



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**BUĞDAY (*Triticum aestivum* L.)’DA SARI PAS  
HASTALIĞINA DAYANIKLILIĞIN ÇOĞALTILMIŞ  
PARÇA UZUNLUK POLİMORFİZMİ İLE  
ARAŞTIRILMASI**

**Handan BALTA  
Biyoloji Anabilim Dalı  
Botanik Programı**

**Danışman  
Yard. Doç. Dr. Mine SARSAĞ-GÜMÜŞ**

**II. Danışman  
Doç. Dr. Ahu ALTINKUT-UNCUOĞLU**

**Haziran, 2010**

**İSTANBUL**



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**BUĞDAY (*Triticum aestivum* L.)’DA SARI PAS  
HASTALIĞINA DAYANIKLILIĞIN ÇOĞALTILMIŞ  
PARÇA UZUNLUK POLİMORFİZMİ İLE  
ARAŞTIRILMASI**

**Handan BALTA  
Biyoloji Anabilim Dalı  
Botanik Programı**

**Danışman  
Yard. Doç. Dr. Mine SARSAĞ-GÜMÜŞ**

**II. Danışman  
Doç. Dr. Ahu ALTINKUT-UNCUOĞLU**

**Haziran, 2010**

**İSTANBUL**

Bu çalışma 16/06/2010 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı Botanik programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Yard. Doç. Dr. Mine SARSAĞ GÜMÜŞ (Danışman)  
İstanbul Üniversitesi  
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Muammer ÜNAL  
İstanbul Üniversitesi  
Fen Fakültesi

Doç. Dr. Gül CEVAHİR ÖZ  
İstanbul Üniversitesi  
Fen Fakültesi

Yard. Doç. Dr. Erdal ÜZEN  
İstanbul Üniversitesi  
Fen Fakültesi

Yard. Doç. Dr. Yıldız AYDIN  
Marmara Üniversitesi  
Fen Edebiyat Fakültesi

Bu alışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliđinin 3485 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

## ÖNSÖZ

Bu tez çalışması boyunca bilgi ve deneyimleriyle her zaman yanımda olan, beni destekleyen ve yönlendiren tez danışmanım değerli hocam Yard. Doç. Dr. Mine SARSAĞ GÜMÜŞ'e; çalışmanın TÜBİTAK, Marmara Araştırma Merkezi, Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü Bitki Biyoteknolojisi Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmesini sağlayan, bu süreç içerisinde her türlü değerli bilgi ve deneyimlerini bana aktaran ve büyük katkılarıyla bana yol gösteren, ikinci tez danışmanım çok değerli hocam Doç. Dr. Ahu ALTINKUT UNCUOĞLU'na teşekkür etmeyi bir borç bilirim.

Deneysel çalışmalarımı gerçekleştirmemde ve tezimin hazırlanması sırasında yardımlarını esirgemeyen ve bilgilerini benimle paylaşan Dr. Ayşen YUMURTACI'ya, her konuda olduğu gibi tezim konusunda da samimi yardımlarını gördüğüm çok sevgili hocalarım Dr. Semra HASANÇEBİ'ye, Dr. Fahriye ERTUGRUL'a, Dr. Funda ŞENTÜRK AKFIRAT'a, Yard. Doç. Dr. Yıldız AYDIN'a ve teknisyenlere teşekkür ederim. Ayrıca, çalışmalarım sırasında engin bilgilerinden yararlandığım Biyoloji Bölüm Başkanı Prof. Dr. Muammer ÜNAL'a, tez çalışmamda emeği geçen ve desteğini esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Gül CEVAHİR ÖZ'e, Yüksek Lisans ders aşamasında bilgi ve deneyimleri ile beni aydınlatan İstanbul Üniversitesi'ndeki değerli hocalarıma da teşekkür ederim. Her türlü destekleri ile tezimin her aşamasında bana yardımcı olan çalışma arkadaşlarım Msc. Özge KARAKAŞ, Dilek TOK, Duygu SEVİNÇ, Msc. Ezgi ÇABUK ŞAHİN'e ve her aşamada yanımda olan Ufuk ÇİÇEK'e çok teşekkür ederim.

Her zaman maddi ve manevi desteğini esirgemeyerek hep yanımda olan sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi sunar, yüksek lisans tez çalışmamı babam Hamid Özcan BALTA'ya ithaf ederim.

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 3485 no'lu tez projesi olarak desteklenmiştir.

**Haziran, 2010**

**Handan BALTA**

## İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ .....	i
İÇİNDEKİLER .....	ii
ŞEKİL LİSTESİ .....	v
TABLO LİSTESİ .....	vii
SEMBOL LİSTESİ .....	viii
ÖZET .....	ix
SUMMARY .....	xi
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL KISIMLAR .....	2
2.1. BUĞDAYIN ÖNEMİ .....	2
2.2. BUĞDAYIN KÖKENİ .....	3
2.3. SARI PAS ETMENİ ( <i>Puccinia striiformis</i> f. sp. <i>tritici</i> ) .....	5
2.4. GENETİK MARKIRLAR .....	12
2.4.1. Morfolojik Markırlar .....	13
2.4.2. Biyokimyasal Markırlar .....	13
2.4.3. Moleküler Markırlar .....	13
2.4.3.1. Hibridizasyona Dayanan Moleküler Markırlar .....	15
2.4.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonuna Dayanan Moleküler Markırlar .....	16
2.4.3.3. DNA Dizi ve Çip (Mikroarray) Teknolojisine Dayanan Moleküler Markırlar .....	24
2.5. DNA DİZİ ANALİZİ .....	26

<b>3. MALZEME VE YÖNTEM .....</b>	<b>29</b>
<b>3.1. BİTKİ MATERYALİ .....</b>	<b>29</b>
3.1.1. Çalışmada Kullanılan Buğday Çeşitleri .....	30
<b>3.2. DNA İZOLASYONU .....</b>	<b>33</b>
<b>3.3. “BULK SEGREGASYON ANALİZLERİNDE” KULLANILACAK     GENOMİK DNA KARIŞIMLARININ HAZIRLANMASI .....</b>	<b>36</b>
<b>3.4. SARI PAS HASTALIĞINA DAYANIKLI VE DUYARLI BUĞDAY     ÇEŞİTLERİNDE AFLP ANALİZLERİ .....</b>	<b>36</b>
3.4.1. Çift İplikli DNA'nın Restriksiyon Enzimleri ile Kesimi .....	37
3.4.2. Çift İplikli DNA'ya Adaptör Parçalarının Bağlanması .....	37
3.4.2.1. Adaptör Hazırlanması .....	38
3.4.3. AFLP Analizlerinde Ön Çoğaltım Aşaması .....	38
3.4.4. AFLP Analizlerinde Seçici Çoğaltım Aşaması .....	39
<b>3.5. ÖN ÇOĞALTIM VE SEÇİCİ ÇOĞALTIM REAKSİYONLARINDA ELDE     EDİLEN PZR ÜRÜNLERİNİN AGARUZ JEL ELEKTROFOREZİNDE     GÖRÜNTÜLENMESİ .....</b>	<b>42</b>
<b>3.6. SEÇİCİ ÇOĞALTIM REAKSİYONLARINDA ELDE EDİLEN PZR     ÜRÜNLERİNİN POLİAKRİLAMİD JEL ELEKTROFOREZİNDE     GÖRÜNTÜLENMESİ .....</b>	<b>43</b>
3.6.1. Poliakrilamid Jel Elektroferez Sisteminin Hazırlanması .....	43
3.6.2. Poliakrilamid Jel Hazırlığı ve Elektroferez İşlemi .....	45
3.6.3. Poliakrilamid Jelde İncelenecek Örneklerin Hazırlığı .....	45
3.6.4. Poliakrilamid Jelin Gümüş Nitrat ile Boyanması .....	46
<b>3.7. BULK SEGREGASYON ANALİZLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ     VE POLİMORFİK FRAGMENTLERİ KLONLAMA ÇALIŞMALARI .....</b>	<b>47</b>
3.7.1. Poliakrilamid Jelden Polimorfik PZR Ürünlerinin Geri Kazanımı .....	47
3.7.2. Agaroz Jelden Geri Kazanım .....	47
3.7.3. Klonlama Aşamaları .....	48
3.7.4. Ligasyon .....	49
3.7.5. Transformasyon .....	49

3.7.6. Transformasyon Sonrası Pozitif Kolonilerin Seçimi ve Koloni PZR ....	50
3.7.7. Plazmid İzolasyonu .....	51
3.8. DNA DİZİ ANALİZİ ÇALIŞMALARI .....	52
3.9. DİZİ ANALİZİ SONUÇLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ .....	54
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>55</b>
4.1. DNA İZOLASYONU .....	55
4.2. BUĞDAYDA AFLP ANALİZLERİ .....	55
4.2.1. AFLP Ön Çoğaltım Reaksiyonu Sonuçları .....	57
4.2.2. AFLP Seçici Çoğaltım Reaksiyonu Sonuçları .....	57
4.3. BUĞDAYDA AFLP SEÇİCİ PRİMER ÇİFTLERİ KULLANILARAK GERÇEKLEŞTİRİLEN “BULK SEGREGASYON ANALİZLERİ” .....	58
4.4. AFLP MARKIRININ POLİAKRİLAMİD JELDEN GERİ KAZANIMI VE DNA DİZİ ANALİZİ SONUÇLARI .....	68
4.4.1. AFLP Markırının Poliakrilamid Jelden Geri Kazanım Çalışmaları ....	68
4.4.2. AFLP Markırı Klonlanma Çalışmaları .....	69
4.4.3. DNA Dizi Analizi Çalışmaları .....	70
<b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ .....</b>	<b>77</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>82</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>92</b>



## ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1	: 2007 yılında dünyadaki buğday ekim alanlarına ait oranlar .....	3
Şekil 2.2	: Buğdayın yayılış haritası ve “Verimli Hilal” bölgesi.....	4
Şekil 2.3	: Başlıca buğday türlerinin evrimi .....	5
Şekil 2.4	: <i>Puccinia striiformis</i> f.sp. <i>tritici</i> 'nin buğdaydaki görünümü .....	6
Şekil 2.5	: Sarı pas etmeninin bitkide oluşturduğu haustorium yapısı .....	7
Şekil 2.6	: <i>Puccinia</i> cinsinin yaşam döngüsü .....	9
Şekil 2.7	: Konakçı ve patojen arasındaki gene karşı gen etkileşimi .....	11
Şekil 2.8	: Genetik markırların sınıflandırılması .....	12
Şekil 2.9	: RFLP metodunun genel şeması .....	16
Şekil 2.10	: Bir zincir reaksiyonu olan PZR .....	18
Şekil 2.11	: AFLP şematik gösterimi.....	24
Şekil 2.12	: Otomatik dizi analizi sisteminin çalışma prensibi.....	27
Şekil 2.13	: DNA parçasının plazmide klonlanması ve rekombinant plazmidin bakteriyeye aktarılması aşamaları .....	28
Şekil 3.1	: Buğday ( <i>Triticum</i> spp.) bitkisi.....	29
Şekil 3.2	: Çalışmada uygulanan DNA izolasyon basamakları .....	35
Şekil 3.3	: Ön çoğaltım aşamasında kullanılan PZR koşulları .....	39
Şekil 3.4	: Poliakrilamid jel elektroforez (PAGE) sistemi .....	44
Şekil 3.5	: pGEM-T Easy vektörünün halkasal yapısı ve referans dizi noktaları..	48
Şekil 3.6	: pGEM-T Easy vektörünün promotör ve çoklu klonlama bölgelerine ait dizi bilgileri .....	49
Şekil 3.7	: <i>M</i> -ACG, <i>P</i> -GAC primer kombinasyonu ile İzgi2001 örneği için beyaz ve mavi kolonilerin belirlenmesi .....	50
Şekil 3.8	: Koloni PZR koşulları.....	51
Şekil 3.9	: GeXP GenomeLab Genetik Analiz (Beckman Coulter) Sistemi .....	52
Şekil 3.10	: DNA dizi analizinde uygulanan PZR koşulları .....	53
Şekil 3.11	: “EMBL-EBI” web sitesinden (alignment) karşılaştırma programı.....	54
Şekil 4.1	: AFLP analizleri sonucu elde edilen farklı anaç kombinasyonlarına (PI178383xHarmankaya99, İzgi2001xES14 ve Sönmez2001xAytın98) ait polimorfizm oranları.....	57
Şekil 4.2	: Anaç DNA'lara ait ön çoğaltım ürünlerinin % 1.5'luk agaroz jeldeki görünüşleri .....	57
Şekil 4.3	: Anaç DNA'lara ait seçici çoğaltım ürünlerinin % 1.5'luk agaroz jel görünüşleri .....	58
Şekil 4.4	: Sönmez2001 x Aytın98 kombinasyonunda <i>M</i> -CAT/ <i>P</i> -GAC (9C) primeri kullanılarak gerçekleştirilen Bulk Segregasyon Analizi .....	60
Şekil 4.5	: İzgi2001 x ES14 kombinasyonunda <i>M</i> -ACG/ <i>P</i> -GAC 6C primer çifti kullanılarak gerçekleştirilen Bulk Segregasyon Analizi .....	61

<b>Şekil 4.6</b>	: İzgi2001 x ES14 kombinasyonuna ait fide dönemi dayanıklı F <sub>2</sub> materyalinin <i>M-ACG/P-GAC</i> (6C) primer kombinasyonu kullanılarak gerçekleştirilen Bulk Segregasyon Analizi .....	62
<b>Şekil 4.7</b>	: İzgi2001 x ES14 kombinasyonuna ait ergin dönem dayanıklı F <sub>2</sub> materyalinin <i>M-ACG/P-GAC</i> (6C) primer kombinasyonu kullanılarak gerçekleştirilen Bulk Segregasyon Analizi .....	64
<b>Şekil 4.8</b>	: İzgi2001 x ES14 kombinasyonuna ait ergin dönem hassas F <sub>2</sub> materyalinin <i>M-ACG/P-GAC</i> (6C) primer kombinasyonu kullanılarak gerçekleştirilen Bulk Segregasyon Analizi .....	65
<b>Şekil 4.9</b>	: İzgi2001 x ES14 kombinasyonuna ait fide dönemi dayanıklı F <sub>2</sub> materyalinin <i>M-ACG/P-GAC</i> (6C) primer kombinasyonu kullanılarak gerçekleştirilen Bulk Segregasyon Analizi .....	66
<b>Şekil 4.10</b>	: İzgi2001 x ES14 kombinasyonuna ait fide dönemi hassas F <sub>2</sub> materyalinin <i>M-ACG/P-GAC</i> (6C) primer kombinasyonu kullanılarak gerçekleştirilen Bulk Segregasyon Analizi .....	67
<b>Şekil 4.11</b>	: Poliakrilamid jelden geri kazanım PZR'si yapılan 6C kombinasyonuna ait örneklerin % 2.5'luk agaroz jel görünüşleri .....	68
<b>Şekil 4.12</b>	: T7/SP6 primerleri ile gerçekleştirilen koloni PZR sonuçlarının % 2.5'luk agaroz jeldeki görünüşleri .....	69
<b>Şekil 4.13</b>	: Plazmid DNA'larının % 1'lik agaroz jeldeki görünüşleri .....	70
<b>Şekil 4.14</b>	: DNA dizi analizi sonuçlarının değerlendirilmesinde kullanılan GeXP GenomeLab Genetik Analiz sistemine ait program ana sayfası .....	70
<b>Şekil 4.15</b>	: ClustalW 2.0 sonucuna göre oluşturulan "Consensus" DNA dizisi....	76

## TABLO LİSTESİ

<b>Tablo 3.1</b>	: PI178383 çeşidinin özellikleri.....	30
<b>Tablo 3.2</b>	: İzgi2001 çeşidinin özellikleri.....	31
<b>Tablo 3.3</b>	: Sönmez2001 çeşidinin özellikleri.....	31
<b>Tablo 3.4</b>	: Harmankaya99 çeşidinin özellikleri.....	32
<b>Tablo 3.5</b>	: ES14 çeşidinin özellikleri.....	32
<b>Tablo 3.6</b>	: Aytın 98 çeşidinin özellikleri.....	33
<b>Tablo 3.7</b>	: Genomik DNA izolasyonunda kullanılan stok çözeltiler.....	36
<b>Tablo 3.8</b>	: Restriksiyon enzim kesiminde kullanılan reaksiyon bileşenleri ve son konsantrasyonları.....	37
<b>Tablo 3.9</b>	: <i>Pst</i> I ve <i>Mse</i> I restriksiyon enzimlerinin çift iplikli DNA'yı kestiği bölgeler.....	37
<b>Tablo 3.10</b>	: <i>Pst</i> I, <i>Mse</i> I enzimlerine özgü adaptör dizileri.....	37
<b>Tablo 3.11</b>	: Adaptör bağlama aşamasında kullanılan reaksiyon bileşenleri ve son konsantrasyonları.....	38
<b>Tablo 3.12</b>	: Ön çoğaltım aşamasında kullanılan primer dizileri.....	38
<b>Tablo 3.13</b>	: Ön çoğaltım reaksiyonunda bileşenler ve son konsantrasyonları....	39
<b>Tablo 3.14</b>	: Seçici çoğaltım reaksiyonunda kullanılan bileşenler ve son konsantrasyonları.....	39
<b>Tablo 3.15</b>	: Seçici çoğaltım aşamasında kullanılan PZR koşulları.....	40
<b>Tablo 3.16</b>	: Seçici çoğaltım PZR'de kullanılan farklı <i>Pst</i> I-NNN ve <i>Mse</i> I-NNN primer kombinasyonları için kullanılan semboller.....	41
<b>Tablo 3.17</b>	: Agaroz jel elektroforezinde kullanılan çözeltiler.....	42
<b>Tablo 3.18</b>	: Örnek yükleme boyası (50 ml) bileşenleri.....	45
<b>Tablo 3.19</b>	: Gümüş boyamada kullanılan bileşenler.....	46
<b>Tablo 3.20</b>	: Ligasyon reaksiyonunda kullanılan bileşenler.....	49
<b>Tablo 3.21</b>	: Koloni PZR'de kullanılan bileşenler.....	51
<b>Tablo 3.22</b>	: DNA dizi analizi PZR bileşenleri ve hacim miktarları.....	53
<b>Tablo 4.1</b>	: Çalışmada kullanılan buğday çeşitlerine ait DNA miktarları.....	55
<b>Tablo 4.2</b>	: Anaçlara ait seçici PZR reaksiyonlarında elde edilen polimorfik bant sayıları ve herbir seçici primer kombinasyonundan elde edilen bant sayısının, bütün seçici primer kombinasyonlarından elde edilen bant sayısına oranının yüzde değerleri.....	56
<b>Tablo 4.3</b>	: DNA dizi analizi sonucu elde edilen İzgi2001'e ait 5 farklı koloninin 5'-3' yönündeki nükleotid dizi bilgileri.....	71
<b>Tablo 4.4</b>	: DNA dizi analizi sonucu elde edilen İzgi2001 x ES14 kombinasyonu ergin dönem dayanıklı F <sub>2</sub> bireylerine ait 5'-3' yönündeki nükleotid dizi bilgileri.....	72
<b>Tablo 4.5</b>	: DNA dizi analizi sonucu elde edilen İzgi2001 x ES14 kombinasyonu fide dönemi dayanıklı F <sub>2</sub> bireylerine ait 5'-3' yönündeki nükleotid dizi bilgileri.....	74
<b>Tablo 4.6</b>	: Oluşturulan "Consensus" (birleştirilmiş) DNA dizisi.....	76

## SEMBOL LİSTESİ

<b>bç</b>	: Baz çifti
<b>cm</b>	: Santimetre
<b>CO<sub>2</sub></b>	: Karbondioksit
<b>g</b>	: Gram
<b>Ha</b>	: Hektar
<b>HCl</b>	: Hidroklorik asit
<b>kb</b>	: Kilo baz
<b>Kg</b>	: Kilogram
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	: Magnezyum klorür
<b>mg</b>	: Miligram
<b>ml</b>	: Mililitre
<b>mM</b>	: Milimolar
<b>ng</b>	: Nanogram
<b>nM</b>	: Nanomolar
<b>pmol</b>	: Piko mol
<b>rpm</b>	: Round per minute
<b>nm</b>	: Nanometre
<b>SLS</b>	: Sample Loading Solution
<b>Taq</b>	: <i>Thermus aquaticus</i>
<b>U</b>	: Ünite
<b>UV</b>	: Ultraviyole
<b>w/v</b>	: Ağırlık/hacim
<b>µl</b>	: Mikrolitre
<b>µM</b>	: Mikromolar
<b>°C</b>	: Santigrat derece
<b>%</b>	: Yüzde

## ÖZET

### **BUĞDAY (*Triticum aestivum* L.)’DA SARI PAS HASTALIĞINA DAYANIKLILIĞIN ÇOĞALTILMIŞ PARÇA UZUNLUK POLİMORFİZMİ İLE ARAŞTIRILMASI**

Ülkemizde ve dünyada bitki hastalıkları buğday verimini önemli derecede sınırlandıran etmenler arasındadır. En çok rastlanan buğday hastalıklarından biri olan ve özellikle “*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*” adlı biyotrofik bir mantarın neden olduğu sarı pas hastalığı, hemen hemen bütün bölgelerde görülmektedir ve verimsiz tohum eldesi sonucunda %80’lere varan önemli derecede ürün kaybına ve tanede kalitenin düşmesine neden olmaktadır.

Bu tez çalışması; kışlık ekmeklik buğday çeşitlerinde sarı pas hastalığına dayanıklılık ile genetik olarak bağlantı gösteren moleküler markırların Bulk segregasyon analizleri ile bütünleştirilmiş AFLP (çoğaltılmış parça uzunluk polimorfizmi) yöntemiyle araştırılmasını kapsamaktadır. Çalışmada klasik ıslah yöntemleri ve fitopatolojik çalışmalar ile belirlenmiş dayanıklı ekmeklik buğday çeşitlerinden PI178383, İzgi2001, Sönmez2001 ve duyarlı ekmeklik buğday çeşitlerinden Harmankaya99, ES14 ve Aytın98 bitki materyali olarak kullanılmıştır. Bu anaçlar kullanılarak PI178383 x Harmankaya99, İzgi2001 x ES14 ve Sönmez2001 x Aytın98 kombinasyonları oluşturulmuş, fide ve ergin döneme ait F<sub>2</sub> populasyonları elde edilmiştir. AFLP analizleri 34 seçici primer çifti kullanılarak öncelikle anaç bitkilerle gerçekleştirilmiştir. Kombinasyonları oluşturan anaçlar arasında polimorfizm gösteren primer çiftleri, bulk segregasyon analizlerinde kullanılmışlardır. Anaçlar arasında 32 primer çifti polimorfik bantlar oluştururken 2 primer çifti monomorfik bant profili vermiştir. 32 AFLP primer çifti toplam 417 polimorfik bant üretmiştir. Bulk segregasyon analizleri sonucunda *M-ACG/P-GAC* seçici primer çifti ile İzgi2001 x ES14 kombinasyonunda dayanıklı anaçta ve dayanıklı F<sub>2</sub> bireylerde bulunup hassas bireylerde bulunmayan 133 bç boyutunda bir bant elde edilmiştir. 133 bç boyutundaki bant fide dönemine ait 30 dayanıklı bireyin 29’unda, ergin döneme ait 30 dayanıklı bireyin 26’sında gözlenirken, fide ve ergin döneme ait hassas bireylerin hiç birinde gözlenmemiştir ve bu yapıyla sarı pas hastalığı dayanıklılık kaynağı ile genetik olarak bağlantı gösteren markır niteliği taşımaktadır. Markır niteliğindeki bu bant klonlanıp, GeXP GenomeLab Genetik Analiz Sistemi (Beckman Coulter) kullanılarak, DNA dizi analizi gerçekleştirilmiştir. DNA dizi analizi çalışmaları İzgi2001, fide ve ergin döneme ait F<sub>2</sub> bitkilerinden elde edilen markır bandı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. DNA dizileri <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/> sitesinde üstüste getirilerek karşılaştırılmıştır. DNA dizi analizi sonucunda, vektör ve adaptör dizilerden arındırılan AFLP markırının 133 bç’lik bant yapısına sahip olduğu gözlenmiştir.

Çalışmalar sonucunda elde edilen 133 bç büyüklüğünde AFLP markırının açılım gösteren populasyonlarda sarı pas hastalığına karşı dayanıklı ve hassas buğday genotiplerinin kısa sürede ve etkin bir biçimde seçilmelerine katkı sağlayarak ülkemizde buğdayda sarı pas hastalığı ile ilişkili olarak bitki ıslah programlarında markır yardımı ile seçim (MAS) çalışmalarında kullanılabilme potansiyeli bulunmaktadır.

## SUMMARY

### INVESTIGATION OF YELLOW RUST DISEASE RESISTANCE IN WHEAT (*Triticum aestivum* L.) BY AMPLIFIED FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM

Plant diseases are among the factors which restrict wheat yield at significant level in our country and worldwide. Yellow rust disease, one of the most common wheat diseases, is caused by especially a biotrophic fungus named “*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*” and it is observed in almost all regions and is causing the loss of up to 80% of the yield and loss of quality in a grain.

This thesis covers investigation of molecular markers which is genetically linked to yellow rust disease in winter bread wheat genotypes by using AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) method in combination with Bulk Segregant Analyses. In this study, PI178383, İzgi2001, Sönmez2001 as resistant bread wheat genotypes and Harmankaya99, ES14, Aytın98 as susceptible bread wheat genotypes were used as materials which are defined by phytopathological studies and classical breeding methods. By using these parents, PI178383 x Harmankaya99, İzgi2001 x ES14 ve Sönmez2001 x Aytın98 combinations were formed and F<sub>2</sub> populations are obtained representing seedling and adult plant stages. Initially, AFLP analyses were performed by using 34 selective primer pairs with parent plants. Primer pairs, which showed polymorphism among parents of combinations, were used in bulk segregant analyses. While 32 primer pairs showed polymorphic fragments, 2 primer pairs were monomorphic fragment profile among parents. 32 primer pairs gave a total of 417 polymorphic fragments. As a result of bulk segregant analyses performed with *M-ACG/P-GAC* selective primer pair; 133 bp sized fragment which was seen in resistant parent and resistant F<sub>2</sub> individuals and did not occur in susceptible individuals derived from İzgi2001 x ES14 combination. While 133 bp sized fragment was observed in 29 of the 30 resistant individuals which belong to seedling stage and also 26 of the 30 resistant individuals at adult stage, it was not observed any of susceptible individuals at both seedling and adult stage. With this pattern, this fragment a marker feature as genetically linked to yellow rust disease resistance source. This marker fragment was cloned and DNA sequence analyses were performed using GeXP GenomeLab Genetic Analyses System (Beckman Coulter). DNA sequence analysis studies were performed by using marker fragment that obtained from İzgi2001 and F<sub>2</sub> plants derived from seedling and adult stage. DNA sequences were aligned successively at <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/> website. As a result of DNA fragment analyses, it was observed that the AFLP marker purified from vector and adapter sequence, has a 133 bp sized fragment pattern.

133 bp sized AFLP marker that was obtained as a result of studies, has a potential to be used in marker assisted selection studies at plant breeding programs related to yellow rust disease for wheat by contribution for effective and fast selection of wheat genotypes that are resistant and susceptible to yellow rust disease in the segregating populations in our country.



## 1. GİRİŞ

Dünyada ve ülkemizde gerek ekiliş gerekse üretim bakımından ilk sıralarda yer alan ve insan besini olması yanında, hayvan beslenmesinde de kullanılan buğday (*Triticum aestivum* L.), buğdaygiller (Poaceae) ailesinden gelen, karasal iklimi tercih eden ve bütün dünyada ıslahı yapılmış tek yıllık otsu bir bitkidir. Buğdayın adaptasyon sınırının genişliği, üretim, taşıma, depolama ve işleme kolaylığı ve ekmek olma özelliğinden dolayı, bir çok ülkede üretimin artırılması çalışmaları hızlandırılmıştır (Kün, 1996).

Türkiye’de bitki hastalıkları buğday verimini önemli derecede sınırlandıran etmenler arasındadır. Yağış ve sıcaklığın uygun gitmesiyle, yöreye ve hastalık etmeninin biyotipine bağlı olarak ilkbaharda ortaya çıkan pas (*Puccinia* spp.) salgınlarından, Türkiye’nin bitkisel üretiminde %80’e varan düzeyde ürün kaybının olduğu bildirilmektedir (Özgen ve diğ., 1985, 1987). Bunlardan biri olan sarı pas, *Puccinia striiformis* f.sp. *tritici* adlı mantarın yarattığı, dünya çapındaki en önemli buğday hastalıklarındandır. Sarı pasın neden olduğu verim kayıplarını azaltmada en etkili yol ise dayanıklı genotiplerin kullanılmasıdır (Mallard ve diğ., 2005). Dayanıklı genotiplerin seçiminde ise buğdayda şimdiye kadar geliştirilmiş olan çeşitli moleküler markır sistemleri kullanılabilir.

Bu tez çalışmasının amacı ülkemizde ve dünyada ekonomik bir değere sahip olan buğday bitkisinin üretimini ve verimini tehdit eden sarı pas hastalığına dayanıklılığın, klasik ıslah yöntemleri ve fitopatolojik çalışmalar ile belirlenmiş olan yurdumuz kökenli 6 farklı buğday genotipinde, AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism, Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi) markır analizleri gerçekleştirilerek sarı pas hastalığı dayanıklılık kaynağı ile bağlantı gösteren moleküler markırların ortaya konmasıdır.

## 2. GENEL KISIMLAR

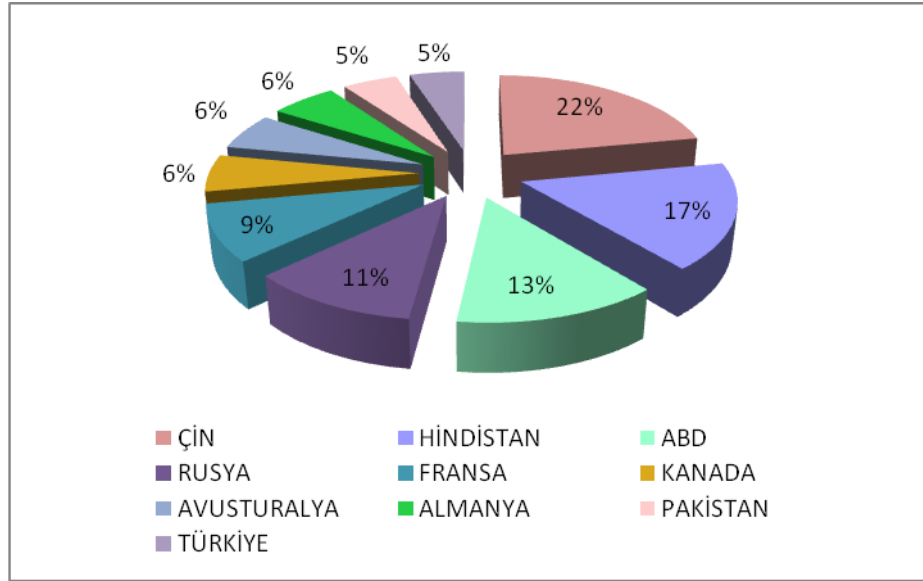
### 2.1. BUĞDAYIN ÖNEMİ

Tahıllar insan beslenmesinde doğrudan ya da dolaylı olarak kullanılan temel ürünlerdir. Ülkelerin değişik yaşam düzeyine ve beslenme alışkanlıklarına göre tahılların ulusal toplam besin tüketimi içindeki payı da farklıdır. Bununla birlikte tahıllar geçmişte ve günümüzde olduğu gibi gelecekte de insanlığın temel besinini oluşturacak ve nüfus artışı karşısında önemini sürdürecektir (Kün, 1996).

Tahıllar arasında buğday (*Triticum aestivum* L.) dünya popülasyonu için en fazla miktarda enerji ve protein kaynağıdır. Buğday tanesi yaklaşık olarak %65–75 nişasta, %8–15 protein, %1–5 yağ, %1.5–3 şeker, %1–2 kül, %11–13 nem içerir. Buğday tanesinde karbonhidrat, yağ ve proteinin yanında insan ve hayvan beslenmesinde önemli derecede rol oynayan vitaminler de bulunmaktadır (Kün, 1988). Ayrıca, un ve yem üretiminde de kullanılan temel bir besin kaynağıdır. Verim açısından kaliteli, tarımı kolay, besin değeri yüksek ve zengin bir alanda üretime sahip olduğu için de dünyada 50’den fazla ülkede yaygın olarak üretilmektedir (Milner ve diğ., 1978).

Dünya nüfusunun yaklaşık %35’inin temel besini olarak buğday, tüm dünyada besinlerden alınan kaloringin %20’sini sağlamaktadır (Kün, 1996). Ülkemizde ise tahıllar diyetimizin %26.4’ünü, buğday ise tek başına bunun %80’inden fazlasını sağlamaktadır ve ülkemizde de en çok İç Anadolu Bölgesi’nde yetiştirilmektedir. Bu nedenle, bölge "Türkiye’nin Buğday Ambarı" olarak da anılmaktadır (Zeybek ve Yiğit, 2004).

Buğday ekim alanı bakımından dünya ülkeleri arasında Türkiye 7. sırada ve ürettiği miktar bakımından ise 8. sırada yer almaktadır (Düşünceli ve diğ., 2007) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1: 2007 yılında dünyadaki buğday ekim alanlarına ait oranlar  
(<http://faostat.fao.org>, 20 Ağustos 2008)

Günümüzde 6.5 milyarı aşan dünya nüfusunun, 2050’li yıllarda 9 milyarı bulması beklenmektedir (Young, 1999). Nüfus artışıyla bütün dünyada olduğu gibi ülkemizde de kişi başına düşen tarım arazisi her geçen gün azalacak, buna karşılık günlük kalori ihtiyacı ve tüketim gittikçe artacaktır. Öyleki tarım yapılabilecek alanların son sınırlarına ulaşılmış olması, çalışmaların birim alandan elde edilen ürün verimini yükseltmek ve hastalık ve zararlılardan kaynaklanan ürün kaybını en aza indirmek üzerine yoğunlaşmasına neden olmuştur. Biyotik (hastalık ve zararlılar) ve abiyotik (sıcak, soğuk, kuraklık ve tuzluluk) stres etmenlerinin oluşturduğu yıllık ortalama %25 ürün kaybı, bitkilerde biyoteknolojik yöntemlerle bu baskı unsurlarına karşı toleransı artırma ve dayanıklılık sağlama konularına önem kazandırmaktadır (Gill ve diğ., 2004).

## 2.2. BUĞDAYIN KÖKENİ

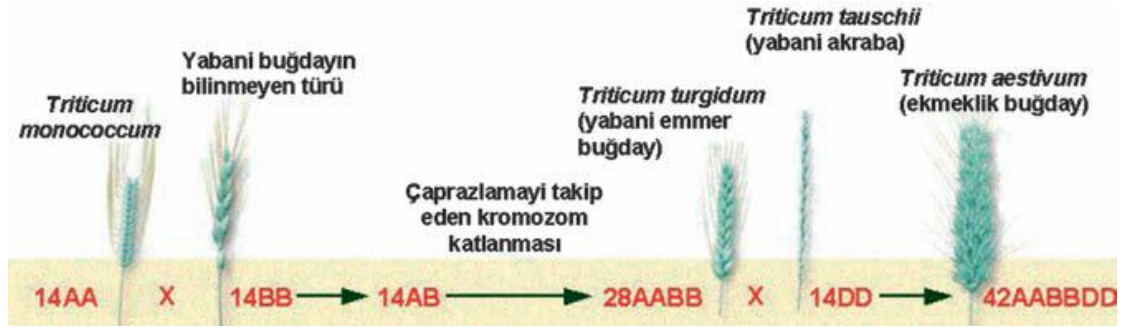
Poaceae familyası içinde yer alan buğdayın geçmişi çok eskilere dayanmakta ve kültüre alınması M.Ö. 8.000-10.000 yıllarına kadar uzanmaktadır (Yadon ve diğ., 2000). Buğdayın kökeni Güneybatı Asya’dır. Türkiye, Suriye, Irak ve Kafkasya’da yabani türlerine rastlanır ve buralar buğdayın gen merkezi olarak kabul edilmektedir (Kırtok, 1997). Nitekim buğday’ın ilk kez “Verimli Hilal” (İsrail, Filistin, Suriye’nin batı kısımları, Türkiye’nin güneydoğusu, kuzey Irak ve İran’ın batı kısmını kapsayan alan) olarak bilinen alanda kültüre alındığı yaygın şekilde kabul görmüştür (Şekil 2.2). Türkiye’nin

Güneydoğu Anadolu bölgesinde Cafer Höyük (Malatya), Çayönü (Diyarbakır), Nevalı Çori (Şanlıurfa), Kuzey Suriye'deki Tel Abu Hüeyra, Tel Aswad ve Irak'taki Jarmo gibi köyler yeryüzünde tarımın ilk yapıldığı alanlardır (Nesbitt ve Samuel, 1998; Lev-Yadun ve diğ., 2000).

Şekil 2.2: Buğdayın yayılış haritası ve “Verimli Hilal” bölgesi (Bilgiç, 2004)



Buğday, *Triticum* ve *Aegilops* olarak adlandırılan 2 cinse ait türlerin genel adıdır. *Triticum* diploid ( $n=7$ ,  $2n=2x=14$ ), tetraploid ( $2n=4x=28$ ) ve heksaploid ( $2n=6x=42$ ) türleri içerir ve A, B, D ve G genomları ile kombinasyonlarına sahiptir. A, B ve D genomları tanımlanmış fakat B ve G genomlarının kökenlendiği atalar tartışma konusudur (Gill ve diğ., 2004). *T. aestivum* AABBDD şeklinde 2 dizi genom duplikasyonları nedeniyle ortaya çıkmış genom yapısına sahiptir. İlk gerçekleşen genom katlanmasıyla tetraploid AABB genom yapısında *T. turgidum* oluşur. A genomu *T. urartu*'dan (AA) kökenlenmektedir (Dvorak, 1998), B genom vericisinin soyu tükenmiştir fakat *Aegilops speltoides* (SS) in atalarından kökenlendiği düşünülmektedir. Fosil kanıtlar ve moleküler çalışmalar *T. aestivum*'un yaklaşık 8000 yıl önce *T. turgidum* ve *A. tauschii* (DD)'nin hibridizasyonu ile meydana geldiğini göstermektedir (Şekil 2.3).



Şekil 2.3: Başlıca buğday türlerinin evrimi (<http://trc.ucdavis.edu>)

Tetraploid makarnalık buğday ve hekzaploid ekmeklik buğday çeşitlerini içeren “modern” buğdaya “kabuksuz” buğday denilmektedir. Buna karşılık diploid (“einkorn”), tetraploid (“emmer”) ve hekzaploid (“spelt”) çeşitlerini içeren, “yabani” buğday, tanelerinin kabukla çevrelenmiş olması nedeniyle “kabuklu” buğday olarak adlandırılmaktadır (Nesbitt ve Samuel, 1996). Günümüzde bunlardan sadece hekzaploid buğdaylar ekmek ve pasta yapımında, tetraploid buğdaylar makarna yapımında yoğun olarak kullanılmaktadırlar. Diploid buğdayların ise günümüzde herhangi bir kullanım alanı bulunmamaktadır. Bugün buğday üretiminin %95’ini ise ekmeklik hekzaploid tip oluşturmaktadır.

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

Organizmanın büyüme ve gelişimine olumsuz etki eden durumlar olarak isimlendirilen stres, iç veya dış kaynaklı olabilmektedir. Bitki üzerinde ender olarak tek başlarına etki yapabilen bu stres etmenleri, genellikle etkilerini eş zamanlı olarak gerçekleştirmektedirler. İç kaynaklı stres etmenlerine örnek olarak, canlının metabolizmasına olumsuz etki eden mutasyonlar ve kontrolsüz hücre bölünmeleri verilebilirken; dış kaynaklı stres etmenleri kendi aralarında biyotik ve abiyotik olarak gruplandırılmaktadır. Kuraklık, tuzluluk, yüksek veya düşük sıcaklık, ışık miktarının azlığı veya fazlalığı, gelişim için gerekli olan maddelerin yetersizliği, pestisitler ve ağır metaller abiyotik stres etmenleri; virus, bakteri, mantar gibi patojenler, böcek gibi zararlılar ve diğer organizmalar biyotik stres etmenleri olarak sınıflandırılmaktadır (Comai ve Madlung, 2004). Biyotik ve abiyotik stresler, ekonomik önemi olan tahıllar dahil, tüm bitkilerin normal fizyolojik işlevlerinde değişikliklere yol açmakta, bitkilerin biyosentetik kapasitelerini azaltmakta, normal fonksiyonlarını değiştirmekte ve bitkinin ölümüne yol açabilecek zararlara neden olabilmektedir (Lichtenhaler, 1996).

Bitkide bir ya da bir kaç seri fizyolojik metabolizma değişiklikleri sonucu ortaya çıkan ve sonuçta bitkide morfolojik değişikliklere ya da normal gelişiminden sapmalara neden olan virus, bakteri ve mantar gibi mikroorganizmaların neden olduğu hastalıklar, tarım ürünlerinin yaklaşık %12'sinin kaybına yol açmaktadır. Buğdayda en fazla ürün kaybına yol açan patojenlerden en yaygın olan fungal kökenli hastalık etmenleri ise; *Puccinia* (pas), *Ustilago* (rastık), *Tilletia* (sürme), *Septoria* (yaprak lekesi-kara zenk), *Alternaria* (yaprak yanıklığı) ve *Fusarium* (külleme)'dur (Stubbs ve diğ., 1986).

Pas hastalıkları, dünya genelinde buğday ekim alanlarında verimi azaltan en önemli biyotik etmenlerdendir (Düşünceli ve diğ., 1999). Buğdayda 3 çeşit pas hastalığı ortaya çıkmaktadır. Bunlar; kök pası, yaprak pası ve sarı pastır. Bu hastalıkların her birine, *Puccinia* denen pas mantarının belli bir türü neden olmakta ve bitkideki görünümüne göre isimlendirilmektedir (Marsalis ve Goldberg, 2006). Genel olarak pas hastalıkları, bitki direncini azaltmakta, yetişkin bitkilerde tohum olgunlaşmasını sınırlamakta ve çiçeklenme sırasında veya öncesinde birçok zarara neden olmaktadır.

İlk kez Gadd tarafından Avrupa'da 1777 yılında tanımlanan sarı pas hastalığı (Eriksson ve Henning, 1896), adını mantarın sarı renkli sporlarından almaktadır. Birincil konakları arasında ekmeçlik buğday, makarnalık buğday ve bazı arpa genotipleri bulunurken alternatif konaklarına rastlanmamıştır. Konak aralığı oldukça dar olan buğday sarı pas mantarlarının sınıflandırılması aşağıdaki gibidir (Curtis ve diğ., 2002), (Şekil 2.4).

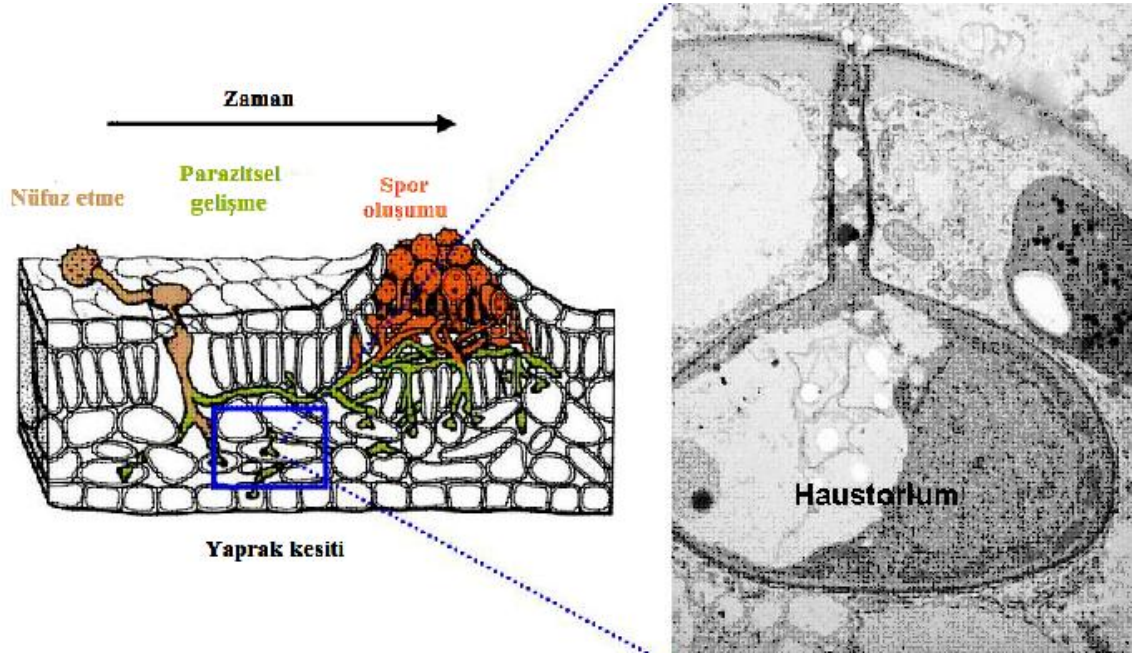


Alem	: Fungi
Şube	: Basidiomycota
Sınıf	: Urediniomycetes
Alt Sınıf	: Incertae sedis
Takım	: Uredinales
Familya	: Pucciniastraceae
Cins	: <i>Puccinia</i>
Tür	: <i>P. striiformis</i> var. <i>striiformis</i>

Şekil 2.4: *Puccinia striiformis* f.sp.*tritici*'nin buğdaydaki görünümü (fotoğraf kaynağı: TÜBİTAK KAMAG 105G075 no'lu proje çalışmasından)

Sarı pas, diğer pas hastalıklarına göre daha yüksek alanlarda, kuzey enlemlerinde, ilkbaharın serin ve yağışlı geçtiği yerlerde yaygın olarak görülmektedir. Dünyaya yayılışı hakkında ilk bilgiler Hassebrauk (1965) tarafından verilmiştir. Buğdayda sarı pas 60'tan fazla ülkede ve Antartika hariç tüm kıtalarda görülmüştür (Chen, 2005). Sarı pas hastalığı ülkemizde de hemen hemen bütün bölgelerde görülmektedir ve verimsiz tohum eldesi sonucunda %80'lere varan önemli derecede ürün kaybına ve tanede kalitenin düşmesine neden olmaktadır. Hastalık yaprak, sap ve başaklarda görülmekle birlikte, tipik belirtilerin görüldüğü yer yapraklardır.

Mantarlar bitki epidermal hücrelerine girişlerini kolaylaştıracak bazı kimyasal bileşenleri taşır ve salgırlar. Eğer spor nemli bir bitki yüzeyi ile karşılaşırse çimlenmesi tetiklenecektir. Çimlenmenin ardından mantardaki çimlenme tüpleri gelişir ve bitki hücrelerinin içlerine kadar nüfuz eder. İki tip penetrasyon görülmektedir. Bunlardan biri stomalar veya yaralanmış dokular gibi açıklıklar yoluyla gerçekleşirken diğeri ise doğrudan bitki yüzeyine nüfuz ederek olmaktadır. Bitkiye nüfuz eden mantar besin sağlayıp yaşamını devam ettirebilmek için haustorium yapısını geliştirir (Şekil 2.5).

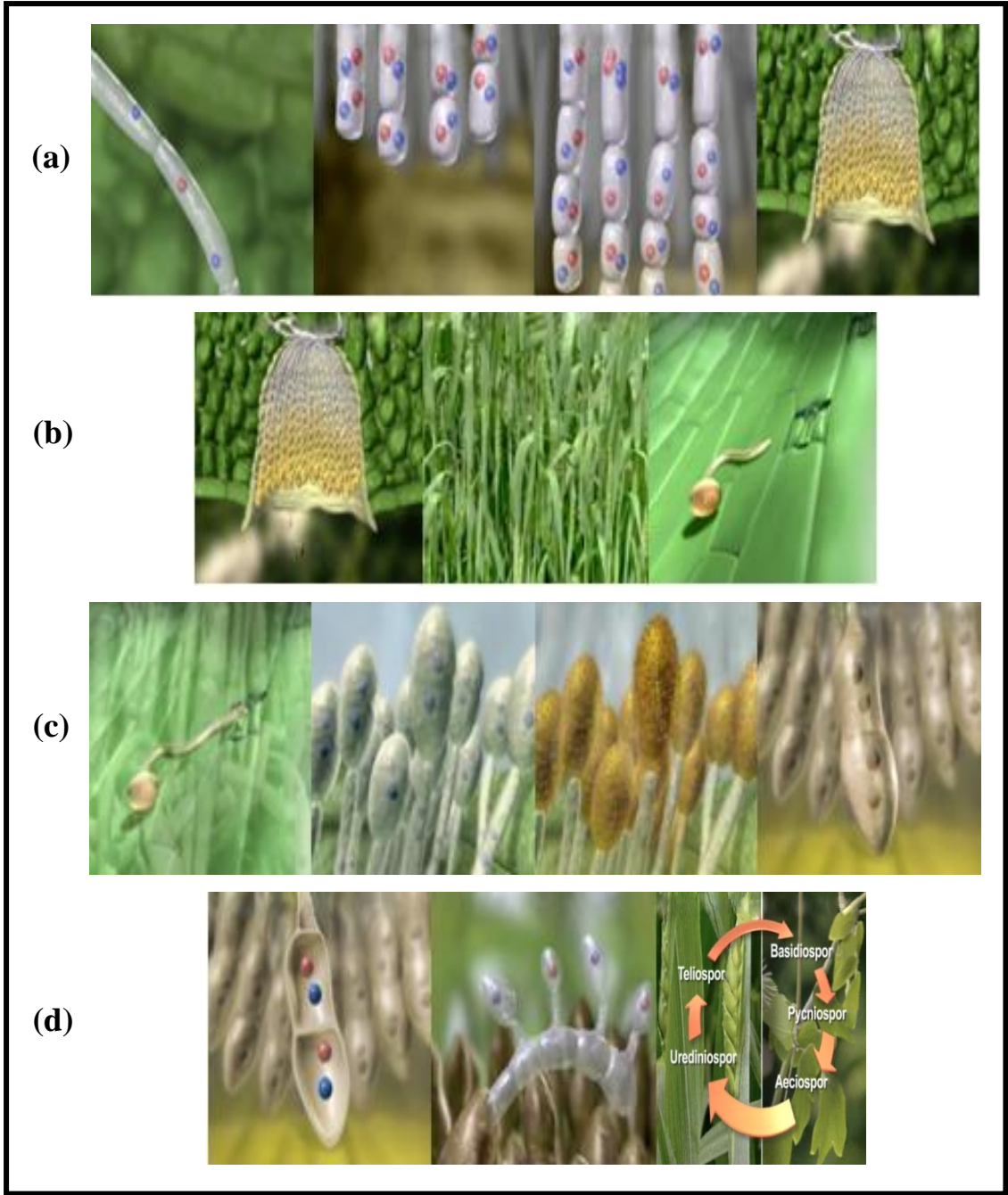


Şekil 2.5: Sarı pas etmeninin bitkide oluşturduğu haustorium yapısı (<http://www.science.org.au>)

Buğday üzerinde gelişen sarı pas hastalığı, fotosentez alanını daraltarak, buğdayda verimi ve tane kalitesini düşürmektedir. Verimdeki bu düşüş, buğday üretiminin yapıldığı alanlara bağlı olarak, %10 ile %70 arasında değişmekle birlikte, verilen bilgilere göre de hassas çeşitlerle sarı pas patojeni kullanılarak yapılan tarla denemelerinde %100'e varan kayıplar oluşmaktadır (Chen, 2005).

Yapraklarda ve başaklarda oluşan sarı renkli üredinianın ip şeklindeki görüntüsünden dolayı "çizgi pası" da denmektedir (Curtis ve diğ., 2002). Bitkinin yaprak ve baş kısmında çizgi olarak ortaya çıkan püstüller, hastalığın en önemli ayırt edici özelliğidir. Hafif sarı bu püstüller olgunlaştıkça, sarı ve turuncu sporları oluşturur. Enfeksiyon bitkinin yeşil olduğu herhangi bir evrede gerçekleşebilmektedir. Hastalığın gelişimi için şartlar uygun hale geldiğinde, enfeksiyon 6-8 saatte tamamlanmakta ve püstüllerden hastalığın yayılmasına neden olacak özellikteki ürediosporlar enfeksiyondan iki hafta sonra oluşmaktadır (Roelfs ve diğ., 1992). Kışı ılık geçen bölgelerde, ürediosporlar bütün yıl hayatta kalabilmektedir. Bu yüzden, patojenin hayat döngüsünü tamamlaması gerekir. Hastalık buğday tarlalarında ilkbaharda hava sıcaklığının 10-15°C (optimum 11°C) olduğu zaman görülmeye başlar. Enfeksiyonların oluşumunda sıcaklık ve nem çok önemlidir. Pas mantarı, farklı spor aşamalarından oluşan bir yaşam döngüsüne sahiptir (Şekil 2.6). Sarı pasın ara konukçusu bilinmemektedir (Marsalis ve Goldberg, 2006).





Şekil 2.6: *Puccinia* cinsinin yaşam döngüsü (<http://www.hgca.com>)

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

Bitkilerde hastalık oluşturan bakteri ve mantarları kontrol etmek için geliştirilen çeşitli kimyasallar, ürün maliyetini artırma ve en önemlisi diğer canlılara zarar verme gibi olumsuz yönlerinden dolayı kullanımını her geçen gün kısıtlanmaktadır. Genetik olarak dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesi, yayılımı paslardan dolayı meydana gelen ürün kaybını düşürmenin en ekonomik ve çevre dostu yoludur.

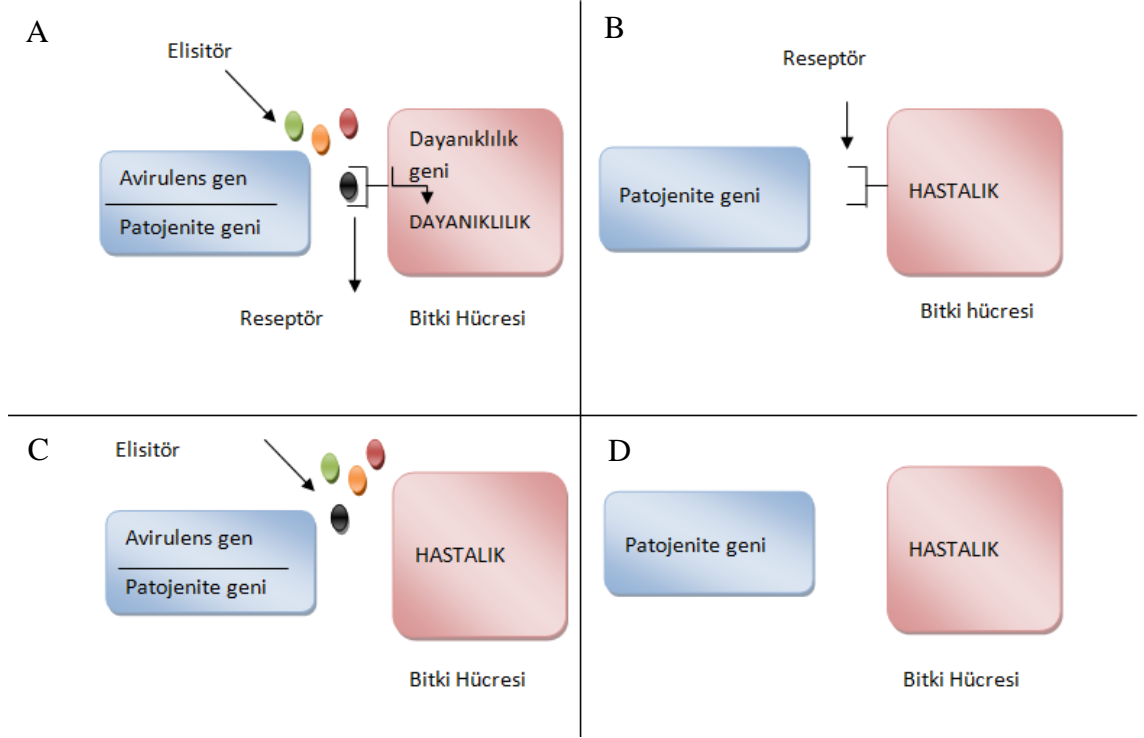
Sarı pas dayanıklılığı fide dönemi dayanıklılığı ve ergin dönem bitki dayanıklılığı olmak üzere 2'ye ayrılır. Fide dönemi dayanıklılığı “seedling resistance, all-stage resistance” fide döneminde gözlenebilen ancak bitkinin tüm gelişim evresi boyunca aktif olan, ırka özgü dayanıklılıktır. Ergin dönem bitki dayanıklılığı “adult stage resistance” ise bitki gelişiminin ileri evrelerinde gözlenmekle birlikte olgunlaşma arttıkça dayanıklılık seviyesi de artmaktadır. Ergin bitki dayanıklılığının bazı türleri ırka özgü iken, bazıları ırka özgü değildir. Sarı pas hastalığına dayanıklılığı sağlayan genlerin büyük çoğunluğu ırka özgüdür (Chen ve Line, 1992a, 1992b, 1993, Chen ve diğ., 1995, 1998a).

Bugüne kadar 40 adet sarı pas dayanıklılık (*Yr*) geni tanımlanmıştır (Chhuneja ve diğ., 2008). Tanımlanan bu 40 genin 30'dan fazlası tüm dönem dayanıklılığı (all-stage resistance) için belirlenerek haritalanmış ve ıslah programlarında markır yardımıyla seçim yoluyla kullanımları mümkün hale gelmiştir (Chen, 2005).

Moleküler markırlar kullanarak bitkilerin çok erken döneminde (fide dönemi) dayanıklılık geni taşıyıp/taşımadıkları hızlı ve güvenli şekilde test edilmektedir. Moleküler markırlar, aynı anda çok bitkinin analizine imkân tanımakta ve aynı bitkide birden fazla dayanıklılık geni analiz edilebilmektedir. Bununla birlikte dayanıklılık genine bağlı moleküler markırların belirlenmesi, dayanıklılık geninin klonlanması için önemli bir adım oluşturmaktadır.

Flor'un (1971) keten pası (*Melanpsora lini*) üzerindeki öncül çalışmaları, bitkilerdeki dayanıklılığı sağlayan her bir gene karşı, patojende bu gene denk gelen ve virulensi kontrol eden bir genin (“gene-for-gene” - gene-karşı-gen) bulunduğunu ortaya çıkarmıştır. Bu modele göre, bitkide herhangi bir patojene karşı oluşan dayanıklılık, biri konakta (*R* geni), biri patojende (*avr* geni) bulunan bir çift dominant genin ürünlerinin etkileşiminin sonucudur. Bu etkileşim sonucunda, bitki ile patojen karşılaştıktan sonra patojen ile konukçu arasında bir tanışma olayı gerçekleşerek, dayanıklılık mekanizmalarını başlatmaktadır. Konukçu bitkilerde bulunan dayanıklılık mekanizmasını harekete geçiren uyarıcılara elisitör adı verilmektedir. Bu olay ile patojen, karşılaştığı bitkinin kendi konukçusu olup olmadığına karar verirken, konukçu bitki de gelen uyarıcının bir patojenden olup olmadığını ve ona karşı nasıl bir reaksiyon

verebileceğini belirlemektedir (Flor, 1971; Dangl ve diğ., 1995). Böylece, bitkide aktif savunma sistemi ve tepki mekanizması çalışmakta ve sonuçta dayanıklılık olgusu ortaya çıkmaktadır (Şekil 2.7).



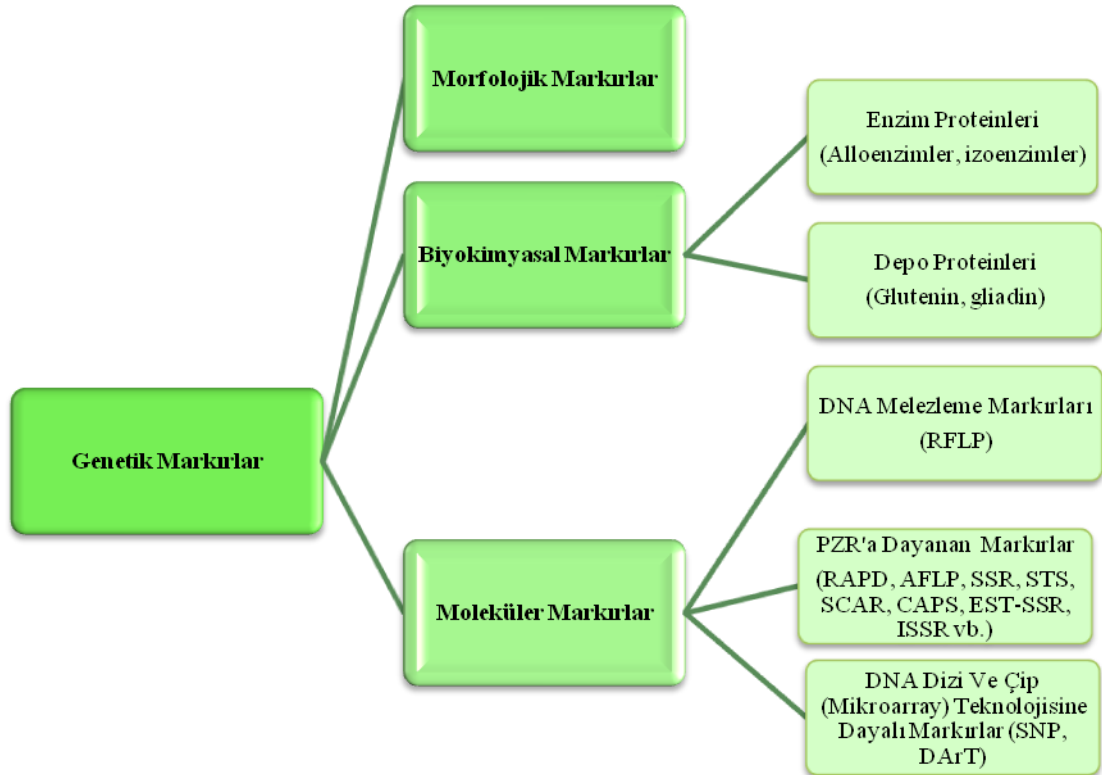
Şekil 2.7: Konakçı ve patojen arasındaki gene karşı gen etkileşimi (Yıldırım, 2005).

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

Patojen bitkide herhangi bir zarar meydana getirmiyor, normal yaşamını devam ettiriyor ve bitkiyi istila ederek çoğalmasını sürdürüyorsa bu bitki o patojene dirençlidir. Ancak, bitki bu patojenin gelişme ve çoğalmasını çeşitli nedenlerle tamamıyla durduruyor ise bu bitki genel anlamıyla dayanıklı olarak kabul edilmekte ve patojen de avirulent olarak adlandırılmaktadır. Dayanıklı bitki ile patojen arasındaki ilişki de uyumsuz olarak kabul edilmektedir (Lindsay ve diğ., 1993).

## 2.4. GENETİK MARKIRLAR

Genetik markırlar organizmalar veya türler arasında genetik farklılıkları ortaya koymaktadırlar. Tüm genetik markırlar “lokus” olarak adlandırılan kromozomlardaki özel genomik pozisyonlarda konumlanmakta ve bağlantılı bir lokustaki allelleri tanımlamak için kullanılan saptanabilir gen ya da DNA parçasını ifade etmektedirler. Genellikle doğrudan hedef geni göstermezler fakat hedef gen için işaret yada etiket görevi yaparlar. Genetik markırların kullanımı ile belirli kromozomlar üzerinde yerleşmiş spesifik genlerin tanımlanması mümkün olabilmektedir. Literatürlere bakıldığında genetik markırların kullanılması fikri çok eskilere dayanmaktadır (Sax, 1932; Wexelsen, 1933) ve 3 ana grupta incelenmektedir (Şekil 2.8). Bunlar görsel olarak ayırt edilebilir karakterler olarak tanımlanan morfolojik markırlar, genin ürününe dayalı olan biyokimyasal markırlar ve DNA çalışmalarına dayanan moleküler markırlardır (Semagn, 2006).



Şekil 2.8: Genetik markırların sınıflandırılması

### **2.4.1. Morfolojik Markırlar**

Bitki populasyonu içinde, bir bitki ya da bir grubu diğerlerinden ayıran seçici özellik, o genotipi ayıran bir markır olarak değerlendirilmektedir. Görünür (fenotipik) özelliklere dayanan markırlara ise morfolojik markırlar denir. Meyve kabuğu, yaprağın şekli, çiçeğin rengi, bitki ağaç özellikleri bu grup markırları oluşturur. Bu tip markırlar, yakın akraba olan bitki toplulukları için etkili değildir. Bitkilerin gelişme dönemi bu tip markırların tekrarlanabilirliğini etkileyebilmektedir (Staub ve Serquen, 1996) ve bu nedenle fenotipe dayalı olarak oluşturulan taksonomiler yanlış sınıflandırmaya neden olabilir. Olumlu yönleri analizlerinin kolay olmaları ve varyasyonlarının fenotipte görülebilmesidir (Parmaksız, 2004; Yıldırım ve Kandemir, 2001). Bu nedenle önemli tarımsal karakterlere bağlı morfolojik markırlar ıslah çalışmalarında kullanım alanı bulmuştur.

### **2.4.2. Biyokimyasal Markırlar**

Morfolojik karakterlerin çevreden etkilenmelerini ortadan kaldırmak için geliştirilen ve gen ürünleri olan proteinlere dayalı olan markırlardır. Tohum kabuğu proteinleri, yapraklarda bulunan kimyasallar, sekonder metabolitler, izoenzimler, vs. bu gruba girmektedirler. Ancak en yaygın kullanılanları izoenzimler ve tohum proteinleridir. Biyokimyasal markırların moleküler markırlara oranla daha az iş gücüyle elde edilmelerine, analizlerinin çabuk, ucuz ve güvenilir olmasına rağmen, sayıca az olmaları olumsuz özellikleridir (Yıldırım ve Kandemir, 2001). Bu markırlardaki varyasyonlar, kodlayıcı DNA bölgelerindeki benzer olmayan değişikliklerden ya da translasyon sonrası (post-translational) protein modifikasyonlarından kaynaklanır. Ancak bu markırların kullanılabilirliği, çalışılan populasyonların yapısına bağlıdır. Örneğin izoenzimler, türler arası veya nispeten uzak bitkiler arasındaki varyasyonları incelemede oldukça yararlı olmasına rağmen, yakın akrabalar arasındaki ilişkileri belirlenmesi için uygun değildir (Staub ve Serquen, 1996).

### **2.4.3. Moleküler Markırlar**

Son yıllarda sistematik çalışmalarında yaygın olarak kullanılan moleküler markırlar; çevresel faktörlerden etkilenmemeleri, çekirdek ve farklı kalıtım şekline sahip kloroplast ve mitokondri gibi organel genomları ile ayrı ayrı çalışılabilmeleri, genetik değişiklikleri daha fazla yansıttıkları için daha az “pleiotropik” olmaları (bir genin

birden fazla karakteri kontrol etmesi), her bir ebeveynden gelen farklı karakterler belirlenebildiği için bitkilerin genetik kökenini ortaya koyabilmeleri, sonsuz sayıda elde edilebilir olmaları gibi çeşitli olumlu yönleri sahiptirler. Moleküler markırlar, ekolojik koşullardan etkilenen morfolojik markırlardan ve epistatik hareketlerden etkilenen genlerin ürünü olan proteine dayalı biyokimyasal markırlardan farklı olarak, DNA düzeyindeki analizlerle saptandıklarından dolayı DNA markırları olarak da bilinmektedirler. Moleküler markırlar çevresel faktörlerden etkilenmemeleri nedeniyle morfoloji ve pedigrü bilgileriyle kıyaslandığında, genetik kaynaklarda çeşitliliği belirlemek için oldukça yararlı araçlardır. Farklı genotiplere ait DNA nükleik asit diziliş farklılığını, değişik şekillerde ortaya koymaktadırlar (Yıldırım ve Kandemir, 2001). Bir moleküler markır, kalıtımı güvenilir şekilde belirlenebilen, bir protein ve DNA değişkenidir (Jones ve diğ., 1997). DNA markırlarında amaç, bireyler (çeşit, hat, tür vb.) arasındaki DNA seviyesindeki farklılığın ortaya çıkarılmasıdır. Eğer bu farklılık genomda tek bir bölgeyi gösteriyorsa bu bir allel olarak adlandırılır. DNA seviyesinde bunu yapmanın en önemli yönü herhangi bir DNA zincirinin, iki birey arasındaki allelik farklılığı gösterebilmesidir.

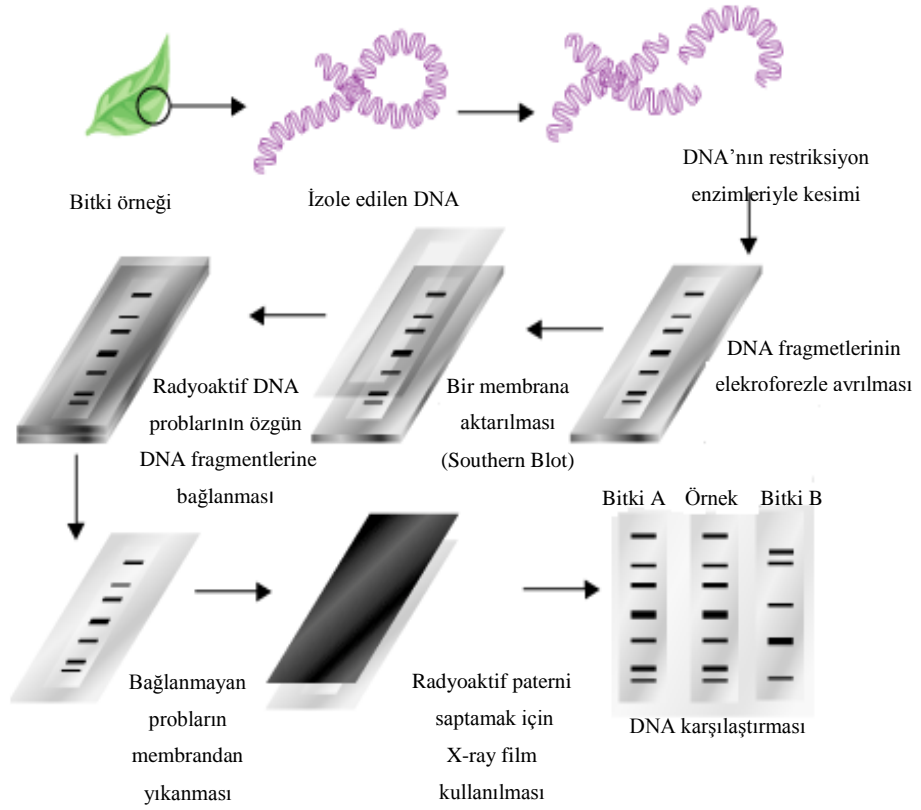
Kullanılacak markır sistemi; polimorfizmin düzeyi veya populasyonun tipi, farklı çevrelerdeki stabilitesi, lokus sayısı, kolaylık, analiz maliyeti, altyapı gibi etmenlerden etkilenmektedir. Her moleküler markır yöntemi olumlu ve olumsuz yönleri sahiptir. Markır seçimi bütün bu kriterler göz önünde bulundurularak amaca uygun olarak yapılmaktadır. Son 20 yıldan beri çok farklı moleküler markır teknikleri kullanılmakta ve üç grupta toplanmaktadır. Bunlar DNA hibridizasyonuna dayalı RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism - Kesilmiş Parça Uzunluk Polimorfizmi), polimeraz zincir reaksiyonuna dayalı SSR (Simple Sequence Repeats - Basit Dizi Tekrarı), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA - Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism - Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi), ISSR (Inter Simple Sequence Repeat - Basit Dizi Tekrarları Arası Bölgeler) ve STS (Sequence Tagged Site - Dizisi Etiketlenmiş Alan) gibi teknikler ile DNA dizi ve çip (mikroarray) teknolojisine dayalı SNP (Single-Nucleotide Polymorphism - Tek Nükleotid Polimorfizmi) ve DArT (Diversity Arrays Technology) teknikleridir. Bu markırlar birçok bitki türünde başarıyla kullanılmıştır. En uygun DNA tekniğini belirlemek amacıyla RFLP, AFLP, RAPD, SSR ve ISSR DNA markır

teknikleri karşılaştırılmış ve polimorfizm bakımından SSR ve AFLP teknikleri, maliyet bakımından RAPD ve ISSR teknikleri, tekrarlanabilirlik bakımından RFLP, SSR, ISSR ve AFLP DNA tekniklerinin tercih edildikleri belirlenmiştir (Powel ve diğ., 1996).

#### *2.4.3.1. Hibridizasyona Dayanan Moleküler Markırlar*

İlk geliştirilen ve hibridizasyona dayanan moleküler markır sistemi olan RFLP (Soller ve Bechman, 1983), restriksiyon enzimleriyle kesilerek etiketlenmiş DNA parçalarının (“prob”), araştırılan DNA örneğindeki benzer veya aynı dizilişteki DNA hibridizasyonuna dayanmaktadır.

RFLP metodunda DNA, özgün DNA bölgelerini kesen restriksiyon enzimi ile kesilmektedir. Her farklı restriksiyon enzimi özel ve karakteristik bir nükleotid dizisini tanımaktadır. Bir tek enzimin kesebildiği, ancak farklı uzunluklarda DNA popülasyonu oluşturulur. Tanıma bölgelerinin değişik sayıda bulunması ve çok farklı restriksiyon enziminin varlığı, çok yararlı bilgilerin elde edilmesine olanak sağlamaktadır (Xu ve diğ., 2001; Kochert, 1997). Varyasyon ya da polimorfizm bireyler arasında kesim bölgelerinin pozisyonunu ve bunlar arasındaki DNA'nın uzunluğunu değiştirmekte ve farklı restriksiyon fragmentlerinin oluşmasını sağlamaktadır (Jones ve diğ., 1997). Elektroforez yöntemi ile farklı büyüklükte DNA fragmentleri büyüklüklerine göre ayrılıp, hibridizasyonun yapılacağı naylon filtrelelere transfer edilip, radyoaktif olmayan veya radyoaktif olarak işaretlenmiş problemlerle (genellikle  $P^{32}$  ile işaretlenmiş, 300-3000 bp uzunluğunda kısa DNA zincirleri) hibridize edilen fragmentler radyografi yöntemi ile belirlenebilmektedir. İki veya daha fazla bireye ait bantlar karşılaştırıldığında, eğer enzimle kesilen DNA'ların uzunluklarında bir farklılık varsa polimorfizm elde edilmektedir. Nükleotid değişikliğinden dolayı restriksiyon enzim kesme noktası kazancı veya kaybı nedeniyle de polimorfizm oluşabilmektedir (Şekil 2.9).



Şekil 2.9: RFLP metodunun genel şeması (<http://www.scq.ubc.ca>)

RFLP sisteminde kısa ömürlü radyoaktif materyal kullanımı, yüksek konsantrasyonda ve saf DNA eldesi ve restriksiyon kesimi uygulaması, uzun ve pahalı izotopik etiketleme gerektirmesi sınırlayıcı etmenlerdir. Diğer bir zorluk ise, RFLP kullanımıyla yakın ilişkili türler arasında polimorfizm bulunamaması ya da düşük oranda (1–3 lokus) bulunmasıdır (Waugh ve Powell, 1992).

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

Bir çeşit "in vitro klonlama" olan PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu), 1985 yılında Henry A. Erlich, Kary Mullis ve Randall K.Saiki tarafından geliştirilmiştir (Mullis ve diğ., 1986). PZR küçük miktarlardaki DNA'nın canlı organizma olmaksızın enzimatik olarak replikasyonunu sağlayan moleküler biyoloji yöntemidir (Semang ve diğ., 2006).

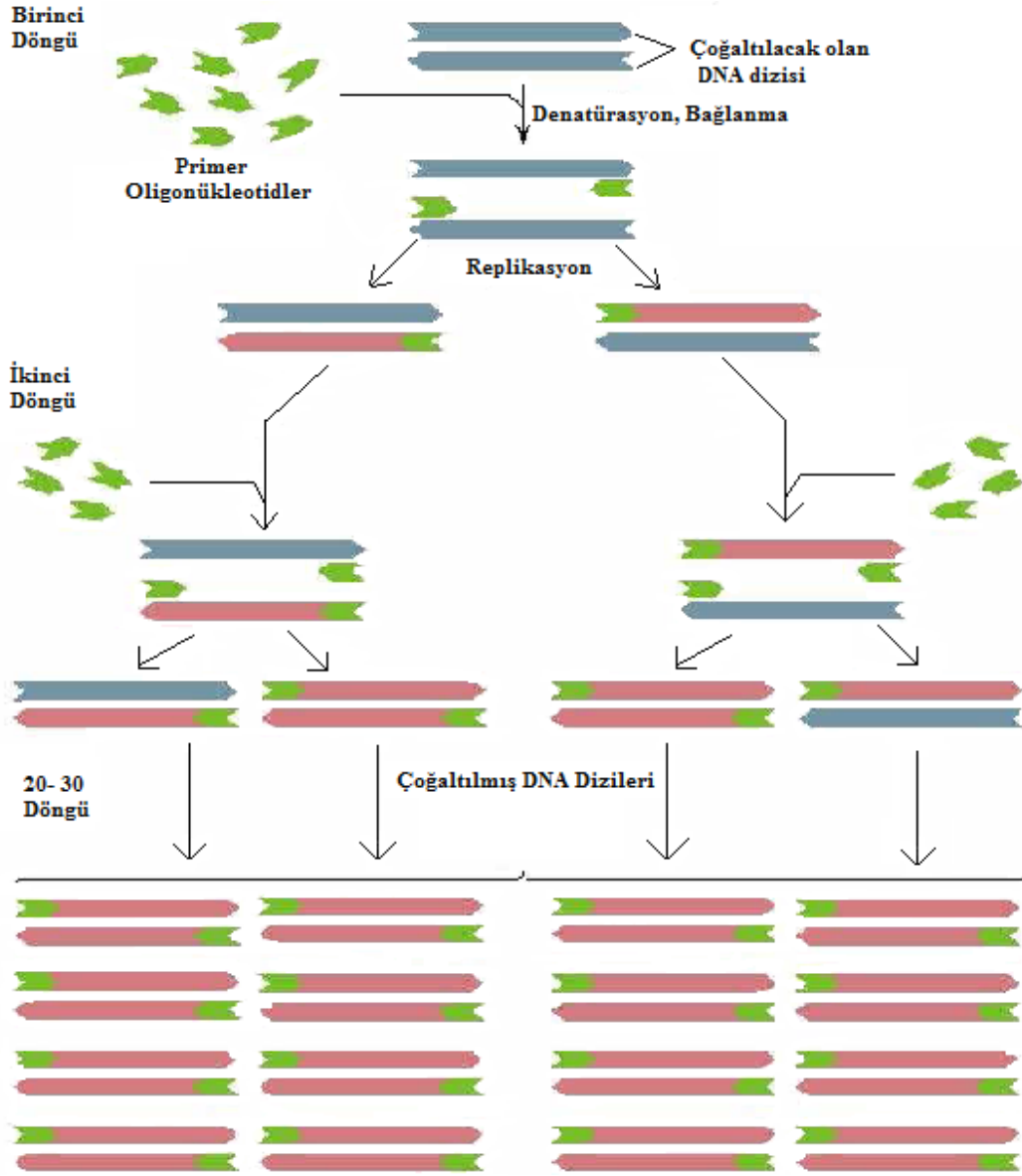
Polimeraz zincir reaksiyonunun gerçekleşmesi üç farklı sıcaklık ortamında çift iplikli DNA molekülünün açılarak uygun primerler ile yeni ipliklerin oluşturulmasını sağlaması prensibine dayanmaktadır. PZR yüksek sıcaklık uygulaması ile çift zincirli



sarmal formda bulunan DNA zincirleri ayrılarak tek iplik formuna geçer. Farklı ısı değişimleri ile reaksiyon tüpü içindeki bileşenler kendilerini organize ederek kalıp DNA'nın benzeri yeni DNA moleküllerini oluşturmaktadırlar. Her PZR döngüsü sonunda DNA'nın sayısı ikiye katlanmaktadır. Çoğaltılacak olan hedef DNA bölgesi az miktarda ve farklı DNA'lar arasında dahi olsa özgün primerler ile çoğaltılabilmektedir. Polimeraz zincir reaksiyonunun gerçekleşmesi için kalıp DNA ve primerlerin yanısıra, deoksiniükleotid trifosfatlar (dNTP'ler), tampon sistemi ve ısıya dayanıklı bir DNA polimeraz enzimi de gerekmektedir.

PZR'da üç temel basamak vardır. İlk adımda çoğaltılacak DNA 90–95°C arasında denatüre edilerek tek zincirli hale getirilmektedir. Bunun için çift zincirli DNA, tek zincirli hale getirilene kadar ısıtılmaktadır. Primerlerin bağlanması ise ikinci adımdır. Sıcaklık 30–70°C arasında bir değere düşürülüp, primerlerin tek zincirli hale getirilmiş olan DNA'ya bağlanması sağlanmaktadır. Bu primerler yapay oligonükleotidlerdir (18–30 nükleotid uzunluğunda) ve çoğaltılacak DNA kısmının uçlarındaki tamamlayıcı dizilere özgül olarak bağlanmaktadır. Bu primerler kalıp DNA'nın sentezi için başlangıç noktası olarak görev yapmaktadırlar. Son basamak polimeraz enzimi ile zincirin uzamasıdır. DNA polimerazın ısıya dayanıklı bir şekli (Taq polimeraz) reaksiyon karışımına eklenir ve DNA sentezi 70–75°C arasındaki sıcaklıkla da gerçekleşmektedir. Polimeraz enzimi, nükleotidleri 5'ucundan 3'ucuna doğru ekleyerek primerin uzamasını sağlamak ve hedef DNA'nın iki zincirli kopyasını oluşturmaktadır. Bu üç aşama bir döngü olarak kabul edilerek, 25–35 döngü uygulanmaktadır (Şekil 2.10).

PZR kalıtsal hastalıklarda taşıyıcının ve hastanın tanısında, analık-babalık tayininde, adli tıpta kimlik belirlemede, kanser oluşumunun araştırılmasında, çeşitli kalıtsal hastalıkların doğum öncesi belirlenmesi, evrim çalışmalarında, mikrobiyolojik kontaminasyonların belirlenmesinde (toprak, su ve gıda maddelerinde), genetik haritalama çalışmalarında, tarımda, sistematik ve evrim çalışmalarında doğadaki çeşitli canlı türlerinin tanısında ve türler arasındaki polimorfizmin belirlenmesinde kapsamlı olarak kullanılmaktadır.



### 1 PZR ÇEVİRİMİ



Şekil 2.10: Bir zincir reaksiyonu olan PZR  
(<http://fig.cox.miami.edu/Faculty/Dana/amplification.gif>)

PZR'nin geliştirilmesi ile tarım genetiğinde birçok markır çeşidi kullanılmıştır. Bunlar;

RAPD ilk defa 1990'da dizisi rastgele seçilmiş primerlerin kullanıldığı ve Polimeraz Zincir Reksiyonu'nu temel alan bir teknik olarak ortaya çıkmıştır. RAPD yönteminin (Williams ve diğ., 1990; Villordon ve LaBonte, 1995) temel prensibi genomik DNA üzerinde rastgele seçilmiş, tek bir 9-10 bazlık oligonükleotidin, düşük bağlanma sıcaklığında rastlantısal bağlanarak PZR ile çoğaltma yapmasıdır. RAPD primerleri, belli bir hedef diziyi çoğaltmak için düzenlenmez. Çoğaltılmış lokus anonimdir, genom arasına dağılmıştır ve 200 ila 2000 kb uzunluğunda DNA'yı çoğaltırlar. Nükleotid dizisinin önceden bilinmesine ihtiyaç duyulmaması RAPD yönteminin olumlu yönüdür. RAPD metodu teknik olarak oldukça basittir, uygulaması hızlıdır, radyoaktif izotop kullanımı gerektirmez ve düşük miktarda DNA yeterlidir. Buna karşın dominant markırlar olmaları (açılan bir populasyonda heterozigotların ortaya çıkarılmaması) ve tekrarlanabilir olmamaları, RAPD için sınırlayıcı etmenlerdir (Jones ve diğ., 1997; Farooq ve Azam, 2002).

RAPD markır sistemi genotip belirlenmesi, genom yapısının araştırılması, çeşitli taksonomik çalışmalar, evrimsel sorunlar, populasyon biyolojisi, bireysel, kültür ve ırk belirlenmesinde, ebeveyn belirleme, genetik varyasyonun belirlenmesi, bağlantı haritalarının oluşturulması, özgün bir gen lokusunun belirlenmesi adli tıp, klinik teşhis, doğum öncesi tanı, salgınlar ve ekoloji alanlarında yoğun bir şekilde kullanılmaktadır.

SSR ökaryotik genomlarda bulunan rastgele ardışık tekrarlanan, işlevi bilinmeyen ancak düzenleyici görevleri olduğu düşünülen nükleotid gruplarıdır. SSR'lar genom boyunca sık bulunurlar, genomu iyi kapsarlar, yüksek düzeyde bilgi verici, tekrar edilebilir ve genoma özgüdürler (Morgante ve Olivieri, 1993; Rafalski ve Tingey, 1993, Powell ve diğ., 1996). SSR'lar 1-6 bazlık tekrarlanan alanlar olmakla birlikte en yaygın dinükleotid (örneğin ATATAT) tekrarlarıdır. Uygulanan polimeraz zincir reaksiyonu, örnek DNA'nın sırayla 5' ve 3' uçlarına bağlanan ileri ve geri primerlerin varlığında gerçekleşmektedir.

Polimorfizm, kaynağını tekrar sayısından alır ve aynı sayıdaki tekrarları temsil eden her bant, farklı bir alleli işaret etmektedir. Tekrar sayısındaki farklılıkların kaynağı ise DNA

replikasyonu sırasındaki kaymalardır (Schlotterer ve Tautz, 1993). SSR markırları genetik haritalama, genetik çeşitliliğin belirlenmesinde kullanılmaktadır. RFLP ve RAPD'e göre yüksek düzeyde polimorfizm göstermeleri ve genomda yüksek oranda bulunma SSR'ları tercih edilen moleküler markırlar haline getirmiştir.

PZR'ye dayalı moleküler markır tekniklerinden bir diğeri olan ISSR metodu, ters konumlanmış ve çoğaltılabilir uzaklıktaki iki basit dizi tekrar bölgesi arasındaki DNA parçasının PZR ile çoğaltımına dayanan bir tekniktir (Zietkiewicz ve diğ., 1994). Primer olarak 2 ile 4 arasında değişen farklı veya aynı nükleotidlerle sabitleştirilen, 16–25 bç uzunluğunda basit olarak tekrarlanan DNA zincirleri kullanılmaktadır. Kullanılan primerler özel olmayıp herhangi bir tekrarlı diziden sentezlenebilir ve primerler uzun olduğu için sıkı bağlanma sağlarlar. Primerler SSR'lar arasında kalan bölgeyi çoğaltırlar.

ISSR'ın temel uygulama alanları genomik parmak izi (Charters ve Wilkinson, 2000), genetik açılım ve filogenetik analizler, SSR motif frekansı belirleme, (Nagaoka ve Ogiwara, 1997), gen işaretleme ve markıra bağlı seçim (Hussain ve diğ., 2000) ve doğal populasyonlarda genetik çeşitliliğin belirlenmesine yönelik çalışmalardır (Qian ve diğ., 2001). Bu tekniğin olumlu yönü az miktarda DNA'ya ihtiyaç duyulması, uygulamasının kolay olması, yüksek tekrarlanabilirlik, ön bilgi gerektirmemesi ve maliyetinin düşük olmasıdır.

STS'ler de (Sequence Tagged Site) rastgele çoğaltım profili ortaya çıkaran yöntemlerin aksine hedef alınan özgül bölgelerin çoğaltımı söz konusudur. STS'ler kromozomal yerleşimi ve nükleotit dizisi bilinen 60-1.000 bç uzunluğunda genom bölgeleridir (Olson ve diğ., 1989). Bu bölgelerin çoğaltımında kullanılan primerler (16-24 baz), genomda az sayıda bulunan, fakat genomlar arasında yüksek oranda korunmuş olan dizilere özgü seçilmektedirler. Farklı genotiplerden üretilen DNA'ların 4 nükleotid taşıyan bir seri kesim enzimi ile kesilmesi sonucu üretilen parçaların içindeki tek nükleotid değişikliği bile tanımlanabilmektedir. Polimorfizm oranı orta düzeydedir. Az miktarda DNA gerektirmesi, ucuz ve hızlı olmasına karşın, STS markır sisteminin en önemli olumsuz yönü primer tasarımı için dizi bilgisi gerektirmesidir (Yıldırım ve Kandemir, 2001).

SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions/Dizisi Karakterize Edilmiş Çoğaltılmış Bölgeler) markır sistemi ise özgül oligonükleotid çiftleri ile çoğaltılabilen ve genetik açıdan tek bir lokus olarak tanımlanan genomik DNA fragmentlerini karakterize etmektedir. SCAR markırları kodominant olarak kalıtılırlar. 1993 yılında yapılan bir çalışmada RAPD markırları SCAR markırlarına dönüştürülmüş ve RAPD markır sisteminin etkinliği biraz daha arttırılmıştır (Paran ve Michelmore, 1993). Bu işlemin yapılabilmesi için çoğaltım ürünleri klonlanır ve dizisi belirlenir. Dizi bilgisi dikkate alınarak daha özgül ve daha uzun primerler tasarlanır (~24 nükleotit uzunluğunda olan bu primerlerin ilk on bazı orijinal RAPD primerinden geri kalan bölgesi ise internal dizilerden oluşturulur). Bu primerler SCAR markırlarının oluşturulmasında kullanılır. SCAR markırları restriksiyon enzimleri ile kesilerek kodominant markırlara dönüştürülebilmektedir (Chawla, 2002).

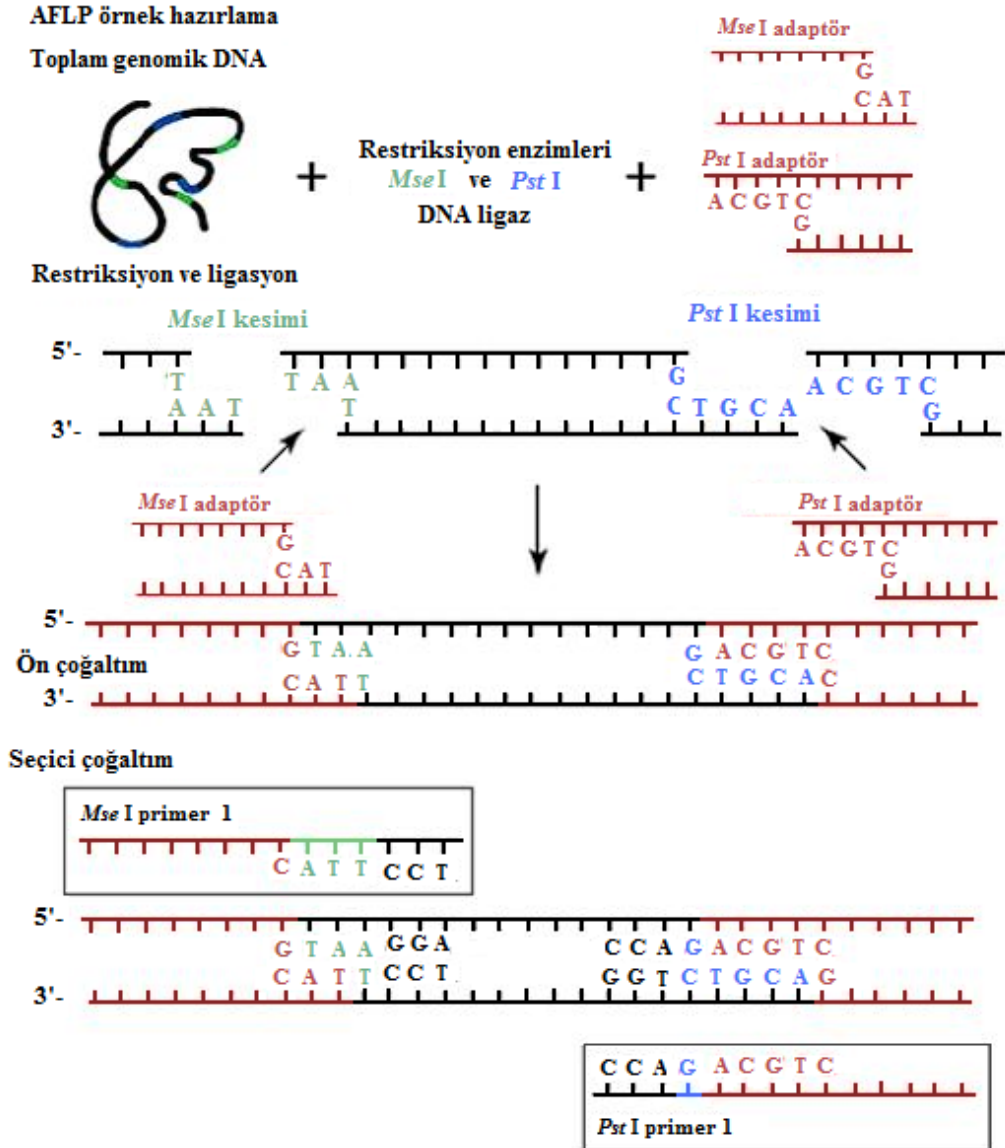
CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence/Çoğaltılmış Kesilmiş Polimorfik Dizi) markırları PZR-RFLP olarak da bilinir ve PZR ürünlerinin restriksiyon enzimleriyle kesimi sonucunda oluşan DNA fragmentlerindeki polimorfizmleri yansıtır. Primer tasarımı için gerekli olan dizi bilgisi gen bankası, genomik DNA, cDNA ya da klonlanmış PZR ürünlerinden sağlanır. Kesim ürünlerinin boyutları karşılaştırılarak polimorfizmler ortaya çıkarılabilir (Koniieczn ve Ausubel, 1993; Jarvis ve diğ., 1994). Bu markır sistemi kodominant özellik göstermektedir.

PZR'ye dayalı moleküler markırlardan son olarak; bu tez çalışmasında dayanıklı genotiplerin seçimi amacıyla kullanılan, yüksek polimorfizm gösteren ve tekrarlanabilen bir teknik olan AFLP markırını gösterebiliriz.

AFLP biyolojide yaygın uygulama alanlarına sahip bir markır sistemidir. Keşfinden beri biyoloji, genetik, ıslah, evrim ve ekolojiyi içine alan geniş araştırma alanlarında kullanılmıştır (Bensch ve Akesson, 2005; Meudt ve Clarke, 2007; Vuylsteke ve diğ., 2007). AFLP kesilmiş DNA parçalarına primer tanıma dizilerinin (adaptör) bağlanmasıyla oluşan PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ile RFLP'nin gücünün birleştiği bir tekniktir (Lynch ve Walsh, 1998). AFLP markırları herhangi bir organizma DNA'sı için başlangıçta dizi analizleri ve primer tayini olmadan kullanılabilir. Karmaşık genetik yapıları açıklayan güvenilir ve bilgi verici problardan oluşmuştur

(Powell ve diğ., 1996). Bu metod Vos ve Zabeau (1995) tarafından geliştirilmiştir ve özel restriksiyon enzimleriyle elde edilen fragmentlerin seçici çoğaltımıdır. Yüksek seçicilikten dolayı, farklı fragmentler AFLP uzamasında sadece tek bir baz ile ayrılan primerlerden çoğalır. AFLP analizleri dört aşamada gerçekleştirilir bunlar 1- Kesim, 2- Adaptör bağlanması, 3- Ön çoğaltım, 4- Seçici çoğaltım (Şekil 2.11). Birinci basamak genomik DNA'nın seyrek kesim yapan (*EcoRI* veya *PstI*) ve sık kesim yapan (*MseI* or *TaqI*) restriksiyon enzim kombinasyonları ile kesimini içermektedir. Bu teknikte özel çift iplikli oligonükleotid adaptörler tasarlanır ve bu adaptörler PZR çoğaltımında bilinen dizilerin sağlanması için restriksiyon parçalarının her iki ucuna da bağlanırlar (Semagn ve diğ., 2006). Adaptör diziler ve restriksiyon bölgeleri birlikte primer bağlanan bölgeler olarak işlev görür. Primerler, bu adaptör bölgeler ve kesim bölgelerine özgü tasarlanılarak 1–3 seçici baz ile 3' uçlarına ilave edilirler. Vos ve diğ. (1995) tarafından ifade edildiği gibi PZR çoğaltımı seçici bazlar olarak adlandırılan adaptör dizilere ilave olan tamamlayıcı nükleotidlere primerlerin bağlandığı yerlerde meydana gelmektedir. İdeal primer uzama boyları türlerin genom boyları ile çeşitlilik göstermektedir ve sürüklenmeye sebep olmayacak kadar fakat çok sayıda bant ile sonuçlanır, bu yeterli polimorfizmi sağlamaktadır (Semagn ve diğ., 2006). Çoğaltılan bu parçalar yüksek ayırım gücüne sahip poliakrilamid jellere yüklenir ve ortaya çıkan polimorfik bantlar arasındaki farklılıklar gözlemlenir. 10 bazdan az uzunluk farklarını agaroz jellerde görüntülemek zorken, poliakrilamid jel elektroforezi tek nükleotidlik uzunluk farkları olan AFLP bant profillerinde yüksek düzeyde kararlık sağlamaktadır. Tüm bu işlemlerde enzimlerin ve adaptörlerin seçimi önem kazanmaktadır (Ridout ve Donini, 1999). AFLP tekniği bitkide DNA parmakizi çalışmaları ve genetik haritalamada yaygın olarak kullanılmaktadır (Ballvora ve diğ., 1995; Thomas ve diğ., 1995; Xu ve diğ., 1999; Xu ve diğ., 2000). Ayrıca herhangi bir türün genom boyunca DNA metilasyonunu incelemek için ve izoşizomerler tarafından meydana gelen kesilmiş DNA fragmentlerinin polimorfizmini belirlemek için de modifiye edilmiştir (Xu ve diğ., 2000). Aynı tanıma bölgelerini paylaşan izoşizomerler, DNA metilasyonuna farklı duyarlılık göstermektedirler (McClelland ve diğ., 1994). AFLP'de tek bir primer kombinasyonu polimorfik bir RFLP markırından 8 kat daha fazla polimorfizm ortaya çıkarma yeteneğine sahiptir. Böylece AFLP analizi ekmeklik buğday için kullanıldığında, 16 kat daha fazla lokus tarayabilir (Mackill ve diğ., 1996). RAPD gibi dizi bilgisi gerektirmemesi ve kısa sürede yüksek polimorfizm göstermesi

bu yöntemin üstünlüklerindedir. AFLP; RAPD, RFLP ve mikrosatellitler ile karşılaştırıldığında tek primer kombinasyonu ile bir jelde aynı anda büyük miktarda polimorfizm gösterebilme kabiliyetindedir (Powell ve diğ., 1996; Milbourne ve diğ., 1997; Russell ve diğ., 1997). Bunun yanı sıra sonuca ulaşmak için ise çok aşama gerektirmesi (Semagn ve diğ., 2006), moleküler biyolojik tekniklerde deneyim gerektirmesi, restriksiyon enzimi kullanımı (Ridout ve Donini, 1999), uygun primer kombinasyonlarının belirlenmesi, eş zamanlı olarak dominant ve kodominant bant profillerinin oluşması, metodun ekonomik olmayışı AFLP'nin kullanımını sınırlayan etmenlerden bazılarıdır (Hartl ve Seefelder, 1998; Lynch ve Milligan, 1994). Farklı restriksiyon enzimi ve primerler, elde edilen verilerin kalite ve miktarında farklılıklar sağladığı için, hedef materyalin öncelikle farklı primer kombinasyonlarıyla denenmesini gerektirmektedir.



Şekil 2.11: AFLP şematik gösterimi (Mueller ve Wolfenbarger, 1999)

#### 2.4.4.2. DNA Dizi ve Çip (Mikroarray) Teknolojisine Dayanan Moleküler Markırlar

DNA mikroarray'i (gen çipi, DNA çipi ya da biyoçip olarak da bilinir) anlatım profili oluşturmak, başka bir ifade ile 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. Yüzeye tutturulan bu DNA segmentleri (20 ile 100 ya da daha fazla nükleotid uzunluğunda olabilir) prob olarak tanımlanmıştır ve bu problemlerin binlercesi tek bir DNA mikroarray'inde birlikte kullanılabilir (İpekdal, 2006). Çipler camdan yapılmış ve küçük karelere bölünmüştürler. Bir sıradaki alanlarda bulunan problemler, birbirlerinden birer nükleotid farklılık göstermektedir. Böylece belirli bir pozisyondaki nükleotid içeriğinin testi için, dördümlü bir alan seti (her



birinde bir nükleotid farklı) gerekmektedir. Genetik test için hücrelerden izole edilen DNA, bir veya daha fazla restriksiyon enzimi ile kesilir. Oluşan parçalar, floresan boya ile işaretlenir ve tek zincirli hale getirildikten sonra çipin içine pompalanır. Problemlerin dizileri ile tam bir eşlenik yapı gösteren parçalar problemlerle birleşir ve dizileri uymayanlar yıkanarak çipten uzaklaştırılır. Bir lazer tarayıcısı çipi okur ve floresan profilini tanımlar. Hibridizasyonun floresan profili, çiple bağlantılı olan bilgisayar programı ile analiz edilir ve veriler nükleotid dizisi şeklinde sunulur. Tek genlerdeki bu mutasyonların test edilmesine ek olarak tek bir çip ile 10.000 genin anlatımındaki değişim taranabilmektedir. DNA çip teknolojisi pek çok deneyin bir anda ve az miktarda materyal ve iş gücü kullanılarak gerçekleştirilmesini sağlar. Radyoaktivite kullanılmadığı için risksizdir. En büyük üstünlüğü gen anlatımını transkripsiyon aşamasında incelemeye olanak vermesidir. Fakat bazı deneysel aşamalardaki zorlukları ve oldukça pahalı olması nedeniyle her laboratuarda kullanılması güçtür. DNA dizi ve çip (Mikroarray) teknolojisine dayanan moleküler markırlar arasında SNP (“Single Nucleotide Polymorphism” - Tek Nükleotit Polimorfizmi) ve DArT (“Diversity Array Technology” – Diversity Array Teknoloji) en önemlileridir (Semagn ve diğ., 2006).

Son yıllarda geliştirilen ve mikroarray hibridizasyonuna dayalı bir moleküler markır tekniği olan DArT, çip teknolojisinin “high throughput” denilen, bir populasyondan veya bir organizmanın genomik DNA’sından köken alan özgün bir DNA fragmentinin varlığını veya miktarını ölçen teknolojiye uygulanan genom analizidir. DArT, oldukça ekonomik bir yöntemdir. DNA dizi bilgisine ihtiyaç duymamakla birlikte az miktarda DNA bu teknolojinin kullanımı için yeterlidir (Jaccoud ve diğ., 2001). DArT tekniği; germplazm karakterizasyonu, genetik haritalama, gen yakalama, moleküler markır yardımıyla ıslah, genom metilasyon değişikliklerinin takibi ve kantitatif özellik lokuslarının (QTL) belirlenmesi gibi uygulamalarda kullanılmaktadır.

SNP (Single Nucleotide Polymorphism/Tek nükleotit polimorfizmi) de özellikle son yıllarda genom taramalarında sıkça kullanılmaktadır. SNP’ler genetik bir lokusta farklı alleller oluşturacak biçimde bir baz/bazlarda meydana gelen nokta mutasyonların sebep olduğu polimorfizmlerdir. Baz değişimlerinden kaynaklanan bu tip DNA dizi farklılıkları, 1977 yılında DNA dizi analizi yönteminin başlamasından itibaren daha iyi tanımlanmıştır. Fakat çok fazla örnekte SNP tanımlanması çip teknolojisinin

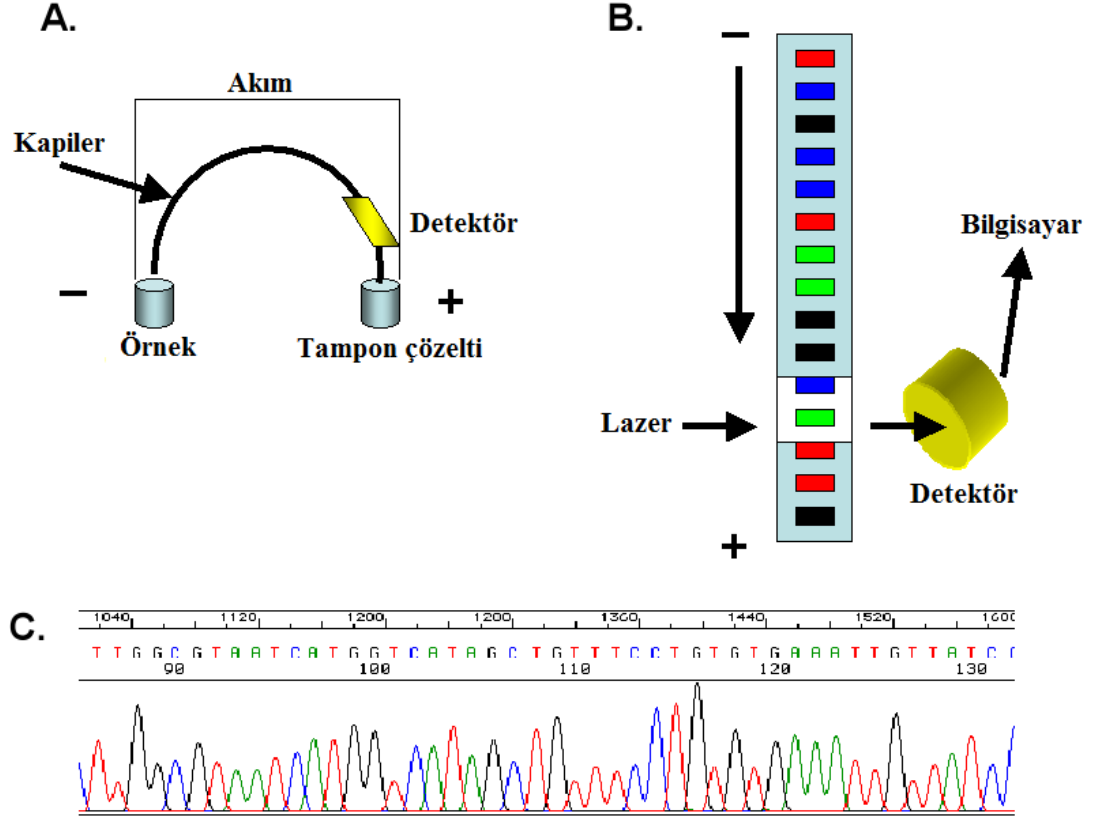
uygulanmasıyla 1990 yılından sonra hız kazanmıştır. Herhangi bir organizmada bol bulunabilmesi, otomosyona uygun olması, diğer markır ve yöntemlerle belirlenemeyen gizli polimorfizmleri tespit edebilmesi SNP'yi moleküler markır gelişiminde ilgi merkezi konumuna getirmiştir. İnsanlarda yaklaşık olarak 3 milyon SNP'nin bulunduğu bildirilmektedir (Russell, 2001).

## 2.5. DNA DİZİ ANALİZİ

DNA dizi analizi DNA'nın nükleotid dizilerinin saptanması amacıyla yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Herhangi bir organizmadan çok miktarda saf DNA fragmentleri elde edilmesini sağlayan rekombinant DNA tekniklerinin gelişmesine paralel olarak dizi analizi yöntemleri de geliştirilmeye başlanmıştır. İlk dizi analizi, 1960'ların başında 75-80 nükleotid kapsayan küçük tRNA'lar ile başlamıştır. Maya alanin tRNA molekülünün 1964'de dizi analizinin yapılması ile moleküler biyolojide önemli bir adım atılmıştır (Adams, 1991). Analiz bir nükleik asit dizisinin diğerine hibridizasyonuna dayanır. Bu hibridizasyon sırasında radyoaktif ya da radyoaktif olmayan maddelerle işaretleme yapılır. DNA dizi analizi, genlerin organizasyonu ve doğası ve ayrıca gen ve gen ürünlerinin değişmesine neden olan mutasyonların (delesyon, insersiyon vb.) sayısı, yeri ve çeşidi ile ilgili bilgi verir (Klug ve Cummings, 2003). DNA dizi analizi yöntemleri 3 gruba ayrılmaktadır. Bunlar; Allan Maxam ve Walter Gilbert'in kimyasal parçalama yöntemi, Fred Sanger ve arkadaşlarının dideoksi enzimatik yöntemi ve floresan temelli otomatik DNA dizi analizi yöntemidir. Allan Maxam ve Walter Gilbert'in kimyasal yöntemi DNA'nın belirli bazlardan kırılmasına dayanmaktadır. Fred Sanger ve arkadaşlarının geliştirdiği ikinci yöntemde ise belirli bir bazda sonlanan bir DNA zinciri sentezi gerçekleştirilmektedir.

Floresan temelli otomatik DNA dizi analizi yönteminde Sanger'in enzimatik DNA sentezine dayanan zincir sonlanma yöntemi kullanılmaktadır. Otomatik DNA dizi analiz cihazları, elektroforez sistemi ve sistemin bağlı olduğu program yüklü olan bilgisayarı içerir. Yaklaşık 50 µm çapındaki kapiller içerisine uygulanan jel içinde yürütme işlemi yapılırken (Şekil 2.12a) çok daha yüksek voltajlar uygulanarak reaksiyon süresi de kısaltılabilmektedir. Bu sistemde, ayrılan bazlar optik pencereden geçerken lazerle uyarılır ve bu sinyal detektör tarafından toplanarak bilgisayara gönderilir (Şekil 2.12b). Burada

emiyon dalga boyları bir nükleotidi işaret edecek şekilde analiz edilerek sonuçlar grafik şeklinde ifade edilir (Şekil 2.12c). DNA dizi analizi cihazlarında 6 bazdan 1000 baza kadar güvenli okuma yapılabilmektedir (Sambrook ve diğ., 1989).

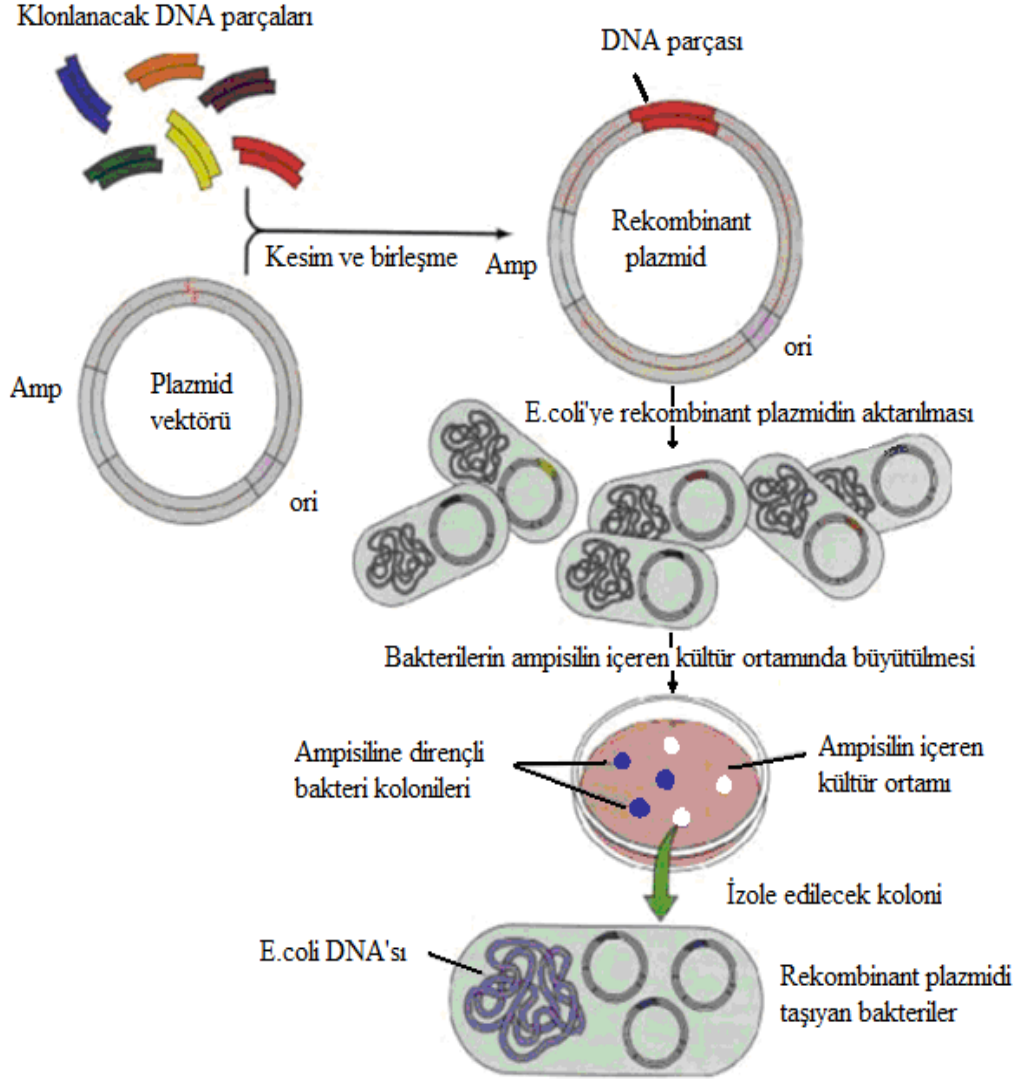


Şekil 2.12: Otomatik dizi analizi sisteminin çalışma prensibi

Yüksek yapılı ökaryotlarda bir gen birkaç yüz Kb (kilobaz) veya Mb (megabaz) ile ölçülebilir. Bu ölçülerdeki bir DNA'nın dizi analizi farklı uygulamaları gerektirir. Çünkü doğrulanmış bir dizinin 1 Mb'sini oluşturmak için 10 Mb bilgiye gerek vardır. Bu da küçük bir bakteri genomuna denk gelmektedir (Primrose ve Twyman, 2006). Özgül genlerin ya da DNA dizilerinin büyük miktarlarda elde edilmesini sağlayan yöntemler nedeniyle rekombinant DNA ve gen klonlama teknolojisi, bilim adamlarının, genlerin organizasyonu, yapısı ve ifadesi ile ilgili çalışmalarını kolaylaştırmaktadır (Klug ve Cummings, 2003).

Gen klonlaması, organizma genomundan elde edilen DNA parçasının vektöre yerleştirilmesidir. Vektör DNA'sına, organizmaya ait bir DNA'nın yerleştirilmesiyle

oluşturulan yeni moleküle rekombinant DNA adı verilmektedir. Bu rekombinant DNA molekülün bakteriyel hücrelere aktarılması (transformasyon) sonucunda bakterilerin bölünmesiyle rekombinant DNA'da replikasyon geçirmekte ve klon olarak isimlendirilen kopyalar meydana getirilmektedir (Şekil 2.13). Klonlanan DNA'nın varlığı, transforme edildiği hücrelerden saflaştırılarak doğrulanmaktadır.



Şekil 2.13: DNA parçasının plazmide klonlanması ve rekombinant plazmidin bakteriye aktarılması aşamaları (<http://fenbilimleri.files.wordpress.com/2008/09/gen.muhendisligi.pdf>)

### 3. MALZEME VE YÖNTEM

#### 3.1. BİTKİ MATERYALİ

Bu çalışmada kışlık ekmeclik buğdayda (*Triticum aestivum* L.) (Şekil 3.1) biyotrofik bir mantar olan *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*'nin sebep olduğu sarı pas hastalığına dayanıklılığın AFLP (Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi) analizleriyle araştırılması için Anadolu Tarımsal Araştırma Enstitüsü (ATAE) tarafından geliştirilen dayanıklı çeşit olarak İzgi2001, Sönmez2001 ile yerel bir çeşit olan PI178383 ile birlikte duyarlı çeşit olarak Aytın98, ES14 ve Harmankaya99 (Tablo 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6) çeşitleri kullanılmıştır. Bu çeşitler, TÜBİTAK MAM Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü serasında yetiştirilmiştir. Bu çeşitlerin özellikleri aşağıdaki tablolarda gösterilmiştir.




Şekil 3.1: Buğday (*Triticum* spp.) bitkisi (fotoğraf kaynağı: TÜBİTAK KAMAG 105G075 no'lu proje çalışmasından)

Buğday (*Triticum* spp.) bitkisinin sistematikteki yeri aşağıda belirtilmiştir.


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

### 3.1.1. Çalışmada Kullanılan Buğday Çeşitleri


Tablo 3.1: PI178383 çeşidinin özellikleri

<b>Kılıçık</b>	Kılıçıklı	
<b>Başak Rengi</b>	Kahverengi	
<b>Dane rengi</b>	Beyaz	
<b>Boy</b>	Orta	
<b>Kışa Dayanıklılığı</b>	İyi	
<b>Kardeşlenme Derecesi</b>	-	
<b>Yatma</b>	Dayanıklı	
<b>Erkencilik</b>	Orta Erkenci	
<b>Ekmeklik Kalitesi</b>	-	
<b>Bintane Ağırlığı</b>	-	
<b>Hektolitre ağırlığı</b>	-	
<b>Sedimentasyonu değeri</b>	-	
<b>Protein oranı</b>	-	
<b>Hastalık ve Zararlı</b>	TMBMV (Toprak Menşeyli Buğday Mozaik Virüs), sarı pas ve kara pasa dayanıklı, kahverengi pasa ise hassas bir çeşittir.	


Tablo 3.2: İzgi2001 çeşidinin özellikleri (<http://www.ataem.gov.tr>)

<b>Kılıçık</b>	Kılıçıklı	
<b>Başak Rengi</b>	Beyaz	
<b>Dane rengi</b>	Beyaz	
<b>Boy</b>	95-105 cm	
<b>Kışa Dayanıklılığı</b>	İyi	
<b>Kardeşlenme Derecesi</b>	Orta-yüksek	
<b>Yatma</b>	Dayanıklı	
<b>Erkencilik</b>	Erkenci	
<b>Ekmeklik Kalitesi</b>	Orta	
<b>Bintane Ağırlığı</b>	34-35 g	
<b>Hektolitreye ağırlığı</b>	79-81 kg	
<b>Sedimentasyonu değeri</b>	30-40 ml	
<b>Protein oranı</b>	Orta	
<b>Hastalık ve Zararlı</b>	Sarı pas, sürme ve راستیغا dayanıklı	


Tablo 3.3: Sönmez2001 çeşidinin özellikleri (<http://www.ataem.gov.tr>)

<b>Kılıçık</b>	Kılıçsız	
<b>Başak Rengi</b>	Beyaz	
<b>Dane rengi</b>	Kırmızı	
<b>Boy</b>	100-110 cm	
<b>Kışa Dayanıklılığı</b>	İyi	
<b>Kardeşlenme Derecesi</b>	Orta	
<b>Yatma</b>	Dayanıklı	
<b>Erkencilik</b>	Erkenci	
<b>Ekmeklik Kalitesi</b>	-	
<b>Bintane Ağırlığı</b>	38-44 g	
<b>Hektolitreye ağırlığı</b>	80-84 kg	
<b>Sedimentasyonu değeri</b>	14-16 ml	
<b>Protein oranı</b>	% 12-14	
<b>Hastalık ve Zararlı</b>	Sarı pasa, kahverengi pas, sürme ve راستیغا dayanıklıdır.	

Tablo 3.4: Harmankaya99 çeşidinin özellikleri (<http://www.ziraatcim.net>)


<b>Kılçık</b>	Kılçıklı	
<b>Başak Rengi</b>	Beyaz	
<b>Dane rengi</b>	Kırmızı	
<b>Boy</b>	85-95 cm	
<b>Kışa Dayanıklılığı</b>	İyi	
<b>Kardeşlenme Derecesi</b>	Orta	
<b>Yatma</b>	Dayanıklı	
<b>Erkencilik</b>	Orta Erkenci	
<b>Ekmeklik Kalitesi</b>	İyi	
<b>Bintane Ağırlığı</b>	38-44 g	
<b>Hektolitre ağırlığı</b>	79-83 kg	
<b>Sedimentasyonu değeri</b>	13-16 ml	
<b>Protein oranı</b>	% 12-14	
<b>Hastalık ve Zararlı</b>	Sürmeye dayanıklı, rastık ve paslara karşı orta duyarlıdır.	

Tablo 3.5: ES14 çeşidinin özellikleri

<b>Kılçık</b>	Kılçıklı	
<b>Başak Rengi</b>	Kahverengi	
<b>Dane rengi</b>	Beyaz	
<b>Boy</b>	90-95 cm	
<b>Kışa Dayanıklılığı</b>	İyi	
<b>Kardeşlenme Derecesi</b>	-	
<b>Yatma</b>	-	
<b>Erkencilik</b>	-	
<b>Ekmeklik Kalitesi</b>	Orta	
<b>Bintane Ağırlığı</b>	32 g	
<b>Hektolitre ağırlığı</b>	-	
<b>Sedimentasyonu değeri</b>	-	
<b>Protein oranı</b>	% 12	
<b>Hastalık ve Zararlı</b>	TMBMV, rastık, sürme ve kahverengi pasa dayanıklı olan çeşit, sarı pas ve kara pasa duyarlıdır.	



Tablo 3.6: Aytın 98 çeşidinin özellikleri (<http://www.ataem.gov.tr>)

<b>Kılçık</b>	Kılçıklı	
<b>Başak Rengi</b>	Kahverengi	
<b>Dane rengi</b>	Beyaz	
<b>Boy</b>	100-105 cm	
<b>Kışa Dayanıklılığı</b>	İyi	
<b>Kardeşlenme Derecesi</b>	Orta-yüksek	
<b>Yatma</b>	Dayanıklı	
<b>Erkencilik</b>	Orta Erkenci	
<b>Ekmeklik Kalitesi</b>	-	
<b>Bintane Ağırlığı</b>	32-34 g	
<b>Hektolitre ağırlığı</b>	78-79 kg	
<b>Sedimentasyonu değeri</b>	35-45 ml	
<b>Protein oranı</b>	% 13-14	
<b>Hastalık ve Zararlı</b>	Kahverengi pasa ve راستیغا dayanıklı.	

### 3.2. DNA İZOLASYONU

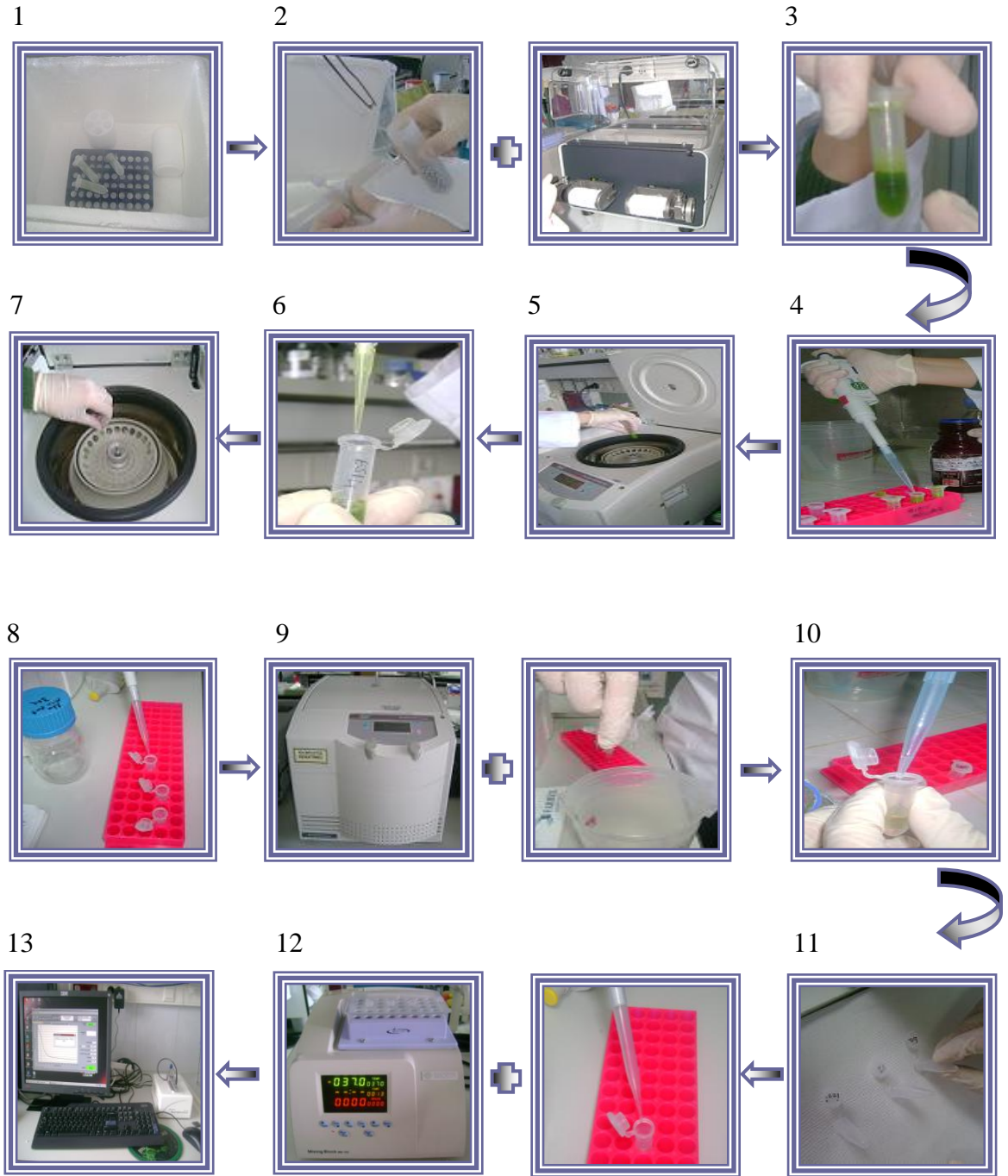
Bu çalışmada genomik DNA izolasyonu, buğday bitkisinin yaprakları kullanılarak Weining ve Langridge (1991) miniprep DNA izolasyon yönteminde bazı değişiklikler yapılarak gerçekleştirildi.

TÜBİTAK MAM Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü Bitki Biyoteknolojisi Laboratuvar'ında yapılan genomik DNA izolasyon çalışmalarında izlenen yollar aşağıda belirtilmiştir.

1. PI178383, İzgi01, Sönmez2001, Aytın98, ES14 ve Harmankaya99 anaç genotiplerine ve PI178383 x Harmankaya99, İzgi2001 x ES14 ve Sönmez2001 x Aytın98 F<sub>2</sub> genotiplerine ait yaprak örnekleri sıvı azotta (-196°C) donduruldu ve izolasyon yapılmaya kadar -80°C'de saklamaya alındı.
2. DNA izolasyonu için 0.2 g tartılıp, 2 ml'lik steril eppendorf tüplere, metal bilyeler eklenerek alınan her bir yaprak örneği "Retsh MM 301" model homojenizatör cihazında toz haline getirildi.

3. Oluşan homojenatın üzerine 600 µl ezme tamponu (Tablo 3.7) eklenerek parçalamaya devam edildi.
4. Ortamdaki proteinleri uzaklaştırmak amacıyla üzerine 600 µl soğuk fenol eklendi, birkaç kere tersyüz edildi ve 10 dakika buzda bekletildi.
5. Tüpler 13.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi.
6. Tüplerde oluşan üst sıvı dikkatlice çöktelden ayrıldı. Üst faz yeni bir tüpe aktarılarak üzerine 600 µl kloroform eklenip iyice karıştırıldı.
7. Tekrar 13.000 rpm'de 10 dakika süreyle santrifüj işleminden sonra oluşan üst sıvı yeni bir tüpe aktarıldı.
8. Üst sıvı üzerine 3 M, 50 µl soğuk sodyum asetat ( $\text{NaAcO}_4$ ) ve 1 ml soğuk saf etanol (EtOH) eklenerek yavaşça bir kaç kez karıştırılıp  $-70^\circ\text{C}$ 'de 30 dakika bekletildi.
9. 13.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi.
10. Oluşan üst sıvı atılarak, pellet 1ml %75'lik soğuk etanol ile 2 defa yıkandı ve 13.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Yıkama işleminden sonra pelletinin belirginleştiği gözlemlendi.
11. Üst sıvıları atılan tüpler, filtre kağıdının üzerine ters çevrilerek kurumaya bırakıldı. Pellet kurduktan sonra, miktarına göre yaklaşık 50–100 µl steril soğuk suda çözüldü.
12. RNA'yı uzaklaştırmak amacıyla 2 µl 2U RNaz (RNase ONE Ribonuclease Promega) eklenen tüpler,  $37^\circ\text{C}$ 'de 40 dakika, daha sonra RNaz enziminin inaktivasyonu için  $65^\circ\text{C}$ 'de 15 dakika inkübe edildi. İzolasyon basamakları şekil 3.2 de gösterilmektedir.

İzole edilen stok DNA'nın miktarının belirlenmesi için, "NanoDrop1000" spektrofotometre cihazında ve 260 nm dalga boyunda, 1/10 oranında sulandırılarak ölçüm yapıldı. Elde edilen ölçüm sonuçlarına göre, stok DNA'ların bir kısmı PZR çalışmalarında kullanılmak üzere miktarları 50 ng/µl olacak şekilde sulandırıldı. PZR için sulandırılmaları yapılan genomik DNA örneklerine ait stok tüpleri  $-20^\circ\text{C}$ 'de saklamaya alındı.



Şekil 3.2: Çalışmada uygulanan DNA izolasyon basamakları (1-13) (TÜBİTAK MAM, GMBE, Bitki Biyoteknolojisi Laboratuvarı)

Tablo 3.7: Genomik DNA izolasyonunda kullanılan stok çözeltiler

Adı	İçeriği	Konsantrasyon	Katalog No
Ezme Tamponu	Sarkozil	%2	Sigma – L-9150
	Tris-HCl pH 8.0	0.1 M	Sigma – T-5941
	EDTA pH 8.0	10 mM	Sigma - SIE6635
Sodyum Asetat	NaOAc <sub>4</sub> pH 4.8 (Glasiyel asetik asit ile)	3 M	Sigma – S-58750

### 3.3.“BULK SEGREGASYON ANALİZLERİNDE” KULLANILACAK GENOMİK DNA KARIŞIMLARININ HAZIRLANMASI

ATAE tarafından tescil ettirilen Harmankaya99, PI178383, ES14, İzgi2001, Sönmez2001 ve Aytın98 anaç bitkileri ile PI178383 x Harmankaya99 ve İzgi2001 x ES14, Sönmez2001 x Aytın98 kombinasyonlarına ait F<sub>2</sub> bitkileri moleküler çalışmalarda kullanıldı. Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü'ne (TARM) ait tarla ve seraya ekilen F<sub>2</sub> bitkileri, lokal sarı pas populasyonu ile inokule edildi. TARM tarafından yapılan hastalık değerlendirme sonuçlarına göre belirlenen en dayanıklı ve en hassas F<sub>2</sub> bitkileri sarı pas dayanıklılığı ile bağlantı gösteren moleküler markırların eldesi için anaçlar ile beraber “bulk segregasyon” analizlerinde kullanıldı. Fide dönemi ve ergin dönem dayanıklılığı için her kombinasyona ait 30'ar (30 dayanıklı, 30 hassas) bitki seçildi ve bu bitkilerin yaprak dokularından genomik DNA izolasyonları yapıldı. İzole edilen DNA'lar “NanoDrop1000” spektrofotometre cihazında 260 nm dalga boyunda ölçüldü ve her biri 100 ng/μl DNA olacak şekilde sulandırıldı. Her 30'lu bitki grubuna ait DNA'lardan eşit hacimde ve son konsantrasyonu 100 ng/μl olacak şekilde hazırlanan DNA karışımları -20 °C'de muhafaza edildi.

### 3.4. SARI PAS HASTALIĞINA DAYANIKLI VE DUYARLI BUĞDAY ÇEŞİTLERİNDE AFLP ANALİZLERİ

Vos ve Zabeau (1995) tarafından geliştirilmiş olan restriksiyon enzim kesimi, adaptör bağlanması, ön çoğaltım, seçici çoğaltım basamaklarını içeren AFLP analizleri, *Pst*I ve *Mse*I enzim kombinasyonları kullanılarak gerçekleştirildi.

### 3.4.1. Çift İplikli DNA'nın Restriksiyon Enzimleri ile Kesimi

Çift iplikli DNA'yı kesmek için sık (dört bazda bir) kesim yapan *MseI* (Fermentas, ER0981), ve seyrek (altı bazda bir) kesim yapan *PstI* (Fermentas, ER0611) enzimleri kullanıldı. Genomik DNA, çalışma sıcaklıkları farklı olan iki enzimden önce *PstI* enzimi (37°C'de) ile 2 saat, sonra *MseI* enzimi (65°C'de) ile 2 saat süreyle Tablo 3.8 deki bileşenler kullanılarak kesildi. Her iki enzimin DNA'yı kestiği bölgeler Tablo 3.9 da verilmiştir.

Tablo 3.8: Restriksiyon enzim kesiminde kullanılan reaksiyon bileşenleri ve son konsantrasyonları

Bileşenler	Miktar (µl)
DNA (250 ng/µl)	2 (500ng)
10X Reaksiyon tamponu	4 ( 1X )
<i>PstI</i> (10U/µl)	0,5 ( 5U )
<i>MseI</i> (10U/µl)	0, 5 ( 5U )
dH <sub>2</sub> O (toplam hacim 40 µl olacak şekilde)	33

Tablo 3.9: *PstI* ve *MseI* restriksiyon enzimlerinin çift iplikli DNA'yı kestiği bölgeler

<i>PstI</i> enziminin kesim bölgesi	<i>MseI</i> enziminin kesim bölgesi
5'-C T G C A <sup>^</sup> G-3'	5'-T <sup>^</sup> T A A-3'
3'-G <sup>^</sup> A C G T C-5'	3'-A A T <sup>^</sup> T-5'

Kesim aşaması sonrası restriksiyon enzimlerinin inaktivasyonunu sağlamak için 80°C'de 15 dakika inkübe edilen tüpler, adaptör dizilerin bağlanması için hazırlandı.

### 3.4.2. Çift İplikli DNA'ya Adaptör Parçalarının Bağlanması

Adaptör dizileri restriksiyon kesim enzimlerinin (*PstI*, *MseI*) kesim yerlerine tamamlayıcı nükleotid dizileri içermektedir. Bu çalışmada kullanılan enzimlere özgün adaptör dizileri Tablo 3.10 da yer almaktadır.

Tablo 3.10: *PstI*, *MseI* enzimlerine özgü adaptör dizileri

Adı	Dizi (5'-3')
<i>MseI</i> (Üst adaptör dizisi)	GACGAGAGTCCTGAG
<i>MseI</i> (Alt adaptör dizisi)	TACTCAGGACTCAT
<i>PstI</i> (Üst adaptör dizisi)	CTCGTAGACTGCGTACATGCA
<i>PstI</i> (Alt adaptör dizisi)	TGTACGCAGTCTAC

### 3.4.2.1. Adaptör Hazırlanması

Kullanılan adaptörlerin konsantrasyonları *MseI* adaptörü için 50 pmol/ $\mu$ l, *PstI* adaptörü için 5 pmol/ $\mu$ l olacak şekilde hazırlandı. Alt ve üst adaptör parçalarının birbirine bağlanması için hem *MseI*/Üst, *MseI*/Alt adaptörleri hem de *PstI*/Üst ve *PstI*/Alt adaptör dizilerinin karışımları 95°C’de 5 dakika inkübe edildikten sonra oda ısısında soğumaya bırakıldı. Bu şekilde hazırlanan adaptör karışımları, Tablo 3.11 de verilen bileşenler ile birlikte kesim reaksiyonu gerçekleştirilen tüplere eklenerek 2 saat süresince 22°C’de inkübe edildi.

Tablo 3.11: Adaptör bağlama aşamasında kullanılan reaksiyon bileşenleri ve son konsantrasyonları

Bileşenler	Miktar ( $\mu$ l)
<i>M</i> -Adaptör (50mM)	1 (1mM)
<i>P</i> -Adaptör (5mM)	1 (0.1mM)
10X T4 DNA Ligaz tamponu	5 (1X)
T4 DNA Ligaz (1U/ $\mu$ l)	1 (1U)
dH <sub>2</sub> O ( toplam 10 $\mu$ l olacak şekilde)	2

Adaptör bağlama aşamasında kullanılan T4 DNA ligaz enziminin inaktivasyonu için örnekler 10 dakika 65°C’de bekletildi.

### 3.4.3. AFLP Analizlerinde Ön Çoğaltım Aşaması

Kesilen DNA parçalarına adaptör dizilerinin bağlanmasıyla oluşan moleküllerin farklı primer çiftleri kullanılarak çoğaltılmasından önce, miktarının artırılması gerekmektedir. Bu amaçla adaptör dizilerinin tamamlayıcısı olan primer çiftleri kullanılarak ön çoğaltım (“pre-amplification”) reaksiyonu gerçekleştirildi. Reaksiyonda *PstI*, *MseI* enzim kesim yerlerine özgü Tablo 3.12 de verilen ön çoğaltım primerleri kullanıldı.

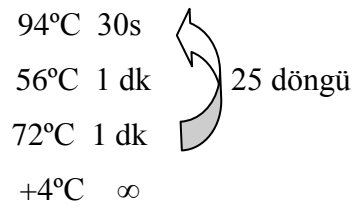
Tablo 3.12: Ön çoğaltım aşamasında kullanılan primer dizileri

<i>M</i> /core	5’- GACGATGAGTCCTGAGTAA-3’
<i>P</i> / core	5’- CTCGTAGACTGCGTACATGCA-3’

PZR sonunda elde edilen ön çoğaltım ürünleri %1.5’luk (100 ml 0.5 X TBE ve 1.5 g agaroz) agaroz jele 50 bç’lik DNA markırı ile birlikte yüklenerek sürüklenme “smear” yapıları kontrol edildi. Ön çoğaltımda kullanılan PZR bileşenleri Tablo 3.13 de, PZR koşulları ise Şekil 3.3 de verilmiştir.

Tablo 3.13: Ön çoğaltım reaksiyonunda bileşenler ve son konsantrasyonları

Bileşenler	Miktar (µl)
Adaptör dizisi bağlanmış DNA	2
M-Primer (50ng/µl)	1 (50ng)
P-Primer (50ng/µl)	1 (50ng)
dNTP (1mM)	2.5 (0.1mM)
Taq DNA polimeraz (5U/ µl)	0.25 (1.25U)
10X PZR tamponu	2.5 (1X)
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	2 (2mM)
dH <sub>2</sub> O (toplam 25 µl olacak şekilde)	13.75



Şekil 3.3: Ön çoğaltım aşamasında kullanılan PZR koşulları

#### 3.4.4. AFLP Analizlerinde Seçici Çoğaltım Aşaması

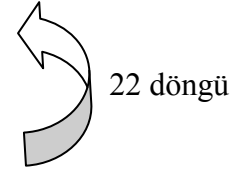
Seçici çoğaltım reaksiyonlarında kullanılmak üzere, ön çoğaltım ürünleri 1:5 oranında sulandırıldı. Seçici çoğaltım reaksiyonunda kullanılan bileşenler Tablo 3.14 de, PZR koşulları ise Tablo 3.15 de verilmiştir.

Tablo 3.14: Seçici çoğaltım reaksiyonunda kullanılan bileşenler ve son konsantrasyonları

Bileşenler	Miktar (µl)
Sulandırılmış ön çoğaltım ürünü	5
M-Primer (50ng/µl)	1 (50ng)
P-Primer (50ng/µl)	1 (50ng)
dNTP (1mM)	5 (0.2mM)
10X PZR tamponu	2.5 (1X)
Taq DNA polimeraz (5U/µl)	0.3 (1.5U)
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	2 (2mM)
H <sub>2</sub> O (toplam 25 µl olacak şekilde)	10.2

Tablo 3.15: Seçici çoğaltım aşamasında kullanılan PZR koşulları

1. 94°C 1 dk	18. 72°C 1 dk 30 sn
2. 65°C 1 dk	19. 94°C 1 dk
3. 72°C 1 dk	20. 59°C 1 dk
4. 94°C 1 dk	21. 72°C 1 dk 30 sn
5. 64°C 1 dk	22. 94°C 1 dk
6. 72°C 1 dk 30 sn	23. 58°C 1 dk
7. 94°C 1 dk	24. 72°C 1 dk 30 sn
8. 63°C 1 dk	25. 94°C 1 dk
9. 72°C 1 dk 30 sn	26. 57°C 1 dk
10. 94°C 1 dk	27. 72°C 1 dk 30 sn
11. 62°C 1 dk	28. 94°C 1 dk
12. 72°C 1 dk 30 sn	29. 56°C 1 dk
13. 94°C 1 dk	30. 72°C 1 dk 30 sn
14. 61°C 1 dk	31. 94°C 1 dk
15. 72°C 1 dk 30 sn	32. 56°C 1 dk
16. 94°C 1 dk	33. 72°C 1 dk 30 sn
17. 60°C 1 dk	34. +4°C ∞



Seçici çoğaltım aşamasında kullanılan primerler ve oluşturacakları kombinasyonlarının harf ve rakam ile gösterimi Tablo 3.16 da verilmiştir.



Tablo 3.16: Seçici çoğaltım PZR’de kullanılan farklı *PstI*-NNN ve *MseI*-NNN primer kombinasyonları için kullanılan semboller

HARF VE RAKAM İLE İSİMLENDİRME M/P	PRİMER KOMBİNASYONU	
	<i>MseI</i> -NNN	<i>PstI</i> -NNN
1B	CCT	GTT
1C	CCT	GAC
2B	CAC	GTT
2C	CAC	GAC
2D	CAC	TGG
3A	ACC	CCA
3B	ACC	GTT
3C	ACC	GAC
3D	ACC	TGG
4A	CCA	CCA
4B	CCA	GTT
4C	CCA	GAC
4D	CCA	TGG
5A	CAA	CCA
5B	CAA	GTT
5C	CAA	GAC
5D	CAA	TGG
6A	ACG	CCA
6B	ACG	GTT
6C	ACG	GAC
6D	ACG	TGG
7B	CGT	GTT
7C	CGT	GAC
7D	CGT	TGG
8B	CGA	GTT
8C	CGA	GAC
8D	CGA	TGG
9A	CAT	CCA
9B	CAT	GTT
9C	CAT	GAC
9D	CAT	TGG
10B	CAG	GTT
10C	CAG	GAC
10D	CAG	TGG

PZR sonunda elde edilen seçici çoğaltım ürünleri öncelikle % 1.5'luk agaroz jele 50 bç'lik DNA markırı ile birlikte yüklendi. Agaroz jelde sürüklenme yapısı gösteren örnekler poliakrilamid jel elektroforezi ile analiz edildi.

### 3.5. ÖN ÇOĞALTIM VE SEÇİCİ ÇOĞALTIM REAKSİYONLARINDA ELDE EDİLEN PZR ÜRÜNLERİNİN AGARUZ JEL ELEKTROFOREZİNDE GÖRÜNTÜLENMESİ

AFLP primerleri ile yapılan ön çoğaltım ve seçici çoğaltım aşamaları sonucu elde edilen PZR örnekleri, agaroz jel elektroforezinde incelendi. Analiz için 0.5 X TBE (Tris/Borate/EDTA)'de hazırlanan % 1.5'lik agaroz jel mikrodalga fırında eritildi. Oda sıcaklığına gelen jele 5 µl etidyum bromür (10 mg/ml) çözeltisi ilave edilerek 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 2.5-3 µl yükleme boyası ile karıştırılarak jel kuyularına yüklendi. PZR ürünlerinin boyutunu belirleyebilmek için 100 bç'lik (MBI Fermentas, SM0323) ve 50 bç'lik (MBI Fermentas, SM0371) DNA markırı kullanıldı. Agaroz jel, PZR ürünlerinin kuyucuklardan çıkması amacıyla öncelikle 100 Volt'ta 10 dakika daha sonra 85 Volt'ta 1 saat yürütüldü. UV ışık altında ("Vilber Lourmat" marka Agaroz Jel Görüntüleme Sistemi) incelenen PZR ürünleri bilgisayara aktarılarak görüntülendi. Agaroz jel elektroforezinde kullanılan çözeltilerin içerikleri ve konsantrasyonları Tablo 3.17 de verilmiştir.

Tablo 3.17: Agaroz jel elektroforezinde kullanılan çözeltiler

Adı	İçeriği	Konsantrasyon	Katalog No
<b>TBE Tamponu</b> (10 X)	Trisma Base	890 mM	Fluka - FL93362
	EDTA	20 mM	Sigma - SIE6635
	Borik Asit	890 mM	Reidel - 31146
<b>Yükleme Boyası</b> (6 X)	Bromofenol Mavisi	% 0.25 (w/v)	Sigma - B-8026
	Sukroz	% 40 (w/v)	Sigma - S-0389
<b>Etidyum Bromür</b>	Etidyum Bromür	10 mg/ml	Sigma - E7637

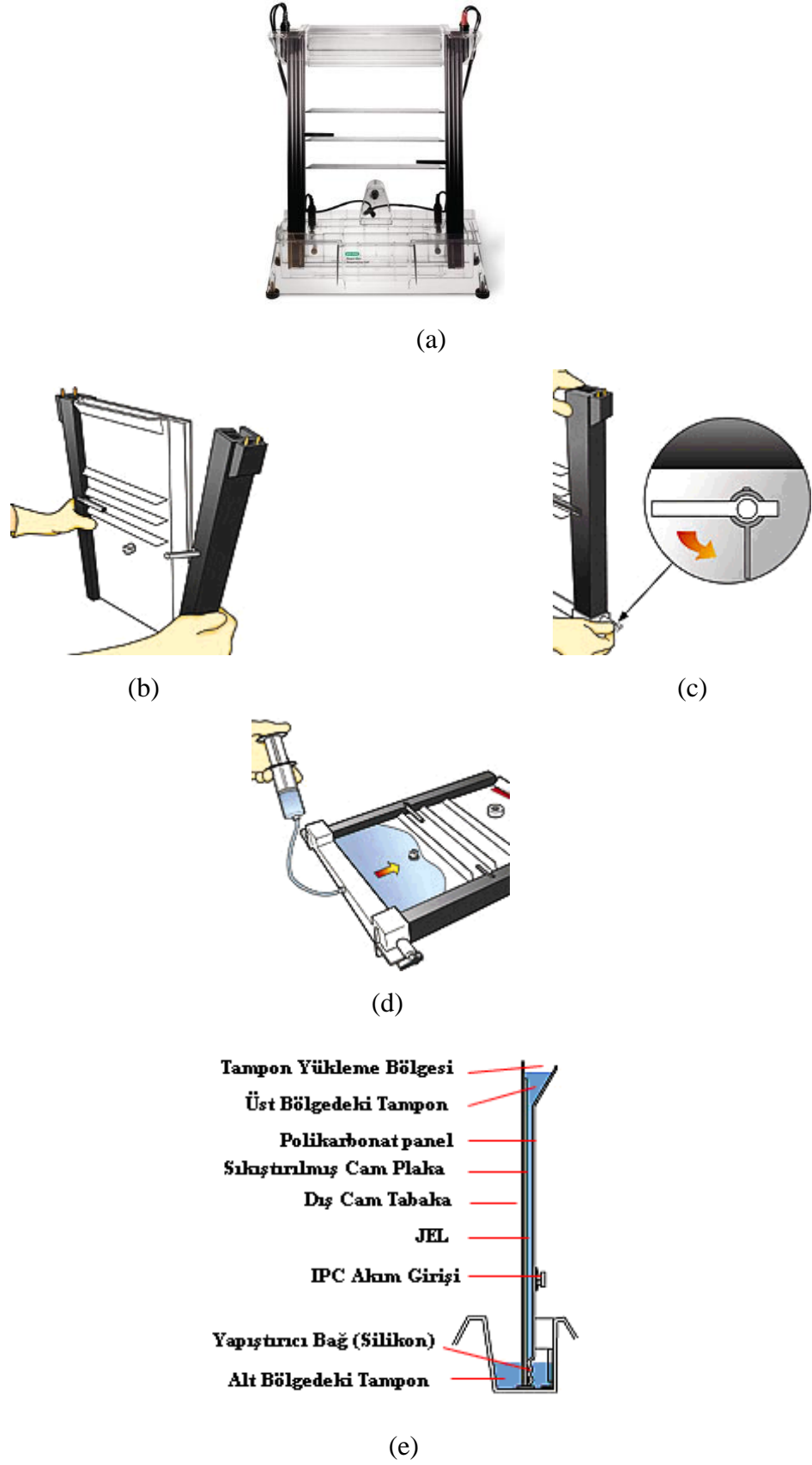
### 3.6. SEÇİCİ ÇOĞALTIM REAKSİYONLARINDA ELDE EDİLEN PZR ÜRÜNLERİNİN POLİAKRİLAMİD JEL ELEKTROFOREZİNDE GÖRÜNTÜLENMESİ

Seçici çoğaltım reaksiyon ürünlerinin agaroz jelde istenilen sürüklenmiş “smear” görüntüleri elde edildikten sonra %6'luk, örnek yükleme öncesi denatüre edilen poliakrilamid jelde görüntülendi.

#### 3.6.1. Poliakrilamid Jel Elektroforez Sisteminin Hazırlanması

Çalışmada kullanılan poliakrilamid jeller ve elektroforez sistemi (Biorad, “Sequi-Gen GT Sequencing Cell”) aşağıdaki adımlar izlenerek hazırlandı.

1. Camlar deterjan ile yıkanarak durulandı. Bidistile su ile dikey hareketlerle silinerek çeker ocak altında kurumaya bırakıldı. Kuruyan her iki cam yüzeyde saf etanol ile silindi.
2. 1 ml etanol-asetik asit karışımına (950 µl etanol +50 µl asetik asit), jelin cama yapışmasını sağlamak amacıyla 3 µl Metakriloksipropiltrimetoksisilane (Sigma, M6514) katılması ile hazırlanan “binding silane” solusyonu, mikropipet yardımı ile noktalar halinde camın tüm yüzeyine damlatılarak tüm yüzeye yayıldı.
3. Plastik kısmın cam yüzeyi de saf su ve etanol ile temizlendikten sonra çeker ocak içinde kurumaya bırakıldı. Jelin plastiğe yapışmasını önleyen “sigmacote” solusyonu, (Sigma, SL2) noktalar halinde damlatılarak yayıldı.
4. Cam ve plastik yüzeylerin temizliğinden sonra ayıraç (“spacer”) ve mandalların temizliği saf etanol ile sağlandı. Böylelikle tüm ön işlemleri tamamlanmış olan poliakrilamid jel elektroforez sistemi Şekil 3.4a da olduğu gibi hazırlanmış oldu.



Şekil 3.4: Poliakrilamid jel elektroforez (PAGE) sistemi (<http://www.biorad.com>)

### 3.6.2. Poliakrilamid Jel Hazırlığı ve Elektroforez İşlemi

1. Poliakrilamid jel (% 6) hazırlığı için 40.56 g üre (Sigma, U5371), 10 ml bidistile su, 9 ml 10X TBE, 11.25 ml %40 akrilamid solusyonu (19:1 akrilamid:bisakrilamid Sigma, A-2917) bir beher içinde çözülerek toplam jel hacmi bidistile su ile 90 ml'ye tamamlandı.
2. Hazırlanan jel solusyonunun havası vakumla alındı.
3. Jelin polimerize olmasına izin vermeden, 90 µl N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED), (Sigma, T7024) ve taze hazırlanmış % 25'lik 90 µl amonyumpersülfat (APS), (Sigma, A9164) ilave edildikten sonra Şekil 3.4d de gösterildiği şekilde şırınga yardımıyla sisteme yüklendi.
4. Gece boyu polimerize olan jeli içeren sistemin alt ve üst tampon yükleme kısmına 1X TBE yürütme tamponu ilave edildi (Şekil 3.4e).
5. Elektroforez işlemi öncesi, 70 watt'da 30 dakika denatürasyonu yapılan poliakrilamid jel, örneklerin yüklenmesinin ardından 80 watt'da 3 saat yürütüldü.

### 3.6.3. Poliakrilamid Jelde İncelenecek Örneklerin Hazırlığı

Poliakrilamid jelin denatüre edilmesinin ardından jele yüklenecek örneklerin hazırlığı yapıldı. Bu amaçla;

1. Örneklerin kuyulara çökmelerini sağlayan yükleme boyası Tablo 3.18 deki bileşenler kullanılarak hazırlandı.
2. 1.5 ml'lik eppendorf tüpe, 2 µl PAGE yükleme boyası ve 5 µl örnek ilave edildikten sonra kısa bir santrifüj yapılarak örnek ile yükleme boyasının karışması sağlandı.
3. Bu karışım 5 dk 95 °C'de denatüre edilip buza alındıktan sonra jele yüklemeye hazır duruma getirildi.

Tablo 3.18: Örnek yükleme boyası (50 ml) bileşenleri

Adı	Miktar (mg/ml)	Katalog No
Deiyonize formamid	49 ml	Sigma - F9037
0.5 M EDTA pH 8.0	1 ml	Sigma - E6635
Bromo fenol mavisi	50 mg	Sigma - B0126
Ksilen sayanol	50 mg	Sigma - X4126

### 3.6.4. Poliakrilamid Jelin Gümüş Nitrat ile Boyanması

Örneklerin elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra, birbirinden ayrılan cam ve plastik kısımlardan cam olanına yapışmış haldeki jelin boyanması Tablo 3.19 da verilen bileşenler kullanılarak aşağıdaki adımlarda gerçekleştirildi.

1. Cama yapışmış olan jel, % 10'luk asetik asitte yürütme boyasının mavi rengi kaybolana kadar çalkalandı.
2. Jel asetik asidin uzaklaştırılması için üç kez ikişer dakika boyunca saf suda çalkalandı.
3. Saf su yıkamasından sonra jel daha önceden hazırlanmış olan gümüş nitrat çözeltisine alınarak yarım saat ışıktan uzak bir ortamda bekletildi.
4. Boyamanın tamamlanmasından sonra 5 sn saf suda bekletilen jel taze olarak hazırlanmış 2 litre geliştirme ("developing") çözeltisinde çalkalandı.
5. Markır ve diğer örneklere ait bantlar istenen koyulukta görünür hale geldikten sonra durdurma çözeltisi olarak da kullanılan % 10'luk asetik asitte 2-3 dk çalkalandı.
6. Saf suda çalkalama yapıldıktan sonra jel bir gece kurumaya bırakıldı.

Tablo 3.19: Gümüş boyamada kullanılan bileşenler

Bileşenler	Miktar (g/ml)	Katalog No
Gümüş nitrat ( $\text{AgNO}_3$ )	2 g	Sigma - S7226
Asetik asit ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ )	200 ml	Sigma - A6283
Sodyum karbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )	60 g	Sigma - S7795
Sodyum tiyosülfat ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ )	500 mg	Sigma - S7026
% 37'lik formaldehit ( $\text{H}_2\text{C}(\text{OH})_2$ )	3 ml	Sigma - F1635

Poliakrilamid jelin gümüş boyama uygulamasında kullanılan gümüş nitrat çözeltisi 2 litre saf suda 2 g gümüş nitrat ve 3 ml % 37'lik formaldehit çözdürülerek hazırlandı ve ışıktan uzak bir ortamda saklandı. % 10'luk asetik asit çözeltisi toplam hacim 2 litre olacak şekilde 200 ml % 37'lik asetik asit'e 1800 ml saf su ilave edilerek hazırlandı. Geliştirme ("Developing") çözeltisinde ise 60 g sodyum karbonat 2 litre soğuk saf suda çözüldü ve üzerine 3 ml % 37'lik formaldehit eklendi. Kullanmadan önce 10 mg/ml konsantrasyonundaki sodyum tiyosülfattan 400 µl ilave edildi. Sodyum tiyosülfat çözeltisi (10 mg/ml) 500 mg sodyum tiyosülfat 50 ml saf suda çözülerek hazırlandı.

### **3.7. BULK SEGREGASYON ANALİZLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ VE POLİMORFİK FRAGMENTLERİ KLONLAMA ÇALIŞMALARI**

Buğday anaçlarında gerçekleştirilen AFLP analizleri sonuçlarına göre, bu anaçlar arasında polimorfizm gösteren AFLP primerleriyle anaçlara ait fide dönemi ve ergin dönem F<sub>2</sub> populasyonları kullanılarak “Bulk Segregasyon Analizleri” gerçekleştirildi. Bulk segregasyon analizleri sonucunda bant profillerine göre değerlendirmeler yapıldı. Sarı pas hastalığı dayanıklılığı ile ilişkili markır adayı olarak belirlenen bantlar jelden geri kazanılıp uygun vektörlere klonlanarak dizileme çalışmaları yapıldı.

#### **3.7.1. Poliakrilamid Jelden Polimorfik PZR Ürünlerinin Geri Kazanımı**

Poliakrilamid jellerin değerlendirilmesi sonucunda markır olarak belirlenen polimorfik bantlar steril bir bistüri yardımı kesildi. Kesilmiş olan jel parçaları steril eppendorf tüplere alınarak, her birinin üzerine 10 µl steril su ilave edildi ve 105°C’de 6 dakika süresince inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında 13.000 rpm’de 1 dakika süreyle santrifüj yapıldı. Oluşan üst sıvının 2 µl’si ile AFLP yönteminde kullanılan seçici primer çiftleri ile aynı PZR koşullarında çoğaltıldı.

#### **3.7.2. Agaroz Jelden Geri Kazanım**

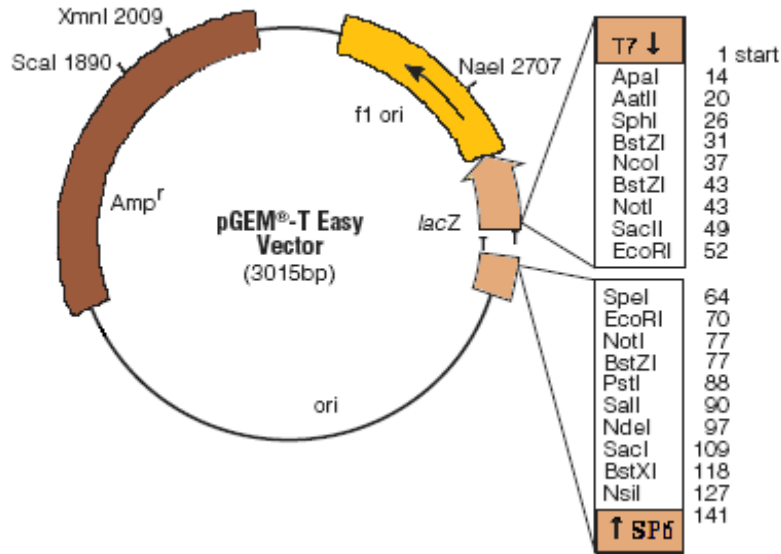
PZR sonunda elde edilen 5 µl seçici çoğaltım ürünü % 1.5’luk agaroz jele yüklenerek bandın DNA büyüklük markırına göre doğru konumda olup olmadığı kontrol edildi. Kalan PZR ürünleri %2.5’luk agaroz jele yüklenerek 90 V’de markır açılana kadar yürütüldü. Agaroz jelden steril bistüri yardımı ile kesilen DNA bantları, 1.5 ml’lik eppendorf tüplere alındı ve miktarları mg cinsinden ölçüldü. Agaroz jelden geri kazanım çalışmalarında “Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System”- (Promega, A9282) kullanıldı. Her bir 100 mg jel örneği için kit içinde yer alan 400 µl “Binding Buffer II” eklendi ve 50-60 °C sıcaklıkta 10 dakika inkübe edilerek jelin erimesi sağlandı. Eriyen jel, kolona aktarılarak 2 dakika beklendi ve 12.000 rpm’de 2 dakika santrifüj yapıldı. Santrifüj sonunda toplama tüpünde oluşan sıvı atıldı. Daha sonra kolona 500 µl yıkama çözeltisi (“wash solution”) eklenerek 12.000 rpm’de 1 dakika süreyle santrifüj yapıldı. Yıkama işlemi 12.000 rpm’de 1 dakika santrifüj yapılarak tekrarlandı. Santrifüj sonrası kolon, steril 1.5 ml’lik bir eppendorf tüpe aktarıldı. Daha sonra, kolona 40 µl steril su ilave edilerek 1 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonrası, 12.000

rpm’de 1 dakika santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrası elde edilen DNA örnekleri -20 °C’de daha sonra kullanılmak üzere saklandı.

### 3.7.3. Klonlama Aşamaları

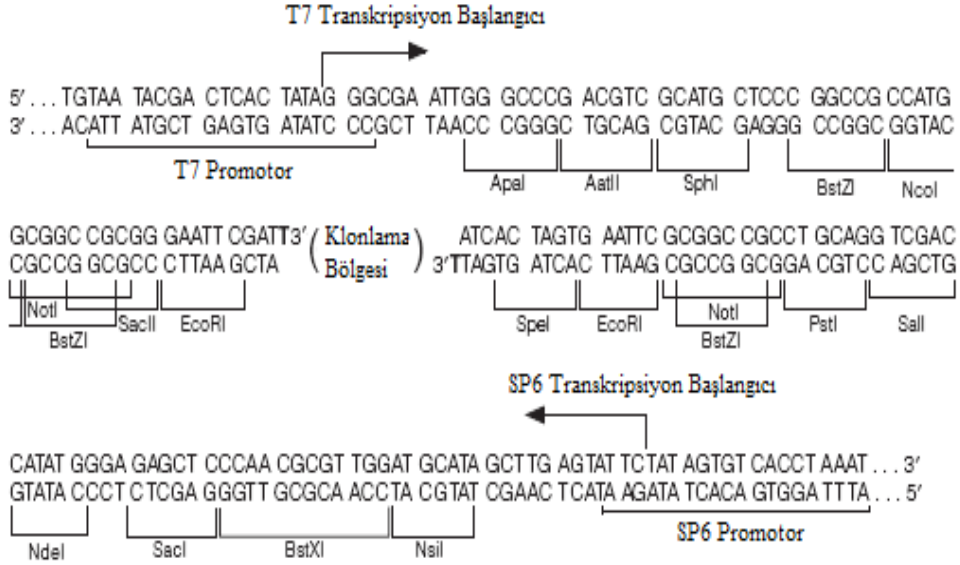
Restriksiyon endonükleaz enzim kesimi ile rastgele oluşan farklı tipteki DNA moleküllerine, dizi analizinde kullanılacak primerlerin ileri ya da geri konumda bağlanma durumları bilinmemektedir. Bu nedenle DNA dizi analizi reaksiyonu da doğrudan poliakrilakrilamid jelden geri kazanımı yapılmış PZR ürünlerinden yapılamamaktadır. Bu yüzden saflaştırılmış DNA parçalarının uygun vektörlere klonlanması gerekmektedir.

Klonlama çalışmalarında, “pGEM-T Easy vektör I” (Promega, A1360) kiti kullanıldı. Şekil 3.5 de pGEM-T Easy vektörünün halkasal yapısı ve referans dizi noktaları, Şekil 3.6 da ise çoklu klonlama bölgesindeki nükleotid dizileri ve Sp6 ve T7 primer bölgeleri gösterildi.



Şekil 3.5: pGEM-T Easy vektörünün halkasal yapısı ve referans dizi noktaları (<http://www.promega.com>, 2009)





Şekil 3.6: pGEM-T Easy vektörünün promotör ve çoklu klonlama bölgelerine ait dizi bilgileri (<http://www.promega.com>, 2009)

### 3.7.4. Ligasyon

Agaroz jelden geri kazanım işleminden sonra DNA parçasının vektör üzerinde bulunan klonlama bölgesine bağlanması için ligasyon işlemi gerçekleştirildi. Ligasyon oda ısısında 1 saat ya da + 4°C’de gece boyu inkübasyon ile Tablo 3.20 deki bileşenler kullanılarak gerçekleştirildi. Ligasyon sonrası vektörün bakteriyeye aktarılması için transformasyon işlemi yapıldı.

Tablo 3.20: Ligasyon reaksiyonunda kullanılan bileşenler

Reaksiyon Bileşenleri	Miktar (µl)
2X Rapid ligasyon tamponu	5
pGEM-T Easy vektör (50ng/µl)	1
PZR ürünü	3
T4 DNA ligaz (3U/µl)	1
Toplam	10

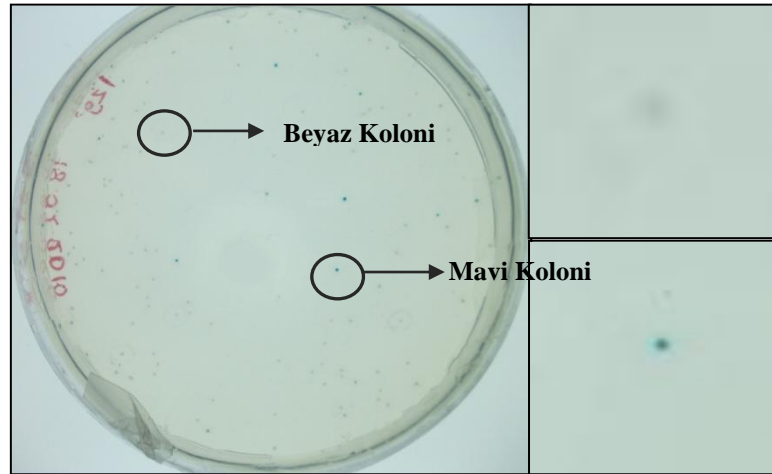
### 3.7.5. Transformasyon

Klonlamada, yabancı DNA molekülünü almak için daha önceden yeterli (“competent”) hale getirilmiş olan DH5α bakteri suşu kullanılmıştır. Seçici besiyeri olarak ampisilin (Sigma – A166) içeren katı LB (Luria Bertani Agar, Difco - 244520) kullanılmıştır (Bertani, 1951). LB besiyeri *E.coli* DH5α suşuna ait bakterilerin üremesi için gerekli mikro ve makro besin elementlerini içermektedir.

Transformasyon için öncelikle, -80 °C'den çıkarılan *E.coli*, DH5α bakteri suşu hücreleri buzda çözüldü. Çözülen bakteri hücrelerinden 50 µl, ligasyonu yapılan plazmid örneklerinden 2 µl alınarak karıştırıldı. Bu karışım buzda 20 dakika bekletildi ve sonra, 1 dakika 42°C'de inkübe edilerek buza alındı. Buzda 5 dakika tutulan tüplere 950 µl sıvı LB eklenerek hacmi 1 ml'ye tamamlanan karışım 37°C'deki etüvde 180 rpm çalkalama hızında 45 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında 1 dk 13.000 rpm'de santrifüj edilen tüplerde oluşan üst sıvınının 950 µl'si atıldı. Bakterileri içeren pellet kalan 50 µl ile iyice karıştırıldıktan sonra ampisilin/X-Gal/IPTG içeren katı LB besiyerine ekildi.

### 3.7.6. Transformasyon Sonrası Pozitif Kolonilerin Seçimi ve Koloni PZR

Katı besiyerine, seçiciliği sağlayan antibiyotik dışında, mavi ve beyaz kolonilerin oluşmasını sağlayan 20 µl IPTG (izopropil-beta-D-tiyogalaktopiranosid, Promega - V395A 24mg/ml) ve 20 µl X-Gal (5-bromo-4-kloro-3indolil-β-D-galaktosid, Fermentas - R0404 20mg/µl) eklendi. Transformasyon sonucunda vektörü içine alan DH5α hücreleri LB/ampisilin/IPTG/X-Gal içeren petrilere ekildi. Ekim yapılan petrilere 37°C'deki etüvde 1 gece inkübe edildi. İnkübasyon sonrası petrilere oluşan mavi ve beyaz koloniler tespit edilerek, her bir petriden ligasyonun gerçekleştiğini gösteren 5 adet beyaz koloni ve kontrol olarak ligasyonun gerçekleşmediğini gösteren 1 adet mavi koloni seçildi (Şekil 3.7).



Şekil 3.7: M-ACG, P-GAC primer kombinasyonu ile İzgi2001 örneği için beyaz ve mavi kolonilerin belirlenmesi


Seçilen koloniler, 12 µl dH<sub>2</sub>O içinde çözülerek bu karışımın 5 µl'si PZR'de kalıp olarak kullanıldı. 7 µl'si ise ampisilin içeren LB sıvı besiyerine ekilerek 37°C'deki çalkalayıcı

etüvde 1 gece boyunca inkübe edildi. Hazırlanan koloni PZR bileşenleri (Tablo 3.21) ile örnekler karıştırılarak koloni PZR (Şekil 3.8) gerçekleştirildi.

Koloni PZR sonrasında örnekler % 2.5'lük agaroz jele yüklenerek klonlaması yapılan bandın boyutu kontrol edilerek, doğru yerde bant veren kolonilere ait bakterilerden plazmid izolasyonu yapıldı. İzolasyon sonrası plazmidlerin konsantrasyonları 260 nm'de "NanoDrop-1000" spektrofotometrede ölçülerek, % 1'lik agaroz jele yüklendi.

Tablo 3.21: Koloni PZR'de kullanılan bileşenler

Bileşenler	Miktar (µl)
Örnek	5
Reaksiyon karışımı	10
T7 primeri (10 µM)	1.5
SP6 primeri (10 µM)	1.5
dH <sub>2</sub> O (toplam hacim 20 µl olacak şekilde)	2

96°C	3 dk.		34 döngü
94°C	30sn.		
50°C	30sn.		
72°C	1dk.		

Şekil 3.8: Koloni PZR koşulları

### 3.7.7. Plazmid İzolasyonu

Plazmidlerin izolasyonu, "Axygen Biosciences AxyPrep Plasmid Miniprep Kit- AP-MN-P-50" ile gerçekleştirildi. Koloni PZR sonucuna göre seçilerek sıvı besiyerine ekilen ve gece boyu büyümesi sağlanan plazmidlerin izolasyonu için öncelikle, 13.000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapıldı ve oluşan üst sıvı atıldı. Üst sıvının atılmasından sonra her bir tüpte elde edilen pelletlerin üzerine 250 µl "S1 tamponu" (RNaz ilave edilen) eklendi ve karıştırılarak pelletlerin çözünmesi sağlandı. Çözülen pelletin üzerine 250 µl "S2 tamponu" eklendi ve 4-6 kez tersyüz edilerek karıştırıldı. Tüpler üzerine 350 µl "S3 tamponu" eklendi, 6-8 kez tekrar karıştırılan tüpler 10 dakika 13.000 rpm'de santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrası oluşan üst sıvı kolona aktararak 13.000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapıldı. Toplama tüpünde santrifüj sonrası biriken sıvı atıldı ve kolon tekrar aynı tüpe yerleştirildi. Daha sonra her bir kolona 700 µl yıkama çözeltisi ("wash

solution”) eklenerek 13.000 rpm’de 1 dakika santrifüj yapıldı. Yıkama işlemi tekrarlandı. Yıkama işleminden sonra toplama tüpünde oluşan sıvı atıldı ve ek olarak yıkama solusyonundan kurtulmak için 13.000 rpm’de 1 dakika santrifüj yapıldı. Son olarak, kolon steril 1.5 ml’lik eppendorf tüpe transfer edildi ve üzerine 50 µl steril su ilave edilerek 1 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyondan sonra 13.000 rpm’de 1 dakika santrifüj yapıldı. İzole edilen plazmidlerin miktarları spektrofotometre (NanoDrop ND1000) ile ölçülerek, DNA dizi analizi reaksiyonu için hazır hale getirildi.

### 3.8. DNA DİZİ ANALİZİ ÇALIŞMALARI

Klonlama sonrası DNA dizi analizi reaksiyonu, GeXP GenomeLab Genetik Analiz Sistemi (Beckman Coulter) cihazı ile gerçekleştirildi (Şekil 3.9).




Şekil 3.9: GeXP GenomeLab Genetik Analiz (Beckman Coulter) Sistemi (TÜBİTAK MAM, GMBE Bitki Biyoteknolojisi Laboratuvarı)

DNA dizi analizi reaksiyonuna izole edilen plazmid örneklerinden 300 ng olacak şekilde ilave edildi. Dizi analizi reaksiyonunda kullanılan bileşenler ilave edilmeden önce plazmidler 96°C’de 3 dakika inkübe edildi, ardından buza alınarak 10 dakika buzda bekletildi. Örneklerin üzerine DNA dizi analizi PZR bileşenleri (“GenomeLab DTCS Starter Kit”- S802018) eklenerek (Tablo 3.22) PZR gerçekleştirildi (Şekil 3.10).

Tablo 3.22: DNA dizi analizi PZR bileşenleri ve hacim miktarları

Bileşenler	Miktar (µl)
Örnek (~300ng) + H <sub>2</sub> O	11.5
-47 Sequencing Primer	0.5
DTCS Quick Start Master Mix	8
Toplam	20

96°C 20 sn  
 50°C 20 sn  
 60 °C 4 dk



35 döngü

Şekil 3.10: DNA dizi analizinde uygulanan PZR koşulları

DNA dizi analizi PZR sonrasında elde edilen örnekler dizi analizi cihazına yüklenmeden önce etanol çöktürmesi ile PZR bileşenlerinden aşağıdaki basamaklar izlenerek ayrıştırıldı.

1. DNA dizi analizi PZR uygulanan her bir örnek için toplam 5 µl (2 µl sodyum asetat, 2 µl sodyum EDTA ve 1 µl glikojen) olacak şekilde, hazırlanan durdurma çözeltisi tüplere ayrı ayrı ilave edildi.
2. Üzerlerine 60 µl soğuk saf etanol (%95'lik alkol) ilave edilen tüpler 14.000 rpm'de 15 dakika + 4°C'de santrifüj edildi.
3. Santrifüj sonrası oluşan üst sıvılar atılarak, tüplerde kalan pellet üzerine 200 µl soğuk etanol (%75) eklendi ve 14.000 rpm'de 2 dk + 4°C'de santrifüj edildi.
4. Santrifüj sonrası oluşan üst sıvı atıldıktan sonra, örnekler 10 dakika vakumda kurutuldu.
5. Kurutma sonunda alkolü uzaklaştırılmış pelletler 40 µl SLS ("Sample Loading Solution"- Örnek Yükleme Çözeltisi) ile çözülerek 96 kuyucuklu dizi analizi yükleme tablasına aktarılarak örneklerin buharlaşmaması için mineral yağ damlatıldı.
6. GeXP GenomeLab Genetik Analiz Sistemi (Beckman Coulter)'ne ait ilgili dizi analizi programında örneklere ait dizi bilgilerinin belirlenmesi çalışmaları gerçekleştirildi.

### 3.9. DİZİ ANALİZİ SONUÇLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

DNA dizi analizi okumaları tamamlandıktan sonra her bir örnek için elde edilen veriler alınarak, <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/> sitesinde üstüste getirilerek karşılaştırıldı (“alignment”) (Şekil 3.11).

The screenshot displays the ClustalW2 web interface with the following settings:

- YOUR EMAIL:** [Empty text box]
- ALIGNMENT TITLE:** Sequence
- RESULTS:** interactive
- ALIGNMENT:** full
- KTUP (WORD SIZE):** def
- WINDOW LENGTH:** def
- SCORE TYPE:** percent
- TOPDIAG:** def
- PAIRGAP:** def
- MATRIX:** def
- GAP OPEN:** def
- NO END GAPS:** yes
- GAP EXTENSION:** def
- GAP DISTANCES:** def
- ITERATION:** none
- NUMITER:** 1
- OUTPUT FORMAT:** aln w/numbers
- OUTPUT ORDER:** aligned
- TREE TYPE:** none
- PHYLOGENETIC TREE:** off
- CORRECT DIST.:** off
- IGNORE GAPS:** off
- CLUSTERING:** NJ

Below the settings is a large text area for entering or pasting sequences. At the bottom, there is an "Upload a file:" button, a "Gözet..." button, and "Run" and "Reset" buttons.

Şekil 3.11: “EMBL-EBI” web sitesinden (alignment) karşılaştırma programı

Her bir analiz sonucu için “alignment” programı ile üst üste karşılaştırılan bu dizilerden AFLP markır dizisine ulaşılacak için ClustalW 2.0 sonucuna göre “Consensus” (birleştirilmiş) DNA dizisi oluşturuldu.

## 4. BULGULAR

### 4.1. DNA İZOLASYONU

Çalışmada kullanılan PI178383, Harmankaya99, İzgi2001, ES14, Sönmez2001 ve Aytın98 çeşitlerinden izole edilen genomik DNA'ların miktarları Tablo 4.1 de verilmiştir.

Tablo 4.1: Çalışmada kullanılan buğday çeşitlerine ait DNA miktarları

Çeşitler	PI178383	Harmankaya99	İzgi2001	ES14	Sönmez2001	Aytın98
DNA miktarı (ng/μl)	1516	2190.4	2103	1654	1856	954

### 4.2. BUĞDAYDA AFLP ANALİZLERİ

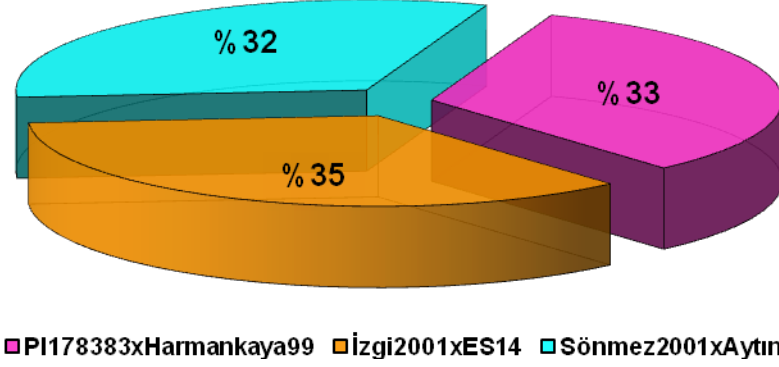
Sarı pas hastalığına dayanıklı (PI178383, İzgi2001, Sönmez2001) ve duyarlı (Harmankaya99, ES14 ve Aytın98) buğday çeşitlerinin DNA'ları kullanılarak 34 adet AFLP primer çifti (Tablo 4.2) ile yapılan PZR analizi sonuçlarına göre boyutları 100-600 bç arasında çoğaltım ürünleri elde edildi. Ön çoğaltım ve seçici çoğaltım reaksiyonlarından sonra ürünler agaroz ve poliakrilamid jel elektroforezinde görüntüledi. Poliakrilamid jel elektroforezinde elde edilen bant profili karşılaştırmalarına göre anaçlar arasında, 32 adet seçici primer çifti, polimorfik yapıda bant profili gösterirken, 2 primer çiftinin ise monomorfik yapıda bant profili gösterdiği belirlendi.

Tablo 4.2: Anaçlara ait seçici PZR reaksiyonlarında elde edilen polimorfik bant sayıları ve herbir seçici primer kombinasyonundan elde edilen bant sayısının, bütün seçici primer kombinasyonlarından elde edilen bant sayısına oranının yüzde değerleri

İsimlendirilmesi M/P	Primer kombinasyonu		Polimorfik bant sayısı			%
	<i>Msel</i> - NNN	<i>PstI</i> - NNN	PxH	İxE	SxA	
1B	CCT	GTT	1	3	-	0,96
1C	CCT	GAC	4	5	1	2,40
2B	CAC	GTT	1	3	4	1,92
2C	CAC	GAC	1	2	5	1,92
2D	CAC	TGG	3	2	-	1,20
3A	ACC	CCA	1	2	3	1,44
3B	ACC	GTT	2	3	4	2,16
3C	ACC	GAC	8	5	7	4,80
3D	ACC	TGG	4	4	2	2,40
4A	CCA	CCA	-	-	-	0,00
4B	CCA	GTT	2	4	-	1,44
4C	CCA	GAC	2	4	5	2,64
4D	CCA	TGG	-	3	1	0,96
5A	CAA	CCA	2	5	4	2,64
5B	CAA	GTT	-	4	1	1,20
5C	CAA	GAC	2	9	6	4,08
5D	CAA	TGG	2	4	-	1,44
6A	ACG	CCA	2	2	2	1,44
6B	ACG	GTT	3	1	2	1,44
6C	ACG	GAC	9	10	8	6,47
6D	ACG	TGG	2	7	3	2,88
7B	CGT	GTT	19	15	10	10,55
7C	CGT	GAC	6	10	7	5,52
7D	CGT	TGG	2	-	6	1,92
8B	CGA	GTT	7	8	5	4,80
8C	CGA	GAC	4	8	6	4,32
8D	CGA	TGG	13	8	16	8,87
9A	CAT	CCA	-	-	-	0,00
9B	CAT	GTT	-	3	2	1,20
9C	CAT	GAC	9	6	5	4,80
9D	CAT	TGG	7	4	9	4,80
10B	CAG	GTT	1	3	2	1,44
10C	CAG	GAC	9	3	4	3,84
10D	CAG	TGG	3	4	2	2,16



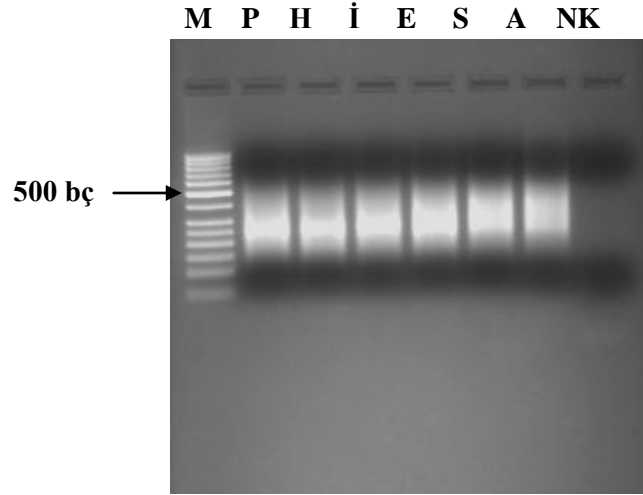
AFLP primer çiftlerinin farklı kombinasyonlara göre (PI178383 x Harmankaya99, İzgi2001 x ES14 ve Sönmez2001 x Aytın98 kombinasyonları) gösterdiği polimorfik bant sayıları ve yüzde değerleri Şekil 4.1 üzerinde gösterildi.



Şekil 4.1: AFLP analizleri sonucu elde edilen farklı anaç kombinasyonlarına (PI178383 x Harmankaya99, İzgi2001 x ES14 ve Sönmez2001 x Aytın98) ait polimorfizm oranları

#### 4.2.1. AFLP Ön Çoğaltım Reaksiyonu Sonuçları

Ön çoğaltım primerleri ile yapılan PZR sonucu elde edilen ürünler agaroz jel (%1.5'luk) elektroforezinde 100-600 bç arasındaki sürüklenme "smear" yapıları gösterdi (Şekil 4.2).



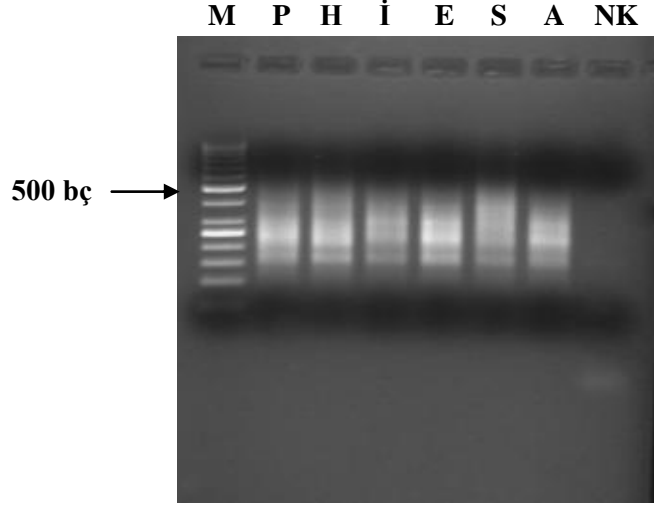
Şekil 4.2: Anaç DNA'lara ait ön çoğaltım ürünlerinin % 1.5'luk agaroz jeldeki görünüşleri

M: 50bç DNA markırı, P: PI178383, H: Harmankaya99, İ: İzgi2001, E: ES14, S: Sönmez2001, A: Aytın98, NK: Negatif Kontrol

#### 4.2.2. AFLP Seçici Çoğaltım Reaksiyonu Sonuçları

Ön çoğaltım reaksiyonu ürünlerinin 1:5 oranında sulandırılıp kalıp olarak kullanılmasıyla 34 adet AFLP primer çifti ile seçici çoğaltım gerçekleştirildi. Reaksiyon ürünleri 50 bç'lik DNA markırı ile birlikte % 1.5'luk agaroz jele yüklendi ve 100-600 bç

arasında “smear” yapısı gözlemlendi. Bu reaksiyon sonucunda gözlenen sürüklenme yapısı için örnek olarak *M-CAT/P-GAC* primer çifti kullanılarak gerçekleştirilen reaksiyon ürünleri örnek olarak verilebilir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3: Anaç DNA'lara ait seçici çoğaltım ürünlerinin % 1.5'lük agaroz jel görünüşleri

M: 500bp DNA markırı, P: P1178383, H: Harmankaya99, İ: İzgi2001, E: ES14, S: Sönmez2001, A: Aytın98, NK: Negatif Kontrol

Kullanılan 34 farklı seçici primer kombinasyonundan elde edilen seçici reaksiyon ürünleri, polimorfik özellikte olanların ayırımının yapılmasını sağlamak amacıyla poliakrilamid jele (%6) yüklendi. Poliakrilamid jele yüklenen 34 AFLP primer çiftinden *M-CCA/P-CCA* (4A) ve *M-CAT/P-CCA* (9A) kombinasyonları anaçlarda monomorfik bant profili gösterdi.

### 4.3. BUĞDAYDA AFLP SEÇİCİ PRİMER ÇİFTLERİ KULLANILARAK GERÇEKLEŞTİRİLEN “BULK SEGREGASYON ANALİZLERİ”

Anaçlara ait DNA'lar kullanılarak gerçekleştirilen PZR analizleri sonucu farklı kombinasyonlarda polimorfik bant profili gösteren AFLP primer çiftleri ile BSA (“Bulk Segregasyon Analizleri”) gerçekleştirildi. Bu amaçla, polimorfik P1178383 x Harmankaya99, İzgi2001 x ES14 ve Sönmez2001 x Aytın98 kombinasyonlarına ait fide dönemi dayanıklı/hassas ve ergin dönem dayanıklı/hassas F<sub>2</sub> karışımlarında PZR analizleri gerçekleştirildi.

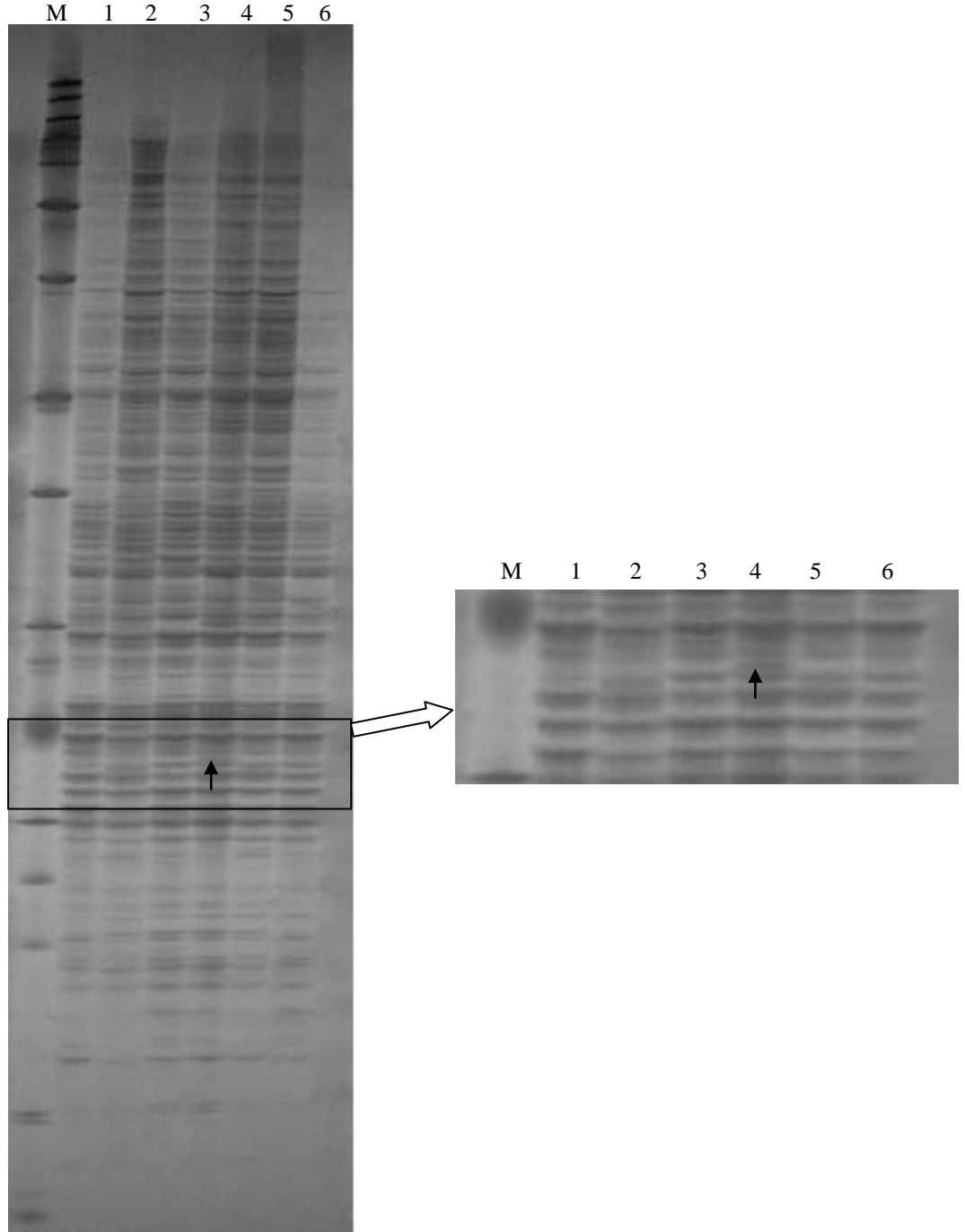
PZR sonucunda polimorfik bant yapıları görülse de bu polimorfik bantların hepsi markır niteliği taşımamaktadır. Polimorfik bir bant profilinin markır niteliği taşıması için,

çoğaltımdan sonra elde edilen ürünlerde dayanıklı anaç ve dayanıklı F<sub>2</sub> “bulk”da bulunan, hassas anaç ve hassas F<sub>2</sub> “bulk”da bulunmayan veya hassas anaç ve hassas F<sub>2</sub> “bulk”da bulunan, dayanıklı anaç ve dayanıklı F<sub>2</sub> “bulk”da bulunmayan bir bant profili gözlemlenmelidir. Ayrıca, polimorfik yapıda olan bandın markır niteliği taşıyıp taşımadığının saptanabilmesi için, F<sub>2</sub> karışımlarında görülen bu bant yapısının bulk karışımlarını oluşturan F<sub>2</sub> bireylerinin de çoğunluğunda gözlemlenmesi gerekmektedir.

Bu nedenle polimorfik olarak seçilen PI178383 x Harmankaya99 kombinasyonuna ait 15 adet, İzgi2001 x ES14 kombinasyonuna ait 15 adet ve Sönmez2001 x Aytn98 kombinasyonuna ait 14 adet AFLP primer kullanılarak BSA yapıldı.

Bulk Segregasyon Analizleri sonucunda *M-ACG/P-GAC* (6C) primer kombinasyonu dışındaki kombinasyonlar, anaçlar arasında polimorfizm göstermelerine karşılık, fide dönemi dayanıklı/hassas ve ergin dönem dayanıklı/hassas F<sub>2</sub> karışımlarında bu bantlar açısından polimorfizm göstermediği saptandı. Sadece anaçlar arasında polimorfik olan bu bant profilleri markır niteliği taşımamaktadır. Şekil 4.4 de markır niteliği taşımayan polimorfik yapıdaki bant profiline örnek olarak *M-CAT/P-GAC* (9C) primer çifti ile Sönmez2001 x Aytn98 kombinasyonunda gerçekleştirilen PZR ürünleri verilmektedir.

SELEKTİF 9C Sönmez2001 x Aytın98  
KOMBİNASYONU

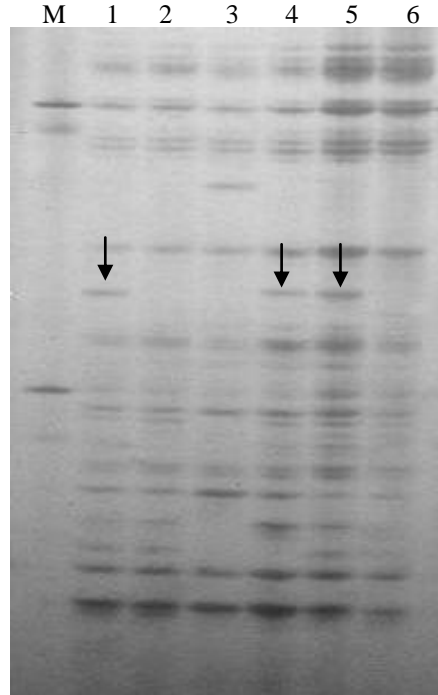


Şekil 4.4: Sönmez2001 x Aytın98 kombinasyonunda *M-CAT/P-GAC* (9C) primeri kullanılarak gerçekleştirilen Bulk Segregasyon Analizi

M: 50bp DNA markır, 1: Ergin dönem dayanıklılığı için Sönmez2001 x Aytın98 dayanıklı F<sub>2</sub> DNA karışımı (dayanıklı "bulk"), 2: Ergin dönem dayanıklılığı için Sönmez2001 x Aytın98 hassas F<sub>2</sub> DNA karışımı (hassas "bulk"), 3: Aytın98, 4: Sönmez2001, 5: Fide dönemi dayanıklılığı için Sönmez2001 x Aytın98 dayanıklı F<sub>2</sub> DNA karışımı (dayanıklı "bulk"), 6: Fide dönemi dayanıklılığı için Sönmez2001 x Aytın98 hassas F<sub>2</sub> DNA karışımı (hassas "bulk").

Şekil 4.4 de 4 numaralı örnek olan dayanıklı anaç Sönmez2001’de ok ile gösterilen polimorfik bir bant gözlemlenirken; bu bant, 3 numaralı örnek olan hassas anaç Aytın98’de gözlemlenmedi. Anaçlar arasında gözlenen bu polimorfizme karşılık, fide dönemi ve ergin dönem dayanıklı ve hassas F<sub>2</sub> karışımlarında bu polimorfizm elde edilmedi. Bu nedenle, anaçlar arasında polimorfik olan bu bant profili markır niteliği taşımamaktadır.

İzgi2001 x ES14 kombinasyonu kullanılarak yapılan “Bulk Segregasyon” analizlerinde *M-ACG/P-GAC* primer kombinasyonu yukarıda da belirtildiği gibi polimorfizm gösterdi. Hem fide, hem de ergin dönem materyalinde, dayanıklı anaç ve dayanıklı F<sub>2</sub> DNA karışımlarında ortak olan, hassas anaç ve hassas F<sub>2</sub> DNA karışımlarında bulunmayan bant yapısı gösterdi. Bu bant profilinin varlığı, dayanıklı ve hassas F<sub>2</sub> DNA karışımlarını oluşturan fide dönemi ve ergin döneme ait tüm bireylerde incelendi. Dayanıklı bireylerde görülüp hassas bireylerde görülmeyen bu bant profilinin sarı pas dayanıklılığı ile genetik olarak bağlantı gösteren bir moleküler markır olarak nitelendirilebileceği düşünüldü.

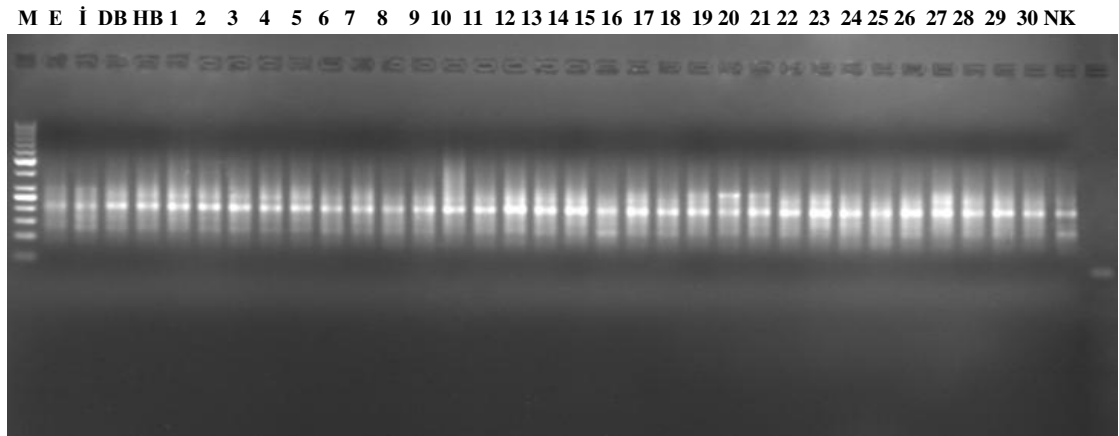


Şekil 4.5:İzgi2001 x ES14 kombinasyonunda *M-ACG/P-GAC* 6C primer çifti kullanılarak gerçekleştirilen Bulk Segregasyon Analizi

M- 50bç DNA markır, 1: Ergin dönem dayanıklılığı için İzgi2001 x ES14 dayanıklı F<sub>2</sub> DNA karışımı (dayanıklı “bulk”), 2: Ergin dönem dayanıklılığı için İzgi2001 x ES14 hassas F<sub>2</sub> DNA karışımı (hassas “bulk”), 3: ES14, 4: İzgi2001, 5: Fide dönemi dayanıklılığı için İzgi2001 x ES14 dayanıklı F<sub>2</sub> DNA karışımı (dayanıklı “bulk”), 6: Fide dönemi dayanıklılığı için İzgi2001 x ES14 hassas F<sub>2</sub> DNA karışımı (hassas “bulk”)

Şekil 4.5 de 3 numaralı örnek hassas anaç ES14'e, 4 numaralı örnek ise dayanıklı anaç İzgi2001'e aittir. Dayanıklı anaç İzgi2001'de, hassas anaç ES14 genotipinde bulunmayan yaklaşık boyutu 170 bç olan bir bant elde edildi. 170 bç büyüklüğündeki bu bant İzgi2001 ve ES14 çaprazından elde edilen fide dönemi ve ergin döneme ait dayanıklı F<sub>2</sub> DNA karışımlarında görülürken (1 ve 5 numaralı örnekler), fide dönemine ve ergin döneme ait hassas F<sub>2</sub> DNA karışımlarında (2 ve 6 numaralı örnekler) görülmediği için bu polimorfizmin markır niteliği taşıyabilir nitelikte olduğu sonucuna varıldı.

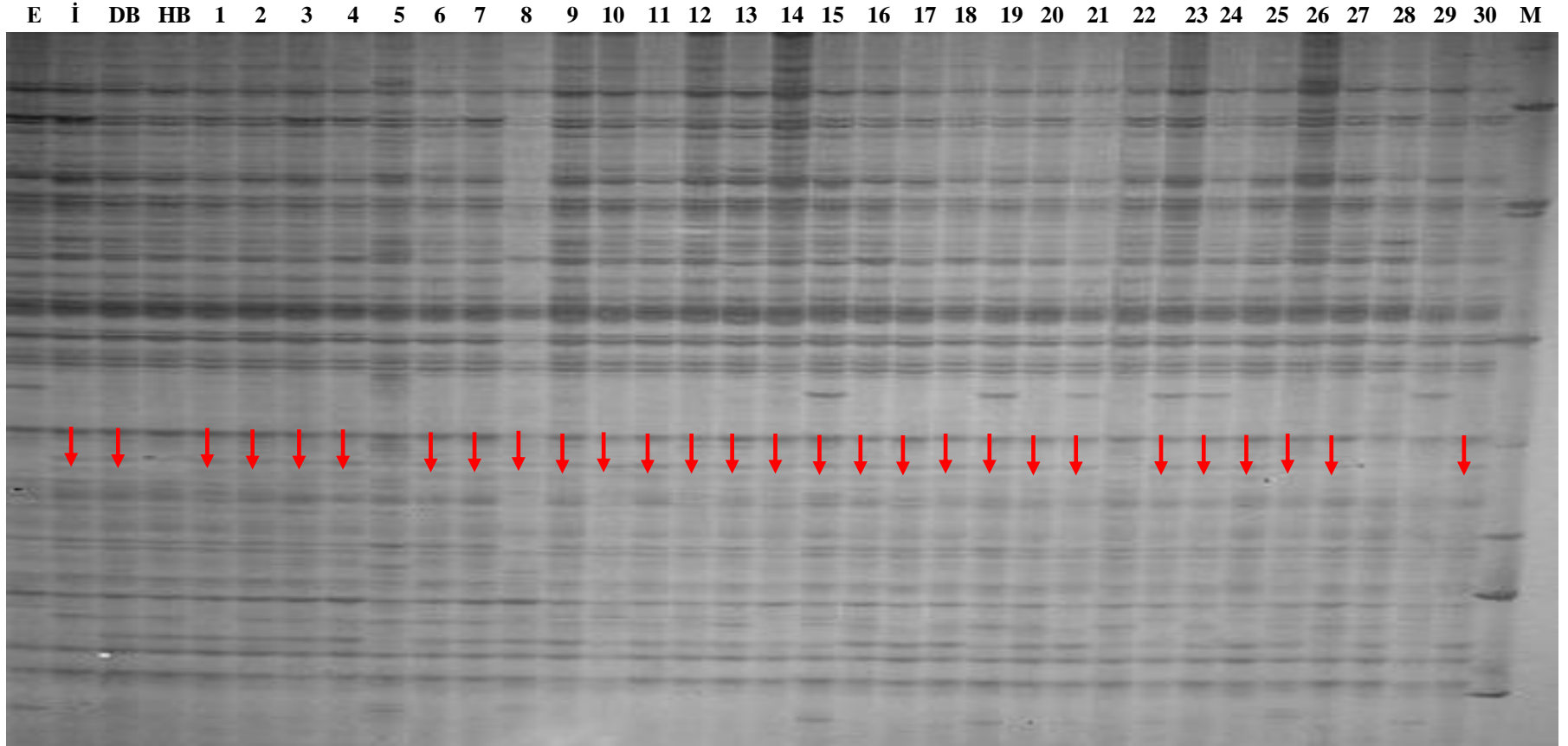
Markır adayı olarak belirlenen *M-ACG/P-GAC* (6C) primer çifti ile elde edilen 170 bç büyüklüğündeki bant yapısı, fide dönemi ve ergin döneme ait dayanıklı F<sub>2</sub> karışımlarında ve bu karışımları oluşturan F<sub>2</sub> bireylerinde bulunurken, bu bandın fide dönemi ve ergin döneme ait hassas F<sub>2</sub> karışımlarında ve bu karışımları oluşturan F<sub>2</sub> bireylerinde bulunmaması gerekmektedir. Bu amaçla ergin dönem ve fide dönemine ait 30'ar adet dayanıklı ve hassas F<sub>2</sub> bireyinde aynı seçici primer kombinasyonu kullanılarak aynı PZR koşullarında anaçlar ve "bulk"lar ile birlikte reaksiyon gerçekleştirildi. Bulkları oluşturan F<sub>2</sub> bireylerinde gerçekleştirilen seçici çoğaltım ürünlerinin agaroz jel görünümüne örnek olarak, İzgi2001 x ES14 kombinasyonuna ait anaçlar ve fide dönemi dayanıklı F<sub>2</sub> DNA karışımını oluşturan 30 adet F<sub>2</sub> bireyinde *M-ACG/P-GAC* primer çifti kullanılarak gerçekleştirilen reaksiyon verilebilir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6: İzgi2001 x ES14 kombinasyonuna ait fide dönemi dayanıklı F<sub>2</sub> materyalinin *M-ACG/P-GAC* (6C) primer kombinasyonu kullanılarak gerçekleştirilen Bulk Segregasyon Analizi

M-50bç DNA markır, E: ES14, İ: İzgi2001, DB: Fide dönemi dayanıklı F<sub>2</sub> DNA karışımı, HB: Fide dönemi hassas F<sub>2</sub> DNA karışımı, 1- 30: Fide dönemi dayanıklı F<sub>2</sub> DNA karışımını oluşturan bireyler, NK: Negatif kontrol

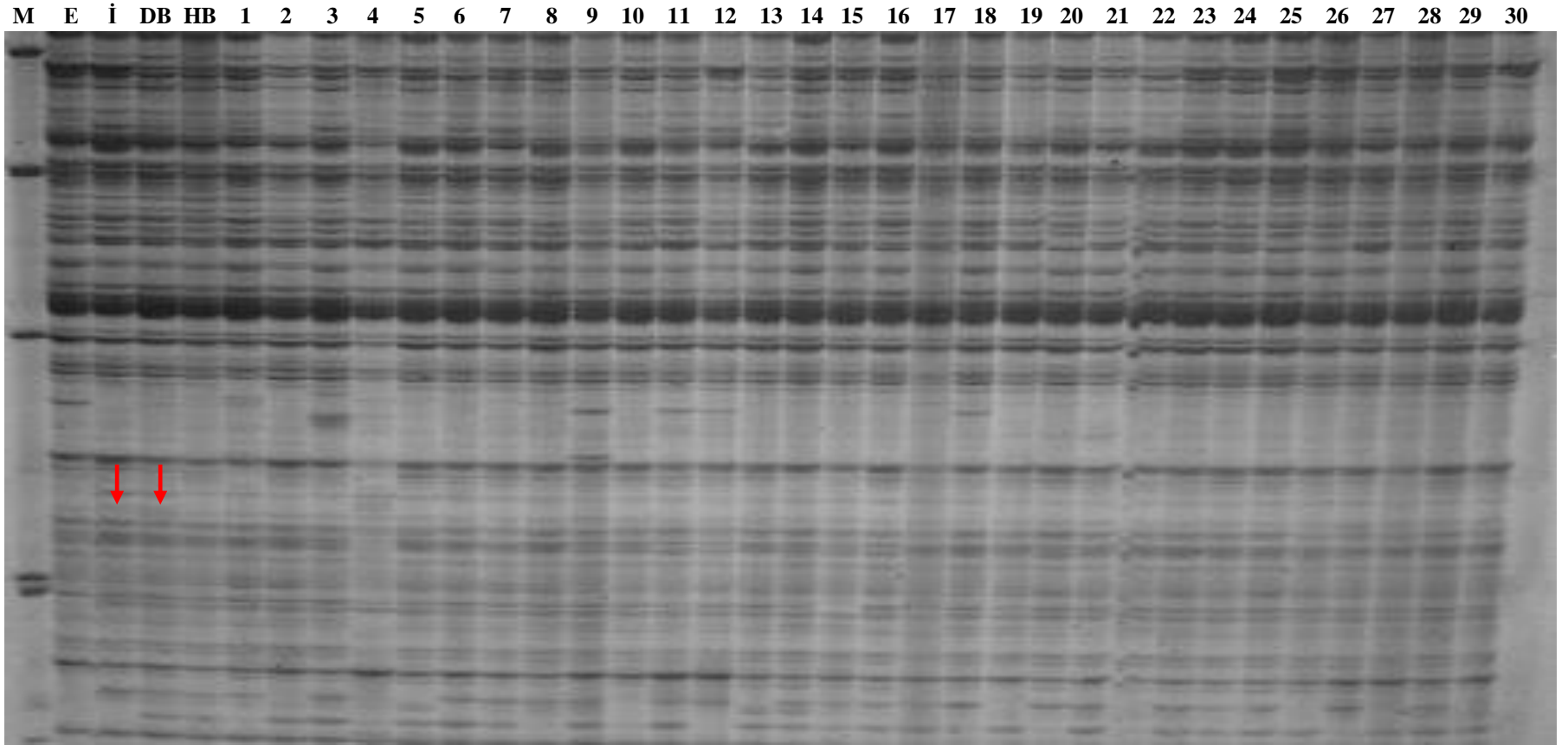
Fide dönemi ve ergin döneme ait dayanıklı ve hassas F<sub>2</sub> DNA karışımını oluşturan tüm bireyler, anaçlar, dayanıklı ve hassas F<sub>2</sub> DNA karışımları *M-ACG/P-GAC (6C)* primer kombinasyonu ile çoğaltılarak reaksiyon ürünleri %6'luk poliakrilamid jele yüklendi (Şekil 4.7, 4.8, 4.9, 4.10).



Şekil 4.7: İzgi2001 x ES14 kombinasyonuna ait ergin dönem dayanıklı  $F_2$  materyalinin *M-ACG/P-GAC* (6C) primer kombinasyonu kullanılarak gerçekleştirilen Bulk Segregasyon Analizi

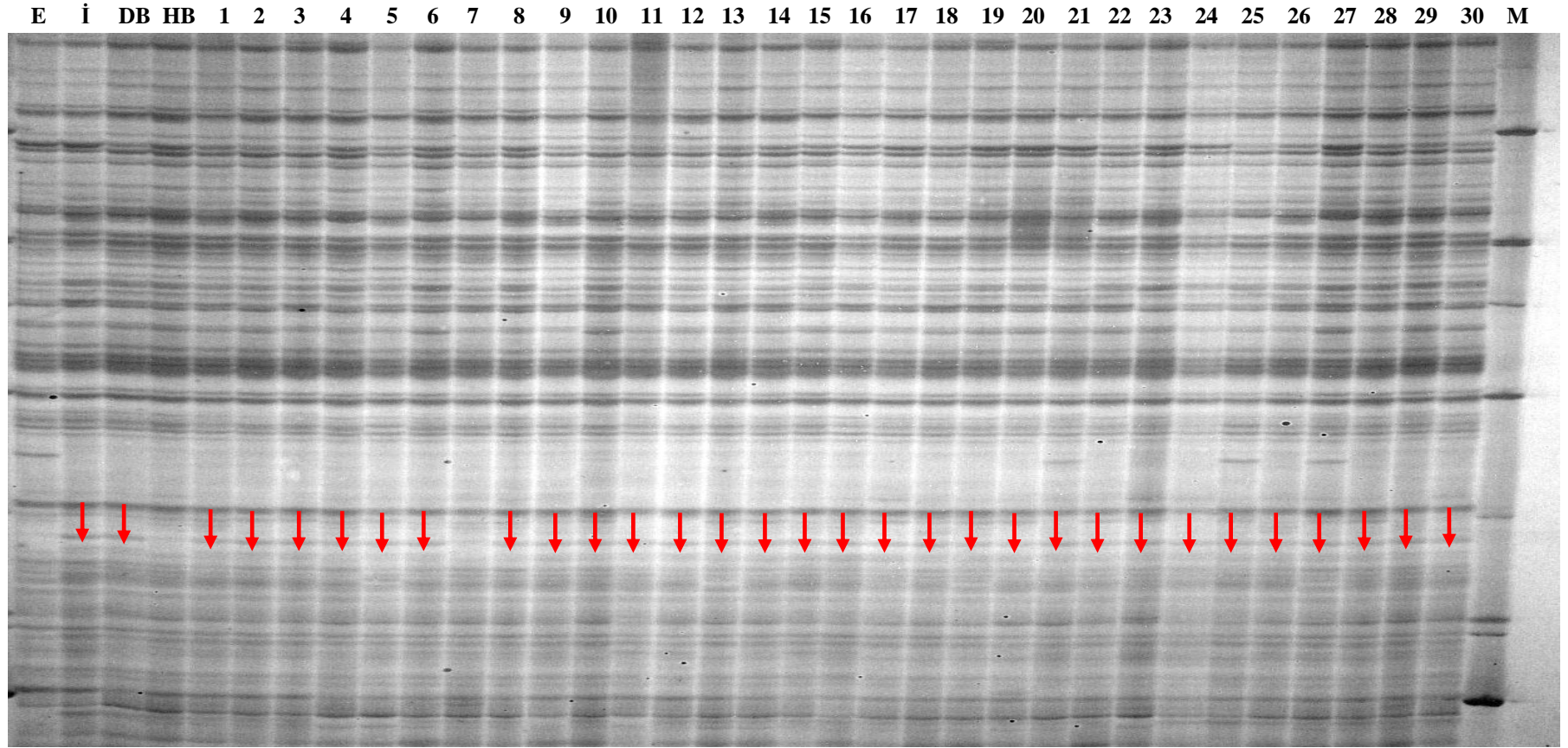
M: 50bp DNA markır,E: ES14, İ: İzgi2001, DB: Ergin dönem dayanıklı  $F_2$  DNA karışımı, HB: Ergin dönem hassas  $F_2$  DNA karışımı, 1- 30: Ergin dönem dayanıklı  $F_2$  DNA karışımını oluşturan bireyler. Oklar polimorfik yapıdaki bantları işaret etmektedir.





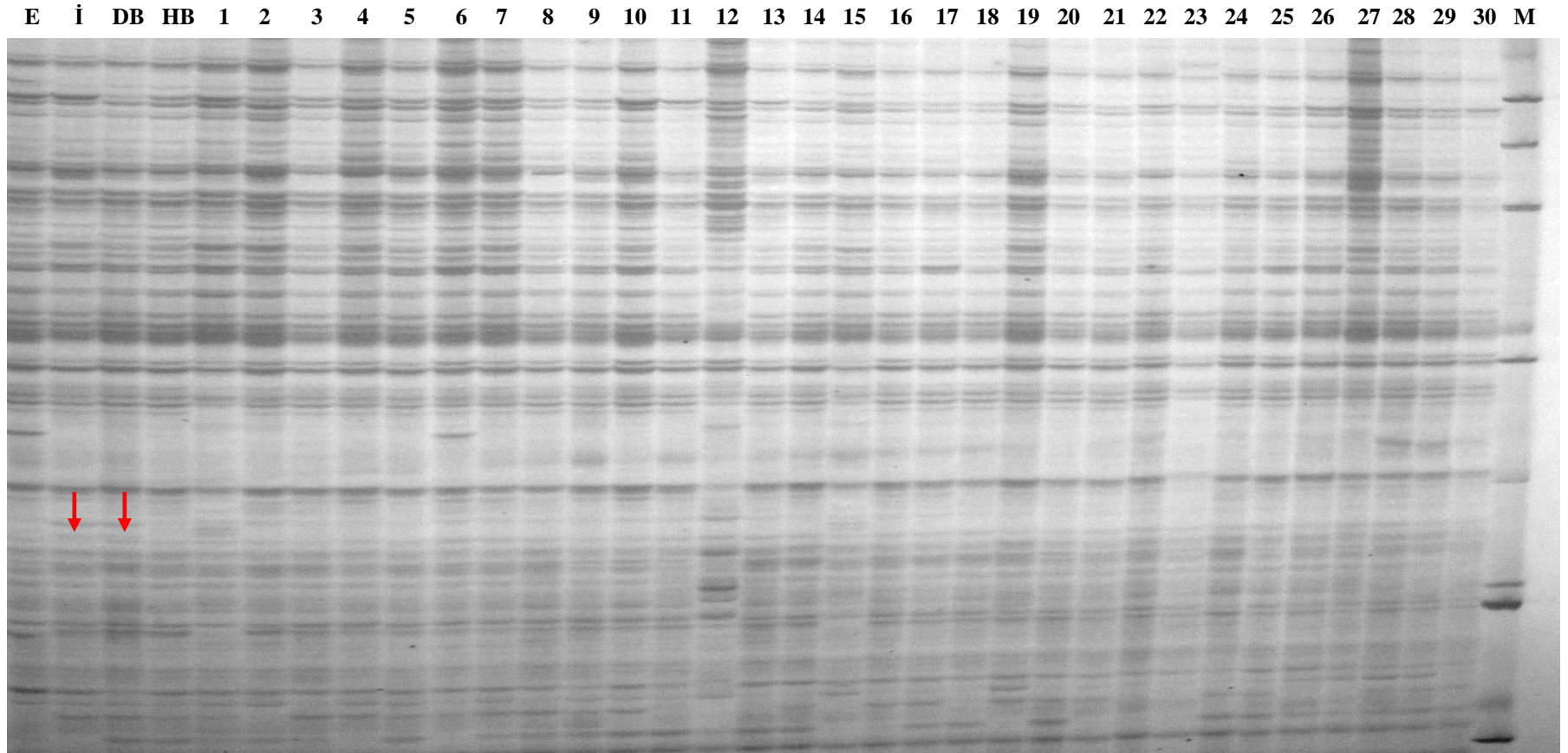
Şekil 4.8: İzgi2001 x ES14 kombinasyonuna ait ergin dönem hassas  $F_2$  materyalinin *M-ACG/P-GAC* (6C) primer kombinasyonu kullanılarak gerçekleştirilen Bulk Segregasyon Analizi

M: 50bp DNA markır, E: ES14, İ: İzgi2001, DB: Ergin dönem dayanıklı  $F_2$  DNA karışımı, HB: Ergin dönem hassas  $F_2$  DNA karışımı, 1- 30: Ergin dönem hassas  $F_2$  DNA karışımını oluşturan bireyler. Oklar polimorfik yapıdaki bantları işaret etmektedir.



Şekil 4.9: İzgi2001 x ES14 kombinasyonuna ait fide dönemi dayanıklı  $F_2$  materyalinin *M*-ACG/*P*-GAC (6C) primer kombinasyonu kullanılarak gerçekleştirilen Bulk Segregasyon Analizi

M: 50bp DNA markır, E: ES14, İ: İzgi2001, DB: Fide dönemi dayanıklı  $F_2$  DNA karışımı, HB: Fide dönemi hassas  $F_2$  DNA karışımı, 1- 30: Fide dönemi dayanıklı  $F_2$  DNA karışımını oluşturan bireyler. Oklar polimorfik yapıdaki bantları işaret etmektedir.



Şekil 4.10: İzgi2001 x ES14 kombinasyonuna ait fide dönemi hassas  $F_2$  materyalinin *M-ACG/P-GAC* (6C) primer kombinasyonu kullanılarak gerçekleştirilen Bulk Segregasyon Analizi

M: 50bç DNA markır, E: ES14, İ: İzgi2001, DB: Fide dönemi dayanıklı  $F_2$  DNA karışımı, HB: Fide dönemi hassas  $F_2$  DNA karışımı, 1- 30: Fide dönemi hassas  $F_2$  DNA karışımını oluşturan bireyler. Oklar polimorfik yapıdaki bantları işaret etmektedir.

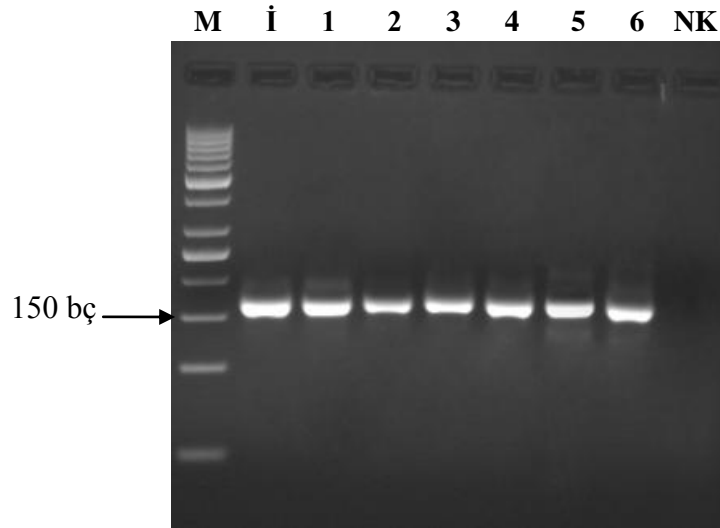
Şekil 4.7, 4.8, 4.9, 4.10 da İzgi2001 ve İzgi2001x ES14 dayanıklı F<sub>2</sub> DNA karışımlarında 170 bç büyüklüğünde bir bant görülürken, ES14 ve İzgi2001 x ES14 hassas F<sub>2</sub> DNA karışımlarında ise bu bant gözlenmedi. 170 bç büyüklüğündeki PZR ürünü, ergin dönem dayanıklı F<sub>2</sub> DNA karışımını oluşturan 30 adet F<sub>2</sub> bireyin 26'sında, fide dönemi dayanıklı F<sub>2</sub> DNA karışımını oluşturan 30 adet F<sub>2</sub> bireyin ise 29'unda gözlemlendi. Bununla birlikte ergin dönem ve fide dönemi hassas F<sub>2</sub> DNA karışımını oluşturan 30 adet F<sub>2</sub> bireyinin hiçbirinde bu bant yapısı gözlemlenmedi.

#### 4.4. AFLP MARKIRININ POLİAKRİLAMİD JELDEN GERİ KAZANIMI VE DNA DİZİ ANALİZİ SONUÇLARI

Bu tez çalışmasında, poliakrilamid jelden kesilerek elde edilen AFLP markır bandı, pGEM-T Easy vektör I sistemine klonlandı ve GeXP GenomeLab Genetik Analiz Sistemi (Beckman Coulter) kullanılarak dizi bilgisi elde edildi.

##### 4.4.1. AFLP Markırının Poliakrilamid Jelden Geri Kazanım Çalışmaları

Poliakrilamid jelden kesildikten sonra miktarlarının artırılması amacıyla tekrar aynı seçici PZR koşullarında çoğaltımı yapılan örnekler% 2.5'luk agaroz jele 50 bç'lik markır ile yüklenerek boyutları kontrol edildi (Şekil 4.11).



Şekil 4.11: Poliakrilamid jelden geri kazanım PZR'si yapılan 6C kombinasyonuna ait örneklerin % 2.5'luk agaroz jel görünüşleri

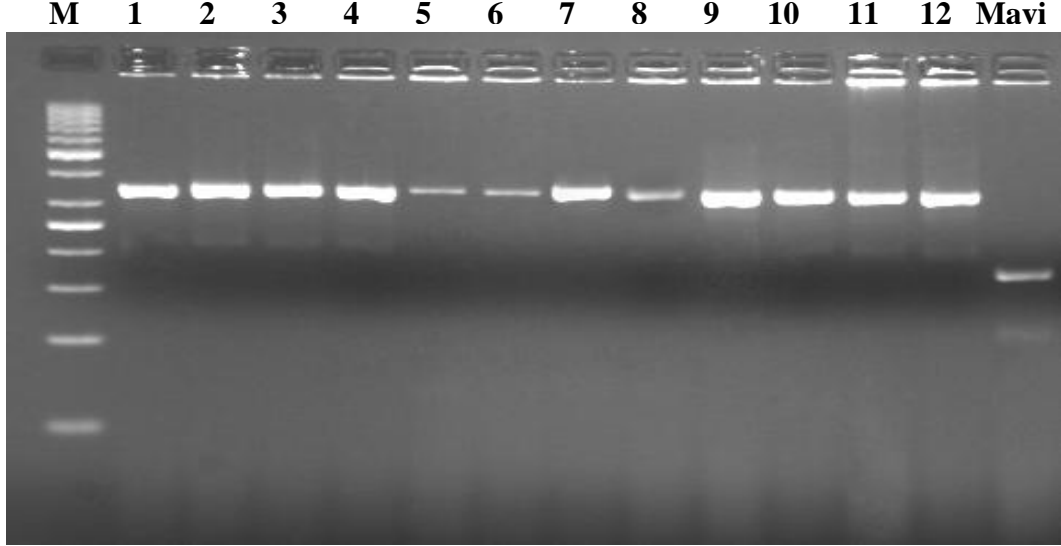
M: 50bç DNA markır, İ: İzgi2001, 1-6: Dayanıklı F<sub>2</sub> bireyleri, NK: Negatif kontrol

PZR ürünleri agaroz jelden kesilerek saflaştırıldı ve klonlama çalışmalarında kalıp olarak kullanıldı.

#### 4.4.2. AFLP Markırı Klonlanma Çalışmaları

Agaroz jelde saflaştırılmış PZR ürünleri, DNA dizi analizi reaksiyonları gerçekleştirilmeden önce vektör (plazmid) DNA'sına aktarıldı.

Klonlanan ve ardından bakteriye aktarılan plazmidlerin içerisinde ilgilenilen bandı taşıyan pozitif klonlar (beyaz koloniler) seçildi. Doğru boyuttaki bandı taşıyan plazmidi daha kesin bir biçimde ayırabilmek amacıyla 6 adet beyaz koloni seçilerek koloni PZR'lerinde kalıp DNA kaynağı olarak kullanıldı. Koloni PZR'nin doğru bir şekilde çalışıp çalışmadığını kontrol etmek için, 1 adet mavi renkli koloni kullanılarak PZR sonucunda, yaklaşık boyutu 150 bp civarında bir ürünün varlığı kontrol edildi. Klonlama vektörü üzerinde bulunan T7/Sp6 bölgelerine özgü primerler kullanılarak yapılan koloni PZR ürünleri (Şekil 4.12) %2.5'lük agaroz jele 50 bp'lik markır ile birlikte yüklendi.

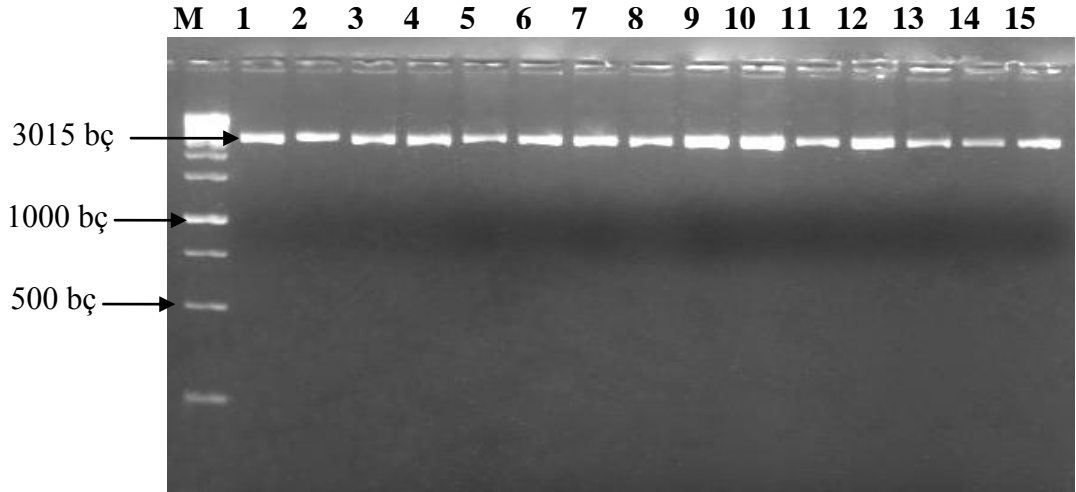


Şekil 4.12: T7/SP6 primerleri ile gerçekleştirilen koloni PZR sonuçlarının % 2.5'lük agaroz jeldeki görünüşleri

M: 50bp DNA markır, 1-6, 7-12: koloni PZR sonrası 2 farklı örneğe ait çoğaltım ürünleri, Mavi: Mavi koloni

Dizi analizi reaksiyonlarına geçilmeden önce, beyaz kolonilere ait bakterilerden plazmid izolasyonları yapıldı. İzole edilen plazmidlerin konsantrasyonları Nanodrop ND1000 cihazında ölçüldükten sonra, saflıklarının kontrolü için %1'lik agaroz jele eşit miktarlarda olacak şekilde (~300 ng) 1 kb'lik markır ile birlikte yüklendi (Şekil 4.13).



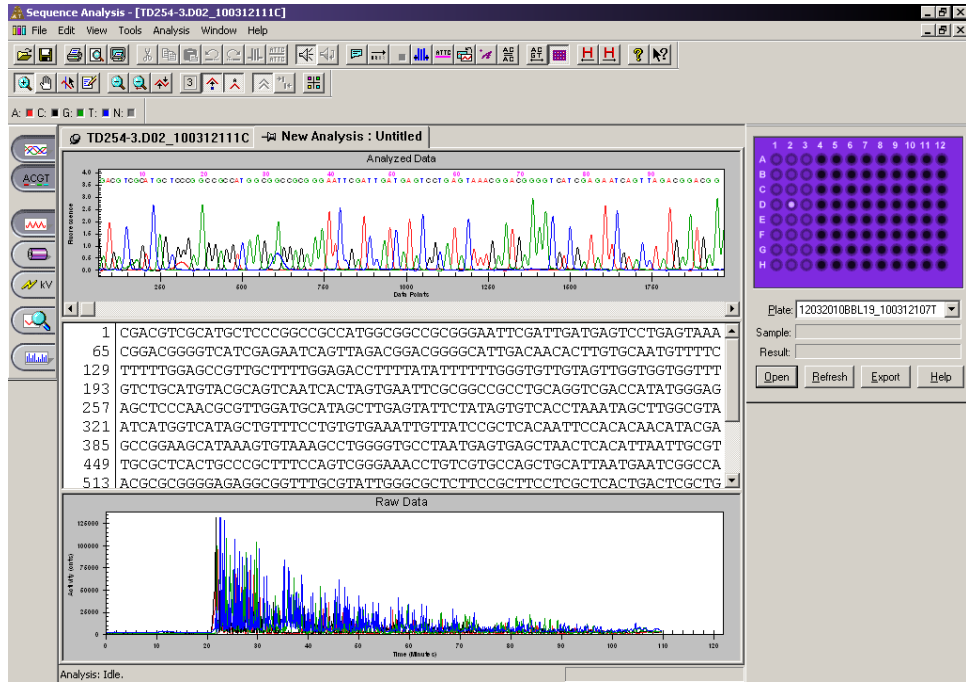


Şekil 4.13: Plazmid DNA'larının % 1'lik agaroz jeldeki görünüşleri.

M: 1 kb DNA markır, 1-15 beyaz kolonilerden izole edilen plazmid DNA'ları

#### 4.4.3. DNA Dizi Analizi Çalışmaları

Poliakrilamid jellerin değerlendirilmesi ve polimorfik bantların klonlama çalışmalarından sonra DNA dizi analizi reaksiyonları gerçekleştirildi. Dizileme reaksiyon ürünlerinin GeXP GenomeLab Genetik Analiz sistemine yüklenmesinden sonra nukleotidlere ait floresan sinyallerin pik görünüşleri ve baz sıraları, dizileme cihazına bağlı monitörde görüntülendi (Şekil 4.14).



Şekil 4.14: DNA dizi analizi sonuçlarının değerlendirilmesinde kullanılan GeXP GenomeLab Genetik Analiz sistemine ait program ana sayfası

DNA dizi analizi verileri NCBI’da (“National Center for Biotechnology Information”- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) bulunan “VecScreen” programı kullanılarak, klonlama vektörüne ait dizi bilgisi çıkarıldı. Tablo 4.3, 4.4, 4.5 deki gri bölgeler klonlama vektörüne ait dizileri, sarı ile boyanmış bölgeler ise AFLP yönteminde kullanılan adaptör dizilerini göstermek üzere işaretlendi. İki adaptör dizi arasındaki bölgeler, AFLP reaksiyonlarında kalıp olarak kullanılan örneklerden elde edilen polimorfik DNA’ya özgü nükleotid dizi bilgisini göstermektedir. DNA dizi analizi sonuçlarının daha doğru bir şekilde yorumlanabilmesi amacıyla, 5’er adet İzgi2001, İzgi2001 x ES14 kombinasyonu ergin dönem dayanıklı F<sub>2</sub> bireyi ve fide dönemi dayanıklı F<sub>2</sub> bireyi seçilerek klonlama çalışmalarında kullanıldı. Ayrıca seçilen bu örneklere ait 3 farklı beyaz koloni kullanılarak DNA dizi analizi reaksiyonu gerçekleştirildi.

Tablo 4.3: DNA dizi analizi sonucu elde edilen İzgi2001’e ait 5 farklı koloninin 5’-3’ yönündeki nükleotid dizi bilgileri

Gri ile işaretlenmiş bölgeler, “pGEM-T Easy” klonlama vektörüne ait bölgeleri, sarı ile işaretlenmiş bölgeler adaptör dizilerini, beyaz bölgeler ise örnek DNA’sına ait nükleotid dizilerini göstermektedir.

Örnek Adı	DNA Dizi Analizi Sonucu Elde Edilen Diziler
İzgi2001 1	GGAATTTCGATTGACTGCGTACATGCA GACAAACACAATTTAGACTATA GTAAGGTACACGTGCATTGCACGCATGAGATTTGGCAACCAAATTATG AATAAATACCACATTATAGCATGCAAGCCTTGAGTCATATATGCATGA TGATAGATGTTTCGTTTACTCAGGACTCATCAATCACTAGTG
İzgi2001 2	GGAATTTCGATTGATGAGTCCTGAGTA AACGTGGAATGATGGCAATGGT AAGTCTGATTTTAGGGCTACTTTATTGAAAACCAGTATGTTAGTAATTC TTTTCTTGGAGTACGAAAGTTGAAATTCGGAATGATGGCAACGGTAAG TATCCGTCATGTC TGCATGTACGCAGTCAATCACTAGTG
İzgi2001 3	GGAATTTCGATTGATGAGTCCTGAGTA AACGGACGGGGCCATCGAGAA TCAGTTAGACGGACGGGGCATTGACAACACTTGTGCAATGTTTTCTTT TTGGAGCCGTTGCTTTTGGAGACCTTTTATATTTTTTGGGTGTTGTAGT TGGTGGTGGTTTGTCTGCATGTACGCAGTCAATCACTAGTG
İzgi2001 4	GGAATTTCGATTGATGAGCCCTGAGTA AACGGACGGGGCCATCGAGAA TCAGTTAGACGGACGGGGCATTGACAACACTTGTGCAATGTTTCCTTT TTGGAGCCGTTGCTTTTGGAGACCTTTTATATTTTTTGGGTGTTGTAGT TGGTGGTGGTTTGTCTGCATGTACGCAGTCAATCACTAGTG
İzgi2001 5	GGAATTTCGATTGATGAGTCCTGAGTA AACGTGGAATGATGGCAATGGT AAGTCTGATTTTAGGGCTACTTTATTGAAAACCAGTATGTTAGTAATTC TTTTCTTGGAGTACGAAAGTTGAAATTCGGAATGATGGCAACGGTAAG TATCCGTCATGTC TGCATGTACGCAGTCAATCACTAGTG

Tablo 4.4: DNA dizi analizi sonucu elde edilen İzgi2001 x ES14 kombinasyonu ergin dönem dayanıklı F<sub>2</sub> bireylerine ait 5'-3' yönündeki nükleotid dizi bilgileri

Gri ile işaretlenmiş bölgeler, "pGEM-T Easy" klonlama vektörüne ait bölgeleri, sarı ile işaretlenmiş bölgeler adaptör dizilerini, beyaz bölgeler ise örnek DNA'sına ait nükleotid dizilerini göstermektedir. Her bir birey için 3 farklı koloni incelenerek DNA dizi analizi sonuçları verilmiştir.

1 numaralı F <sub>2</sub> birey -1	GGAATTCGATTGATGAGTCCTGAGTA AACGGACGGGGCCATCGAGAA TCAGTTAGACGGACGGGGCATTGACAACACTTGTGCAATGTTTTCTTT TTGGAGCCGTTGCTTTTGGAGACCTTTTATATTTTTTGGGTGTTGTAGA TGGTGGTGGTTTGTC TGCATGTACGCAGTC AATCACTAGTG
1 numaralı F <sub>2</sub> birey -2	GGAATTCGATTGATGAGTCCTGAGTA AACGGACGGGGCCATGAGAAT CAGTTAGACGGACGGGGCATTGACATCACTTGTGCAATGTTTTCTTTTT GGAGCCGTTGCTTTTGGAGACCTTTTATATTTTTCTGGGTGTTGTAGTTG GTGGTGGTTTGTC TGCATGTACGCAGTC AATCACTAGTG
1 numaralı F <sub>2</sub> birey -3	GGAATTCGATTGACTGCGTACATGCA GACAAACCACCACCAACTACA ACACCCAAAAAATATAAAAGGTCTCCAAAAGCAACGGCTCCAAAAAG AAAACATTGCACAAGTGTGTGTCAGTGCCCCGTCCGTCTAACTCGATTC TCGCCATGGCCCCGTCCGTT TACTCAGGACTCATC AATCACCTAGTG
7 numaralı F <sub>2</sub> birey -1	GAATTCGATTGACTGCGTACATGCA GACAACACCAGATTGTTATTCAG CCGAGGGTTCGGAAAATATACCCGTCACCAACTCGGAAGTGGAGAGC GCCATGAATCATCGGCACTATGAGGCTGTCTTACGAGACCCTCAGTTT TCGGAGGAGGCGTT TACTCAGGACTCATC AATCACTAGTG
7 numaralı F <sub>2</sub> birey -2	GGAATTCGATTGATGAGTCCTGAGTA AACGGACGGGGCCATCGAGAA TCAGTTAGACGGACAGGGCATTGACAACACTTGTGCAATGTTTTCTTT TTGGAGCCGTTGCTTTTGGAGACCTTTTATATTTTTTGGGTGTTGTAGT TGGTGGTGGTTTGTC TGCATGTACGCAGTC AATCACTAGTG
7 numaralı F <sub>2</sub> birey -3	GGAATTCGATTGATGAGTCCTGAGTA AACGTGGAATGATGGCAATGGT AAGTCTGATTTTAGGGCTACTTTATTGAAAACCAGTATGTTAGTAATTC TTTTCTTGGAGTACGAAAGTTAAAATTCGGAATGATGGCAACGGTAGG TATCCGTCATGTC TGCATGTACGCAGTC AATCACTAGTG
11 numaralı F <sub>2</sub> birey -1	GGAATTCGATTGATGAGTCCTGAGTA AACGGACGGGGTTCATCGAGAA TCAGTTAGACGGACGGGGCATTGACAACACTTGTGCAATGTTTTCTTT TTGGAGCCGTTGCTTTTGGAGACCTTTTATATTTTTTGGGTGTTGTAGT TGGTGGTGGTTTGTC TGCATGTACGCAGTC AATCACTAGTG
11 numaralı F <sub>2</sub> birey -2	GGAATTCGATTGATGAGTCCTGAGTA AACGGACGGGGCTATCGAGAA TCAGTTAGACGGACGGGGCATTGACAACACTTGTGCAATGTTTTCTTT TTGGAGCCGTTGCTTTTGGAGACCTTTTATATTTTTTGGGTGTTGTAGT TGGTGGTGGTTTGTC TGCATGTACGCAGTC AATCACTAGTG



Tablo 4.4 ün devamı.

11 numaralı F <sub>2</sub> birey -3	GGAATTTCGATTGATGAGTCCTGAGTA AACGGACGGGGCCATCAGGAA TCAGTTAGACGGACGGGGCATTGACAACACTTGTGCAATGTTTTCTTT TTGGAGCCGTTGCTTTTGGAGACCTTTTATATTTTTTGGGTGTTGTAGT TGGTGGTGGTTTGTC TGCAT TGT TACC CAGTC AATCACTAGTG
13 numaralı F <sub>2</sub> birey -1	GGAATTTCGATTGATGAGTCCTGAGTA AACGTGGAATGATGGCAATGGT AAGTCTGATTTTAGGGCTACTTTATTGAAAACCAGTATGTTAGTAATTC TTTTCTTGGAGTACGACAGTTGAAATTCGGAATGATGGCAACGGTAAG TATCCGTCATGTC TGCATGTACGCAGTC AATCACTAGTG
13 numaralı F <sub>2</sub> birey -2	GGAATTTCGATTGATGAGTCCTGAGTA AACGGACGGGGTCATCGAGAA TCAGTTAGACGGACGGGGCATTGACAACACTTGTGCAATGTTTTCTTT TTGGAGCCGTTGCTTTTGGAGACCTTTTATATTTTTTGGGTGTTGTAGT TGGTGGTGGTTTGTC TGCATGTACGCAGTC AATCACTAGTG
13 numaralı F <sub>2</sub> birey -3	GGAATTTCGATTGATGAGTCCTGAGTA AACGGACGGGGCCATCGAGAA TCAGTTAGACGGACGGGGCATTGACAACACTTGTGCAATGTTTTCTTT TTGGAGCCGTTGCTTTTGGAGACCTTTTATATTTTTTGGGTGTTGTAGT TGGTGGTGGTTTGTC TGCATGTACGCAGTC AATCACTAGTG
17 numaralı F <sub>2</sub> birey -1	GGAATTTCGATTGATGAGTCCTGAGTA AACGGACGGGGCCATCGAGAA TCAGTTAGACGGACGGGGCATTGACAACACTTGTGCAATGTTTTCTTT TTGGAGCCGTTGCTTTTGGAGACCTTTTATATTTTTTGGGTGTTGTAGT TGGTGGTGGTTTGTC TGCATGTACGCAGTC AATCACTAGTG
17 numaralı F <sub>2</sub> birey -2	GGAATTTCGATTGATGAGTCCTGAGTA AACGGACGGGGCCATCGAGAA TCAGTTAGACGGACGGGGCATTGACAACACTTGTGCAATGTTTTCTTT TTGGAGCCGTTGCTTTTGGAGACCTTTTATATTTTTTGGGTGTTGTAGT TGGTGGTGGTTTGTC TGCATGTACGCAGTC AATCACTAGTG
17 numaralı F <sub>2</sub> birey -3	GGAATTTCGATTGATGAGTCCTGAGTA AACGGACGGGGCCATCGAGAA TCAGTTAGACGGACGGGGCATTGACAACACTTGTGCAATGTTTTCTTT TTGGAGCCGTTGCTTTTGGAGACCTTTTATATTTTTTGGGTGTTGTAGT TGGTGGTGGTTTGTC TGCATGTACGCAGTC AATCACTAGTG

Tablo 4.5: DNA dizi analizi sonucu elde edilen İzgi2001 x ES14 kombinasyonu fide dönemi dayanıklı F<sub>2</sub> bireylerine ait 5'-3' yönündeki nükleotid dizi bilgileri

Gri ile işaretlenmiş bölgeler, "pGEM-T Easy" klonlama vektörüne ait bölgeleri, sarı ile işaretlenmiş bölgeler adaptör dizilerini, beyaz bölgeler ise örnek DNA'sına ait nükleotid dizilerini göstermektedir. Her bir birey için 3 farklı koloni incelenerek DNA dizi analizi sonuçları verilmiştir.

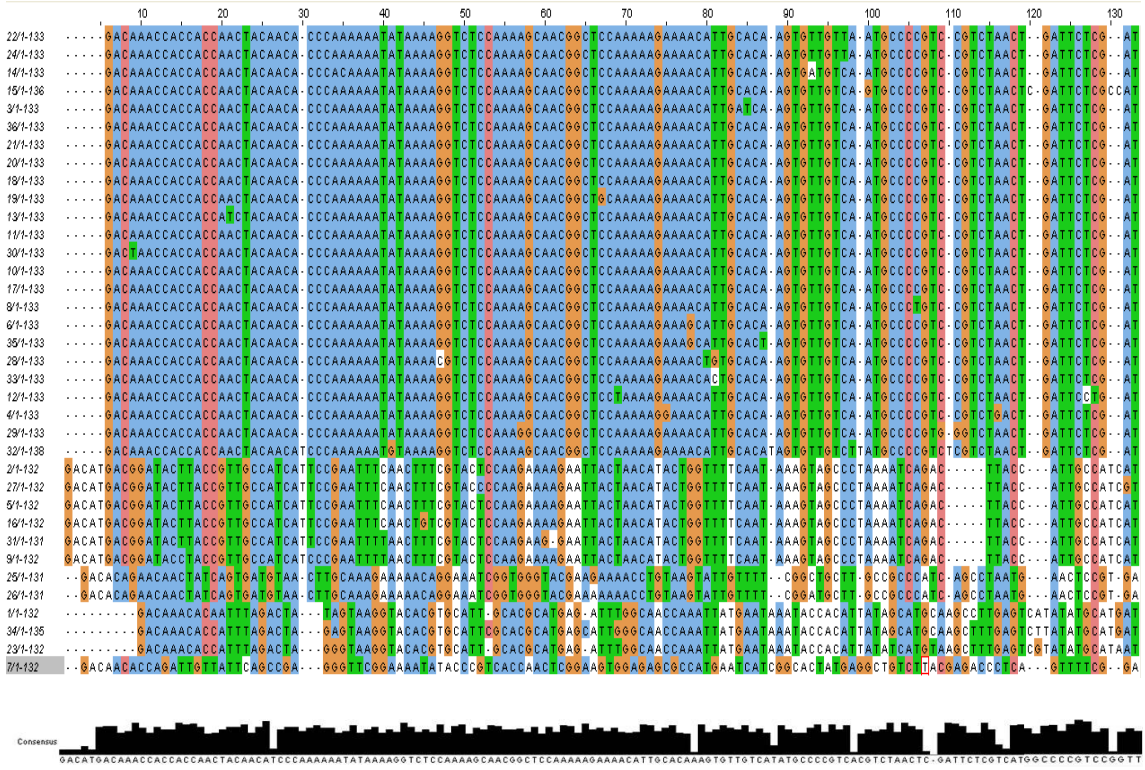
2 numaralı F <sub>2</sub> birey -1	GGAATTTCGATTGATGAGTCCTGAGTA AACGGACGGGGCCATCGAGAA TCAGTTAGACGGACGGGGCATTAAACAACACTTGTGCAATGTTTTCTTT TTGGAGCCGTTGCCTTTGGAGACCTTTTATATTTTTTTGGGTGTTGTAGT TGGTGGTGGTTTGTCTGCATGTACGCAGTCAATCACTAGTG
2 numaralı F <sub>2</sub> birey -2	GGAATTTCGATTGACTGCGTACATGCA GACAAACACCATTTAGACTAGG GTAAGGTACACGTGCATTGCACGCATGAGATTTGGCAACCAAATTATG AATAAATACCACATTATATCATGTAAGCTTTGAGTCGTATATGCATAA TGTAGATGTTTCGTTTACTCAGGACTCATCAATCACTAGTG
2 numaralı F <sub>2</sub> birey -3	GGAATTTCGATTGATGAGTCCTGAGTA AACGGACGGGGCCATCGAGAA TCAGTTAGACGGACGGGGCATTAAACAACACTTGTGCAATGTTTTCTTT TTGGAGCCGTTGCCTTTGGAGACCTTTTATATTTTTTTGGGTGTTGTAGT TGGTGGTGGTTTGTCTGCATGTACGCAGTCAATCACTAGTG
4 numaralı F <sub>2</sub> birey -1	GGAATTTCGATTGACTGCGTACATGCA GACACAGAACA ACTATCAGTG ATGTA ACTTGCAAAGAAAAACAGGAAATCGGTGGGTACGAAGAAAAC CTGTAAGTATTGTTTTTCGGCTGCTTGCCGCCCATCAGCCTAATGAACTC CGTGAACACCCGTTTACTCAGGACTCATCAATCACTAGTG
4 numaralı F <sub>2</sub> birey -2	GGAATTTCGATTGACTGCGTACATGCA GACACAGAACA ACTATCAGTG ATGTA ACTTGCAAAGAAAAACAGGAAATCGGTGGGTACGAAAAAAAC CTGTAAGTATTGTTTTTCGGATGCTTGCCGCCCATCAGCCTAATGAACTC CGTGAACACCCGTTTACTCAGGACTCATCAATCACTAGTG
4 numaralı F <sub>2</sub> birey -3	GGAATTTCGATTGACTGCGTACATGCA GACATGACGGATACTTACCGTT GCCATCATTCCGAATTTCAACTTTTCGTACCCCAAGAAAAGAATTACTA ACATACTGGTTTTCAATAAAGTAGCCCTAAAATCAGACTTACCATTGC CATCGTTCACGTTTACTCAGGACTCATCAATCACTAGTG
21 numaralı F <sub>2</sub> birey -1	GGAATTTCGATTGATGAGTCCTGAGTA AACGGACGGGGCCATCGAGAA TCAGTTAGACGGACGGGGCATTGACAACACTTGTGCAATGTTTTCTTT TTGGAGCCGTTGCCTTTGGAGACCTTTTATATTTTTTTGGGTGTTGTAGT TGGTGGTGGTTTGTCTGCATGTACGCAGTCAATCACTAGTG
21 numaralı F <sub>2</sub> birey -2	GGAATTTCGATTGATGAGTCCTGAGTA AACGGGCGGGGGCCATCGAGAA TCAGTTAGACGGACGGGGCATTGACAACACTTGTGCAATGTTTTCTTT TTGGAGCCGTTGCCTTTGGAGACCTTTTATATTTTTTTGGGTGTTGTAGT TGGTGGTGGTTTGTCTGCATGTACGCAGTCAATCACTAGTG

Tablo 4.5 in devamı.

21 numaralı F <sub>2</sub> birey -3	GGAATTTCGATTGACTGCGTACATGCA GACTAACCACCACCAACTACAA CACCCAAAAAATATAAAAAGGTCTCCAAAAGCAACGGCTCCAAAAAGA AAACATTGCACAAGTGTGTCAATGCCCGTCCGTCTAACTGATTCTC GATGGCCCGTCCGTTACTCAGGACTCATCAATCACTAGTG
26 numaralı F <sub>2</sub> birey -1	GGAATTTCGATTGATGAGTCCTGAGTA AACGGACGGGGCCATCGAGAA TCAGTTAGACGGACGGGGCATTGACAACACTTGTGCAATGCTTTCTTT TTGGAGCCGTTGCTTTTGGAGACCTTTTATATTTTTTGGGTGTTGTAGT TGGTGGTGGTTTGTCTGTCATGTACGCAGTCAATCACTAGTG
26 numaralı F <sub>2</sub> birey -2	GGAATTTCGATTGACTGCGTACATGCA GACAAACCACCACCAACTACA ACACCCAAAAAATATAAAAAGGTCTCCAAAAGCAACGGCTCCAAAAAG AAAACATTGCACAAGTGTGTCAATGCCCGTCCGTCTAACTGATTCT CGATGGCCCGTCCGTTACTCAGGACTCATCAATCACTAGTG
26 numaralı F <sub>2</sub> birey -3	GGAATTTCGATTGATGAGTCCTGAGTA AACGTGGAATGATGGCAATGGT AAGTCTGATTTTAGGGCTACTTTATTGAAAACCAGTATGTTAGTAATTC TCTTCTGGAGTACGAAAGTTAAAATTCGGAATGATGGCAACGGTAAG TATCCGTCATGTCTGTCATGTACGCAGTCAATCACTAGTG
29 numaralı F <sub>2</sub> birey -1	GGAATTTCGATTGACTGCGTACATGCA GACAAACCACCACCAACTACA ACATCCAAAAAATGTAAAAGGTCTCCAAAAGCAACGGCTCCAAAAA GAAAACATTGCACATAGTGTGTCTTATGCCCGTCTCGTCTAACTGAT TCTCGATGGCCCGTCCGTTACTCAGGACTCCATCAATCACTAGTG
29 numaralı F <sub>2</sub> birey -2	GGAATTTCGATTGATGAGTCCTGAGTA AACGGACGGGGCCATCGAGAA TCAGTTAGACGGACGGGGCATTGACAACACTTGTGCAATGCTTTCTTT TTGGAGCCGTTGCTTTTGGAGACCTTTTATATTTTTTGGGTGTTGTAGT TGGTGGTGGTTTGTCTGTCATGTACGCAGTCAATCACTAGTG
29 numaralı F <sub>2</sub> birey -3	GGAATTTCGATTGACTGCGTACATGCA GACAAACACCATTTAGACTAGA GTAAGGTACACGTGCATTCGCACGCATGAGCATTGGGCAACCAAATTA TGAATAAATACCACATTATAGCATGCAAGCTTTGAGTCTTATATGCAT GATGTAGATGTTTCGTTTACTCAGGACTCATCAATCACTAGTG

DNA dizi analizi reaksiyonu sonucunda, İzgi2001 x ES14 kombinasyonunda sarı pas hastalığına dayanıklılık ile ilişkili bulunan AFLP markırı için 5 adet farklı İzgi2001 ve 5'er adet ergin dönem dayanıklı F<sub>2</sub> bireyi ile fide dönemi dayanıklı F<sub>2</sub> bireyinin 3 farklı kolonisinin 133 bç'lik bant yapısına sahip olduğu gözlemlendi.

DNA dizileri <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/> sitesinde üst üste getirilip (Şekil 4.15) çakıştırılarak “Consensus” (birleştirilmiş) DNA dizisine ulaşıldı (Tablo 4.6).



Şekil 4.15: ClustalW 2.0 sonucuna göre oluşturulan “Consensus” DNA dizisi.

Tablo 4.6: Oluşturulan “Consensus” (birleştirilmiş) DNA dizisi

5'-GACAAACCACCACCACTACAACACCCAAAAAATATAAAAGGTCTCCAAAAGCAACGGCTCCAAAAAGAAAACATTGCACAAGTGTGTC AATGCCCGTCCGTCTAACTGATTCTCGA TGGCCCCGTCCGTT-3'

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Buğday, insanlar tarafından tüketilen en önemli tahıl bitkisi olup, yurdumuzdaki tüm tarımsal alanlarda yetiştirilmektedir. Buğday hastalıkları Türkiye’de ve dünyada buğday tarımını olumsuz yönde ve önemli ölçüde etkilemektedir. *Puccinia striiformis* f.sp. *tritici*’nin neden olduğu sarı pas (çizgi pası) hastalığı ise yurdumuzda en sık olarak görülen buğday hastalıklarından biridir. Salgınlar, genellikle yurdumuzun batı bölgelerinde görülürken; en fazla kayıp, baharın serin ve yağışlı geçtiği dönemlerde gerçekleşmektedir. Sarı pas hastalığı, yurdumuzda ve Avrupa ülkelerinde fungusit kullanılarak kontrol altına alınmaya çalışılmaktadır. Ancak fungusitlerin ekolojik açıdan olumsuz etkileri ve sık kullanımının fungusit dayanıklılığına yol açması, sarı pas hastalığına karşı farklı yöntemlerin kullanılmasını gerektirmektedir. Bu yöntemlerden biri de patojene dayanıklı genotiplerin yetiştirilmesidir (Dutlu ve Prescott, 1976; Jorgensen, 1991). Ülkemizde birçok tarımsal araştırma, üniversite ve diğer kuruluşlarda buğdayda ıslah çalışmaları yapılmaktadır. Islah amaçlarından biri de hastalıklara dayanıklılıktır.

Günümüzde sarı pas hastalığı ile ilgili yapılan çalışmalar (Singh ve diğ., 2000; Wang ve diğ., 2002; Chen ve diğ., 2003; Li ve diğ., 2006) sarı pas dayanıklılık genleriyle bağlantı gösteren moleküler markırların geliştirilmesine yöneliktir. Çalışmada kullanılan moleküler markır yöntemi, araştırmanın amacına, populasyonun yapısına, çalışılan bitki türüne ve analiz için gerekli zaman ve maliyete bağlı olarak seçilmektedir.

Bu tez çalışmasında da Bulk Segregasyon Analizi ile bütünleştirilmiş AFLP yöntemiyle ülkemiz ve dünya açısından ekonomik bir değere sahip olan buğday bitkisinin üretimini ve verimini tehdit eden sarı pas hastalığı açısından, klasik ıslah yöntemleri ve fitopatolojik çalışmalar ile sarı pas hastalığına dayanıklı ve hassas olarak belirlenmiş yurdumuz kökenli buğday (*Triticum aestivum* L.) çeşitlerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Bulk segregant analizi, herhangi bir gen bölgesine bağlı markır belirlemede hızlı, basit ve güvenilir bir yöntemdir (Michelmore ve diğ., 1991). Yöntemin uygulamasındaki amaç, arzu edilen gen veya karakter için bir populasyonun olmasıdır. Burada populasyon arzu edilen karakteri taşıyan ve taşımayanların melezlenmesiyle elde edilmektedir. Populasyonu oluşturan bireyler istenilen karakteri içerenler ve içermeyenler olarak belirlendikten sonra, DNA'ları iki farklı havuz olarak oluşturulmaktadır. Böylece arzu edilen karakter açısından aynı ama diğer bölgeler bakımından tamamen rastlantısal olan bir materyal elde edilmiş olmaktadır (Michelmore ve diğ., 1991). Havuzlar arasında farklılık gösteren bant (markır) genetiksel olarak istenilen özelliğe bağlı olabilmektedir. BSA metodu; RAPD, AFLP ve SSR markırları ile birlikte bitkilerde tarımsal öneme sahip genlerle ilgili markır oluşturmada yoğun şekilde kullanılmaktadır (Lee, 1995; Young, 1999).

Altinkut ve Gözükırmızı (2003) arpada kuraklık dayanıklılığı ile bağlantı gösteren AFLP markırları tanımlamak için BSA'dan faydalanmışlardır. Kuraklığa hassas ST 5819 ve dayanıklı olarak Tokak adlı kültüre alınmış arpa anaçlarının çaprazlanması ile elde edilen F<sub>2</sub> populasyonları kullanmış, *MseI/PstI* enzim kombinasyonları kullanılarak 40 primer kombinasyonu ile gerçekleştirdikleri çalışmada dayanıklı anaç ve dayanıklı "bulk"da bulunan ve hassas anaç ve hassas "bulk"da bulunmayan 172 bç boyutunda bir AFLP fragmenti elde etmişlerdir. Bu fragment dayanıklı ve hassas F<sub>2</sub> bireylerinde de test edilmiş, BSA'nın başarı ile kullanıldığını gösterilmiştir. Benzer şekilde Akfırat ve diğ., (2010) SSR analizleri sonucunda BSA metodunu kullanarak Xgwm 382 markırı ile buğdayda sarı pas hastalığı dayanıklılık kaynağı ile genetik olarak bağlantı gösteren bir markır ortaya koymuşlardır.

BSA kullanılarak moleküler markır bulmaya dayalı başka bir çalışmada Ganapathy ve diğ. (2009) tarafından güvercin bezelyesi denilen *Cajanus cajan*'ın önemli ürün kaybına neden olan sterility mozaic disease (SMD) için araştırma yapılmıştır. Araştırmada hastalığa dayanıklılık ile ilişkili AFLP ve SSR markırlarını tanımlamak için dayanıklı BRG 3 ve hassas TTB 7 adlı kültüre alınmış anaçları ile onların çaprazlanmasını oluşturan F<sub>2</sub> birey populasyonunu içeren BSA kullanılmışlardır. Anaçlar, bulklar ve bulkları oluşturan dayanıklı ve hassas F<sub>2</sub> bireyler arasında polimorfik markırları tanımlamak için toplamda 156 SSR ve 16 AFLP primer çifti incelenmişlerdir. Anaçlar arasında

polimorfik olan 10 SSR primeri bulklar arasında polimorfizm göstermemiştir. Anaçlar arasında polimorfik olan 13 AFLP primer çiftinden ise 2 tanesi (*E-CAA/M-GTG*, *E-CAG/M-GCC*) 150, 60,120 ve 150 bç'lik dayanıklı ve hassas bulklarda polimorfik olan markırlar meydana getirmiştir. Bunlardan *E-CAA/M-GTG* primer çiftinin oluşturduğu 150 bç'lik, *E-CAA/M-GTG* primer çiftinin oluşturduğu 60 bç'lik markırlar hassasiyet ile ilişkili olup, sadece hassas F<sub>2</sub> bireylerde çoğalmış ve markıra dayalı seçimde kullanım için çok uygun olduğu belirtilmiştir.

Benzer şekilde bu tez çalışmasında da AFLP yöntemi BSA ile birlikte kullanılmıştır. Bu amaçla fide ve ergin dönem dayanıklılığı olmak üzere her kombinasyona ait 30'ar (30 dayanıklı, 30 hassas) bitki seçilmiştir.

AFLP tekniği, restriksiyon enzimleriyle kesilen DNA'nın bu enzimlere özgü adaptörle birleştirilmesinden sonra ardısıra gerçekleştirilen PZR reaksiyonlarının ardından poliakrilamid jelde yürütülmesine dayanmaktadır (Vos ve diğ., 1995). Adaptör ve restriksiyon dizisi, primerlerin bağlanma yeri olarak görev yapmakta ve primerlerin 3' ucuna seçici bazlar eklenerek PZR yapılmaktadır. Bu teknik, genomda çok fazla genetik lokusu analiz ettiği için moleküler markır oluşturmak için sıkça başvurulan DNA parmak izi metodudur. Aynı anda 30-40 allel incelenebildiği için oldukça kullanışlı bir tekniktir (Vos ve diğ., 1995). AFLP tekniğinin bir diğer olumlu yönü de DNA baz dizilim bilgisine ihtiyaç duyulmamasıdır. Lin ve diğ. (1996), soyanın genetik haritasını oluşturmada RFLP, RAPD ve AFLP markırlarını kullanmışlar ve bu markırlardan AFLP'nin polimorfizm elde etmede diğerlerinden çok daha üstün olduğunu bildirmişlerdir. Bu nedenle türler arası ve tür içi genetik çeşitlilik araştırmalarında (Folkerstma ve diğ., 1996; Hongtrakul ve diğ., 1997; Semblat ve diğ., 1998) ve dayanıklılık genlerine bağlı markır oluşturma çalışmalarında (Lu ve diğ., 1998; Lu ve diğ., 1999; Xu ve Kobran, 2000) yoğun şekilde kullanılmıştır. Bununla birlikte AFLP tekniğinin yüksek maliyeti, çok fazla iş gücü gerektirmesi gibi sınırlayıcı yönleri de bulunmaktadır. Bu güçlükler AFLP markırının PZR'ye dayalı markıra çevrilmesiyle aşılabilmektedir. Havuç (Bradeen ve Simon, 1998), brassica (Negi ve diğ., 2000), kuşkonmaz (Reamon-Büttner ve diğ., 2000), soya (Meksem ve diğ., 2001), elma (Xu ve diğ., 2001), arpa ve buğday (Shan ve diğ., 1999) gibi farklı bitki türlerinde AFLP markırları PZR'ye dayalı markırlara kolaylıkla çevrilebilmiştir.

Williams ve diğ. (2002), buğday ve diğer tahılların ekonomik zararlılarından biri olan kök lezyon nematodu, *Pratylenchus neglectus*'a karşı moleküler markır oluşturmak amacıyla yaptıkları çalışmada katlanmış-haploid populasyonları dayanıklılık yönünden tanımlamışlardır. BSA-AFLP yöntemi kullanarak Excalibur adlı kültüre alınmış buğdayda *P. neglectus*'a bağlı AFLP markırını tanımlamışlardır.

Sardesai ve diğ., (2002), çeltiğin en önemli zararlısı olan *Orseolia oryzae*'nin farklı biyotiplerine karşı dayanıklılığı kontrol eden dominant Gm7 genine bağlı moleküler markırlar belirlemek için 157 AFLP primer kombinasyonu kullanmışlardır. Bu primer kombinasyonlarından 4 adedinin (*EcoRI/MseI*) duyarlı bireylere, 20 adedinin (*PstI/MseI*) duyarlı bireylere, 5 adedinin (*PstI/MseI*) ise duyarlı bireylere bağlı olduğu belirlemişlerdir. Bunlardan *P-CG/M-CTG* primer kombinasyonu ile elde edilen DNA bandının 24 duyarlı bireyin, 22 tanesinde bulunduğunu belirlemişlerdir. Gm7 genine bağlı olduğunu düşündükleri bu bandı klonladıktan sonra, dizilemişlerdir. Bu markırın çeltik ıslahında bu zararlıya karşı dayanıklılık çalışmalarında kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Benzer şekilde bu tez çalışmasında da 34 adet AFLP primer çifti kullanılarak buğdayda sarı pas hastalığına dayanıklılık ile genetik olarak bağlantı gösteren markırların bulunması amaçlanmış ve PI178383 x Harmankaya99, İzgi2001 x ES14 ve Sönmez2001 x Aytın98 kombinasyonlarında Bulk Segregasyon Analizleri gerçekleştirilmiştir. Anaç bitkiler arasında AFLP markırların 32 (%94) tanesi polimorfik, 2 (%6), tanesi ise monomorfik bant profili göstermiş ve polimorfizm gözlenen primerler kullanılarak Bulk Segregasyon Analizleri gerçekleştirilmiştir. BSA sonuçlarına göre 29 tanesi PI178383 x Harmankaya99, 31 tanesi İzgi2001 x ES14 ve 28 tanesi Sönmez2001 x Aytın98 kombinasyonlarında gözlenmiştir. 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 her birinde



de gözlemlenmesi gerekmektedir. Bu çalışmada, *M-ACG/P-GAC* (6C) primer çifti ile İzgi2001 x ES14 kombinasyonunda 133 bç büyüklüğünde bir AFLP markırı elde edilmiştir. Markır olarak nitelendirilen polimorfik bant profili çoğaltımdan sonra elde edilen ürünlerde dayanıklı anaç ve dayanıklı F<sub>2</sub> “bulk”da bulunan, hassas anaç ve hassas F<sub>2</sub> “bulk”da bulunmayan bir bant profili göstermiştir. Bu AFLP markırı fide ve ergin döneme ait F<sub>2</sub> bireyleri incelendiğinde, fide dönemine ait dayanıklı 30 bireyden 29 tanesinde, ergin döneme ait dayanıklı 30 bireyden 26 tanesinde gözlenmiş, fide ve ergin döneme ait hassas bireylerin ise hiç birinde gözlenmemiştir. Elde edilen 133 bç'lik markır bandının fide ve tarla dönemine ait dayanıklı bireylerde 30 bireyden 29 ve 26 dayanıklı bireyde gözlenmesi iki şekilde değerlendirilebilmektedir. Bu birey seçimi sırasında dayanıklı birey yerine hassas birey alınarak hatalı hastalık değerlendirmesi (skorlama) yapılması veya elde edilen markır ile sarı pas hastalığı dayanıklılık kaynağı arasında rekombinasyon meydana gelmiş olmasıyla açıklanabilmektedir.

Bu markır hem fide hem de ergin dönemde dayanıklılık gösterdiği için her iki dayanıklılık mekanizmasının avantajlarını taşımaktadır. Fide ve ergin dönem dayanıklılığının kombinasyonunu içeren varyeteler sabit ve yüksek düzeyde sarı pas dayanıklılığı için ideal genotiplerdir (Reddy, 2006).

Çalışmalar sonucunda elde edilen AFLP markırının ülkemizde buğdayda sarı pas hastalığı ile ilişkili olarak bitki ıslah programlarında markır yardımı ile seçim (MAS) çalışmalarında kullanılabilme potansiyeli bulunmaktadır.

## KAYNAKLAR

- AKFIRAT, F.Ş., AYDIN, Y., ERTUĞRUL, F., HASANÇEBİ, S., BUDAK, H., AKAN, K., MERT, Z., BOLAT, N., UNCUOĞLU, A.A., 2010, A microsatellite marker for yellow rust resistance in wheat, *Cereal Research Communications*, 38 (2), 204-211.
- ALTINKUT, A., GOZUKIRMIZI, N., 2003, Search for microsatellite markers associated with water-stress tolerance in wheat through bulked segregant analysis, *Molecular Biotechnology*, 23, 97- 105.
- ADAMS, M.D., KELLEY, J.M., GOCAYNE, J.D., DUBNICK, M., POLYMERPOULOS, M.H., XIAO, H., MERRIL, C.R.; WU, A.; OLDE, B.; MORENO R.F., 1991, Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project, *Science*, 252, 1651–1656.
- BALLVORA, A., HESSELBACH, J., NIEWHNER, J., LEISTER, D., SALAMINI, F., GEBHARDT, C., 1995, Marker enrichment and high-resolution map of the segment of potato chromosome VII harbouring the nematode resistance gene *Gro*, *Mol Gen Genet.*, 249, 82-90.
- BENSCH, S., AKESSON, M., 2005, Ten years of AFLP in ecology and evolution: why so few animals?, *Mol Ecol.*, 14, 2899–2914.
- BERTANI, G., 1951, Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*", *J. Bacteriol.*, 62, 293-300.
- BRADEEN, J.M., SIMON; P.W., 1998, Conversion of an AFLP Fragment Linked to the Carrot Y2 Locus to a Simple, Codominant PCR-Based Marker Form, *Theor. Appl. Genetics*, 97, 960–967.
- BİLGİÇ, H., Anadolu uygarlıklarının izinde buğdayın kökleri, 2004.
- CHARTERS, Y.M., WILKINSON, M.J., 2000, The use of self-pollinated progenies as 'in-groups' for the genetic characterization of cocoa germplasm, *Theor. Appl. Genet.*, 100, 160-166.
- CHAWLA, H.S., 2002, Introduction to plant biotechnology, *Science Publisher Inc, Second edition, USA.*, 330-358.
- CHEN, X.M., LINE, R.F., 1992a, Identification of stripe rust resistance genes in wheat cultivars used to differentiate North American races of *Puccinia striiformis*, *Phytopathology*, 82, 1428–1434.

- CHEN, X.M., LINE, R.F., 1992b, Inheritance of stripe rust resistance in wheat cultivars used to differentiate races of *Puccinia striiformis* in North America, *Phytopathology*, 82, 633–637.
- CHEN, X.M., LINE, R.F., 1993, Inheritance of stripe rust resistance in wheat cultivars postulated to have resistance genes at *Yr3* and *Yr4* loci, *Phytopathology*, 83: 382–388.
- CHEN, X.M., LINE, R.F., JONES, S.S., 1995, Chromosomal location of genes for stripe rust in spring wheat cultivars Compar, Fielder, Lee, and Lemhi and interactions of aneuploid wheats with races of *Puccinia striiformis*. *Phytopathology*, 85, 375–381
- CHEN, X.M., LINE, R.F., SHI, Z.X., LEUNG, H., 1998a, Genetics of wheat resistance to stripe rust, *Proceedings of the 9th International Wheat Genetics Symposium*. 2–7 August 1998, University of Saskatchewan, Saskatoon, Sask. University Extension Press, University of Saskatchewan, Saskatoon, Sask. Vol. 3. pp. 237–239
- CHEN, G.P., MA, W.S., HUANG, Z.L., XU, T., XUE, Y.B., SHEN, Y.Z., 2003, Isolation and characterization of *TaGSK1* involved in wheat salt tolerance”, *Plant Science*, 165, 1369-1375.
- CHEN, X.M., 2005, Epidemiology and control of stripe rust (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*) on wheat, *Can. J. Plant Pathol.*, 27, 314–337.
- 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.
- COMAI, L., MADLUNG, A., 2004, The effect of stress on genome regulation and structure, *Annals of Botany*, 94(4), 481-495
- CURTIS, B.C., MACPHERSON, H.G., RAJARAM, S., 2002, Bread wheat improvement and production, *Food and Agriculture Organization of the United Nations Corporate Document Repository*, 9251048096.
- DANGL, J.L., 1995, Piece De Resistance: Novel Classes of Plant Disease Resistance Genes, *Cell*, (80), 363-366.
- DUTLU, C., PRESCOTT, J.M., 1976, Sources of resistance in bread and durum wheats to several races of stripe rust, *J. Turkish Phytopathol*, 5, 81-84
- DÜŞÜNCELİ, F., ÇETİN, L., ALBUSTAN, S., 1999, Orta Anadolu buğday ekilişlerinde pas hastalıklarının (*Puccinia* spp.) yaygınlığı, önemi ve alınması gereken tedbirler, *Hububat tarımının sorunları ve çözüm yolları sempozyumu*, 8-11 Haziran 1999, Konya.

- DÜŞÜNCELİ, F., AKAR, T., YAZAR, S., DÖNMEZ, E., AVCI, M., 2007, Current status of wheat breeding in Turkey, *J. Agric. Res.*, 45 (1).
- DVORAK, J., LUO, M.C., YANG, Z.I., ZHANG, H.B., 1998, The Structure of the *Aegilops tauschii* gene pool and the Evolution of Hexaploid Wheat, *Theo. Appl. Genet.*, 97, 657-670.
- ERIKSSON, J., HENNING, E., 1896, *Die Getreideroste*, Norsteadt & Soner, Stockholm.
- FAROOQ, S., AZAM, F., 2002, Molecular Markers in Plant Breeding-II Some Pre-requisites for Use, *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 5(10), 1141-1147.
- FLOR, H.H., 1971, Current Status of the Gene-For-Gene Concept, *Annual Review of Phytopathology*, 9, 275-296.
- FOLKERSTMA, R.T., ROUPPE VAN DER VOORT, J.N.A.M., DE GROOT, K.E., VAN ZANDVOORT, P.M., SCHOTS, A., GOMMERS, F.J., HELDER, J., BAKKER, J., 1996, Gene Pool Similarities of Potato Cyst Nematode Populations Assessed by AFLP Analysis, *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 9 (1), 47-54.
- GANAPATHY, K.N., BYRE GOWDA, M., VENKATESHA, S.C., RAMACHANDRA, R., GNANESH, B.N., GIRISH, G., 2009, Identification of AFLP markers linked to sterility mosaic disease in pigeonpea *Cajanus cajan* (L.) Millsp., *International Journal of Integrative Biology*, 7, 145-149
- GILL, B.S., APPELS, R., BOTHA-OBERHOLSTER, A.M., BUELL, C.R., BENNETZEN, J.L., CHALHOUB, B., CHUMLEY, F., DVORAK, J., IWANAGA, M., KELLER, B., LI, W., MCCOMBIE, W.R., OGIHARA, Y., QUETIER, F., SASAKI, T., 2004, A workshop report on wheat genome sequencing: International genome research on wheat consortium, *Genetics*, 168, 1087-1096.
- HARTL, L., SEEFELDER, S., 1998, Diversity of selected hop cultivars detected by fluorescent AFLPs, *Theo. Appl. Genet.*, 96, 112- 116.
- HASSEBRAUK, K., 1965, Nomenklatur, geographische Verbreitung und Wirtsbereich des Gelbrostes, *Puccinia striiformis* West. Mitt. Biol. Bundesanst. Land-Forstwirtschaft. Berl.-Dahl., 116, 1-75.
- HONGTRAKUL, V., HUESTIS, G.M, KNAPP, S.J., 1997, Amplified Fragment Length Polymorphisms as Tool for DNA Fingerprinting Sunflower Germplasm: Genetic Diversity Among Oilseed Inbred Lines, *Theoretical and Applied Genetics*, 95, 400-407.
- HUSSAIN, A.J., GUPTA, V., ALI, J., RANJEKAR, P.K., SIDDIQ, E.A., 2000, Physiological characterization, genetics and molecular mapping of a new source of temperature sensitive genetic male sterility in rice, *Fourth International Rice Genetics Symposium, 2000 Philippines*, 95.

- İPEKDAL, K., 2006, Microarray Teknolojisi Evrimsel ve Ekolojik Çalışmalarda Kullanımı, *Proteomik ve Genomik*.
- 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).
- JARWIS, P., LISTER, C., SZABO, V., DEAN, C., 1994, Integration of CAPs markers into the RFLP map generated using recombinant inbred lines of *Arabidopsis thaliana*, *Plant Mol. Biol.*, 24, 685-687.
- JONES, N., OUGHAM, H., THOMAS, H., 1997, Markers and mapping: we are all geneticists now, *New Phytol.*, 137, 165- 177.
- JORGENSEN, J.H., 1991, *Integrated control of cereal mildews: Virulence patterns and their change*, Riso National Laboratory, Roskilde, Denmark.
- KIRTOK, Y., 1997, *Genel Tarla Bitkileri. Serin ve Sıcak İklim Tahılları*, Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Adana.
- KLUG, W.S., CUMMINGS, M.R., 2003, *Genetik Kavramlar*, Prof. Dr. Cihan Öner, (eds.), Palme Yayıncılık, Ankara.
- KONIECZYN, A., AUSUBEL, F. M., 1993, A procedure for mapping *Arabidopsis* mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers, *The Plant L*, 4, 403-410.
- KOCHERT, G., 1997, Restriction fragment length polymorphism in plants and its implications, *Subcellular Biochem.*, 17, 167-190.
- KÜN, E., 1988, *Serin İklim Tahılları*, Ankara Üniv. Ziraat Fak., Ankara.
- KÜN, E., 1996, *Serin İklim Tahılları*, A. Ü. Zir. Fak. Yayınevi, Ankara.
- LEE, M., 1995, DNA Markers and Plant Breeding Programs, *Adv. Argon*, 55, 265–344.
- LEV-YADUN, A., GOPHER, A., ABBO, S., 2000, The cradle of agriculture, *Science*, 288, 1602-1603.
- 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*, 112(8), 1434-1440.
- LICHTENHALER, M.D., 1996, Vegetation Stress: an Introduction to the Stress Concept in Plants, *Journal of Plant Physiology*, 148, 4-14.

- LINDSAY, J.P., LAMB, C.J., DIXON, R.A., 1993, Microbial Recognition and Activation of Plant Defense Systems”, *Trends in Microbiology*, (4), 181-187.
- LIN, J.J., KUO, J., MA, J., SAUNDERS, J.A., BEARD, H.S., MACDONALD, M.H., KENWORTHY, W., UDE, G.N., MATTHEWS, B.F., 1996, Identification of Molecular Markers in Soybean Comparing RFLP, RAPD and AFLP DNA Mapping Techniques, *Plant Molecular Biology Reporter*, 14(2), 156–169.
- LU, Z.X., SOSINSKI, B., REIGHARD, G.L., BAIRD, W.V., ABBOTT, A.G., 1998, Construction of a Genetic Linkage Map and Identification of AFLP Markers for Resistance to Root-Knot Nematodes in Peach Root-Stocks, *Genome*, 41, 199–208.
- LU, Z.X., SOSEY-ALAONI, K., REIGHARD, G.L., BAIRD, W.M.V., ABBOTT, A.G., 1999, Development and Characterization of a Codominant Marker Linked to Root-Knot Nematode Resistance, and Its Application to Peach Rootstock Breeding, *Theor. Appl. Genet.*, 99, 115-122.
- LYNCH, M., MILLIGAN, B.G., 1994, Analysis of population genetics structure with RAPD markers, *Mol. Ecol.*, 3, 91-99.
- LYNCH, M., WALSH, B., 1998, Genetics and analysis of quantitative traits, *Sinauer Associates*, Sunderland, MA.
- MACKILL, D.J., ZHANG, Z., REDONA, E.D., COLOWIT, P.M., 1996, Level of polymorphism and genetic mapping of AFLP markers in rice, *Genome*, 39, 969-977.
- MALLARD, S., GAUDET, D., ALDEIA, A., ABELARD, C., BESNARD, A. L., SOURDILLE, P., DEDRYVER, F., 2005, Genetic analysis of durable resistance to yellow rust in bread wheat, *Theoretical Applied Genetics*, 110, 1401-1409.
- MARSALIS, M.A., GOLDBERG, N.P., 2006, Leaf, Stem and Stripe Rust Diseases of Wheat, *Guide*, A-415.
- MCCLELLAND, M., NELSON, M., RASCHKE, E., 1994, Effect of Site-Specific Modification on Restriction Endonucleases and DNA Modification Methyltransferases, *Nucleic Acids Res.*, 22, 3640-3659.
- MEKSEM, K., RUBEN, E., HYTEN, D., TRIWITAYAKORN, K., 2001, Conversion of AFLP Bands into High-Throughput DNA Markers, *Mol. Gene.Genet*, 265, 207–214.
- MEUDT, H.M., CLARKE, A.C., 2007, Almost forgotten or latest practice? AFLP applications, analyses and advances, *Trends Plant Sci.*, 12, 106–117.
- MICHELMORE, R.W., PARAN, I., KESSELI, R.V., 1991, Identification of markers linked to disease genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 88, 9828-9832.

- MILNER, M., SCRIMSHAW, N., WANG, D.I.C., 1978, *Protein Resources and Technology*, AVI Publishing, Westport, USA.
- MILBOURNE, D., MEYER, R., BRADSHAW, J.E., BAIRD, E., BONAR, N., PROVAN, J., POWELL, W., WAUGH, R., 1997 Comparison of PCR-based marker systems for the analysis of genetic relationships in cultivated potato, *Mol. Breed.*, 3,127-136
- MORGANTE, M., OLIVIERI, A.M., 1993, PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics, *The Plant Journal*, 3, 175-182.
- MUELLER, U.G., WOLFENBARGER, nL.L., 1999, AFLP genotyping and fingerprinting, *Trends Ecol. Evol.*, 14, 389-394.
- 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.
- NAGAOKA, T., OGIHARA, Y., 1997, Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers, *Theor. Appl. Genet.*, 94, 597-602.
- NEGI, M.S., DEVIC, M, DELSENY, M., LAKSHMIKUMARAN, M., 2000, Identification of AFLP Fragments Linked to Seed Coat Color in *Brassica juncea* and Conversion to SCAR Marker for Rapid Selection, *Theor. Appl. Genet.*, 101, 146-152.
- NESBITT, M., SAMUEL, D., 1996, From staple crop to extinction? The archaeology and history of the hulled wheats, *Hulled Wheats: Proceedings of the First International Workshop on Hulled Wheats, 21-22 July 1995, Pascoli, Italy*, In PADULOSI, S., HAMMER, K., HELLER J. (eds.), IPGRI, Rome, Italy, 41-100.
- NESBIT, M., SAMUEL, L., 1998, Wheat domestication: archeobotanical evidence, *Science*, 279, 1433.
- OLSON, M., HOOD, L., CANTOR, C., DOTSTEIN, D., 1989, A common language for physical mapping of the human genome, *Science (Washington DC)*, 254, 1434-1435.
- ÖZGEN, M., KINACI, E., 1985, Bitkilerde Hastalıklara Dayanıklılık, Dayanıklılık Islahı Yöntemleri ve Yeni Gelişmeler, *Buğday ve Mısır Hastalıkları Semineri*, Orza, Ankara.
- ÖZGEN, M., KINACI, E., KÜN, E., 1987, Buğday-Aegilops üzerinde Araştırmalar, *Türkiye Tahıl Simpozyumu*, Toprak Mahsulleri Ofisi Altınova Tarım İşletmesi Müdürlüğü, Ankara.
- PARAN, I., MICHELMORE, R.W., 1993, Development of reliable PCR based markers linked to downy mildew resistance gene lettuce, *Theor. Appl. Genet.*, 85, 985-993.

- PARMAKSIZ, İ., 2004, *Papaver cinsi Oxytona seksiyonunun Türkiye’de yetişen türlerinde genetik çeşitliliğin RAPD markörleri ile analizi*, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara, Türkiye.
- PRIMROSE, S.B., TWYMAN, R.M., 2006, Principles of Gene Manipulation and Genomics, *Blackwell Publishing*, 644.
- POWELL, W., MORGANTE, M., ANDRE, C., HANAFEY, M., VOGEL, M.J., TINGEY, S.V., RAFALSKI, A., 1996, The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis, *Mol. Breed.*, 2, 225-235.
- QIAN, W., GE, S., HONG, D.Y., 2001, Genetic variation within and among populations of a wild rice *Oryza granulata* from China detected by RAPD and ISSR markers, *Theor. Appl. Genet.*, 102, 440-449.
- RAFALSKI, S., TINGEY, A., 1993, Genetics diagnostics in plant breeding: RAPDs, microsatellite and machines, *Trends Genet*, 9, 275–280.
- REAMON-BUTTNER, S.M., JUNG, C., 2000, AFLP-Derived STS Markers for the Identification of Sex in *Asparagus officinalis* L., *Theor. Appl. Genet.*, 100, 432-438.
- REDDY, L.J., 2006, *Investigations in Wheat (Triticum aestivum L. em Thell) Using Molecular and Conventional Breeding Techniques for Abiotic and Biotic Stress*, Doktora Tezi, Washington State University, 1- 29.
- RIDOUT, C., DONINI, P., 1999, Use of AFLP in cereals research, *Trends Plant Sci.*, 4, 76-79.
- ROELFS, A.P., HUERTA-ESPINO, J., MARSHALL, D., 1992, Barley stripe rust in Texas, *Plant Dis.*, 76, 538.
- RUSSELL, J.R., FULLER, J.D., MACAULAY, M., HATZ, B.G., JAHOOR, A., POWELL, W., WAUGH, R., 1997, Direct comparison of levels of genetic variation among barley accessions detected by RFLPs, AFLPs, SSRs and RAPDs, *Theor. Appl. Genet.*, 95, 714-722.
- RUSSELL, P.J., 2001, *Genetics*, In CUMMINGS, B. (eds.), San Francisco, USA.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T., 1989, *Molecular Cloning: A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 0879693096.
- SARDESAI, N., KUMAR, A., RAJYASHRI, K.R., NAIR, S., MOHAN, M., 2002, Identification and Mapping of an AFLP Marker Linked to Gm7, a Gall Midge Resistance Gene and its Conversion to a SCAR Marker for its Utility in Marker Aided Selection in Rice, *Theor. Appl. Genet.*, 105, 691-698.



- SAX, K., 1932, Sterility in wheat hybrids. II. Chromosome behavior in partially sterile hybrids, *Genetics*, 7, 513-552.
- SCHLOTTERER, C., TAUTZ, D., 1993, Slippage Synthesis of Simple Sequence DNA, *Nucleic Acid Research*, 20, 211-215.
- SEMAGN, K., BJØRNSTAD, Å., NDJIONDJOP, M.N., 2006, An overview of molecular marker methods for plants, *African Journal of Biotechnology*, 5 (25), 2540-2568.
- SEMBLAT., J.P., WAJNBERG, E., DALMASSO, A., ABAD, P., CASTAGNONE-SERENO, P., 1998, High-Resolution DNA Fingerprinting of Parthenogenetic Root-Knot Nematodes Using AFLP analysis, *Molecular Ecology*, 7, 119–125.
- SHAN, X., BLAKE, T.K., and TALBERT, L.E., 1999., Conversion of AFLP Markers to Sequence-Specific PCR Markers in Barley and Wheat, *Theor. Appl. Genet.*, 98, 1072-1078.
- SINGH, R.P., NELSON, J.C., SORRELLS, M.E., 2000, Mapping *Yr28* and Other Genes for Resistance to Stripe Rust in Wheat, *Crop Sci.*, 40, 1148-1155.
- SOLLER, M., BECHMANN, J.S., 1983, Genetic Polymorphism in varietal identification and genetic improvement, *Theor. Appl. Genet.*, 82, 233-241.
- STAUB, J.E., SERQUEN, F.C., GUPTA, M., 1996, Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding, *Hort Science*, 31, 729-741.
- STUBBS, R.W., PRESCOTT, J.M., SAARI, E.E., DUBIN, H.J., 1986, *Cereal Disease Methodology Manual*, Centro Internacional de Mejoramiento de maiz y trigo (CIMMYT), Mexico.
- THOMAS, C.M., VOS, P., ZABEAU, M., JONES, D.A., NORCOTT, K.A., CHADWICK, B.P., JONES, J.D.G., 1995, Identification of amplified restriction fragment polymorphism (AFLP) markers tightly linked to the tomato Cf-9 gene for resistance to *Cladosporium fulvum*, *Plant J.*, 8, 785-794.
- VILLORDON, A.Q., LABONTE, D.R., 1995, Variation in Randomly Amplified DNA Markers and Storage Root Yield in 'Jewel' Sweetpotato Clones, *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 120, 734-740.
- VOS, P., HOGERS R., REIJANS M., VAN DE LEE, T., HORNES, M., FRITERS, A., POT, J., PELEMAN, J., KUPIER, M., ZABEAU, M., 1995, AFLP: a new technique for DNA fingerprinting, *Nucl Acids Res*, 23, 4407-4414.
- VUYLSTEKE, M., PELEMAN, J.D., VAN EIJK, M.J., 2007, AFLP technology for DNA fingerprinting, *Nat Protoc*, 2, 1387–1398.

- WANG, L., MA, J., ZHOU, R., WANG, X., JIA, J., 2002, Molecular tagging of the yellow rust resistance gene *Yr10* in common wheat, P.I.178383 (*Triticum aestivum* L), *Euphytica*, 124, 71–73.
- WAUGH, R., POWELL, W., 1992, Using RAPD markers for crop improvement, *TibTech.*, 10, 186- 191.
- WEINING, S., LANDRIDGE, P., 1991, Identification and mapping of polymorphisms in cereals based on the polymerase chain reaction, *Theor. Appl. Genet.*, 82, 209-216.
- WEXELSEN, H., 1933, Linkage between quantitative and qualitative characters in barley, *Hereditas (Lund)*, 17, 323-341.
- WILLIAMS, J.G.K., KUBELIK, A.R., LIVAK, K.J., RAFALSKI, J.A., TINGEY, S.V. 1990, DNA Polymorphisms Amplified by Arbitrary Primers are Useful as Genetic Markers. *Nucleic Acids Research*, 18 (22), 6531–6535.
- WILLIAMS, K.J., TAYLOR, S.P., BOGACKI, P., PALLOTTA, M., BARIANA, H.S., WALLWORK, H., 2002, Mapping of the Root Lesion Nematode (*Pratylenchus neglectus*) Resistance Gene *Rlnn1* in Wheat, *Theor. Appl. Genet.*, 104, 874–879.
- XU, D.H., ABE, J., KANAZAWA, A., GAI, J. Y., SHIMAMOTO, Y., 2001, Identification sequence variations by PCR-RFLP and its application to the evolution of cpDNA diversity in wild and cultivated soybeans, *Theor. Appl. Genet.*, 102, 683-688.
- XU, M.L., MELCHINGER, A.E., XIA, X.C., LUEBBERSTEDT, T., 1999, High-resolution mapping of loci conferring resistance to a sugarcane mosaic virus in maize using RFLP, SSR, and AFLP markers, *Mol Gen Genet.*, 261, 574-581.
- XU, M.L., KORBAN, S.S., 2000, Saturation Mapping of the Apple Scab Resistance Gene *Vf* Using AFLP Markers, *Theor. Appl. Genet.*, 101, 844-851.
- YADON, S.I., GOPHER, A., ABOO, S., 2000, The Cradle of Agriculture, *Science*, 64-65.
- 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.
- 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.
- YOUNG, N.D., 1999, A Cautiously Optimistic Vision for Marker-Assisted Breeding, *Mol. Breed.*, 5, 505-510.

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 Eagean and Western Mediterrian in Turkey, *Pakistan journal of biological sciences*, 7, 1967-1971.

ZIETKIEWICZ, E., RAFALSKI, A., LABUDA, D., 1994, Genome Fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification, *Genomics* 20, 176-183.

<http://faostat.fao.org> [Ziyaret Tarihi: 10 Ocak 2010].

<http://trc.ucdavis.edu> [Ziyaret Tarihi: 3 Mart 2010].

<http://www.science.org.au> [Ziyaret Tarihi: 10 Nisan 2010].

<http://www.hgca.com> [Ziyaret Tarihi: 5 Ekim 2009].

<http://www.scq.ubc.ca> [Ziyaret Tarihi: 16 Nisan 2010].

<http://fig.cox.miami.edu/Faculty/Dana/amplification.gif> [Ziyaret Tarihi: 22 Mayıs 2009].

<http://fenbilimleri.files.wordpress.com/2008/09/gen.muhendisligi.pdf> [Ziyaret Tarihi: 9 Ocak 2010].

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

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

<http://www.biorad.com> [Ziyaret Tarihi: 5 Şubat 2009].

<http://www.promega.com> [Ziyaret Tarihi: 10 Mart 2010].

<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/> [Ziyaret Tarihi: 14 Mart 2010].

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov> [Ziyaret Tarihi: 10 Şubat 2009].

<http://faostat.fao.org> [Ziyaret Tarihi: 20 Ağustos 2008].

## ÖZGEÇMİŞ

12 Temmuz 1983'te İstanbul'da doğdum. 1989-1997 yılları arasında Şişli Kaptanpaşa İlköğretim Okulu'nda, 1997-2001 yılları arasında Sakıp Sabancı Lisesi (YDA)'nde öğrenim gördükten sonra, 2005 yılında İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden biyolog ünvanı alarak mezun oldum. 2005-2007 yılları arasında İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tezsiz Yüksek Lisans Ortaöğretim Alan Öğretmenliği Programında Biyoloji Öğretmenliğini tamamlayarak mezuniyet belgesi aldım. Aynı yıl içinde İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Botanik Programı'nda Tezli Yüksek Lisans eğitimine başladım.

## BİLİMSEL ÇALIŞMALAR

Sevinç D., Balta H., Akan K., Mert Z., Çetin L., Bolat N., Yorgancılar Ö., Uncuoğlu A. A., 2009, Buğday (*Triticum aestivum* L.)'da sarı pas hastalığına dayanıklılığın değişik tipte moleküler markör teknikleri kullanılarak incelenmesi, XVI. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi 13-16 Aralık 2009-Antalya, Biyoteknoloji 2009 Bildiri Kitabı, 5-6.

H Balta, A Yumurtacı, K Akan, Z Mert, L Cetin, N Bolat, A Altinkut Uncuoğlu, 2010, Investigations on resistant and susceptible wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars for yellow rust disease with AFLP markers, 2nd International Symposium on Genomics of Plant Genetic Resources, 24-27 April 2010, Bologna, Italy.