ng/ul	260/280
PI316811	Papaver bracteatum	Türkiye	845.05	2.01
PI376824	Papaver bracteatum	Türkiye	945.06	1.99
PI376830	Papaver bracteatum	Türkiye	376.57	1.8
PI376808	Papaver bracteatum	Türkiye	1296.89	1.96
WP11439	Papaver umbanatum	Türkiye	702.75	1.88
PI568210	Papaver umbanatum	Türkiye	752.35	1.87
PI568211	Papaver umbonatum	Türkiye	365.43	1.76
W611447	Papaver umbanatum	Türkiye	313.44	1.79
W623976	Papaver arenarium	Ermenistan	361.13	1.74
PI414784	Papaver bracteatum	İran	455.98	1.82
W623866	Papaver armeniacum	Ermenistan	314.84	1.82
PI376812	Papaver bracteatum	Türkiye	349.47	1.79
W618131	Papaver nudicaule	Mogolistan	680.92	1.85
W617203	Papaver rhoeas	Bulgaristan	459.79	1.72
PI229617	Papaver orientale	İran	566.31	.72
W610919	Papaver rhoeas	Bulgaristan	491.13	1.82
PI378582	Papaver orientale	İran	317.32	1.75
W611440	Papaver umbonatum	Türkiye	198.74	1.7
W611442	Papaver umbonatum	Türkiye	233.22	1.64
W611439	Papaver umbonatum	Türkiye	482.35	1.84
PI381607	Papaver bracteatum	İran	553.37	1.64

W611444	Papaver umbonatum	Türkiye	792.14	1.82
W611443	Papaver umbonatum	Türkiye	888.18	1.91
PI381612	Papaver Pseudo-orientale	İran	532.91	1.79
11T103	Papaver somniferum cv. 1259-1	Türkiye	1373.06	1.89
11T104	Papaver somniferum cv. Kemer kaya	Türkiye	466.27	1.78
11T105	Papaver somniferum cv. 1065	Türkiye	498.56	1.66
11T106	Papaver somniferum	Türkiye	1074.04	1.95
11T107	Papaver somniferum	Türkiye	468.82	1.69
11T108	Papaver somniferum	Türkiye	392.08	1.79
11T109	Papaver somniferum	Türkiye	484.65	1.82
11T110	Papaver somniferum	Türkiye	1302.01	1.9
11T111	Papaver somniferum	Türkiye	342.93	1.48
11T112	Papaver somniferum	Türkiye	1352.57	1.81
11T113	Papaver somniferum	Türkiye	1309.62	1.8
11T114	Papaver somniferum	Türkiye	103.4	1.75
11T115	Papaver somniferum	Türkiye	740.65	1.81
11T116	Papaver somniferum	Türkiye	531.83	2.1
11T117	Papaver somniferum	Türkiye	924.23	1.73
11T118	Papaver somniferum	Türkiye	546.11	1.53
11T119	Papaver somniferum	Türkiye	437.68	1.44
11T120	Papaver somniferum	Türkiye	292.33	1.62
11T121	Papaver somniferum	Türkiye	224.08	1.89
11T122	Papaver somniferum	Türkiye	1220.08	1.98
11T123	Papaver somniferum	Türkiye	859.79	1.85
11T124	Papaver somniferum	Türkiye	699.75	1.97
11T125	Papaver somniferum	Türkiye	1785.02	2
11T126	Papaver somniferum	Türkiye	1460.36	1.96
11T127	Papaver somniferum	Türkiye	1114.39	1.99
11T128	Papaver somniferum	Türkiye	1317.04	2
11T129	Papaver somniferum	Türkiye	1270.12	1.97
11T130	Papaver somniferum	Türkiye	562.82	2.08
11T131	Papaver somniferum	Türkiye	494.05	2
11T132	Papaver somniferum	Türkiye	701.72	2.02
11T133	Papaver somniferum	Türkiye	373.79	1.84
11T134	Papaver somniferum	Türkiye	507.81	2
11T135	Papaver somniferum	Türkiye	445.07	2
11T136	Papaver somniferum	Türkiye	775.9	2.06
11T137	Papaver somniferum	Türkiye	515.9	2.04
11T138	Papaver somniferum	Türkiye	440.21	2
11T139	Papaver somniferum	Türkiye	444.76	2.06
11T140	Papaver somniferum	Türkiye	761.56	2.02
11T141	Papaver somniferum	Türkiye	725.94	2.05
11T142	Papaver somniferum	Türkiye	692.65	2.09
11T143	Papaver somniferum	Türkiye	783.81	2.03

11T144	Papaver somniferum	Türkiye	307.07	2.02
11T145	Papaver somniferum	Türkiye	662.86	2.08
11T146	Papaver somniferum	Türkiye	527.43	2.04
11T147	Papaver somniferum	Türkiye	870.89	2.09
11T148	Papaver somniferum	Türkiye	808.76	2.01
11T149	Papaver somniferum	Türkiye	425.86	1.93
11T150	Papaver somniferum	Türkiye	765.03	1.85
11T151	Papaver somniferum	Türkiye	272.32	1.91
11T152	Papaver somniferum	Türkiye	371.84	1.94
11T153	Papaver somniferum	Türkiye	441.92	1.7
11T154	Papaver somniferum	Türkiye	722.33	1.98
11T155	Papaver somniferum	Türkiye	536.2	1.75
11T156	Papaver somniferum	Türkiye	742.31	1.98
11T157	Papaver somniferum	Türkiye	856.47	1.95
11T158	Papaver somniferum	Türkiye	730.32	2.01
11T159	Papaver somniferum	Türkiye	941.36	2.05
11T160	Papaver somniferum	Türkiye	1110.72	2.06
11T161	Papaver somniferum	Türkiye	956.16	2.07
11T162	Papaver somniferum	Türkiye	1591.72	2.01
11T163	Papaver somniferum	Türkiye	825.78	1.94
11T164	Papaver somniferum	Türkiye	1464.8	2.07
11T165	Papaver somniferum	Türkiye	1100.84	2.11
11T166	Papaver somniferum	Türkiye	1607.47	2.08
11T167	Papaver somniferum	Türkiye	1766.59	2.16
11T168	Papaver somniferum	Türkiye	1405.82	2.05
11T169	Papaver somniferum	Türkiye	1213.85	2.05
11T170	Papaver somniferum	Türkiye	735.78	1.96
11T171	Papaver somniferum	Türkiye	996.92	2.1
11T172	Papaver somniferum	Türkiye	1324.36	2.13
11T173	Papaver somniferum	Türkiye	475.84	2.04
11T174	Papaver somniferum	Türkiye	1192.5	2.04
11T175	Papaver somniferum	Türkiye	1312.55	2.01
11T176	Papaver somniferum	Türkiye	1257.9	2.04
11T177	Papaver somniferum	Türkiye	875.01	2.02
11T178	Papaver somniferum	Türkiye	978.65	2.02
11T179	Papaver somniferum	Türkiye	1206.71	2
11T180	Papaver somniferum	Türkiye	1978.76	2.06
11T181	Papaver somniferum	Türkiye	878.02	2.02
11T182	Papaver somniferum	Türkiye	922.3	1.9
11T183	Papaver somniferum	Türkiye	551.95	1.96
11T184	Papaver somniferum	Türkiye	1288.9	2.14
11T185	Papaver somniferum	Türkiye	1691.16	2
11T186	Papaver somniferum	Türkiye	1030.63	2.13
11T187	Papaver somniferum	Türkiye	961.68	2.1

11T188	Papaver somniferum	Türkiye	413.73	2.02
11T189	Papaver somniferum	Türkiye	721.61	2.07
11T190	Papaver somniferum	Türkiye	1066.06	2.07
11T191	Papaver somniferum	Türkiye	955.22	2.1
11T192	Papaver somniferum	Türkiye	1835.03	2.13
11T193	Papaver somniferum	Türkiye	1155.21	2.11
11T194	Papaver somniferum	Türkiye	1475.43	2.02
11T195	Papaver somniferum	Türkiye	1675.05	2.07
11T196	Papaver somniferum	Türkiye	1059.45	2.08
11T197	Papaver somniferum	Türkiye	1964.71	2.05
11T198	Papaver somniferum	Türkiye	1598.36	2.02
11T199	Papaver somniferum	Türkiye	1527.31	1.9
11T200	Papaver somniferum	Türkiye	1580.6	1.94
11T201	Papaver somniferum	Türkiye	876.45	2.11
11T202	Papaver somniferum	Türkiye	1335.13	2.12
11T203	Papaver somniferum	Türkiye	942.79	2.07
11T204	Papaver somniferum	Türkiye	1732.96	2.1
11T205	Papaver somniferum	Türkiye	975.97	2.01
11T206	Papaver somniferum	Türkiye	1873.15	2.08
11T207	Papaver somniferum	Türkiye	1139.51	2.02
11T208	Papaver somniferum	Türkiye	1073.69	2.05
11T209	Papaver somniferum	Türkiye	1490.22	2.08
11T210	Papaver somniferum	Türkiye	533.96	2.01
11T211	Papaver somniferum	Türkiye	810.04	2.04
11T212	Papaver somniferum	Türkiye	871.23	2.08
11T213	Papaver somniferum	Türkiye	1377.47	2.09
11T214	Papaver somniferum	Türkiye	1081.67	1.98
11T215	Papaver somniferum	Türkiye	1194.17	2.07
11T216	Papaver somniferum	Türkiye	1060.89	2.05
11T217	Papaver somniferum	Türkiye	1891.13	1.95
11T218	Papaver somniferum	Türkiye	1282.92	2.04
11T219	Papaver somniferum	Türkiye	1575.92	2.12
11T220	Papaver somniferum	Türkiye	1412.74	2.1
11T221	Papaver somniferum	Türkiye	1564.74	1.99
11T222	Papaver somniferum	Türkiye	1485.07	2.1
11T223	Papaver somniferum cv. OFİ58	Türkiye	1570.54	2.09
11T224	Papaver somniferum cv. TMO01	Türkiye	1329.37	2.09
11T225	Papaver somniferum cv. OFİ54	Türkiye	1450.79	2.02
11T226	Papaver somniferum cv. AFYON 95	Türkiye	1775.43	2.01
11T227	Papaver somniferum cv. TMO02	Türkiye	331.34	2 1
11T228	Papaver somniferum cv. OFİ 95	Türkiye	1557.4	2.11
11T229	Papaver somniferum cv. OFİ S3	Türkiye	1525.26	2.09
11T230	Papaver somniferum cv. OFİ 96	Türkiye	1884.79	2.04
11T231	Papaver somniferum cv. TMO03	Türkiye	1979.29	1.99

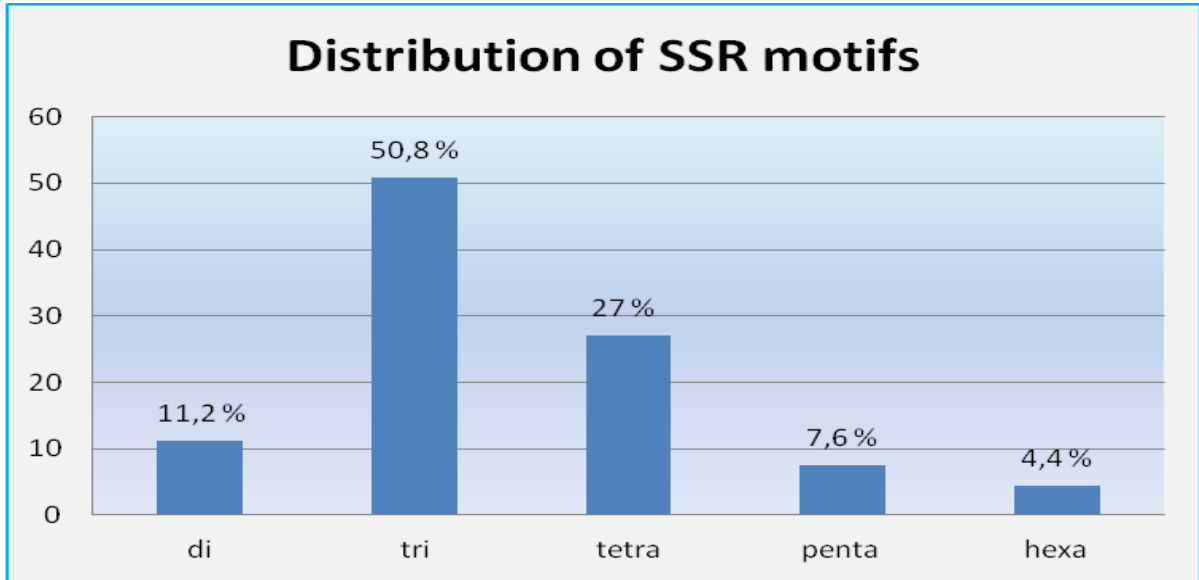
#### 4.2.2. EST-SSR Markörlerinin Geliştirilmesi ve Genetik Çeşitlilik Analizleri

Papaver somniferum için geliştirilmiş EST dizileri NCBI veri tabanından indirilmiştir. EST dizilerinden adaptor ve vektör dizilerini çıkarılmıştır. Bu dizi budama işlemi elde edilen dizilerin yanlış olarak biraraya gelmesini önlemek için gereklidir. Toplam 20062 dizi okuması CAP3 programı kullanılarak gruplandırılmıştır. Bu şekilde, toplam 9923 okuma 2056 contig halinde biraraya getirilmiştir. Biraraya getirilen contiglerin büyüklüğü 198 – 9387 nukleotid (bp) arasında değişmiştir ve ortalama 1209 bp uzunlukta olmuştur. Toplam 10139 okuma biraraya getirilememiştir. Bu analizler sonucunda, 12195 adet unigene dizisi belirlenmiştir. SSR belirlemek için programın parametreleri en az 6 adet dinukleotid tekrarı veya 4 adet trinukleotid tekrarı veya 3 adet tetra, penta ve hexanukleotid tekrarı olacak şekilde ayarlanmıştır. Bu şekilde, unigene olarak elde edilen 1784 (%14.6) diziden 2485 SSR belirlenmiştir. Trinukleotidler en yoğun gözlenen motiflerdir ve bunu tetra ve dinukleotidler takip etmektedir (Şekil 12). Haşhaş için NCBI veribankasında mevcut olan toplam 28.885 adet EST dizisi SeqClean programı kullanılarak temizlenmiştir. Bu temizleme işlemi sonucunda elde edilen veriler Tablo 7’de verilmiştir.

Tablo 7. Dizi önışlemesi ve montajlama istatistikleri

Parametreler	Ham (işlenmemiş) EST'ler	Temizlenmiş EST'ler	Contig'ler	Singlet'lar
Minimum dizi uzunluğu (nt)	50	101	135	101
Makimum dizi uzunluğu (nt)	2,435	2,435	5,600	2,435
Ortalama dizi uzunluğu (nt)	821.5 ± 279.9	823.7 ± 276.5	1,213.5 ± 542.2	849.5 ± 283.6
Toplam dizi sayısı	20,885	20,795	2,297	12,660
Toplam baz (nt) sayısı	17,158,054	17,130,647	2,787,822	10,755,450

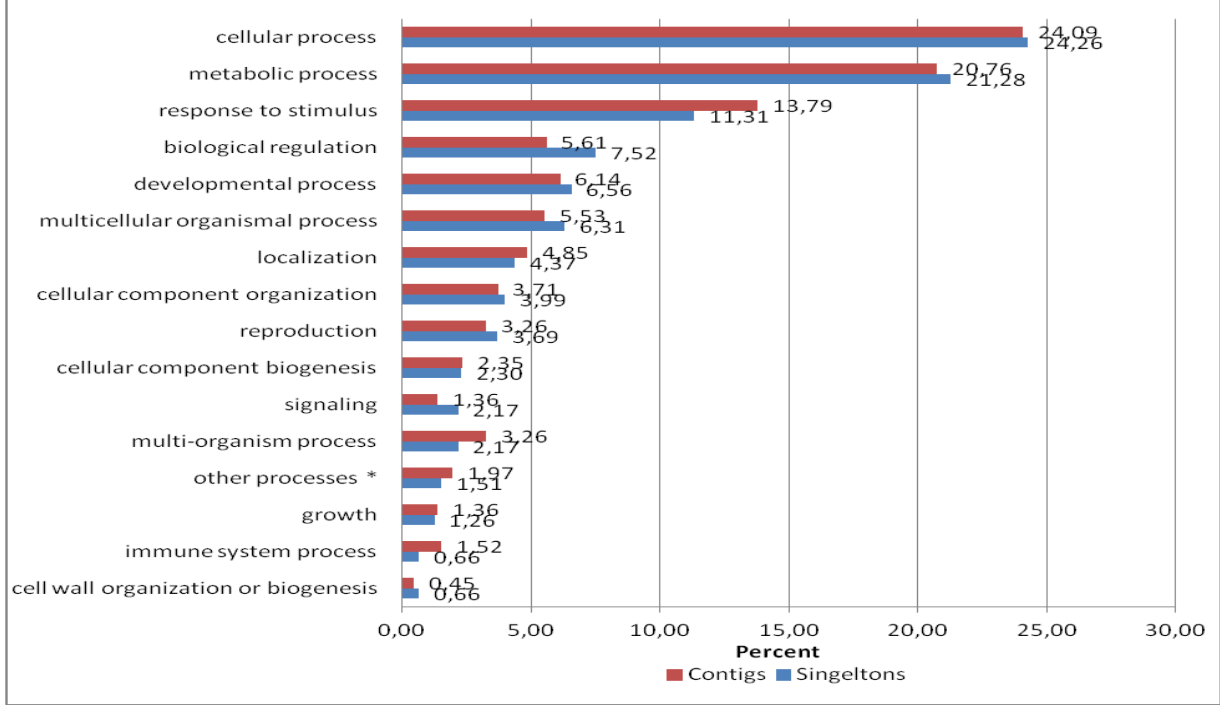
Şekil 12. Biraraya getirilen EST unigene dizilerinden elde edilen SSR motiflerinin dağılımı



Temizleme işleminden sonra, 20.795 EST dizisi MIRA programı kullanılarak montajlanmıştır. Sonuç olarak, 8.135 dizi okuması 2.297 adet contig içerisinde biraraya getirilmiştir ve oluşturulan contiglerin uzunlukları 135 – 5.600 nt arasında değişiklik göstermiştir ve ortalama contig uzunluğu 1.213 nt. olmuştur. Toplam 12.660 dizi okuması biraraya getirilememiştir ve singlet olarak kalmıştır. Bu singletların uzunluğu 101 – 2.435 nt arasında değişiklik göstermiştir ve ortalama singlet uzunluğu 850 nt olarak belirlenmiştir. Contigler ve singletlar birlikte 14.957 unigeneleri temsil etmektedir ve bu değer haşhaş genomunda yaklaşık 13.5 Mb DNA'ye denk gelmektedir. Blast2Go kullanılarak montajlanan EST lerin (contig veya singlet) gen fonksiyonları belirlenmiştir. Elde edilen EST dizileri halka açık bir veribankasından elde edildiği ve belli bir amaç için geliştirilmediği için çalışma kapsamında yapılan analiz sonuçlarından çok anlamlı sonuçlar beklenmemektedir. Bunun yanısıra , yinede genel öneme sahip olan birtakım biyolojik işlemler tespit edilmiştir ve sonuçlar Şekil 13’de verilmiştir. Toplam 2.456 unigene (550 contig + 1.906 singlet) nin ontolojileri belirlenmiştir. Singletların ve contiglerin ontolojileri

Şekil 1’de de gösterildiği gibi birbirine çok benzemektedir. Unigenelerin önemli bir kısmı hücresel ve metabolik işlemlerle (sırasıyla, %24 ve %21), çok daha az bir kısmı ise uyarıcı tepki (yaklaşık %12) reaksiyonları ilgili bulunmuştur. Biyolojik düzenleme, gelişimsel ve çok hücreli organizmal işlemler unigenelerin yaklaşık olarak %6 ile temsil edilmektedir. Geri kalan kategoriler ise toplam ünigenelerin %5’den daha az olarak karşımıza çıkmaktadır.

Şekil 13. Haşhaş genlerinin veribankaları ile kıyaslanması sonucu elde edilen fonksiyonel sınıfları



Bu çalışma kapsamında oluşturulan unigeneler kullanılarak SSR motifleri araştırılmıştır ve toplam 3.701 tekrarı olmayan SSR motifi 2.818 unigeneden saptanmıştır (Tablo 8). Tablo 8 haşhaş EST veribankasından belirlenen SSR'ların tekrar tiplerini vermektedir.

Tablo 8. Haşhaş SSR motif tipleri ve sıklığı

Tekrar Tipi	SSR'ların Sayısı	Bütün SSR'ların Oranı (%)
Mononucleotide	697	18.8
Dinucleotide	407	11.0
Trinucleotide	1435	38.8
Tetranucleotide	819	22.1
Pentanucleotide	224	6.1
Hexanucleotide	93	2.5
Heptanucleotide	20	0.5
Octanucleotide	6	0.2
Total	3701	100

Bu analizlere göre, unigenelerin %18.8'i en az bir SSR motifi içermektedir. Toplam SSR motif uzunluğu 156 nt ye kadar değişiklik göstermiştir. Belirlenen en uzun SSR motifi hexanucleotide tekrarıdır. Çok sayıda unigene birden çok sayıda SSR motifi içerdiği gözlenmiştir. Örneğin, sırasıyla, 446 unigene (SSR motifi taşıyan unigenelerin %16'sı) 2 SSR, 125 unigene (%4) 3 SSR, 32 unigene (%1) 4 SSR ve 14 unigene (%0.5) ise 5 SSR motifi içermektedir. İlave, 2 unigenenin (<0.1%) 7 SSR ve sadece 1 unigenenin ise 8 SSR motifi içerdikleri belirlenmiştir. Belirlenen SSR motiflerinin üçte biri (%39'u) trinukleotide tekrarıdır. Tetra- ve mononucleotide tekrarları da genel olarak gözlenmektedir (sırasıyla,



%22 ve %19). Dinukleotideler bulunma çokluğu bakımından dördüncü sırada yer almıştır ve toplam SSR'ların %11'i dinukleotide tekrarlarıdır. Bunun yanısıra, penta- ve hexanukleotideler çok az sıklıkta rastlanırken (sırasıyla, %6 ve %3), hepta- ve octanucleotideler birlikte belirlenen SSR motiflerinin %1'inden daha azını oluşturmaktadırlar. Mononukleotide tekrarları arasında (A/T)n tekrarları (G/C)n tekrarlarına göre daha fazla sıklıkta gözlenmektedir ve mononukleotidelerin %57'si (A/T)n tekrarlarıdır (Tablo 9). Tablo 9 en çok gözlenen SSR motiflerini vermektedir.

Tablo 9. Haşhaş EST veribankalarında en yoğun gözlenen SSR motifleri

SSR motifi	SSR motiflerinin sayısı	SSR
		Motiflerinin yüzdesi
A/T	400	57.4
AT/TA	71	17.4
TA/AT	66	16.2
AG/TC	54	13.3
GA/CT	51	12.5
TTC/AAG	89	6.2
AAG/TTC	84	5.9
GAA/CTT	82	5.7
AGA/TCT	78	5.4
AAAT/TTTA	47	5.7
AAATA/TTTAT	19	8.5

Dinukleotide tekrarları arasında, (AT/TA)n ve (TA/AT)n tekrarları en bol gözlenen motiflerdir (sırasıyla, %17 ve %16). Trinukleotideler arasında, (TTC/AAG)n ve (AAG/TTC)n tekrarları en çok gözlenen trinukleotide tekrarlarıdır (yaklaşık %6). Sadece 1 motif tetra- ve heptanukleotidelerin %5'inden daha fazla sıklıkta gözlenmiştir. Her ikisinde AT-zengin tekrarları olup: AAAT/TTTA ve AAATA/TTTAT dizileri şeklinde ortaya çıkmaktadırlar.

SSR motiflerini iki uçtan çevreleyen primerler yine Batchprimer3 programı kullanılarak dizayn edilmiştir. Primer dizayn kriterleri arasında %50 GC içermesi ve PCR ürün büyüklüğünün en az 150 bp olması yer almaktadır. Böylece, belirlenen SSR motiflerinin %86.4'üne denk gelen 2147 primer çifti geliştirilmiştir. Genetik çeşitlilik analizlerinde kullanılmak üzere toplam 100 adet primer sentezletirilmiştir. Sentezletirilen primerlerin DNA dizi analiz cihazında kullanımı için ileri primerin 5' önüne M13 primer dizisi eklenmiştir (Tablo 10).

Tablo 10. EST dizilerinden geliştirilen SSR dizileri

Primer Name	Sequence
psSSR001-F	CACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTTGGTATCAACCGTTTAGGC
psSSR001-R	TATTCACCTCAACCGGAAG
psSSR002-F	CACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGTTTACGGGCATCCAAC
psSSR002-R	GTTGAGGCTTTTCACCCTAC
psSSR003-F	CACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTCACCACTGGTCTTGAATCTC
psSSR003-R	CTCTTCCCACCACACTCTTA
psSSR004-F	CACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTACGTATGCACGCAAGTAAC
psSSR004-R	GCAGTACCAACACCAAGTTT
psSSR005-F	CACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGGTAGAATGATGAGGCCTAGTA
psSSR005-R	ATCTTCGAGGGACAACCTCTC
psSSR006-F	CACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGTCCAAAGTCCAGTCCAAT
psSSR006-R	CGGATTTGTGCTTAGGTAGA
psSSR007-F	CACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGTGGCCTATGTGAAGATTTG

psSSR007-R	TAGCTCCACTTCATCCAAC
psSSR008-F	CACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGAAGCCGTTGTTTCGGTA
psSSR008-R	GGACTAGGATTCCACCATTG
psSSR009-F	CACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGTCTCGCGATTTCTACTTGT
psSSR009-R	TTACCTCTTTAGGGGGAAAC
psSSR010-F	CACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGTGGGTATGAGCAGCAG
psSSR010-R	TTGGTGGTGTCCAAGAAG
psSSR011-F	CACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTAAAGCACCCCATTTCCACC
psSSR011-R	TTACCAGTTCCTCCCTCAC
psSSR012-F	CACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTCTGAAATCCTTCTATGTGC
psSSR012-R	TTCCTCACACTCCATATCGT
psSSR013-F	CACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTCAAGTAAGCCTAACCCATGA
psSSR013-R	TAAGGTTAGGAGCCCAATG
psSSR014-F	CACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTCGTGGAATGAACGAGATG
psSSR014-R	GCAGCAGCAGGTAAGAA
psSSR016-F	CACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTCTCTCAATGCTCTTCTGACA
psSSR016-R	GCTTCTCAAACCAGCTAAGA
psSSR017-F	CACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGATTTACAGGTTCTGAAGTGG
psSSR017-R	CCCTTCCGTAGGGTTTTA
psSSR018-F	CACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTCTGCAAGGTTTTGTGTTCTC
psSSR018-R	ACGACAGCCCATACAAGTAG
psSSR019-F	CACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTCGTCTCTTTGGTTGTGTCTT
psSSR019-R	GTCCAAAGTCCAGTCCAAT
psSSR021-F	CACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGACAGGCTGAAGATAGTTCCG
psSSR021-R	CCCAGGTTTCATTCTCTAGT
psSSR022-F	CACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGCACGTGAATATCAAGTCCT
psSSR022-R	TGATTGACTAGTTGCGTGAG
psSSR023-F	CACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGTATGCCTACGCGATTTG
psSSR023-R	GGGATTTCATGCTACTCAG
psSSR024-F	CACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTCTGTAGCGGCCTAATACAGT
psSSR024-R	GACTCCTAGGTTTGAACGAG
psSSR025-F	CACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGAGGCATATTCTGGCTCAC
psSSR025-R	GACGTTTTGACCTGGAGAC
psSSR026-F	CACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGTGGGTTCCCTTGTATCTG
psSSR026-R	TCCTAAACCCCTCTCTTCTC
psSSR027-F	CACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGCTCATGACCTATTTTCAGC
psSSR027-R	CGAGCAACTGAGCAAGTATT
psSSR028-F	CACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTAGGGTTTGGAGAGAAGAAAC
psSSR028-R	GTTGGCCACCTAAACAATC
psSSR029-F	CACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTTGTAICTCGACAATGATGCAC
psSSR029-R	TCACCAGTCATGGGAATC
psSSR030-F	CACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTCTTGCGATCAAGGTATCCTA
psSSR030-R	GATCGTTCCACAGAGAGTA
psSSR031-F	CACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGACAGCTTGCCCTGCTAGTAT

psSSR031-R	TACTGCTGGGAAGAACCA
psSSR032-F	CACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGCAGAGGATATGACTGTTCCG
psSSR032-R	AGCTTGAACAGACCGTACAC
psSSR033-F	CACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTAGGGGGACAAATATAGGGTA
psSSR033-R	GGATATGTGGTGGTGCTACT
psSSR035-F	CACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGGATTCCCTTGCAAGTCAAC
psSSR035-R	GGCAGGTAGTGTTGGTATTC
psSSR036-F	CACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTTGTCAGTGGAAGTCAATGGTA
psSSR036-R	CTGCAATCTCTTTCCTATGG
psSSR037-F	CACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGGATGTTTCTTGTTGTTCC
psSSR037-R	GCCATCAATCTCTTCTTCT
psSSR039-F	CACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTACTTAAGGCATCATCTCAGC
psSSR039-R	GAATAGCCAGTGTCTCAAGG
psSSR040-F	CACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTACTTACACACAAGCGAGGT
psSSR040-R	GGACCATGTTTCCAAGT
psSSR041-F	CACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGTAGATTGGCCTTGTGAGAG
psSSR041-R	CACTCCGAGCTGTTTCTAAC
psSSR043-F	CACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGGGTAAACTGTTTCGCTGAC
psSSR043-R	TAGAGGACCATGCTGCGTA
psSSR044-F	CACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGTAGTTCCTTCTGCTGTTGG
psSSR044-R	TGCGGATGTGTAAGTCTG
psSSR045-F	CACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTCAAAGTGCCTGAGGAAAC
psSSR045-R	GTTAGCGTAGACACCCATTG
psSSR046-F	CACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGTAGGGGGAAACTAGTCCAT
psSSR046-R	CAGGATGCGATGAAGAAG
psSSR047-F	CACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGTAGATGTGGAAGCATTGG
psSSR047-R	GGATGACTTAGAGCACAAAG
psSSR048-F	CACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTCGATTGTCCAGTCGAAAG
psSSR048-R	ACGTCTCTTGGTTGTGTCT
psSSR049-F	CACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTCCATTATCACTAGGGTGGTG
psSSR049-R	GAGCAGTCTTGCTCTCATTC
psSSR050-F	CACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTATGGAGCCAAGTATGCTG
psSSR050-R	CAACTCGGTGCGTATCAT
psSSR051-F	CACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTCCAAGAGAAGAAGAAGATGG
psSSR051-R	GGCTTTATTCGGTACGTCTA
psSSR052-F	CACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTCATATACCTGCGTGACCAGT
psSSR052-R	CCCACAGACTCTTCTCCTCT
psSSR053-F	CACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTCTGAGCTCAAAGCATCC
psSSR053-R	CTAAGCCACACACGTTTAC
psSSR054-F	CACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTATCTTCTGTGGGTTGGT
psSSR054-R	GTGCTAAAGAGCAGACCCTA
psSSR055-F	CACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTACCAGTCTCTCACATTGG
psSSR055-R	GGGCTTCACAAGAGGTA
psSSR056-F	CACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTCCGTTGACGTTAAGTTGG

psSSR056-R	CTCTTACGTCCATCGAACAC
psSSR057-F	CACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTTTATAGGCAGCTTGGATCTC
psSSR057-R	CCCTTCCACATTGAGTATGT
psSSR058-F	CACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGGTACCTTTACACGGAGTTG
psSSR058-R	TACAGGTAAGTGGTCCTGGTC
psSSR059-F	CACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGAGCAGCAGAGGATATGAAG
psSSR059-R	CCTCACCAAACCTCTTACACC
psSSR060-F	CACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGCTGGAAAGAGCTAGATTTG
psSSR060-R	GTCGTAATCCTGATGATGG
psSSR061-F	CACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTTGGTAGAATGTGTGATGGTG
psSSR061-R	ATTACCACCGCTCTCCAG
psSSR062-F	CACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTTCGACTCAGTCCATAGACAA
psSSR062-R	CAATGTATGCGAGTTCGAC
psSSR063-F	CACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGCATCTGGGTCGTTACAG
psSSR063-R	GATGATGAGGAGGACTCTGA
psSSR064-F	CACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTTTAAGGATACCCTTCCGTAG
psSSR064-R	CTAAGGACTTGGAACAAAGC
psSSR065-F	CACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTCCCACAACCATTTGCTAC
psSSR065-R	GCCCCATCTAGTCATCAAC
psSSR066-F	CACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTCTCATGAACTCAGGTTTCGTT
psSSR066-R	GTTCCAATGTCCTTCATGTC
psSSR067-F	CACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGAAGGAAAAACCTCAAGTC
psSSR067-R	GCATAAAGTTGCACTCTCGT
psSSR069-F	CACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTCGATCTTAGTCATCGTTCGT
psSSR069-R	CTTAGACCAAACGCAAAGAC
psSSR070-F	CACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTCGTTGGGATTCGAACTACT
psSSR070-R	CCTTCTCACATACCTTCCTG
psSSR071-F	CACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGAACATGCCATCACATC
psSSR071-R	GTCTGTAGCAGCCTTTTCC
psSSR072-F	CACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTTAACCAGGGGTCAGTGTAGTA
psSSR072-R	GGTATTTGTGAGTGCTGGAG
psSSR073-F	CACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGAAGTTGCTCTTGCTGAAGT
psSSR073-R	GCTGGCAACAACCTCTATCTT
psSSR074-F	CACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTTCAGACTCTCTTCCCTCTCC
psSSR074-R	CTCCTATCACATGGGTGAAC
psSSR075-F	CACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTACCTTCTCATCATCAACAC
psSSR075-R	GGTCCAAGAAGACGAGATTT
psSSR076-F	CACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTCCTTCGTCGTTTCATCATC
psSSR076-R	GGTCCTAGGGTGGAGAATAC
psSSR077-F	CACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTATCCTGTCTGTTATCCGATG
psSSR077-R	TTACCGGTCTAGAAATGAGG
psSSR078-F	CACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGAAGAAGCGAAACCCATC
psSSR078-R	CCACAACAGTCTCACAACCC
psSSR079-F	CACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTCCGAAGTTAGCCATATGAAC

psSSR079-R	CACACCGTGGCTTAATGT
psSSR080-F	CACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTCATGGGATCAAGGAAACC
psSSR080-R	CACCTCATGGTTCCTCATTA
psSSR081-F	CACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGAGATACGCACAGTTTACGC
psSSR081-R	GAAGGAGAACTAGGGTTTGG
psSSR082-F	CACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTTGAGATAAGCACAGTTCACG
psSSR082-R	TGACTAGGGTTTGAATAGC
psSSR083-F	CACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGACCGAAGGTCTAGTTTTGG
psSSR083-R	CCCTGAACCAGATTTATTCC
psSSR084-F	CACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGACGCAAACACACATATCC
psSSR084-R	AACTAGGGTTTGAATAGCC
psSSR085-F	CACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGGGTTTTGAACTAAGTGCTC
psSSR085-R	GGAGCAATTGATGGTTAGAG
psSSR086-F	CACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGCCTGTGTGAGGTGTAAATA
psSSR086-R	ACGAACACAACCTACCAAGC
psSSR087-F	CACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGAGAGCTGCCATTAGATGC
psSSR087-R	GAGTCGTGCATGATTCCA
psSSR088-F	CACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTTGGAGGATCATGGTAAGG
psSSR088-R	GGAGGAAGGAAAAACCAC
psSSR089-F	CACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTATTTAGGATTCACGGGTACG
psSSR089-R	GTACGAGCATTACCTTTGA
psSSR090-F	CACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTTACGGTCCTTACCTGTTAGC
psSSR090-R	AGAAGAAAGTTGCGTGAGAG
psSSR091-F	CACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTACGTCCTTGAGTGTCTTCC
psSSR091-R	GAACGTTCTGTACTCCTCT
psSSR093-F	CACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGTGGCCACCTAAACAATC
psSSR093-R	GAGTTCTTCTGCAACTACCG
psSSR094-F	CACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGTGGAGAGAACAACAACCAT
psSSR094-R	GATAGAAAGGGTCTTTTGG
psSSR095-F	CACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTCAGAACCGAACTAGACGAAC
psSSR095-R	GCTATCGTAGGACAAGCTCA
psSSR096-F	CACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTCATCGACGAGACATTGAAG
psSSR096-R	ATGGATGACTCCGAGCTTA
psSSR097-F	CACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTTTCCAGTAGTCCCTCTGAAG
psSSR097-R	CTGGGTTTATGAGGTTGG
psSSR098-F	CACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTAAGGGGAAGAAGATCTTAGC
psSSR098-R	AACTGATACTTTGCCAGTCC
psSSR099-F	CACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTTCGTGGGTTATCTCAATCTC
psSSR099-R	AATGAGTGATAGCACCTTGG
psSSR100-F	CACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGGGTATACTTGGGTTTGGGA
psSSR100-R	CCCTTTTGAACCTTCTACGTG

Proje kapsamında geliştirilen EST-SSR ların haşhaş ve yabancı türlerinde çalıştığını göstermek üzere Türkiye'de yetiştirilen 37 haşhaş çeşiti ve 7 adet yakın akraba türden oluşan bir panel kullanılmıştır. 9 adet kültür çeşiti Toprak Mahsülleri Ofisi (TMO) tarafından sağlanmıştır. Diğer kültür ve yabancı formlara ait tohumlar Anadolu Tarımsal Araştırma Enstitüsü tarafından sağlanmıştır. Çalışmada

kullanılacak 7 adet yabancı tür arasında *Papaver orientale* (Iran), *Papaver pseudoorientale* (Iran), *Papaver bracteatum* (Iran), *Papaver rhoeas* (Bulgaria), *Papaver umbonatum* (Turkey), *Papaver nudicaule* (Mongolia) ve *Papaver armeniacum* (Armenia) yer almaktadır (Tablo 11). Tohum örnekleri DNA izolasyonu aşamasına kadar bitki büyütme kabini içerisinde yetiştirilmiştir. Genomik DNA'ların izolasyonunda CTAB (Doyle 1990) metodu kullanılmıştır.

Tablo 11. Çalışmada geliştirilen SSR markörlerinin değişik türlerdeki etkinliğini testlemek için kullanılan genotipler

Genotip isimleri	Kaynak	Lokasyon
1290	ETAE	-
1061	ETAE	-
1259	ETAE	-
1065	ETAE	-
kemerkaya	ETAE	-
aday1	ETAE	-
tınaztepe	ETAE	-
zaferyolu	ETAE	-
anayurt	ETAE	-
afyon95	ETAE	-
ofis3	TMO	-
ofis4	TMO	-
ofis8	TMO	-
ofis95	TMO	-
ofis96	TMO	-
TM01	TMO	-
TM02	TMO	-
TM03	TMO	-
TM04	TMO	-
PI 229617 ( <i>Papaver orientale</i> )	ETAE	Iran
PI 381612 ( <i>Papaver pseudo-orientale</i> )	ETAE	Iran
PI 414784 ( <i>Papaver bracteatum</i> )	ETAE	Iran
W6 10919 ( <i>Papaver rhoeas</i> )	ETAE	Bulgaria
W6 11444 ( <i>Papaver umbonatum</i> )	ETAE	Turkey
W6 18131 ( <i>Papaver nudicaule</i> )	ETAE	Mongolia
W6 23866 ( <i>Papaver armeniacum</i> )	ETAE	Armenia
5	ETAE	BURDUR-ÇELTİK
12	ETAE	YALVAÇHÖYÜKLÜ-İSPARTA
16	ETAE	ÇAMLİBEL ULUBEY -UŞAK
26	ETAE	DEREŞENEK-AFYON
32	ETAE	AFYON-MERKEZ
33	ETAE	SANDIKLI-EKİNHİSAR
37	ETAE	YALVAÇHÖYÜKLÜ-İSPARTA
40	ETAE	İSPARTA
41	ETAE	ŞUHUT KOÇYATAĞI
45	ETAE	SİMAV-KÜTAHYA

48	ETA E	ÇİVRİL KARAYAHŞİLER-DENİZLİ
62	ETA E	SÜLÜMENLİ-AFYON
72	ETA E	KOÇYATAĞI-ŞUHUT-AFYON
76	ETA E	UŞAK-GÖGEN
78	ETA E	SANDIKLI-ALACAMI-AFYON
92	ETA E	BOLVADİN-MERKEZ
96	ETA E	KÜTAHYA
111	ETA E	ŞUHUT-AFYON

Çalışmada toplam 35 adet EST-SSR primeri kullanılmıştır. PCR reaksiyonları için karışım 8 pmol M13 geri primeri, 2 pmol ileri primeri, 0,2 mM dNTPs, 50ng kalıp DNA, 1U Taq DNA polimeraz, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,024mM M13 ve 2,5ul PCR buffer içermiştir ve toplam reaksiyon hacmi 25 ul'dir. PCR koşulları ise 94°C'ta (5 dk), daha sonra 94°C (30 s) / 56°C (45 s) / 72°C (45 s)'den oluşan 30 döngü, ardından 94°C (30 s) / 53°C (45 s) / 72°C (45 s)'den oluşan 8 döngü ve son olarak da 72°C'ta 10 dk'lık son uzatmadan oluşmaktadır. PCR'in sonlanmasının ardından 3ul PCR ürünü 27ul örnek yükleme (sample loading) tampon çözeltisi (Backman) ve 0,5ul 600bp size standart (Backman) ile karıştırılıp Backman CEQ8800 cihazında kapiller elektroforezi gerçekleştirilmiştir. 35 SSR primer toplam 267 polimorfik parçacık (band) üretmiştir (Tablo 12). Bütün genotipler için ortalama polimorfik bilgi içeriği (PIC = Polymorphism Information Content) en düşük psSSR051 ve psSSR099 için 0.09 ile en yüksek psSSR053 için 0.30 arasında değişiklik göstermiştir. Sadece *P. Somniferum* tohum örnekleri düşünüldüğünde çoğu SSR markörlerinin ortalama polimorfik bilgi içeriği önemli ölçüde azalma göstermiştir. *Papaver somniferum* kıyaslamaları için en çok bilgi veren markörler 0.26 ve 0.27 PIC değerleri ile psSSR079, psSSR086 ve psSSR053 markörleridir. 35 SSR marköründen 4 adeti *P. somniferum* tohum örnekleri için hiç polimorfik bulunmamışlardır. Sonuç olarak, EST dizilerinden geliştirilen SSR markörlerinin büyük bir çoğunluğunun *Papaver somniferum* tohum örnekleri içerisinde polimorfik oldukları gösterilmiştir. Bunun yanısıra, geliştirilen markörlerin sadece *P. somniferum* değil diğer papaver türlerinde de çalışmasından dolayı, markörlerin diğer papaver türleri için de polimorfik oldukları ve taşınabildikleri gösterilmiştir.

Tablo 12. SSR markörleri ile üretilen parçacık sayıları

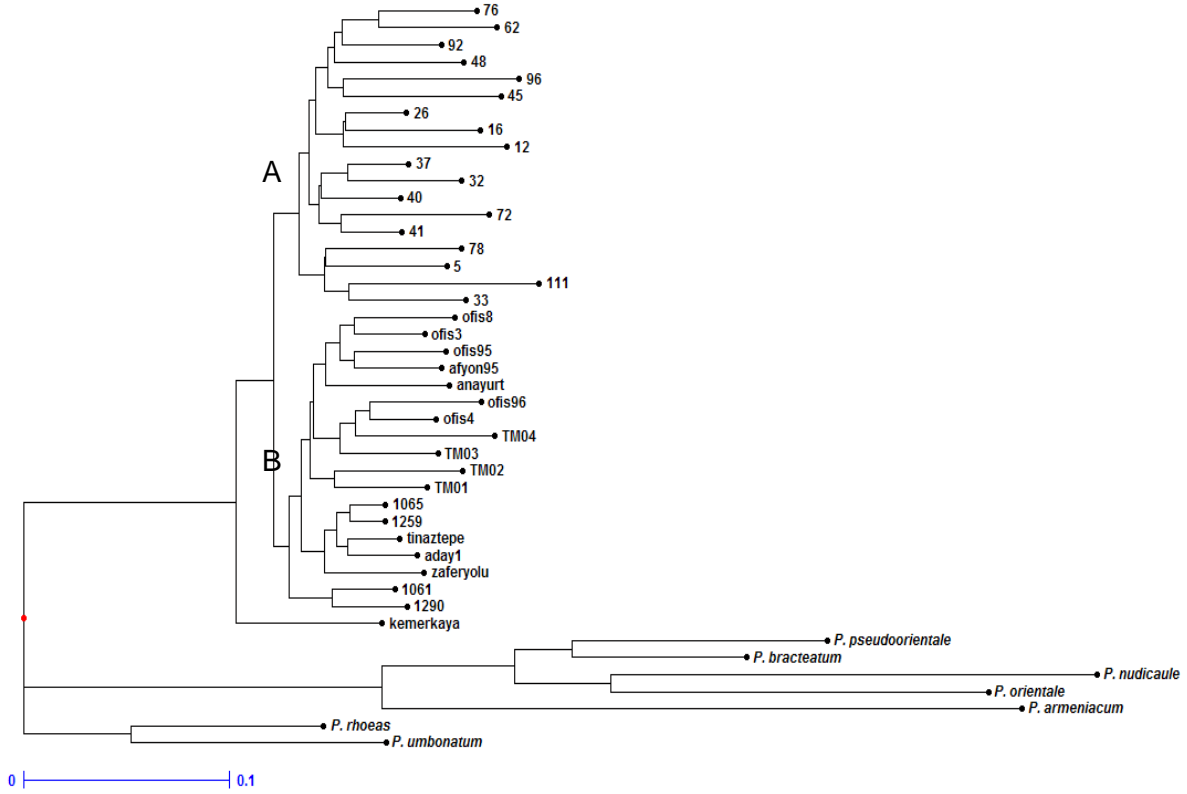
SSR markörü	Tekrar Motifi	Polimorfik parçacık sayısı/Toplam parçacık sayısı	Ortalama PIC ± SE (bütünörneklerde)	Polimorfik parçacık sayısı/Toplam parçacık sayısı (P.somniferum)	Ortalama PIC± SE (P.somniferum)
psSSR079	(TG)6	9/9 (100%)	0.25 ± 0,04	4/4 (100%)	0.26 ±0,09
psSSR013	(TTTTTC)3	10/12 (83%)	0.23 ± 0,06	8/12 (67%)	0.20 ±0,06
psSSR087	(TTTC)3	7/7 (100%)	0.27 ± 0,06	4/6 (67%)	0.12 ±0,56
psSSR010	(AGAA)3	6/6 (100%)	0.22 ± 0,06	1/2 (50%)	0.25 ±0,18
psSSR030	(TTTTA)4	3/7 (43%)	0.13 ± 0,06	1/5 (20%)	0.01 ±0,01
psSSR047	(ATGT)3	11/11 (100%)	0.29 ± 0,04	8/9 (89%)	0.15 ±0,04
psSSR028	(TGAT)3	10/11 (91%)	0.25 ± 0,05	3/6 (50%)	0.10 ±0,07
psSSR058	(TGTACC)3	11/11 (100%)	0.19 ± 0,04	4/9 (44%)	0.07 ±0,05
psSSR091	(TG)8	7/7 (100%)	0.23 ± 0,04	6/6 (100%)	0.18 ±0,04
psSSR051	(AGA)4	6/6 (100%)	0.09 ± 0,03	0/2 (0%)	0
psSSR086	(TGTGT)3	11/11 (100%)	0.27 ± 0,04	9/9 (100%)	0.27 ±0,05
psSSR055	(TTATT)4	17/17 (100%)	0.18 ± 0,02	2/9 (22%)	0.06 ±0,05
psSSR022	(CAAT)3	14/22 (64%)	0.12 ± 0,02	6/16 (38%)	0.03 ±0,02
psSSR054	(TTTTG)3	23/23 (100%)	0.23 ± 0,02	7/9 (78%)	0.09 ±0,04
psSSR071	(CT)6	10/10 (100%)	0.24 ± 0,05	7/7 (100%)	0.19 ±0,07

psSSR060	(ATG)4	7/7 (100%)	0.15 ± 0,04	0/1 (0%)	0
psSSR037	(GAA)4	10/10 (100%)	0.20 ± 0,05	6/6 (100%)	0.21 ± 0,06
psSSR014	(CT)8	7/12 (58%)	0.16 ± 0,05	5/11 (45%)	0.14 ± 0,06
psSSR081	(TAAA)3	18/18 (100%)	0.16 ± 0,03	6/8 (75%)	0.13 ± 0,51
psSSR076	(AT)8	37/38 (97%)	0.16 ± 0,02	5/17 (29%)	0.05 ± 0,03
psSSR080	(AAT)4	20/22 (91%)	0.15 ± 0,03	6/22 (27%)	0.06 ± 0,02
psSSR099	(ATC)5	5/7 (71%)	0.09 ± 0,03	2/5 (40%)	0.03 ± 0,02
psSSR096	(GTCT)4	9/9 (100%)	0.20 ± 0,03	2/5 (40%)	0.04 ± 0,03
psSSR004	(AAG)4	9/10 (90%)	0.17 ± 0,04	4/8 (50%)	0.09 ± 0,04
psSSR100	(ACT)3	13/13 (100%)	0.17 ± 0,03	11/11 (100%)	0.12 ± 0,04
psSSR045	(TTC)5	12/13 (92%)	0.21 ± 0,03	9/12 (75%)	0.09 ± 0,02
psSSR001	(TG)6	22/28 (78%)	0.19 ± 0,03	10/23 (43%)	0.06 ± 0,02
psSSR002	(TTTG)3	41/41 (100)	0.16 ± 0,02	34/34 (100%)	0.17 ± 0,02
psSSR024	(TTTGT)3	13/14 (93%)	0.11 ± 0,02	0/3 (0%)	0
psSSR052	(GATG)3	8/8 (100%)	0.24 ± 0,03	0/4 (0%)	0
psSSR078	(GAA)4	16/16 (100%)	0.15 ± 0,03	1/4 (25%)	0.08 ± 0,07
psSSR053	(AAGA)3	16/16 (100%)	0.30 ± 0,04	14/14 (100%)	0.26 ± 0,17
psSSR049	(AT)7	3/3 (100%)	0.19 ± 0,11	1/2 (50%)	0.24 ± 0,17
psSSR097	(ATCC)4	4/4 (100%)	0.19 ± 0,07	1/2 (50%)	0.23 ± 0,17
psSSR090	(CCTCT)3	4/4 (100%)	0.26 ± 0,13	2/3 (67%)	0.07 ± 0,03

Bu primerlerin PCR ile çoğaltılması ile elde edilen genotipik veriler Dice indeksi ve Unweighted Neighbor-Joining algoritması kullanarak papaver genotipleri arasındaki genetik benzerlik matrisinin hesaplanmasında kullanılmıştır. Elde edilen dendrogram (Şekil 14) Mantel testi ile ( $r = 0.998$ ) belirlenen uzaklık matrisi ile çok yüksek düzeyde korelasyon vermiştir. Haşhaş tohum örnekleri arasındaki minimum benzemezlik oranı 0.03 (bu sonuç %97 oranında bir benzerlik anlamına gelmektedir) iken maksimum benzemezlik oranı 0.77 (bu sonuç %23 oranında bir benzerlik anlamına gelmektedir) olarak belirlenmiştir. Ortalama benzemezlik oranı ise 0.32 dir. Beklendiği gibi, papaver yabancı türlerinin oluşturduğu grup, *P. somniferum* tohum örneklerinin oluşturduğu gruptan ayrılmıştır. Akraba haşhaş türleri kültür haşhaş çeşitlerinden minimum 0.61 oranında farklılık (%39 oranında benzerlik) göstermiştir. *Papaver somniferum* tohum örnekleri iki genel grup içerisinde yer almıştır. Bu tohum örneklerinden sadece Kemer kaya bu gruplar içerisinde yer almamıştır. A grubu içerisinde 18 haşhaş tohum örneği yer almıştır ve bu genotipler Türkiye'nin değişik haşhaş yetiştirilen bölgelerinden toplanan eski çeşit veya ekotiplerden oluşmaktadır. Bu grup B grubuna göre daha yüksek oranda benzemezlik göstermiştir. A grubunu oluşturan genotipler arasındaki minimum benzemezlik derecesi 0.06 (%94 benzer) buna karşın maksimum benzemezlik derecesi ise 0.19 (%81 benzer) olarak belirlenmiştir. B grubu çoğu halen tarımı yapılan çeşit veya ıslah hatlarından oluşan 18 adet haşhaş genotipini içermektedir. B grubunu oluşturan genotipler arasındaki minimum benzemezlik derecesi 0.03 (%97 benzer) buna karşın maksimum benzemezlik derecesi ise 0.13 (%87 benzer) olarak belirlenmiştir. Kemer kaya çeşiti haşhaş tohum örnekleri arasında genetik olarak en ayrı olan genotip olarak göze çarpmıştır ve geri kalan tohum örneklerinin hiç biriyle aynı grupta yer almamıştır. Ayrıca, temel bileşen analizleri de EST-SSR verileri için uygulanmıştır. Bu hesaplamalar sonucunda, ilk üç Eigen vektörü, tohum örnekleri arasındaki toplam varyasyonun sırasıyla, %58.9, %11,4 ve %5.6 sını açıklamıştır. Toplam olarak bu üç vektör varyasyonun %75.9'sını açıklamıştır. Uygulanan PCA analiz sonuçları oluşturulan dendrogram analizi ile uyumlu bulunmuştur (Şekil 14). Papaver somniferum tohum örnekleri çok yakın olarak gruplanırken diğer papaver türleri ise daha uzakta bir grup oluşturmuşlardır. Uygulanan PCA deki *P. somniferum* tohum örneklerini şekilde daha kolay okuyabilmek için diğer papaver türleri analizden çıkarılmıştır ve analiz tekrar edilmiştir (Şekil 14). Dendrogramdan da görüldüğü gibi mevcut ıslah materyalleri ve çeşitler grup oluştururken ekotipler gruptan biraz daha ayrılmışlardır. Genel olarak, dendrogram ve PCA analizleri, EST-SSR markörlerinin *P. somniferum* ve akraba türleri arasındaki genetik çeşitlilik analizlerinde kullanımlarının uygun olduğunu göstermiştir. Markörler haşhaş tohum örnekleri arasında sınırlı düzeyde genetik çeşitlilik göstermiştir. Bunun yanı sıra, mevcut çeşit ve ıslah hatları ekotipler ile kıyaslandığında daha az genetik çeşitlilik göstermiştir.



Şekil 14. EST-SSR markör verilerine dayalı haşhaş tohum örneklerinde yapılan UPGMA analizi sonucu elde edilen dendrogram.



#### 4.2.3. Genomik SSR markörlerinin Geliştirilmesi ve Genetik Çeşitlilik Analizleri

Papaver somniferum genomu için genomik DNA'dan SSR markörü geliştirmek amacıyla Türkiye'de en çok yetiştirilen haşhaş çeşitlerinden birisi olan Kemerkaya 95 çeşiti kullanılmıştır. Bu amaç için yaklaşık 30 civarında *Papaver somniferum* cv. Kemerkaya çeşitine ait bitkilerden DNA çıkarılmıştır. DNA izolasyonu için Promega wizard magnetic 96 DNA promega kiti kullanılmıştır. DNA izolasyon işlemi Beckman Coulter Biomek NX sistemi kullanılmıştır. İzole edilen genomik DNA'nın kalite ve miktarı NanoDrop spektrofotometre kullanılarak ölçülmüştür. Ayrıca, 1 µl genomik DNA %2'lik jel elektroforezinde de görüntülenmiştir. Elde edilen DNA, dizi analizleri için Roche – USA Firmasına gönderilmiştir. Dizileme çalışmasında genomik shotgun dizileme teknolojisi pirosekans platformu (Roche 454 GS-FLX sistemi) kullanılarak yapılmıştır. Pirosekans platformu ile yapılan iki okumada toplam 1,244,412 reads (okuma) gerçekleştirilmiş ve bu okumalar sonucunda toplam 695,339,138 baz çifti dizilenmiştir. En kısa okuma uzunluğu 52; en uzun okuma uzunluğu ise 1,201 nükleotit ve medianı ise 549 nükleotit olarak bulunmuştur. Bu şekilde elde edilen ham genomik diziler birbirinin aynısı yada birbirini tamamlayıcı diziler (contig) olabileceği için bu dizilerin daha büyük kontigler içerisinde toplanması sağlanmıştır. Bu amaç için öncelikle bütün diziler vektör dizileri bakımından SeqClean programı kullanılarak taranmıştır (CHEN ve ark. 2007). Bu program dizilerdeki klonlama vektörlerine ait muhtemel kalan dizilerin ortadan kaldırılması için geliştirilmiştir. Basit dizi tekrarları sekans montajlaması veya biraraya toplanması işlemleri için zararlı olduğu için bu tekrar dizileri belirlendikten sonra RepMasker programı (JURKA ve ark. 1992) kullanarak analiz dışı bırakılmıştır ancak tekrarların orijin ve konumları daha sonraki işlemler için saklanmıştır. Bu şekilde temizlenen diziler daha sonra MIRA programı kullanılarak daha büyük diziler (contigs) haline getirilmiştir. Bu program kullanılarak toplam 599,603 adet okuma 210,720 contigte toplanmıştır. En kısa contig uzunluğu 40 bp; en uzun contig uzunluğu 1064 bp ve median ise 342 bp uzunluğunda belirlenmiştir. Dizi analizi sonuçlarına ait istatistik veriler Tablo 13'de detaylı olarak sunulmuştur. Daha sonra, bu dizileri, öncelikle herhangi bir contig ile örtüşen tüm klonları bulmak için, BLAST programı (ALTSCHUL ve ark. 1990) kullanılarak genoma lokalize edilmiştir.

Tablo 13. Dizi analizi sonucu elde edilen verilerin istatistiki analizleri

Okuma(read) sayısı	1,244,412
Toplam okuma uzunluğu	695,339,138
En kısa okuma uzunluğu	52
Okuma uzunluk ortalaması	549
Okuma uzunluğu standart sapması	66.004
En uzun okuma uzunluğu	1,201
Bir araya getirelemeyen okuma sayısı	644,809
Bir araya getirilen okuma sayısı	599,603
Toplam contig uzunluğu	82,412,704
Contig sayısı	210,720
En kısa contig uzunluğu	40
Contig uzunluğu ortalaması	342
Contig uzunluğunun standart sapması	301.258
En uzun contig uzunluğu	10,604
Contiglerdeki en az okuma(read) sayısı	1.0
Contiglerdeki en az okuma(read) sayısı ortalaması	2.0
Contiglerdeki en az okuma(read) sayısı standart sapması	4.809
Contiglerdeki en fazla okuma(read) sayısı	451.0

Toplam 23,427 SSR tekrarı 19,045 kontig dizisinde belirlenmiştir. Kontig dizilerinin yaklaşık %16'sı birden fazla SSR tekrarı içermektedir. Örneğin, 2343 numaralı kontig iki farklı, 522 numaralı kontig ise üç farklı SSR motifi içermektedir. Bir kontigde en fazla on ve onbir SSR tekrarı bulunmaktadır. Belirlenen SSR uzunlukları 3 ve 226 nükleotit arasında değişmekte olup, ortalama değer  $13.5 \pm 0.03$  nükleotit (SH) olarak belirlenmiştir. Trinükleotit tekrarları %48.7 oranı ile en sık rastlanan SSR motifi tekrarı çeşididir. Tetranükleotit tekrarları toplam SSR'ların %27.7'sini oluşturmaktadır ve ikinci en sık rastlanan motiftir. Diğer SSR tekrar çeşitleri %10'dan daha az bulunmaktadır ve hepta- ve oktanükleotit SSR tekrarları en az bulunan SSR motif çeşitleridir. Bazı SSR motiflerine diğerlerinden daha sık rastlandığı bulunmuştur (Tablo 14).

Tablo 14. SSR tekrar çeşitleri

Motif uzunluğu	SSR sayısı	Sıklık (%)
Mononükleotit	842	3.6
Dinükleotit	2114	9.0
Trinükleotit	11,406	48.7
Tetranükleotit	6493	27.7
Pentanükleotit	1600	6.8
Hekzanükleotit	828	3.5
Heptanükleotit	114	0.5
Okta nükleotit	30	0.1
Toplam	23,427	100

Trinükleotit tekrarlar haşhaş genomunda en çok bulunan tekrarlardır (%48). Trinükleotit tekrarların Arabidopsis, pirinç, soya fasüyesi ve sorgum genomlarında da en fazla bulunan tekrarlar olduğu rapor edilmiştir (CAVAGNARO ve ark. 2010). Trinükleotit tekrarlarından sonra en fazla bulunan SSR tekrarları sırası ile tetra-, di- ve pentanükleotit tekrarları olarak bulunmuştur ve bu sıralama Arabidopsis, pirinç, soya fasüyesi ve sorgum bitkilerinde de geçerlidir (CAVAGNARO ve ark. 2010). Haşhaş genomik SSR tekrar çeşitlerinin oranları mononükleotit tekrarlar hariç (mononükleotit tekrarlar genomik dizilerde

5. en yüksek, EST dizilerinde üçüncü en yüksek olarak bulunmuştur) tüm tekrar motiflerinde aynıdır (ŞELALE ve ark. 2013). EST dizilerinde trinükleotit tekrarların yüksek oranda bulunması, diğer SSR tekrarları çerçeve kayması mutasyonuna neden olduğundan bu tekrarların negatif seleksiyona maruz kalması ile açıklanabilmesine rağmen, böyle bir seçilimin genomik diziler için geçerli olup olmadığı açık değildir.

Mononükleotit çeşitlerin büyük çoğunluğunu A/T (%82.2) tekrar motifi oluşturmaktadır. Dinükleotit tekrarlar arasında AT/TA (%50.4) tekrarı en çok belirlenen tekrardır. AAG/TTC (%19.7) en sık rastlanan trinükleotit tekrarıdır. AT zengin tekrarlar, tetra-, penta- ve hekzanükleotit SSR tekrarlarında en fazla bulunan tekrarlardır (Tablo 15)

Tablo 15. Genomik dizilerde en fazla bulunan SSR motifleri

SSR motifi	SSR sayısı	SSR motif yüzdesi
A/T	692	82.2
C/G	150	17.8
AT/TA	1066	50.4
AG/TC	383	18.1
AC/TG	340	16.1
CT/GA	318	15.0
AAG/TTC	2243	19.7
ACC/TGG	1381	12.1
AAC/TTG	1228	10.8
AAAT/TTTA	1101	17.0
AAATA/TTTAT	300	18.8
AAAAAT/TTTTTA	88	10.6

Farklı tekrar motifleri arasında, AT zengin motifler en fazla rastlanan motifler olmuştur. Aynı zamanda AT zengin motiflerin başka çift çenekli bitkilerde (CAVAGNARO ve ark. 2010) ve hashaş EST dizilerinde de (ŞELALE ve ark. 2013) en fazla rastlanan motifler oldukları rapor edilmiştir. Trinükleotit tekrarlar arasında en sık rastlanan AAG/TTC tekrar motifi, hashaş genomunda en fazla rastlanan motif olarak tespit edildiği gibi hıyar, soya fasulyesi, Arabidopsis ve üzüm gibi bitkilerde de en fazla bulunmaktadır (CAVAGNARO et al. 2010). Ayrıca, AAG/TTC tekrar motifinin hashaş EST dizilerinde de en fazla bulunduğu rapor edilmiştir (ŞELALE ve ark. 2013). LI ve ark. (2004) tarafından AAG/TTC tekrar motifinin bitki genomlarında en fazla bulunan tekrar motifi olduğu rapor edilmiştir.

SSR primerlerinin büyük bir çoğunluğu (%96) PCR ürünü vermiştir. Genomik dizilerin amplifikasyon oranları hashaş EST spesifik işaretleyicilerin amplifikasyon oranından (%82) yüksektir. Bu yüksek amplifikasyon oranı genomik dizilerin yüksek kalitede oluşundan ve primer tasarlama sürecinde uygun parametrelerin kullanılmasından kaynaklanmaktadır. Bu çalışmada genomik SSR işaretleyicileri orta düzeyde polimorfizm ortaya koymuşlardır (ortalama interspesifik (türler arası) PIC: 0.19, intraspesifik (tür içi) PIC:0.17). Genomik SSR işaretleyicilerinin polimorfizm düzeyi, EST spesifik SSR işaretleyicilerinden düşük düzeyde bulunmuştur (Şelale ve ark. 2013; Lee ve ark. 2011). Genomik SSR işaretleyicilerinin EST spesifik SSR işaretleyicilerine göre daha fazla polimorfik olduğu rapor edilmiş olmakla birlikte, Tian ve arkadaşları (2012) EST spesifik SSR işaretleyicilerinin genomik SSR işaretleyicilerine göre *Coreoperca whiteheadi* de daha polimorfik olduklarını göstermişlerdir.

Genomik SSR işaretleyicilerinin büyük çoğunluğu birden fazla PCR fragmenti vermiştir (ortalama 5 fragment). Bu durum hashaş genomunun poliploid olmasında kaynaklanmaktadır. Havaş (*P. somniferum*, 2n = 22) farklı türlerin oluşturduğu (x=7) anöploid bir bitki olduğundan (LAVANIA ve SRIVASTAVA 1999) tek bir SSR lokusu en fazla altı PCR fragmenti verebilir. Bu çalışmada genomik SSR primer çiftlerinden dokuz adedi (%17) altıdan fazla fragment üretmiştir. Bu durum, dokuz SSR işaretleyicisinin birden fazla SSR lokusunu çoğalttığını göstermektedir. Bahsi geçen işaretleyiciler, Tablo 5'te yıldız ile işaretlenmiş şekilde gösterilmektedir. Genomik SSR işaretleyicilerinin ürettiği fragment sayısının, LEE ve ark. (2011) tarafından geliştirilen altı adet EST spesifik SSR işaretleyicisinden (ortalama 2.8 ± 0.5 fragment) fazla olmasının sebebi, LEE ve ark. (2011) üçten fazla PCR fragmenti veren markörleri kullanmamış olmalarıdır. Genomik SSR işaretleyicilerinin ortalama

fragment sayısı, ŞELALE ve ark. (2013) tarafından geliştirilen EST spesifik SSR markörlerinden (ortalama 8.4 fragment) azdır. Bu farklılık, multialelik EST spesifik işaretleyicilerin sayısının (23 EST SSR işaretleyicisi) multialelik genomik SSR işaretleyicilerinin sayısından fazla olmasından kaynaklanmaktadır. Genomik ve EST SSR işaretleyicileri arasında fragment sayısı bakımından gözlemlenen bu farkın gerçek olup olmadığının, daha fazla sayıda genomik ve EST SSR işaretleyicisinin testlenmesi ile kontrol edilmesi gerekmektedir. Genomik SSR işaretleyicilerinin haşhaş yakın türlerine transfer edilebilirlik oranları %89 ve %98 arasında değişmektedir. SSR işaretleyicilerinin yüksek transfer edilebilirlik oranı, EST spesifik SSR işaretleyicileri için de rapor edilmiştir (ŞELALE ve ark. 2013). SSR işaretleyicilerinin yüksek transfer edilebilirlik oranı, haşhaş yakın türleri arasında korunmuş genom bölgelerinin varlığına işaret etmektedir. Haşhaş yakın türlerine transfer edilen SSR işaretleyicileri, mevcut moleküler çalışmanın sınırlı miktarda olduğu haşhaşın yakın türleri için değerli bir kaynaktır.

Proje kapsamında geliştirilen 100 adet genomik SSR işaretleyicisi, altı adet haşhaş çeşidi üzerinde testlenmiştir. Bunlardan 96'sı (%96) PCR ürünü vermiştir. SSR işaretleyicilerinden agaroz jel elektroforezi ile görüntülediğinde iyi amplifikasyon verdiği tespit edilen 53 tanesi, 37 haşhaş çeşidinde ve yedi adet haşhaş yakın akraba türünde testlenmiştir (Tablo 16). Bu çalışmada Türkiye'de yetişen 37 haşhaş çeşidi ve yedi adet *Papaver* türü kullanılmıştır. (Tablo 16). Sekiz haşhaş çeşidi Toprak Mahsulleri Ofisi'nden, 29 haşhaş çeşidi Anadolu Tarım Araştırma Enstitüsü'nden (Eskişehir) temin edilmiştir. SSR işaretleyicilerinin haşhaşın yakın türlerine transfer edilebilirliğini belirlemek için *Papaver orientale* (İran), *Papaver pseudoorientale* (İran), *Papaver bracteatum* (İran), *Papaver rhoeas* (Bulgaristan), *Papaver umbonatum* (Türkiye), *Papaver nudicaule* (Moğolistan) and *Papaver armeniacum* (Ermenistan) olmak üzere toplam yedi adet haşhaş yakın tür kullanılmıştır. Total genomik DNA izolasyonu için, her bir bitki çeşidi fide viyollerine dikilmiştir. Bitkiler serada (24-25 °C, ortalama %33 nem) büyütülmüştür. Her bir çeşit için 10 adet bitki yaprağı karışımından oluşan örneklerden CTAB yöntemi ile DNA izole edilmiştir (Doyle 1990).

Tablo 16. Çalışmada kullanılan bitki materyalleri

İsim	Kaynak	Lokasyon	Yerli çeşit/haşhaş hattı/Tür
1290	AARI	-	haşhaş hattı
1061	AARI	-	haşhaş hattı
1259	AARI	-	haşhaş hattı
1065	AARI	-	haşhaş hattı
Kemer kaya	AARI	-	haşhaş hattı
Tınaztepe	AARI	-	haşhaş hattı
Zaferyolu	AARI	-	haşhaş hattı
Anayurt	AARI	-	haşhaş hattı
Afyon95	AARI	-	haşhaş hattı
Ofis3	TMO	-	haşhaş hattı
Ofis4	TMO	-	haşhaş hattı
Ofis8	TMO	-	haşhaş hattı
Ofis95	TMO	-	haşhaş hattı
TM01	TMO	-	haşhaş hattı
TM02	TMO	-	haşhaş hattı
TM03	TMO	-	haşhaş hattı
TM04	TMO	-	haşhaş hattı
7	AARI	Sandıklı, Alagöz, Afyon	Yerli çeşit
10	AARI	Çeltik, Burdur	Yerli çeşit
14	AARI	Sivas	Yerli çeşit
15	AARI	Koçyatağı, Şuhut, Afyon	Yerli çeşit

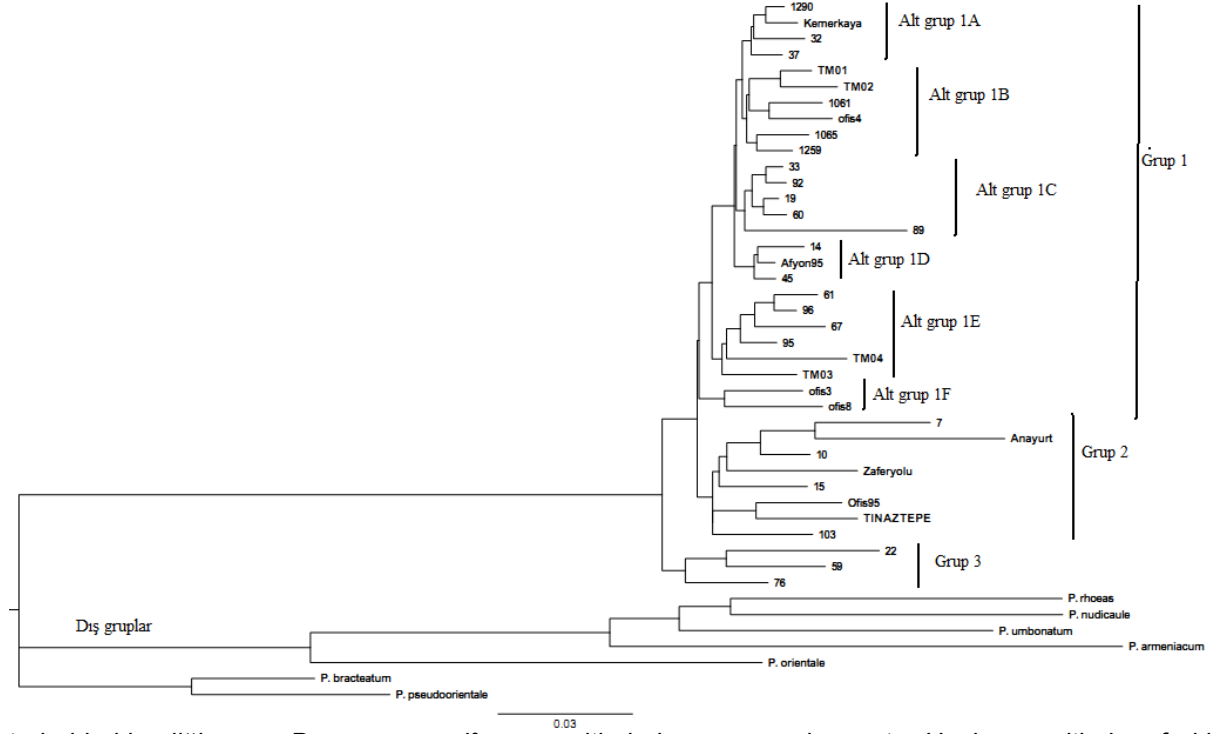
19	AARI	Dişli, Afyon	Yerli çeşit
22	AARI	Anayurt, Şuhut, Afyon	Yerli çeşit
32	AARI	Afyon	Yerli çeşit
33	AARI	Ekinhisar, Sandıklı, Afyon	Yerli çeşit
37	AARI	Höyükü, Yalvaç, Isparta	Yerli çeşit
45	AARI	Simav, Kütahya	Yerli çeşit
59	AARI	Sülümenli, Afyon	Yerli çeşit
60	AARI	Koçyatağı, Afyon	Yerli çeşit
61	AARI	Şuhut, Afyon	Yerli çeşit
67	AARI	Alacami, Sandıklı, Afyon	Yerli çeşit
76	AARI	Göğen, Uşak	Yerli çeşit
89	AARI	Güre, Uşak	Yerli çeşit
92	AARI	Bolvadin, Afyon	Yerli çeşit
95	AARI	Acıpayam, Denizli	Yerli çeşit
96	AARI	Kütahya	Yerli çeşit
103	AARI	Çay, Afyon	Yerli çeşit
PI 229617	AARI	İran	<i>P. orientale</i>
PI 381612	AARI	İran	<i>P. pseudoorientale</i>
PI 414784	AARI	İran	<i>P. bracteatum</i>
W6 10919	AARI	Bulgaristan	<i>P. rhoeas</i>
W6 11444	AARI	Türkiye	<i>P. umbonatum</i>
W6 18131	AARI	Moğolistan	<i>P. nudicaule</i>
W6 23866	AARI	Ermenistan	<i>P. armeniacum</i>

Bu çalışmada kullanılan haşhaş çeşitlerinden 17'si Türkiye'nin çeşitli bölgelerinde yetişen yerli çeşitler olup, geri kalanlar tescilli haşhaş hatlarından ve ıslah hatlarından oluşmaktadır. 53 SSR işaretleyicisi haşhaş çeşitleri ve haşhaş yakın türlerinde 209, sadece haşhaş çeşitlerinde ise 90 polimorfik bant vermiştir. SSR işaretleyicilerinin vermiş olduğu bant sayıları 1 ve 13 arasında değişmektedir (ortalama  $5 \pm 0.01$  (SH) fragment). Toplam 48 SSR (%95) işaretleyicisi, haşhaş çeşitleri ve haşhaş yakın türlerinde polimorfik bulunmuştur (ortalama fragment polimorfizmi 84%). SSR işaretleyicilerinin haşhaş çeşitlerinde ve yakın türlerinde polimorfizm bilgi içeriği değeri (PIC) 0.05 (psgSSR076) ve 0.47 (psgSSR022) arasında değişmekte olup, ortalama polimorfizm bilgi içeriği (PIC) değeri 0.19 olarak belirlenmiştir. SSR işaretleyicilerinin %60.4'ü intraspesifik (tür içi) polimorfizm göstermiştir (ortalama fragment polimorfizmi %63). Ortalama intraspesifik polimorfizm bilgi içeriği (PIC) değeri 0.17 olarak belirlenmiştir. Intraspesifik polimorfizm bilgi içeriği (PIC) değeri 0.05 ve 0.49 (psgSSR022) arasında değişmektedir. SSR motifi çeşidi ya da SSR uzunluğu ve işaretleyicinin polimorfizm bilgi içeriği değeri arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır. Toplam 53 adet genomik SSR işaretleyicisinin haşhaşın yedi yakın türüne (*P. bracteatum*, *P. pseudoorientale*, *P. orientale*, *P. nudicaule*, *P. armeniacum*, *P. rhoeas* ve *P. umbonatum*) transfer edilebilme oranları belirlenmiştir. SSR işaretleyicileri yüksek transfer edilebilme oranına sahiptir. 53 adet SSR işaretleyicisinin tamamı, *P. pseudoorientale*'de PCR ürünü vermiştir. Toplam 52 işaretleyici (%98) *P. bracteatum* ve *P. nudicaule* türlerinde PCR ürünü vermiştir. 51 SSR işaretleyicisi (%96) *P. orientale* ve *P. armeniacum* türlerinde PCR ürünü vermiştir. Toplam 49 SSR işaretleyicisi (%92) *P. umbonatum*'da PCR ürünü vermiştir. Toplam 47 (%89) SSR işaretleyicisi *P. rhoeas*'de PCR ürünü vermiştir.

Tüm analizlerde haşhaş çeşitlerinde %10'dan daha az görülen fragmentler güvenilir olmadığından analizlerden çıkarılmıştır. Toplam 209 yüksek kaliteli polimorfik fragment haşhaş çeşitlerinde ve haşhaşın yakın türlerinde genetik çeşitliliğin belirlenmesinde kullanılmıştır. İkili (1 ve 0 değerlerinden oluşan) veri dosyası, DICE katsayısı kullanılarak uzaklık matrisinin hesaplanmasında ve Neighbor-joining algoritması ile haşhaş genotiplerinin genetik çeşitliliğinin belirlenmesinde kullanılmıştır. Mantel testi, dendrogram (Şekil 15) ve uzaklık matrisi arasında kuvvetli bir korelasyon olduğunu göstermektedir

( $r = 0.998$ ). Haşhaş genotipleri arasındaki en küçük farklılık 0.008, en yüksek farklılık 0.48 (% 52 benzerlik) olarak belirlenmiştir. Ortalama farklılık oranı 0.14 olarak bulunmuştur. Haşhaş çeşitleri ile yakın türleri arasında farklılık oranı 0.23 ile 0.48 arasında değişmektedir. *Papaver somniferum*'un yakın

Şekil 15: Genomik SSR işaretleyicilerinin oluşturduğu dendrogram.



türleri beklendiği üzere *Papaver somniferum* çeşitlerinden ayrı gruplanmıştır. Haşhaş çeşitleri üç farklı grupta toplanmıştır. Grup 1, 13 yerli haşhaş çeşidinden ve 13 tescilli haşhaş hattından oluşmaktadır. Grup 1'de çeşitlilik 0.01 ve 0.08 arasında değişmekte olup, ortalama çeşitlilik 0.04 olarak bulunmuştur. Grup 1, altı alt gruptan oluşmaktadır (alt grup A-F). Grup 1B, sadece tescilli haşhaş hatlarından oluşmaktadır. Grup 1C, sadece yerli haşhaş çeşitlerinden oluşmaktadır. Diğer gruplarda yerli haşhaş çeşitleri ve tescilli haşhaş hatları karışık (intermixed) olarak bulunmaktadır. Grup 2'de çeşitlilik 0.03 ve 0.16 arasında değişmekte olup, ortalama çeşitlilik 0.06 olarak bulunmuştur. Grup 3, 59, 22 ve 76 numaralı haşhaş çeşitlerinden oluşmaktadır ve bu grup genetik olarak en farklı gruptur.

#### 4.2.4. Haşhaş için Moleküler Genetik Bağlantı Haritasının Oluşturulması

Moleküler genetik haritalama çalışmaları için *Papaver somniferum* var. Kemer kaya 95 x *Papaver somniferum* var. 1061 hatlarının melezlenmesiyle elde edilmiş bir F<sub>2</sub> populasyonu kullanılmıştır. Bu amaç için yaklaşık 250 F<sub>2</sub> tohumu ATAE deneme tarlalarına ekilmiş ve 225 bitki elde edilmiştir. Yazlık dönemde ekilen her bir F<sub>2</sub> bitkisi bazı morfolojik ve morfin içerikleri bakımından karakterize edilmiştir. Sonuçlar Tablo 17'de verilmiştir. Ayrıca, her bir F<sub>2</sub> bitkisi F<sub>2</sub>:3 generasyonunu oluşturmak amacıyla kendilenmiştir. Kendilenen kapsüller tek tek hasat edilerek F<sub>2</sub>:3 generasyonuna ait tohumlar elde edilmiştir.

Tablo 17. F<sub>2</sub> populasyonuna ait bazı morfolojik ve morfin içerikleri

Genotip No	Bitki Boyu	Kapsül Eni	Kapsül Boyu	Kapsül İndeksi	Yıldız Sayısı	Morfin
1	55	3.2	2.7	1.19	10	0.387
3	45	2	3.4	0.59	6	0.178
6	46	1.7	2.6	0.65	8	0.313
8	49	1.4	3.4	0.41	6	0.239
12	51	2	3	0.67	9	0.329
14	37	2.2	4.2	0.52	8	0.209

15	54	2.5	3.5	0.71	8	0.145
17	44	1.7	2.5	0.68	7	0.178
18	55	1.8	2.5	0.72	8	0.245
19	61	2.5	4.4	0.57	7	0.066
20	61	2.1	3.2	0.66	6	0.289
21	61	2	3.5	0.57	8	0.271
22	53	1.5	3.1	0.48	7	0.375
23	60	1.2	2.7	0.44	8	0.108
24	60	2	3.4	0.59	8	0.149
25	45	1.7	3.2	0.53	8	0.155
26	59	2.2	3.5	0.63	6	0.195
28	57	2	3.8	0.53	7	0.18
29	70	2.2	2.6	0.85	10	0.405
33	37	3	3.5	0.86	12	0.536
34	68	2.2	3.8	0.58	7	0.352
35	54	2.2	4.8	0.46	8	0.211
37	61	1.8	3.5	0.51	9	0.21
38	59	2.8	2.8	1.00	10	0.451
39	58	1.8	3	0.60	9	0.106
41	50	1.8	3.8	0.47	7	0.365
43	43	1.5	2.8	0.54	6	0.163
45	40	1.5	2.7	0.56	6	0.139
47	48	1.5	3	0.50	6	0.26
50	50	1.9	3.5	0.54	7	0.251
51	68	2.5	3	0.83	9	0.405
52	82	2.6	4.8	0.54	9	0.469
53	67	1.9	3.5	0.54	9	0.346
54	70	2.2	2.5	0.88	10	0.214
55	61	2.4	3.4	0.71	8	0.336
57	59	2.4	3.2	0.75	9	0.395
59	50	1.5	2.8	0.54	5	0.436
61	57	2.2	3.5	0.63	8	0.197
63	57	2.3	3.3	0.70	9	0.443
64	70	2.8	4.4	0.64	9	0.384
65	56	2.2	3.8	0.58	7	0.341
66	56	2.2	4	0.55	8	0.148
67	63	1.8	2.1	0.86	7	0.222
68	69	2.8	4	0.70	8	0.561
69	48	1.8	2.8	0.64	6	0.19
70	58	2.3	3	0.77	8	0.393
71	58	2.8	4.8	0.58	8	0.435
72	71	2.4	4.2	0.57	9	0.395
73	66	2	3.5	0.57	7	0.279
74	61	2.8	2.8	1.00	10	0.646
75	55	2	3	0.67	8	0.172
76	82	3.6	4.2	0.86	12	0.686
77	59	3	4.2	0.71	8	0.197
78	70	3.3	4.2	0.79	10	0.125
79	46	2.8	3.5	0.80	7	0.3
80	57	1.5	2.8	0.54	9	0.276
81	54	1.9	4.3	0.44	6	0.262

83	59	2.5	3.8	0.66	8	0.234
84	61	2.3	3.4	0.68	9	0.274
85	60	2.2	3.8	0.58	8	0.433
86	66	2	3.5	0.57	9	0.172
87	44	1.3	2.8	0.46	6	0.247
89	55	3.8	3.4	1.12	9	0.546
91	54	2.7	3.8	0.71	8	0.18
92	56	2.5	3.2	0.78	8	0.132
93	47	2.2	3.2	0.69	7	0.343
94	45	1.4	3.4	0.41	6	0.331
95	46	1.8	3.8	0.47	7	0.154
96	61	2.5	3.6	0.69	8	0.417
97	43	1.8	3	0.60	7	0.278
98	63	2.4	4.5	0.53	9	0.31
99	76	3.4	4.7	0.72	10	0.139
100	59	1.5	3.8	0.39	6	0.368
101	51	2	3.5	0.57	7	0.318
103	60	2.4	4	0.60	9	0.267
104	75	3.3	3.3	1.00	12	0.513
105	60	2.5	4.2	0.60	6	0.282
106	65	2.6	4.2	0.62	10	0.304
107	54	2	4.2	0.48	8	0.363
108	56	2.5	4.5	0.56	8	0.329
109	42	1.5	2.9	0.52	5	0.133
110	53	1.4	2.7	0.52	7	0.357
111	51	2.1	3.4	0.62	8	0.384
112	65	3.7	3.7	1.00	12	0.447
114	64	2.2	1	2.20	7	0.38
115	54	2.2	4	0.55	8	0.24
117	50	3.4	3.9	0.87	8	0.12
118	36	1.8	2.7	0.67	8	0.399
119	49	2.5	3	0.83	6	0.335
120	54	1.7	3.8	0.45	7	0.389
121	68	1.8	2.5	0.72	8	0.334
122	64	3.3	4.3	0.77	10	0.283
123	74	2.7	4.2	0.64	9	0.21
124	44	4	2.4	1.67	11	0.32
125	51	1.8	3.4	0.53	6	0.225
127	56	2.2	2.7	0.81	10	0.0908
129	53	1.9	4.1	0.46	9	0.18
130	53	1.5	3.9	0.38	9	0.379
131	52	3.5	4.8	0.73	7	0.16
132	44	3.8	3.9	0.97	6	0.147
133	59	2.4	4.2	0.57	7	0.349
134	45	1.5	3.4	0.44	6	0.22
136	50	2	3.5	0.57	8	0.183
137	47	2	3	0.67	8	0.353
139	51	2.5	4.6	0.54	8	0.234
142	54	24	3.4	7.06	8	0.122
143	67	3.8	3.5	1.09	9	0.363
144	57	2.2	3.2	0.69	6	0.231



146	42	1.8	3.5	0.51	8	0.203
147	55	1.5	3.5	0.43	8	0.2
148	48	2.2	3.4	0.65	6	0.291
149	52	2.4	3.8	0.63	7	0.257
150	54	2.4	4.4	0.55	7	0.272
151	62	2.7	4.4	0.61	8	0.232
153	53	2.2	3.5	0.63	9	0.277
154	54	1.8	3.4	0.53	5	0.284
158	60	2.7	4	0.68	8	0.226
160	43	1.4	2.8	0.50	7	0.257
161	52	2.4	3.4	0.71	8	0.32
162	72	2.7	3.5	0.77	10	0.337
164	52	2.4	3.2	0.75	6	0.266
165	70	3.4	4.1	0.83	9	0.32
166	42	1.5	2.8	0.54	6	0.301
167	56	2.8	4.8	0.58	9	0.296
168	53	1.5	3	0.50	7	0.431
169	60	2.2	4.2	0.52	6	0.419
170	50	2.6	3.6	0.72	7	0.388
172	65	2.7	4.5	0.60	10	0.295
173	45	2	3	0.67	6	0.302
174	58	2.4	4.4	0.55	8	
175	52	1.8	3.4	0.53	7	0.123
176	56	2.8	4.5	0.62	8	0.195
178	62	2.7	3.7	0.73	7	0.347
179	59	2	3.5	0.57	7	0.211
180	73	3.3	3.9	0.85	10	0.213
181	69	2.3	3.7	0.62	7	0.235
182	58	3	3.5	0.86	7	0.389
183	50	2.2	3.2	0.69	9	0.312
184	46	1.8	3	0.60	5	0.255
185	48	1.8	3.5	0.51	6	0.203
188	80	2.4	4.8	0.50	10	0.237
189	49	2.2	3.8	0.58	7	0.122
191	57	2	3.8	0.53	9	0.37
192	44	1.8	3.6	0.50	7	0.303
193	60	2.3	3.8	0.61	6	0.141
194	65	2.4	3.8	0.63	10	0.287
196	49	1.5	3.5	0.43	8	0.23
197	50	2.2	3.5	0.63	7	0.108
199	49	2.3	3.5	0.66	7	0.28
200	47	1.8	3	0.60	6	0.277
202	42	2.4	2.7	0.89	6	0.192
203	62	2.2	3.9	0.56	7	0.27
204	57	2.5	4.5	0.56	8	0.454
205	80	4.8	4.8	1.00	11	0.481
206	59	3	4.3	0.70	7	0.325
207	50	1.9	3.5	0.54	6	0.324
208	49	1.7	3.5	0.49	7	0.263
209	62	2.8	3.9	0.72	9	0.18
210	49	2.5	4.5	0.56	9	0.221

211	70	2.5	3.9	0.64	8	0.438
212	46	2	3.7	0.54	6	0.354
214	56	2.4	3.5	0.69	8	0.364
215	77	2.8	4.5	0.62	9	0.347
216	70	2.7	3.9	0.69	8	0.323
217	63	3	4.8	0.63	10	0.457
218	70	3	3.2	0.94	9	0.638
219	73	3.9	3.5	1.11	12	0.747
220	75	2.7	4.5	0.60	9	0.491
221	60	2.4	3.5	0.69	8	0.47
222	46	2	2.8	0.71	7	0.411
223	48	2	3.9	0.51	7	0.141
224	57	2.2	3.7	0.59	8	0.278
225	65	2.5	3	0.83	9	0.306
226	60	3.2	3.9	0.82	9	0.344
227	77	3.8	4.5	0.84	10	0.477
228	72	2.5	3.3	0.76	9	0.44
230	59	3	4.6	0.65	9	0.383
231	69	2.7	4.2	0.64	7	0.243
232	72	2.9	4.2	0.69	8	0.558
233	65	2.5	4.5	0.56	8	0.314
234	74	3.8	4.4	0.86	9	0.312
235	61	2.4	4	0.60	7	0.453
236	60	2.7	4	0.68	8	0.301
237	69	3.1	4.8	0.65	9	0.634
238	65	1.8	2.8	0.64	8	0.251
239	70	3.2	3.4	0.94	9	0.645
240	72	3.3	4.2	0.79	8	0.448
241	53	2.2	4	0.55	7	0.227
242	53	2.1	2.9	0.72	8	0.176
243	65	2.5	4	0.63	7	0.297
244	73	2.2	3.4	0.65	9	0.253
245	70	3.3	3.4	0.97	11	0.615
246	45	3	3.4	0.88	7	0.17
247	49	2.5	4	0.63	8	0.237
248	60	2.7	4.2	0.64	10	0.324
249	61	2.6	4	0.65	9	0.173
250	56	2.8	3.5	0.80	7	0.17
251	50	2.1	3.5	0.60	7	0.292
253	54	32.4	4	8.10	8	0.264
254	44	2.2	3.7	0.59	6	0.195
255	42	2	3.5	0.57	6	0.331
256	54	2.4	4.2	0.57	8	0.123
257	43	1.9	3.5	0.54	7	0.115
258	42	2.3	3.8	0.61	7	0.222
259	58	2	3.5	0.57	7	0.255
261	49	2.2	3.5	0.63	7	0.209
262	56	2.7	3.5	0.77	8	0.294
263	54	1.8	3	0.60	7	0.212
264	45	2	3.8	0.53	8	0.172
265	48	1.8	2.6	0.69	7	0.378

266	51	2.7	3.3	0.82	6	0.203
267	68	2.4	3.7	0.65	8	0.379
268	61	3.8	402	0.01	9	0.333
269	68	2.9	4.5	0.64	9	0.336
270	60	3.3	4.8	0.69	9	0.426
272	46	1.7	3	0.57	7	0.281
274	53	1.1	2.7	0.41	5	0.196
275	45	2.7	2.9	0.93	10	0.365
276	79	1.3	2.3	0.57	7	0.278
277	66	2.7	4.5	0.60	8	0.393
278	46	1.8	1.8	1.00	8	0.414
279	60	2.2	2.8	0.79	8	0.418
281	64	3.2	3.5	0.91	9	0.343
282	53	1.6	2.5	0.64	9	0.448
283	63	2.4	2.2	1.09	11	0.335

Proje kapsamında öngörülen moleküler genetik bağlantı haritası oluşturma çalışmaları için ATAE – Eskişehir'e gidilerek her bir F2 bitkisinden uygun miktarda yaprak örnekleri alınmış ve sıvı azot uygulamasıyla dondurulan örnekler İYTE'ye getirilmiştir. DNA izolasyon çalışmaları için Promega Wizard Genomic DNA Purification Kiti kullanılmıştır. Bu çalışma sonucunda yaklaşık 150 adet örnekten iyi düzeyde DNA çıkarılmıştır ve bu örnekler genetik haritalama çalışmalarda kullanılmıştır. Tablo 18 DNA izolasyon çalışmaları sonucunda elde edilen DNA miktarlarını vermektedir.

Tablo 18. Haritalama çalışmalarında kullanılan F2 popülasyonuna ait bitkilerden elde edilen DNA miktarları

Genotip No	ng/ul	A260	A280	260/280
1	725.41	14.508	7.735	1.88
3	514.95	10.299	5.558	1.85
5	125.34	2.507	1.263	1.90
7	161.07	3.221	1.806	1.78
11	350.86	7.017	3.684	1.9
12	573.18	11.464	6.631	1.73
14	152.19	3.044	1.472	2.07
15	2117.74	42.355	21.505	1.97
16	418.8	8.376	4.274	1.96
18	663.18	13.264	7.126	1.86
19	791.28	15.826	8.881	1.78
20	134.74	2.695	1.53	1.76
22	731	14.62	7.823	1.87
23	491.96	9.839	5.248	1.87
24	471.95	9.439	5.001	1.89
25	309.3	6.186	3.482	1.78
26	303.74	6.075	3.216	1.89
29	584.68	11.694	6.247	1.87
33	126.68	2.534	1.361	1.86
34	520.44	10.409	9.494	1.1
35	795.35	15.907	8.268	1.92
37	831.46	16.629	8.363	1.99
38	363.97	7.279	3.961	1.84
39	420.13	8.403	4.549	1.85

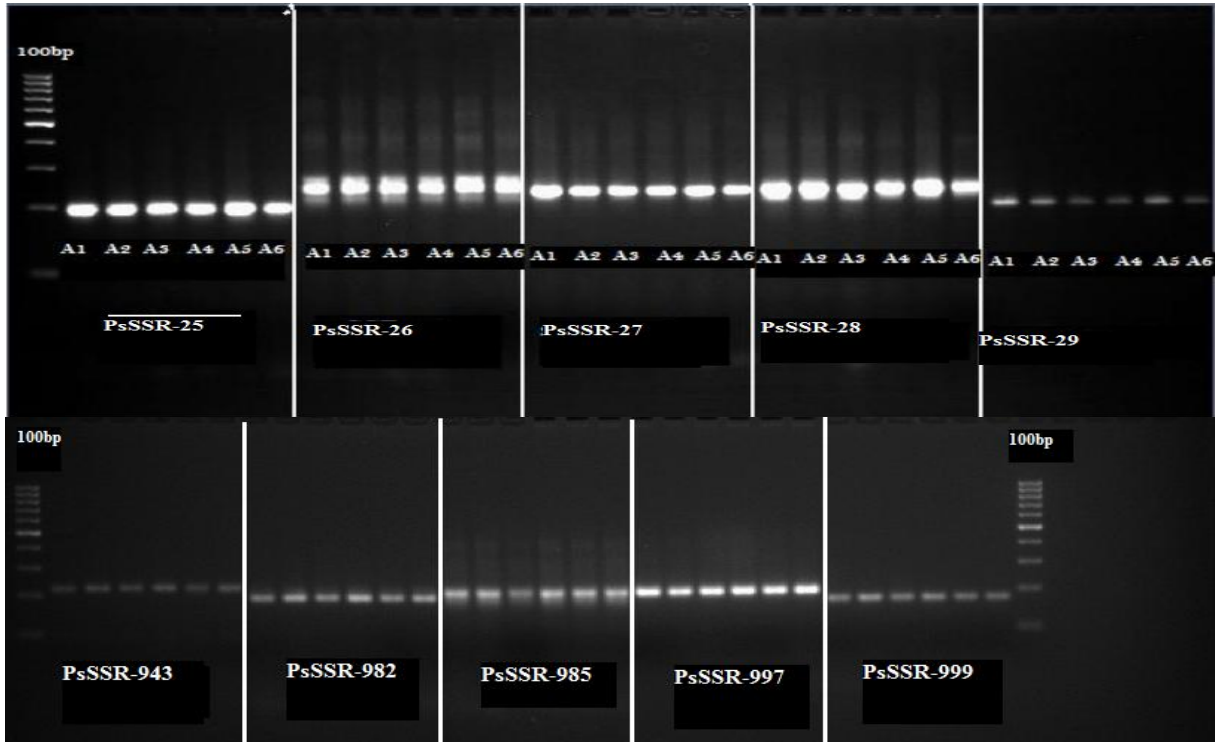
41	525.03	10.501	5.738	1.83
45	406.89	8.138	4.274	1.9
50	172.25	3.445	1.744	1.98
52	462.54	9.251	5.448	1.7
53	244.27	4.885	2.547	1.92
57	288.68	5.774	3.306	1.75
60	417.26	8.345	4.345	1.92
61	321.4	6.428	3.492	1.84
63	545.77	10.915	6.06	1.8
64	1049.92	20.998	10.76	1.95
65	505.43	10.109	5.172	1.95
66	400.2	8.004	4.088	1.96
67	1396.57	27.931	13.882	2.01
68	1022	20.44	10.543	1.94
71	129.4	2.588	1.313	1.97
72	746.5	14.93	7.887	1.89
73	432.76	8.655	4.763	1.82
74	291.57	5.831	3.061	1.9
75	19.93	0.399	0.212	1.88
76	164.2	3.284	1.594	2.06
78	136.94	2.739	1.488	1.84
79	30.99	0.62	0.576	1.08
80	306.27	6.125	3.197	1.92
81	658.83	13.177	6.458	2.04
85	909.14	18.183	9.992	1.82
86	302.3	6.046	3.276	1.85
87	86.54	1.731	0.93	1.86
89	536.58	10.732	6.158	1.74
91	1051.88	21.038	11.412	1.84
92	103.27	2.065	1.043	1.98
93	172.88	3.458	1.92	1.8
94	191.83	3.837	1.926	1.99
97	591.44	11.829	6.688	1.77
98	285.73	5.715	2.954	1.93
99	411.2	8.224	4.309	1.91
100	563.5	11.27	6.554	1.72
101	294.94	5.899	3.165	1.86
109	138.73	2.775	1.439	1.93
110	473.59	9.472	4.915	1.93
111	366.11	7.322	3.893	1.88
112	889.59	17.792	8.846	2.01
117	725.6	14.512	7.235	2.01
118	410.2	8.204	4.468	1.84
122	450.51	9.01	4.638	1.94
123	387.68	7.754	4.146	1.87

129	186.55	3.731	1.893	1.97
131	537.09	10.742	5.346	2.01
133	585.2	11.704	5.962	1.96
137	312.25	6.245	3.209	1.95
139	64.62	1.292	0.643	2.01
143	718	14.36	7.11	2.02
149	383.39	7.668	4.192	1.83
150	504.51	10.09	4.964	2.03
151	470	9.4	5.171	1.82
154	132.59	2.652	1.275	2.08
158	251.49	5.03	2.55	1.97
159	519.79	10.396	5.394	1.93
162	507.15	10.143	4.996	2.03
166	443.39	8.868	4.649	1.91
169	495.2	9.904	5.319	1.86
170	285.82	5.716	2.927	1.95
173	254.52	5.09	2.691	1.89
174	495.06	9.901	5.084	1.95
179	425.31	8.506	4.601	1.85
180	451.62	9.032	4.668	1.93
183	120	2.4	1.259	1.91
186	1466.95	29.339	14.325	2.05
189	308.03	6.161	3.182	1.94
191	744.63	14.893	7.446	2
192	133.5	2.67	1.354	1.97
194	295.34	5.907	3.116	1.9
197	128.49	2.57	1.419	1.81
199	185.18	3.704	7.953	0.47
204	95.91	1.918	1.22	1.57
206	750.37	15.007	8.335	1.8
212	318.33	6.367	3.438	1.85
216	781.26	15.625	8.681	1.8
217	656.18	13.124	6.806	1.93
222	237.26	4.745	2.533	1.87
224	461.45	9.229	5.284	1.75
225	514.16	10.283	5.747	1.79
226	711.48	14.23	7.608	1.87
227	1100.85	22.017	12.144	1.81
232	885.49	17.71	9.374	1.89
233	813.23	16.265	8.678	1.87
238	530.55	10.611	5.571	1.9
242	228.36	4.567	2.354	1.94
243	255.48	5.11	2.861	1.79
244	1118.72	22.374	12.273	1.82
245	1024.94	20.499	11.117	1.84

247	180.39	3.608	1.81	1.99
250	177.29	3.546	1.816	1.95
259	37.83	0.757	0.275	2.75
263	14.27	0.285	0.196	1.46
264	65.98	1.32	0.677	1.95
265	215.02	4.3	2.345	1.83
266	300.31	6.006	3.175	1.89
268	543.35	10.867	6.318	1.72
269	146.85	2.937	1.501	1.96
269	306.45	6.129	3.242	1.89
270	518.46	10.369	5.662	1.83
271	843.6	16.872	9.494	1.78
272	231.92	4.638	2.461	1.88
281	586.83	11.737	6.152	1.91
283	1046.27	20.925	11.5	1.82

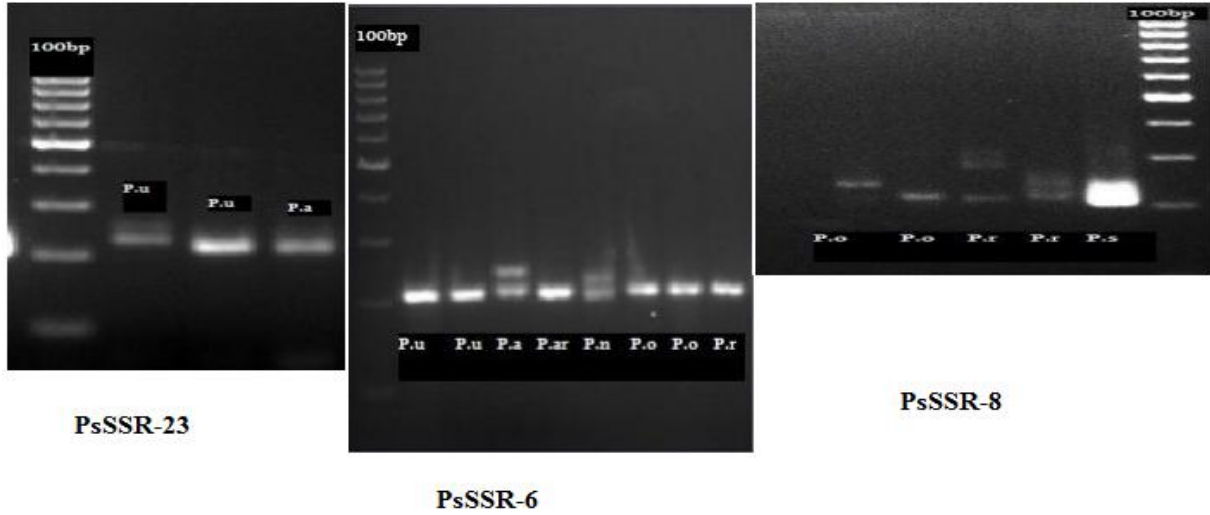
Nanodrop ile yapılan ölçümlerden de anlaşıldığı gibi haritalama popülasyonunu oluşturan bitkilerden yüksek miktar ve kalitede DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Proje kapsamında öngörüldüğü üzere, Haşhaş'ta genetik harita oluşturulmasında kullanılacak SSR markörlerini belirlemek için, proje kapsamında geliştirilen 1000 adet genomik DNA spesifik SSR markörü kullanılarak anaç hatlarda polimorfizm tarama çalışması yapılmıştır. Proje kapsamında oluşturulan haritalama popülasyonlarının ebeveynleri olan *Papaver somniferum* var. Kemer kaya, 1259-1, 1065, 1061-7, Aday1 ve 1290 çeşitlerinin verdiği DNA bant profilleri agaroz jelde incelenmiş ve en iyi amplifikasyon veren SSR markörleri belirlenmiştir. Tarama sonucunda 912 SSR markörü iyi amplifikasyon vermiştir. Toplam 33 SSR marköründe hiç amplifikasyon gözlenmemiştir. Dokuz SSR marköründe üç bant ve 46 SSR marköründe iki bant gözlemlenmiştir. Tarama sonucunda polimorfik SSR markörü bulunamamıştır. Çalışma sonucunda iyi amplifikasyon veren bazı SSR markörleri gösterilmektedir (Şekil 16).

Şekil 16. Çalışma sonucunda iyi amplifikasyon veren bazı SSR markörleri; 100bp: 100bp size standard DNA ladder. A1: Kemer kaya, A2: 1259-1, A3: 1065, A4: 1061-7, A5: aday1; A6: 1290.



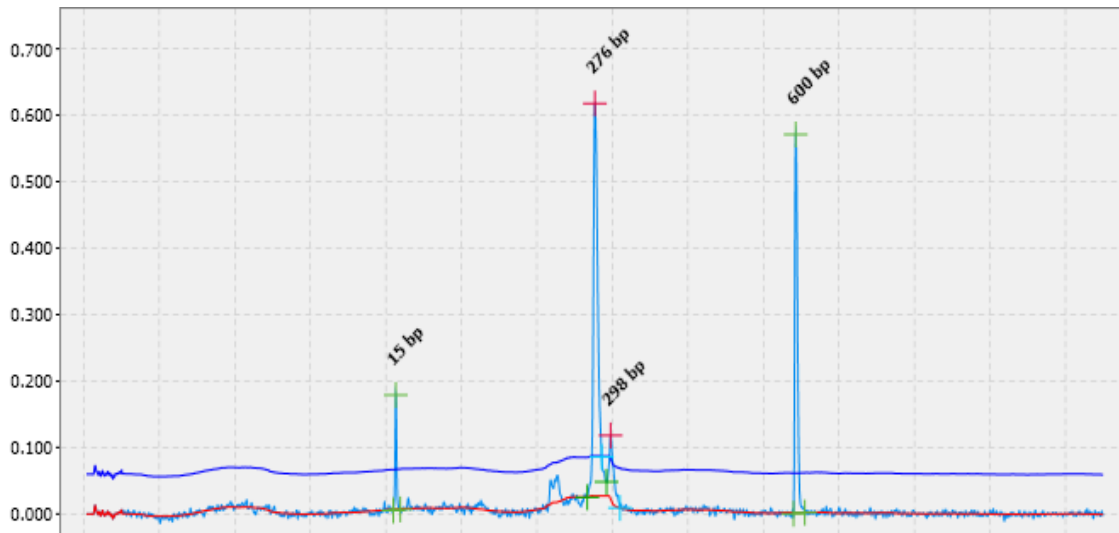
Proje kapsamında geliştirilen genomik DNA spesifik SSR (psSSRg) markörleri *Papaver somniferum*'un yakın türlerinde genetik çeşitliliğin belirlenmesi çalışmalarında da kullanılacağından, 100 adet gSSR markörü seçilmiştir ve bu markörler kullanılarak *Papaver somniferum* ve yakın türlerinde polimorfizm tarama çalışması yapılmıştır. Çalışmada kullanılan 100 adet gSSR markörün *Papaver somniferum* ve yakın türleri olan *P. bracteatum*, *P. umbonatum*, *P. arenarium*, *P. armeniacum*, *P. nudicaule*, *P. rhoeas*, *P. orientale* türlerinde verdiği DNA bant profilleri incelenmiş ve amplifikasyon veren ve polimorfik olan gSSR markörleri belirlenmiştir. Bu çalışmalar sonucunda üç adet polimorfik gSSR markörü belirlenmiştir. Şekil 13 polimorfik bulunan gSSR markörlerini göstermektedir. Şekil 17 bu çalışma sonucunda *Papaver somniferum* 'un yakın türlerinde en iyi amplifikasyon veren SSR markör sayılarını göstermektedir.

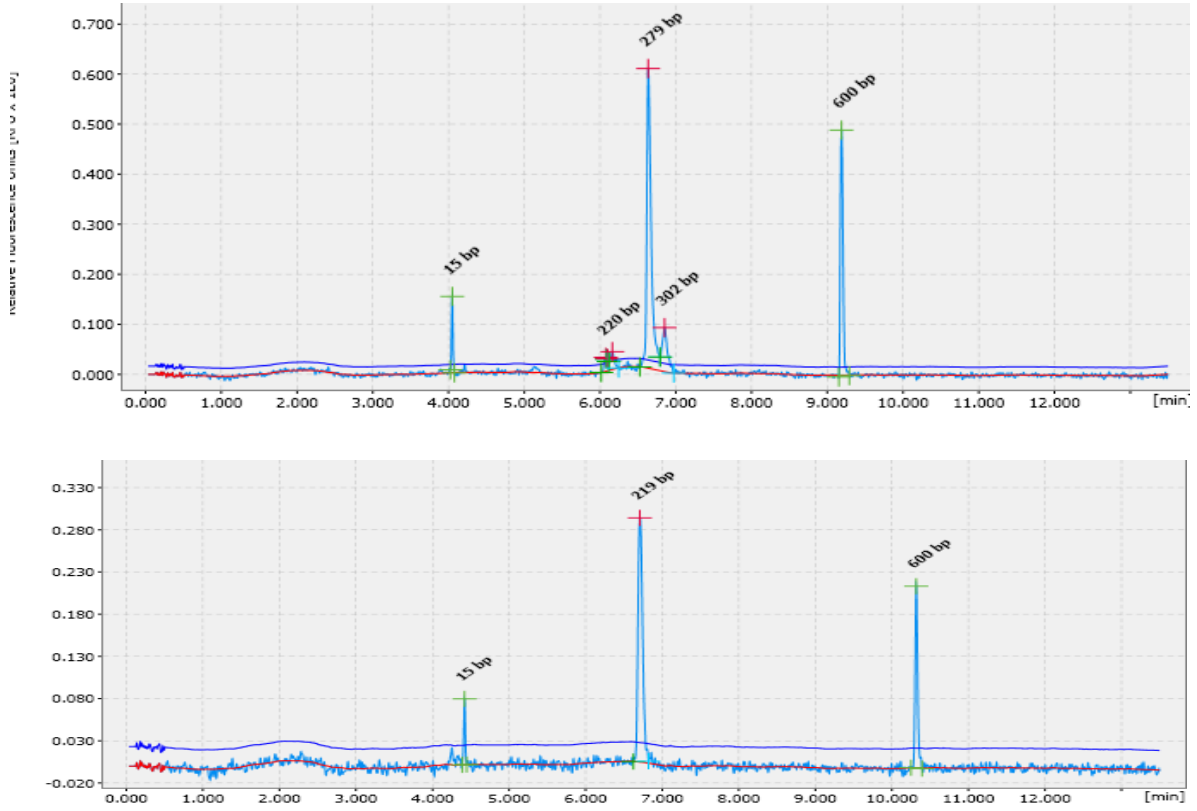
Şekil 17. *Papaver somniferum* ve yakın türlerinde bulunan polimorfik SSR markörleri. P.u: *P. umbonatum*, P.a : *P. arenarium*, P.ar: *P. armeniacum*, P.o: *P. orientale*, P.r: *P. rhoeas*. P.s: *Papaver somniferum*.



Agaroz jelde görüntülemeyen bazı gSSR markörleri Qiaxcel, QIAGEN kapiler elektroforez sisteminde yüksek çözünürlük sağlayan OM800 programı kullanılarak analiz edilmiştir. Proje kapsamında oluşturulan haritalama popülasyonunun ebeveyni olan *Papaver somniferum* var. Kemer kaya ve 1061-7 çeşitleri ile yapılan polimorfizm tarama çalışmaları sonucunda 22 adet polimorfik gSSR markörü belirlenmiştir. Bu çalışma sonucunda elde edilen polimorfik PCR ürünü veren bazı SSR markörleri Şekil 18'te gösterilmiştir.

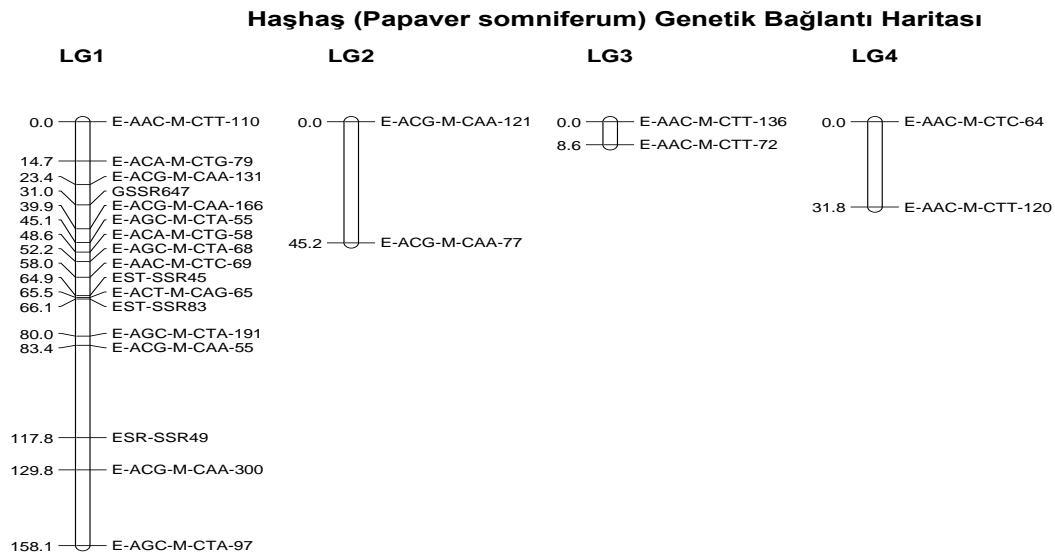
Şekil 18. SSR primerlerinin anaçlarda taranması sonucu elde edilen PCR ürünlerinin kapillar elektroforez görüntüleri



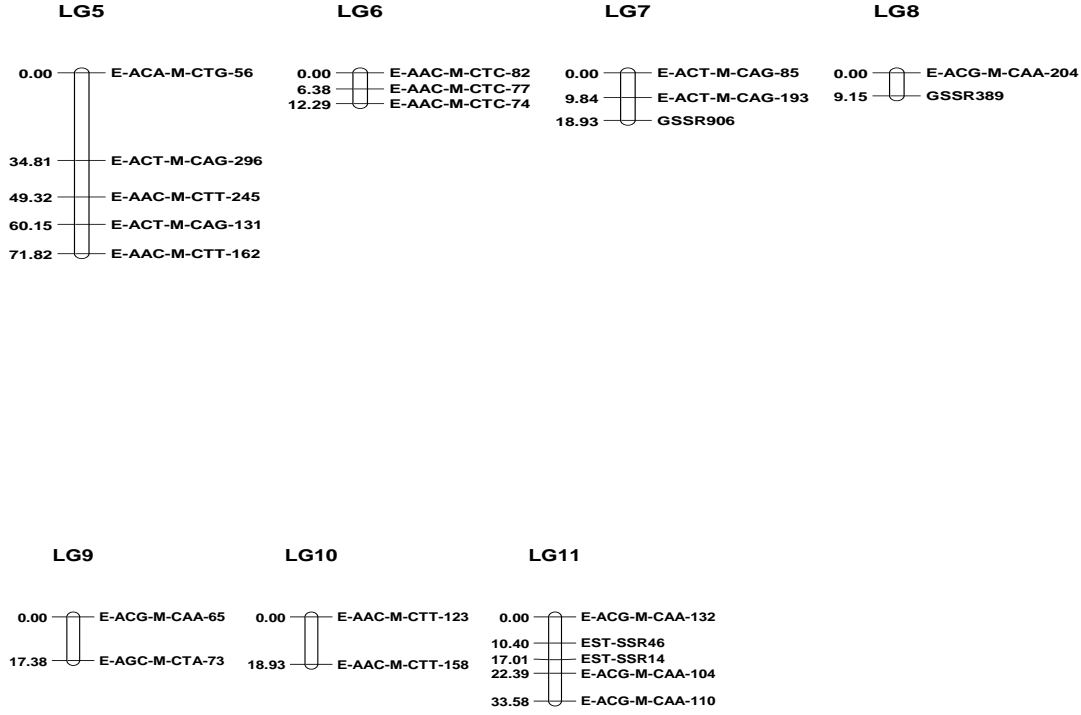


Proje kapsamında genetik bağlantı haritası oluşturmak için proje kapsamında geliştirilen gSSR ve AFLP markörleri de kullanılmıştır. Haritalama popülasyonunun ebeveynlerinde polimorfik bulunan altı adet AFLP primer kombinasyonu ve haritalama popülasyonunda açılım gösteren 15 adet SSR işaretleyicisi haritalama çalışmasında kullanılmıştır. Haritalama popülasyonunda toplam 101 adet AFLP lokusu açılım göstermiştir. Polimorfik bulunan lokuslar dominant olarak skorlanmıştır. Tüm haritalama hesaplarında JoinMap haritalama programı kullanılmıştır. Toplam 37 AFLP ve 8 adet SSR işaretleyicisi 11 bağlantı grubunda haritalanmıştır. Bağlantı grubu sayısı haşhaş kromozom sayısına eşittir. Gruplandırma işleminde LOD değeri en az 3.0 olarak kullanılmıştır. Markörler arasındaki mesafe Kosambi haritalama fonksiyonu kullanılarak hesaplanmıştır. Şekil 19 proje kapsamında oluşturulan haşhaş genetik bağlantı haritasını göstermektedir.

Şekil 19. Haşhaş genomu için geliştirilen moleküler genetik bağlantı haritası







Oluşturulan moleküler genetik bağlantı haritası düşük çözünürlüktedir. Haritanın çözünürlüğünün artırılması için çalışmalara devam edilmektedir.

#### 4.2.5. Haşhaş'ta İlişkilendirme Analizleri

##### 4.2.5.1. AFLP Markörleri ile Haşhaş gen kaynaklarının genotiplenmesi

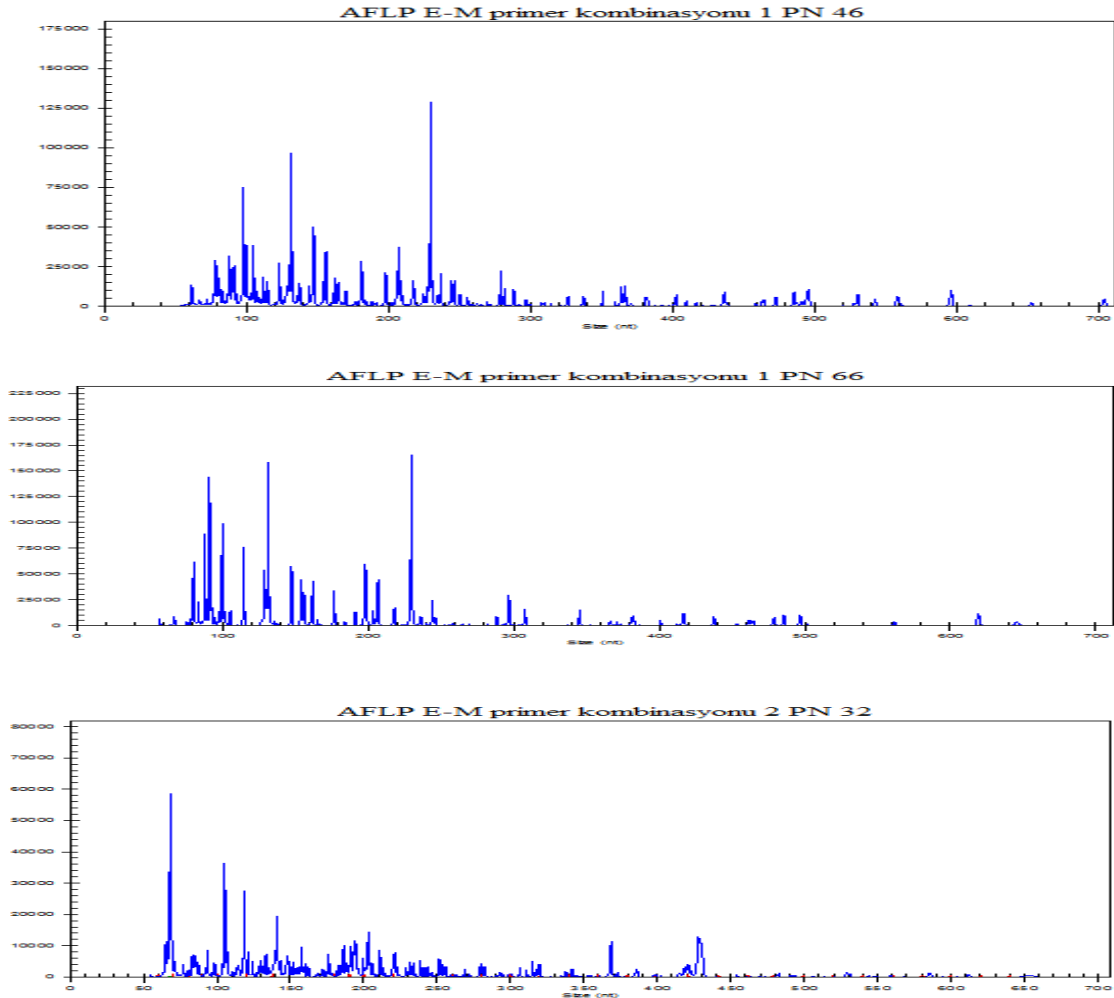
Proje kapsamında öngörülen toplam 10 adet seçici *EcoRI*/*MseI* AFLP primer kombinasyonu (Tablo x) haşhaş'ta ilişkilendirme haritalaması çalışmalarında kullanılmıştır. Toplam 10 adet seçici *EcoRI*/*MseI* AFLP primer kombinasyonu 95 adet genotipten oluşan haşhaş koleksiyonu testlenmiştir. Her bir kombinasyonun vermiş olduğu fragment (lokus) sayısı Tablo 19'te gösterilmektedir. Selective PCR amplifikasyonu ile çoğaltılan fragmentler dominant olarak skorlanmıştır (varlığı için 1 yokluğu için 0) toplam 367 adet AFLP fragmenti Türk haşhaş çeşitlerinde polimorfik olarak bulunmuştur. Skorlanan AFLP fragmentleri ilişkilendirme haritalaması analizlerinde kullanılmıştır. Şekil 20. AFLP fragmentlerini göstermektedir.

Tablo 19. İlişkilendirme haritalaması çalışmalarında kullanılan AFLP kombinasyonları ve vermiş olduğu polimorfik fragment sayısı.

Kombinasyon numarası	Primer E	primer M	Polimorfik Fragment sayısı
1	ACT	CAG	24
2	AAC	CTT	34
3	AAC	CTC	36

4	ACG	CAA	42
5	ACC	CAC	54
6	AGC	CTA	28
7	ACA	CTG	37
8	ACC	CAG	51
9	ACA	CAG	11
10	AGG	CAT	50
Toplam	-	-	367

Şekil 20. Seçici AFLP amplifikasyonlarının görüntüleri



#### 4.2.5.2. EST ve Genomik DNA spesifik işaretleyicileri kullanılarak haşhaş genkaynaklarının genotiplenmesi

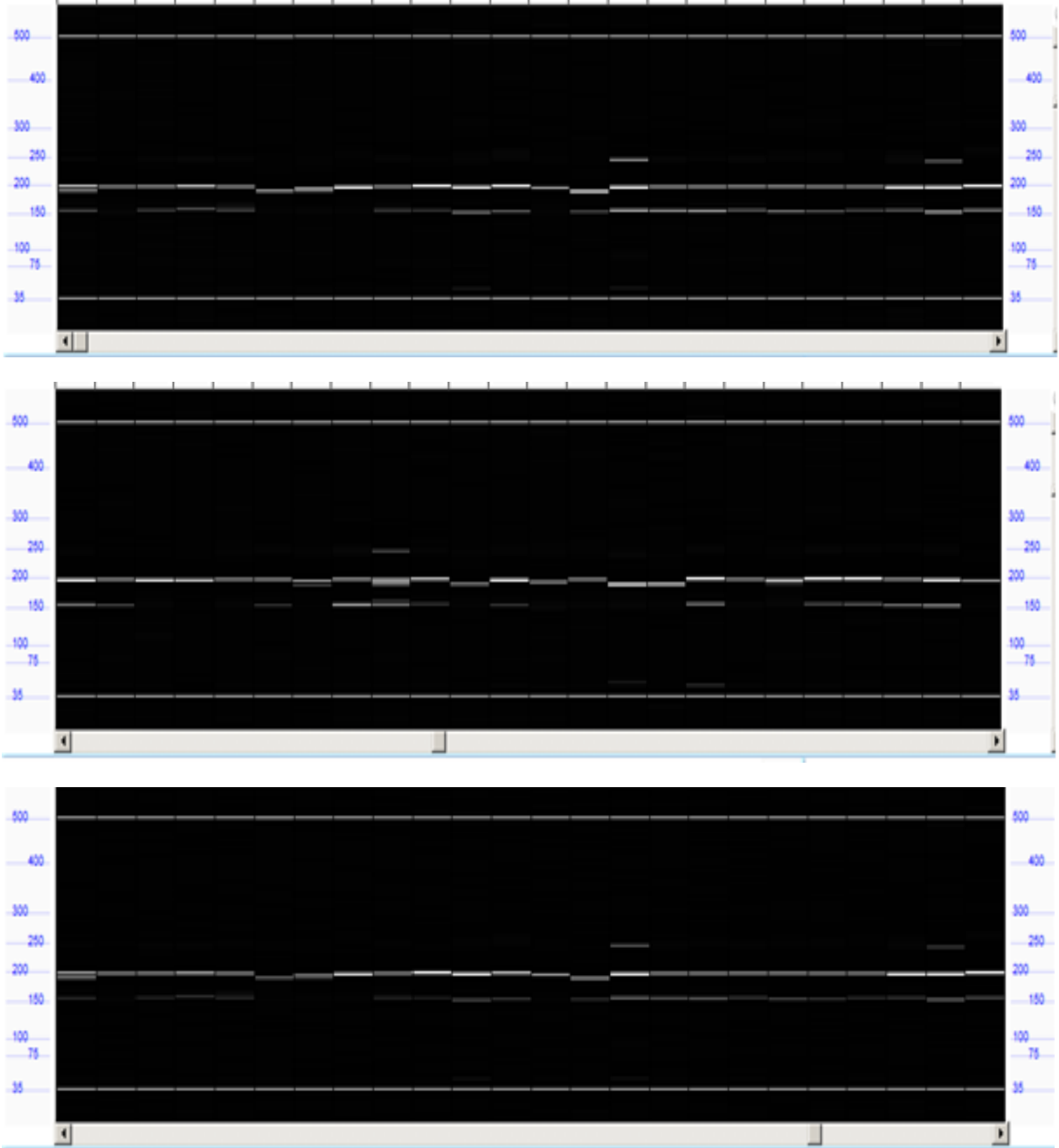
Proje kapsamında haşhaş EST ve genomik DNA dizileri kullanılarak geliştirilen SSR primerleri 125 genotipten oluşan Türk haşhaş germplazm kaynaklarının genotipik profillerinin çıkarılmasında kullanılmıştır (Tablo 20). Toplam 100 adet EST ve genomik DNA spesifik SSR markörü haşhaş çeşitlerinde testlenmiştir. SSR markörlerinin vermiş olduğu PCR fragmentleri kapiler elektroforez kullanılarak analiz edilmiştir. EST-SSR ve genomik SSR markörleri toplam 307 adet PCR ürünü vermiştir. Bu ürünlerden 172 (56%) adedi haşhaş genotipleri arasında polimorfik olarak bulunmuştur. SSR markörlerinin vermiş olduğu PCR fragmentleri dominant olarak skorlanmıştır (varlığı için 1 yokluğu için 0). Tablo x çalışmada kullanılan haşhaş çeşitlerinin genotiplenmesinde kullanılan SSR markörlerini göstermektedir. Şekil 21 SSR işaretleyicilerinin vermiş olduğu PCR ürünlerini göstermektedir.

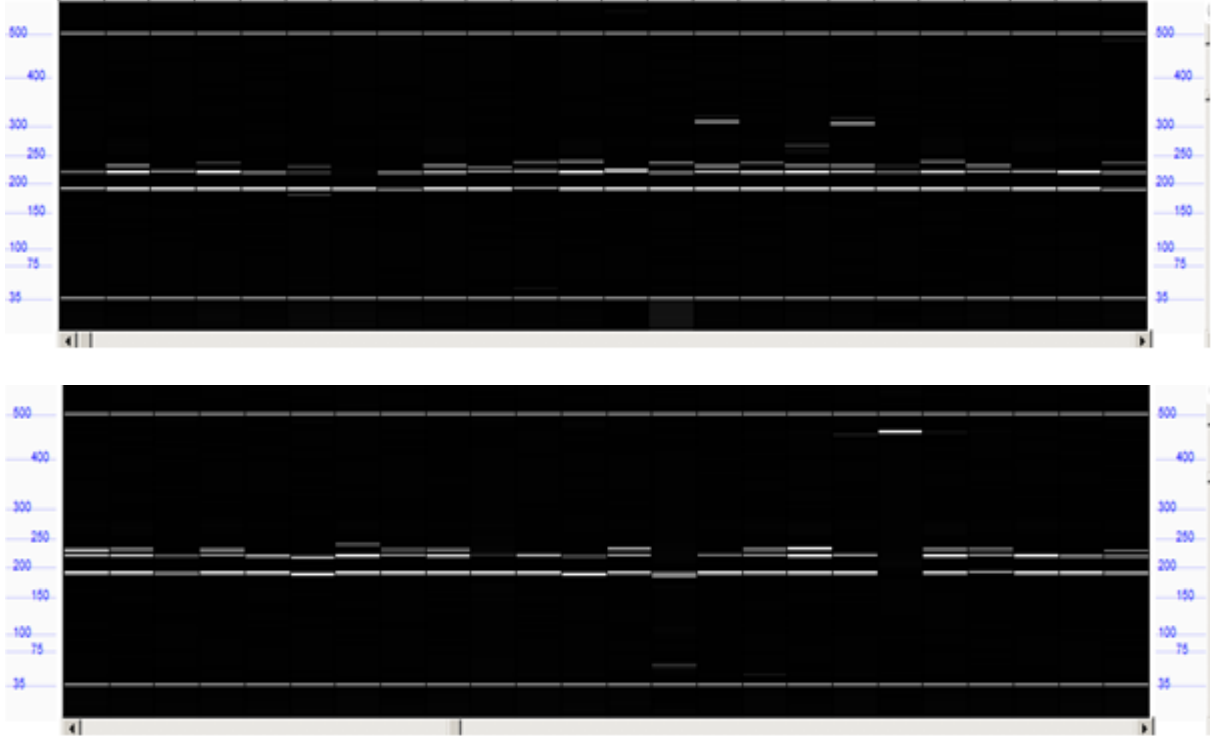
Tablo 20. Türk haşhaş çeşitlerinin genotiplendirilmesinde kullanılan SSR markörleri.

SSR işaretleyicisi	EST/genomik	SSR işaretleyicisi	EST/genomik
14	EST	191	genomik DNA
18	EST	268	genomik DNA
23	EST	297	genomik DNA
24	EST	306	genomik DNA
41	EST	318	genomik DNA
45	EST	356	genomik DNA
46	EST	367	genomik DNA
47	EST	391	genomik DNA
48	EST	484	genomik DNA
49	EST	496	genomik DNA
51	EST	500	genomik DNA
52	EST	502	genomik DNA
54	EST	515	genomik DNA
59	EST	516	genomik DNA
69	EST	588	genomik DNA
76	EST	596	genomik DNA
83	EST	600	genomik DNA
93	EST	601	genomik DNA
6	genomik DNA	603	genomik DNA
8	genomik DNA	647	genomik DNA
40	genomik DNA	672	genomik DNA
57	genomik DNA	808	genomik DNA
64	genomik DNA	853	genomik DNA
184	genomik DNA	872	genomik DNA
510	genomik DNA	873	genomik DNA
895	genomik DNA	342	genomik DNA
900	genomik DNA	305	genomik DNA
905	genomik DNA	307	genomik DNA
909	genomik DNA	344	genomik DNA
910	genomik DNA	452	genomik DNA
914	genomik DNA	868	genomik DNA
351	genomik DNA	820	genomik DNA
353	genomik DNA	477	genomik DNA
369	genomik DNA	482	genomik DNA
375	genomik DNA	271	genomik DNA
387	genomik DNA	448	genomik DNA
388	genomik DNA	200	genomik DNA
389	genomik DNA	907	genomik DNA
538	genomik DNA	185	genomik DNA
561	genomik DNA	716	genomik DNA
598	genomik DNA	5	genomik DNA
662	genomik DNA	23	genomik DNA

563	genomik DNA	38	genomik DNA
141	genomik DNA	37	genomik DNA
889	genomik DNA	34	genomik DNA
881	genomik DNA	47	genomik DNA
852	genomik DNA	22	genomik DNA
849	genomik DNA	80	genomik DNA
869	genomik DNA	60	genomik DNA
526	genomik DNA	529	genomik DNA

Şekil 21. gSSR588 markörünün haşhaş çeşitlerinde vermiş olduğu açılım görülmektedir.





#### 4.2.5.3. MLM (Mixed Linear Model) yöntemi kullanılarak Haşhaş'ta Agromonik karakterler İçin Kantitatif Karakter Lokuslarının (QTL) belirlenmesi

Haşhaş'ta agromonik karakterlerle ilişkili kantitatif karakter lokusları (QTL) SSR ve AFLP lokuslarının Tassel programı ile analizi sonucu belirlenmiştir. Bu amaç için çalışmada kullanılan haşhaş çeşitlerinin agromonik karakterlerine ait verileri, Structure programı (PRITCHARD ve ark. 2000) ile elde edilen populasyon yapısı (K=2) sonuçları, çeşitlerin akrabalık ilişkilerini gösteren K matrisi ve polimorfik SSR ve AFLP lokusları kullanılmıştır. Tüm bu verileri değerlendiren MLM (mixed linear model) yöntemi analizlerde kullanılmıştır. Toplam beş adet SSR lokusu ve 33 adet AFLP lokusunun haşhaş bitki boyu ile ilişkili olduğu bulunmuştur (Tablo 21). Toplam 2 adet SSR ve 28 AFLP lokusunun haşhaş dal sayısı ve kapsülde tepçik sayısı karakteri ile ilişkili olduğu bulunmuştur (Tablo 22). Toplam 5 adet SSR ve 26 AFLP lokusunun haşhaş kapsül boyu karakteri ile ilişkili olduğu bulunmuştur (Tablo 23). Ayrıca 2 adet SSR ve 34 AFLP lokusunun haşhaş kapsül eni karakteri ile ilişkili olduğu bulunmuştur (Tablo 24). Toplam 20 AFLP lokusunun kapsül verimi ile ilişkili olduğu belirlenmiştir (Tablo 25). Toplam 2 adet SSR ve 22 AFLP lokusunun haşhaş tohum verimi karakteri ile ilişkili olduğu bulunmuştur (Tablo 26). Haşhaşta morfin sentezi ile ilişkili olan 2 SSR ve 16 AFLP lokusu belirlenmiştir. Tablo 27 morfin senteziyle ilişkili olan SSR ve AFLP lokuslarını göstermektedir.

Tablo 21. MLM ilişkilendirme haritalaması sonucu Haşhaş bitki boyu karakteri ile ilişkili olan markörler (p<0.05).

işretleyici	p değeri p<0.05	SSR/AFLP
E-ACC_M-CAC-110	8.9266E-11	AFLP
E-ACG_M-CAA-222	9.3069E-11	AFLP
E-ACC_M-CAC-121	4.5156E-10	AFLP
G905-354	5.1994E-08	SSR
E-ACC_M-CAC-67	8.0031E-08	AFLP
E-ACC_M-CAG-124	0.000029238	AFLP
E-ACC_M-CAC-134	0.000099753	AFLP
E-ACC_M-CAG-165	0.0001511	AFLP
E-ACC_M-CAC-116	0.00021191	AFLP
E-AGC_M-CTA-79	0.00043776	AFLP

E-ACC_M-CAC-182	0.0011	AFLP
E-ACC_M-CAC-86	0.0012	AFLP
E-ACG_M-CAA-128	0.0013	AFLP
G563-191	0.0016	SSR
E-AAC_M-CTC-114	0.0025	AFLP
E-AAC_M-CTC-100	0.0036	AFLP
E-AGG_M-CAT-134	0.0072	AFLP
E-ACC_M-CAC-79	0.0091	AFLP
E-AAC_M-CTT-132	0.0099	AFLP
E-AGG_M-CAT-124	0.011	AFLP
GSSR388-378	0.0127	SSR
E-ACC_M-CAC-137	0.0155	AFLP
E-ACC_M-CAC-160	0.017	AFLP
E-ACG_M-CAA-152	0.0197	AFLP
EST-76-268	0.0207	SSR
E-ACC_M-CAC-158	0.0219	AFLP
E-AGG_M-CAT-136	0.0233	AFLP
E-AAC_M-CTT-67	0.0238	AFLP
E-AAC_M-CTC-219	0.0243	AFLP
E-AAC_M-CTT-114	0.0269	AFLP
E-AGG_M-CAT-196	0.0273	AFLP
GSSR589-329	0.0288	SSR
E-ACC_M-CAC-113	0.0346	AFLP
E-AGG_M-CAT-128	0.0347	AFLP
E-AGC_M-CTA-166	0.0363	AFLP
E-AAC_M-CTT-185	0.0407	AFLP
E-AAC_M-CTC-65	0.0456	AFLP
E-AAC_M-CTT-64	0.0496	AFLP

Tablo 22. MLM ilişkilendirme haritalaması sonucu Haşhaş dal sayısı ve kapsül tepelik sayısı karakteri ile ilişkili olan markörler (  $p < 0.05$ ).

işretleyici	p değeri $p < 0.05$	SSR/AFLP
E-AAC_M-CTT-133	0.000058223	AFLP
E-AAC_M-CTT-251	0.0027	AFLP
E-ACG_M-CAA-73	0.0047	AFLP
E-AAC_M-CTT-76	0.0057	AFLP
E-AAC_M-CTT-368	0.0065	AFLP
E-ACA_M-CAG-103	0.0098	AFLP
E-ACG_M-CAA-76	0.0103	AFLP
E-AAC_M-CTT-175	0.0105	AFLP
E-AAC_M-CTT-83	0.0142	AFLP
G910-210	0.0171	SSR
G589-325	0.0185	SSR
E-AGG_M-CAT-195	0.0209	AFLP
E-ACC_M-CAG-87	0.0231	AFLP

E-ACC_M-CAC-146	0.0238	AFLP
E-ACC_M-CAG-153	0.0239	AFLP
E-ACG_M-CAA-90	0.0253	AFLP
E-ACC_M-CAG-109	0.0272	AFLP
E-ACT_M-CAG-185	0.0274	AFLP
E-AAC_M-CTT-186	0.0308	AFLP
E-ACC_M-CAC-267	0.0345	AFLP
E-ACC_M-CAG-98	0.035	AFLP
E-AGG_M-CAT-60	0.0377	AFLP
E-AAC_M-CTC-220	0.0378	AFLP
E-AAC_M-CTT-114	0.0411	AFLP
E-ACC_M-CAG-122	0.0434	AFLP
E-AAC_M-CTT-191	0.0449	AFLP
E-ACC_M-CAG-124	0.0462	AFLP
E-AAC_M-CTC-96	0.0472	AFLP
E-AAC_M-CTC-183	0.0481	AFLP
E-AGC_M-CTA-113	0.0493	AFLP

Tablo 23. MLM ilişkilendirme haritalaması sonucu haşhaş kapsül boyu ile ilişkili olan markörler (p<0.05).

işretleyici	p değeri p<0.05	SSR/AFLP
E-ACT_M-CAG-145	8.2059E-06	AFLP
E-ACC_M-CAC-158	0.000012474	AFLP
E-ACC_M-CAC-196	0.000029181	AFLP
E-AGC_M-CTA-78	0.00057229	AFLP
E-ACC_M-CAC-122	0.00094263	AFLP
E-AAC_M-CTT-83	0.0011	AFLP
E-AGG_M-CAT-196	0.0011	AFLP
E-ACC_M-CAC-182	0.0027	AFLP
E-AGC_M-CTA-164	0.0028	AFLP
E-ACC_M-CAC-86	0.0034	AFLP
E-AGC_M-CTA-79	0.0045	AFLP
E-AAC_M-CTT-114	0.0052	AFLP
E-AGG_M-CAT-176	0.0057	AFLP
E-AAC_M-CTT-191	0.0069	AFLP
E-AAC_M-CTC-106	0.0069	AFLP
E-ACC_M-CAC-125	0.0073	AFLP
E-AGG_M-CAT-137	0.0076	AFLP
E-AAC_M-CTC-110	0.0091	AFLP
E-ACC_M-CAG-177	0.0099	AFLP
E-AAC_M-CTC-114	0.0103	AFLP
E-AAC_M-CTT-220	0.0126	AFLP
E-ACC_M-CAG-85	0.0169	AFLP
GSSR184-227	0.0176	SSR
GSSR184-230	0.0176	SSR

E-ACC_M-CAC-164	0.0182	AFLP
E-ACC_M-CAG-125	0.0199	AFLP
EST-23-300	0.0245	SSR
E-ACC_M-CAC-133	0.0296	AFLP
EST-389-206	0.0372	SSR
GSSR907-180	0.0398	SSR
E-ACC_M-CAC-79	0.0424	AFLP

Tablo 24. MLM ilişkilendirme haritalaması sonucu haşhaş kapsül eni ile ilişkili olan markörler (p<0.05).

işretleyici	p değeri p<0.05	SSR/AFLP
GSSR563-191	0.0035	SSR
G907-180	0.0361	SSR
E-ACT_M-CAG-185	0.0497	AFLP
E-AAC_M-CTT-203	0.00087338	AFLP
E-AAC_M-CTT-76	0.0293	AFLP
E-AAC_M-CTT-191	0.0056	AFLP
E-AAC_M-CTT-83	0.0022	AFLP
E-AAC_M-CTT-133	2.6152E-06	AFLP
E-AAC_M-CTT-121	0.0087	AFLP
E-AAC_M-CTT-204	0.0018	AFLP
E-AAC_M-CTC-94	0.0456	AFLP
E-AAC_M-CTC-87	0.0109	AFLP
E-AAC_M-CTC-103	0.000059301	AFLP
E-AAC_M-CTC-112	0.0118	AFLP
E-AAC_M-CTC-183	0.0017	AFLP
E-AAC_M-CTC-231	0.0401	AFLP
E-ACG_M-CAA-71	0.0248	AFLP
E-ACG_M-CAA-90	7.8008E-09	AFLP
E-ACG_M-CAA-100	0.00080997	AFLP
E-ACG_M-CAA-152	0.0131	AFLP
E-ACC_M-CAC-196	7.6774E-06	AFLP
E-ACC_M-CAC-131	0.0038	AFLP
E-ACC_M-CAC-268	0.00027614	AFLP
E-ACC_M-CAC-205	9.4378E-09	AFLP
E-ACC_M-CAC-157	0.002	AFLP
E-ACC_M-CAC-146	0.0171	AFLP
E-ACC_M-CAC-122	0.0081	AFLP
E-ACC_M-CAC-75	0.0042	AFLP
E-AGC_M-CTA-167	0.0413	AFLP
E-AGC_M-CTA-138	0.0115	AFLP
E-ACC_M-CAG-177	0.0181	AFLP
E-AGG_M-CAT-137	0.0108	AFLP
E-AGG_M-CAT-162	0.0041	AFLP



E-AGG_M-CAT-129	0.0166	AFLP
E-AGG_M-CAT-145	0.01	AFLP
E-AGG_M-CAT-124	0.0083	AFLP

Tablo 25. MLM ilişkilendirme haritalaması sonucu haşhaş kapsül verimi ile ilişkili olan markörler (p<0.05).

işretleyici	p değeri p<0.05	SSR/AFLP
E-AAC_M-CTT-66	6.0891E-06	AFLP
E-AAC_M-CTT-121	0.0233	AFLP
E-AAC_M-CTT-130	0.0236	AFLP
E-AAC_M-CTT-220	0.03	AFLP
E-AAC_M-CTC-92	0.0473	AFLP
E-AAC_M-CTC-100	0.0097	AFLP
E-AAC_M-CTC-82	0.0017	AFLP
E-AAC_M-CTC-96	0.0215	AFLP
E-ACG_M-CAA-223	0.0102	AFLP
E-ACC_M-CAC-153	0.0214	AFLP
E-ACC_M-CAC-157	0.0292	AFLP
E-ACC_M-CAC-146	0.0051	AFLP
E-ACC_M-CAC-133	0.024	AFLP
E-AGC_M-CTA-167	0.0012	AFLP
E-AGC_M-CTA-79	0.038	AFLP
E-AGC_M-CTA-138	0.0447	AFLP
E-ACC_M-CAG-153	0.0244	AFLP
E-ACC_M-CAG-170	0.0196	AFLP
E-AGG_M-CAT-135	0.0152	AFLP
E-AGG_M-CAT-210	0.0066	AFLP

Tablo 26. MLM ilişkilendirme haritalaması sonucu haşhaş tohum verimi ile ilişkili olan markörler(p<0.05).

işretleyici	p değeri p<0.05	SSR/AFLP
G375-312	0.0225	SSR
G375-361	0.0279	SSR
E-ACT_M-CAG-150	0.00016119	AFLP
E-ACT_M-CAG-165	0.0271	AFLP
E-AAC_M-CTT-191	0.000042072	AFLP
E-AAC_M-CTC-215	0.0423	AFLP
E-AAC_M-CTC-108	0.0023	AFLP
E-AAC_M-CTC-100	0.00078555	AFLP
E-AAC_M-CTC-114	0.0287	AFLP
E-AAC_M-CTC-96	0.0136	AFLP
E-AAC_M-CTC-183	0.0249	AFLP
E-AAC_M-CTC-231	0.0182	AFLP
E-ACG_M-CAA-128	0.0308	AFLP
E-ACG_M-CAA-60	0.0065	AFLP

E-ACC_M-CAC-131	0.0044	AFLP
E-ACC_M-CAC-86	0.0379	AFLP
E-ACC_M-CAC-121	0.00080515	AFLP
E-ACC_M-CAC-154	0.0287	AFLP
E-ACC_M-CAC-164	0.0095	AFLP
E-ACC_M-CAC-125	0.0364	AFLP
E-AGC_M-CTA-167	0.0179	AFLP
E-AGC_M-CTA-79	0.0137	AFLP
E-AGC_M-CTA-113	0.0337	AFLP
E-ACC_M-CAG-153	0.0188	AFLP

Tablo 27. MLM ilişkilendirme haritalaması sonucu haşhaş morfin oranı ile ilişkili olan markörler (p<0.05).

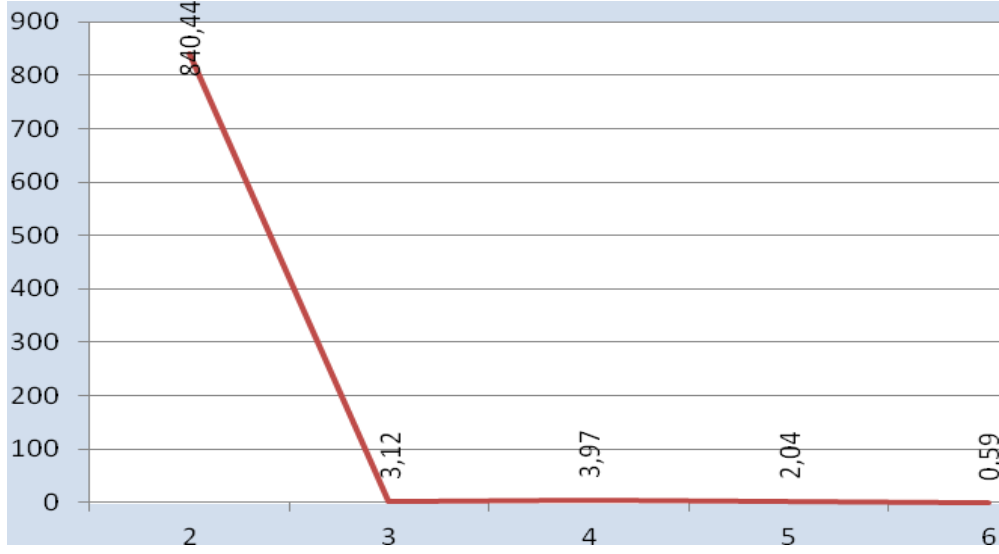
işretleyici	p değeri p<0.05	SSR/AFLP
G561-210	0.0162	SSR
GSSR6-214	0.0365	SSR
E-AAC_M-CTC-88	0.0387	AFLP
E-AAC_M-CTC-87	0.0028	AFLP
E-AAC_M-CTC-71	0.0252	AFLP
E-AAC_M-CTC-110	0.0262	AFLP
E-ACG_M-CAA-64	0.0294	AFLP
E-ACC_M-CAC-110	0.0028	AFLP
E-ACC_M-CAC-67	0.0063	AFLP
E-ACC_M-CAC-117	0.023	AFLP
E-ACC_M-CAC-164	0.00034058	AFLP
E-ACC_M-CAC-72	0.023	AFLP
E-ACC_M-CAC-73	0.0245	AFLP
E-AGC_M-CTA-78	0.0016	AFLP
E-ACC_M-CAG-111	0.000037238	AFLP
E-ACA_M-CAG-158	0.041	AFLP
E-AGG_M-CAT-162	0.0088	AFLP
E-AGG_M-CAT-210	0.0127	AFLP

#### 4.2.5.4. Haşhaş Çeşitlerinin Populasyon Yapısının Belirlenmesi

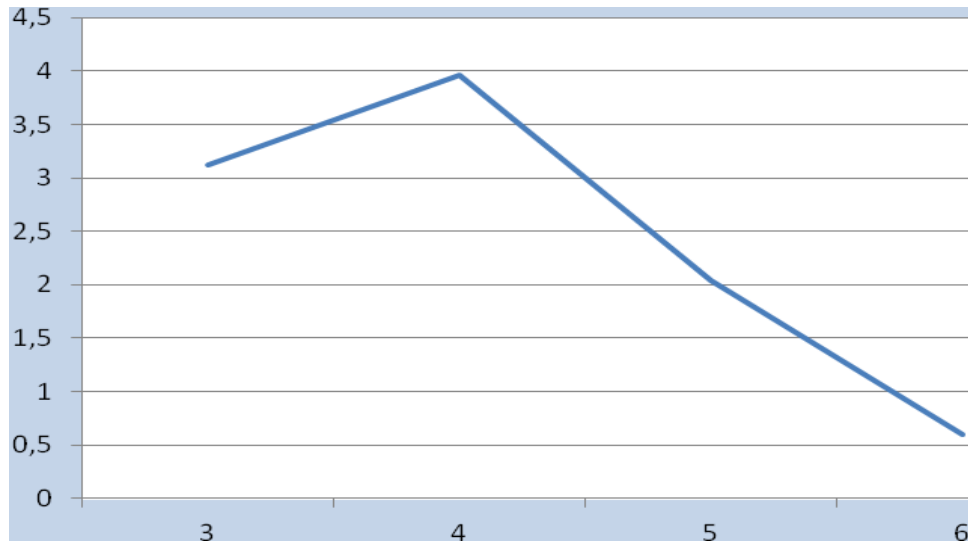
Toplam 95 haşhaş çeşidi 100 adet SSR ve 10 adet seçici AFLP kombinasyonu ile testlenmiş ve STRUCTURE programı (Pritchard ve ark. 2000) kullanılarak kümeleme analizi yapılmıştır. Haşhaş populasyonunu en iyi yansıtan grup sayısını belirlemek için EVANNO ve ark. (2005) tarafından tanımlanan hoc istatistiği kullanılmıştır. Bunun için Haşhaş populasyonu 1 den 6'ya kadar gruplar için ayrı ayrı değerlendirilmiş ve her bir grubun olasılık değişimi ( $\Delta K$ ) hesaplanmıştır. En yüksek  $\Delta K$  değeri K=2 (iki küme) için bulunmuştur. Şekil 22 farklı küme sayılarının (K=2-6)  $\Delta K$  değerlerini göstermektedir. İkinci en yüksek  $\Delta K$  değerine sahip grup sayısı 4 olarak bulunmuştur (Şekil 23). Populasyon yapısını yansıtan en iyi grup sayısı iki olmasına rağmen haşhaş populasyonu karışık (intermixed) bir populasyon olduğundan, grup sayısı dört (K=4) populasyon yapısını iyi şekilde yansıtmaktadır. Şekil 24 (K=2) ve Şekil 25 (K=4) haşhaş K=2 ve K=4 grup sayıları için populasyon yapılarını göstermektedir. Böyle karışık (intermixed) populasyonlarda en düşük grup sayısı gerçek populasyon yapısı olarak değerlendirilmesi önerilmektedir. Bundan dolayı ilişkilendirme haritalaması hesaplamalarında haşhaş populasyonu iki grup (K=2) olarak kullanılacaktır. K=2 değeri için bireylerin farklı kümelerde bulunma olasılığı hesaplanmıştır. Tablo 28 bireylerin iki kümede (grup1 ve grup2) bulunma olasılıklarını vermektedir. Gruplandırma yapılırken P>0.8 değeri dikkate alınmıştır. Böylelikle birinci grupta 22 adet

birey ve ikinci kümede 48 adet birey bulunmaktadır. Toplam 25 adet bireyin hangi kümeye ait olduğu belirlenememiştir (intermixed). Grup 1'deki bireylerin arasındaki ortalama farklılık 0.2090 olarak hesaplanmıştır. Grup 2'deki bireylerin arasındaki ortalama uzaklık 0.2102 olarak belirlenmiştir.

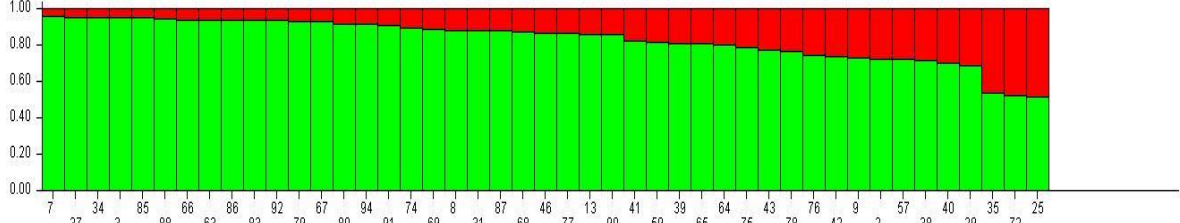
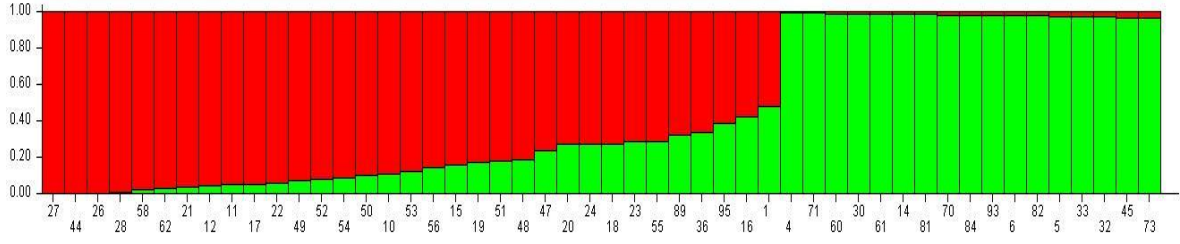
Şekil 22. Farklı küme sayılarının (K=2-6)  $\Delta K$  değerleri. En yüksek  $\Delta K$  değerine sahip olan küme sayısı (K=2) popülasyon yapısını en iyi yansıtmaktadır.



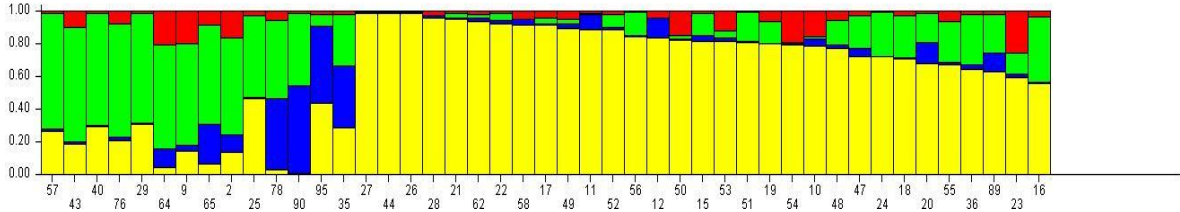
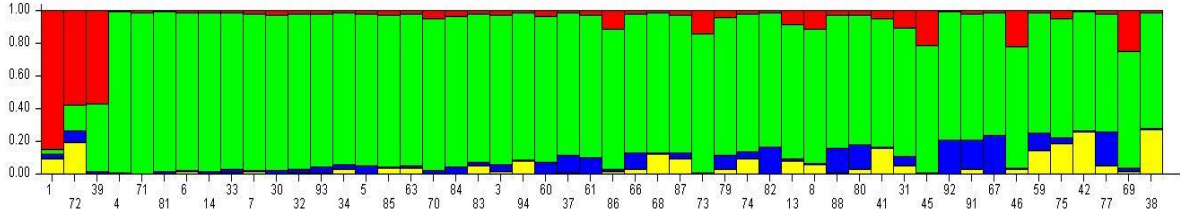
Şekil 23. Farklı küme sayılarının (K=3-6)  $\Delta K$  değerleri. En yüksek ikinci  $\Delta K$  değerine sahip olan küme sayısı (K=4).



Şekil 24. Haşhaş çeşitlerinin (K=2 için) populasyon yapısı. Kırmızı ve yeşil renkler iki farklı kümeyi göstermektedir.



Şekil 25. Haşhaş çeşitlerinin (K=4 için) populasyon yapısı. Kırmızı, yeşil ve sarı renkler üç farklı grubu göstermektedir



Tablo 28. Haşhaş çeşitlerinin iki farklı kümede bulunma olasılıkları

Structure Numarası	PN	Grup1	Grup2	Grup1/Grup2
4	39	0.005	0.995	grup2
71	73	0.005	0.995	grup2
60	82	0.009	0.991	grup2
30	34	0.01	0.99	grup2
61	81	0.01	0.99	grup2
14	6	0.014	0.986	grup2
81	77	0.014	0.986	grup2
70	120	0.015	0.985	grup2
84	69	0.015	0.985	grup2
93	75	0.018	0.982	grup2
6	50	0.021	0.979	grup2
82	76	0.021	0.979	grup2
5	47	0.022	0.978	grup2

33	63	0.022	0.978	grup2
32	35	0.028	0.972	grup2
45	12	0.03	0.97	grup2
73	113	0.035	0.965	grup2
7	54	0.037	0.963	grup2
37	27	0.043	0.957	grup2
34	65	0.044	0.956	grup2
3	52	0.046	0.954	grup2
85	70	0.047	0.953	grup2
88	121	0.056	0.944	grup2
66	108	0.058	0.942	grup2
63	110	0.059	0.941	grup2
86	98	0.06	0.94	grup2
83	78	0.061	0.939	grup2
92	68	0.061	0.939	grup2
79	94	0.065	0.935	grup2
67	104	0.066	0.934	grup2
80	117	0.079	0.921	grup2
94	102	0.084	0.916	grup2
91	122	0.088	0.912	grup2
74	112	0.105	0.895	grup2
69	106	0.11	0.89	grup2
8	41	0.116	0.884	grup2
31	8	0.117	0.883	grup2
87	71	0.117	0.883	grup2
68	105	0.127	0.873	grup2
46	62	0.13	0.87	grup2
77	91	0.131	0.869	grup2
13	48	0.138	0.862	grup2
90	99	0.142	0.858	grup2
41	29	0.174	0.826	grup2
59	74	0.185	0.815	grup2
39	61	0.187	0.813	grup2
65	107	0.19	0.81	grup2
64	109	0.196	0.804	grup2
75	111	0.212	0.788	intermixed
43	11	0.227	0.773	intermixed
78	93	0.233	0.767	intermixed
76	119	0.251	0.749	intermixed
42	21	0.259	0.741	intermixed
9	43	0.267	0.733	intermixed
2	51	0.273	0.727	intermixed
57	116	0.278	0.722	intermixed
38	57	0.279	0.721	intermixed

40	28	0.293	0.707	intermixed
29	30	0.312	0.688	intermixed
35	26	0.464	0.536	intermixed
72	72	0.472	0.528	intermixed
25	31	0.481	0.519	intermixed
1	38	0.519	0.481	intermixed
16	17	0.574	0.426	intermixed
95	114	0.608	0.392	intermixed
36	66	0.662	0.338	intermixed
89	100	0.677	0.323	intermixed
55	85	0.71	0.29	intermixed
23	15	0.711	0.289	intermixed
18	20	0.725	0.275	intermixed
20	23	0.728	0.272	intermixed
24	55	0.728	0.272	intermixed
47	25	0.764	0.236	intermixed
48	56	0.813	0.187	grup1
51	58	0.818	0.182	grup1
19	13	0.827	0.173	grup1
15	16	0.84	0.16	grup1
56	118	0.854	0.146	grup1
53	88	0.876	0.124	grup1
10	46	0.889	0.111	grup1
50	32	0.896	0.104	grup1
54	86	0.909	0.091	grup1
52	84	0.916	0.084	grup1
49	60	0.928	0.072	grup1
22	53	0.939	0.061	grup1
17	18	0.943	0.057	grup1
11	36	0.945	0.055	grup1
12	37	0.951	0.049	grup1
21	14	0.962	0.038	grup1
62	79	0.966	0.034	grup1
58	83	0.974	0.026	grup1
28	49	0.991	0.009	grup1
26	10	0.994	0.006	grup1
27	3	0.996	0.004	grup1
44	24	0.996	0.004	grup1

#### 4.2.5.5. Türk haşhaş çeşitlerinde çekirdek koleksiyonu oluşturulması

Proje kapsamında 95 haşhaş çeşidi AFLP ve SSR işaretleyicileri kullanılarak karakterize edilmiştir. Bu işaretleyicilerle oluşturulan polimorfik PCR fragmentleri dominant olarak skorlanmıştır. Bu genotip verileri türk haşhaş çeşitlerinden çekirdek koleksiyonu belirlenmesinde kullanılmıştır. Çekirdek koleksiyonu PowerCore programı( KİM ve ark. 2007) kullanılarak oluşturulmuştur. Oluşturulan çekirdek koleksiyonunda toplam 30 adet haşhaş çeşidi bulunmaktadır (Tablo 29).

Tablo 29. Haşhaş çekirdek koleksiyonu

Bitki No	Çiçek Rengi	Toplandıkları Lokasyonlar
11	YEŞİL	AFYON-MERKEZ
12	PEMBE	YALVAÇHÖYÜKLÜ-İSPARTA
18	YEŞİL	İSPARTA
20	SARI	BOLVADİN-AFYON
21	BEYAZ	KOÇYATAĞI-ŞUHUT-AFYON
31	SARI	KARAYAHŞİLER-ÇİVRİL DENİZLİ
32	BEYAZ	AFYON-MERKEZ
37	BEYAZ	YALVAÇHÖYÜKLÜ-İSPARTA
38	SARI	BURDUR-ÇELTİK
41	BEYAZ	ŞUHUT KOÇYATAĞI
43	PEMBE	BURDUR-ÇELTİK
46	SARI	BURDUR-ÇELTİK
47	MAVİ	ÇİVRİL KARAYAHŞİLER-DENİZLİ
48	KAHVE	ÇİVRİL KARAYAHŞİLER-DENİZLİ
49	SARI	UŞAK- ÇEVREKÖYÜ
56	SARI	DERESENEK-AFYON
61	YEŞİL	ŞUHUT-AFYON
62	KAHVE	SÜLÜMENLİ-AFYON
66	YEŞİL	ÇOBANLAR-AFYON
72	SARI	KOÇYATAĞI-ŞUHUT-AFYON
79	YEŞİL	HİSARCIK EMET -KÜTAHYA
82	SARI	DİŞLİ KASABASI-AFYON
83	SARI	ŞUHUT-KOÇYATAĞI-AFYON
85	YEŞİL	SANDIKLI ALACAMI-AFYON
98	SARI	ÇAY-KARACAÖREN-AFYON
106	SARI	ŞUHUT-ANAYURT-AFYON
107	SARI	ACIPAYAN-DENİZLİ
109	BEYAZ	ACIPAYAN-DENİZLİ
113	SARI	ARIZLAR KÖYÜ-SANDIKLI-AFYON
114	SARI	SÜLÜMENLİ-AFYON

## 5. SONUÇLAR

1. Proje kapsamında Türk haşhaş koleksiyonları kullanılarak yapılan genetik çeşitlilik analizlerinde haşhaş için genetik varyasyon düzeyinin fazla olmadığı sonucu EST-SSR, genomik-SSR ve AFLP analizleri ile ortaya konmuştur.
2. Türk haşhaş genotipleri arasında agro-morfolojik karakterler gözönünde bulundurularak yapılan genetik çeşitlilik analizlerinde özellikle kantitatif kalıtım gösteren karakterler bakımından genotipler arasında sınırlı düzeyde varyasyon gözlenmiştir
3. Proje kapsamında haşhaş genomu için ilk kez genomik diziler oluşturulmuştur ve bu diziler kullanılarak yeni SSR markörleri geliştirilmiştir. Geliştirilen markörler genetik çeşitlilik ve haritalama çalışmalarında kullanılmıştır. Ayrıca, halka açık veribankalarından temin edilen EST dizileri kullanılarak SSR markörleri geliştirilmiştir. Bu markörler de genetik çeşitlilik analizlerinde ve haritalama çalışmalarında kullanılmıştır. Böylece, moleküler genetik çalışmalar için ihmal edilmiş bir tür olan haşhaş genomu için yeni genomik araçlar geliştirilmiştir.
4. Proje kapsamına düşük çözünürlükte genomik-SSR ve AFLP markörlerine dayalı bir moleküler genetik bağlantı haritası oluşturulmuştur. Bu haritanın çözünürlüğünün artırılması çalışmalarına laboratuvarımızda bir doktora çalışması kapsamında devam edilecektir.
5. Proje kapsamında haşhaş bitkisi için önemli bazı agro-morfolojik karakterler ve morfin içeriği için ilişkilendirme analizleri ile bazı QTL lokusları belirlenmiştir.



## EK-2

### YARARLANILAN KAYNAKLAR LİSTESİ İÇİN BİBLİYOGRAFİK VERİLERİN GENEL DÜZENLEME ŞEKLİ

#### Yararlanılan kaynak;

1. **Periyodik yayın ise;** yazar(lar)'ın, soyadı, adının başharfi, makale adı, derginin adı (varsa uluslararası kısaltmaları), cilt no, sayı no, başlangıç ve bitiş sayfa no, yıl.

**Örnek:** ÖZSOYLU Ş., Koçak N., Deniz Mavisi Histiositozisi, *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*, 16, 304-9, (1973).

2. **Kitap ise;** yazar(lar)'ın, soyadı, adının başharfi, kitabın adı, editörün adı (varsa), cilt no, basımevinin adı, yayınlandığı yer, basım yılı, sayfa no.

**Örnek:** ARIMAN, A., *Progress in Particle and Nuclear Physics*, ed: Wilconsin D., Vol:1, Pergamon, New York, (1978). Pp: 41.

3. **Kitaptan bölüm ise;** yazar(lar)'ın, soyadı, adının başharfi, bölümün adı, bölümün alındığı kitabın adı, editörün adı (varsa), cilt no, basımevinin adı, yayınlandığı yer, basım yılı, sayfa no.

**Örnek:** ARIMAN, A., *Progress in Particle and Nuclear Physics*, ed: Wilconsin D., Vol:1, Pergamon, New York, (1978). Pp: 41.

4. **Tez veya proje ise;** yazar(lar)'ın, soyadı, adının başharfi, tezin adı, tezin türü (Ph.D., M.Sc.), tez çalışmasının yapıldığı kuruluşun adı ve adresi, çalışmanın yapıldığı yıl.

**Örnek:** TAŞÇIOĞLU, S., *Blister Bakırın Perlitle Arıtılması*, (Doktora Tezi), İstanbul Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, (1984).

5. **Tebliğ veya rapor ise;** yazar(lar)'ın, soyadı, adının başharfi, tebliğin adı, kongre-seminer adı, sunulduğu yer, basım yeri, yıl, sayfa no.

**Örnek:** FEUER, H., Aydın, A., Preparation and Reactions of 4-Nitro-5,6-Diphenyl-2H-Pyridazine-3-one, 6<sup>th</sup> Int. Congress of Heterocyclic Chemistry, Tehran-Iran, (1977) pp: 418-9.

## REFERANSLAR

- Abdelkrim J., Bruce C. R., Jo-ann L S., Neil J.I., Fast cost-effective development of species-specific microsatellite markers by genomic sequencing, *Short Technical Reports*, 46, (2009).
- Acharya H.S., Vimal S., Molecular Characterization of Opium Poppy (*Papaver somniferum*) Germplasm, *American Journal of Infectious Diseases*, 5(2), 155–160, (2009).
- Agrama H.A, Eizenga G.C, Yan W., Association mapping of yield and its components in rice cultivars, *Mol. Breed.* 19, 341–356, (2007).
- Andersen J.R., Schrag T., Melchinger A.E., Zein I., Lubberstedt T., Validation of Dwarf8 polymorphisms associated with flowering time in elite European inbred lines of maize (*Zea mays* L.), *Theor Appl Genet.*, 111, 206–217, (2005).
- Anonim (2005) TMO'nun 10.02.2005 tarih ve B122TMO0180001 sayılı resmi yazısı.
- Aranzana M.J., Kim S., Zhao K., Bakker E., Horton M., Genome-wide association mapping in *Arabidopsis* identifies previously known flowering time and pathogen resistance genes, *PLoS Genet.* 1,5, 531-539, (2005).
- Arslan O., Değişik Gelişim Devrelerinde Farlı Tohum Renkli Haşhaş Bitkilerinin Muhtelif Kısımlarındaki Alkaloid Oluşumu üzerine Araştırmalar, Doçentlik Tezi, Ankara, (1982).
- Arslan N., Er C., Camcı H., Haşhaş ekim Yasağının kaldırılmasından Beri Haşhaş Tarımı ve Problemleri, VI. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı. Bildiri Kitabı, Ankara, (1986) . pp: 99-118.
- Baldwin B.G., Sanderson M.J., Porter J.M., Wojciechowski M.F., Cambell C.S., Donogue M.J., The ITS region of nuclear DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 82, 247-277, (1995).
- Bao J.S., Corke H., Sun M., Microsatellites, single nucleotide polymorphisms and a sequence tagged site in starch-synthesizing genes in relation to starch physicochemical properties in nonwaxy rice (*Oryza sativa* L.), *Theor. Appl. Genet.*, 113, 1185–1196, (2006).
- Belo A., Zheng P., Luck S., Shen B., Meyer D.J., Li B., Tingey S., Rafalski A., Whole genome scan detects an allelic variant of fad2 associated with increased oleic acid levels in maize, *Mol. Genet. Genomics*, 279, 1–10, (2008).
- Bennett M.D., Smith J.B., Nuclear DNA amounts in angiosperms, *Phil. Trans. Royal. Soc. London B*, 274, 227-274, (1976).
- Bernath J., Danos B., Veres T., Szanto J. Teteny P., Variation in alkaloid production in poppy ecotypes: responses to different environments, *Biochem. Syst. And Ecol.*, 16 (2), 171-175, (1988).
- Bernath J., Poppy, The Genus *Papaver*, Department of Medicinal Plant Production, University of Horticulture and Food Industry, Budapest, Hungary, (1998).
- Bhandari M.M., Out-crossing in opium poppy (*Papaver somniferum* L.), *Euphytica* 48, 167-169, (1990).
- Bradbury P.J., Zhang Z., Kroon D.E., Casstevens T.M., Ramdoss Y. Buckler ES., TASSEL: software for association mapping of complex traits in diverse samples, *Bioinformatics*, 23(19), 2633-2635, (2007).
- Breseghello F., Sorrells M.E., Association mapping of kernel size and milling quality in wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars, *Genetics*, 172, 1165–1177, (2006).
- Cancer G., MIRA: An Automated Genome and EST Assembler, (2005).
- Caroloan J.C., Hook I.L.I., Walsh J.J. Hodkinson T.R., Using AFLP markers for species differentiation and assessment of genetic variability of in vitro cultured *Papaver bracteatum* (Section *Oxytona*), *In Vitro Cell Dev Biol Plant*, 38, 300-307,(2002).
- Carolan J.C., Hook I.L.I., Chase M.W., Kadereit J.W., Hodkinson T.R., Phylogenetics of *Papaver* and related genera based on DNA sequences from ITS nuclear ribosomal DNA and Plastid trnL intron and trnL-F intergenic spacers. *Annals of Botany*, 98, 141-155, (2006).
- Casa A.M., Pressoira G., Brown P.J., Mitchell S.E., Rooney W.L., Tuinstrac M.R., Franks C.D., Kresovicha S., Community resources and strategies for association mapping in sorghum. *Crop Sci.*, 48, 30–40, (2008).
- Causse M., Linkage Disequilibrium mapping for tomato fruit quality traits, The 5<sup>th</sup> Solanaceae Genome Workshop. Germany, (2008).
- Cavagnaro P.F, A.S Douglas, Yang L., Simon P. W. ve ark., Genome-wide characterization of simple sequence repeats in cucumber (*Cucumis sativus* L.), *BMC Genomics*, 11, 569, (2010).
- Chabane K., Ablett G., Cordeiro M., Valkoun J., Henry R J., EST versus genomic derived microsatellite markers for genotyping wild and cultivated barley, 903–909, (2005).

- Chevreux B., Pfisterer T., Drescher B., Using the miraEST assembler for reliable and automated mRNA transcript assembly and SNP detection in sequenced ESTs. *Genome Research*, 14, 1147-59, (2004).
- Chung A.M., Staub J.E., Chen J.F., Molecular phylogeny of Cucumis species as revealed by consensus chloroplast SSR marker length and sequence variation, *Genome*, 49, 219-229, (2006).
- Cho Y.G., Ishii T., Temnykh S., Chen X., Lipovich L., McCouch S.R., Park W.D., Ayres N., Cartinhour S., Diversity of microsatellites derived from genomic libraries and GenBank sequences in rice (*Oryza sativa* L.), *Theor Appl Genet.*, 100, 713-722, (2000).
- Conesa A., Götz S., García-Gómez J.M., Terol J., Talón M., Robles M., Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research, *Bioinformatics*, 21, 3674-3676, (2005).
- Desgagne-Penix I., Khan M.F., Schriemer D.C., Cram D., Nowak J., Facchini P.J., Integration of deep transcriptome and proteome analyses reveals the components of alkaloid metabolism in opium poppy cell cultures, *BMC Plant Biology*, 10, 252-269, (2010).
- Dittbrenner A., Lohwasser U., Mock H.P. Börner A., Molecular and phytochemical studies of *Papaver somniferum* in the context of infraspecific classification, *Acta. Hort*, 799, 81-88, (2008).
- Doerge R.W., Mapping and analysis of quantitative trait loci in experimental populations. *Nat. Rev. Genet.*, 3, 43–52, (2002).
- Doyle J.J., Doyle J.E., Isolation of plant DNA from fresh tissue, *Focus*, 12, 13-15, (1990).
- Dubedout M., Analysis of progenies from a circular plan of crosses in poppy (*Papaver somniferum* L.), (Doktora tezi), Thesis Univ. Of Paris, Orsay, pp:101. (1993).
- Ehrenreich I.M., Stafford P.A., Purugganan M.D., The genetic architecture of shoot branching in *Arabidopsis thaliana*: A comparative assessment of candidate gene associations vs. quantitative trait locus mapping, *Genetics*, 176, 1223–1236, (2007).
- Ellis J. R., Burke J. M., EST-SSRs as a resource for population genetic analyses, *Heredity*, 99, 125–132, (2007).
- Eken H., Haşhaş, Tarımsal Ekonomi Araştırma Enstitüsü Yayınları, 7 (7), 1-4, (2004).
- Ellegren H., Microsatellites: simple sequences with complex evolution, *Nat. Rev. Genet.*, 5, 435-445, (2004).
- Ersoz E.S., Yu J., Buckler E.S., Applications of linkage disequilibrium and association mapping in crop plants, Genomic assisted crop improvement: Genomics approaches and platforms, ed: Varshney R., Tuberosa R., Vol I, Springer Verlag, Germany, (2008), pp. 97–120.
- Eujayl I., Sorrells M., Baum M., Wolters P., Powell W., Assessment of genotypic variation among cultivated durum wheat based on EST-SSRs and genomic SSRs, *Euphytica*, 119, 39–43, (2000).
- Facchini P. J., Vincenzo D. L., Opium poppy and Madagascar periwinkle: model non-model systems to investigate alkaloid biosynthesis in plants, *The Plant journal* □: for cell and molecular biology, 54(4), 763–84, (2008).
- FAO Statistics (2006, 2007) <http://apps.fao.org/faostat>.
- Frary A., Xu Y., Liu J., Mitchell S., Tedeschi E., Tanksley S.D., Development of a set of PCR-based anchor markers encompassing the tomato genome and evaluation of their usefulness for genetics and breeding experiments, *Theor. Appl. Genet.*, 111, 291–312, (2005).
- Gao L.F., Tang J.F., Li H.W., Jia J.Z., Analysis of microsatellites in major crops assessed by computational and experimental approaches, *Mol. Breed.*, 12, 245-261, (2003).
- Geiringer H., On the probability theory of linkage in Mendelian heredity, *Ann Math Stat.*, 15, 25–57, (1944).
- Ghorghita G., Niculita C., Influence of self-pollination and of the branching degree on some morpho-physiological indices in opium poppy (*Papaver somniferum* L.), *Revue Roumaine De Biologie Serie De Biologie Vegetale*, 35(1), 67-74, (1990).
- Gümüşçü A., Seçilmiş Haşhaş (*Papaver somniferum* L.) Hatlarının Melezlerinde Verim ve Bazı Özelliklerde Heterosis Üzerine Araştırmalar, (Doktora tezi), Ankara üniversitesi Ziraat Fakültesi, (2001).
- Gümüşçü, A., Neşet A., Researches on Heterosis on Yield and Yield Components of Some Poppy, *Tarım Bilimleri dergisi*, 14(4), 365–373, (2008).
- Gupta P.K., Varshney R.K., The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat, *Euphytica*, 113, 163-185, (2000).

- Hardy O.J., Vekemans X., SPAGeDi: A versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels, *Mol. Ecol. Notes*, 2, 618–620, (2002).
- Harjes C.E., Rocheford T.R., Bai L., Brutnell T.P., Kandianis C.B., Sowinski S.G., Stapleton A.E., Vallabhaneni R., Williams M., Wurtzel E.T., Yan J., Buckler E.S., Natural genetic variation in lycopene epsilon cyclase tapped for maize biofortification, *Science*, 319, 330–333, (2008).
- Hari S., Sharma A., Sharma V., Molecular characterization of opium poppy (*Papaver somiferum*) germplasms, *American J. Inf. Dis.*, 2, 155-160, (2009).
- Hedrick P.W., Gametic disequilibrium measures: proceed with caution, *Genetics*, 117, 331–341, (1987).
- Hill W.G., Robertson A., Linkage disequilibrium in finite populations, *Theor Appl Genet.*, 38, 226–231, (1968).
- Holland J.B., Genetic architecture of complex traits in plants, *Curr. Opin. Plant Biol.*, 10, 156–161, (2007).
- Hui Y.H., Handbook of Food Science, Technology, and Engineering, CRC Press, (2006).
- Hlavackova Z., Investigation of The Inheritance of Morphine Content and Oil Content in Seed of *Papaver somniferum*, *Genetika a Slechteni. Prague.*, 9(1), 39-44, (1973).
- Hlavackova Z., Application of three and six parameter test to the genetical analysis of seed weight per plant and plant height in seed poppy, *Genetika a Slechteni*, 14 (2), 153-160, (1978).
- Incekara F., Türkiye Haşhaş Çeşitleri ve Bunların Tohum ve Afyon Verimi Bakımından Değerleri, Toprak Mahsulleri Ofisi Yayını, Ankara, (1949).
- INCB., List of psychotropic substances under international control, www.incb.org, pp: 1-32 (2003).
- Jones, N., Helen O., Howard T., Izolda P., Markers and mapping revisited: finding your gene, *The New phytologist*, 183(4), 935–66, (2009).
- Kadereit J.W., Kubitzki K., Rohweer J.G., Bittrich V., The families and genera of vascular plants, Vol. II, Springer-Verlag, Berlin, (1993), pp: 20-33.
- Kadereit J.W., Schwarzbach A.E., Jork KB., The phylogeny of papaver s.l. (Papaveraceae): polyphyly or monophyly?, *Pl Syst. Evo.*, 204, 75-98, (1997).
- Kandalkar V.S., Patidar H., Nigam K.B., Combining ability analysis for harvest index, seed yield and important component characters in opium poppy (*Papaver somniferum* L.), *Indian J. Genet.*, 52, 275–279, (1992).
- Kalia P.J., Rai M.K., Kalia S., Singh R., Dhawan A.D., Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants, *Euphytica*, 177, 309-334, (2011).
- Kantety R.V., Rotal M.L., Matthews D.E., Sorrells M.E., Data mining for simple sequence repeats in expressed sequence tags from barley, maize, rice, sorghum and wheat, *Plant Mol. Bio.*, 48, 501–10, (2002).
- Kapoor L.D., Opium poppy: Botany, chemistry and pharmacology. Food Product Press, New York, (1997). Pp: 19.
- Khanna K.R., and Shukla S., High-performance liquid chromatography investigation of the inheritance of major opium alkaloids, *Planta Medica*, 2, 157-158, (1986).
- Khanna K.R. and Shukla S. A., Study on the economic potential of interspecific crosses in opium poppy, XVIth International Congress of Genetics, Toronto-Canada, 1988 Pp: 465.
- Kim K.S., Ratcliffe S.T., French B.W., Liu L., Sappington T.W., Utility of EST-Derived SSRs as Population Genetics Markers in a Beetle, *Journal of Heredity*, 99(2), 112-124, (2008).
- Kraakman A.T.W., Martínez F., Mussiraliev B., Eeuwijk FA., Niks RE., Linkage disequilibrium mapping of morphological, resistance and other agronomically relevant traits in modern spring barley cultivars, *Mol. Breed.*, 17, 41–58, (2006).
- Kumar S., Blaxter M. L., Comparing de novo assemblers for 454 transcriptome data., *BMC Genomics*, 11, 571, (2010).
- Kumpatla S.P., Mukhopadhyay S., Mining and survey of simple sequence repeats in expressed sequence tags of dicotyledonous species, *Genome*, 48, 985-998, (2005).
- Lavania U.C., Srivastava S., Quantitative delineation of karyotype variation in Papaver as an measure of phylogenetic differentiation origin, *Current Science*, 77, 429-435, (1999).
- Landers E.S., Green P., Abrahamson J., Barlow A., Daly M.J., Lincoln S.E., Newburg L., Mapmaker: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations, *Genomics*, 1, 174-181, (1987).
- Lawson M.J., Zhang L., Distinct patterns of SSR distribution in the Arabidopsis thaliana and rice genomes, *Genome Biol.*, 7; R14, (2006).

- Lee E.J., Hwang I.K., Kim N.Y., Lee K.L., Han M.S., Lee Y.H., Kim M.Y., Yang M.S., An assessment of the utility of universal and specific genetic markers for opium poppy identification, *J. Forensic Sci.*, 55, 1002-1008, (2010).
- Lee E.J., Jin G.N., Lee K.L., Han S.M., Lee Y.H., Yang M.S., Exploiting Expressed Sequence Tag Databases for the Development and Characterization of Gene-Derived Simple Sequence Repeat Markers in the Opium Poppy (*Papaver somniferum* L.) for Forensic Applications, *J. Forensic Sci.*, 56, 1131-1135, (2011).
- Li Y.C., Korol A.B., Fahima T., Beiles A., Nevo E., Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review, *Mol. Ecol.*, 11, 2453-2465, (2002).
- Li Y.C., Korol A.B., Fahima T., Nevo E., Microsatellites within genes: structure, function, and evolution, *Mol. Biol. Evol.*, 21, 991-1007, (2004).
- Lewontin R.C., Kojima K. The evolutionary dynamics of complex polymorphisms, *Evolution*, 14, 458-472, (1960).
- Malausa, T., Megle, E., Nicolas F., High-throughput microsatellite isolation through 454 GS-FLX Titanium pyrosequencing of enriched DNA libraries, *Mol. Ecol. Resour.*, 638-644, (2011).
- Malosetti M., Linden C.G., Vosman B., Eeuwijk FA., A mixed-model approach to association mapping using pedigree information with an illustration of resistance to phytophthora infestans in potato, *Genetics*, 175, 879-889, (2007).
- Mansfield D., An analysis of licit opium poppy cultivation: India and Turkey. [www.geopium.org](http://www.geopium.org), p:1-54. (2001).
- Marcotte E.M., Pellegrini M., Yeates T.O., Eisenberg D., A census of protein repeats, *J. Mol. Biol.*, 293, 151, (1999).
- Morgante M., Hanafey M., Powell W., Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genomes, *Nature Genetics*, 3(2), 194-200, (2002).
- Morice J., Louarn J., Study of morphine in the oil poppy (*Papaver somniferum* L.), *Annales de l'Amelioration des Plantes*, 21(4), 465-484, (1971).
- Morin R.D., Bainbridge M., Fejes A., Hirst A., Krzywinski M., Pugh T.J., McDonald H., Varhol R., Jones S.J.M., Marra M.A., Profiling the HeLa S3 transcriptome using randomly primed cDNA and massively parallel short-read sequencing, *BioTechniques*, 45, 81-94, (2008).
- Miller J.A.C., Henning L., Heazlewood VL., Larkin P.J., Chitty J., Allen R., Brown PH., Gerlach WL., Fist AJ. Pollination biology of oilseed poppy, *Papaver somniferum* L., *Australian Journal of Agricultural Research*, 56: 483-490, (2005).
- Mun J.H., Kim D.J., Choi H.K., Gish J., Debelle F., Mudge J., Denny R., Endre G., Saurat O., Dudez A.M., Kiss G.B., Roe B., Young N.D., Cook D.R., Distribution of microsatellites in the genome of *Medicago truncatula*: A resource of genetic markers that integrate genetic and physical maps, *Genetics*, 172, 2541-2555, (2006).
- Nelson J.C., QGENE: software for marker-based genomic analysis and breeding, *Mol Breed.*, 3, 229-235, (1997).
- Nergiz C., Qtlés S., The proximate composition and some minor constituents of poppy seeds, *J. Sci. Food Agric.*, 66, 17-120, (1994).
- Nordborg M., Tavaré S., Linkage disequilibrium: what history has to tell us, *Trends Genet.*, 18(2), 83-90, (2002).
- Olsen K.M., Halldorsdottir S.S., Stinchcombe J.R., Weinig C., Schmitt J., Linkage disequilibrium mapping of *Arabidopsis* CRY2 flowering time alleles, *Genetics*, 167, 1361-1369, (2004).
- Ooijen, J.W., Maliepaard C. MapQTL version 3.0: Software for the calculation of QTL positions on genetic maps, Plant Genome IV Abstracts, (1996).
- Palaisa K.A., Morgante M., Williams M., Rafalski A., Contrasting effects of selection on sequence diversity and linkage disequilibrium at two phytoene synthase loci, *Plant Cell*, 15, 1795-1806, (2003).
- Parmaksız I., Sarihan E.O., Özcan S., Genetic Variation between Species in Oxytona section of *Papaver* genus revealed by Morphological and RAPD markers, 4th International Agro-Environ. role of multi-purpose agriculture in sustaining global environment, Udine-Italy, (2004), pp: 535.
- Parmaksız, I., Özcan S., Morphological, chemical, and molecular analyses of Turkish *Papaver* accessions (Sect. Oxytona), *Turk. J. Bot.*, 35, 1-16, (2011).
- Patra N.K., Ram R.S., Chauhan S.P., Singh A.K., Quantitative studies on the mating system of opium poppy (*Papaver somniferum* L.), *Theor Appl Genet.*, 84, 299-302, (1992).
- Perrier X., Jacquemoud-Collet J.P., DARwin software <http://darwin.cirad.fr/darwin>, (2006).

- Poncet V., Rondeau M., Tranchant C., Cayrel A., Hamon S., Kochko A., Hamon P., SSR mining in coffee tree EST databases: potential use of EST–SSRs as markers for the *Coffea* genus, *Mol. Gen. Genomics*, 276, 436-449, (2006).
- Price A.H., Believe it or not, QTLs are accurate. *Trends Plant Sci.*, 11(5), 213-6, (2006).
- Pritchard J.K., Stephens M., Rosenberg NA, Donnelly P., Association mapping in structured populations, *Am. J. Hum. Genet.*, 67,170–181, (2000).
- Rajendrakumar P., Biswal A.K., Balachandran S.M., Srinivasarao K., Sundaram R.M., Simple sequence repeats in organellar genomes of rice: frequency and distribution in genic and intergenic regions, *Bioinformatics*, 23, 1-4, (2007).
- Ripatti S., Becker T., Bickeböllner H., Dominicus A., Fischer C., Humphreys K., Jonasdottir G., Moreau Y., Olsson M., Ploner A., Sheehan N., Steen K., Baur M., van Duijn C., Palmgren J., GENESTAT: an information portal for design and analysis of genetic association studies, *European Journal of Human Genetics*, 17(4), 533–536, (2008).
- Roldán-Ruiz I., Dendauw J., Bockstaele E.V., Depicker A., Loose M. D., AFLP markers reveal high polymorphic rates in ryegrasses (*Lolium* spp.), *Mol. Breed*, 6, 125–134, (2000).
- Rudd S. Expressed sequence tags: alternative or complement to whole genome sequences?, *Trends Plant Sci.*, 8, 321–329, (2003).
- Saini H.C., Kaicker U.S., Combining ability for opium yield in exotic times indigenous crosses of opium-poppy (*Papaver somniferum*) grown in different environments, *Indian Journal Of Agricultural Sciences*, 56(1), 21-27, (1986).
- Saunders J.A., Pedroni M.J., Penrose L.D.J. Fist A.J., AFLP Analysis of opium poppy, *Crop Sci.*, 41, 1596-160, (2001).
- Schloss J., Mitchell E., White M., Kukatla R., Bowers E., Paterson H., Kresovich S., Characterization of RFLP probe sequences for gene discovery and SSR development in *Sorghum bicolor* (L.) Moench, *Theor. Appl. Genet.*, 105,912–920, (2002).
- Schulz H., Baranska M., Quilitzsch R., Schütze W., Determination of alkaloids in capsules, milk and ethanolic extracts of poppy (*Papaver somniferum* L.) by ATR-FT-IR and FT-Raman spectroscopy, *Analyst*, 129, 917-920, (2004).
- Scott K.D., Egger P., Seaton G., Rosetto M., Ablett E.M, Lee L.S., Henry R.J., Analysis of SSRs derived from grape ESTs, *Theor. Appl. Genet.*, 100, 723-726, (2000).
- Salvi S., Conserved non-coding genomic sequences associated with a flowering-time quantitative trait locus in maize, *Proc. Natl. Acad. Sci.*,104,11376–11381, (2007).
- Saryar G., Biodiversity in the alkaloids fo Turkish papaver species, *Pure Appl Chem.*, 74, 557-574, (2002).
- Saunders J.A., Pedroni M.J., Penrose L.D.J., Fist A.J., AFLP analysis of opium poppy, *Crop Science*, 41, 1596-1601, (2001).
- Seçmen Ö., Gemici Y., Görk G., Bekat L., Leblebici E., Tohumlu Bitkiler Sistematığı (Ders Kitabı), Ege Üniv Fen Fak Ders Kitapları Serisi, No: 116. İzmir, (1995).
- Schiff P.L.J., Opium and its alkaloids, *American Journal of Pharmaceutical Education*, 66, 186-194, (2002).
- Sharma R.K., Bhardwaj P., Negi R., Mohapatra T. Ahuja P.S., Identification, characterization and utilization of unigene derived microsatellite markers in tea (*Camellia sinensis* L.), *BMC Plant Biol.* 9, 53, (2009).
- Shukla S., Genetics of seed yield and its contributing traits in opium poppy (*Papaver somniferum* L.), *Proceedings of the National Academy of Sciences India Section B Biological Sciences*, 62(2), 213-217, (1992).
- Shukla S., Khanna K.R., Genetical study for earliness in *Papaver somniferum* L., *Indian Journal of Genetics and Plant Breeding*, 52(1), 33-38, (1992).
- Shoyama Y., Kawachi F., Tanaka H., Nakai R., Shibata T. Nishi K., Genetic and alkaloid analysis of *Papaver* species and their F1 hybrid by RAPD, HPLC and ELISA, *Forensic Science International*, 91(3), 207-217, (1998).
- Sip V., Martinek N., Skorpik M., A study of the inheritance of economically important characters in poppy, *Genetika a Slechteni*, 13, 207-218, (1977).
- Sorrells M.E., Wilson W.A., Direct classification and selection of superior alleles for crop improvement, *Crop Sci.*, 37, 691-697, (1997).
- Stam P., Construction of integrated genetic linkage maps by means of a new computer package: JoinMap. *Plant Journal*, 3, 739-744, (1993).
- Straka P., Nothnagel T., A genetic map of *Papaver somniferum* L. based on molecular and morphological markers. *J Herbs Spices & Med Plants*, 9(2/3), 235-241, (2002).

- Szalma S.J., Buckler E.S., Snook M.E., McMullen M.D. Association analysis of candidate genes for maysin and chlorogenic acid accumulation in maize silks. *Theor Appl Genet.* 110, 1324–1333, (2005).
- Şelale H., Çelik İ., Gültekin V., Allmer J., Doğanlar S., Frary A., Development of EST-SSR markers for diversity and breeding studies in opium poppy (*Papaver somniferum* L.), *Plant breeding*, 132, (2013).
- Taberlet P.L., Gielly I., Pautou G., Bouvet J., Universal primers for amplifications of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology*, 17, 1105-1109, (1991).
- Temnykh S., Park W.D., Ayres N., Cartinhour S., Hauck S.N., Lipovich L., Cho Y.G., Ishii T., McCouch S.R., Mapping and genome organization of microsatellite sequences in rice (*Oryza sativa* L.), *Theor. Appl. Genet.*, 100, 697-712, (2000).
- Tetenyi P. Opium poppy (*Papaver somniferum* L.): botany and horticulture. *Horticultural Reviews*, 19, 373-408, (1977).
- Thornsberry J.M., Goodman M.M., Doebley J., Kresovich S., Nielsen D., Dwarf8 polymorphisms associate with variation in flowering time, *Nat. Genet.*, 28, 286–289, (2001).
- Toprak Mahsulleri Ofisi, Haşhaş raporu, TMO, Ankara, (2009).
- Tracy W.F., Whitt S.R., Buckler E.S., Recurrent mutation and genome evolution: example of *Sugary1* and the origin of sweet maize, *Crop Sci.*, 46, 1–7, (2006).
- Wang M.L., Barkley N.A., Jenkins T.M., Microsatellite markers in plants and insects. Part I. Applications of biotechnology, *Genes Genomes Genomics*, 3, 54-67, (2009).
- Wei X.M., Jackson P.A., McIntyre C.L., Aitken K.S., Croft B., Associations between DNA markers and resistance to diseases in sugarcane and effects of population substructure, *Theor. Appl. Genet.*, 114, 155–164, (2006).
- Wilson L.M., Whitt S.R., Ibanez A.M., Rocheford T.R., Goodman M.M. ve ark., Dissection of maize kernel composition and starch production by candidate gene association, *Plant Cell* 16, 2719–2733, (2004).
- Winzer T., Gazda V., He Z., Kaminski F., Kern M., Larson R., Li Y., Fergus Meade, Roxana Teodor, and Fabián E Vaistij. 2012, A *Papaver somniferum* 10-Gene Cluster for Synthesis of the Anticancer Alkaloid Noscapine, *Scienceexpress*, 29, 1704-1708.
- White P.T., The poppy, *The American National Geographic Magazine.*, 167, 143-189, (1985).
- Woodhead M., Russell J., Squirrell J., Hollingsworth P.M., Mackenzie K., Gibby M., Powell W., Comparative analysis of population genetic structure in *Athyrium distentifolium* (Pteridophyta) using AFLPs and SSRs from anonymous and transcribed gene regions. *Mol Ecol*, 14, 1681–95, (2005).
- Van Berloo R., Zhu A., Ursem R., Verbakel H., Gort G., Van Eeuwijk F.A., Diversity and linkage disequilibrium analysis within a selected set of cultivated tomatoes. *Theor Appl Genet.*, 117(1), 89–101, (2008).
- Varshney R.K., Graner A., Sorrells M.E., Genic microsatellite markers in plants: features and applications, *Trends Biotech*, 23, 48–55, (2005).
- Varshney R.K., Sigmund R., Borner A., Korzun V., Stein N., Sorrells M.E., Langridge P., Graner A., Interspecific transferability and comparative mapping of barley EST–SSR markers in wheat rye and rice, *Plant Sci.*, 168, 195-202, (2005).
- Veselovskaya M.A. The poppy. American Publishing Co., New Delhi ve New York, USA., (1976). Pp: 200.
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., Lee T.h., Van Der H. M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M., Zabeau M., AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23, 4407-4414, (1995).
- Yadav H.K., Shukla S., Singh S.P., Genetic variability and interrelationship among opium and its alkaloids in opium poppy (*Papaver somniferum* L.), *Euphytica*, 150, 207-214, (2006).
- Ye K., Ken Y., Keshava N., Shanks J., Kapp J.A., Tekmal R.R., Petros J., Joshi H.C., Opium alkaloid noscapine is an antitumor agent that arrests metaphase and induces apoptosis in dividing cells, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95, 1601-1606, (1998).
- Yi G., Lee J.M., Lee S., Choi D., Kim B.D., Exploitation of pepper EST–SSRs and an SSR-based linkage map, *Theor. Appl. Genet.*, 114, 113-130, (2006).
- You F.M., Huo N., Gu Y.Q., Luo M.C., Ma Y., Hane D., Lazo G.R., Dvorak J., Anderson O.D. BatchPrimer3: A high throughput web application for PCR and sequencing primer design. *BMC Bioinformatics*, 9, 253, (2008).
- Yu J., Buckler E.S., Genetic association mapping and genome organization of maize, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 17, 155–160, (2006).

- Yu J., Pressoir G., Briggs W.H., Vroh B.i.I., Yamasaki M., Doebley J.F., McMullen M.D., Gaut B.S., Nielsen D.M., Holland J.B., Kresovich S., Buckler E.S., A unified mixed-model method for association mapping that accounts for multiple levels of relatedness. *Nat. Genet.*, 38, 203–208. (2006).
- Zane L., Bargelloni L., Patarnello T., Strategies for microsatellite isolation: a review. *Mol. Ecol.*, 11, 1-16, (2002).
- Zhang Z., Schwartz S., Wagner L., Miller W., A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J. Comp. Biol.*, 7, 203-214, (2000).
- Ziegler j., Facchini P.J., Alkaloid Biosynthesis: Metabolism and Trafficking, *The Annual Review of Plant Biology*, 59, 735–69, (2008)
- Zhu C., Gore M., Buckler E.S., Yu J., Status and Prospects of Association Mapping in Plants, *Plant Genome*, 1, 5-20, (2008).



**TÜBİTAK**  
**PROJE ÖZET BİLGİ FORMU**

<b>Proje No:</b> 109O797
<b>Proje Başlığı:</b> Haşhaş ( <i>Papaver somniferum</i> )'ta Moleküler Genetik Analizler
<b>Proje Yürütücüsü ve Araştırmacılar:</b> Prof. Dr. Anne FRARY, Dr. Hüseyin CAMCI, Dr.Arzu KÖSE Dr. Ferda Çelikoğlu KOŞAR
<b>Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:</b> İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Gülbahçe Kampüsü, Urla, İzmir
<b>Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi:</b> Anadolu Tarımsal Araştırma Enstitüsü, Karabayırbağları, Eskişehir
<b>Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:</b> 01/04/2010 – 01/04/2013
<b>Öz (en çok 70 kelime)</b> Haşhaş ( <i>Papaver somniferum</i> ) eski çağlardan beri kapsüllerinde içerdiği ve narkotik, analjezik, sadative gibi ağrı kesici ilaçların hazırlanmasında kullanılan morfin, kodein, tebain, narkotine, papaverine gibi önemli alkaloidler ve tohumlarındaki besin içerikleri açısından ilgi çeken bir üründür. Türkiye zengin haşhaş gen kaynaklarına sahip bulunmaktadır. Önerilen projede ulusal haşhaş genetik kaynaklarının agro-morfolojik ve proje kapsamında geliştirilen moleküler markörler ile karakterizasyonu yapılmıştır. Ayrıca, haşhaş ilişkilendirme haritalaması ile agronomik ve alkaloid içeriklerin genetik esasları belirlenmiştir.
<b>Anahtar Kelimeler:</b> Haşhaş, Alkaloid, SSR, Genetik Çeşitlilik, İlişkilendirme Haritalaması, Kantitatif Karakter Lokusları (QTL)
<b>Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu mu?</b> Evet <input type="checkbox"/> Gerekli Değil <input checked="" type="checkbox"/> Fikri Ürün Bildirim Formu'nun tesliminden sonra 3 ay içerisinde patent başvurusu yapılmalıdır.
<b>Projeden Yapılan Yayınlar:</b> 1. Şelale H, Çelik I, Gültekin V, Allmer J, Doğanlar S, Frary A (2013) Development of EST-SSR markers for diversity and breeding studies in opium poppy. Plant Breeding DOI:10.1111/pbr.12059. 2. Çelik I, Gültekin V, Allmer J, Doğanlar S, Frary A (2013) Development of genomic simple sequence repeat markers in opium poppy by next generation sequencing. Theoretical Applied Genetics, Sunuldu.

Ekte Bulunan “ARDEB Başarı Öyküsü Formu”, “Kazanımlar” Bölümünde Belirtilen Kriterlere Göre Proje Çıktılarının Başarı Öyküsü Niteliği Taşdığını Düşünüyorsanız “ARDEB Başarı Öyküsü Formu”nu doldurunuz.

### ARDEB BAŞARI ÖYKÜSÜ

<b>Proje Adı</b> Haşhaş ( <i>Papaver somniferum</i> )’ta Moleküler Genetik Analizler	<b>Proje Yürütücüsü</b> Prof. Dr. Anne Frary
	<b>Proje No</b> 109O797
	<b>Destek Miktarı (TL)</b> 360.000,00
	<b>Proje Başlama-Bitiş Tarihi</b> 01.04.2010 / 01.04.2013
	<b>Yürütücü Kuruluş</b> İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü
	
<b>Projenin Amacı ve Önemi</b> ( <i>En fazla 150 kelime</i> ) (Maddeler halinde sıralayınız)	
<b>Proje ile Elde Edilen veya Beklenen Bilimsel, Teknolojik, Ekonomik ve Sosyal Kazanımlar</b> ( <i>En fazla 200 kelime</i> ) <ul style="list-style-type: none"><li>• Projeden uluslararası, etki faktörü yüksek dergilerde yapılan yayın(lar)-(etki faktörünü de veriniz)</li><li>• Proje kapsamında elde edilen ürün, buluş, çıktı vb. için alınacak/alınmış patentler ve/veya gerçekleştirilmiş/gerçekleştirilecek teknolojik/ticari uygulama(lar)</li><li>• Proje kapsamında alınan ödüller/ödül adaylıkları</li><li>• Projenin ülkenin bilimsel ve teknolojik araştırma gücüne, bilim insanı yetiştirilmesi ve yeni yetenekler kazanılmasına sağladığı katkılar</li></ul>	
<b>Proje için TÜBİTAK Desteğinin Önemi</b> ( <i>En fazla 150 kelime</i> )	

1. Proje yürütücüsü iletişim bilgileri:  
Adı – Soyadı : Anne Frary  
Unvanı : Prof. Dr.  
Telefon : 232 750 7306  
E-posta adresi : annefrary@iyte.edu.tr