



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOKTORA TEZİ**

**KIŞLIK EKMEKLİK BUĞDAY (*Triticum aestivum* L.)’DA  
SARI PAS HASTALIĞINA DAYANIKLILIĞIN  
BİYOTEKNOLOJİK YÖNTEMLERLE İNCELENMESİ**

**Özge KARAKAŞ**

**Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı  
Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı**

**I. Danışman**

**Doç. Dr. Filiz Gürel**

**II. Danışman**

**Doç. Dr. Ahu Altınkut Uncuoğlu**

**Haziran, 2010**

**İSTANBUL**



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOKTORA TEZİ**

**KIŞLIK EKMEKLİK BUĞDAY (*Triticum aestivum* L.)’DA  
SARI PAS HASTALIĞINA DAYANIKLILIĞIN  
BİYOTEKNOLOJİK YÖNTEMLERLE İNCELENMESİ**

**Özge KARAKAŞ**

**Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı  
Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı**

**I. Danışman**

**Doç. Dr. Filiz Gürel**

**II. Danışman**

**Doç. Dr. Ahu Altınkut Uncuoğlu**

**Haziran, 2010**

**İSTANBUL**

Bu çalışma 24/06/2010 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji ve Genetik programında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Doç. Dr. Filiz GÜREL (Danışman)  
İstanbul Üniversitesi  
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Avni KURU  
İstanbul Üniversitesi  
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Şule ARI  
İstanbul Üniversitesi  
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Beyazıt ÇIRAKOĞLU  
Acıbadem Üniversitesi  
Fen-Edebiyat Fakültesi

Prof. Dr. Meral ÜNAL  
Marmara Üniversitesi  
Fen-Edebiyat Fakültesi

Bu alışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 1832 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

## ÖNSÖZ

Bu tez çalışması boyunca bilgi ve deneyimleriyle beni destekleyen ve yönlendiren birinci tez danışmanım değerli hocam Doç. Dr. Filiz Gürel'e ve çalışmanın TÜBİTAK, Marmara Araştırma Merkezi, Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü Bitki Biyoteknolojisi Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmesini sağlayan, bilgi ve tecrübeleri ile her aşamada yanımda olan, değerli yardım ve katkılarıyla bana yol gösteren ikinci tez danışmanım değerli hocam Doç. Dr. Ahu Altinkut-Uncuoğlu'na teşekkür etmeyi bir borç bilirim.

Deneysel çalışmalarımı gerçekleştirmemde benden bilgi ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi, Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü Bitki Biyoteknolojisi Laboratuvarı çalışanlarından Dr. Semra Hasançebi'ye, Dr. Fahriye Ertuğrul'a, manevi desteği için Yard. Doç. Dr. Yıldız Aydın'a ve Dr. Funda Şentürk Akfırat'a ve çalışmamı kolaylaştıran teknisyenlere teşekkür ederim. Tez dönemim boyunca bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, önerileri bana yol gösterici olan saygıdeğer hocam Prof. Dr. Şule Arı' ya ve Prof. Dr. Beyazıt Çırakoğlu'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca, yetişmemde emeği geçen ve desteğini esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Nermin Gözükırmızı başta olmak üzere İstanbul Üniversitesi'ndeki tüm hocalarıma da teşekkür ederim. Her türlü destekleri ve yardımları ile hep yanımda olan arkadaşlarım, Msc. Seval Ercan Süslü, Msc. Ezgi Çabuk Şahin, Dilek Tok, Handan Balta, Duygu Sevinç ve Orhan Metin'e çok teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olan, beni maddi ve manevi olarak her yönden destekleyen ve hiçbir fedakarlığı esirgemeyen babam Kemal Karakaş, annem Refiye Karakaş ve kardeşim Özgür Karakaş'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Doktora tezimi, her zaman bilimin tek doğru yol olduğuna inanan ve beni bu doğrultuda cesaretlendiren, eğitim hayatım boyunca desteğini hiç eksiltmeyen saygıdeğer babam Kemal Karakaş'a ithaf ediyorum. Her şey için çok teşekkürler...

Bu tez çalışması, TÜBİTAK, Marmara Araştırma Merkezi, Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü, Bitki Biyoteknolojisi Laboratuvarı'nda yürütülmekte olan TÜBİTAK KAMAG tarafından desteklenen TARAL 1007-105G075 numaralı proje ve İstanbul Üniversitesi BAP birimi tarafından 1832 no'lu tez projesi olarak desteklenmiştir.

**Haziran, 2010**

**Özge KARAKAŞ**

## İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ .....	i
İÇİNDEKİLER .....	ii
ŞEKİL LİSTESİ .....	iv
TABLO LİSTESİ .....	vi
SEMBOL LİSTESİ .....	vii
ÖZET .....	viii
SUMMARY .....	x
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL KISIMLAR .....	3
2.1. BUĞDAYIN ÖNEMİ .....	3
2.2. BUĞDAYIN GENOMİK ORGANİZASYONU .....	5
2.3. BUĞDAY SARI PAS ETMENİ <i>Puccinia striiformis</i> f. sp. <i>tritici</i> .....	6
2.4. SARI PAS DAYANIKLILIK MEKANİZMASI .....	9
2.5. AŞIRI DUYARLI YANIT .....	11
2.6. BİTKİLERDEKİ SİSTEMİK DAYANIKLILIK MEKANİZMALARI ...	12
2.6.1. Sistemik Olarak Kazanılmış Dayanıklılık .....	13
2.6.2. Uyarılmış Sistemik Dayanıklılık .....	14
2.7. BİTKİ BAĞIŞIKLIK SİSTEMİ .....	15
2.7.1. R Proteinlerinin Yapısı .....	17
2.8. GENETİK MARKIRLAR .....	20
2.8.1. Morfolojik Markırlar .....	21
2.8.2. Biyokimyasal Markırlar .....	21

<b>2.8.3. Moleküler Markırlar (DNA Markırları) .....</b>	<b>22</b>
2.8.3.1. <i>Hibridizasyona Dayalı Moleküler Markırlar.....</i>	<i>22</i>
2.8.3.2. <i>Polimeraz Zincir Reaksiyonu Kullanımına Dayanan Moleküler Markırlar.....</i>	<i>23</i>
2.8.3.3. <i>DNA Dizi ve Çip (Mikroarray) Teknolojisine Dayalı Moleküler Markırlar.....</i>	<i>25</i>
<b>2.9. DAYANIKLILIK GEN ANALOGLARI.....</b>	<b>25</b>
<b>2.10. ANLATIM YAPAN İŞARETLENMİŞ DİZİLER.....</b>	<b>26</b>
<b>2.11. GEN ANLATIM ANALİZLERİ .....</b>	<b>27</b>
<b>3. MALZEME VE YÖNTEM .....</b>	<b>30</b>
<b>3.1. BİTKİ MATERYALİ .....</b>	<b>30</b>
<b>3.2. DNA İZOLASYONU .....</b>	<b>33</b>
<b>3.3. BULK SEGREGASYON ANALİZİ.....</b>	<b>35</b>
<b>3.3.1. Bulk Segregasyon Analizlerinde Kullanılacak Genomik DNA Karışımlarının Hazırlanması .....</b>	<b>35</b>
<b>3.4. EST VERİTABANI ÇALIŞMALARI.....</b>	<b>37</b>
<b>3.5. DNA DÜZEYİNDE GERÇEKLEŞTİRİLEN ÇALIŞMALAR.....</b>	<b>39</b>
<b>3.5.1. Primer Tasarımı .....</b>	<b>39</b>
<b>3.5.2. EST Kökenli Primerler ile Gerçekleştirilen PZR Analizleri .....</b>	<b>42</b>
<b>3.5.3. Buğdaya Ait RGA Dizilerinin Belirlenmesi.....</b>	<b>43</b>
<b>3.5.4. Moleküler Markır Analizlerine Ait PZR Ürünlerinin Görüntülenmesi .....</b>	<b>47</b>
<b>3.5.5. Buğday Çeşitleri Arasındaki Genetik İlişkinin Belirlenmesi.....</b>	<b>47</b>
<b>3.6. RNA DÜZEYİNDE GERÇEKLEŞTİRİLEN ÇALIŞMALAR.....</b>	<b>49</b>
<b>3.6.1. Gen Anlatım Analizlerinde Kullanılmak Üzere Dayanıklılık Mekanizmasında Rol Oynadığı Düşünülen Genlerin Ortak Dizilerinin Belirlenmesi .....</b>	<b>49</b>
<b>3.6.2. Gen Anlatım Analizlerinde Kullanılmak Üzere, Stres ve Stresle İlişkili Kontig ve Singletonlardan Tasarlanan Primerler .....</b>	<b>50</b>
<b>3.6.3. Çoklu Dizi Eşleştirilmesi .....</b>	<b>52</b>

3.6.4. Gen Anlatım Analizlerinde Kullanılacak GeXP Genetik Analiz Sistemi .....	52
3.6.5. Gen Anlatım Analizlerinde Kullanılacak Primerlerin GeXP Genetik Analiz Sisteminde Tasarlanması.....	54
3.6.6. Gen Anlatım Analizlerinde Kullanılacak Bitkilere Pas Uygulamasının Gerçekleştirilmesi.....	60
3.6.7. Total RNA İzolasyonu .....	66
3.6.8. RNA Miktarının ve Saflığının Belirlenmesi.....	68
3.6.8.1. NanoDrop (ND1000) ile RNA Örneklerinin Ölçülmesi.....	68
3.6.8.2. Bioanalyzer ile RNA Örneklerinin Ölçülmesi.....	69
3.6.9. İzolasyonu Yapılan RNA'lara DNaz Uygulanması.....	71
3.6.10. DNaz Uygulanmış Örneklerle 18S PZR.....	72
3.6.11. Transkriptlerde Çoklu (Multipleks) Gen Anlatım Analizleri .....	72
3.6.11.1. Ters Transkripsiyon Reaksiyonu.....	73
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>77</b>
<b>4.1. EST VERİTABANI ÇALIŞMALARI.....</b>	<b>77</b>
<b>4.2. DNA DÜZEYİNDE GERÇEKLEŞTİRİLEN ÇALIŞMALAR.....</b>	<b>88</b>
<b>4.2.1. Primer Tasarımı .....</b>	<b>88</b>
<b>4.2.2. EST Kökenli Primerleri ile Gerçekleştirilen PZR Analizleri .....</b>	<b>89</b>
4.2.2.1. Anaçların DNA'ları ile Gerçekleştirilen PZR Sonuçları .....	89
4.2.2.2. Bulk DNA'ları ile Gerçekleştirilen PZR Sonuçları.....	96
<b>4.2.3. Buğdaya Ait RGA Dizilerinin Belirlenmesi.....</b>	<b>97</b>
<b>4.2.4. RGA-EST Kökenli Primerleri ile Gerçekleştirilen PZR Analizleri .....</b>	<b>97</b>
4.2.4.1. Anaçların DNA'ları ile Gerçekleştirilen PZR Sonuçları.....	97
<b>4.2.5. Dendogram Hazırlanması .....</b>	<b>100</b>
4.2.5.1. EST Kökenli Primerler Kullanılarak Buğday Çeşitleri Arasındaki Genetik Benzerliğin Belirlenmesi.....	100
4.2.5.2. RGA-EST Kökenli Primerler Kullanılarak Buğday Çeşitleri Arasındaki Genetik Benzerliğin Belirlenmesi.....	102
<b>4.3. RNA DÜZEYİNDE GERÇEKLEŞTİRİLEN ÇALIŞMALAR.....</b>	<b>103</b>



<b>4.3.1. Gen Anlatım Analizlerinde Kullanılmak Üzere Dayanıklılık Mekanizmasında Rol Oynadığı Düşünülen Genlerin Ortak Dizilerinin Belirlenmesi .....</b>	<b>103</b>
<b>4.3.2. Gen Anlatım Analizlerinde Kullanılmak Üzere, Stres ve Stresle İlişkili Kontig ve Singletonlardan Tasarlanan Primerler .....</b>	<b>106</b>
4.3.2.1. Çoklu Dizi Eşleştirmesi.....	106
<b>4.3.3. Total RNA İzolasyonu .....</b>	<b>111</b>
4.3.3.1. RNA Miktarının ve Saflığının Belirlenmesi.....	111
<b>4.3.4. İzolasyonu yapılan RNA'lara DNaz Uygulanması.....</b>	<b>113</b>
<b>4.3.5. DNaz Uygulanmış Örneklerle 18S PZR.....</b>	<b>114</b>
<b>4.3.6. Transkriptlerde Çoklu (Multipleks) Gen Anlatım Analizleri .....</b>	<b>114</b>
4.3.6.1. Kontrol ve Pas Uygulanmış Örneklerde Çoklu Gen Anlatım Analizlerinin Karşılaştırılması.....	115
<b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ .....</b>	<b>123</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>133</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>147</b>

## ŞEKİL LİSTESİ

<b>Şekil 2.1</b>	: 2007 yılında dünyadaki buğday ekim alanlarına ait oranlar .....	4
<b>Şekil 2.2</b>	: Buğdayın yayılış haritası ve “Verimli Hilal” bölgesi .....	5
<b>Şekil 2.3</b>	: Hegzaploid buğdayın evrimi .....	6
<b>Şekil 2.4</b>	: <i>Puccinia striiformis</i> f.sp. <i>tritici</i> mantarının hassas bir buğday bitkisinin yaprağının üzerinde oluşturduğu üredinia.....	7
<b>Şekil 2.5</b>	: Sarı pas etmeni <i>Puccinia striiformis</i> 'in yaşam döngüsü .....	8
<b>Şekil 2.6</b>	: Sarı pas hastalığının dünya üzerindeki yayılımı .....	9
<b>Şekil 2.7</b>	: Konakçı ve patojen arasındaki gene karşı gen etkileşimi .....	10
<b>Şekil 2.8</b>	: Patojen enfeksiyonu sonucu bitkide gözlenen HR.....	11
<b>Şekil 2.9</b>	: Bitkilerde sistemik kazanılmış ve uyarılmış sistemik dayanıklılığın şematik gösterimi.....	12
<b>Şekil 2.10</b>	: Geniş spektrumlu patojenlere karşı HR ve diğer nekrotik reaksiyonları takiben gelişen dayanıklılık olan sistemik kazanılmış dayanıklılığın (SAR) gösterimi .....	13
<b>Şekil 2.11</b>	: Bitkilerde gözlenen uyarılmış sistemik dayanıklılığın (ISR) gösterimi.....	14
<b>Şekil 2.12</b>	: Bitki bağışıklık sisteminde dört fazlı zig zag modeli.....	15
<b>Şekil 2.13</b>	: Bitkide PAMP ve efektör tarafından tetiklenen bağışıklık .....	16
<b>Şekil 2.14</b>	: Bitkide R genlerinin kodladığı proteinlerin beş farklı sınıfının gösterimi.....	17
<b>Şekil 2.15</b>	: Bitkide gene karşı gen ve bekçi hipotezinin şematik gösterimi .....	18
<b>Şekil 2.16</b>	: Genetik markırların sınıflandırılması .....	21
<b>Şekil 2.17</b>	: RFLP markır sisteminin şematik gösterimi.....	23
<b>Şekil 2.18</b>	: PZR aşamalarının şematik gösterimi .....	24
<b>Şekil 2.19</b>	: SYBR® Green kullanılarak gerçekleştirilen Real-time PZR aşamalarının şematik gösterimi.....	28
<b>Şekil 2.20</b>	: Taqman® probu kullanılarak gerçekleştirilen Real-time PZR aşamalarının şematik gösterimi.....	29
<b>Şekil 3.1</b>	: Buğday ( <i>Triticum</i> spp.) bitkisinin sistematikteki yeri.....	30
<b>Şekil 3.2</b>	: DNA izolasyonunun şematik gösterimi .....	34
<b>Şekil 3.3</b>	: NanoDrop1000 spektrofotometre cihazı.....	35
<b>Şekil 3.4</b>	: Bulk Segregasyon Analizinde kullanılacak DNA karışımlarının (bulk) hazırlanışı. ....	36
<b>Şekil 3.5</b>	: Sarı pas uygulanmış buğdaya ait EST kitaplığının belirlenmesi .....	37
<b>Şekil 3.6</b>	: EST kitaplığı kullanılarak kontig ve singletonların elde edilmesi.....	38
<b>Şekil 3.7</b>	: Polimeraz Zincir reaksiyonunun şematik gösterimi.....	43
<b>Şekil 3.8</b>	: Dendogram oluşturmak için kullanılan “PopGene32” ve ‘TreeView’ bilgisayar programları .....	48
<b>Şekil 3.9</b>	: Buğday ve farklı organizmalardaki aynı genlerin ortak dizilerinin “BioEdit programı” kullanılarak belirlenmesi .....	49

<b>Şekil 3.10</b>	: GeXP Analiz Sistemi (Beckman Coulter GenomeLab).....	52
<b>Şekil 3.11</b>	: GeXP Analiz Sistemi Yazılımı (Beckman Coulter GenomeLab).....	53
<b>Şekil 3.12</b>	: GeXP Analiz Sistemine (Beckman Coulter GenomeLab) ait parçalar	53
<b>Şekil 3.13</b>	: İleri ve geri kimerik primerlerin gösterimi.....	54
<b>Şekil 3.14</b>	: İleri ve geri kimerik primer örneği.....	54
<b>Şekil 3.15</b>	: Gen anlatım analizlerinde kullanılan GeXP Sistemi primer tasarımı programı “eXpress profiler” sayfası .....	55
<b>Şekil 3.16</b>	: Gen anlatımı analizlerinde kullanılacak bitki materyalinin hazırlığı ve seçilen zaman aralıkları.....	61
<b>Şekil 3.17</b>	: Gen anlatımı analizlerinde kullanılacak bitki materyaline pas uygulanması ve seçilen zaman aralıklarında bitki materyalinin toplanması .....	62
<b>Şekil 3.18</b>	: Gen anlatımı analizlerinde kullanılacak bitki materyalinden total RNA izolasyonu .....	67
<b>Şekil 3.19</b>	: NanoDrop (ND1000) ile RNA'nın konsantrasyonunun belirlenmesi..	69
<b>Şekil 3.20</b>	: Agilent Bioanalyzer 2100 cihazı ve parçaları .....	71
<b>Şekil 3.21</b>	: DNaz uygulamasında kullanılan çözeltiler ve miktarları.....	71
<b>Şekil 3.22</b>	: 18 S PZR hazırlığı ve kullanılan PZR programı .....	72
<b>Şekil 3.23</b>	: Gen anlatım analizlerinde kullanılan GeXP Sistemi primer tasarımı programı “eXpress profiler” sayfası .....	73
<b>Şekil 3.24</b>	: GeXP Genetik Analiz Sisteminde kapiller elektroforez işlemi için kullanılan yönerge şeması.....	76
<b>Şekil 4.1</b>	: Sarı pas uygulanmış buğdaya ait EST kitaplığının gösterimi .....	77
<b>Şekil 4.2</b>	: Kontaminasyonlu dizi içeren EST'nin görünümü.....	78
<b>Şekil 4.3</b>	: Contig Express Modülünde EST'ler kullanılarak kontig oluşturulması .....	79
<b>Şekil 4.4</b>	: Sarı pas mantarı bulaştırılmış <i>Triticum aestivum</i> 'a ait kontiglerin BlastX analizi sonucu protein profilleri .....	87
<b>Şekil 4.5</b>	: Sarı pas mantarı bulaştırılmış <i>Triticum aestivum</i> 'a ait singletonların BlastX analizi sonucu protein profilleri .....	87
<b>Şekil 4.6</b>	: DNA (EST) düzeyinde çalışmaların akış şeması .....	88
<b>Şekil 4.7</b>	: Primer Premier 5.0 programının gösterimi .....	89
<b>Şekil 4.8</b>	: Polimorfiz gözlenen kontig primerine (Kontig 46) örnek.....	90
<b>Şekil 4.9</b>	: Polimorfizm gösteren kontig primerlerinin kombinasyonlarına göre dağılımını gösteren şema.....	90
<b>Şekil 4.10</b>	: Kontiglerin polimorfizm gösteren primerlerinin fonksiyonel kategorilerinin şematik gösterimi.....	92
<b>Şekil 4.11</b>	: Polimorfizm gözlenen singleton primerine (CA598286) örnek.....	93
<b>Şekil 4.12</b>	: Polimorfizm gösteren singleton primerlerinin kombinasyonlarına göre dağılımını gösteren şema .....	93
<b>Şekil 4.13</b>	: Singletonların polimorfizm gösteren primerlerinin fonksiyonel kategorilerinin şematik gösterimi.....	95
<b>Şekil 4.14</b>	: Sönmez2001 x Aytın98 kombinasyonuna ait CA599121 primeri kullanılarak elde edilen PZR ürünleri .....	96
<b>Şekil 4.15</b>	: Polimorfizm gösteren RGAP primerlerinin kombinasyonlarına göre dağılımını gösteren şema.....	98
<b>Şekil 4.16</b>	: Anaçlarda RGAP primerleri kullanılarak gerçekleştirilen PZR sonuçları .....	98

<b>Şekil 4.17</b>	: PHYLIP 3.5. versiyonunun göre değiştirilmiş Nei genetik uzaklığına (Nei 1978) göre oluşturulan populasyonların dendogramı.....101
<b>Şekil 4.18</b>	: PHYLIP 3.5. versiyonunun göre değiştirilmiş Nei genetik uzaklığına (Nei 1978) göre oluşturulan populasyonların dendogramı.....103
<b>Şekil 4.19</b>	: CA598151, CA599285 ve Kontig 9'un cDNA'sının BİOEDİT programı kullanılarak gerçekleştirilen çoklu eşleştirilmesi.....107
<b>Şekil 4.20</b>	: CA599115 ve Kontig 113'ün cDNA dizilerinin BİOEDİT programı kullanılarak gerçekleştirilen çoklu eşleştirilmesi.....108
<b>Şekil 4.21</b>	: CA598422 ve CA598687'nin cDNA dizilerinin BİOEDİT programı kullanılarak gerçekleştirilen çoklu eşleştirilmesi.....108
<b>Şekil 4.22</b>	: CA598366 ve RLK'nın cDNA dizilerinin BİOEDİT programı kullanılarak gerçekleştirilen çoklu eşleştirilmesi.....109
<b>Şekil 4.23</b>	: CA598691 ve Kontig 57'nin cDNA dizilerinin BİOEDİT programı kullanılarak gerçekleştirilen çoklu eşleştirilmesi.....110
<b>Şekil 4.24</b>	: CA598691 ve CA598755'in cDNA dizilerinin BİOEDİT programı kullanılarak gerçekleştirilen çoklu eşleştirilmesi.....110
<b>Şekil 4.25</b>	: Seçilen dizilerin BİOEDİT programı kullanılarak gerçekleştirilen çoklu eşleştirilmesi.....111
<b>Şekil 4.26</b>	: İzolasyonu yapılan RNA'ların "Agilent Bioanalyzer 2100" cihazı ile kalitelerinin ölçülmesi.....112
<b>Şekil 4.27</b>	: Harmankaya99'a ait 0-48. saat RNA'ların % 1'lik DEPC'li agaroz jelde görünümü.....113
<b>Şekil 4.28</b>	: PI178384'e ait DNaz uygulanmış RNA'ların agaroz jelde gösterimi.....113
<b>Şekil 4.29</b>	: Harmankaya99 ve PI178384'e ait RNA'larla 18S PZR'nin agaroz jelde gösterimi.....114
<b>Şekil 4.30</b>	: Kontig çoklu primerleri ile Harmankaya99 (12. Saat) kontrol ve pas uygulanmış örneklerde gen anlatım analizleri.....115
<b>Şekil 4.31</b>	: Harmankaya99 genotipinde (8. saat pas uygulanmış) resistance çoklu primerine ait grafik.....115
<b>Şekil 4.32</b>	: ES14 genotipinde (48. saat pas uygulanmış) resistance çoklu primerine ait grafik.....116
<b>Şekil 4.33</b>	: Singleton 1 çoklu primerleri ile PI178383 (8. saat) kontrol ve pas uygulanmış örneklerde gen anlatım analizleri.....116
<b>Şekil 4.34</b>	: Sönmez2001 genotipinde (12. saat pas uygulanmış) singleton 2 çoklu primerine ait grafik.....117
<b>Şekil 4.35</b>	: Aytın98 genotipinde (12. saat pas uygulanmış) singleton 2 çoklu primerine ait grafik.....117
<b>Şekil 4.36</b>	: Aytın98 genotipinde (12. saat pas uygulanmış) singleton 2 çoklu primerine ait grafik.....118
<b>Şekil 4.37</b>	: Harmankaya99 genotipinde (48. saat kontrol ve pas uygulanmış) singleton 1 çoklu primerine ait grafik.....118
<b>Şekil 4.38</b>	: Tüm genotiplerde (pas uygulanmış ve kontrol) belirlenen zaman aralıklarında wali5 (166) (CA598422'nin BlastX homoloğu) geninin anlatımı.....119
<b>Şekil 4.39</b>	: Harmankaya99 genotipinde (12. saat kontrol ve pas uygulanmış) kontig çoklu primerine ait grafik.....119

<b>Şekil 4.40</b>	: Tüm genotiplerde (pas uygulanmış ve kontrol) belirlenen zaman aralıklarında wali7 (166) (Kontig80'nin BlastX homoloğu) geninin anlatımı.....	120
<b>Şekil 4.41</b>	: Aytın98 genotipinde (12. saat kontrol ve pas uygulanmış) kontig çoklu primerine ait grafik.....	120
<b>Şekil 4.42</b>	: Tüm genotiplerde (pas uygulanmış ve kontrol) belirlenen zaman aralıklarında 14-3-3 (208) (CA597830'un BlastX homoloğu) geninin anlatımı .....	121
<b>Şekil 4.43</b>	: Harmankaya99 genotipinde (24. saat kontrol ve pas uygulanmış) singleton 2 çoklu primerine ait grafik.....	121
<b>Şekil 4.44</b>	: Tüm genotiplerde (pas uygulanmış ve kontrol) belirlenen zaman aralıklarında (CA597830'un BlastX homoloğu) PR 1.2 geninin anlatımı.....	122
<b>Şekil 4.45</b>	: Tüm genotiplerde (pas uygulanmış ve kontrol) belirlenen zaman aralıklarında (CA598691'in BlastX homoloğu) LTP geninin anlatımı.....	122

## TABLO LİSTESİ

<b>Tablo 2.1</b>	: Dünyada ve Türkiye’de 2008 yılına ait buğday ekili alan- üretim miktarı-verim .....	3
<b>Tablo 3.1</b>	: Çalışmada kullanılan buğday çeşitleri ve özellikleri .....	31
<b>Tablo 3.2</b>	: Genomik DNA izolasyonunda kullanılan stok çözeltiler.....	33
<b>Tablo 3.3</b>	: Sarı pas uygulanmış <i>Triticum aestivum</i> ’a ait EST’lerin genel yapısı .....	38
<b>Tablo 3.4</b>	: PZR Analizlerinde kullanılan kontig primerler.....	39
<b>Tablo 3.5</b>	: PZR Analizlerinde kullanılan singleton primerler .....	40
<b>Tablo 3.6</b>	: Çalışmada kullanılan buğdaya ait RGA dizilerinin gen bankası erişim numaraları .....	44
<b>Tablo 3.7</b>	: PZR Analizlerinde kullanılan RGA primerler .....	45
<b>Tablo 3.8</b>	: Agaroz jel elektroforezinde kullanılan çözeltiler.....	47
<b>Tablo 3.9</b>	: Gen anlatım analizlerinde kullanılmak üzere seçilen stres ve stresle ilişkili kontigler .....	50
<b>Tablo 3.10</b>	: Gen anlatım analizlerinde kullanılmak üzere seçilen stres ve stresle ilişkili singletonlar.....	51
<b>Tablo 3.11</b>	: Gen anlatım analizlerinde kullanılacak GeXP’ye özgü hastalık direnç mekanizması ile ilişkili primerler. ....	56
<b>Tablo 3.12</b>	: Gen anlatım analizlerinde kullanılacak GeXP’ye özgü kontiglerin primer dizileri.....	57
<b>Tablo 3.13</b>	: Gen anlatım analizlerinde kullanılacak GeXP’ye özgü singletonların primer dizileri (1) .....	58
<b>Tablo 3.14</b>	: Gen anlatım analizlerinde kullanılacak GeXP’ye özgü singletonların primer dizileri (2) .....	59
<b>Tablo 3.15</b>	: Pas uygulanan bitkilerde hastalık oluşumunu takiben Izgi01 genotipinde gözlenen pas okuma sonuçları .....	63
<b>Tablo 3.16</b>	: Pas uygulanan bitkilerde hastalık oluşumunu takiben ES14 genotipinde gözlenen pas okuma sonuçları .....	63
<b>Tablo 3.17</b>	: Pas uygulanan bitkilerde hastalık oluşumunu takiben Sönmez2001 genotipinde gözlenen pas okuma sonuçları .....	64
<b>Tablo 3.18</b>	: Pas uygulanan bitkilerde hastalık oluşumunu takiben Aydın98 genotipinde gözlenen pas okuma sonuçları .....	64
<b>Tablo 3.19</b>	: Pas uygulanan bitkilerde hastalık oluşumunu takiben PI178384 genotipinde gözlenen pas okuma sonuçları. ....	65
<b>Tablo 3.20</b>	: Pas uygulanan bitkilerde hastalık oluşumunu takiben Harmankaya99 genotipinde gözlenen pas okuma sonuçları .....	65
<b>Tablo 3.21</b>	: GeXP Start kit’e ait ters transkripsiyon reaksiyonu bileşenleri .....	74
<b>Tablo 3.22</b>	: RNA’dan birinci iplik cDNA sentez koşulları .....	74
<b>Tablo 3.23</b>	: Çoklu PZR’de kullanılan bileşenler .....	75
<b>Tablo 3.24</b>	: Çoklu PZR koşulları.....	75

<b>Tablo 3.25</b>	: Gen anlatım analizinde kullanılan örnek yükleme çözeltisi bileşenleri .....	76
<b>Tablo 4.1</b>	: Buğdaya ait kontaminasyonlu dizileri içeren EST' ler .....	78
<b>Tablo 4.2</b>	: Sarı pas uygulanmış <i>Triticum aestivum</i> 'a ait EST'lerin genel yapısı .....	78
<b>Tablo 4.3</b>	: Kontig dizilerinin BlastX sonuçları .....	80
<b>Tablo 4.4</b>	: Singleton dizilerinin BlastX sonuçları .....	82
<b>Tablo 4.5</b>	: Farklı kombinasyonlara göre monomorfik ve polimorfik bant yapısı gösteren kontig primerlerinin listelenmesi.....	91
<b>Tablo 4.6</b>	: Farklı kombinasyonlara göre monomorfik ve polimorfik bant yapısı gösteren singleton primerlerinin listelenmesi .....	94
<b>Tablo 4.7</b>	: Farklı kombinasyonlara göre monomorfik ve polimorfik bant yapısı gösteren RGA'lara ait primerlerin listelenmesi .....	99
<b>Tablo 4.8</b>	: Dayanıklı ve hassas <i>Triticum aestivum</i> çeşitlerinin Nei (1978)'ye göre genetik uzaklık ve genetik benzerlik matrisi.....	101
<b>Tablo 4.9</b>	: Dayanıklı ve hassas <i>Triticum aestivum</i> çeşitlerinin Nei (1978)'ye göre genetik uzaklık ve genetik benzerlik matrisi.....	102
<b>Tablo 4.10</b>	: Hastalık direnç mekanizması ile ilişkili genlere ait dizilerin korunmuş bölgelerinin ve çoğaltım ürünlerinin gösterimi.....	104
<b>Tablo 4.11</b>	: Lipid transfer protein (LTP) karşılık gelen kontig ve singletonların dizilerinin özellikleri .....	106
<b>Tablo 4.12</b>	: Aynı proteine karşılık gelen kontig ve singletonların dizilerinin özellikleri.....	107
<b>Tablo 4.13</b>	: wali5 ve wali6'ya karşılık gelen kontig ve singletonların dizilerinin özellikleri.....	108
<b>Tablo 4.14</b>	: Receptor-like kinase protein (RLK)'ya karşılık gelen kontig ve singletonların dizilerinin özellikleri .....	109
<b>Tablo 4.15</b>	: Type 1 non specific lipid transfer protein precursor'e karşılık gelen kontig ve singletonların dizilerinin özellikleri .....	109
<b>Tablo 4.16</b>	: Aynı proteine karşılık gelen kontig ve singletonların dizilerinin özellikleri.....	110

## SEMBOL LİSTESİ

<b>cm</b>	: Santimetre
<b>CO<sub>2</sub></b>	: Karbondioksit
<b>EtOH</b>	: Etanol
<b>gr</b>	: Gram
<b>Ha</b>	: Hektar
<b>HCl</b>	: Hidroklorik asit
<b>Hg</b>	: Hektogram
<b>Kg</b>	: Kilogram
<b>Km</b>	: Kilometre
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	: Magnezyum klorür
<b>mg</b>	: Miligram
<b>ml</b>	: Mililitre
<b>mM</b>	: Milimolar
<b>NaAcO<sub>4</sub></b>	: Sodyum asetat
<b>ng</b>	: Nanogram
<b>nM</b>	: Nanomolar
<b>nm</b>	: Nanometre
<b>SDS</b>	: Sodyum Dodesil Sülfat
<b>U</b>	: Ünite
<b>w/v</b>	: Ağırlık/hacim
<b>µl</b>	: Mikrolitre
<b>µM</b>	: Mikromolar
<b>°C</b>	: Santigrat derece
<b>%</b>	: Yüzde



## ÖZET

### KIŞLIK EKMEKLİK BUĞDAY (*Triticum aestivum* L.)’DA SARI PAS HASTALIĞINA DAYANIKLILIĞIN BİYOTEKNOLOJİK YÖNTEMLERLE İNCELENMESİ

*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*’nin neden olduğu sarı pas hastalığı dünyada buğday üretiminin en önemli sınırlayıcısıdır ve gıda güvenliği için ciddi bir tehdittir. Bu çalışmada Türkiye’de yetişen ve sarı pasa hassasiyetleri daha önce belirlenmiş olan bazı kışlık ekmeçlik buğday genotiplerinde genetik çeşitliliğin belirlenebilmesi ve bu hastalığa dayanıklılıkla ilişkili markır bulunması amacıyla EST (anlatım yapan işaretlenmiş diziler) kökenli kontigler, singletonlar ve RGA (direnc gen analogları)-EST’leri incelenmiştir. Bu amaçla sarı pas uygulanmış buğdaya ait toplam 1549 EST’den biyoinformatik analiz ile 136 adet kontig ve 989 adet singleton elde edilmiştir. BlastX taramasına göre kontiglerin %29’u (39) ve singletonların %10’u (96) *Triticum aestivum* genleri ile homoloji göstermiştir. Kontig ve singletonlarla eşleşen veri tabanı (BlastX) protein sentezi, fotosentez, metabolizma ve enerji, stres proteinleri, transporter proteinler, protein parçalanma ve yeniden dönüşümü, hücre büyüme ve bölünmesi, reaktif oksijen süpürücüleri gibi 8 fonksiyonel gruba ayrılmıştır. Kontig ve singletonlardan tasarlanan primerlerle gerçekleştirilen PZR analizleri kontiglerde en polimorfik fonksiyonel kategorinin fotosentez; singletonlarda ise en polimorfik fonksiyonel kategorinin metabolizma ve enerji olduğunu göstermiştir. EST kökenli primerler ile yapılan PZR analizi çalışmalarında çeşitli derecelerde polimorfizm görülmesine karşın, hassas ve dayanıklı bireyleri ayıracak moleküler markır elde edilememiştir. Elde edilen DNA bandı paternleri buğday genotiplerinde genetik uzaklığı araştırmada kullanılmıştır. Sonuç olarak, en yakın çeşitler Harmankaya99 ve Sönmez2001 (0.2359) iken, en uzak çeşitler ise Aytın98 ve Izgi01 (0.3973) olmuştur.

Genetik çeşitlilik çalışmalarında ayrıca NBS-LRR (lösence zengin tekrarlar) sınıfına ait buğday dizilerinden kökenlenen ve RGA-EST’lerini içeren 77 NBS, kullanılmıştır. PZR analizlerinde 77 RGA-EST primeri kullanılmış ve 38 tanesi genotipler arasında polimorfik bant profili göstermiştir. Sonuçlar EST kökenli dizilerin genetik çeşitlilik çalışmalarında son derece değerli kaynaklar olabileceğini ve hastalık direnc genlerinin etiketlenebileceği haritalama popülasyonlarının geliştirilmesinde kullanılabileceğini göstermektedir.

Çalışmada, sarı pas bulaşmış hassas ve dayanıklı buğday çeşitleri kullanılarak EST temelinde dayanan çoklu gen anlatım analizleri gerçekleştirilmiştir. Bunun için sadece stres ve stresle ilişkili kontig ve singletonlar kullanılmıştır. Ayrıca ilgili veritabanlarında hastalık dayanıklılığında sorumlu genler belirlenerek bu dizilerden GeXP sistemine uygun primerler tasarlanmıştır. Çoklu gen anlatım analizleri hem sarı pas bulaştırılmış hem de kontrol bitkilerin RNA örneklerinde gerçekleştirilmiştir. Hastalık dayanıklılık mekanizmasını tetikleyecek koşulları taklit edebilmek amacıyla 5 farklı zaman aralığı

(0., 8., 12., 24. ve 48. saat) seçilmiştir. Altı buğday genotipi (*Triticum aestivum* L. cvs. PII78383, Izgi01, Sönmez2001- sarı pasa dayanıklı genotipler ve *Triticum aestivum* L. cvs. Harmankaya99, ES14, Aytın98-sarı pasa hassas genotipler) seçilen zaman aralıklarında gen anlatım analizlerinde kullanılmıştır. Sonuç olarak, hastalıkla inoküle olmuş bitkilerde anlatımları artan genler arasında PR5 (Patogenezle ilişkili gen), PR2 (singleton CA598181'in BlastX homoloğu) ve GRAB2 (singleton CA597983'ün BlastX homoloğu) genleri öne çıkmış, bu genlerin anlatımları kontrol bitkilerde belirlenmemiştir. Bu genlerin, bitkilerde patojen saldırısına yanıtta önemli rol oynadığı bilinmektedir.

## SUMMARY

### INVESTIGATION OF YELLOW RUST DISEASE RESISTANCE IN WINTER TYPE BREAD WHEAT (*Triticum aestivum* L.) USING BIOTECHNOLOGICAL METHODS

Wheat yellow rust, caused by *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*, is a major constraint in wheat production and is a serious threat to food security worldwide. In this study, EST (Expressed Sequence Tag)-derived contigs, singletons and RGA (Resistance Gene Analogue)-ESTs were used to assess genetic diversity and in order to identify molecular markers related to yellow rust disease resistance among some Turkish wheat genotypes which have been cultivated and examined for their sensitivity to yellow rust disease previously. For this purpose, 136 contigs and 989 singletons were obtained from 1549 ESTs (belong to wheat treated by yellow rust) which were present in databases by a bioinformatics study. Results of the BlastX search showed that 29% (39) of contigs and 10% (96) of singletons have homology to genes of *Triticum aestivum*. The database-matched contigs and singletons (BlastX) were assigned to 8 functional groups such as protein synthesis, photosynthesis, metabolism and energy, stress proteins, transporter proteins, protein breakdown and recycling, cell growth and division and reactive oxygen scavengers. PCR analyses with primers designed from contigs and singletons showed that the most polymorphic functional category of contigs were photosynthesis and the most polymorphic functional category of singletons were metabolisms and energy. As a result of the PCR analyses with EST-derived primers, a numbers of polymorphic bands obtained however those do not include markers to distinguish sensitive and resistance parents. Instead, DNA banding patterns were used to analyse genetic variability among the resistant and susceptible wheat genotypes, and the mean genetic distance between the genotypes was pointed in this study. The lowest genetic distance was determined between Harmankaya99 and Sönmez2001 (0.2359), and the highest genetic distance between Aytın98 and Izgi01 (0.3973).

77 Wheat NBS (Nucleotide Binding Site) containing RGA-ESTs derived from two NBS regions from wheat sequences of the NBS-LRR (Leucine Rich Repeat) class, were also used for genetic diversity analysis. 77 RGA-EST derived primers were used for PCR analysis and 38 of them showed polymorphic banding profile between the genotypes. The results indicated that EST-derived sequences can be used for genetic diversity studies as highly valuable sources and they were useful in the identification of suitable parents for the development of mapping populations for tagging disease resistance genes.

EST-based multiplex gene expression analyses were performed by using yellow rust infected susceptible and resistant wheat varieties. Only stress and stress related contigs and singletons were selected for the analyses. In addition, the genes responsible for the disease resistance were determined in the related databases and used for primer design

proper to GeXP system. Multiplex gene expression analyses were conducted using RNA samples from yellow rust infected and control plants. 5 different time points (0h, 8h, 12h, 24h and 48h) were chosen to mimic the conditions, trigger disease resistance mechanism. Six bread wheat genotypes (*Triticum aestivum* L. cvs. PI178383, Izgi01, Sönmez2001- yellow rust resistant cultivars and *Triticum aestivum* L. cvs. Harmankaya99, ES14, Aytın98- yellow rust susceptible cultivars) were used in the chosen time points for the gene expression analyses. As a result, PR5 (Pathogenesis related gene5), PR2 (BlastX homolog of singletone CA598181) and GRAB2 (BlastX homolog of singletone CA597983) were the genes with high expression levels in inoculated plants while there was no expression in the controls. These genes are known to have important roles in defense response mechanisms during the pathogen attacks in plants.

## 1. GİRİŞ

Buğday tüm dünyada insan besini olarak yaygın bir şekilde kullanılan ve ülkemizde de gıda, ekonomi ve ticaret yönünden önemli yeri olan bir bitkidir. Buğday, dünyada toplam tahıl ekilişinin %32'sini, toplam tahıl üretiminin ise %35'ini tek başına sağlamaktadır. Türkiye'de ise ekili alanların yaklaşık %67'sini, tahılların ise %62'sini buğday ekim alanları oluşturmaktadır (Bilgin ve Korkut, 2005). Vitamin ve mineral madde yönünden zengin, en önemli karbonhidrat kaynaklarından biri olan buğday; ortam koşullarına uyumu, tanelerinin kolay saklanabilmesi ve kolayca una çevrilmesi gibi özelliklerinden dolayı, beslenmenin en önemli bileşenidir (Milner ve diğ., 1978). Türkiye'de günlük enerji gereksinmesinin yaklaşık %40'dan fazlası sadece buğday tarafından karşılanmaktadır. Bu oran kırsal kesimlerde %75'in üzerine çıkmaktadır. Buğdayın gerek ülkemizde çok geniş kesimlerde ana gıda kaynağı olması, gerekse Avrupa Birliği ülkelerinde dahi günlük enerji gereksinmesinin karşılanmasında ortalama %20 paya sahip olması bu bitkinin biyotik ve abiyotik stres etmenlerince iyileştirilmesi gerekliliğini ortaya koymaktadır. 2025 yılında dünya nüfusu için gereken toplam buğday miktarının 786 milyon ton olacağı tahmini, buğday üretiminin artırılmasının önemini vurgulamaktadır. Buğday üretimini artırmada en etkili olan yol ise biyotik ve abiyotik stres etmenlerine dayanıklı çeşitlerin geliştirilerek birim alanda daha çok ürün elde etme yoluna gidilmesidir (Alam, 2004).

Buğday verimini sınırlayan biyotik faktörlerden en önemlisi çeşitli patojenlerin oluşturduğu hastalıklardır. Ülkemizde ve dünyada önemli biyotik stres etmenlerinden biri olan ve yurdumuzda buğday tarımında bazı alanlarda %80'lere varan ürün kayıplarına neden olan sarı pas hastalığı için yurdumuz orijinli kışlık ekmeklik buğday çeşitlerinde; bu hastalığa dayanıklı genotiplerin kısa sürede seçimine olanak tanıyan sarı pas dayanıklılığına özgün EST kökenli DNA markırlarının belirlenmesi, RGA-EST'ler ve EST kökenli kontig ve singletonların genetik yakınlık analizlerinin gerçekleştirilmesi, stres ve stresle ilişkili EST'lerin gen anlatım profillerinin belirlenmesi, bitkilerde mantar hastalıklarına dayanıklılık mekanizmasında rol oynayan genlerin anlatım profillerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu şekilde bitki genotiplerinin

sarı pas hastalığına dayanıklılık açısından hem yapısal (DNA düzeyinde bitkide sarı pas hastalığı ile ilişkili EST'lerin ve RGA-EST'lerin taranması) hem de işlevsel düzeyde (EST ve çeşitli bitki hastalıklarına dayanıklılık mekanizmasında rol oynayan genlerin gen anlatım profillerinin) belirlenerek doğru ve etkin bir biçimde tanımlanması mümkün olacaktır.

## 2. GENEL KISIMLAR

### 2.1. BUĞDAYIN ÖNEMİ

Tahıllar dünyada kültürü yapılan bitkiler içinde en fazla ekim alanına ve üretime sahiptir. Tahıllar içerisinde de buğday (*Triticum aestivum* L.), insan beslenmesinde kullanılan kültür bitkileri arasında ekiliş ve üretim bakımından ilk sırada yer almaktadır (Çölkesen, 1995). Buğday (*Triticum* spp.) bütün dünyada ıslahı yapılmış, tek yıllık otsu bir bitkidir. Türkiye’de ekonomik ve kültürel açıdan en önemli tahıl olarak nitelendirilmektedir. Değişik iklim ve toprak koşullarında yetiştirilebilmesi, bileşiminde karbonhidrat, nişasta, protein, bazı vitamin ve mineral maddeleri bulundurması, değerli ve ucuz bir besin kaynağı olması bakımından hızla artan dünya nüfusunun beslenmesinde vazgeçilmez bir ürün niteliği taşımaktadır. Bu durum göz önüne alındığında bu bitki biyotik ve abiyotik stres etmenlerinin etkisinden en az zarar görecektir şekilde iyileştirilmeli ve ürün kayıpları en aza indirilmeye çalışılmalıdır (Li ve diğ., 2006).

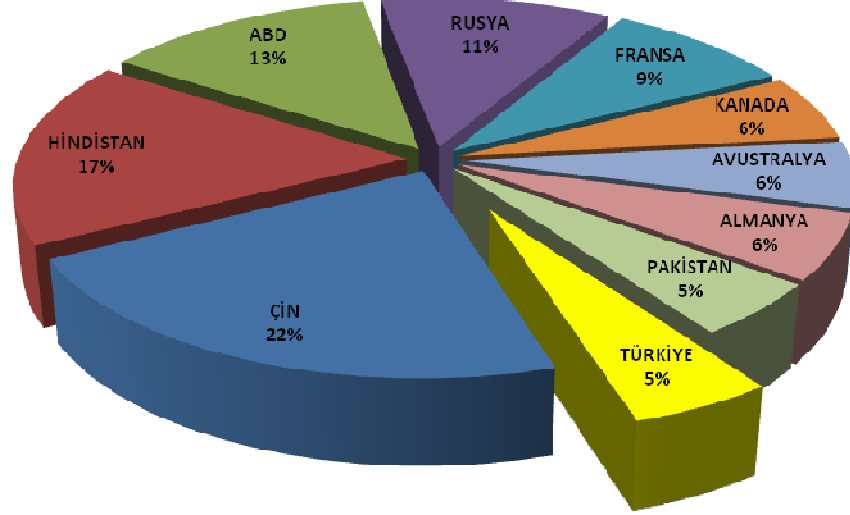
Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) (Food and Agriculture Organization of the United Nations) tarafından açıklanan verilere göre ise, 2008 yılında dünyada ve Türkiye’de buğday ekili alan, üretim miktarı ve verimi Tablo 2.1 de verilmiştir.

Tablo 2.1: Dünyada ve Türkiye’de 2008 yılına ait buğday ekili alan-üretim miktarı-verim  
(<http://faostat.fao.org>)

	Ekili Alan (Ha)	Üretim Miktarı (Ton)	Verim (Hg/Ha)
<b>Dünya</b>	*223.564.097	*689.945.712	30.861
<b>Türkiye</b>	7.582.531	17.782.000	23.451

\* Tahmini veriler

Türkiye buğdayın ekim alanı bakımından dünya ülkeleri arasında 7. sırada ve üretilen miktar bakımından ise 8. sırada yer almaktadır (Akar ve diğ., 2007) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1: 2007 yılında dünyadaki buğday ekim alanlarına ait oranlar (<http://faostat.fao.org>)

Buğday ülkemizde en çok İç Anadolu Bölgesi'nde yetiştirilmekte ve bu nedenle bölge Türkiye'nin "buğday ambarı" olarak da anılmaktadır (Zeybek ve Yiğit, 2004).

Yapılan kazılarda ortaya çıkarılan buğday tohumlarının incelenmesi sonucu buğdayın M.Ö. 7000 yıllarında kültüre alındığı anlaşılmıştır. "Verimli Hilal" olarak adlandırılan Kuzey Suriye'den Güneydoğu Türkiye, Kuzey Irak ve Batı İran doğrultusunda yay şeklinde uzanan bölge, buğday ıslahına ilk başlanan bölge olarak bilinmektedir (Zohary ve Hopf, 1994) (Şekil 2.2).

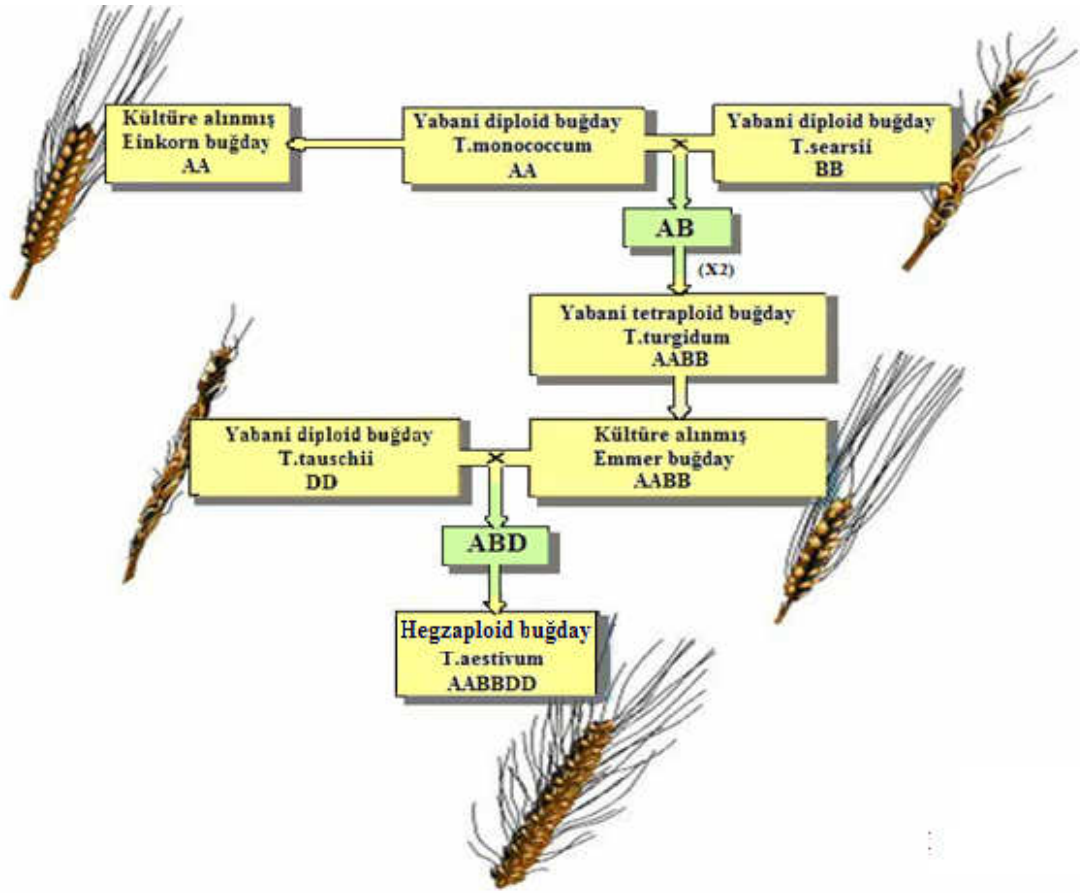




Şekil 2 2: Buğdayın yayılış haritası ve “Verimli Hilal” bölgesi (Nesbitt ve Samuel, 1998)

## 2.2. BUĞDAYIN GENOMİK ORGANİZASYONU

Buğday  $1.6 \times 10^{10}$  bç’lik oldukça büyük bir genomu sahiptir (Flavell ve Smith, 1976). Genom büyüklüğü pirinçten (*Oryza sativa*) 35 kat, mısırdan ise (*Zea mays*) 6 kat daha büyüktür (Arumuganathan ve Earle, 1991). *Triticum* A, B, D ve G genomlarına sahiptir ve kombinasyonları da bulunmaktadır. B ve G genomlarının atasal S genomundan kökenlendiği düşünülmektedir (Bahrman ve diğ., 1988). Kültürü yapılan modern buğday çeşitleri temel olarak iki türe aittir. Bunlardan biri hegzaploid ekmeklik buğday olan *Triticum aestivum* ( $2n = 6x = 42$ ) (AABBDD), diğeri ise makarna ve daha düşük kaliteli ekmek yapımında kullanılan sert ya da durum tipi buğday olan tetraploid *Triticum durum*’dur ( $2n = 4x = 28$ ) (AABB). Buğday genomunun büyük bölümü transkripsiyona (%95–99) uğramayan kısımdır (Sandhu ve Gill, 2002). Kalan %1.5’lik kısım ise kümeler (cluster) halinde bulunan genleri içerir (Dilbirliği ve Gill, 2003). Hegzaploid buğday genomunda 75 000 ile 150 000 arası gen olduğu tahmin edilmektedir ve bu genlerin ancak %1.2 – 2.4’ünün fonksiyonel genler olduğu düşünülmektedir (Erayman ve diğ., 2004). Tetraploid makarnalık buğday ve hegzaploid ekmeklik buğday çeşitlerini içeren modern buğdaya kabuksuz buğday da denilmektedir. Buna karşılık diploid (einkorn), tetraploid (emmer) ve hegzaploid (spelt) çeşitlerini içeren, yabani buğday, tanelerinin kabukla çevrelenmiş olması nedeniyle kabuklu buğday olarak da adlandırılmaktadır (Nesbitt ve Samuel, 1998).

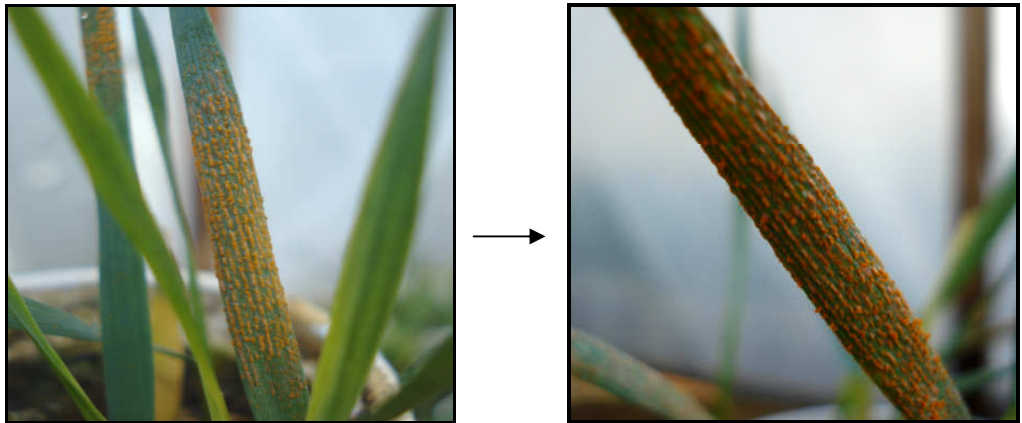


Şekil 2.3: Hegzaploid buğdayın evrimi (<http://www.sciag.ukzn.ac.za/bgm/files/lecture.ppt>)

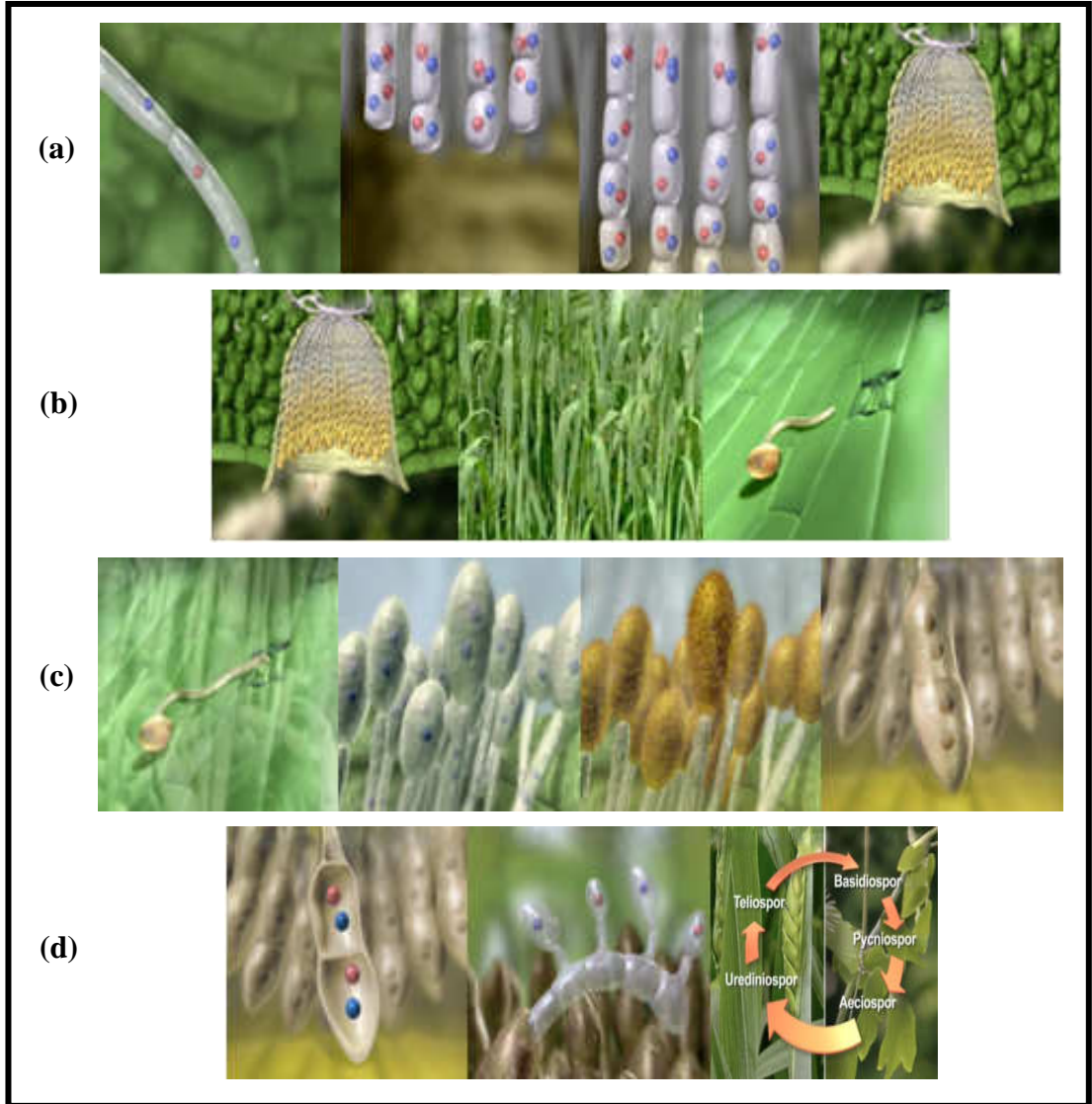
### 2.3. BUĞDAY SARI PAS ETMENİ *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*

Buğday verimini sınırlayan biyotik etmenlerden en önemlisi çeşitli patojenlerin oluşturduğu hastalıklardır. Bu hastalık etmenlerinden en fazla ürün kaybına sebep olanlarından biri de pas hastalıklarıdır (Li ve diğ., 2006) Önemli biyotik stres etmenlerinden biri olan buğday pas mantarları, Basidiomycetes sınıfına, Uredinales takımına, Pucciniaceae ailesine ve *Puccinia* cinsine ait; konak aralığı oldukça dar, konakçı üzerinden beslenmesi zorunlu olan biyotrof özellikteki patojenlerdir (Curtis ve diğ., 2002). Sarı pas hastalık etmeni ilk kez Gadd tarafından 1777 yılında Avrupa'da tanımlanmıştır. Patojenin tür ismi farklı araştırmacılar tarafından günümüze kadar *Uredo glumarum* (Schmidt, 1827), *Puccinia striaeformis* (Westendorp, 1854), *Puccinia straminis* (Fuckel, 1860), *Puccinia glumarum* (Eriksson ve Henning, 1894) gibi farklı şekillerde isimlendirilmiş ve 1953 yılında "*Puccinia striiformis*" adı verilmiştir (Hylander ve diğ., 1953).

Sarı pas hastalığının gelişimi için nem, sıcaklık ve rüzgar olmak üzere 3 etmen önemlidir. Mantar, ilkbaharda özellikle serin nemli havalarda, büyümeye başlamakta ve aktif olarak spor üreten lezyonlar üretmektedir. Hastalık adını, mantarın sarı renkli sporlarından alır. Bulaşmış alanlarda, özellikle, çevresel koşullar uygun olduğunda, ürün kayıpları % 100'e ulaşabilir (Roelfs, 1989). Hastalık etmeni olan patojen arpa, çavdar ve diğer bazı türlerde de etkisini gösterir. Sarı pas, diğer pas hastalıkları içinde en erken görülen pas türüdür. Sarı pas tahılların yaprak, sap ve başaklarında görülse de, esas ortaya çıktığı yer yapraklardır. Yaprakların üst yüzeyinde makine dikişi şeklinde ve sarı renkte püstüller oluşur. Bu püstüllerin dizilişi bir çizgiye benzediği için bu pas türüne çizgi pası da denilebilmektedir (Şekil 2.4). Bu püstüllerde yazlık sporlar (ürediospor) üretilmekte olup mevsim sonuna doğru ya da hastalığın gelişimi için olumsuz şartlar oluştuğunda, yazlık sporların yerini siyah renkli kışık sporlar (teliospor) almaktadırlar. Ürediosporlar, yuvarlak veya oval şekilli, çeperi dikenlidir ve yüzeyine dağılmış olarak bulunan 3–4 adet deliğe sahiptir, teliosporlar ise uzunca, kalın çeperli ve arası hafif boğumlu düz iki hücreden oluşmaktadırlar. Salgın ile bu ürediosporlar bir başka bölge, bir başka ülke ve hatta kıtalar arası bile taşınabilir. Optimum şartlarda bulaşma sonrası inkübasyon süresi 12–14 gündür. Şartların ürediosporlar için uygunluğunu yitirdiği döneme girildiği zaman ürediospor yapılarını oluşturan kısımlarda teliosporlar oluşmaya başlar. Teliosporlar haploid bazidiosporları üretmek için çimlenebilirler. Bunun sonucunda ufak tefek ve sarı-turuncu renkli “üredia” denen pas püstülleri şeklinde bir mantar görünüşü belirmektedir (Şekil 2.5).



Şekil 2.4: *Puccinia striiformis* f.sp. *tritici* mantarının hassas bir buğday bitkisinin yaprağının üzerinde oluşturduğu üredinia (fotoğraf kaynağı: TÜBİTAK KAMAG 105G075 no'lu proje çalışmasından)



Şekil 2.5: Sarı pas etmeni *Puccinia striiformis*'in yaşam döngüsü (<http://www.hgca.com>)

a) *Puccinia* enfeksiyonundan sonra öncelikle püstül oluşumu başlar. Tek bir lezyon yaklaşık 350.000 spor taşır. b) Uredosporlar düzgün, yuvarlak şekilde bir oluşum gösterirler. c) Kalın duvarlı kırmızımsı sporlar yırtılmış püstüllerle birlikte bulunur. d) İki hücreli teliosporlar, uredosporlarla birlikte bulunabilir.

Sarı pas hastalığı özellikle Kuzeybatı Avrupa, Kuzey Amerika, Hindistan ve Çin'i içine alan daha serin bölgelerde görülen önemli bir küresel problemdir (Singh ve diğ., 2008) (Şekil 2.6). Sarı pasın ara konukçusu bilinmemektedir (Marsalis ve Goldberg, 2006).



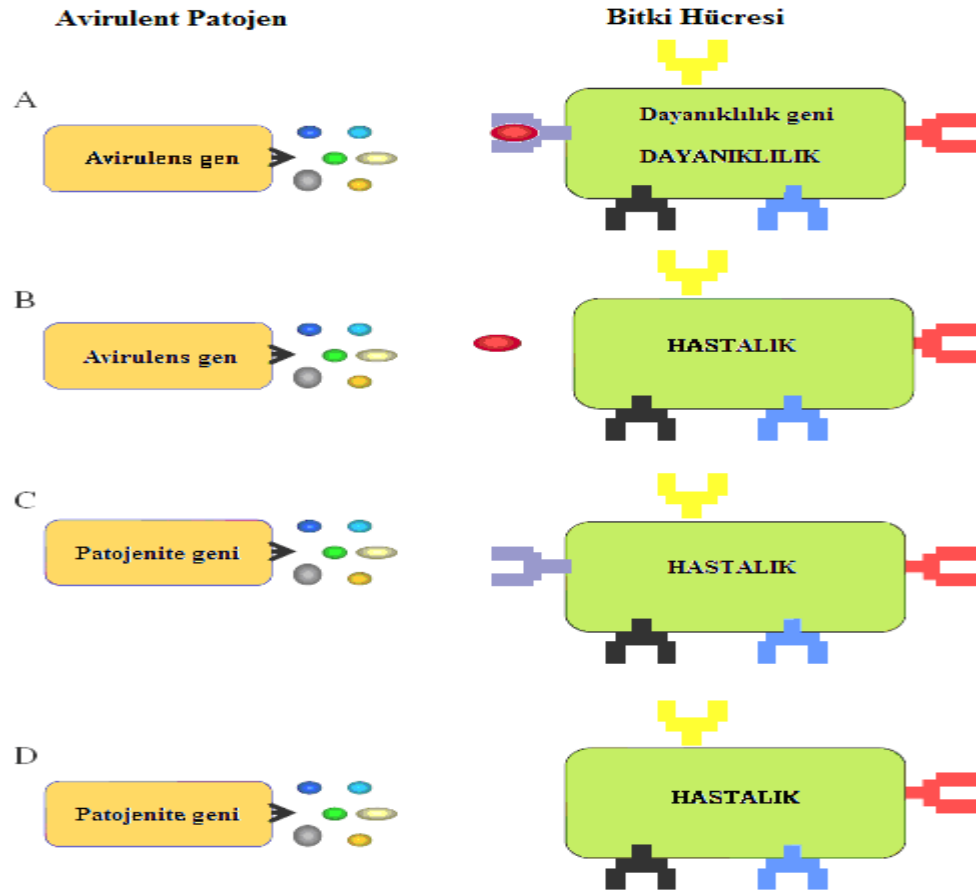
Şekil 2.6: Sarı pas hastalığının dünya üzerindeki yayılımı (CABI Crop Protection Compendium 2004, [www.cabicompendium.org](http://www.cabicompendium.org))

#### 2.4. SARI PAS DAYANIKLILIK MEKANİZMASI

Sarı pas için dayanıklılık ırka özgü fide ve ergin bitki dayanıklılığı ile ırka özgü olmayan ergin bitki dayanıklılığından oluşmaktadır (Johnson, 1988). Sarı pasın ırka özgün direnci kalitatif kalıtımın tüm dönemlerine yayılmış dayanıklılıktır ve tek bir majör *R* geni ile kontrol edilir. Fide dönemi dayanıklılığını sağlayan genler, tüm büyüme evrelerinde anlatımı olan genler olmasına rağmen, ergin dönem dayanıklılığını sağlayan genler, yetişkin evrede etkin olan ve olgunlaşma arttıkça dayanıklılık düzeyinin de arttığını ifade eden genlerdir. Ergin bitki dayanıklılığı türe özgü olmayıp, süreklidir ve daha geç oluşmaktadır. Bugüne kadar 40 adet sarı pas dayanıklılık (*Yr*) geni tanımlanmıştır (Chhuneja ve diğ., 2008). Belirlenen sarı pas dayanıklılık genlerinin çoğu türe özgü koruma sağlar. Dayanıklılık, uygun avirulens geni taşıyan *P. striiformis* f. sp. *tritici* ırklarına karşıdır (Boyd, 2005). *Yr10* geni ilk defa Türk hattı olan PI178383'de tanımlanmıştır (Bariana ve diğ., 2002). Kromozom 1B de bulunur ve NBS-LRR proteinini kodlar.

Bitkiler çok sayıda patojen ile karşılaşmakta ve karmaşık savunma sistemleri sayesinde çeşitli savunma mekanizmaları geliştirmektedir. Bitkiler bu yolla patojen atağını algılamakta, sınırlandırmakta ve karşı atağa geçebilmektedir (Kitajima ve Sato, 1999; Selitrennikoff, 2001). Bitki ve biyotrof mantar arasındaki etkileşim gene-karşı-gen (gene for gene) modeli ile açıklanabilir (Flor, 1971). Bu modele göre, bitkide, herhangi bir patojene karşı oluşan dayanıklılık, biri konakta (*R* geni) diğeri patojende (*Avr* geni)

bulunan bir çift dominant genin ürünlerinin etkileşiminin sonucudur (Grenan, 2006; Jones ve Dangl, 2006). Bu etkileşim sonucunda, bitki patojeni tanımış olur ve dayanıklılık mekanizmalarını başlatır. *Avr* geni tarafından sentezlenen ligand, *R* geninin ürününe bağlanarak onu aktif hale getirir. Aktif duruma geçen *R* geninin ürünü de savunma yanıtını başlatacak olan sinyallerin iletimini sağlar (Şekil 2.7).



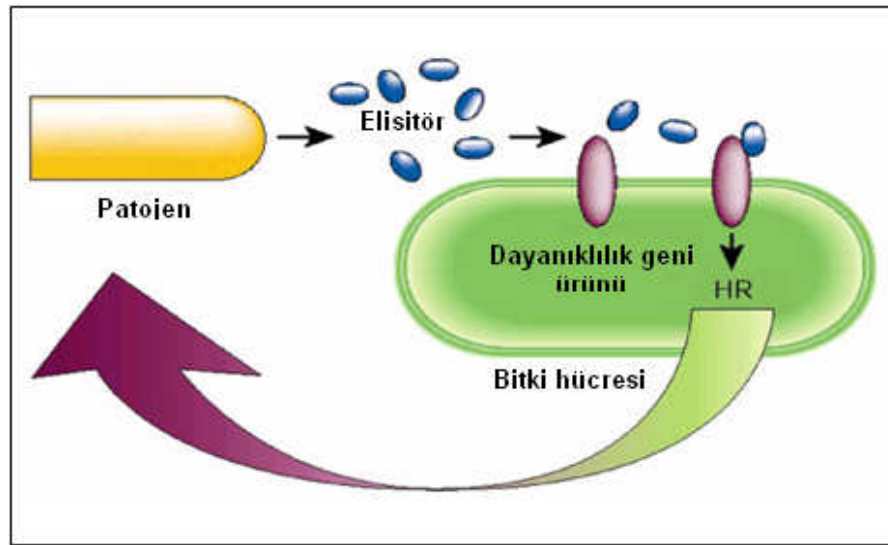
Şekil 2.7: Konakçı ve patojen arasındaki gene karşı gen etkileşimi (Yıldırım, 2005)

A: *Avr* genini içeren patojen ve uygun *R* genini içeren bitki etkileşimi sonucu oluşan dayanıklılık, B: Patojenin *Avr* sinyalini üretmesine karşın, eşleşen sinyali iletecek bir *R* ürünü olmadığı için hastalıkla sonuçlanan etkileşim, C: Konakçı bitkinin *R* genini taşımasına karşın, patojenin *R* geninin tanıyabileceği *Avr* genini kaybetmesi ile hastalıkla sonuçlanan etkileşim, D: Patojen ve bitkinin eşleşen *Avr* ve *R* genlerini sırasıyla kaybetmesi sonucu hastalık oluşumu



## 2.5. AŞIRI DUYARLI YANIT

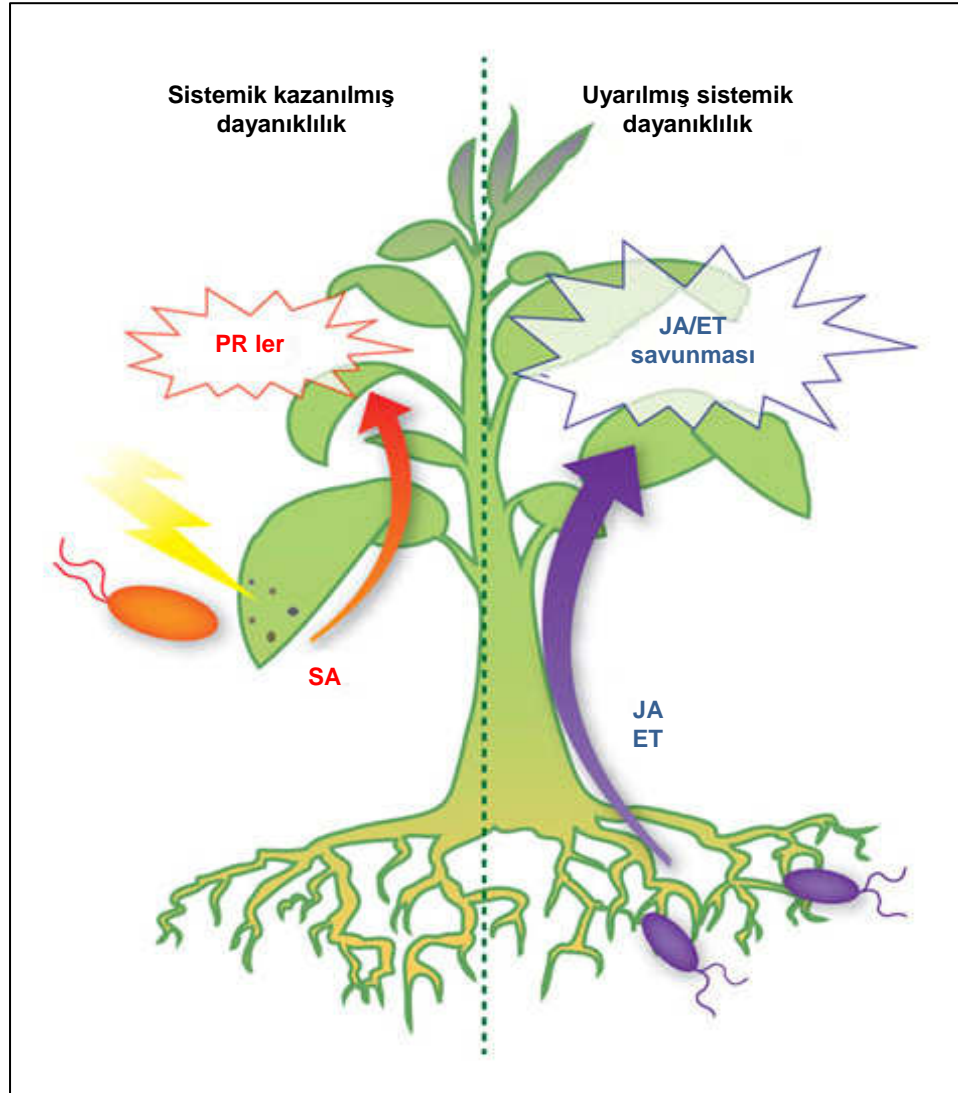
Gene karşı gen etkileşiminin tetiklediği dayanıklılık mekanizması “Aşırı Duyarlı Yanıt (HR) (Hypersensitive Response)” olarak isimlendirilir. *R-Avr* tanınması bitkideki savunma sinyal yollarını aktifleştirir ve sistemik kazanılmış dayanıklılığı (SAR) (Systemic Acquired Resistance) tetikleyen salisilik asit (SA) birikimi gözlenir (Feys ve Parker, 2000). Patojenin varlığı ile oluşan sinyal *R* genleri tarafından tanınır ve aktifleşen sinyal yolları sonucu enfeksiyon bölgesinde plazma zarının geçirgenliğinde değişiklik, iyon kanallarının hızlı etkinlik göstermesi, oksidatif patlama, reaktif oksijen türlerinin (ROS) (Reactive Oxygene Species) üretimi, antimikrobiyal bileşenlerin birikimi ve hücre duvarının kalınlaştırılması gibi değişimler gerçekleşir. HR, enfeksiyon bölgesinde hızlı ve bölgesel hücre ölümleriyle tanımlanır (Hammond-Kossack ve Jones, 1997). Meydana gelen hücre ölümü, patojenin besin kaynaklarına ulaşması ve üremesini engelleyerek patojenin büyümesini sınırlar. Direnç cevabının başlayabilmesi için sinyal moleküllerine ihtiyaç duyulur. Bu sinyal moleküllerinin tümü “elisitörler” olarak adlandırılır fakat çok azı moleküler seviyede oligosakkaritler, glikoproteinler ve glikopeptidler olarak tanımlanmıştır. Elisitörler belirli bir konak bitki ve patojen sistemine özel olabilmekte veya yayılan patojene özgü çok genel hücre duvarı bileşeni olabilmektedir (Ebel ve Casio,1994; Wojtaszek, 1997) (Şekil 2.8). Aşırı duyarlı yanıt (HR) hızlı programlı hücre ölümü (PCD) olarak da adlandırılır (Shirasu ve Schulze-Lefert, 2000).



Şekil 2.8: Patojen enfeksiyonu sonucu bitkide gözlenen HR (Stuiver ve Custers, 2001)

## 2.6. BİTKİLERDEKİ SİSTEMİK DAYANIKLILIK MEKANİZMALARI

Sistemik kazanılmış dayanıklılık (SAR) ve uyarılmış sistemik dayanıklılık (Induced Systemic Resistance) (ISR) bitkilerde oluşan dayanıklılığın iki formunu oluşturur (Gary ve diğ., 1934). Hem SAR hem de ISR de bir hastalık, farklı bir patojen ya da parazit bulaşmış bitkiler, aynı veya farklı bir hastalık enfeksiyonuna karşı bağışıklık kazanmış hale gelebilmektedir (Şekil 2.9).

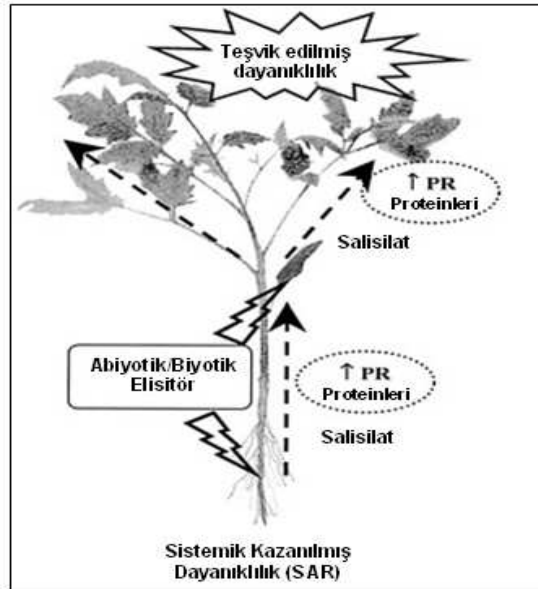


Şekil 2.9: Bitkilerde sistemik kazanılmış ve uyarılmış sistemik dayanıklılığın şematik gösterimi (Pieterse ve diğ., 2009)



### 2.6.1. Sistemik Olarak Kazanılmış Dayanıklılık

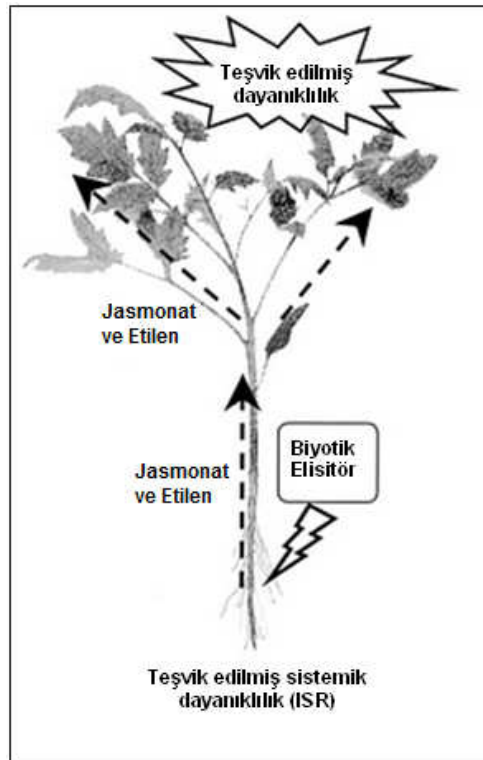
Geniş spektrumlu patojenlere karşı HR ve diğer nekrotik reaksiyonları takiben gelişen dayanıklılık sistemik kazanılmış dayanıklılık (SAR) olarak adlandırılır (Vallad ve Goodman, 2004). Endojen olarak sentezlenen salisilik asit miktarının artışı ile tanımlanır (Malamy ve diğ., 1990; Métraux ve diğ., 1990). SAR patogenez ilişkili (PR) proteinleri kodlayan genlerin aktifleşmesi ile ilişkilidir (Van Loon ve Van Strien, 1999) (Şekil 2.10). Bu şekilde hücresel savunma cevabı teşvik edilmemiş bitkiye göre çok hızlı şekilde ve büyük oranda gerçekleşir (Mur ve diğ., 2006). Bitkide SAR'ın klasik formu virulent, virulent olmayan veya patojenik olmayan mikroplar, salisilik asit, 2,6-dikloro-isonikotinik asit (INA) veya benzo (1,2,3) thiadiazole-7-carbothiotic asit S-metil ester (BTH) gibi kimyasallar tarafından tetiklenir (Sticher ve diğ., 1997). Bitki ve elisitöre bağlı olarak SAR'ın gelişebilmesi için bitkide salisilik asit ile ilişkili transkriptlerin birikimi gereklidir (Cameron, 2000). Bitki salisilik asit biriktirme yeteneğini kaybederse patojenin uyarıcı olarak kullanıldığı durumlarda bile patogenezle ilişkili gen anlatımı gerçekleşmez ve SAR başlatılamaz (Lawton ve diğ., 1995; Vallad ve Goodman, 2004). SAR çeşitli bitki aileleri arasında korunmuşluk gösterir ve geniş ölçekte viral, bakteriyal patojenler ve mantarlara karşı etkilidir (Sticher ve diğ., 1997).



Şekil 2.10: Geniş spektrumlu patojenlere karşı HR ve diğer nekrotik reaksiyonları takiben gelişen dayanıklılık olan sistemik kazanılmış dayanıklılığın (SAR) gösterimi

### 2.6.2. Uyarılmış Sistemik Dayanıklılık

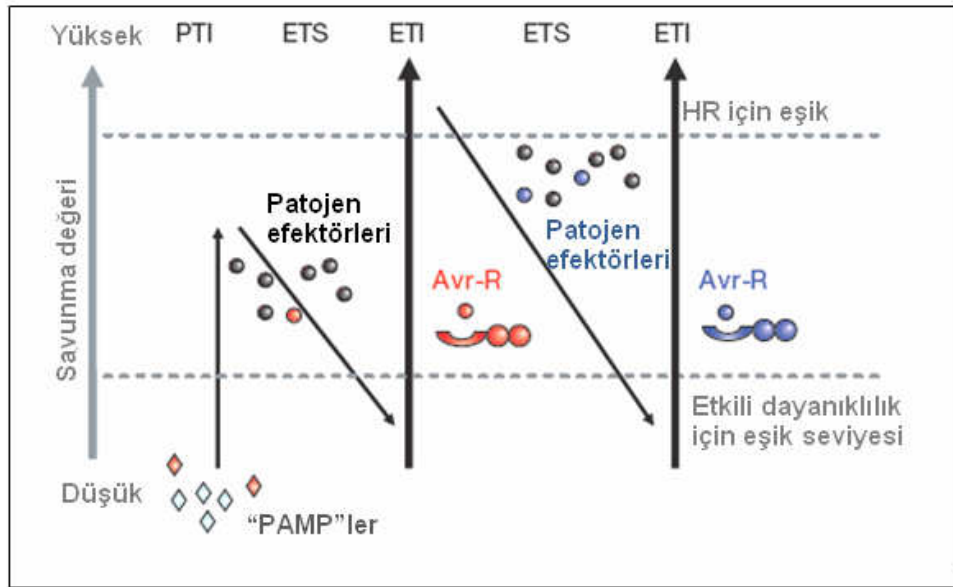
Bitkilerde gözlenen uyarılmış sistemik dayanıklılığın (ISR) (Induced Systemic Resistance) sinyal yolu patojen bulaşması ile başlar ve klasik sistemik kazanılmış dayanıklılık (SAR) yolundan farklılık gösterir. SAR nekrotik bir patojenin enfeksiyonu sonucu oluşan sistemik olarak teşvik edilen bir hastalık direnç formudur (Ryals ve diğ., 1996). Salisilik asidin yanında, bitki büyüme düzenleyicilerinden jasmonik asit ve etilen de bitki savunma cevabında etkilidir (Boller, 1991; Wasternack ve Parthier, 1997) (Şekil 2.11). Jasmonik asit ve türevleri “jasmonat” olarak adlandırılır, thionin (Epple ve diğ., 1995) ve proteinaz inhibitörleri (Farmer ve diğ., 1992) gibi savunma ile ilişkili genlerin sentezini teşvik eder. Bununla beraber etilen PR gen ailelerinin çok sayıda üyesini teşvik eder (Brederode ve diğ., 1991; Potter ve diğ., 1993). Aynı zamanda jasmonat ve etilen, elisitör tarafından teşvik edilen PR gen anlatımını düzenleyebilmek için birlikte görev alırlar (Xu ve diğ., 1994). Hem jasmonat hem de etilenin sistemik olarak teşvik edilen savunma cevabının oluşması için gerekli olduğu bildirilmiştir (Van Loon, 1977; Farmer ve Ryan, 1992; Penninckx ve diğ., 1996) fakat yine de birçok durumda rolleri çok belirgin değildir.



Şekil 2.11: Bitkilerde gözlenen uyarılmış sistemik dayanıklılığın (ISR) gösterimi

## 2.7. BİTKİ BAĞIŞIKLIK SİSTEMİ

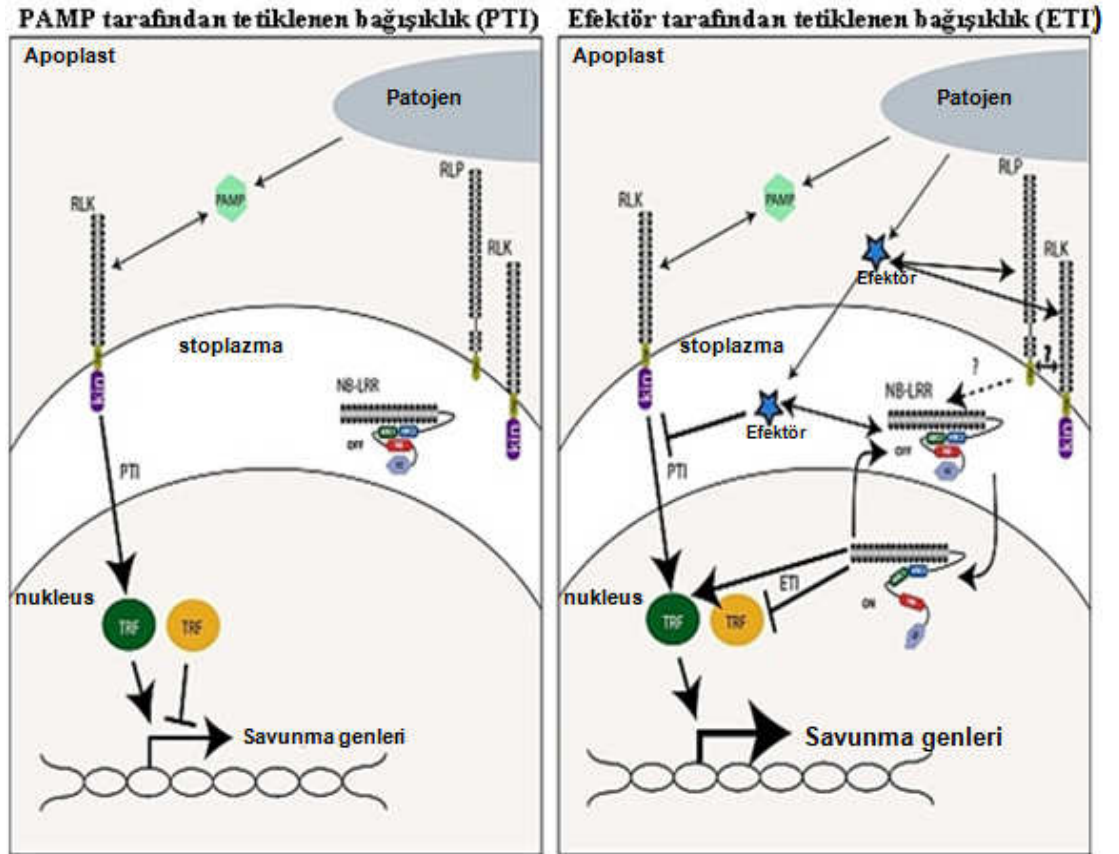
Bitki bağışıklık sistemi ikiye ayrılır. Bunlardan ilki transmembran model tanıma reseptörleri (PRR) (Transmembrane Pattern Recognition Receptors)'dir. Flagellin gibi ağır olarak evrimleşen mikrobiyal veya patojen kökenli moleküler yapılara (MAMP veya PAMP) (Microbial Associated Molecular Patern - Pathogen Associated Molecular Patern) cevap olarak gelişir (Zipfel ve Felix, 2005). İkincisi ise *R* genleri tarafından kodlanan polimorfik NB-LRR protein ürünleri kullanılarak kazanılan bağışıklıktır (Dangl ve Jones, 2001). Bu tip bağışıklık nukleotid bağlanma (NB) domaini ile lösince zengin tekrarlı domain (LRR)'e göre isimlendirilir. NBB-LRR proteinleri hayvanlara özgü CATERPILLER/NOD/NLR (Ting ve Davis, 2005) proteinleri ile STAND ATPaz'ları ile ilişkilidir (Leipe ve diğ., 2004). Patojen efektörleri, NB-LRR proteinleri ile tanımlanır ve benzer savunma cevaplarını aktiveleştirirler. NB-LRR kaynaklı hastalık direnci sadece canlı konak dokularında gelişen patojenler (obligat-zorunlu patojen) veya hemibiyotrofik patojenlere karşı etkilidir. Kolonizasyon sırasında konak hücreyi öldüren (nekrotrof) patojenlere karşı etkili değildir (Glazebrook, 2005). Bitki bağışıklık sistemi dört fazlı zig zag model ile de tanımlanabilir (Şekil 2.12).



Şekil 2.12: Bitki bağışıklık sisteminde dört fazlı zig zag modeli (Jones ve diğ., 2006)

1.faz da transmembran modeli tanıma reseptörleri patojen veya mikrobiyal kökenli yapıları tanır ve bunun sonucunda kolonizasyon durdurularak patojen kökenli moleküler

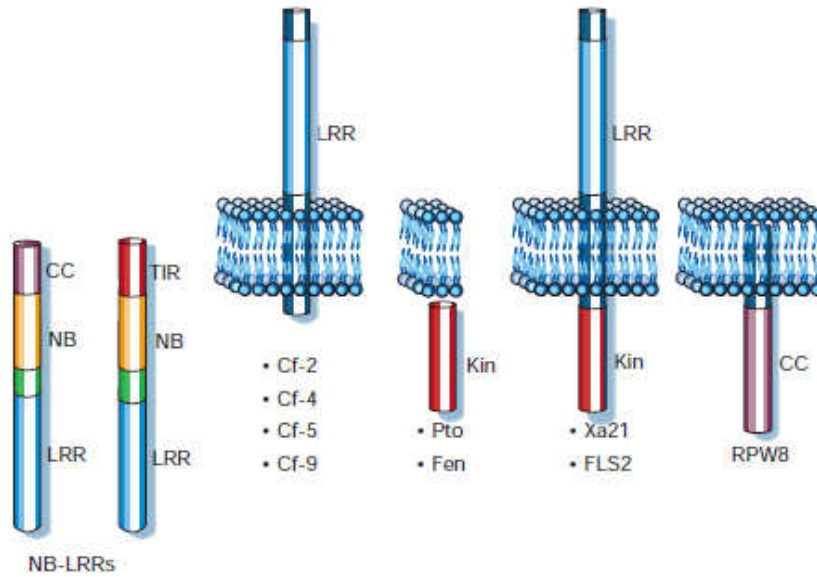
yapılar tarafından tetiklenen bağışıklık (PTI) (Pathogen Triggered Immunity) gelişir. 2. fazda patojenler, efektörleri yayarak patojen virulensine katkıda bulunurlar. Bu efektörler PAMP tarafından teşvik edilen bağışıklığa (PTI) engel olarak efektör tarafından tetiklenen hassasiyete (ETS) (Effector-Triggered Susceptibility) yol açar. 3. fazda NB-LRR proteinleri belirli bir efektörü tanıyarak efektör tarafından tetiklenen bağışıklığa (ETI) (Effector Triggered Immunity) yol açar (Şekil 2.13). Tanıma dolaylı yolla ya da doğrudan efektörün NB-LRR tarafından tanınmasıyla gerçekleşebilir. Efektör tarafından tetiklenen bağışıklık (ETI), hızlandırılmış ve çoğaltılmış bir tür PAMP tarafından teşvik edilen bağışıklık (PTI) cevabıdır. Genellikle enfeksiyon bölgesinde aşırı duyarlı hücre ölümü (HR) ile sonuçlanan cevap ve bunun sonucunda ise hastalık direnci gözlenir. 4. fazda ise patojenleri tanımadan sorumlu efektör genleri değişikliğe uğratarak bitkiyi efektör tarafından tetiklenen bağışıklıktan (ETI) kaçınmaya sevk eder.



Şekil 2.13: Bitkide PAMP ve efektör tarafından tetiklenen bağışıklık (Takken ve Tameling, 2009)

### 2.7.1. R Proteinlerinin Yapısı

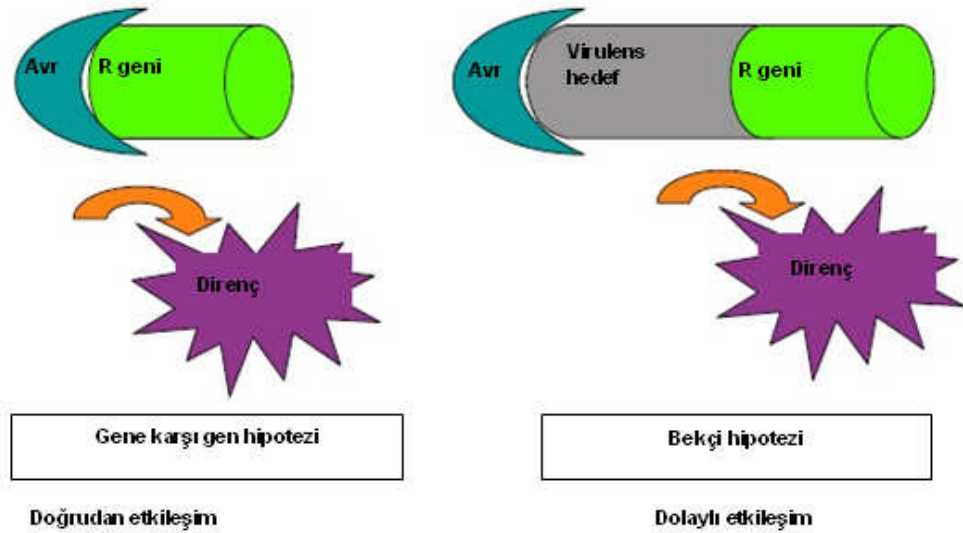
Bitki hastalık direnç proteinlerinin çoğu lösince zengin tekrarlar (LRR) (Leucin Rich Repeat), nükleotid bağlanma bölgesi (NBS) (Nucleotid Binding Side) ve amino terminal sinyal domaini içerir. Bu proteinler NBS-LRR proteinleri olarak adlandırılır. Bir çok organizmada proteinlerin içerdiği LRR domaini, proteinlerin etkileşiminden sorumludur ve proteinin aktifleştirilmesinde düzenleyici bir modül olarak rol oynar (Dangl ve Jones, 2001). Etkörlerin tanınmasıyla aktif hale gelen R proteinlerinin büyük bir kısmı içerdikleri yapısal motiflere göre beş sınıfa ayrılır. 1. sınıf sadece domatesteki Pto'yu içermektedir. 2. sınıfa dahil olan proteinler lösince zengin tekrarlar (LRR), nükleotid bağlanma bölgesi (NBS), lösin zipper (LZ) veya coiled coil (CC) dizisini içerir. 3. sınıf, 2. sınıf ile benzerlik gösterir fakat CC dizisi yerine Toll ve Interlökin 1 reseptörü (IL-1R) olarak adlandırılan proteinleri içerir. İlk üç sınıfa ait olan R proteinlerinin transmembran (TM) domainleri bulunmaz ve hücre içinde yerleşim gösterirler. Domatesteki Cf proteinleri 4. sınıfı oluşturur. NBS içermezler bunun yanında TM, hücre dışı LRR ve küçük stoplazmik bir kuyruk yapısı taşır. 5. sınıf piriçteki Xa21 proteinini içerir (Dangl ve Jones, 2001). Hücre dışı LRR ve TM ayrıca sitoplazmik serin/treonin kinaz bölgesi taşır. R proteinlerinin birkaçı bu beş sınıfa dahil olmaz. Mısırdaki Hm1, arpadaki Mlo, *Arabidopsis* teki RPW8 buna örnek verilebilir (Şekil 2.14).



Şekil 2.14: Bitkide R genlerinin kodladığı proteinlerin beş farklı sınıfının gösterimi (Dangl ve Jones, 2001)

Bitki EST veritabanları analiz edildiğinde tek çenekli bitkilerin (monokotillerin) TIR-NB-LRR içeren proteinleri taşımadıkları bunun yerine CC-NB-LRR içeren proteinleri taşıdıkları belirlenmiştir (Radwan ve diğ., 2005). Bu durum tek çenekli ve çift çenekli bitkilerin dayanıklılık mekanizmasında önemli farklılıklar olduğunu düşündürmektedir. CC-NB-LRR genlerinden (%40) daha fazla miktarda TIR-NB-LRR geni (%60) bulunmaktadır. *Arabidopsis*'in tüm kromozomları üzerinde yayılmış ~100 R lokusu bulunmaktadır. Hayvanların bağışıklık sistemi de LRR reseptörlerini kullanır. Bu reseptörler Toll-benzeri reseptör veya TLR'ler olarak adlandırılır. İnsan genomunda da ~15–20 *TLR* geni bulunmaktadır. TLR'lerin patojeni tanıma özelliği sınırlı olmakla beraber oldukça yüksek korunmuşluk gösterirler.

Bitkiler memelilerden farklı olarak hareketli savunma hücreleri içeren bağışıklık sisteminden yoksundur. Onun yerine, her hücrenin oluşumuyla birlikte taşıdığı bağışıklık ve enfeksiyon bölgesinden yayılan sistemik sinyaller mevcuttur (Ausubel, 2005; Chisholm ve diğ., 2006). Bitkilerdeki birçok R proteini patojen tarafından kodlanan efektörler ile doğrudan değil dolaylı olarak aktif hale geçebilmektedir. Bu "bekçi (guard) hipotezi"nde R proteinleri patojen efektörlerinin etkisi ve hareketlerine uyumlu hale gelerek konak hedeflerini dolaylı olarak tanımaktadır (Van der Biezen, 1998) (Şekil 2.15).



Şekil 2.15: Bitkide gene karşı gen ve bekçi hipotezinin şematik gösterimi (AnnTufan, 2003)

Bitkilerin patojen atağına karşı gösterdikleri savunma mekanizmalarından bazıları antifungal aktiviteye sahip düşük moleküler ağırlıklı bileşikler, proteinleri ve peptidleri sentezlemeleridir (Bull ve diğ., 1992; Kitajima ve Sato, 1999). Bu proteinler hem sürekli hem de mantar saldırıları ile uyarılan dayanıklılık için gerekli görünmektedir. Antifungal proteinlerin birçok sınıfı mantarın hücre duvarının sentezini baskılar veya hücre duvarı yapısı ve fonksiyonuna zarar verir. Diğer bir sınıfı ise hücre zarına zarar vererek mantar hücrelerinin lizisine neden olur (Selitrennikoff, 2001).

Bitkilerde patojen saldırılarına karşı savunma mekanizmasında iş gören genler ve bu genlerin çok sayıda ve değişik tipte protein ürünleri yer almaktadır. Bunlardan; SGT1 ve RAR1 R proteinleri tarafından meydana getirilen dirençlilik için çok önemli bir role sahiptir (Austin ve diğ., 2002). SGT1 proteininin direnç cevabını oluşturma mekanizması henüz anlaşılammıştır. Bununla beraber, SGT1'in ubiquitin ligaz kompleksi ile birleşerek eklemeli bir etki gösterdiği ve bu durumun hastalık dayanıklılığında önemli bir rol oynadığı bilinmektedir (Azevedo ve diğ., 2002). Literatürde RAR1'in R proteinlerinin stabilitesini düzenleyebileceği ifade edilmiştir. Bu protein patojen tanınması ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> birikimi ile konak hücrenin ölümünden sorumludur. RAR1 ve SGT1 ile birlikte Hsp90 şaperon kompleksi hastalık direnç sinyali için gerekli substrat stabilitesi veya aktivitesini düzenler. Bitkilerde ikiden fazla Hsp90 geni bulunmaktadır. Çok hücreli organizmalarda Hsp90 ailesinin üyeleri endoplazmik retikulum, mitokondri ve bitkilerde bunlara ek olarak kloroplastlarda bulunur. R genine dayalı dirençlilikte gerekli olan çoklu protein yapısının düzenlenmesinde görevlidir (Bansal ve diğ., 2004).

Kinaz enzimlerinden MAP kinazlar (MAPK) (Mitogen Activating Protein Kinase-mitojen aktiveleştirici protein kinazlar); erken bitki savunma sinyali için gereklidir ve bitki savunması sırasında transkripsiyonel düzenlenmeye yardımcı olur. PR proteinlerinin (Pathogenesis Related Protein) anlatımını teşvik eder ve patojene karşı dirençliliği artırır (Zhang ve Klessig, 1997; Doehlemann ve diğ., 2006).

Patogenezle ilişkili proteinler antifungal özellik gösteren proteinlerdir ve bu bitki proteinleri "patogenez ilişkili proteinler (PR Proteinleri)" olarak adlandırılır. Bu proteinler serolojik ve amino asit dizi analizine göre PR 1,-2, -3, -4, -5 olmak üzere beş

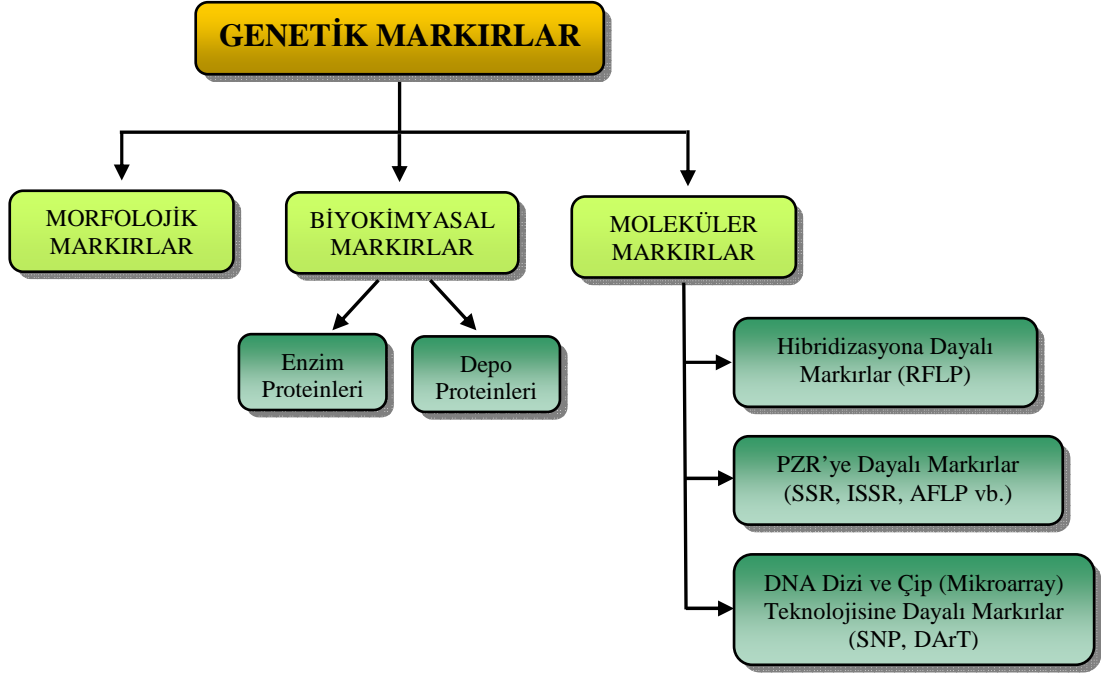
grupta toplanır (Loon, 2006). Patojen bitkiye bulaştığında PR-1 proteinlerinin yüksek seviyede birikimleri olur ve hem bitki hem de *in vitro* da antifungal özellik gösterirler (Niderman, 1995). PR-1 benzeri proteinler bazı bitkilerde hedef hücrenin membran kanal proteinleri ile etkileşime girerek  $Ca^{+2}$ 'nin salınmasını baskılamaktadır (Morrisette ve diğ., 1995). PR-2 proteinleri *in vitro* da (1,3)  $\beta$ -endoglukanaz aktivitesine sahiptir. PR-2 proteini mantar hücre duvarındaki yapısal (1,3)  $\beta$ -glukanı hidrolize ederek hücre duvarının zayıflamasına yol açar. Bu zayıflamış hücre duvarı mantar hücrelerinin lizisine ve ölümüne neden olur. PR-3 proteinleri *in vitro* kitinaz aktivitesine sahiptir. Bu proteinler *in situ* hücre duvarındaki kitin polimerlerini zedeleyen endokitinazlardır. Bu durum hücre duvarının güçsüzleşmesine ve mantar hücrelerinin osmotik olarak daha hassas hale gelmelerine neden olur. PR-4 kitin bağlayıcı proteinlerdir. PR-5 proteinleri “thaumatin”in amino asit dizisi ile önemli benzerlik gösterir ve TL (Thaumatococcus-Daniyel) proteinleri olarak bilinir. Birçok TL proteini mantar hücrelerinin hücre duvarını etkileyerek hücre geçirgenliğinde değişikliklere yol açar fakat protoplast üzerinde ya etki göstermez ya da çok az etkilidir (Selitrennikoff, 2001).

LTP'ler (Lipid Transfer Proteins) membranlar arasında fosfolipidleri aktarma yeteneğine sahiptir. *In vitro*'da sitoplazmik organeller arasında lipid değişimi ve daha da önemlisi patojenlere karşı savunmayı da içeren birçok görevleri vardır. Proteaz inhibitörleri, serin ve sistein proteazları baskılayan protein baskılayıcılar antifungal proteinlerin bir sınıfı olarak ayrılır ve bitki, hayvan patojenlerine karşı potansiyel aktivite gösterirler.

## 2.8. GENETİK MARKIRLAR

Genetik markır, bağlantılı bir lokustaki allelleri tanımlamak için kullanılan saptanabilir gen ya da DNA parçasını ifade eder. Genetik markırlar organizmanın ya da türün bireyleri arasında farklılıklar gösterir. Genellikle doğrudan hedef geni göstermezler fakat hedef gen için işaret veya etiket görevi yaparlar. Genlere çok yakın yer alan genetik markırlar “gen etiketleri” olarak bilinirler. Bütün genetik markırlar, kromozomlarda “lokus” olarak adlandırılan özgün genomik yerleşimlerde yer almaktadırlar (Collard ve diğ., 2005).





Şekil 2.16: Genetik markırların sınıflandırılması

### 2.8.1. Morfolojik Markırlar

Fenotipik özelliklere dayalı, tek lokus ile idare edilebilen ve çevre koşullarına karşı değişken olan markırlardır. Az sayıda olmaları, diğer lokuslardan ve çevresel koşullardan yüksek oranlarda etkilenebilmeleri, istenilen bazı özellikleri taşıyan genleri maskeleyebilmeleri ve çoğunlukla dominant özellikte olmaları nedeniyle fazla kullanılmamaktadırlar (Yıldırım ve Kandemir, 2001).

### 2.8.2. Biyokimyasal Markırlar

Genlerin ürünleri olan proteinlere dayanan markırlara biyokimyasal markırlar denir. Sayıca çok az olmaları ve varyasyonlarının düşük olmasına rağmen analizlerinin çabuk, güvenilir ve tekrarlanabilir olması, çevreden ve diğer lokuslardan etkilenmemesi olumlu yönleridir. İzozimler, en fazla kullanılan protein markırlardır. Bir enzimin alternatif formları olarak tanımlanırlar ve bir genin farklı allelleri ya da farklı genler tarafından kodlanmaktadır (Staub ve diğ., 1996).

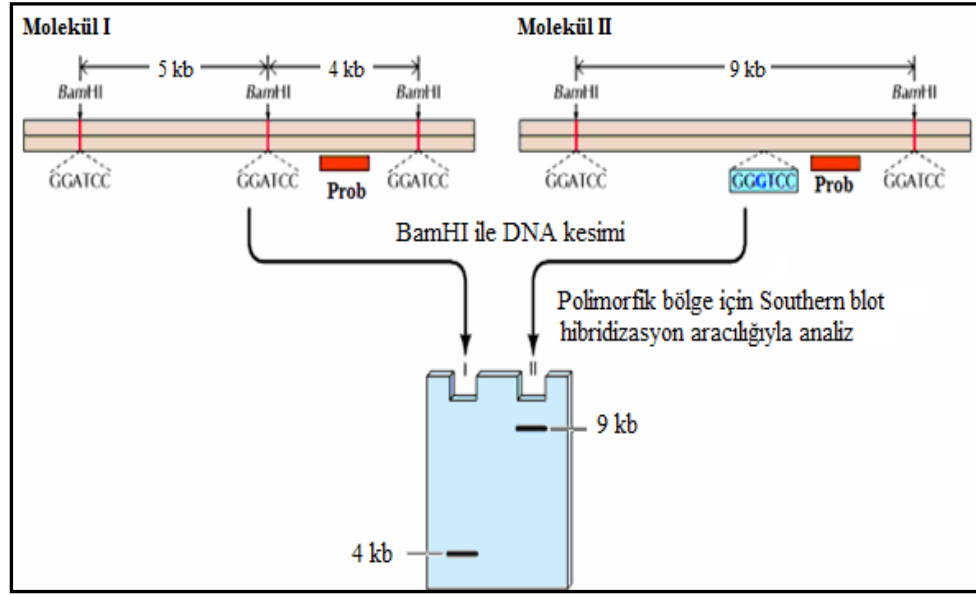
### 2.8.3. Moleküler Markırlar (DNA Markırları)

Organizma genomundaki herhangi bir gen bölgesi ya da gen bölgesi ile ilişkili DNA parçasını ifade eden, biyolojik etkileri olmayan ve nesilden nesile aktarılan DNA dizilerine moleküler markır denir (Semagn ve diğ., 2006). Genel olarak DNA'yı temel alan markır sistemleri, diğerk markır sistemlerinden (morfolojik ve biyokimyasal markırlar) daha etkilidirler. Moleküler markırlar tüm bitkide, doku ve hüresel düzeyde saptanabilmektedir. DNA markırları stabildirler, tüm dokularda ortaya çıkabilirler ve çevresel koşullardan etkilenmezler. Moleküler markırlar bazı tahıl yetiştirme programlarında lokusları ve genom bölgelerini araştırmada geniş çaplı olarak kullanılmaktadırlar. Bunlar başlıca tahıl türlerinde mevcut olan tarımsal özellikler ve hastalık dayanıklılığıyla sıkı ilişkilidirler (Phillips ve Vasil, 2001; Jain ve diğ., 2002; Gupta ve Varshney, 2004).

Moleküler markırlar, hibridizasyona dayalı, polimeraz zincir reaksiyonuna (Polymerase Chain Reaction) dayalı, DNA dizi ve çip (mikroarray) teknolojisine dayalı markırlar olarak üçe ayrılırlar.

#### 2.8.3.1. Hibridizasyona Dayalı Moleküler Markırlar

Bu yöntem, DNA/DNA veya DNA/RNA arasında melez moleküller oluşturulması esasına dayanmaktadır ve istenilen DNA parçalarının genomdaki yerlerinin belirlenmesini sağladığı gibi bu parçaların nukleotid dizilerinin araştırılmasında da kullanılmaktadır. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism - Kesilmiş Parça Uzunluk Polimorfizmi), hibridizasyona dayalı bir teknik olup, geliştirilen ilk moleküler markır yöntemidir (Şekil 2.17). İlk olarak 1975 yılında adeno-virüs serotipinde ısıya hassas mutantların genetik haritalanması için DNA dizi polimorfizminin belirlenmesinde kullanılmıştır (Grodzicker ve diğ., 1975). Ardından Botstein ve diğ. (1980) tarafından insan genomu çalışmalarında ve daha sonra bitki genomu ile yapılan çalışmalarda kullanılmıştır (Helentjaris ve diğ., 1986; Weber ve Helentjaris, 1989).

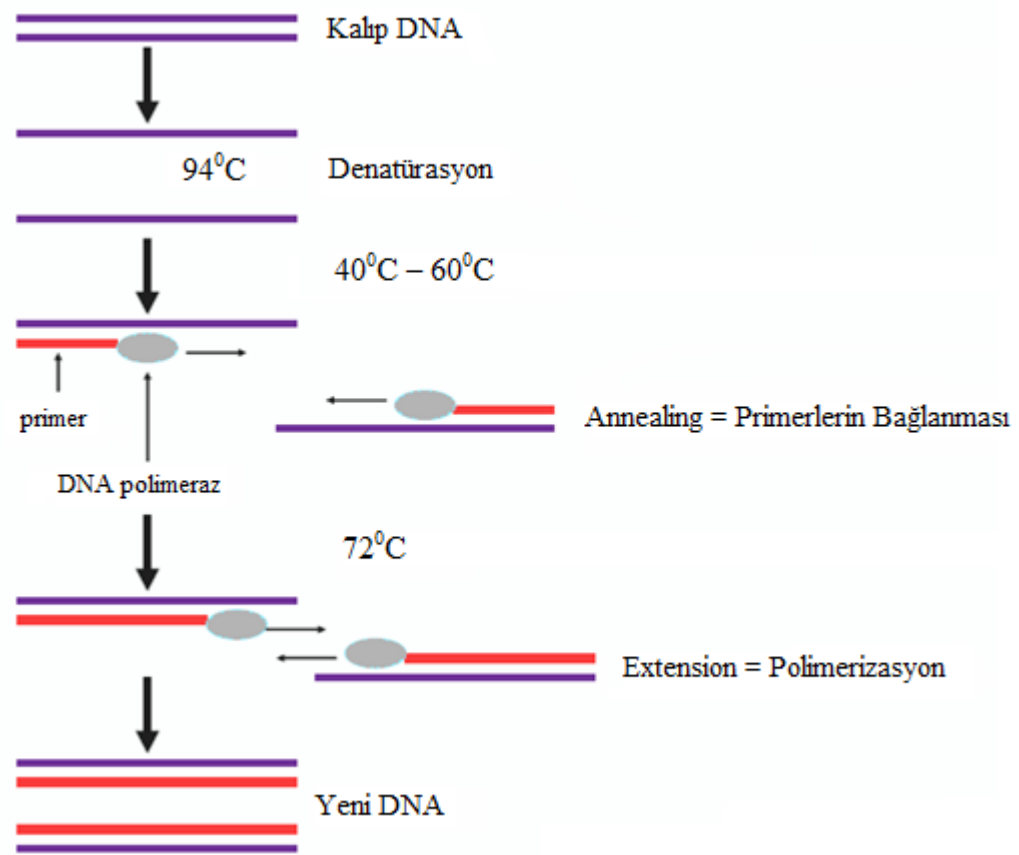


Şekil 2.17: RFLP markır sisteminin şematik gösterimi

RFLP tekniğinin yüksek tekrarlanabilirliği vardır ve kodominant kalıtım gösterir ancak bu özelliklerinin yanı sıra yüksek kalitede ve fazla miktarda DNA'ya ihtiyaç duymaları (Potter ve Jones, 1991; Roy ve diğ., 1992; Young ve diğ., 1992), uygulama açısından zorluğu ve otomasyon sıkıntısının olması gibi olumsuzluklarından dolayı PZR'ye dayalı RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA- rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) ve SSR (Simple Sequence Repeat) gibi markır sistemleri, gittikçe artan bir şekilde RFLP'nin yerini almaktadırlar.

#### 2.8.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Kullanımına Dayanan Moleküler Markırlar

Kary Mullis tarafından 1983'te geliştirilen bu teknik PZR temelli birçok tekniğin gelişmesine olanak sağlamıştır. PZR'nin temeli; hedef genetik materyalin, bir çift oligonükleotid primer, deoksिनükleotid trifosfatlar (dNTP'ler), tampon sistemi ve ısıya dayanıklı bir DNA polimeraz enzimi yardımıyla çoğaltılmasına dayanmaktadır (Şekil 2.18).



Şekil 2.18: PZR aşamalarının şematik gösterimi

PZR tekniği; DNA dizi analizi ve DNA haritalaması, DNA parmakizi çalışmaları, genetik haritalama, insan genom projesi araştırmaları, adli tıp, türler arasındaki polimorfizmin hesaplanması, evrim, bitkilerde tohum saflığının belirlenmesi, klonlama, genetik olarak değiştirilmiş organizmaların belirlenmesi, mutagenез çalışmaları ve gen anlatımlarının karşılaştırılmasında kullanılmaktadır.

PZR'ye dayalı yaygın olarak kullanılan markır sistemlerinden bazıları; SSR (Simple Sequence Repeat- basit dizi tekrarı, mikrosatellit), ISSR (Inter Simple Sequence Repeat- basit dizi tekrarları arası bölgeler), SRAP (Sequence-Related Amplified Polymorphism- dizi ilişkili çoğaltım polimorfizmi), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism- çoğaltılmış parça uzunluk polimorfizmi), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA- rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA) ve STS (Sequence Tagged Site- dizisi etiketlenmiş alan)'dir.

### 2.8.3.3. DNA Dizi ve Çip (Mikroarray) Teknolojisine Dayalı Moleküler Markırlar

DNA çipi (DNA mikroarray'i ya da biyoçip), binlerce genin anlatım düzeyini aynı anda izlemek amacı ile cam, plastik veya silikon çip gibi katı bir yüzeye tutturularak sıralı bir şekilde (array) oluşturulmuş mikroskobik DNA spotlarıdır. Bir mikroarray'de bu spotlardan onbinlerce bulunabilmektedir. DNA çiplerinin üretilmesinde, yarı-iletken endüstri teknolojisinde, allel-özümlü oligonükleotidler (Allele-Specific Oligonucleotides, ASO) olarak bilinen sentetik problara benzer DNA probları kullanılmaktadır. Son yıllarda ise *Arabidopsis* (Lin ve Wu., 2004), pirinç (Lan ve diğ., 2004), mısır (Wang ve diğ., 2003), çilek (Aharoni ve diğ., 2002) ve fasulye (Arimura ve diğ., 2000) gibi tarımsal açıdan önemli olan birçok bitkide, farklı koşullardaki gen anlatım profillerini belirlemek için mikroarray teknolojisi kullanılmaktadır.

Son yıllarda geliştirilen ve mikroarray hibridizasyonuna dayalı bir moleküler markır tekniği olan DArT (Diversity Array Technology) DNA çip teknolojisinin DNA polimorfizm teknolojisine uygulanması olan "high throughput" genom analizidir. Bu teknoloji, genom boyunca yayılan birkaç yüz polimorfik lokusun, eşzamanlı tiplenmesine imkan vermektedir (Jaccoud ve diğ., 2001; Wenzel ve diğ., 2004) ve bir popülasyondan veya bir organizmanın genomik DNA'sından kökenlenen özgün bir DNA parçasının varlığını veya miktarını ölçmektedir.

## 2.9. DAYANIKLILIK GEN ANALOGLARI

*Puccinia striiformis tritici* hastalık etmeninin neden olduğu sarı pas hastalığı buğday için önemli hastalıklardandır. Dirençli çeşitlerin geliştirilmesi sarı pasın kontrol altına alınabilmesi için en etkili, ekonomik ve çevreye duyarlı yoldur (Line ve Chen, 1995). Markıra dayalı seçimde doğrudan direnç genleri ile ilişkili markırlar bir gene bağlı markırlardan daha çok tercih edilmektedir. Bitki direnç genleri ile ilgili son çalışmalar ve moleküler markır teknikleri direnç genleri için doğrudan markırlar geliştirmeyi olanaklı hale getirmiştir. Patojenlere direnç kazandıran genler farklı türlerden klonlanmıştır. Klonlanan direnç genlerinde lösence zengin tekrarlar (LRR), nukleotid bağlanma bölgeleri (NBS) ve serin/treonin kinaz domainleri gibi ortak motiflerin varlığı belirlenerek diğer bitki türlerinde de benzer dizileri izole etme fırsatı yaratılmıştır. Bu motiflere dayanarak oluşturulan dejenere primerler ile dayanıklılık gen analogları

(RGA) (Resistance Gene Analog) olarak adlandırılan belirli genomik DNA dizileri çoğaltılabilmektedir. RGA uygulamaları bitki direnç genlerinin izole edilebilmesi ve moleküler markır geliştirilmesinde kullanılmaya başlanmıştır. Leister ve diğ. (1996) patatesten bilinen direnç genlerine homolog PZR ürünleri elde etmiştir. Aynı zamanda bu ürünler nematodlara ait direnç lokusu *Gro1* ve geç yanıklık direnç lokusu *R7* ile bağlantılıdır. Benzer olarak Kanazin ve diğ. (1996) soya fasulyesinde bilinen direnç genlerinin yanında çok sayıda RGA lokusu haritalamıştır. Yu ve diğ. (1996) soya fasulyesinde bilinen potivirüsler (*Rsv1* ve *Rpv*), "*Phytophthora* root rot" (*Rps1*, *Rps2*, ve *Rps3*) ve külleme hastalığı (powdery mildew) direnç genlerinin yakınındaki RGA'ları haritalamıştır. Feuillet ve diğ. (1997) yaprak pası dirençliliği için aday bir gen olan *LrK10*'u izole etmiştir. Bununla beraber çalışmalarda RGA'lar agaroz jel elektroforezi kullanılarak belirlenmiştir ve bunun sonucunda DNA parçalarında tek bant açısından yüksek çeşitlilik gözlenmiştir. RGA'lar RFLP analizlerinde prob olarak kullanılarak polimorfik markırlar elde edilmiştir. Chen ve diğ. (1998) yüksek çözünürlükte elektroforez kullanarak ve PZR ürünlerinin hassas olarak ayırımını yapabilmek için klonlanmış direnç genlerinin korunmuş bölgelerinden kökenlenen primerler kullanarak RGA uygulamasını geliştirmişlerdir. Daha sonra bu teknik direnç gen analog polimorfizmi (RGAP) (Resistance Gene-Analog Polymorphism) olarak adlandırılmıştır (Chen ve diğ., 1998). RGAP tekniği buğdayda sarı pasa karşı direnç genleri, sarı pas, yaprak pası, yanık, leke, arpa sarı cüceliği ve arpa baş yanıklığına direnç sağlayan genler için başarılı bir şekilde moleküler markırlar geliştirmiştir (Chen ve diğ., 1998; Toojinda ve diğ., 2000; Shiz ve diğ., 2001).

## 2.10. ANLATIM YAPAN İŞARETLENMİŞ DİZİLER

Anlatım yapan işaretlenmiş diziler (EST) (expressed sequence tag) teknolojisi klasik genetik uygulamalar ile çalışılması zor olan organizmalardaki genlerin belirlenmesi için kullanılmaktadır (Gueguen ve diğ., 2003). Son zamanlarda, *P. triticina*'yı da içeren çeşitli mantar türlerine ait EST kitaplıkları oluşturulmuştur ve büyük olasılıkla birçoğu *P. striiformis* mantarıyla yakın ilişkilidir. EST'ler mRNA kökenli gen dizilerinin etiketlemesi ile oluşan 200-700 baz çiftlik kısa cDNA dizileridir (Adams ve diğ., 1991). 50'den fazla bitki türü için EST ve cDNA dizileri kullanılabilir durumdadır. Bitkiler arasında ise buğday genel veritabanlarında en geniş EST koleksiyonuna sahip bitkidir.

Buğday için EST veritabanlarında toplam 23.000 uni-geni kapsayan 38 farklı kitaplıktan toplam 1.071.054 EST bulunmaktadır. EST analizleri kromozomal bölgelerdeki birçok genin analiz edilmesi ve yeni genlerin belirlenmesi, farklı organ ve dokulardaki gen anlatımlarının araştırılmasında etkili bir yöntemdir (Wang ve diğ., 2006). Bitkilerde biyolojik fonksiyona ait genlerin tanımlanmasında EST'lerden gelen verilerin yorumlanması yaygın olarak kullanılan bir uygulama haline gelmektedir (Gueguen ve diğ., 2003). Özellikle çeşitli biyotik ve abiyotik strese cevap olarak farklı gelişimsel evrelerin EST'lerini içeren kitaplıkların kullanımı yaygınlaşmaktadır (Randhawa, 2004). Gen bölgelerini belirleyebilmek için *Puccinia striiformis* sp. *tritici* uygulanmış *Triticum aestivum* cDNA kitaplığı kontig haritaları oluşturmak için kullanılabilir (Ling ve diğ., 2007). EST'ler hedeflenen organizmadaki genomik çalışmalar için gen dizi bilgisi sağlamaktadır (Rudd, 2003).

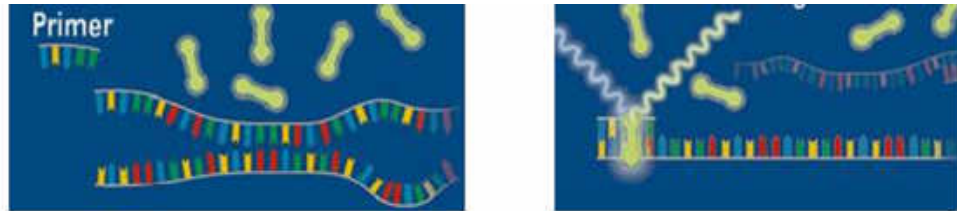
## 2.11. GEN ANLATIM ANALİZLERİ

Polimeraz zincir reaksiyonu DNA zincirinin önceden belirlenen bir bölgesini çoğaltmak için günümüzde sıklıkla kullanılan teknolojilerden biridir. Son yıllarda PZR reaksiyonlarında kullanılan cihazların (thermocycler) hassas ölçüm aletleriyle birleştirilmesi, real-time PZR (gerçek zamanlı PZR) olarak adlandırılan yeni bir yöntemin gelişmesine neden olmuştur. Bu yöntem sayesinde DNA ve RNA örnekleri kalitatif ve kantitatif olarak kısa sürede analiz edilebilmekte, çok sayıda örnek ile son derece az kontaminasyon riskiyle güvenle çalışılabilmektedir.

Real-time PZR'de ürünlerin analizi reaksiyon sırasında yapılmaktadır. Ürünlerin kalitatif ve kantitatif analizlerinde, diziye özgün olmayan floresan boyalardan ya da diziye özgün problemlardan yararlanılmaktadır. Kantitatif PZR olarak da özetlenebilen teknik temel olarak; her PZR döngüsü sonunda üretilen DNA miktarıyla orantılı olarak yükselen floresan sinyalin ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Floresan ışımaya ortamda bulunan ve çalışma prensiplerine bağlı olarak farklılık gösteren floresan işaretleyiciler yardımıyla sağlanmaktadır. Böylece kantitatif ölçüm, tekniğin adından da anlaşılacağı üzere, her döngüde gerçek zamanlı olarak yapılabilmektedir.

Bazı cihazlarda 384 örnek analizi yapılabilmesi çok uygulamalı çalışmalarda zaman kazandırmaktadır. Bu teknik, DNA ve RNA'nın çok hassas bir şekilde belirlenmesini dolayısıyla az miktarda başlangıç materyaliyle çalışılmasını veya çok sayıda gen anlatımının sınırlı RNA örneklerinde belirlenmesine olanak vermektedir. Sistemin belirleyiciliği, hedef dizilerin bu dizilere özel sentezlenmiş oligonükleotidlerle belirlenmesiyle sağlanırken, elde edilen ürün, reaksiyon sonrasında jel elektroforezi, ürün erime grafikleri ve dizi analizi yöntemleriyle doğrulanabilmektedir. Sistemin en tercih edilen özelliği hassas kantitatif ölçüm imkanı vermesidir.

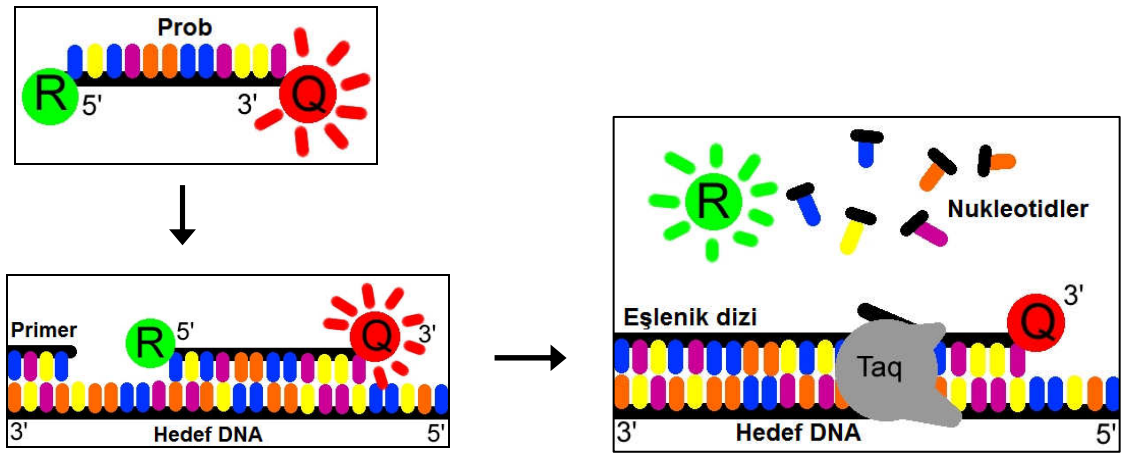
Real-time PZR teknolojisi temel olarak, reaksiyon sonunda ortaya çıkan ürünün floresans ışımaya bağlı olarak miktarının belirlenmesi esasına dayanmaktadır. Günümüzde bu amaçla kullanılmakta olan dört farklı teknoloji bulunmaktadır. Bunlar Taqman®, Molecular Beacons, Scorpions® ve SYBR® Green'dir. SYBR Green diğerlerinden farklı olarak floresan ışımaya veren bir boya olup reaksiyon karışımına doğrudan eklenir ve primerlerin bağlanmasıyla gerçekleşen uzama aşamasında hedef DNA'nın çift sarmal hale gelmesiyle DNA'ya bağlanan SYBR green miktarı artmakta ve buna bağlı olarak yayılan floresan miktarında da artış gözlenmektedir. Fakat bu uygulamada floresan artışı her zaman özgün bir çoğalmayı göstermeyebilir. Çünkü, ortamda hedef DNA olmadığı ve primerlerin birbirleriyle dimer yapmaları durumunda da SYBR-green ışımaya verebilmektedir. Bu olumsuzluğu gidermek için, PZR sonrasında primer setleriyle elde edilen ürünlerin erime eğrilerinin ( $T_m$ ; çift sarmal DNA'nın %50'sinin tek sarmal hale gelmesi için gerekli sıcaklık) analizi, reaksiyon bitiminde ortam sıcaklığı yükseltilerek ve belirli aralıklarla floresans miktarı kaydedilerek belirlenir (Şekil 2.19).



Şekil 2.19: SYBR® Green kullanılarak gerçekleştirilen Real-time PZR aşamalarının şematik gösterimi



Diğer teknolojilerde ise hedefe özel, 5' ucunda reporter florokrom, 3' ucundan söndürücü florokrom bulunan proplar kullanılmaktadır. Bu proplar hedefe bağlı bulunmadıkları durumlarda "Förster Rezonans Enerji Transferi" (FRET) esasına göre sinyal oluşması söndürücü florokrom tarafından engellenmektedir. Örneğin Taqman sisteminde DNA polimerazın 5'→3'nükleaz aktivitesi kullanılarak prob 5' ucundan yıkılarak reporter florokrom serbest kalır ve sinyal oluşur. Çoğaltım devam ettiği sürece yıkılan prob miktarına bağlı olarak sinyal miktarı da artmaktadır (Şekil 2.20).




Şekil 2.20: Taqman® probu kullanılarak gerçekleştirilen Real-time PZR aşamalarının şematik gösterimi (<http://home.cc.umanitoba.ca>)

### 3. MALZEME VE YÖNTEM

#### 3.1. BİTKİ MATERYALİ




Bu çalışmada kışlık ekmeclik buğdayda (*Triticum aestivum* L.) biyotrofik bir mantar olan *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*'nin neden olduğu sarı pas hastalığına dayanıklılığın moleküler markırlar ile araştırılması için Anadolu Tarımsal Araştırma Enstitüsünün tescil ettirdiği dayanıklı (PI178383, İzgi2001 ve Sönmez2001) ve hassas (Harmankaya 99, Aydın98 ve ES14) çeşitler anaç olarak kullanıldı. Bu çeşitler TÜBİTAK Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü serasında yetiştirildi.

Anadolu Tarımsal Araştırma Enstitüsü (ATAE) tarafından oluşturulan PI178383 x Harmankaya99, İzgi2001 x ES14 ve Sönmez2001 x Aydın98 kombinasyonlarına ait F<sub>2</sub> populasyonları Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü (TARM) tarafından fide ve ergin dönem dayanıklılığı için sera ve tarlaya ekildi. Sarı pas inokulumu ile inokulasyon sonrası pas okuma değerlerine göre en dayanıklı ve en hassas olarak belirlenen F<sub>2</sub> bireyleri bu tez çalışmasında materyal olarak kullanıldı. Buğday (*Triticum* spp.) bitkisinin sistematikteki yeri şekil 3.1 de gösterilmiştir.




Alem	: Plantae	
Şube	: Angiospermeae	
Sınıf	: Monocotyledoneae	
Takım	: Poales	
Familya	: Graminea	
Alt familya	: Pooideae	
Cins	: <i>Triticum</i>	
Tür	: <i>Triticum aestivum</i> L.	

Şekil 3. 1: Buğday (*Triticum* spp.) bitkisinin sistematikteki yeri

Tablo 3. 1: Çalışmada kullanılan buğday çeşitleri ve özellikleri

<b>ÇALIŞMADA KULLANILAN DAYANIKLI BUĞDAY ÇEŞİTLERİ</b>	
<b>ÇEŞİTLER</b>	<b>ÖZELLİKLERİ</b>
<p><b>PI178383</b></p> 	<p>Kılçıklı, başağı kahverengi, beyaz taneli, orta boylu kışlık ekmeklik buğday çeşididir. Kışa dayanıklı, yatmaya duyarlı ve orta erkencidir. TMBMV (Toprak Menşeli Buğday Mozaik Virüs), sarı pas ve kara pasa dayanıklı, kahverengi pasa ise hassas bir çeşittir.</p>
<p><b>İZGİ2001</b></p> 	<p>Kılçıklı, beyaz renkli başak ve tanelere sahip olan yaklaşık 95–105 cm boyunda kışlık ekmeklik buğday çeşididir. Kışa dayanıklılığı iyi ve kardeşlenmesi orta veya yüksek orandadır. Kuru koşullara önerilen bu çeşit, yatmaya dayanıklı ve erkencidir. Verim özellikleri oldukça iyidir (300–500 kg/da). Protein oranı orta derecede olan çeşidin bin tane ağırlığı 34–35 gr; hektolitre ağırlığı 79–81 kg, sedimentasyon değeri 30–40 arasındadır. Sarı pasa, sürmeye ve راستیға karşı dayanıklıdır. Orta Anadolu ve geçit bölgelerinin taban ve yarı taban yerlerinde yetiştirilmesi tavsiye edilir (<a href="http://www.ataem.gov.tr">http://www.ataem.gov.tr</a>).</p>
<p><b>SÖNMEZ2001</b></p> 	<p>İri, beyaz renkli ve kılçıksız başak tipine sahip, kırmızı sert taneli kışlık ekmeklik buğday çeşididir. Boyu yaklaşık olarak 100–110 cm arasındadır. Erkenci ve yatmaya dayanıklıdır. Kardeşlenme düzeyi orta olup iyi şartlarda artmaktadır. Sap verimi yüksektir. Verim düzeyi kuruda 250 kg/da ve iyi şartlarda 600 kg/da' a ulaşmaktadır. Gübrelemeye karşı tepkisi oldukça iyidir. 1000 tane ağırlığı 38–44 g, hektolitre ağırlığı 80–84 kg, protein %12–14, mikro SDS sedimentasyonu 14–16 ml, stabilite 5–10 dakika gelişme süresi 3–6 dakika ve yumuşama derecesi 120–150 BU'dır. Doğal epidemik koşullarında bölgenin en önemli hastalığı olan sarı pas, kahverengi pas, sürme ve راستیға dayanıklıdır (<a href="http://www.ataem.gov.tr">http://www.ataem.gov.tr</a>).</p>

Tablo 3.1'in devamı

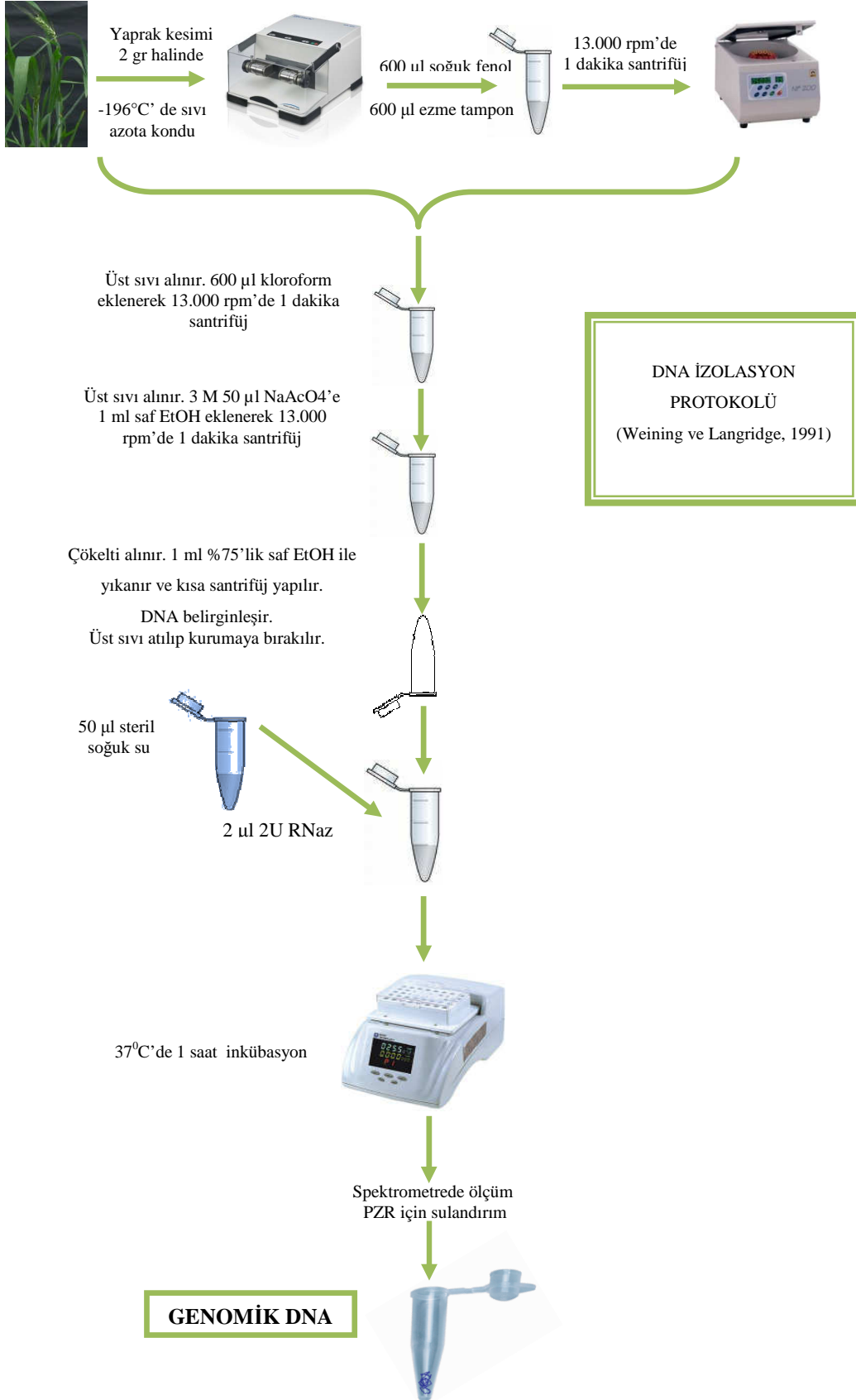
ÇALIŞMADA KULLANILAN DUYARLI BUĞDAY ÇEŞİTLERİ	
ÇEŞİTLER	ÖZELLİKLERİ
<p><b>HARMANKAYA99</b></p> 	<p>Kılçıklı, beyaz başaklı, kırmızı orta sert taneli, 90–100 cm boyunda ve kışa dayanıklılığı oldukça iyi olan bir buğday çeşididir. 1993–1998 yılları 6 yıllık ortalama verimi 350 kg/da olan çeşit, yağışın iyi olduğu 1998 yılında 550 kg/da'a kadar çıkmıştır. Hektolitre ağırlığı 81 kg, bin tane ağırlığı 34 gr, tanede protein oranı %13 olup ekmeklik kalitesi iyidir. Sürmeye dayanıklı, rastık ve paslara karşı duyarlıdır. Orta Anadolu ve geçit bölgelerinde taban yerlere ve yağışı biraz daha iyi olan veya bir kez takviye sulamanın yapılabileceği yerlerde yetiştirilmek üzere önerilmektedir (www.ziraatcim.net).</p>
<p><b>ES14</b></p> 	<p>Kılçıklı, kahverengi başaklı, orta sert beyaz taneli, 90–95 cm boyunda kışık ekmeklik buğday çeşididir. Kışa dayanıklılığı iyidir. İyi sulamayla verimi 700 kg/da'a kadar çıkmaktadır. Teknolojik özellikleri orta olan ES14'ün, bin tane ağırlığı 32 gr, tanede protein oranı %12 olup ekmeklik kalitesi orta derecededir. TMBMV(Toprak Menşeli Buğday Mozaik Virüs), rastık, sürme ve kahverengi pasa dayanıklı olan çeşit, sarı pas ve kara pasa duyarlıdır. Orta Anadolu ve geçit bölgeleri sulu alanlarında yetiştirilmek üzere önerilebilecek bir çeşittir.</p>
<p><b>AYTIN98</b></p> 	<p>Kahverengi başaklara sahip olan Aytın98, kılçıklı ve beyaz tanelidir. 100 - 105 cm boyundadır. İyi derecede kışa dayanıklıdır. Orta veya yüksek derecede kardeşlenme gösterir. Orta derecede erkenci ve yatmaya dayanıklıdır. Verim düzeyi kuruda 216 kg/da ve iyi şartlarda 631 kg/da'a kadar ulaşır. 1000 tane ağırlığı 32-34 gr, hektolitre ağırlığı 78-79 kg, protein %13-14 ve mikro SDS sedimentasyonu 35-45 ml'dir. Kahverengi pasa ve rastığa karşı dayanıklıdır (http://www.ataem.gov.tr).</p>

### 3.2. DNA İZOLASYONU

Bu çalışmada için buğday bitkisinin yaprakları kullanılarak Weining ve Langridge (1991) miniprep DNA izolasyon yönteminde bazı değişiklikler yapılarak genomik DNA izolasyonu gerçekleştirildi. Harmankaya99, PI178383, ES14, İzgi2001 anaç genotipleri ile PI178383 x Harmankaya99, İzgi2001 x ES14 ve Sönmez2001 x Aydın98 F<sub>2</sub> genotiplerine ait yaprak örnekleri sıvı azotta (-196 °C) donduruldu ve izolasyon yapılmaya kadar -80 °C’de saklamaya alındı. DNA izolasyonu için her bir yaprak örneğinden 0.2 g tartılarak “Retsh MM 301” model homojenizatör cihazı kullanılarak toz haline getirildi. Buzda tutularak soğutulmuş 2 ml’lik steril ependorf tüplere alınan homojenatın üzerine 600 µl ezme tamponu eklenerek parçalamaya devam edildi. Ortamdaki proteinleri uzaklaştırmak amacıyla üzerine 600 µl soğuk fenol eklenen tüpler, birkaç kere tersyüz edildikten sonra 13.000 rpm’de 1 dakika santrifüj edildi. Tüplerde oluşan üst sıvı dikkatlice çökeltiden ayrıldı. Üst faz yeni bir tüpe aktarılarak üzerine 600 µl kloroform eklenip iyice karıştırıldı ve tekrar 13.000 rpm’de 1 dakika süreyle santrifüj işleminden sonra oluşan üst sıvı yeni bir tüpe aktarıldı. Üzerine 3 M 50 µl soğuk sodyum asetat (NaAcO<sub>4</sub>) ve 1 ml soğuk saf etanol (EtOH) eklenen üst sıvı, yavaşça bir kaç kere karıştırılıp 13.000 rpm’de 1 dakika santrifüj edildi (Tablo 3.2). Oluşan üst sıvı atılarak dipte kalan çökelti 1 ml %75’lik soğuk saf etanol ile 2 defa yıkandı. Yıkama işleminden sonra DNA pelletinin belirginleştiği gözlemlendi. Üst sıvıları atılan tüpler filtre kağıdının üzerine ters çevrilerek oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Pellet kurduktan sonra pelletin miktarına göre yaklaşık 50 µl steril soğuk suda çözdürüldü. RNA’yı uzaklaştırmak amacıyla 2 µl 2U RNaz (RNase ONE Ribonuclease M4261 Promega) eklenen tüpler, 37 °C’de 1 saat inkübe edildi. PZR için sulandırılmaları yapılan genomik DNA örnekleri -20 °C’ de saklamaya alındı (Şekil 3.2).

Tablo 3.2 : Genomik DNA izolasyonunda kullanılan stok çözeltiler

Çözeltinin İsmi	İçeriği	Konsantrasyonu
Ezme Tamponu	Sarkozil	%2
	Tris-HCl pH 8.0	0.1 M
	EDTA pH 8.0	10 mM
Sodyum Asetat	NaOAc pH 4.8 (Glasiyel asetik asit ile)	3 M



Şekil 3. 2: DNA izolasyonunun şematik gösterimi

İzolasyon sonrasında, DNA miktarının belirlenmesi ve PZR’de kullanılmak üzere sulandırım oranlarının hesaplanması için DNA örnekleri 1/10 oranında sulandırıldı. NanoDrop1000 spektrofotometre cihazında (Şekil 3. 3) 260 nm dalga boyunda ölçüm yapılarak DNA konsantrasyonları belirlendi. Elde edilen ölçümler sonrasında, PZR’de kullanılmak üzere DNA miktarlarının 50 ng/µl olacak şekilde sulandırılmaları gerçekleştirildi.



Şekil 3. 3: NanoDrop1000 spektrofotometre cihazı (TÜBİTAK MAM, GMBE, Bitki Biyoteknolojisi Laboratuvarı)

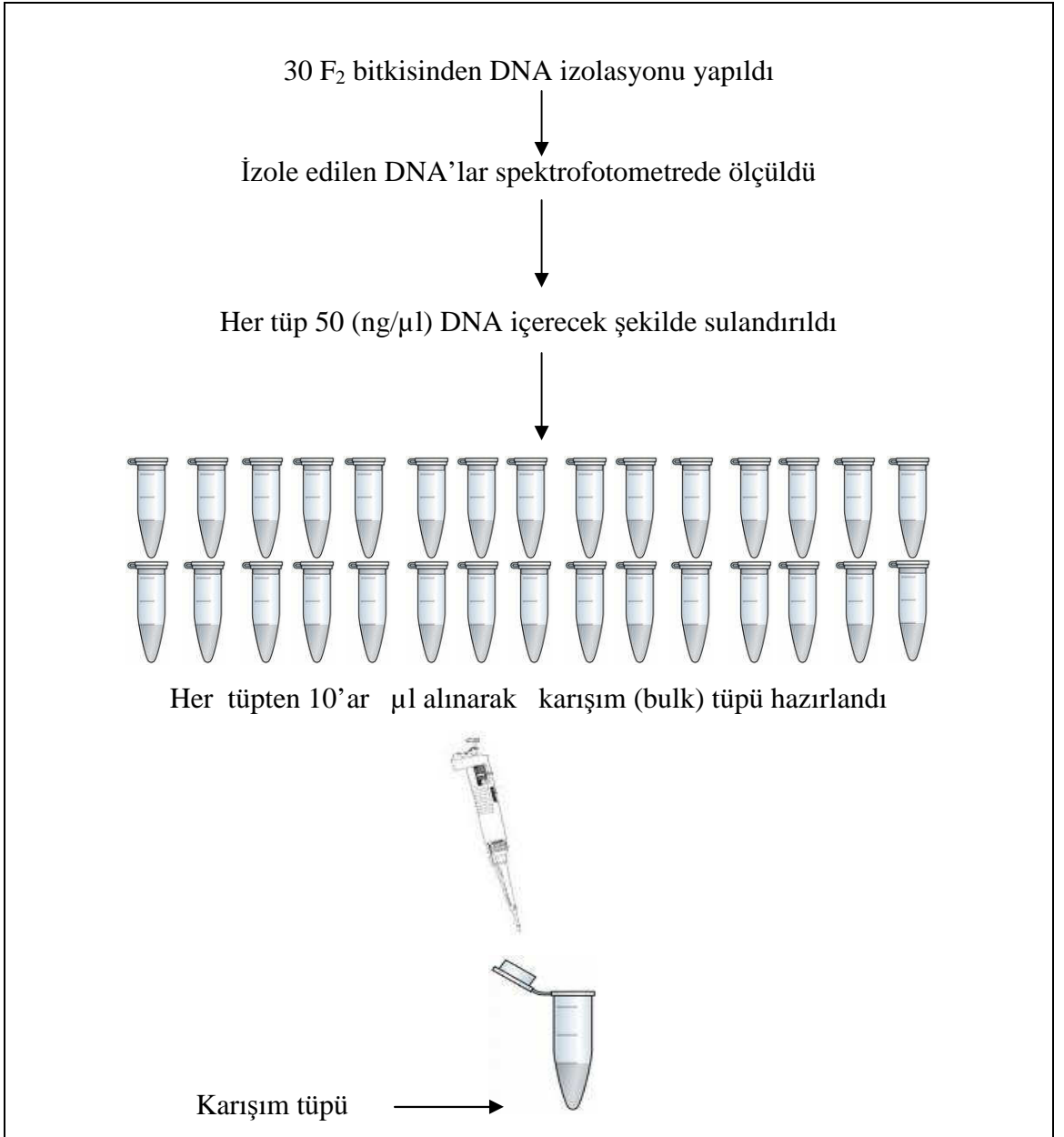
### 3.3. BULK SEGREGASYON ANALİZİ

Bulk Segregasyon Analizleri (BSA) için anaç çeşitlerin melezlenmesi sonucu elde edilen  $F_2$  populasyonundan en dayanıklı ve en hassas genotipler seçilerek, bu genotiplerden genomik DNA izolasyonları yapıldı. DNA’ların kendi aralarında eşit olarak karıştırılması sonucu hassas ve dayanıklı  $F_2$  DNA karışımları “bulk” oluşturuldu ve bu karışımlar anaç DNA örnekleriyle birlikte PZR analizlerinde kullanıldı.

#### 3.3.1. Bulk Segregasyon Analizlerinde Kullanılacak Genomik DNA Karışımlarının Hazırlanması

PI178383, Harmankaya99, İzgi2001, ES14, Sönmez2001 ve Aytın98 anaç bitkileri ile PI178383xHarmankaya99, İzgi2001xES14 ve Sönmez2001xAytın98 kombinasyonlarına ait  $F_2$  bitkileri moleküler çalışmalarda kullanıldılar. Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü tarafından yapılan pas okuma sonuçlarına göre belirlenen en dayanıklı ve en hassas  $F_2$  bitkileri sarı pas dayanıklılığı ile bağlantı gösteren moleküler markır eldesi için anaçlar ile beraber “bulk segregasyon” analizlerinde kullanıldılar. Ergin dönem dayanıklılığı için her kombinasyona ait 24’le 30 arası

bitkinin (dayanıklı ve hassas), fide dönemi dayanıklılığı için de her kombinasyona ait 24'le 30 arası bitkinin (dayanıklı ve hassas) yaprak dokularından genomik DNA izolasyonları yapıldı. İzole edilen DNA'lar NanoDrop1000 spektrofotometre cihazında 260 nm dalga boyunda ölçüldü ve her biri  $\mu\text{l}$ 'de 50 ng DNA olacak şekilde sulandırıldı. Her 30'lü ve 24'lü bitki grubuna ait DNA'lardan eşit hacimde ve final konsantrasyonu 50 ng/ $\mu\text{l}$  olacak şekilde hazırlanan DNA karışımları  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edildi. Anaç DNA'lar kullanılarak karışım (bulk) DNA'sının hazırlanışı aşağıdaki gibi özetlenebilir (Şekil 3.4).



Şekil 3. 4: Bulk Segregasyon Analizinde kullanılacak DNA karışımlarının (bulk) hazırlanışı



### 3.4. EST VERİTABANI ÇALIŞMALARI

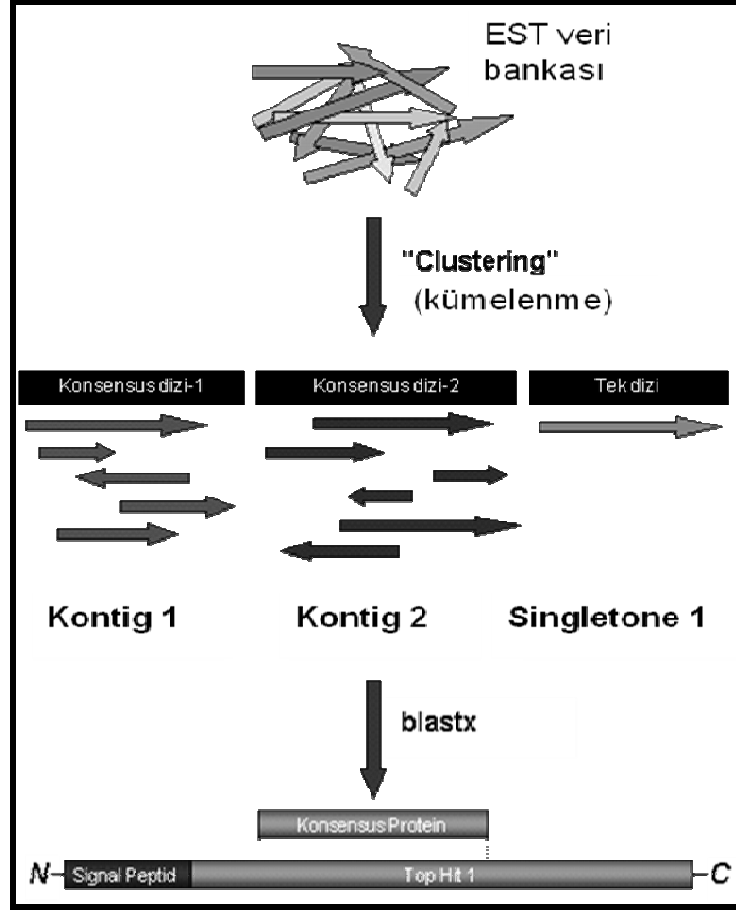
Sarı pas hastalığına dayanıklılığı sağlayacak moleküler markırların elde edilmesine yönelik olarak EST veri tabanı çalışmaları yapıldı. Aynı zamanda bu veriler genetik çeşitliliğin belirlenmesi çalışmalarında da kullanıldı. Sarı pasa dayanıklılık ile genetik bağlantı gösteren EST kökenli DNA markırları elde etmek amacıyla aşağıda detaylı olarak açıklanan işlemler yapılarak *Triticum aestivum*'a ait EST kökenli primerler tasarlandı. Graingenes (<http://wheat.pw.usda.gov>) veritabanından buğdayda sarı pas hastalığı ile ilişkili EST kütüphanesi belirlenerek, dokulara özgün olarak EST sayısı saptandı (Şekil 3. 5). Sarı pas uygulanmış *Triticum aestivum*'a ait EST'lerin genel yapısı Tablo 3. 3 de gösterilmiştir.

The screenshot shows the GrainGenes-SQL Query Resources interface. The search query is 'yellow rust' and the target is 'Library'. The results show a library named 'TA117G1X' with 1549 sequenced ESTs. A red box highlights this result, and a red arrow points to it. Below the result, there is a link to 'all library ESTs in FASTA format -> click here'. The details for the library are as follows:

name:	TA117G1X
genus:	Triticum
species:	aestivum
germplasm:	
tissue:	
stage:	
treatment:	yellow rust infested

Şekil 3.5: Sarı pas uygulanmış buğdaya ait EST kitaplığının belirlenmesi

EST'lerin vektör kontaminasyon taramaları NCBI'da yapılarak temizlendi. Kontaminasyonları temizlenen EST Dizileri "Vector NTI 10.0 Contamination Express" programında "Contig Express Modülü"ne aktarıldı ve EST'lerin birbirleriyle aynı olan bölgeleri bir araya getirildi. Elde edilen vektörden arındırılmış EST'lerin primer oluşturmak üzere kontig haritaları çıkartıldı (Şekil 3. 6).



Şekil 3.6: EST kitaplığı kullanılarak kontig ve singletonların elde edilmesi

Tüm EST'lerin "FASTA formatı"ndaki dizilerinin "BlastX analizleri" yapıldı. Kontig ve singletonlara karşılık gelen protein profilleri çıkarıldı. Bu çalışmalardan hareketle BlastX sonuçları her bir kontiğin eşleştiği organizma, eşleştiği protein, bu proteinlerin BLAST HIT'leri ve erişim numaraları başlıkları altında toplandı.

Tablo 3.3: Sarı pas uygulanmış *Triticum aestivum*'a ait EST'lerin genel yapısı

Sarı pas uygulanmış <i>Triticum aestivum</i> 'a ait ESTler	
<b>Kitaplık Adı</b>	TA117G1X
<b>Toplam EST sayısı</b>	1549
<b>Kontig Sayısı</b>	136
<b>Toplam kontig boyutu (bç)</b>	80241
<b>Kontigleri oluşturan EST sayısı</b>	560
<b>Singleton sayısı</b>	989 / %63.84
<b>Kontaminasyonlu EST sayısı</b>	16

### 3. 5. DNA DÜZEYİNDE GERÇEKLEŞTİRİLEN ÇALIŞMALAR

#### 3. 5. 1 Primer Tasarımı

Dokulara özgün olarak çıkarılan kontiglerden “sense” ve “antisense” yönünde primerler “Primer Premier 5” ve “Primer 3.0” programları kullanılarak tasarlandı (Tablo 3.4, Tablo 3.5) Bu primerler ile bu genlerin varlığı öncelikle PZR yöntemi kullanılarak anaçların total DNA’larında belirlendi.

Tablo 3.4 : PZR analizlerinde kullanılan kontig primerler

Primer	Dizi (5'-3')	Primer	Dizi (5'-3')
Kontig 1	F: ACA gAT AgA AgC Agg ACg AA R: AAg ggT TgA Agg AAT TAT TgT C	Kontig 58	F: ggg CAA gAA gAA ggA AgA gg R: TgA ggg TTA ggg AAg ggA gA
Kontig 8	F: CCT CCA CTT CgC TgC TCC CT R: gCT CCT ggT TgC CgT TCT CC	Kontig 63	F: CAg ggA ggT CgC AAg CAA R: TCA ACC CAA CgT ACg CAT
Kontig 9	F: CAA ACT CgA TAg ggA Tgg C R: gCT TgA TTT gCA TAT Tgg gAC	Kontig 65	F: gCT gCC TAT CTg CTT gCT T R: CCT TTC TCC Agg gAC CTT T
Kontig 12	F: ACg CAC ATC ggA CAC gC R: CAg CTC CCg gTT CTT gg	Kontig 66	F: gCg CAT CgT gAT ggA gCT R: Tgg gAg CCT TTg TTg TTg g
Kontig 17	F: gCC ACC TTC TCA gCC ACA R: TTC gCC ggA ACA CCA AAC	Kontig 73	F: CTg gTT TgC TAC TCC Tgg T R: Tgg CAT CCT TTg TTC TTT C
Kontig 19	F: gCg gCA ACT ggA AAT g R: AgC CCT TgA gCg gAg T	Kontig 75	F: gAg ATg gAC gAg ggA gTg AA R: ATg ggg TCT CCC TTg TTC TT
Kontig 21	F: gCC CTC AAg ATT TCA AgC Ag R: ggg TTT TCg gAC AgT TTT gA	Kontig 80	F: gCC AAg gAg TgA ggA Agg R: TCg ATT CAC ggA ggA gCA
Kontig 22	F: ggA CAC CgA TgA gCA CCA R: AAg TTg ggA ggT TTC Agg	Kontig 90	F: gAT TCg CAT CgC AgC ACA R: gCg gTT AAA CAg ACC CAg T
Kontig 24	F: ggT Tgg CTT CTC CTC CCC T R: CgA gCT TCC TTg CCg TTC A	Kontig 91	F: TTT Tgg TCC TTC ggT TTC g R: TCC TCC Tgg TgC ggT gA
Kontig 30	F: gTT gAT gAg gAC CTT gTT TC R: TTg TTC ggg ggT TTT ATT TT	Kontig 93	F: TTC AgC gAg CAC ggC AAA g R: gAC ACA Agg ATg gAT ggg A
Kontig 33	F: ATg TCC CTC TCC TCg ACC TT R: AgT ggA TCA CCT CgA gCT TC	Kontig 96	F: CTg CTg CTg CAA CAA gAT g R: gTT CCA ATg CCA CCA ATC T
Kontig 34	F: ACT TCC gCA gCC TgT ACC TT R: CCA ACA ATT AgC CCA CTC AC	Kontig 99	F: gCA TCT CCC CTC gAT TCC TA R: CgA CCC CgC TCT TCT CCT TC
Kontig 35	F: CAA Tgg CgT CCA CCT CCT gC R: AgT CCg gTg ATg gTC TTC TTg g	Kontig 105	F: CCg ATA ATA CAA TAC CAT R: TAC TCC TTT TTT gAC CTC
Kontig 39	F: ggT gTT CTA CCg CTC CAA R: gAC gCC CAT TAC CCT TTT	Kontig 110	F: CAT CTC gCT CCC CAC CTT R: TTT gCC CTT TgT TTg TTT
Kontig 40	F: ACC CAC TAT ACC CAg gAg gC R: TCA gAA Cgg gAA gAA gCA gA	Kontig 113	F: CAA AAA TAg CgT gCA Agg Tg R: TTg TTT CCA gTT Tgg TTg gA

Tablo 3.4 ün devamı

Kontig 46	F: gCA Agg Cgg TgA AgA ACg R: CCC TTT ggA CAg gAA CCC	Kontig 122	F: AgC AAg gTT ggC TTC gTC R: CCg AgA ATT AAC AgC Agg AC
Kontig 49	F: CTC gTg Ccg AAag ACA gAA A R: CCC TCC CTT Tgg TTg gTT	Kontig 133	F: CgT TAG CAg gAg CgA gTg R: gAg CAA ATC CAg CgA CCT
Kontig 52	F: TTg ggT TCA CAg ATT Tgg Agg R: gAA gCA ATT AAC Agg gAC ACg	Kontig 135	F: gCC gCA CAA gTT CTA CCA Cg R: ggA TTg ggA gTg ACg gTT CT
Kontig 55	F: gAg TAC CgC TgC TTC gTC R: CCA CCT CCg CCA CTg AA	Kontig 136	F: CAC CCA CTC CCA AAC CCT C R: gAT TTC AAg CAA gAA CCA A
Kontig 57	F: CAC ggT TTC CAg CAA gCA R: TTg gCg TTC Agg gTC CTC		

Tablo 3.5 : PZR analizlerinde kullanılan singleton primerler

Primer	Dizi (5'-3')	Primer	Dizi (5'-3')
CA598034	F: AgC CTA AAA AAA AgC ATA R: Agg AgT CCC gTC AAA AAA	CA598930	F: gTg gAC CAT gCA gAT CgA gg R: ggg ggC AAT TTT TAT TTT Ag
CA598174	F: gAC CAA gAA CCg TCT CAT C R: TCA AgT CTC ACA ACA TCA A	CA598143	F: gAT CAA gTg CTg CAA ggT gA R: TTg TTA TAA Cgg CgC ATC AA
CA598286	F: gTT CTC CgA CCT CCA CAC R: gTC ATC ATC TTC ATC CTT	CA599110	F: TCg gCT ACC ACC gTC gCA CC R: ACC CTC AAT Cgg CCA CAC CT
CA598347	F: ggA ACg CAC CTC CTC CCC TC R: CCA gTC CCg gCA CCT TTg AA	CA599107	F: Agg ACA CCA CgA gCA TC R: CCC CTT ggg AAC AgC Ag
CA598432	F: CgC TgA AgA gAA gAA ggA R: CgC ATA ggA ggA ACC CAC	CA599218	F: CCT CCT CTC CTC CgA TAA TA R: ACA TAG gCA gCT TTC CCA CA
CA598523	F: ggA ggA ggA gAg Cgg Cgg C R: ATA TCC CAg gAg TgA ACg g	CA598196	F: ggT CgT TTC gCT CTC CCC R: ATT TCT CCT CAg CTg gTT
CA598719	F: gCC TCA TCC CCC TCC TCC Gc R: CgA TTC gCT CTT gCT TCC AC	CA599282	F: gCg TAG TTC AAg Tgg ggg R: AAA AAT CAT TTA ggg ggg
CA598762	F: ACg gCg ggA Tgg ggg Agg R: TTT gCT Tgg gAC gAT gAA	CA598296	F: gCA CTg CTg gTg gAg ATg R: gTT Cgg ACg gAT TgA ggC
CA599271	F: TCg gCA CgA ggg TAA gAA g R: AgT TTg gAg CAA Cgg gAg T	CA598421	F: CTC CTC TCC TCC gAT AAT A R: TTg ACC TTC CCT CCC ACC T
CA598802	F: gCT CgT CCT CAA CAT CTC R: TTT CAC CTT CAg gCC ACT	CA598485	F: ACC gTT gCT gAC gCT gCC R: CCC CCA TTg TTC CCC ATT
CA598725	F: CAg CgA TAT gCT CgT ATT gg R: CTC TCA ATT CCT Cgg CAA TC	CA598584	F: CCC CTg Agg TgA TTg CTg R: TCg CCC TTg TAG gTg CCA
CA599103	F: TgT CgT CTg CgT ATT ggT g R: Cgg ACT Tgg TgA CTT gCT A	CA598818	F: TCC TTg CTg CCT gCT ACA R: TCC TCC ATT CTC Cgg TTC
CA598961	F: ggA ggA AAA gAg gAA ggA R: TCA AAT gAg TgT CgC AgA	CA598677	F: CgA CTA CCT TAT CCg CTC C R: ggg TTA CTC CCT TTT TTg A
CA598949	F: gTT TgT gAg CgA Tgg CgT TT R: ATT gAC TTC AgC CTT Tgg gg	CA598518	F: TCg gCA CgA ggg AgA AgC R: ATC ggA Agg Agg TAA AAC

Tablo 3.5'in devamı

CA597765	F: TgA TTT CCT TTA TgC TTg Tg R: gCT TgT TgC TTg gTg ggg Tg	CA598700	F: gAC TCC ATA CAA TCC CCA R: gCA CCC gTT TTT CCA CAT
CA598239	F: ATT CAA CAT CCT CAA CAA R: gAA ACC CCC AAg gCA CCA	CA598975	F: CgC AgT TAg CCA gAg AgA R: ggA gTT Tgg AgA gCA CgT
CA598314	F: ATg gCg TCC ACC TCC TgC TT R: ggT Tgg TCg ggg TTT gAT TA	CA598244	F: ggA gAT ggT Tgg TTg TgT T R: CCA ggg gTT gTT ggT AAA T
CA598577	F: CgA CCT gCC CTA CTC TTg C R: AAC CCA CCT TgC CTC CAT T	CA599101	F: CgT CgT CgC CAC AAg AgT T R: CgC CCg TgT TCC CCA gAT T
CA599238	F: ggC gTC CAC CTC CTg CTT CC R: TTg TTg TTg ggg TTT gAT TA	CA597808	F: CAC CTT CCT CCC TTC CTC CT R: CAT CTT TgT TgA CCC TCC TT
CA598919	F: TAC TgA TTC TTg TgT CTT A R: CAC CCT TTA TCT ACT TTT A	CA598837	F: gAg AgT gAg gAg TgA gAA gA R: AAA gCA TTA ggg ATT ggA TA
CA598848	F: CCA gAT TTC CTT CCC CAT R: CAg CAC CAg CAg CAg CCC	CA598850	F: ACg CCC AgC CCT CAC AAg A R: ACg gAC CCA CAC ACA AgC A
CA599257	F: TgT TCT CAA CCT CCC CTC C R: CAA CgT ACT CAg CAC CCA g	CA599262	F: CCC ACC CAC TCC CAA ACC CT R: CCg gCC AgC TCC AgC ACC TC
CA597851	F: TTT ggA ggC ggC AgA gTA R: gTC ggT gAA ggg CgT ggT	CA598020	F: gTC ACA TCA TCT TCT CCC T R: TCC CCA ACA TCA ACT CCg T
CA598130	F: CTg ggA ggT ggT gTg TgA Tg R: ACT TTT TTg gTT gAg ggg AA	CA598235	F: gCg AgA Agg AAC AgC AAg R: TTA gAC ggA CCA CgA Agg
CA598258	F: CTC TCC CCC CCT CCC CAg R: gAg TTC ACC CCC gCC CCg	CA598359	F: CCC TgC TgA AAT CAT TgT R: TAg TTg TCg gAg CTC TTg
CA598637	F: CAC CTC gTg AgT CCT CgT Cg R: TgC ggg TCT TCT TgT TgT CC	CA598674	F: AAg gTg CTg gAg gTC TAC R: AAT CAC ggC TTC TTg ggA
CA599135	F: AAg gCg AAg AAg CCA ggT TT R: Tgg ATT ggA ggA TTg ggg AA	CA599114	F: CCg Tgg TCg TCC TCg gCg Tg R: ggC AAT TAC Cgg ggg AAA CT
CA599099	F: CTC ggA ggT gAg CgA AAA T R: gAC CCC CCC gTT gAg AAg C	CA599049	F: ATT CTg CTC TgC TCC TCC R: CAg TTC gTC ACg ggT TTg
CA599032	F: gCC gAT CCA TTC ATC CCg A R: AgC AgT TgC CCC ACC CAg T	CA599013	F: TgA ACA AAg gAg ACA Cgg T R: TAT TgA TTg gAT TAA ggC C
CA598962	F: CAg ggA Cgg TgA CTg TgC C R: AAT gTC gTT TgC ggT TgT A	CA598940	F: gAC gCT CAA gCC CCC Ag R: Agg TTT gTT TgC CCA TA
CA599166	F: Agg gCT CCT ATg CTT CgC R: gTT gTA CgC CgC TTg gTC	CA599172	F: gCA gCC gAC ggT gAA gAt R: gAg ggC gTT gAA gTT TgA gTA g
CA597830	F: CgT gAg AAC AgC gAA gCg R: gAT TgA TgC gAA CAT Agg C	CA597983	F: TCA CgC ACT ACC TCA CCC R: CCC TTC CAg TAC CCT TTC T
CA598102	F: ggC ACA gAC CCT AAC CAC R: gAg TAC ATT CAC ggA gAC g	CA598181	F: CAC CCC gCA ggA CTT CgT R: TTT ATT TCC AgT TgA TTA
CA598187	F: TAg TAT TCT CCC CgC CAC R: CAT CCT TTA ATT TTT TCA	CA598128	F: gCC TTC TTg AAC CAT CCT g R: gCT TTg AAA TTT ggC gCC C
CA598256	F: ggg CAT TgT TgA CTC TgA R: TTg TTC TCg gCA ATC TCA	CA598366	F: CCC gTg gCA gTC AAg ATg R: TTg AAg CCC AAC Agg ATg

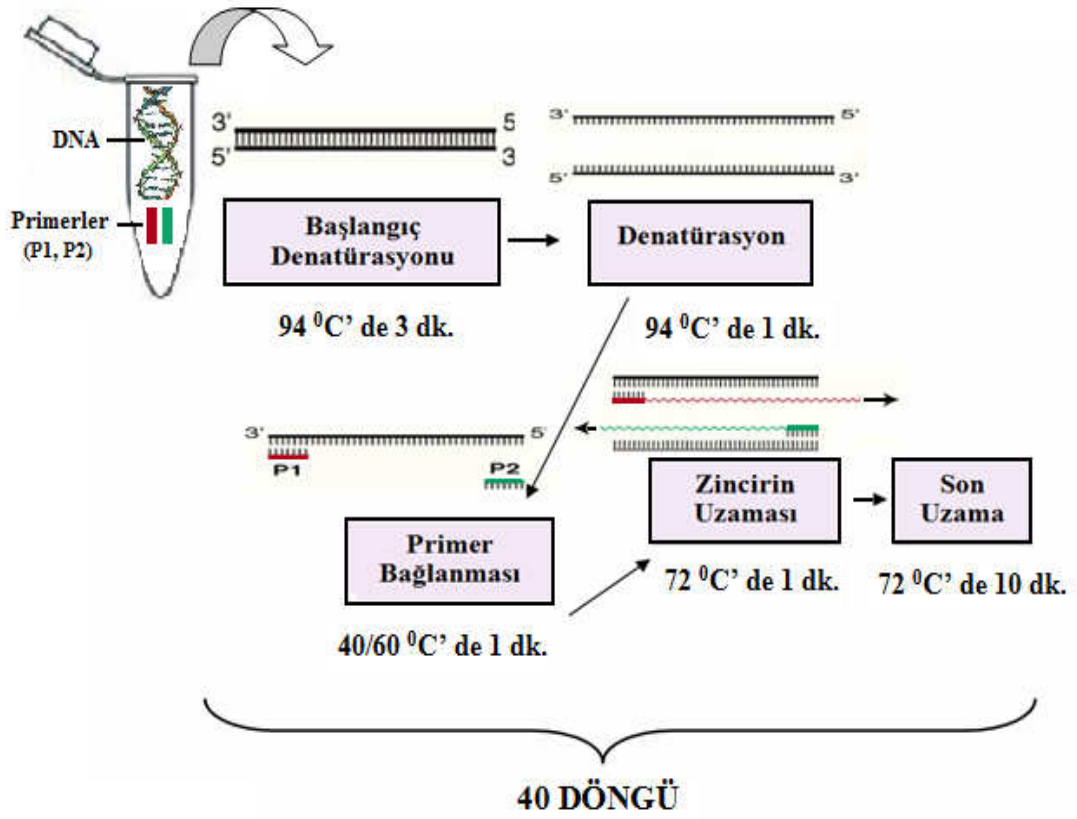
Tablo 3.5'in devamı

CA598422	F: CAC gAg TgA AgT gAg AgC R: TAT TTT ATT TTA ggC ggA	CA598476	F: ATT TCC CgA AgT TAg gCg R: CTC AAg ggC TgT AAg gTg
CA598630	F: CAA AgC AAA TCC CAC AAT R: TgA ggC gTA ACA TCC AAg	CA598687	F: gAg CAA gTT TAg gAg CgA CCA A R: ATg TAC ggg AAg gCg gAg C
CA598694	F: AAT gTC Tgg CTg ggT TCA R: TCA gTC TTT CTT Tgg Tgg C	CA599121	F: AAA CAA CCA TgA AgA ACA CC R: CAC ATC TAC gCA CAA AAA Cg
CA598966	F: ggC TgT TTg AgA ATg gAC gg R: CTT Tgg TTT Tgg AgC ggg TT	CA598941	F: CAT CAC CAA ggA ggA CA R: AAA gAA Cgg gAA gAg CC
CA597760	F: gTg CTg gCg ATg gTg CTC R: gCC gTT Cgg ggT TgT TgT	CA598151	F: gCg AgC CCT CCA CCA CAA R: Cgg CAA AgT AAT CAA TCA
CA598557	F: ATg ggg AAg AAg CAg gTg g R: TTg gTT TgA ACA Agg AAg A	CA598672	F: CAg Tgg gTg TCA ggA gTC T R: TgT gTT gTg TTg TgT TgT T
CA598691	F: AAg CCg AAg CAC TAg ATC C R: ACA TTC CAg AAA AAC ACg A	CA598755	F: AgC AAg CAA gCC gAA gCA CT R: Cgg gAA Agg AAA ACg gAg gA
CA599273	F: gCA gCT CCA gCg gCg CAg gC R: gCg gTg TAg gTg gTA Agg gT	CA599285	F: gCT CAC CAC CAC TAC TA R: ggA TgC CCg Cgg CCT TC
CA599115	F: CgT gCg ggC Agg Tgg ACT R: TgA CAT gCT gAT ggg gAA	CA599235	F: gAT ggC Tgg gCT ACT CTC T R: TTT ggA CCC CCg AAT TTT g
CA599277	F: gCT TTT TTC CCC TTC CTC Cg R: gCC CCT TTg AAT CAA TgT CC	CA598980	F: ATg AAC TgC TTC TgC TCC T R: TAg ATT TCg TAC TCT Tgg g
CA599015	F: CCA TAT CCT CTC CCA AgC R: TCC CAC CCA TTC TCA AAC	CA599119	F: CTC CCC AAA gCC CTA ACC R: AgC CAg gAA ggC gAA gAA g

### 3.5.2. EST Kökenli Primerler ile Gerçekleştirilen PZR Analizleri

Çalışmada 39 adet EST (Expressed Sequence Tag) (Anlatım Yapan İşaretlenmiş Diziler) kökenli kontig ve 92 adet EST kökenli singleton primer çifti ile anaç bitkiler (PI178383, Harmanakaya99, İzgi2001, ES14, Sönmez2001 ve Aytın98) kullanılarak PZR analizleri gerçekleştirildi (Şekil 3.7).

PZR uygulamasında 0.2 ml'lik tüpler kullanıldı ve "Eppendorf Mastercycler Gradient" cihazında 25 µl hacimde çoğaltım gerçekleştirildi. Her genotip için tüplerdeki son konsantrasyon 1 X Taq Buffer (MBI Fermentas, Germany), 2.5 mM MgCl<sub>2</sub> (MBI Fermentas, Germany), 0.2 mM dNTP (MBI Fermentas, Germany), 400 nM ileri primer, 400 nM geri primer ve 0.625 U/µl Taq polimeraz (MBI Fermentas, Germany) ve 100 ng DNA olacak şekilde karışım hazırlandı.



Şekil 3.7: Polimeraz zincir reaksiyonunun şematik gösterimi

### 3.5.3. Buğdaya Ait RGA Dizilerinin Belirlenmesi

Buğdaya ait NBS-LRR sınıfına ait iki NBS bölgesinden kökenlenen ve buğdaya ait NBS (nukleotid bağlanma bölgesi) içeren 77 RGA-EST dizisi mantar hastalığına dayanıklılık ile ilişkili markır eldesi ve anaçlar arasında genetik uzaklık çalışmaları için kullanıldı. Bu amaçla buğdaya ait RGA-EST dizilerinin (Tablo 3.6) vektör kontaminasyon taramaları NCBI’da yapılarak temizlendi. 15 RGA-EST dizisinde kontaminasyon belirlendi. Kontaminasyonları temizlenen “EST” dizilerinden “sense” ve “antisense” yönünde primerler “Primer Premier 5” ve “Primer 3.0” programları kullanılarak tasarlandı (Tablo 3.7). Bu primerler aracılığıyla bu genlerin varlığı öncelikle PZR yöntemi kullanılarak anaçların total DNA’larında belirlendi.

Tablo 3.6: Çalışmada kullanılan buğdaya ait RGA dizilerinin gen bankası erişim numaraları

<b>Buğdaya ait RGA dizileri gen bankası erişim numarası</b>		
BE400250	CA606728	CA617198
BE405711	CA610289	BM134978
BE498831	CA652512	BU099584
BE499177	CA662188	CA736742
BE500158	CA662651	CA740494
BF482358	CA676926	CA724373
BJ255861	CA679534	CA498317
BJ258770	CA681703	CA696482
BJ269157	CA725884	BJ213107
BJ270203	CA726158	BJ316279
BJ272146	CA733486	BJ277253
BJ286558	CA741642	BQ743300
BJ295708	CA742788	BF484437
BJ300496	CA742849	BJ207304
BQ239089	CA499328	CA744411
BQ241493	CA692539	BJ276947
BQ246913	BJ246024	BJ225910
BQ579469	BJ245188	CA727476
BQ753146	CA501245	BE405507
BQ802253	BM134773	BE418533
BQ802688	BQ752781	BF199788
BQ803195	BE591190	BF473313
BQ901277	CD910548	BE445244
BU100242	BE517538	BE605005
CA500988	CA497657	BE426789
CA600403	BQ744464	



Tablo 3.7: PZR analizlerinde kullanılan RGA primerler

Primer	Sequence (5'-3')	Primer	Sequence (5'-3')
BE400250	F: 5' CAT CTT ATT gTT TgT CCC T 3' R: 5' gAg TAT gAT TTA TCC TTg g 3'	BE405711	F:5' CAT TTC gCA TAC TTT TTg A 3' R:5' TTC TgT gAT TTT TAC TCC C 3'
BE498831	F:5' AgA CAA gAT TAg Tgg AAC g 3' R:5' AAA gAA AgA TAg CAT Agg T 3'	BE499177	F:5' ATC AgT CAC CgT gTC TCA 3' R:5' TTC TTT CTC gCT ATA TTT 3'
BE500158	F:5' AAC AgA TgA gAA ACC AAA g 3' R:5' ATC AAC gAC AAC AAA ATA C 3'	BF482358	F:5' gAg AAA CCC gCA gCg AgA g 3' R:5' TTT gTg AAC ATA gCC ATT A 3'
BJ255861	F:5' ggA ATC ggC AAg ACC ACT C 3' R: 5' CAC ATC ATC CAg CAC CAg g 3'	BJ258770	F: 5' TTg TCg ggC TTg gTg gTC TA 3' R: 5' TgC TgT TTg CTT CAT TAC TT 3'
BJ269157	F: 5' gCT TCA TCT ACC TCC CAA CA 3' R:5' CCC CCA CAC TCA TCC TCA TA 3'	BJ270203	F: 5' ggC AgA gCA gTC CAg CAg 3' R: 5' TCg TAA TAA CAC gCA AAT 3'
BJ272146	F: 5' ggA gCg gAC AgT gAg ACA T 3' R: 5' ggC AAg AAg CAg gAg CAT A 3'	BJ286558	F:5' ACC ATA Agg AAA AAC ACC A 3' R: 5' CTC AAC AAA ggC AAg ACT A 3'
BJ295708	F:5' TTT AgC ACA TCA ACC TCg 3' R: 5' gAT TCT CTC AAA AAC gCC 3'	BJ300496	F: 5' CTA TTg TTg gAT TTg gTg gg 3' R: 5' CgA TAC ggg TTg TCg TgA TT 3'
BQ239089	F: 5' CAA CCC TTC TCA AAA CAT T 3' R: 5' TCA TTC AAg CAC TCC ATC C 3'	BQ241493	F: 5' CCg TgC CCT CAg TTC AAT 3' R: 5' CAT ACg TAg CTg CCC TCC 3'
BQ246913	F:5' gAA CAg CgA AAg Tgg gAg gA 3' R: 5' TgT AgA AgA Cgg CgC AgA Ag 3'	BQ579469	F: 5' ggT CTg gAA CTC AAT gAT gC 3' R: 5' CAA ggC TgT TTT Tgg CTg gT 3'
BQ753146	F: 5' AAg ACC TgT gTg TTT ggA T 3' R: 5' CAg CTT TgT gTA CTT gCA T 3'	BQ802253	F: 5' ATC TAT CAC ATC gAg CCC C 3' R: 5' gAC ATC CCA TCA TAC TgC C 3'
BQ802688	F: 5' CTA TTA gTT gTg CTT TTC C 3' R: 5' TTC ACC TAT CCA TTg TTT A 3'	BQ803195	F: 5' ACT gCg ggg CTT TTg TCT C 3' R: 5' gCT TCT TAg gTg gTg ggg A 3'
BQ901277	F: 5' gAg CTg CTC CAC ATC CAA AT 3' R: 5' CCA CAC TTg TgA Agg CTg Tg 3'	BU100242	F:5' ATA TCC CAA AAA CCT AAC A 3' R: 5' AgC AAC TCA CCA TAC TCA A 3'
CA500988	F: 5' ACg ACA CCA TTC AAC gCC T 3' R: 5' TCC CgA ACC TCC AAA ACC A 3'	CA600403	F: 5' Agg TgA AgT CgT gCT TAT gg 3' R: 5' TTC TgA TgT CCg AgT TTT gg 3'
CA606728	F: 5' AgA TgA gTg ggA gAg ggT 3' R: 5' CAg gTC TTg gAg ATg ggT 3'	CA610289	F: 5' gTC AgT Cgg AgA ggT ggg A 3' R: 5' AgT ATC ggg AgT ggA AAA T 3'
CA652512	F: 5' gAT AgC ACT ACg CAC ATT 3' R: 5' CCA TCA ACC ATC CAA CAg 3'	CA662188	F: 5' AAA CTC TTT CCC ACA TCT 3' R: 5' gTg CCT ggA CAA TAA CCT 3'
CA662651	F: 5' gAC CTT CCC CAT CAC CTA 3' R:5' TTC CCg TTC CAA ACC CAg 3'	CA676926	F: 5' TgC CAT TTC ATA CAC ACg 3' R: 5' AgA gCA ACA gTC CCC CAg 3'
CA679534	F: 5' ATg gAC ATC CTC CTT CAA 3' R: 5' TCA TCC CAA Tgg TTA gTT 3'	CA681703	F: 5' CCC ATA AAA ACA CAA TCT 3' R: 5' gAC gAC gAC AAC Agg ACA 3'
CA725884	F: 5' CTT TgC CgA TTT gAg ACA 3' R: 5' Agg ATT gAg ggA TgC TTC 3'	CA726158	F: 5' TAA TCC gAC CAA AAA CAg gC 3' R: 5' CCA AgA ggT gAA ACC AAA gA 3'
CA733486	F: 5' CAT CAC CAA gCC AAA AgC A 3' R: 5' CTg gAg AAg TAA gAC CCg A 3'	CA741642	F: 5' AgA gAA TCA gCA gAC AAg gC 3' R: 5' AAA CAT CAT CCA gCA CgA gC 3'

Tablo 3.7'nin devamı

CA742788	F: 5' TCT CCT CAT CTT CCT TAg CA 3' R: 5' ATC ACA gTC TCg CAg TCA TT 3'	CA742849	F:5' CAg gTg TCg TAg gTg AAT g 3' R:5' TgT ggA TAg CAg Agg gATT 3'
CA499328	F: 5' TgA AAg TgA AAA ggA ggg C 3' R:5' CCA AAg ACA AAT gTg AgA A 3'	CA692539	F: 5' Cgg TTg ATg AAT gAC ACg AA 3' R: 5' CTg ACA CTg AAg CAg ggA gC 3'
BJ246024	F:5' TCT ACA CAA CAg AAg ggC A 3' R:5' gAA ggT TTA ggA CAC ggA C 3'	BJ245188	F:5' AAA TCC TCC gAA gAg AAC A 3' R:5' TTA CAA TCg CAg CCA ACA A 3'
CA501245	F:5' ATA gCg gAA ggC TTT gTC 3' R:5' CgA TgT TCg gTg gTA gTA 3'	BM134773	F:5' AgA TTT TgC TAT gCT TTC AC 3' R:5' TTA CTC ATT TTC TTT gCT gC 3'
BQ752781	F:5' gTg gAT AgC AgA Agg ATT 3' R:5' ACT TgA TTA gAT ggA ACA 3'	BE591190	F:5' AAT CAA TgA ggA Agg AAT gg 3' R: 5' gTA ACg ggA gAg AAA ACA gC 3'
CD910548	F:5' AAg Tgg gTT gCT gAg ggT TT 3' R:5' TgC ggC AgT TCT TCT AgT gT 3'	BE517538	F:5' ATg gAT TgC TgA Agg gTT 3' R:5' gAg TgA TCT ggC ATg ggA 3'
CA497657	F:5' CCg AAg gCA AgT AAA AAg g 3' R:5' AAg AgC CCg AAC TgC gAC A 3'	BQ744464	F: 5' ggg ATC TTC CAC ACC ATT 3' R: 5' gCT TTC CgA TTT CAC CAg 3'
CA617198	F: 5' gTC CAC ATg ggg TgA AgT AA 3' R: 5' AAg TCC AAC AAC gCg AgA gA 3'	BM134978	F: 5' CAg AAA CTg AAg AgA TgC T 3' R: 5' TAT TgA CAg ATg ACg gAC A 3'
BU099584	F: 5' ggC TCT CTC TgT CTT CTg 3' R: 5' gCT TTA TTC TgT gCA TCA 3'	CA736742	F: 5' TTC TCC CCT CTg TCA AC 3' R: 5' AgC CAT gCA TCT TCT AC 3'
CA740494	F: 5' gAg Cgg ggA gCA ATT CTT CT 3' R:5' ATC CTT CAg CgA CCC ACA TA 3'	CA724373	F: 5' ggg CTg CCA TAT CAT CTC AA 3' R: 5' ACC TCC gTC CAA gTT CCT Cg 3'
CA498317	F: 5' TAC TTC CgC AAA TgC CCA g 3' R: 5' TTC CAg TTT CCA AAC ACC g 3'	CA696482	F: 5' ATg ACC TTC CAg ACg ACC T 3' R: 5' TCC gCT TTC CAT CCA CTT A 3'
BJ213107	F: 5' TTA AgC TCC TgT TTg Tgg 3' R: 5' TTg CCC TTC TgT TgT ATg 3'	BJ316279	F: 5' CTg AAA AgA TgT ggT gg 3' R: 5' TTT Agg TgT ggA ggT Ag 3'
BJ277253	F: 5' AgA AgA CAC AgC AgA AgA gT 3' R: 5' TTC AAC ATC CCC AAT AAA AC 3'	BQ743300	F: 5' AAg TCg TgC TTC CTC TAC 3' R: 5' AgT CTC CCT TAT gTC CAg 3'
BF484437	F: 5' CAg gAg gTg gTT AgC ggA 3' R: 5' ATg gAT ggA AAg gTg gCA 3'	BJ207304	F: 5' TAT TTT TgC TCT ATT Tgg g 3' R: 5' gTC TTC ACC TCT gTg CTg T 3'
CA744411	F: 5' CgA gTg Tgg TTA TCC CTT g 3' R: 5' gCT CCT CTg CTA TCT gTg C 3'	BJ276947	F: 5' AAC CTA TTC CCT CCA TTC 3' R: 5' TCA TTT CTT CAA CTT CCA 3'
BJ225910	F: 5' TTg CTT gAT TTA gCg gAT A 3' R: 5' CAg ACT CTT gAg gAC TTT C 3'	CA727476	F: 5' gCA gTg TAg ggA AAT CgT g 3' R: 5' AAg TCA TTg gAg TTg ggA g 3'
BE405507	F: 5' ATg CTT AgT gTT gTC TCC A 3' R: 5' TAA TCC ATC ACA TTT CCT T 3'	BE418533	F: 5' ACA ggC AAA TgA ACg ACg 3' R: 5' TgT gAA ATg CTC TCT AAg 3'
BF199788	F: 5' ATC gCC AAC CAA ATC AAT g 3' R: 5' TgT TTT TCC CAA CCC ACC A 3'	BF473313	F: 5' CTg gAA AAg CAC AgT TgA 3' R: 5' gTg gAT gAT ggA AgA AgA 3'
BE445244	F: 5' TAA ggC ggT TAT gAA gCA 3' R: 5' TCg gAA ggA CTg Agg AAA 3'	BE605005	F: 5' ATA AAg gAT ggg ATg gAA 3' R: 5' CTT gAg ggA ATC TgA gCA 3'
BE426789	F: 5' AAT gTT ggg TgT CAg TTT CC 3' R: 5' AgC ATg TCC ATC CAg gTT TC 3'		

### 3. 5. 4. Moleküler Markır Analizlerine Ait PZR Ürünlerinin Görüntülenmesi

EST kökenli kontig, singleton ve RGA-EST primerleri kullanılarak elde edilen PZR ürünleri agaroz jel elektroforezinde incelendi. Analiz için 0.5 X TBE (Tris/Borate/EDTA)'de hazırlanan %2'lik agaroz (Sigma A5093) jel, mikrodalga fırında eritildi. Oda sıcaklığına gelen jele 5 µl etidyum bromür (10 mg/ml) çözeltisi eklenip karıştırıldı ve yatay elektroforez kasetine döküldü. Elektroforez kaseti jelin polimerize olması için oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi ve 0.5 X TBE tamponu içeren elektroforez tankına yerleştirildi. PZR ürünleri 3.5 µl yükleme tamponu ile karıştırılarak 20-22 µl hacimde jel kuyularına yüklendi. PZR ürünlerinin boyutunu belirleyebilmek için 50 bp'lik (MBI Fermentas SM0371, Germany) DNA markırları kullanıldı. Jele yüklenen PZR ürünleri 80 Volt'ta 2 saat süre ile elektroforez işlemine tabi tutuldu. UV ışık altında (Vilber Lourmat) incelenen PZR ürünlerinin, Sony UPP-110HG Type V High Glossy Printing Paper film üzerinde fotoğrafı çekildi. Agaroz jel elektroforezinde kullanılan çözeltilerin içerikleri ve konsantrasyon miktarları Tablo 3.8 de verildi.

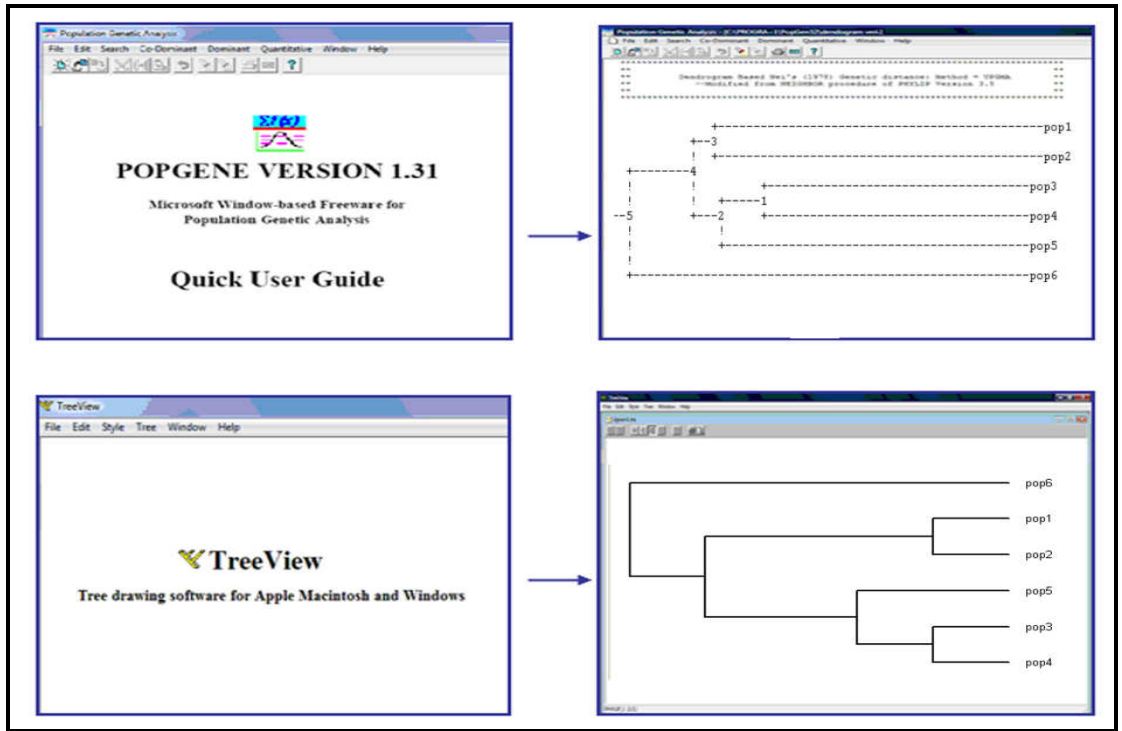
Tablo 3.8: Agaroz jel elektroforezinde kullanılan çözeltiler

<b>Çözelti Adı</b>	<b>İçeriği</b>	<b>Konsantrasyonu</b>
TBE Tamponu (10X)	Trisma Base	890 mM
	EDTA	20 mM
	Borik Asit	890 mM
Yükleme Tamponu (6X)	Bromofenol Mavisi	%0.25 (w/v)
	Sukroz	%40 (w/v)
Etidyum Bromür	Etidyum Bromür	10 mg/ml

### 3. 5. 5. Buğday Çeşitleri Arasındaki Genetik İlişkinin Belirlenmesi

Sarı pas uygulanmış buğdaya ait EST kökenli primerler (39 adet kontig ve 92 adet singleton primeri) kullanılarak buğday çeşitleri ile PZR reaksiyonu sonucunda elde edilen polimorfik bantlar, bireyler arasındaki genetik benzerlik ile genetik uzaklığı belirlemek ve dendogram oluşturmak için "PopGene32" bilgisayar programı ile değerlendirildi. "PopGene32" programı ile elde edilen dendogramı düzenlemek için ise 'TreeView' bilgisayar programı kullanıldı.

“PopGene32” programında dendogram oluşturmak için öncelikle, PZR denemeleri sonucu elde ettiğimiz polimorfik bant profiline göre, her bir anaç için, bantların varlığında ‘1’, yokluğunda ise ‘0’ dan oluşan kodlarla excel dosyasında bir veri matrisi oluşturuldu. Bu veriler, “PopGene32” programının kullanabileceği veriler haline getirilebilmek amacıyla “wordpad” yardımı ile hazırlandı. Daha sonra hazırlanan veriler “PopGene32” programına aktarılarak bireyler arasındaki genetik benzerlik ve genetik uzaklık belirlenerek dendogram çıkarıldı. Son olarak “TreeView” programı ile dendograma son hali verildi (Şekil 3. 8).



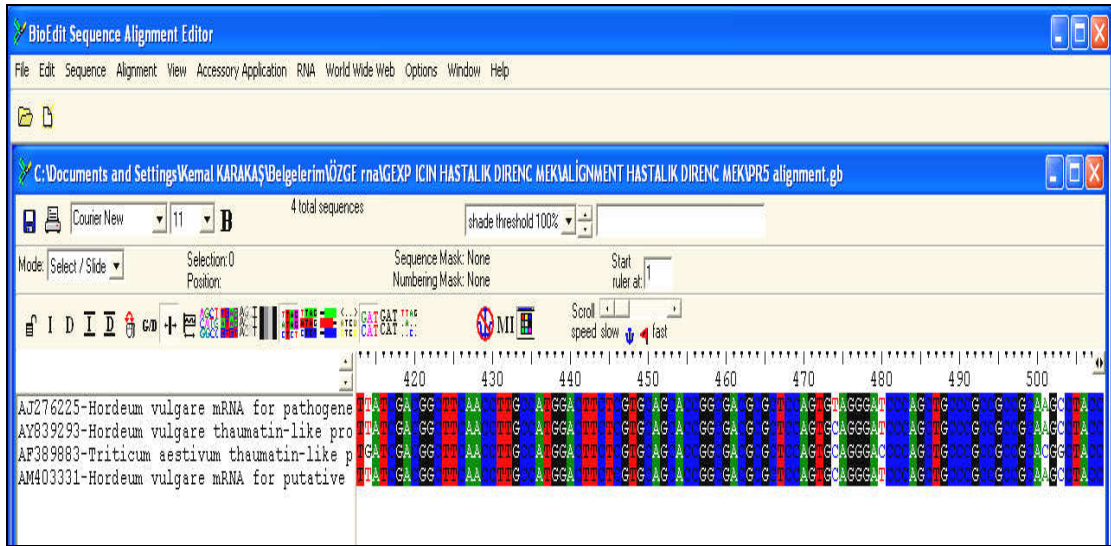
Şekil 3.8: Dendogram oluşturmak için kullanılan “PopGene32” ve “TreeView” bilgisayar programları

“PopGene32” programında belirlenen bireyler arasındaki uzaklık ya da yakınlık mesafe analizleri, Nei’nin (1978) genetik benzerlik ve genetik uzaklık ölçümüne göre matrisler oluşturularak gerçekleştirildi.

### 3. 6. RNA DÜZEYİNDE GERÇEKLEŞTİRİLEN ÇALIŞMALAR

#### 3.6.1. Gen Anlatım Analizlerinde Kullanılmak Üzere Dayanıklılık Mekanizmasında Rol Oynadığı Düşünülen Genlerin Ortak Dizilerinin Belirlenmesi

Bitkilerde mantar hastalıklarına karşı dayanıklılık mekanizmasında rol oynayan çeşitli genler belirlenerek bu genlerin mRNA dizileri “fasta formatı”nda kaydedildi. Buğday ve farklı organizmalarda aynı genlere ait mRNA dizileri, “BioEdit programı” kullanılarak karşılaştırıldı ve ortak diziler belirlendi (Şekil 3. 9), daha sonra bu ortak diziler primer tasarımında kullanıldı. Bu genler; PR1 (Pathogenesis Related 1), PR4 (Pathogenesis Related 4), PR5 (Pathogenesis Related 5), MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase), RAD6 (Ubiquitin-Conjugating Enzyme), Hsp70 (Heat shock protein 70), Hsp90 (Heat shock protein 90), SGT1 (Suppressor of G<sub>2</sub> allele of skp1), RAR1 (Required for *Mla12* Resistance), RLK (Receptor Like Kinase)’dır. Bu genlerden primer tasarımı GeXP GenomeLab Genetik Analiz Sisteminde (Beckman Coulter) “multipleks” halinde gerçekleştirildi.



Şekil 3. 9: Buğday ve farklı organizmalardaki aynı genlerin ortak dizilerinin “BioEdit programı” kullanılarak belirlenmesi

### 3. 6. 2. Gen Anlatım Analizlerinde Kullanılmak Üzere, Stres ve Stresle İlişkili Kontig ve Singletonlardan Tasarlanan Primerler

Kontig ve singletonların protein karşılıklarından yola çıkılarak RNA düzeyinde analizler gerçekleştirmek için ise stres ve stresle ilişkili olanlar belirlendi. Seçilen kontig ve singletonlar Tablo 3. 9 ve Tablo 3. 10 da gösterildi. Bunlardan benzer gene karşılık gelen kontig ve singletonların cDNA dizilerine BIOEDIT programı ile dizi eşleştirmesi (alignment) yapılarak içlerinden en uygun olan dizi tercih edildi. GeXP Genetik Analiz Sisteminde (Beckman Coulter GenomeLab) primer tasarımı gerçekleştirildi. Primerler multipleksler halinde cihaz tarafından bir araya getirildi. Her bir multipleks 9–10 kontig veya singletonun bulunduğu primerleri içermektedir.

Tablo 3. 9: Gen anlatım analizlerinde kullanılmak üzere seçilen stres ve stresle ilişkili kontigler

<b>Kontig adı</b>	<b>Protein adı</b>	<b>Erişim no</b>	<b>cDNA uzunluğu</b>
<b>Kontig 34</b>	jasmonate-induced protein	AAR20919	915
<b>Kontig 55</b>	glycine-rich RNA-binding protein	BAF30986	492
<b>Kontig 80</b>	wali7	AAC37416	815
<b>Kontig 91</b>	cold shock protein-1	BAB78536	690
<b>Kontig 9</b>	lipid transfer protein (LTP)	ABB90546	348
<b>Kontig 90</b>	putative membrane protein	ABB90549	435
<b>Kontig 113</b>	lipid transfer protein 3 (LTP3)	AAP23941	369
<b>Kontig 52</b>	Metallothionein-like protein 1	P43400 L11879	228
<b>Kontig 75</b>	metallothionein mRNA	AAP80616	345
<b>Kontig 57*</b>	type 1 non-specific lipid transfer protein precursor	CAH69190	354

\* Aynı protein'e karşılık gelen farklı kontig veya singleton ile eşleştiği için listeden çıkarıldı.

Tablo 3. 10: Gen anlatım analizlerinde kullanılmak üzere seçilen stres ve stresle ilişkili singletonlar

Singleton adı	Protein adı	Erişim no	cDNA uzunluğu
CA599166	cold acclimation induced protein 2-1	AAV16797	966
CA599172	stress responsive protein	AAV44603	588
CA597830	14-3-3 protein	AAR89812	786
CA597983	GRAB2 protein	CAA09372	1056
CA598102	WIR1A protein	Q01482	267
CA598181	pathogenesis-related protein 1.2	CAA07474	522
CA598187	VER2	BAA32786	903
CA598256	heat shock protein 80	AAD11549	2103
CA598366*	receptor-like kinase protein (Lrk)	AAS93629	1392
CA598422	wali5	AAA50850	270
CA598476	LRR19	AAK20736	2763
CA598630	Translationally-controlled tumor protein homolog (TCTP)	Q8LRM8 AF508970	507
CA598687*	wali6	AAC37417	267
CA598694	cold-responsive LEA/RAB-related COR protein	AF255053	501
CA599121	putative proteinase inhibitor-related protein	AAS49905	273
CA598966	MAP kinase	ABS11090	1110
CA598941	calcium-dependent protein kinase	ABY59005	1677
CA597760	type 1 non specific lipid transfer protein precursor	CAH69210	363
CA598151*	lipid transfer protein precursor	AAG27707	348
CA598557	type 2 non specific lipid transfer protein precursor	CAH69201	291
CA598691	type 1 non-specific lipid transfer protein precursor	CAH04983	348
CA598755*	type 1 non specific lipid transfer protein precursor	CAH69190	354
CA599273	Outer mitochondrial membrane protein porin (Voltage-dependent anion-selective channel protein) (VDAC)	P46274 X77733	828
CA599285*	putative lipid transfer protein	ABB90547	399
CA599115*	type 1 non specific lipid transfer protein precursor	CAH69199	326

\* Aynı protein'e karşılık gelen farklı kontig veya singleton ile eşleştiği için listeden çıkarıldı

### 3. 6. 3. Çoklu Dizi Eşleştirilmesi

Gen anlatım analizlerinde kullanılmak üzere stres ve stresle ilişkili kontig ve singletonları seçebilmek amacıyla aynı proteinle eşleşen veya aynı erişim numarasına sahip olan dizilerin çoklu eşleştirilmesi (multiple alignment) yapıldı. Eşleşen diziler karşılaştırıldı ve gen anlatım analizlerinde kullanılacak primer tasarımı için en sorunsuz ve uzun dizi tercih edildi

### 3. 6. 4. Gen Anlatım Analizlerinde Kullanılacak GeXP Genetik Analiz Sistemi

Gen anlatım analizlerinde kullanılacak primerlerin tasarlandığı “GeXP Genetik Analiz Sistemi (Beckman Coulter GenomeLab)” (Şekil 3.10, Şekil 3.11) kullanılarak çoklu gen anlatım analizleri gerçekleştirilebilmekte ve gen anlatım profilleri karşılaştırmalı olarak ortaya konulabilmektedir.

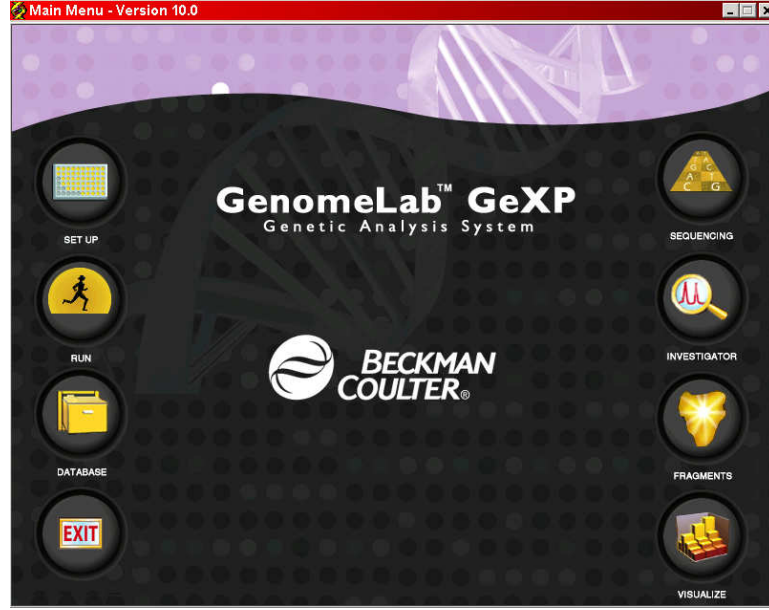
Çoklu gen anlatım analizi 5 temel basamaktan oluşmaktadır:

1. Primer tasarımı
2. cDNA sentezi
3. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)
4. PZR ürünlerinin kapiler elektroforez sisteminde yürütülmesi
5. Dizi ve transkript profillemeye analizleri



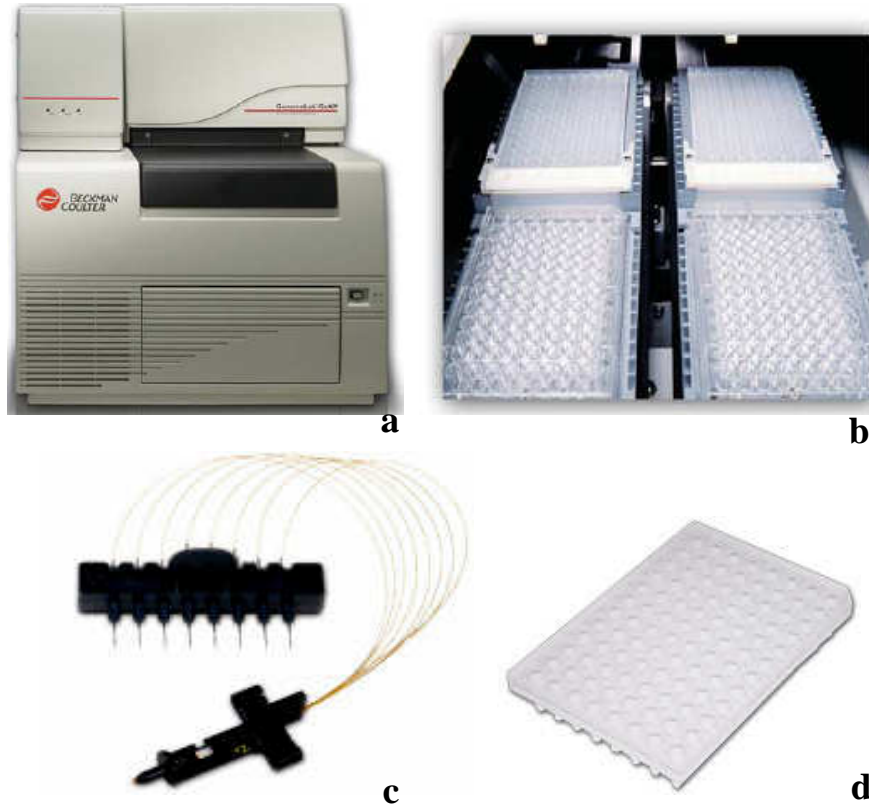
Şekil 3.10: GeXP Analiz Sistemi (Beckman Coulter GenomeLab)





Şekil 3.11: GeXP Analiz Sistemi Yazılımı (Beckman Coulter GenomeLab)

GeXP analiz sistemine ait parçalar aşağıda gösterilmektedir (Şekil 3.12).

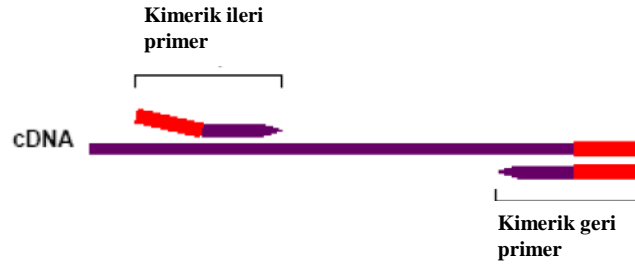


Şekil 3.12: GeXP Analiz Sistemine (Beckman Coulter GenomeLab) ait parçalar;  
a) GeXP Sistemi genel görünümü, b) Çift panelli örnek yükleme bölmesi, c) 8'li kapiller, d) 96 örneklik PZR tablası

### 3. 6. 5. Gen Anlatım Analizlerinde Kullanılacak Primerlerin GeXP Genetik Analiz Sisteminde Tasarlanması

Primer tasarımı için öncelikle anlatım düzeyi incelenecek olan genlerin mRNA dizi bilgisinin bulunması gereklidir (NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Ardından analize alınacak genlere ait diziler cihazın “eXpress Profiller yazılımı”nda bulunan “eXpress Designer modülü”ne tek tek tanıtılmalıdır (Manuel veya internet sitelerinden).

İlgili genlere ait dizi bilgileri kullanılarak aynı GC içeriğine ve aynı erime sıcaklığına sahip, sadece ilgili genle ilgili ileri (forward) ve geri (reverse) primer çiftleri birkaç saniye içinde üretilmektedir. Üretilen primerler, gene özgü dizilerine ek olarak, 5’ uçlarında evrensel primer dizileri de içermektedir (Şekil 3.13). İleri ve geri primer örneği Şekil 3.14 de verilmiştir. Primerlerin tasarım aşamasında; bu primerlerle elde edilen PZR ürünlerinin 100–400 nükleotid ve birbirlerinden en az 5 baz farklı uzunluklarda olması gerekmektedir.



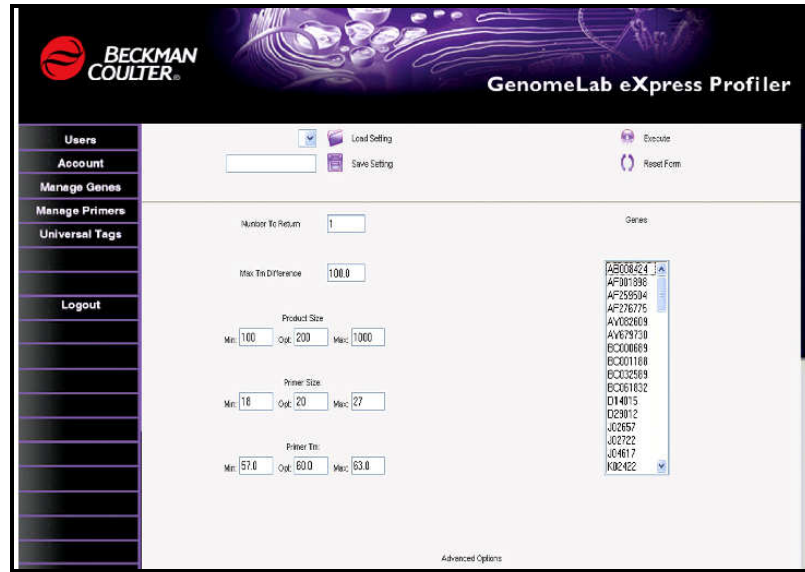
Şekil 3.13: İleri ve geri kimerik primerlerin gösterimi

İleri (Forward) primer Üniversal Etiket – 18bç ile 19bç uzunluğunda, Tm 55 °C
<u>AGGTGACACTATAGAATATCTTCAAGACACTGGGAGGG</u> Üniversal etiket
Geri-ters (reverse) primer Üniversal Etiket – 20bç uzunluğunda, Tm 57 – 63 °C
<u>AGGTGACACTATAGAATATCTTCAAGACACTGGGAGGG</u> Üniversal etiket

Şekil 3.14: İleri ve geri kimerik primer örneği

Ters transkripsiyon reaksiyonunda ve çoklu PZR'lerde kullanılan geri (revers) ve ileri (forward) primerlerin tasarlanmasında GeXP Genetik Analiz Sistemine (Beckman Coulter GenomeLab) ait “eXpress Primer Design” (Şekil 3.15) programı kullanıldı. Seçilmiş olan transkript dizileri ve sürekli anlatım yapan (housekeeping) genlerden aktin ve gliseraldehit fosfat dehidrogenaz (GAPDH) dizileri bir arada kullanılarak primer sentezi gerçekleştirildi (Tablo 3. 11, Tablo 3. 12, Tablo 3.13, Tablo 3.14).

Reaksiyonlarda kullanılan ileri ve geri primer karışımları 10 µM olacak şekilde stok olarak hazırlandı. Geri primer karışımı 1:20, ileri primer karışımı ise 1:50 oranında sulandırılarak reaksiyonlarda kullanıldı. Tüm geri primer dizilerinde ilk 18 nükleotid, ileri primer dizilerinde ise ilk 19 nükleotid ortak dizilerden oluşmaktadır. Böylelikle sadece istenen transkriptlere ait daha özgün çoğaltım gerçekleştirilmiş olmaktadır. Gen anlatım analizlerinde kullanılmak üzere primerler hem mantar hastalıklarına direnç mekanizmasında görev alan genler hem de stres ve stresle ilişkili kontig ve singletonların eşleştiği proteinlere karşılık gelen dizilerden tasarlandı.



Şekil 3.15: Gen anlatım analizlerinde kullanılan GeXP Sistemi primer tasarımı programı “eXpress profiler” sayfası (<http://www.beckmancoulter.com>)

Tablo 3.11. Gen anlatım analizlerinde kullanılacak GeXP'ye özgü hastalık direnç mekanizması ile ilişkili primerler

Multipleks			
Resistance			
Primerin Adı	Ürün Boyutu	İleri Primer w/ Evrensel	Geri Primer w/ Evrensel
PR4 (100) (26,20)-(125,19)	137	AGGTGACACTATAGAATAcgcagaataactgggacctg	GTACGACTCACTATAGGGAggccaccctgactggacc
Actin (108) (428,20)-(535,20)	145	AGGTGACACTATAGAATAccctctatgcaagtggctgt	GTACGACTCACTATAGGGAgaagaatggcatgaggaagc
MAPK (115) (1518,20)(1632,20)	152	AGGTGACACTATAGAATAgcagtgagccctcaaaagtc	GTACGACTCACTATAGGGAacttgggaagcgctaagtctc
RAD6 (122) (271,20)-(392,20)	159	AGGTGACACTATAGAATAtacagaaccagtgaggccct	GTACGACTCACTATAGGGActcgcgtgtacattctggctg
PR1 (129) (128,20)-(256,20)	166	AGGTGACACTATAGAATAggcgaaaagaaggactacga	GTACGACTCACTATAGGGAgttattgttgacagcagcgc
Hsp90 (136) (872,20)-(1007,20)	173	AGGTGACACTATAGAATAatgactgggaggagcatttg	GTACGACTCACTATAGGGAAgcttgatgttggccctt
SGT1 (143) (150,20)-(292,20)	180	AGGTGACACTATAGAATAcatcaagctgggagttaca	GTACGACTCACTATAGGGAcaagagcagcctttgcagtt
Hsp70 (150) (45,21)-(194,20)	187	AGGTGACACTATAGAATAcgtcaactacaagggtgagga	GTACGACTCACTATAGGGAtgggagtcgttgaagtaggc
RLK (157) (190,20)-(346,20)	194	AGGTGACACTATAGAATAgctcgtcatctccacagtt	GTACGACTCACTATAGGGAttgctaaggcagagactgg
PR5 (164) (32,18)-(195,20)	201	AGGTGACACTATAGAATAaagccggaaggataggg	GTACGACTCACTATAGGGAgtagaatcctgggtgctgc
RAR1 (172) (99,20)-(270,20)	209	AGGTGACACTATAGAATAgagctgttgcaagcaaagaa	GTACGACTCACTATAGGGAggtttccacaccctgcttag
GAPDH (207) (26,20)-(232,20)	244	AGGTGACACTATAGAATAcaaggctgcagctcacatta	GTACGACTCACTATAGGGAAatcaaacctcaacaatgcc

Tablo 3.12. Gen anlatım analizlerinde kullanılacak GeXP'ye özgü kontiglerin primer dizileri

Multipleks			
Kontig			
Primerin Adı	Ürün Boyutu	İleri Primer w/ Evrensel	Geri Primer w/ Evrensel
Kontig91 (100) (28,20)-(127,19)	137	AGGTGACACTATAGAATAaagtgggtcaacgtcaccaa	GTACGACTCACTATAGGGAagtagccgtcggacttgat
Actin (108) (428,20)-(535,20)	145	AGGTGACACTATAGAATAccctctatgcaagtggctgt	GTACGACTCACTATAGGGAgaagaatggcatgaggaagc
Kontig9 (115) (220,20)-(334,20)	152	AGGTGACACTATAGAATAgcgtgcaagtgcattaagag	GTACGACTCACTATAGGGAagcagtccacggatgagcta
Kontig113 (122) (156,20)-(277,20)	159	AGGTGACACTATAGAATActcgatcagcaaggagtgt	GTACGACTCACTATAGGGAatgatggacttgatgctggg
Kontig75 (129) (78,20)-(206,21)	166	AGGTGACACTATAGAATAgcggataaactcagaggag	GTACGACTCACTATAGGGAatcgtccatctcagggtacatc
Kontig90 (136) (142,20)-(277,20)	173	AGGTGACACTATAGAATAaggatcacctgcatgacgtt	GTACGACTCACTATAGGGAagaagaagagccccgtcaag
Kontig34 (144) (434,20)-(577,20)	181	AGGTGACACTATAGAATActgtccatggattttgtccc	GTACGACTCACTATAGGGAatgtgccgtgctaactgtg
Kontig55 (151) (12,18)-(162,19)	188	AGGTGACACTATAGAATAcgagtaccgtgcttctgt	GTACGACTCACTATAGGGAgaagggtgacgaacccgaac
Kontig52 (158) (60,20)-(217,19)	195	AGGTGACACTATAGAATAgtaccctgatctgacggagc	GTACGACTCACTATAGGGAaggggttgcaactgcaagt
Kontig80 (165) (605,20)-(769,20)	202	AGGTGACACTATAGAATAcgagaatccaagaacaagg	GTACGACTCACTATAGGGAacaccatctacacgaacgg
GAPDH (207) (26,20)-(232,20)	244	AGGTGACACTATAGAATAcaaggctgcagctcacatta	GTACGACTCACTATAGGGAatcaaacctcaacaatgcc

Tablo 3.13. Gen anlatım analizlerinde kullanılacak GeXP'ye özgü singletonların primer dizileri (1)

Primerin Adı	Ürün Boyutu	İleri Primer w/ Evrensel	Geri Primer w/ Evrensel
S630 (100) (112,20)-(211,20)	137	AGGTGACACTATAGAATAcaaggagcagttgatgtgga	GTACGACTCACTATAGGGAcaatgtcaaccaccttcag
Actin (108) (428,20)-(535,20)	145	AGGTGACACTATAGAATAccctctatgcaagtggctgt	GTACGACTCACTATAGGGAgaagaatggcatgaggaagc
S187 (115) (320,20)-(434,20)	152	AGGTGACACTATAGAATAAttgaacaagcaggtgagtg	GTACGACTCACTATAGGGAagctcccatgtttccatc
S172 (122) (380,20)-(501,19)	159	AGGTGACACTATAGAATAaactacctggacgagtcggtg	GTACGACTCACTATAGGGAgtggtactgtgcccgttg
S422 (129) (99,21)-(227,19)	166	AGGTGACACTATAGAATAcaacaactgcagtccttctc	GTACGACTCACTATAGGGAgatttcataatccgcgcagc
S166 (137) (240,20)-(376,19)	174	AGGTGACACTATAGAATAcaacaccagcactacgtga	GTACGACTCACTATAGGGAagagcagcagcagatgag
S694 (144) (358,20)-(501,20)	181	AGGTGACACTATAGAATAgacaccgctgcacagtacac	GTACGACTCACTATAGGGAtcactgtctctcccatcc
S273 (156) (462,20)-(617,20)	193	AGGTGACACTATAGAATAAttcgccaataacaatgctg	GTACGACTCACTATAGGGAgagaagctggtggcagctc
S102 (166) (85,20)-(250,20)	203	AGGTGACACTATAGAATAatcatcaacagctccgtctg	GTACGACTCACTATAGGGAaccggtgctacatccgtaa
S760 (173) (190,18)-(362,20)	210	AGGTGACACTATAGAATAgtcaggccaacaacagc	GTACGACTCACTATAGGGAcagtgatcgagttgcagtc
S557 (183) (37,18)-(219,18)	220	AGGTGACACTATAGAATActgatgctggctgctg	GTACGACTCACTATAGGGAgtaggtgggctcctggc
GAPDH (207) (26,20)(232,20)	244	AGGTGACACTATAGAATAcaaggctgcagctcacatta	GTACGACTCACTATAGGGAatcaaacctcaacaatgcc

Tablo 3.14. Gen anlatım analizlerinde kullanılacak GeXP'ye özgü singletonların primer dizileri (2)

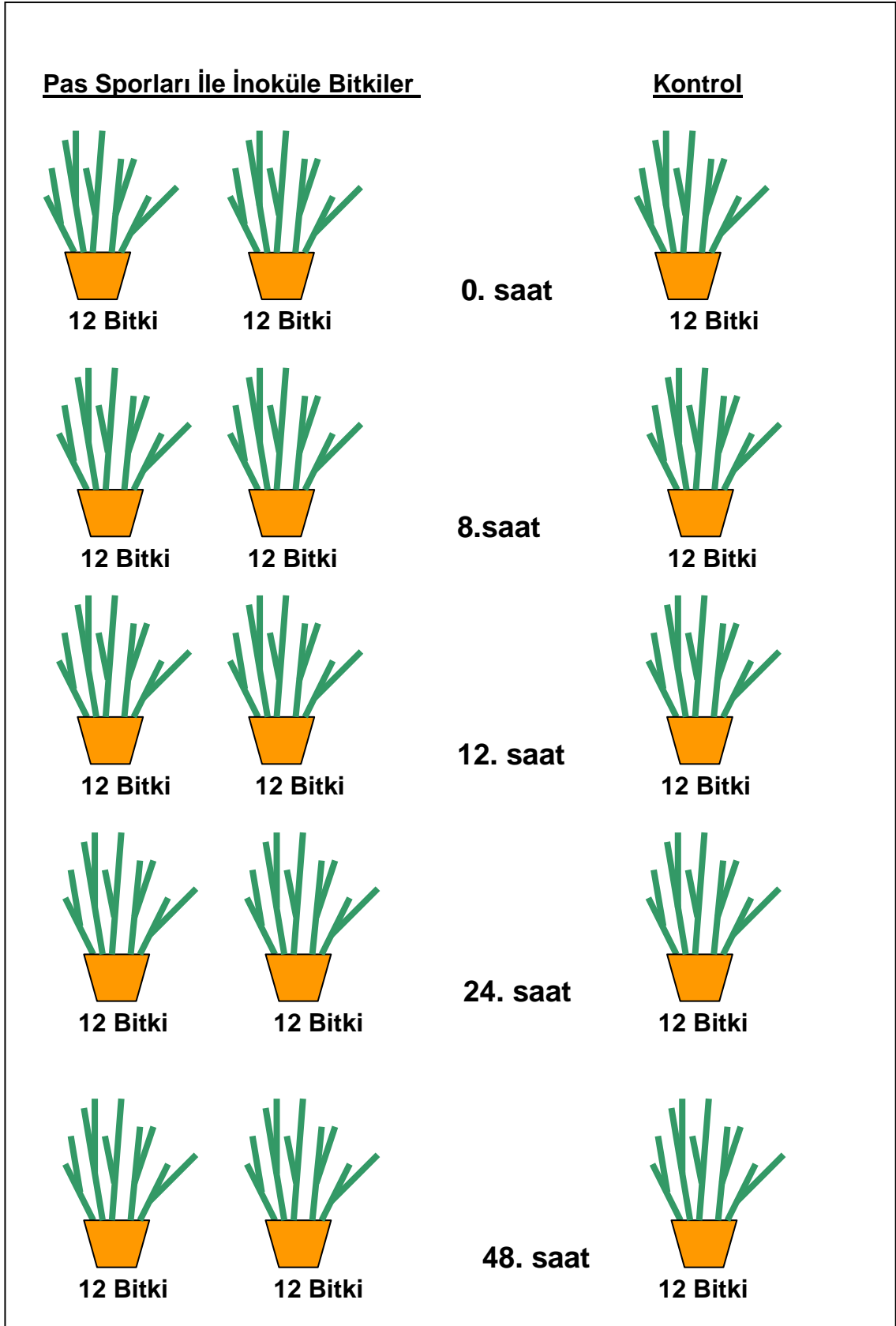
Primerin Adı	Ürün Boyutu	İleri Primer w/Evensel	Geri Primer w/Evensel
S966 (100) (248,20)-(347,20)	137	AGGTGACACTATAGAATAagatcaagctcctcaggcac	GTACGACTCACTATAGGGAgcgatgtagcgtcgttgaa
Actin (108) (428,20)-(535,20)	145	AGGTGACACTATAGAATAccctctatgcaagtggcgt	GTACGACTCACTATAGGGAgaagaatggcatgaggaagc
S121 (115) (101,20)-(215,19)	152	AGGTGACACTATAGAATAacaactgcaggtccttctcc	GTACGACTCACTATAGGGAcaccggaacgtcttgtag
S691 (122) (224,19)-(345,20)	159	AGGTGACACTATAGAATAactgcctcaagaacctggc	GTACGACTCACTATAGGGAgtgaaggtgttcagttgg
S941 (130) (1030,20)(1159,20)	167	AGGTGACACTATAGAATAgcacacgaagtctatgcca	GTACGACTCACTATAGGGAgcaaacctcctcttcaac
S476 (137) (2428,20)(2564,20)	174	AGGTGACACTATAGAATAttggaatttacgcagggtc	GTACGACTCACTATAGGGAagctcgggacgtctacgaa
S256 (146) (905,20)-(1050,20)	183	AGGTGACACTATAGAATActctctgtggagggtcagctt	GTACGACTCACTATAGGGAcagctcctcacagttgcca
LRK (157) (190,20)-(346,20)	194	AGGTGACACTATAGAATAgctcgtcatctccacaggtt	GTACGACTCACTATAGGGAattgctaaggcaggagactgg
S983 (164) (19,20)-(182,20)	201	AGGTGACACTATAGAATAgtgatggatctggaggtgga	GTACGACTCACTATAGGGAaggctcgttcttgttgagtc
S830 (171) (322,20)-(492,20)	208	AGGTGACACTATAGAATAaagcttctggactcccact	GTACGACTCACTATAGGGAgatgtcctgggctgactgt
GAPDH (207) (26,20)-(232,20)	244	AGGTGACACTATAGAATAcaaggctgcagctcacatta	GTACGACTCACTATAGGGAatcaaacctcaacaatgcc
S181 (214) (241,19)-(454,20)	251	AGGTGACACTATAGAATAaacatcttctggggtccg	GTACGACTCACTATAGGGAagttgcaggtgatgaagacg

### **3. 6. 6. Gen Anlatım Analizlerinde Kullanılacak Bitkilere Pas Uygulamasının Gerçekleştirilmesi**

Gen Anlatım analizlerinde kullanılacak pas uygulanmış bitki materyali ile kontrol bitki materyali Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü (TARM) tarafından hazırlandı. Bu çalışma için Şekil 3.16 daki şemada ayrıntılı olarak açıklandığı şekilde tasarlandı ve farklı zaman dilimlerinde (0. 8. 12. 24. 48. saatler) pas ile inoküle edilmiş ve edilmemiş (kontrol) olarak örnek alımı gerçekleştirildi (Şekil 3.17).

Gen anlatım analizlerinde kullanılacak pas uygulanmış ve uygulanmamış kontrol bitkiler tamamen aynı fiziksel koşulların bulunduğu sera koşullarında inkübe edildi. Örnek alımı sırasında bitkiler her defasında kullanılan makaslar alkolle silinerek kesildi ve sonra hemen sıvı azota alınarak donduruldu. Bu şekilde RNA'ların izolasyonu sağlıklı şekilde gerçekleştirildi (Şekil 3.18). Bu işlem sırasında bitkiler üzerinde bir yaprak bırakılarak pas inokülasyonunun takibi yapıldı ve enfeksiyon gelişimi izlendi. Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü (TARM) tarafından bu süreç sonunda pas okuma sonuçları (Tablo 3.15, Tablo 3.16, Tablo 3.17, Tablo 3.18, Tablo 3.19, Tablo 3.20) değerlendirilerek RNA izolasyonu için bitki materyalinin seçimi gerçekleştirildi. Skop skalasına göre pas okuma sonuçları "0-5" dayanıklı ve "6-10" hassas olarak değerlendirilmektedir.





Şekil 3.16: Gen anlatımı analizlerinde kullanılacak bitki materyalinin hazırlığı ve seçilen zaman aralıkları



Şekil 3.17: Gen anlatımı analizlerinde kullanılacak bitki materyaline pas uygulanması ve seçilen zaman aralıklarında bitki materyalinin toplanması

Tablo 3.15: Pas uygulanan bitkilerde hastalık oluşumunu takiben Izgi01 genotipinde gözlenen pas okuma sonuçları

<b>İZGİ01</b>						
	0. Saat	8. Saat	12. Saat	24. Saat	48. Saat	
1	0	0	0	0	0	1
2	0	0	0	0	0	2
3	0	0	0	0	0	3
4	0	0	0	0	0	4
5	0	0	0	0	0	5
6	0	0	0	0	0	6
7	0	0	0	0	0	7
8	0	0	--	0	0	8
9	0	0	--	0	0	9
10	0	0	--	0	0	10
11	0	0	--	0	--	11
12	0	0	--	0	--	12

Tablo 3.16: Pas uygulanan bitkilerde hastalık oluşumunu takiben ES14 genotipinde gözlenen pas okuma sonuçları

<b>ES14</b>						
	0. Saat	8. Saat	12. Saat	24. Saat	48. Saat	
1	8	8	8	8	8	1
2	8	8	8	8	8	2
3	8	8	8	8	8	3
4	8	8	8	8	8	4
5	8	8	8	8	8	5
6	8	8	8	8	8	6
7	8	8	8	8	8	7
8	8	8	8	8	8	8
9	8	8	8	8	8	9
10	8	8	8	8	8	10
11	8	8	8	8	8	11
12	8	8	8	8	8	12

Tablo 3.17: Pas uygulanan bitkilerde hastalık oluşumunu takiben Sönmez2001 genotipinde gözlenen pas okuma sonuçları

<b>SÖNMEZ2001</b>						
	0. Saat	8. Saat	12. Saat	24. Saat	48. Saat	
1	0	0	7	7	7	1
2	0	0	7	7	7	2
3	0	0	3	6-7	7	3
4	7	0	7	;	7	4
5	0	5-6	7	;	7	5
6	0	;	7	6-7	3	6
7	7	;	7	7	7	7
8	0	;	7	6-7	;	8
9	0	0	7	5	7	9
10	7	7	7	5-6	7	10
11	7	;	7	7	7	11
12	0	7	--	6-7	--	12

Tablo 3.18: Pas uygulanan bitkilerde hastalık oluşumunu takiben Aydın98 genotipinde gözlenen pas okuma sonuçları

<b>AYTIN98</b>						
	0. Saat	8. Saat	12. Saat	24. Saat	48. Saat	
1	0	8	8	7	7	1
2	0	8	8	8	8	2
3	8	0	8	8	7	3
4	7	8	8	8	8	4
5	7	0	8	8	8	5
6	7	7	8	8	8	6
7	0	0	8	0	0	7
8	7	0	8	8	8	8
9	0	0	8	0	8	9
10	7	0	8	8	8	10
11	7	7	8	7	8	11
12	7	8	8	0	8	12

Tablo 3.19: Pas uygulanan bitkilerde hastalık oluşumunu takiben PI178384 genotipinde gözlenen pas okuma sonuçları.

<b>PI 178384</b>						
	0. Saat	8. Saat	12. Saat	24. Saat	48. Saat	
1	0	0	0	0	0	1
2	0	0	0	0	0	2
3	0	0	0	0	0	3
4	0	0	0	0	0	4
5	0	0	0	0	0	5
6	0	0	0	0	0	6
7	0	0	0	0	0	7
8	0	0	0	0	--	8
9	0	0	0	0	--	9
10	0	--	--	0	--	10
11	--	--	--	0	--	11
12	--	--	--	0	--	12

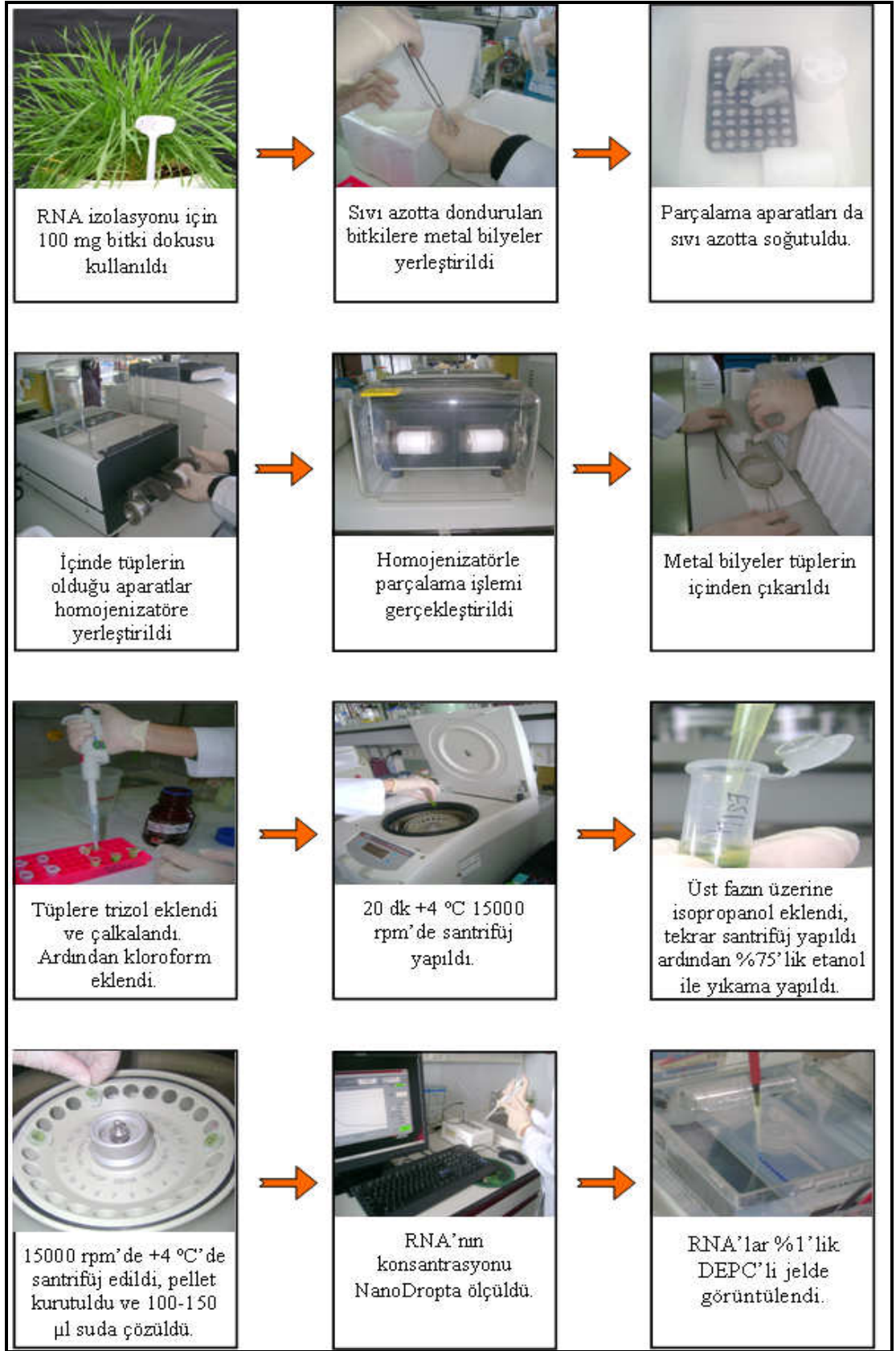
Tablo 3.20: Pas uygulanan bitkilerde hastalık oluşumunu takiben Harmankaya99 genotipinde gözlenen pas okuma sonuçları

<b>HARMANKAYA99</b>						
	0. Saat	8. Saat	12. Saat	24. Saat	48. Saat	
1	7	0	8	8	0	1
2	0	0	8	7	7	2
3	8	0	0	7	0	3
4	0	0	8	8	8	4
5	0	8	8	0	8	5
6	0	8	8	8	0	6
7	8	0	8	8	8	7
8	0	8	8	8	8	8
9	7	8	8	8	8	9
10	8	8	8	6-7	8	10
11	8	0	7	8	8	11
12	8	0	--	8	0	12

### 3. 6. 7. Total RNA İzolasyonu

RNA izolasyonları “TriPure Isolation Reagent” (Roche) kullanılarak firma tarafından belirtilen şekilde yapıldı (Şekil 3.18). 1 ml Trizol solüsyonu ile 50–100 mg bitki dokusundan RNA izole edilebilmektedir. RNA'nın çabuk yıkılabilen bir molekül olması sebebiyle izolasyonlar steril kabinde gerçekleştirildi ve kullanılan cam malzemeler % 0.1'lik DEPC (Dietilpirokarbonat) (DEPC, Sigma, D-5758) çözeltisinde bir gece bekletildikten sonra 180 °C'deki etüvde 3 saat bekletilerek kullanıldı. DEPC'li çözeltiler bir gece bekletildikten sonra otoklavlandı.

Buğday bitkisinin yapraklarından alınan 100 mg bitki dokusu sıvı azotta dondurulduktan sonra homojenizatör ile toz haline getirildi. Ardından ependorf tüplere alınarak üzerine 1 ml Trizol eklendi. Hafifçe alt üst edilen tüpler 5 dakika oda ısısında bekletildi. Üzerine 200 µl kloroform eklenip karıştırıldı ve oda ısısında 2–3 dakika bekletildi. 20 dk +4 °C'deki santrifüjde 15000 rpm'de santrifüj edildi ve üst faz yeni bir ependorf tüpe alınarak üzerine 500 µl isopropanol eklendi. 1–2 kez karıştırılan tüpler oda ısısında 10 dk bekletildi. 15 dk 15000 rpm'de +4 °C'de santrifüj işlemi gerçekleştirildi. Pelletin üzerine 1 ml soğuk %75'lik etanol eklenerek yıkama yapıldı. Pelletin toplanması için 5 dk 15000 rpm'de +4 °C'de santrifüj edildi. Pellet oda ısısında kurularak, 30–100 µl suda çözüldü ve buza alındı. İzole edilen RNA hemen kullanılmayacak ise -80 °C'de saklandı. RNA'lar DEPC içeren %1'lik agaroz jele yüklenerek görüntülendi.



Şekil 3.18: Gen anlatımı analizlerinde kullanılacak bitki materyalinden total RNA izolasyonu

### 3. 6. 8. RNA Miktarının ve Saflığının Belirlenmesi

Karşılaştırmalı olarak gerçekleştirilen gen anlatım analizlerinde kullanılacak RNA moleküllerinin kırılmamış halde yüksek kalitede olması ve miktarının hassas biçimde ölçülmüş olması son derece önemlidir. Eğer analiz için kullanılacak RNA molekülleri kırılmış, parçalanmış durumda ise ve miktarı olması gerekenden az veya çok ise elde edilen veriler önemli ölçüde yanıltıcı sonuçlar doğurabilmektedir. Bu nedenle özellikle RT PZR, cDNA “array”leri ve kantitatif RT PZR (Real time PCR) gibi karşılaştırmalı gen anlatım analizlerinde çok kaliteli RNA’ya gereksinim vardır. RNA moleküllerinin miktar ve kalitesininin daha hassas biçimde ölçümüne yönelik çeşitli metodlar geliştirilmiştir. Bunlardan biri olan “NanoDrop” teknolojisi aslında spektrofotometreden oluşmaktadır. Bilinen diğer spektrofotometrelerle kıyaslandığında kullanım kolaylığı ve ölçüm hassasiyeti önemli üstünlükler sumaktadır. Bu alanda geliştirilen bir diğer önemli teknik mikrokanallara sahip çiplerde RNA’ların molekül büyüklüklerine göre elektroforetik olarak ayrılmaları prensibine dayanan “Agilent Bioanalyzer” teknolojisidir.

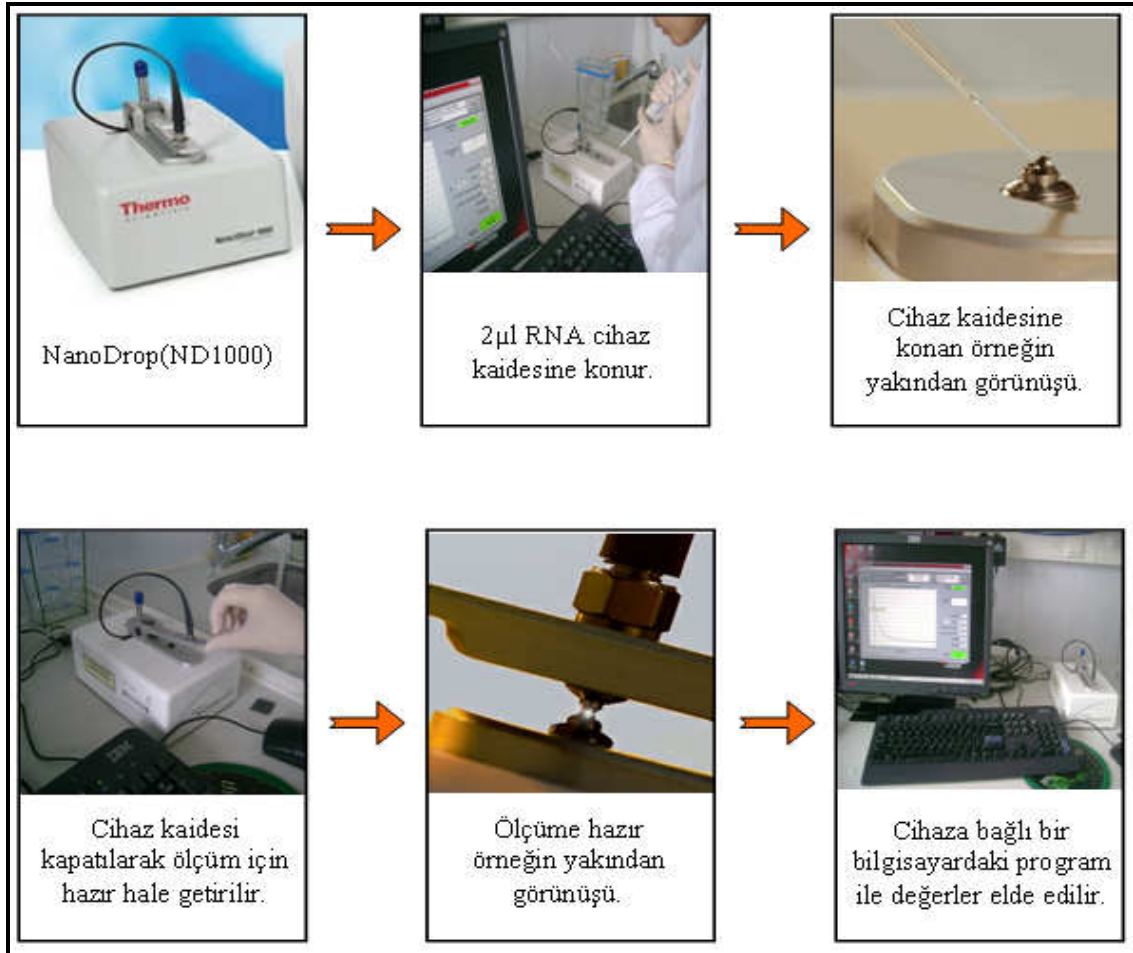
#### 3.6.8.1. NanoDrop (ND1000) ile RNA Örneklerinin Ölçülmesi

“NanoDrop” tekniğinde örnek, örnek kaidesine bir damla halinde yüklenir. Daha sonra örnek aparatı kapatılarak bir damla halinde bulunan örneğe aparat tarafından hafif bir baskı uygulanır. Oluşan bu yüzey gerilimi ile örneğin yerinde kalması sağlanır ve örnek spektrofotometrik olarak okunur. Cihaza bağlı bir bilgisayardaki program ile değerler elde edilir (Şekil 3.19). Ancak ölçümden sonra RNA kalitesi ve DNA kontaminasyonu agaroz jelde kontrol edilmelidir.

RNA örnekleri DEPC’li ddH<sub>2</sub>O ile 1/100 oranında sulandırıldı. Daha sonra NanoDrop (ND1000) ile 260 ve 280 nm dalga boylarında ölçüm yapıldı. RNA örnekleri uygun konsantrasyonlarda sulandırıldı. Cihazın ölçebildiği RNA konsantrasyon aralığı 2–3000 ng/μl’dir. 2 μl nükleazlardan arınmış su NanoDrop cihaz kaidesi üzerine bir damla halinde konuldu ve bilgisayardaki program ile kör (blank) alındı. Daha sonra sulandırılmış RNA örneğinden 2 μl alınarak cihaz kaidesi üzerine bir damla halinde konuldu. Daha sonra cihazın bilgisayarına ait program ile örnekler 230, 260, 280 nm’de okundu. RNA’ların miktar tayini, 260 nm dalga boyunda ölçülen absorbans değerlerine



göre yapıldı.  $A_{260}/A_{280}$  oranı 1.8 -2.0 olan RNA'lar saf olarak kabul edildi. RNA örneklerinin miktar ve saflık tayini yapıldıktan sonra total RNA'nın bütünlüğünün değerlendirildiği DEPC içeren %1'lik agaroz jelin kullanıldığı elektroforez gerçekleştirildi.



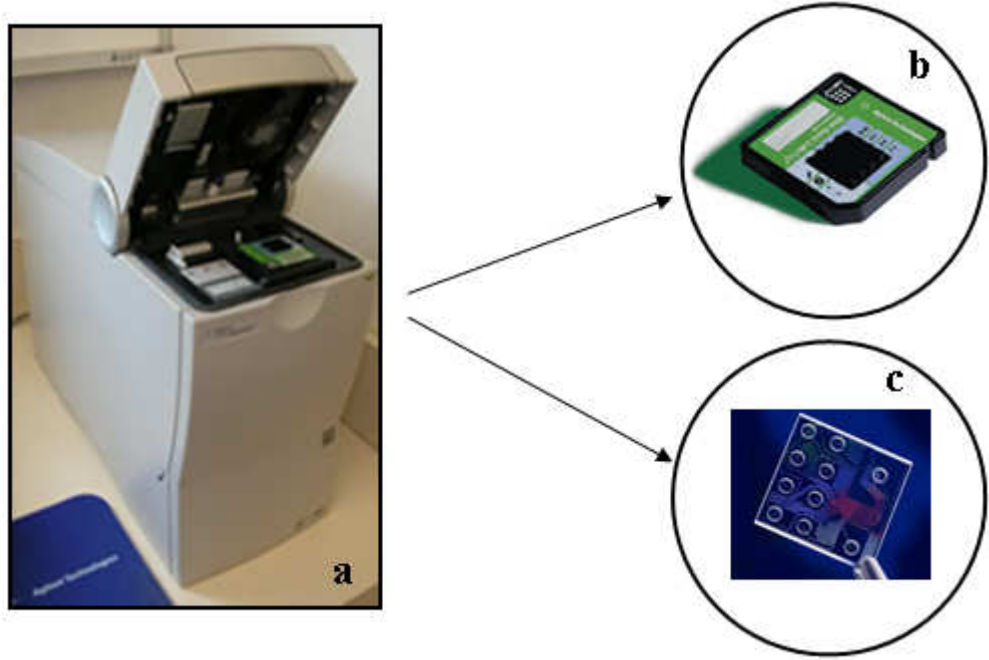
Şekil 3.19: NanoDrop (ND1000) ile RNA'nın konsantrasyonunun belirlenmesi

### 3.6.8.2. Bioanalyzer ile RNA Örneklerinin Ölçülmesi

RNA'lar ayrıca "Agilent Bioanalyzer 2100" cihazı ile de analiz edildi. Cihaz mikrofluid teknolojisine dayalı elektroforez yöntemiyle DNA, RNA ve protein gibi elektrik yüklü molekülleri ayırmakta, ayırım sonucunda elde edilen verileri yazılım programı aracılığı ile standartlarla karşılaştırarak moleküllerin büyüklüğü ve miktarını belirlemektedir.

“Agilent Bioanalyzer tekniği”nde özel çipler ve özeltiiler kullanılmaktadır. Bu ipler “Agilent Bioanalyzer 2100” cihazına yerleştirilir. iplerde çok ince kapillerler vardır. Cihaz moleküllerin klasik elektroforez yöntemiyle ayırma işlemini mikrofluid teknolojisi için geliştirilen çipler aracılığıyla yapmaktadır. Analiz için hazırlık aşamasında bu mikro kanallar jel ve floresan boylarla doldurulur ve böylece her bir kuyucuk ve kanal bir elektrik devresi biçime getirilir. Cihazın kapağında bulunan 16 pinli kartuş, her bir pin (elektrod) bir kuyucuk içine yerleşebilecek şekilde tasarlanmıştır ve her elektrod birbirinden bağımsız bir güç kaynağıyla bağlantılıdır. Örnek, bu kapillerler içinde hareket eder. Bu iplere yüklenen RNA örnekleri ve standart ile RNA bantlarının miktar ve kalitesi standart ile karşılaştırılarak analiz edilir. Cihaz çalıştırıldığında her kanalda klasik jel elektroforezlerinde olduğu gibi bir voltaj gradienti uygulanmış olur ve örneklerde bulunan farklı moleküller, moleköl büyüklüğu ve elektrik yükü oranına bağlı olarak jel porları arasından geçerek birbirinden ayrılır. Ayırma işlemini sırasında elde edilen veriler yazılım programı aracılığıyla ile değerlendirilerek örneklerde hangi büyüklükte moleküller bulunduğu ve miktarı gibi bilgiler detaylı biçimde verilir (şekil 3.20). Ölçüm sonrasında jel görüntüsü mükemmel bir şekilde elde edilmektedir.

Örnek hazırlığı, analizi yapılacak molekölün tipi ve büyüklüğüne uygun olarak hazırlanmış kitlerin kullanım klavuzlarında detaylı biçimde açıklanmıştır. Analiz edilecek örnekler (DNA, RNA ve Protein) kitlerin kullanım klavuzlarında açıklanığı şeklinde hazırlanarak ip kuyucuklarına yerleştirilir.



Şekil 3.20: Agilent Bioanalyzer 2100 cihazı ve parçaları

a) "Agilent Bioanalyzer 2100" cihazı, b) Özel çipler, c) Çiplerin içindeki çok ince kapillerler

### 3. 6. 9. İzolasyonu Yapılan RNA'lara DNaz Uygulanması

Örneklere ait RNA'lara, genomik DNA kontaminasyonunu engellemek amacıyla DNaz uygulaması yapıldı. DNaz uygulaması aşağıda belirtildiği şekilde gerçekleştirildi (Şekil 3.21).

24 $\mu$ l Total RNA (10 $\mu$ g)
3 $\mu$ l DNase reaksiyon buffer (10X)
3 $\mu$ l DNase I (1u/ $\mu$ l)
0,75 $\mu$ l Rnasin (Promega)
<hr/>
30,75 $\mu$ l : Toplam

Şekil 3.21: DNaz uygulamasında kullanılan çözeltiler ve miktarları

Reaksiyon 37 °C de 1 saat inkübe edildi. Bu sürenin sonunda enzim aktivitesi 15 mM EDTA eklendikten sonra 72 °C'de tutularak durduruldu. RNA'lar DEPC içeren %1'lik jelde görüntülendi.

### 3. 6. 10. DNaz Uygulanmış Örneklerle 18S PZR

DNaz uygulanan örneklerde genomik DNA'nın varlığını kontrol etmek amacıyla 18S primerleri kullanılarak PZR gerçekleştirildi (Şekil 3.22).

18S PZR hazırlığı					
4 µl	RNA (DNaz uygulanmış)	94 °C	2 dak	35 döngü	
12.5 µl	2x Master Mix	94 °C	30 sn.		
1.5 µl	18S Forward primer	50 °C	30 sn.		
1.5 µl	18S Reverse primer	72 °C	1 dak		
5.5 µl	H <sub>2</sub> O	72 °C	7 dak.		
25 µl	Tüp başına	4 °C	inkübasyon		

Şekil 3.22: 18 S PZR hazırlığı ve kullanılan PZR programı

### 3. 6. 11. Transkriptlerde Çoklu (Multipleks) Gen Anlatım Analizleri

Gen anlatım analizleri, kontig ve singletonların protein karşılıklarından yola çıkılarak stres ve stresle ilişkili olanlar ayrıca bitkilerde mantar hastalıklarına dayanıklılık mekanizmasında rol oynayan çeşitli genlerin ortak dizileri kullanılarak dayanıklı ve hassas çeşitlerin mantar hastalığına karşı seçilen zaman aralıklarındaki gen anlatım düzeyleri kontrol bitkilerle karşılıklı olarak incelenmeye çalışıldı.

Gen anlatım analizlerinde kullanılan dört farklı multipleks (çoklu primer)((Kontig, Singleton 1, Singleton 2, Hastalık direnç genleri (Resistant genes)) ile beş farklı zaman aralığında (0, 8, 12, 24, 48. saat) altı bitkide (PI178383, Harmankaya99, İzgi01, ES14, Sönmez2001, Aytın98) gen anlatım analizleri gerçekleştirildi.

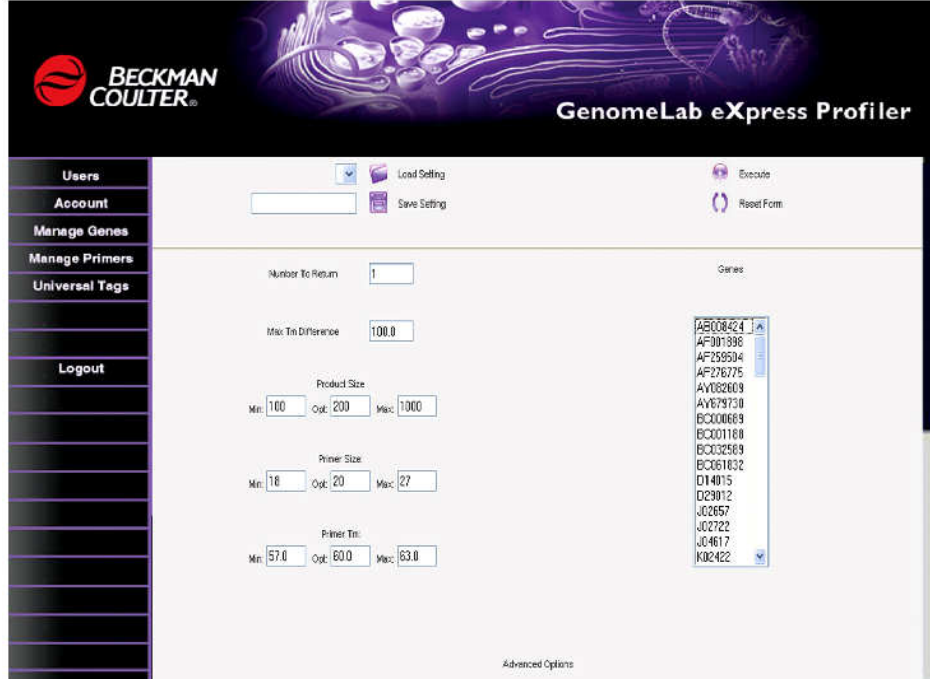
Gen anlatım analizleri birbirini takip eden iki reaksiyonda gerçekleştirildi. Bunlar;

1-Ters transkripsiyon reaksiyonu ile birinci iplik cDNA sentezi.

2-Birinci iplik cDNA kullanılarak gerçekleştirilen çoklu (multipleks) PZR'dir.

Ters transkripsiyon reaksiyonunda ve çoklu PZR'lerde kullanılan geri (revers) ve ileri (forward) primerlerin tasarlanmasında GeXP Genetik Analiz Sistemine ait "eXpress Primer Design" (Şekil 3.23) programı kullanıldı.

Seçilmiş olan transkript dizileri ve sürekli anlatım yapan (housekeeping) genlerden aktin ve gliseraldehit fosfat dehidrogenaz (GAPDH) dizileri birarada kullanılarak primer sentezi gerçekleştirildi.



Şekil 3.23: Gen anlatım analizlerinde kullanılan GeXP Sistemi primer tasarımı programı “eXpress profiler” sayfası (<http://www.beckmancoulter.com>)

### 3.6. 11. 1. Ters Transkripsiyon Reaksiyonu

Gen anlatım analizi çoklu PZR’de cDNA molekülü kalıp olarak kullanıldı. Bu amaçla gen anlatım analizi gerçekleştirilecek örneklerin toplam RNA’larından birinci iplik cDNA sentezi “Beckman GenomeLab GeXP Start Kit” (Katalog No: A21019) kullanılarak gerçekleştirildi. Analiz yapılacak her örneğe ait kontrol ve sarı pas uygulamalarının toplam RNA’ları ters transkripsiyon reaksiyonunda kullanıldı. Ters transkripsiyon reaksiyonunda kullanılan bileşenler Tablo 3.21 de verilmiştir.

Tablo 3.21: GeXP Start kit'e ait ters transkripsiyon reaksiyonu bileşenleri

<b>Bileşenler</b>	<b>Miktar (µl)</b>
dH <sub>2</sub> O	3 µl
5X RT tamponu	4 µl
RT geri primer karışımı (500 nM)	2 µl
Kanamisin RNA'sı	5 µl
Örnek RNA'sı (5–20 ng/ µl)	5 µl
Ters transkriptaz	1 µl
Toplam	20 µl

Ters transkripsiyon reaksiyonunda toplam RNA'dan birinci iplik cDNA sentezi aşağıda belirtilen sıcaklık ve sürelerde gerçekleştirildi (Tablo 3.22).

Tablo 3.22: RNA'dan birinci iplik cDNA sentez koşulları

<b>Basamak</b>	<b>Döngü sayısı</b>	<b>Sıcaklık</b>	<b>Süre</b>
1	1	95°C	10 dk
		94°C	30 sn
2	34	55°C	30 sn
		68°C	1 dk
3	1	4°C	∞

Birinci iplik cDNA molekülü ve çoklu PZR'ye ait ileri primer karışımı kullanılarak seçilmiş olan transkript dizilerine özgü çoğaltım reaksiyonu gerçekleştirildi. Bu reaksiyon ile kontrol ve sarı pas uygulanmış gruplara ait örneklerde çoklu gen anlatım analizleri yapıldı. Çoklu PZR analizlerinde kullanılan bileşenler Tablo 3.23 de verildi.

Tablo 3.23: Çoklu PZR’de kullanılan bileşenler

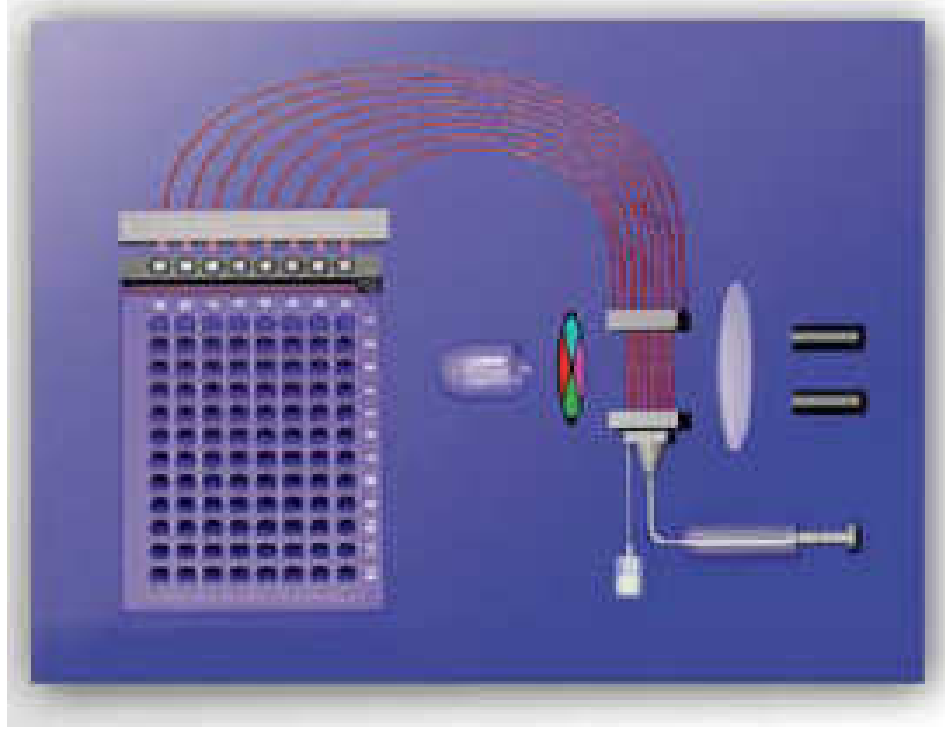
Bileşenler	Miktar ( $\mu$ l)
5 X PZR tamponu	4 $\mu$ l
25 mM MgCl <sub>2</sub>	4 $\mu$ l
İleri primer karışımı (200 nM)	2 $\mu$ l
“Thermo-Start” DNA Polimeraz	0.7 $\mu$ l
RT reaksiyonundan cDNA kalıbı	9.3 $\mu$ l
Toplam hacim	20 $\mu$ l

Çoklu PZR, ileri primer karışımı ile Tablo 3.24 de gösterilen koşullarda gerçekleştirildi.

Tablo 3.24: Çoklu PZR koşulları

Basamak	Döngü sayısı	Sıcaklık	Süre
1	1	48°C	1 dk
2	1	37°C	5 dk
3	1	42°C	60 dk
4	1	95°C	5 dk
5	1	4°C	$\infty$

Çoklu primer karışımı ile gerçekleştirilen PZR sonrasında elde edilen reaksiyon ürünleri, GeXP Genetik Analiz Sisteminde kullanılan 96 örneklik yükleme aparatına yüklenerek, gen anlatım modülü programı ile analiz edildi. Yükleme öncesi örnekler 1:20 oranında 10 mM Tris-HCl (pH: 8.0) kullanılarak sulandırıldı. GeXP Genetik Analiz Sisteminde “frag3” programı altında örneklerin çoklu gen anlatım analizleri için kapiller elektroforez işlemi gerçekleştirildi (Şekil 3.24).



Şekil 3.24: GeXP Genetik Analiz Sisteminde kapiller elektroforez işlemi için kullanılan yönerge şeması (<http://www.beckmancoulter.com>)

Daha önce sulandırılmaları yapılan 1 hacim (1  $\mu$ l) PZR örneği, 19 hacim (19  $\mu$ l) örnek yükleme çözeltisi (Tablo 3.25) ile karıştırılarak analiz için hazırlandı.

Tablo 3.25: Gen anlatım analizinde kullanılan örnek yükleme çözeltisi bileşenleri

Bileşen	Miktar
DNA size standart-400	0.25 $\mu$ l
Örnek yükleme çözeltisi (SLS)	18.75 $\mu$ l



## 4. BULGULAR

### 4.1. EST VERİTABANI ÇALIŞMALARI

Buğdayda sarı pas hastalığı ile ilişkili EST kütüphanesinin belirlenmesi yoluyla, dokulara özgün olarak EST sayısının tespit edilmesi için; [http://wheat.pw.usda.gov/cgi-bin/westsql/est\\_lib.cgi](http://wheat.pw.usda.gov/cgi-bin/westsql/est_lib.cgi) adresi kullanılarak sarı pas uygulanmış buğdaya (*Triticum aestivum*) ait “TA117G1X” isimli 1549 adet EST’ye ulaşıldı (Şekil 4.1).

The screenshot shows the GrainGenes-SQL Query Resources interface. The search query is 'yellow rust' and the target is 'Library'. The results show 'Library TA117G1X with 1549 sequenced ESTs'. Below this, there is a link to 'all library ESTs in FASTA format -> click here'. A red box highlights the search result, and a red arrow points to it.

start over	Query by Library or EST GenBank accession	Query Target
Search:	yellow rust	Library

**Query Results**

Library TA117G1X with 1549 sequenced ESTs

all library ESTs in FASTA format -> [click here](#)

```

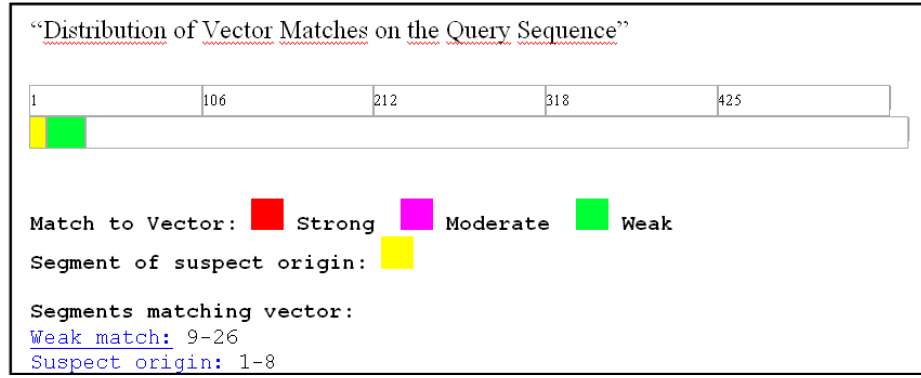
name:      TA117G1X
genus:     Triticum
species:   aestivum
germplasm:
tissue:
stage:
treatment: yellow rust infested
  
```

Şekil 4.1: Sarı pas uygulanmış buğdaya ait EST kitaplığının gösterimi

Belirlenen 1549 adet EST dizisinde vektör kontaminasyonunun varlığını araştırabilmek amacıyla <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen.html> adresi kullanılarak gerçekleştirilen taramalar sonucunda 16 adet EST’ye ait kontaminasyonlu diziler belirlendi ve bu kontaminasyonlu diziler temizlendi (Tablo 4.1, Şekil 4.2)

Tablo 4.1: Buğdaya ait kontaminasyonlu dizileri içeren EST'ler

CA597953	CA597981	CA597987	CA598046
CA598146	CA598156	CA598174	CA598199
CA598353	CA598388	CA598412	CA598440
CA598553	CA598683	CA599081	CA599084

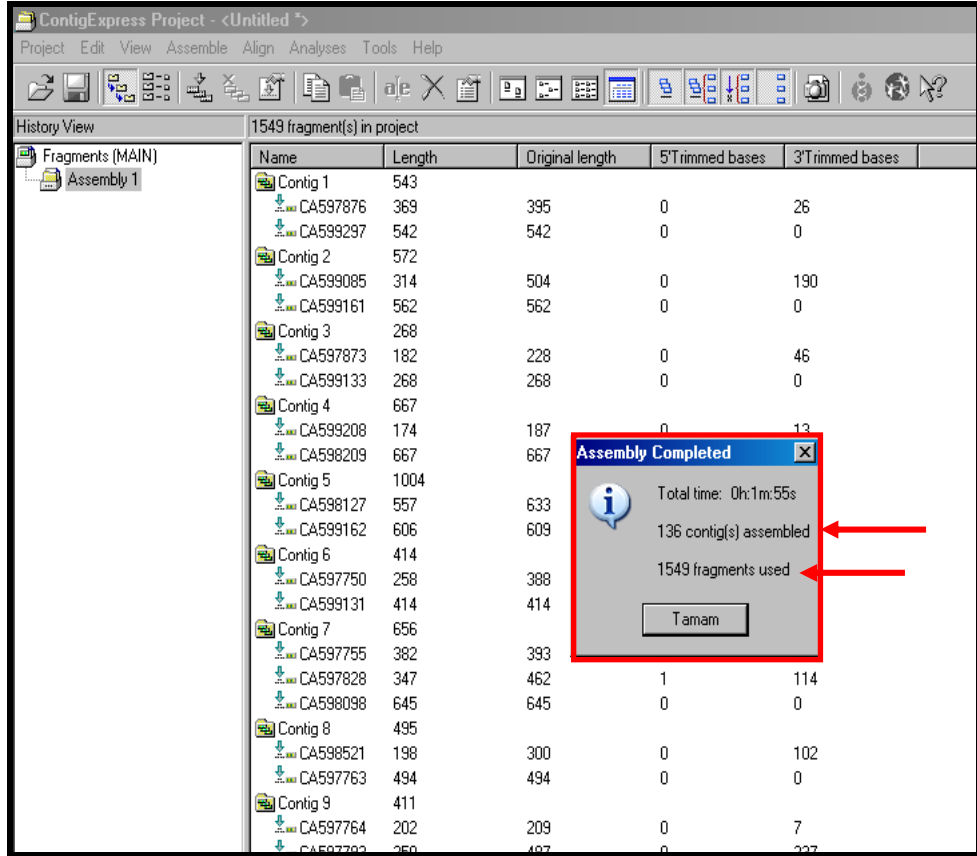


Şekil 4.2: Kontaminasyonlu dizi içeren EST'nin görünümü

Kontaminasyonlu dizileri temizlenen 1549 EST'den 'Vector NTI programı' ile birbirleriyle aynı olan bölgeleri bir araya getirilerek 136 adet kontig oluşturuldu. Kontigleri oluşturan EST'ler sayıldığında 136 adet kontiğe karşılık 560 adet EST olduğu belirlendi. Singletonların bulunması için sarı pasa ait 1549 EST'den kontigleri oluşturan 560 adet EST çıkarıldı. Bu tanımlamaya göre 989 adet singleton bulundu (Tablo 4.2, Şekil 4.3).

Tablo 4.2: Sarı pas uygulanmış *Triticum aestivum*'a ait EST'lerin genel yapısı

Sarı pas uygulanmış <i>Triticum aestivum</i> 'a ait ESTler	
<b>Kitaplık Adı</b>	TA117G1X
<b>Toplam EST sayısı</b>	1549
<b>Kontig Sayısı</b>	136
<b>Toplam kontig boyutu (bç)</b>	80241
<b>Kontigleri oluşturan EST sayısı</b>	560
<b>Singleton sayısı</b>	989 / %63.84
<b>Kontaminasyonlu EST sayısı</b>	16



Şekil 4.3: Contig Express Modülünde EST'ler kullanılarak kontig oluşturulması

Tüm EST'lerin "FASTA formatı"ndaki dizilerinin BlastX analizleri yapıldı. Kontig ve singletonlara karşılık gelen protein profilleri çıkarıldı. Bu çalışmalardan hareketle BlastX sonuçları her bir kontiğin eşleştiği organizma, eşleştiği protein, bu proteinlerin 'BLAST HIT'leri ve erişim numaraları başlıkları altında toplandı (Tablo 4.3, Tablo 4.4).

Tablo 4.3: Kontig dizilerinin BlastX sonuçları

Sorgulanan dizi adı	Blast hit sayısı	Blast sonucunun eşleştiği organizma	Blast sonucunun eşleştiği protein	Erişim numarası
Kontig1	100	<i>Triticum aestivum</i>	ribosomal protein L16	NP_114295
Kontig8	44	<i>Triticum aestivum</i>	ribosomal protein S7	AAW50993
Kontig9	101	<i>Triticum aestivum</i>	lipid transfer protein	ABB90546
Kontig12	101	<i>Triticum aestivum (bread wheat)</i>	Chlorophyll a-b binding protein, chloroplast precursor (LHCII type I CAB) (LHCP).	P04784
Kontig17	100	<i>Triticum aestivum (bread wheat)</i>	Ferredoxin, chloroplast precursor	P00228
Kontig19	100	<i>Triticum aestivum</i>	triosephosphat-isomerase	CAC14917
Kontig21	198	<i>Triticum aestivum</i>	putative glycine decarboxylase subunit	AAM92707
Kontig22	281	<i>Triticum aestivum (bread wheat)</i>	eukaryotic translation initiation factor 5A1	AAZ95171
Kontig24	100	<i>Triticum aestivum (bread wheat)</i>	single-stranded nucleic acid binding protein	AAA75104
Kontig30	100	<i>Triticum aestivum (bread wheat)</i>	cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	AAP83583
Kontig33	294	<i>Triticum aestivum (bread wheat)</i>	chlorophyll a/b-binding protein WCAB precursor [ <i>Triticum aestivum</i> ].	AAB18209
Kontig34	65	<i>Triticum aestivum (bread wheat)</i>	jasmonate-induced protein	AAR20919
Kontig35	44	<i>Triticum aestivum (bread wheat)</i>	Oxygen-evolving enhancer protein 2, chloroplast precursor (OEE2)	Q00434
Kontig39	100	<i>Triticum aestivum (bread wheat)</i>	geranylgeranyl hydrogenase	AAZ67145
Kontig40	100	<i>Triticum aestivum (bread wheat)</i>	chlorophyll a/b-binding protein WCAB precursor	AAB18209
Kontig46	102	<i>Triticum aestivum (bread wheat)</i>	chlorophyll a/b-binding protein WCAB precursor	AAB18209
Kontig49	31	<i>Triticum aestivum (bread wheat)</i>	oxygen-evolving complex precursor	AAP80632
Kontig52	9	<i>Triticum aestivum (bread wheat)</i>	Metallothionein-like protein 1 (MT-1).	P43400
Kontig55	198	<i>Triticum aestivum (bread wheat)</i>	glycine-rich RNA-binding protein	BAF30986
Kontig57	100	<i>Triticum aestivum (bread wheat)</i>	type 1 non-specific lipid transfer protein precursor	CAH04983
Kontig58	33	<i>Triticum aestivum (bread wheat)</i>	RUB1-conjugating enzyme	AAP80608
Kontig63	103	<i>Triticum aestivum (bread wheat)</i>	Oxygen-evolving enhancer protein 1, chloroplast precursor (OEE1) (33 kDa subunit of oxygen evolving system of photosystem II) (OEC 33 kDa subunit) (33 kDa thylakoid membrane protein)	P27665

Tablo 4.3'ün devamı

Sorgulanan dizi adı	Blast hit sayısı	Blast sonucunun eşleştiği organizma	Blast sonucunun eşleştiği protein	Erişim numarası
Kontig85	101	<i>Triticum aestivum (bread wheat)</i>	acidic ribosomal protein P2	AAP80619
Kontig86	199	<i>Triticum aestivum (bread wheat)</i>	cyclophilin A-1	AAK49426
Kontig73	190	<i>Triticum aestivum (bread wheat)</i>	dehydroascorbate reductase	AAL71854
Kontig75	63	<i>Triticum aestivum (bread wheat)</i>	metallothionein	AAP80616
Kontig80	33	<i>Triticum aestivum (bread wheat)</i>	wali7	AAC37416
Kontig90	52	<i>Triticum aestivum (bread wheat)</i>	putative membrane protein	ABB90649
Kontig91	100	<i>Triticum aestivum (bread wheat)</i>	cold shock protein-1	BAB78536
Kontig93	155	<i>Triticum aestivum (bread wheat)</i>	Ps16 protein	BAA22411
Kontig98	109	<i>Triticum aestivum (bread wheat)</i>	Elongation factor 1-alpha (EF-1-alpha)	Q03033
Kontig99	72	<i>Triticum aestivum (bread wheat)</i>	histone H1 WH1A.2	AAD41006
Kontig105	131	<i>Triticum aestivum (bread wheat)</i>	ribulose-bisphosphate carboxylase (EC 4.1.1.39) small chain precursor (clone pWS4.3) - wheat	RKWTS
Kontig110	82	<i>Triticum aestivum (bread wheat)</i>	Cytochrome b6-f complex iron-sulfur subunit, chloroplast precursor (Rieske iron-sulfur protein) (Plastohydroquinone:plastocyanin oxidoreductase iron-sulfur protein) (ISP) (RISP)	Q7X9A6
Kontig113	103	<i>Triticum aestivum (bread wheat)</i>	lipid transfer protein 3	AAP23941
Kontig122	163	<i>Triticum aestivum (bread wheat)</i>	ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase small subunit	BAB19814
Kontig133	100	<i>Triticum aestivum (bread wheat)</i>	ribosomal protein L36	AAW50980
Kontig135	100	<i>Triticum aestivum (bread wheat)</i>	60s ribosomal protein L21	AAP80636
Kontig138	100	<i>Triticum aestivum (bread wheat)</i>	Histone H2A.2.1	P02276

Tablo 4.4: Singleton dizilerinin BlastX sonuçları

Sorgulanan dizi adı	Blast hit sayısı	Blast sonucunun eşleştiği organizma	Blast sonucunun eşleştiği protein	Erişim numarası
CA599282	199	<i>Triticum aestivum</i>	ATP synthase CF1 alpha subunit.	NP_114256
CA599218	88	<i>Triticum aestivum</i>	ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase small subunit.	BAB19811
CA598725	191	<i>Triticum aestivum</i>	ribosomal protein L14.	NP_114294
CA597765	119	<i>Triticum aestivum</i>	RuBisCO large subunit-binding protein subunit alpha, chloroplast precursor (60 kDa chaperonin subunit alpha) (CPN-60 alpha).	P08823
CA597760	100	<i>Triticum aestivum</i>	type 1 non specific lipid transfer protein precursor.	CAH69210
CA597766	3	<i>Triticum aestivum</i>	aintegumenta-like protein.	ABB90555
CA597808	116	<i>Triticum aestivum</i>	geranylgeranyl hydrogenase.	AAZ67145
CA597830	100	<i>Triticum aestivum</i>	14-3-3 protein.	AAR89812
CA597851	49	<i>Triticum aestivum</i>	plastid glutamine synthetase isoform GS2c.	AAZ30062
CA597983	100	<i>Triticum aestivum</i>	GRAB2 protein.	CAA09372
CA598020	103	<i>Triticum aestivum</i>	Protein H2A.5 (wch2A-2).	Q43213
CA598034	100	<i>Triticum aestivum</i>	histone deacetylase.	AAU82113
CA598102	22	<i>Triticum aestivum</i>	WIR1A protein.	Q01482
CA598128	100	<i>Triticum aestivum</i>	probable light-induced protein.	AAP80856
CA598130	100	<i>Triticum aestivum</i>	Tubulin beta-2 chain (Beta-2 tubulin)	Q9ZRB1
CA598143	172	<i>Triticum aestivum</i>	Thioredoxin M-type, chloroplast precursor (TRX-M).	Q9ZP21
CA598151	100	<i>Triticum aestivum</i>	lipid transfer protein precursor .	AAG27707
CA598174	200	<i>Triticum aestivum</i>	S28 ribosomal protein .	AAP80664
CA598181	110	<i>Triticum aestivum</i>	pathogenesis-related protein 1.2 .	CAA07474
CA598182	2	<i>Triticum aestivum</i>	pathogenesis-related protein 1.2 .	CAA07474
CA598187	98	<i>Triticum aestivum</i>	VER2.	BAA32786
CA598196	1	<i>Triticum aestivum</i>	putative cytochrome c oxidase subunit.	AAM92706
CA598235	100	<i>Triticum aestivum</i>	plasma membrane intrinsic protein 1 .	AAF61463

Tablo 4.4'ün devamı

Sorgulanan dizi adı	Blast hit sayısı	Blast sonucunun eşleştiği organizma	Blast sonucunun eşleştiği protein	Erişim numarası
CA598239	151	<i>Triticum aestivum</i>	triose phosphate translocator.	AAK01174
CA598244	14	<i>Triticum aestivum</i>	glycosyltransferase.	CAI30070
CA598256	100	<i>Triticum aestivum</i>	heat shock protein 80.	AAD11549
CA598258	22	<i>Triticum aestivum</i>	fasciclin-like protein FLA26 .	ABI95416
CA598286	80	<i>Triticum aestivum</i>	Elongation factor 1-beta (EF-1-beta)	P29546
CA598296	106	<i>Triticum aestivum</i>	beta-1,3-glucanase precursor	AAD28734
CA598314	11	<i>Triticum aestivum</i>	Oxygen-evolving enhancer protein 2, chloroplast precursor (OEE2)	Q00434
CA598347	114	<i>Triticum aestivum</i>	putative ribosomal protein S18	AAM92708
CA598359	198	<i>Triticum aestivum</i>	sucrose synthase type I	CAA04543
CA598366	105	<i>Triticum aestivum</i>	receptor-like kinase protein	AAS93629
CA598421	121	<i>Triticum aestivum</i>	ribulose-bisphosphate carboxylase (EC 4.1.1.39) small chain precursor (clone pWS4.3).	RKWTS
CA598422	75	<i>Triticum aestivum</i>	wali5.	AAA50850
CA598432	99	<i>Triticum aestivum</i>	ribosomal protein P1	AAW50990
CA598476	100	<i>Triticum aestivum</i>	LRR19	AAK20736
CA598485	100	<i>Triticum aestivum</i>	ribulosebisphosphate carboxylase	CAA25058
CA598489	64	<i>Triticum aestivum</i>	histone H2A	AAB00193
CA598518	157	<i>Triticum aestivum</i>	phosphoribulokinase; ribulose-5-phosphate kinase	CAA41020
CA598523	100	<i>Triticum aestivum</i>	ribosomal protein L19	AAP80858
CA598557	79	<i>Triticum aestivum</i>	type 2 non specific lipid transfer protein precursor	CAH69201
CA598577	252	<i>Triticum aestivum</i>	Ferredoxin, chloroplast precursor.	P00228
CA598584	258	<i>Triticum aestivum</i>	putative fructose 1-,6-biphosphate aldolase .	CAD12665
CA598630	101	<i>Triticum aestivum</i>	Translationally-controlled tumor protein homolog (TCTP)	Q8LRM8
CA598637	100	<i>Triticum aestivum</i>	histone H2A	AAB00193



Tablo 4.4'ün devamı

Sorgulanan dizi adı	Blast hit sayısı	Blast sonucunun eşleştiği organizma	Blast sonucunun eşleştiği protein	Erişim numarası
CA598672	100	<i>Triticum aestivum</i>	lipid transfer protein	ABB90546
CA598674	100	<i>Triticum aestivum</i>	glutathione transferase F6	CAD29479
CA598677	100	<i>Triticum aestivum</i>	ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase small subunit	BAB19812
CA598687	55	<i>Triticum aestivum</i>	wall6.	AAC37417
CA598691	100	<i>Triticum aestivum</i>	type 1 non-specific lipid transfer protein precursor	CAH04983
CA598694	45	<i>Triticum aestivum</i>	cold-responsive LEA/RAB-related COR protein	AF255053
CA598700	195	<i>Triticum aestivum</i>	fructan 1-exohydrolase	CAD48199
CA598719	24	<i>Triticum aestivum</i>	50S ribosomal protein L9, chloroplast precursor (CL9)	Q8L803
CA598755	100	<i>Triticum aestivum</i>	type 1 non specific lipid transfer protein precursor	CAH69190
CA598762	95,9	<i>Triticum aestivum</i>	Cysteine synthase (O-acetylserine sulfhydrylase) (O-acetylserine (Thio)-lyase) (CSase A) (OAS-TL A).	P38076
CA598818	100	<i>Triticum aestivum</i>	putative fructose 1-,6-bisphosphate aldolase.	CAD12665
CA598837	128	<i>Triticum aestivum</i>	glutathione S-transferase.	AAD56395
CA598848	167	<i>Triticum monococcum</i> .	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.	AAW68026
CA598850	42	<i>Triticum aestivum</i>	putative proteinase inhibitor-related protein.	AAS49905
CA598919	43	<i>Triticum aestivum</i>	ferredoxin-NADP(H) oxidoreductase .	CAD30024
CA599168	137	<i>Triticum aestivum</i>	cold acclimation induced protein 2-1 .	AAV16797
CA599172	135	<i>Triticum aestivum</i>	stress responsive protein	AAV44603
CA599235	100	<i>Triticum aestivum</i>	beta-expansin TaEXPB3 .	AAT99294
CA599238	77	<i>Triticum aestivum</i>	Oxygen-evolving enhancer protein 2, chloroplast precursor (OEE2) (23 kDa subunit of oxygen evolving system of photosystem II) (OEC 23 kDa subunit) (23 kDa thylakoid membrane protein).	Q00434
CA599257	101	<i>Triticum monococcum</i>	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.	AAW68026
CA599262	196	<i>Triticum aestivum</i>	Histone H2A.2.1	P02276
CA599265	2	<i>Triticum aestivum</i>	Phosphoglycerate kinase, chloroplast precursor	P12782



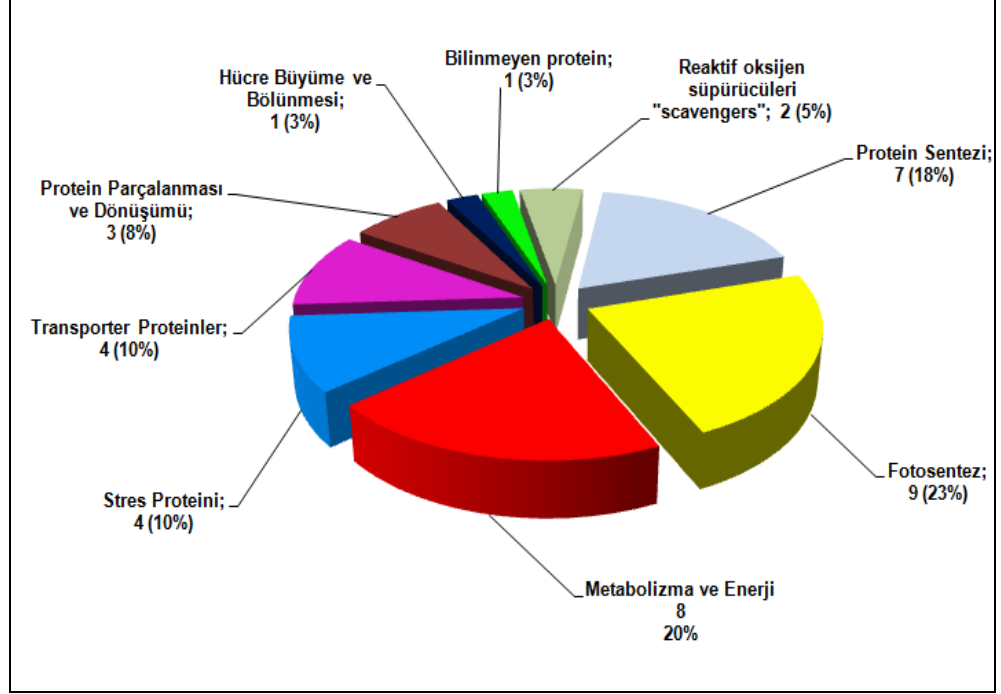
Tablo 4.4'ün devamı

Sorgulanan dizi adı	Blast hit sayısı	Blast sonucunun eşleştiği organizma	Blast sonucunun eşleştiği protein	Erişim numarası
CA599271	100	<i>Triticum aestivum</i>	ribosomal protein L18	AAW 50985
CA599273	68	<i>Triticum aestivum</i>	Outer mitochondrial membrane protein porin (Voltage-dependent anion-selective channel protein) (VDAC).	P46274
CA599277	103	<i>Triticum aestivum</i>	putative SKP1 protein	CAE53885
CA599285	154	<i>Triticum aestivum</i>	putative lipid transfer protein	ABB90547
CA598802	100	<i>Triticum aestivum</i>	ribosomal protein L11	AAW 50983
CA598930	100	<i>Triticum aestivum</i>	thioredoxin h .	CAB96931
CA598940	199	<i>Triticum aestivum</i>	cyc07	AAP80855
CA598941	298	<i>Triticum aestivum</i>	calcium-dependent protein kinase .	ABY59005
CA598949	100	<i>Triticum aestivum</i>	putative 40S ribosomal protein S3 .	AAM92710
CA598961	100	<i>Triticum aestivum</i>	ribosomal protein L13a	AAW 50984
CA598962	57	<i>Triticum aestivum</i>	reversibly glycosylated polypeptide .	CAA77237
CA598966	282	<i>Triticum aestivum</i>	MAP kinase	ABS11090
CA598975	105	<i>Triticum aestivum</i>	(1,3;1,4) beta glucanase	CAA80493
CA598980	31	<i>Triticum aestivum</i>	minichromosomal maintenance factor .	AAS68103
CA599013	100	<i>Triticum aestivum</i>	D1 protease-like protein precursor .	AAL99044
CA599015	17	<i>Triticum aestivum</i>	putative beta-expansin	BAD06319
CA599032	114	<i>Triticum aestivum</i>	tonoplast intrinsic protein	ABI96817
CA599049	41	<i>Triticum aestivum</i>	porphobilinogen deaminase	AAL12221
CA599099	100	<i>Triticum aestivum</i>	gamma-type tonoplast intrinsic protein .	AAD10494
CA599101	100	<i>Triticum aestivum</i>	small GTP-binding protein .	AAD28731
CA599103	19	<i>Triticum aestivum</i>	pre-mRNA processing factor	AAV84871
CA599107	82	<i>Triticum aestivum</i>	Sedoheptulose-1,7-bisphosphatase, chloroplast precursor (Sedoheptulose bisphosphatase) (SBPase) (SED(1,7)P2ase).	P46285

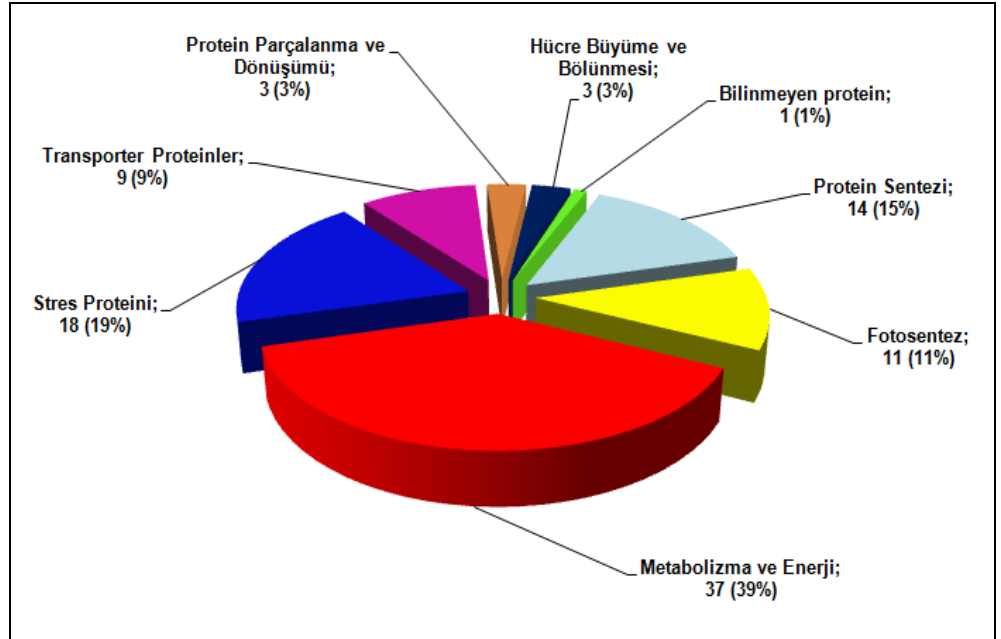
Tablo 4.4'ün devamı

Sorgulanan dizi adı	Blast hit sayısı	Blast sonucunun eşleştiği organizma	Blast sonucunun eşleştiği protein	Erişim numarası
CA599110	199	<i>Triticum aestivum</i>	Ribulose biphosphate carboxylase small chain PWS4.3, chloroplast precursor (RuBisCO small subunit PWS4.3).	F00871
CA599114	3	<i>Triticum aestivum</i>	Metallothionein-like protein 1 (MT-1).	P43400
CA599115	178	<i>Triticum aestivum</i>	type 1 non specific lipid transfer protein precursor .	CAH69199
CA599119	5	<i>Triticum aestivum</i>	putative high mobility group protein .	CAI64395
CA599121	51	<i>Triticum aestivum</i>	putative proteinase inhibitor-related protein .	AAS49905
CA599135	257	<i>Triticum aestivum</i>	putative cellulose synthase	BAD06322

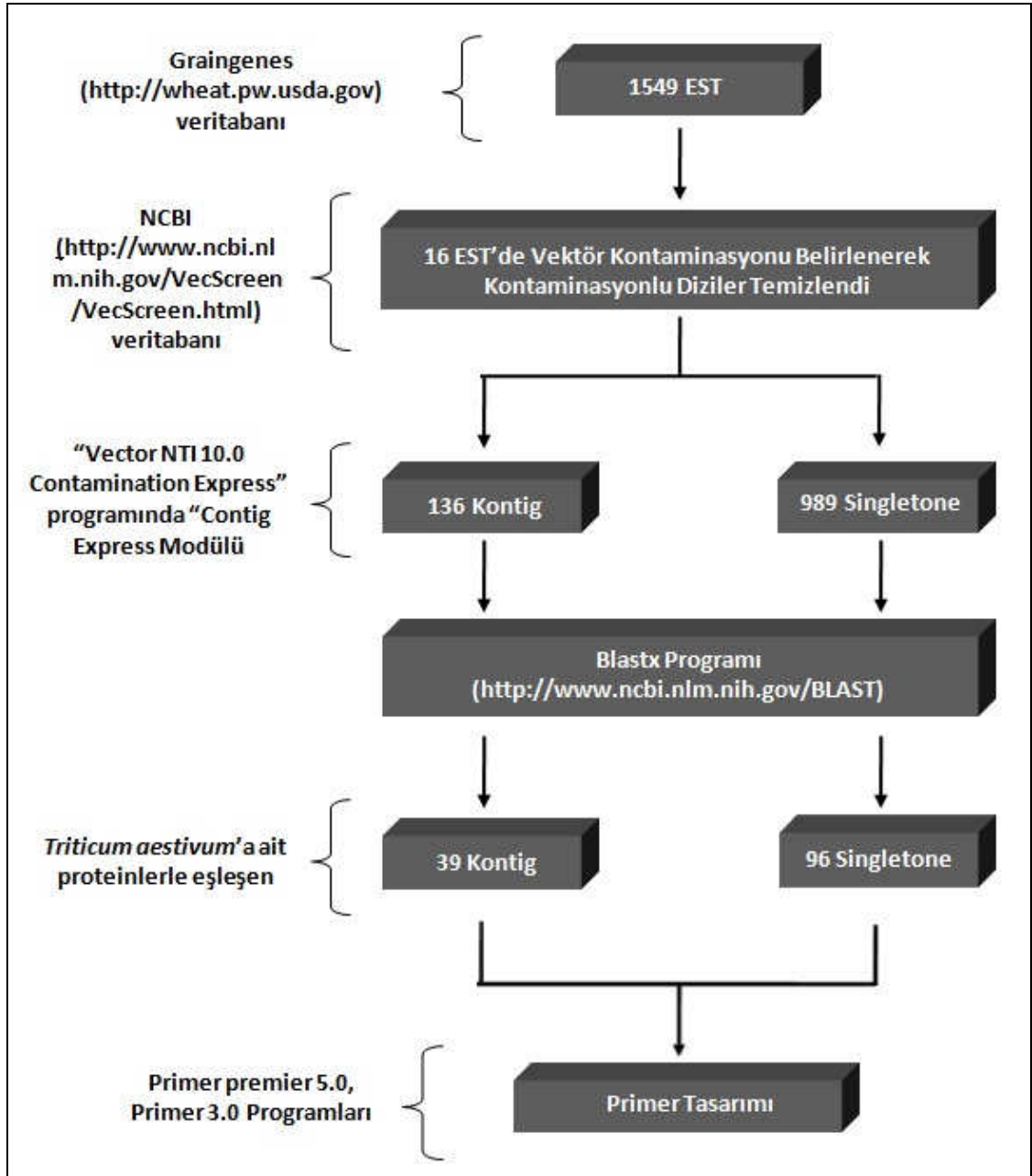
*Triticum aestivum*'la eşleşen kontig ve singletonlar seçilerek değerlendirildi (Şekil 4.4, Şekil 4.5). Çalışmanın aşamaları Şekil 4.6 da ayrıntılı olarak gösterilmektedir.



Şekil 4.4: Sarı pas mantarı bulaştırılmış *Triticum aestivum*'a ait kontiglerin BlastX analizi sonucu protein profilleri



Şekil 4.5: Sarı pas mantarı bulaştırılmış *Triticum aestivum*'a ait singletonların BlastX analizi sonucu protein profilleri



Şekil 4.6: DNA (EST) düzeyinde çalışmaların akış şeması

## 4. 2. DNA DÜZEYİNDE GERÇEKLEŞTİRİLEN ÇALIŞMALAR

### 4. 2. 1. Primer Tasarımı

Primer 3.0 ve Primer Premier 5.0 programları kullanılarak *Triticum aestivum*'a ait kontiglerden 39 adet, singletonlardan ise 92 adet primer tasarlandı (Şekil 4.7). Yapılan PZR analizlerinde kullanılan primerlere tasarlandığı kontiğin veya singletonun adı verildi.

	Rating	Seq No	Length	Tm [°C]	GC%	ΔG [kcal/mol]	Activity [μg/OD]	Degeneracy	Ta Opt [°C]
Sense	100	1	18	59.1	55.6	-37.0	32.0	1	--
Anti-sense	92	409	19	54.8	52.6	-36.8	31.3	1	--
Product	89	--	409	94.8	65.2	--	--	--	57.8

#	Rating	Tm [°C]	Product Size	Ta Opt [°C]	Mark
6	91	57.5 54.8	221	56.7	<input type="checkbox"/>
7	90	0.0 0.0	114	35.3	<input type="checkbox"/>
8	89	59.1 54.8	409	57.8	<input type="checkbox"/>
9	88	59.1 57.0	176	58.3	<input type="checkbox"/>
10	88	59.1 58.6	174	59.0	<input type="checkbox"/>

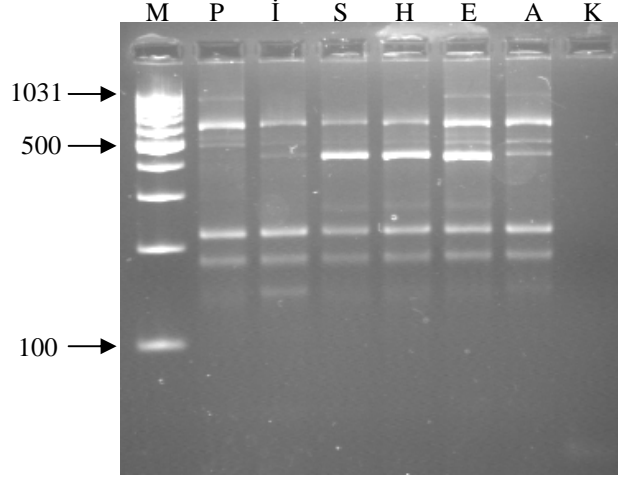
Şekil 4.7: Primer Premier 5.0 programının gösterimi

### 4. 2. 2. EST Kökenli Primerleri ile Gerçekleştirilen PZR Analizleri

#### 4.2.2.1. Anaçların DNA'ları ile Gerçekleştirilen PZR Sonuçları

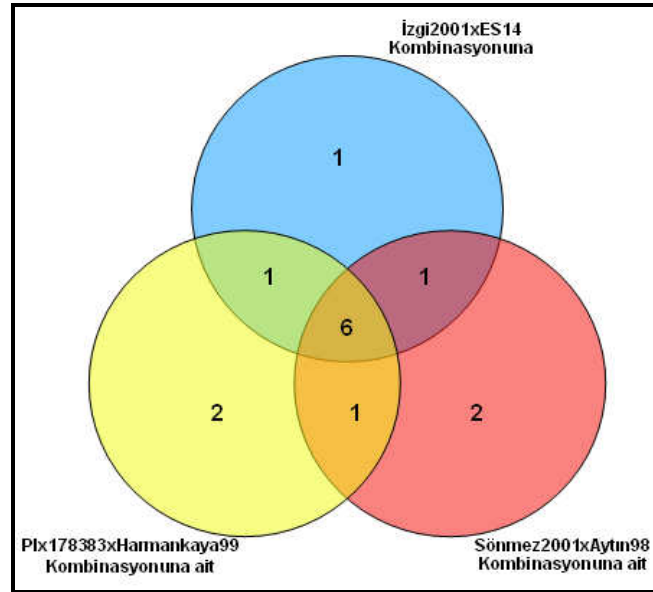
Anaçlara ait DNA'lar kullanılarak PZR analizleri gerçekleştirilen 39 adet kontig primerinin 14 tanesi polimorfik 24 tanesi ise monomorfik bant profili gösterdi, primerlerden birinde ise çoğaltım gözlenmedi (Şekil 4.8). Farklı kombinasyonlara göre (PI178383xHarmankaya99, İzgi2001xES14 ve Sönmez2001xAydın98 kombinasyonları) monomorfik ve polimorfik bant yapısı gösteren kontiglere ait primerler listelendi (Tablo 4.5). Bu primerlerin 6 tanesi (Kontig 46, Kontig 55, Kontig 65, Kontig 66, Kontig 75, Kontig 136) her üç kombinasyonda da (PI178383xHarmankaya99, İzgi2001xES14 ve Sönmez2001 x Aydın98 kombinasyonları) polimorfizm gösterirken, 2 tanesi (Kontig 19,

Kontig 90) sadece P1178383xHarmankaya99, 1 tanesi (Kontig 110) İzgi2001xES14, 2 tanesi ise (Kontig 17, Kontig 133) Sönmez2001 x Aydın98 kombinasyonlarında polimorfizm gösterdi (Şekil 4.9). Kontiglerin polimorfizm gösteren primerlerinin fonksiyonel kategorileri belirlenerek şema halinde gösterildi (Şekil 4.10).



Şekil 4.8: Polimorfizm gözlenen kontig primerine (Kontig 46) örnek

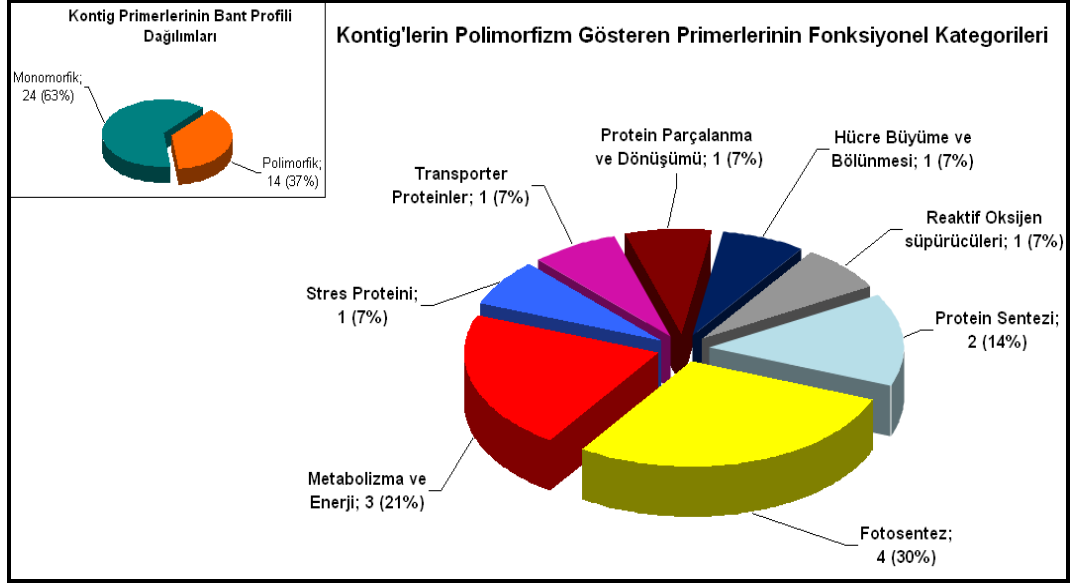
M: 100bp DNA Ladder, P:P1178383, İ:İzgi01, S:Sönmez2001, H:Harmankaya99, E:ES14, A:Aydın98, K: Kontrol



Şekil 4.9: Polimorfizm gösteren kontig primerlerinin kombinasyonlarına göre dağılımını gösteren şema

Tablo 4.5: Farklı kombinasyonlara göre monomorfik ve polimorfik bant yapısı gösteren kontig primerlerinin listelenmesi

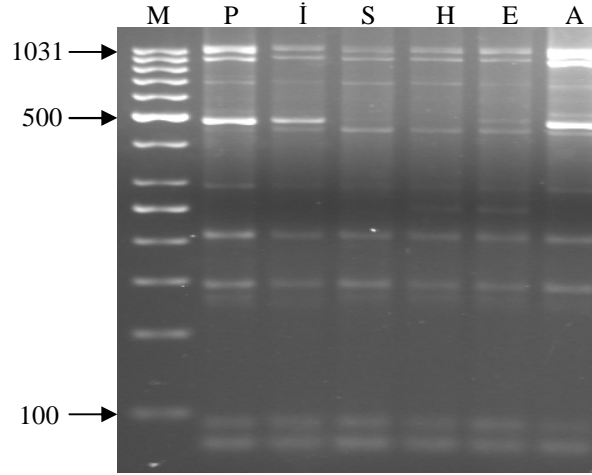
Kombinasyonlar	Monomorfik Bant Yapısı Gösteren Primerler			Polimorfik Bant Yapısı Gösteren Primerler
PII78383 x Harmankaya99	Kontig 1	Kontig 30	Kontig 113	Kontig 46
	Kontig 8	Kontig 99	Kontig 52	Kontig 65
	Kontig 22	Kontig 39	Kontig 93	Kontig 75
	Kontig 96	Kontig 34	Kontig 133	Kontig 73
	Kontig 135	Kontig 80	Kontig 17	Kontig 136
	Kontig 12	Kontig 91	Kontig 110	Kontig 19
	Kontig 33	Kontig 21	Kontig 49	Kontig 90
	Kontig 35	Kontig 58	Kontig 105	Kontig 66
	Kontig 40	Kontig 9	Kontig 122	Kontig 55
	Kontig 63	Kontig 57	Kontig 24	
İzgi2001 x ES14	Kontig 1	Kontig 30	Kontig 52	Kontig 75
	Kontig 8	Kontig 99	Kontig 93	Kontig 66
	Kontig 22	Kontig 39	Kontig 73	Kontig 46
	Kontig 96	Kontig 34	Kontig 133	Kontig 65
	Kontig 135	Kontig 80	Kontig 17	Kontig 136
	Kontig 12	Kontig 90	Kontig 19	Kontig 110
	Kontig 33	Kontig 91		Kontig 49
	Kontig 35	Kontig 21		Kontig 24
	Kontig 40	Kontig 58		Kontig 55
	Kontig 63	Kontig 9		
	Kontig 105	Kontig 57		
Kontig 122	Kontig 113			
Sönmez2001 x Aytın98	Kontig 1	Kontig 63	Kontig 57	Kontig 46
	Kontig 8	Kontig 105	Kontig 113	Kontig 65
	Kontig 22	Kontig 122	Kontig 52	Kontig 55
	Kontig 96	Kontig 30	Kontig 93	Kontig 73
	Kontig 135	Kontig 99	Kontig 110	Kontig 136
	Kontig 12	Kontig 39	Kontig 24	Kontig 133
	Kontig 33	Kontig 34	Kontig 19	Kontig 17
	Kontig 35	Kontig 80	Kontig 90	Kontig 49
	Kontig 40	Kontig 91	Kontig 58	Kontig 75
	Kontig 9	Kontig 21		Kontig 66



Şekil 4.10: Kontiglerin polimorfizm gösteren primerlerinin fonksiyonel kategorilerinin şematik gösterimi

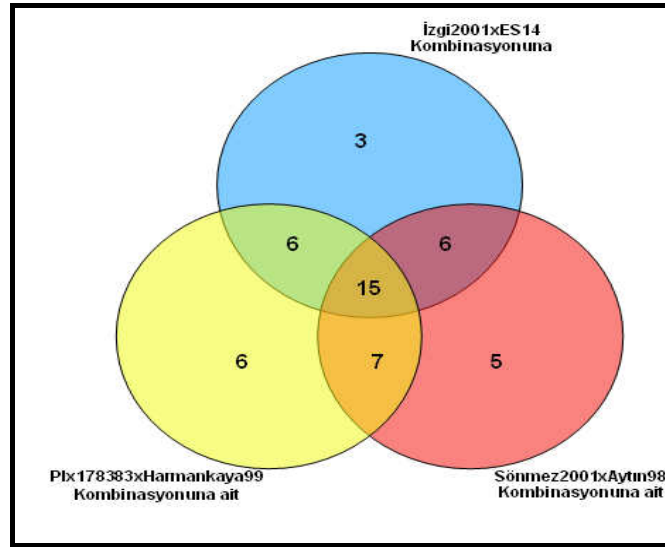
Anaçlara ait DNA'lar kullanılarak yapılan PZR analizlerinde kullanılan 92 adet singleton primerinin 48 tanesi polimorfik 44 tanesi ise monomorfik bant profili gösterdi (Şekil 4.11). Farklı kombinasyonlara göre monomorfik ve polimorfik bant yapısı gösteren singletonlara ait primerler listelendi (Tablo 4. 6). Bu primerlerin 15 tanesi her üç kombinasyonda da (PI178383xHarmankaya99, İzgi2001xES14 ve Sönmez2001 x Aytın98 kombinasyonları) (CA598286, CA598949, CA599135, CA598359, CA597808, CA598102, CA599285, CA598366, CA598577, CA598432, CA598485, CA599032, CA598244, CA599166, CA598258) polimorfizm gösterirken, 6 tanesi sadece PI178383xHarmankaya99 (CA598850, CA598557, CA598523, CA598818, CA598296, CA599172), 3 tanesi İzgi2001xES14 (CA598941, CA598421, CA599110), 5 tanesi ise Sönmez2001 x Aytın98 kombinasyonlarında (CA598196, CA597760, CA598584, CA599099, CA598700) polimorfizm gösterdi (Şekil 4. 12). Singletonların polimorfizm gösteren primerlerinin fonksiyonel kategorileri belirlenerek şema halinde gösterildi (Şekil 4.13).





Şekil 4.11: Polimorfizm gözlenen singleton primerine (CA598286) örnek

M: 100bp DNA Ladder, P:PI178383, İ:İzgi01, S:Sönmez2001, H:Harmankaya99, E:ES14, A:Aytın98

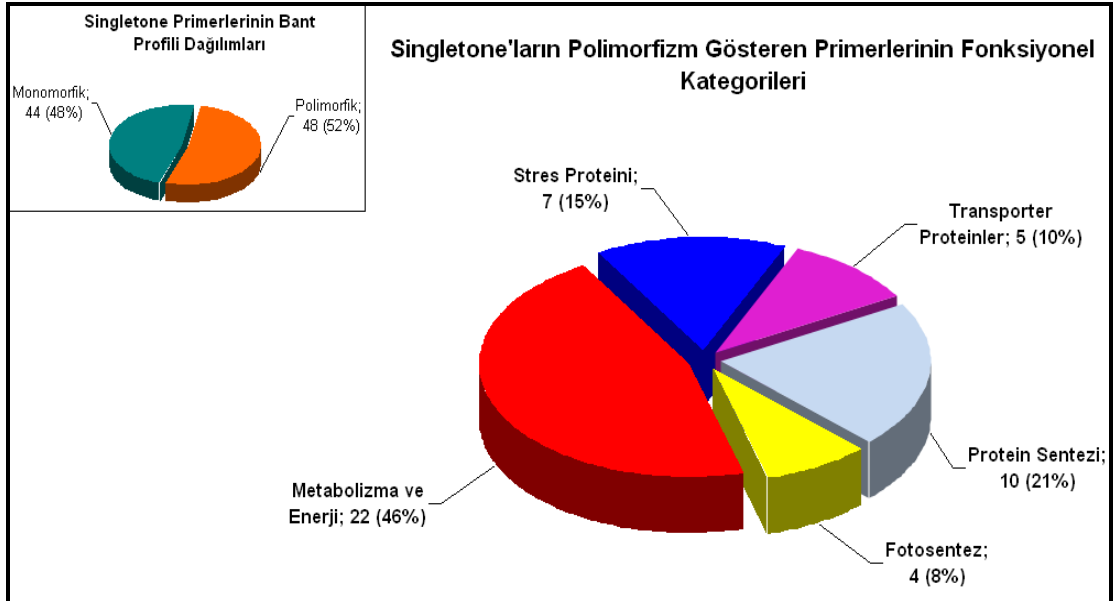


Şekil 4.12: Polimorfizm gösteren singleton primerlerinin kombinasyonlarına göre dağılımını gösteren şema

Tablo 4.6: Farklı kombinasyonlara göre monomorfik ve polimorfik bant yapısı gösteren singleton primerlerinin listelenmesi

Kombinasyonlar	Monomorfik Bant Yapısı Gösteren Primerler			Polimorfik Bant Yapısı Gösteren Primerler	
PI178383 x Harmankaya99	CA599262	CA598034	CA599013	CA598286	CA599285
	CA599110	CA598196	CA598962	CA598850	CA598314
	CA598174	CA597760	CA597830	CA598949	CA598366
	CA598762	CA598672	CA597983	CA598975	CA598577
	CA598725	CA598941	CA598181	CA599135	CA599115
	CA599103	CA598966	CA598187	CA598359	CA598719
	CA597765	CA599107	CA598256	CA598637	CA598432
	CA598239	CA598584	CA598422	CA597808	CA598523
	CA599238	CA599099	CA598476	CA598961	CA598940
	CA598919	CA598848	CA598630	CA599121	CA598258
	CA598930	CA598421	CA598687	CA598557	CA598347
	CA598143	CA598700	CA598694	CA598102	CA599271
	CA599282	CA598020	CA598151	CA597851	CA599218
	CA598677	CA598130	CA598691	CA599032	CA598485
	CA598518	CA598235	CA598755	CA598244	CA598818
	CA599101	CA598674	CA599273	CA598802	
	CA598837	CA599114	CA599235	CA598296	
	CA599257	CA599049	CA598980	CA599166	
	CA599015	CA598128	CA599119	CA599172	
İzgi2001 x ES14	CA598850	CA598919	CA598256	CA598286	CA598848
	CA599119	CA598930	CA598422	CA598949	CA598432
	CA598128	CA598143	CA598476	CA598975	CA598421
	CA598196	CA599282	CA598630	CA599135	CA598940
	CA598637	CA598677	CA598687	CA599166	CA598258
	CA597760	CA598518	CA598694	CA598102	CA599262
	CA598961	CA599101	CA598151	CA598366	CA598347
	CA599121	CA598837	CA598691	CA598034	CA599218
	CA598557	CA599257	CA598755	CA598359	CA598485
	CA598584	CA598020	CA599273	CA598672	
	CA599099	CA598130	CA599235	CA598577	
	CA599115	CA598235	CA599277	CA598719	
	CA598523	CA598674	CA598980	CA597808	
	CA598700	CA599114	CA599015	CA598941	
	CA599271	CA599049	CA598725	CA599285	
	CA598818	CA599013	CA599103	CA598966	
	CA597851	CA598962	CA597765	CA599107	
	CA598802	CA597830	CA598239	CA598314	
	CA598296	CA597983	CA599238	CA599032	
	CA599172	CA598181	CA598762	CA599110	
CA598174	CA598187		CA598244		

Sönmez2001 x Aytın98	CA598850	CA598837	CA598694	CA598286	CA599107
	CA598975	CA599257	CA598151	CA598949	CA598577
	CA598128	CA598020	CA598691	CA599135	CA598584
	CA598557	CA598130	CA598755	CA598034	CA599099
	CA598941	CA598235	CA599273	CA597808	CA599115
	CA598314	CA598674	CA599235	CA598961	CA598848
	CA598719	CA599114	CA599277	CA598196	CA598432
	CA598523	CA599049	CA598980	CA598102	CA598700
	CA598421	CA599013	CA599015	CA598802	CA598258
	CA598940	CA598962	CA599119	CA598359	CA599262
	CA598347	CA597830	CA599103	CA599166	CA599271
	CA599218	CA597983	CA597765	CA598366	CA598485
	CA598818	CA598181	CA598239	CA598637	CA597851
	CA599110	CA598187	CA599238	CA597760	
	CA598296	CA598256	CA598919	CA598672	
	CA599172	CA598422	CA598930	CA599121	
	CA598174	CA598476	CA598143	CA599285	
	CA598762	CA598630	CA599282	CA598966	
	CA598725	CA598687	CA598677	CA599032	
	CA599101	CA598518		CA598244	
Primer yapımına uygun olmayan EST Dizileri	CA599265	CA598489	CA598182	CA597766	

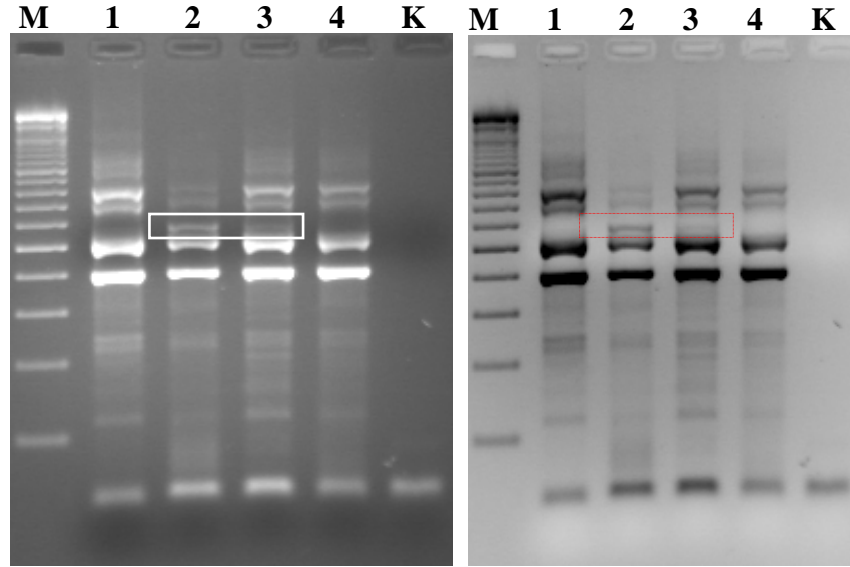


Şekil 4.13: Singletonların polimorfizm gösteren primerlerinin fonksiyonel kategorilerinin şematik gösterimi

Kontig ve singleton primerler ile anaç bitkiler kullanılarak yapılan analizler sonucu PII78383xHarmankaya99, İzgi2001xES14 ve Sönmez2001xAytın98 kombinasyonunda polimorfizm gözlenen primerler ile “Bulk Segregasyon Analizleri” gerçekleştirildi. Burada, ergin döneme ve fide dönemine ait F<sub>2</sub> DNA karışımları kullanıldı ve anaç bitkiler ile gerçekleştirilen analizler sonucunda görülen polimorfizmin bu karışımlar arasında olup olmadığı incelendi.

#### 4.2.2.2. Bulk DNA'ları ile Gerçekleştirilen PZR Sonuçları

Anaç DNA'larında polimorfizm gösteren 14 adet kontig ve 48 adet singleton primeri ile “Bulk Segregasyon Analizi” gerçekleştirildi. Dayanıklı çeşit olan Sönmez2001 ve duyarlı çeşit olan Aytın98 arasında polimorfizm gösteren CA599121 isimli singleton primeri kullanılarak gerçekleştirilen “Bulk Segregasyon Analizi” örnek olarak gösterilmektedir. (Şekil 4.14).



Şekil 4.14: Sönmez2001 x Aytın98 kombinasyonuna ait CA599121 primeri kullanılarak elde edilen PZR ürünleri

M: 100+500bp DNA Ladder, 1. Aytın98, 2. Sönmez2001, 3. Sönmez2001 x Aytın98 kombinasyonuna ait fide dönemi dayanıklı F<sub>2</sub> DNA karışımı, 4. Sönmez2001 x Aytın98 kombinasyonuna ait fide dönemi hassas F<sub>2</sub> DNA karışımı, K. Kontrol

Şekil 4.14 e göre dayanıklı çeşit olan Sönmez2001’de görülen işaretlenmiş bant, duyarlı çeşit olan Aytın98’de görülmediğinden bu bant açısından anaçlar arasında bir polimorfizm gözlenmektedir. Bulk Segregasyon Analizlerinde elde edilen polimorfik

bir bant profilinin markır niteliği taşıması için, çoğaltımdan sonra elde edilen ürünlerde dayanıklı anaç ve dayanıklı F<sub>2</sub> DNA karışımında (bulk) bulunan, duyarlı anaç ve duyarlı F<sub>2</sub> DNA karışımında bulunmayan veya duyarlı anaç ve duyarlı F<sub>2</sub> DNA karışımında bulunan, dayanıklı anaç ve dayanıklı F<sub>2</sub> DNA karışımında bulunmayan bir bant profili gözlemlenmelidir. Ayrıca, F<sub>2</sub> karışımlarında görülen bant yapısının bu karışımları oluşturan F<sub>2</sub> bireylerinin de her birinde gözlemlenmesi gerekmektedir. Sönmez2001 ve Aytın98 arasında görülen işaretli bant Bulk Segregasyon Analizleri sonucunda fide dönemi Sönmez2001 x Aytın98 dayanıklı F<sub>2</sub> DNA karışımında gözlenmekte fakat duyarlı F<sub>2</sub> DNA karışımlarında gözlenmemektedir. Anaçlar arasında markır niteliği taşıdığı düşünülen, polimorfizm gösteren bu bant profilinin bulku oluşturan her bir DNA ile yapılan PZR analizleri incelendiğinde bu primerin markır niteliği taşımadığı belirlendi.

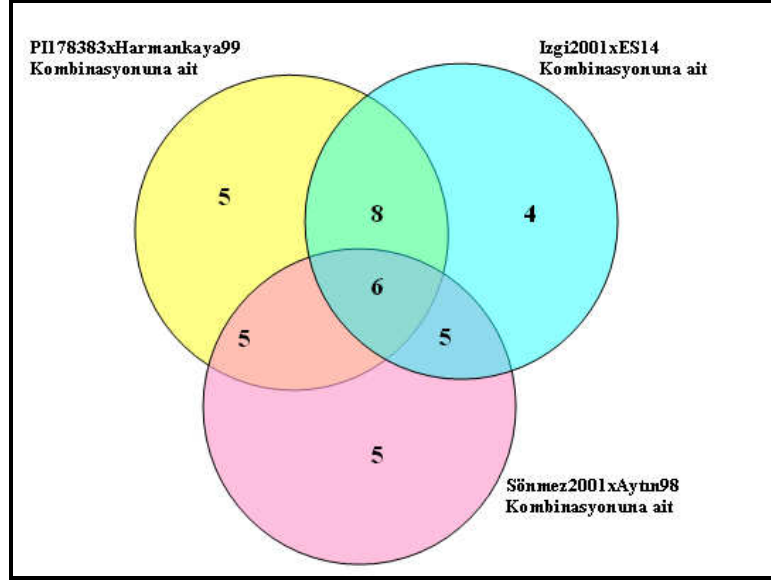
#### **4.2.3. Buğdaya Ait RGA Dizilerinin Belirlenmesi**

Buğdaya ait NBS-LRR sınıfına ait iki NBS bölgesinden kökenlenen ve buğdaya ait NBS (nukleotid bağlanma bölgesi) içeren 77 RGA-EST dizisi mantar hastalığı ile bağlantı gösteren markır elde edebilmek ve genetik uzaklık çalışmaları için kullanıldı. Buğdaya ait 15 RGA-EST dizisinde kontaminasyon belirlendi.

#### **4. 2. 4. RGA-EST Kökenli Primerler ile Gerçekleştirilen PZR Analizleri**

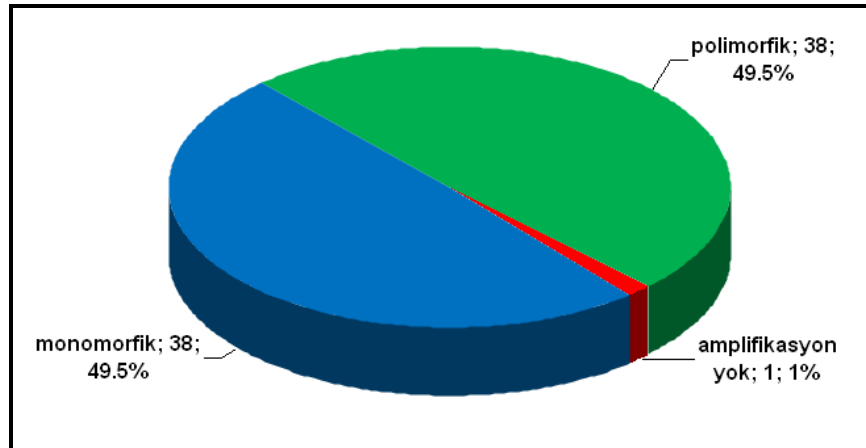
##### *4.2.4.1. Anaçların DNA'ları ile Gerçekleştirilen PZR Sonuçları*

Farklı kombinasyonlara göre monomorfik ve polimorfik bant yapısı gösteren RGA'lara ait primerler listelendi (Şekil 4.15, Tablo 4. 7).



Şekil 4.15: Polimorfizm gösteren RGAP primerlerinin kombinasyonlarına göre dağılımını gösteren şema

RGA primerlerinin 38 tanesi monomorfik, 38 tanesi ise polimorfik bant profili gösterdi. Primerlerden 1 tanesi ise çoğaltım ürünü göstermedi (Şekil 4.16).



Şekil 4.16: Anaçlarda RGAP primerleri kullanılarak gerçekleştirilen PZR sonuçları

Tablo 4.7: Farklı kombinasyonlara göre monomorfik ve polimorfik bant yapısı gösteren RGA'lara ait primerlerin listelenmesi

Kombinasyonlar	Monomorfik Bant Yapısı Gösteren Primerler			Polimorfik Bant Yapısı Gösteren Primerler	
PII78383 x Harmankaya99	BJ255861(7)	BQ901277(23)	BJ207304(82)	BE400250(1)	CA742849(40)
	BJ270203(10)	CA500988(25)	CA744411(83)	BE405711(2)	CA501245(60)
	BQ802688(21)	CA600403(26)	BJ276947(84)	BE499177(4)	BJ245188(59)
	CA499328(41)	CA606728(27)	BJ225910(85)	CA679534(33)	BE500158(5)
	BJ286558(12)	CA662651(31)	BE405507(87)	BU099584(71)	BQ743300(80)
	BQ239089(15)	CA726158(36)	BE418533(126)	BE498831(3)	CA652512(29)
	BQ803195(22)	CA741642(38)	BF199788(127)	BF482358(6)	CA692539(53)
	CA662188(30)	CA742788(39)	BF473313(128)	BQ753146(19)	CA610289(28)
	CA740494(73)	BM134773(61)	BE445244(129)	CA681703(34)	
	BJ258770(8)	BQ752781(62)	BE605005(130)	CA725884(35)	
	BJ272146(11)	BE591190(63)	BE426789(131)	CA733486(37)	
	BJ295708(13)	CD910548(64)	CA736742(72)	BJ300496(14)	
	BQ241493(16)	BE517538(65)	CA724373(74)	CA676926(32)	
	BQ246913(17)	CA497657(66)	BJ277253(79)	CA498317(75)	
	BQ579469(18)	CA617198(68)	BF484437(81)	CA696482(76)	
	BJ213107(77)	BM134978(70)		BJ316279(78)	
İzgi2001 x ES14	BE400250(1)	CA741642(38)	BJ276947(84)	BJ255861(7)	CA727476(86)
	BE405711(2)	CA742788(39)	BJ225910(85)	BJ270203(10)	BU100242(24)
	BE499177(4)	BM134773(61)	BE405507(87)	BQ802688(21)	CA652512(29)
	BJ258770(8)	BQ752781(62)	BE418533(126)	CA499328(41)	CA692539(53)
	BJ272146(11)	BE591190(63)	BF199788(127)	BE498831(3)	CA498317(75)
	BJ286558(12)	CD910548(64)	BF473313(128)	BF482358(6)	CA696482(76)
	BJ295708(13)	BE517538(65)	BE445244(129)	BQ753146(19)	BJ316279(78)
	BQ239089(15)	CA497657(66)	BE605005(130)	CA681703(34)	
	BQ246913(17)	CA617198(68)	BE426789(131)	CA725884(35)	
	BQ579469(18)	BM134978(70)	CA606728(27)	CA733486(37)	
	BQ803195(22)	CA736742(72)	CA662651(31)	BJ269157(9)	
	BQ901277(23)	CA724373(74)	CA726158(36)	CA742849(40)	
	CA500988(25)	BJ213107(77)	BU099584(71)	BJ246024(58)	
	CA600403(26)	BJ277253(79)	CA740494(73)	CA501245(60)	
	CA679534(33)	BF484437(81)	CA744411(83)	BQ744464(67)	
	CA662188(30)	BJ207304(82)		BE500158(5)	

Sönmez2001 x Aytın98	BE400250(1)	CA500988(25)	CA736742(72)	BJ286558(12)	CA681703(34)
	BE405711(2)	CA600403(26)	CA724373(74)	BQ239089(15)	CA725884(35)
	BE499177(4)	CA606728(27)	BJ213107(77)	BQ803195(22)	CA733486(37)
	CA679534(33)	CA662651(31)	BJ277253(79)	CA662188(30)	BJ269157(9)
	BU099584(71)	CA726158(36)	BF484437(81)	CA740494(73)	BJ300496(14)
	BJ255861(7)	CA741642(38)	BJ207304(82)	BE498831(3)	
	BJ270203(10)	CA742788(39)	CA744411(83)	BF482358(6)	
	BQ802688(21)	BM134773(61)	BJ225910(85)	BQ753146(19)	
	CA499328(41)	BQ752781(62)	BE418533(126)	CA676926(32)	
	BJ258770(8)	BE591190(63)	BF199788(127)	CA610289(28)	
	BJ272146(11)	CD910548(64)	BF473313(128)	BQ743300(80)	
	BJ295708(13)	BE517538(65)	BE605005(130)	CA727476(86)	
	BQ246913(17)	CA497657(66)	BE445244(129)	BU100242(24)	
	BQ579469(18)	CA617198(68)	BE426789(131)	BJ246024(58)	
	BQ901277(23)	BM134978(70)		BQ744464(67)	
	BE405507(87)	BJ276947(84)		BJ245188(59)	

Anaç DNA'larında polimorfizm gösteren 38 adet RGA primeri ile "Bulk Segregasyon Analizi" gerçekleştirildi. Anaçlar arasında gözlenen polimorfizmlere karşılık, Bulk Segregasyon Analizleri sonucunda fide dönemi ve ergin dönem dayanıklı ve duyarlı F<sub>2</sub> DNA karışımlarında bu bantlar açısından polimorfizm elde edilmemiştir. Bu nedenle, anaçlar arasında polimorfik olan bu bant profilleri markır niteliği taşımamaktadır.

#### 4. 2. 5. Dendogram Hazırlanması

##### 4.2.5.1. EST Kökenli Primerler Kullanılarak Buğday Çeşitleri Arasındaki Genetik Benzerliğin Belirlenmesi

Sarı pas uygulanmış buğdaya ait EST kökenli primerler (39 adet kontig ve 92 adet singleton primeri) kullanılarak çalışmada kullanılan dayanıklı ve hassas kışlık ekmeklik buğday çeşitlerinin genetik uzaklık ve benzerlik matrisi ve dendogramı oluşturuldu (Tablo 4. 8) (Şekil 4.17).

Çalışmalarımızda kullanılan dayanıklı ve hassas kışlık ekmeklik buğdayın genetik yakınlığı, sarı pas uygulanmış buğdaya ait TA117G1X isimli EST kitaplığı kullanılarak elde edilen 39 kontig ve 92 singleton primeri ile karakterize edildi. Hassas ve dayanıklı çeşitler arasında 14 kontig ve 48 singleton primeri polimorfik bant profili gösterdi. Hassas ve dayanıklı çeşitlerin POPGENE programı kullanılarak belirlenen genetik



uzaklığı ve genetik benzerliği Tablo 4. 7 de gösterildi. Çeşitlerin uzaklığı 0 ile 0.3973 arasında değişmektedir. En uzak çeşitler Aytın98 ve Izgi01 olarak belirlendi. Uzaklık 0.3973'tür. En yakın çeşitler ise Harmankaya99 ve Sönmez2001'dir (0.2359). Dendogram 2 ana kola ayrılmaktadır. İlk kol sadece Aytın98'i içermektedir. İkinci kol ise 2 alt kola ayrılmaktadır. Alt kollardan ilki PI178383 ve Izgi01'i içermektedir. İkinci alt kol ise kendi içinde tekrar iki alt kola ayrılmaktadır. İlki sadece ES14'ü, ikincisi ise Sönmez2001 ve Harmankaya99'u içermektedir.

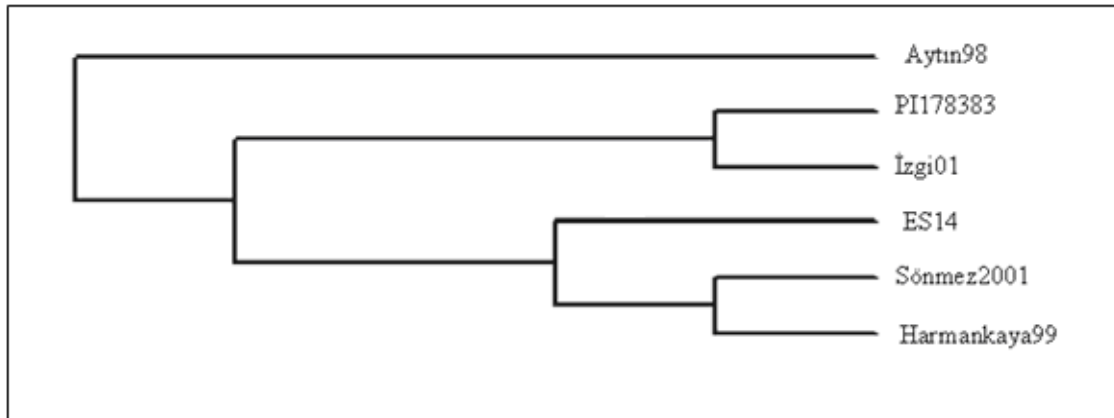
Dendogram Şekil 4.17 de gösterilmektedir. Oluşturulan dendogram EST kökenli kontig ve singletonların yakın genotipler arasında büyük oranda genetik çeşitlilik tespit edebileceğini göstermektedir.

Tablo 4.8. Dayanıklı ve hassas *Triticum aestivum* çeşitlerinin Nei's (1978)'ye göre genetik uzaklık ve genetik benzerlik matrisi

pop ID	PI178383	Izgi01	Sönmez2001	Harmankaya99	ES14	Aytın98
PI178383	****	0.7443 †	0.7253†	0.7532†	0.7392†	0.7025†
Izgi01	0.2953‡	****	0.7633†	0.7456†	0.7165†	0.6722†
Sönmez2001	0.3211‡	0.2701‡	****	0.7899†	0.7506†	0.6835†
Harmankaya99	0.2835‡	0.2936‡	0.2359‡	****	0.7684†	0.7038†
ES14	0.3021‡	0.3334‡	0.2868‡	0.2635‡	****	0.7481†
Aytın98	0.3531‡	0.3973‡	0.3805‡	0.3513‡	0.2902‡	****

†Genetik benzerlik“identity” .

‡ Genetik uzaklık “ distance”.



Şekil 4.17. PHYLIP 3.5. versiyonunun göre değiştirilmiş Nei (1978) genetik uzaklığına göre oluşturulan populasyonların dendogramı

#### 4.2.5.1. RGA-EST Kökenli Primerler Kullanılarak Buğday Çeşitleri Arasındaki Genetik Benzerliğin Belirlenmesi

Buğdaya ait EST kökenli RGAP primerler (77 adet) kullanılarak çalışmada kullanılan dayanıklı ve hassas kışlık ekmeklik buğday çeşitlerinin genetik uzaklık ve benzerlik matrisi ve dendogramı oluşturuldu (Tablo 4.9) (Şekil 4.18).

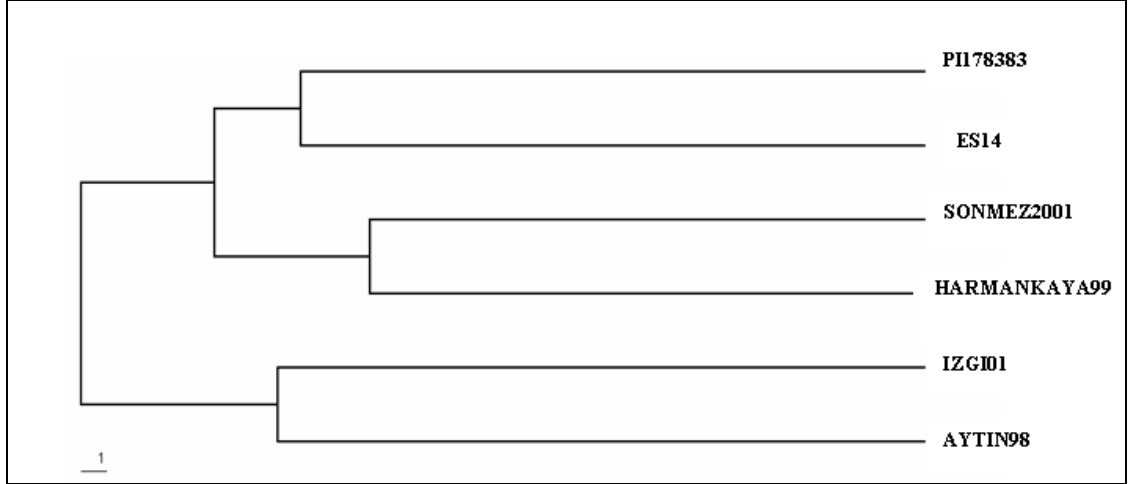
Hassas ve dayanıklı çeşitler arasında 38 RGAP primeri polimorfik bant profili gösterdi. Hassas ve dayanıklı çeşitlerin POPGENE programı kullanılarak belirlenen genetik uzaklığı ve genetik benzerliği Tablo 4.8 de gösterilmiştir. Çeşitlerin uzaklığı 0 ile 0.7274 arasında değişmektedir. En uzak çeşitler PI178383 ve Izgi01 olarak belirlenmiştir. Uzaklık 0.7274'tür. En yakın çeşitler ise Harmankaya99 ve Sönmez2001'dir (0.4282). Dendogram 2 ana kola ayrılmaktadır. İlk kol kendi içinde yine 2 kola ayrılmaktadır. Bu alt kollardan biri PI178383 ve ES14'ü, diğeri ise Sönmez2001 ve Harmankaya99'u içermektedir. İkinci alt kol ise Izgi01 ve Aytın98'i içermektedir. Dendogram Şekil 4.18 de gösterilmektedir. Oluşturulan dendogram EST-RGA kökenli primerlerin yakın genotipler arasında büyük oranda genetik çeşitlilik tespit edebileceğini göstermektedir.

Tablo 4.9: Dayanıklı ve hassas *Triticum aestivum* çeşitlerinin Nei (1978)'ye göre genetik uzaklık ve genetik benzerlik matrisi

pop ID	PI178383	Izgi01	Sönmez2001	Harmankaya99	ES14	Aytın98
PI178383	****	0.4831†	0.5281†	0.5843†	0.6180†	0.4944†
Izgi01	<b>0.7274‡</b>	****	0.5281†	0.5393†	0.5281†	0.6067†
Sönmez2001	0.6385‡	0.6385‡	****	0.6517†	0.5955†	0.6067†
Harmankaya99	0.5374‡	0.6174‡	<b>0.4282‡</b>	****	0.6067†	0.5056†
ES14	0.4813‡	0.6385‡	0.5183‡	0.4997‡	****	0.4944†
Aytın98	0.7044‡	0.4997‡	0.4997‡	0.6820‡	0.7044‡	****

† Genetik benzerlik "identity"

‡ Genetik uzaklık "distance"



Şekil 4.18: PHYLIP 3.5. versiyonunun göre değiştirilmiş Nei genetik uzaklığına (Nei 1978) göre oluşturulan popülasyonların dendogramı

### 4. 3. RNA DÜZEYİNDE GERÇEKLEŞTİRİLEN ÇALIŞMALAR

#### 4.3.1. Gen Anlatım Analizlerinde Kullanılmak Üzere Dayanıklılık Mekanizmasında Rol Oynadığı Düşünülen Genlerin Ortak Dizilerinin Belirlenmesi

Buğday ve farklı organizmalarda dayanıklılık mekanizmasında rol oynadığı düşünülen genlerin (PR1 (Pathogenesis Related Gene 1), PR4 (Pathogenesis Related Gene 4), PR5 (Pathogenesis Related Gene 5), MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase), RAD6 (Ubiquitin-Conjugating Enzyme), Hsp70 (Heat Shock Protein 70), Hsp90 (Heat Shock Srotein 90), SGT1 (Suppressor of G2 Allele of Skp1), RAR1 (Required for *Mla12* Resistance), RLK (Receptor Like Kinase)) mRNA dizilerinin, “BioEdit programı” kullanılarak karşılaştırılması sonucu elde edilen ortak diziler ve bu diziler kullanılarak sentez edilen GeXP primerlerinin çoğaltım ürünleri Tablo 4.10 da gösterilmektedir.

Tablo 4.10: Hastalık direnç mekanizması ile ilişkili genlere ait dizilerin korunmuş bölgelerinin ve çoğaltım ürünlerinin gösterimi

Gen	Genin çeşitli organizmalardaki ortak dizileri
PR4	GCAACGTATCATTACTACCGGCCAGCGCAGAATAACTGGGACCTGGGCGGCCCGCGGTGAGCGCTACTGCGCAACCTGGGACGCCAGCAAGCCGCTGTCTGGCGGTCCAAGTACGGGTGGACGGCCTTCTGCGCCCCCGCGGCCACGGGCAGGCGGCGTGCAGCAAGTGCCTCCGGGTGACGAACCCGGCAGCGGGGCGCAGGTGACGGCGAGGATCGTGGACCAGTGCCCAACGGCGGGCTGGACCTGGACTGGGACACCGTCTTCAACCAAGATCGACACCAACGGGATCGGGTACCAGCAAGCCATCTTAATGT
MAPK	GATACATGGGGGAGGGAACGGCATCGTCGACGGCTTCCGCCGCTTGTCCACCGCCGCACGCCCTCCGGCTCCGTGCTCGGCAGTTCCAACCAGTCTCCGCCGGCAGGACTCCTCCGACGTGCGAGCCGCGAGGGCCTGGATCTCGTGGGCTCCGCTCCATCCGCGTCCCAAGCGCAAGATGCCGCTCCCGTCGAGAGCCACAAGAAGAACAATAATGGAGAAAGAATTCTCACAGAGTATGGAGAGGCAAGCCAGTACCAAAATCCAAGAAGTTGTTGGCAAGGGGAGTTATGGAGTAGTGTCTGCTGCAATAGATACCCGCACCGGCGAGCGGGTTCGATTAAGAAGATCAATGACGTGTTGAGCACGTCCTCGGATGCCACACGCATCCTCCGCGAGGTCAAGTCTTCCGGCTGCTACGTCATCCAGACGTGGTAGAGATCAAGCACATAATGCTCCCCCTTCTCGGAGGGAGTTCCAAGATATATATGTGTTTTCGAGCTGATGGAGTCAGATCTCCATCAGGTCATCAGAGCGAATGATGACCTCACAGCTGAGCAATACCAGTTTTCTTTACCAGCTTCTCCGCGCTCTCAAGTACATCCATGGGGCTAATGTATTTATCGCGATCTGAAGCCCAAGAATATACTGGCCAACGCAGACTGCAAACTGAAAATTTGTGACTTGGACTTGC CGTGTATCATTTAATGATGCTCCTTACGCTATATTTGGACGGATTATGTAGCAA CAAGGTGGTACAGGGCCCTGAATTATGTGGCTCCTTTTTCTCGAAATACACTCCTGCTATTGATATTTGGAGTATTGGATGCATATTTGCCGAGCTTCTACTGGACGGCCACTCTTCTGGGAAGAATGTTCGTACACCAGTTAGATATAATAACAGATCTTCTTGGAACTCCATCATCAGAAACCTTATCTCGGATTCGAAATGAGAAGGCCAGGAGGTACTTAAGTTGCATGCGAAAAAACACCCGTGACCTTGACTCAGAAATTTCTAATGCTGATCCATTGGCGGTTCCGCTACTGGGTCGTTTACTTGCATTTGATCCTAAAGACCGCCTTACGCTGAAGAGGCTTTAGCAGACCCATATTTTGCATCTCTTGGCAATGTGGAGCGTGAGCCTTCAAGGCATCCAATTTGAACTTGAAGTTGAGTTTGGAGAGACGAAAGGTGACAAAAGATGATGTTAGGGAATTGATCTATCGAGAGATTTTGGAGTACCATCCACAGATGGAGGAATACATGAAAGGTGGAGACCAGATTAGCTTCTATCCAAAGTGGTGTGACCGCTTTAAACGGCAGTTTGCACACCTGGAGGAGCATTACAGCAAAGGAGAACGAGGTTCTCCGCTGCAAAGAAAGCATGCCTTTTACCAAGGCAGAGGGTAGGTGCATCGAACGACGGTAATAATGAGCAGCATATTAGTGATCAGGAGATGAGTGCAGAGCCTGATGCCCATGGTGCAGTGAGCCCTCAAAAGTCAAGGATGCACCCGGTGTGGCCAGAATGGTCTGAGCCCCACCAGCTTGAGCCGCGGACCTCAAGAGCGCGAGCATTAGCGCTTCCAAGTGCCTGTTGTCAACCCGAATAAACAGCCAGAGTATGACGACGCGATCTCTGAGGAAACAGAAGGAGCCGTCGATGGACTATCCGAGAAGGTCTCAAAGATGCATGCCTAG
Rad6	CGACGCCGGCAGGAAGCGCCTGATGCGGACTTCAAGCGGCTGCAGCAGGACCCGCCCGCGGCATCAGCGGCGCGCCGCACGACAACAACATCACCTCTGGAAACGCCGTCATATTTGGGCCTGATGACACGCCGTGGGATGGAGGTACGTTCAAGCTGACCTGCAATTCACAGAAGATTACCCCAA CAAGCCACCAACTGTTCCGGTTTGTCTCAAGGATGTTTACCCAAACATTTATGCAGATGGAAGCATCTGCTTGGACATCTTACAGAACCAGTGGAGCCCTATATATGATGTTGCAGCAATATTGACCTTATCCAGTCCCTGCTGTGCGACCCGAACCCGAATTCTCCTGCGAACTCTGAAGCAGCCAGAATGTACAGCGAGAACAAAGCGCGAGTACAACCGCAAGGTTCTGTGAGGTCGTGGAGCAGAGCTGGACAGCGGACTAGCGTTGCCAGATCCTGCAATAA
PR1	GAGCTACGCCAACCAGAGGATCAACGACTGCAAGCTCCAGCACTCGGGCGGGCCGTACGGGGA GAACATCTTCTGGGGTCCGCCGCGCGGACTGGAAGGCGGCGACGCGGTGAACGCGTGGGTGGCGAAAAGAAGGACTACGACTACGGCTCCAAACCTGCGCGGCGGGGAAGGTGTGCGGGC ACTACACGCAGGTGGTGTGGCGCGCTCAACCAGCATCGGCTGCGCCCGCGTCTGCAACAATAAACCTCGGCGTCTTTCATCACTGCAACTACGACCCCGGGAATATCATTGGACAGAACC ATACTA

<p><b>Hsp90</b></p>	<p>ATGGCGACGGAGACCGGACCTTCGCCTTCCAGGCCGAGATCAACCAGCTCCTCTCGCTCATCA TCAACACCTTCTACTCCAACAAGGAGATCTTCTCCGCGAGCTCATCTCCAACCTCCTCCGATGCC TTGGACAAGATCAGGTTCGAGAGCCTCACGGACAAGAGCAAGCTAGACGCGCAGCCCGAGCTC TTCATCCACATCATCCCGGACAAGGGCGACCAACACGCTCACGATCGTTGACAGCGGCATTGGGA TGACCAAGTCCGACCTCGTCAACAACTCGGGACCATCGCCAGGTCCGGGACCAAGGAGTTCA TGGAGGCCCTCGCCGCGGCGCCGACGTGTCCATGATTGGGCAGTTCGGTGTCCGTTTCTACTC CGCCTACCTCGTCGCCGAGAGGGTTGTCTGTCAACCAAGCACAACGACGACGAGCAGTACGT GTGGGAGTCCCAGGCCGGTGGCTCCTTACCCTCACTCGTGATACGTCTGGGGAGCAGCTCGGC AGGGGTACCAAGATGGTCTTACTCAAGGACGACCAGATGGAATACCTTGAGGAGCGCCGC ATCAAGGATCTAGTTAAGAAGCACTCTGAGTTTATCAGCTACCCATCTCCCTGTGGACTGAGA AGCCACCGAGAAGGAAATTTCTGATGATGAAGATGAGGAGGAGAAGAAGGATACTGAGGAG GGCAAGGTTGAGGATGTTGATGAGGAGAAGGAAGAGAAGGAAAAAGAAGAAAAAGGATCA AGGAAGTCTCTACGAGTGAACCTGGTCAACAAGCAGAAGCCGATCTGGATGAGGAAGCCAG AGGAGATCAACAAGGAAGAGTACGCTGCTTCTACAAGAGCTTGACCAATGACTGGGAGGAGC ATTTGGCTGTCAAGCACTTCTCTGTTGAGGGTCAAGTTGAGTTCAAGGCTGTCTGTTGTGCC AAGAGGGCCCCCTTCGACCTCTTCGACAACAAGAAGAAGGCCAACAAACATCAAGCTGTACGTG CGCCGTGTCTTATCATGGATAACTGTGAGGAGTTGATCCCTGAGTACCTGAGCTTTGTCAAGG GCATTGTTGATTCAGAGGACCTTCCCCTGAACATCTCCCCTGAGAC</p>
<p><b>SGT1</b></p>	<p>ATGGCCGCCGCCGCGGTCGGATCTGGAGAGCAAGGCCAAGGAGGCCTTCGTCGACGACGAC TTCGAGCTGGCCGCCGAGCTCTACACCAGGCCATCGAGGCGGGGCCGGCTACCGCGAACTC TACGCCGACCGAGCCAGGCGCAATCAAGCTGGGCAGTTACAATGAGGCTGTAGCTGATGCC AACAAAGCAATTGAACTTGATCCTTCGATGCATAAAGCATACCTTCGGAAGGGCTCTGCTTGCA TCAAGCTGGAGGAATACCAAACTGCAAAAGGCTGCTCTTGAAGTGGGTTCTTATGCATCTGG TGACTCGAGGTTACTCGTCTGATGAAGGAGTGTGATGATCGTATTGCTGAGGAGGCTAGCCAG GTGCCAGTAAAGAATGCCGCTGCGGCTGTTGCTTCACT</p>
<p><b>HSP70</b></p>	<p>CCCTTCAAGGTCATCCCTGGCCCTGCAGACAAGCCCATGATCGTCTGTCAACTACAAGGGTGAGG AGAAGCAGTTTCGACGCGGAGGAGATCTCTCCATGGTGTATCAAGATGAGGGAGATCGCTG AGGCCTTCTCGGCAACTCTGTCAAGAAGCAGCCGTGGTCAACGTTCCGCGCTACTTCAACGACTC CCAAGCCAGGCCACTAAGGACGCCGGCGCCATCGCCGGGCTGAACGTGCTGCGCATCATCAA CGAGCCCACTGTGCTGCCATCGCTACGGCCTTGACAAGAAGGCGACCAGCACCAGGTGAGAA GAACGTCTCATCTTCGAC</p>
<p><b>RLK</b></p>	<p>CATCATCATGTGGATGATGTTGGGAAATCAATCAGGAAGATAGCATGCTCTGGCCAAGACACCA TCTAGTCCACCCAGTTCTTTGCCATACAGTGTACGCGCCATAGATTACAAGCGTTCTTCCATG AAGATCACCCCACTTGTAGACCCCTGTTTGGTACTCCAGCAGAAGCTCGCCATCTCCAGAAAGCT CGTCATCTCCACAGGTTGATGTTATCAACGATGAGAAGCCAAGTCTTGACAGATATTTATTTG GAGTTCTACAATTTCCCTAGTACGCTGTTCAAGAGAGGTTTGCACCTGGTGCAGCCGATGGGATT GCTGGCCAGTCTCCTGCCTTAGCAAATAACCACTCTTTTATTTGGTGAATGGTTATGAAGA CATGTCTATTCTCCGTTGGACTGCAAGGTCGTCC</p>
<p><b>PR5</b></p>	<p>ACGTCGAGCATCAACGTGCCCGCCGGCACCCAAAGCCGGAAGGATATGGGCACGCACCCGGGTGC TCGTTCAATGGCGGTAGCGGGAGCTGCCAGACCCGGCGACTGCGGGCGCCAGCTCTCATGCTCTC TCTCCGGGACGCCACCAGCAACGCTGGCCGAGTTCAACATCGGGCGGCGCAGCACCCAGGATT TCTACGACATCTCGTTATCGACGGCTTCAACCTTGCCATGGACTTCTCGTGCAGCACCCGGCA CGCGTCCAGTGTAGGGATCCCAGCTGCCG</p>
<p><b>RAR1</b></p>	<p>ATAGGCTGCGACGCCATGTTACCCGACGACGACAACCCCGACGGCTCCTGCCACTACCACCCCT CCGGACCTATGTTTCATGATGGCATGAAAGAGTGGAGCTGTTGCAAGCAAAGAAAGCCATGATT TAGCTTATTTTAGCTATTCCTGGATGTGCCACAGGGAAGCATAAAGTGAAGAAACCAGTCAACA AAAGCTGTTTCTTAACTCAAAGGCCAACCCCAAAAGTTAGCTCAATCCAGTCTTCTAAGC AGGGTGTGGAAACCAGGCTGCTCCAGGTGCCGTCAGGGTTTCTTTGCTCCGACCATGGATC ACAGCCCAAGGCACAAAAACAGTTGCTGTAATGGTACAAATACGGAA</p>
<p><b>ACTIN</b></p>	<p>ATGGCTGACGGTGAGGACATCCAGCCCTTGTCTGTGACAATGGAACCCGGAATGGTCAAGGCT GGTTTCGCTGGAGATGATGCACCAAGGCTGTTTTCCCTAGCATAAGTTGGTCGCCACGGCACA CTGGTGTATGGTAGGGATGGGGCAGAAGGATGCCTATGTTGGTGTAGAGGCGCAGTCCAAGA GAGGTATCTCACACTCAAGTACCCGATCGAGCACGGCATCGTGAGCAACTGGGATGACATGG AGAAAAATCTGGCATCACACTTCTACAATGAGCTCCGTGTGGCACCCGAGGAGCACCCTGTGTT GCTCACTGAGGTCCTTTGAACCCAAAGCCAACAGAGAGAAGATGACCCAGATTATGTTGA GACTTTCAATGTTCTGCCATGTACGTGCAATTCAGGCCGTGCTTTCCCTCTATGCAAGTGGTC GTACTACTGGTATCGTTCTCGACTCTGGTGTAGGGTGCAGCCACACTGTGCCCATTTACGAAGG ATATGCGCTTCTCATGCCATCTTCTGTTGGATCTCGCTGGTCCGGATCTACGGACTCC</p>

<b>GAPDH</b>	CCACCGGTGTCTTCACTGACAAGGACAAGGCTGCAGCTCACATTAAGGGTGGTGCCAAGAAGG TCATCATTCTGCTCCAGCAAGGATGCTCCCATGCTTGTCTGTGGTGTCAATGAGAAGGAATA CAAGTCTGACATCGACATTGTCTCCAACGCTAGCTGCACCCTAACTGCCTTGTCTCTTGTCTA AGGTTATCAATGACAGGTTGGCATTGTTGAGGGTTTGATGACCACAGTTTCATGCCATGACTGC AACCCAGAAGACTGTTGATGGTCTTCCAGCAAGGACTGGAGAGGTGGAAGGGCTGCCAGCTT CAACATCATTCCAAGCAGCACTGGTGCCGCAAAGGCTGTTGGCAAGGTGCTCCAGAGCTTAAC GGAAAGTTGACTGGAATGGCCTTCCGTGTTCCCACTGTTGATGTTTCTGTTGTTGATCTGACTGT TAGACTTGCGAAGCCAGCAACCTATGATCAGATTAAGGCTGCTATCAAGGAGGAGTCTGAGGG AAACCTCAAGGGCATTGTTGGTTACGTTGATGAGGACCTGTTTCCACTGACTTTCAGGGTGAC AACAGGTCCAGCATCTTTGATGCTAAGGC
--------------	---

Bu genlerden primer tasarımı GeXP GenomeLab Genetik Analiz Sisteminde (Beckman Coulter) multipleks halinde gerçekleştirildi.

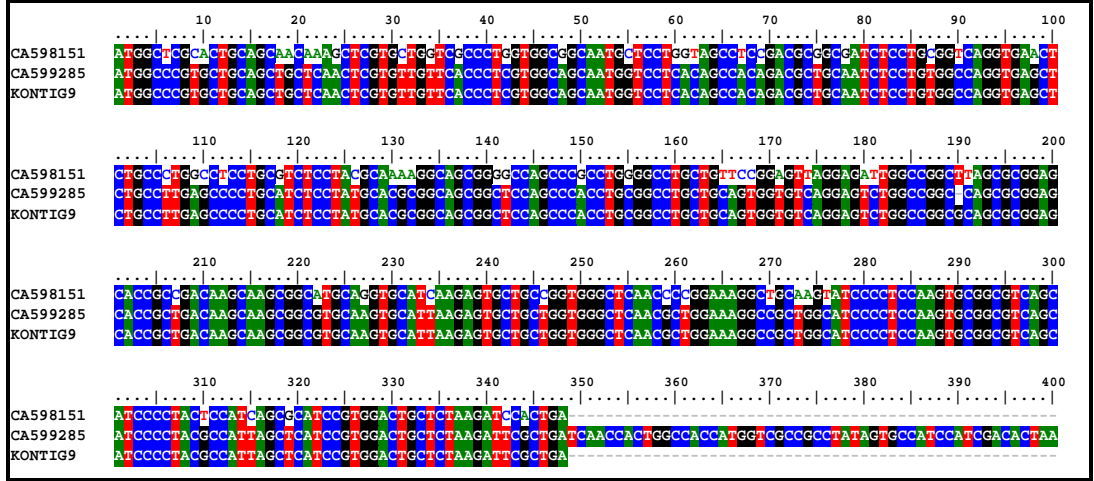
#### 4. 3. 2. Gen Anlatım Analizlerinde Kullanılmak Üzere, Stres ve Stresle İlişkili Kontig ve Singletonlardan Tasarlanan Primerler

##### 4.3.2.1 Çoklu Dizi Eşleştirmesi

Gen anlatım analizlerinde kullanılmak üzere stres ve stresle ilişkili kontig ve singletonları seçebilmek amacıyla aynı proteinle eşleşen veya aynı erişim numarasına sahip olan dizilerin çoklu eşleştirilmesi (multiple alignment) sonucu Tablo 4. 11, Tablo 4. 12, Tablo 4. 13, Tablo 4. 14, Tablo 4. 15, Tablo 4. 16 ve Şekil 4. 19, Şekil 4. 20, Şekil 4. 21, Şekil 4. 22, Şekil 4. 23, Şekil 4. 24, Şekil 4. 25 de gösterilmektedir.

Tablo 4.11: lipid transfer protein (LTP) karşılık gelen kontig ve singletonların dizilerinin özellikleri

Singleton adı	Singleton/Kontig uzunluğu	Protein adı	Erişim no	cDNA uzunluğu
CA598151	669	lipid transfer protein precursor	AAG27707	348
CA599285	534	putative lipid transfer protein	ABB90547	399
Kontig 9	403	lipid transfer protein(LTP)	ABB90546	348



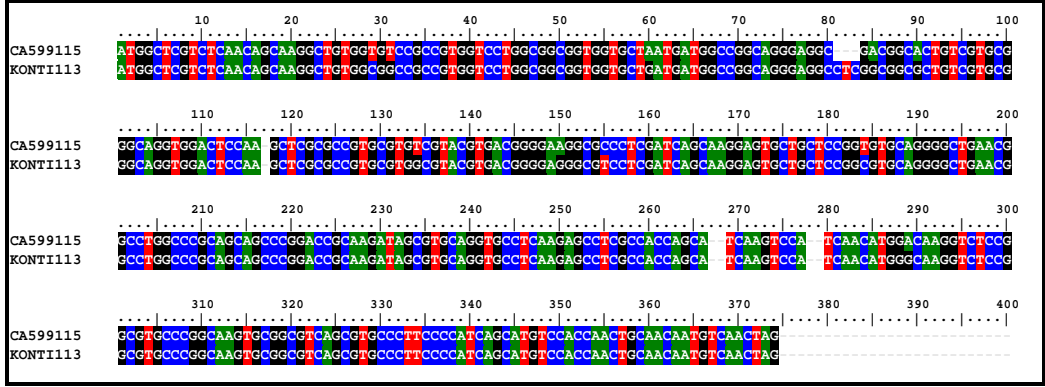
Şekil 4. 19: CA598151, CA599285 ve Kontig 9'un cDNA'sının BİOEDİT programı kullanılarak gerçekleştirilen çoklu eşleştirilmesi

Eşleşen dizilerin karşılaştırılması sonucunda gen anlatım analizlerinde kullanılacak primer tasarımı için “CA598151” (lipid transfer protein precursor) ve “CA599285” (putative lipid transfer protein) yerine onlara eş olan Kontig 9'un (LTP) (Lipid Transfer Protein) mRNA dizisi kullanıldı.

Eşleşen diziler karşılaştırıldı (Tablo 4.12) ve gen anlatım analizlerinde kullanılacak primer tasarımı için “CA599115” (type 1 non specific lipid transfer protein precursor) yerine onunla yüksek dizi benzerliği gösteren Kontig 113'ün (LTP3) (lipid transfer protein 3) dizisi kullanıldı (Şekil 4.20).

Tablo 4.12: Aynı proteine karşılık gelen kontig ve singletonların dizilerinin özellikleri

Singleton adı	Singleton/Kontig uzunluğu	Protein adı	Erişim no	cDNA uzunluğu
CA599115	422	type 1 non specific lipid transfer protein precursor	CAH69199	326
Kontig 113	599	lipid transfer protein 3 (LTP3)	AAP23941	369

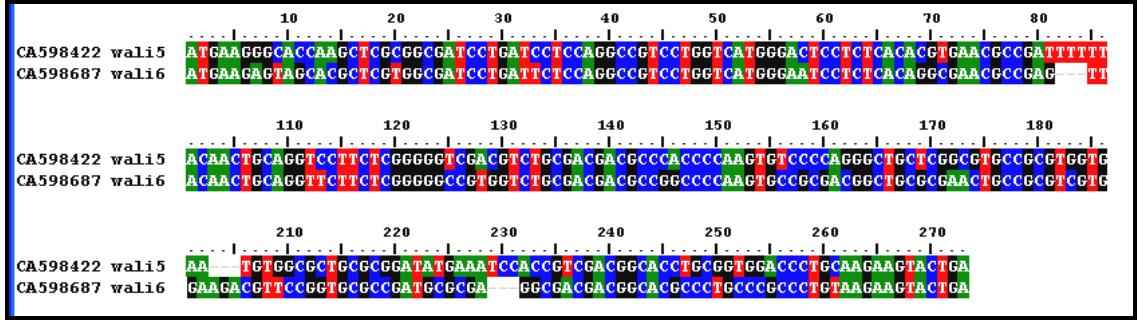


Şekil 4. 20: CA599115 ve Kontig 113'ün cDNA dizilerinin BİOEDİT programı kullanılarak gerçekleştirilen çoklu eşleştirilmesi

Eşleşen diziler karşılaştırıldı (Tablo 4.13) ve gen anlatım analizlerinde kullanılacak primer tasarımı için "CA598687" (wali6) yerine onunla yüksek dizi benzerliği gösteren CA598422'ün (wali5) dizisi kullanıldı (Şekil 4. 21).

Tablo 4.13: wali5 ve wali6'ya karşılık gelen kontig ve singletonların dizilerinin özellikleri

Singleton adı	Singleton uzunluğu	Protein adı	Erişim no	cDNA uzunluğu
CA598422	566	wali5	AAA50850	270
CA598687	548	wali6	AAC37417	267



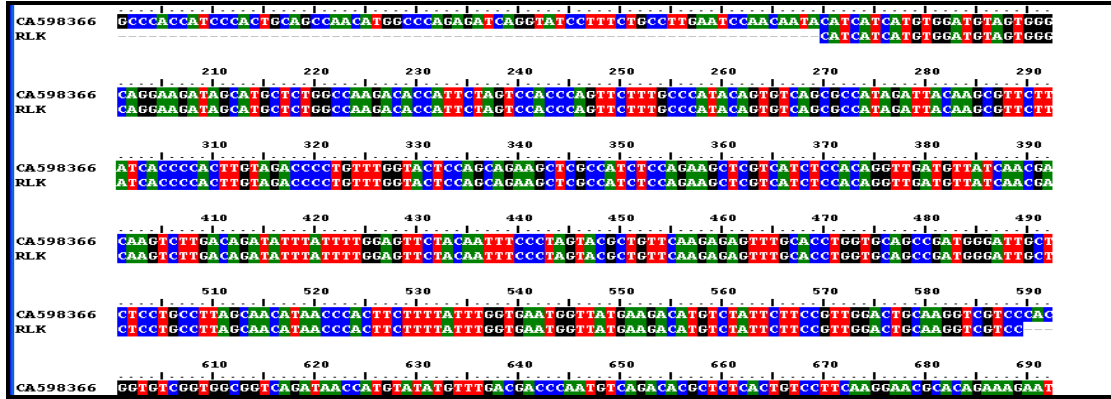
Şekil 4. 21: CA598422 ve CA598687'nin cDNA dizilerinin BİOEDİT programı kullanılarak gerçekleştirilen çoklu eşleştirilmesi

Eşleşen diziler karşılaştırıldı (Tablo 4.14) ve gen anlatım analizlerinde kullanılacak primer tasarımı için CA598366 (AAS93629) (*Triticum aestivum* receptor-like kinase protein (RLK) mRNA, partial cds.) yerine ona eş olan RLK (Receptor-Like Kinase Protein)'nın dizisi kullanıldı (Şekil 4. 22).



Tablo 4.14: receptor-like kinase protein (RLK)'ya karşılık gelen kontig ve singletonların dizilerinin özellikleri

Singleton adı	Singleton uzunluğu	Protein adı	Erişim no	cDNA uzunluğu
CA598366	566	receptor-like kinase protein (Lrk)	AAS93629	270
RLK	-	receptor-like kinase protein (Lrk)	AY584533	1528

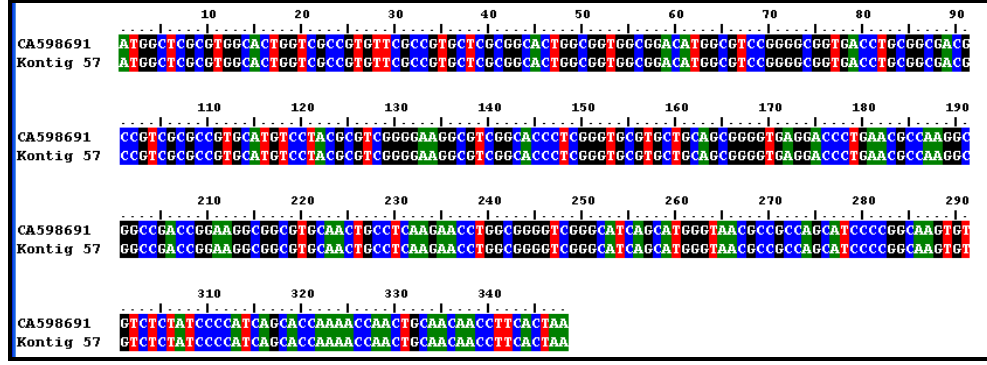


Şekil 4. 22: CA598366 ve RLK'nın cDNA dizilerinin BİOEDİT programı kullanılarak gerçekleştirilen çoklu eşleştirilmesi

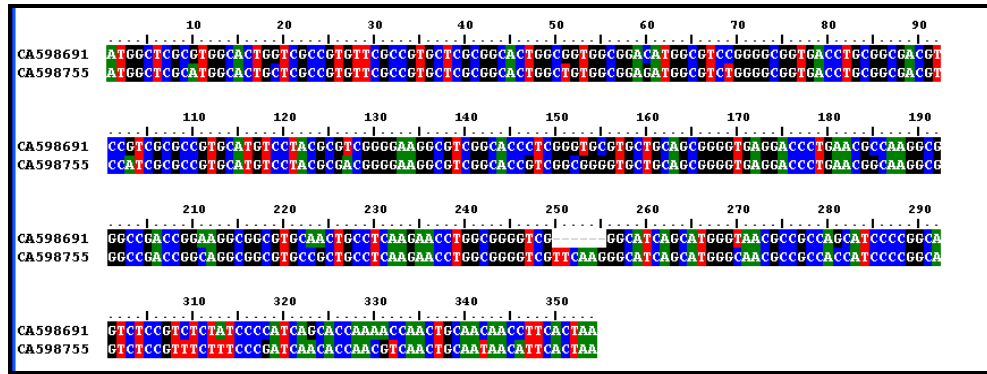
NCBI'da yapılan Blast analizi sonucu "CA598691" ve Kontig 57'nin protein karşılığı, erişim numarası ve cDNA dizisinin aynı olduğu belirlendi (Tablo 4.15) ve "Kontig 57" iptal edilerek gen anlatım çalışmalarında kullanılmak üzere primer tasarımı "CA598691"den gerçekleştirildi (Şekil 4.23). Ayrıca "CA598691" ile aynı protein karşılığına sahip "CA598755"den de primer tasarımı gerçekleştirilmedi. "CA598691" ve "CA598755" in dizilerinin eşleştirilmesi (alignment) Şekil 4.24 de gösterilmektedir.

Tablo 4.15: type 1 non specific lipid transfer protein precursor'e karşılık gelen kontig ve singletonların dizilerinin özellikleri

Singleton adı	Singleton/Kontig uzunluğu	Protein adı	Erişim no	cDNA uzunluğu
CA598691	542	type 1 non-specific lipid transfer protein precursor	CAH04983	348
Kontig 57	534	type 1 non-specific lipid transfer protein precursor	CAH04983	348
CA598755	403	type 1 non specific lipid transfer protein precursor	CAH69190	354



Şekil 4. 23: CA598691 ve Kontig 57'nin cDNA dizilerinin BİOEDİT programı kullanılarak gerçekleştirilen çoklu eşleştirilmesi

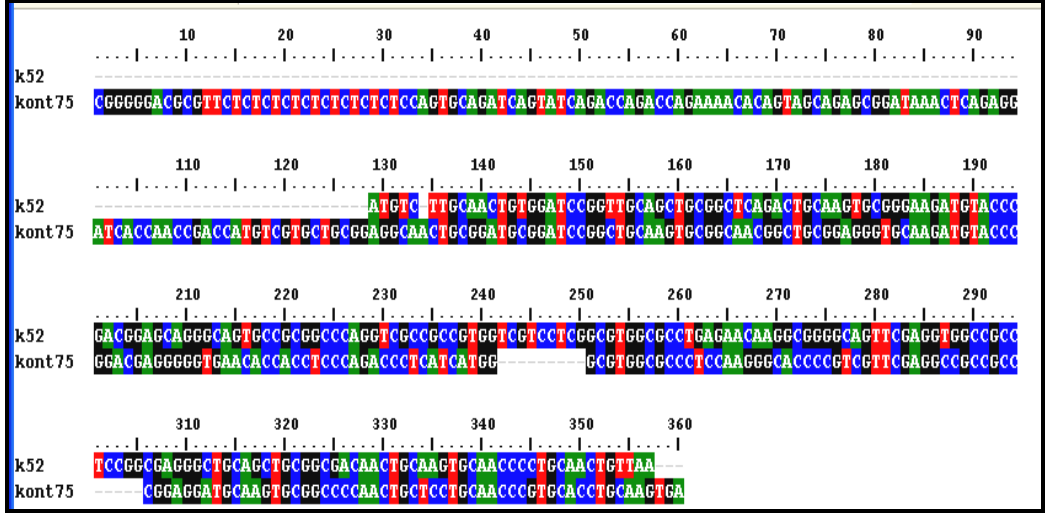


Şekil 4. 24: CA598691 ve CA598755'in cDNA dizilerinin BİOEDİT programı kullanılarak gerçekleştirilen çoklu eşleştirilmesi

Kontig 52 ve Kontig 75 BlastX analizi sonucu aynı proteinle eşleşmesine rağmen dizileri ortak değildir ve gen anlatım analizlerinde kullanılmak üzere bu kontiglere ait diziler ayrı ayrı primer tasarımında kullanıldı (Tablo 4.16, Şekil 4.25).

Tablo 4.16: Aynı proteine karşılık gelen kontig dizilerinin özellikleri

Kontig adı	Kontig uzunluğu	Protein adı	Erişim no	cDNA uzunluğu
Kontig 52	627	Metallothionein-like protein 1	P43400 L11879	228
Kontig 75	562	metallothionein mRNA	AAP80616	345



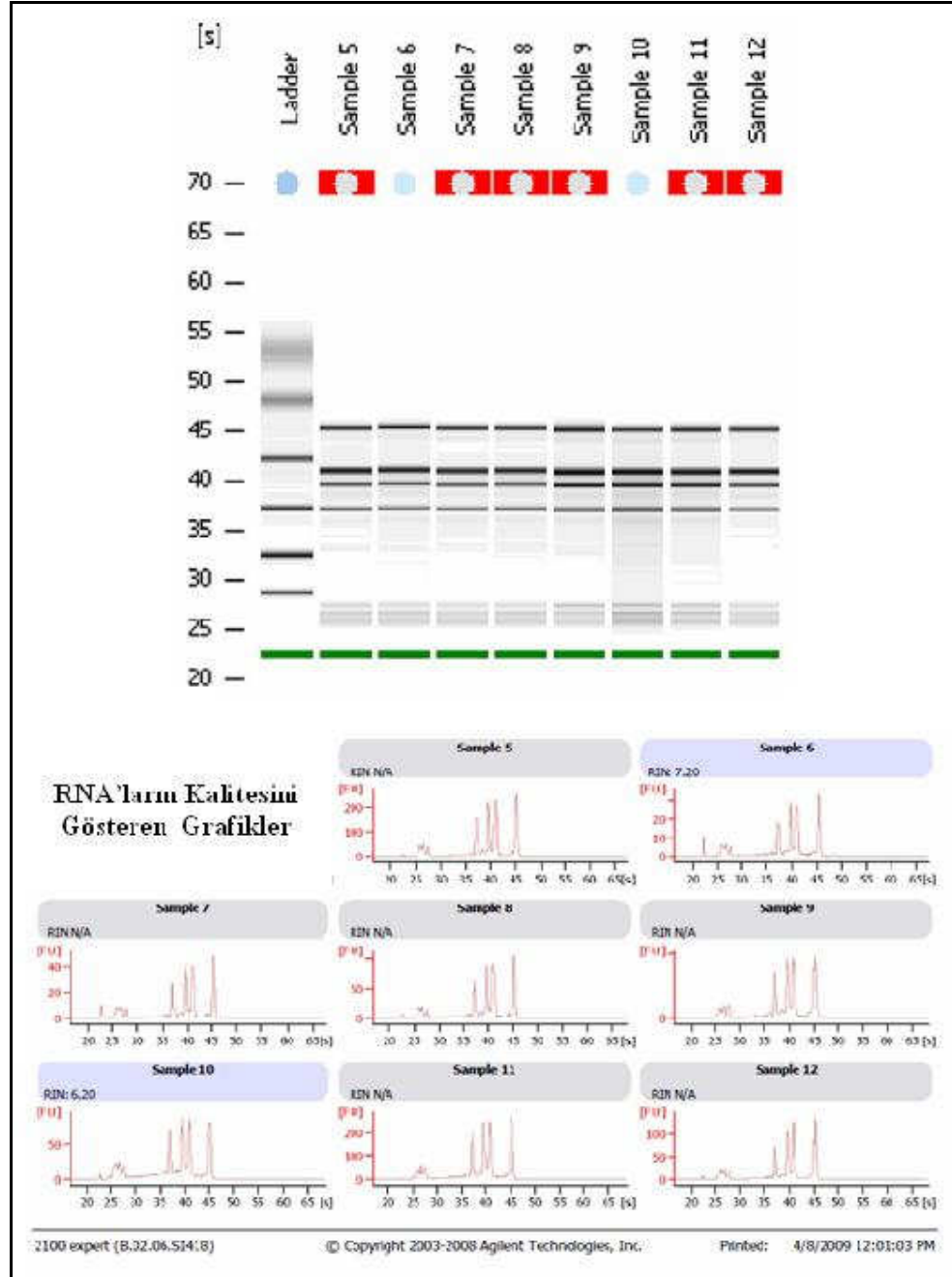
Şekil 4. 25: Seçilen dizilerin BİOEDİT programı kullanılarak gerçekleştirilen çoklu eşleştirilmesi

### 4. 3. 3. Total RNA İzolasyonu

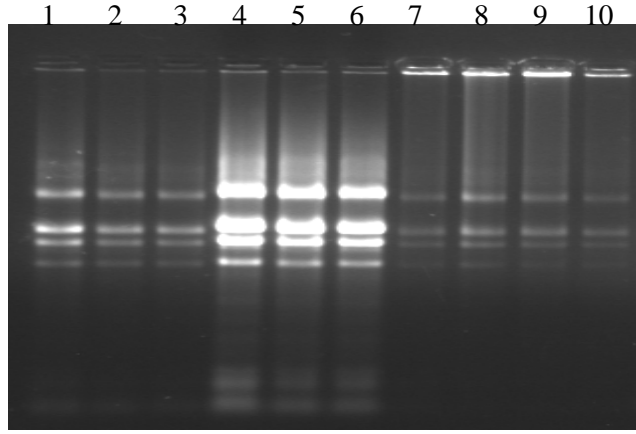
RNA izolasyonları “TriPure Isolation Reagent” (Roche) kullanılarak firma tarafından belirtilen şekilde yapıldı. İzolasyon pas ile inoküle edilmiş ve edilmemiş (kontrol) bitkilerde (PI178384, İzgi01, Sönmez2001, Harmankaya99, ES14 ve Aytın98) farklı zaman aralıklarında (0. 8. 12. 24. 48. saatler) gerçekleştirildi.

#### 4. 3. 3. 1. RNA Miktarının ve Saflığının Belirlenmesi

RNA’ların miktar tayini, 260 nm dalga boyunda ölçülen absorbans değerlerine göre yapıldı.  $A_{260}/A_{280}$  oranı 1.8-2.0 olan RNA’lar saf olarak kabul edildi. RNA örneklerinin miktar ve saflık tayini yapıldıktan sonra (Şekil 4.26) total RNA’nın bütünlüğünün değerlendirildiği DEPC içeren %1’lik agaroz jel kullanılarak elektroforez işlemi gerçekleştirildi (Şekil 4.27).



Şekil 4. 26: İzolasyonu yapılan RNA'ların "Agilent Bioanalyzer 2100" cihazı ile kalitelerinin ölçülmesi

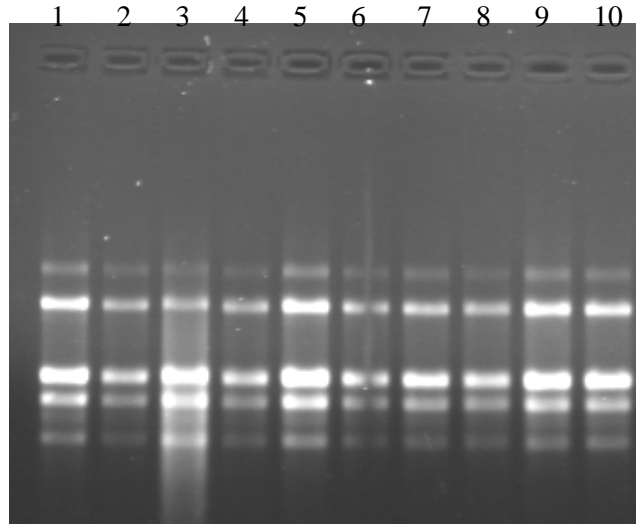


Şekil 4. 27: Harmankaya99'a ait 0-48. saat RNA'ların DEPC'li % 1'lik agaroz jelde görünümü

1) 0. Saat Kontrol 2) 0. Saat Pas Uygulama 3) 8. Saat Kontrol 4) 8. Saat Pas Uygulama 5) 12. Saat Kontrol 6) 12. Saat Pas Uygulama 7) 24. Saat Kontrol 8) 24. Saat Pas Uygulama 9) 48. Saat Kontrol 10) 48. Saat Pas Uygulama

#### 4. 3. 4. İzolasyonu Yapılan RNA'lara DNaz Uygulanması

Örneklere ait RNA'lara, genomik DNA kontaminasyonunu engellemek amacıyla DNaz uygulaması yapıldı. DNaz uygulanmış RNA'lara ait örnek şekil 4.28 de gösterildi.

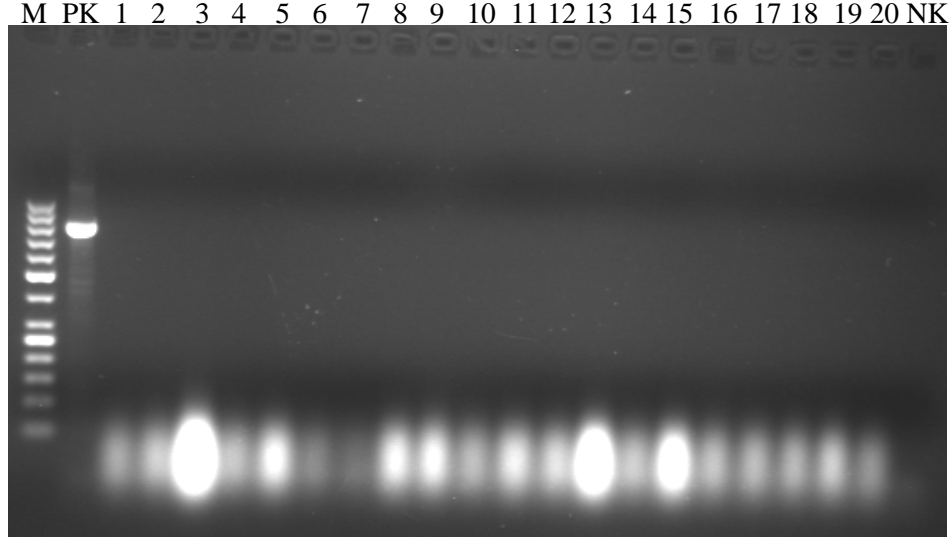


Şekil 4. 28: PI178384'e ait DNaz uygulanmış RNA'ların agaroz jelde gösterimi

1) 0. Saat Kontrol 2) 0. Saat Pas Uygulama 3) 8. Saat Kontrol 4) 8. Saat Pas Uygulama 5) 12. Saat Kontrol 6) 12. Saat Pas Uygulama 7) 24. Saat Kontrol 8) 24. Saat Pas Uygulama 9) 48. Saat Kontrol 10) 48. Saat Pas Uygulama

#### 4. 3. 5. DNaz Uygulanmış Örneklerle 18S PZR

DNaz uygulanan örneklerde genomik DNA'nın varlığını kontrol etmek amacıyla 18S primerleri kullanılarak PZR gerçekleştirildi (Şekil 4.29)

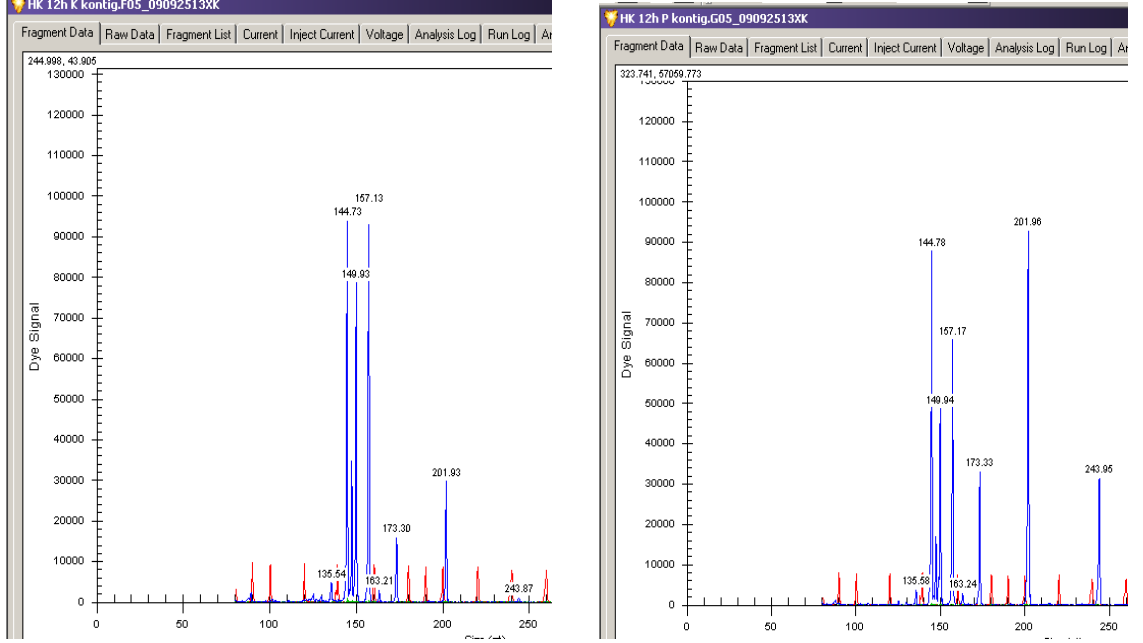


Şekil 4. 29: Harmankaya99 ve PI178384'e ait RNA'larla 18S PZR'nin agaroz jelde gösterimi

M. 50 bp DNA Markır, PK. Pozitif Kontrol, Harmankaya (1-10). 1) 0. Saat Kontrol 2) 0. Saat Pas Uygulama 3) 8. Saat Kontrol 4) 8. Saat Pas Uygulama 5) 12. Saat Kontrol 6) 12. Saat Pas Uygulama 7) 24. Saat Kontrol 8) 24. Saat Pas Uygulama 9) 48. Saat Kontrol 10) 48. Saat Pas Uygulama. PI (11-20) 11) 0. Saat Kontrol 12) 0. Saat Pas Uygulama 13) 8. Saat Kontrol 14) 8. Saat Pas Uygulama 15) 12. Saat Kontrol 16) 12. Saat Pas Uygulama 17) 24. Saat Kontrol 18) 24. Saat Pas Uygulama 19) 48. Saat Kontrol 20) 48. Saat Pas Uygulama. NK. Negatif Kontrol

#### 4. 3. 6. Transkriptlerde Çoklu (Multipleks) Gen Anlatım Analizleri

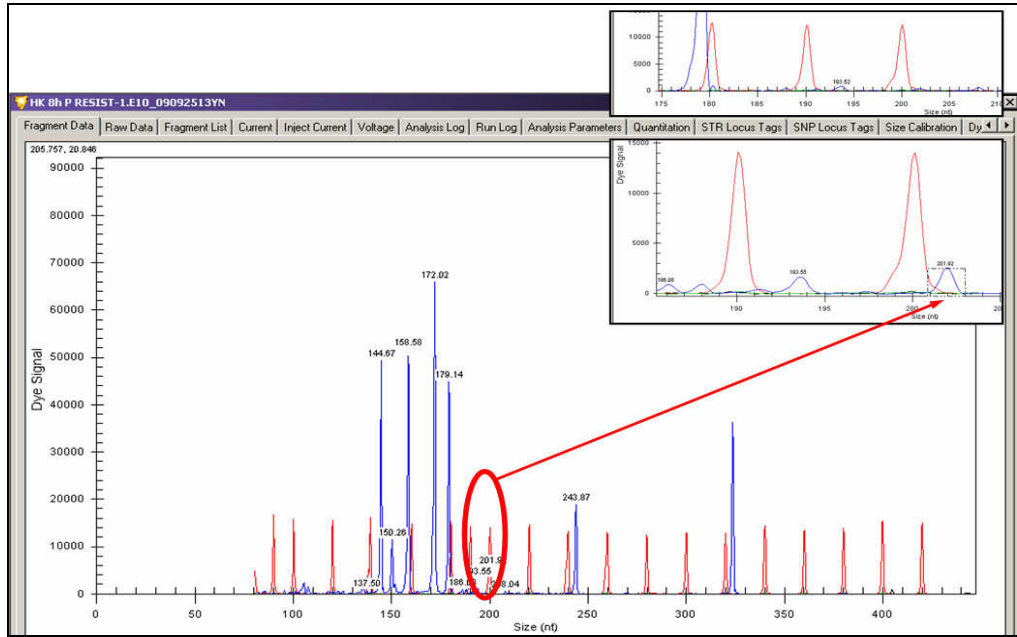
Gen anlatım analizlerinde kullanılan dört farklı multipleks (çoklu primer) ((Kontig, Singleton 1, Singleton 2, Hastalık direnç genleri (Resistant genes)) ile beş farklı zaman aralığında (0, 8, 12, 24, 48. saat) altı bitkide (PI178383, Harmankaya99, İzgi01, ES14, Sönmez2001, Aydın98) gen anlatım analizleri gerçekleştirildi. Şekil 4.30 da GeXP Genetik Analiz Sisteminde Harmankaya99 genotipinde, pas uygulanmış ve kontrol bitkide 12. saat gen anlatım analizleri gösterilmektedir.



Şekil 4. 30: Kontig çoklu primerleri ile Harmankaya99 (12. Saat) kontrol ve pas uygulanmış örneklerde gen anlatım analizleri

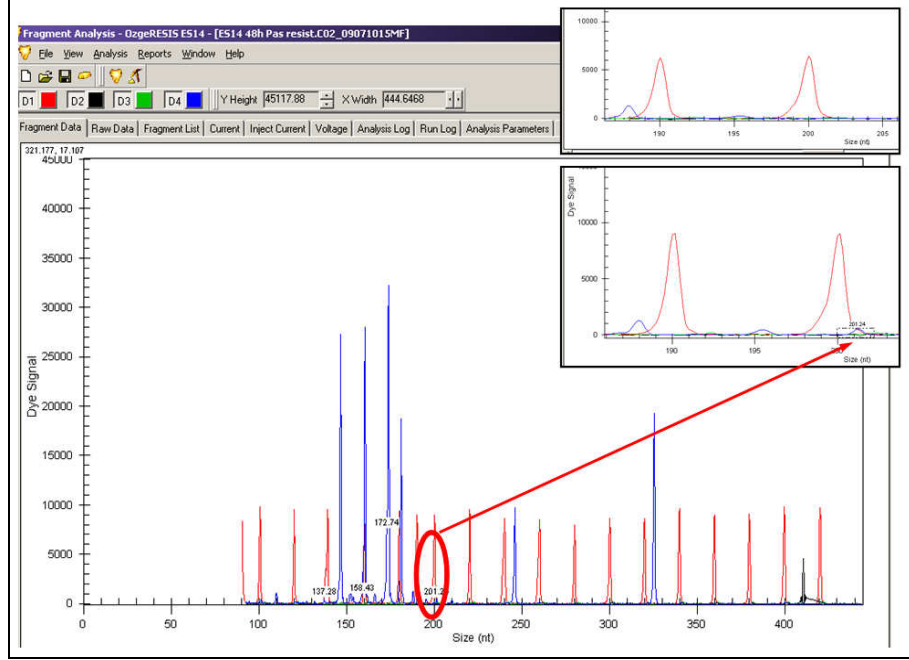
#### 4.3.6.1 Kontrol ve Pas Uygulanmış Örneklerde Çoklu Gen Anlatım Analizlerinin Karşılaştırılması

Kontrol bitkide PR5 geninin (201) anlatımı belirlenemezken, pas uygulanmış bitkide gen anlatımı görülmektedir (Şekil 4.31).



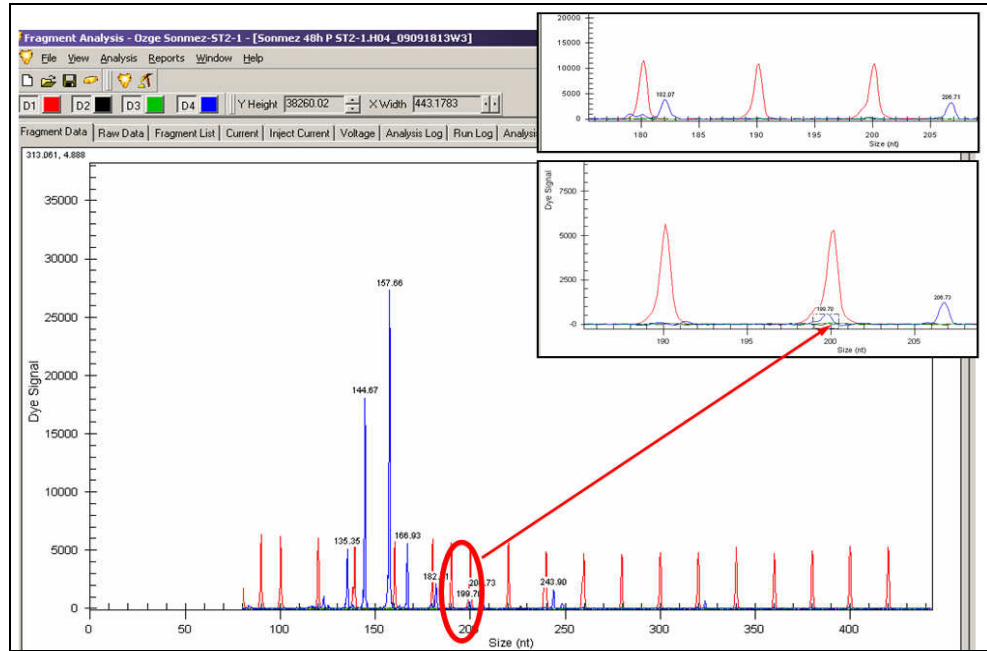
Şekil 4.31: Harmankaya99 genotipinde (8. saat pas uygulanmış) resistant çoklu primerine ait grafik

Kontrol bitkide PR5 geninin (201) anlatımı belirlenemezken, pas uygulanmış bitkide gen anlatımı görülmektedir (Şekil 4.32).



Şekil 4.32: ES14 genotipinde (48. saat pas uygulanmış) resistant çoklu primerine ait grafik

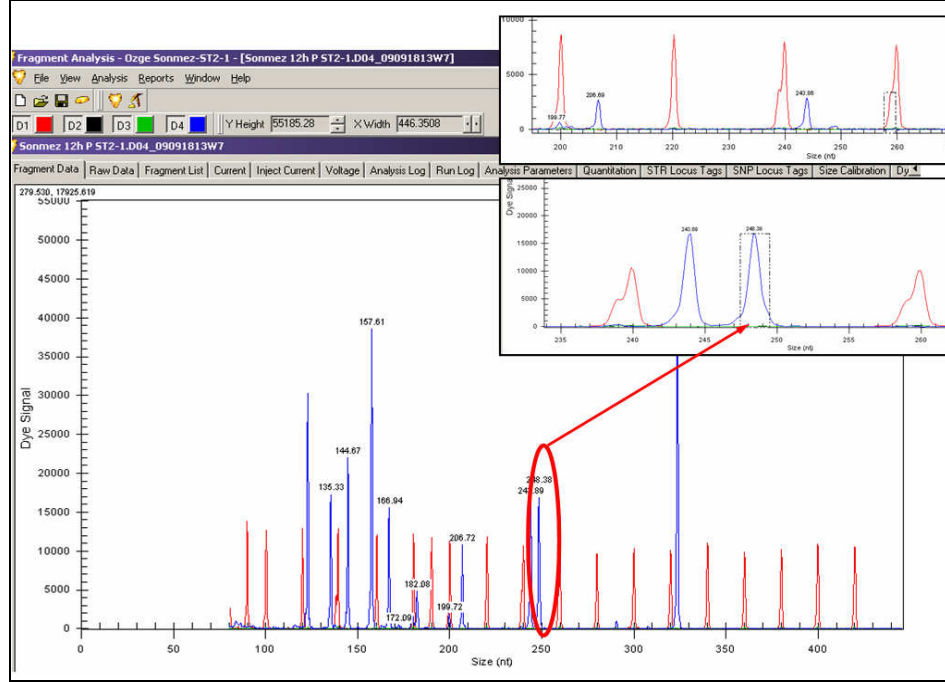
Kontrol bitkide GRAB2 (CA597983'ün BlastX homologu) geninin (201) anlatımı belirlenemezken, pas uygulanmış bitkide gen anlatımı görülmektedir (Şekil 4.33).



Şekil 4.33: Singleton 1 çoklu primerleri ile PI178383 (8. saat kontrol ve pas uygulanmış örneklerde gen anlatım analizleri

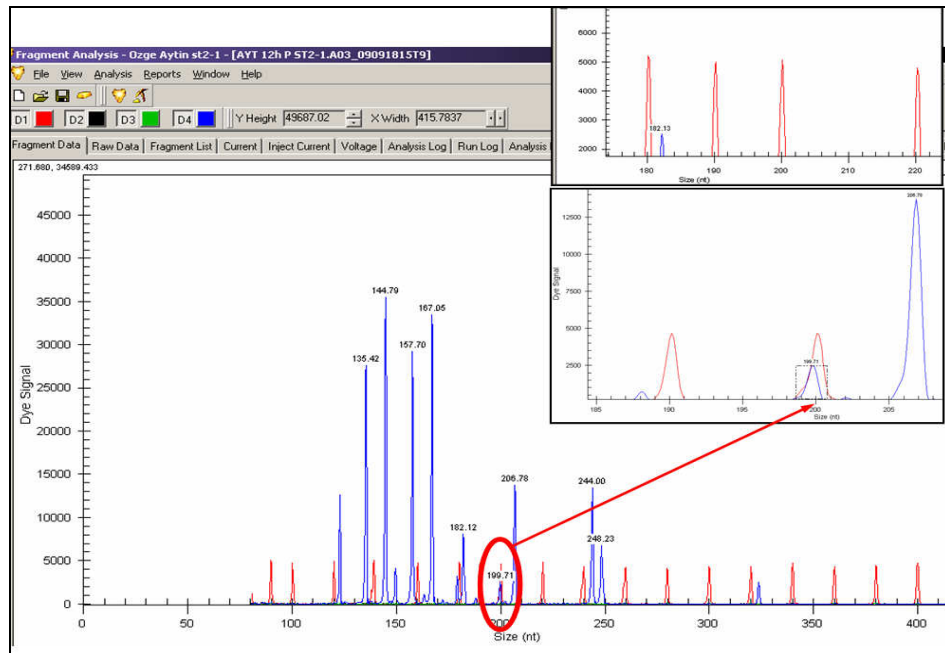


Kontrol bitkide Patogeneyle ilişkili (251) (CA598181'in BlastX homoloğu) genin anlatımı belirlenemezken, pas uygulanmış bitkide gen anlatımı görülmektedir (Şekil 4.34).



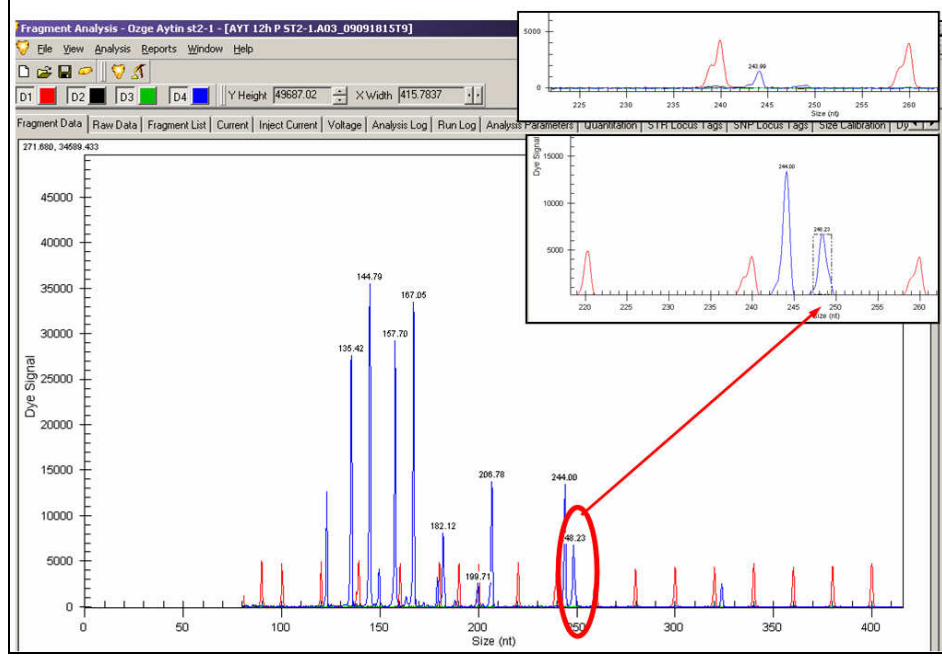
Şekil 4.34: Sönmez2001 genotipinde (12. saat pas uygulanmış) singleton 2 çoklu primerine ait grafik

Kontrol bitkide GRAB2 (CA597983'ün BlastX homoloğu) geninin (201) anlatımı belirlenemezken, pas uygulanmış bitkide gen anlatımı görülmektedir (Şekil 4.35).



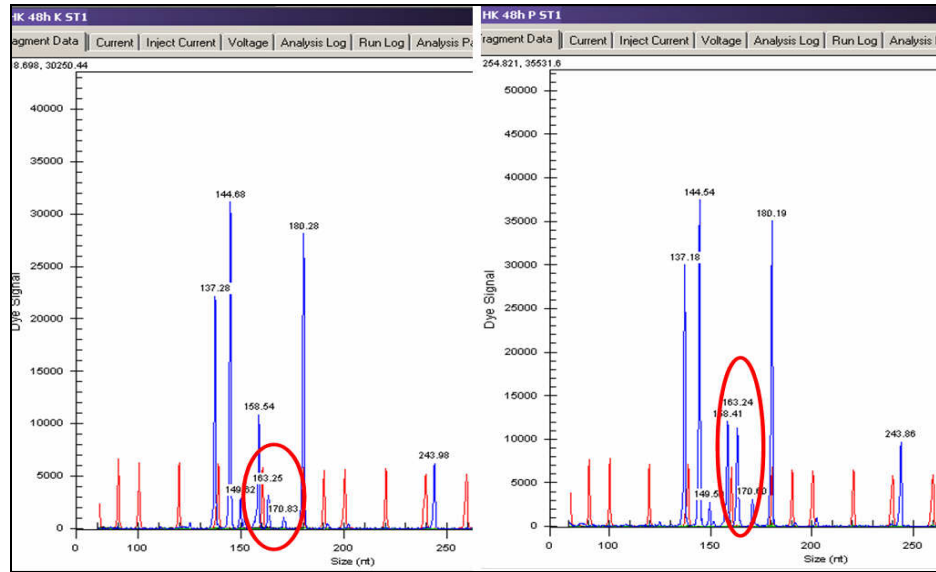
Şekil 4.35: Aydın98 genotipinde (12. saat pas uygulanmış) singleton 2 çoklu primerine ait grafik

Kontrol bitkide Patogenezle ilişkili (251) (CA598181'in Blastx homoloğu) genin anlatımı belirlenemezken, pas uygulanmış bitkide gen anlatımı görülmektedir (Şekil 4.36).

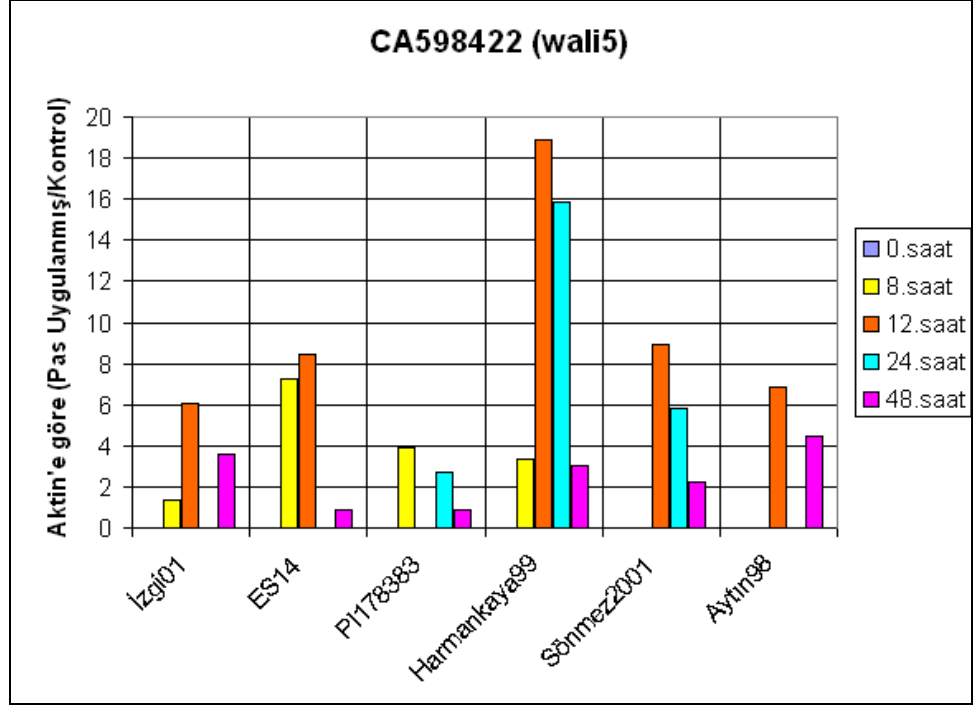


Şekil 4.36: Aydin98 genotipinde (12. saat pas uygulanmış) singleton 2 çoklu primerine ait grafik

Pas uygulanmış bitkide wali5 (166) (CA598422'nin Blastx homoloğu) geninin anlatımı kontrol bitkiye göre artış gösterdi (Şekil 4.37, Şekil 4.38).

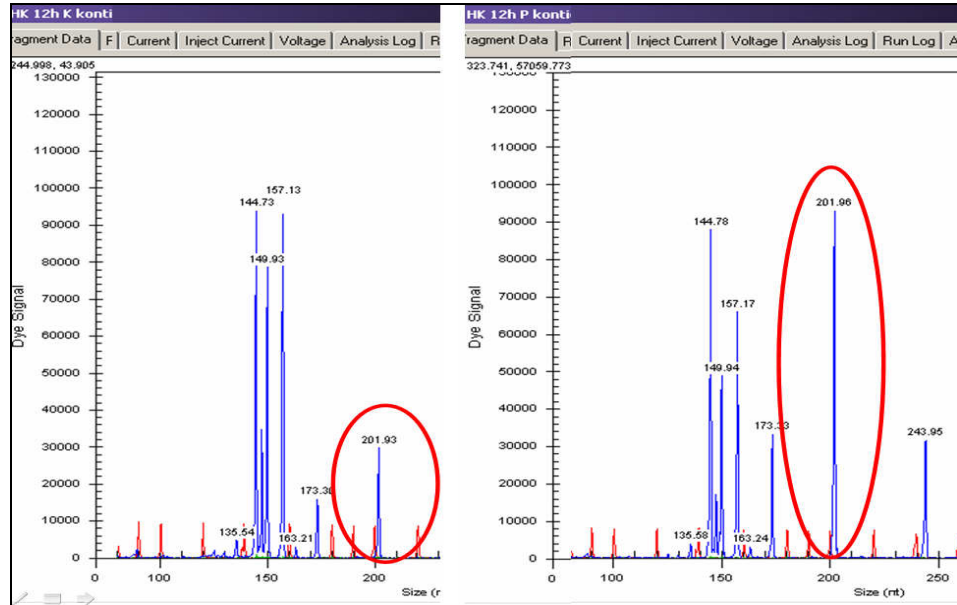


Şekil 4.37: Harmankaya99 genotipinde (48. saat kontrol ve pas uygulanmış) singleton 1 çoklu primerine ait grafik

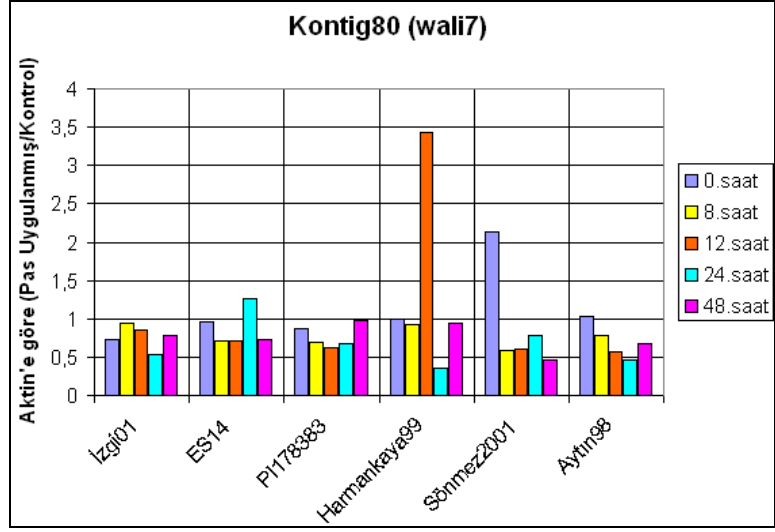


Şekil 4.38: Tüm genotiplerde (pas uygulanmış ve kontrol) belirlenen zaman aralıklarında wali5 (166) (CA598422'nin Blastx homoloğu) geninin anlatımı

Pas uygulanmış bitkide wali7 (202) (Kontig 80'in BlastX homoloğu) geninin anlatımı kontrol bitkiye göre artış gösterdi (Şekil 4.39). Tüm genotiplerde belirlenen zaman aralıklarında wali7 geninin anlatımı Şekil 4.40 da gösterilmektedir.

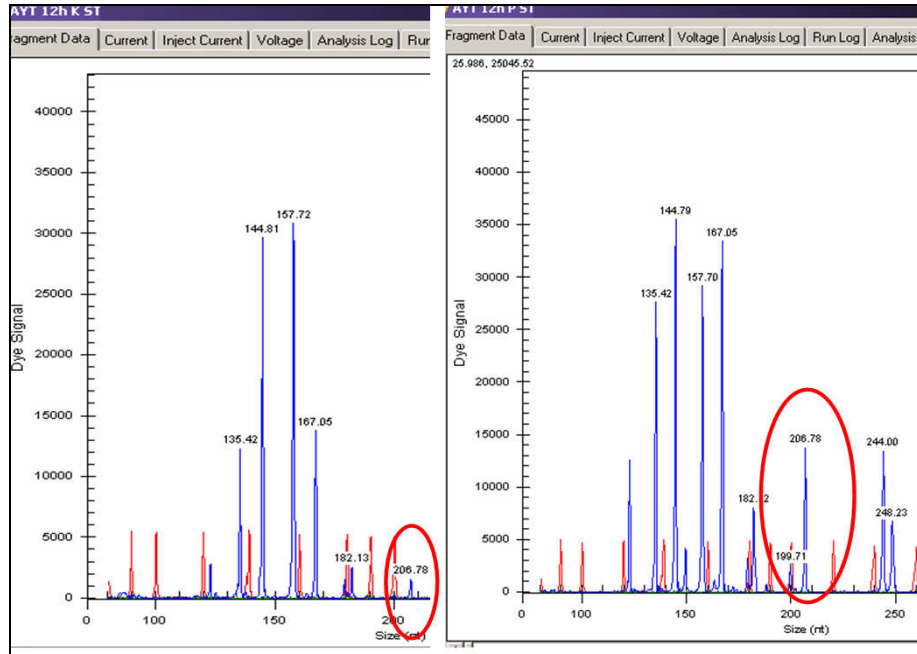


Şekil 4.39: Harmanıkaya99 genotipinde (12. saat kontrol ve pas uygulanmış) kontig çoklu primerine ait grafik

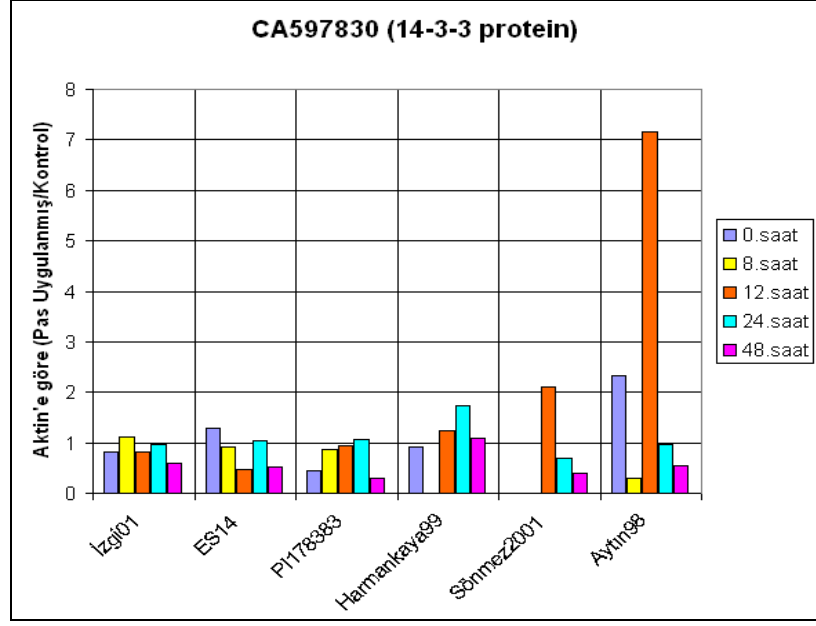


Şekil 4.40: Tüm genotiplerde (pas uygulanmış ve kontrol) belirlenen zaman aralıklarında wali7 (166) (Kontig80'nin BlastX homoloğu) geninin anlatımı

Pas uygulanmış bitkide ürünü 14-3-3 proteini olan (208) (CA597830'un Blastx homoloğu) genin anlatımı kontrol bitkiye göre artış gösterdi (Şekil 4.41). Tüm genotiplerde belirlenen zaman aralıklarında 14-3-3 geninin anlatımı Şekil 4.42 de gösterilmektedir.

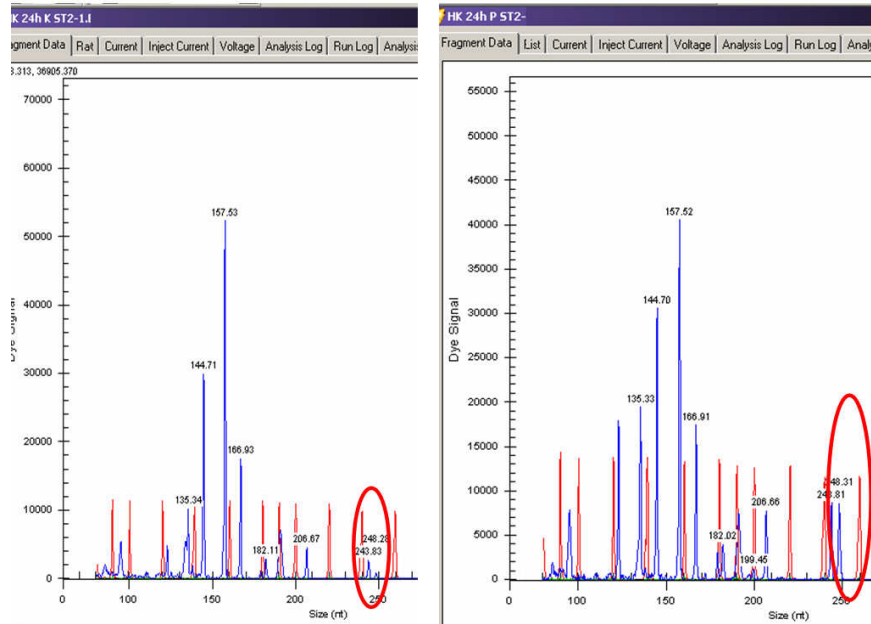


Şekil 4.41: Aytın98 genotipinde (12. saat kontrol ve pas uygulanmış) kontig çoklu primerine ait grafik

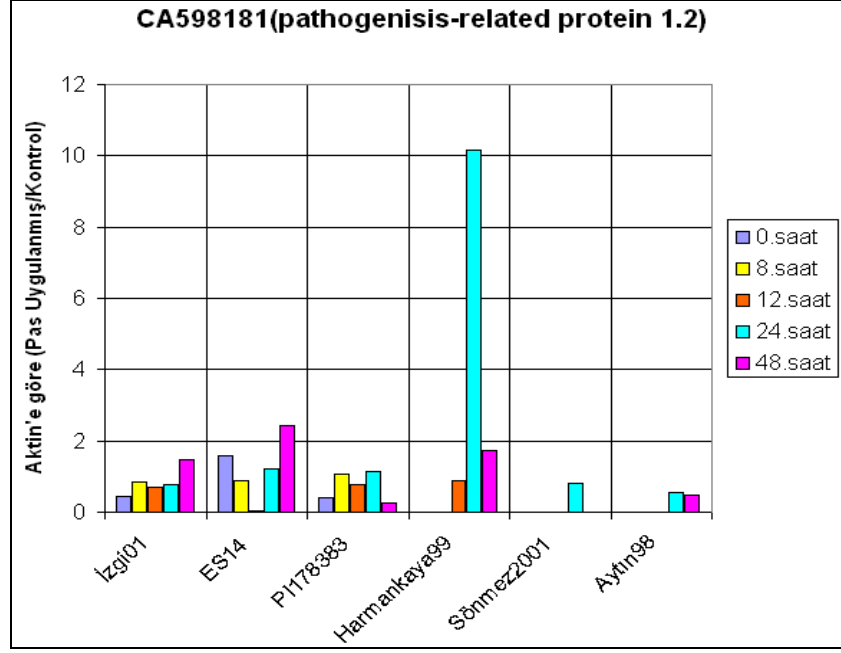


Şekil 4.42: Tüm genotiplerde (pas uygulanmış ve kontrol) belirlenen zaman aralıklarında 14-3-3 (208) (CA597830'un Blastx homoloğu) geninin anlatımı

Pas uygulanmış bitkide patogenezle ilişkili (PR 1.2) (251) (CA598181'in Blastx homoloğu) genin anlatımı kontrol bitkiye göre artış göstermiştir (Şekil 4.43). Tüm genotiplerde belirlenen zaman aralıklarında patogenezle ilişkili genin anlatımı Şekil 4.44 de gösterilmektedir.

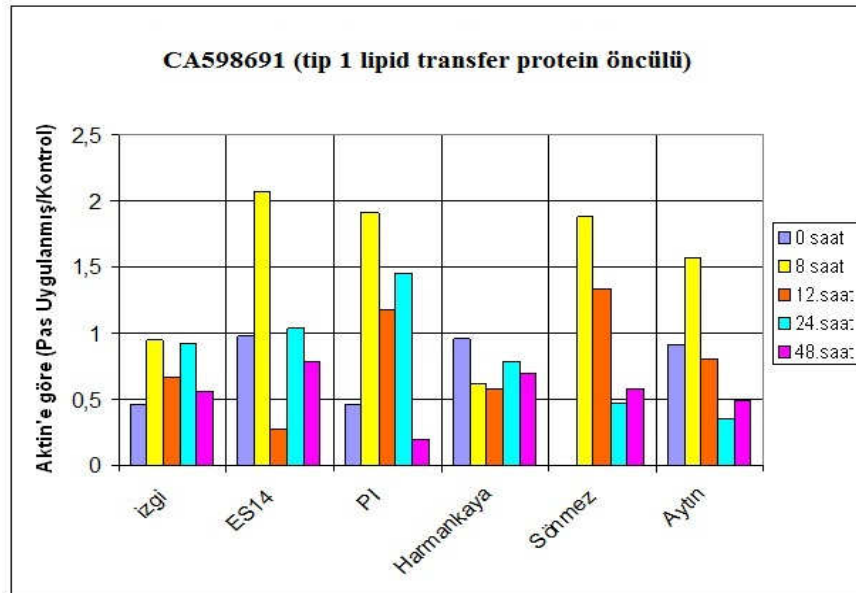


Şekil 4.43: Harmankaya99 genotipinde (24. saat kontrol ve pas uygulanmış) singleton 2 çoklu primerine ait grafik



Şekil 4.44: Tüm genotiplerde (pas uygulanmış ve kontrol) belirlenen zaman aralıklarında (CA597830'un Blastx homoloğu) PR 1.2 geninin anlatımı

Singleton CA598691'n BlastX karşılığının “tip 1 lipid transfer protein öncülü” olduğu belirlenmiştir. Kontrol ve pas uygulaması yapılmış genotiplerin pas uygulaması gerçekleştirilen zaman dilimlerinde kontrol bitkilere göre gen anlatımları karşılaştırıldığında PI178383, Sönmez2001 ve Aydın98 genotiplerinde kontrol bitkilere göre gen anlatımında ~1.5 kat artış gözlenmiştir.



Şekil 4.45: Tüm genotiplerde (pas uygulanmış ve kontrol) belirlenen zaman aralıklarında (CA598691'in Blastx homoloğu) LTP geninin anlatımı

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu tez çalışmasında stratejik bir ürün bitkisi olan buğdayda sarı pas hastalığı ile mücadeleye katkı sağlayacak biyoteknolojik çalışmalar yapılmıştır. Mantarları, bakterileri, virüsleri, nematodları ve böcekleri de içeren çok sayıda patojen buğdayda (*Triticum aestivum* L.  $2n = 42$ , AABBDD) dünya genelinde büyük oranda ürün kayıplarına yol açmaktadır. Sarı pas bu patojenler arasında en fazla zarara yol açan etmenlerden biridir. Sarı pası kontrol altına alabilmek ve dayanıklılık için ıslah çalışmaları gerçekleştirmek en ekonomik ve çevreyle uyumlu yöntemdir. Bu nedenle, dayanıklı kaynaklar kullanılarak gerçekleştirilen genetik çalışmaların yürütülmesi büyük önem taşımaktadır. Dünya üzerinde 1.5 milyon fungal tür belirlenmiş (Hawksworth 2001), ve en az 712,000 fungal türünde varlığı tahmin edilmektedir (Schmit ve Mueller, 2007). Tahıllarda geniş spektrumlu hastalık dayanıklılığı oluşturmada en önemli yöntem biyoteknoloji ve geleneksel ıslah yöntemlerinin bir arada kullanılmasıdır. Bu çalışmanın ilk aşamasında önemli bir biyoteknolojik yaklaşım olan DNA temelli moleküler markırların eldesi için EST dizilerine özgül primerler tasarlanmış ve kullanılmıştır.

EST'ler transkripsiyonel bölgelerden elde edilen ve farklı türlerde yüksek korunmuşluk gösteren evrensel dizilerdir. Bu diziler karşılaştırmalı genomik çalışmaları gerçekleştirebilmek için oldukça kullanışlıdır. Özellikle EST temelli PZR markırları kolayca elde edilebilen düşük maliyetli markırlardır (Ya-Ping ve diğ., 2009). Çok çeşitli türlere ait EST kitaplıklarına ulaşabilmek için yaygın olarak kullanılabilen birkaç veri tabanı bulunmaktadır. Bunlardan en önemlileri TIGR gen indeksleri (<http://www.tigr.org/tdb/tgi/>), TIGR EGO (Lee ve diğ., 2002) ve NCBI veri tabanlarıdır (Pontius ve diğ., 2003). Bu kaynaklar dizilere ulaşmayı sağlayan ve araştırılan dizi bilgisi ile ilgili gerekli bilgilerin sunulduğu erişim yollarıdır. Bu çalışmada da buğday ile ilgili EST bilgilerini elde etmede bu veritabanlarından aktif olarak yararlanılmıştır.

Dayanıklı ve hassas çeşitlerdeki EST anlatım analizlerinde ilk adım olarak, sarı pas uygulanmış buğdaya (*Triticum aestivum*) ait “TA117G1X” isimli kitaplıktan 1549 adet EST’ye ulaşılmıştır. Kontaminasyonlu dizileri temizlenen bu EST’ler ile 136 adet kontig ve 989 adet singleton elde edilmiştir. “BlastX analizleri” sonucu kontig ve singletonlara karşılık gelen protein profilleri çıkarılarak bu proteinler fonksiyonlarına göre metabolik kategorilere ayrılmıştır. Kontig ve singletonlarda en büyük fonksiyonel kategori metabolizma ve enerji olarak belirlenmiştir. DNA seviyesinde PZR analizleri gerçekleştirebilmek amacıyla 92 adet singleton, 39 adet ise kontig primeri tasarlanarak kışlık ekmeçlik buğdaya ait altı genotipte PZR analizleri gerçekleştirilmiştir. Anaçlar düzeyinde yüksek seviyede polimorfizm gözlenmekle beraber (kontig primerler kullanılarak gerçekleştirilen PZR analizlerinde anaçlar düzeyinde polimorfiz %37, singleton primerler kullanıldığında ise bu oran %52 olarak belirlenmiştir) bu çalışmada gerçekleştirilen Bulk Segregasyon Analizleri sonucunda saptanan polimorfik bantların markır niteliği taşımadığı belirlenmiştir. Benzer şekilde Ya-Ping ve diğerleri tarafından 2009 da gerçekleştirilen bir çalışmada buğday külleme hastalığı (powdery mildew), pas hastalıklarına, mantarlara, buğday mozaik virüsü gibi hastalıklara direnç gösterebilen ve buğdaya yakın yabani bir tür olan *Haynaldia villosa* (L.) *schur* kullanılarak gerçekleştirilen çalışmalarda buğday ve pirince ait EST’ler kullanılarak 240 STS primerine ulaşılmış ve DNA düzeyinde analizler gerçekleştirilmiştir. Bu analizler sonucunda *H. Villosa*’da 1V ve 7V arasında 13 adet kromozoma spesifik markır geliştirilmiştir (Ya-Ping ve diğ., 2009). Çalışmamızda çok sayıda (92+39+77 adet) primer kullanılmasına karşın markır niteliği taşıyan bant profili elde edilememesinin nedeni seçilen bölgelerdeki korunmuşluk nedeniyle ayırt edici markırların oluşmaması olabilir. EST’ler transkripsiyonel bölgelerden elde edildikleri için oldukça yüksek korunmuşluk göstermektedir. Daha fazla sayıda ve farklı EST’lere ait primer dizilerinin denenmesiyle bu sorun aşılabilecektir.

Çalışmada ikinci adım olarak elde edilen EST- temelli markırlar ile çeşitlerin akrabalık dereceleri incelenmiştir. Dayanıklı ve hassas kışlık ekmeçlik buğdayların genetik uzaklık ve benzerliğini ölçmek için, sarı pas uygulanmış buğdaya ait TA117G1X isimli EST kitaplığı kullanılarak elde edilen 62 polimorfik markırın hassas ve dayanıklı çeşitlerdeki yayılımı POPGENE programı ile incelenmiştir. Çeşitlerin uzaklığı 0 ile 0.3973 arasında değişmektedir. En uzak çeşitler Aytın98 ve Izgi01 olarak belirlenmiştir.



Uzaklık 0.3973'tür. En yakın çeşitler ise Harmankaya99 ve Sönmez2001'dir (0.2359). Son yıllarda yaygınlaşan EST dizileme projeleri ile bir çok bitki grubuna ait EST kitaplıklarının türlerin birbiriyle olan genetik yakınlık analizlerinde kullanılmaya başlandığı görülmektedir (Ohlrogge ve Benning, 2000). Torre ve diğerleri tarafından 2006 yılında gerçekleştirilen bir çalışmada tohumlu bitkilerin büyük bir grubunun genetik yakınlık ilişkilerini inceleyebilmek amacıyla EST dizilerinden yararlanılmıştır. Buğday ve pirincin genom yakınlığının araştırıldığı başka bir çalışmada *Triticeae*'ye ait 5.780 EST'den yararlanılmıştır (La Rota ve Sorrells, 2004). Bu çalışmalarda açıklanan çok çeşitli ölçümler EST'lerin filogenetik analizlerde başarıyla kullanılabileceğini desteklemektedir.

Tez çalışmasında hassas ve dayanıklı bireyleri ayırmada polimorfik markır eldesi için kullanılan diğer bir yaklaşım genomdaki RGA (resistance gene analogs)'lara dayanmaktadır. RGA uygulamaları bitki direnç genlerinin izole edilebilmesi ve moleküler markır geliştirmede 1995 ten beri başarıyla kullanılmaktadır. Markıra dayalı seçimde doğrudan direnç genleri ile ilişkili markırlar bir gene bağlı markırlardan daha çok tercih edilmektedir. Bitki direnç genleri ile ilgili son çalışmalar ve moleküler markır teknikleri direnç genleri için doğrudan markırlar geliştirmeyi olanaklı hale getirmiştir. Buğdayda en az 397 genin hastalıklara ve ya pestisitlere dayanıklılık sağladığı bilinmekle beraber (McIntosh ve diğ., 2005), *Lr21* (Huang ve diğ., 2003), *Lr10* (Feuillet ve diğ., 2003) ve *Pm3* (Yahiaoui ve diğ., 2004) gibi sadece birkaç tanesi klonlanmış direnç genleri olarak bilinmektedir. Bu tez çalışması kapsamında buğdaya ait NBS-LRR sınıfına ait iki NBS bölgesinden kökenlenen ve buğdaya ait NBS (nükleotid bağlanma bölgesi) içeren 77 RGA-EST dizisi moleküler markır elde edebilmek ve genetik uzaklık çalışmaları için kullanılmıştır. Vektör kontaminasyonları temizlenen RGA-EST dizilerinden tasarlanan primerler ile gerçekleştirilen PZR analizleri sonucunda anaçlar arasında %49.5 polimorfizm belirlenmiştir. Fakat Bulk Segregasyon Analizleri sonucunda fide dönemi ve ergin dönem dayanıklı ve duyarlı F<sub>2</sub> DNA karışımlarında bu bantlar açısından polimorfizm elde edilmemiştir. Bu nedenle, anaçlar arasında polimorfik olan bu bant profilleri markır niteliği taşımamaktadır. 2002 de Mohler ve diğerleri tarafından 11 buğday 3 arpa ve 1 pirinç genotipinde gerçekleştirilen RGA analizleri sonucunda *Triticeae*'lerin 1 S kromozomunun hastalık direnç lokusu ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. Buğdayda Fusarium head blight (FHB) ile bağlantı

belirlenirken arpa ve pirinçte külleme hastalığı direnç genleri *Mla1* ve *Pm17* ile bağlantı belirlenmiştir.

Hassas ve dayanıklı çeşitler arasında polimorfizm gösteren 38 RGA-EST primeri ile anaçların genetik uzaklık ve benzerliği POPGENE programı kullanılarak belirlenmiştir. Çeşitlerin uzaklığı 0 ile 0.7274 arasında değişmektedir. En uzak çeşitler PI178383 ve Izgi01 olarak belirlenmiştir. Uzaklık 0.7274'tür. En yakın çeşitler ise Harmankaya99 ve Sönmez2001'dir (0.4282). Hem EST kökenli kontig ve singletonların hem de RGA-EST'lerin kullanıldığı genetik uzaklık ve benzerlik çalışmalarında en yakın çeşitler Harmankaya99 ve Sönmez2001 olarak belirlenmiştir. En uzak çeşitler ise EST kökenli kontig ve singletonlar kullanıldığında Aytın98 ve Izgi01, RGA-EST'ler kullanıldığında ise PI178383 ve Izgi01 olarak belirlenmiştir. Genom üzerinde farklı bölgelerden kökenlenen farklı primer setlerinin kullanıldığı PZR analizleri ile genomdaki farklı bölgeler çoğaltıldığı için birebir örtüşen sonuçların gözlenmemesi beklenen bir sonuçtur.

Populasyon genetik analizleri gerçekleştirebilmek amacıyla birçok bilgisayar programı kullanılabilir durumdadır. Bu programlar populasyonun yapısı ve çeşitliliği konusunda birçok bilgi sağlamaktadır. Bu programlardan biri olan POPGENE (Yeh ve Boyle, 1997) kullanımı kolay "Microsoft Windows" temeline dayanan populasyonların içinde ve arasında kodominant veya dominant markırların kullanılarak genetik çeşitlilikleri belirleyebilen bir bilgisayar programıdır (Saad, 2009). Naz ve diğerleri tarafından 2006 da gerçekleştirilen çalışmada 10 buğday hattı 6 RAPD primeri ile analiz edilerek POPGENE programı yardımı ile genetik uzaklıkları belirlenmiştir.

Çalışmada son olarak dayanıklı ve hassas bireyler arasında gen anlatımının farklılığı incelenmiştir. Gen anlatımının hızlı analizinde en etkili yöntem real-time PZR (gerçek zamanlı PZR)'dir. Bu yöntem sayesinde DNA ve RNA örnekleri kalitatif ve kantitatif olarak kısa sürede analiz edilebilmektedir. Fakat tek genin anlatımının incelendiği analizler kullanım açısından çok pratik yöntemler değildir. Bu nedenle tez çalışmasında aynı anda 30 genin anlatım analizlerini gerçekleştirebilen, kullanımı kolay, zaman yönünden büyük üstünlükler sağlayan GeXP GenomeLab Genetik Analiz Sistemi (Beckman Coulter) kullanılmıştır. Gen anlatım analizleri "multiplex" halinde

gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla biyoinformatik analizler ile elde edilen kontig ve singletonların fonksiyonel kategorileri BlastX analizi ile belirlendikten sonra stres ve stresle ilişkili olanlar belirlenerek gen anlatım analizlerinde kullanılmak üzere primerler tasarlanmıştır. Ayrıca bitkilerde mantar hastalık mekanizması ile ilişkili genler belirlenerek bu genlerin farklı organizmalardaki dizileri eşleştirilerek ortak olan korunmuş bölgelerinden de gen anlatım analizleri gerçekleştirilebilmek için primerler tasarlanmıştır. Bu amaçla dört multipleks oluşturulmuştur (Kontig 1, Singleton 1, Singleton 2, Resistance multipleksleri). Her bir multipleksde 2 kontrol gen (Aktin ve GAPDH) ve anlatımı araştırılan 10 gen bulunmaktadır. Bu çalışmanın sonucunda dikkat çekici veriler elde edilmiştir.

Yürütülen bu doktora tez projesi kapsamında singleton CA598691'nin BlastX karşılığının "tip 1 lipid transfer protein öncülü" olduğu belirlenmiştir. Kontrol ve pas uygulaması yapılmış genotiplerin pas uygulaması gerçekleştirilen zaman dilimlerinde kontrol bitkilere göre gen anlatımları karşılaştırıldığında PI178383, Sönmez2001 ve Aytın98 genotiplerinde kontrol bitkilere göre gen anlatımında ~1.5 kat artış gözlenmiştir. ES14 genotipinde ise bu artış 2 katı aşmıştır. Bu bulgular tip 1 nonspesifik lipid transfer proteinde 8. saatin patojene cevapta belirleyici olduğunu ve genotiplerin patojene karşı oluşturdukları cevabın patojenle temastan sonraki 8. saatte başladığını düşündürmektedir. 8. saatten sonra ise bu genin anlatımında düşüş gözlenmektedir. LTP'lerin hücre dışı yayılımı ve enfeksiyon sonrası gen anlatımlarında meydana gelen değişiklikler bu proteinlerin aktif bitki savunma proteinleri olduğunu düşündürmektedir (Kirubakaran ve diğ., 2008). Mantar hastalıklarına karşı bitki savunmasında genellikle büyük çeşitlilik gösteren bitki proteinleri önemli rol oynar. Lipid transfer proteinleri (LTP), PR proteinlerinin bir üyesidir ve bitkiler aleminde önemli role sahiptir. LTP'lerin fitopatojenlere karşı antimikrobiyal potansiyelleri ile ilgili araştırmalar bulunmaktadır. Velazhahan ve diğ. "pearl millet" tohumlarından antifungal protein izole ederek saflaştırmıştır. Bu proteinin yapısı incelendiğinde pamuk, buğday ve arpadaki LTPlerle yüksek seviyede dizi benzerliği taşıdığı belirlenmiştir. Ayçiçeği tohumlarındaki antifungal LTP proteinlerinin *F. solani* f. sp. *eumartii*'ye karşı kullanıldığında spor çimlenmesini baskıladığı belirlenmiştir. Kirubakaran ve diğ. (2008) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada buğdaydaki LTP'nin pirinç gibi ekonomik önemi olan tahıllar ile yonca ve muz gibi önemli bitkilerde geniş boyutta fitopatojenik

funguslara karşı antifungal aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Belirlenen buğday *Ltp 3F1* geninin bitkilerde hastalık dirençliliğinde etkili olduğu ve genetik mühendisliği tekniği ile kullanılabilceği saptanmıştır.

Patojene cevap ile ilişkili birçok bitki savunma mekanizması aynı zamanda alüminyum (Al) toksisitesi semptomları ile de ilişkilidir. Bu durum Al'nin patogenezle ilişkili sinyal iletim yolunda elisitör olarak rol oynayabileceğini düşündürmektedir (Hamel ve diğ., 1998). Tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen biyoinformatik analizler kapsamında singleton CA598422'nin BlastX homoloğunun "*wali5* geni" olduğu belirlenmiştir. Bu gen bitkilerde alüminyum toksisitesi ile ilişkilidir. Alüminyumun bitkilerde patojenle ilişkili sinyal iletim yolunda etkili olduğuna dair çalışmalar mevcuttur. Genome Lab GeXP genetik analiz sistemi ile gerçekleştirilen çalışma kapsamında tüm genotiplerde (PI178383 dışında) *wali5* genin anlatımında 12. saatte önemli bir artış gözlenmiştir. Tüm genotiplerde gen anlatım analizleri kontrol bitki ile karşılaştırmalı olarak incelendiğinde gen anlatım seviyelerinde ~6–19 kat arası artış gözlenmiştir. Benzer bir çalışmada wali genleri patogenezle ilişkili protein 1. 2 (PR-1.2) ile ilişkilendirilmiş ve bu genin anlatımında bitkide 12. saatte artış gösterdiği belirtilerek gen anlatımında yaklaşık 10 katlık bir artış saptanmıştır. Bizim çalışmamız da bu bulgu ile paralellik göstermektedir. Pirinçte cv Blanco da PR 1.2 geninin anlatım yolunda Al'nin etkili olduğunu ve bu genin ait olduğu grubun memeliler, böcekler, mantarlar ve bitkilerde de ortak olduğu belirlenmiştir fakat bu proteinin ait olduğu ailenin fonksiyonu tam olarak bilinmemektedir (Milla ve diğ., 2002). Kontig 80'nin BlastX homoloğu *wali7* genidir. *wali5* geninde de olduğu gibi bu gen bitkilerde alüminyum toksisitesi ile ilişkilidir ve aynı zamanda hastalık dayanıklılık yolunda rol oynadığı düşünülmektedir. Richards ve diğerleri tarafından 1994 yılında gerçekleştirilen bir çalışmada buğday köklerinde düşük seviyede *wali7* mRNA'sının bulunduğu ve 24 saat Al ile etkileşimden sonra bu genin anlatımının 3 gün boyunca artışını sürdürdüğü belirlenmiştir. *wali7* mRNA'sı aynı zamanda yapraklarda da bulunmaktadır. Fakat kökler Al ile etkileşime girse bile yapraklardaki genin anlatımında artış gözlenmemektedir. Genome Lab GeXP genetik analiz sistemi ile gerçekleştirilen tez çalışması kapsamında Harmankaya99 genotipinde *wali7* genin anlatımında 12. saatte önemli bir artış gözlenmiştir (pas uygulaması yapılmış bitkide kontrol bitkiye göre ~ 3.5 kat). Diğer genotiplerde bu genin anlatımı bu kadar yüksek olmamıştır.

Gen anlatım analizlerinde hastalık mekanizması ile ilişkili genlerin içinde bulunduğu çoklu primerlerin (multipleks) grubuna dahil olan MAPK geninin anlatımı en yüksek seviyeye ES14 genotipinde ve 8. saatte ulaşmıştır (pas uygulaması yapılmış bitkide kontrol bitkiye göre ~ 4 kat). Ardından PI178383 genotipinde 48. saatte ve Harmankaya99 genotipinde 24. saatte pas uygulaması yapılmış bitkide kontrol bitkiye göre ~2.5 kata varan artış gözlenmiştir. Mitojen-aktifleştirici protein kinazlar (MAPK) (Mitogen-Activated Protein Kinase) ökaryotlarda korunmuştur ve mayalardan insana kadar çok çeşitli organizmalarda tanımlanmışlardır (Herskowitz, 1995; Schaeffer ve Weber, 1999). Bitkilerde çeşitli patojenlere karşı savunma cevabı olarak çok sayıda MAPK belirlenmiştir. Bitki hücrelerinde MAPK aktivitesi avirulent patojenle temastan sonra veya patojen kökenli elisitörlere cevap olarak tetiklenir. Genin bu hızlı aktifleşme süreci MAPK'nin bitkilerde savunma ile ilişkili sinyal iletim yolunda primer bir bileşen olduğunu düşündürmektedir (Pedley ve Martin, 2005) MAPK'ler hastalık direnç cevabı ile ilişkilidir ve genellikle nekrotrofik mantarların saldırısı sırasında anlatım seviyelerinde değişiklikler gözlenir. Benzer şekilde salatalıkta köklerin *Trichoderma asperellum* ile inokülasyonundan sonra MAPK'nin aktif hale geldiği belirlendi. Bitkilerde bu genin aktifleşmesi bakteriyel bir patojen olan *Trichoderma*'ya karşı savunma cevabını tetiklemektedir. MAPK geni susturulduğunda bitkide savunma cevabı belirlenememiştir. Bu çalışmada MAPK'nin yaralanma gibi diğer stres cevaplarında da etkili rol oynadığı belirtilmiştir (Shoresha ve diğ., 2006).

Singleton CA598256'nin BlastX homoloğu ısı şoku proteini 80 (HSP80) (Heat Shock Protein 80) olarak belirlendi. En yüksek gen anlatımı Aytın98 genotipinde pas uygulaması yapılmış bitkide kontrol bitkiye göre ~2.5 - 3 kat arası artış belirlendi. Hsp 80 ve 90'nın NB-LRR proteinlerinin birikiminde belirleyici olduğu belirlenmiştir (Holt ve diğ., 2005).

Singleton CA597830'nin BlastX homoloğu 14-3-3 genidir. Bu genin ürünü olan protein yüksek korunmuşluk gösteren bir moleküldür. Sinyal iletimi, hücre döngüsünün kontrolü gibi çok çeşitli biyolojik süreçlerde görev almaktadır. Diğer yandan bu proteinin sinir zedelenmesi veya patojenler, metabolik stres gibi dış ve ya iç kaynaklı streslerle tetiklendiğine dair kanıtlar bulunmaktadır fakat bu mekanizmalar henüz

açıklığa kavuşmamıştır (Bae ve diğ., 2003; Namikawa ve diğ., 1998; Roberts ve diğ., 2002). Yürütülen doktora tez çalışması kapsamında Aytın98 genotipinde 12. saatte pas uygulaması yapılmış bitkide kontrol bitkiye göre gen anlatımında ~ 7–8 katlık bir artış gözlenmiştir. Bu genin anlatımının patojen enfeksiyonu sonucu arttığına yönelik bulguları bizim çalışmamızda desteklemektedir. 14-3-3 proteinine dair ilk bulgular arpada powdery mildew mantarıyla etkileşim sonucunda transkriptlerde birikim olarak gözlenmiştir (Brandt ve diğ., 1992; Thordal-Christensen ve diğ., 1992). 14-3-3 proteininin birikimi erken fakat yavaş meydana gelmektedir. Bu proteinin proton pompalarını düzenleyerek aşırı duyarlı yanıtı tetiklediği bildirilmiştir (Zhou ve diğ., 2000). 14-3-3 proteininin bitki patojen direnç cevabı ile ilgili farklı bir rolü de *Arabidopsis AKR2* geni belirlendikten sonra açığa çıkmıştır (Yan ve diğ., 2002). *AKR2* maya ikili hibrid teknolojisi ile incelenmiş ve bu proteinin 14-3-3 proteini ile etkileşimde olduğu belirlenmiştir. Ayrıca patojen dayanıklılık cevabında olumsuz yönde rol oynadığı bildirilmiştir. Roberts ve Bowles (1999), domateste mantar patojeni *Cladosporium fulvum*'um avirulens elisitörü olan Avr9 ile etkileşimden sonra gen anlatımını analiz etmiş ve benzer sonuçlara ulaşmıştır.

Singleton CA598181'in BlastX homologu patogenezele ilişkili protein 1.2 (PR 1.2) olarak belirlendi. Bu genin anlatımı Harmanakaya99 genotipinde 24. saatte pas uygulaması yapılmış bitkide kontrol bitkiye göre ~10–11 kat arası artış gözlemlendi. ES14 genotipinde ise 48. saatte bu artış pas uygulaması yapılmış bitkide kontrol bitkiye göre ~2–2.5 kat arasında gözlenmiştir. Bitkiler, fungus ve virüs gibi bir patojenle karşılaştıklarında fitoaleksinler, antimikrobiyal peptidler ve küçük proteinler (thionin, defensin benzeri proteinler, ve peptidler gibi düşük molekül ağırlığına sahip bileşikler) üretir ve birçok antimikrobiyal proteinin anlatımını artırır (Bull ve diğ., 1992; Caruso ve diğ., 1996). Bu bitki proteinleri patogeneze ilişkili proteinler (PR Proteinleri) olarak adlandırılır ve bu proteinler amino asit dizi analizine göre 5 grupta toplanır. Bunlar PR 1,-2, -3, -4, -5'tir (Van Loon, 1985). Patojen bitkiye bulaştığında PR-1 proteinlerinin yüksek seviyede birikimleri olur ve hem bitkide hem de *in vitro* da antifungal özellik gösterirler (Tahiri-Alaoui ve diğ., 1993; Niderman ve diğ., 1995). PR-1 proteinleri buğday, pirinç, mısır, tütün, *Arabidopsis*, arpa ve diğer birçok bitkide bulunmuştur (Molina ve diğ., 1999; Agrawal ve diğ., 2000; Bryngelsson ve diğ., 1994; Muradov ve diğ., 1993). Farklı organizmalardaki bu proteinlerin dizileri karşılaştırıldığında en az

%35 oranında benzerlik görülmüştür (Selitrennikof, 2001) PR-1 proteinleri, bitkilerde patojen olan birçok fungusu karşı mikromolar seviyede bile antifungal aktivite göstermiştir (Niderman ve diğ., 1995).

PR5 geninin anlatımı Harmanakaya99 genotipinde 8. saatte ve ES14 genotipinde 48. saatte kontrol bitkilerde belirlenemezken pas uygulanmış bitkilerde bu genin anlatımı saptanmıştır.

Singleton CA597983'ün BlastX homoloğu GRAB2 genidir. Aydın98 genotipinde 12. saatte ve Sönmez2001 genotipinde 48. saatte bu genin anlatımı kontrol bitkilerde belirlenemezken pas uygulanmış bitkilerde bu genin anlatımı saptanmıştır.

Singleton CA598181'in BlastX homoloğu pathogenezele ilişkili protein 1.2 (PR 1.2) olarak belirlendi. Bu genin anlatımı Sönmez2001 12. saat ve Aydın98 12. saatte kontrol bitkilerde belirlenemezken pas uygulanmış bitkilerde bu genin anlatımı saptanmıştır. Bu bulgular bu genlerin anlatımının patojen bulaşması ile tetiklendiğini düşündürmektedir.

Bu tez çalışmasında buğday bitkisinin üretimini ve verimini tehdit eden sarı pas hastalığına dayanıklı ve duyarlı olduğu klasik ıslah yöntemleri ve fitopatolojik çalışmalar ile belirlenen buğday çeşitlerinin hem DNA düzeyinde (EST kökenli kontig, singleton ve RGA-EST) hem de RNA düzeyinde GeXP GenomeLab Genetik Analiz Sistemi (Beckman Coulter) kullanılarak analizleri gerçekleştirildi. DNA düzeyinde gerçekleştirilen çalışmalar kapsamında çeşitler arasındaki akrabalık derecelerinin belirlenmesinde genetik uzaklık ve benzerliklerinin belirlenmesi sonucunda elde edilen bilgilerin, bitki ıslah çalışmalarında kalitatif ve kantitatif karakterler için yapılacak markırlara dayalı seçim, genetik ve bağlantı haritaları oluşturma, QTL analizleri gibi araştırmalara katkı sağlayacak bir ön çalışma niteliğinde olduğu düşünülmektedir. Ayrıca bu çalışmada buğdaya ait EST dizileri ve biyoinformatik araçlar gen anlatımlarını belirlemede yüksek verimlilikte kullanılmıştır. Çok sayıda genin aynı anda analizine olanak tanıyan GeXP GenomeLab Genetik Analiz Sistemi (Beckman Coulter) kullanılarak ilk defa ülkemize özgü çeşitlerde pas uygulamasını takiben farklı saatlerde mantar hastalık direncine karşı gen anlatım profilleri çıkarılmaya çalışılmış ve çeşitli sonuçlar elde edilmiştir. Bu çalışmanın daha sonra yapılması planlanan hastalık

dayanıklılık mekanizması ve sinyal iletim yollarının araştırılması gibi daha karmaşık çalışmalara katkı sağlayacağı düşünülmektedir.



## KAYNAKLAR

- ADAMS, M. D., KELLEY, J. M., GOCAYNE, J. D., DUBNICK, M., POLYMEROPOULOS, M. H., XIAO, H., MERRIL, C. R., WU, A., OLDE, B., MORENO, R. F., KERLAVAGE, A. R., MCCOMBIE, W. R., VENTER, J. C., 1991, Complementary DNA sequencing: Expressed sequence tags and human genome Project, *Science*, 252, 1651-1656.
- AGRAWAL, G. K., JWA, N. S., RAKWAL, R., 2000, A novel rice (*Oryza sativa L.*) acidic PR1 gene highly responsive to cut, phytohormones, and protein phosphatase inhibitors, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 274,157–165.
- AHARONI, A., KEIZER, L. C., VAN DEN BROECK, H. C., BLANCO-PORTALES, R., MUNOZ-BLANCO, J., BOIS, G., SMIT P., DE VOS, R. C., O'CONNELL, A. P., 2002, Novel insight into vascular, stress, and auxin-dependent and independent gene expression programs in strawberry, a non-climacteric fruit, *Plant Physiol.*, 129, 1019-31.
- AKAR, T., 2002, Türkiye’de yetiştirilen yerel makarnalık buğday çeşitlerinde genetik farklılığın polimorfik DNA analizi ile belirlenmesi, *Doktora Tezi*, Ankara Üniv., Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı.
- ALAM J., 2004, Improvement of growth and yield of bread wheat by means of chemical manipulation under glass house conditions, *Yüksek lisans tezi*, University of the Free State.
- ANNTUFAN, H., 2003, Characterization of yellow rust (*Puccinia striiformis*) resistance in a F<sub>6</sub> durum wheat population, *Doktora Tezi*, Colorado State University.
- ARIMURA, G., TASHIRO, K., KUHARA, S., NISHIOKA, T., OZAWA, R., TAKABAYASHI, J., 2000, Gene responses in bean leaves induced by herbivory and by herbivore-induced volatiles, *Biochem Biophys Res Commun*, 22, 277-305.
- ARUMUGANATHAN, K., EARLE, E. D., 1991, Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Molecular Biology Reporter* 9, 208-218.
- AUSTIN, M.J., MUSKETT, P., KAHN, K., FEYS, B.J., JONES, J.D., PARKER, J.E., 2002, Regulatory role of SGT1 in early R gene-mediated plant defenses, *Science*, 295, 2077-2080.

- AUSUBEL, F. M., 2005, Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved?, *Nature Immunol.*, 6, 973–979.
- AZEVEDO, C., SADANANDOM, A., KITAGAWA, K., FREIALDENHOVEN, A., SHIRASU, K., SCHULZE-LEFERT, P., 2002, The RAR1 interactor SGT1, an essential component of R gene-triggered disease resistance, *Science*, 295, 2073–2076.
- BAE, S., XIAO, Y., LI, G., CASIANO, C.A., ZHANG, L., 2003, Effect of maternal chronic hypoxic exposure during gestation on apoptosis in fetal rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 285, 983–990.
- BAHRMAN, N., ZIVY, M., THIELLEMENT, H., 1988, Genetic relationships in the sitopsis section of *Triticum* and the origin of the B genome of polyploid wheats, *Heredity*, 61, 473–480.
- BANSAL, P. K., ABDULLE, R., KITAGAWA, K., 2004, Sgt1 associates with Hsp90: an initial step of assembly of the corekinetochore complex, *Mol Cell Biol*, 24, 8069–8079.
- BARIANA, H. S., BROWN, G. N., AHMED, N. U., KHATKAR, S., CONNER, R. L., WELLINGS, C. R., HALEY, S., SHARP, P. J., LAROCHE, A., 2002, Characterisation of *Triticum vavilovii* -derived stripe rust resistance using genetic, cytogenetic and molecular analyses and its marker-assisted selection, *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 104, 315–320.
- BİLGİN, O., KORKUT, K. Z., 2005, Bazı ekmeklik buğday (*Triticum aestivum* L.) çeşit ve hatlarının tane verimi ve bazı fenolojik özelliklerinin belirlenmesi, *Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 2 (1).
- BOLLER, T., 1991, Ethylene in pathogenesis and disease resistance. In the plant hormone ethylene, A.K. Mattoo and J.C. Suttle, eds (Boca Raton, FL: CRC Press), 293–314.
- BOTSTEIN, D., WHITE, R.L., SKOLNICK, M., DAVIS, R.W., 1980, Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms, *Am. J. Hum. Genet.*, 32, 314–331.
- BOYD, L.A., 2005, Can Robigus defeat an old enemy? – Yellow rust of wheat, *Journal of Agricultural Science*, 143, 233–243.
- BRANDT, J., THORDAL-CHRISTENSEN, H., VAD, K., GREGERSEN, P.L. COLLINGE, D. B., 1992, A pathogen-induced gene of barley encodes a protein showing high similarity to a protein kinase regulator, *Plant J.*, 2, 815–820.
- BREDERODE, F. T., LINTHORST, H. J. M., BOL, J. F., 1991, Differential induction of acquired resistance and PR gene expression in tobacco by virus infection, ethephon treatment, UV light and wounding, *Plant Mol. Biol.*, 17, 1117–1125.

- BRYNGELSSON, T., SOMMER-KNUDSEN, J., GREGERSEN, P. L., COLLINGE, D. B., EK, B., THORDAL-CHRISTENSEN, H., 1994, Purification, characterization, and molecular cloning of basic PR-1-type pathogenesis-related proteins from barley, *Mol. Plant Microbe Interact.*, 7, 267–275.
- BULL, J., MAUCH, F., HERTIG, C., REGMANN, G., DUDLER, R., 1992, Sequence and expression of a wheat gene that encodes a novel protein associated with pathogen defense, *Mol. Plant Microbe Interact*, 5, 516–519.
- CAMERON, R. K., 2000, Salicylic acid and its role in plant defense responses: what do we really know?, *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 56, 91–93.
- CARUSO, C., CAPORALE, C., CHILOSI, G., VACCA, F., BERTINI, L., MAGRO, P., POERIO, E., BUONOCORE, V., 1996, Structural and antifungal properties of a pathogenesis-related protein from wheat kernel, *J. Protein Chem.*, 15, 35–44.
- CHEN, X. M., 2005, Epidemiology and control of stripe rust (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*) on wheat, *Can. J. Plant Pathol*, 27, 314–337.
- CHEN, X. M., HAYES, P. M., TOOJINDA, T., VIVAR, H., KUDRNA, D., KLEINHOF, A., LEUNG, H., LINE, R. F., 1998a, Genetic mapping of genes for stripe rust resistance in barley using resistance gene analog polymorphism and AFLP markers, *Phytopathology*, 88, 16.
- CHEN, X. M., LINE, R. F., LEUNG, H., 1998b, Genome scanning for resistance-gene analogs in rice, barley and wheat by high-resolution electrophoresis, *Theor Appl Genet*, 97, 345–355.
- CHHUNEJA, P., KAUR, S., GARG, T., GHAI, M., KAUR, S., PRASHAR, M., BAINS, N.S., GOEL, R.K., KELLER, B., DHALIWAL, H.S., SINGH, K., 2008, Mapping of adult plant stripe rust resistance genes in diploid A genome wheat species and their transfer to bread wheat, *Theor. Appl. Genet.*, 116, 313–324.
- CHISHOLM, S. T., COAKER, G., DAY, B., STASKAWICZ, B. J., 2006, Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response, *Cell*, 124, 803–814.
- COLLARD, B.C.Y., JAHUFER, M.Z.Z., BROUWER, J.B., PANG, E.C.K., 2005, An introduction to markers, Quantitative Trait Loci (QTL) mapping and marker assisted selection for crop improvement: The basic concepts, *Euphytica*, 142, 169–196.
- CURTIS, B. C., MACPHERSON, H. G., RAJARAM, S., 2002, Bread wheat improvement and production, Food and Agriculture Organization of the United Nations, 9251048096.
- ÇÖLKESEN, M., 1995, Harran ovasında buğday tarımı ve sorunları üzerine yapılan araştırma ve gözlemler, *Harran Üniversitesi Zir. Fak. Der.*, 1, 117-131.

- DANGL, J. L., JONES, J. D. G., 2001, Plant pathogens and integrated defence responses to infection, *Nature*, 411, 826–833.
- DİLBİRLİĞİ, M., GILL, K. S., 2003, Identification and analysis of expressed resistance gene sequences in wheat, *Plant Molecular Biology*, 53, 771–787.
- DOEHLEMANN, G., BERNDT, P., HAHN, M., 2006, Different signalling pathways involving a G $\alpha$  protein, cAMP and a MAP kinase control germination of *Botrytis cinerea* conidia, *Molecular Microbiology*, 59, 821–835.
- EBEL, J., CASIO, E. G., 1994, Elicitors of plants defense responses, *International Review of Cytology*, 148, 1-36.
- EPPLE, P., APEL, K., BOHLMANN, H., 1995, An *Arabidopsis thaliana* thionin gene is inducible via a signal transduction pathway different from that for pathogenesis-related proteins, *Plant Physiol*, 109, 813–820.
- ERAYMAN, M., SANDHU, D., SIDHU, D., DİLBİRLİĞİ, M., BAENZIGER, P. S., GILL, K. S., 2004, Demarcating the gene-rich regions of the wheat genome, *Nucleic Acids Research*, 32, 1-20.
- ERIKSSON, J., HENNING, E., 1894, Die Hauptresultate einer neuen untersuchung über die getreiderostpilze, *Z. Pflanzenkr.*, 4, 197–203.
- FARMER, E.E., JOHNSON, R.R., RYAN, C.A., 1992, Regulation of expression of proteinase inhibitor genes by methyl jasmonate and jasmonic acid, *Plant Physiol*, 98, 995–1002.
- FARMER, E. E., RYAN, C. A., 1992, Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors, *Plant Cell*, 4, 129–134.
- FEUILLET, C., SCHACHERMAYR, G., KELLER, B., 1997, Molecular cloning of a new receptor-like-kinase gene encoded at the Lr10 disease resistance locus of wheat, *Plant J.*, 11, 45–52.
- FEUILLET, C., TRAVELLA, S., STEIN, N., ALBAR, L., NUBLAT, A., KELLER, B., 2003, Map-based isolation of the leaf rust disease resistance gene *Lr10* from the hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) genome, *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 15253–15258.
- FEYS, B. J., PARKER, J. E., 2000, Interplay of signaling pathways in plant disease resistance, *Trends in Genetics* 16, 449–455.
- FLAVELL, R. B., SMITH, D. B., 1976, Nucleotide sequence organisation in the wheat genome, *Heredity : an International Journal of Genetics*, 37, 231-252.
- FLOR, H. H., 1971, Current status of the gene-for-gene concept, *Annual Review of Phytopathology*, 9, 275-296.

- FUCKEL, L., 1860, *Enumeratio fungorum nassovia*, *Jahrb Ver Naturk*, Herzogth. Nassau, 15, 9
- GARY, E., ROBERT, V., GOODMAN, M., 2004, Systemic Acquired Resistance and Induced Systemic Resistance in conventional agriculture, *Crop Sci.*, 44, 1920–1934.
- GLAZEBROOK, J., 2005, Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens, *Annu. Rev. Phytopathol.*, 43, 205–227.
- GRENAN, A., 2006, Plant response to bacterial pathogens overlap between innate and gene-for-gene defense response, *Plant Physiology*, 142, 809–811.
- GRODZICKER, T., WILLIAMS, J., SHARP, P., SAMBROOK, J., 1975, Physical mapping of temperature sensitive mutants of adenovirus, *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol*, 39, 439-446.
- GUEGUEN, Y., CADORET, J. P., FLAMENT, D., BARREAU-ROUMIGUIERE, C., GIRARDOT, A. L., GARNIER, J., HOAREAU, A., BACHERE, E., ESCOUBAS, J. M., 2003, Immune gene discovery by expressed sequence tags generated from hemocytes of the bacteria-challenged oyster, *Crassostrea gigas*, *Gene*, 303, 139-145.
- GUPTA, P.K., VARSHNEY, R.K., 2004, In GUPTA, P.K., VARSHNEY, R.K. (eds), *Cereal genomics: an overview Cereal genomics*, Kluwer Academic Press, Dordrecht, The Netherlands, pp. 639.
- HAMEL, F., BRETON, C., HOUDE, M., 1998, Isolation and characterization of wheat aluminium-regulated genes: possible involvement of aluminium as a pathogenesis response elicitor, *Planta* 205, 531-538.
- HAMMOND-KOSACK, K. E., JONES, J. D., 1997, Plant disease resistance genes, *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.*, 48, 575-607.
- HAWKSWORTH, D. L., 2001, The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycol Res.*, 105(12), 1422–1432
- HELENTJARIS, T., SLOCUM, M., WRIGHT, S., SCHAEFER, A., NIENHUIS, J., 1986, Construction of genetic linkage maps in maize and tomato using restriction fragment length polymorphisms, *Theor. Appl. Genet.*, 61, 650-658.
- HERSKOWITZ, I., 1995. MAP kinase pathways in yeast: For mating and more. *Cell* 80, 187–197.
- HOLT, B. F., BELKHADIR, Y., DANGL, J. L., 2005, Antagonistic control of disease resistance protein stability in the plant immune system, *SCIENCE*, 309

- HUANG, L., BROOKS, S.A., LI, W.L., FELLERS, J.P., TRICK, H.N., GILL, B.S., 2003, Map-based cloning of leaf rust resistance gene *Lr21* from the large and polyploid genome of bread wheat, *Genetics* 164, 655–664.
- HYLANDER, N., JØRSTAD, I., NANFELDT, J.A., 1953, Enumeratio uredinearum scandinavicarum, *Opera Bot*, 1, 1–102.
- JACCOUD, D., PENG, K., FEINSTEIN, D., KILIAN, A., 2001, Diversity arrays: a solid state technology for sequence information independent genotyping, *Nucleic Acids Res.*, 29 (4).
- JAIN, S.M., BRAR, D.S., AHLOOWALIA, B.S., 2002, Molecular techniques in crop improvement, *Kluwer Academic Publishers*, The Netherlands.
- JOHNSON, R., 1988, In SIMMONDS, N.W., RAJARAM, S. (eds), Durable resistance to yellow (stripe) rust in wheat and its implications in plant breeding, Breeding strategies for resistance to the rusts of wheat, CIMMYT, Mexico, pp., 63-75.
- JONES, J., DANGL, J., 2006, The plant immune system, *Nature*, 444, 323-329.
- KANAZIN, V., MAREK, L. F., SHOEMAKER, R. C., 1996, Resistance gene analogs are conserved and clustered in soybean, *Proc Natl Acad Sci USA*, 93, 11.746-11.750.
- KIRUBAKARAN, S. I., BEGUM, S. M., ULAGANATHAN, K., SAKTHIVEL, N., 2008, Characterization of a new antifungal lipid transfer protein from wheat, *Plant Physiology and Biochemistry* , 46, 918-927.
- KITAJIMA, S., SATO, F., 1999, Plant pathogenesis-related proteins: molecular mechanisms of gene expression and protein function, *J. Biochem*, 125, 1-8.
- LA ROTA, M., SORRELLS M. E., 2004, Comparative DNA sequence analysis of mapped wheat ESTs reveals the complexity of genome relationships between rice and wheat, *Funct Integr Genomics*, 4, 34–46.
- LAN, L., CHEN, W., LAI, Y., SUO, J., KONG, Z., LI, C., LU, Y., ZHANG, Y., ZHAO, X., ZHANG, X., ZHANG, Y., HAN, B., CHENG, J., XUE, Y., 2004, Monitoring of gene expression profiles and isolation of candidate genes involved in pollination and fertilization in rice (*Oryza sativa* L.) with a 10K cDNA microarray, *Plant Mol. Biol.*, 54, 471-487.
- LAWTON, K., WEYMANN, K., FRIEDRICH, L., VERNOOIJ, B., UKNES, S., RYALS, J., 1995, Systemic acquired resistance in *Arabidopsis* requires salicylic acid but no ethylene, *Mol. Plant-Microb. Interact*, 6, 863–870.
- LEE, Y., SULTANA, R., PERTEA, G., CHO, J., KARAMYCHEVA, S., TSAI, J., PARVIZI, B., CHEUNG, F., ANTONESCU, V., WHITE, J., 2002, Cross-referencing eukaryotic genomes: TIGR orthologous gene alignments (TOGA). *Genome Res* 12, 493-502.

- LEIPE, D. D., KOONIN, E. V., ARAVIND, L. S., 2004, A class of P-loop NTPases including animal and plant regulators of programmed cell death: multiple, complex domain architectures, unusual phyletic patterns, and evolution by horizontal gene transfer, *J. Mol. Biol.*, 343, 1–28.
- LEISTER, D., BALLVORA, A., SALAMINI, F., GEBHARDT, C., 1996, A PCR based approach for isolating pathogen resistance genes from potato with potential for wide application in plant, *Nature Genet.*, 14, 421–429.
- LI, G. Q., LI, Z. F., YANG, W. Y., ZHANG, Y., HE, Z. H., XU, S. C., SINGH, R. P., QU, Y. Y., XIA, X. C., 2006, Molecular mapping of stripe rust resistance gene *YrCH42* in Chinese wheat cultivar Chuanmai 42 and its allelism with *Yr24* and *Yr26*, *Theor Appl Genet.*
- LIN, J.F., WU, S.H., 2004, Molecular events in senescing *Arabidopsis* leaves, *Plant J.*, 39, 612–628.
- LINE, R. F., CHEN, X. M., 1995, Success in breeding for and managing durable resistance to wheat rusts, *Plant Dis.*, 79, 1254–1255.
- LING, P., WANG, M., CHEN, X., CAMPBELL, K. G., 2007, Construction and characterization of a full-length cDNA library for the wheat stripe rust pathogen (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*), *BMC Genomics*, 8, 145.
- LOON, L. C., REP, M., PIETERSE, C. M. J., 2006, Significance of inducible defense-related proteins in infected plants, *Annu. Rev. Phytopathol.*, 44, 135–62.
- MALAMY, J., CARR, J., KESSIG, D., RASKIN, I., 1990, Salicylic acid: A likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection, *Science*, 250, 1002–1004.
- MARSALIS, M.A., GOLDBERG, N.P., 2006, Leaf, stem and stripe rust diseases of wheat, *New Mexico State University, Guide*, A-415.
- MCINTOSH, R., DEVOS, K., DUBCOVSKY, J., ROGERS, W., MORRIS, C., APPELS, R., ANDERSON, O., 2005, Catalogue of gene symbols for wheat: 2005 Supplement.
- MÉTRAUX, J. P., SIGNER, H., RYALS, J., WARD, E., WYSS-BENZ, M., GAUDIN, J., RASCHDORF, K., SCHMID, E., BLUM, W., INVERARDI, B., 1990, Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance, *Science* 250, 1004–1006.
- MILLA, M., BUTLER, E., HUETE, A.R., WILSON, C.F., ANDERSON, O., GUSTAFSON, J.P., 2002. Expressed sequence tag-based gene expression analysis under aluminium stress in rye, *Plant Physiology*, 130, 1706–1716.
- MILNER, M., SCRIMSHAW, N., WANG, D.I.C., 1978, Protein resources and technology, AVI Publishing, Westport, USA.

- MOHLER, V., KLAHR, A., WENZEL, G., SCHWARZ, G., 2002, A resistance gene analog useful for targeting disease resistance genes against different pathogens on group 1S chromosomes of barley, wheat and rye, *Theor Appl Genet*, 105, 364-368.
- MOLINA, A., GORLACH, J., VOLRATH, S., RYALS, J., 1999, Wheat genes encoding two types of PR-1 proteins are pathogen inducible, but do not respond to activators of systemic acquired resistance, *Mol. Plant Microbe Interact*, 12, 53-58.
- MORRISETTE, J., KRATZSCHMAR, J., HAENDLER, B., EL-HAYEK, R., MOCHCA-MORALES, J., MARTIN, B. M., PATEL, J. R., MOSS, R. L., SCHLEUNING, W. D., CORONADO, R., POSSANI, L. D., 1995, Primary structure and properties of helothermine, a peptide toxin that blocks ryanodine receptors, *Biophys. J*, 68, 2280-2288.
- MULLIS, K., FALOONA, F., SCHARF, S., SAIKI, R., HORN, G., ERLICH, H., 1986, Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: The polymerase chain reaction, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 51, 263-273.
- MUR, L. A. J., NAYLOR, G., WARNER, S. A. J., SUGARS, J. M., WHITE, R. F., LI, G. Q., LI, Z. F., YANG, W. Y., ZHANG, Y., HE, Z. H., XU, S. C., SINGH, R. P., QU, Y. Y., XIA, X. C., 2006, Molecular mapping of stripe rust resistance gene *YrCH42* in Chinese wheat cultivar Chuanmai 42 and its allelism with *Yr24* and *Yr26*, *Theor Appl Genet*. DOI 10.1007/s00122-006-0245-y
- MURADOV, A., PETRASOVITS, L., DAVIDSON, A., SCOTT, K. J., 1993, A cDNA clone for a pathogenesis-related protein 1 from barley, *Plant Mol. Biol.* 23, 439-442.
- NAMIKAWA, K., SU, Q., KIRYU-SEO, S., KIYAMA, H., 1998, Enhanced expression of 14-3-3 family members in injured motoneurons, *Brain Res Mol Brain Res*, 55, 315-320.
- NAZ, A., SWATI, A.S., KHAN, I.A., 2006, Studies on genetic diversity in Pakistani wheat varieties using randomly amplified polymorphic DNA, *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 9,15, 2858-2861.
- NESBITT, M., SAMUEL, D., 1998, Wheat domestication: archaeobotanical evidence, *Science*, 279, 1433.
- NEI, M., 1978, Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals, *Genetics*, 583-590.
- NIDERMAN, T., GENETET, I., BURYERE, T., GEES, R., STINTZI, A., LEGRAND, M., FRITIG, B., MOSINGER, E., 1995, Pathogenesis-related PR-1 proteins are antifungal. Isolation and characterization of three 14-kilodalton proteins of tomato and of a basic PR-1 of tobacco with inhibitory activity against *Phytophthora infestans*, *Plant Physiol.* 108, 17-27.



- OHLROGGE, J., BENNING, C., 2000, Unravelling plant metabolism by EST analysis. *Curr Opin Plant Biol* , 3, 224-228.
- PEDLEY, K.F., MARTIN, G. B, 2005, Role of mitogen-activated protein kinases in plant immunity, *Current Opinion in Plant Biology*, 8, 541–547.
- PENNINCKX, I. A. M. A., EGGERMONT, K., TERRAS, F. R. G., THOMMA, B. P. H. J., DE SAMBLANX, G. W., BUCHALA, A., MÉTRAUX, J.-P., MANNERS, J.M., BROEKAERT, W.F., 1996, Pathogen-induced systemic activation of a plant defensin gene in *Arabidopsis* follows a salicylic acid-independent pathway, *Plant Cell*, 8, 2309–2323.
- PHILLIPS, R.L., VASIL, I.K., 2001, *DNA-based markers in plants*, In PHILLIPS, R.L., VASIL, I.K. (eds.), *DNA-based markers in plants*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 497.
- PIETERSE, C. M. J., LEON-REYES, A., VAN DER ENT, S., VAN WEES, S. C. M., 2009, Networking by small-molecule hormones in plant immunity, *Nature Chemical Biology*, 5, 308 – 316
- PONTIUS, J. U., WAGNER, L., SCHULER, G. D., 2003, UniGene: A unified view of the transcriptome. In *The NCBI Handbook*,. 857–868. National Center for Biotechnology Information Bethesda, MD.
- POTTER, R.H., JONES, M.G.K., 1991, *Molecular analysis of genetic stability*, In DODDS, J.H. (eds.), *In vitro methods for conservation of plant genetic resources*, Chapman and Hall, London, 71-91.
- POTTER, S., UKNES, S., LAWTON, K., WINTER, A. M., CHANDLER, D., DIMAIO, J., NOVITZKY, R., WARD, E., RYALS, J., 1993, Regulation of a hevein-like gene in *Arabidopsis*, *Mol. Plant-Microbe Interac.*, 6, 680–685.
- RADWAN, O., MOUZEYAR, S., NICOLAS, P., VE BOUZIDI, M. F., 2005, Induction of a sunflower CC-NBS-LRR resistance gene analogue during incompatible interaction with *Plasmopara halstedii*, *Journal of Experimental Botany*, 56, 412, 567–575.
- RANDHAWA, H. S., 2004, Deletion mapping of homoeologous group 6-specific wheat expressed sequence tags, *Genetics*, 168, 677-686.
- ROBERTS, M.R., BOWLES, D.J., 1999, Fusicoccin, 14-3-3 proteins and defense responses in tomato plants, *Plant Physiol*, 119, 1243–1250.
- ROBERTS, M.R., SALINAS, J., COLLINGE, D.B., 2002, 14-3-3 proteins and the response to abiotic and biotic stress, *Plant. Mol. Biol* , 50, 1031-1039.
- ROELFS, A.P., 1989, Epidemiology of the cereal rusts in North America., *Can J Plant Pathol*, 11, 86-90.

- ROY, A., FRASCARIA, N., MACKAY, J., BONSCQUET, J., 1992, Segregating random amplified polymorphic DNA (RAPDs) in *Betula alleghaniensis*, *Theor. Appl. Genet.*, 85, 173-180.
- RUDD, S., 2003, Expressed sequence tags: alternative or complement to whole genome sequences? *Trends in Plant Science*, 8, 321-329.
- RYALS, J. A., NEUENSCHWANDER, U. H., WILLITS, M. G., MOLINA, A., STEINER, H. Y., HUNT, M. D., 1996, Systemic acquired resistance, *Plant Cell*, 8, 1809-1819.
- SANDHU, D., GILL, K. S., 2002, Gene-containing regions of wheat and the other grass genomes, *Plant Physiol*, 128, 803-811.
- SAAD, Y.M., 2009, Analysis of Genetic Variations in Two *Sarotherodon galilaeus* Sexes Using Popgene Global Veterinaria 3, 22-25.
- SCHAEFFER, H. J., Webber, M. J., 1999, Mitogen-activated protein kinases: Specific messages from ubiquitous messengers, *Mol. Cell. Biol.* 19, 2435-2444.
- SCHMIDT, J.K., 1827, Allgemeine ökonomisch-technische flora oder abbildungen und beschreibungen aller in bezug auf ökonomie und technologie, merkwürdigen Gewächse, Jena, Germany. 1, 27.
- SCHMIT, J.P., MUELLER, G. M., 2007, An estimate of the lower limit of global fungal diversity. *Biodivers Conserv*, 16(1), 99-111.
- SELITRENNIKOFF, C. P., 2001, Antifungal proteins, *Applied And Environmental Microbiology*, 67, 2883-2894.
- SEMAGN, K., BJØRNSTAD, Å., NDJIONDJOP, M.N., 2006, An overview of molecular marker methods for plants, *African Journal of Biotechnology*, 5 (25), 2540-2568.
- SHIRASU, K., SCHULZE-LEFERT, P., 2000, Regulators of cell death in resistance. *Plant Molec Biol.*, 44, 371-385.
- SHIZ, X., CHEN, X. M., LINE, R. F., LEUNG, H., WELLINGS, C. R., 2001, Development of resistance gene analog polymorphism markers for the Yr9 gene resistance to wheat stripe rust, *Genome*, 44, 509-516.
- SHORESHA, M., GAL-ONB, A., LEIBMANB, D., CHETA, I., 2006, Characterization of a MAPK gene from cucumber required for *Trichoderma* conferred plant resistance, *Plant Physiology Preview*, Published on September 1.
- SINGH, D., PARK, R.F., MCINTOSH, R.A., BARIANA, H.S., 2008, Characterisation of stem rust and stripe rust seedling resistance genes in selected wheat cultivars from the united kingdom, *Journal of Plant Pathology*, 90 (3), 553-562.

- STAUB, J.E., SERQUEN, F.C., GUPTA, M., 1996, Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding, *Hort Science*, 31, 729-741.
- STICHER, L., MAUCH-MANI, B., MÉTRAUX, J. P., 1997, Systemic acquired resistance, *Annual Review of Phytopathology*, 35, 235–270.
- STUIVER, M. H., CUSTERS, J. H. H. V., 2001, Engineering disease resistance in plants, *Nature*, 411, 865-868.
- TAHIRI-ALAOUI, A., DUMAS-GAUDOT, E., GIANINAZZI, S., 1993, Immunocytochemical localization of pathogenesis-related PR-1 proteins in tobacco root tissues infected *in vitro* by the black root rot fungus *Chalara elegans*, *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 42, 69–82.
- TAKKEN, F. L. W., TAMELING, W. I. L., 2009, To nibble at plant resistance proteins, *Science*, 324, 744 – 746.
- THORDAL-CHRISTENSEN, H., BRANDT, J., CHO, B.H., RASMUSSEN, S.K., GREGERSEN, P.L., SMEDEGAARD-PETERSEN, V., COLLINGE, D.B., 1992, cDNA cloning and characterization of two barley peroxidase transcripts induced differentially by the powdery mildew fungus *Erysiphe graminis*, *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 40, 395– 409.
- TING, J. P., DAVIS, B. K., 2005, Caterpillar: a novel gene family important in immunity, cell death, and diseases, *Annu. Rev. Immunol*, 23, 387–414.
- TOOJINDA, T., BROERS, L., CHEN, X. M., HAYES, P.M., KLEINHOF, A., KORTE, J., KUDRNA, D., LEUNG, H., LINE, R. F., POWELL, W., VIVAR, H., 2000, Mapping qualitative and quantitative disease resistance genes in a doubled haploid population of barley (*Hordeum vulgare*), *Theor Appl Genet*, 101, 580–589.
- TORRE, J.E.B., EGAN, M.G., KATARI, M. S., BRENNER, E., D., STEVENSON, D. W., CORUZZI, G. M., DESALLE, R., 2006, ESTimating plant phylogeny: lessons from partitioning, *BMC Evolutionary Biology*, 6, 48.
- VALLAD, G. E., GOODMAN, R., 2004, Systemic acquired resistance and induced systemic resistance in conventional agriculture. *Crop Sci.*, 44, 1920-1934.
- VAN DER BIEZEN, E. A., JONES, J. D. G., 1998, Plant disease resistance proteins and the gene-for-gene concept, *Trends Biochem. Sci.*, 23, 454–456.
- VAN LOON, L. C., 1977, Induction by chloroethylphosphonic acid of viral-like lesions, associated proteins, and systemic resistance in tobacco, *Virology*, 80, 417–420.
- VAN LOON, L. C., 1985, Pathogenesis-related proteins, *Plant Mol. Biol.*, 116, 111–116.

- VAN LOON, L. C., VAN STRIEN, E. A., 1999, The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins, *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 55, 85–97
- WANG, H., MIYAZAKI, S., KAWAI, K., DEYHOLOS, M., GALBRAITH, D.W., BOHNERT, H. J., 2003, Temporal progression of gene expression responses to salt shock in maize roots, *Plant Mol. Biol.*, 52, 873-891.
- WANG, Y., YANG, C., LIU, G., JIANG, J., WU, J., 2006, Generation and analysis of expressed sequence tags from a cDNA library of *Tamarix androssowii*, *Plant Science*, 170, 28-36.
- WASTERNAK, C., PARTHIER, B., 1997, Jasmonate-signaled plant gene expression, *Trends Plant Sci.*, 2, 302–307.
- WEBER, D., HELENTJARIS, T., 1989, Mapping RFLP loci in maize using B-A translocations, *Genetics*, 121, 583-590.
- WEINING, S., LANDRIDGE, P., 1991, Identification and mapping of polymorphisms in cereals based on the polymerase chain reaction, *Theor. Appl. Genet.*, 82, 209-216.
- WENZEL, P., CARLING, J., KUDRNA, D., JACCOUD, D., HUTTNER, E., KLEINHOF, A., KILIAN, A., 2004, Diversity Arrays Technology (DArT) for whole-genome profiling of barley, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 9915-9920.
- WESTENDORP, G.D., 1854, Quatrième notice sur quelques cryptogames récemment découvertes en Belgique, *Bull. Acad. R. Sci.*, 21, 229–246.
- WOJTASZEK P., 1997, Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection, *Biochem. J.*, 322, 681–692.
- XU, Y., CHANG, P.-F.L., LIU, D., NARASIMHAN, M.L., RAGHOTHAMA, K.G., HASEGAWA, P.M., BRESSAN, R.A., 1994, Plant defense genes are synergistically induced by ethylene and methyl jasmonate, *Plant Cell*, 6, 1077–1085.
- YAHIAOUI, N., SRICHUMPA, P., DUDLER, R., KELLER, B., 2004, Genome analysis at different ploidy levels allows cloning of the powdery mildew resistance gene *Pm3b* from hexaploid wheat, *Plant J*, 37, 528–538.
- YAN, J., WANG, J., ZHANG, H., 2002, An ankyrin repeat-containing protein plays a role in both disease resistance and antioxidation metabolism, *Plant J*. 29, 193–202.
- YA-PING C., AI-ZHONG, C., XIU-E, W., PEI-DU, C., 2009, Screening and application of EST-based PCR markers specific to individual chromosomes of *Haynaldia villosa*, *Acta Agron Sin*, 35(1) 1–10.

- YEH, F.C., BOYLE, T.B., 1997, Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits, *Belgian J. Bot.*, 129- 157.
- YILDIRIM, F., 2005, Elucidation of *R* gene mediated yellow rust disease resistance mechanism in wheat by dual bait yeast two- hybrid analysis, *Doktora Tezi*, Ortadoğu Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Türkiye.
- YILDIRIM, A., KANDEMİR, N., 2001, *Genetik markörler ve analiz metodları*, Bitki Biyoteknolojisi Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları, ÖZCAN, S.; GÜREL, E.; BABAĞLU, M. (eds.), Selçuk Üniversitesi Basımevi, Konya, Türkiye, 334-363.
- YOUNG, N.D., MENANCIO-HAUTEA, D., FATOKUN, C.A., DANESH, D., 1992, *RFLP technology, crop improvement, and international agriculture*, In THOTTAPPILLY, G., MONTI, L.M., MOHAM, D.R., MOORE, A.W. (eds.), *Biotechnology: Enhancing research on tropical crops in Africa*. Technical Center for Agriculture and Rural Cooperation, International Institute of Tropical Agriculture, 221-230.
- YU, Y. G., BUSS, G. R., MAROOF, M. A., 1996, Isolation of a superfamily of candidate disease resistance genes in soybean based on a conserved nucleotide-binding site, *Proc Natl Acad Sci USA*, 93, 11.751–11.756.
- ZEYBEK, A., YİĞİT, F., 2004, Determination of virulence genes frequencies in wheat stripe rust (*Puccinia striiformis f. sp. tritici*) populations during natural epidemics in the regions of southern aegean and western mediterranean in Turkey, *Pakistan J. of Biol. Sci.*, 7.
- ZHANG, S., KLESSIG, D. F., 1997, Salicylic acid activates a 48 kDa MAP kinase in tobacco, *Plant Cell*, 9, 809-824.
- ZHOU, F. S., ANDERSEN, C. H., BURHENNE, K., FISCHER, P. H., COLLINGE, D. B., THORDAL-CHRISTENSEN, H., 2000, Proton extrusion is an essential signaling component in HR of epidermal single cells in the barley-powdery mildew interaction, *Plant J.*, 23, 245–254.
- ZIPFEL, C., FELIX, G., 2005, Plants and animals: a different taste for microbes?, *Curr Opin. Plant Biol*, 8, 353-360.
- ZOHARY, D., HOPF M., 1994, The origin and spread of cultivated plants in West Asia; Europe, and the Nile valley. *Domestication of plants in the Old World, 2nd Edition Oxford University Press, New York, USA*.
- [www.cabicompendium.org](http://www.cabicompendium.org) [Ziyaret Tarihi: 21 Mayıs 2009].
- <http://faostat.fao.org> [Ziyaret Tarihi: 10 Ocak 2010].
- <http://www.sciag.ukzn.ac.za> [Ziyaret Tarihi: 12 Ocak 2010].

<http://www.hgca.com> [Ziyaret Tarihi: 01 Ekim 2009].

[www.ziraatcim.net](http://www.ziraatcim.net) [Ziyaret Tarihi: 20 Nisan 2009].

<http://www.ataem.gov.tr> [Ziyaret Tarihi: 15 Nisan 2009].

<http://wheat.pw.usda.gov> [Ziyaret Tarihi: 10 Nisan 2007].

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov> [Ziyaret Tarihi: 18 Nisan 2007].

<http://home.cc.umanitoba.ca> [Ziyaret Tarihi: 14 Mart 2010].

## ÖZGEÇMİŞ

3 Haziran 1979 yılında İstanbul'da doğdum. 1995–1998 yılları arasında Özel İstanbul Ar-El Lisesinde öğrenim gördükten sonra, 1998 yılında İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nü kazandım ve 2002 yılında mezun oldum. 2002–2005 yılları arasında İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik Yüksek Lisans Programını tamamlayarak mezuniyet belgesi aldım. 2005 yılında İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji ve Genetik doktora Programı'nda doktora eğitimine başladım.

## YAYINLAR

**Karakas, Ö.**, Gürel, F., 2003, Arpa (*Hordeum vulgare* L.)'da gen transferi frekansının artırılması yönünde çalışmalar, XIII. Biyoteknoloji Kongresi, Ağustos 2003, Çanakkale. 213, 25–29 (Poster)

**Karakas Ö.**, Gürel, F., 2005, Arpa (*Hordeum vulgare* L.) dokularına *Agrobacterium tumefaciens* aracılığı ile gen aktarımı. XIV. Biyoteknoloji Kongresi, Ağustos 2005, Eskişehir. S. 264–269 (Bildiri)

**Karakas Ö.**, Hasançebi S, Ertuğrul F., Aydın Y., Akfırat F, Çetin L., Albustan S., Mert Z., Akan K., Düşünceli F., Bolat N., Çakmak M., Belen S., Yorgancılar Ö., Özdemir E, Altınkut Uncuoğlu A., 2008, Investigation of Yellow Rust (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*) Disease Resistance in Wheat (*Triticum aestivum* L.) Using EST (Expressed Sequence Tags Database" XIX. Biology Congress, June 2008, Trabzon TURKEY (Bildiri).

**Karakas Ö.**, Yumurtaci A., Hasaebi S., Altinkut Uncuoğlu A., 2008, Determination of Novel Genes for Plant Disease resistance: Data Mining of EST Databases, IV. Biotechnology Congress, October 2008, İzmir TURKEY (Poster).

**Karakas Ö.**, Hasaebi S., Ertuğrul F., Akan K., Mert Z., etin L., Bolat N., Uncuoğlu A. A., 2009, EST-Based Multiplex Gene Expression in Yellow Rust Infected Wheat Using GenomeLab GeXP Genetic Analysis System, 12. ICRPMC Congress 13-16 Haziran 2009 (Bildiri)

Gürel F., **Karakas Ö.**, Albayrak G., Arı Ő., 2009 “Regeneration Capacity of Mature Embryo-Derived Callus In Barley (*Hordeum vulgare* L.), Acta Biologica Hungarica, 60 (3): 309-319 (Yayın).

**Karakas Ö.**, Ertugrul F, Hasancebi S, Akan K, Bolat N' Altinkut Uncuoglu A, 2010, Defense-related Multiplex Gene Expression in Wheat in Response to Interaction with *Puccinia striiformis*, 2. International Symposium on Genomics of Plant Genetic Resources, 24-27 April 2010, Bologna, Italy (Poster).

**Karakas Ö.**, Altinkut Uncuoglu A., 2010, A comparative assessment of genetic diversity in wheat using EST-derived sequences, 8. International Wheat Conference (8. IWC), 1-4 June 2010, St Petersburg, Russia (Poster).

**Karakas Ö.**, Gürel F, Altinkut Uncuoglu A., 2010, Exploiting of A Wheat EST Database for Assessment of Genetic Diversity, Genetics and Molecular Biology (Yayın, baskıda)