



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Yr10 BUĞDAY (TRITICUM AESTIVUM L.) SARI PAS  
(PUCCINIA STRIIFORMIS) DAYANIKLILIK GENİNİN  
EKMEKLİK BUĞDAY ÇEŞİTLERİNDE TARANMASI**

**Ashhan TEMEL**

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

**Danışman**

**Prof.Dr. Nermin GÖZÜKIRMIZI**

**Aralık, 2006**

**İSTANBUL**



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Yr10 BUĞDAY (TRITICUM AESTIVUM L.) SARI PAS  
(PUCCINIA STRIIFORMIS) DAYANIKLILIK GENİNİN  
EKMEKLİK BUĞDAY ÇEŞİTLERİNDE TARANMASI**

**Ashhan TEMEL**

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

**Danışman**

**Prof.Dr. Nermin GÖZÜKIRMIZI**

**Aralık, 2006**

**İSTANBUL**

Bu çalışma 26/12/2006 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji ve Genetik programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Prof. Dr. Nermin GÖZÜKIRMIZI (Danışman)  
İstanbul Üniversitesi  
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Güler TEMİZKAN  
İstanbul Üniversitesi  
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Avni KURU  
İstanbul Üniversitesi  
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Ayşegül TOPAL SARIKAYA  
İstanbul Üniversitesi  
Fen Fakültesi

Prof. Dr. Beyazıt ÇIRAKOĞLU  
Marmara Üniversitesi  
Tıp Fakültesi

Bu alışma TÜBİTAK, MAM, Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü, Bitki Biyoteknolojisi Laboratuvar'ında yürütülmekte olan TARAL 1007 programı kapsamındaki 105G075 nolu "Kışlık Ekmeklik Buğday (*Triticum aestivum* L.)'da Sarı Pas Hastalığına Dayanıklılık için Moleküler Markörlerin Geliştirilmesi" isimli proje kapsamında gerçekleştirilmiş olup; İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterlięinin T-840/02062006 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

## **ÖNSÖZ**

Bu tez çalışmasında, Yr10 sarı pas dayanıklık geninin çeşitli ekmeklik buğday genotiplerinde varlığını saptamaya yönelik çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

Yüksek lisans eğitimim boyunca benden desteğini esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Nermin GÖZÜKIRMIZI'ya en içten teşekkürlerimi sunarım. Tezim kapsamında tüm deneysel çalışmalarımı gerçekleştirdiğim TÜBİTAK, Marmara Araştırma Merkezi, Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü, Bitki Biyoteknolojisi Laboratuvar elemanlarından, değerli fikirleriyle bana yol gösteren Dr. Ahu ALTINKUT UNCULOĞLU ve Dr. Fahriye ERTUĞRUL'a ; çalışmamın her aşamasında bana yardımcı olan Dr. Funda ŞENTÜRK AKFIRAT'a, Ayşen YUMURTACI'ya, Gonca BULUT'a, Rahmi BÜYÜKKESKİN'e ve sevgi ve ilgilerinden destek aldığım tüm arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca yanımda olan AİLEME ise sonsuz teşekkürlerimi bir borç bilirim.

**Aralık, 2006**

**Aslıhan TEMEL**

## İÇİNDEKİLER

|                                                                                                                                             |      |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| ÖNSÖZ .....                                                                                                                                 | i    |
| İÇİNDEKİLER .....                                                                                                                           | ii   |
| ŞEKİL LİSTESİ .....                                                                                                                         | iv   |
| TABLO LİSTESİ .....                                                                                                                         | v    |
| SEMBOL LİSTESİ .....                                                                                                                        | vi   |
| ÖZET .....                                                                                                                                  | vii  |
| SUMMARY .....                                                                                                                               | viii |
| 1. GİRİŞ .....                                                                                                                              | 1    |
| 2. GENEL KISIMLAR .....                                                                                                                     | 2    |
| 3. MALZEME VE YÖNTEM .....                                                                                                                  | 13   |
| 3. 1. BİTKİ MATERYALİ.....                                                                                                                  | 13   |
| 3. 2. GENOMİK DNA İZOLASYONU.....                                                                                                           | 16   |
| 3. 3. Yr10 GENİNİN YAPISI.....                                                                                                              | 17   |
| 3. 4. PRİMER TASARIMI.....                                                                                                                  | 18   |
| 3. 5. Yr10 GENİNİN PCR İLE TARANMASI.....                                                                                                   | 18   |
| 3. 6. PCR ÜRÜNLERİNİN AGARUZ JEL ELEKTROFOREZİNDE İNCELENMESİ<br>.....                                                                      | 19   |
| 3. 7. DİZİ ANALİZİ.....                                                                                                                     | 19   |
| 3. 7. 1. Yr10 Geninin Birinci Eksonunun 39-792 bç'lik Kısımının ve İkinci<br>Eksonunun 2067-3377 bç'lik Kısımının PCR ile Çoğaltılması..... | 20   |
| 3. 7. 2. PCR Ürünlerinin Geri Kazanılması.....                                                                                              | 20   |
| 3. 7. 3. Dizi Analizi.....                                                                                                                  | 20   |
| 3. 7. 4. Sonuçların Birbirleriyle Karşılaştırılması.....                                                                                    | 20   |

|                                                                                            |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>4. BULGULAR .....</b>                                                                   | <b>21</b> |
| <b>4. 1. Yr10 GENİNİN PCR İLE TARANMASI.....</b>                                           | <b>21</b> |
| <b>4. 1. 1. E1 Primerleri Kullanılarak Yapılan PCR Sonuçları.....</b>                      | <b>21</b> |
| <b>4. 1. 2. E2 Primerleri Kullanılarak Yapılan PCR Sonuçları.....</b>                      | <b>22</b> |
| <b>4. 1. 3. E2A Primerleri Kullanılarak Yapılan PCR Sonuçları.....</b>                     | <b>22</b> |
| <b>4. 1. 4. E2 İleri ve E2A Geri Primerleri Kullanılarak Yapılan PCR Sonuçları.....</b>    | <b>23</b> |
| <b>4. 2. DİZİ ANALİZİ.....</b>                                                             | <b>24</b> |
| <b>4. 2. 1. Yr10 Geninin Birinci Eksonunun 39-792 bç'lik Kısımının Dizi Analizi.....</b>   | <b>24</b> |
| <b>4. 2. 2. Yr10 Geninin İkinci Eksonunun 2067-3377 bç'lik Kısımının Dizi Analizi.....</b> | <b>29</b> |
| <b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ .....</b>                                                          | <b>35</b> |
| <b>KAYNAKLAR .....</b>                                                                     | <b>40</b> |
| <b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>                                                                      | <b>49</b> |

## ŞEKİL LİSTESİ

- Şekil 2.1** : *P. striiformis* mantarının duyarlı bir buğday bitkisinin yaprağının üzerinde oluşturduğu üredinia .....6
- Şekil 2.2** : Pas hastalığı etkeni olan bir mantar tarafından enfekte edilen duyarlı ve dayanıklı mısır yaprağının şematik gösterimi .....7
- Şekil 2.3** : Polimeraz Zincir Reaksiyonu ..... 10
- Şekil 3.1** : Yr10 geninin şematik yapısı ..... 17
- Şekil 4.1** : E1 primerleri ile yapılan PCR ürünlerinin %1'lik nusieve agaroz-agaroz jeldeki görünüşleri..... 21
- Şekil 4.2** : E2 primerleri ile yapılan PCR ürünlerinin %1'lik nusieve agaroz-agaroz jeldeki görünüşleri..... 22
- Şekil 4.3** : E2A primerleri ile yapılan PCR ürünlerinin %1'lik nusieve agaroz-agaroz jeldeki görünüşleri..... 23
- Şekil 4.4** : E2 ileri ve E2A geri primerleri ile yapılan PCR ürünlerinin %1'lik nusieve agaroz-agaroz jeldeki görünüşleri..... 23
- Şekil 4.5** : E1 primerleri ile yapılan dizi analizi sonuçlarının Jalview programı kullanılarak karşılaştırılması.....29
- Şekil 4.6** : E2 ileri ve E2A geri primerleri ile yapılan dizi analizi sonuçlarının Jalview programı kullanılarak karşılaştırılması.....34



## TABLO LİSTESİ

|                  |                                                                         |           |
|------------------|-------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Tablo 2.1</b> | : Tahıllarda en çok kullanılan markır sistemlerinin karşılaştırılması.. | <b>11</b> |
| <b>Tablo 3.1</b> | : Genomik DNA izolasyonunda kullanılan çözeltiler.....                  | <b>17</b> |
| <b>Tablo 3.2</b> | : Çalışmada kullanılan primerler ve baz dizileri.....                   | <b>18</b> |
| <b>Tablo 3.3</b> | : Agaroz jel elektroforezinde kullanılan çözeltiler .....               | <b>19</b> |
| <b>Tablo 4.1</b> | : 7 çeşide ait 754 bç'lik bölgenin dizileri .....                       | <b>24</b> |
| <b>Tablo 4.2</b> | : 754 bç'lik bölge bakımından 7 çeşidin benzerlik oranları .....        | <b>26</b> |
| <b>Tablo 4.3</b> | : 4 çeşide ait 1311 bç'lik bölgenin dizileri .....                      | <b>30</b> |
| <b>Tablo 4.4</b> | : 1311 bç'lik bölge bakımından 4 çeşidin benzerlik oranları .....       | <b>32</b> |

## SEMBOL LİSTESİ

|             |                                           |
|-------------|-------------------------------------------|
| <b>AFLP</b> | : Çoğaltılmış Parça Uzunluğu Polimorfizmi |
| <b>ATP</b>  | : Adenin trifosfat                        |
| <b>bç</b>   | : Baz çifti                               |
| <b>bp</b>   | : “Base pair”                             |
| <b>°C</b>   | : Santigrad derece                        |
| <b>DNA</b>  | : Deoksiribonükleik asit                  |
| <b>dNTP</b> | : Deoksiribonükleotid trifosfat           |
| <b>EDTA</b> | : Etilendiamintetraasetikasit             |
| <b>FAO</b>  | : Food and Agriculture Organization       |
| <b>g</b>    | : Gram                                    |
| <b>GTP</b>  | : Guanin trifosfat                        |
| <b>kb</b>   | : Kilobaz                                 |
| <b>LRR</b>  | : “Leucine rich repeat”                   |
| <b>M</b>    | : Molar                                   |
| <b>mg</b>   | : Miligram                                |
| <b>ml</b>   | : Mililitre                               |
| <b>mM</b>   | : Milimolar                               |
| <b>NBS</b>  | : “Nucleotide binding site”               |
| <b>ng</b>   | : Nanogram                                |
| <b>OD</b>   | : Optik densite                           |
| <b>PCR</b>  | : “Polimerase Chain Reaction”             |
| <b>RAPD</b> | : Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA     |
| <b>RFLP</b> | : Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi |
| <b>RGAP</b> | : Dayanıklılık Gen Analog Polimorfizmi    |
| <b>RNaz</b> | : Ribonükleaz                             |
| <b>SSR</b>  | : Basit Dizi Tekrarları                   |
| <b>Taq</b>  | : <i>Thermus aquaticus</i>                |
| <b>TBE</b>  | : Tris-Borik asit-EDTA                    |
| <b>U</b>    | : Ünite                                   |
| <b>w/v</b>  | : Ağırlık/hacim                           |
| <b>µl</b>   | : Mikrolitre                              |
| <b>µM</b>   | : Mikromolar                              |

## ÖZET

### **Yr10 BUĞDAY (TRITICUM AESTIVUM L.) SARI PAS (PUCCINIA STRIFORMIS) DAYANIKLILIK GENİNİN EKMEKLİK BUĞDAY ÇEŞİTLERİNDE TARANMASI**

Bu çalışmada, yurdumuz kökenli ekmeklik buğday çeşitlerinde, *Puccinia striiformis* mantarının neden olduğu sarı pas hastalığına dayanıklılık sağlayan Yr10 geni ve varyasyonlarını saptamayı amaçladık. Bugüne kadar bulunan sarı pas dayanıklılık genleri içinde yalnızca Yr10 geninin dizisi (Gen Bankası no: AF149112) bilinmektedir. Yr10 geninin 7 farklı ekmeklik buğday çeşidinde varlığını araştırmak amacıyla Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) yöntemi kullanılmıştır. Birinci ekson bölgesinden tasarlanan E1 primer çifti (İleri 5' CTTGCTGGCGACCTGCTTA 3'; Geri 5' TGTTTCGCTCCACGCTGACT 3') ve ikinci ekson bölgesinden tasarlanan E2 primer çifti (İleri 5' TGGTAGTAGAGTAATCGCAACA 3'; Geri 5' TCTTCAGATTTGGAGGTAGG 3') ile tüm çeşitlerde çoğaltım ürünleri oluşturulmuştur. İkinci eksondan tasarlanan E2A primer çifti (İleri 5' TGGAAATGGATAGGCGAAGG 3'; Geri 5' AAATCAATGAAGCCGCAACC 3') ile 4 çeşitte (P.I.178383, Altay2000, Aytın98 ve ES14) çoğaltım ürünü oluşturulmasına karşın; 3 çeşitte (Harmankaya99, İzgi01 ve Sönmez2001) çoğaltım ürünü gözlenmemiştir. E2 ileri ve E2A geri primerleri kullanılarak gerçekleştirilen PCR sonucunda, E2A geri primerinin 3 çeşitte (Harmankaya99, İzgi01 ve Sönmez2001) genomik DNA'ya bağlanamadığı gösterilmiştir. E2 ileri ve E2A geri primerleri ile 4 çeşitte elde edilen 1311 bp uzunluğundaki çoğaltım ürünleri ve E1 primer çifti ile 7 çeşitte elde edilen 754 bp uzunluğundaki çoğaltım ürünlerinin dizi analizi gerçekleştirilmiştir. Dizi analizi sonuçları ClustalW çoklu dizileme "multiple alignment" programı kullanılarak değerlendirilmiş ve benzerlik oranları çıkarılmıştır. Dizi farklılıkları ise Jalview programı kullanılarak gösterilmiştir. Dizi analizi, birinci ekson bölgesi bakımından Yr10 genine en fazla benzeyen çeşitlerin Altay2000 ve P.I.178383; ikinci ekson bölgesi bakımından Yr10 genine en fazla benzeyen çeşidin ise P.I.178383 olduğunu göstermiştir. Benzerlik oranları incelendiğinde, birinci ekson bölgesi bakımından Yr10 genine en az benzeyen çeşitlerin Harmankaya99, İzgi01 ve Sönmez2001 oluşu göze çarpmaktadır. Bu çalışmadan elde edilen bulgular, (1) Yr10 geninin çalışmada kullanılan tüm çeşitlerde var olduğunu; (2) çeşitler arasındaki farklılığın ikinci ekson bölgesindeki varyasyonlardan kaynaklandığını ve (3) birinci eksonun ikinci eksone oranla daha korunmuş olduğunu göstermektedir. Bu çalışma, PCR ve dizi analizi yöntemi kullanılarak Yr10 geninin varyasyonlarını saptama amacıyla gerçekleştirilmiş ilk çalışma olup, elde edilen bulguların sarı pasa dayanıklı ve duyarlı çeşitler arasındaki benzerliklerin saptanmasına katkı sağlayarak, ıslah çalışmalarına yardımcı olması beklenmektedir.

## SUMMARY

### SCREENING OF Yr10 WHEAT (*TRITICUM AESTIVUM* L.) YELLOW RUST (*PUCCINIA STRIIFORMIS*) RESISTANCE GENE IN BREAD WHEAT CULTIVARS

In this study, we aimed to determine the presence and variations of the gene Yr10, which confers resistance to yellow rust caused by the fungus *Puccinia striiformis*, in Turkish bread wheat varieties. Among the yellow rust resistance genes only the sequence of Yr10 (GenBank no: AF149112) was released. Polymerase Chain Reaction (PCR) was used to determine the presence of Yr10 in 7 different bread wheat varieties. Amplification products obtained with E1 primer pair (Forward 5' CTTGCTGGCGACCTGCTTA 3'; Reverse 5' TGTTTCGCTCCACGCTGACT 3') designed according to the sequence of the first exon and E2 primer pair (Forward 5' TGGTAGTAGAGTAATCGCAACA 3'; Reverse 5' TCTTCAGATTTGGAGGTAGG 3') designed according to the sequence of the second exon, in all varieties. Amplification product was obtained in 4 varieties (P.I.178383, Altay2000, Aytın98 and ES14) using E2A primer pair (Forward 5' TGGAAATGGATAGGCGAAGG 3'; Reverse 5' AAATCAATGAAGCCGCAACC 3') designed according to the sequence of the second exon. According to the results of PCR with E2 forward and E2A reverse primers, it was shown that E2A reverse primer could not anneal to genomic DNA in 3 varieties (Harmankaya99, İzgi01 and Sönmez2001). 1311 bp PCR products of 4 varieties obtained using E2 forward and E2A reverse primers and 754 bp PCR products of 7 varieties obtained using E1 primer pair were subjected to sequence analysis. Examination of the sequencing results and the calculation of the similarity scores were carried out using ClustalW "multiple sequence alignment program". Jalview "a multiple alignment editor" was used to visualize nucleotide sequence alignments. Sequence analysis showed that the varieties which is most similar to the first exon of Yr10 are Altay2000 and P.I.178383 and the variety which is most similar to the second exon of Yr10 is P.I.178383. It was observed that 3 varieties (Harmankaya99, İzgi01 and Sönmez2001) are the least similar to the first exon of Yr10. The results obtained from this work indicate that (1) Yr10 gene is present in all of these varieties, (2) the divergence between the varieties is arised from the variations in the second exon and (3) the first exon is more conserved than the second exon. This is the first study carried out to examine the variations of Yr10 using PCR and sequence analysis. The results of this work will contribute to determine the divergence between resistant and susceptible varieties and will be helpful to breeding applications.

## 1. GİRİŞ

Buğday (*Triticum aestivum* L.), yıllık 600 milyon tonu aşan üretimi ile en önemli tahıl bitkisi olup, insanlar tarafından tüketilen başlıca karbohidrat ve protein kaynaklarından biridir. *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* mantarının yol açtığı sarı pas hastalığı özellikle serin iklimlerde yetişen buğday çeşitlerinde önemli kayıplara neden olmaktadır. Fungisit kullanımını ve sarı pasın neden olduğu verim kayıplarını azaltmada en etkili yol dayanıklı çeşitlerin kullanılmasıdır [Mallard ve diğ., 2005].

Buğday çeşitlerindeki sarı pas dayanıklılığının en yaygın çeşidi tek bir genin kontrolündeki ırka özgü dayanıklılık olup, bilinen sarı pas dayanıklılık genlerinin çoğunluğu ırka özgü dayanıklılık sağlar. Yr10 geni de dizisi bilinen ilk sarı pas dayanıklılık geni olup, ırka özgü (Örn; CYR31) dayanıklılık sağlar.

Bu tez çalışmasında Yr10 sarı pas dayanıklılık geninin yurdumuz kökenli ekmeklik buğday çeşidinde varlığını ve varyasyonlarını saptamak amaçlandı. 7 farklı ekmeklik buğday çeşidinde Yr10 geninin varlığı ve varyasyonları PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ile araştırıldı. Yr10 geninin ekson ve intron bölgeleri belirlenerek, ekson bölgelerini çoğaltacak primerler tasarlandı. İkinci eksonun uç kısmına özgü primer kullanılarak yapılan PCR'da 3 çeşitte çoğaltım gözlenmedi. Olası baz dizisi değişikliklerini belirlemek için ikinci ekson bölgesini çoğaltan 2 ayrı çifte ait primerler kullanılarak PCR gerçekleştirildi. PCR ürünleri agaroz jelden kesilip, geri kazanılarak dizi analizine gönderildi. Dizi analizi sonuçları birbirleriyle ve Yr10 geninin (AF149112) dizisi ile biyoinformatik yöntemler kullanılarak karşılaştırıldı.

## 2. GENEL KISIMLAR

Buğday (*Triticum* spp.) çok eski zamanlardan beri tarımı yapılan ve başlıca besin kaynağı olarak tüketilen bir bitkidir. Yapılan kazılarda ortaya çıkarılan buğday tohumlarının incelenmesi sonucu buğdayın M.Ö 7000 yıllarında kültüre alındığı anlaşılmıştır. Buğday bitkisinin kökeninin Güneybatı Asya olduğu kabul edilmekle birlikte; Türkiye, Suriye, Irak ve Kafkasya'da yabani buğday türlerinin bulunduğu bu yüzden de bu bölgenin gen merkezi olarak kabul edilmesi gerektiği belirtilmektedir [Harlan ve Zohary, 1966]. FAO'nun verilerine göre, 2005 yılında dünyada buğday ekili alan 216 milyon hektar olup, toplam üretim 628 milyon tondur [<http://faostat.fao.org/>]. Buğday, dünyada toplam tahıl ekilişinin %32'sini, toplam tahıl üretiminin ise %35'ini tek başına sağlamaktadır [Anonim, 1999]. Vitamin ve mineral madde yönünden zengin, en önemli karbonhidrat kaynaklarından biri olan buğday; ortam koşullarına uyumu, tanelerinin kolay saklanabilmesi ve kolayca una çevrilmesi gibi özelliklerinden dolayı, beslenmenin en önemli bileşenidir [Milner ve diğ., 1978].

Buğday türleri ploidi seviyelerine göre 3 grupta toplanırlar. Bunlar; diploid ( $2n=14$ ) *Triticum monococcum* AA, tetraploid ( $2n=28$ ) *Triticum turgidum* ssp. *durum* AABB (makarnalık buğday, durum buğdayı) ve heksaploid ( $2n=42$ ) *Triticum aestivum* ssp. *aestivum* AABBDD (ekmeklik buğday)'dur [Joppa, 1993]. Optimum gelişme sıcaklığı  $25^{\circ}\text{C}$  olan buğdayın değişik genotipleri birbirinden çok farklı toprak ve iklim koşullarında yaşayabilir. Buğdayın en iyi geliştiği bölgelerdeki yıllık yağış miktarı 375-875 mm olup; nem miktarındaki artış kök yapısının bozulmasına, hastalıklara ve dolayısıyla verimde azalmaya neden olur. Dünyada herhangi bir yerde ve herhangi bir zamanda toplanabilen bir bitki olmasına rağmen, buğdayın Kuzey Yarımküredeki ılıman bölgelerde hasat mevsimi nisan ve eylül ayları iken; Güney Yarımküredeki hasat mevsimi ekim ve ocak aylarıdır [Leonard ve Martin, 1963].

Türkiye’de 9.3 milyon hektar alanda ekimi yapılan ve 21 milyon ton üretimi olan buğday, yurdumuzdaki toplam tahıl ekilişinin %67’sini ve toplam tahıl üretiminin de %62’sini tek başına karşılamaktadır [<http://faostat.fao.org/>; Anonim, 1999]. 2025 yılında dünya nüfusu için gereken toplam buğday miktarının 786 milyon ton olacağı tahmini, buğday üretiminin artırılmasının önemini vurgulamaktadır. Buğday üretimi ise 2 yolla artırılabilir: 1-Buğday ekilen alanları genişletmek, 2-Buğday verimini arttırmak [Curtis ve diğ., 2002]. Tarım alanlarını genişletmek için orman alanlarının azaltılmasının, buğday üretimini arttırmada tek başına yeterli olamayacağı ve bu uygulamanın başka sorunlara (ozon tabakasına etkisi, yeni toprak çeşitlerinin ortaya çıkması vb.) yol açabilecek olması, buğday da dahil olmak üzere diğer tarım ürünlerinde verimin artırılması yolunda ilerlemenin, ihtiyacı karşılamada daha iyi sonuçlar vereceğini düşündürmektedir. Verim artışı ise; gübreleri daha etkili bir biçimde kullanarak, ComCat® gibi verim arttırıcı maddelerden yararlanarak ve ortam koşullarına dayanıklı çeşitler yetiştirerek sağlanabilir [Alam, 2004].

Organizmanın büyüme ve gelişimine olumsuz etki eden durumlar olarak isimlendirilen stres, iç kaynaklı veya dış kaynaklı olabilir. İç kaynaklı stres etmenlerine örnek olarak, canlının metabolizmasına olumsuz etki eden mutasyonlar ve kontrolsüz hücre bölünmeleri gösterilirken; dış kaynaklı stres etmenleri ise kendi aralarında biyotik ve abiyotik olarak gruplandırılırlar. Biyotik stres, patojenleri (virüs, bakteri, mantar), zararlıları (böcek) ve diğer organizmalarla rekabeti içerirken; kuraklık, tuzluluk, yüksek veya düşük sıcaklık, ışık miktarının azlığı veya fazlalığı, gelişim için gerekli olan maddelerin yetersizliği, pestisitler ve ağır metaller abiyotik stres etmenlerini oluşturmaktadır [Comai ve Madlung, 2004].

Virus, bakteri ve mantar gibi mikroorganizmaların neden olduğu hastalıklar, tarım ürünlerinin yaklaşık % 12’sinin kaybına yol açmaktadır. Özellikle bazı mantar türlerinin salgıladığı toksik maddeler, insan sağlığı üzerinde de olumsuz etkilere neden olmaktadır. Bitkilerde hastalık oluşturan bakteri ve mantarları kontrol etmek için geliştirilen çeşitli kimyasalların ise, ürün maliyetini arttırma ve en önemlisi diğer canlılara zarar verme gibi olumsuz yönlerinden dolayı kullanımı her geçen gün kısıtlanmaktadır. İslah, hastalıklara dayanıklı bitki elde etmek için kullanılan bir yoldur. Bitki ıslahı ile dayanıklılığı sağlayan pek çok gen, yabani bitkilerden kültür bitkilerine

aktarılmıştır. Bazen belli bir patojene dayanıklılık sağlayan gen, diğer bitki türlerinde hatta diğer canlı türlerinde (bakteri, mantar, böcek gibi) bulunabileceğinden, klasik ıslah yöntemleri bu gibi durumlarda işe yaramamaktadır. Biyoteknoloji alanındaki gelişmeler ise, klasik ıslah yöntemlerinin yetersiz kaldığı durumlarda çeşitli gen aktarım yöntemlerinin kullanılarak istenilen genin hedef bitkiye aktarımına olanak vermiştir [Özcan ve diğ., 2004].

En önemli biyotik stres etmenlerinden biri olan mantarlar, bitki hücrelerini enfekte etme yöntemlerine göre 3 grupta incelenirler: 1- Nekrotrof, 2- Hemibiyotrof ve 3-Biyotrof. Nekrotrof mantarlar, hücredeki enzimleri hedef alan toksik maddeleri sentezleyerek hücrenin ölümüne yol açar ve ölü hücrenin içeriğini metabolize ederler. Nekrotrof mantarlara karşı dayanıklılığı sağlayan genler ise patojenin salgıladığı toksik maddeyi etkisiz hale getiren enzimlerin sentezinden sorumludurlar. Konak aralığı biyotrof mantarlara oranla geniş olan nekrotrof mantarlarda hastalık oluşturma yeteneği baskın bir karakter iken; konak dayanıklılığı çekinik bir karakterdir. Nekrotrof mantarlara örnek olarak, bitki hücrelerinin histon deasetilaz enzimini inhibe eden HC toksinini salgılayan, yaprak lekesi “leaf spot” etkeni *Helminthosporium carbonum* verilebilir. Mısır bitkisinden izole edilen Hm1 geninin ürünü olan NADPH oksidoredüktaz enziminin HC toksinini etkisiz hale getirerek *H. carbonum*’a karşı dayanıklılık sağladığı düşünülmektedir [Pryor, 1987; Walton, 1996]. Patateste “late blight” hastalığının etkeni olan *Phytophthora infestans* gibi hemibiyotrof mantarlar ise, bir süre biyotrof olarak yaşamını sürdürdükten sonra nekrotrof duruma geçerler [Creighton, 1999]. Nekrotroflardan farklı olarak, biyotrof mantarlar enfekte ettikleri hücrenin metabolizmasını, kendi gelişme ve üremelerini kolaylaştıracak şekilde değiştirirler [Agrios, 1988]. Salgıladıkları sitokin benzeri hormonların etkisiyle yapraklarda, senesens geçirmemiş mezofil hücrelerinin oluşturduğu yeşil renkli bölgeler görülür. Biyotrof mantarların metabolizmaları belli bir bitki türüne özgü olduğundan konak aralıkları dardır. Keten pası “flax rust” hastalığının etkeni olan *Melampsora lini* mantarının başka bir bitkide hastalık oluşturmaması bu duruma örnek olarak verilebilir [Pryor, 1987; Hammond-Kosack ve Jones, 1997].

Mantarlar, tahıl bitkilerinde hastalık oluşturan organizmalar içerisinde en fazla ürün kaybına yol açan patojenler olup; *Puccinia* (Pas), *Ustilago*, *Tilletia*, *Erysiphe*, *Septoria*,



*Alternaria* ve *Fusarium* en yaygın olarak bulunan cinslerdir [Stubbs ve diğ., 1986]. Pas hastalıkları, dünya genelinde buğday ekim alanlarında verimi azaltan en önemli biyotik etmenlerdendir [Düşünceli ve diğ. 1999]. Buğday pas mantarları, Basidiomycetes sınıfına, Uredinales takımına, Pucciniaceae ailesine ve *Puccinia* cinsine ait; konak aralığı oldukça dar olan biyotrof patojenlerdir [Curtis ve diğ., 2002]. Gövde pası veya kara pas hastalığının etmeni olan *Puccinia graminis*, yaprak pası veya kahverengi pas hastalığının etmeni olan *Puccinia recondita* ve çizgi pası da denilen sarı pas hastalığının etmeni olan *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* Eriks. & E. Henn. tüm dünyada buğday, arpa ve yulaf gibi tahıllarda ciddi ürün kaybına yol açan başlıca pas etmeni mantarlardır [Stubbs ve diğ., 1986]. İlk kez 1777 yılında gözlenmesine rağmen, 1896 yılında Eriksson ve Henning tarafından sarı pas hastalığına yol açan patojenin diğer pas mantarlarından farklı olduğu tanımlanmış ve *P. glumarum* olarak isimlendirilmiştir. 1953 yılında ise Hylander ve ark. *P. striiformis* adını vermişlerdir .

Sarı pas, diğer pas hastalıklarına göre daha yüksek alanlarda, kuzey enlemlerinde ve ilkbaharın serin ve yağışlı geçtiği yerlerde yaygın olarak görülmektedir. Enfeksiyon bitkinin yeşil olduğu herhangi bir evrede gerçekleşebilir (Şekil 2. 1). Yapraklarda ve başaklarda oluşan sarı renkli üredinianın ip şeklindeki görüntüsünden dolayı “çizgi pası” da denir [Curtis ve diğ., 2002]. Birincil konakları arasında ekmeklik buğday, makarnalık buğday ve bazı arpa genotipleri bulunurken alternatif konaklarına rastlanmamıştır. Uygun koşullar altında, enfeksiyondan iki hafta sonra üredinospor oluşumu başlar [Roelfs ve diğ., 1992]. Sarı pas, fotosentezin gerçekleştiği alanı daralttığından, verimi ve tane kalitesini düşürür. Sarı pas, buğday üretiminin yapıldığı alanlarda, % 10 ile % 70 arasında değişen oranlarda verim kaybına neden olur. Hassas çeşitlerle yapılan tarla denemelerinde % 100’e varan kayıpların oluştuğu gözlenmiştir [Chen, 2005].



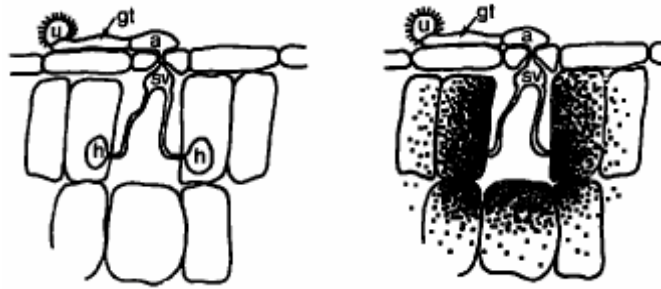
**Şekil 2.1.** *P. striiformis* mantarının duyarlı bir buğday bitkisinin yaprağının üzerinde oluşturduğu üredinia (Bowden, 2001)

Sarı pas dayanıklılığı fide dayanıklılığı ve ergin bitki dayanıklılığı olmak üzere 2'ye ayrılır. Fide dayanıklılığı “seedling resistance, all-stage resistance” fide döneminde gözlenebilen ancak bitkinin tüm gelişim evresi boyunca aktif olan, ırka özgü dayanıklılıktır. Ergin bitki dayanıklılığı ise bitki gelişiminin ileri evrelerinde gözlenir. 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].

Bitki ve biyotrof mantar arasındaki etkileşim Flor'un (1942, 1955) keten bitkisi ve keten pası hastalığının etkeni olan *Melampsora lini*'de yaptığı çalışmalara dayanarak geliştirdiği gene-karşı-gen “gene for gene” modeli ile açıklanabilir. 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 ürünüdür. Bu etkileşim sonucunda, bitki patojeni tanımış olur ve dayanıklılık mekanizmalarını başlatır. Avr geninde veya Avr proteininde gerçekleşecek olan bir değişiklik, patojenin, bitki tarafından tanınmasını engellediğinden, patojenin virulent duruma gelebilmesi için bitki tarafından tanınmaktan kaçınması gerekmektedir [Pryor, 1987]. Biyotrof mantarlara hastalık oluşturma yeteneğini kazandıran mutasyonların oranı %1 civarındadır. Bu oranın spontan mutasyonların oluşma sıklığından 2-3 kat fazla oluşu, mantarların kolaylıkla virulent duruma geçebildiğini gösterir [Day, 1974].

Gene-karşı-gen etkileşiminin tetiklediği dayanıklılık mekanizması aşırı duyarlı yanıt “hypersensitive response” olarak isimlendirilir. Aşırı duyarlı yanıt, komşu hücreleri patojenin varlığına karşı uyaracak olan sinyal moleküllerin oluşturulması,

antimikrobiyal enzim ve metabolitlerin sentezi, enfeksiyonun gerçekleştiği bölgeyi çevreleyen hücre duvarlarının güçlendirilmesi ve patojenle temas kuran hücrelerin programlı ölümü gibi mekanizmaları kapsar. Programlı hücre ölümü bitkinin patojene gösterdiği en önemli dayanıklılık mekanizması olup, hücre bileşenlerinin kahverengileşmesine neden olan katalitik reaksiyonlar tarafından gerçekleştirilir. Ölü hücreler geçirgen olmayan bir tabaka oluşturarak, patojeni sağlıklı hücrelerden uzak tutar (Şekil 2.2) [Stackman, 1915; Pryor, 1987; Goodman ve Novacky, 1994; Bent, 1996; Dangl ve diğ., 1996; Hammond-Kosack, 1996].



**Şekil 2. 2.** Pas hastalığı etkeni olan bir mantar tarafından enfekte edilen duyarlı (solda) ve dayanıklı (sağda) mısır yaprağının şematik gösterimi. Çimlenen ürediospor (u), germ tüpü (gt) appresoriumu (a) oluşturur, beki hücrelerinin altına doğru substomatal vesikül (sv) gelişir ve mezofil hücrelerinde haustoriumu oluşturacak olan bir çift enfeksiyon çengeli meydana gelir. Sağdaki dayanıklı yapraktaki hücrelerin üzerinde oluşan koyuluk, konak hücrenin ölümüne yol açarak, patojenin izolasyonunu sağlayacak olan aşırı duyarlılık oluşumunu göstermektedir (Pryor, 1987).

Flor'un gene-karşı-gen modeline göre, Avr geni tarafından sentezlenen ligand, R geninin ürününe bağlanarak aktive eder. Aktif duruma geçen R geninin ürünü de savunma yanıtını başlatacak olan sinyallerin iletimini sağlar. İzole edilen R genlerinin büyük çoğunluğu, maya, *Drosophila* ve memelilerde bulunan reseptör proteinlere yapısal benzerlik gösteren proteinleri kodlarlar. R genlerinin ürünleri de reseptör benzeri fonksiyonları yerine getirirler [Gabriel ve Rolfe, 1990]. R proteinlerinin büyük çoğunluğunun yapısında NBS "Nucleotide Binding Site" ve LRR "Leucine Rich Repeat" altbirimleri bulunur. Bitkilerde NBS-LRR yapısını gösteren çok sayıda gen bulunmaktadır. Arabidopsis genomunun %1'ini NBS-LRR yapısındaki genler oluşturmaktadır [McDowell ve diğ., 1998; Bendahmane ve diğ., 1999; Gassmann ve diğ., 1999; Tai ve diğ., 1999; Wang ve diğ., 1999]. NBS-LRR genlerindeki NBS, ATP veya GTP bağlarken, LRR birimi protein - ligand etkileşiminden sorumludur. Tanıma

işlevinin spesifik oluşunu LRR birimi sağlar [Tameling ve diğ., 2002; Tanabe ve diğ., 2004]. LRR biriminin üç boyutlu yapısı ilk kez ribonukleaz inhibitöründe (RI) incelenmiştir [Kobe ve Deisenhofer, 1993]. LRR 20- 29 amino asit uzunluğunda olup, ortak dizi xLxxLxLxxNx şeklindedir. X harfi herhangi bir aminoaside, L lösin aminoasidine ve N ise asparagin, metionin, treonin veya glutamin aminoasitlerinden birine karşılık gelmektedir [Luo ve diğ., 2003].

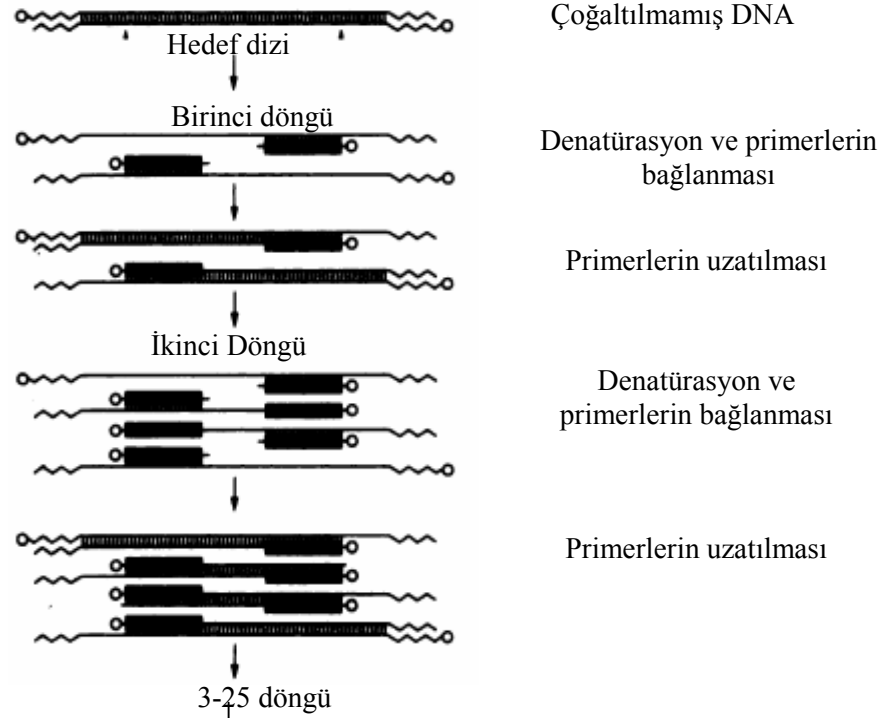
Sarı pas hastalığına ırka özgü dayanıklılık sağlayan genlerden biri olan Yr10 geninin varlığı, ekmeçlik buğday genotipi olan P.I.178383'te saptanmıştır [Wang ve diğ., 2002]. Yr10 geninin ürünü, sarı pas hastalığına dayanıklılığı sağlayan, NBS-LRR yapısında bir proteindir (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Moleküler markırlar, genellikle biyolojik etkileri olmayan ve sonraki nesillere aktarılan DNA dizileridir. Görünür özelliklere dayanan morfolojik markırlardan ve genlerin ürünü olan proteinlere dayanan biyokimyasal markırlardan farklı olarak, DNA düzeyindeki analizlerle saptandıklarından, DNA markırları olarak da bilinirler. Özellikle ekonomik önemi olan bitkilerde DNA haritalarının oluşturulması markıra dayalı seçilimin ilk adımıdır. Sonraki adım ise ilgilenilen karakter ve markırlar arasındaki bağlantının araştırılarak, ilgilenilen karakter üzerinde etkisi olduğu düşünülen genlerin saptanmasıdır. İlgilenilen genin yakınında veya bazı durumlarda içinde bulunan markırlar saptandıktan sonra, markıra dayalı seçilimi gerçekleştirmek mümkündür. Markıra dayalı seçim (MAS), markırı taşıdığı saptanan bireylerin seçilmesiyle, ilgilenilen geni taşıyan bireylerin de seçilmiş olmasıdır [<http://www.fao.org/Biotech/c10doc.htm>].

Dayanıklılık genlerinin belirlenmesine yönelik moleküler markır geliştirilmesi ve markıra dayalı seçim, sarı pasa yönelik yapılan çalışmaların başında gelmektedir. Yr5 [Sun ve diğ., 2002; Chen ve diğ., 2003; Yan ve diğ., 2003;], Yr9 [Shi ve diğ., 2001], Yr10 [Frick ve diğ., 1998; Shao ve diğ., 2001; Bariana ve diğ., 2002; Smith ve diğ., 2002; Wang ve diğ., 2002], Yr15 [Chague ve diğ., 1999; Peng ve diğ., 2000], Yr17 [Robert ve diğ., 1999; Seah ve diğ., 2001], Yr18 [Suenaga ve diğ., 2003], Yr24 [Zakari ve diğ., 2003], Yr26 [Ma ve diğ., 2001], Yr28 [Singh ve diğ., 2000], Yr32 [Eriksen ve diğ., 2004], Yr33 [McIntosh ve diğ., 2004], Yr34 [McIntosh ve diğ., 2004], Yr36 [J.

Dubcovsky 2004, kişisel görüş], YrH52 [Peng ve diğ., 2000] ve Yrns-B1 [Börner ve diğ., 2000] genlerine yönelik moleküler markırlar geliştirilmiştir. Bu markırlar, gene olan yakınlığına bağlı olarak, markıra dayalı seçimde kullanılabilir. Sarı pas dayanıklılık genlerine yönelik markırlar genellikle RAPD, SSR, AFLP yöntemleri kullanılarak geliştirilmiştir. Yr17 markırlarında ise Chen ve diğ. (1998b) tarafından geliştirilen RGAP yöntemine benzerlik gösteren bir yöntem kullanılmıştır [Chen, 2005]. Moleküler markır belirleme yöntemlerinin hepsinin olumlu ve olumsuz yönleri bulunmasına rağmen, kullanım kolaylığı ve maliyeti kullanılacak yöntemin seçilmesinde etkili olmaktadır (Tablo 2.1). Moleküler markır belirleme yöntemleri 2 grupta incelenirler: 1- RFLP gibi hibridizasyona dayalı teknikler, 2- PCR yöntemine dayalı teknikler. Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLP), hibridizasyona dayalı bir yöntem olup, geliştirilen ilk moleküler markır belirleme tekniğidir. İlk kez Botstein ve diğ. (1980) tarafından insan genomu çalışmalarında kullanılmıştır. Fazla miktarda ve yüksek kalitede genomik DNA'ya ihtiyaç duyulması, melezlemeye dayandığından uzun sürmesi ve fazla işgücü gerektirmesi bu yöntemin olumsuz yönleridir. Olumlu yönleri ise; genomdaki kopya sayısı düşük DNA parçalarının kullanılması ve farklı araştırma koşullarında bile aynı sonuçları vermesidir [Gupta ve diğ., 1999; Özcan ve diğ., 2004]. 2- PCR yöntemine dayalı markır teknikleri ise adından da anlaşılacağı gibi Polimeraz Zincir Reaksiyonu "Polimerase Chain Reaction" (PCR) kullanılarak geliştirilmişlerdir. PCR, dizisi bilinen bir DNA parçasının replikasyonunu sağlayan, hızlı ve duyarlı bir *in vitro* nükleik asit sentez yöntemidir [Saiki ve diğ., 1985; Erlich ve diğ., 1988]. PCR tekniğinde hedef dizinin iki ipliğinin zıt uçlarına tamamlayıcı özellikteki 2 oligonükleotid DNA parçaları (primer) kullanılır. Böylece DNA sentezi 2 primer arasındaki bölgede gerçekleşir. Reaksiyon karışımı dört çeşit deoksinükleotid trifosfatları (dNTP), çoğaltılacak DNA'yı, ısıya dayanıklı polimeraz enzimini (*Taq* polimeraz) ve primerleri içeren tamponlanmış bir çözeltilidir. Bu yöntemde ilk olarak, DNA ısıtılarak denatüre edilir. Reaksiyon karışımı daha sonra primerlerin DNA'da tamamlayıcı oldukları bölgelere bağlanmasını sağlayacak sıcaklığa getirilir. En son aşamada ise primerlerin *Taq* polimeraz tarafından uzatılacağı sıcaklık sağlanarak bir döngü tamamlanır (Şekil 2.3). Denatürasyon, bağlanma ve uzama aşamalarının döngüler halinde tekrarlanması sonucu hedef DNA ortamda fazla miktarda birikir [Erlich ve diğ., 1988; Saiki ve diğ., 1988]. İlk uygulamalarında DNA polimerazın Klenow parçası kullanılan ve tüpleri farklı sıcaklıklardaki su banyolarından geçirerek

yapılan PCR, ısıya dayanıklı *Taq* polimeraz enziminin ve sıcaklık değişimlerini otomatik olarak sağlayan aygıtların geliştirilmesiyle yaygınlık kazanmış ve moleküler biyolojide kullanılan en temel yöntemlerden biri olmuştur [Lawyer ve diğ., 1989; Gelfand ve White, 1990].



Ortamdaki DNA miktarında en az  $10^6$  kat artış  
**Şekil 2. 3.** Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Rose, 1991)

PCR'a dayalı markır tekniklerinin olumlu yönleri, hibridizasyona dayalı yöntemlere oranla masrafı, işgücünü ve geçen süreyi azaltmalarındır. En yaygın olarak kullanılan PCR markır belirleme yöntemleri Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA (RAPD), Çoğaltılmış Parça Uzunluğu Polimorfizmi (AFLP) ve mikrosatellit olarak da bilinen Basit Dizi Tekrarları (SSR)'dır. RAPD tekniğinde dizisi bilinmeyen, rastgele seçilmiş ancak GC oranı %50 ve üzerinde olan bir oligonükleotid primer kullanılır. Reaksiyon sonucu oluşan polimorfik DNA parçaları markır olarak nitelendirilmektedir. RAPD yönteminde primerlerin genomun değişik bölgelerine bağlanma olasılığını arttırmak için düşük bağlanma sıcaklıkları ( $34^{\circ}\text{C}$ - $36^{\circ}\text{C}$ ) kullanılır [Williams ve diğ., 1990]. Az miktarda DNA'nın kullanılabilmesi, primer sentezi için dizi bilgisine ihtiyaç duyulmadığı, reaksiyon sonuçları agaroz jellerde görüntülenebildiği ve radyoaktif madde kullanımını gerektirmediği için ucuz ve kolay bir yöntemdir. Ancak markırlarının dominant oluşu ve tekrar edildiğinde aynı sonuçları vermemesi bu

yöntemin kullanımını sınırlayan etmenlerdir [Hu ve Quiros, 1991; Mori ve diğ., 1993; Mohan ve diğ., 1997]. RAPD yöntemi pek çok bitki türünde kullanılmıştır [Hu ve Quiros, 1991; Weining ve Langridge, 1991; Çobanoğlu, 1994; Mackill, 1995; Albayrak, 2000; Uncuoğlu, 2001]. Ancak polimorfizm oranının düşük oluşu ekmeklik buğdayda bu yöntemin kullanımı sınırlamaktadır [Gupta ve diğ., 1999]. Çoğaltılmış Parça Uzunluğu Polimorfizmi (AFLP) yöntemi ise restriksiyon endonükleazlar tarafından oluşturulan parçaların PCR tekniği ile çoğaltılmasıdır. Bu teknikte önce genomik DNA restriksiyon endonükleazları kullanılarak kesilir, restriksiyon parçalarına çift iplikli DNA adaptörleri bağlanır ve adaptör diziler ve restriksiyon bölgeleri primer bağlanma bölgeleri olarak kullanılarak, adaptörlerden geliştirilen primerlerle, adaptörler arasında kalan bölge çoğaltılır [Vos ve diğ., 1995]. Polimorfizm oranının yüksekliği ve tekrarlanabilir oluşu AFLP yönteminin olumlu yönlerini oluştururken; pahalı oluşu, markırların RAPD yöntemindeki gibi dominant oluşu ve reaksiyon sonuçlarını gözlemek için RAPD'den farklı olarak poliakrilamid jel kullanılması ve masraflı oluşu tekniğin olumsuz yönleridir [Lin ve diğ., 1996]. Mikrosatellit olarak da bilinen basit dizi tekrarları (SSR), prokaryot ve ökaryot genomlarında bulunan 1-6 nükleotid uzunluğundaki dizilerdir. Mikrosatellitlerin bitki genomlarında fazla sayıda bulunduğu Condit ve Hubbel (1991) tarafından belirtilmiştir. Buğdayda en yaygın olarak bulunan mikrosatellitler dinükleotid yapısında olup, 40 tekrar sayısına kadar çıkabilir. Tekrarlı dizilerden sentezlenen primerler kullanılarak genomik DNA çoğaltılır [Staub ve diğ., 1996]. Polimorfizm oranının yüksek oluşu, homozigot ve heterozigot ayrımını gerçekleştirebilmesi SSR tekniğinin olumlu özelliklerini oluşturur [Saghai Maroof ve diğ., 1994; Plaschke ve diğ., 1995]. Primer sentezi için klonlama ve dizi analizi çalışmalarını gerektirmesi, reaksiyon sonuçlarının poliakrilamid jellerde gözlenebilir olması SSR tekniğinin olumsuz yönleridir [Röder ve diğ., 1995; Bryan ve diğ., 1997].

**Tablo 2. 1.** Tahıllarda en çok kullanılan markır sistemlerinin karşılaştırılması (Korzun, 2003)

| Özellik                               | RFLP    | RAPD            | AFLP    | SSR     |
|---------------------------------------|---------|-----------------|---------|---------|
| Gerekli olan DNA miktarı (µg)         | 10      | 0.02            | 0.5-1.0 | 0.05    |
| DNA kalitesi                          | Yüksek  | Yüksek          | Orta    | Orta    |
| Analiz edilen polimorfik lokus sayısı | 1.0-3.0 | 1.5-50          | 20-100  | 1.0-3.0 |
| Kullanım kolaylığı                    | Zor     | Kolay           | Kolay   | Kolay   |
| Tekrarlanabilirliği                   | Yüksek  | Güvenilir değil | Yüksek  | Yüksek  |
| Analiz başına tutar                   | Yüksek  | Düşük           | Orta    | Düşük   |

Farklı bitki türlerindeki patojen dayanıklılık genlerinin, patojenin tanınmasında iş gören altbirimlerinin yapısal yönden benzerlik göstermesine rağmen, genler arasındaki dizi benzerliği RFLP tekniği için yeterli değildir. Ancak, benzer bölgelerden geliştirilen primerlerle PCR çoğaltımı sonucu, dayanıklılık gen analoglarının (RGA) saptanması mümkündür. Dayanıklılık gen analogları, bilinen dayanıklılık genlerine benzer diziler taşır ve genomun dayanıklılık genlerini içeren belli bölgelerinde bulunurlar. Polimorfizm oranının yüksek oluşu, kullanılan primerler uzun olduğundan sonuçların güvenilir ve tekrarlanabilir oluşu, diğer moleküler markırlardan farklı olarak çoğaltım ürünlerinin biyolojik aktivitesi olabilecek gen analogları olması, dayanıklılık gen analog polimorfizmi (RGAP) tekniğinin olumlu yönlerini oluştururken; sonuçların poliakrilamid jelde görüntülenme gerekliliği bu tekniğin olumsuz yanını oluşturur [Kanazin ve diğ., 1996; Leister ve diğ., 1996; Michelmore, 1996; Yu ve diğ., 1996].



### 3. MALZEME VE YÖNTEM

#### 3. 1. BİTKİ MATERYALİ

Bu çalışmada, 7 adet kışlık ekmeklik buğday (*Triticum aestivum* ssp. *aestivum*) çeşidi kullanıldı. Dayanıklı çeşit olarak, uzun yıllardır sarı pas hastalığına yönelik çalışmalar gerçekleştiren Anadolu Tarımsal Araştırma Enstitüsü tarafından geliştirilen Altay2000, İzgi01, Sönmez2001 ile Yr10 sarı pas dayanıklılık genini içerdiği bilinen ve yerel bir çeşit olan PI178383 çeşitleri ile birlikte duyarlı çeşit olarak yine Anadolu Tarımsal Araştırma Enstitüsünün tescil ettirdiği Aydın98, ES14 ve Harmankaya99 çeşitleri kullanıldı. Bu çeşitlerin özellikleri aşağıda gösterilmektedir.

#### **ALTAY2000**

**Morfolojik Özellikleri:** Kılçıklı, açık kahverengi başaklı, beyaz taneli, 100-110 cm boyunda, kışlık ekmeklik buğday çeşididir.

**Tarımsal Özellikleri:** Kuru koşullara önerilen çeşidin, kışa dayanıklılığı iyi ve iyileşen koşullara iyi karşılık verebilmektedir.

**Verim Özellikleri:** 1995-1999 yılları arasındaki 5 yıllık ortalama verimi 348 kg/da olmuş ve diğer çeşitlere üstünlük sağlamıştır. Yağışın iyi olduğu 1998 yılında verimi Eskişehir’de 650 kg/da’a kadar çıkmıştır.

**Teknolojik Özellikleri:** Tescil denemelerinde elde edilen sonuçlara göre; hektolitre ağırlığı 79 kg, bin tane ağırlığı 33-42 gr, tanede protein oranı orta, sedimantasyon değeri 34-37 arasında değişmektedir, ekmeklik kalitesi iyidir.

**Hastalık Zararlı Durumu:** Orta Anadolu bölgesinin önemli hastalıklarından sürme, rastık, sarı pas ve toprak kaynaklı buğday mozaik virüs hastalıklarına karşı dayanıklı, kara ve kahverengi pasa orta duyarlıdır.

**Tavsiye Edilen Bölgeler:** Orta Anadolu ve Geçit Bölgelerinin taban, yarı taban ve kıraç yerlerine tavsiye edilir. Adaptasyon yeteneği çok iyi bir çeşittir.

## **AYTIN98**

**Morfolojik Özellikleri:** Kılçıklı, kırmızı başaklı, beyaz taneli, 95-100 cm boyunda kışlık ekmeklik buğday çeşididir.

**Tarımsal Özellikleri:** Kışa ve kurağa dayanıklılığı oldukça iyidir.

**Verim Özellikleri:** Aytın98'in uzun yıl ortalama verimi 333 kg/da iken iyi yerlerde 500 kg/da'a kadar çıkmaktadır.

**Teknolojik Özellikleri:** Teknolojik özellikleri oldukça iyi olan Aytın98'in hektolitre ağırlığı 79 kg, bintane ağırlığı 33 gr, tanede protein oranı % 13 olup ekmeklik kalitesi iyidir.

**Hastalık Zararlı Durumu:** Rastık ve kahverengi pasa dayanıklı olan çeşit, sürme, sarı pas ve kara pasa tarla şartlarında orta hassastır.

**Tavsiye Edilen Bölgeler:** Gerek79'un önerildiği her yere rahatlıkla önerilebilecek bir çeşittir.

## **ES14**

**Morfolojik Özellikleri:** Kılçıklı, kahverengi başaklı, orta sert beyaz taneli, 90-95 cm boyunda kışlık ekmeklik buğday çeşididir.

**Tarımsal Özellikleri:** Kışa dayanıklılığı iyidir.

**Verim Özellikleri:** İyi sulamayla verimi 700 kg/da'a kadar çıkmaktadır.

**Teknolojik Özellikleri:** Teknolojik özellikleri orta olan ES14'ün, bintane ağırlığı 32 gr, tanede protein oranı % 12 olup ekmeklik kalitesi ortadır.

**Hastalık Zararlı Durumu:** Toprak kaynaklı buğday mozaik virüsü, rastık, sürme ve kahverengi pasa dayanıklı olan çeşit, sarı pas ve kara pasa has duyarlıdır.

**Tavsiye Edilen Bölgeler:** Orta Anadolu ve Geçit Bölgeleri sulu alanlarına önerilebilecek bir çeşittir.

## **HARMANKAYA99**

**Morfolojik Özellikleri:** Kılçıklı, beyaz başaklı, kırmızı taneli, 90-100 cm boyunda kışlık ekmeklik buğday çeşididir.

**Tarımsal Özellikleri:** Kışa dayanıklılığı oldukça iyi olan çeşidin kurağa dayanıklılığı Gerek79 veya Kırgız95 kadar değildir.

**Verim Özellikleri:** 1993-98 yılları 6 yıllık ortalama verimi 350 kg/da olan çeşit (aynı yıllarda Gerek79'un verimi 311kg), yağışın iyi olduğu 1998 yılında 550 kg/da'a kadar çıkmıştır.

**Teknolojik Özellikleri:** Hektolitre ağırlığı 81 kg, bintane ağırlığı 34 gr, tanede protein oranı % 13 olup ekmeklik kalitesi iyidir.

**Hastalık Zararlı Durumu:** Orta Anadolu bölgesinin önemli hastalıklarından sürmeye dayanıklı, rastık ve paslara karşı duyarlıdır.

**Tavsiye Edilen Bölgeler:** Orta Anadolu ve Geçit Bölgelerinde taban yerlere ve yağışı biraz daha iyi olan veya bir kez takviye sulamanın yapılabileceği yerlere önerilmektedir.

### **İZGİ01**

**Morfolojik Özellikleri:** Kılçıklı, beyaz başaklı, beyaz taneli, 95-105 cm boyunda kışlık ekmeklik buğday çeşididir.

**Tarımsal Özellikleri:** Kuru koşullara önerilen çeşit, kışa ve yatmaya dayanıklı, kardeşlenmesi yüksek ve erkencidir.

**Verim Özellikleri:** Uzun yıllar ve çok lokasyon ortalamasına göre oldukça iyidir (300-500 kg/da).

**Teknolojik Özellikleri:** Ekmeklik kalitesi bakımından Gerek79 ayarında ve orta olan çeşidin, bintane ağırlığı 34-35 gr; hektolitre ağırlığı 79-81 kg, sedimantasyonu 30-40, protein oranı ortadır.

**Hastalık Zararlı Durumu:** Orta Anadolu bölgesinin en önemli hastalığı olan sarı pasa ve sürmeye dayanıklıdır.

**Tavsiye Edilen Bölgeler:** Orta Anadolu ve Geçit Bölgelerinin taban ve yarı taban yerlerine tavsiye edilir.

### **SÖNMEZ2001**

**Morfolojik Özellikleri:** Kılçıksız, beyaz başaklı, kırmızı taneli, 100-110 cm boyunda kışlık ekmeklik buğday çeşididir.

**Tarımsal Özellikleri:** Kuru alanlar için önerilen çeşit, kışa ve yatmaya dayanıklı, kardeşlenmesi orta ve orta erkencidir.

**Verim Özellikleri:** Uzun yıllar ve çok lokasyon ortalamasına göre oldukça iyidir (250-500 kg/da).

**Teknolojik Özellikleri:** Ekmeklik kalitesi bakımından iyi bir çeşittir. Bintane ağırlığı 36-38 gr, hektolitre ağırlığı 80-82 kg, sedimantasyonu 32-45, protein oranı yüksektir.

**Hastalık Zararlı Durumu:** Orta Anadolu bölgesinin en önemli hastalığı olan sarı pasa ve sürmeye dayanıklıdır.

**Tavsiye Edilen Bölgeler:** Orta Anadolu ve Geçit Bölgelerinin taban ve yarı taban yerlerine tavsiye edilir. Bezostaya'ya benzeyen çeşidin verimi kuruda Bezostaya'dan çok daha iyidir.

Yerel bir çeşit olan ve Yr10 sarı pas dayanıklılık geni ve 3 minör gen taşıdığı bilinen PI178383 ise Şemdinli civarından seleksiyon yöntemiyle elde edilen bir çeşittir. Orta boylu, kılçıklı, başak rengi kahverengi, beyaz taneli, yatmaya duyarlı, orta erkenci, kışa dayanıklı ve yüksek ısıda yatay mukavemet gösterir. Sarı pas ve kara pasa dayanıklı, kahverengi pasa duyarlıdır.

7 ayrı çeşide ait bitkiler, TÜBİTAK, MAM, Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü serasında yetiştirildi. Her çeşitten 10 tohum saksılara ekildi. 23 günlük fidelerin yaprakları kesilerek alüminyum folyolara sarıldı. Folyoyla kaplanmış örnekler sıvı azotta (-196°C) dondurularak, -80°C'de saklamaya alındı. DNA izolasyonu için 0.2 g yaprak dokusu kullanıldı.

### **3. 2. GENOMİK DNA İZOLASYONU**

Bu çalışmada, Song ve Henry (1995) tarafından değiştirilen, Weining ve Langridge (1991) miniprep DNA izolasyon yöntemi kullanıldı. Taze yapraklardan 0.2 g tartılarak, steril, soğuk havanda sıvı azot kullanılarak toz haline getirildi. Buzda tutularak soğutulmuş 1.5 ml'lik steril tüplere alınan homojenatın üzerine 0.6 ml ezme tamponu (Tablo 3.1) eklenerek parçalamaya devam edildi. Üzerine 0.6 ml soğuk fenol (P-4682 Sigma) eklenen tüpler, birkaç kere tüp tersyüz edilerek buzda 20 dakika bekletildi. 13000 devir/dakika'da 1 dakika santrifüj edildikten sonra tüpte oluşan üst sıvı dikkatlice çökeltiden ayrıldı. Yeni bir tüpe aktarılan üst sıvının üzerine 0.6 ml kloroform eklenip iyice karıştırıldı. 13000 devir/dakika'da 1 dakika süren santrifüj işleminden sonra oluşan üst sıvı yeni bir tüpe aktarıldı. Üzerine 50 µl 3 M soğuk sodyum asetat ve 1 ml soğuk saf etanol (EtOH) eklenen üst sıvı bir kaç kere yavaşça karıştırıldıktan sonra -70°C'de 30 dakika bekletildi. 13000 devir/dakika'da 1 dakika süren santrifüj işleminden sonra oluşan üst sıvı atılarak dipte kalan çökelti 1 ml %75'lik soğuk saf etanol ile 2 defa yıkandı. Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra üst sıvısı atılan tüpler temiz bir kaba filtre kağıdının üzerine ters çevrilerek kapatıldı ve kurumaya bırakıldı.

Kuruyan çökelti 50 µl steril soğuk suda çözüldü. 2µl 2U RNaz (RNase ONE Ribonuclease M4261 Promega) eklenen tüpler, 37<sup>0</sup>C’de 1 saat; RNaz’ın denatürasyonu için 65<sup>0</sup>C’de 10 dakika tutuldu.

İzole edilen DNA’nın miktarının belirlenmesi ve PCR’da kullanılacak sulandırım oranlarının hesaplanması için spektrofotometrede (Biorad Smartspec 3000) ölçüm yapıldı. Steril distile su ile 1/200 oranında sulandırılan genomik DNA örneklerinin 260 nm dalga boyundaki absorbans değerleri ölçüldükten sonra, çift zincirli DNA molekülünün konsantrasyonu aşağıdaki formül [Sambrook ve diğ., 1989] kullanılarak hesaplandı.

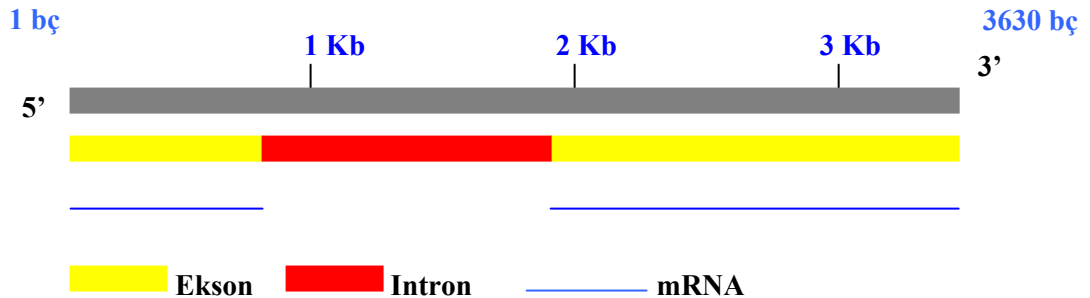
$$\text{DNA miktarı (ng/}\mu\text{l)} = \text{OD}_{260} \times 50 \times \text{sulandırım oranı (200)}$$

**Tablo 3. 1.** Genomik DNA izolasyonunda kullanılan çözeltiler

| Çözeltilinin İsmi                                      | İçeriği                                                            |
|--------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|
| Ezme Tamponu<br>pH 8.0                                 | Sarkosyl % 2<br><br>Tris-HCL pH 8.0 0.1 M<br><br>EDTA pH 8.0 10 mM |
| Sodyum Asetat 3 M<br>pH 4.8 (Glasiyel asetik asit ile) | NaOAc                                                              |

### 3. 3. Yr10 GENİNİN YAPISI

Yr10 buğday (*Triticum aestivum* L.) sarı pas (*Puccinia striiformis*) dayanıklılık geninin dizisi NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) veritabanında araştırıldı. Yr10 geninin (Gen Bankası no: AF149112), 1-833 bç ve 1989-3630 bç arasında 2 ekson bölgesi bulunmaktadır (Şekil 3. 1).



**Şekil 3. 1.** Yr10 geninin şematik yapısı

### 3. 4. PRİMER TASARIMI

Ekson 1 (1-833 bç) ve Ekson 2 (1989-3630 bç) bölgelerini çoğaltacak primerlerin tasarımı, Primer Premier Version 5.00 programı kullanılarak gerçekleştirildi. Ekson 1 bölgesi için 1 çift, Ekson 2 bölgesi için 2 çift primer tasarlandı. Integrated DNA Technologies, Inc. firması tarafından sentezlenen primerler Rafigen A.Ş. tarafından sağlandı. Çalışmada kullanılan primerler Tablo 3. 2’de verildi.

**Tablo 3. 2.** Çalışmada kullanılan primerler ve baz dizileri (İ=İleri, G=Geri)

| Primer Adı | Çoğaltacağı Bölge      | Baz Dizisi                                                   | Ürün Boyutu |
|------------|------------------------|--------------------------------------------------------------|-------------|
| E1         | Ekson 1 (1-833 bç)     | İ 5’CTTGCTGGCGACCTGCTTA 3’<br>G 5’TGTTTCGCTCCACGCTGACT 3’    | 754 bç      |
| E2         | Ekson 2 (1989-3630 bç) | İ 5’TGGTAGTAGAGTAATCGCAACA 3’<br>G 5’TCTTCAGATTTGGAGGTAGG 3’ | 377 bç      |
| E2A        | Ekson 2 (1989-3630 bç) | İ 5’ TGGAAATGGATAGGCGAAGG 3’<br>G 5’ AAATCAATGAAGCCGCAACC 3’ | 872 bç      |

### 3. 5. Yr10 GENİNİN PCR İLE TARANMASI

7 farklı ekmeklik buğday çeşidinde Yr10 geninin varlığı PCR yöntemi ile araştırıldı. Yr10 geninin ekson bölgelerine özgü 3 farklı primer çifti kullanıldı. PCR analizleri 0.5 ml’lik tüpler kullanılarak Eppendorf Mastercycler Gradient makinasında 25 µl hacimde gerçekleştirildi. Final konsantrasyonları 1X *Taq* Buffer (500mM KCl, 100mM Tris-HCl pH 9.0, 1% Triton X-100), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTP karışımı, 2µM ileri primer, 2 µM geri primer ve 1U *Taq* polimeraz (M186A Promega) olacak şekilde tüm bileşenler tüpte karıştırıldıktan sonra üzerlerine 4 µl (200 ng) genomik DNA eklendi. Genomik DNA’nın denatürasyonunun sağlanması için 94°C’de 30 saniye, primerlerin genoma bağlanması için uygun sıcaklıkta 30 saniye, enzimin reaksiyonu yürütmesi için 72°C’de 1 dakika bekletilip 30 döngü tamamlandıktan sonra, 72°C’de 7 dakika tutularak PCR tamamlandı. Yr10 geninin birinci eksonunun 39-792 bç’lik kısmının varlığını araştırmak için E1 primer çifti; Yr10 geninin ikinci eksonunun 2067–2443 bç’lik kısmının varlığını araştırmak için E2 primer çifti; Yr10 geninin ikinci eksonunun 2506–3777 bç’lik kısmının varlığını araştırmak için E2A primer çifti ve Yr10 geninin 2067–3377 bp arası bölgenin varlığını araştırmak için E2 ileri ve E2A geri primerleri kullanıldı. Bağlanma sıcaklığı E1 primer çifti ve E2A primer çifti için 55<sup>0</sup>C, E2 primer çifti için 50<sup>0</sup>C, E2 ileri, E2A geri primerleri için 60<sup>0</sup>C olarak belirlendi.

### 3. 6. PCR ÜRÜNLERİNİN AGAROZ JEL ELEKTROFOREZİNDE İNCELENMESİ

PCR ürünlerinin analizi için %1'lik nusieve agaroz - agaroz jel kullanıldı. 0.7 gr agaroz (A6013 Sigma) ve 0.3 gr nusieve agaroz (50080 FMC Bioproducts), 100 ml 0.5X TBE tamponunda (Tablo 3. 3) mikrodalga fırında eritildi. Oda sıcaklığına gelen jele 5 µl etidyum bromür çözeltisi eklenip karıştırıldı ve yatay elektroforez kasetine döküldü. Jelin polimerize olması için oda sıcaklığında 30 dakika bekletilen elektroforez kaseti, 0.5X TBE tamponu içeren elektroforez tankına yerleştirildi. PCR ürünleri 3 µl yükleme tamponu (Tablo 3. 3) ile karıştırılarak 20 µl hacimde jel kuyularına yüklendi. PCR ürünlerinin boyutunu belirleyebilmek için 100 bp plus marker (GeneRuler 100bp Plus SM0323 Fermentas), DNA ladder mix (GeneRuler DNA ladder mix SM0338 Fermentas) ve 1 kb marker (1 kb DNA marker G571A Promega) kullanıldı. 70 Voltta yürütülen PCR ürünlerinin UV ışık altında (Vilber Lourmat) incelenen PCR ürünlerinin, Sony UPP-110HG Type V High Glossy Printing Paper film üzerinde fotoğrafı çekildi.

**Tablo 3. 3** Agaroz jel elektroforezinde kullanılan çözeltiler

| Çözeltinin İsmi           | İçeriği                                               |
|---------------------------|-------------------------------------------------------|
| TBE Tamponu (10 X) pH 8.0 | Trisma Base 890 mM<br>EDTA 20 mM<br>Borik Asit 890 mM |
| Yükleme Çözeltisi (6 X)   | Bromofenol Mavisi %0,25 (w/v)<br>Sukroz %40 (w/v)     |
| Etidyum Bromür            | Etidyum Bromür 10 mg/ml                               |

### 3. 7. DİZİ ANALİZİ

Yr10 geninin eksonlarının farklı çeşitlerdeki varyasyonlarını saptamak amacıyla dizi analizi yaptırıldı. E1 primer çifti ve E2 ileri, E2A geri primerleri kullanılarak yapılan PCR ürünleri geri kazanılarak dizi analizine gönderildi. Farklı çeşitlere ait dizi analizi sonuçları birbirleriyle karşılaştırıldı.

### **3. 7. 1. Yr10 Geninin Birinci Eksonunun 39-792 bç'lik Kısımının ve İkinci Eksonunun 2067–3377 bç'lik Kısımının PCR ile Çoğaltılması**

Yr10 geninin 39-792 bç'lik kısmını çoğaltmak için E1 primer çifti; 2067–3377 bç'lik kısmını çoğaltmak için E2 ileri ve E2A geri primerleri kullanılarak 50 µl hacimde Eppendorf Mastercycler Gradient makinasında PCR gerçekleştirildi. Final konsantrasyonları 1X *Taq* Buffer (500mM KCl, 100mM Tris-HCl pH 9.0, 1% Triton X-100) 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTP karışımı, 2µM ileri primer, 2 µM geri primer ve 1U *Taq* polimeraz (M186A Promega) olacak şekilde tüm bileşenler 0.5 ml'lik tüpte karıştırıldıktan sonra üzerlerine 8 µl (800 ng) genomik DNA eklendi. Tüpler; başlangıç denatürasyonu için 94°C'de 2 dakika bekletildi. Genomik DNA'nın denatürasyonunun sağlanması için 94°C'de 30 saniye, primerlerin genoma bağlanması için uygun sıcaklıkta 30 saniye, enzimin reaksiyonu yürütmesi için 72°C'de 1 dakika bekletilip 30 döngü tamamlandıktan sonra, 72°C'de 7 dakika tutularak PCR tamamlandı. Bağlanma sıcaklığı E1 primer çifti için 55<sup>0</sup>C, E2 ileri, E2A geri primerleri için 60<sup>0</sup>C olarak belirlendi.

### **3. 7. 2. PCR Ürünlerinin Geri Kazanılması**

%1'lik agaroz jelde, 35 dakika boyunca 70 Voltta yürütülen PCR ürünleri, steril bistüri kullanılarak agaroz jelden kesildi ve saflaştırma kiti (Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System A9281 Promega) kullanılarak geri kazanıldı.

### **3. 7. 3. Dizi Analizi**

Yr10 geninin birinci eksonunun 39-792 bç'lik kısmının dizi analizi için 40 µl hacimdeki saflaştırma ürünleri, 5mM konsantrasyondaki E1 ileri E1 geri primerleri ile; ikinci eksonunun 2067–3377 bç'lik kısmının dizi analizi için 40 µl hacimdeki saflaştırma ürünleri, 5mM konsantrasyondaki E2 ileri ve E2A geri primerleri ile birlikte IONTEK laboratuvarına gönderildi.

### **3. 7. 4. Sonuçların Birbirleriyle Karşılaştırılması**

7 çeşide ait birinci ekson bölgesinin ve 4 çeşide ait ikinci ekson bölgesinin dizileri, ClustalW programı [Thompson ve diğ., 1994] kullanılarak birbirleriyle karşılaştırıldı ve benzerlik oranları gösterildi. Baz dizileri arasındaki benzerlik ise Jalview programı [Clamp ve diğ., 2004] kullanılarak görüntülendi.



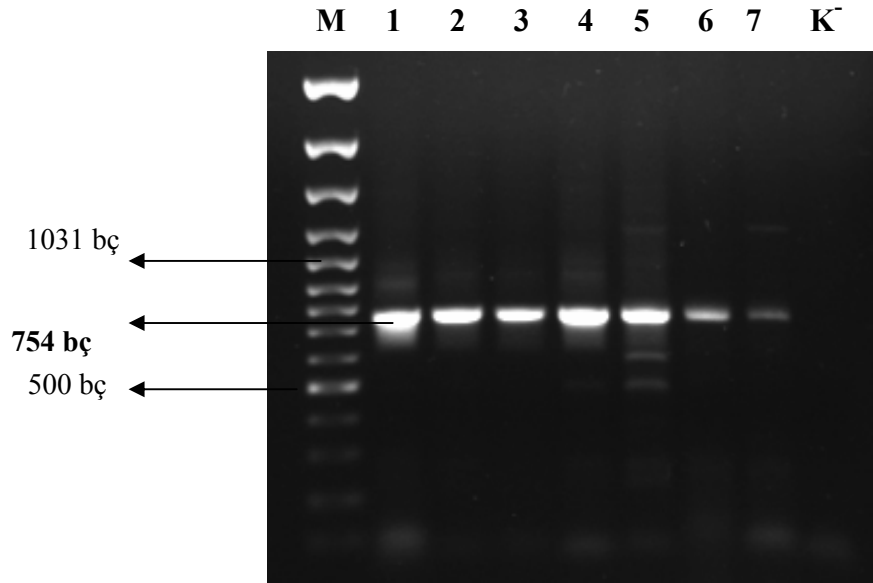
## 4. BULGULAR

### 4.1. Yr10 GENİNİN PCR İLE TARANMASI

Yr10 geninin birinci ve ikinci eksonuna ait bölgelerin varlığı, bu geni taşıdığı bilinen P.I.178383 çeşidinde, sarı pas hastalığına dayanıklı olduğu bilinen 3 çeşitte (Altay2000, İzgi01 ve Sönmez2001) ve duyarlı olduğu bilinen 3 çeşitte (Aytın98, ES14 ve Harmankaya99) araştırıldı.

#### 4.1.1. E1 Primerleri Kullanılarak Yapılan PCR Sonuçları

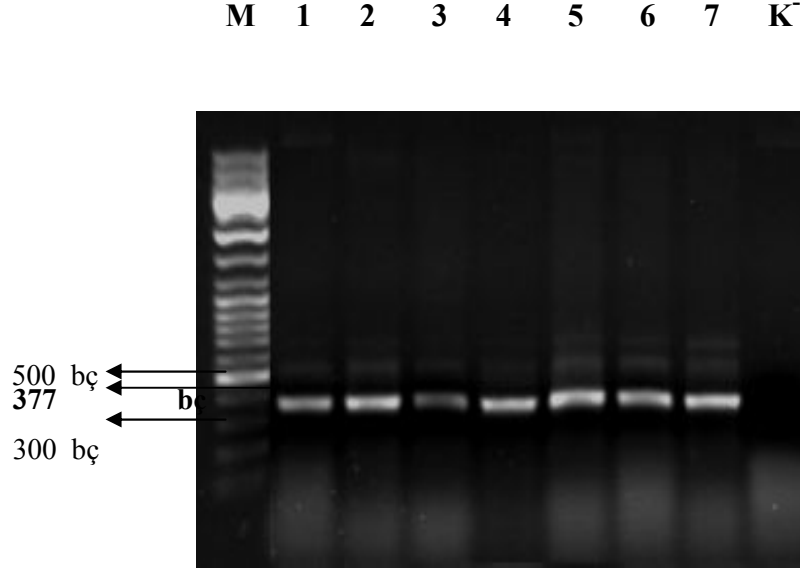
E1 primerleri kullanılarak yapılan PCR ürünleri “100 bp DNA ladder plus” marker ile agaroz jelde 35 dakika boyunca yürütülerek, UV ışık altında incelendi. Yr10 geninin birinci eksonunun içindeki 39 – 792 bç’lik bölgenin tüm çeşitlerde çoğaltıldığı gözlemlendi (Şekil 4. 1).



**Şekil 4. 1.** E1 primerleri ile yapılan PCR ürünlerinin %1’lik nusieve agaroz-agaroz jeldeki görünümleri. **M.** 100 bp DNA ladder plus, **1.** P.I.178383, **2.** Altay2000, **3.** Aytın98, **4.** ES14, **5.** Harmankaya99, **6.** İzgi01, **7.** Sönmez2001, **K<sup>-</sup>** . Negatif Kontrol

#### 4. 1. 2. E2 Primerleri Kullanılarak Yapılan PCR Sonuçları

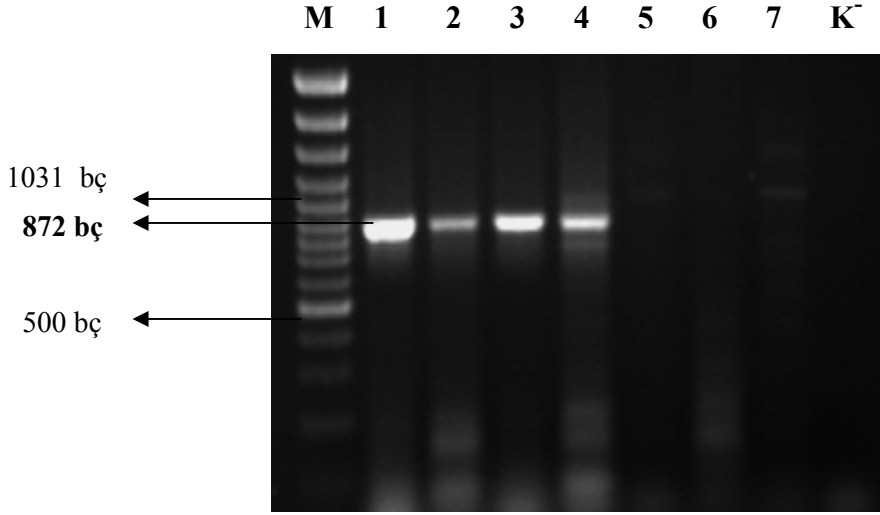
E2 primerleri kullanılarak yapılan PCR ürünleri “DNA ladder mix“ marker ile agaroz jelde 25 dakika boyunca yürütülerek, UV ışık altında incelendi. Yr10 geninin ikinci eksonunun içindeki 2067– 2443 bç’lik bölgenin tüm çeşitlerde çoğaltıldığı gözlemlendi (Şekil 4. 2).



**Şekil 4. 2.** E2 primerleri ile yapılan PCR ürünlerinin %1’lik nusieve agaroz-agaroz jeldeki görünüşleri. **M.** DNA ladder mix, **1.** P.I.178383, **2.** Altay2000, **3.** Aytın98, **4.** ES14, **5.** Harmankaya99, **6.** İzgi01, **7.** Sönmez2001, **K.** Negatif Kontrol

#### 4. 1. 3. E2A Primerleri Kullanılarak Yapılan PCR Sonuçları

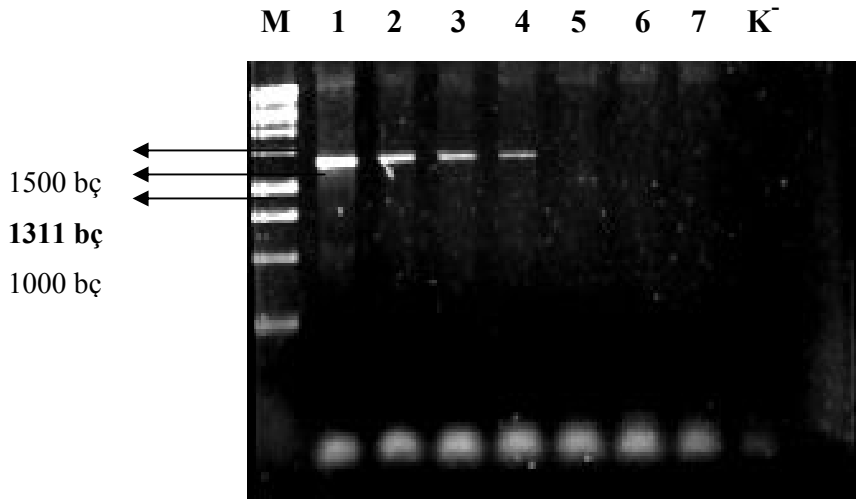
E2A primerleri kullanılarak yapılan PCR ürünleri 100 bp plus marker ile agaroz jelde 40 dakika boyunca yürütülerek, UV ışık altında incelendi. Yr10 geninin ikinci eksonunun içindeki 2506 – 3377 bç’lik bölge P.I.178383 (1 numara), Altay2000 (2 numara), Aytın98 (3 numara), ES14 (4 numara) çeşitlerinde çoğaltıldı. Magnezyum titrasyonu yapıp, farklı dNTP ve enzim konsantrasyonları ve farklı bağlanma sıcaklıkları denenmesine rağmen; Harmankaya99 (5 numara), İzgi01 (6 numara) ve Sönmez2001 (7 numara) çeşitlerinde çoğaltım ürünü oluşumu gözlenmedi (Şekil 4. 3).



**Şekil 4. 3.** E2A primeri ile yapılan PCR ürünlerinin %1'lik nusieve agaroz-agaroz jeldeki görünümleri. **M.** 100 bp DNA ladder plus, **1.** P.I.178383, **2.** Altay2000, **3.** Aydın98, **4.** ES14, **5.** Harmankaya99, **6.** İzgi01, **7.** Sönmez2001, **K<sup>-</sup>.** Negatif Kontrol

#### 4. 1. 4. E2 İleri ve E2A Geri Primerleri Kullanılarak Yapılan PCR Sonuçları

E2A primer çifti ile Harmankaya99, İzgi01 ve Sönmez2001 çeşitlerinde çoğaltım ürünü oluşumu gözlenmediğinden, E2A primerlerinin hangi bölgede bağlanamadığını araştırmak amacıyla E2 ileri ve E2A geri primerleri kullanılarak PCR yapıldı. 2067-3377 (79-1389) bç'lik bölge P.I.178383 (1 numara), Altay2000 (2 numara), Aydın98 (3 numara), ES14 (4 numara) çeşitlerinde çoğaltıldı. Magnezyum titrasyonu yapıp, farklı dNTP ve enzim konsantrasyonları ve farklı bağlanma sıcaklıkları denenmesine rağmen; Harmankaya99 (5 numara), İzgi01 (6 numara) ve Sönmez2001 (7 numara) çeşitlerinde çoğaltım ürünü oluşumu gözlenmedi (Şekil 4. 4).



**Şekil 4. 4.** E2 ileri ve E2A geri primerleri ile yapılan PCR ürünlerinin %1'lik nusieve agaroz-agaroz jeldeki görünümleri. **M.** 1kb Marker, **1.** P.I.178383, **2.** Altay2000, **3.** Aydın98, **4.** ES14, **5.** Harmankaya99, **6.** İzgi01, **7.** Sönmez2001, **K<sup>-</sup>.** Negatif Kontrol

## 4. 2. DİZİ ANALİZİ

Yr10 geninin birinci (39-792 bç) ve ikinci (2067–3377 bç) eksonlarının farklı çeşitler arasındaki varyasyonlarını saptamak amacıyla dizi analizi gerçekleştirildi.

### 4. 2. 1. Yr10 Geninin Birinci Eksonunun 39-792 bç'lik Kısımının Dizi Analizi

7 çeşide ait (PI178383, Altay2000, Aytın98, ES14, Harmankaya99, İzgi01 ve Sönmez2001) 754 bç'lik bölgenin dizileri (Tablo 4.1) “ClustalW” çoklu dizileme programı kullanılarak karşılaştırıldı (Tablo 4. 2). Dizi benzerlikleri Jalview programı kullanılarak gösterildi (Şekil 4. 5).

**Tablo 4.1.** 7 çeşide ait 754 bç'lik bölgenin dizileri

PI178383

```
CTTGCTTGGCGACCTGCTTAAGGAGGAGTACAACCTGCACAAGAGCACCAA
GGGTGAGATCAAGTTCCTCAAAGCAGAGCTGGAGAGCATGGAGGCTGCCCT
CATCAAGATCTCGGAGGCACCCTTGGATCAGCCACCTAACATTCAGGTCAA
GCTCTGGGCGAGGGACGTCAAGGACCTGTCCTATGAGATCGAAGATGGCAT
CGACAAATCCGGGTGCACCTTGAGTGCCGGCAACAAAAGAAGCCACACAG
CTTTATGGGTTTCATCCACAAAAGCATGGACATGCTGACAAAGGGCAAGAT
CCGACACAAAATAGGCATCGATATCAAAGACATCAAGAGCCGCATCAAGGA
GGTCAGTGACAGGCGTGAAAGGTACAAGGTTGATAGCGTTGCGCCCAAGCC
CACCGGCACAAGTACTGATACTTCCGCCAGTTAGCCTTGTTCAAAAAGGC
GGAAGAGCTTATTGGCACCAAAGAAAAGAGCCTTGACATAGTCAAGATGCT
GACGGAAGGAGATGAGGTCTTCAAGAAACATCTTAAGATGGTCTCTATTGT
TGGCTTTGGAGGCTTAGGGAAGACAACCTTTGCTAACGTGGTATATGAGAA
GCTTCGCGGGGACTTTGATTGTGCAGCTTTTGTCTCTGTGTCTCTTAATCC
TGACATGAAGAAGCTTTTCAAGTGTTTGCTCCATCAGCTTGACAGGCAGTA
GTACAAATAACATCATGGACGAGTCAGCGTGGACCGAAACA
```

---

ALTAY2000

```
CTTGCTTGGCGACCTGCTTAAGGAGGAGTACAACCTGCAGAAGAGCGAGAC
CAAGGGTGAGATCAAGTTCCTCAAAGCAGAGCTGGAGAGCATGGAGGCTGC
CCTCATCAAGATCTCGGAGGCACCCTTGGATCAGCCACCTAACATTCAGGT
CAAGCTCTGGGCGAGGGACGTCAAGGACCTGTCCTATGAGATCGAAGATGG
CATCGACAAATCCGGGTGCACCTTGAGTGCCGGCAACAAAAGAAGCCACA
CAGCTTTATGGGTTTCATCCACAAAAGCATGGACATGCTGACAAAGGGCAA
GATCCGACACAAAATAGGCATCGATATCAAAGACATCAAGAGCCGCATCAA
GGAGGTCAGTGACAGGCGTGAAAGGTACAAGGTTGATAGCGTTGCGCCCAA
GCCACCGGCACAAGTACTGATACTTCCGCCAGTTAGCCTTGTTCAAAA
GGCGGAAGAGCTTATTGGCACCAAAGAAAAGAGCCTTGACATAGTCAAGAT
GCTGACGGAAGGAGATGAGGTCTTCAAGAAACATCTTAAGATGGTCTCTAT
TGTTGGCTTTGGAGGCTTAGGGAAGACAACCTTTGCTAACGTGGTATATGA
GAAGCTTCGCGGGGACTTTGATTGTGCAGCTTTTGTCTCTGTGTCTCTTAA
TCCTGACATGAAGAAGCTTTTCAAGTGTTTGCTCCATCAGCTTGACAAGGG
CGAGTACAATAACATCATGGACGAGTCAGCGTGGAGCGAAACA
```

---

---

AYTIN98

TGACCGCGAGACACAGGGAGAGATGGGTTCCCTCAAGCAGAGCTGGAGAGCA  
TGGAGGCCGCCCTCATCAAGATCTCGGAGGCACCCTTGGATCAGCCACCTA  
ACATTCAGGTCAAGCTCTGGGCGAGGGACGTCAAGGACCTGTCCTATGAGA  
TCGAAGATGGCATCGACAAATTCCGGGTGCACCTTGAGTGCCGGCAACAAA  
AGAAGCCACACAGCTTTATGGGTTTCATCCACAAAAGCATGGACATGCTGA  
CAAAGGGCAAGATCCGACACAAAATAGGCATCGATATCAAAGACATCAAGA  
GCCGCATCAAGGAGGTCAGTGACAGGCGTGAAAGGTACAAGGTTGATAGCG  
TTGCGCCCAAGCCCACCGGCACAAGTACTGATACACTTCGCCAGTTAGCCT  
TGTTCAAAAAGGCGGAAGAGCTTATTGGCACCAAGAAAAGGAGCCTTGAC  
ATAGTCAAGATGCTGACGGAAGGAGATGAGGTCTTCAAGAAACATCTTAAG  
ATGGTCTCTATTGTTGGCTTTGGAGGCTTAGGGAAGACAACCTTTGCTAAC  
GTGGTATATGAGAAGCTTCGCGGTGGACTTTGATTGTGCAGCTTTTGTCTC  
TGTGTCTCTAATCCTTTACAGAAGAACTTTCAAGGTGTTGCTCCTACGCT  
GGCAGGAATCAAACCTTTTTTAAATAATGCGTAGGTGGGGGTGGTA

ES14

CTTGCTAGGACGACTTGCTTAGGGAGGGTGTGCGGACCGCGAGACACAGGG  
TGAGATCAGTTCCCTCAAAGCAGAGCTGGAGAGCATGGAGGCTGCCCTCATC  
AAGATCTCGGAGGCACCCTTGGATCAGCCACCTAACATTCAGGTCAAGCTC  
TGGGCGAGGGACGTCAAGGACCTGTCCTATGAGATCGAAGATGGCATCGAC  
AAATTCGGGTGCACCTTGAGTGCCGGCAACAAAAGAAGCCACACAGCTTT  
ATGGGTTTCATCCACAAAAGCATGGACATGCTGACAAAAGGGCAAGATCCGA  
CACAAAATAGGCATCGATATCAAAGACATCAAGAGCCGCATCAAGGAGGTG  
AGTGACAGGCGTGAAAGGTACAAGGTTGATAGCGTTGCGCCCAAGCCCACC  
GGCACAAGTACTGATACACTTCGCCAGTTAGCCTTGTTCAAAAAGGCGGAA  
GAGCTTATTGGCACCAAGAAAAGAGCCTTGACATAGTCAAGATGCTGACG  
GAAGGAGATGAGCTCTTCAAGAAACATCTTAAGATGGTCTCTATTGTTGGC  
TTTGGAGGCTTAGGGAAGACAACCTTTGCTAACGTGGTATATGAGAAGCTT  
CGCGGGGACTTTGATTGTGCAGCTTTTGTCTCTGTGTCTCTTAATCCTGAC  
TTGAAAAGCTTTTCAAGTGTGCTCCATCAGCTGACAGGGCAGTCAAACCT  
GCCATCCTGGATTATTCCCCGTGTAAGTAAATA

HARMANKAYA99

ATTTATAGAAGTAAAAAGTAGGGAAGAGGGAAACCGGAACTCGAGACACTA  
GAGTGAGATCAGTTCCCTCAAGCATAGCTGGAGAGCAGGGAGGCTGCCCTT  
CATCAGGATCTCAGAGGCACCCTTGGATCAGTCACCTGACATCCAGGTCAA  
GCTCTGGGCGAGGAATGTCACGAACCTTTCCCTATGAAATCAAGAATGGGAT  
CAATAGATCCCAGGGGACCTTGATGTGCCGGAACCAAAAAAGCCACAAA  
GTTTTATGGTCTTCATCCAAAAAATAAGGAACAGGTTAACAAAAGGGAAAAAT  
GCCAACACAACATAGGCATCAATATCAAAAACATCAAGAACTGGATCAAGG  
AGGTCAAGTCAAGGAGGCGGTGAAGGTTACAAGGTGAGACAGTGTTGTGCCAAG  
GCCACCGGCACAAGTACTGATTCCCTTCGCCAGTTAGCTTTGTTCAAGAAG  
GCGACAGAGCTTATTGGCACCGAAAGGAGGAGCCTTGACATAGTCAGGATG  
GTGATGGAGGGAGACGAGATGATCAAGAAACAACCGAAGCTGATCTCTATT  
GTTGGCTTTGGAGGCTTAGGGAAGACAACCTTTGCTAATATGGTGTATGAG  
AAGCTTCGAGAGAAATTCGATTGTCGAGCTTTTGTTCGGTCTCTCTTAAT  
CCTGACATGAAGAAGCTTTTCAAGAGTTGCTCCATCAACTGGCAGACAATA  
CTACACTCTCACCTCTCCTTATATACC

İZGİ01

CTTGTGGGGGACTTGCTTAAGGAGGAGTATGGACAGCAGAAAACCCGGAGT  
GAGATCAGTTTTCCCTTAAAGCCAAGTTAGAGAGCATGGAAGCTGCCCTCATC  
AAGGTTTTAGAGGCACCCTTGGATCAGCCACCTGACATCCAGGTCAAGCTT  
TGGGCAAGGGATGTCAGCGACCTGTCTATGAGATTGAGGACAGCGTTGAC  
AGATTCCGGGTGCGCCTTGAGTGCCGGGAACAAAAAAGCCACAGAGCTTT  
ATGGGTTTTATCCAGAGAAGTATGGACATGCTGACAAAAGGGCAAGATGCAA  
CACAAAATTGGCGTCGATATCAAAGACATCAAGAGCCGTATCAAGGAGGTC  
TGTGAGAGGCGTGAAAGGCACAAGGTTGACAGTGTTGTGCCCAAGCCACT  
GGCACAAGTACTGATACCCTTCGCCAGTTAGCCTTGTTTAAAAAGGCGATC  
GAGCTTATTGGCATCGAAGAGAAGAGCGCTGACATGGTCAAGATGCTAATG  
GAGGGAGACGAGGTGATCAGGAAGCACCCTAAGCTGATCTCTATTGTTGGC  
TTTGGAGGCTTAGGGAAGACAACCTCTTGCTAATATGGTGTATGAGAAGCTT  
CGAGAGAAATTTAATTGTGGAGCTTTTGTTCATATCGCTTAATCCCGAC  
ATGAAGAAGCTTTCAAGAGTTTGCGCATCAACTGGCAGACAATCAAATATA  
ATTAACACCCTGATA

SÖNMEZ2001

CCTGGTCAGGAACAGAAAATAGGTTCGAGTACAACCGACTGCGAGACCCAGG  
AGTGAGATCAAGTTCCCTTAAAGCCAAGTTAGAGAGCATGGAAGCTGCCCTC  
ATCAAGGTTTTAGAGGCACCCTTGGATCAGCCACCTGACATCCAGGTCAAG  
CTCTGGCAAGGGATGTCAGCGACCTGTCTATGAGATTGAGGACAGCGTTG  
ACAGATTCCGGGTGCGCCTTGAGTGTCGGGAACAAAAGAAGCCACAGAGCT  
TTATGGGTTTTATCCAGAGAAGTATGGACATGCTGACAAAAGGGCAAGATGC  
GACACAAAATTGGCGTCGATATCAAAGACATCAAGAGCCGTATCAAGGAGG  
TCTGTGAGAGGCGTGAAAGGCACAAGGTTGACAGTGTTGTGCCCAAGCCCA  
CTGGCACAAGTACTGATACCCTTCGCCAGTTAGCCTTGTTTAAAAAGGCGA  
TCGAGCTTATTGGCATCGAAGAGAAGAGCGTTGACATGGTCAGGATGCTAA  
TGGAGGGAGACGAGGTGATCAAGAAGCAACCCAAGCTGATCTCTATTGTTG  
GCTTTGGAGGCTTAGGGAAGACAACCTCTTGCTAATATGGTGTATGAGAAGC  
TTTCGAGAGAAATTTAATTGTGGAGCTTTTGTTCGTTTCTCTTAATCCCG  
ACATGAAGAAGCTTTTCAAGAGTTTGCGCATCAACTGCAAGACAATCAATT  
ACGGGTCTTAAAAAATCTATCTTTGACC

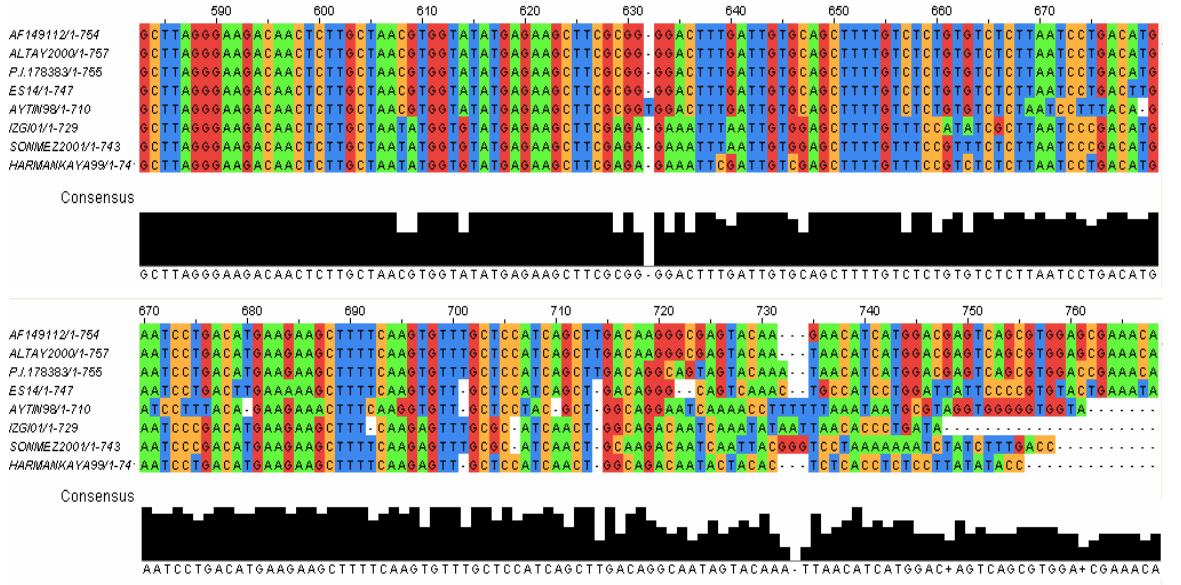
**Tablo 4. 2.** 754 bç'lik bölge bakımından 7 çeşidin benzerlik oranları

| DiziA | İsim     | Nukleotid | DiziB | İsim         | Nukleotid | Oran |
|-------|----------|-----------|-------|--------------|-----------|------|
| 1     | AF149112 | 754       | 2     | PI178383     | 755       | 98   |
| 1     | AF149112 | 754       | 3     | ALTAY2000    | 757       | 99   |
| 1     | AF149112 | 754       | 4     | AYTIN98      | 710       | 88   |
| 1     | AF149112 | 754       | 5     | ES14         | 747       | 95   |
| 1     | AF149112 | 754       | 6     | HARMANKAYA99 | 741       | 77   |
| 1     | AF149112 | 754       | 7     | İZGİ01       | 729       | 82   |
| 1     | AF149112 | 754       | 8     | SÖNMEZ2001   | 743       | 79   |

|   |              |     |   |              |     |    |
|---|--------------|-----|---|--------------|-----|----|
| 2 | PI178383     | 755 | 3 | ALTAY2000    | 757 | 98 |
| 2 | PI178383     | 755 | 4 | AYTIN98      | 710 | 88 |
| 2 | PI178383     | 755 | 5 | ES14         | 747 | 95 |
| 2 | PI178383     | 755 | 6 | HARMANKAYA99 | 741 | 78 |
| 2 | PI178383     | 755 | 7 | İZGİ01       | 729 | 84 |
| 2 | PI178383     | 755 | 8 | SÖNMEZ2001   | 743 | 79 |
| 3 | ALTAY2000    | 757 | 4 | AYTIN98      | 710 | 89 |
| 3 | ALTAY2000    | 757 | 5 | ES14         | 747 | 95 |
| 3 | ALTAY2000    | 757 | 6 | HARMANKAYA99 | 741 | 77 |
| 3 | ALTAY2000    | 757 | 7 | İZGİ01       | 729 | 82 |
| 3 | ALTAY2000    | 757 | 8 | SÖNMEZ2001   | 743 | 80 |
| 4 | AYTIN98      | 710 | 5 | ES14         | 747 | 92 |
| 4 | AYTIN98      | 710 | 6 | HARMANKAYA99 | 741 | 78 |
| 4 | AYTIN98      | 710 | 7 | İZGİ01       | 729 | 79 |
| 4 | AYTIN98      | 710 | 8 | SÖNMEZ2001   | 743 | 80 |
| 5 | ES14         | 747 | 6 | HARMANKAYA99 | 741 | 77 |
| 5 | ES14         | 747 | 7 | İZGİ01       | 729 | 82 |
| 5 | ES14         | 747 | 8 | SÖNMEZ2001   | 743 | 78 |
| 6 | HARMANKAYA99 | 741 | 7 | İZGİ01       | 729 | 76 |
| 6 | HARMANKAYA99 | 741 | 8 | SÖNMEZ2001   | 743 | 79 |
| 7 | İZGİ01       | 729 | 8 | SÖNMEZ2001   | 743 | 90 |







Şekil 4. 5. E1 primerleri ile yapılan dizi analizi sonuçlarının Jalview programı kullanılarak karşılaştırılması

#### 4. 2. 2. Yr10 Geninin İkinci Eksonunun 2067–3377 (79-1389) bç'lik Kısımının Dizi Analizi

4 çeşide ait (PI178383, Altay2000, Aytın98 ve ES14) 1311 bç'lik bölgenin dizileri (Tablo 4.3) “ClustalW” çoklu dizileme programı kullanılarak karşılaştırıldı (Tablo 4. 4).

Dizi benzerlikleri Jalview programı kullanılarak gösterildi (Şekil 4. 6).

**Tablo 4. 3. 4** çeşide ait 1311 bç'lik bölgenin dizileri

PI178383

ATATCTAGTTGCAAGAGTTGGTGGTGTTCAGCTAAACCTCTTTCTACTA  
TTGACTCAAGACAATTATTCTATCAAAGAATATTTGGAATTGGCGACAAGC  
GTCCCTCTATTTCAGTTGGCTGAAGTAAGTGAGAAAATTTTAGGGAAATGTG  
GCGGAGTACCATTAGCTATCATTACACTGGCTAGTATGTTGGCTGGTAAAA  
AGGAACATGAAATTACATATACTTATTGGTACAAGGTGTACCAATCTATGG  
GTTCTGGGCTAGAAAATAATCCTGGCCTGATGGACATGAGGAGGATACTAC  
ATGTCAGTTACTATGACCTACCTCCAAATCTGAAAACCTTGTTTACTGTATC  
TCAGTTTGTATCCGAAGGATTATAATATTGAAACCAAAGAGTTGATATGGA  
AATGGATAGGCGAAGGATTCATTCATGAAGAGCAAGGGAAGAGCTTGTATG  
AAGTAGGAGAGGATTACATTGCTGAGCTCATAAACAAAAGCTTGGTCCAAC  
CAATGTATATCAATATTGCTAATAAGGCGAGCTCTGTCCGTGTACACGACA  
TGGTGCTTGACCTTATCACTTCCTTGTCAAATGAGGAGAACCTTCTCGCAA  
CATTGGGTGGTCAGCAGACCAGGTCCTGCCAAGTAAGATCCGTGCGATGT  
CTCTCCAAAGCAGTAATGAAGAGGATGTCCAGCCAATGCCAACCATGAGCA  
GCTTGTCCCATGTGAGGTCACTTACTGTGTTTCAGTAAAGACCTCAGTTTGC  
TGTCCGCACTTTTCAGTTTTTCTTGTCTGCGTGCATTGGATTTAAGTGGTT  
GTGAGGAAGTGGGTAATCATCACATGAAGGACATTTGCAATTTATTTCACT  
TGAGGTATCTGAGTCTAGAAGGGACATCTATCACTGAGATCCCAGAAAGAGA  
TAAGCAATCTACGGCTTCTGCAATTGCTAGTCATAAGGTCCACAAAATGA  
AAAAATTTCCATCAACCTTTGTTTCAGCTAGGACAACCTGGTGTTCATTGACA  
TGGGTAATAGGGAAGTCTCTAGATTGCTTCTAAAATCAATGTCCACCTTGC  
CCTCCCTCTCTTCACTTGAATCGGAATAGGAGAAGCTGAGAGAGGAAGACC  
TCCAAATACTTGGGAGCATGCCGTCTCTGCATGACCTCTCTATTGATGTAG  
GTTATTGGGAAAGAGGCAGAGATAAAAGGCTAGTCATGACCAGTGGTCTCC  
CTCCGTTGACAGTATGT

ALTAY2000

CATCTTTGTGCACGAGTTGGTGGTGTCTCATCAGCTTAAACCTCCTTCTACT  
AGTGACTCACGACTCTATTCTATCAAAGAATATTTGGAATTGGCGACAA  
GCGTCCCTCTATTTCAGTTGGCTGAAGTAAGTGAGAAAATTTCTTAGGGAAAT  
GTGGCGGAGTACCATTAGCTATCATTACACTGGCTAGTATGTTGGCTGGTA  
AACAGGAACATGAAAATACGTCGACTGTCTCTCCAAAGCAGTAATGAAGAG  
GATGTCCAGCCAATGCCAACCATGAGCAGCTTGTCCCATGTGAGGTCACTT  
ACTGTGTTTCAGTAAAGACCTCAGTTTGTCTGTCGGCACTTTTCAGTTTTTCTT  
GTCTTGCCTGCATTGGATTTAAGTGGTTGTGAGGAAGTGGGTAATCATCAC  
ATGAAGGACATTTGCAATTTATTTCACTTGGAGTATCTGAGTCTAGAAGGG  
ACATCTATCACTGAGATCCCAGAAAGAGATAAGCAATCTACGGCTTCTGCAA  
TTGCTAGTCATAAGGTCCACAAAATGAAAAATTTCCATCAACCTTTGTT  
CAGCTAGGACAACCTGGTGTTCATTGACATGGGTAATAGGGAAGTCTCTAGA  
TTGCTTCTAAAATCAATGTCCACCTTGCCCTCCCTCTCTTCACTTGAATC  
GGAATAGGAGAAGCTGAGAGAGGAAGACCTCCAAATACTTGGGAGCATGCCG  
TCTCTGCATGACCTCTCTATTGATGTAGGTTATTGGGAAAGAGGCAGAGAT  
AAAAGGCTAGTCATTGACAGTGGTCTCCCTCCGTCTCGGAGTCATTGAA

AYTIN98

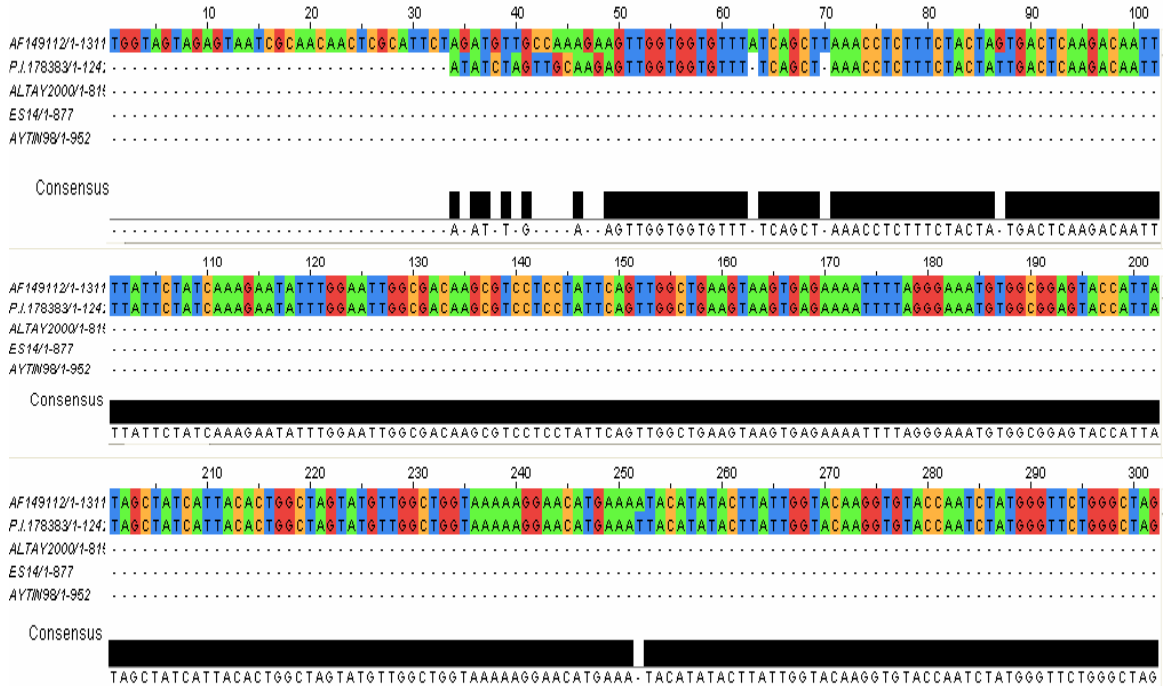
AAACATCTGATGCTGCCAAAGCCAGCTTGGTGGATGCTTCATCCATGCCTT  
ACAACCTCTCCTTCTGCTATCTAAGTAGCACACTCAACGTACCACCTCTATC  
TTCTTAGTCCAACACGAGATATGATTGCGAATACTTGCGCCGCACGAATGT  
CGTCTCCTCTCCGTAATGTCATGCTCTGAGCGTGCACAGCTACAGTTCGAC  
GCAACAACCTTCTACACGCCGCACAACATGACGAGCAGTGCAGCTACCTCAT  
ATTATCCTCTACTCCACTCTAACAGCGTAGCGGACTACGATCAGTGCTATG  
AGCCCAGTGAGTCAACATAGCGACTCTCTCCTCATAAATCAGACGTACAAT  
CACTTAGCTCAGCGAACTGTGAGATAGATACACATACCTCTTAAGTGGCG  
CGTGTCTGTGCAGACTAGAGATCATTAGAACCTAACTTAGGCTATCTGTT  
TTTCGTGTCCGACGTGCATTGAATGTAAGAGCTTGTGAGGAAGGGGTTAAT  
CATCACATGAAGGACGTTTGAATTTATGTCAGTGGAGGTATGTGAGTCTA  
GAAGGGACATCTATCATTGAGATCCCGAAAGAGATAAGCAATCTACGGCTT  
CTGCAATTGCTAGTCATAAGGTCCACAAAAATGAAAAAATTTCCATCAACC  
TTTGTTTCCAGCTAGGACAACCTGGTGTTCATTGACATGGGTAATAGGGAAAGTC  
TCTAGATTGCTTCTAAAATCAATGTCCACCTTGCCCTCCCTCTCTTCACTT  
GCAATCGGAATAGGAGAAGTGGAGAGGAAGACCTCCAAATACTTGGGAGC  
ATGCCGTCTCTGCATGACCTCTCTATTGATGTAAGGGGTTGGGAAAGAGGC  
AGAGATAAAAGGCTAGTCACGACATGTGGTCTCCCTCCGTGTGGTATGTTT  
GTCAGATTCCCTCTTGCCCTCTCTCCGTAGGGT

ES14

CTCACTGTGCAACAGTTGGTGGTGTATCAGCTCCACCTCTTTCACTAGTG  
ACTCAAGACCATTAAAGATCAAAGAATATTTGGAATTGGGGACAAGCGTCC  
CTTTAAACAGTTGGATGAAGTAAGTGAGAAAATTTTAGGGAAATGTGGAGA  
AGTAACATTAGATAATATTACACCGGTAGTATGTTGGATGGTAAAAAGGA  
AAATGAAAATATATATAATTATTGGTAAAAGGTGTATCGCAACATTGGGTG  
GTCAGCAGACCAGGTCAGTCCAAGTAAGATCCGTGACTGTCTCTCCAAA  
GCAGTAATGAAGAGGATGTCCAGCCAATGCCAACCATGAGCAGCTTGTCCC  
ATGTGAGGTCACCTACTGTGTTTCAAGTAAAGACCTCAGTTTGTGTGCGGCAC  
TTTCAGGTTTTCTTGTCTGCGTGCATTGGATTTAAGTGGTTGTGAGGAAG  
TGGGTAATCATCACATGAAGGACATTTGCAATTTATTTCACTTGGAGGTATC  
TGAGTCTAGAAGGGACATCTACTGAGATCCCGAAAGAGATAAGCAATC  
TACGGCTTCTGCAATTGCTAGTCATAAGGTCCACAAAAATGAAAAAATTTT  
CATCAACCTTTGTTTCCAGCTAGGACAACCTGGTGTTCATTGACATGGGTAATA  
GGGAAGTCTCTAGATTGCTTCTAAAATCAATGTCCACCTTGCCCTCCCTCT  
CTTCACTTGCATCGGAATAGGAGAAGTGGAGAGGAAGACCTCCAAATAC  
TTGGGAGCATGCCGTCTCTGCATGACCTCTCTATTGATGTAGATTGTGGGA  
AAGAGGCAGAGATAAAAGGCTAGTCATGACCAGTGGTCTCCCTCCGTCTCG  
ACAGTATGAA

**Tablo 4. 4.** 1311 bç'lik bölge bakımından 4 çeşidin benzerlik oranları

| DiziA | İsim      | Nukleotid | DiziB | İsim      | Nukleotid | Oran |
|-------|-----------|-----------|-------|-----------|-----------|------|
| 1     | AF149112  | 1311      | 2     | PI178383  | 1242      | 97   |
| 1     | AF149112  | 1311      | 3     | ALTAY2000 | 815       | 71   |
| 1     | AF149112  | 1311      | 4     | AYTIN98   | 952       | 45   |
| 1     | AF149112  | 1311      | 5     | ES14      | 877       | 71   |
| 2     | PI178383  | 1242      | 3     | ALTAY2000 | 815       | 70   |
| 2     | PI178383  | 1242      | 4     | AYTIN98   | 952       | 46   |
| 2     | PI178383  | 1242      | 5     | ES14      | 877       | 72   |
| 3     | ALTAY2000 | 815       | 4     | AYTIN98   | 952       | 53   |
| 3     | ALTAY2000 | 815       | 5     | ES14      | 877       | 92   |
| 4     | AYTIN98   | 952       | 5     | ES14      | 877       | 49   |



310 320 330 340 350 360 370 380 390 400  
AF149112/1-1311 AGAAAATAATCCTGGCCTGATGGACATGAGGAGGATACTACATGTCAGTTACTATGACCTACCTCCAAATCTGAAAGACTTGTITACTGTATCTCAGTTTGT  
P.1178383/1-124: AGAAAATAATCCTGGCCTGATGGACATGAGGAGGATACTACATGTCAGTTACTATGACCTACCTCCAAATCTGAAAGACTTGTITACTGTATCTCAGTTTGT  
ALTAY2000/1-81: .....CATCTTTTGTGCACGAGTTGGTG  
ES14/1-877 .....CTCACTGTGCAACAGTTGGTG  
AYTM98/1-952 .....AAACATCTGATGCTGCCAAAGGCCAGCTTGGTGGATG

Consensus



410 420 430 440 450 460 470 480 490 500  
AF149112/1-1311 TA-TCCAGAGGATTATAA...TATTGAAACCAAGAGTTGATATGAAATGGATAGGCGAAGGATTCATTTCATGAAAG-AGCAAAGGGAAGAGCTTGTATGAAAG  
P.1178383/1-124: TA-TCCAGAGGATTATAA...TATTGAAACCAAGAGTTGATATGAAATGGATAGGCGAAGGATTCATTTCATGAAAG-AGCAAAGGGAAGAGCTTGTATGAAAG  
ALTAY2000/1-81: TGGTGCTCATCAGCTTAAACCTCCTTCTACTAGTGAAGTCAAGACACTCTATTCTAT-CAAAGAAAT-ATTTGGAAAT-GGCGACAAGCGTCCCTCATTCAG  
ES14/1-877 TGGTGT-ATCAGCTCCA--CCTCTTTCACTAGTGAAGTCAAGACACTTAAAG--AT-CAAAGAAAT-ATTTGGAAAT-GGCGACAAGCGTCCCTCATTCAG  
AYTM98/1-952 TGGTTCATCCATGCTTACAACTCTCTCTCTGCTATCTAAGTAGCACACTCAACGTACCACCTCATCTTCTTAGTCCAACACGAGATATGATTGCGAATAC

Consensus



510 520 530 540 550 560 570 580 590 600  
AF149112/1-1311 AGTAGGAGAGGATTACATTGCTGAGCTCATAAACAAGAGCTTGGTCCAAACCAATGTATATCAATATTGCTAATAAGGCGAGCTCTGTCGGTGTACACGACAT  
P.1178383/1-124: AGTAGGAGAGGATTACATTGCTGAGCTCATAAACAAGAGCTTGGTCCAAACCAATGTATATCAATATTGCTAATAAGGCGAGCTCTGTCGGTGTACACGACAT  
ALTAY2000/1-81: AGTTGGCT-GAAGTAAGTGAGAAAATTTCTAGGGAATGTGGCGAGTACCAATTAGCTATCATTACACTGGCTAGTATG...TTGGCTGGTAAACAGGA...  
ES14/1-877 AGTTGGAT-GAAGTAAGTGAGAAAATTTCTAGGGAATGTGGCGAGTACCAATTAGATAATATTACACCGGTAGTATG...TTGGATGGTAAACAGGA...  
AYTM98/1-952 ACTTGCGCCGACGAA--TGTCGCTCCTCTCCGTAATGTCATGCTCTGAGCGTGCACAGCTACAGTTC-ACGCAACAACCTTCTACACGG-CGCAACAACAT

Consensus



610 620 630 640 650 660 670 680 690 700  
AF149112/1-1311 ATGGTGCTTGACCTTATCACTTCCCTTGTCAAATGAGGAGAACTTTCTCGCAACATTGGGTGGTTCAGCAG-ACCAGGTCAGTCCAAAGTAAGATCCGTCGACT  
P.1178383/1-124: ATGGTGCTTGACCTTATCACTTCCCTTGTCAAATGAGGAGAACTTTCTCGCAACATTGGGTGGTTCAGCAG-ACCAGGTCAGTCCAAAGTAAGATCCGTCGACT  
ALTAY2000/1-81: .....ACATGAAAAA...CGTCGACT  
ES14/1-877 .....AAATGAAAAATATATAAATATTGGTAAAAGGTGATCGCAACATTGGGTGGTTCAGCAG-ACCAGGTCAGTCCAAAGTAAGATCCGTCGACT  
AYTM98/1-952 ATGACGAGCAGTGCAGCTACCTCATATTATCTCTACTCCACTTAAACGCGTAGCGGACTACGATCAGTCTATGAGCCCAAGTGAAGTCA-ACATAGCGACT

Consensus



710 720 730 740 750 760 770 780 790 800  
AF149112/1-1311 CTGTCTCTCCA--AAGCAGTAATGAAGAGGAT--GTCCAGCCAATGCCAACCATGAGCA-GCTTGTCCCATGTGAGGTCACCTTACTGTGTTTCAGTAAAGACC  
P.1178383/1-124: CTGTCTCTCCA--AAGCAGTAATGAAGAGGAT--GTCCAGCCAATGCCAACCATGAGCA-GCTTGTCCCATGTGAGGTCACCTTACTGTGTTTCAGTAAAGACC  
ALTAY2000/1-81: CTGTCTCTCCA--AAGCAGTAATGAAGAGGAT--GTCCAGCCAATGCCAACCATGAGCA-GCTTGTCCCATGTGAGGTCACCTTACTGTGTTTCAGTAAAGACC  
ES14/1-877 CTGTCTCTCCA--AAGCAGTAATGAAGAGGAT--GTCCAGCCAATGCCAACCATGAGCA-GCTTGTCCCATGTGAGGTCACCTTACTGTGTTTCAGTAAAGACC  
AYTM98/1-952 CTGTCTCTCTAATAATCAGACGTACAATCACTTAGCTCAGCGAACTGTGAGATAGATACACATACCTCTTAAAGTGGCGGTGTCTGTGCGAGACTAGAGATC

Consensus



810 820 830 840 850 860 870 880 890 900  
AF149112/1-1311 CCTC...AGTTTGTCTGCGGCACCTTTCAGGTTTCTTGTCTCTGCGTGCATTGGATTTAAGTGGTTGTGAGGAAAGTGGGTAATCATCACATGAAGGACATTTG  
P.1178383/1-124: CCTC...AGTTTGTCTGCGGCACCTTTCAGGTTTCTTGTCTCTGCGTGCATTGGATTTAAGTGGTTGTGAGGAAAGTGGGTAATCATCACATGAAGGACATTTG  
ALTAY2000/1-81: CCTC...AGTTTGTCTGCGGCACCTTTCAGGTTTCTTGTCTCTGCGTGCATTGGATTTAAGTGGTTGTGAGGAAAGTGGGTAATCATCACATGAAGGACATTTG  
ES14/1-877 CCTC...AGTTTGTCTGCGGCACCTTTCAGGTTTCTTGTCTCTGCGTGCATTGGATTTAAGTGGTTGTGAGGAAAGTGGGTAATCATCACATGAAGGACATTTG  
AYTM98/1-952 TCATTAGAACCTAAACTTAG-CTATCTGTTTTCTGCTCCAGCTGCATTGAATGTAAGAGCTTGTGAGGAAAGGTTAATCATCACATGAAGGACATTTG

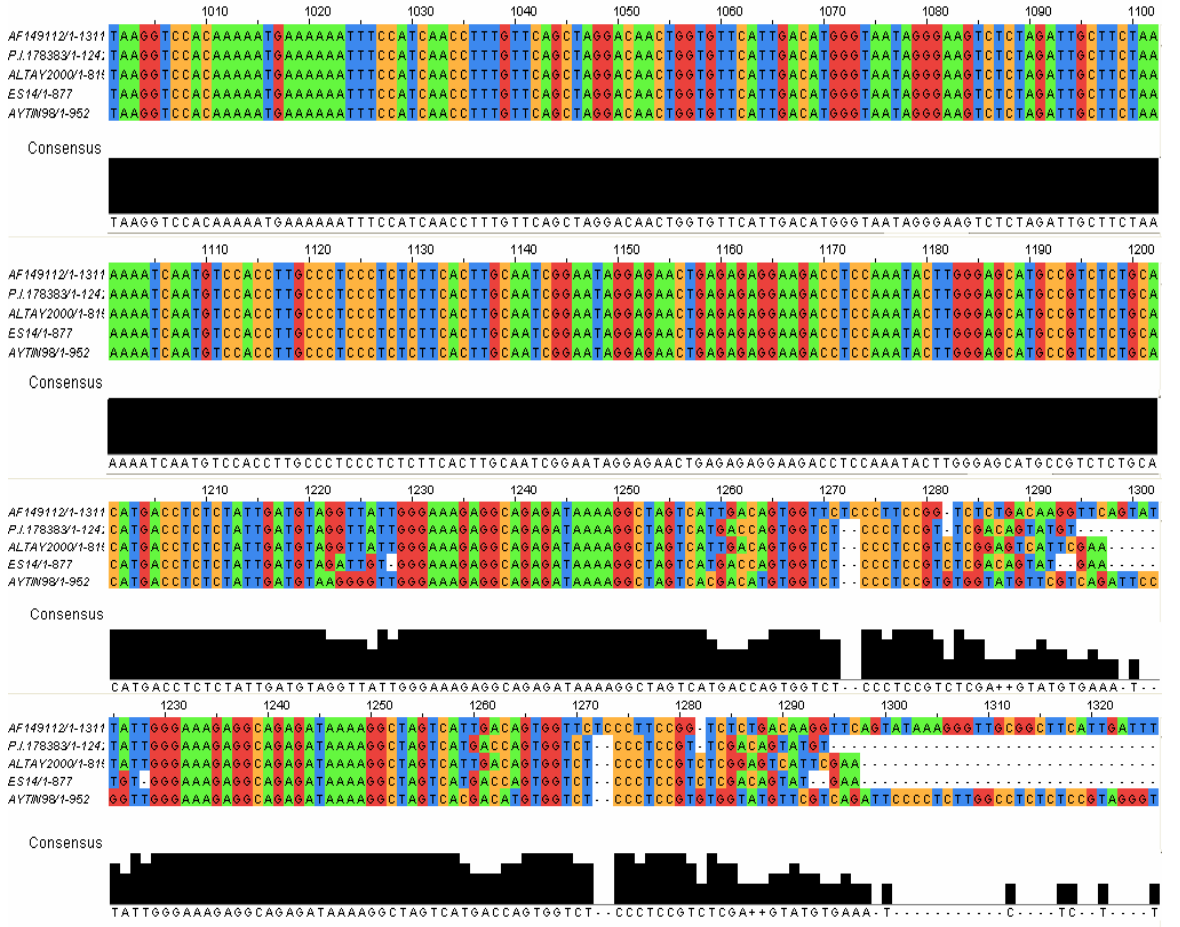
Consensus



910 920 930 940 950 960 970 980 990 1000  
AF149112/1-1311 TGCAATTTATTTCACTTGAAGTATCTGAGTCTAGAAGGGACATCTATCACTGAGATCCCAGAAAGAGATAAGCAATCTACGGCTTCTGCAATTTGCTAGTCATA  
P.1178383/1-124: TGCAATTTATTTCACTTGAAGTATCTGAGTCTAGAAGGGACATCTATCACTGAGATCCCAGAAAGAGATAAGCAATCTACGGCTTCTGCAATTTGCTAGTCATA  
ALTAY2000/1-81: TGCAATTTATTTCACTTGAAGTATCTGAGTCTAGAAGGGACATCTATCACTGAGATCCCAGAAAGAGATAAGCAATCTACGGCTTCTGCAATTTGCTAGTCATA  
ES14/1-877 TGCAATTTATTTCACTTGAAGTATCTGAGTCTAGAAGGGACATCTATCACTGAGATCCCAGAAAGAGATAAGCAATCTACGGCTTCTGCAATTTGCTAGTCATA  
AYTM98/1-952 TGCAATTTATTTCACTTGAAGTATCTGAGTCTAGAAGGGACATCTATCACTTGAAGTCCCAGAAAGAGATAAGCAATCTACGGCTTCTGCAATTTGCTAGTCATA

Consensus





**Şekil 4. 6.** E2 ileri ve E2A geri primerleri ile yapılan dizi analizi sonuçlarının Jalview programı kullanılarak karşılaştırılması

Dizi analizi, birinci ekson bölgesi bakımından Yr10 genine en fazla benzeyen çeşitlerin Altay2000 ve P.I.178383; ikinci ekson bölgesi bakımından Yr10 genine en fazla benzeyen çeşidin ise P.I.178383 olduğunu göstermiştir. Benzerlik oranları incelendiğinde, birinci ekson bölgesi bakımından Yr10 genine en az benzeyen çeşitlerin Harmankaya99, İzgi01 ve Sönmez2001 oluşu göze çarpmaktadır. Bu çalışmadan elde edilen bulgular, (1) Yr10 geninin çalışmada kullanılan tüm çeşitlerde var olduğunu; (2) çeşitler arasındaki farklılığın ikinci ekson bölgesindeki varyasyonlardan kaynaklandığını ve (3) birinci eksonun ikinci eksone oranla daha korunmuş olduğunu göstermektedir.

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Buğday, insanlar tarafından tüketilen en önemli tahıl bitkisi olup, yurdumuzdaki tüm tarımsal alanlarda yetiştirilmektedir. 9.3 milyon hektar ekim alanı ve 21 milyon ton üretimi ile Türkiye, buğday üreten başlıca ülkeler arasında yedinci sıradadır [FAO, 2002]. Tüm dünyada 7000'den fazla türe sahip olan pas mantarları (Uredinales) en fazla kayba yol açan hastalıkların etmenidirler. Pas mantarları, rüzgarla taşınabilen çok sayıda urediniospor üretibildikleri için salgın oluşturma yeteneğine sahiptirler. *Puccinia* cinsinin üyeleri, pirinç dışındaki diğer tahıl bitkilerinde önemli hastalıklara yol açarlar [Hooker, 1967]. *Puccinia striiformis* f.sp. *tritici*'nin neden olduğu sarı pas (çizgi pası) hastalığı, yurdumuzda en sık olarak görülen buğday hastalıklarından biridir. Sarı pas %70'e varan verim kaybına yol açar ve tahıl ürünlerinin kalitesini düşürür [Roelfs ve Bushnell, 1985; De Vallavieille-Pope ve diğ., 1990]. 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 alınmıştır. Ancak fungusitlerin ekolojik açıdan olumsuz etkilerinin oluşu ve sık kullanımın 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].

Sarı pas dayanıklılığı, bitki yetiştirme programlarının başlıca araştırma konularından biridir. Son yıllarda sarı pasa dayanıklılık genlerinin bulunmasına ve genomdaki yerlerinin saptanmasına yönelik çalışmalar yaygınlık kazanmıştır. Japon araştırmacılar tarafından geliştirilen bir buğday veritabanı olan KOMUGI'ye göre (<http://www.shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi>) 40'tan fazla sarı pas dayanıklılık geni bulunmuş, bu genlerin yarıdan fazlasının genomdaki yerleri belirlenmiştir [Christiansen ve diğ., 2006].

Dizisi bilinen ilk sarı pas dayanıklılık geni olan Yr10 geninin (Gen Bankası no: AF149112) varlığına ilk kez yurdumuz kökenli bir ekmeklik buğday çeşidi olan P.I.178383'te rastlanmıştır. Sarı pas hastalığına karşı, bitkinin tüm yaşamı boyunca aktif olan dayanıklılık sağlar. 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. Wang ve diğ. (2002) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, Yr10 geniyle bağlantı gösteren mikrosatellit markırların belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu çalışmada P.I.178383 çeşidi ile Çin kökenli sarı pasa duyarlı bir ekmeklik buğday çeşidi ebeveyn olarak kullanılmıştır. Bu 2 çeşidin çaprazlanması sonucu oluşturulan F<sub>1</sub> bireyinden elde edilen 97 adet F<sub>2</sub> bireyinde, sarı pas dayanıklılığının kalıtımı ve Yr10 genine bağlı mikrosatellit markırların dağılımı incelenmiştir. 1B kromozomunun kısa kolunda bulunan 9 mikrosatellit markırdan 3 tanesi ebeveynler arasında polimorfizm göstermiştir. F<sub>2</sub> bireylerinin dağılımı ve Yr10 geniyle yakın bağlantı gösteren Xpsp3000 markırının PCR sonuçları incelendiğinde, sarı pas dayanıklılığının dominant bir gen (Yr10) tarafından sağlandığı anlaşılmaktadır.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) günümüzde moleküler biyolojide yaygın olarak kullanılan yöntemlerin başında gelmektedir. PCR, ortamdaki DNA molekülleri arasından belirli bir diziyi tanıyan ve hedef diziyi kalıp olarak kullanarak 2 adet oligonükleotidin (primer), DNA molekülünün kopyasının çıkarıldığı bir uygulamadır. Bu uygulama sonunda, hedef dizinin iki ucundan tasarlanan primerlerin arasında kalan bölge çoğaltılmış olur. Tekniğin geliştirilmesine yönelik çalışmaların sonucunda, Saiki ve diğ. (1985) tarafından orak hücre anemisinin teşhisinde kullanılan PCR yönteminin uygulama alanları oldukça genişlemiştir. PCR günümüzde hastalık teşhisi, genetik haritalama, gen anlatımı, genin organizmadaki varlığını saptama ve dizi analizi gibi amaçlarla kullanılmaktadır.

Bu çalışmada, Yr10 geninin 7 farklı ekmeklik buğday çeşidinde varlığı araştırılmıştır. Yr10, 1-833 bç ve 1989-3630 bç uzunluğunda 2 eksondan oluşmaktadır. Birinci ekson (1-833 bç) bölgesinden tasarlanan 1 çift ve ikinci ekson (1989-3630 bç) bölgesinden tasarlanan 2 çift primer kullanılarak PCR gerçekleştirilmiştir. Birinci ekson bölgesinden tasarlanan E1 çifti ve ikinci ekson bölgesinden tasarlanan E2 primer çifti ile tüm



beklenen uzunluktaki çoğaltım ürünlerinin elde edilmesi, Yr10 geninin çalışmada kullanılan tüm çeşitlerde bulunduğunu göstermiştir. İkinci eksonun uç kısmından tasarlanan E2A primer çifti ile 3 çeşitte (Harmankaya99, İzgi01 ve Sönmez2001) tüm PCR optimizasyon çalışmalarına rağmen çoğaltım gözlenmemesi, bu çeşitlerde E2A primerinin çoğalttığı bölge bakımından önemli varyasyonlar olması gerektiği sonucunu düşündürmektedir. E2 ileri ve E2A geri primerleri birlikte kullanılarak gerçekleştirilen PCR sonunda, aynı çeşitlerde çoğaltım ürününün oluşmadığı görüldüğünden, bu durum yukarıda belirtilen çeşitlerde, E2A geri primerinin genomik DNA'ya bağlanmasını engelleyen varyasyonlar olduğu şeklinde açıklanmaktadır.

Bir türün belli bir çeşidinde bulunduğu bilinen bir genin, aynı türün farklı çeşitlerinde de varlığını araştırmaya yönelik çalışmalar gerçekleştirilmektedir. Garde ve diğ. (1999) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, *Lactococcus lactis* ssp *cremoris* ırkında bulunan *acmA* geninin *L. lactis* ssp *lactis* ırkında varlığı araştırılmıştır. *acmA* geninden tasarlanan 2 dizileme primeri ile PCR gerçekleştirildiğinde, bu genin *lactis* ırkında da mevcut olduğu kanıtlanmıştır.

Dizileme, bir makromolekülün karakterizasyonundaki en önemli adımdır. Makromolekülün, protein olduğu durumlarda proteinin yapısındaki amino asitler araştırılırken; DNA dizilemede bazlar incelenir. Rekombinant DNA teknolojisinin ilerlemesiyle, DNA molekülünün dizisi saptanarak, protein ürünün de dizisinin belirlenebileceği anlaşılmıştır. DNA molekülünün dizisini belirledikten sonraki aşama, dizi analizi sonuçlarının dizisi daha önceden bilinen DNA parçalarıyla karşılaştırılmasıdır. Araştırılan dizi “query sequence” bir veritabanına yazılır ve benzer diziler aranır. Dizi benzerliklerinin aranmasında en yaygın olarak kullanılan programların başında BLAST “Basic Local Alignment Search Tool” gelmektedir. BLAST incelemesinde, araştırılan dizinin veritabanındaki dizilerle ikili karşılaştırılması gerçekleştirilir. İki den fazla sayıdaki dizinin karşılaştırılmasının istendiği durumlarda ise Clustal “multiple alignment” çoklu dizileme programı kullanılır [Thompson ve diğ., 1994]. Clustal programı, verilen dizilerin tümünü karşılaştırarak, benzerlik oranlarını ve ortak diziyi oluşturur [Dale ve Von Schantz, 2002]. Jalview ise çoklu dizileme programı olmasına rağmen, ClustalW programından farklı olarak, dizi benzerliklerinin ve farklılıklarının renklerle gösterilmesine olanak tanımaktadır [Clamp ve diğ., 2004].

Jalview programıyla oluşturulan dizi karşılaştırma analizinin altındaki grafik ortak diziyi “consensus sequence” göstermektedir. Karşılaştırma analizinde her baz farklı renkte gösterilmekte iken; ortak dizi grafiğinde bazlar çubuksu yapılar şeklinde belirtilmektedir. Çubuksu yapının en uzun olduğu bölgelerdeki baz, tüm dizilerde aynıdır.

Bu tez çalışmasında, E1 primer çifti ve E2 ileri, E2A geri primerleri kullanılarak oluşturulan çoğaltım ürünlerinin dizi analizi gerçekleştirildi. E1 primer çifti kullanılarak, tüm çeşitlerde elde edilen çoğaltım ürünlerinin dizi analizi sonucunda, Yr10 geninin birinci ekson bölgesine en fazla benzeyen çeşidin sarı pasa dayanıklı olduğu bilinen Altay2000 olduğu anlaşılmıştır. Yr10 geni ile Altay2000 arasındaki benzerlik oranı % 99 iken; Yr10 geni ile P.I.178383 arasındaki benzerlik oranı % 98’dir. Yr10 geninin dizisinin (AF149112) P.I.178383 çeşidinden sağlandığı düşünüldüğünde, P.I.178383 çeşidinin benzerlik oranının Altay2000 çeşidinden daha fazla olması gerekmektedir. Ancak *Taq* polimeraz enziminin PCR sırasında yanlış eşleşmeler yapabilme olasılığı dikkate alınır, bu oran farkının çok önemli olmadığı anlaşılmaktadır. Birinci eksonun dizi analizinden çıkarılan en ilgi çekici sonuç ise; Yr10 genine en az benzerlik gösteren çeşitlerin, E2A primer çifti ile PCR ürünü elde edilemeyen Harmankaya99 (% 77), İzgi01 (% 82) ve Sönmez2001 (% 79) oluşudur. Benzerlik oranları, birinci ekson bölgesinin yüksek oranda korunmuş olarak tüm çeşitlerde bulunduğunu göstermektedir. E2 ileri ve E2A geri primerleri kullanılarak 4 çeşitte (P.I.178383, Altay2000, Aydın98 ve ES14) elde edilen çoğaltım ürünlerinin dizi analizi sonucunda ise; 951-1221 bç arasındaki bölgenin çeşitlerde değişikliğe uğramadığı ve Yr10 geninin ikinci eksonuna en fazla benzeyen çeşidin P.I.178383 olduğu görülmüştür. Çalışma kapsamında gerçekleştirilen PCR ve dizi analizi çalışmaları, Yr10 geninin (AF149112), sarı pasa dayanıklı P.I.17838 ve Altay2000 çeşitleri ile sarı pasa duyarlı ES14 çeşidinde çok iyi korunduğunu, dizi farklılıkları olmasına rağmen dayanıklı İzgi01 ve Sönmez2001 çeşitleri ile duyarlı Aydın98 ve Harmankaya99 çeşitlerinde de bulunduğunu ve çeşitler arasındaki dizi farklılığının ağırlıklı olarak ikinci ekson bölgesinden kaynaklandığını göstermiştir. Bizim çalışmamıza benzer biçimde Garde ve diğ. (1999) tarafından *Lactococcus lactis* bakterisinin *lactis* ve *cremoris* ırklarında gerçekleştirilen çalışmada, *lactis* ve *cremoris* ırklarında oluşturulan PCR ürünlerinin dizi analizi yapılmış ve sonuçlar BLAST

programları kullanılarak *acmA* geninin dizisi ile karşılaştırılmıştır. Fakat bu araştırmacılar inceledikleri gen yönünden bir farklılık izlememişlerdir.

PCR ve dizi analizi yöntemleri, genin varlığının saptanmasında olduğu gibi, değişik tür ve çeşitlerin, genin dizisi bakımından karşılaştırılması ve türlerin sınıflandırılması gibi amaçlarla da kullanılabilir. Woo ve diğ. (2000) Enterobacteriaceae ırkının teşhisinde PCR ve dizi analizi yöntemlerinden yararlanmışlardır. Bir hastanın dışkısında Enterobacteriaceae ailesine ait bir bakteri ırkının varlığı araştırılmış ancak fenotipik yöntemler, izolatanın Enterobacteriaceae ailesinden olduğunu kanıtlayamamıştır. 16S rRNA geninin aynı tür içinde ve aynı cinsin farklı türleri içinde yüksek oranda korunmuş olduğu bilgisinden ve PCR, dizi analizi yöntemlerinden yararlanılarak izolatanın hangi tür olduğu belirlenebilmiştir. 16S rRNA genini çoğaltan primer çifti ile PCR gerçekleştirilmiş ve çoğaltım ürününün dizi analizi yapılmıştır. Biyokimyasal testler izolatanın *Salmonella arizonae* (% 73) ve *Escherichia coli* (% 76) türlerine benzer olduğunu ortaya koymasına karşın; dizi analizi sonucu, *S. typhi*, *S. typhimurium* ve *E. coli* K-12 türlerinin 16S rRNA dizileri ile ClustalW programı kullanılarak karşılaştırıldığında, izolatanın dizisiyle, *E. coli* K-12 ırkının dizisi arasında tek bazın, *Salmonella* türleri ile arasında ise 47-48 bazın farklı olduğunu görülmüştür.

Bu çalışma, Yr10 geninin (AF149112) dizisi kullanılarak varlığının ve varyasyonlarının araştırıldığı ilk çalışma olup; moleküler biyolojide yaygın olarak kullanılan PCR ve dizi analizi yöntemlerinin, Yr10 geninin varlığını ve varyasyonlarını saptamada kullanılabileceğini göstermiştir. Elde edilen bulguların, bu alanda gerçekleştirilecek klasik ıslah uygulamalarına ve moleküler düzeydeki çalışmalara katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

## KAYNAKLAR

- AGRIOS, G., 1988, *Plant Pathology*, 3<sup>rd</sup> edition, Academic Press, London, 0120445638
- ALAM, J., 2004, *Improvement of growth and yield of bread wheat by means of chemical manipulation under glass house conditions*, Yüksek lisans tezi, University of the Free State
- ALBAYRAK, G., 2000, *Nohutta (Cicer arietinum) Antraknoza (Ascochyta rabiei) dirençli ve hassas genotiplerin moleküler markırlarla incelenmesi*, Doktora tezi, İstanbul Üniversitesi
- ANONİM, 1999, FAO Production Yearbook, Rome
- BARIANA, H.S., BROWN, G.N., AHMED, N.U., KHATKAR, S., CONNER, R.L., WELLINGS, C.R., HALEY, S., SHARP, P.J., LAROCHE, A., 2002, Characterization of *Triticum vavilovii*-derived stripe rust resistance using genetic, cytogenetic and molecular analyses and its marker-assisted selection, *Theor. Appl. Genet*, 104, 315–320
- BENDAHMANE, A., KANYUKA, K., BAULCOMBE, D., 1999, The Rx gene from potato controls separate virus resistance and cell death responses, *Plant Cell*, 11, 781-791
- BENT, A.F., 1996, Plant Disease Resistance Genes: Function Meets Structure, *Plant Cell*, 8, 1757-1771
- BOTSTEIN, D., WHITE, R.L., SKOLNICK, M., DAVIS, R.W., 1980, Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms, *Am. J. Hum. Genet*, 32, 314-331
- BOWDEN, R.L., 2001, *Wheat Stripe Rust* [online], Department of plant pathology, Kansas State University, <http://www.oznet.k-state.edu/path-ext/factSheets/Wheat/Wheat%20Stripe%20Rust.asp> [Ziyaret Tarihi: 19 eylül 2006]
- BÖRNER, A., RÖDER, M.S., UNGER, O., MEINEL, A., 2000, The detection and molecular mapping of a major gene for non specific adult plant disease resistance against stripe rust (*Puccinia striiformis*) in wheat, *Theor. Appl. Genet*, 100, 1095–1099
- BRYAN, G.J., COLLINS, A.J., STEPHENSON, P., ORRY, A., SMITH, J.B., GALE, M.D., 1997, Isolation and characterization of microsatellites from hexaploid bread wheat, *Theor Appl Genet*, 94, 557-563

- CHAGUE, V., FAHIMA, T., DAHAN, A., SUN, G.L., KOROL, A.B., RONIN, Y.I., GRAMA, A., RÖDER, M.S., and NEVO, E., 1999, Isolation of microsatellite and RAPD markers flanking the *Yr15* gene of wheat using NILs and bulked segregant analysis, *Genome*, 42, 1050–1056
- CHEN, X.M., 2005, Epidemiology and control of stripe rust [*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*] on wheat, *Can. J. Plant Pathol*, 27, 314–337
- CHEN, X.M., 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 Compair, 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, X.M., LINE, R.F., LEUNG, H., 1998b, Genome scanning for resistance gene analogs in rice, barley, and wheat by high resolution electrophoresis, *Theor. Appl. Genet*, 97, 345–355
- CHEN, X., MARCELO, A.S, GUIPING, Y., JUN, S., DUBCOVSKY, J., 2003, Development of Sequence Tagged Site and Cleaved Amplified Polymorphic Sequence Markers for Wheat Stripe Rust Resistance Gene *Yr5*, *Crop Science*, 43, 2058–2064
- CHRISTIANSEN, M. J., FEENSTRA, B., SKOVGAARD, I.M., ANDERSEN, S.B., 2006, Genetic analysis of resistance to yellow rust in hexaploid wheat using a mixture model for multiple crosses, *Theor Appl Genet*, 112, 581–591
- CLAMP, M., CUFF, J., SEARLE, S. M., BARTON, G. J., 2004, The Jalview Java Alignment Editor, *Bioinformatics*, 20, 426-427
- COMAI, L., MADLUNG, A., 2004, The effect of stress on genome regulation and structure, *Annals of Botany*, 94(4), 481-495
- CONDIT, R., HUBBEL S., 1991, Abundance and DNA sequence of two-base repeat regions in tropical tree genomes, *Genome*, 34, 66-71

CREIGHTON, T.E., 1999, *Encyclopedia of Molecular Biology*, John Wiley & Sons, 0-471-15302-8

CURTIS, B.C., MACPHERSON, H.G., RAJARAM, S., 2002, *Bread Wheat Improvement and Production*, Food and Agriculture Organization of the United Nations, 9251048096

ÇOBANOĞLU, G., 1994, *Arpa genomunun moleküler analizi*, Yüksek lisans tezi, İstanbul Üniversitesi

DALE, J.W., VON SCHANTZ, M., 2002, *From Genes to Genomes: Concepts and Applications of DNA Technology*, John Wiley & Sons, West Sussex, England, 0471497827

DANGL, J.L., DIETRICH, R.A., RICHBERG, M.H., 1996, Death Don't Have No Mercy: Cell Death Programs in Plant-Microbe Interactions, *The Plant Cell*, 8, 1793-1807

DAY, P.R., 1974, *Genetics of Host-Parasite Interaction*, W.H. Freeman & Co, San Francisco, 0716708442

DE VALLAVIELLE-POPE, C., PICARD-FORMERY, H., RADULOVIC, S., JOHNSON, R., 1990, Specific resistance factors to yellow rust in seedlings of some French varieties and pathotypes of *Puccinia striiformis* Westend in France, *Agronomie*, 10, 103-113

DUBCOVSKY, J., 2004, Kişisel görüşme

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

ERIKSEN, L., AFSHARI, F., CHRISTIANSEN, M.J., MCINTOSH, R.A., JAHOR, A., WELLINGS, C.R., 2004, Yr32 for resistance to stripe (yellow) rust present in the wheat cultivar Carstens V, *Theor. Appl. Genet*, 108, 567-575

ERIKSSON, J., HENNING, E., 1896, *Die Getreideroste*, Norsteadt & Soner, Stockholm

ERLICH, H. A., GELFAND, D. H., SAIKI, R. K., 1988, Specific DNA amplification, *Nature* (London), 331, 461-462

FAO, 2002, *Food and Agriculture Organization of the United Nations, Production Yearbook*, Roma, İtalya, 9250049854

FLOR, H.H., 1955, Host-parasite interaction in flax rust-its genetics and other implications, *Phytopathology*, 45, 680-685

FLOR, H.H. 1942, Inheritance pathogenicity in a cross between physiological races 22 and 24 of *Melampsora lini*, *Phytopathology*, 32(5), 653-669

FRICK, M.M., HUEL, R., NYKIFORUK, C.L., CONNER, R.L., KUSYK, A., LAROCHE, A., 1998, Molecular characterisation of a wheat stripe rust resistance gene in Moro wheat. *Proceedings of the 9th International Wheat Genetics Symposium. 2-7 August 1998*, University of Saskatchewan, Saskatoon, University Extension Press, University of Saskatchewan, Saskatoon, Sask., 3, 181-182

GABRIEL, D.W., ROLFE, B.G., 1990, Working models of specific recognition in plant-microbe interactions, *Annu. Rev. Phytopathol*, 28, 365-391

GARDE, S., BABIN, M., GAYA, P., NUNEZ, M., MEDINA, M., 1999, PCR Amplification of the Gene *acmA* Differentiates *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *L. lactis* subsp. *cremoris*, *Appl Environ Microbiol*, 65(11), 5151-5153

GASSMANN, W., HINSCH, M.E., STASKAWICZ, B.J., 1999, The *Arabidopsis* RPS4 bacterial-resistance gene is a member of the TIR-NBS-LRR family of disease-resistance genes, *Plant J*, 20(3), 265-277

GELFAND, D. H., WHITE, T. J. 1990, *PCR Protocols*, Academic, New York

GOODMAN, R.N., NOVACKY, A.J., 1994, *The hypersensitive response in plants to pathogens*, Amer Phytopathological Society, St Paul, 0890541655

GUPTA, P. K., VARSHNEY, R. K., SHARMA, P. C., RAMESH, B., 1999, Molecular markers and their applications in wheat breeding, *Plant Breeding*, 118, 369-390

HAMMOND-KOSACK, K.E., JONES, J.D.G., 1996, Resistance Gene-Dependent Plant Defense Responses, *Plant Cell*, 8, 1773-1791

HAMMOND-KOSACK, K.E., JONES, J.D.G., 1997, Plant Disease Resistance Genes, *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecu*, 48, 575-607

HARLAN, J.R., ZOHARY, D., 1966, Distribution of wild wheats and barley, *Science*, 4, 1074-1079

HOOKER, A.L., 1967, The genetics and expression of resistance in plants to rusts of the genus *Puccinia*, *Annu Rev Phytopathol*, 5, 163-182

HU, J., QUIROS, C.F., 1991, Identification of broccoli and cauliflower cultivars with RAPD markers, *Plant Cell Reports*, 10, 505-511

HYLANDER, N., JORSTAD, I., NANNFELDT, J.A., 1953, Enumeratio uredinearum Scandinavicarum, *Opera Bot.*, 1, 1-102

- JOPPA, L.R., 1993, Chromosome engineering in tetraploid wheat, *Crop Science*, 33, 908-913
- JORGENSEN, J.H., 1991, *Integrated control of cereal mildews: Virulence patterns and their change*, Riso National Laboratory, Roskilde, Denmark
- KANAZIN, V., MAREK, L.F., SHOEMAKER, R.C., 1996, Resistance gene analogs are conserved and clustered in soybean, *Proc Natl Acad Sci USA*, 93, 11746-11750
- KOBE, B., DEISENHOFER, J., 1993, Crystal structure of porcine ribonuclease inhibitor, a protein with leucine-rich repeats, *Nature*, 366, 751-756
- KORZUN, V., 2003, Molecular markers and their applications in cereals breeding, *Marker assisted selection: A fast track to increase genetic gain in plant and animal breeding?*, 17-18 Ekim 2003 Turin, The University of Turin, Food and Agriculture Organization of the United Nations
- LAWYER, F. C., STOFFEL, S., SAIKI, R., MYAMBO, K., DRUMMOND, R., GELFAND, D. H., 1989, Isolation, characterization and expression in *Escherichia coli* of the DNA polymerase gene from *Thermus aquaticus*, *J. Biol. Chem*, 264, 6427-6437
- LEISTER, D., BALLVORA, A., SALAMINI, F., GEBHARDT, C., 1996, A PCR-based approach for isolating pathogen resistance genes from potato with a potential for wide application in plants, *Nature Genet*, 14, 421-429
- LEONARD, W.H., MARTIN, J.H., 1963, *Cereal Crops*, MacMillan Publishing, New York, USA
- 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
- 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
- LUO, M., CARSON, M., LI, S., LIN, G., SCHORMANN, N., SYMERSKY, J., 2003, Structural Genomics of *Caenorhabditis Elegans*: Crystal Structure of the Tropomodulin C-Terminal Domain, *PROTEINS: Structure, Function, and Genetics*, 53, 947-949
- MA, J., ZHOU, R., DONG, Y., WANG, L., WANG, X., JIA, J., 2001, Molecular mapping and detection of the yellow rust resistance gene Yr26 in wheat transferred from *Triticum turgidum* L. using microsatellite markers, *Euphytica*, 120, 219-226
- MACKILL, D.J., 1995, Classifying japonica rice cultivars with RAPD markers, *Crop Science*, 35, 889-894



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, *Theor Appl Genet*, 110, 1401–1409

McDOWELL, J.M., DHANDAYDHAM, M., LONG, T.A., AARTS, M.G.M., GOFF, S., HOLUB, E.B., DANGL, J.L., 1998, Intragenic recombination and diversifying selection contribute to the evolution of downy mildew resistance at the RPP8 locus of *Arabidopsis*, *Plant Cell*, 10, 1861-1874

McINTOSH, R.A., DEVOS, K.M., DUBCOVSKY, J., ROGERS, W.J. 2004, *Catalogue of gene symbols for wheat: 2004 supplement* [online], <http://grain.jouy.inra.fr/ggpages/wgc/2004upd.html> [Ziyaret tarihi: 31 Aralık 2004]

MICHELMORE, R., 1996, Flood warning-resistance genes unleashed, *Nature Genet*, 14, 376-378

MILNER, M., SCRIMSHAW, N., WANG, D.I.C., 1978, *Protein Resources and Technology*, AVI Publishing, Westport, USA

MOHAN, M., NAIR, S., BHAGWAT, A., KRISHNA, T.G., YANO, M., 1997, Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants, *Molecular Breeding*, 3, 87-103

MORI, M., HOSAKA, K., UMEMURA, Y., KANEDA, C., 1993, Rapid identification of Japanese potato cultivars by RAPDs, *Jpn. J. Genet*, 68, 167-174

ÖZCAN, S., BABAOĞLU, M., GÜREL, E., 2004, *Bitki Biyoteknolojisi Cilt 2 Genetik mühendisliği ve uygulamaları*, 2. basım, Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları, Konya, 975-6652-03-9

PENG, J.H., FAHIMA, T., RODER, M.S., HUANG, Q.Y., DAHAN, A., LI, Y.C., GRAMA, A., NEVO, E., 2000, High-density molecular map of chromosome region harboring stripe-rust resistance genes YrH52 and Yr15 derived from wild emmer wheat, *Triticum dicoccoides*, *Genetica (The Hague)*, 109, 199–210

PLASCHKE, J., GANAL, M.W., RÖDER, M.S., 1995, Detection of genetic diversity in closely related bread wheat using microsatellite markers, *Theor Appl Genet*, 91, 1001-1007

PRYOR, T., 1987, The origin and structure of fungal disease resistance genes in plants, *TIG*, 3(6), 157-161

ROBERT, O., ABELARD, C., DEDRYVER, F., 1999, Identification of molecular markers for the detection of the yellow rust resistance gene Yr17 in wheat, *Mol. Breed*, 5, 167–175

ROELFS, A.P., BUSHNELL, W.R., 1985, *The cereal Rusts Vol 2 Disease, Distribution, Epidemiology and Control*, Academic Press, Orlando, USA

- ROELFS, A.P., HUERTA-ESPINO, J., MARSHALL, D., 1992, Barley stripe rust in Texas, *Plant Dis.*, 76, 538
- ROSE, E.A., 1991, Applications of the polymerase chain reaction to genome analysis, *FASEB*, 5(1), 46-54
- RÖDER, M., PLASCHKE, S.U., KOENING, BÖRNER, A., SORRELS, M.E., TANKSLEY, S.D., GANAL, M.W., 1995, Abundance, variability and chromosomal location of microsatellites in wheat, *Mol Gen Genet*, 246, 327-333
- SAGHAI MAROOF, M.A., BIYASHEV, R.M., YANG, G.P., ZHANG, Q., ALLARD, R.W., 1994, Extraordinarily polymorphic microsatellite DNA in barley: species diversity, chromosomal locations and population dynamics, *Proc Natl Acad Sci USA*, 91, 5466-5470
- SAIKI, R. K., GELFAND, D. H., STOFFEL, S., SCHARF, S. J., HIGUCHI, R., HORN, G. T., MULLIS, K. B., ERLICH, H. A., 1988, Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase, *Science*, 293, 487-491
- SAIKI, R. K., SCHARF, S., FALOONA, F., MULLIS, K. B., HORN, G. T., ERLICH, H. A., ARNHEIM, N., 1985, Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia, *Science*, 230, 1350-1354
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T., 1989, *Molecular Cloning: A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 0879693096
- SEAH, S., BARIANA, H., JAHIER, J., SIVASITHAMPARAM, K., LAGUDAH, E.S., 2001, The introgressed segment carrying rust resistance genes Yr17, Lr37 and Sr38 in wheat can be assayed by a cloned disease resistance gene-like sequence, *Theor. Appl. Genet*, 102, 600–605
- SHAO, Y.T., NIU, Y.C., ZHU, L.H., ZHAI, W.X., XU, S.C., WU, L.R., 2001, Identification of an AFLP marker linked to the stripe rust resistance gene Yr10 in wheat, *Chin. Sci. Bull*, 46, 1466–1469
- SHI, Z.X., CHEN, X.M., LINE, R.F., LEUNG, H., WELLINGS, C.R., 2001, Development of resistance gene analog polymorphism markers for the Yr9 gene resistance to wheat stripe rust, *Genome*, 44, 509–516
- 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
- SMITH, P.H., KOEBNER, R.M.D., BOYD, L.A., 2002, The development of a STS marker linked to a yellow rust resistance derived from the wheat cultivar Moro, *Theor. Appl. Genet*, 104, 1278–1282

- SONG, W., HENRY, R.J., 1995, Molecular analysis of the DNA polymorphism of wild barley (*Hordeum spontaneum*) germplasm using the polymerase chain reaction, *Genetic Resources and Crop Evolution*, 42(3), 273-280
- STACKMAN, E.C., 1915, Relation between *Puccinia graminis* and plant highly resistance to its attack, *J. Agric. Res*, 4, 193-199
- STAUB, J.E., SERQUEN, F.C., GUPTA, M., 1996, Genetic markers, map construction and their application in plant breeding, *Hort Science*, 31(5), 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
- SUENAGA, K., SINGH, R.P., HUERTA-ESPINO, J., WILLIAM, H.M., 2003, Microsatellite markers for genes Lr34/Yr18 and other quantitative trait loci for leaf rust and stripe rust resistance in bread wheat, *Phytopathology*, 93, 881-890
- SUN, Q., WEI, Y., NI, C., XIE, C., YANG, T., 2002, Microsatellite marker for yellow rust resistance gene Yr5 introgressed from spelt wheat, *Plant Breed*, 121, 539-541
- TAI, T.H., DAHLBECK, D., CLARK, E.T., GAJIWALA, P., PASION, R., WHALEN, M.C., STALL, R.E., STASKAWICZ, B.J., 1999, Expression of the Bs2 pepper gene confers resistance to bacterial spot disease in tomato, *Proc Natl Acad Sci USA*, 96, 14153-14158
- TAMELING, W.I.L., ELZINGA, S.D.J., DARMIN, P.S., VOSSEN, J.H., TAKKEN, F.L.W., HARLING, M.A., CORNELISSEN, B., 2002, The tomato R gene products I-2 and Mi-1 are functional ATP binding proteins with ATPase activity, *Plant Cell*, 14, 2929-2939
- TANABE, T., CHAMAILLARD, M., OGURA, Y., ZHU, L., QIU, S., MASUMOTO, J., GHOSH, P., MORAN, A., PREDERGAST, M.M., TROMP, G., 2004, Regulatory regions and critical residues of NOD2 involved in muramyl dipeptide recognition, *EMBO J*, 7, 1587-1597
- THOMPSON, J.D., HIGGINS, D.G., GIBSON, T.J., 1994, CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice, *Nucleic Acids Res*, 22, 4673-4680
- UNCUOĞLU, A.A., 2001, *Arpa (Hordeum vulgare L.) ve buğday (Triticum aestivum L.)'da kuraklığa dirençli bitkilerin biyoteknolojik yöntemlerle tanımlanması*, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi
- 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

WALTON, J.D., 1996. Host-selective toxins: agents of compatibility, *Plant Cell*, 8, 1723-1733

WANG, L.F., MA, J.X., ZHOU, R.H., WANG, X.M, JIA, J.Z., 2002, Molecular tagging of the yellow rust resistance gene Yr10 in common wheat, P.I.178383 (*Triticum aestivum* L.), *Euphytica*, 124, 71-73

WANG, Z.X., YANO, M., YAMANOUCHI, U., IWAMOTO, M., MONNA, L., HAYASAKA, H., KATAYOSE, Y., SASAKI, T., 1999, The Pib gene for rice blast resistance belongs to the nucleotide binding and leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes, *Plant J*, 19, 55-64

WEINING, S., LANGRIDGE, P., 1991, Identification and mapping of polymorphisms in cereals based on the polymerase chain reaction, *Theor Appl Genet*, 82(2), 209-216

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

WOO, P.C.Y., LEUNG, P.K.L., LEUNG, K.W., YUEN, K.Y., 2000, Identification by 16S ribosomal RNA gene sequencing of an Enterobacteriaceae species from a bone marrow transplant recipient, *J Clin Pathol: Mol Pathol*, 53, 211-215

YAN, G.P., CHEN, X.M., LINE, R.F., WELLINGS, C.R., 2003, Resistance gene analog polymorphism markers co-segregating with the Yr5 gene for resistance to wheat stripe rust, *Theor. Appl. Genet*, 106, 636-643

YU, Y.G., BUSS, G.R., MAROOF, M.A.S., 1996, Isolation of a superfamily of candidate disease-resistance genes in soybean based on a conserved nucleotide-binding site, *Proc Natl Acad Sci USA*, 93, 11751-11756

ZAKARI, A., MCINTOSH, R.A., HOVMOLLER, M.S., WELLINGS, C.R., SHARIFLOU, M.R., HAYDEN, M., BARIANA, H.S., 2003, Recombination of Yr15 and Yr24 in chromosome 1BS. *Proceedings of 10th International Wheat Genetics Symposium*. 1-5 September 2003, Rome, Italy. Istituto Sperimentale per la Cerealcoltura, Rome, Italy. 1, 417-420

## **ÖZGEÇMİŞ**

1983 yılında İstanbul'da doğdum. İlk öğrenimimi Sarıyer İlköğretim Okulu'nda tamamladıktan sonra, 1993 yılında girdiğim Vefa Anadolu Lisesi'nden 2000 yılında mezun oldum. 2000 yılında girdiğim İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden 2004 yılında mezun oldum ve İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nün açtığı yüksek lisans sınavını kazanarak, 2004 yılında Prof. Dr. Nermin GÖZÜKIRMIZI'nın danışmanlığında yüksek lisans eğitimime başladım.

