

T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SARI PAS HASTALIĞINA DAYANIKLI VE DUYARLI
EKMEKLİK BUĞDAY (*Triticum aestivum* L.)
ÇEŞİTLERİNDE DNA METİLASYON
POLİMORFİZMİNİN İNCELENMESİ

Dilek TOK

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
BİYOLOJİ PROGRAMI

DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. Yıldız AYDIN

II. DANIŞMAN
Doç. Dr. Ahu ALTINKUT UNCUOĞLU

İSTANBUL 2010

**T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**SARI PAS HASTALIĞINA DAYANIKLI VE DUYARLI
EKMEKLİK BUĞDAY (*Triticum aestivum* L.)
ÇEŞİTLERİNDE DNA METİLASYON
POLİMORFİZMİNİN İNCELENMESİ**

**Dilek TOK
(141100620070155)**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
BİYOLOJİ PROGRAMI**

**DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. Yıldız AYDIN**

**II. DANIŞMAN
Doç. Dr. Ahu ALTINKUT UNCUOĞLU**

İSTANBUL 2010

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmam boyunca engin bilgi ve ilgisi ile hep yanımda olan, bana moleküler biyolojiyi sevdiren ve kendisiyle çalışma şansı tanıyan, değerli bilgileri ile yolumu aydınlatan ve beni hep destekleyen danışmanım çok değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Yıldız AYDIN'a, tez çalışmamın TÜBİTAK, Marmara Araştırma Merkezi, Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü Bitki Biyoteknolojisi Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmesini sağlayan, bu süreç içerisinde her türlü değerli bilgi ve deneyimlerini bana aktaran ve büyük katkılarıyla bana yol gösteren, ikinci danışmanım çok değerli hocam Doç. Dr. Ahu ALTINKUT UNCUOĞLU'na teşekkürü bir borç bilirim.

Tezimin hazırlanması sırasında yardımlarını esirgemeyen ve bilgilerini benimle paylaşan Dr. Funda Şentürk-Akfırat'a, deneysel çalışmalarımda teknik konularda beni yönlendiren Dr. Ayşen YUMURTACI'ya, her konuda olduğu gibi tezim konusunda da samimi yardımlarını gördüğüm çok sevgili hocalarım Dr. Fahriye ERTUĞRUL ve Dr. Semra Hasançebi'ye, her alanda bilgisini benimle paylaşan arkadaşım Özge KARAKAŞ' a, tezimin her aşamasında bana yardımcı olan öğrenci arkadaşlarım Handan Balta, Ezgi Çabuk Şahin ve Duygu Sevinç'e ve TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi, Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü Bitki Biyoteknolojisi Laboratuvarı'nda çalışan teknisyenlerimiz Konca Bulut ve Rahmi Büyükkeskin'e verdikleri her türlü destek için teşekkürü bir borç bilirim. Ayrıca, her koşulda maddi ve manevi desteğini esirgemeyerek hep yanımda olan anneme, kardeşime, teyzeme ve beni yalnız bırakmayan Eser Togay Tibet'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışması, TÜBİTAK, Marmara Araştırma Merkezi, Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü, Bitki Biyoteknolojisi Laboratuvarı'nda yürütülmekte olan TÜBİTAK KAMAG tarafından desteklenen TARAL 1007-105G075 numaralı ve Marmara Üniversitesi, BAPKO, FEN-C-YLP-110908-0231 numaralı projeler tarafından desteklenmiştir.

Mayıs, 2010

Dilek TOK

İÇİNDEKİLER

	<u>SAYFA NO</u>
TEŞEKKÜR.....	i
ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vi
SEMBOLLER.....	vii
KISALTMALAR.....	viii
ŞEKİLLER.....	x
TABLolar	xiii
BÖLÜM I. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
I.1. GİRİŞ.....	1
I.2. AMAÇ.....	3
BÖLÜM II. GENEL BİLGİLER.....	4
II.1. BUĞDAYIN ÖNEMİ.....	4
II.2. SARI PAS ETMENİ <i>Puccinia striiformis</i> f. sp. <i>tritici</i>	6
II.3. PAS HASTALIKLARI İLE MÜCADELEDE MOLEKÜLER MARKÖRE DAYALI SEÇİLİMİN ÖNEMİ.....	12
II.4. GENETİK MARKÖRLER.....	13
II.4.1. Morfolojik Markörler.....	13
II.4.2. Biyokimyasal Markörler.....	13
II.4.3. Moleküler Markörler (DNA Markörleri).....	14
II.4.3.1. Hibridizasyona Dayanan Moleküler Markörler.....	14
II.4.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Kullanımına Dayanan Moleküler Markörler.....	15
II.4.3.3. DNA Dizi ve Çip (Mikroarray) Teknolojisine Dayanan Moleküler Markörler.....	27
II.5. BİTKİLERDE EPİGENETİK KALITIM.....	27
II.5.1. Histon Modifikasyonları.....	28

II.5.2. DNA Metilasyonu.....	29
II.5.3. DNA Metilasyonunun Değerlendirilmesinde Kullanılan Yöntemler.....	34
BÖLÜM III. TEZ ÇALIŞMALARI.....	40
III.1. BİTKİ MATERYALİ.....	40
III.2. DNA İZOLASYONU.....	43
III.3. “BULK SEGREGASYON ANALİZLERİNDE” KULLANILACAK GENOMİK DNA KARIŞIMLARININ HAZIRLANMASI.....	46
III.4. SARI PAS HASTALIĞINA KARŞI DAYANIKLI VE DUYARLI BUĞDAY ÇEŞİTLERİ İLE YAPILAN RAPD ANALİZLERİ.....	48
III.4.1. Sarı Pas Hastalığına Karşı Dayanıklı ve Duyarlı Buğday Çeşitlerine Ait Anaçlar ile Yapılan RAPD Analizleri....	48
III.4.1.1. PZR Koşulları.....	50
III.4.1.2. PZR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforez Analizleri.....	51
III.4.2. Sarı Pas Hastalığına Karşı Dayanıklı ve Duyarlı Buğday Çeşitlerine Ait F ₂ Karışımları ile Yapılan RAPD Analizleri.....	52
III.5. SARI PAS HASTALIĞINA KARŞI DAYANIKLI VE DUYARLI BUĞDAY ÇEŞİTLERİNDE RAPD MARKÖRLERİ KULLANILARAK YAPILAN CRED-RA ANALİZLERİ.....	53
III.5.1. Sarı Pas Hastalığına Karşı Dayanıklı ve Duyarlı Buğday Çeşitlerine Ait Anaçlarda Yapılan CRED-RA Analizler.....	53
III.5.1.1. PZR Koşulları.....	54
III.5.2. Sarı Pas Hastalığına Karşı Dayanıklı ve Duyarlı Buğday Çeşitlerine Ait F ₂ Karışımlarında Yapılan CRED-RA Analizleri.....	54
BÖLÜM IV. SONUÇLAR ve TARTIŞMA.....	56

IV.1. DNA İZOLASYONU.....	56
IV.2. “BULK SEGREGASYON ANALİZİNDE” KULLANILAN F₂ KARIŞIM (BULK) DNA’LARI VE SULANDIRIM ORANLARI.....	56
IV.3. SARI PAS HASTALIĞINA DAYANIKLI VE DUYARLI BUĞDAY ÇEŞİTLERİ İLE YAPILAN RAPD ANALİZ SONUÇLARI.....	57
IV.3.1. Sarı Pas Hastalığına Karşı Dayanıklı ve Duyarlı Buğday Çeşitlerine Ait Anaçlar ile Yapılan RAPD Analiz Sonuçları.....	57
IV.3.2. Sarı Pas Hastalığına Karşı Dayanıklı ve Duyarlı Buğday Çeşitlerine Ait F₂ karışımların ile Yapılan RAPD Analiz Sonuçları.....	63
IV.4. SARI PAS HASTALIĞINA KARŞI DAYANIKLI VE DUYARLI BUĞDAY ÇEŞİTLERİNDE RAPD MARKÖRLERİ KULLANILARAK YAPILAN CRED-RA ANALİZ SONUÇLARI.....	66
IV.4.1. Sarı Pas Hastalığına Karşı Dayanıklı ve Duyarlı Buğday Çeşitlerine Ait Anaçlar ile Yapılan CRED-RA Analiz Sonuçları.....	66
IV.4.2. Sarı Pas Hastalığına Karşı Dayanıklı ve Duyarlı Buğday Çeşitlerine Ait Anaçlar ile Yapılan CRED-RA Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	69
IV.4.3. Sarı Pas Hastalığına Karşı Dayanıklı ve Duyarlı Buğday Çeşitlerine Ait F₂ Karışımları ile Yapılan CRED-RA Analiz Sonuçları.....	76
IV.4.4. Sarı Pas Hastalığına Karşı Dayanıklı ve Duyarlı Buğday Çeşitlerine Ait F₂ Karışımları ile Yapılan CRED-RA Analizleri Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	76
BÖLÜM V. SON DEĞERLENDİRMELER ve ÖNERİLER.....	97
KAYNAKLAR.....	102
ÖZGEÇMİŞ.....	116

ÖZET

SARI PAS HASTALIĞINA DAYANIKLI VE DUYARLI EKMEKLİK BUĞDAY (*Triticum aestivum* L.) ÇEŞİTLERİNDE DNA METİLYASYON POLİMORFİZMİNİN İNCELENMESİ

Klasik ıslah çalışmalarının çok maliyetli olması, uzun zaman alması ve fazla işgücü gerektirmesi nedeniyle, moleküler ıslah çalışmaları son yıllarda hız kazanmıştır. Özellikle, tarımsal açıdan önemli yeni moleküler markörlerin geliştirilmesi, bitki ıslah programlarına uygun genotiplerin seçimi ve genotiplerin birbirine yakınlık ve uzaklık matrislerinin oluşturulması açısından son derece önemlidir. Bu tez çalışmasında; sarı pas hastalığına dayanıklı ve duyarlı anaç genotipler (PI178383, Harmankaya99, İzgi01, ES14, Sönmez2001, Aytın98) ve F₂ bireyleri, 50 RAPD primeri kullanılarak taranmıştır. Anaçlar arasında polimorfik olduğu gözlemlenen 45 adet RAPD primeri kullanılarak PI178383 x Harmankaya99, İzgi01 x ES14 ve Sönmez2001 x Aytın98 kombinasyonlarında Bulk Segregasyon Analizleri yapılmıştır. Ayrıca, DNA metilasyon polimorfizmini belirlemek amacıyla CRED-RA tekniği yardımıyla, RAPD analizlerinde kullanılan 50 adet primeri ile aynı çeşit genotipler polimeraz zincir reaksiyonuna tabi tutulmuştur. CRED-RA analizleri sonucunda anaçlar arasında polimorfik olarak belirlenen 50 adet primer, yine aynı koşullar altında PI178383 x Harmankaya99, İzgi01 x ES14 ve Sönmez2001 x Aytın98 kombinasyonlarında Bulk Segregasyon Analizleri'nde de kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar, DNA metilasyon polimorfizmi ve epigenetik markör olasılığı açısından değerlendirilmiştir. Bu verilere göre, DNA metilasyon polimorfizmi oranının en fazla PI178383 x Harmankaya99 kombinasyonunda, en az ise İzgi01 x ES14 kombinasyonunda olduğu görülmüştür. Epigenetik markör olma olasılığının ise Sönmez2001 x Aytın98 kombinasyonunda en fazla, PI178383 x Harmankaya99 kombinasyonunda ise en az olduğu belirlenmiştir. Her iki değerlendirme sonucunda da sarı pas hastalığı dayanıklılık kaynağı ile genetik olarak bağlantı gösteren bir markör elde edilememiştir.

Mayıs, 2010

Dilek TOK

ABSTRACT
INVESTIGATIONS OF DNA METHYLATION
POLYMORPHISM IN TOLERANT AND SUSCEPTIBLE BREAD
WHEAT (*Triticum aestivum* L.) CULTIVARS FOR YELLOW
RUST DISEASE

Molecular breeding studies, runs up in late years because of classis breeding studies are very expensive, have very long times and too much reproductive power. Particularly, the development of molecular markers associated with important agricultural traits, is extremely important selection of consistant genotypes to plant breeding programs and generating the distance/similarity matrixes among genotypes. In this thesis study, yellow rust disease resistant and susceptible (PI178383, Harmankaya99, İzgi2001, ES14, Sönmez2001, Aytın98) parent genotypes and their F₂ individuals were screened by 50 RAPD primers. Bulk Segregation Analyses were performed in PI178383 x Harmankaya99, İzgi01 x ES14 ve Sönmez2001 x Aytın98 combinations with 45 RAPD primers that observed polymorphic between parents. 50 RAPD primers were also used in RAPD analyses, which were used in PCR with the same genotypes by CRED-RA technique for determining the DNA methylation polymorphism. CRED-RA analyses results identified as polymorphic between the rootstocks of 50 primers were also used again in PI178383 x Harmankaya99, İzgi01 x ES14 ve Sönmez2001 x Aytın98 combinations in bulk segregation analyses under the same conditions. The obtained results were evaluated in terms of DNA methylation polymorphism and epigenetic marker. Based on these data, the highest DNA methylation polymorphism ratio was observed in PI178383 x Harmankaya99 combination, the lowest DNA methylation polymorphism ratio was observed in İzgi01 x ES14 combination. The most epigenetic marker are likely to be in Sönmez2001 x Aytın98 combination, the least in PI178383 x Harmankaya99 combination was determined. A marker that genetic linkage resistant genes of stripe rust disease could not be obtained at the end of the assessment results in both.

May, 2010

Dilek TOK

SEMBOLLER

cm	: Santimetre
CO₂	: Karbondioksit
EtOH	: Etanol
g	: Gram
Hg	: Hektogram
Kg	: Kilogram
Ha	: Hektar
HCl	: Hidroklorik asit
MgCl₂	: Magnezyum klorür
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
NaAcO₄	: Sodyum asetat
ng	: Nanogram
nm	: Nanometre
U	: Unit
µl	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar
°C	: Santigrat derece
%	: Yüzde

KISALTMALAR

AFLP	: Amplified Fragment Length Polymorphism, oğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi
AP-PZR	: Rastgele Düzenlenmiş PZR, Arbitrarily Primed PZR”)
bç	: Baz ifti
BSA	: Bulk Segregation Analysis, Bulk Segregasyon Analizi
C	: Sitozin
CAPS	: Cleaved Amplified Polymorphic Sequence, oğaltılmış Kesilmiş Polimorfik Dizi
COBRA	: Combined Bisulphite Restriction Analysis, Karışık Bisulfit Restriksiyon Analizi
CpG	: Sitozin fosfo Guanin
CRED-RA	: Coupled Restriction Enzyme Digestion - Random Amplification, ift Restriksiyon Enzim Kesimi - Rastgele ođaltım
DAF	: DNA Parmakizi oğaltımı, DNA Amplification Fingerprinting”)
DNA	: Deoksiribonkleikasit
dNTP	: Dinkleotid tri fosfat
DArT	: Diversity Arrays Technology, Diversity Array Teknoloji
EDTA	: Etilen diamin tetraasetik asit
EST	: Expressed Sequence Tags, İfade Edilen Dizi Etiketleri
FAO	: Food and Agricultural Organization
HR	: Hypersensitive Response, Aşırı Duyarlı Yanıt
ISSR	: Inter Simple Sequence Repeat, Basit Dizi Tekrarları Arası Bölgeler
MAS	: Marker Assisted Selection, Marköre Dayalı Seçilim
MSAP	: Methylation-Sensitive Amplified Polymorphism, Metilasyona Duyarlı oğaltım Polimorfizmi
PZR	: Polymerase Chain Reaction, Polimeraz Zincir Reaksiyonu
QTL	: Quantitative Trait Loci, Kantitatif Karakterlerin Aktarımı
R	: Resistant, Dayanıklı

RAPD	: Randomly Amplified Polymorphic DNA, Rasgele oğaltılmış Polimorfik DNA
RFLP	: Restriction Fragment Length Polymorphism, Kesilmiş Para Uzunluk Polimorfizmi
RNA	: Ribonkleikasit
SCARs	: Sequence Characterized Amplified Regions, Dizisi Karakterize Edilmiş oğaltılmış Bölgeler
SNP	: Single Nucleotide Polymorphism, Tek Nükleotit Polimorfizmi
SSR	: Simple Sequence Repeat, Basit Dizi Tekrarı
STS	: Sequence Tagged Sites, Dizisi Etiketlenmiş Alan
T_a	: Annealing temperature, Bağlanma Sıcaklığı
Taq	: <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	: Tris borik asit EDTA
UV	: Ultraviyole

ŞEKİLLER

	<u>SAYFA NO</u>
Şekil II.1	: 2007 yılında dünyadaki buğday ekim alanlarına ait oranlar 4
Şekil II.2	: Yurdumuzda buğday ekiminin yapıldığı bölgeler..... 5
Şekil II.3	: <i>Puccinia striiformis</i> f.sp. <i>tritici</i> ' in buğdaydaki görünümü..... 8
Şekil II.4	: Sarı Pas etmeni <i>Puccinia striiformis</i> 'in yaşam döngüsü..... 9
Şekil II.5	: <i>P. striiformis</i> f.sp. <i>tritici</i> 'nin dünya üzerindeki dağılımı 11
Şekil II.6	: RFLP markör sisteminin şematik gösterimi..... 15
Şekil II.7	: Polimeraz zincir reaksiyonu aşamalarının şematik gösterimi 16
Şekil II.8	: RAPD tekniğinin şematik gösterimi 19
Şekil II.9	: DNA metilasyonunun şematik gösterimi 30
Şekil II.10	: <i>HpaII</i> ve <i>MspI</i> enzimlerinin kesim özellikleri ve kesim bölgeleri..... 32
Şekil II.11	: DNA metilasyon polimorfizminin değerlendirilmesinde yararlanılan ifadeler..... 37
Şekil III.1	: Buğday (<i>Triticum</i> spp.) bitkisi 40
Şekil III.2	: DNA izolasyonunda izlenen aşamalar 45
Şekil III.3	: “Bulk Segregasyon Analizinde” kullanılacak DNA'nın (“bulk”) hazırlanışı 47
Şekil III.4	: RAPD markörler için kullanılan PZR programı 51
Şekil III.5	: Farklı 6 çeşit genotipin restriksiyon enzimleri ile kesimi 53
Şekil III.6	: CRED-RA analizinde kullanılan verilerin excel formatına yerleştirilmesi..... 55
Şekil IV.1	: OPD16 primeri kullanılarak buğday çeşitlerinde elde edilen monomorfik bant profili 57
Şekil IV.2	: OPF13 primeri kullanılarak buğday çeşitlerinde elde edilen polimorfik bant profili..... 58
Şekil IV.3	: Çalışmada kullanılan monomorfik ve polimorfik primer sayıları..... 58
Şekil IV.4	: Çalışmada kullanılan primerlerle kombinasyonlara ait elde edilen monomorfik ve polimorfik primer sayıları 60
Şekil IV.5	: Çalışmada kullanılan primerlerin polimorfizm yüzdeleri 62

Şekil IV.6	: OPF12 primeri kullanılarak PI178383 x Harmankaya99 kombinasyonuna ait fide ve ergin dönem için gerçekleştirilen “Bulk Segregasyon Analizi”	63
Şekil IV.7	: OPA12 primeri kullanılarak İzgi2001 x ES14 kombinasyonuna ait fide ve ergin dönem için gerçekleştirilen “Bulk Segregasyon Analizi”	64
Şekil IV.8	: OPM9 primeri kullanılarak Sönmez2001 x Aytın98 kombinasyonuna fide ve ergin dönem için gerçekleştirilen “Bulk Segregasyon Analizi”	65
Şekil IV.9	: OPA14 primeri kullanılarak gerçekleştirilen PZR sonucu.....	67
Şekil IV.10	: Çalışmada kullanılan primerlerle kombinasyonlara ait elde edilen monomorfik ve polimorfik primer sayıları	69
Şekil IV.11	: OPA12 primeri kullanılarak gerçekleştirilen PZR sonucu.....	70
Şekil IV.12	: DNA metilasyon polimorfizmi incelemeleri sonucunda kombinasyonlara göre anaç genotipler arasında belirlenen polimorfik (a) ve monomorfik (b) bantların karşılaştırılması.	71
Şekil IV.13	: OPB8 primeri kullanılarak gerçekleştirilen PZR sonucu.....	72
Şekil IV.14	: Epigenetik markör incelemeleri sonucunda, kombinasyonlara göre anaç genotipler arasında belirlenen epigenetik markör olasılığı.....	73
Şekil IV.15	: PI178383 x Harmankaya99 kombinasyonunda OPB3 primeri kullanılarak gerçekleştirilen “Bulk Segregasyon Analizi”	77
Şekil IV.16	: İzgi2001 x ES14 kombinasyonunda OPA9 primeri kullanılarak gerçekleştirilen “Bulk Segregasyon Analizi”	78
Şekil IV.17	: Sönmez2001 x Aytın98 kombinasyonunda OPE8 primeri kullanılarak gerçekleştirilen “Bulk Segregasyon Analizi”	79
Şekil IV.18	: CRED-RA yöntemi ile analiz edilen bulklar arasındaki DNA metilasyon polimorfizmi yüzdeleri	80
Şekil IV.19	: PI178383 x Harmankaya99 kombinasyonunda OPB11 primeri kullanılarak gerçekleştirilen “Bulk Segregasyon Analizi”	82
Şekil IV.20	: İzgi2001 x ES14 kombinasyonunda OPE8 primeri kullanılarak gerçekleştirilen “Bulk Segregasyon Analizi”	83

SAYFA NO

Şekil IV.21	: Sönmez2001 x Aytın98 kombinasyonunda OPE8 primeri kullanılarak gerçekleştirilen “Bulk Segregasyon Analizi”	84
Şekil IV.22	: CRED-RA yöntemi ile analiz edilen bulklar arasındaki epigenetik markör yüzdeleri	85

TABLolar

SAYFA NO

Tablo II.1	: 2000-2008 yılları arasında Türkiye'deki buğday ekiliş-üretim-verim değerleri.....	6
Tablo II.2	: CRED-RA analizinde kullanılan <i>HpaII</i> ve <i>MspI</i> enzimlerinin özelliklerinin karşılaştırılması.....	33
Tablo III.1	: Çalışmada kullanılan buğday genotipleri.....	41
Tablo III.1' in devamı	: Çalışmada kullanılan buğday çeşitleri ve genel özellikleri	42
Tablo III.2	: Genomik DNA izolasyonunda kullanılan stok çözeltiler.....	43
Tablo III.3	: Çalışmada kullanılan OP ve UBC Serisi RAPD primerlerinin dizileri ve T _a değerleri.....	48
Tablo III.4	: Agaroz jel elektroforezinde kullanılan çözeltiler	52
Tablo IV.1	: Çalışmada kullanılan çeşitlerin DNA'larının miktarları ve sulandırım oranları	56
Tablo IV.2	: Farklı kombinasyonlara göre monomorfik ve polimorfik bant yapısı gösteren RAPD primerlerinin listesi	59
Tablo IV.3	: RAPD primerlerinin amplifikasyonu sonucu elde edilen toplam bant sayıları, polimorfik bant sayıları ve polimorfizm oranları	61
Tablo IV.4	: CRED-RA analizlerinde kullanılan farklı kombinasyonlara göre monomorfik ve polimorfik bant yapısı gösteren RAPD primerlerinin listesi.....	68
Tablo IV.5	: RAPD ve CRED-RA analizleri sonucuna göre elde edilen polimorfik ve monomorfik kombinasyon listesi	74
Tablo IV.6	: CRED-RA yöntemi ile yapılan bulklarda metilasyon polimorfizmi ve epigenetik markör oranlarının karşılaştırılması.....	87
Tablo IV.7	: PI178383 x Harmankaya99 kombinasyonuna ait metilasyon polimorfizmi ve epigenetik markör değerlerinin primerler açısından incelenmesi.....	90
Tablo IV.8	: İzgi01xES14 kombinasyonuna ait metilasyon polimorfizmi ve epigenetik markör değerlerinin primerler açısından incelenmesi	92

Tablo IV.9 : Sönmez2001 x Aytın98kombinasyonuna ait metilasyon polimorfizmi
ve epigenetik markör değerlerinin primerler açısından
incelenmesi.....94

BÖLÜM I

GİRİŞ VE AMAÇ

I.1. GİRİŞ

Tüm dünyada besin maddesi olarak yaygın bir şekilde kullanılan buğday ülkemiz ekonomisi açısından da önemli yeri olan bir bitkidir. Ancak buğday hastalıklarından biri olan ve özellikle *Puccinia striiformis* f.sp. *tritici* adlı biyotropik bir mantarın neden olduğu sarı pas hastalığı, üretiminin yapıldığı alanlara bağlı olarak, yurdumuzda hemen hemen bütün bölgelerde, %10 ile %100 arasında değişmekle beraber önemli derecede ürün kayıplarına ve kalitenin düşmesine neden olmaktadır. Bu hastalıkla mücadele amacıyla yapılan kimyasal ilaçlama uygulamaları biyolojik ortamı etkilemekte, dengeleri bozabilmekte, hatta besin zincirine girerek insanlarda da toksik etkiler oluşturabilmektedir. Tüm bu olumsuzluklar dikkate alındığında hastalıklarla mücadelede tarımı yapılan bitkilerin sahip olduğu genetik dayanıklılık; üreticiler tarafından kullanılabilir uygun, ucuz ve pratik bir kontrol metodu olarak tercih edilen alternatif bir yaklaşımdır. Bu nedenle, sarı pas hastalıklarına karşı dayanıklı ve duyarlı buğday çeşitlerinin varlığının belirlenip üretimde değerlendirilmesi ıslah açısından büyük önem taşımaktadır. Bütün bunların yanında, çevresel ve genetik düzensizlik veya stres, metilasyonun neden olduğu genetik ve epigenetik değişiklikleri teşvik eder. Üstelik bitki yaşamında yer alan, metilasyon değişikliklerini teşvik eden çevresel ve genetik uyarıcılar yeni epigenetik farklılıklar yaratabilir ve sonraki nesilleri etkileyebilir. Bunlara neden olan birçok çevresel ve genetik uyarıcılar, metilasyon farklılığına neden olur. Alüminyum, ağır metaller ve su stresi gibi çevresel uyarıcılar genom boyunca ve spesifik lokuslarda sitozin metilasyonunun artmasına veya azalmasına sebep olur. Bu anlamda, bitki genomunun çevresel ve genetik strese cevabı, hem yeni genetik polimorfizmi hem de epigenetik metilasyon polimorfizmini meydana getirir. Sitozin metilasyonunun neden olduğu cis veya trans elementlerdeki DNA polimorfizmi, metilasyon polimorfizmini oluşturur. Buna alternatif olarak, eş alleller

farklı metilasyon bölgelerinde yer alır. Stresin etkisini gösterdiği genotiplerde, fenotipik çeşitlilik görülebilir ve bitki gelişimi etkilenebilir. Bitkilerin genetik uyarılması, bir nesilden gelecek nesle aktarılan özellikler için kişisel farklılıklara neden olur. DNA metilasyonu, etkilelenen gen anlatımı nedeniyle yeni ve kalıtsal farklılıklara sebep olur.

Yurdumuz kökenli buğday çeşitlerinin sarı pas hastalığı açısından değerlendirildiğinde, anaç bitkiler ile dayanıklı ve duyarlı F₂ karışımlarında, dayanıklı genotipi işaret eden polimorfik yapıda DNA dizilerinin elde edilmesi durumunda bu farklılığa yol açan dizi markör olarak kullanılabilir ve yurdumuz kökenli çeşitlerin PZR yöntemiyle kısa sürede taranabilmesinde kullanılacaktır. Ayrıca, epigenetik varyasyonların en önemli nedenlerinden biri olan DNA metilasyonunu belirlemek için kullandığımız CRED-RA tekniği; metilasyona duyarlı kesim enzimleriyle DNA'nın kesimi sonrasında buğday çeşitleri arasındaki metilasyon değişimlerini ve polimorfizmi belirler. Gözlemlenen bu değişiklikler, genetik ve epigenetik yapının temelini oluşturur. Bu çalışmada, RAPD ve CRED-RA tekniklerini karşılaştırmalı kullanarak metilasyon farklılıkları incelenmiş, CRED-RA yönteminin kullanımına ve buğday çeşitleri arasında DNA metilasyon hatlarındaki polimorfizmi belirlemede etkili olan epi-markörlerin incelenmesine dikkat çekilmiştir.

Bu çalışmalar sonucunda, bitki genotiplerinin sarı pas hastalığına dayanıklılık açısından doğru ve etkin bir biçimde tanımlanması mümkün olacaktır. Ayrıca elde ettiğimiz sonuçlar, sadece DNA metilasyon farklılıklarının karakteristiğinin ve dağılım kuralının anlaşılmasında yardımcı olmakla kalmayacak, üstelik ıslah uygulamaları ve önemi olan farklı araştırmalar için teorik bir temel sağlayacaktır.

I.2. AMAÇ

Tüm dünyada buğdayın ana gıda kaynağı olması ve günlük enerji ihtiyacının karşılanmasında ortalama %20 paya sahip olması, bu bitkinin biyotik ve abiyotik stres etmenlerine karşı iyileştirilmesi gerekliliğini ortaya koymaktadır. Dünyada ve ülkemizde üzerinde tarım yapılabilecek alanların azalmış olması, araştırmacıları daha yüksek verim alma konusuna yönlendirmiştir. Klasik ıslah çalışmaları zaman alıcı ve masraflı olduğundan sürenin kısaltılması ve ekonomik maliyetin en az düzeye indirilmesi istenilen amaca en kısa zamanda ulaşılmasıyla mümkündür. Buğday ıslahında da, belli çevre şartlarında en iyi ürünü verebilecek niteliklerde yeni çeşitlerin ortaya çıkarılması için üstün genotiplerin elde edilebilmesi hedeflenmektedir.

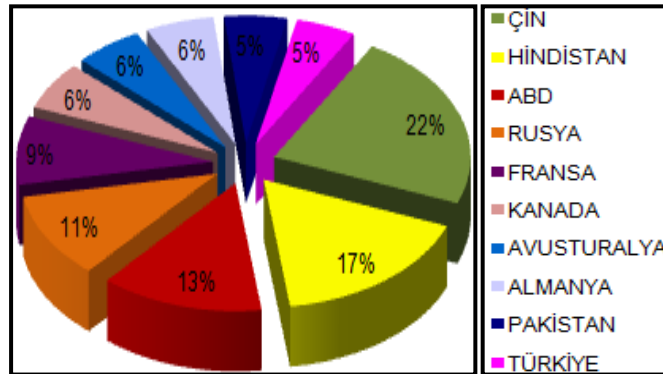
Sarı pas hastalığı, yurdumuzda buğday alanlarında % 100'lere varan ürün kayıplarına neden olan, ülkemizdeki ve dünyadaki önemli biyotik stres etmenlerinden biridir. Bu tez çalışmasında, buğday bitkisinin üretimini ve verimini tehdit eden ve *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* adlı biyotrofik bir mantarın neden olduğu sarı pas hastalığı açısından, dayanıklı ve duyarlı olarak belirlenen yurdumuz kökenli bazı kışlık ekmeklik buğday çeşitlerinin kısa sürede ve kolaylıkla seçilmesine katkı sağlayabilecek özgün RAPD primerlerinin PZR ve CRED-RA analizleri ile taranması amaçlanmıştır. Elde edilen veriler, çalışmada kullanılan buğday çeşitlerinin genetik ve epigenetik açıdan değerlendirilmesine sağlayacağı katkılar yönünden de önemlidir. Sonuçta elde edilen veriler ile bu alandaki literatüre de önemli katkılar sağlayacaktır.

BÖLÜM II

GENEL BİLGİLER

II.1. BUĞDAYIN ÖNEMİ

Buğday (*Triticum aestivum* L.), buğdaygiller (*Poaceae*) ailesinden gelen, karasal iklimi tercih eden ve bütün dünyada ıslahı yapılmış, tek yıllık otsu bir bitkidir. Ayrıca, un ve yem üretiminde de kullanılan temel bir besin kaynağıdır. Verim açısından kaliteli, tarımı kolay, besin değeri yüksek ve zengin bir alanda üretime sahip olduğu için de dünyada 50'den fazla ülkede yaygın olarak üretilmektedir (Milner ve ark., 1978). Genellikle ılık ve serin iklim şartlarında yetişen buğdayın ortalama gelişme sıcaklığı 25°C'dir ve değişik genotipleri birbirinden çok farklı toprak ve iklim koşullarında yaşayabilir. Yıllık yağışın 500-600 mm olduğu yerlerde veya toprakta bu nemi sağlayacak sulamalarda kaliteli ve bol ürün alınabilmektedir (www.gap.gov.tr). Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü ("*FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations*") tarafından açıklanan verilere göre; dünyada 240 milyon hektardan daha fazla bir alanda yetiştirilmekte olan buğday, dünya ticaretinde önemli bir yere sahiptir. Buğdayın ekim alanı bakımından dünya ülkeleri arasında Türkiye 7.sırada ve ürettiği miktar bakımından ise 8.sırada yer almaktadır (Akar ve ark., 2007) (Şekil II.1).



Şekil II.1. 2007 yılında dünyadaki buğday ekim alanlarına ait oranlar (<http://faostat.fao.org>).

Özellikle yurdumuz gibi tahıl ağırlıklı beslenme sistemine sahip ülkelerde buğdayın ekim, üretim ve verim açısından önemi daha da öne çıkmaktadır. Buğday, ülkemizde de en çok İç Anadolu Bölgesi'nde yetiştirilmektedir. Bu nedenle, bölge "Türkiye'nin Buğday Ambarı" olarak da anılmaktadır (Zeybek ve Yiğit, 2004; Chen, 2005). Şekil II.2' de renklendirilen alanlar, Türkiye'de buğday ekimi yapılan bölgelerdir. Koyu yeşil ile gösterilen alanlar buğday üretiminin yoğun, açık yeşil ile gösterilen alanlar orta yoğun, açık mavi ile gösterilen alanlar az yoğun olduğu bölgelerdir.



Şekil II.2. Yurdumuzda buğday ekiminin yapıldığı bölgeler (<http://www.tugem.gov.tr>).

Ülkemizin buğday tarımını sınırlayıcı en önemli etmeni olan pas hastalıkları arasında, özellikle *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* adlı biyotrofik bir mantarın neden olduğu sarı pas hastalığı yurdumuzda hemen hemen bütün bölgelerde görülmektedir ve verimsiz tohum eldesi sonucunda % 100'lere varan önemli derecede ürün kaybına ve danede kalitenin düşmesine neden olmaktadır. Ülkemizde bugüne kadar kayıtlara geçen ve değişik pas hastalıklarının oluşturduğu ürün kaybı %12-80 arasında değiştiği, duyarlı çeşitlerle sarı pas patojeni kullanılarak yapılan tarla denemelerinde % 100'e varan kayıpların olduğu gözlenmiştir. FAO'nun istatistikleri değerlendirildiğinde, dünya üretiminin önemli bir paya sahip olan, en önemli buğday üretici ve tüketici ülkeleri arasında yer alan Türkiye'de 9.300.000 ha ekim alanı ile 2004 yılındaki buğday üretiminin 21 milyon ton iken, 2008 yılında 7.582.531 ha ekim alanı ile yaklaşık 17 milyon 678 bin tona düştüğü görülmektedir

(Tablo II.1) (<http://faostat.fao.org>). Bu düşüşte, pas hastalıkları önemli bir paya sahiptir.

Tablo II.1. 2000-2008 yılları arasında Türkiye'deki buğday ekiliş-üretim-verim değerleri (<http://faostat.fao.org>).

YILLAR	Ekiliş (Hektar)	Üretim (Ton)	Verim (Kg/Hektar)
2000	9.400.000	21.000.000	2.234
2001	9.350.000	19.000.000	2.032
2002	9.300.000	19.500.000	2.097
2003	9.100.000	19.000.000	2.088
2004	9.300.000	21.000.000	2.258
2005	9.250.000	21.500.000	2.324
2006	9.300.000	21.010.000	2.152
2007	9.300.000	17.678.000	1.901
2008	7.582.531	17.782.000	2.345

Bu durum, buğday veriminin sarı pas gibi biyotik stres etmenlerine çok bağımlı olduğunu, kararlı ve yüksek bir verim için bu etmenlerin etkisini azaltıcı sistemlerin ve hastalığa dayanıklı genotiplerin geliştirilmesi gerektiğini göstermektedir.

II.2. SARI PAS ETMENİ *Puccinia striiformis f. sp. tritici*

Bitkilerin büyümesine ve gelişimine olumsuz yönde etki eden stres, iç ve dış kaynaklı olmak üzere iki gruba ayrılır. İç kaynaklı stres etmenleri, canlıda olumsuz sonuçlar doğuran mutasyonlar ve hastalık kaynaklı kontrolsüz hücre bölünmeleridir. Dış kaynaklı stres etmenleri ise biyotik ve abiyotik olmak üzere ikiye ayrılır. Kuraklık, tuzluluk, yüksek veya düşük sıcaklık, ışık miktarının azlığı veya fazlalığı, gelişim için gerekli olan maddelerin yetersizliği, pestisitler ve ağır metaller abiyotik stres etmenleri; virüs, bakteri, mantar gibi patojenler, böcek gibi zararlılar ve diğer organizmalar biyotik stres etmenleri olarak sınıflandırılmaktadır (Comai ve Madlung, 2004). Buğdayda en önemli stres etmeni, dış kaynaklı biyotik etmen olarak kabul edilen patojenlerdir. Bunlardan; *Fusarium* (Külleme), *Puccinia* (Pas), *Ustilago* (Rastık), *Septoria* (Yaprak lekesi-Kara zenk), *Rhizoctonia* (Kök çürüklüğü), *Alternaria* (Yaprak yanıklığı), *Microdochium* (Başak küfü) gibi en önemli fungal kökenli hastalık etmenleridir (www.ziraatcim.net). Mantarlar, tahıl bitkilerinde hastalık oluşturan organizmalar içerisinde en fazla ürün kaybına yol açan

patojenlerdir. *Puccinia* türlerinin sebep olduğu hastalıklar 'pas hastalıkları' olarak bilinmektedir ve önemli biyotik stres etmenleri arasında yer almaktadır (Düşünceli ve ark., 1999).

Buğdayda 3 çeşit pas hastalığı ortaya çıkmaktadır. Bunlar; kök pası, yaprak pası ve sarı pastır. Bu hastalıkların her birine, *Puccinia* denen pas mantarının belli bir türü neden olmakta ve bitkideki görünümüne göre isimlendirilmektedir (Marsalis ve Goldberg, 2006). Siyah pas olarak bilinen kök pasına *P.graminis* f.sp.*tritici* denen mantar neden olur. Kök pası, öncelikle köklerde ardından ise tohum, yaprak ve yaprak kınında görülebilen, önce oval uzayan kızıl-kahve olan lezyonlar son safhada bulanık ve siyah sporlar oluşturur. Bu, bitki köklerini zayıflatır ve geçici konağa zarar verir. Genelde yaprakta görülen *P.recondita* f.sp.*tritici* (şimdi *P.triticina* olarak bilinir) denen mantarın neden olduğu yaprak pası lezyonları, önce küçük ve dairesel daha sonraları yuvarlak ve sarı lezyonlar turuncu püstüllere dönüşür. Bunların oluşturduğu yüzlerce spor, püstülden kolayca çıkar. Tohumun baş kısmında görünen zayıf turuncu lezyonların püstüllere dönüşmemesi, yaprak pasını kök pasından ayırt etmemizi sağlayan en önemli özelliktir.

Ürün kaybı çeşitlerin duyarlılıklarına, çevre koşullarına, etmenlerin ırklarına göre değiştiği gibi yıldan yıla ve bölgeden bölgeye göre de farklılıklar göstermektedir (Zeybek ve Yiğit, 2004; Chen, 2005). Diğer pas hastalığı olan sarı pas hastalığına *P.striiformis* f.sp.*tritici* denen mantar neden olur. Bu patojen arpa, çavdar ve diğer bazı türlerde etkisini gösterir. Sarı pas, diğer pas hastalıkları içinde en erken görülen pas türüdür. 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 arkadaşları tarafından *P.striiformis* adını verilmiştir. Birincil konakları arasında ekmeklik buğday, makarnalık buğday ve bazı arpa genotipleri bulunurken alternatif konaklarına rastlanmamıştır. Konak aralığı oldukça dar olan buğday sarı pas mantarlarının sınıflandırılması aşağıdaki gibidir (Curtis ve ark., 2002) (Şekil II.3).



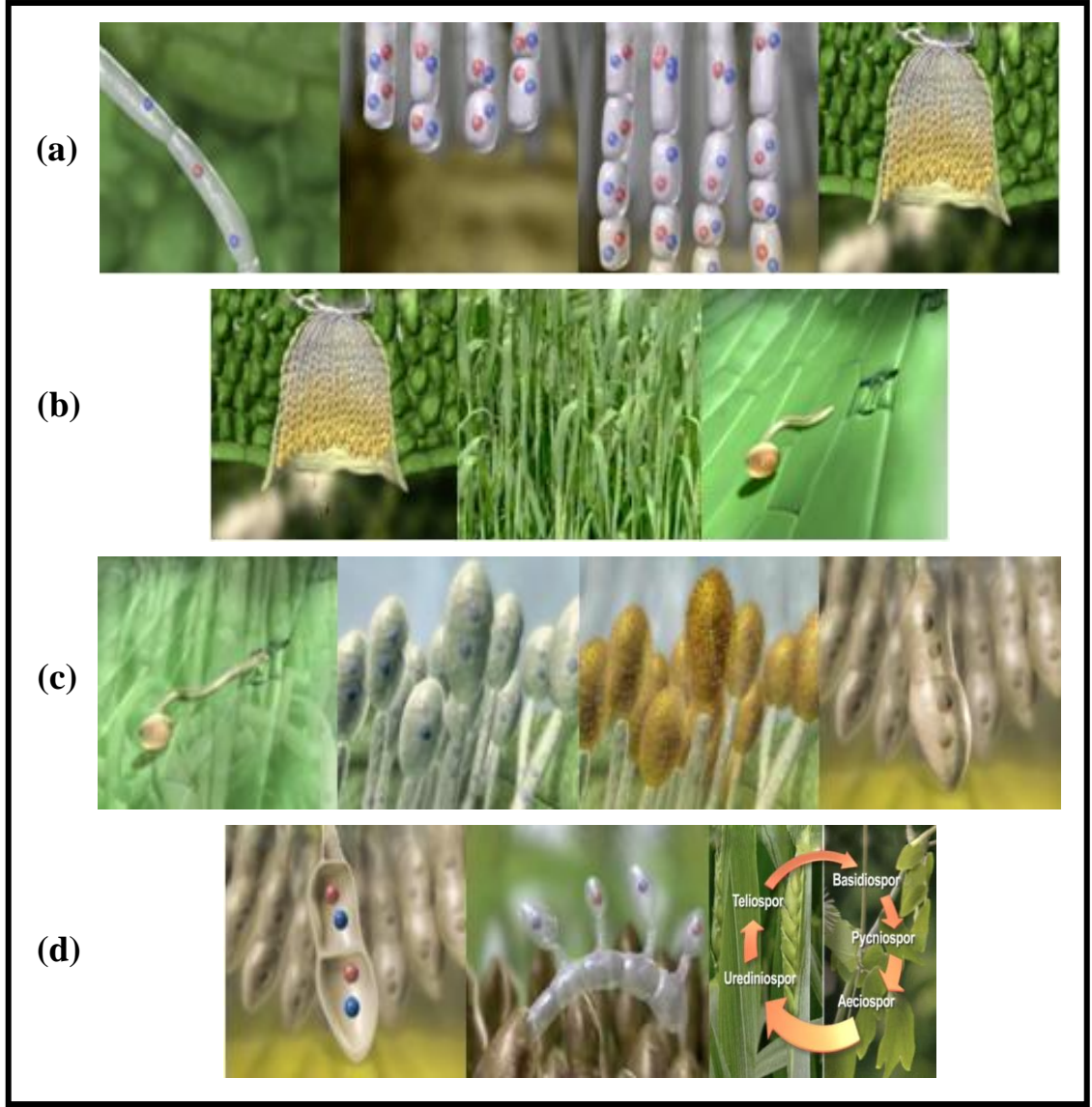
Alem	: Fungi
Şube	: Basidiomycota
Sınıf	: Urediniomycetes
Alt Sınıf	: Incertae sedis
Takım	: Uredinales
Familya	: Pucciniastraceae
Cins	: <i>Puccinia</i>
Tür	: <i>P. striiformis</i> var. <i>striiformis</i>

Şekil II.3. *Puccinia striiformis* f.sp. *tritici*' in buğdaydaki görünümü.

Yaprakların üst yüzeyinde ve başaklarda makine dikişi şeklinde ve sarı renkli püstüllerin dizilişinin çizgiye benzer görüntüsünden dolayı “çizgi pası” da denir (<http://www.ziraatci.com/>). Bitkinin yaprak ve baş kısmında çizgi olarak ortaya çıkan bu püstüller, hastalığın en önemli ayırt edici özelliğidir. Hafif sarı bu püstüller olgunlaştıkça, sarı ve turuncu sporları oluşturur. Hastalık geliştikçe, püstül etrafında bulunan dokular kahverengiye dönüşür ve yanmış görünümünü alır.

Püstüller yazlık sporların üretildiği yerlerdir. Mevsim sonuna doğru yazlık sporların yerini siyah renkli kışlık sporlar alır. Yapraklardaki sararma, hem yaprak pası hem de sarı pas arasındaki en önemli farktır. Bu belirtileri gösteren birçok bitki, tarlada uzaktan bile fark edilebilir (Marsalis ve Goldberg, 2006).

Hastalığın gelişimi için şartlar uygun hale geldiğinde, enfeksiyon 6–8 saatte tamamlanır ve püstüllerden hastalığın yayılmasına neden olacak özellikteki ürosporlar 12–14 günde oluşur. Kışı ılık geçen bölgelerde, ürosporlar bütün yıl hayatta kalabilmektedir. Bu yüzden, patojenin hayat döngüsünü tamamlaması gerekir. Pas mantarı, farklı spor aşamalarından oluşan ve iki farklı konak bitkiye ihtiyacı olan bir yaşam döngüsüne sahiptir (Şekil II.4). Sarı pasın ara konukçusu bilinmemektedir (Marsalis ve Goldberg, 2006).



Şekil II.4. Sarı Pas etmeni *Puccinia striiformis*'in yaşam döngüsü (<http://www.hgca.com>).

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

Enfeksiyonların oluşumunda sıcaklık ve nem çok önemlidir. Hastalık buğday tarlalarında ilkbaharda hava sıcaklığının 10°-15 °C (optimum 11 °C) olduğu zaman görülmeye başlar.

Bitkiler içerisinde buldukları ortamlarda biyotik ve abiyotik etmenler tarafından devamlı şekilde uyarılırlar. Bu uyarıların hücre membranındaki reseptörler tarafından alınarak sinyal iletişimi yoluyla hücre içerisindeki gerekli yerlere iletilmesi sonucu bitkide bir tepki oluşur (Tör, 1998).

Bitki ve biyotrof mantar arasındaki etkileşim, Flor (1971) tarafından keten bitkisi ve keten pası hastalığının etkeni olan *Melampsora lini* 'de geliştirilen "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 sonucudur. Bu etkileşim sonucunda, bitki ile patojen arasında ilk temas kurulduktan sonra patojen ile konukçu arasında bir tanışma olayı gerçekleşir ve dayanıklılık mekanizmalarını başlatır. Bu olay ile patojen, karşılaştığı bitkinin kendi konukçusu olup olmadığına karar verirken, konukçu bitki de gelen uyarıcının bir patojenden olup olmadığını ve ona karşı nasıl bir reaksiyon verebileceğini tespit eder. Böylece, bitkide aktif savunma sistemi ve tepki mekanizması çalışmakta ve sonuçta dayanıklılık olgusu ortaya çıkmaktadır (Flor, 1971; Dangl ve ark., 1995).

Gene karşı gen etkileşiminin tetiklediği dayanıklılık mekanizması "Aşırı Duyarlı Yanıt - Hypersensitive Response (**HR**)" olarak isimlendirilir. Aşırı duyarlı yanıt, komşu hücreleri patojenin varlığına karşı uyaracak olan sinyal moleküllerin oluşturulması ve patojenle temas kuran hücrelerin programlı ölümü gibi mekanizmaları kapsar (Yu ve ark., 1998; Pryor, 1987). Duyarlı denilen konukçu bitki ile virulent denilen patojen arasındaki ilişki uyumlu olarak tarif edilir. Buna karşılık, patojen bitkide herhangi bir zarar meydana getirmiyor, normal yaşamını devam ettiriyor ve bitkiyi istila ederek çoğalmasını sürdürüyorsa bu bitki o patojene dirençlidir. Ancak, bitki bu patojenin gelişme ve çoğalmasını çeşitli nedenlerle tamamıyla durduruyor ise bu bitki genel anlamıyla dayanıklı olarak kabul edilmekte ve patojen de avirulent olarak adlandırılır. Dayanıklı bitki ile patojen arasındaki ilişki de uyumsuz olarak kabul edilir (Lindsay ve ark., 1993).

Sarı pasın dünyadaki yayılımına bakıldığında, diğer pas hastalıklarına göre daha yüksek alanlarda, kuzey enlemlerinde ve ilkbaharın serin ve yağışlı geçtiği yerlerde yaygın olarak görülmektedir. Sarı pas hastalığı özellikle Kuzey-batı Avrupa, Kuzey Amerika, Hindistan ve Çin'i içine alan daha serin bölgelerde görülen önemli bir küresel problemdir (Singh ve ark., 2002). Buna ek olarak, Sarı pas ülkemizde özellikle İç ve Doğu Anadolu, kahverengi pas sahil bölgeleri, kara pas ise Güney, Batı ve İç Anadolu bölgelerinde yaygındır (<http://www.ipsalatarim.gov.tr>), (Şekil II.5).



Şekil II.5. *P. striiformis* f.sp. *tritici*'nin dünya üzerindeki dağılımı (CABI, Crop Protection Compendium, <http://www.cabicompendium.org>, 2005).

Sarı pas yurdumuzda hemen hemen bütün bölgelerde olduğu gibi dünya çapında da önemli derecede ürün kaybına ve tanede kalitenin düşmesine neden olduğu için buğday çeşitlerinin sarı pas hastalığına dayanıklılık açısından doğru ve etkin bir biçimde ve kısa zamanda tanımlanması oldukça önemlidir. Bitki ıslahında hastalık ve zararlılara dayanıklı ve adaptasyon yeteneği yüksek yeni çeşitlerin seçimi; zahmetli, yüksek maliyet gerektiren ve oldukça uzun zaman alan işlemlerdir. Bu çalışma, buğday ıslahı çalışmaları kapsamında genetik materyalin sarı pas hastalığı için doğru olarak değerlendirilmesinin yanı sıra bu alanda bundan sonra yapılacak araştırmalara ve diğer moleküler markör çalışmalarına da veri sağlayarak literatüre önemli katkıda bulunması açısından son derece önem taşımaktadır. Bu anlamda, verilerimizi değerlendirmede RAPD markör çalışmaları ve DNA metilasyon analizleri bize yardımcı olacaktır.

II.3. PAS HASTALIKLARI İLE MÜCADELEDE MOLEKÜLER MARKÖRE DAYALI SEÇİLİMİN ÖNEMİ

Bitkilerde üstün bireylerin belirlenmesinde, morfolojik özellikleri yansıtan agronomik verilerin yanında, daha kesin tanımlara dayalı yöntemler son yıllarda hızla kullanıma girmiştir. Stres koşullarından etkilenmeyen ve çeşit geliştirme çalışmalarına hız kazandıran moleküler markörler birçok bitki türünde tanımlama amacıyla kullanılmaktadır.

Bitkilerin, sarı pas hastalığının fungusit yardımı ile klasik olarak test edilmesi uzun zaman almakta, dayanıklılık çalışmaları yavaş ilerlemekte, fazla iş gücü gerekmekte ve inokulasyon sırasında sorunlarla karşılaşmaktadır. Bütün bu olumsuzluklar, sarı pas hastalığına karşı dayanıklılık sağlayan gene bağlı moleküler markör veya markörlerin geliştirilmesiyle aşılabilmektedir. Moleküler markörler kullanarak bitkilerin çok erken döneminde (fide dönemi) dayanıklılık geni taşıyıp taşımadıkları hızlı ve güvenli şekilde test edilebilmektedir. Moleküler markörler, aynı anda çok bitkinin analizine imkân tanımakta ve aynı bitkide birden fazla dayanıklılık geni analiz edilebilmektedir. Ayrıca kullanılacak markörün kodominant olması, heterozigot ve homozigot dayanıklı bireyleri birbirlerinden ayırabildiği için ıslah çalışmasına büyük bir hız vermektedir. Bununla birlikte dayanıklılık genine bağlı moleküler markörlerin geliştirilmesi, dayanıklılık geninin belirlenmesi için de önemli bir adım oluşturmaktadır.

Bitki ıslahında kullanılan en etkili yöntemlerden biri olan “Marköre Dayalı Seçilim (MAS)”, önemli agronomik karakterleri kontrol eden gen(ler) ile sıkı ilişkili olan ve kolaylıkla tanınabilen moleküler markörlerin kullanılması esasına dayanan bir tekniktir. Klasik ıslah metotlarının başarısını artırıcı yardımcı bir teknik olan MAS, hedef genin oldukça hızlı, etkin, doğru ve ekonomik bir seleksiyon tekniğidir. Erken nesilden genç evrede bitki seçimine izin vermesi ve verimsiz olan allellerin büyük oranda azaltılıp elimine edilebilmesi bakımından çok büyük avantaj sağlayan MAS, bitki biyoçeşitliliğinin korunması, geri melez ıslahında, somaklonal varyasyonların belirlenmesi, genetik haritaların oluşturulması, yeni çeşitlerin geliştirilmesi, filogenetik ilişkilerin ortaya konması, ıslah çalışmaları ve kantitatif karakterlerin aktarımı (QTL) gibi durumlarda büyük avantajlar sağlar (Korzun, 2003) (fao.org). Marköre Dayalı Seçilimin amacı, ihtiyaç duyulan zamanı azaltmak ve maliyetleri düşürmektir. Devam eden çalışmalar, MAS tekniğini daha ucuz ve daha etkili hale getirecektir.

Son yıllarda bitki yetiştirme programlarının başlıca araştırma konularından biri olan sarı pas hastalığına karşı dayanıklılık genlerinin bulunmasına, patojene dayanıklı genotiplerin yetiştirilmesine ve genomdaki yerlerinin saptanmasına yönelik çalışmalar yaygınlık kazanmıştır. Hastalık ile mücadelede sarı pas oluşumuna savunma cevabı oluşturabilecek dirençli buğday hatlarının belirlenmesi ve bu hatların ekimi yoluna gidilerek çevreye en az zarar vererek ürün eldesini en üst seviyeye getirmek amaçlanmalıdır. Bu amaçla “Marköre Dayalı Seçilim (MAS)” dediğimiz moleküler yöntemler, pas hastalıkları ile mücadelede yararlanılan en etkin araçlardır.

II.4. GENETİK MARKÖRLER

Birçok bilim adamının kullandığı dolaylı bir metot olan genetik markörlerin kullanımı ile belirli kromozomlar üzerinde yerleşmiş spesifik genlerin tanımlanması mümkün olabilmektedir (Semagn ve ark., 2006). Genetik markörler üç grupta incelenmektedir.

II.4.1. Morfolojik Markörler

Fenotipik özelliklere dayalı, tek lokus ile idare edilebilen ve çevre koşullarına karşı değişken olan markörlerdir. Fenotip üzerinde olumsuz etkilere sahip olabilmeleri, az sayıda olmaları, çevresel koşullardan yüksek oranlarda etkilenmeleri gibi olumsuz; bazı özgül genlerin takibinin kolaylaşması, dominant ya da resesif olması gibi olumlu yönleri sahiptir.

II.4.2. Biyokimyasal Markörler

Morfolojik karakterlerin çevreden etkilenmelerini ortadan kaldırmak için geliştirilen ve gen ürünleri olan proteinlere dayalı olan markörlerdir. Sayıca çok az olmaları ve varyasyonlarının düşük olmasına rağmen en önemli avantajları analizlerinin çabuk, güvenilir ve tekrarlanabilir olması, çevreden ve diğer lokuslardan etkilenmemeleridir. Bunlar, enzim (izozimler) ve enzim olmayan proteinler (gliadin ve glutenin gibi depo proteinleri) olarak ikiye ayrılmaktadırlar. Bir genin farklı allelleri ya da farklı genler tarafından kodlanan protein markörleri olan izozimler hızlı ve ucuz olmasının yanısıra lokus sayısının az olması, bazı izozimlerin belirli dokularda ve belirli gelişme dönemlerinde bulunması gibi dezavantajlara sahiptir.

Buğday tohumunda bulunan iki depo protein grubu olan gliadin ve glutenin, depo protein markörleri amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadırlar.

II.4.3. Moleküler Markörler (DNA Markörleri)

Organizma genomundaki herhangi bir gen bölgesi ya da gen bölgesi ile ilişkili DNA parçasını ifade eden, biyolojik etkileri olmayan ve nesilden nesile aktarılan DNA dizilerine “Moleküler markör” denir (Semagn ve ark., 2006). Moleküler markörler, DNA düzeyindeki analizlerle saptandıklarından dolayı DNA markörleri olarak da bilinirler.

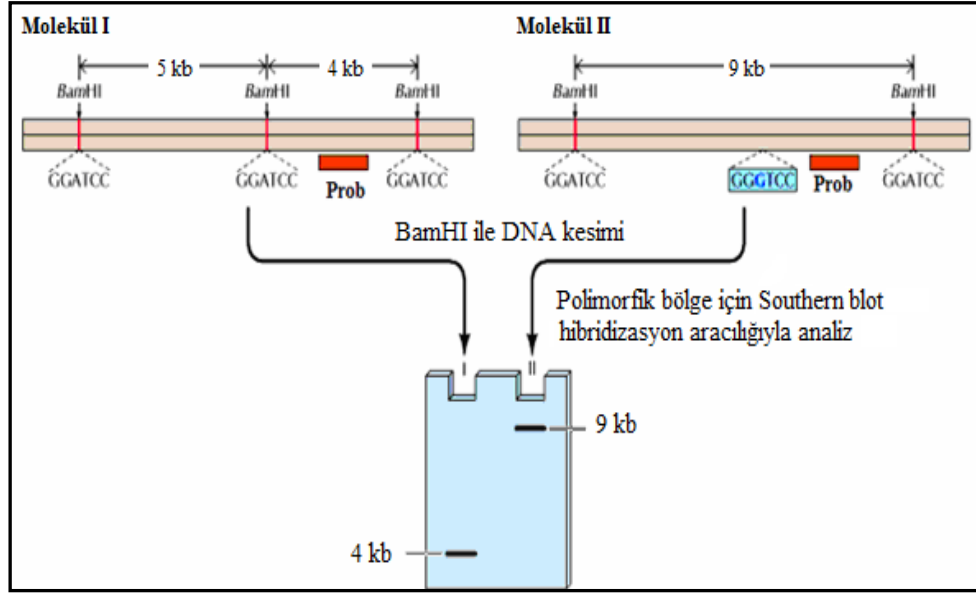
Günümüzde buğday ıslah programlarında yapılan biyoteknolojik uygulamalar arasında yer alan moleküler markör çalışmaları bitki ıslahının etkinliğini önemli derecede artırmaktadır (Motavei ve ark., 2007). Bir moleküler markör yüksek derecede polimorfik davranış göstermeli, kodominant olmalı, genomda sıkça bulunmalı, düzgün dağılım gösterip bütün dokularda gözlenebilme imkanı vermeli, yüksek tekrarlanabilirlik özelliğine sahip olmalı, otomasyona uygun ve hızlı değerlendirilebilmelidir. DNA markörleri stabildirler, tüm dokularda ortaya çıkabilirler ve ekolojik koşullardan etkilenmezler. Epistatik ve pleiotropik etkilere duyarlı değildirler, kalıtları basit ilkelere sahiptir. Genetik çeşitlilik ve germplasm karakterizasyonunun değerlendirilmesi, genotiplerin tanımlanması ve parmak izi, populasyonlar arasındaki genetik uzaklığın tahmini, marköre dayalı seçim ve yararlı aday genlerin dizilerinin tanımlanması gibi çalışmalarda, seleksiyonda, genetik bağlantı haritalamalarında, çeşit tanımlayıp korumakta, genotipler arası genetik uzaklığı belirlemede, hastalık dayanıklılığı ve dayanıklı çeşitlerin ıslah programlarında kullanılmasında ve ıslah projelerinin sürelerini kısaltarak maliyetlerini düşürme amacıyla moleküler markör yöntemlerinden yararlanılır (Reddy, 2001; Bilgin ve Korkut, 2005).

Moleküler markörler, Hibridizasyona Dayalı, Polimeraz Zincir Reaksiyonuna (“Polymerase Chain Reaction”) Dayalı ve DNA Sekans ve Çip (mikroarray) Teknolojisine Dayalı Markörler olarak üçe ayrılırlar.

II.4.3.1. Hibridizasyona Dayanan Moleküler Markörler

Restriksiyon enzimleri ile kesilen DNA parçalarının (prob) araştırılan DNA örneğindeki benzer veya aynı dizilişteki DNA hibridizasyonu sonucu kesilen DNA parçacıklarının jel elektroforez yöntemi ile ayrıştırılmasını ve bu parçacıkların

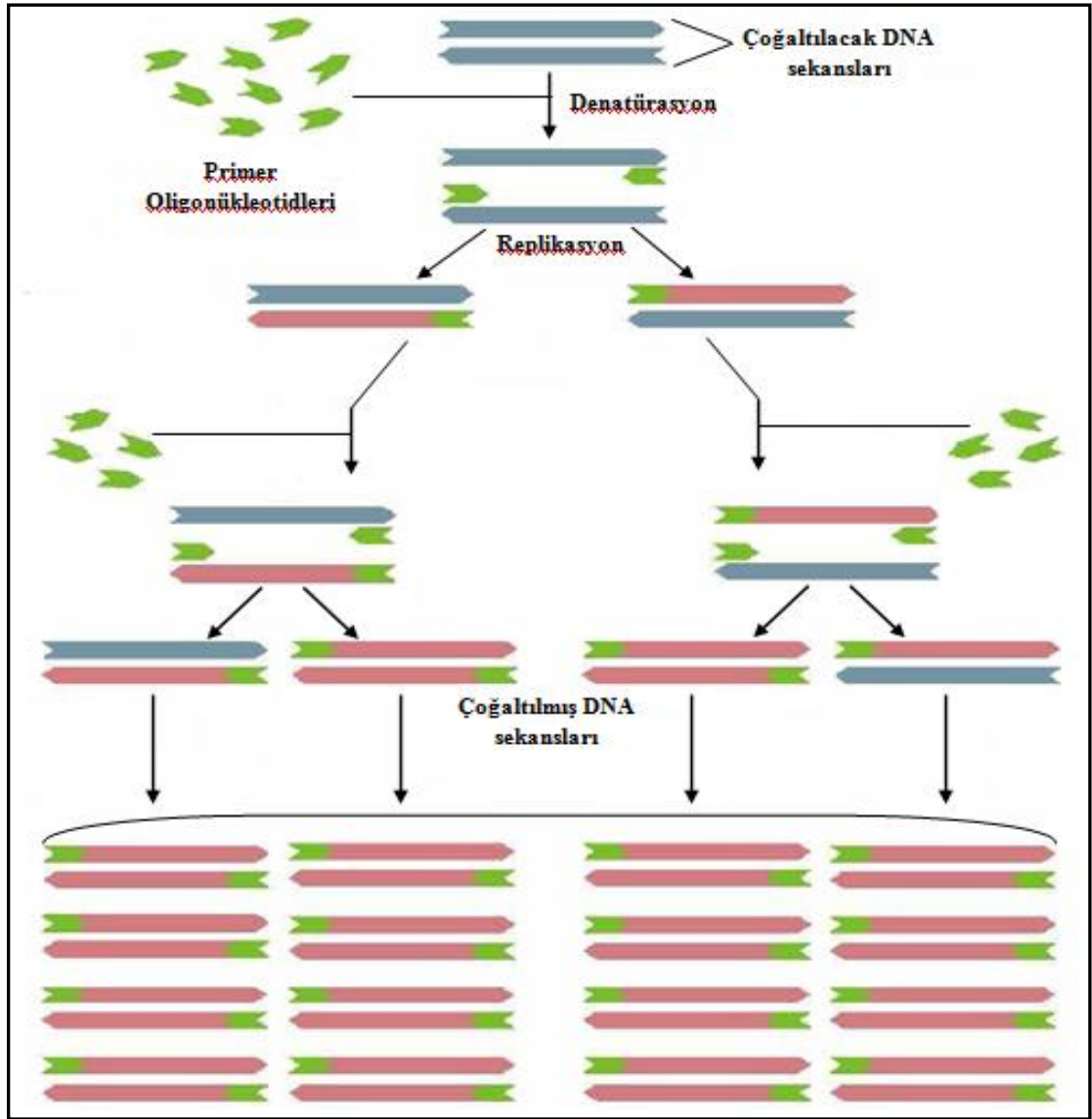
membrana emdirilmesi (blotting) sonucunda prob DNA hibridizasyonu olaylarını içermektedir. RFLP (“Restriction Fragment Length Polymorphism” - Kesilmiş Parça Uzunluk Polimorfizmi), hibridizasyona dayalı bir yöntem olup, geliştirilen ilk moleküler markördür (Şekil.6).



Şekil II.6. RFLP markör sisteminin şematik gösterimi.

II.4.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Kullanımına Dayanan Moleküler Markörler

PZR, canlı organizma olmaksızın primer denilen sentetik oligonükleotid dizilerinin yardımıyla herhangi bir organizmaya ait genomik DNA’ daki özgül bölgelerin çoğaltılmasını sağlayan basit ama çok başarılı bir *invitro* DNA sentezi yöntemidir. DNA molekülünün milyonlarca hatta milyarlarca kopyasını kısa zamanda yapan bu teknik, Cetus firmasının insan genetiği departmanında çalışan araştırmacı Kary Mullis tarafından 1985’de bulunmuş ve patenti alınmıştır. PZR; ilk defa, aynı yıl Kary Mullis ve arkadaşları tarafından orak hücre anemisinin tanısının konulmasında uygulamaya sokulmuştur. 1993 yılında bu çalışma Kary Mullis’e Nobel ödülünü kazandırmıştır. PZR’ ın ilk uygulamasında kullanılan enzimin denatürasyon süresince inaktif hale dönüşmesi nedeniyle karşılaşılan sorun, *Thermus aquaticus*’dan ısıya dayanıklı *Taq* DNA polimeraz enziminin elde edilmesiyle ortadan kaldırılmış ve PZR çalışmalarının otomasyonu sağlanmıştır (Semagn ve ark., 2006) (Şekil II.7).



Şekil II.7. Polimeraz zincir reaksiyonu aşamalarının şematik gösterimi.

Çoğaltılacak olan genomik DNA, ısıya dayanıklı DNA polimeraz (veya ısıya dayanıklı başka bir DNA polimeraz), 9-10 oligonükleotidden oluşan sentetik primer, magnezyum klorür, dNTP (deoksिनükleotid trifosfatlar) ve uygun pH ve iyon koşullarını sağlayan, özellikle magnezyum içeren PZR tampon karışımı (mastermiks) PZR reaksiyonunun bileşenleridir. PZR tekniği; DNA dizi analizi ve DNA haritalaması, DNA parmakizi çalışmaları, genetik haritalama, İnsan Genom Projesi araştırmaları, adli tıp, türler arasındaki polimorfizmin hesaplanması, evrim, bitkilerde tohum saflığının belirlenmesi, klonlama, genetik olarak değiştirilmiş organizmaların belirlenmesi, mutageniz çalışmaları ve gen ifadelerinin karşılaştırılmasında kullanılmaktadır.

RAPD (“Random Amplified Polymorphic DNA”-Rasgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA), **AFLP** (“Amplified Fragment Length Polymorphism”-Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi), **SSR** (“Simple Sequence Repeat”-Basit Dizi Tekrarı, Mikrosatellit), **STS** (“Sequence Tagged Site”-Dizisi Etiketlenmiş Alan), **EST** (“Expressed Sequence Tag”-İfade Edilen Dizi Etiketleri) lerden köken alan EST-SSR markörleri, **SCARs** (“Sequence Characterized Amplified Regions”-Dizisi Karakterize Edilmiş Çoğaltılmış Bölgeler), **CAPS** (“Cleaved Amplified Polymorphic Sequence”-Çoğaltılmış Kesilmiş Polimorfik Dizi), **SSR** (“Simple Sequence Repeat”-Basit Dizi Tekrarı, Mikrosatellit) ve **ISSR** (“Inter Simple Sequence Repeat”-Basit Dizi Tekrarları Arası Bölgeler) markörleri en önemli markör çeşitleridir (Semagn ve ark., 2006).

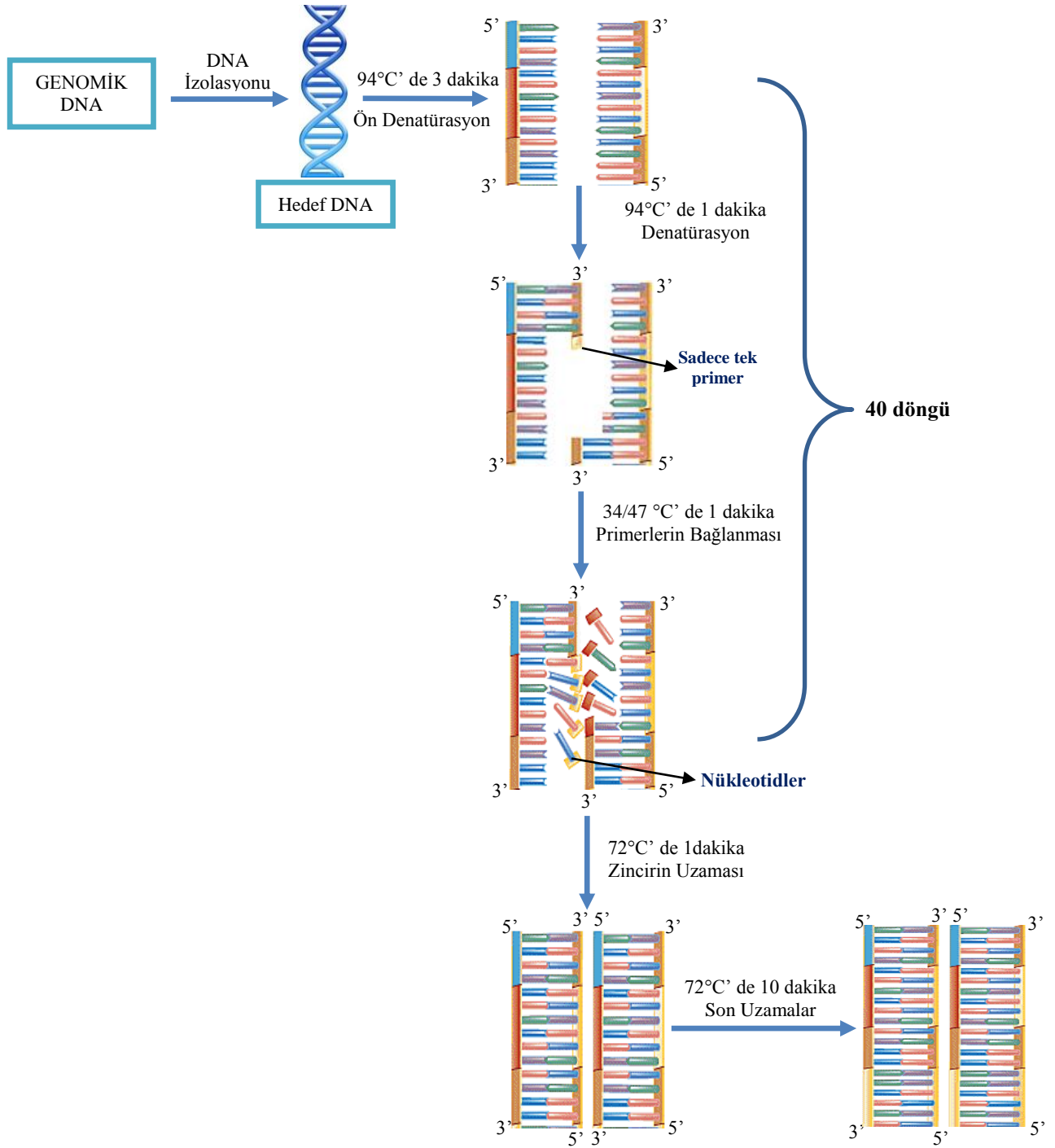
Son yıllarda yapılan araştırmalar sırasında tercih edilen, hızlı ve pratik sonuç elde etmeye yarayan ve polimeraz zincir reaksiyonuna dayalı moleküler markörlerden biri olan RAPD markörü, sarı pas hastalığına dayanıklı genotiplerin seçimini sağlamak amacıyla bu tez çalışmasında kullanılmıştır.

RAPD (“Random Amplified Polymorphic DNA”- Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA) Tekniği ve Yapılan Çalışmalar

RAPD (“Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA, Randomly Amplified Polymorphic DNAs”) ilk defa 1990’da rastgele seçilmiş primerlerin kullanıldığı ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu’nu (PZR) temel alan bir teknik olarak ortaya çıkmıştır (Williams ve ark., 1990). Aynı yıllarda bu teknik, diğer bir çalışma grubu tarafından uygulanmış ve **AP-PZR** (“Rastgele Düzenlenmiş PZR, Arbitrarily Primed PZR”) olarak isimlendirilmiştir. 1991 tarihinde ise bu metot ile aynı temele dayanan fakat farklı olarak 10 nükleotitten daha kısa primerlerle daha kompleks DNA parmak izi profili elde edilen **DAF** (“DNA Parmakizi Çoğaltımı, DNA Amplification Fingerprinting”) olarak isimlendirilen diğer benzer bir metot yayınlanmıştır (Öz Aydın ve ark., 2004).

RAPD yönteminde amaç, dizi bilgisi olmayan türlerden DNA parçalarının çoğaltılmasıdır. Rasgele primerler ile nükleik asitlerin çoğaltımında, primerler arası etkileşim ve enzim ile bağlanma bölgelerinin uygunluğu esas alınır. Hedeflenen dizi bilgisi olmadan istenen DNA’nın çoğaltımı için genellikle 30°C - 46°C düşük bağlanma sıcaklığında 10 bp’lik tek bir rasgele oligonükleotid primerin kullanılması yeterlidir. Elde edilen PZR ürünleri %1.5 - 2.0’lik etidyum bromid ile muamele

edilen agaroz jelde yürütülür. Gerekli görüldüğü durumlarda ürünler, gümüş nitratla boyanan poliakrilamid jel gibi farklı yöntemlerden yararlanılarak yürütülebilir (Hollingsworth ve ark., 1998). Agaroz jel elektroforezinin kolay ve az maliyetli olması RAPD markörlerini daha kullanışlı hale getirmiştir. RAPD fragmentleri, tek lokusun çoğaltımından meydana gelir. Oluşan polimorfizm bantın olup olmasına ve bantların parlaklıklarının farklılıklarına göre iki şekilde ortaya çıkar (Devos ve ark., 1992; Semagn ve ark., 2006) (Şekil.II.8).



Şekil II.8. RAPD tekniğinin şematik gösterimi.

Genel olarak RAPD tekniğinin en büyük avantajı, ilgilenilen taksonun genleriyle ilgili herhangi bir ön bilgi gerektirmemesidir (Başbüyük ve ark., 2000). Çoğaltmada tüm organizmalar için özgün bölgelere rastgele bağlanarak çoğaltma yapan aynı oligonükleotid primer seti kullanılmaktadır (Welsh ve ark., 1991). Bir primer ile, farklı bitkilerin genomik DNA' ları farklı olacağından RAPD analizi sonucunda elde edilen bant profili farklı olacaktır (Glick ve ark., 1998). Bu farklılık sayesinde

organizmalar karşılaştırılır. Farklı araştırıcılar tarafından kodominant veriler gerektirmeyen sistematik problemlerin çözümünde RAPD markörlerin kullanımı, güçlü bir şekilde savunulmaktadır (Halldén ve ark., 1994).

RAPD yönteminin RFLP ve biyokimyasal markörlere (izozimler) göre birçok avantajları vardır. Bu yöntem yoğun laboratuvar çalışmaları ve Southern transferler, filtre hibridizasyonları, otoradyografi gibi pahalı yöntemler gerektirmediğinden ve agaroz jelde görüntülenebilmesi nedeniyle ucuz ve basit olduğundan dolayı daha az maliyetlidir. Çok aşamaya ihtiyaç yoktur. Herhangi bir genomik kütüphane oluşturulmasına gerek duymaz. RFLP analizlerinde olduğundan çok daha az miktarda genomik DNA'ya ihtiyaç duyulur. RAPD yöntemi izozimlerden farklı olarak genom boyunca sınırsız sayıda işaretleyici elde edilmesini sağlar. Ayrıca türler arası ve tür içinde, RFLP ve izozimlerin sağladığından çok daha fazla polimorfizm belirler (Whitkus ve ark., 1994). DNA'ya dayalı markörlerin gelişmesiyle metali tolere edebilen fenotiple ilgili DNA bölgesi tespit edilebilmekte ve kirliliği gidermede kullanılabilir türler geliştirilebilmektedir (Clemens ve ark., 2002; Babaoğlu ve ark., 2004).

RAPD markörünün dezavantajları, tekrarlanabilirlik, dominant kalıtım ve homoloji olarak sayılabilir. Birçok faktör RAPD reaksiyonlarında tekrarlanabilirliği etkilemektedir. Bunlar arasında; DNA'nın nitelik ve niceliği, PZR buffer, MgCl₂ konsantrasyonu, primer ile DNA oranı, bağlanma sıcaklığı, Taq DNA polimerazın kaynağı ve PZR cihazının çeşidi sayılabilir (Wolff ve ark., 1993). RAPD markörünün tekrarlanabilirliği hakkındaki endişe ile birlikte uygun parametrelerin kullanımı, birçok primerin testi, verimli DNA fragmentlerinin eldesi (Yang ve ark., 1993), uygun DNA polimerazın kullanımı (Skroch ve ark., 1995) ve uygun DNA ekstrasyon protokolünün seçimine olanak sağlar (Micheli ve ark., 1994). Yalancı pozitiflik veya negatifliğin tekrarlanması, genetik çeşitlilik ve haritalama çalışmalarını içeren birçok önemli çalışmada RAPD tekniğinin güvenilirliğini azaltır (Rabouam ve ark., 1999). Örnekler arasındaki RAPD fragmentlerinin karşılaştırılması, homolog lokuslara yerleşmiş yürüyen bantların varsayımı ile başlar. Ayrıca elektroforetik çözüme dayalı çalışmalara göre eş uzunluktaki homolog bantlar özellikle poliploid türlerde yeterli derecede doğru olmayabilir. Örneğin eş uzunlukta olan bazı RAPD bantları homolog olmayabilir (Pillay ve Kenny, 1995). Bu aşamada gümüş boyama ve poliakrilamid jel kullanılarak oluşan fragmentlerin büyüklüklerine tam olarak karar verilir (Huff ve ark., 1993). RAPD markörünün diğer dezavantajı,

dominant karakterlere göre ayrılmış allellerin büyüklüğüdür. Bu teknik, heterozigot bireylerden homozigot dominantların ayırt edilmesini engeller. RAPD tekniği, heterozigot allellerden veya homozigot dominantlardan fragment elde etmeyi sağlar. Homozigot resesif allellerden fragment elde edilmez. Çünkü çoğaltım her iki allelede zarar verir (Semagn ve ark., 2006).

Bunun yanında, RAPD yönteminin güvenilirliğini ve tekrarlanabilirliğine etki eden farklı çoğaltma değişkenleri vardır. En önemli değişkenlerden bazıları hedef DNA, MgCl₂ konsantrasyonu, *Taq* DNA polimeraz konsantrasyonu, primer konsantrasyonu, dNTP konsantrasyonu, primer karışımları olarak sayılabilir (Öz Aydın ve ark., 2004). RAPD markörü, dominant olmasından dolayı heterozigotlardan homozigotları ayırt edemez. Bu da marköre dayalı seçim (MAS), genetik haritalama ve genetik popülasyon analizlerinde RAPD markörünün kullanılabilirliğini ve güvenilebilirliğini azaltır (Semagn ve ark., 2006).

RAPD markör sistemi avantajları nedeniyle prokaryotik ve ökaryotik türler gibi pek çok farklı yapının genotipinin belirlenmesi, genom yapısının araştırılması, çeşitli taksonomik çalışmalar, evrimsel sorunlar, popülasyon biyolojisi, ırk ve ebeveyn belirlenmesinde, genetik varyasyonun belirlenmesi, bağlantı haritalarının oluşturulması, özgün bir gen lokusunun belirlenmesi, adli tıp, klinikal teşhis, prenatal tanı, salgınlar ve ekoloji alanlarında yoğun bir şekilde kullanılmaktadır.

Bunlardan başka bitki türlerinin genetik akrabalıklarının belirlenmesi, sistematik tür problemlerinin çözümlenmesi, hibritlerin belirlenmesi, popülasyonlar arası ve popülasyon içi genetik çeşitliliğin belirlenmesi gibi durumlarda da kullanılmaktadır. Değişik familyalara ait ve farklı özelliklere sahip bir çok bitki türünün genetik akrabalığının ve türlerinin belirlenmesi amacıyla yapılan bir çok başarılı RAPD çalışması vardır. Örneğin *Labiatae* familyasına ait farklı *Mentha* türlerinin, türler arası farklılıklarını belirlemek için RAPD tekniğinin uygun olduğu ve türlerin bu teknikte açıkça belirlenebildiği açıklanmıştır (Khanuja ve ark., 2000).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda türlerin genetik akrabalığını belirlemek ve bağlantı haritalarını oluşturmak için RAPD markörleri ile RFLP markörleri birlikte kullanılmıştır (Nocelli ve ark., 1999). Diğer bazı çalışmalarda da RAPD, Mikrosatellit, CAPS, SCAR ve AFLP teknikleri birlikte kullanılarak amaçlar doğrultusunda daha kesin sonuçlara ulaşılmaya çalışılmıştır (Laroche ve ark., 2000). Bazı çalışmalarda RAPD ve diğer PZR temelli çalışmalar ile morfolojik ve kimyasal karakterlerin analizleri değişik amaçlar için birlikte değerlendirilmektedir.

Persson ve arkadaşları *Vaccinium vitisideae* L. türünde yaptıkları çalışmada RAPD ve yaprak şekil analizleriyle türün genetik çeşitliliği ve klonun büyüklüğü ortaya çıkarılmıştır (Persson ve ark., 2001). Siyah Meksika tatlı mısır populasyonunda kromozom çalışmalarıyla gösterilen B kromozomları, RAPD tekniği ile elde edilen polimorfik bantlar sayesinde de belirlenmiştir (Gourmet ve ark., 1996). Bir diğer çalışmada bazı bitkilerinin RAPD analizleri ile uçucu yağlarının değişkenlikleri karşılaştırılmıştır. RAPD analizi ile bitki türlerinin genetik farklılıkları belirlenmiştir. Bu sonuçlarla bir türe ait olduğu düşünülen iki farklı soydan bir tanesinin aslında farklı bir tür olduğuna karar verilmiştir (Kohjyouma ve ark., 1997). *Allium cepa* bitkisinde seksüel ve aseksüel formlar arasındaki genetik ilişkinin belirlenmesinde RAPD markörü ve morfolojik özellikler yine birlikte kullanılmıştır (D'Ennequin ve ark., 1997). Diğer bir çalışmada RAPD markörü ile *Dendroseris* (Asteraceae) türleri arasındaki çeşitlilik belirlenmiştir. Türkiye *Satureja* cinsine (*Labiatae*) ait bazı türler sistematik problemler içermektedir. Bu sistematik problemlerin çözümünde RAPD tekniği kullanılmıştır (Öz Aydın ve ark., 2004).

RAPD markörleri birçok tahıl içeren ürünlerde ümit verici sonuçlar göstermektedir (Devos ve Gale, 1992). Bunlar, kültürler, alt kültürler ve türler arasındaki filogenetik akrabalıkları belirlemede, popülasyon ve türlerde genetik varyasyonun değerlendirilmesinde, kültürlerin tanımlanması ve sınıflandırılmasında, gen etiketlenmesini ve genetik bağlantı haritalarının yapımını içeren bir çok amaçta kullanılmaktadır. Bu uygulamalar türe spesifik markörlerin gelişimine, buğdayda kromozoma spesifik ve genoma spesifik markörlerin gelişimine imkan sağlamaktadır. Ayrıca RAPD tekniği, bitki geliştirme programları sırasında ayrılan popülasyonlarda ekonomik önemi olan özelliklerin değişimi amacıyla istenen genotipin seçimi ve belirlenmesi amacıyla moleküler markörlerin gelişimini sağlar (Göçmen ve ark., 2003).

Markör gelişimi ve ekmeklik buğdayın ekonomik açıdan önem taşıyan bazı özelliklerinin QTL analizleri ile ortaya konması amacıyla yapılan Kunduru 1149 ve Cham-1 ekmeklik buğday çaprazlaması çalışmasında, 150 bç'lik bant oluşmuş ve RAPD markörleri geliştirilmiştir. Bu çaprazlamanın dişi materyali Kunduru 1149; soğuğa karşı dayanıklı, sarı pasa karşı duyarlı, yüksek derecede kaliteli, ürün verme açısından düşük özellikte bir buğday çeşididir. Çaprazlamanın erkek materyali Cham-1; soğuğa karşı duyarlı, sarı pasa karşı dayanıklı, kalitesi düşük, yüksek ürün verme kapasitesine sahip bir buğday çeşididir. Kullanılan 284 RAPD primeri melez

DNA'lar ile taranmıştır. Sonuçta 83 primerin en az bir polimorfik lokusa sahip olduğu görülmüştür. Böylece bu çalışmada ekmeklik buğday için polimorfik bir RAPD primerinin bulunma sıklığı %29.23 tür. Bu çalışmada RAPD markörlerinin, ucuz, basit ve hızlı olmasının yanı sıra tahıl türleri için en kullanışlı moleküler markör çeşidi olduğu kanıtlanmıştır. Deneyler sırasında RAPD markörlerinin verimliliğinin az olması ve DNA hazırlıkları arasındaki RAPD verimsizliği bu teknikte karşılaşılan en büyük problemdir. Ekmeklik buğdayın F₆ popülasyonunun genotipleri için yüksek bir tekrarlanılabilir özelliğinde ve güvenilir bir yol izlenmiştir (Göçmen ve ark., 2003).

Motavei ve arkadaşları (2007), 14 adet buğday çeşidinde RAPD ve ISSR markörler ile genetik tanımlama çalışmaları yapmışlardır. Her iki markör çeşidinde de yüksek polimorfizm görülmüş, RAPD analizlerinde 42 adet banttan 31 adedi (%71) polimorfik iken; ISSR analizlerinde 28 adet allelden 19 adedi (%67.8) polimorfik bulunmuştur. Sonuçta 2 buğday varyetesinin ("Yecora Rojo" ve "West Bread") çaprazlanmasıyla elde edilen buğday hatları (L3, L4, L5, L10, L11 ve L12) sıcaklık dayanıklılığı ve duyarlılığına göre iki farklı kümeye ayrılmıştır.

Kullanımının kolay olması, hızlı, ucuz ve pratik bir yöntem olmasından dolayı RAPD tekniği yıllardan beri birçok çalışmada kullanılmıştır.

Genetik çeşitliliği belirlemek amaçlı pek çok çalışmada RAPD analizleri kullanılmıştır. Bernard ve arkadaşlarının (1997) çalışmasında; Türkiye, İran ve İsrail orjinli toplam 88 yabancı arpa (*Hordeum spontaneum*) genotipinde genetik çeşitlilik araştırmışlardır. Kullanılan 33 RAPD primerinin 22'sinin skorlanabilir bant üretebildiğini, primer başına 1 ile 11 arasında polimorfik bant düştüğünü ve incelenen 88 genotipten sadece 4 adedinin DNA parmak izi bakımından birbirine benzediğini, toplam genetik çeşitliliğin popülasyon içinde % 75, popülasyonlar arasında ise % 25 olarak bulunduğunu rapor etmişlerdir.

Cao ve ark. (1998), 10 RAPD primeri kullanılarak 69 *T. spelta* ve 32 *T. macha* buğday türlerinde türler arası ve tür içi genetik çeşitliliği belirleyip, Jaccard genetik benzerlik katsayısını hesapladıklarını, kümeleme analiz yaptıklarını, sonuçta bu iki türün coğrafik orjinleri ile uyumlu olarak bulunduğunu, *T. macha*'nın *T. spelta*'dan daha fazla genetik çeşitliliğe sahip olduğunu bildirerek, RAPD DNA markörünün buğday germplazmalarının karakterizasyonunda rahatlıkla kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Stojalowski ve Goral (2002), erkek kısır 5 triticale genotipi ile 3 triticale çeşidinde 34 RAPD ve 10 ISSR primeri kullanarak genetik çeşitliliği inceledikleri çalışmada, her iki DNA markörünün de düşük seviyede polimorfizm gösterdiğini ve incelenen genotipler için genetik çeşitliliğin düşük olduğunu bildirmişlerdir.

Budak ve ark. (2004), SSR, ISSR, SRAP ve RAPD DNA markörlerini kullanarak *Buchloe dactyloides* (manda otu) biyotiplerinde genetik çeşitliliği araştırdıkları çalışmada; ortalama genetik benzerliğin SSR'da 0.52, ISSR'da 0.51, SRAP'da 0.62 ve RAPD'te 0.57 olarak bulunduğunu, kullanılan 4 farklı DNA markörünün karşılaştırılması sonucunda RAPD ile SRAP markörleri arasında en yüksek korrelasyon değerinin $r = 0.73$ olarak saptandığını bildirerek, amaca uygun DNA markör seçmede kullanılacak kriterin araştırmanın yapılacağı alt yapıya göre değişeceğini bildirmişlerdir.

Martins-Lopes ve ark.(2007), ISSR ve RAPD DNA markörleri ile 30 Portekiz ve 8 yabancı orjinli zeytin (*Olea europaea* L) çeşitlerinde genetik çeşitliliği belirlemek için yaptıkları çalışmada, 20 RAPD primerinin toplam 301 bant ürettiğini ve bunun da 262'sinin polimorfik olduğunu, 17 ISSR primerinin ise toplam 204 bant ürettiğini ve bunun da 180'inin polimorfik olduğunu, her iki DNA markörü tekniğinde de polimorfizm oranının benzer bulunduğunu (RAPD için % 88; ISSR için % 87), primer başına polimorfik band sayısının RAPD'de 13.1 adet, ISSR'da ise 10.6 olduğunu bildirerek, hem RAPD hem de ISSR markör tekniğinin zeytin çeşitlerini birbirinden ayırmada rahatlıkla kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Motawei ve ark. (2007), ISSR ve RAPD DNA markörünü kullanarak 12 ekmeklik buğday hattı ile 2 ekmeklik buğday çeşidinde (Yecora Rojo ve West Bread) genetik çeşitliliği araştırdıkları çalışmada, RAPD analizi sonucunda elde edilen 42 bandın 31'inin polimorfik bulunduğunu (% 71), ISSR analizinde elde edilen 28 bandın 19'unun polimorfik olarak saptandığını (% 67.8), kümeleme analizi sonucu ekmeklik buğday hat ve çeşitlerinin pedigrilerine göre kümelendiğini, bu iki DNA markörünün amaca uygun buğday ıslahında kullanılabilceği sonucuna varmışlardır.

Doku kültürü şartlarında varyasyonların belirlenmesinde RAPD analizleri yaygın olarak kullanılır. Bu teknik, Zhao ve ark., tarafından mısır hatları arasındaki çeşitliliği belirlemek amacıyla çalışılmıştır (Zhao ve ark., 2007). Kuznetsova ve arkadaşları, farklı mısır genotiplerinin uzun zamanlı kallus kültürlerinin rejenerantlarını analiz etmişlerdir (Kuznetsova ve ark., 2005). Genetik farklılıkları

görüntülemek için, rejenerantlar hem RAPD hem de ISSR yöntemleriyle karşılaştırılmıştır. Venkatachalam ve arkadaşları (2007), mikropropogasyon yapılmış muzda sitokininlerin yüksek seviyedeki etkilerini ve RAPD ile ISSR markörlerini kullanarak bitkiciklerin genetik stabilitesini belirlenmesini araştırmışlardır. MS besiyerinde yetiştirilen kontrol olarak kullanılan bitkiler ile farklı sitokinin uygulanan mikropropogasyon yapılmış bitkicikler RAPD ve ISSR profilleri ile karşılaştırılmıştır (Temel ve ark., 2008).

Mevcut sistematığın kontrol edilmesi ve morfolojik analiz çalışmalarında RAPD analizleri kullanılabilir. Örneğin; Cao ve arkadaşlarının (1999) çalışmasında, RAPD tekniği ile yapılan yanlış sınıflandırılmış buğday örneklerinin yeniden sınıflandırılması amacıyla morfolojik olarak *T. macha* veya *T. vavilovii* ismiyle sınıflandırılmış olan ve yanlış sınıflandırıldığı şüphelenilen 12 genotip ile kontrol genotiplerini RAPD markörü ile analiz ettiklerini, incelenen 12 genotipten 5'inin *T. turgidum* ssp. *dicoccon*, 1'inin *T. timophevii* ssp. *timophevii* ve 6'inin *T. monococcum* ssp. *monococcum* olduğunu tespit ettiklerini, RAPD DNA markörünün buğday materyalinin sınıflandırılması ve bazı türlerin belirlenmesinde rahatlıkla kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Maric ve ark. (2004), RAPD markörünün kullanıldığı, morfolojik özellikler ve çeşitlerin pedigrı kayıtlarını kullanarak 14 Hırvatistan ekmeklik buğday hattı arasındaki genetik farklılığı belirlemek için yaptıkları araştırmada, test edilen 36 RAPD primerden 14'ünün polimorfik bulunduğunu, bunlardan 341 polimorfik bant ürettiğini, morfolojik analiz için 12 özelliğin kullanıldığını, RAPD markörünün ekmeklik buğday çeşit ve hatları arasında yüksek polimorfizm gösterdiğini ve test edilen metotlar arasında istatistiki olarak önemli bir farkın olmadığını bildirmişlerdir.

Akrabalık ilişkilerinin araştırıldığı çalışmalarda RAPD analizleri kolaylıkla kullanılabilir. Örnek olarak; Fernandez ve arkadaşlarının (2002), RAPD ve ISSR DNA markörleri ile farklı ülkelerden gelen 16 arpa çeşidinin filogenetik akrabalık ilişkilerini inceledikleri çalışmada, 10 RAPD primerinin 125, 10 ISSR primerinin ise 228 bant ürettiğini, RAPD ve ISSR verileri kullanılarak yapılan kümeleme analizi sonucunda çeşitlerin yazlık/kışlık ve altı sıralı/iki sıralı olarak gruplandığını belirterek, RAPD ve ISSR markörlerinin DNA parmak izi analizlerinde kullanılacak DNA markörleri olduğunu bildirmişlerdir.

Akar (2002), RAPD DNA markörünü kullanarak Türkiye'nin farklı bölgelerinden toplanmış 10 tane makarnalık yerel çeşidi ile 3 tane tescilli makarnalık buğday çeşidi arasında genetik benzerliği araştırdığı çalışmada, 10 bazlık 15 RAPD primeri ile elde edilen 92 adet banttandır 12'sinin monomorfik, 80'inin ise polimorfik olduğunu, yerel çeşitler içinde genetik çeşitliliğin tescilli çeşitlere göre yüksek bulunduğunu, genetik benzerlik katsayısının 0.74 ile 0.99 arasında değiştiğini, morfolojik karakterler bakımından da yerel çeşitlerde yüksek derecede varyasyon olduğunu bildirerek, incelenen yerel çeşitlerden bazılarının makarnalık buğday ıslahında kullanılabileceğini bildirmiştir.

Tanyolaç (2003), ISSR ve RAPD DNA markörlerini kullanarak, Türkiye'nin batısından toplanmış 15 yabancı arpa (*Hordeum spontaneum*) populasyonu arasındaki genetik ilişkileri araştırdığı çalışmada, 55 RAPD ve 10 ISSR primeri kullandığını, her iki markörün kullanılmasıyla 55 polimorfik bant elde edildiğini, ISSR ve RAPD verilerine göre yapılan kümeleme analizi sonucuna göre iki farklı grubun saptandığını, en yakın genetik ilişkinin ($GU=0.192$) ile Pınarbaşı ve Bornova populasyonları arasında, en uzak genetik ilişkinin ise ($GU=0.926$) ile İçmeler ve Aydın populasyonları arasında bulunduğunu bildirerek, her iki dominant DNA markörünün Arpa'da genetik varyasyonu saptamada etkili bir şekilde kullanılabileceğini bildirmiştir.

Genetik haritalama ve genetik uzaklık çalışmalarında RAPD analizleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Örneğin, Bilgin ve Korkut (2005), bazı ekmeklik buğday (*Triticum aestivum*) çeşit ve hatlarının genetik uzaklıklarının belirlenmesi amacı ile, kullanılan 10 baz uzunluğundaki 10 RAPD primerinden iyi sonuç veren 5'inin değerlendirmeye alındığını, primerler genelinde, genotiplerin amplifikasyon bant sayılarının 2-11 adet arasında değiştiğini, en fazla polimorfik bant sayısının T5 primerinden elde edildiğini, ekmeklik buğday genotiplerinde en düşük benzerlik oranının 0.365 ile Mv-17 ve ME-2 arasında, en yüksek genetik benzerliği de IBWSN-69 ve MV-17 çeşitleri arasında 0.946 ile bulunduğunu bildirmişlerdir.

II.4.3.3. DNA Dizi ve Çip (Mikroarray) Teknolojisine Dayanan Moleküler Markörler

DNA Dizi ve Çip (Mikroarray) teknolojisine dayanan moleküler markörler arasında **SNP** (“Single Nucleotide Polymorphism” - Tek Nükleotit Polimorfizmi) ve **DArT** (“Diversity Array Technology” – Diversity Array Teknoloji) en önemlileridir (Semagn ve ark., 2006). DNA mikroarray’i (gen çipi, DNA çipi ya da biyoçip) cam, plastik veya silikon çip gibi katı bir yüzeye tutturularak sıralı bir şekilde (array) oluşturulmuş, bir mikroarray’de onbinlerce bulunabilen mikroskobik DNA spotlarıdır. Yüzeye tutturulan bu DNA segmentleri prob olarak tanımlanmıştır ve bu problemlerin binlercesi tek bir DNA mikroarray’inde birlikte kullanılabilir (İpekdal, 2006). Bir sıradaki alanlarda bulunan problemler, birbirlerinden birer nükleotid farklılık göstermektedir. Böylece belirli bir pozisyondaki nükleotid içeriğinin testi için, dördü bir alan seti (her birinde bir nükleotid farklı) gerekmektedir. Genetik test için hücrelerden DNA izole edilir ve bir veya daha fazla restriksiyon enzimi ile kesilir. Oluşan parçalar, floresan boya ile işaretlenir ve tek zincirli hale getirildikten sonra çipin içine pompalanır. Problemlerin dizileri ile tam bir eşleşme yapı gösteren parçalar problemlerle birleşir ve dizileri uymayanlar yıkanarak çipten uzaklaştırılır. Bir lazer tarayıcısı çipi okur ve floresan profilini tanımlar. Hibridizasyonun floresan profili, çiple bağlantılı olan bilgisayar programı ile analiz edilir ve veriler nükleotid dizisi şeklinde sunulur. Tek genlerdeki bu mutasyonların test edilmesine ek olarak, DNA çipleri binlerce farklı geni aynı anda taramak için de kullanılabilir.

II.5. BİTKİLERDE EPİGENETİK KALITIM

DNA dizisinde herhangi bir değişiklik olmadan ve daha sonra ortaya çıkan, epigenetik değişiklikler, histon modifikasyonu, kromatin düzenlenmesi ve DNA dizilerinin metillenmesi gibi birbirine bağımlı bir dizi olayları içerir. Bunların hepsi, fizyolojik ve gelişimsel birçok “**stres**” etmeni tarafından uyarılır (Boyko ve ark., 2008).

Bitkilerde, genetik ve epigenetik değişikliklere yol açan strese yanıt esnek ve kısa zamanlıdır (Lukens ve ark., 2007). DNA metilasyonu kalımsal ve fenotipik varyasyonların teşvik edilmesine ve tolerans, dayanıklılık ve koruma gibi adaptasyon

mekanizmalarının gelişmesine neden olur (Shoyama ve ark., 1997; Rani ve ark., 2000; Arnholdt-Shmitt ve ark., 2004; Comai ve ark., 2004; Qin ve ark., 2007).

“Epigenetik” kavramı ilk kez 1950’lerde Conrad Waddington tarafından “genotipin fenotipe dönüşmesi aşamasındaki işlemler” olarak önerilmiştir. Günümüzde ise, “DNA dizi değişikliği olmadan mayotik ve/veya mitotik olarak kalıtılabilen gen ekspresyon değişiklikleri” olarak tanımlanmaktadır. Epigenetik, özellikle canlıların gelişim sürecinde gözlemlenen, hücre farklılaşmaları sırasında ortaya çıkan gen ifadesindeki değişikliklerde önemli rol oynamaktadır. Gen ifadesinde görülen bu değişiklikler, DNA’nın farklı kromatin yapılarına paketlenmesiyle ortaya çıkmaktadır. Ayrıca, DNA’da veya kromatindeki histon proteinlerine bağlı nükleotidlerin kimyasal değişimine bağlıdır (Gupta ve ark., 2008).

Epigenetik bileşenler, farklı çevre koşullarında türlerin uzun vadeli adaptasyonunda önemli bir rol oynayabilirler. Bu yüzden epigenetik belirteçler, yapılacak olan popülasyon çalışmalarında göz ardı edilmemelidirler (Lira-Medeiros ve ark., 2010).

DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları, epigenetik çalışmalarında en çok değerlendirilen durumlardır.

II.5.1. Histon Modifikasyonları

DNA’nın paketlenmesinde görevli olan histon proteinlerinin bazik amino-terminal uçları nükleozomdan çıkıntılar yapar ve bir takım posttranslasyonel modifikasyonlara uğrayabilir. Histonlar üzerinde yapılan bu değişiklikler, kromatinin yapısının gevşek ya da sıkı olma durumunu etkileyerek gen ifadesinde regülasyon rol oynar. Histonlardaki modifikasyonların ve DNA metilasyonunun birlikte çalışarak gen ifadesinin durumunu belirlediği ve bu şekilde hücrenin yazgısının belirlenmesinde önemli rol oynadığı kabul edilmektedir.

II.5.2. DNA Metilasyonu

DNA metilasyonu, sitozin bazında meydana geldiği için “sitozin metilasyonu” olarak da isimlendirilmesinin yanında, çoğu ökaryotik genomun içinde bulunduğu yüksek yapılı bitkiler hakkındaki bilgiyi arttırmayı sağlayan önemli bir epigenetik modifikasyondur.

DNA metilasyonunun etkilediği gen regülasyonu ökaryotlarda son yıllarda yoğun olarak araştırılan ve ökaryotik hücrelerde görülen önemli epigenetik değişikliklerinden biridir. Ayrıca, DNA metilasyonu insanlarda ve pek çok memelide bilinen tek doğal DNA modifikasyonudur ve yalnızca guanin (G) tarafından takip edilen sitozin (C) bazını etkiler ve böylelikle, bu organizmalarda, yalnızca CpG alanlarında gözlenir (Martienssen ve ark., 2001). DNA metilasyonu tarafından ortaya konulan epigenetik modifikasyonlar, gen regülasyon sürecinin anlaşılması ve transkripsiyonel kontrolün değerlendirilmesinde oldukça önemli hale gelmiştir. Gen nükleotid dizisinde değişiklik olmaksızın, gen ifadesinde kalıtılabilir değişimlerin gözlemlenmesi ve aynı genotipin nasıl olup da farklı fenotiplere yol açtığı epigenetik ile açıklanabilir.

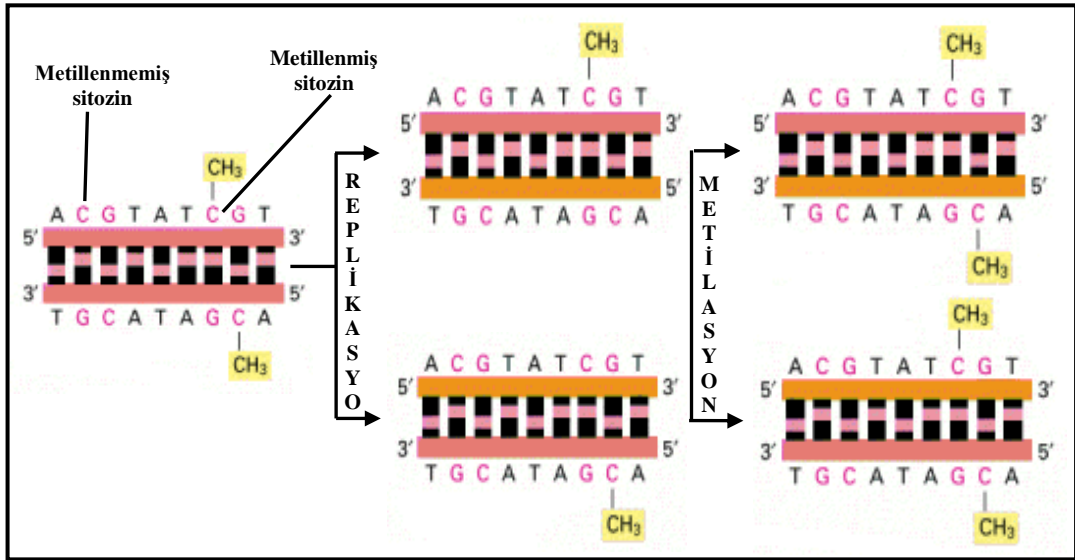
Metilasyon aracılığıyla oluşan DNA dizisindeki değişiklikler, bitkilerde epigenetik olarak kalıcı bir kalıtım gösterirler. DNA metilasyonundaki değişiklikler, geri dönüşümlü olmasına rağmen genellikle kalıcı modifikasyonlardır, kolay kolay tolere edilemezler. Ayrıca epigenetik modifikasyonlar, sadece bitkinin strese maruz kalması sırasında ortaya çıkmaz, gen anlatımındaki çok sayıdaki değişiklik sonucunda da ortaya çıkabilir ve nesiller boyunca aktarılabilir (Boyko ve ark., 2008). Yüksek yapılı bitki genomunda, ‘CpNpG’ trinükleotid veya ‘CpG’ dinükleotidlerinde, yaklaşık olarak %90’ı metillenmiş olan bölgedeki sitozinlerin %20-50’si metillenmiştir. Metilasyon farklılığı ve kalıtsal hatlar, kardeşler ve onların ebeveynleri arasında analiz edilebilir (Yong ve ark., 2008). Aslında hayvanlardan çok bitkilerde gözlemlenen DNA metilasyonundaki değişiklikler, bitkinin yerleşik olan yaşam şekline uygundur (Takeda ve Paszkowski, 2006; Finnegan ve ark.,1998).

CpG bölgelerindeki DNA metilasyon hatları, bitki gametogenezi sırasında epigenetik kalıtımın anahtarı olarak görülmektedir.

Kısmen de olsa bitki gelişiminin düzenlenmesinde DNA metilasyonunun rol oynadığını ifade eden çalışmalar mevcuttur. Bazı türlerde (domates, pirinç gibi) farklı organlar arasında sitozin metilasyonunda önemli farklılıklar olduğu tespit

edilmiştir. Genomik DNA metilasyon seviyeleri gelişim evresine bağlı olarak fide döneminden ergin döneme doğru da artış gösterir (örneğin *Arabidopsis*) (Downton ve Dickinson, 2006).

DNA metilasyonun temeli, DNA dizisindeki sitozin ile 5-metilsitozinin ayırt edilmesine dayanır (Şekil II.10). Bu olay, spesifik DNA metil transferaz enzimi aracılığıyla S-adinozil methioninden metil grubunun taşınmasını anlatmaktadır. Yani DNA metillenmesi, genel kural olarak, DNMT (DNA metil transferaz)'ler tarafından CpG adacıklarında ve sitozinin 5. karbonunda meydana gelir (Vanyushin, 2005; Hafız ve ark., 2006) (yunus.hacettepe.edu.tr) (Şekil.II.9). Bu tez çalışmasında, sitozin bazında görülen değişimler temel alınarak incelenen DNA metilasyonu çalışılmıştır.



Şekil II.9. DNA metilasyonunun şematik gösterimi.

Bitkilerde sitozin DNA metilasyonu CpG, CpNpG (N bazı, p ise iki baz arasındaki fosfodiester bağımlı gösterir) CG ve CNG bölgelerinde ve asimetrik CpHpH bölgelerinde (H; adenin, sitozin ve timini gösterir) görülür (Dai ve ark., 2005). Enzim çiftiyle kesilen DNA fragmentlerinin primerle çoğaltımı sonucu oluşan elektroforetik hatlardaki farklılıklar, DNA metilasyon oranının değerlendirilmesi için bir kriter olarak kullanılmaktadır. Kesim ve çoğaltımdan sonra örneklerin elektroforezdeki farklılıkları, DNA metilasyon seviyesini belirler (Armstrong ve ark., 1994). Bu amaçla, CRED-RA tekniği yardımıyla türler arası metilasyon seviyesi ölçülebilir.

DNA metilasyon seviyesinin ölçülmesi amacıyla *Arabidopsis* (Cervera ve ark., 2002), pirinç (Wang ve ark., 2004), fıçı yoncası (*Medicago truncatula*) (Santos ve ark., 2002), Pisum (Knox ve ark., 2001), pamuk (Keyte ve ark., 2006), mısır (Kaeppeler ve ark., 1993), zeytin, hurma (Jaligot ve ark., 2000), muz (Echeverria ve ark., 2001), gül (Xu ve ark., 2004), şerbetçi otu (Peredo ve ark., 2006), arpa (Li ve ark., 2007), *Codonopsis lanceolata* (Guo ve ark., 2007) ve patates (Sharma ve ark., 2007) gibi birçok bitki ile çalışılmıştır (Schellenbaum ve ark., 2008).

Metilasyonun iki ana görevi vardır:

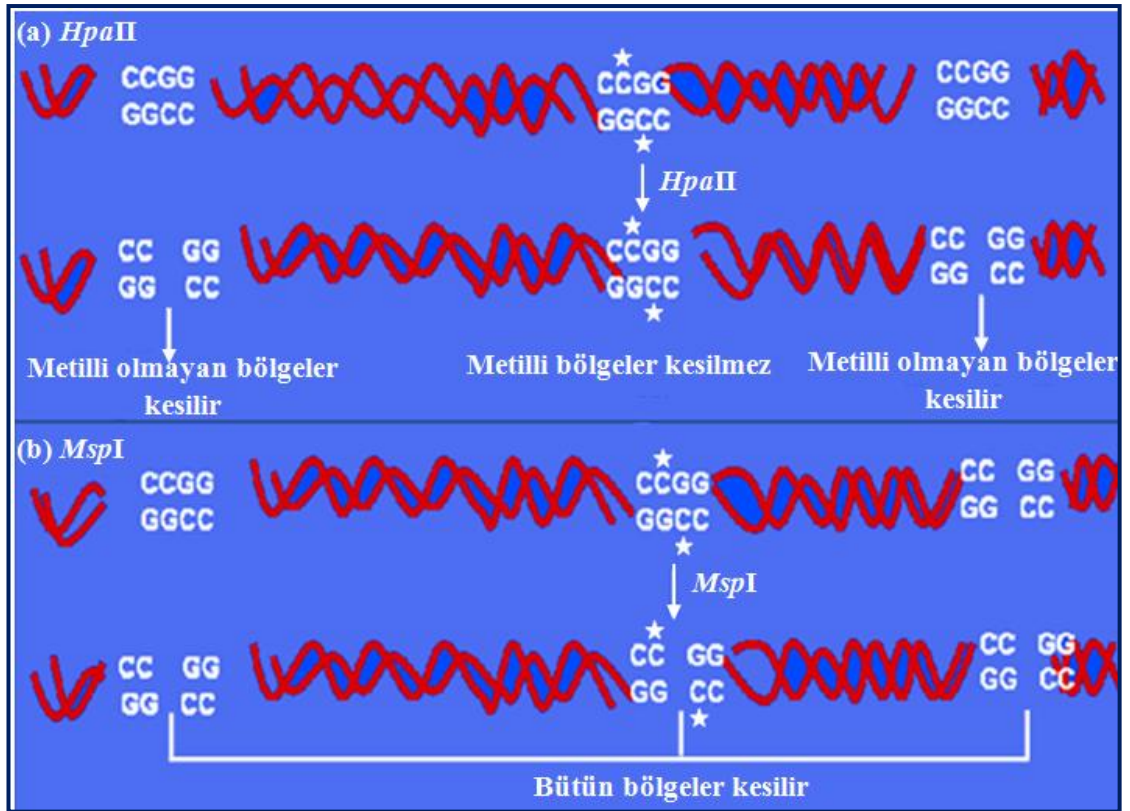
- Transkripsiyonu baskılamak.
- Genomun güvenliğini ve yapısal bütünlüğünü sağlamak.

DNA metilasyonu, gen anlatımı kontrolünde, fenotipik ve fonksiyonel anormallikler ve evrim araştırmalarında önemli rollere sahiptir. Bunun yanında, karsinogenez (mitoz), gen sessizleşmesi, genomik damgalanma, kromatin düzenlenmesi, hastalığa karşı koruma, DNA replikasyonun düzenlenmesi gibi farklı aktivitelerde de rol oynar (Chan ve ark., 2005). Erken tanı olanağı sağlayabilmesi, kanserin sınıflandırılması, prognozu ve tedavisi ile ilgili olarak yol gösterici olabilmesi nedeniyle metilasyon, kanser araştırmalarında önemli bir yere sahiptir. DNA'nın metilasyonu gen anlatımını kontrol eden hücrel bir epigenetik programdır. Kanserleşmenin erken evresinde metillenme paterninin değişiklik gösterdiğinin anlaşılması kanser araştırmalarında önemli bir aşama olmuştur. Daha spesifik olarak yakın gelecekte farklı kanser türlerinde epigenetik markörler kullanılabilir. Örneğin yaygın bir kanser türü olan meme kanserinde 7 gende anormal epigenetik değişimler saptanmıştır. Bu genler: SEMA6B, BIN1, VCIPI1, LAMC3, KCNH2, CACNG4 ve PSMF1 genleridir. SEMA6B'de %38, BIN1'de %18, LAMC3'de %8 oranlarında metilasyon belirlenmiştir. Bu genler normal meme dokusunda metile durumda değildirler. Bunlar da, DNA "çevreden etkilenir" sözünü doğrulamaktadır.

DNA metilasyonu, DNA metiltransferazlar tarafından gerçekleştirilen enzimatik bir modifikasyondur. Eklenmiş olan metil grubu baz eşleşmesinin kendisini etkilemese de metil gruplarının dışarı doğru çıkıntı yapması DNA-protein etkileşimlerini etkileyebilir. Ökaryotlarda DNA metiltransferazların iki farklı tipi tanımlanmıştır. *de nova* metiltransferazlar (Dnmt3a ve Dnmt3b), metillenmemiş DNA'yı substrat olarak kullanır. Dnmt1 gibi bakım yapan metiltransferazlar, metilasyon alanlarının replikasyonu ile oluşan yarı metillenmiş DNA'yı metiller.

Dnmt1 gibi bakım yapan metiltransferazların oluşturduğu metilasyon, kalıp DNA iplikliğinin varolan metilasyon paternini yeniye sentezlenmiş olana kopyalar. Bu nedenle DNA metilasyonu kalıtlanabilir ve epigenetik bir işaret olarak nesiller boyunca mitotik ve mayotik hücre bölünmeleriyle transfer edilir.

En çok kullanılan izoşimer çifti olan ve metilasyonda farklı duyarlılık gösteren *Hpa* II ve *Msp* I enzimlerinin her ikisi de CCGG bölgesini tanır. *Hpa* II, mC/mCGG iç sitozini metiller ve dış sitozinin yarı metillendiği bölgeleri kesmez. *Msp* I, mC/CGG dış sitozini metiller ve iç sitozinde metilenmiş bölgeleri keser (Magdalena ve ark., 2004; Bauren ve ark., 2003). *Hpa*II, sitozin tamamen metilenmişse (double-strand) kesim yapamaz ama dıştaki C tamamen metillenmemişse (single-strand) kesim yapabilir. Buna karşılık; içteki C tamamen metillenmiş ya da metillenmemişse *Msp*I kesim yapar (McClelland ve ark., 1994; Zhao ve ark., 2007; Schellenbaum ve ark., 2008, Şekil II.10 ve Tablo II.2).



Şekil II.10. *Hpa*II ve *Msp*I enzimlerinin kesim özellikleri ve kesim bölgeleri.

(a) Eğer ikinci sitozin metilli ise (yıldızla gösterilmiştir) *Hpa*II kesim yapamaz. (b) *Msp*I ise ikinci sitozin metilli olsun ya da olmasın tüm CCGG bölgelerinden DNA'yı keser. Bu nedenle belirli bir dokuda, belirli bir genin metillenme durumu, o dokudan izole edilen DNA'yı *Hpa*II ve *Msp*I ile keserek saptanabilir.

Tablo II.2. CRED-RA analizinde kullanılan *HpaII* ve *MspI* enzimlerinin özelliklerinin karşılaştırılması.

<i>HpaII</i>	<i>MspI</i>
İçteki C metilenmişse kesim yapamaz	İçteki C metilenmişse kesim yapar
Dıştaki C tamamen metilenmemişse kesim yapar	Dıştaki C metilenmişse kesim yapar
İç sitozini metiller	Dış sitozini metiller

PZR öncesi restriksiyon enzimleriyle DNA'nın kesimi, bazı bantların görünmemesiyle sonuçlanabilir. Bu bantlar, enzimle kesilen bölgelerde modifiye edilmiş bant profilleridir. Bundan sonraki incelemelerde, enzimlerle kesilen örneklerden çoğaltım ürünleri elde edilir. Öncelikle *MspI* ile kesilen örnekte sonra *HpaII* ile kesilen örnekte bant görülür. Böylece 5mC5mCGG veya 5mCCGG çeşidindeki örnekte metillenme nedeniyle değişikliğe uğramış CCGG bölgesinin varlığı kanıtlanmış olur.

Metilasyonun varlığı veya yokluğu, *HpaII* ve *MspI* izoşizomerik restriksiyon enzimlerine cevap veren metilasyon çifti ile genomik DNA'nın kesimi sayesinde belirlenen polimorfizmin ortaya çıkması ile sonuçlanır (Hafız ve ark., 2006).

DNA'yı oluşturan dört bazın (A-adenin, T-timin, C-sitozin, G-guanin), 16 olası dinükleotid kombinasyonu (AA, AT, AC, AG, TT, TA, TC, TG, CC, CA, CT, CG, GG, GA, GT ve GC) bulunmaktadır. Dinükleotidler bazen NpN olarak gösterilir. Burada N bazı, p ise iki baz arasındaki fosfodiester bağımlı temsil etmektedir (örneğin; CpG Sitozin fosfo Guanin anlamındadır). Yani, bir DNA sekansında herhangi bir dinükleotidin bulunma olasılığı 1/16 ya da ~ %6'dır. Buna karşın insanlarda CpG dinükleotidi sıklığının ölçüsü çok azdır, buna CG baskılanması denmektedir. CG baskılanması, sitozin metilasyonunun kullanıldığı bütün genomlarda karakteristiktir. Bu olay, insan genomunun başından sonuna kadar 300-3000 bp uzunluğundaki küçük alanlar haricinde, çok belirgindir. Bu alandaki CpG'lerin sıklığı ya beklenen değerdedir ya da beklenilenden daha fazladır. Genomun %1 kadarında bulunan bu alanlara CpG adacıkları denilir. CpG adalarının, CG baskılanması olayından evrim süresince kaçabilmesinin nedeni; tipik şekilde metillenmemeleri ve mutasyon baskısına uğramamalarıdır. CpG adaları, ifade olan genlerin 5' bölgesinde bulunur ve insan promotorlarının % 60'ından fazlası bu CpG adalarını içermektedir. Buna karşın, pek çok CpG adaları genlerin promotorlarında

bulunmamaktadır ve bunların önemi açıklığa kavuşturulamamıştır. Burada en önemli alanlar, promotorlardaki CpG adalarıdır. Çünkü metillendikleri zaman gen sürekli sessiz hale gelir ve bu sessizlik mitoz bölünmeler boyunca aktarılır. Bu sebeple, epigenetiği CpG adacıklarının metilasyonunun temsil ettiği düşünülür.

II.5.3. DNA Metilasyonunun Değerlendirilmesinde Kullanılan Yöntemler

Genlerin metilasyon derecelerinin ölçülmesinde çok çeşitli yöntemler kullanılmaktadır (yunus.hacettepe.edu.tr). Bunlardan bazıları;

- (1) Southern Blot Analizi,
- (2) Metilasyona Duyarlı Çoğaltım Polimorfizmi (MSAP),
- (3) DNA'nın sodyum bisülfat ya da metabisülfat ile kimyasal olarak modifikasyonu (COBRA),
- (4) DNA'nın metilasyona duyarlı bir restriksiyon endonükleaz ile kesilmesi (CRED-RA).

Biz tez çalışmamızda, sarı pas hastalığına dayanıklı ve duyarlı anaçlar (PI178383, Harmankaya99, İzgi01, ES14, Sönmez2001 ve Aytın98) ile birlikte göz önünde tutulan kombinasyonların (PI178383 x Harmankaya99, İzgi01 x ES14, Sönmez2001 x Aytın98) metilasyona farklı duyarlılık gösteren (*HpaII* ve *MspI*) izoşimer çifti ile muamele edildiği CRED-RA tekniğini kullandık.

1. Southern Blot Analizi:

Southern blot, DNA metilasyon analizinde en sık kullanılan yöntemdir. Bu yöntemde; genomik DNA, aynı dizilim için spesifik olan metilasyona duyarlı ve duyarsız endonükleazlarla kesilir (*HpaII* ve *MspI*). Kesilen fragmentler agaroz jelde ayırıldıktan sonra membrana transfer edilir ve hedef DNA dizisi için spesifik olan bir proba hibridize edilir. Otoradyografi yöntemi ile tahmin edilen büyüklükteki bantların varlığı belirlenir. Gereken DNA miktarının örnek başına 5-10 µg olması ve tamamlanmamış enzim kesiminin sonuçları etkilemesi bu yöntemin dezavantajlarıdır.

2. MSAP ("Methylation-Sensitive Amplified Polymorphism-Metilasyona Duyarlı Çoğaltım Polimorfizmi")

MSAP, AFLP tekniği dediğimiz standart çoğaltılmış parça uzunluk polimorfizminin değiştirilmiş versiyonudur.

Bu teknikte, aynı kesim bölgelerini (50-CCGG) tanımlayan ama sitozin metilasyonuna farklı duyarlılık gösteren izoşimer çifti olan *MspI* ve *HpaII* enzimleri kullanılır. Ayrıca her bir DNA örneğinin, EcoRI + *HpaII* ve EcoRI + *MspI* kesimiyle oluşan spesifik fragmentlerin farklılığı dikkate alınır (Salmon ve ark., 2005). Kesilen DNA fragmentlerini hedef alan primerlerle polimeraz zincir reaksiyonuna tabi tutulur.

Preamplifikasyon ve selektif amplifikasyon AFLP analizlerindeki gibidir. Elektroforez ve otoradyografik yöntemlerle fragmentler analiz edilir. Bu tekniğin en büyük sınırlaması, enzim kesiminin tamamlanmak zorunda olması ve hedef bölgede pek çok CpG alanının olması durumunda bazıları metillenmiş bazıları metillenmemiş sonuçların yetersiz olmasıdır.

3. COBRA (“Combined Bisulphite Restriction Analysis- Karışık Bisülfüt Restriksiyon Analizi”)

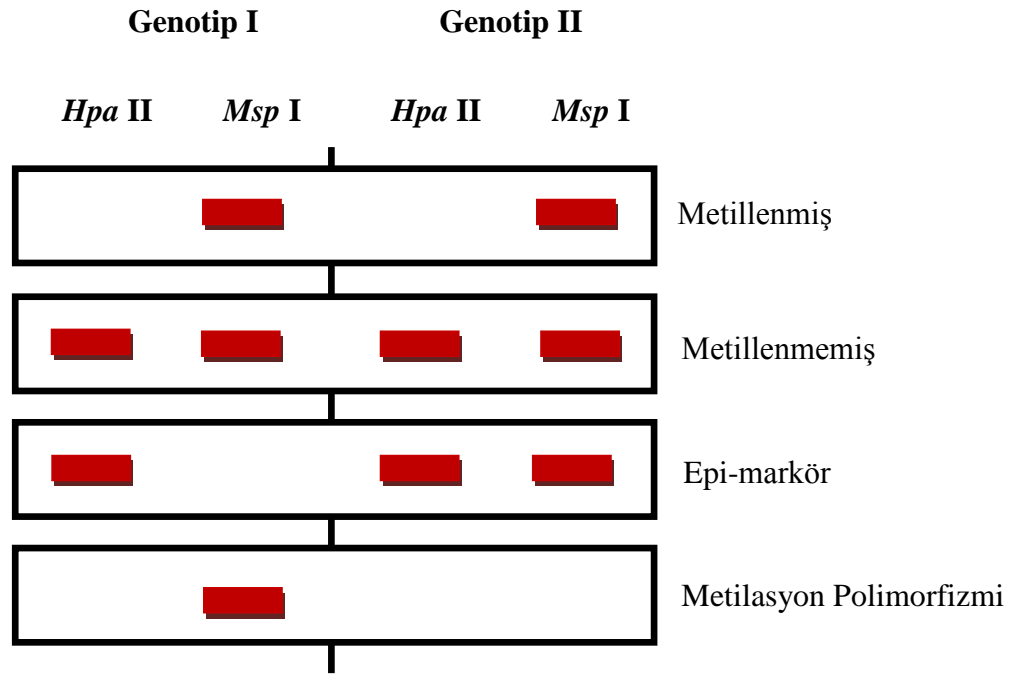
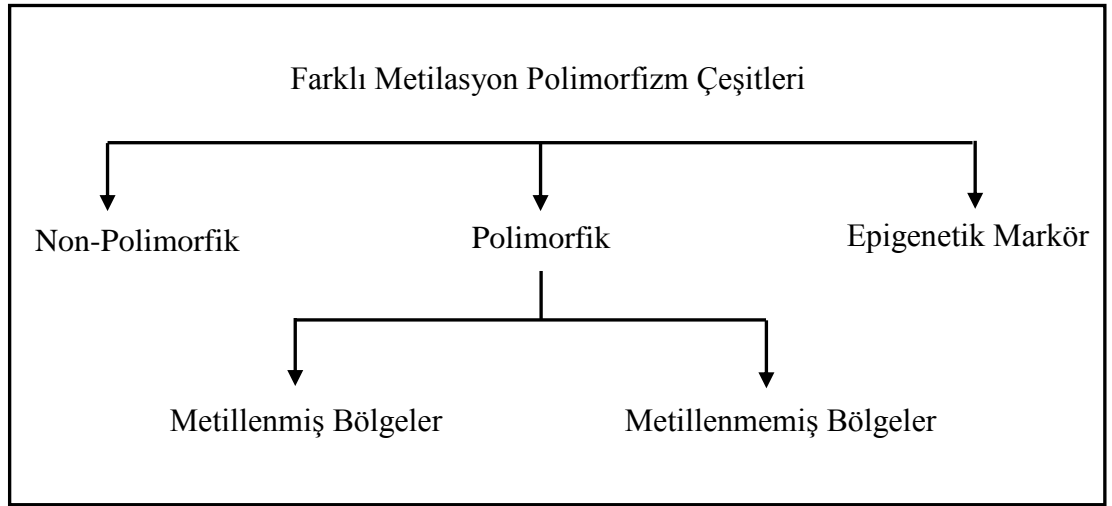
Bisülfüt metodu, 5-metilsitozin içeren DNA dizisinde, genlerin metilasyon derecelerini analiz etmek için yeni tekniklerin geliştirilmesine olanak sağlar (Clark ve ark, 1994). Bu yöntem, sodyum bisülfüt yardımıyla tek iplikli DNA’ daki bütün sitozinlerin urasile deamine edilmesi temeline dayanır. Bu sırada 5-MC (5-metilsitozin) değişmeden kalır (Hayatsu ve ark., 1970). Daha sonra bu modifiye edilmiş DNA, uygun primer seti kullanılarak PZR ile amplifiye edilir. Bu çoğaltımda, değiştirilmiş sitozin olan urasiller timin olarak çoğaltılır, sadece 5-MC’ler sitozin olarak kalır. Çoğaltılmış fragmentlere ya direkt ya da her bir molekülün klonlanmasından sonra dizi analizi yapılabilir.

4. CRED-RA (“Coupled Restriction Enzyme Digestion-Random Amplification”-Çift Restriksiyon Enzim Kesimi-Rastgele Çoğaltım”)

CRED-RA (“Coupled Restriction Enzyme Digestion-Random Amplification”-Çift restriksiyon enzim kesimi - rastgele çoğaltım), epigenetik varyasyonların sebep olduğu DNA metilasyonunu belirlemede kullanılan bir metottur (Cai ve ark., 1996). Bu yöntemde, *HpaII* ve *MspI* gibi metilasyona duyarlı enzimler ile DNA kesiminden sonrasında genotipler arasındaki metilasyon değişimleri belirlenir (Levanic ve ark., 2004; Prakash ve ark., 1997).

Ayrıca bu teknik, metilasyona farklı hasassiyet gösteren izoşimer çiftlerinin her biri tarafından kesilen DNA fragmentleri arasındaki karşılaştırmaya ve seçici PZR'a dayalıdır (Lopez ve ark., 1997).

Farklı kesim enzimlerinin yarattığı sonuçların değerlendirilmesinde çeşitli ifadeler kullanılmıştır. DNA metilasyonuna bağlı değerlendirmeler; polimorfik, non-polimorfik ve epigenetik markör olmak üzere üç şekilde ele alınabilir (Takata ve ark., 2005; Keyte ve ark., 2006). Genotip bazında ele alındığında *MspI* enzim kesimi sonucunda bir bant profili elde edilip *HpaII* enzim kesimi sonucunda ise herhangi bir bant profilinin elde edilemediği durumlar "metillenmiş" olarak ifade edilir. Genotipte her iki enzim kesimi sonucunda da bir bant elde edilmesi durumu ise "metillenmemiş" olarak ifade edilir. Genotipler arasında (ikili kombinasyonlarda) metilasyon bölgelerinden doğan farklılıklar (*HpaII* ve *MspI* enzim kesimlerine bağlı olarak) polimorfik, non-polimorfik ve epigenetik markör olarak değerlendirilir. (Şekil.II.11).



Şekil II.11. DNA metilasyon polimorfizminin değerlendirilmesinde yararlanılan ifadeler (Keyte ve ark., 2006).

DNA metilasyon polimorfizmi, dokulara göre farklılık göstermektedir. Örneğin; Levanic ve arkadaşları (2004) tarafından yapılan çalışmada, CRED-RA tekniği kullanılarak 3 embriyonik kabak çeşidinde doku kültürü yöntemlerinin teşvik ettiği stres gözlemlenmiştir. Sonuçta, DNA metilasyonunun en fazla erken embriyo safhasında olduğu, embriyogenezin başlamasıyla sitozin metilasyonunun seviyesinin arttığı görülmüştür.

DNA metilasyon polimorfizmi, inhibitörler tarafından baskılanır. Örnek olarak; Prakash ve arkadaşları (2003) tarafından yapılan çalışmada, 5-azacytidine ve 5-aza-2 β -deoxycytidine gibi DNA metilleme inhibitörleri kullanılarak *Petunia* yaprak explantlarında ve CCGG ve CGCG dizilerinde sitozin metillenmeleri incelenmiştir. Sonuçta, *HpaII* ve *MspI* enzimleri ile kesim sonrası çoğaltım sonucunda MADS-box ve CDC48 genlerinde oluşan sitozin metilasyonunun, inhibitörler sayesinde azaldığı görülmüştür.

DNA metilasyon polimorfizmi, generasyon farklılığını belirlemek amacıyla kullanılabilir. Örneğin; Xiong ve arkadaşları (1999) tarafından yapılan çalışmada, pirinç kültürleri ve onların F1 hibritleri arasındaki kalıtsal metillenme farklılıkları incelenmiştir. Pirinç kültürleri arasında ve düşük kopya dizilerinin dördünde gözlenen metilasyon, pirinçte kültürler arası genetik varyasyona katkı sağladığı görülmüştür.

Bazı buğday türlerinde düşük kopyalı ve tekrarlı DNA' yı etkileyen değişimler gözlemlenmiştir. Örneğin; allotetraploidi gösteren buğdaylarda epigenetik açıdan yeniden programlama görülmektedir. Poliploididen sorumlu genetik ve epigenetik mekanizmalar incelendiğinde, buğday ve bazı türlerin genom duplikasyonu ile ilişkili benzer ve farklı mekanizmalara sahip olduğu görülmüştür. Örnek olarak, buğday gibi pamuk da genomik homeostaz göstermekte fakat epigenetik açıdan yeniden programlanma görülmemektedir (Adams ve Wendel, 2004).

Kallusun genetik ve epigenetik stabilitesi, sırasıyla RAPD ve CRED-RA teknikleri ile araştırılmıştır. Bu amaçla, arpanın (*Hordeum vulgare* cv. Zafer-160) olgun embriyoları, MS besiyerinde 24 hafta kültüre alınmıştır. RAPD analizleri yardımıyla test edilen 20 primerin 16 tanesi ile 103 çoğaltım ürünü elde edilmiştir. Bunlardan 24 adedi olgun embriyoya spesifik, 54 adedi kallusa spesifik ve 25 tanesi her iki doku çeşidinde de görülür. RAPD analizleri sırasında en iyi çoğaltım ürünü veren 3 primer, CRED-RA analizlerinde de kullanılmıştır ve 17 çoğaltım ürünü elde edilmiştir. Bunlardan 8 tanesi farklı çoğaltım ürünleridir.

Buna göre, kültür şartları, genetik farklılıklara neden olur ve üstelik sitozin metilasyon değişikliklerine bir kanıttır.

BÖLÜM III

TEZ ÇALIŞMALARI

Bu tez çalışmasının deneysel kısmı, TÜBİTAK, Marmara Araştırma Merkezi, Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü, Bitki Biyoteknolojisi laboratuvarının imkânlarından yararlanılarak gerçekleştirilmiştir.

III.1. BİTKİ MATERYALİ

Bu çalışmada, sarı pas hastalığına karşı (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*) dayanıklı ve duyarlı buğday çeşitlerinin araştırılması için dayanıklı çeşit olarak, Anadolu Tarımsal Araştırma Enstitüsü (ATAE) tarafından geliştirilen İzgi01, Sönmez2001 ve yerel bir çeşit olan PI178383 ile duyarlı çeşit olarak Aytın98, ES14 ve Harmankaya99 olmak üzere 6 adet kışlık ekmeklik buğday (*Triticum aestivum* L.) kullanılmıştır (Tablo III.1. ve devamı). Bu çeşitler, TÜBİTAK Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü serasında yetiştirilmiştir.




Triticum aestivum ssp. *aestivum* olarak bilinen ekmeklik buğday, tetraploid *Triticum turgidum* (AABB) buğdayının *Aegilops tauschii* (D) ile hibridizasyonu sonucu meydana gelen AABBDD genoma sahip hekzaploid bir türdür ve sistematikteki yeri aşağıda olduğu gibidir (Şekil III.1.).






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

Şekil III.1. Buğday (*Triticum* spp.) bitkisi (<http://www.apsnet.org>).

Tablo III.1. Çalışmada kullanılan buğday genotipleri.

GENEL ÖZELLİKLER	ÇEŞİTLER		
	 PI178383	 Harmankaya99	 İzgi2001
Kılıçık	Kılıçıklı	Kılıçıklı	Kılıçıklı
Başak Rengi	Kahverengi	Beyaz	Beyaz
Dane rengi	Beyaz	Kırmızı	Beyaz
Boy (cm)	Orta	85-95	95-105
Kışa Dayanıklılığı	İyi	İyi	İyi
Kardeşlenme Derecesi	–	Orta	Orta –yüksek
Yatma	Dayanıklı	Dayanıklı	Dayanıklı
Erkencilik	Orta Erkenci	Orta Erkenci	Erkenci
Ekmeklik Kalitesi	–	İyi	Orta
Bintane Ağırlığı (g)	–	38-44g	34-35g
Hektolitre Ağırlığı (kg)	–	79-83	79–81
Sedimentasyon Değeri (ml)	–	13-16	30–40
Protein Oranı (%)	–	12-14	Orta
Hastalık ve Zararlı	TMBMV, sarı pas ve kara pasa dayanıklı, kahverengi pasa ise duyarlı bir çeşittir.	Sürmeye dayanıklı, rastık ve paslara karşı orta duyarlıdır.	Sarı pas, sürme ve راستیға dayanıklı.

Tablo III.1'in devamı. Çalışmada kullanılan buğday çeşitleri ve genel özellikleri.

GENEL ÖZELLİKLER	ÇEŞİTLER		
	 ES14	 Sönmez2001	 Aytın98
Kılçık	Kılçıklı	Kılçıksız	Kılçıklı
Başak Rengi	Kahverengi	Beyaz	Kahverengi
Dane rengi	Beyaz	Kırmızı	Beyaz
Boy (cm)	90-95	100-110	100-105
Kışa Dayanıklılığı	İyi	İyi	İyi
Kardeşlenme Derecesi	—	Orta	Orta-yüksek
Yatma	—	Dayanıklı	Dayanıklı
Erkencilik	—	Erkenci	Orta Erkenci
Ekmeklik Kalitesi	Orta	—	—
Bintane Ağırlığı (g)	32 g	38-44 g	32-34 g
Hektolitre Ağırlığı (kg)	—	80-84	78-79
Sedimentasyon Değeri (ml)	—	14-16	35-45
Protein Oranı (%)	12	12-14	13-14
Hastalık ve Zararlı	TMBM, rastık, sürme ve kahverengi pasa dayanıklı olan çeşit, sarı pas ve kara pasa duyarlıdır.	Sarı pasa, kahverengi pas, sürme ve rastığa dayanıklıdır.	Kahverengi pasa ve rastığa dayanıklı.

III.2. DNA İZOLASYONU

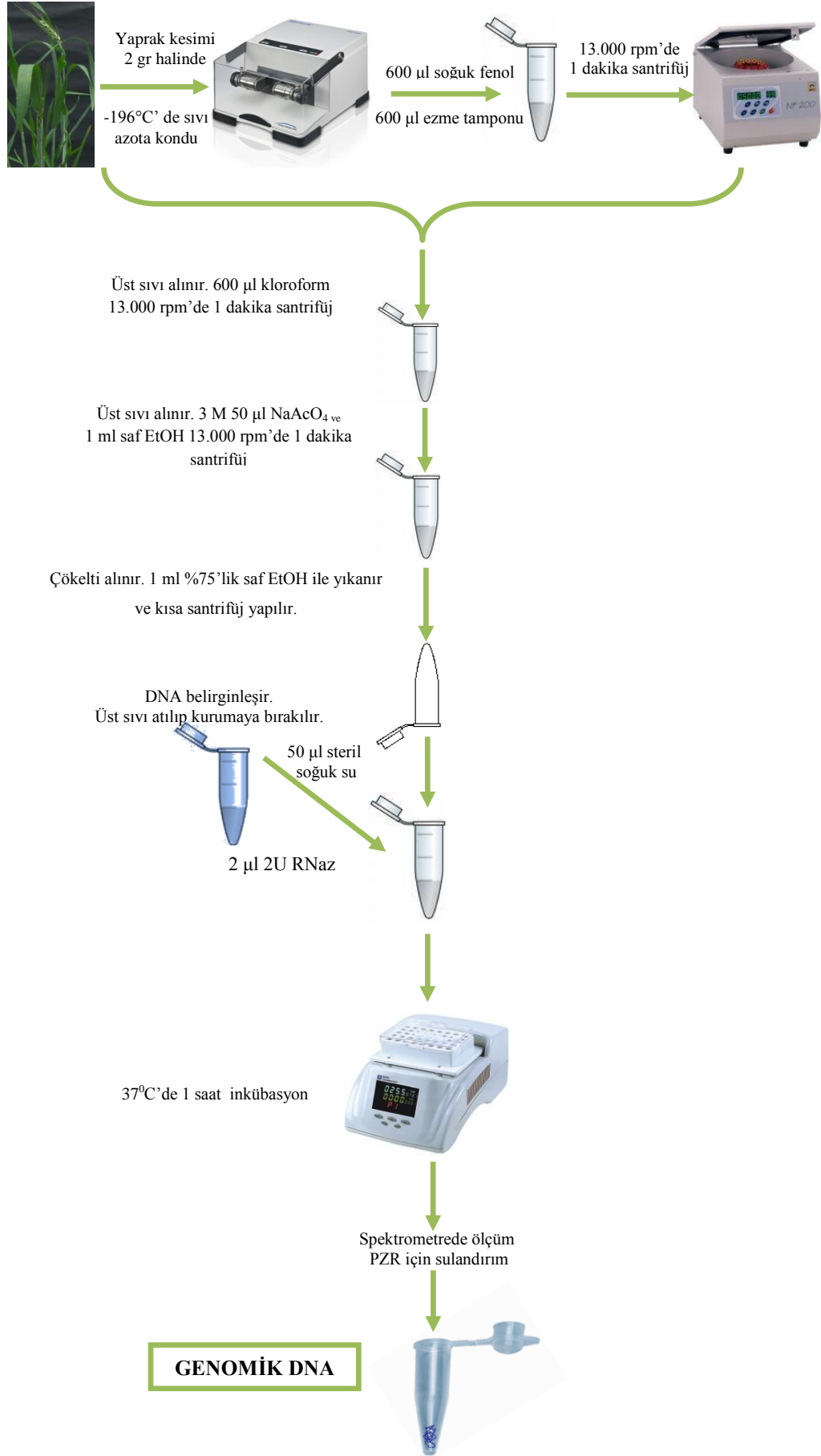
Bu çalışmada genomik DNA izolasyonu için buğday bitkisinin yaprakları kullanılarak Song ve Henry (1995) tarafından modifiye edilen, Weining ve Landridge (1991) miniprep DNA izolasyonu metodu kullanılmıştır. PI178383, Harmankaya99, İzgi2001, ES14, Sönmez2001 ve Aytın98 anaç genotiplerine ait yaprak örnekleri sıvı azotta (-196°C) donduruldu ve izolasyon yapılmaya kadar -80°C’de saklamaya alınmıştır. DNA izolasyonu için metal bilyeler eklenen 2 ml’lik steril ependorf tüplere, tartılan 0, 2 g her bir yaprak örneği alınarak homojenizatör cihazında (Retsh MM 301) toz haline getirilmiştir. Oluşan homojenatın üzerine 600 µl ezme tamponu (Tablo III.2) eklenerek parçalamaya devam edilmiştir.

Tablo III.2. Genomik DNA izolasyonunda kullanılan stok çözeltiler.

Adı	İçeriği	Konsantrasyon	Katalog No
Ezme Tamponu	N-Lauroylsarcosine sodium salt	% 2	Sigma – L-9150
	Tris-HCl pH 8.0	0.1 M	Sigma – T-5941
	EDTA pH 8.0	10 mM	Sigma - SIE6635
Sodyum Asetat	NaOAc pH 4.8 (Glasiyel asetik asit ile)	3 M	Sigma – S-58750

Ortamdaki proteinleri uzaklaştırmak amacıyla üzerine 600 µl soğuk fenol eklenen tüpler, birkaç kere tersyüz edildikten sonra 10 dakika buzda bekletilmiştir ve 13.000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Tüplerde oluşan üst sıvı dikkatlice çökeltiden ayrılmıştır. Üst faz yeni bir tüpe aktarılarak üzerine 600 µl kloroform eklenip iyice karıştırılıp tekrar 13.000 rpm’de 10 dakika süreyle santrifüj işleminden sonra oluşan üst sıvı yeni bir tüpe aktarılmıştır. Üzerine 3 M 50 µl soğuk sodyum asetat (NaAcO₄) ve 1 ml soğuk saf etanol (%95’lik EtOH) eklenen üst sıvı, yavaşça bir kaç kere karıştırılıp DNA pelletleri görüldükten sonra -70°C’de 30 dakika bekletilmiştir. Daha sonra 13.000 rpm’de 1 dakika süreyle santrifüj edildi. Oluşan üst sıvı atılarak dipte kalan çökelti 1 ml %75’lik soğuk saf etanol ile 2 defa yıkanmıştır. DNA pelletinin belirginleştiği gözlemlendikten sonra üst sıvıları atılan tüpler filtre kağıdının üzerine ters çevrilerek kurumaya bırakılmıştır. Pellet

kuruduktan sonra pelletin miktarına göre yaklaşık 50 – 100 µl steril soğuk suda çözdürülmüştür. RNA'yı uzaklaştırmak amacıyla 2 µl 2U RNaz (RNase ONE Ribonuclease Promega - M4261) eklenen tüpler, 37°C'de 40 dakika ve sonra 65°C'de 10 dakika süreyle inkübe edilmiştir. İzole edilen DNA'nın miktarının belirlenmesi ve PZR'da kullanılacak sulandırım oranlarının hesaplanması için 1/10 oranında sulandırılmıştır ve daha sonra ND1000 spektrofotometre cihazında 260 nm (nanometre) dalga boyunda ölçümleri yapılmıştır. Elde edilen ölçümler sonrasında, PZR'de kullanılmak üzere DNA miktarlarının 50 ng/µl olacak şekilde sulandırılmaları gerçekleştirilmiştir. Bunun için öncelikle, ND1000 spektrofotometre cihazında belirlenen DNA miktarları, ölçüm öncesi 1/10 oranında sulandırıldığı için 10 ile çarpıldı ve çıkan sonuç ile PZR'de kullanılacak 50 ng/µl DNA sulandırılmaları hazırlanmıştır. PZR için sulandırılmaları yapılan genomik DNA örnekleri -20 °C'de saklamaya alınmıştır (Şekil III.2).



Şekil III.2. DNA izolasyonunda izlenen aşamalar.

III.3. “BULK SEGREGASYON ANALİZLERİNDE” KULLANILACAK GENOMİK DNA KARIŞIMLARININ HAZIRLANMASI

Michelmore ve arkadaşları tarafından 1991 yılında geliştirilen BSA (“Bulk Segregasyon Analizi”) genetik olarak açılım gösteren bir populasyonun bireyelerine (F₂ ya da F₃ generasyonuna ait bitkiler) ait iki farklı DNA karışımı (“bulk”) arasında polimorfik markörlerin bulunması esasına dayanır.

Bulk Segregasyon Analizleri (BSA) için anaç çeşitlerin melezlenmesi sonucu elde edilen F₂ populasyonundan pas okuma sonuçlarına göre en dayanıklı ve en duyarlı genotipler seçilip ve bu genotiplerden genomik DNA izolasyonları yapılarak, DNA’ların kendi aralarında eşit olarak karıştırılması sonucu duyarlı ve dayanıklı F₂ DNA karışımları (“bulk”) oluşturulmuştur ve bu karışımlar anaç DNA örnekleriyle birlikte PZR analizlerinde kullanılmıştır. Sonraki aşamalarda, PZR ürünleri agaroz jele yüklenip incelendiğinde dayanıklı ve duyarlı anaçlar arasında tespit edilen polimorfizmin varlığı yada yokluğuna göre aynı primerler kullanılarak bu anaçların ‘F₂ bulk’larına da PZR uygulanmıştır.

PI178383, Harmankaya99, İzgi2001, ES14, Sönmez2001 ve Aytın98 anaç bitkileri ile PI178383 x Harmankaya99, İzgi2001 x ES14 ve Sönmez2001 x Aytın98 kombinasyonlarına ait F₂ bitkileri bu tez çalışmasında kullanılmıştır. TARM’a ait tarla ve seraya ekilen F₂ bitkileri, sarı pas populasyonu ile inokule edildikten sonra yapılan pas okuma sonuçlarına göre belirlenen en dayanıklı ve en duyarlı F₂ bitkileri, anaçlar ile beraber “bulk segregasyon” analizlerine tabi tutulmuştur. Fide dönemi dayanıklılığı için her kombinasyona ait 30’ar bitkinin (30 dayanıklı ve 30 duyarlı), ergin dönem dayanıklılığı için her kombinasyona ait 24’er (24 dayanıklı ve 24 duyarlı) bitki seçilmiştir ve bu bitkilerin yaprak dokularından genomik DNA izolasyonları yapılmıştır. İzole edilen DNA’lar NanoDrop1000 spektrofotometre cihazında 260 nm dalga boyunda ölçüldükten sonra her biri 50 ng/ µl olacak şekilde sulandırılmıştır. Her 30’lu ve 24’lü bitki grubuna ait DNA’lardan eşit hacimde ve final konsantrasyonu 50 ng/µl olacak şekilde hazırlanan DNA karışımları -20 °C’de muhafaza edilmiştir. Bulk segregasyon analizi için DNA karışımlarının hazırlanışı aşağıdaki şekilde özetlenmiştir (Şekil III.3).

Fide dönemi (30 bitki) ve ergin döneme (24 bitki) ait F₂ bitkilerinden genomik

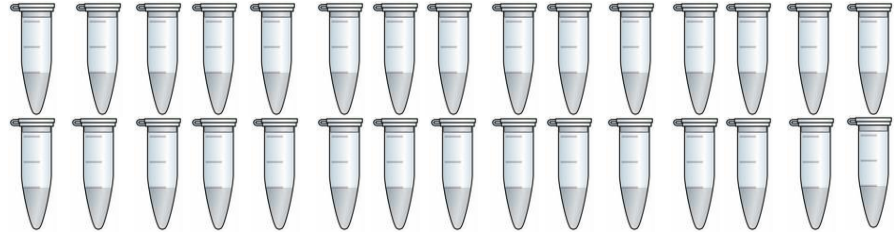
DNA izolasyonunun yapılması



İzole edilen DNA'ların spektrofotometrede ölçümü



Her tüpün 50 ng/μl DNA içerecek şekilde sulandırılması



Her bir tüpten eşit hacimde DNA alınarak karışım tüpleri hazırlanması



Bulk tüpü →

Şekil III.3. “Bulk Segregasyon Analizinde” kullanılacak DNA'nın (“bulk”) hazırlanışı.

III.4. SARI PAS HASTALIĞINA KARŞI DAYANIKLI VE DUYARLI BUĞDAY ÇEŞİTLERİ İLE YAPILAN RAPD ANALİZLERİ

III.4.1. Sarı Pas Hastalığına Karşı Dayanıklı ve Duyarlı Buğday Çeşitlerine Ait Anaçlar ile Yapılan RAPD Analizleri

Sarı pas hastalığına karşı (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*) dayanıklı ve duyarlı buğday türlerinin taranması için polimeraz zincir reaksiyonuna dayalı RAPD tekniği (“Randomly Amplified Polymorphic DNA – Rasgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA”) kullanılmıştır. Bu amaçla, sırasıyla Operon Teknolojileri firması (Alameda, California) ve British Columbia Üniversitesi (Vancouver, Canada) tarafından geliştirilen OP ve UBC serisi 50 adet RAPD primerinden faydalanılmıştır. Kullanılan primerlere ait diziler ve T_a (“annealing” sıcaklığı, primerlerin kalıp DNA’ya bağlanması için gerekli sıcaklık) değerleri Tablo III.3’de yer almaktadır.

Tablo III.3. Çalışmada kullanılan OP ve UBC Serisi RAPD primerlerinin dizileri ve T_a değerleri.

Primerin Adı	Primer Dizisi (5’-3’)	T_a (°C)
OPA-02	TGC CGA GCT G	37
OPA-03	AGT CAG CCA C	39.5
OPA-09	GGG TAA CGC C	40
OPA-10	GTG ATC GCA G	38
OPA-12	TCG GCG ATA G	39.5
OPA-13	CAG CAC CCA C	40
OPA-14	TCT GTG CTG G	39.5
OPA-15	TTC CGA ACC C	39.5
OPA-16	AGC CAG CGA A	44
OPA-17	GAC CGC TTG T	39.5
OPA-18	AGG TGA CCG T	44.5
OPA-19	CAA ACG TCG G	42
OPB-02	TGA TCC CTG G	39.5
OPB-03	CAT CCC CCT G	42
OPB-05	TGC GCC CTT C	46
OPB-06	TGC TCT GCC C	46
OPB-08	GTC CAC ACG G	40

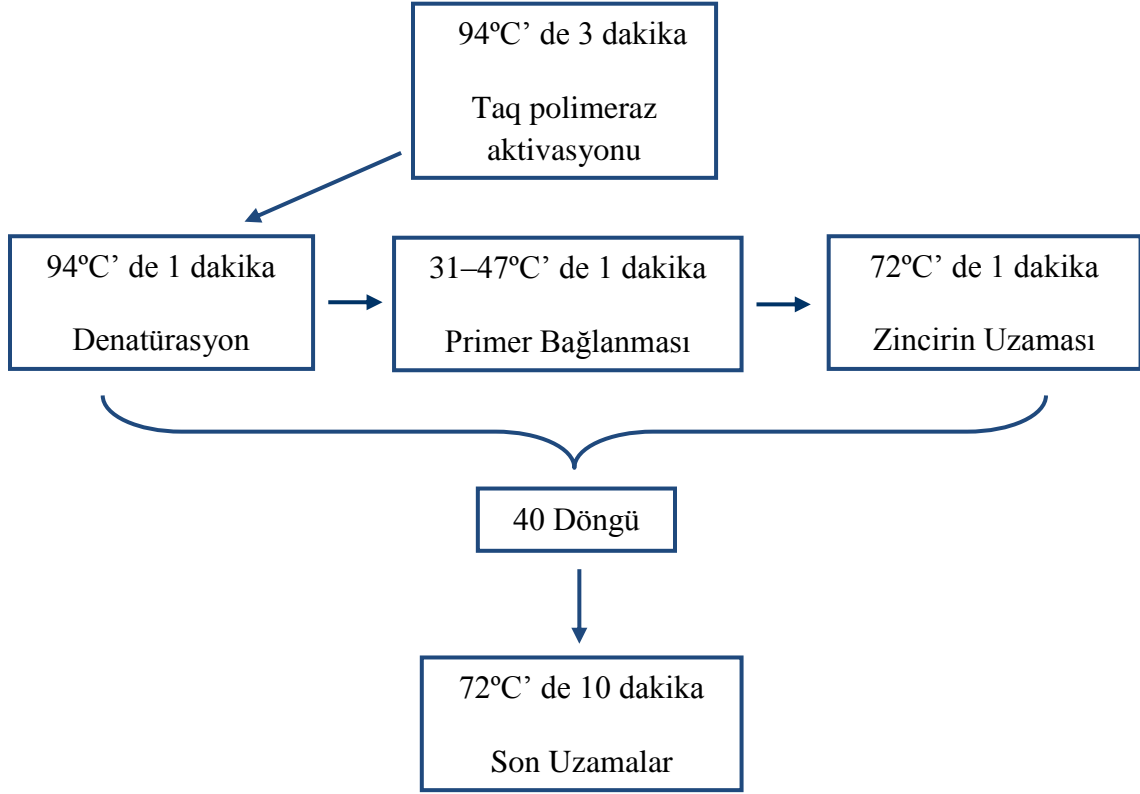
OPB-09	TGG GGG ACT C	44.5
OPB-10	CTG CTG GGA C	44.5
OPB-11	GTA GAC CCG T	39.5
OPB-13	TTC CCC CGC T	45
OPB-14	TCC GCT CTG G	44.5
OPC-04	CCG CAT CTA C	39.5
OPC-05	GAT GAC CGC C	44.5
OPC-06	GAA CGG ACT C	45
OPC-07	GTC CCG ACG A	44.5
OPC-08	TGG ACC GGT G	46
OPC-09	CTC ACC GTC C	45
OPC-15	GAC GGA TCA G	47
OPC-19	GTT GCC AGC C	47
OPD-16	AGG GCG TAA G	39.5
OPD-19	CTG GGG ACT T	39.5
OPE-08	TCA CCA CGG T	46
OPE-17	CTA CTG CCG T	42
OPF-12	ACG GTA CCA G	39.5
OPF-13	GGC TGC AGA A	42
OPF-14	TGC TGC AGG T	46
OPH-04	GGA AGT CGC C	40
OPH-11	CTT CCG CAG T	44
OPJ-10	AAG CCC GAG G	37
OPI-20	AAG CGG CCT C	37
OPK-04	CCG CCC AAA C	47
OPM-09	GTC TTG CGG A	40
OPM-10	TCT GGC GCA C	37
OPT-16	GGT GAA CGC T	40
OPT-17	CCA ACG TCG T	45
UBC-199	GCT CCC CCA C	37
UBC-212	GCT GCG TGA C	35.7
UBC-359	AGG CAG ACC T	34
UBC-551	GGA AGT CCA C	34.5

Kullanılan primerlerin kalıp DNA'ya bağlanması için gerekli sıcaklıklarda (T_a) polimeraz zincir reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Bu sıcaklıkların belirlenmesi için "Gradient-PZR" yönteminden yararlanılmıştır. Gradient-PZR yönteminde, aynı çeşit genomik DNA ve aynı çeşit primerin içinde bulunduğu farklı sayıdaki tüpler polimeraz zincir reaksiyonuna tabi tutulmuştur. Bu yöntemin en önemli özelliği, her tüpe etki edecek bağlanma sıcaklığının farklı olmasıdır. Reaksiyon sonucu elde edilen ürünlerin agaroz jel elektroforezinde yürütülmesi sonucu reaksiyonun çalıştığı en iyi sıcaklık belirlenmiştir.

III.4.1.1. PZR Koşulları

PZR uygulamasında her genotip için 0, 2 ml'lik tüplerdeki 25µl içerisinde son konsantrasyon; 1X Taq Buffer (MBI Fermentas, Germany), 2.5mM MgCl₂ (MBI Fermentas, Germany), 0.2mM dNTP (MBI Fermentas, Germany), 0.625 U/µl Taq polimeraz, 800nmol primer ve 100 ng genomik DNA şeklindedir.

RAPD markörler için kullanılan PZR programı; başlangıç denatürasyonu için 94°C'de 3 dakika; genomik DNA'nın denatürasyonu için 94°C'de 1dakika, primerin DNA'ya bağlanması için primer çiftine uygun bir sıcaklıkta (31 - 47 °C) 1 dakika, zincir uzaması için 72 °C'de 1 dakika bekletilip 40 döngü tamamlandıktan sonra, son uzama için de 72 °C'de 10 dakika tutularak tamamlanmıştır (Şekil III.4). Bu işlem, "Eppendorf Mastercycler Gradient, Biorad ve Applied" cihazlarında yapılmıştır.



Şekil III.4. RAPD markörler için kullanılan PZR programı.

III.4.1.2. PZR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforez Analizleri

RAPD primeri ile yapılan PZR sonucunda oluşan çoğaltım ürünleri %1'lik veya %2'lik agaroz jelde yürütülmüştür. Bunun için 0.5X TBE çözeltisi kullanılarak hazırlanan %1'lik veya %2'lik agaroz, mikrodalga fırında eritilmiştir. Oda sıcaklığına gelen jel 5 µl etidyum bromid (10mg/ml) çözeltisi eklenip karıştırıldıktan sonra yatay elektroforez kasetine dökülmüştür. Elektroforez kaseti jelin polimerize olması için oda sıcaklığında 30 dakika bekletilmiştir ve 0.5XTBE tamponu içeren elektroforez tankına yerleştirilmiştir (Tablo III.5). PZR ürünleri 2, 5 µl yükleme tamponu ile karıştırılarak 14-15 µl hacimde jel kuyularına yüklenmiştir. PZR ürünlerinin boyutunu belirleyebilmek için örnekler, 100 bç'lik (Fermentas) ve 50 bç'lik (Fermentas) DNA markörleri ile birlikte jele yüklenmiştir. Jel PZR ürünlerinin kuyucuklardan çıkması amacıyla 100 Volt'ta yaklaşık 2 saat yürütüp UV ışık altında (Vilber Lourmat) incelenen PZR ürünlerinin, Sony UPP-110HG Type V High Glossy Printing Paper film üzerinde fotoğrafı çekilmiştir.

Tablo III.4. Agaroz jel elektroforezinde kullanılan çözeltiler.

Adı	İçeriği	Konsantrasyon	Katalog No
TBE Tamponu (10X)	Trisma Base	890 mM	Fluka - FL93362
	EDTA	20 mM	Sigma - SIE6635
	Borik Asit	890 mM	Reidel - 31146
Yükleme Tamponu (6X)	Bromofenol Mavisı	% 0, 25 (w/v)	Sigma - B-8026
	Sukroz	% 40 (w/v)	Sigma - S-0389
Etidyum Bromür	Etidyum Bromür	10 mg/ml	Sigma - E7637

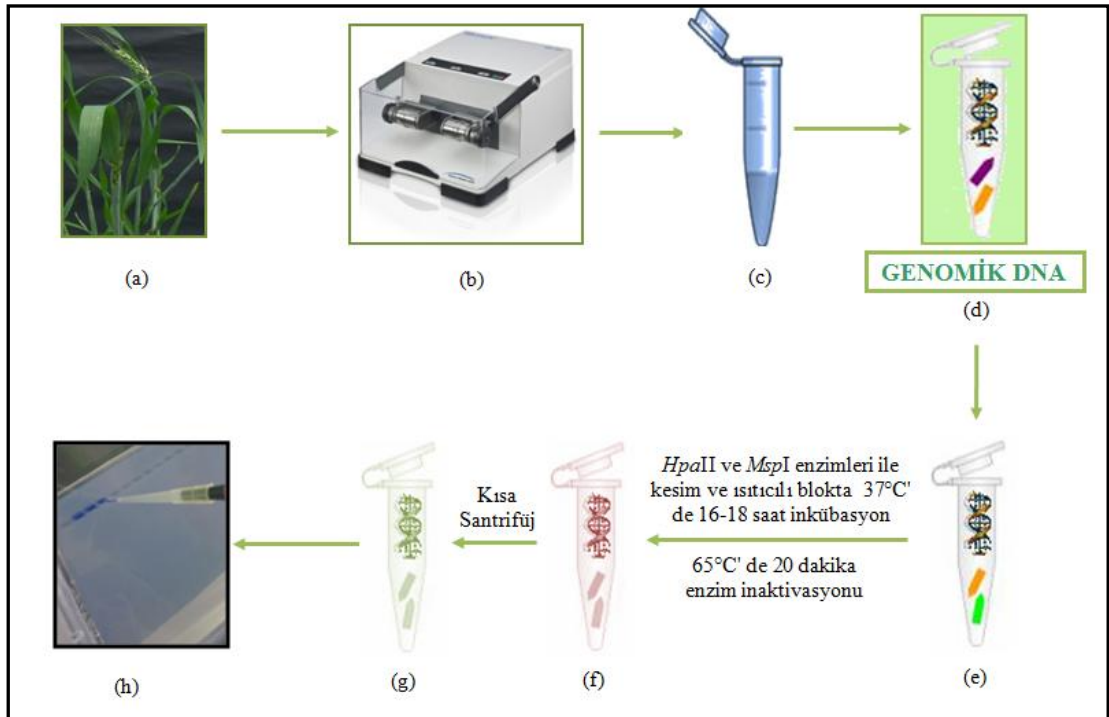
III.4.2. Sarı Pas Hastalığına Karşı Dayanıklı ve Duyarlı Buğday Çeşitlerine Ait F₂ Karışımları ile Yapılan RAPD Analizleri

Kombinasyonlara ait anaçlar arasında polimorfik olarak belirlenen primerler sarı pas hastalığı dayanıklılık kaynağı ile genetik olarak bağlantı gösteren bir markör elde edilebilmesi amacıyla, bu kombinasyonlara ait genetik açılım gösteren fide ve ergin dönem F₂ DNA karışımlarında da incelenerek Bulk Segregasyon Analizleri'ne tabi tutulmuştur. Bu tez çalışmasında kullanılan; İzgi01, Sönmez2001 ve P178383I dayanıklı çeşitler ile Aytın98, ES14 ve Harmankaya99 duyarlı çeşitleri geliştirilmekte olan haritalama populasyonları göz önüne alınarak ikili kombinasyonlar halinde (PI178383 x Harmankaya99, İzgi01 x ES14, Sönmez2001 x Aytın98) değerlendirilmiştir. 50 adet RAPD primeri ile anaç genotiplerin polimeraz zincir reaksiyonuna tabi tutulması sonucunda belirlenen 50 adet polimorfik bant yapısı gösteren primerler ile aynı PZR koşulları altında PI178383 x Harmankaya99, İzgi01 x ES14 ve Sönmez2001 x Aytın98 kombinasyonlarıyla tekrar PZR reaksiyonuna tabi tutulmuştur. Kullanılan PZR programı ve PZR koşulları yukarıda belirtildiği şekilde gibidir. Elde edilen ürünler %1 veya %2' lik agaroz jel elektroforezinde yürütüldükten sonra UV ışığı altında görüntülenmiştir. Elde edilen RAPD sonuçları agaroz jel elektroforezinde değerlendirildikten sonra aynı primerler CRED-RA tekniği ile de incelenmiştir.

III.5. SARI PAS HASTALIĞINA KARŞI DAYANIKLI VE DUYARLI BUĞDAY ÇEŞİTLERİNDE RAPD MARKÖRLERİ KULLANILARAK YAPILAN CRED-RA ANALİZLERİ

III.5.1. Sarı Pas Hastalığına Karşı Dayanıklı ve Duyarlı Buğday Çeşitlerine Ait Anaçlarda Yapılan CRED-RA Analizleri

Çalışmada kullanılan buğday genotiplerinin enzimatik reaksiyona tabi tutulması sonucu metilasyonun hangi çeşitlerde ortaya çıktığını ve buna bağlı olarak metilasyon görülen çeşitlerdeki polimorfizmi belirlemek amacıyla anaçlarda CRED-RA analizleri yapılmıştır. Sarı pas hastalığına karşı dayanıklı ve duyarlı toplam 6 adet kışlık ekmeklik buğday, 50 adet RAPD primeri ile DNA metilasyon polimorfizminin incelenmesi için CRED-RA analizine tabi tutulmuştur. Elde edilen örnekler, %2'lik agaroz jele yürütülmüştür. Bu amaçla, sarı pasa dayanıklı ve duyarlı 6 adet buğday genotipi, DNA metilasyonuna farklı duyarlılık gösteren *HpaII* ve *MspI* restriksiyon enzimleriyle muamele edilmiştir (Şekil III.5).



Şekil III.5. Farklı 6 çeşit genotipin restriksiyon enzimleri ile kesimi; (a) Bitki materyali, (b) Bitki homojenizasyonu, (c) DNA izolasyonu, (d) Genomik DNA'nın elde edilmesi, (e) DNA'nın 50 ng'lık olacak şekilde sulandırılması, (f) *HpaII* ve *MspI* kesim enzimleri uygulanmış DNA'nın 37°C'de geceboyu inkübe edilmesi ve sonunda 65 °C'de 20 dakika enzim inaktivasyonu, (g) Isıtıcı bloktan alınan tüplerin oda sıcaklığında bekletilmesi ve kısa santrifüj, (h) Kesimin gerçekleşip gerçekleşmediğinin görülmesi için örneklerin %1'lik agaroz jele yüklenmesi.

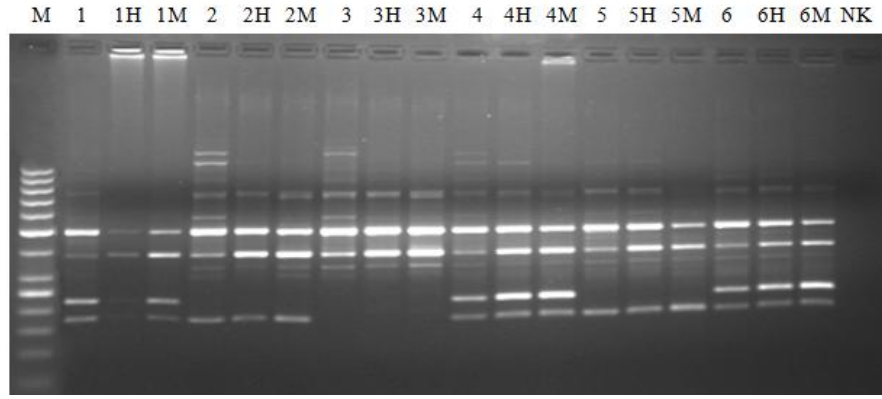
DNA metillenmesini belirlemek için kullanılan CRED-RA tekniğinde, her bir genotip için 100 µl hacimde 2.5 µg genomik DNA, 1X Tango Buffer, 10 U/µl *HpaII* ve 10 U/µl *MspI* olacak şekilde hazırlanan tüpler 37°C'de geceboyu ve ardından enzim inaktivasyonunu sağlamak için 65°C'de 20 dakika bekletilmiştir (Temel ve ark. 2008). CRED-RA analizlerinin diğer bir aşamasında, *HpaII* ve *MspI* enzimleri ile muamele edilen her bir genotipe ait kesim ürünü genomik DNA'lar, kesimin gerçekleşip gerçekleşmediğinin görülmesi amacıyla %1'lik agaroz jele yüklenmiştir. Bu aşamadan sonra kesimi gerçekleştirilen 6 adet buğday çeşidine ait genomik DNA'lar, RAPD-PZR analizlerinde kullanılan 50 adet polimorfik RAPD primerleri ile aynı koşullar altında polimeraz zincir reaksiyonuna tabi tutulmuştur. Bu amaçla izlenen yöntem aşağıdaki gibidir:

III.5.1.1. PZR Koşulları

CRED-RA analizinde kullanılan PZR programı, RAPD tekniğinde kullanılan PZR programı ile aynı şekildedir. Polimeraz zincir reaksiyonuna tabi tutulan primerler %2'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülüp UV ışığı altında görüntülenmiştir. Böylece, 6 çeşit buğday genotipine ait dayanıklı ve duyarlı türler arasında görülen polimorfik bant profillerine bakılarak BSA analizine tabi tutulacak genotipler belirlenmiştir.

III.5.2. Sarı Pas Hastalığına Karşı Dayanıklı ve Duyarlı Buğday Çeşitlerine Ait F₂ Karışımlarında Yapılan CRED-RA Analizleri

Anaç genotipler arasında görülen polimorfizmin F₂ döllerine aktarılıp aktarılmadığını gözlemlemek için PI178383 x Harmankaya99, İzgi2001 x ES14 ve Sönmez2001 x Aydın98 dayanıklı ve duyarlı F₂ DNA karışımları arasında oluşan enzim kesimine bağlı farklılıklar, hem epigenetik markör hem de metilasyon polimorfizmi açısından incelenmiştir. Bu amaçla, her iki değerlendirmede kullanılacak veriler, excel formatına yerleştirilmiştir. Daha sonra dikkat alınacak 0-1 şeklinde bantlar incelendi ve gerekli istatistiksel hesaplamalar yapılmıştır (Şekil III.6).



	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
1		ac-1	ac-2	ac-3	ac-4	ac-5	ac-6	ac-7	ac-8	ac-9	ac-10	ac-11	ac-12	ac-13
2	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1
3	1H	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1
4	1M	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1
5	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1
6	2H	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1
7	2M	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1
8	3	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
9	3H	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1
10	3M	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1
11	4	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1
12	4H	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1
13	4M	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1
14	5	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1
15	5H	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1
16	5M	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1
17	6	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
18	6H	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
19	6M	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
20														
21		ac-OPE17												

Şekil III.6. CRED-RA analizinde kullanılan verilerin excel formatına yerleştirilmesi.

BÖLÜM IV

SONUÇLAR ve TARTIŞMA

IV.1. DNA İZOLASYONU

PI178383, Harmankaya99, İzgi2001, ES14, Sönmez2001 ve Aytın98 anaç bitkilerinden izole edilen DNA'ların miktarları ve sulandırım oranları Tablo IV.1'de verilmiştir.

Tablo IV.1. Çalışmada kullanılan çeşitlerin DNA'larının miktarları ve sulandırım oranları.

Çeşitler	DNA miktarı (ng/μl)	Sulandırım Oranı (50 ng/μl)
PI178383	3320.1	66.42
Harmankaya99	2190.4	43.80
İzgi2001	1454.5	29.09
ES14	1435.9	28.71
Sönmez2001	4072.5	81.45
Aytın98	2097.6	41.95

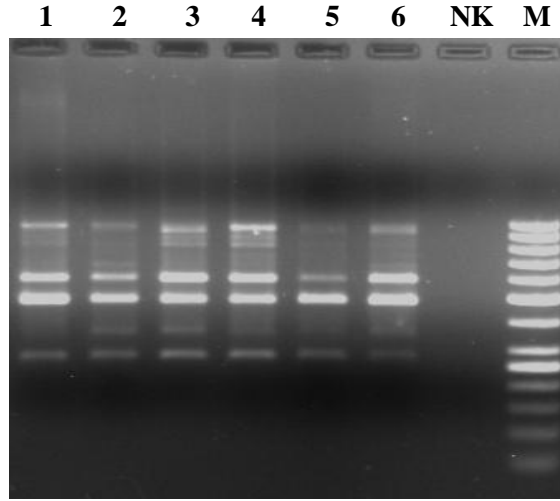
IV.2. “BULK SEGREGASYON ANALİZİNDE” KULLANILAN F₂ KARIŞIM (BULK) DNA'LARI VE SULANDIRIM ORANLARI

Bulk Segregasyon Analizinde kullanılan, en dayanıklı ve en duyarlı F₂ karışımlarını oluşturan bireylere ait DNA'lar NanoDrop1000 spektrofotometre cihazında 260 nm. dalga boyunda ölçülmüştür. Her biri μl'de 50 ng DNA olacak şekilde sulandırılan fide dönemi dayanıklılığı için en dayanıklı ve en duyarlı, ergin dönem dayanıklılığı için en dayanıklı ve en duyarlı olarak belirlenmiştir.

IV.3. SARI PAS HASTALIĞINA DAYANIKLI VE DUYARLI BUĞDAY ÇEŞİTLERİ İLE YAPILAN RAPD ANALİZ SONUÇLARI

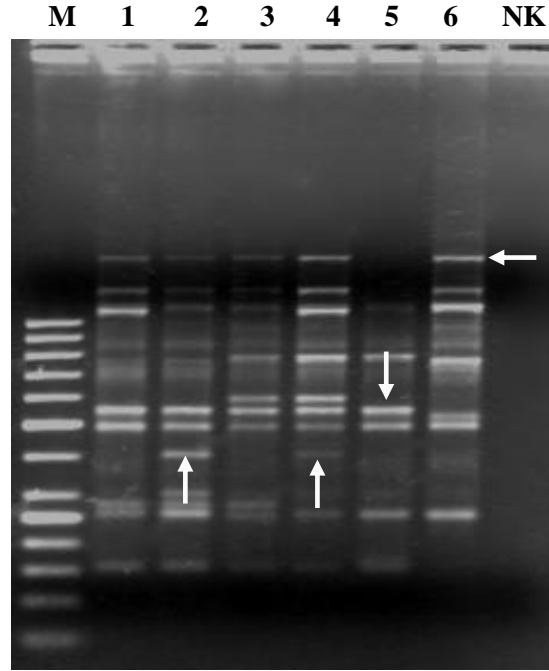
IV.3.1. Sarı Pas Hastalığına Karşı Dayanıklı ve Duyarlı Buğday Çeşitlerine Ait Anaçlar ile Yapılan RAPD Analiz Sonuçları

Sarı pas hastalığına dayanıklı ve duyarlı çeşitlerin, 50 adet RAPD primerleri ile taranması sonucunda, 5 adet RAPD primeri (OPA-13, OPB-8, OPD-16, OPE-17, OPT-16) tüm anaçlar arasında monomorfik bant profili göstermiştir. Diğer 45 RAPD primeri ile ise polimorfik bant profili elde edilmiştir. Monomorfik bant profiline örnek olarak OPD16 primeri verilebilir (Şekil IV.1). Bu primerle elde edilen çoğaltım ürünlerinin hepsi agaroz jel elektroforezi sonucunda aynı bant profili göstermiştir.



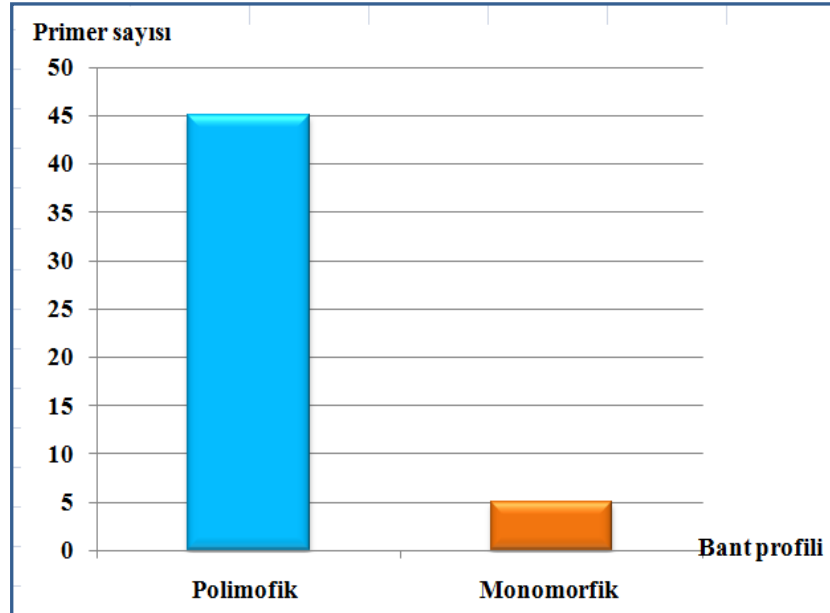
Şekil IV.1. OPD16 primeri kullanılarak buğday çeşitlerinde elde edilen monomorfik bant profili. **1:** PI178383, **2:** Harmankaya99, **3:** İzgi2001, **4:** ES14, **5:** Sönmez2001, **6:** Aytın98, **NK:** Negatif Kontrol, **M:** 50 bç DNA Ladder.

Polimorfik bant profiline örnek olarak OPF13 primeri verilebilir (Şekil IV.2). Bu primerle elde edilen çoğaltım ürünlerinin hepsi agaroz jel elektroforezi sonucunda polimorfik bant profili göstermiştir.



Şekil IV.2. OPF13 primeri kullanılarak buğday çeşitlerinde elde edilen polimorfik bant profili. Beyaz oklar ile gösterilen bantlar kombinasyonlar arasındaki polimorfizmi işaret etmektedir. Dayanıklı ve duyarlı çeşitler arasındaki bu farklı bant profillerine dayanarak, OPF13 primeri polimorfik olarak kabul edilebilir. **M:** 50 bp DNA Ladder, **1:** PI178383, **2:** Harmankaya99, **3:** İzgi2001, **4:** ES14, **5:** Sönmez2001, **6:** Aydın98, **NK:** Negatif Kontrol.

Tüm primerler ile elde edilen agaroz jel görüntüleri incelendiğinde 6 anaç için belirlenen toplam monomorfik ve polimorfik primerler Şekil IV.3’ de gösterilmiştir.



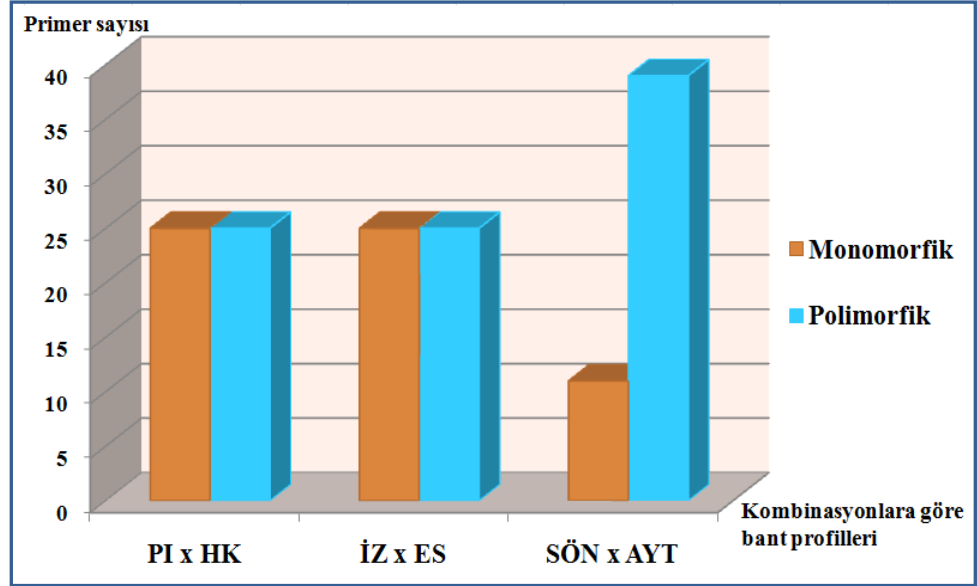
Şekil IV.3. Çalışmada kullanılan monomorfik ve polimorfik primer sayıları.

Ayrıca, anaçlara ait DNA’lar ile yapılan PZR analizleri sonucunda polimorfik görülen toplam 45 adet primerin PI178383 x Harmankaya99, İzgi2001 x

ES14 ve Sönmez2001 x Aydın98 kombinasyonlarındaki dağılımları da incelenmiştir. Bazı primerlerin kombinasyonlar arasında ortak olmakla beraber, PI178383 x Harmankaya99 kombinasyonu için 25 adet monomorfik ve 25 adet polimorfik bant profili gösteren primer, İzgi2001 x ES14 kombinasyonu için yine 25 adet monomorfik ve 25 adet polimorfik bant profili gösteren primer ve Sönmez2001 x Aydın98 kombinasyonu için 11 adet monomorfik ve 39 adet polimorfik bant profili gösteren primer olduğu gözlenmiştir (Tablo IV.2 ve Şekil IV.4).

Tablo IV.2. Farklı kombinasyonlara göre monomorfik ve polimorfik bant yapısı gösteren RAPD primerlerinin listesi.

Kombinasyonlar	Monomorfik Bant Yapısı Gösteren Primerler	Polimorfik Bant Yapısı Gösteren Primerler
PI178383 x Harmankaya99	OPA-05, OPA-09, OPA-10, OPA-13, OPA-14, OPA-19, OPB-08, OPB-11, OPB-14, OPC-04, OPC-06, OPC-07, OPC-08, OPC-15, OPC-19, OPD-16, OPD-19, OPE-17, OPF-14, OPH-11, OPJ-10, OPM-09, OPM-10, OPT-16, UBC-359.	OPA-02, OPA-03, OPA-12, OPA-15, OPA-16, OPA-17, OPA-18, OPB-02, OPB-03, OPB-05, OPB-06, OPB-10, OPB-13, OPC-05, OPC-09, OPE-08, OPF-12, OPF-13, OPH-04, OPJ-20, OPK-04, OPT-17, UBC-199, UBC-212, UBC-551.
İzgi2001 x ES14	OPA-02, OPA-03, OPA-13, OPA-19, OPB-03, OPB-06, OPB-08, OPB-10, OPB-11, OPB-13, OPC-04, OPC-08, OPC-15, OPC-19, OPD-16, OPD-19, OPE-08, OPE-17, OPF-12, OPF-14, OPM-10, OPT-16, OPT-17, UBC-199, UBC-551.	OPA-05, OPA-09, OPA-10, OPA-12, OPA-14, OPA-15, OPA-16, OPA-17, OPA-18, OPB-02, OPB-05, OPB-14, OPC-05, OPC-06, OPC-07, OPC-09, OPF-13, OPH-04, OPH-11, OPJ-10, OPJ-20, OPM-09, OPK-04, UBC-212, UBC-359.
Sönmez x Aydın98	OPA-13, OPA-14, OPA-15, OPB-08, OPD-16, OPE-17, OPF-12, OPH-11, OPK-04, OPT-16, UBC-551.	OPA-02, OPA-03, OPA-05, OPA-09, OPA-10, OPA-12, OPA-16, OPA-17, OPA-18, OPA-19, OPB-02, OPB-03, OPB-05, OPB-06, OPB-10, OPB-11, OPB-13, OPB-14, OPC-04, OPC-05, OPC-06, OPC-07, OPC-08, OPC-09, OPC-15, OPC-19, OPD-19, OPE-08, OPF-13, OPF-14, OPH-04, OPJ-10, OPJ-20, OPM-09, OPM-10, OPT-17, UBC-199, UBC-212, UBC-359.



Şekil IV.4. Çalışmada kullanılan primerlerle kombinasyonlara ait elde edilen monomorfik ve polimorfik primer sayıları.

Bu çalışmada anaçlar arasında kullanılan RAPD primerlerinin %90'ının polimorfik olduğu belirlenmiş ve bu primerlerin elimizdeki buğday çeşitlerinin ayırımında etkin olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

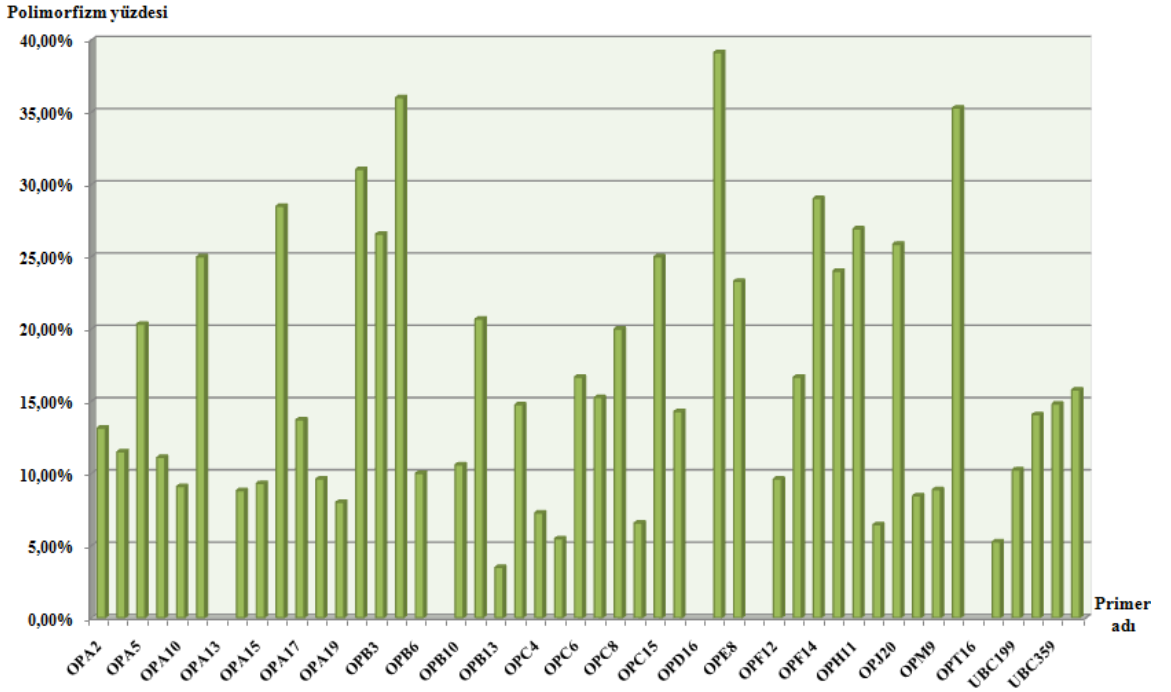
Ayrıca, sarı pas hastalığına dayanıklı ve duyarlı kışlık ekmeklik buğday çeşitlerinde en polimorfik RAPD primerlerini saptamak için, test edilen 50 adet primerin her birine düşen toplam bant sayısı, polimorfik ve monomorfik bant sayısı ve polimorfizm oranları da hesaplanmıştır (Tablo IV.3).

Tablo IV.3. RAPD primerlerinin amplifikasyonu sonucu elde edilen toplam bant sayıları, polimorfik bant sayıları ve polimorfizm oranları.

Primerin Adı	Toplam Bant Sayısı	Polimorfik Bant Sayısı	Polimorfizm Yüzdesi	Primerin Adı	Toplam Bant Sayısı	Polimorfik Bant Sayısı	Polimorfizm Yüzdesi
OPA2	38	5	%13.15	OPC7	59	9	%15.25
OPA3	78	9	%11.5	OPC8	80	16	%20.00
OPA5	59	12	%20.33	OPC9	76	5	%6.57
OPA9	54	6	%11.11	OPC15	8	2	%25.0
OPA10	66	6	%9.09	OPC19	28	4	%14.28
OPA12	32	8	%25	OPD16	45	0	-
OPA13	57	0	-	OPD19	46	18	%39.13
OPA14	34	3	%8.82	OPE8	30	7	%23.3
OPA15	43	4	%9.30	OPE17	27	0	-
OPA16	63	18	%28.5	OPF12	52	5	%9.61
OPA17	102	14	%13.72	OPF13	66	11	%16.66
OPA18	52	5	%9.61	OPF14	31	9	%29.03
OPA19	50	4	%8.00	OPH4	50	12	%24.00
OPB2	29	9	%31.03	OPH11	26	7	%26.93
OPB3	64	17	%26.56	OPJ10	93	6	%6.45
OPB5	47	17	%36.01	OPJ20	58	15	%25.86
OPB6	70	7	%10	OPK4	71	6	%8.45
OPB8	30	0	-	OPM9	45	4	%8.88
OPB10	66	7	%10.60	OPM10	17	6	%35.29
OPB11	29	6	%20.68	OPT16	41	0	-
OPB13	57	2	%3.50	OPT17	57	3	%5.26
OPB14	61	9	%14.75	UBC199	39	4	%10.25
OPC4	55	4	%7.27	UBC212	64	9	%14.06
OPC5	73	4	%5.47	UBC359	54	8	%14.81
OPC6	72	12	%16.66	UBC551	19	3	%15.78

Araştırmada kullanılan 10 baz uzunluğundaki 50 farklı primerin hepsinde de bantlar değerlendirilebilir olarak gözlenmiştir. Analizler sonucunda değerlendirmeye alınan 50 RAPD primeri, toplam 2563 adet bant vermiştir. Bu bantlardan 357 adedi polimorfik, 2206 adedi monomorfik bantlardır. Ortalamalar alınarak değerlendirildiğinde; birey başına düşen bant sayısı 51.26; ortalama polimorfik bant sayısı 7.14; ortalama monomorfik bant sayısı 44.12 olarak hesaplanmıştır. Primerler değerlendirildiğinde; en fazla polimorfik bant veren primerin %39.13 oranı ile OPD-

19 (18 adet bant); en fazla monomorfik bant veren primerin %86.28 oranı ile OPA-17 (88 bant) olduğu gözlenmiştir. Primerlerin reaksiyon sonucunda oluşturduğu çoğaltım ürünlerinin sayısı 8-102 arasında değişmektedir. Bu veriler esas alındığında, elde edilen bantların % 13.93'ünün polimorfik olduğu (Şekil IV.5) ve % 86.07'sinin monomorfik olduğu belirlenmiştir. Buna göre, çalışmalarımızda kullanılan buğday çeşitleri arasında varyasyonun olduğunu ve ıslah çalışmalarında kullanılacak çeşit seçiminde bu verilerin değerlendirilebileceği söylenebilir.



Şekil IV.5. Çalışmada kullanılan RAPD primerlerinin polimorfizm yüzdeleri.

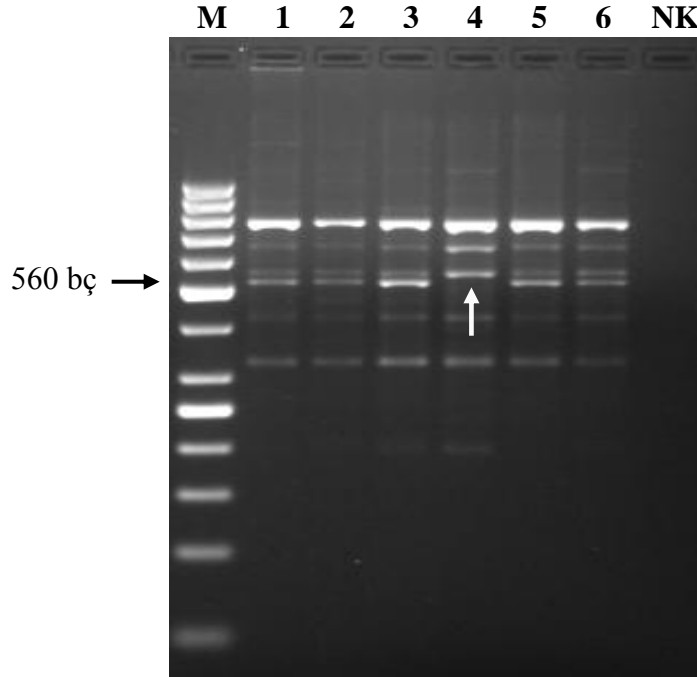
Benzer şekilde, Iqbal ve arkadaşları (1997), 23 elit seviyedeki ticari pamuk çeşidi arasındaki genetik farklılıkları RAPD tekniği ile araştırdıkları çalışmalarında, 50 RAPD primeri kullandıklarını, 49 RAPD primerinin polimorfik bant oluşturduğunu, toplam 349 bant amplifikasyonundan % 89.1'ini polimorfik olarak gözlemlediklerini bildirerek RAPD tekniğinin melezleme ıslahında kullanılacak anaçların seçiminde yardımcı olabileceğini rapor etmişlerdir.

Dakir ve arkadaşları (2002), RAPD markörü kullanarak Fas'tan toplanmış bazı arpa genotiplerinde genetik çeşitliliği değerlendirmek amacıyla yaptıkları çalışmada; 6 yerel arpa popülasyonu ile 21 RAPD primerinden 100 polimorfik RAPD bandı elde edildiğini, RAPD'in genetik çeşitliliği belirlemede etkili bir yöntem olduğunu belirtmişlerdir.

IV.3.2. Sarı Pas Hastalığına Karşı Dayanıklı ve Duyarlı Buğday Çeşitlerine Ait F₂ karışımları ile Yapılan RAPD Analiz Sonuçları

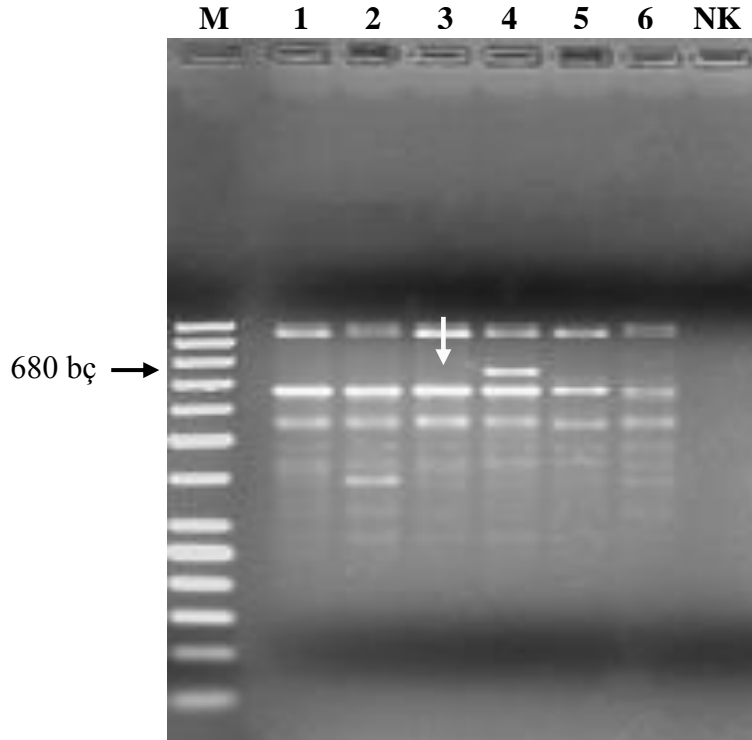
Kombinasyonlara ait anaçlar arasında polimorfik olarak belirlenen primerler (bakınız: Tablo IV.2), sarı pas hastalığı dayanıklılık kaynağı ile genetik olarak bağlantı gösteren bir markör elde edilebilmesi amacıyla, bu kombinasyonlara ait genetik açılım gösteren fide ve ergin dönem F₂ DNA karışımlarında da incelenerek Bulk Segregasyon Analizleri'ne tabi tutulmuştur.

Yapılan Bulk Segregasyon Analizleri sonucunda, kombinasyonlara ait anaçlara arasında polimorfik bant profili veren primerlerin aynı kombinasyona ait F₂ DNA karışımlarında gözlenmediği ortaya çıkmıştır. Bu durum için PI178383 x Harmankaya99 kombinasyonunda OPF12 primeri ve İzgi2001 x ES14 kombinasyonunda OPA12 primeri ve Sönmez x Aytın98 kombinasyonunda OPM9 primeri ile elde edilen agaroz jel görüntüleri örnek olarak verilebilir (Şekil IV.6, Şekil IV.7 ve Şekil IV.8). Bu primerle elde edilen çoğaltım ürünlerinin hepsi agaroz jel elektroforezi sonucunda benzer bant profili göstermiştir.



Şekil IV.6. OPF12 primeri kullanılarak PI178383 x Harmankaya99 kombinasyonuna ait fide ve ergin dönem için gerçekleştirilen “Bulk Segregasyon Analizi”. Beyaz oklar ile gösterilen bant, anaçlar arasındaki polimorfizmi işaret etmektedir. **M:** Markör (50bç), **1-** Ergin dönem dayanıklılığı için PI178383 x Harmankaya99 dayanıklı F₂ DNA karışımı (dayanıklı “bulk”), **2-** Ergin dönem dayanıklılığı için PI178383 x Harmankaya99 duyarlı F₂ DNA karışımı (duyarlı “bulk”), **3-** Harmankaya99, **4-** PI178383, **5-** Fide dönemi dayanıklılığı için PI178383 x Harmankaya99 dayanıklı F₂ DNA karışımı (dayanıklı “bulk”), **6-** Fide dönemi dayanıklılığı için PI178383 x Harmankaya99 duyarlı F₂ DNA karışımı (duyarlı “bulk”), **NK-** Negatif Kontrol.

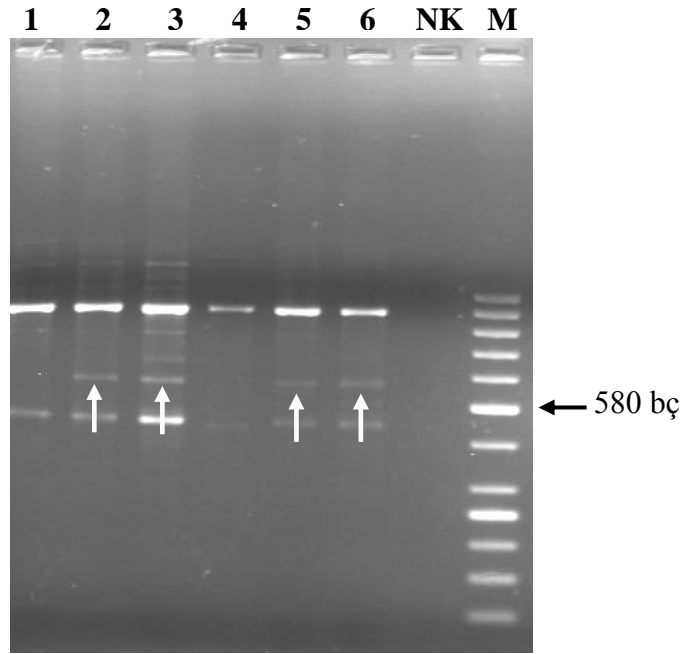
Şekil IV.6'da 3 numaralı örnek olan duyarlı anaç Harmankaya99'da yaklaşık 560 bç'den büyük bir bant gözlemlenirken; bu bant, 4 numaralı örnek olan dayanıklı anaç PI178383'de gözlemlenmemiştir. Anaçlar arasında gözlenen bu polimorfizme karşılık, fide dönemi dayanıklı F₂ karışımında (5 numaralı örnek), fide dönemi duyarlı F₂ karışımında (6 numaralı örnek), ergin dönem dayanıklı F₂ karışımında (1 numaralı örnek) ve ergin dönem duyarlı F₂ karışımında (2 numaralı örnek) da bu bantın gözlemlenmesi nedeniyle anaçlar arasında polimorfik olan bu bant profili markör niteliği taşımamaktadır.



Şekil IV.7. OPA12 primeri kullanılarak İzgi2001 x ES14 kombinasyonuna ait fide ve ergin dönem için gerçekleştirilen “Bulk Segregasyon Analizi”. Beyaz oklar ile gösterilen bant, anaçlar arasındaki polimorfizmi işaret etmektedir. **M:** Markör (50bç), **1-** Ergin dönem dayanıklılığı için İzgi2001 x ES14 dayanıklı F₂ DNA karışımı (dayanıklı “bulk”), **2-** Ergin dönem dayanıklılığı için İzgi2001 x ES14 duyarlı F₂ DNA karışımı (duyarlı “bulk”), **3-** ES14, **4-** İzgi2001, **5-** Fide dönemi dayanıklılığı için İzgi2001 x ES14 dayanıklı F₂ DNA karışımı (dayanıklı “bulk”), **6-** Fide dönemi dayanıklılığı için İzgi2001 x ES14 duyarlı F₂ DNA karışımı (duyarlı “bulk”), **NK-** Negatif Kontrol.

Şekil IV.7'de 3 numaralı örnek olan duyarlı anaç ES14'de yaklaşık 680 bç civarında bir bant gözlemlenirken; bu bant, 4 numaralı örnek olan dayanıklı anaç İzgi01'de gözlemlenmemiştir. Anaçlar arasında gözlenen bu polimorfizme karşılık, fide dönemi dayanıklı F₂ karışımında (5 numaralı örnek), fide dönemi duyarlı F₂ karışımında (6 numaralı örnek), ergin dönem dayanıklı F₂ karışımında (1 numaralı örnek) ve ergin dönem duyarlı F₂ karışımında (2 numaralı örnek) da bu bantın

gözlemlenmesi nedeniyle anaçlar arasında polimorfik olan bu bant profili markör niteliği taşımamaktadır. Bu veriler sayesinde, çeşitler arasında polimorfik olan markörler, bu çeşitlere ait haritalama populasyonlarında taranarak, bağlantı haritalarının oluşturulması, sarı pas hastalığı ile genetik olarak bağlantı gösterip göstermediğinin belirlenmesi amacıyla kullanılabilir.



Şekil IV.8. OPM9 primeri kullanılarak Sönmez2001 x Aytın98 kombinasyonuna ait fide ve ergin dönem için gerçekleştirilen “Bulk Segregasyon Analizi”. Beyaz oklar ile gösterilen bantlar polimorfizmi işaret etmektedir. **M:** Markör (50bç), **1-** Ergin dönem dayanıklılığı için Sönmez2001 x Aytın98 dayanıklı F₂ DNA karışımı (dayanıklı “bulk”), **2-** Ergin dönem dayanıklılığı için Sönmez2001 x Aytın98 duyarlı F₂ DNA karışımı (duyarlı “bulk”), **3-** Aytın98, **4-** Sönmez2001, **5-** Fide dönemi dayanıklılığı için Sönmez2001 x Aytın98 dayanıklı F₂ DNA karışımı (dayanıklı “bulk”), **6-** Fide dönemi dayanıklılığı için Sönmez2001 x Aytın98 duyarlı F₂ DNA karışımı (duyarlı “bulk”), **NK-** Negatif Kontrol.

Şekil IV.8’ de görüldüğü gibi, 3 numaralı örnek olan duyarlı anaç Aytın98’ de görülen bant, 4 numaralı örnek olan dayanıklı anaç Sönmez2001’ de görülmemiştir. Anaçlar arasında gözlemlenen bu polimorfizm, fide dönemine ait dayanıklı ve duyarlı olan F₂ DNA karışımlarına ve ergin döneme ait duyarlı olan F₂ DNA karışımlarına da aktarıldığı için markör niteliği taşıyan bir bant söz konusu değildir. PII78383 x Harmankaya99 kombinasyonu arasında 25, İzgi2001 x ES14 kombinasyonu arasında 25 ve Sönmez2001 x Aytın98 kombinasyonu arasında 39 primerle yapılan çoğaltım sonucunda polimorfik bant yapıları görülse de bu polimorfik bantların hepsi markör niteliği taşımamaktadır.

Divaret ve arkadaşlarının (1999) çeşitler arasındaki genetik uzaklık ve benzerliği incelemek amacıyla yaptıkları çalışmada, 7 farklı *B. oleracea* L. çeşidi ile 8 adet RAPD primeri polimeraz zincir reaksiyonuna tabi tutularak dendogramlar oluşturulmuştur.

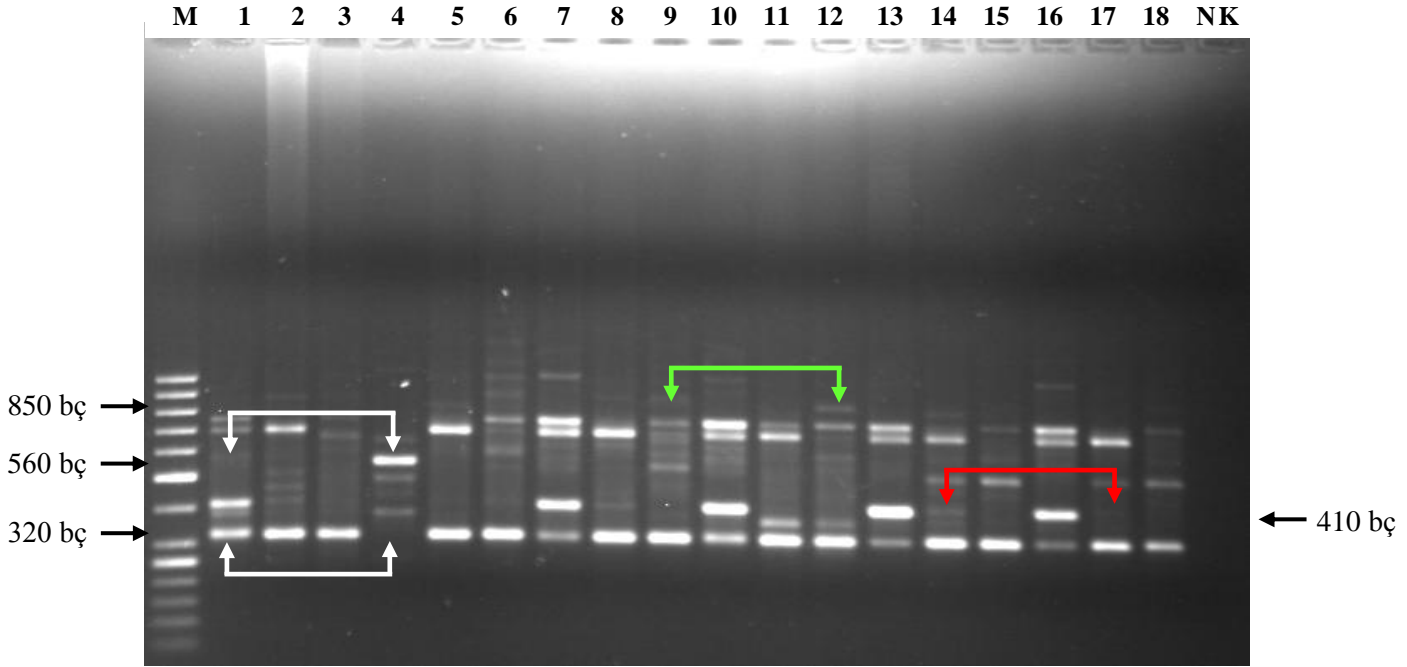
Akar ve arkadaşlarının (2007) Türkiye'nin bazı bölgelerinden toplanan bazı makarnalık buğday çeşitlerinin genetik farklılığını belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada, 100 farklı *T.durum* L. çeşidi ile 300 adet RAPD primeri polimeraz zincir reaksiyonuna tabi tutulmuş ve aralarındaki genetik benzerlik incelenmiştir.

Benzer şekilde bu çalışmada, sarı pas hastalığı dayanıklılık kaynağı ile genetik olarak bağlantı gösteren bir markör elde edilememiştir.

IV.4. SARI PAS HASTALIĞINA KARŞI DAYANIKLI VE DUYARLI BUĞDAY ÇEŞİTLERİNDE RAPD MARKÖRLERİ KULLANILARAK YAPILAN CRED-RA ANALİZ SONUÇLARI

IV.4.1. Sarı Pas Hastalığına Karşı Dayanıklı ve Duyarlı Buğday Çeşitlerine Ait Anaçlar ile Yapılan CRED-RA Analiz Sonuçları

Bu şekilde CRED-RA analizlerinde kullanılan sarı pas hastalığına dayanıklı ve duyarlı olan buğday çeşitlerinde epigenetik farklılıkların belirlenmesi amacıyla CRED-RA tekniği kullanılmıştır. 50 adet RAPD primerleri ile yapılan CRED-RA analizleri sonucunda çoğaltım ürünleri agaroz jel elektroforezinde görüntülenmiştir. Çeşitler arasındaki *MspI* ve *HpaII* enzim kesimlerine bağlı bant profilindeki farklılıklar, polimorfik olarak değerlendirilmiş ve bu analizler sonucunda 50 adet primer ile de polimorfik bant profili elde edilmiştir. Polimorfik bant profiline örnek olarak OPA14 primeri verilebilir (Şekil IV.9). Bu primerle elde edilen çoğaltım ürünlerinin hepsi agaroz jel elektroforezi sonucunda polimorfik bant profili göstermiştir.



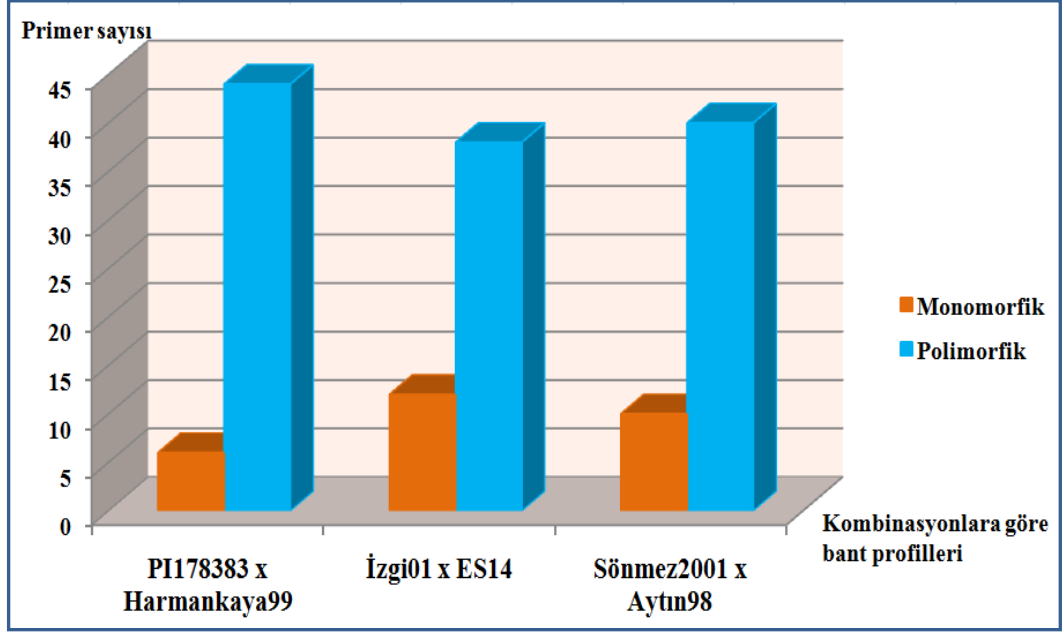
Şekil IV.9. OPA14 primeri kullanılarak gerçekleştirilen PZR sonucu. Beyaz oklar ile gösterilen bantlar anaçlar arasındaki polimorfizmi, kırmızı oklar ile işaret edilenler *HpaII* kesiminden sonra oluşan polimorfizmi ve yeşil oklar ile gösterilenler *MspI* kesiminden sonra oluşan polimorfizmi işaret etmektedir. **M:** Markör (50bç), **1.** PI178383, **2.** *HpaII* enzimi uygulanmış PI178383, **3.** *MspI* enzimi uygulanmış PI178383, **4.** Harmankaya99, **5.** *HpaII* enzimi uygulanmış Harmankaya99, **6.** *MspI* enzimi uygulanmış Harmankaya99, **7.** İzgi2001, **8.** *HpaII* enzimi uygulanmış İzgi2001, **9.** *MspI* enzimi uygulanmış İzgi2001, **10.** ES14, **11.** *HpaII* enzimi uygulanmış ES14, **12.** *MspI* enzimi uygulanmış ES14, **13.** Sönmez2001, **14.** *HpaII* enzimi uygulanmış Sönmez2001, **15.** *MspI* enzimi uygulanmış Sönmez2001, **16.** Aykın98, **17.** *HpaII* enzimi uygulanmış Aykın98, **18.** *MspI* enzimi uygulanmış Aykın98, **NK.** Negatif Kontrol.

Şekil IV.9’ da, 1 numaralı örnek olan dayanıklı anaç PI178383’de yaklaşık 320 bç büyüklüğündeki bant, 4 numaralı örnek olan duyarlı anaç Harmankaya99’de gözlemlenmemektedir. Aynı şekilde, 12 numaralı örnek olan *MspI* enzimi uygulanmış ES14’de 850 bç büyüklüğündeki bant 9 numaralı örnek olan *MspI* enzimi uygulanmış İzgi2001’de bulunmamaktadır. Bu, *MspI* enzimi ile kesim sonrasında oluşan farklılığı göstermektedir. Yine, 14 numaralı örnek olan *HpaII* enzimi uygulanmış Sönmez2001’de 410 bç büyüklüğündeki bant 17 numaralı örnek olan *HpaII* enzimi uygulanmış Aykın98’ de görülmemektedir. Bu, *HpaII* enzimi ile kesim sonrasında oluşan farklılığı göstermektedir. Enzim kesimleri sonrası oluşan bu farklılıklar değerlendirilerek, aralarında polimorfizm görülen kombinasyonlar belirlenmiş ve Bulk Segregasyon Analizi’ne tabi tutulmuştur.

Polimorfik olarak belirlenen bu primerlerin kombinasyonlara ait anaçlar arasındaki dağılımları incelendiğinde ise, Tablo IV.4 ve Şekil.IV.10’da PI178383 x Harmankaya99 kombinasyonuna ait 44 adet, İzgi2001 x ES14 kombinasyonuna ait 38 adet ve Sönmez2001 x Aytın98 kombinasyonuna ait 40 adet RAPD primeri ile Bulk Segregasyon Analizleri gerçekleştirildiği gösterilmiştir.

Tablo IV.4. CRED-RA analizlerinde kullanılan farklı kombinasyonlara göre monomorfik ve polimorfik bant yapısı gösteren RAPD primerlerinin listesi.

Kombinasyonlar	Monomorfik Bant Yapısı Gösteren Primerler	Polimorfik Bant Yapısı Gösteren Primerler
PI178383 x Harmankaya99	OPA-02, OPA-09, OPA-10, OPB-08, OPC-07, UBC-359, UBC-551.	OPA-03, OPA-05, OPA-12, OPA-13, OPA-14, OPA-15, OPA-16, OPA-17, OPA-18, OPA-19, OPB-02, OPB-03, OPB-05, OPB-06, OPB-10, OPB-11, OPB-13, OPB-14, OPC-04, OPC-05, OPC 06, OPC-08, OPC-09, OPC-15, OPC-19, OPD-16, OPD-19, OPE-08, OPE-17, OPF-12, OPF-13, OPF-14, OPH-04, OPH-11, OPJ-10, OPJ-20, OPK-04, OPM-09, OPM-10, OPT-16, OPT-17, UBC-199, UBC-212.
İzgi2001 x ES14	OPA-05, OPA-13, OPB-03, OPB-11, OPC-06, OPC-08, OPD-16, OPF-12, OPJ-10, OPM-10, OPT-16.	OPA-02, OPA-03, OPA-09, OPA-10, OPA-12, OPA-14, OPA-15, OPA-16, OPA-17, OPA-18, OPA-19, OPB-02, OPB-03, OPB-05, OPB-06, OPB-08, OPB-10, OPB-13, OPB-14, OPC-04, OPC-05, OPC-07, OPC-09, OPC-15, OPC-19, OPD-19, OPE-08, OPE-17, OPF-13, OPF-14, OPH-04, OPH-11, OPJ-20, OPK-04, OPM-09, OPT-17, UBC-199, UBC-212, UBC-359, UBC-551.
Sönmez x Aytın98	OPA-10, OPA-13, OPA-14, OPB-08, OPC-05, OPC-08, OPD-16, OPF-12, OPM-10.	OPA-02, OPA-03, OPA-05, OPA-09, OPA-12, OPA-15, OPA-16, OPA-17, OPA-18, OPA-19, OPB-02, OPB-03, OPB-05, OPB-06, OPB-10, OPB-11, OPB-13, OPB-14, OPC-04, OPC 06, OPC-07, OPC-09, OPC-15, OPC-19, OPD-19, OPE-08, OPE-17, OPF-13, OPF-14, OPH-04, OPH-11, OPJ-10, OPJ-20, OPK-04, OPM-09, OPT-16, OPT-17, UBC-199, UBC-212, UBC-359, UBC-551.



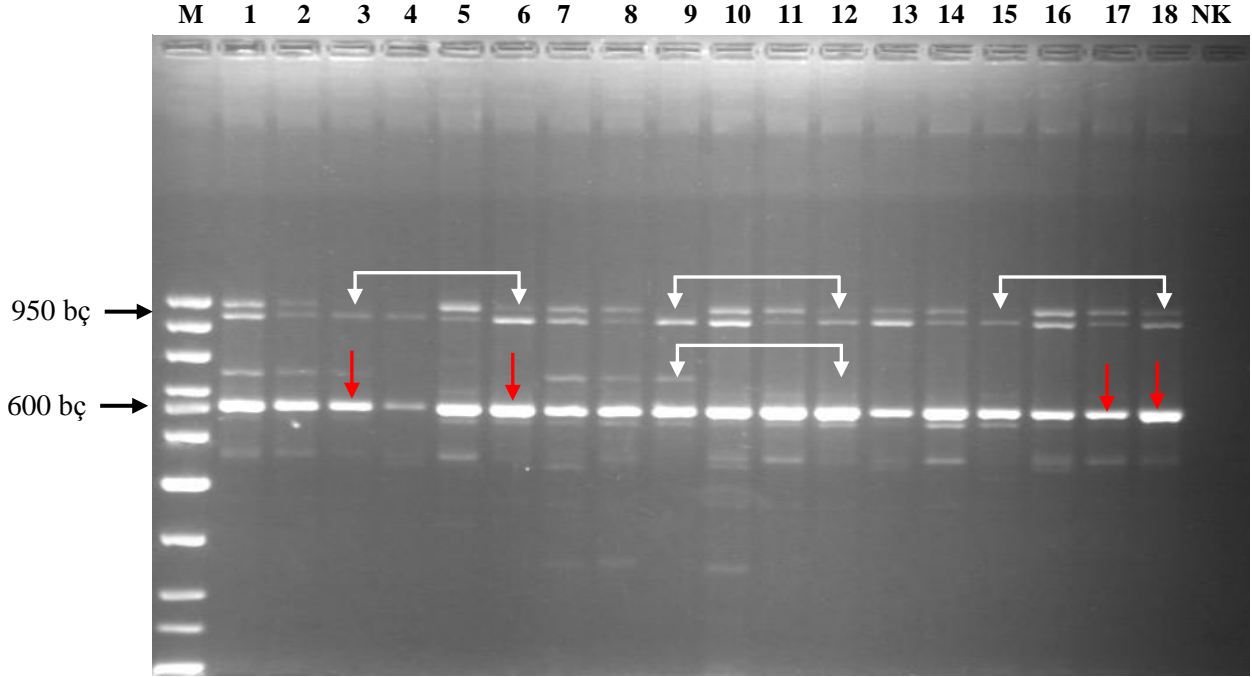
Şekil IV.10. Çalışmada kullanılan primerlerle kombinasyonlara ait elde edilen monomorfik ve polimorfik primer sayıları.

IV.4.2. Sarı Pas Hastalığına Karşı Dayanıklı ve Duyarlı Buğday Çeşitlerine Ait Anaçlar ile Yapılan CRED-RA Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Çalışmada kullanılan 6 farklı buğday genotipinin *HpaII* ve *MspI* enzimleri ile kesimi sonucu elde edilen farklı bant profilleri 2 şekilde değerlendirilmiştir. Bunlar; *MspI* enzim kesimi farklılığının dikkate alındığı “DNA metilasyon polimorfizmi” ve *HpaII* enzim kesimi farklılığının dikkate alındığı “Epigenetik Markör” çalışmalarıdır.

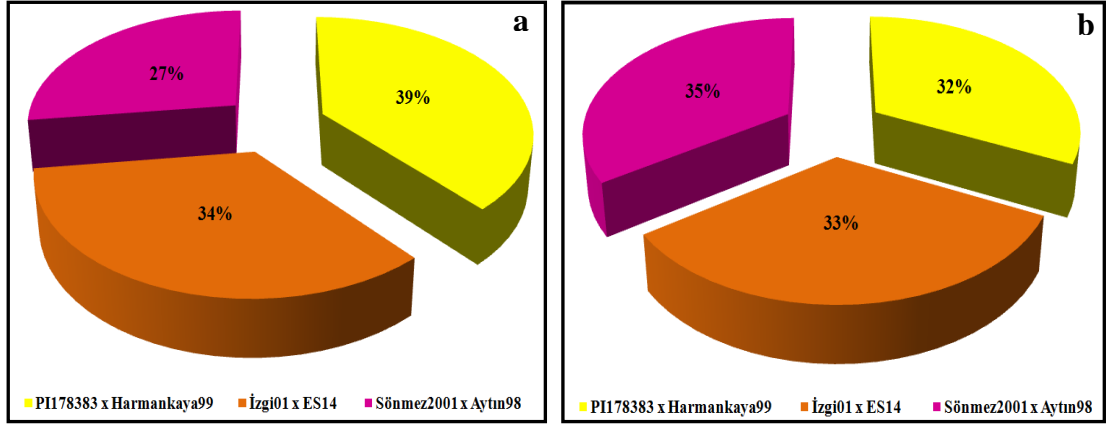
A) Sarı Pas Hastalığına Dayanıklı ve Duyarlı Buğday Çeşitlerine Ait Anaçlar ile Yapılan DNA Metilasyon Polimorfizmi Sonuçları

Anaçlar arasındaki DNA metilasyon polimorfizminin belirlenmesi için *MspI* enzim kesiminden oluşan farklılıkları göz önünde bulundurulmuştur. Şekil IV.11’ da görülen beyaz renkli oklar, kombinasyonlar halinde incelenen anaçların *MspI* enzimi uygulanmış bantlarındaki farklılığı ifade etmektedir. Kırmızı renkli oklar ise metillenmenin olmadığı ve her iki genotipte de *MspI* enzimi kesimi sonucu oluşan bantların varlığını göstermektedir. Örnek olarak, OPA12 primeriyle elde edilen bant profilleri Şekil IV.11’ daki gibidir.



Şekil IV.11. OPA12 primeri kullanılarak gerçekleştirilen PZR sonucu. Beyaz oklar ile gösterilen bantlar anaçlar arasındaki metillenmiş bantları, kırmızı oklar ile işaret edilenler metillenmemiş bantları işaret etmektedir. **M:** Markör (50bç), **1.** PI178383, **2.** *HpaII* enzimi uygulanmış PI178383, **3.** *MspI* enzimi uygulanmış PI178383, **4.** Harmankaya99, **5.** *HpaII* enzimi uygulanmış Harmankaya99, **6.** *MspI* enzimi uygulanmış Harmankaya99, **7.** İzgi2001, **8.** *HpaII* enzimi uygulanmış İzgi2001, **9.** *MspI* enzimi uygulanmış İzgi2001, **10.** ES14, **11.** *HpaII* enzimi uygulanmış ES14, **12.** *MspI* enzimi uygulanmış ES14, **13.** Sönmez2001, **14.** *HpaII* enzimi uygulanmış Sönmez2001, **15.** *MspI* enzimi uygulanmış Sönmez2001, **16.** Aydın98, **17.** *HpaII* enzimi uygulanmış Aydın98, **18.** *MspI* enzimi uygulanmış Aydın98, **NK.** Negatif Kontrol.

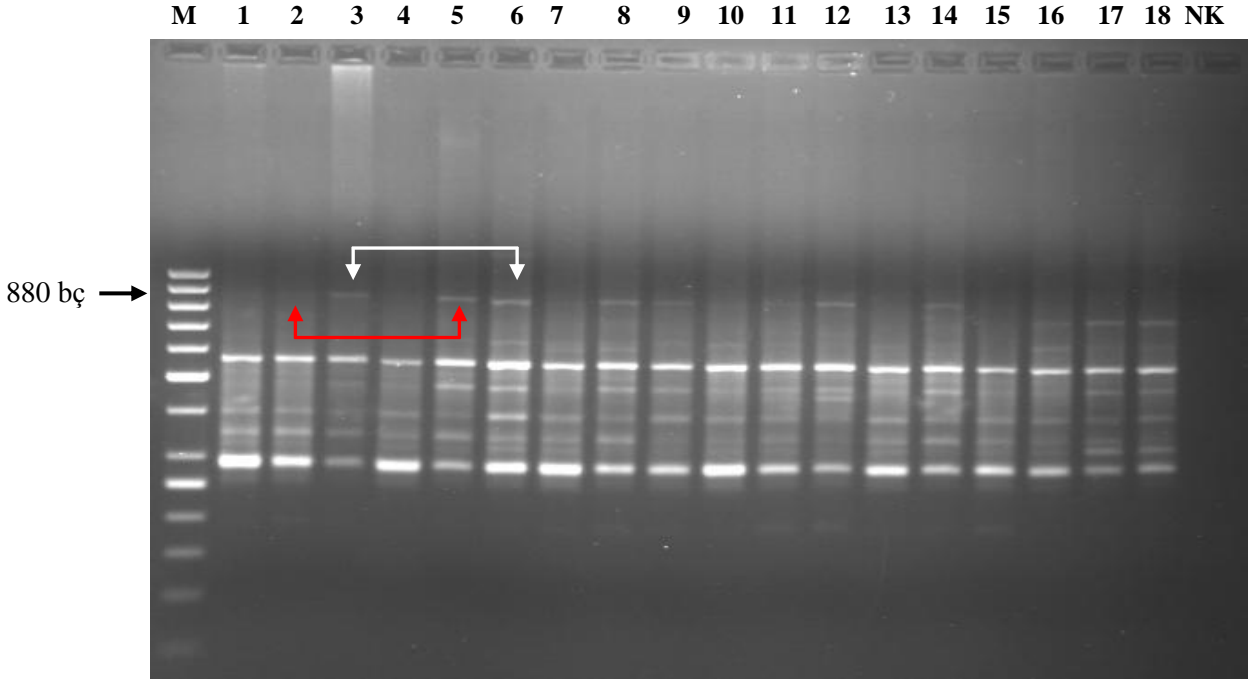
Sadece *MspI* enzim kesimi ile oluşan ve genotipler arasında farklılık gösteren bant sayıları dikkate alınarak yapılan değerlendirmelerde, PI178383 ve Harmankaya99 genotipleri arasında 124 adet polimorfik ve 518 adet monomorfik bant görülürken, İzgi01 ve ES14 genotipleri arasında 110 adet polimorfik ve 532 adet monomorfik bant görülmüştür. Sönmez2001 ve Aydın98 genotipleri arasında ise 86 adet polimorfik ve 556 adet monomorfik bant gözlemlenmiştir (Şekil IV.12).



Şekil IV.12. DNA metilasyon polimorfizmi incelemeleri sonucunda kombinasyonlara göre anaç genotipler arasında belirlenen polimorfik (a) ve monomorfik (b) bantların karşılaştırılması.

B) Sarı Pas Hastalığına Dayanıklı ve Duyarlı Buğday Çeşitlerine Ait Anaçlar ile Yapılan Epigenetik Markör Sonuçları

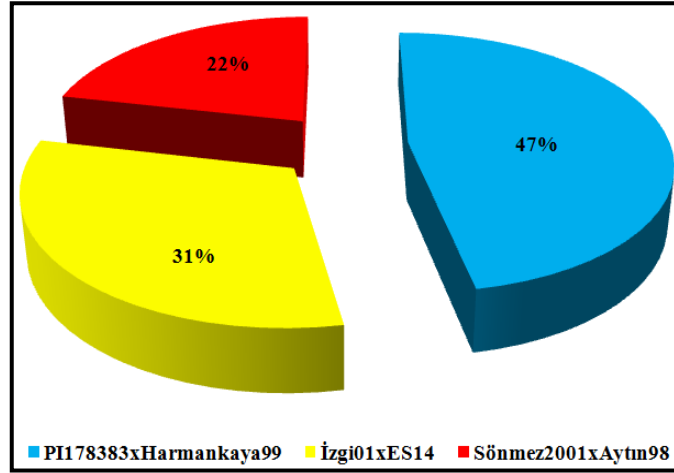
Dayanıklı ve duyarlı olan ekmeklik buğday genotiplerinin CRED-RA tekniği ile analizleri sonucunda, kombinasyonlara ait anaçlar arasında *HpaII* enzim kesimi farklılığı dikkate alınarak epigenetik markör olma olasılığı yüksek bant profilleri belirlenmiştir. PI178383-Harmankaya99 genotiplerinin arasında 24 adet, İzgi01-ES14 genotiplerinin arasında 16 adet ve Sönmez2001-Aytın98 genotipleri arasında ise 11 adet epigenetik markör olma olasılığı bulunan polimorfik bant profili gözlemlenmiştir. Bunlar, her iki genotipte de *MspI* enzimi ile kesim sonrası oluşan ve sadece bir genotipteki *HpaII* enzimi ile kesim farklılığı gözlemlenen bantlardır. Bu duruma, İzgi01-ES14 anaçları arasında OPB8 primeriyle elde edilen *HpaII* enzim kesimi açısından polimorfik olan bant profili örnek olarak verilebilir (Şekil.IV.13).



Şekil IV.13. OPB8 primeri kullanılarak gerçekleştirilen PZR sonucu. Beyaz oklar ile gösterilen bantlar anaçlar arasındaki *MspI* enzimi ile oluşan, kırmızı oklar ile işaret edilenler *HpaII* enzim kesiminden oluşan bantları işaret etmektedir. **M:** Markör (50bç), **1.** PI178383, **2.** *HpaII* enzimi uygulanmış PI178383, **3.** *MspI* enzimi uygulanmış PI178383, **4.** Harmankaya99, **5.** *HpaII* enzimi uygulanmış Harmankaya99, **6.** *MspI* enzimi uygulanmış Harmankaya99, **7.** İzgi2001, **8.** *HpaII* enzimi uygulanmış İzgi2001, **9.** *MspI* enzimi uygulanmış İzgi2001, **10.** ES14, **11.** *HpaII* enzimi uygulanmış ES14, **12.** *MspI* enzimi uygulanmış ES14, **13.** Sönmez2001, **14.** *HpaII* enzimi uygulanmış Sönmez2001, **15.** *MspI* enzimi uygulanmış Sönmez2001, **16.** Aytın98, **17.** *HpaII* enzimi uygulanmış Aytın98, **18.** *MspI* enzimi uygulanmış Aytın98, **NK.** Negatif Kontrol.

Şekil IV.13’ de gösterilen agaroz jel fotoğrafı incelendiğinde, PI178383, Harmankaya99, İzgi01, ES14, Sönmez2001 ve Aytın98 genotipleri arasında varolan epigenetik markör olma olasılığı fazla olan bir bant profili dikkat çekmiştir. Bu amaçla, PI178383 ve Harmankaya99 genotipleri arasında 3 numaralı örnek olan *MspI* enzimi uygulanmış PI178383 ve 6 numaralı örnek olan *MspI* enzimi uygulanmış Harmankaya99 genotiplerinde kesim sonrası oluşan bant, 5 numaralı örnek olan *HpaII* enzimi uygulanmış Harmankaya99 genotipinde görülürken, 2 numaralı örnek olan *HpaII* enzimi uygulanmış PI178383 genotipinde görülmemiştir. Aslında, *HpaII* enzim kesimi ile oluşan bantlardaki farklılıklar, epigenetik markör olma olasılığı fazla olan bant profilini işaret etmektedir.

Yapılan incelemeler sonucunda, kombinasyonlara ait anaçlar arasında epigenetik markör olma olasılığı açısından polimorfik olarak bulunan primerler ile elde edilen sonuçlar Şekil.IV.14’de grafik halinde sunulmuştur.



Şekil.IV.14. Epigenetik markör incelemeleri sonucunda, kombinasyonlara göre anaç genotipler arasında belirlenen epigenetik markör olasılığı.

RAPD ve CRED-RA analizlerinden elde ettiğimiz sonuçlara göre (Tablo IV.5), anaçlar arasında gözlenen polimorfizm, restriksiyon enzimlerinin farklı bölgeleri tanınması ve bu bölgelerin PZR ile çoğaltılması ile değişmektedir. RAPD analizleri sonucu OPA19 primerinin sadece Sönmez2001 ve Aydın98 genotipleri arasında polimorfizm göstermesine karşın, CRED-RA analizleri sonucu PI178383 ve Harmankaya99, İzgi2001 ve ES14 ve Sönmez2001 ve Aydın98 genotipleri arasında polimorfizm göstermiştir. RAPD analizleri sonucu OPA5 primerinin İzgi2001 ve ES14 genotipleri arasında gösterdiği polimorfizm, CRED-RA analizleri sonucu gözlemlenememiştir. Buna ilaveten, RAPD analizleri sonucu tüm genotipler arasında monomorfizm gözlenen OPE17 primerinin, CRED-RA analizleri sonucu tüm genotipler arasında polimorfizm görülmüştür.

Tablo IV.5. RAPD ve CRED-RA analizleri sonucuna göre elde edilen polimorfik ve monomorfik kombinasyon listesi.

Primer Adı	RAPD			CRED-RA		
	Genotipler			Genotipler		
	PI178383- Harmankaya99	İzgi01- ES14	Sönmez2001- Aytın98	PI178383- Harmankaya99	İzgi01- ES14	Sönmez2001- Aytın98
OPA-02	+	-	+	-	+	+
OPA-03	+	-	+	+	+	+
OPA-05	-	+	+	+	-	+
OPA-09	-	+	+	-	+	+
OPA-10	-	+	+	-	+	-
OPA-12	+	+	+	+	+	+
OPA-13	-	-	-	+	-	-
OPA-14	-	+	-	+	+	-
OPA-15	+	+	-	+	+	+
OPA-16	+	+	+	+	+	+
OPA-17	+	+	+	+	+	+
OPA-18	+	+	+	+	+	+
OPA-19	-	-	+	+	+	+
OPB-02	+	+	+	+	+	+
OPB-03	+	-	+	+	+	+
OPB-05	+	+	+	+	+	+
OPB-06	+	-	+	+	+	+
OPB-08	-	-	-	-	+	-
OPB-10	+	-	+	+	+	+
OPB-11	-	-	+	+	+	+
OPB-13	+	-	+	+	+	+
OPB-14	-	+	+	+	+	+
OPC-04	-	-	+	+	-	+
OPC-05	+	+	+	+	+	+
OPC-06	-	+	+	+	-	+
OPC-07	-	+	+	-	+	+
OPC-08	-	-	+	+	-	-
OPC-09	+	+	+	+	+	+
OPC-15	-	-	+	+	+	+
OPC-19	-	-	+	+	+	+

OPD-16	-	-	-	+	-	-
OPD-19	-	-	+	+	+	+
OPE-08	+	-	+	+	+	+
OPE-17	-	-	-	+	+	+
OPF-12	+	-	-	+	-	-
OPF-13	+	+	+	+	+	+
OPF-14	-	-	+	+	+	+
OPH-04	+	+	+	+	+	+
OPH-11	-	+	-	+	+	+
OPJ-10	-	+	+	+	-	+
OPJ-20	+	+	+	+	+	+
OPM-09	-	+	+	+	+	+
OPM-10	-	-	+	+	-	-
OPK-04	+	+	-	+	+	+
OPT-16	-	-	-	+	+	+
OPT-17	+	-	+	+	+	+
UBC-199	+	-	+	+	+	+
UBC-212	+	+	+	+	+	+
UBC-359	-	+	+	-	+	+
UBC-551	+	-	-	+	-	-

IV.4.3. Sarı Pas Hastalığına Karşı Dayanıklı ve Duyarlı Buğday Çeşitlerine Ait F₂ Karışımları ile Yapılan CRED-RA Analiz Sonuçları

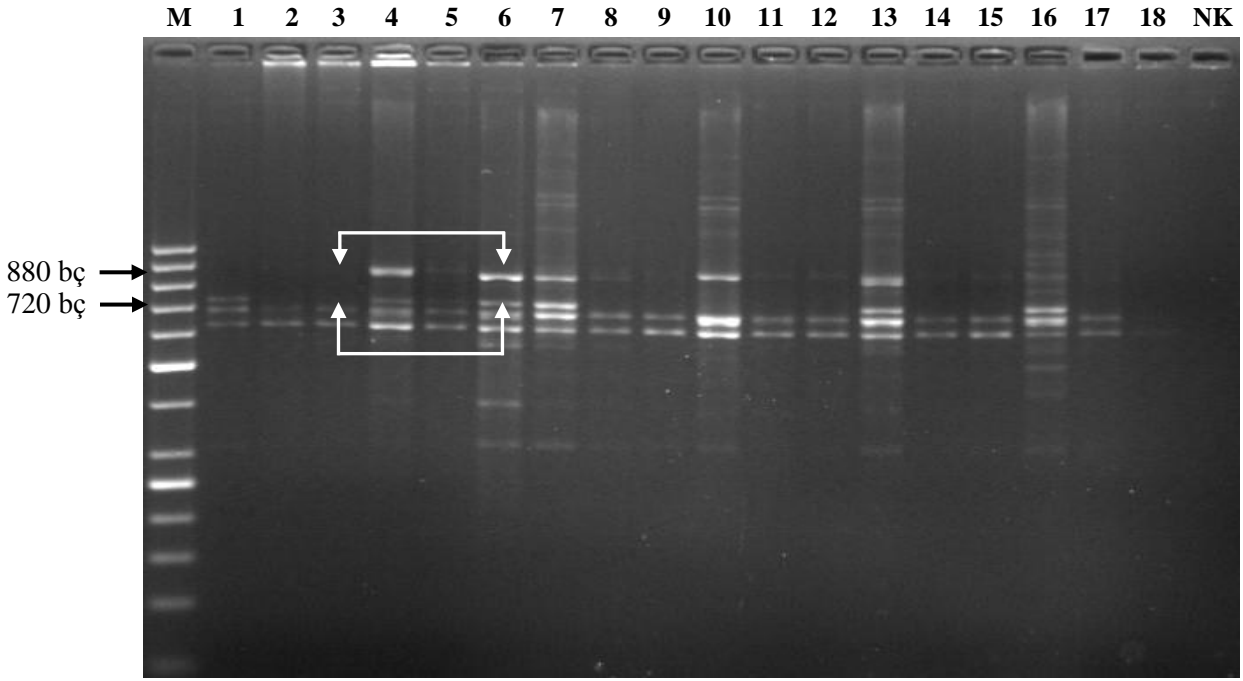
Kombinasyonlara ait anaçlar arasında hem *MspI* hem de *HpaII* enzim kesimleri açısından ayrı ayrı polimorfik olarak belirlenen primerler, sarı pas hastalığı dayanıklılık kaynağı ile genetik olarak bağlantı gösteren bir markör elde edilebilmesi amacıyla, bu kombinasyonlara ait genetik açılım gösteren fide ve ergin dönem F₂ DNA karışımlarında da incelenerek Bulk Segregasyon Analizleri'ne tabi tutulmuştur.

IV.4.4. Sarı Pas Hastalığına Karşı Dayanıklı ve Duyarlı Buğday Çeşitlerine Ait F₂ Karışımları ile Yapılan CRED-RA Analizleri Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Çalışmada kullanılan 6 farklı buğday genotipinin *HpaII* ve *MspI* enzimleri ile kesimi sonucu elde edilen farklı bant profilleri 2 şekilde değerlendirilmiştir. Bunlar; *MspI* enzim kesimi farklılığının dikkate alındığı “DNA metilasyon polimorfizmi” ve *HpaII* enzim kesimi farklılığının dikkate alındığı “Epigenetik Markör” çalışmalarıdır.

A) Sarı Pas Hastalığına Dayanıklı ve Duyarlı Buğday Çeşitlerine Ait F₂ Karışımları ile Yapılan DNA Metilasyon Polimorfizmi Sonuçları

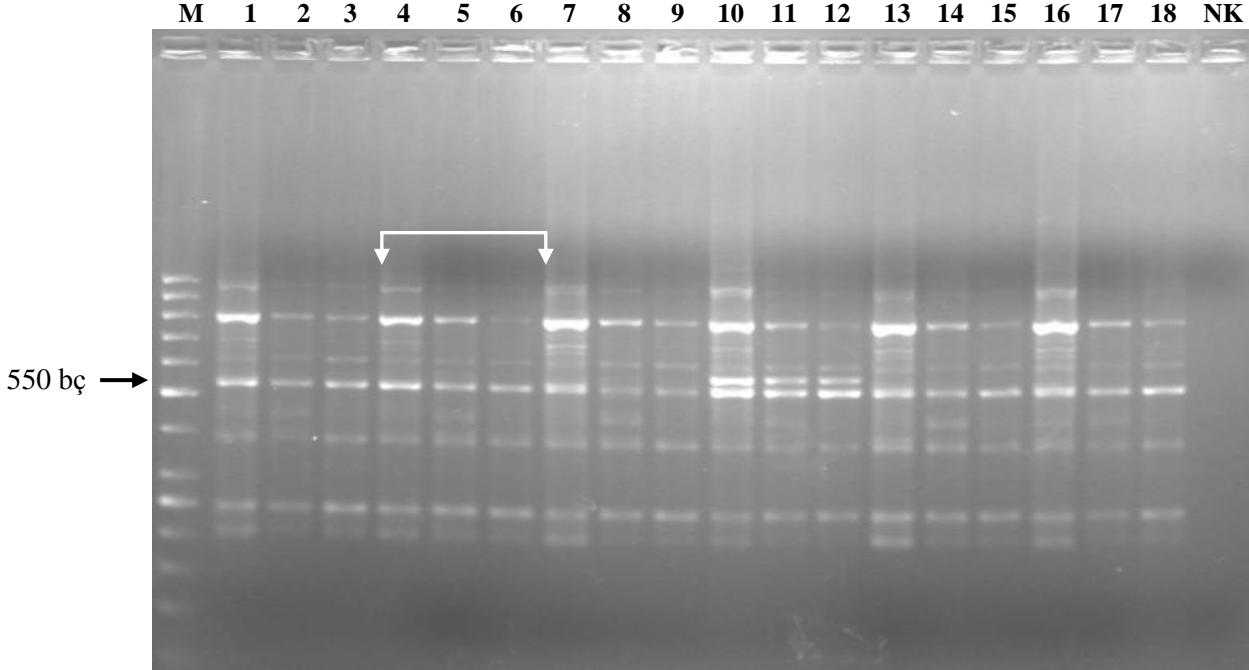
Kombinasyonlar arasında *MspI* enzim kesimi sonucu oluşan bantların farklılığından yararlanılarak yapılan değerlendirmelere göre PI178383 x Harmankaya99, İzgi01 x ES14 ve Sönmez2001 x Aytın98 kombinasyonları için DNA metilasyon polimorfizmi belirlenmiştir. Örnek olarak, PI178383 x Harmankaya99 kombinasyonu için OPB3 primerindeki DNA metilasyon polimorfizmini ifade eden bant profilini Şekil IV.15’de, İzgi01 x ES14 kombinasyonu için OPA9 primerindeki DNA metilasyon polimorfizmini ifade eden bant profilini Şekil IV.16’da, Sönmez2001 x Aytın98 kombinasyonu için OPE8 primerindeki DNA metilasyon polimorfizmini ifade eden bant profilini Şekil IV.17’de görebiliriz.



Şekil IV.15. PI178383 x Harmankaya99 kombinasyonunda OPB3 primeri kullanılarak gerçekleştirilen “Bulk Segregasyon Analizi”. Beyaz oklar ile gösterilen bantlar polimorfizmi işaret etmektedir. **M:** Markör (50bç), **1.** Ergin dönem dayanıklılığı için PI178383 x Harmankaya99 dayanıklı F₂ DNA karışımı (dayanıklı “bulk”), **2.** *Hpa*II enzimi uygulanmış ergin dönem dayanıklılığı için PI178383 x Harmankaya99 dayanıklı F₂ DNA karışımı (dayanıklı “bulk”), **3.** *Msp*I enzimi uygulanmış ergin dönem dayanıklılığı için PI178383 x Harmankaya99 dayanıklı F₂ DNA karışımı (duyarlı “bulk”), **4.** Ergin dönem dayanıklılığı için PI178383 x Harmankaya99 duyarlı F₂ DNA karışımı (duyarlı “bulk”), **5.** *Hpa*II enzimi uygulanmış ergin dönem dayanıklılığı için PI178383 x Harmankaya99 duyarlı F₂ DNA karışımı (duyarlı “bulk”), **6.** *Msp*I enzimi uygulanmış ergin dönem dayanıklılığı için PI178383 x Harmankaya99 duyarlı F₂ DNA karışımı (duyarlı “bulk”), **7.** Harmankaya99, **8.** *Hpa*II enzimi uygulanmış Harmankaya99, **9.** *Msp*I enzimi uygulanmış Harmankaya99, **10.** PI178383, **11.** *Hpa*II enzimi uygulanmış PI178383, **12.** *Msp*I enzimi uygulanmış PI178383, **13.** Fide dönemi dayanıklılığı için PI178383 xHarmankaya99 dayanıklı F₂ DNA karışımı (dayanıklı “bulk”), **14.** *Hpa*II enzimi uygulanmış fide dönemi dayanıklılığı için PI178383 xHarmankaya99 dayanıklı F₂ DNA karışımı (dayanıklı “bulk”), **15.** *Msp*I enzimi uygulanmış fide dönemi dayanıklılığı için PI178383 xHarmankaya99 dayanıklı F₂ DNA karışımı (dayanıklı “bulk”), **16.** Fide dönemi dayanıklılığı için PI178383 xHarmankaya99 duyarlı F₂ DNA karışımı (duyarlı “bulk”), **17.** *Hpa*II enzimi uygulanmış fide dönemi dayanıklılığı için PI178383 xHarmankaya99 duyarlı F₂ DNA karışımı (duyarlı “bulk”), **18.** *Msp*I enzimi uygulanmış fide dönemi dayanıklılığı için PI178383 xHarmankaya99 duyarlı F₂ DNA karışımı (duyarlı “bulk”), **NK.** Negatif Kontrol.

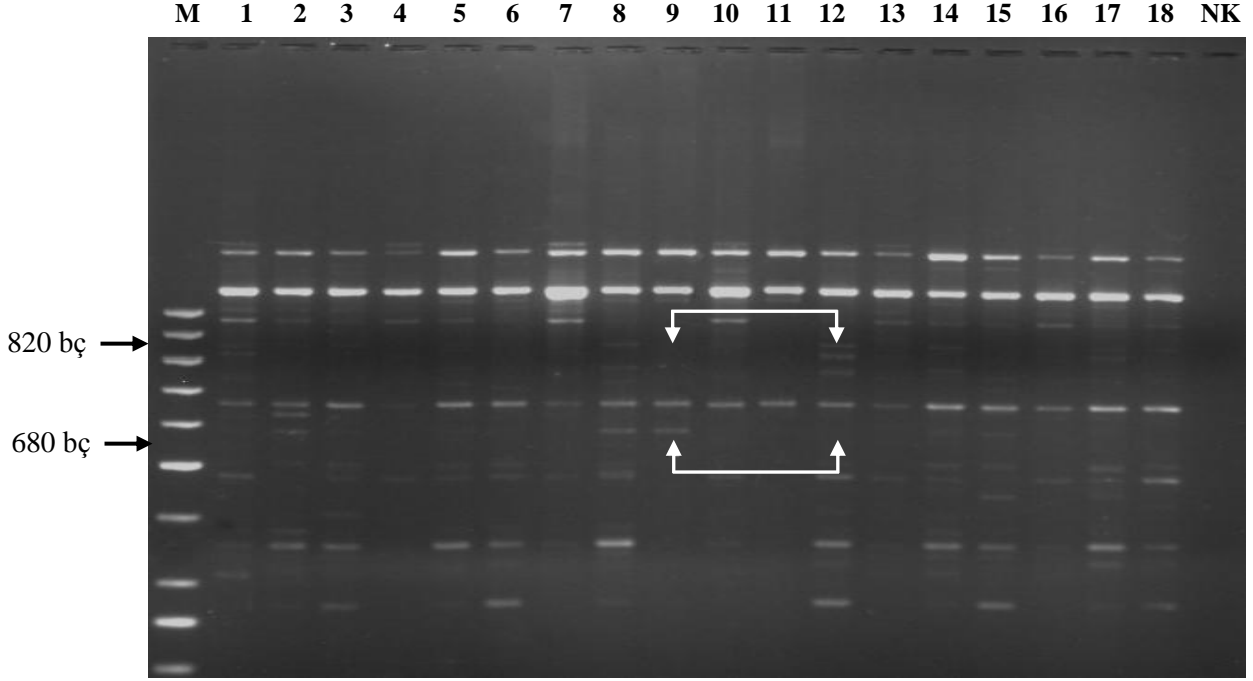
Şekil IV.15’ de OPB3 primerine ait PI178383 x Harmankaya99 kombinasyonunda, 880 bç büyüklüğündeki, 6 numaralı örnek olan *Msp*I enzimi uygulanmış ergin döneme ait duyarlı F₂ DNA karışımı (duyarlı “bulk”)’ nda görülen bant, 3 numaralı örnek olan *Msp*I enzimi uygulanmış ergin döneme ait dayanıklı F₂ DNA karışımı (duyarlı “bulk”)’ nda görülmeyerek DNA metilasyon polimorfizmini ifade eden bant profilini göstermektedir. Aynı şekilde, 720 bç büyüklüğündeki, 6 numaralı örnek olan *Msp*I enzimi uygulanmış ergin döneme ait duyarlı F₂ DNA

karışımı (duyarlı “bulk”)’ nda görülen bant, 3 numaralı örnek olan *MspI* enzimi uygulanmış ergin döneme ait dayanıklı F₂ DNA karışımı (duyarlı “bulk”)’ nda görülmemektedir.



Şekil IV.16. İzgi2001 x ES14 kombinasyonunda OPA9 primeri kullanılarak gerçekleştirilen “Bulk Segregasyon Analizi”. Beyaz oklar ile gösterilen bantlar metilasyon polimorfizmini işaret etmektedir. **M:** Markör (50bç), **1.** Ergin dönem dayanıklılığı için İzgi2001 x ES14 dayanıklı F₂ DNA karışımı (dayanıklı “bulk”), **2.** *HpaII* enzimi uygulanmış ergin dönem dayanıklılığı için İzgi2001 x ES14 dayanıklı F₂ DNA karışımı (dayanıklı “bulk”), **3.** *MspI* enzimi uygulanmış ergin dönem dayanıklılığı için İzgi2001 x ES14 dayanıklı F₂ DNA karışımı (duyarlı “bulk”), **4.** Ergin dönem dayanıklılığı için İzgi2001 x ES14 duyarlı F₂ DNA karışımı (duyarlı “bulk”), **5.** *HpaII* enzimi uygulanmış ergin dönem dayanıklılığı için İzgi2001 x ES14 duyarlı F₂ DNA karışımı (duyarlı “bulk”), **6.** *MspI* enzimi uygulanmış ergin dönem dayanıklılığı için İzgi2001 x ES14 duyarlı F₂ DNA karışımı (duyarlı “bulk”), **7.** ES14, **8.** *HpaII* enzimi uygulanmış ES14, **9.** *MspI* enzimi uygulanmış ES14, **10.** İzgi2001, **11.** *HpaII* enzimi uygulanmış İzgi2001, **12.** *MspI* enzimi uygulanmış İzgi2001, **13.** Fide dönemi dayanıklılığı için İzgi2001 x ES14 dayanıklı F₂ DNA karışımı (dayanıklı “bulk”), **14.** *HpaII* enzimi uygulanmış fide dönemi dayanıklılığı için İzgi2001 x ES14 dayanıklı F₂ DNA karışımı (dayanıklı “bulk”), **15.** *MspI* enzimi uygulanmış fide dönemi dayanıklılığı için İzgi2001 x ES14 dayanıklı F₂ DNA karışımı (dayanıklı “bulk”), **16.** Fide dönemi dayanıklılığı için İzgi2001 x ES14 duyarlı F₂ DNA karışımı (duyarlı “bulk”), **17.** *HpaII* enzimi uygulanmış fide dönemi dayanıklılığı için İzgi2001 x ES14 duyarlı F₂ DNA karışımı (duyarlı “bulk”), **18.** *MspI* enzimi uygulanmış fide dönemi dayanıklılığı için İzgi2001 x ES14 duyarlı F₂ DNA karışımı (duyarlı “bulk”), **NK.** Negatif Kontrol.

Şekil IV.19’ de OPA9 primerine ait İzgi2001 x ES14 kombinasyonunda, 550 bç büyüklüğündeki 9 numaralı örnek olan *MspI* enzimi uygulanmış ES14’ de görülen bant, 12 numaralı örnek olan *MspI* enzimi uygulanmış İzgi2001’ de görülmeyerek DNA metilasyon polimorfizmini ifade eden bant profilini göstermektedir.

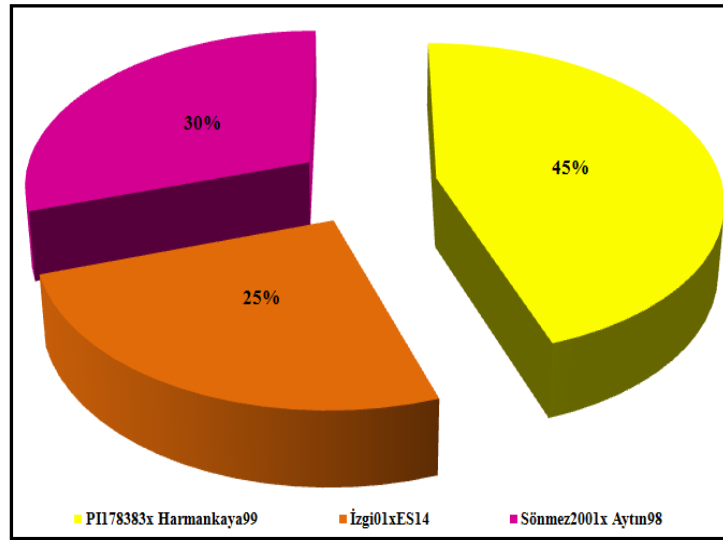


Şekil IV.17. Sönmez2001 x Aytın98 kombinasyonunda OPE8 primeri kullanılarak gerçekleştirilen “Bulk Segregasyon Analizi”. Beyaz oklar ile gösterilen bantlar polimorfizmi işaret etmektedir. **M:** Markör (50bç), **1.** Ergin dönem dayanıklılığı için Sönmez2001 x Aytın98 dayanıklı F₂ DNA karışımı (dayanıklı “bulk”), **2.** *HpaII* enzimi uygulanmış ergin dönem dayanıklılığı için Sönmez2001 x Aytın98 dayanıklı F₂ DNA karışımı (dayanıklı “bulk”), **3.** *MspI* enzimi uygulanmış ergin dönem dayanıklılığı için Sönmez2001 x Aytın98 dayanıklı F₂ DNA karışımı (duyarlı “bulk”), **4.** Ergin dönem dayanıklılığı için Sönmez2001 x Aytın98 duyarlı F₂ DNA karışımı (duyarlı “bulk”), **5.** *HpaII* enzimi uygulanmış ergin dönem dayanıklılığı için Sönmez2001 x Aytın98 duyarlı F₂ DNA karışımı (duyarlı “bulk”), **6.** *MspI* enzimi uygulanmış ergin dönem dayanıklılığı için Sönmez2001 x Aytın98 duyarlı F₂ DNA karışımı (duyarlı “bulk”), **7.** Aytın98, **8.** *HpaII* enzimi uygulanmış Aytın98, **9.** *MspI* enzimi uygulanmış Aytın98, **10.** Sönmez2001, **11.** *HpaII* enzimi uygulanmış Sönmez2001, **12.** *MspI* enzimi uygulanmış Sönmez2001, **13.** Fide dönemi dayanıklılığı için Sönmez2001 x Aytın98 dayanıklı F₂ DNA karışımı (dayanıklı “bulk”), **14.** *HpaII* enzimi uygulanmış fide dönemi dayanıklılığı için Sönmez2001 x Aytın98 dayanıklı F₂ DNA karışımı (dayanıklı “bulk”), **15.** *MspI* enzimi uygulanmış fide dönemi dayanıklılığı için Sönmez2001 x Aytın98 dayanıklı F₂ DNA karışımı (dayanıklı “bulk”), **16.** Fide dönemi dayanıklılığı için Sönmez2001 x Aytın98 duyarlı F₂ DNA karışımı (duyarlı “bulk”), **17.** *HpaII* enzimi uygulanmış fide dönemi dayanıklılığı için Sönmez2001 x Aytın98 duyarlı F₂ DNA karışımı (duyarlı “bulk”), **18.** *MspI* enzimi uygulanmış fide dönemi dayanıklılığı için Sönmez2001 x Aytın98 duyarlı F₂ DNA karışımı (duyarlı “bulk”), **NK.** Negatif Kontrol.

Şekil IV.17’ de OPE8 primerine ait Sönmez2001 x Aytın98 kombinasyonunda görülen, 680 bç büyüklüğünde 9 numaralı örnek olan *MspI* enzimi uygulanmış Aytın98’ de görülen bant, 12 numaralı örnek olan *MspI* enzimi uygulanmış Sönmez2001’ de görülmeyerek DNA metilasyon polimorfizmini ifade eden bant profilini göstermektedir. Buna benzer olarak, 820 bç büyüklüğündeki yine 9 numaralı örnek olan *MspI* enzimi uygulanmış Aytın98’ de görülmeyen bant, 12

numaralı örnek olan *MspI* enzimi uygulanmış Sönmez2001' de görülerek DNA metilasyon polimorfizmini ifade eden bant profili teşkil etmektedir.

DNA metilasyon polimorfizmi değerlendirmeleri, her üç kombinasyonda da anaçlar ile fide ve ergin döneme ait dönemlerine ait dayanıklı ve duyarlı F_2 karışımlarındaki toplam polimorfik bant sayıları hesaplanarak yapılmıştır. Buna göre, DNA metilasyon polimorfizmini ifade eden PII78383 x Harmankaya99 kombinasyonunda 481 adet, İzgi01 x ES14 kombinasyonunda 271 adet ve Sönmez2001 x Aydın98 kombinasyonunda 324 adet bant profili belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, en fazla DNA metilasyon polimorfizmi PII78383 x Harmankaya99 kombinasyonuna aittir (Şekil IV.18).



Şekil IV.18. CRED-RA yöntemi ile analiz edilen bulklar arasındaki DNA metilasyon polimorfizmi yüzdeleri.

Her üç kombinasyonda fide ve ergin döneme ait dayanıklı ve duyarlı F_2 karışımlarından elde edilen sonuçlar ayrı ayrı olarak değerlendirilmiştir.

PII78383 x Harmankaya99 kombinasyonuna ait fide dönemine ait dayanıklı F_2 karışımlarında 108 adet, fide dönemine ait duyarlı F_2 karışımlarında 92 adet, ergin döneme ait dayanıklı F_2 karışımlarında 115 adet ve ergin döneme ait duyarlı F_2 karışımlarında 166 adet metilasyon polimorfizmi gösteren bant bulunmuştur.

İzgi01 x ES14 kombinasyonuna ait fide dönemine ait dayanıklı F_2 karışımlarında 69 adet, fide dönemine ait duyarlı F_2 karışımlarında 65 adet, ergin döneme ait dayanıklı F_2 karışımlarında 82 adet ve ergin döneme ait duyarlı F_2 karışımlarında 55 adet metilasyon polimorfizmi gösteren bant bulunmuştur.

Sönmez2001 x Aydın98 kombinasyonuna ait fide dönemine ait dayanıklı F₂ karışımlarında 70 adet, fide dönemine ait duyarlı F₂ karışımlarında 89 adet, ergin döneme ait dayanıklı F₂ karışımlarında 96 adet ve ergin döneme ait duyarlı F₂ karışımlarında 69 adet metilasyon polimorfizmi gösteren bant bulunmuştur.

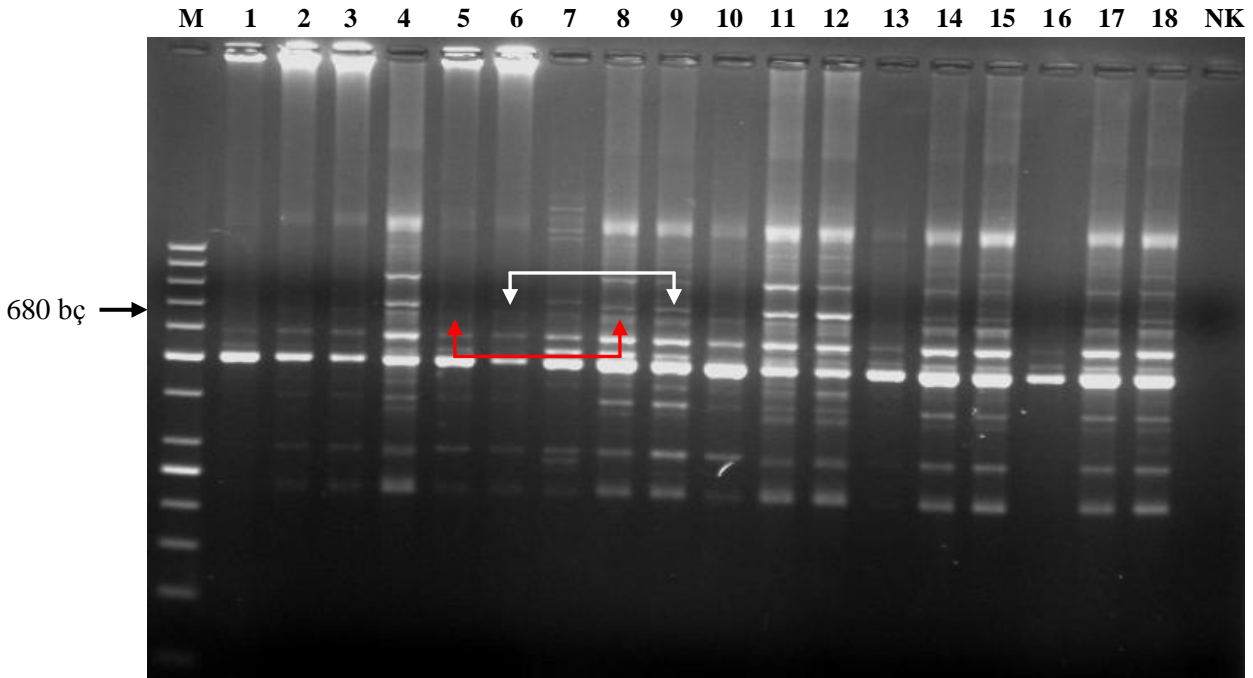
Tüm elde edilen sonuçlar incelendiğinde, her üç kombinasyon arasında, en fazla DNA metilasyon polimorfizmi gösteren PI178383 x Harmankaya99 kombinasyonu, en az DNA metilasyon polimorfizmi gösteren İzgi01x ES14 kombinasyonudur.

Fide ve ergin döneme ait F₂ DNA karışımları incelendiğinde ise, en fazla DNA metilasyon polimorfizmi gösteren PI178383 x Harmankaya99 kombinasyonda ergin döneme ait duyarlı F₂ karışımı, en az DNA metilasyon polimorfizmi gösteren İzgi01x ES14 kombinasyonunda ergin döneme ait duyarlı F₂ karışımıdır.

B) Sarı Pas Hastalığına Dayanıklı ve Duyarlı Buğday Çeşitlerine Ait F₂ Karışımları ile Yapılan Epigenetik Markör Sonuçları

Kombinasyonlar arasında *MspI* enzim kesimi sonucu oluşan bandın varlığında *HpaII* enzim kesimi sonucu oluşan bandın farklılığından yararlanılarak yapılan değerlendirmelere göre PI178383 x Harmankaya99, İzgi01 x ES14 ve Sönmez2001 x Aydın98 kombinasyonları için epigenetik markör olma olasılığı bulunan bant profilleri belirlenmiştir.

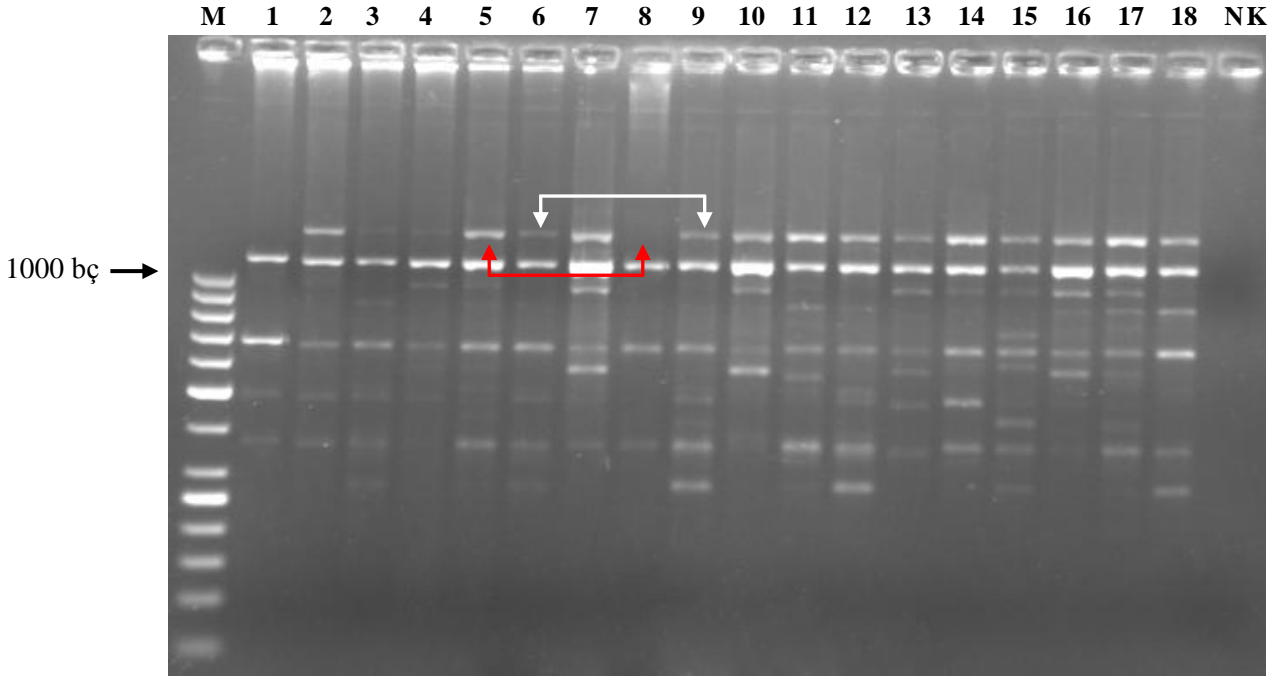
Örnek olarak, PI178383 x Harmankaya99 kombinasyonu için OPB11 primerindeki epigenetik markör olma olasılığını ifade eden bant profilini Şekil IV.19'da, İzgi01 x ES14 kombinasyonu için OPE8 primerindeki epigenetik markör olma olasılığını ifade eden bant profilini Şekil IV.20'de, Sönmez2001 x Aydın98 kombinasyonu için OPE8 primerindeki epigenetik markör olma olasılığını ifade eden bant profilini Şekil IV.21'de görebiliriz.



Şekil IV.19. PI178383 x Harmankaya99 kombinasyonunda OPB11 primeri kullanılarak gerçekleştirilen “Bulk Segregasyon Analizi”. Beyaz oklar ile gösterilen bantlar polimorfizmi işaret etmektedir. **M:** Markör (50bç), **1.** Ergin dönem dayanıklılığı için PI178383 x Harmankaya99 dayanıklı F₂ DNA karışımı (dayanıklı “bulk”), **2.** *HpaII* enzimi uygulanmış ergin dönem dayanıklılığı için PI178383 x Harmankaya99 dayanıklı F₂ DNA karışımı (dayanıklı “bulk”), **3.** *MspI* enzimi uygulanmış ergin dönem dayanıklılığı için PI178383 x Harmankaya99 dayanıklı F₂ DNA karışımı (duyarlı “bulk”), **4.** Ergin dönem dayanıklılığı için PI178383 x Harmankaya99 duyarlı F₂ DNA karışımı (duyarlı “bulk”), **5.** *HpaII* enzimi uygulanmış ergin dönem dayanıklılığı için PI178383 x Harmankaya99 duyarlı F₂ DNA karışımı (duyarlı “bulk”), **6.** *MspI* enzimi uygulanmış ergin dönem dayanıklılığı için PI178383 x Harmankaya99 duyarlı F₂ DNA karışımı (duyarlı “bulk”), **7.** Harmankaya99, **8.** *HpaII* enzimi uygulanmış Harmankaya99, **9.** *MspI* enzimi uygulanmış Harmankaya99, **10.** PI178383, **11.** *HpaII* enzimi uygulanmış PI178383, **12.** *MspI* enzimi uygulanmış PI178383, **13.** Fide dönemi dayanıklılığı için PI178383 xHarmankaya99 dayanıklı F₂ DNA karışımı (dayanıklı “bulk”), **14.** *HpaII* enzimi uygulanmış fide dönemi dayanıklılığı için PI178383 xHarmankaya99 dayanıklı F₂ DNA karışımı (dayanıklı “bulk”), **15.** *MspI* enzimi uygulanmış fide dönemi dayanıklılığı için PI178383 xHarmankaya99 dayanıklı F₂ DNA karışımı (dayanıklı “bulk”), **16.** Fide dönemi dayanıklılığı için PI178383 xHarmankaya99 duyarlı F₂ DNA karışımı (duyarlı “bulk”), **17.** *HpaII* enzimi uygulanmış fide dönemi dayanıklılığı için PI178383 xHarmankaya99 duyarlı F₂ DNA karışımı (duyarlı “bulk”), **18.** *MspI* enzimi uygulanmış fide dönemi dayanıklılığı için PI178383 xHarmankaya99 duyarlı F₂ DNA karışımı (duyarlı “bulk”), **NK.** Negatif Kontrol.

Şekil IV.19’ da görüldüğü gibi, PI178383 x Harmankaya99 kombinasyonunda, 6 numaralı örnek olan *MspI* enzimi uygulanmış ergin dönem e ait duyarlı F₂ (duyarlı “bulk”) DNA karışımında ve 9 numaralı örnek olan *MspI* enzimi uygulanmış duyarlı anaç Harmankaya99’ de görülen 680 bç büyüklüğündeki bant beyaz oklar ile gösterilmiştir. Diğer taraftan kırmızı ile belirtilen aynı bant, 8 numaralı örnek olan *HpaII* enzimi uygulanmış duyarlı anaç Harmankaya99’ de görülürken, 5 numaralı örnek olan *HpaII* enzimi uygulanmış ergin döneme ait duyarlı F₂ (duyarlı “bulk”)

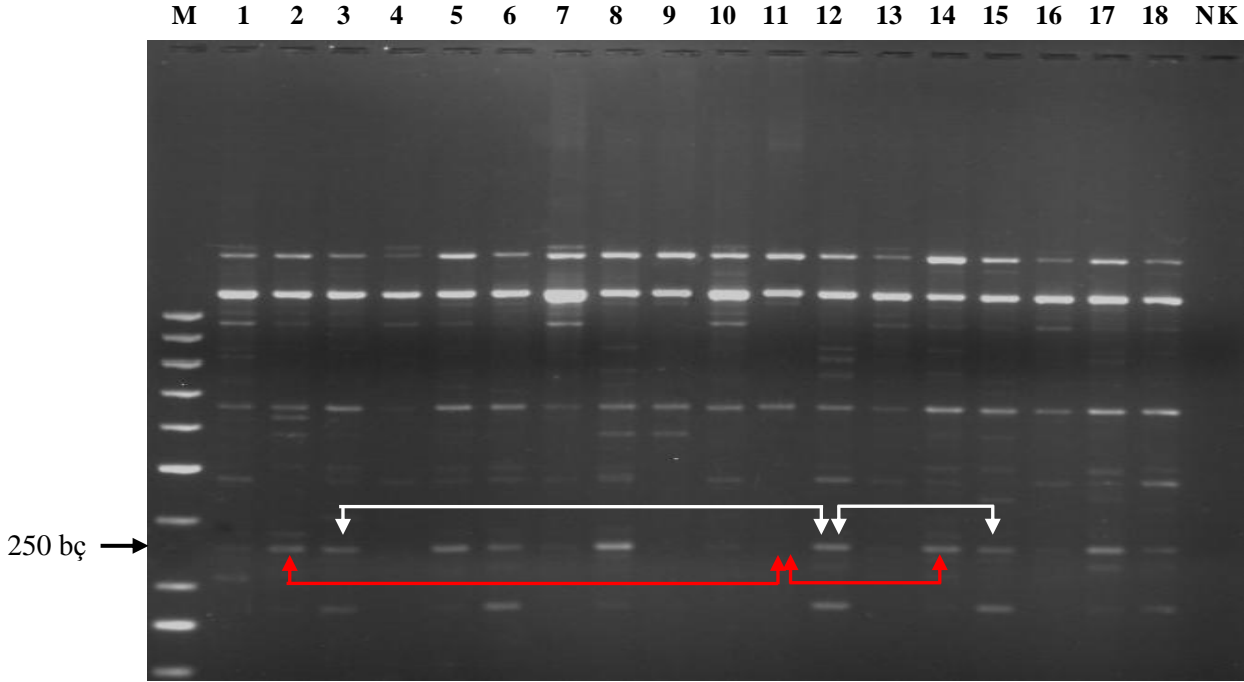
DNA karışımında görülmemiştir. Bu nedenle bu, epigenetik markör olma olasılığı yüksek bir bant olarak nitelendirilebilir.



Şekil IV.20. İzgi2001 x ES14 kombinasyonunda OPE8 primeri kullanılarak gerçekleştirilen “Bulk Segregasyon Analizi”. Beyaz oklar ile gösterilen bantlar *MspI* enziminin kesimi sonucu oluşan bantları, kırmızı ile gösterilen bantlar ise *HpaII* enzim kesiminden sonra oluşan polimorfizmi işaret etmektedir. **M:** Markör (50bç), **1.** Ergin dönem dayanıklılığı için İzgi2001 x ES14 dayanıklı F₂ DNA karışımı (dayanıklı “bulk”), **2.** *HpaII* enzimi uygulanmış ergin dönem dayanıklılığı için İzgi2001 x ES14 dayanıklı F₂ DNA karışımı (dayanıklı “bulk”), **3.** *MspI* enzimi uygulanmış ergin dönem dayanıklılığı için İzgi2001 x ES14 dayanıklı F₂ DNA karışımı (duyarlı “bulk”), **4.** Ergin dönem dayanıklılığı için İzgi2001 x ES14 duyarlı F₂ DNA karışımı (duyarlı “bulk”), **5.** *HpaII* enzimi uygulanmış ergin dönem dayanıklılığı için İzgi2001 x ES14 duyarlı F₂ DNA karışımı (duyarlı “bulk”), **6.** *MspI* enzimi uygulanmış ergin dönem dayanıklılığı için İzgi2001 x ES14 duyarlı F₂ DNA karışımı (duyarlı “bulk”), **7.** ES14, **8.** *HpaII* enzimi uygulanmış ES14, **9.** *MspI* enzimi uygulanmış ES14, **10.** İzgi2001, **11.** *HpaII* enzimi uygulanmış İzgi2001, **12.** *MspI* enzimi uygulanmış İzgi2001, **13.** Fide dönemi dayanıklılığı için İzgi2001 x ES14 dayanıklı F₂ DNA karışımı (dayanıklı “bulk”), **14.** *HpaII* enzimi uygulanmış fide dönemi dayanıklılığı için İzgi2001 x ES14 dayanıklı F₂ DNA karışımı (dayanıklı “bulk”), **15.** *MspI* enzimi uygulanmış fide dönemi dayanıklılığı için İzgi2001 x ES14 dayanıklı F₂ DNA karışımı (dayanıklı “bulk”), **16.** Fide dönemi dayanıklılığı için İzgi2001 x ES14 duyarlı F₂ DNA karışımı (duyarlı “bulk”), **17.** *HpaII* enzimi uygulanmış fide dönemi dayanıklılığı için İzgi2001 x ES14 duyarlı F₂ DNA karışımı (duyarlı “bulk”), **18.** *MspI* enzimi uygulanmış fide dönemi dayanıklılığı için İzgi2001 x ES14 duyarlı F₂ DNA karışımı (duyarlı “bulk”), **NK.** Negatif Kontrol.

Şekil IV.20’ de görüldüğü gibi, İzgi2001 x ES14 kombinasyonunda, 6 numaralı örnek olan *MspI* enzimi uygulanmış ergin döneme ait duyarlı F₂ (duyarlı “bulk”) DNA karışımında ve 9 numaralı örnek olan *MspI* enzimi uygulanmış duyarlı anaç ES14’ de görülen 1000 bç’ den büyük bant beyaz oklar ile gösterilmiştir. Diğer taraftan kırmızı ile belirtilen aynı bant, 5 numaralı örnek olan *HpaII* enzimi uygulanmış ergin döneme ait duyarlı F₂ (duyarlı “bulk”) DNA karışımında

görülürken, 8 numaralı örnek olan *HpaII* enzimi uygulanmış duyarlı anaç ES14' de görülmemiştir. Bu nedenle bu, epigenetik markör olma olasılığı yüksek bir bant olarak nitelendirilebilir.

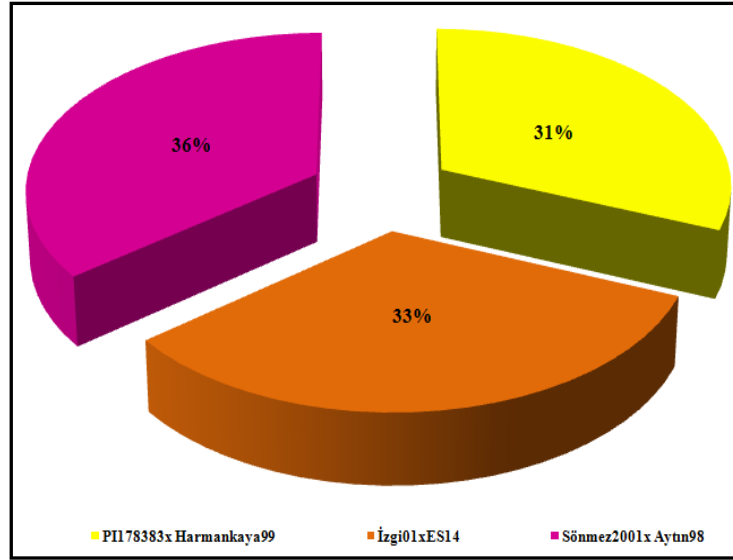


Şekil IV.21. Sönmez2001 x Aytın98 kombinasyonunda OPE8 primeri kullanılarak gerçekleştirilen “Bulk Segregasyon Analizi”. Beyaz oklar ile gösterilen bantlar polimorfizmi işaret etmektedir. **M:** Markör (50bç), **1.** Ergin dönem dayanıklılığı için Sönmez2001 x Aytın98 dayanıklı F₂ DNA karışımı (dayanıklı “bulk”), **2.** *HpaII* enzimi uygulanmış ergin dönem dayanıklılığı için Sönmez2001 x Aytın98 dayanıklı F₂ DNA karışımı (dayanıklı “bulk”), **3.** *MspI* enzimi uygulanmış ergin dönem dayanıklılığı için Sönmez2001 x Aytın98 dayanıklı F₂ DNA karışımı (duyarlı “bulk”), **4.** Ergin dönem dayanıklılığı için Sönmez2001 x Aytın98 duyarlı F₂ DNA karışımı (duyarlı “bulk”), **5.** *HpaII* enzimi uygulanmış ergin dönem dayanıklılığı için Sönmez2001 x Aytın98 duyarlı F₂ DNA karışımı (duyarlı “bulk”), **6.** *MspI* enzimi uygulanmış ergin dönem dayanıklılığı için Sönmez2001 x Aytın98 duyarlı F₂ DNA karışımı (duyarlı “bulk”), **7.** Aytın98, **8.** *HpaII* enzimi uygulanmış Aytın98, **9.** *MspI* enzimi uygulanmış Aytın98, **10.** Sönmez2001, **11.** *HpaII* enzimi uygulanmış Sönmez2001, **12.** *MspI* enzimi uygulanmış Sönmez2001, **13.** Fide dönemi dayanıklılığı için Sönmez2001 x Aytın98 dayanıklı F₂ DNA karışımı (dayanıklı “bulk”), **14.** *HpaII* enzimi uygulanmış fide dönemi dayanıklılığı için Sönmez2001 x Aytın98 dayanıklı F₂ DNA karışımı (dayanıklı “bulk”), **15.** *MspI* enzimi uygulanmış fide dönemi dayanıklılığı için Sönmez2001 x Aytın98 dayanıklı F₂ DNA karışımı (dayanıklı “bulk”), **16.** Fide dönemi dayanıklılığı için Sönmez2001 x Aytın98 duyarlı F₂ DNA karışımı (duyarlı “bulk”), **17.** *HpaII* enzimi uygulanmış fide dönemi dayanıklılığı için Sönmez2001 x Aytın98 duyarlı F₂ DNA karışımı (duyarlı “bulk”), **18.** *MspI* enzimi uygulanmış fide dönemi dayanıklılığı için Sönmez2001 x Aytın98 duyarlı F₂ DNA karışımı (duyarlı “bulk”), **NK.** Negatif Kontrol.

Şekil IV.21’ de görüldüğü gibi, Sönmez2001 x Aytın98 kombinasyonunda, 3 numaralı örnek olan *MspI* enzimi uygulanmış ergin döneme ait dayanıklı F₂ (duyarlı “bulk”) DNA karışımında, 12 numaralı örnek olan *MspI* enzimi uygulanmış dayanıklı anaç Sönmez2001’de ve 15 numaralı örnek olan *MspI* enzimi uygulanmış

fide dönemine ait dayanıklı F₂ (dayanıklı “bulk”) DNA karışımında da ortak olarak görülen 250 bç büyüklüğündeki bant beyaz oklar ile gösterilmiştir. Diğer taraftan kırmızı ile belirtilen aynı bant, 2 numaralı örnek olan *Hpa*II enzimi uygulanmış ergin döneme ait dayanıklı F₂ (dayanıklı “bulk”) DNA karışımında ve 14 numaralı örnek olan *Hpa*II enzimi uygulanmış fide dönemine ait dayanıklı F₂ (dayanıklı “bulk”) DNA karışımında da görülürken, 11 numaralı örnek olan *Hpa*II enzimi uygulanmış dayanıklı anaç Sönmez2001’de görülmemiştir. Bu nedenle bu, epigenetik markör olma olasılığı yüksek bir bant olarak nitelendirilebilir.

Epigenetik markör değerlendirmeleri, her üç kombinasyonda da anaçlar ile fide ve ergin döneme ait dönemlerine ait dayanıklı ve duyarlı F₂ karışımlarındaki toplam polimorfik bant sayıları hesaplanarak yapılmıştır. Buna göre, epigenetik markör olma olasılığını ifade eden PI178383 x Harmankaya99 kombinasyonunda 69 adet, İzgi01 x ES14 kombinasyonunda 73 adet ve Sönmez2001 x Aytın98 kombinasyonunda 79 adet bant profili belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, en fazla epigenetik markör olma olasılığına sahip bant profili Sönmez2001 x Aytın98 kombinasyonuna aittir (Şekil IV.22).



Şekil IV.22. CRED-RA yöntemi ile analiz edilen bulklar arasındaki epigenetik markör yüzdeleri.

Her üç kombinasyonda fide ve ergin döneme ait dayanıklı ve duyarlı F₂ karışımlarından elde edilen sonuçlar ayrı ayrı olarak değerlendirilmiştir.

PI178383xHarmankaya99 kombinasyonuna ait ergin döneme ait dayanıklı F₂ karışımında 15 adet, ergin döneme ait duyarlı F₂ karışımında 10 adet, fide dönemine ait dayanıklı F₂ karışımında 19 adet ve fide dönemine ait duyarlı F₂ karışımında 25 adet metilasyon polimorfizmi gösteren bant bulunmuştur.

İzgi01xES14 kombinasyonuna ait ergin döneme ait dayanıklı F₂ karışımında 9 adet, ergin döneme ait duyarlı F₂ karışımında 24 adet, fide dönemine ait dayanıklı F₂ karışımında 15 adet ve fide dönemine ait duyarlı F₂ karışımında 25 adet metilasyon polimorfizmi gösteren bant bulunmuştur.

Sönmez2001xAytın98 kombinasyonuna ait ergin döneme ait dayanıklı F₂ karışımında 20 adet, ergin döneme ait duyarlı F₂ karışımında 13 adet, fide dönemine ait dayanıklı F₂ karışımında 24 adet ve fide dönemine ait duyarlı F₂ karışımında 22 adet metilasyon polimorfizmi gösteren bant bulunmuştur.

Tüm elde edilen sonuçlar incelendiğinde, her üç kombinasyon arasında en fazla epigenetik markör olma olasılığı yüksek bant profili gösteren Sönmez2001 x Aytın98 kombinasyonu, en az epigenetik markör olma olasılığı yüksek bant profili gösteren PI178383 x Harmankaya99 kombinasyonudur.

Her üç kombinasyon arasında, en fazla epigenetik markör olma olasılığı yüksek bant profili gösteren hem PI178383 x Harmankaya99 hem de İzgi01 x ES14 kombinasyonunda fide dönemine ait duyarlı F₂ karışımı, en az epigenetik markör olma olasılığı yüksek bant profili gösteren İzgi01 x ES14 kombinasyonunda ergin döneme ait dayanıklı F₂ karışımıdır.

PI178383 x Harmankaya99, İzgi01 x ES14 ve Sönmez2001 x Aytın98 kombinasyonlarının CRED-RA analiz sonuçlarına ait DNA metilasyon polimorfizmi ve epigenetik markör değerlendirmelerinden elde edilen sonuçlar Tablo IV.6' da verilmiştir.

Tablo IV.6. CRED-RA yöntemi ile yapılan bulklarda metilasyon polimorfizmi ve epigenetik markör oranlarının karşılaştırılması.

Genotipler	DNA METİLYASYON POLİMORFİZMİ BANT SAYISI VE ORANLARI			EPIGENETİK MARKÖR BANT SAYISI VE ORANLARI		
	PI178383x Harmankaya99	İzgi01x ES14	Sönmez2001x Aytın98	PI178383x Harmankaya99	İzgi01x ES14	Sönmez2001x Aytın98
Ergin Döneme Ait Dayanıklı F₂ Karışımı	115 (%41)	82 (%60)	96 (%58)	15 (%60)	9 (%27)	20 (%60.60)
Ergin Döneme Ait Duyarlı F₂ Karışımı	166 (%59)	55 (%40)	69 (%42)	10 (%40)	24 (%73)	13 (%39.40)
Fide Dönemine Ait Dayanıklı F₂ Karışımı	108 (%54)	69 (%52)	70 (%44)	19 (%43)	15 (%37)	24 (%52.17)
Fide Dönemine Ait Duyarlı F₂ Karışımı	92 (%46)	65 (%48)	89 (%56)	25 (%57)	25 (%63)	22 (%47.83)

CRED-RA analizleri yardımıyla yapılan sarı pas hastalığına dayanıklı ve duyarlı buğday çeşitlerine ait F₂ karışımlarında elde edilen veriler karşılaştırıldığında bazı primerlerin metilasyon polimorfizmi ve epigenetik markör değerlendirilmelerinde dikkat çekici sonuçlar verdiği görülmüştür.

Örneğin; PI178383xHarmankaya99 kombinasyonuna ait ergin döneme ait dayanıklı F₂ karışımında %12.1 oranı ile OPK4 primeri en fazla DNA metilasyon polimorfizmi gösterirken, bu primerle yapılan analizlerde epigenetik markör olasılığı gösteren bant profili görülmemiştir. Ergin döneme ait duyarlı F₂ karışımında ise, DNA metilasyon polimorfizmi açısından yine %9.64 oranı ile **OPK4** primeri örnek verilebilir. Fakat epigenetik markör olasılığı açısından en fazla olan %40 oranı ile OPB2 primeri örnek verilebilir. Bunların yanında fide dönemine ait dayanıklı F₂ karışımında ise DNA metilasyon polimorfizmi açısından %12.04 ile OPA15 primeri ve epigenetik markör olasılığı açısından %21.05 ile OPK4 primeri örnek verilebilir. Bu kombinasyona ait fide dönemine ait duyarlı F₂ karışımında ise DNA metilasyon

polimorfizmi açısından %8.70 ile OPA5 ve OPC9 primerleri; epigenetik markör olasılığı açısından %16 ile OPB11 primeri görülebilir (TabloIV.7).

Örneğin; İzgi01xES14 kombinasyonunda ergin döneme ait dayanıklı F₂ karışımında %7.32 oranı ile OPC9 ve OPF13 primerleri en fazla DNA metilasyon polimorfizmi gösterirken, epigenetik markör değerlendirmelerinde ise %33.33 ile OPE8 primeri en yüksek oranda sonuç vermiştir. Ergin döneme ait duyarlı F₂ karışımında ise, DNA metilasyon polimorfizmi açısından yine %12.73 oranı ile OPA14 primeri örnek verilebilir. Fakat epigenetik markör açısından en fazla olan %20.83 oranı ile **UBC199** primeri örnek verilebilir. Bunların yanında fide dönemine ait dayanıklı F₂ karışımında ise DNA metilasyon polimorfizmi açısından %8.70 ile OPE8 primeri ve epigenetik markör açısından %20 ile **OPM9** primeri örnek verilebilir. Bu kombinasyona ait fide dönemine ait duyarlı F₂ karışımında ise DNA metilasyon polimorfizmi açısından %12.3 ile OPM9; epigenetik markör açısından %20 ile UBC199 primeri görülebilir (TabloIV.8).

Ayrıca, Sönmez2001xAytın98 kombinasyonuna ait ergin döneme ait dayanıklı F₂ karışımında %12.5 oranı ile **OPE8** primeri en fazla DNA metilasyon polimorfizmi gösterirken, yapılan analizlerde %25 ile **OPB11** primeri, epigenetik markör profili göstermiştir. Aynı şekilde, ergin döneme ait duyarlı F₂ karışımında ise, DNA metilasyon polimorfizmi açısından yine %14.49 oranı ile OPE8 primeri örnek verilirken, epigenetik markör açısından %30.77 oranı ile OPB11 primeri örnek verilebilir. Bunların yanında fide dönemine ait dayanıklı F₂ karışımında, DNA metilasyon polimorfizmi açısından %21.43 ile OPE8 primeri ve epigenetik markör açısından %20.83 ile OPB11 primeri örnek verilebilir. Bu kombinasyona ait fide dönemine ait duyarlı F₂ karışımında ise yine DNA metilasyon polimorfizmi açısından %11.24 ile OPE8; epigenetik markör açısından %27.27 ile OPB11 primeri görülebilir (TabloIV.9).

DNA metilasyon polimorfizmi açısından tüm kombinasyonlar göz önünde bulundurulduğunda, ergin döneme ait dayanıklı F₂ karışımında **OPE8** primeri, ergin döneme ait duyarlı F₂ karışımında yine **OPE8** primeri, fide dönemine ait dayanıklı F₂ karışımında yine **OPE8** primeri, fide dönemine ait duyarlı F₂ karışımında yine **OPE8** primeri öne çıkmaktadır.

Epigenetik markör değerlendirmeleri açısından tüm kombinasyonlar göz önünde bulundurulduğunda, ergin döneme ait dayanıklı F₂ karışımında **OPE8** primeri, ergin döneme ait duyarlı F₂ karışımında **OPB2** primeri, fide dönemine ait dayanıklı F₂

karışımında **OPK4** primeri, fide dönemine ait duyarlı F₂ karışımında **OPB11** primeri öne çıkmaktadır.

Tüm bu değerlendirmeler sonucunda, metilasyon çalışmalarında, yüksek polimorfizm elde etmek amacıyla OPK4, OPM9, OPB2, UBC199, OPE8 ve OPB11 primerlerinden yararlanmak yapacağımız çalışmanın önemi açısından faydalı olacaktır.

TabloIV.7. PII78383xHarmankaya99 kombinasyonuna ait metilasyon polimorfizmi ve epigenetik markör değerlerinin primerler açısından incelenmesi.

DAYANIKLI VE DUYARLI BULKLARDA YAPILAN CRED-RA ANALİZLERİ																
PII78383xHarmankaya99																
FİDE DÖNEMİNE AİT DENEMELER									ERGİN DÖNEME AİT DENEMELER							
Dayanıklı F₂ Karışımı				Duyarlı F₂ Karışımı					Dayanıklı F₂ Karışımı				Duyarlı F₂ Karışımı			
Primerin Adı	DNA Met. Pol.	% oran	Epimarkör	% oran	DNA Met. Pol.	% oran	Epimarkör	% oran	DNA Met. Pol.	% oran	Epimarkör	% oran	DNA Met. Pol.	% oran	Epimarkör	% oran
OPA-02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OPA-03	1	0,93	1	5,26	3	3,26	-	-	1	0,87	1	6,67	1	0,60	-	-
OPA-05	6	5,56	-	-	8	8,70	1	4,00	5	4,35	1	6,67	4	2,41	-	-
OPA-09	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OPA-10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OPA-12	-	-	1	5,26	1	1,09	-	-	1	0,87	1	6,67	1	0,60	-	-
OPA-13	1	0,93	-	-	2	2,17	1	4,00	6	5,22	-	-	5	3,01	-	-
OPA-14	5	4,63	-	-	2	2,17	-	-	6	5,22	-	-	8	4,82	-	-
OPA-15	13	12,04	1	5,26	2	2,17	1	4,00	2	1,74	-	-	11	6,63	-	-
OPA-16	10	9,26	-	-	1	1,09	-	-	7	6,09	-	-	13	7,83	-	-
OPA-17	8	7,41	-	-	-	-	-	-	3	2,61	-	-	12	7,23	-	-
OPA-18	-	-	-	-	1	1,09	-	-	-	-	1	6,67	1	0,60	-	-
OPA-19	2	1,85	-	-	2	2,17	-	-	1	0,87	-	-	1	0,60	-	-
OPB-02	5	4,63	-	-	5	5,43	6	24,00	4	3,48	-	-	6	3,61	4	40,00
OPB-03	-	-	1	5,26	1	1,09	-	-	2	1,74	-	-	4	2,41	1	10,00
OPB-05	2	1,85	-	-	1	1,09	1	4,00	2	1,74	-	-	1	0,60	-	-
OPB-06	1	0,93	1	5,26	4	4,35	1	4,00	1	0,87	1	6,67	2	1,20	1	10,00
OPB-08	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OPB-10	1	0,93	-	-	-	-	1	4,00	-	-	1	6,67	2	1,20	-	-
OPB-11	1	0,93	-	-	1	1,09	4	16,00	7	6,09	-	-	8	4,82	1	10,00
OPB-13	2	1,85	1	5,26	2	2,17	-	-	2	1,74	1	6,67	3	1,81	-	-
OPB-14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OPC-04	3	2,78	-	-	6	6,52	-	-	1	0,87	-	-	3	1,81	-	-
OPC-05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OPC-06	1	0,93	1	5,26	-	-	1	4,00	-	-	1	6,67	3	1,81	-	-
OPC-07	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OPC-08	1	0,93	-	-	1	1,09	-	-	1	0,87	-	-	2	1,20	-	-

OPC-09	7	6,48	-	-	8	8,70	-	-	2	1,74	-	-	-	-	1	10,00
OPC-15	1	0,93	-	-	-	-	-	-	1	0,87	-	-	1	0,60	-	-
OPC-19	3	2,78	-	-	3	3,26	-	-	3	2,61	-	-	2	1,20	-	-
OPD-16	6	5,56	-	-	7	7,61	3	12,00	8	6,96	-	-	10	6,02	-	-
OPD-19	1	0,93	-	-	3	3,26	-	-	2	1,74	-	-	4	2,41	-	-
OPE-08	1	0,93	-	-	1	1,09	1	4,00	-	-	-	-	-	-	-	-
OPE-17	-	-	3	15,79	2	2,17	-	-	3	2,61	-	-	2	1,20	-	-
OPF-12	2	1,85	-	-	-	-	-	-	3	2,61	-	-	3	1,81	-	-
OPF-13	1	0,93	-	-	3	3,26	-	-	3	2,61	-	-	2	1,20	-	-
OPF-14	2	1,85	-	-	2	2,17	1	4,00	2	1,74	1	6,67	2	1,20	-	-
OPH-04	1	0,93	-	-	-	-	1	4,00	-	-	-	-	-	-	-	-
OPH-11	-	-	1	5,26	3	3,26	2	8,00	1	0,87	1	6,67	4	2,41	-	-
OPJ-10	5	4,63	2	10,53	-	-	-	-	3	2,61	1	6,67	7	4,22	-	-
OPJ-20	-	-	-	-	1	1,09	-	-	-	-	1	6,67	6	3,61	-	-
OPK-04	1	0,93	4	21,05	1	1,09	-	-	14	12,1	-	-	16	9,64	1	10,00
OPM-09	2	1,85	-	-	4	4,35	-	-	3	2,61	1	6,67	2	1,20	-	-
OPM-10	2	1,85	-	-	2	2,17	-	-	1	0,87	1	6,67	-	-	1	10,00
OPT-16	-	-	-	-	2	2,17	-	-	-	-	-	-	1	0,60	-	-
OPT-17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UBC-199	1	0,93	2	10,53	4	4,35	-	-	5	4,35	1	6,67	8	4,82	-	-
UBC-212	6	5,56	-	-	-	-	-	-	6	5,22	-	-	2	1,20	-	-
UBC-359	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UBC-551	3	2,78	-	-	3	3,26	-	-	3	2,61	-	-	3	1,81	-	-
Toplam	108		19		92		25		115		15		166		10	

TabloIV.8. İzgi01xES14 kombinasyonuna ait metilasyon polimorfizmi ve epigenetik markör değerlerinin primerler açısından incelenmesi.

DAYANIKLI VE DUYARLI BULKLARDA YAPILAN CRED-RA ANALİZLERİ																
İZGİ01xES14																
FİDE DÖNEMİNE AİT DENEMELER									ERGİN DÖNEME AİT DENEMELER							
Primerin Adı	Dayanıklı F ₂ Karışımı				Duyarlı F ₂ Karışımı				Dayanıklı F ₂ Karışımı							
	DNA Met. Pol.	% oran	Epimarkör	% oran	DNA Met. Pol.	% oran	Epimarkör	% oran	DNA Met. Pol.	% oran	Epimarkör	% oran	DNA Met. Pol.	% oran	Epimarkör	% oran
OPA-02	1	1,45	1	6,67	-	-	3	12	3	3,66	1	11,11	-	-	3	12,50
OPA-03	3	4,35	1	6,67	-	-	1	4	3	3,66	-	-	-	-	3	12,50
OPA-05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OPA-09	1	1,45	-	-	-	-	-	-	1	1,22	-	-	-	-	-	-
OPA-10	1	1,45	-	-	-	-	-	-	1	1,22	-	-	-	-	-	-
OPA-12	1	1,45	-	-	-	-	1	4	1	1,22	-	-	1	1,82	-	-
OPA-13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OPA-14	3	4,35	-	-	3	4,61	3	12	5	6,10	-	-	7	12,73	2	8,33
OPA-15	-	-	1	6,67	-	-	2	8	1	1,22	1	11,11	3	5,45	3	12,50
OPA-16	1	1,45	-	-	1	1,5	-	-	3	3,66	1	11,11	2	3,64	-	-
OPA-17	3	4,35	1	6,67	4	6,15	-	-	2	2,44	1	11,11	2	3,64	1	4,17
OPA-18	1	1,45	-	-	-	-	-	-	1	1,22	-	-	1	1,82	-	-
OPA-19	1	1,45	-	-	2	3,07	-	-	1	1,22	-	-	-	-	-	-
OPB-02	3	4,35	-	-	3	4,61	-	-	4	4,88	-	-	-	-	-	-
OPB-03	-	-	-	-	-	-	1	4	-	-	-	-	1	1,82	-	-
OPB-05	2	2,90	1	6,67	-	-	-	-	1	1,22	-	-	1	1,82	-	-
OPB-06	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OPB-08	2	2,90	-	-	1	1,53	-	-	3	3,66	-	-	6	10,91	-	-
OPB-10	3	4,35	1	6,67	3	4,61	1	4	4	4,88	-	-	1	1,82	-	-
OPB-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OPB-13	-	-	2	13,33	-	-	1	4	3	3,66	1	11,11	3	5,45	-	-
OPB-14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OPC-04	1	1,45	-	-	1	1,53	-	-	1	1,22	-	-	-	-	-	-
OPC-05	-	-	1	6,67	1	1,53	-	-	1	1,22	-	-	-	-	-	-
OPC-06	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OPC-07	2	2,90	-	-	1	1,53	-	-	1	1,22	-	-	1	1,82	-	-
OPC-08	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OPC-09	3	4,35	-	-	4	6,15	1	4	6	7,32	-	-	3	5,45	1	4,17

OPC-15	-	-	1	6, 67	-	-	-	-	1	1, 22	-	-	-	-	-	-
OPC-19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OPD-16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OPD-19	1	1, 45	-	-	3	4, 61	-	-	1	1, 22	-	-	-	-	-	-
OPE-08	6	8, 70	2	13, 33	5	7, 69	2	8	-	-	3	33, 33	3	5, 45	2	8, 33
OPE-17	3	4, 35	-	-	1	1, 53	-	-	3	3, 66	-	-	1	1, 82	-	-
OPF-12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OPF-13	5	7, 25	-	-	5	7, 69	-	-	6	7, 32	-	-	-	-	-	-
OPF-14	3	4, 35	-	-	1	1, 53	-	-	3	3, 66	-	-	1	1, 82	3	12, 50
OPH-04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OPH-11	3	4, 35	-	-	2	3, 07	-	-	2	2, 44	-	-	4	7, 27	-	-
OPJ-10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OPJ-20	2	2, 90	-	-	2	3, 07	2	8	3	3, 66	-	-	2	3, 64	1	4, 17
OPK-04	2	2, 90	-	-	3	4, 61	1	4	-	-	1	11, 11	3	5, 45	-	-
OPM-09	3	4, 35	3	20, 00	8	12, 3	1	4	5	6, 10	-	-	5	9, 09	-	-
OPM-10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OPT-16	1	1, 45	-	-	2	3, 07	-	-	1	1, 22	-	-	-	-	-	-
OPT-17	2	2, 90	-	-	2	3, 07	-	-	4	4, 88	-	-	1	1, 82	-	-
UBC-199	1	1, 45	-	-	1	1, 53	5	20	2	2, 44	-	-	-	-	5	20, 83
UBC-212	2	2, 90	-	-	1	1, 53	-	-	1	1, 22	-	-	2	3, 64	-	-
UBC-359	3	4, 35	-	-	5	7, 69	-	-	4	4, 88	-	-	1	1, 82	-	-
UBC-551	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Toplam	69		15		65		25		82		9		55		24	

TabloIV.9. Sönmez2001xAytın98 kombinasyonuna ait metilasyon polimorfizmi ve epigenetik markör değerlerinin primerler açısından incelenmesi.

DAYANIKLI VE DUYARLI BULKLARDA YAPILAN CRED-RA ANALİZLERİ																
Sönmez2001xAytın98																
FİDE DÖNEMİNE AİT DENEMELER									ERGİN DÖNEME AİT DENEMELER							
Dayanıklı F₂ Karışımı					Duyarlı F₂ Karışımı				Dayanıklı F₂ Karışımı				Duyarlı F₂ Karışımı			
Primerin Adı	DNA Met. Pol.		Epimarkör		DNA Met. Pol.		Epimarkör		DNA Met. Pol.		Epimarkör		DNA Met. Pol.		Epimarkör	
OPA-02	2	2, 86	2	8, 33	2	2, 25	1	4, 55	4	4, 17	2	10, 00	-	-	-	-
OPA-03	1	1, 43	-	-	-	-	-	-	1	1, 04	-	-	-	-	-	-
OPA-05	1	1, 43	2	8, 33	7	7, 87	-	-	1	1, 04	2	10, 00	7	10, 14	-	-
OPA-09	-	-	-	-	1	1, 12	-	-	-	-	-	-	1	1, 45	-	-
OPA-10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OPA-12	-	-	-	-	2	2, 25	1	4, 55	1	1, 04	1	5, 00	2	2, 90	1	7, 69
OPA-13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OPA-14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OPA-15	1	1, 43	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1, 45	-	-
OPA-16	1	1, 43	-	-	-	-	-	-	-	-	1	5, 00	1	1, 45	-	-
OPA-17	4	5, 71	-	-	1	1, 12	-	-	4	4, 17	-	-	1	1, 45	-	-
OPA-18	1	1, 43	1	4, 17	2	2, 25	1	4, 55	1	1, 04	-	-	-	-	-	-
OPA-19	1	1, 43	-	-	-	-	-	-	1	1, 04	-	-	-	-	-	-
OPB-02	2	2, 86	1	4, 17	5	5, 62	-	-	4	4, 17	-	-	3	4, 35	-	-
OPB-03	1	1, 43	-	-	2	2, 25	-	-	-	-	-	-	2	2, 90	-	-
OPB-05	1	1, 43	-	-	-	-	-	-	2	2, 08	-	-	4	5, 80	-	-
OPB-06	2	2, 86	-	-	2	2, 25	1	4, 55	4	4, 17	-	-	2	2, 90	-	-
OPB-08	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OPB-10	2	2, 86	1	4, 17	1	1, 12	1	4, 55	3	3, 13	-	-	1	1, 45	-	-
OPB-11	1	1, 43	5	20, 83	-	-	6	27, 27	3	3, 13	5	25, 00	-	-	4	30, 77
OPB-13	1	1, 43	-	-	-	-	-	-	1	1, 04	-	-	-	-	-	-
OPB-14	2	2, 86	-	-	3	3, 37	-	-	2	2, 08	2	10, 00	1	1, 45	1	7, 69
OPC-04	-	-	-	-	3	3, 37	-	-	1	1, 04	-	-	1	1, 45	-	-
OPC-05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OPC-06	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OPC-07	1	1, 43	1	4, 17	3	3, 37	-	-	1	1, 04	-	-	3	4, 35	1	7, 69
OPC-08	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

OPC-09	1	1, 43	7	29, 17	5	5, 62	3	13, 64	6	6, 25	1	5, 00	4	5, 80	-	-
OPC-15	2	2, 86	-	-	3	3, 37	-	-	1	1, 04	-	-	2	2, 90	-	-
OPC-19	3	4, 29	-	-	3	3, 37	-	-	5	5, 21	-	-	2	2, 90	1	7, 69
OPD-16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OPD-19	-	-	-	-	5	5, 62	-	-	5	5, 21	-	-	5	7, 25	-	-
OPE-08	15	21, 43	3	12, 50	10	11, 24	-	-	12	12, 50	4	20, 00	10	14, 49	-	-
OPE-17	1	1, 43	-	-	-	-	-	-	1	1, 04	-	-	-	-	-	-
OPF-12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OPF-13	5	7, 14	1	4, 17	7	7, 87	-	-	8	8, 33	-	-	4	5, 80	1	7, 69
OPF-14	-	-	-	-	2	2, 25	3	13, 64	4	4, 17	-	-	1	1, 45	-	-
OPH-04	2	2, 86	-	-	2	2, 25	-	-	2	2, 08	-	-	2	2, 90	-	-
OPH-11	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1, 04	-	-	1	1, 45	-	-
OPJ-10	2	2, 86	-	-	-	-	-	-	1	1, 04	-	-	-	-	-	-
OPJ-20	-	-	-	-	3	3, 37	-	-	3	3, 13	2	10, 00	-	-	-	-
OPK-04	5	7, 14	-	-	3	3, 37	2	9, 09	4	4, 17	-	-	2	2, 90	1	7, 69
OPM-09	4	5, 71	-	-	4	4, 49	-	-	2	2, 08	-	-	2	2, 90	-	-
OPM-10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OPT-16	1	1, 43	-	-	1	1, 12	-	-	1	1, 04	-	-	-	-	-	-
OPT-17	1	1, 43	-	-	2	2, 25	-	-	1	1, 04	-	-	-	-	-	-
UBC-199	1	1, 43	-	-	2	2, 25	-	-	2	2, 08	-	-	2	2, 90	-	-
UBC-212	2	2, 86	-	-	3	3, 37	1	4, 55	3	3, 13	-	-	2	2, 90	1	7, 69
UBC-359	-	-	-	-	-	-	2	9, 09	-	-	-	-	-	-	2	15, 38
UBC-551	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Toplam	70		24		89		22		96		20		69		13	

CRED-RA analizleri kapsamında yapılan DNA metilasyon polimorfizmi ve epigenetik markör değerlendirmeleri sonucunda, kombinasyonlara ait anaçlar arasında polimorfizm belirlenmesine rağmen yine bu kombinasyonlara ait genetik açılım gösteren F₂ populasyonlarında aynı polimorfizm belirlenememiş, dolayısıyla sarı pas hastalığı dayanıklılık kaynağı ile genetik olarak bağlantı gösteren bir markör elde edilememiştir.

DNA metilasyon polimorfizminden kaynaklanan polimorfizmi belirlemek amacıyla yapılan çalışmalara bakıldığında, bulk segregasyon analizleri kapsamında herhangi bir literatüre ulaşılammıştır. Ancak, DNA metilasyon polimorfizmini, genetik ve epigenetik farklılıkları belirlemek amacıyla birçok bitkide çeşitli teknikler yardımıyla birçok çalışma yapılmıştır. Örneğin, MSAP tekniğı yardımıyla, bazı pirinç hibritlerinde görülen DNA metilasyon polimorfizmini açıklayan Xiong ve arkadaşlarının (1999) yaptığı çalışmada, toplamda görülen 1,076 fragmentin içinde 46 tane farklı metilasyon bölgesi (epi-markör) olduğunu belirlemiştir. Araştırmacılar, bu epi-markörlerin bireye özgü veya hibrite özgü farklı gen anlatımlarını açıklamada bir ipucu olduğunu gözlemlemiştir. Ashikawa ve arkadaşları (2001), birkaç tekrarlı pirinç kültüründe MSAP tekniğı yardımıyla, genomda rastgele yerleşmiş farklı metilasyon bölgelerini taşıyan fragmentleri göstermişlerdir. Ayrıca, Cervera ve arkadaşları (2002) tarafından yapılan çalışmada, ekotipler arası karşılaştırmasında toplam fragmentlerin yaklaşık % 35'inin ve bir ekotip içinde yapılan karşılaştırmada toplam fragmentlerin yaklaşık %1'inden daha azının epi-markörü temsil ettiği bildirilmiştir. Marfil ve arkadaşları (2009) tarafından yapılan çalışmada, patates bitkisinde MSAP ve Southern blot teknikleri kullanılarak geniş bitki genomundaki metilasyon bölgeleri ve metilenme seviyesi incelenmiştir. Sonuçta bitkinin mitokondrial ve nükleer DNA'sında görülen metilasyon farklılıkları belirlenmiştir. Bu sonuçlar ile birlikte bizim sonuçlarımız göz önüne alındığında, patates, pirinç ve diğer tahıllarda fenotipi etkileyen epigenetik varyasyonların her zaman olabileceğı ve epigenetik varyasyonların türlere göre farklı şekilde ortaya çıktığı görülmüştür.

BÖLÜM V

SON DEĞERLENDİRMELER ve ÖNERİLER

Türkiye, Yakın ve Orta Doğu'nun en önemli ekmeklik buğday üreticilerindedir. Ancak buğday tarımını olumsuz yönde etkileyen sarı pas hastalığı özellikle epidemi yıllarında tüm dünyanın ve ülkemizin karşı karşıya kaldığı önemli bir sorundur. Bu hastalık sonucunda oluşan zararı azaltmak için izlenecek en etkili yaklaşım, dayanıklı çeşitlerin ıslahının yapılmasıdır.

Genetik dayanıklılık, sarı pas hastalığına karşı mücadelede kullanılan çevre açısından risk taşımayan güvenilir bir yöntemdir. Bitkilerin, *Puccinia* mantarı ile klasik olarak test edilmesi uzun zaman almakta, fazla iş gücü gerekmekte ve inokulasyon sırasında sorunlarla karşılaşmaktadır. Bu problemler dayanıklılık çalışmalarının yavaş ilerlemesine neden olmaktadır. Bütün bu olumsuzluklar, sarı pasa karşı dayanıklılık sağlayan gene bağlı moleküler markör veya markörlerin geliştirilmesiyle aşılabilmektedir. Moleküler markörler kullanarak bitkilerin çok erken döneminde (fide dönemi) dayanıklılık geni taşıyıp/taşımadıkları hızlı ve güvenli şekilde test edilmektedir. Moleküler markörler, aynı anda çok bitkinin analizine imkân tanımakta ve aynı bitkide birden fazla dayanıklılık geni analiz edilebilmektedir. Bununla birlikte dayanıklılık genine bağlı moleküler markörlerin belirlenmesi, dayanıklılık geninin klonlanması için önemli bir adım oluşturmaktadır. Bitki ıslahında moleküler markörlerin kullanımı büyük avantajlar sağlamaktadır. Sarı pas dayanıklılığı, buğday ıslah programlarının başlıca araştırma konularından biridir. Son yıllarda sarı pasa dayanıklılık genlerinin bulunmasına ve genomdaki yerlerinin saptanmasına yönelik çalışmalar yaygınlık kazanmıştır (Christiansen ve ark., 2006).

Bu çalışmada, 6 farklı kışlık ekmeklik buğday çeşidinde (PI178383, Harmankaya99, İzgi01, ES14, Sönmez2001 ve Aytın98) ve kombinasyonlarına (PI178383 x Harmankaya99, İzgi01 x ES14, Sönmez2001 x Aytın98) ait genetik açılım gösteren F₂ populasyonlarında DNA metilasyonuna ve epigenetik farklılıklara

bağlı polimorfizm RAPD ve CRED-RA analizleri kullanılarak belirlenmeye çalışılmıştır. Tüm anaç ve kombinasyonlar, moleküler karakterizasyon ve sarı pas dayanıklılık geni ile ilişkili markörlerin belirlenmesi amacıyla 50 adet RAPD primeri kullanılarak PZR analizlerine tabi tutulmuşlardır. Bu tarama sonucunda, çeşitler arasında 5 adet primer ile monomorfik bant profili elde edilirken, 45 adet primer ile polimorfik bant profili elde edilmiştir. Elde edilen 2563 bandın %14'ü polimorfik, %86'sı monomorfik bantlardır. Tüm kombinasyonlarda elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, en fazla polimorfik bant veren primerin %39.13 oranı ile OPD-19 ve en fazla monomorfik bant veren primerin %86.28 oranı ile OPA-17 olduğu gözlenmiştir. Ortalamalar alınarak değerlendirildiğinde, ortalama polimorfik bant sayısı 7.14 olarak hesaplanmıştır. Ayrıca, anaçlara ait DNA'lar ile yapılan PZR analizleri sonucunda polimorfik görülen toplam 45 adet primerin PI178383 x Harmankaya99, İzgi2001 x ES14 ve Sönmez2001 x Aytın98 kombinasyonlarındaki dağılımları da incelenmiştir. Bazı primerler kombinasyonlar arasında ortak olmakla beraber, PI178383 x Harmankaya99 kombinasyonu için 25 adet monomorfik ve 25 adet polimorfik bant profili gösteren primer, İzgi2001 x ES14 kombinasyonu için yine 25 adet monomorfik ve 25 adet polimorfik bant profili gösteren primer ve Sönmez2001 x Aytın98 kombinasyonu için 11 adet monomorfik ve 39 adet polimorfik bant profili gösteren primer olduğu gözlenmiştir. Her kombinasyona ait anaçlar arasında polimorfik olarak belirlenen primerler, bu kombinasyonlara ait genetik açılım gösteren fide ve ergin dönem F₂ DNA karışımlarında da incelenerek sarı pas dayanıklılığı ile genetik bağlantı gösteren bir markör elde edilebilmek amacıyla Bulk Segregasyon Analizleri'ne tabi tutulmuşlardır. Buna göre, en fazla polimorfizm oranı Sönmez2001 x Aytın98 kombinasyonunda görülmüş ancak hiçbir kombinasyonda markör niteliği taşıyan bant profili elde edilememiştir.

RAPD analizleri yanı sıra yine aynı anaç ve kombinasyonlarda DNA metilasyonuna ve epigenetik farklılıklara bağlı polimorfizmi belirlemek için CRED-RA analizleri ve bu verilere dayalı markör eldesi amacıyla da BSA gerçekleştirilmiştir. DNA metilasyonun nasıl gerçekleştiği hakkındaki bilgiler, genellikle fenotipik varyasyonlar ile sınırlıdır. Ayrıca, genetik modifikasyonların da birçok fenotipik varyasyonlara sebep olduğu bilinmektedir. Tüm genotiplere ve kombinasyonlara ait DNA örnekleri CRED-RA analizleri için farklı duyarlılığa sahip kesim enzimleri (*HpaII* ve *MspI*) ile muamale edilmiş ve RAPD ile aynı koşullar altında PZR'a tabi tutulmuşlardır. Anaçlara ait DNA'larda görülen polimorfizme

göre belirlediğimiz kombinasyonlar arasında en çok PI178383 x Harmankaya99 kombinasyonunun CRED-RA analizlerinde yüksek oranda polimorfizm gösterdiği tespit edilmiştir.

Çalışmamızda materyal olarak kullanılan buğday çeşitleri ile 50 adet RAPD primeri kullanılarak yapılan CRED-RA analizlerinde, PI178383 x Harmankaya99 kombinasyonu için 44 adet, İzgi2001 x ES14 kombinasyonu için 38 adet ve Sönmez2001 x Aytın98 kombinasyonu için 40 adet polimorfik bant profili gösteren primer olduğu gözlenmiştir. CRED-RA analizleri sonucu elde edilen veriler, DNA metilasyon polimorfizmi ve epigenetik markör olarak iki farklı şekilde değerlendirilmiştir. Anaç genotipler ile 50 adet RAPD primerinin PZR analizine tabi tutulması sonucunda, PI178383 x Harmankaya99 kombinasyonunda %39, İzgi01 x ES14 kombinasyonuna ait %34 ve Sönmez2001 x Aytın98 kombinasyonuna ait %27 oranında DNA metilasyon polimorfizmini ifade eden bandın olduğu görülmüştür. Buna ek olarak epigenetik markör değerlendirilmelerinde ise, PI178383 x Harmankaya99 kombinasyonu için % 5.2, İzgi01 x ES14 kombinasyonu için % 4.9 ve Sönmez2001 x Aytın98 kombinasyonu için % 2.5 oranında epigenetik markör olma olasılığı yüksek bant olduğu belirlenmiştir. Ancak, hiçbir kombinasyonda sarı pas dayanıklılığı ile genetik bağlantı gösteren bir markör elde edilememiştir.

Her kombinasyona ait anaçlar arasında polimorfik olarak belirlenen primerler, bu kombinasyonlara ait genetik açılım gösteren fide ve ergin dönemlere ait F₂ DNA karışımlarında da incelenerek Bulk Segregasyon Analizleri'ne tabi tutulmuşlardır. Tüm kombinasyonlara ait genetik açılım gösteren fide ve ergin dönem F₂ DNA karışımlarında yapılan CRED-RA analizleri sonucunda, DNA metilasyon polimorfizmi açısından PI178383 x Harmankaya99 kombinasyonunda toplam 481 adet, İzgi01 x ES14 kombinasyonunda toplam 271 ve Sönmez2001 x Aytın98 kombinasyonunda ise toplam 324 adet bant gözlemlenmiştir.

Bunun yanında epigenetik markör açısından PI178383 x Harmankaya99 kombinasyonunda toplam 69 adet, İzgi01 x ES14 kombinasyonunda toplam 73 ve Sönmez2001 x Aytın98 kombinasyonunda ise toplam 79 adet bant gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar değerlendirildiğinde, her üç kombinasyon arasında en fazla epigenetik markör olma olasılığı yüksek bant profili gösteren Sönmez2001 x Aytın98 kombinasyonu, en az epigenetik markör olma olasılığı yüksek bant profili gösteren PI178383 x Harmankaya99 kombinasyonudur. Her üç kombinasyon arasında, en fazla epigenetik markör olma olasılığı yüksek bant profili gösteren hem PI178383 x

Harmankaya99 hem de İzgi01 x ES14 kombinasyonunda fide dönemine ait duyarlı F₂ karışımı, en az epigenetik markör olma olasılığı yüksek bant profili gösteren İzgi01 x ES14 kombinasyonunda ergin döneme ait dayanıklı F₂ karışımıdır.

PI178383 x Harmankaya99 kombinasyonuna ait ergin döneme ait dayanıklı F₂ karışımında %12.1 oranı ile OPK4 primeri en fazla DNA metilasyon polimorfizmi gösterirken, bu primerle yapılan analizlerde epigenetik markör profili elde edilememiştir. Ergin döneme ait duyarlı F₂ karışımında ise, DNA metilasyon polimorfizmi açısından yine %9.64 oranı ile OPK4 primeri örnek verilebilir. Fakat epigenetik markör açısından en fazla olan % 40 oranı ile OPB2 primeri örnek verilebilir. Bunların yanında fide dönemine ait dayanıklı F₂ karışımında ise DNA metilasyon polimorfizmi açısından %12.04 ile OPA15 primeri ve epigenetik markör açısından %21.05 ile OPK4 primeri örnek verilebilir. Bu kombinasyona ait fide dönemine ait duyarlı F₂ karışımında ise DNA metilasyon polimorfizmi açısından %8.70 ile OPA5 ve OPC9 primerleri; epigenetik markör açısından %16 ile OPB11 primeri görülebilir. İzgi01 x ES14 kombinasyonuna ait ergin döneme ait dayanıklı F₂ karışımında %7.32 oranı ile OPC9 ve OPF13 primerleri en fazla DNA metilasyon polimorfizmi gösterirken, bu primerle yapılan analizlerde %33.33 ile OPE8 primeri epigenetik markör görülmüştür. Ergin döneme ait duyarlı F₂ karışımında ise, DNA metilasyon polimorfizmi açısından yine %12.73 oranı ile OPA14 primeri örnek verilebilir. Fakat epigenetik markör açısından en fazla olan % 20.83 oranı ile UBC199 primeri örnek verilebilir. Bunların yanında fide dönemine ait dayanıklı F₂ karışımında ise DNA metilasyon polimorfizmi açısından %8.70 ile OPE8 primeri ve epigenetik markör açısından %20 ile OPM9 primeri örnek verilebilir. Bu kombinasyona ait fide dönemine ait duyarlı F₂ karışımında ise DNA metilasyon polimorfizmi açısından %12.3 ile OPM9; epigenetik markör açısından %20 ile UBC199 primeri görülebilir. Sönmez2001 x Aytın98 kombinasyonuna ait ergin döneme ait dayanıklı F₂ karışımında %12.5 oranı ile OPE8 primeri en fazla DNA metilasyon polimorfizmi gösterirken, yapılan analizlerde %25 ile OPB11 primeri, epigenetik markör profili göstermiştir. Aynı şekilde, ergin döneme ait duyarlı F₂ karışımında ise, DNA metilasyon polimorfizmi açısından yine %14.49 oranı ile OPE8 primeri örnek verilirken, epigenetik markör açısından % 30.77 oranı ile OPB11 primeri örnek verilebilir. Bunların yanında fide dönemine ait dayanıklı F₂ karışımında, DNA metilasyon polimorfizmi açısından %21.43 ile OPE8 primeri ve epigenetik markör açısından %20.83 ile OPB11 primeri örnek verilebilir. Bu

kombinasyona ait fide dönemine ait duyarlı F₂ karışımında ise yine DNA metilasyon polimorfizmi açısından %11.24 ile OPE8; epigenetik markör açısından %27.27 ile OPB11 primeri görülebilir.

Bu veriler incelendiğinde, DNA metilasyon polimorfizmi açısından tüm kombinasyonlar göz önünde bulundurulduğunda, hem fide dönemi hem de ergin dönemde dayanıklı ve duyarlı F₂ karışımlarında **OPE8** primeri öne çıkmaktadır. Ayrıca, epigenetik markör değerlendirmeleri açısından tüm kombinasyonlar göz önünde bulundurulduğunda, ergin döneme ait dayanıklı F₂ karışımında **OPE8** primeri, ergin döneme ait duyarlı F₂ karışımında **OPB2** primeri, fide dönemine ait dayanıklı F₂ karışımında **OPK4** primeri, fide dönemine ait duyarlı F₂ karışımında **OPB11** primeri öne çıkmaktadır.

Bu tez çalışması sonucunda ayrıca, Türkiye’de yetiştirilen bazı buğday çeşitleri arasındaki moleküler olarak genetik polimorfizm saptamak için her bir primerde görülen polimorfik bant sayısı hesaplanmış ve buğday genotiplerini DNA seviyesinde birbirinden ayırmamıza yarayan en uygun RAPD primerinin OPD-19 olduğu belirlenmiştir.

Bitkilerdeki epigenetik ve genetik sistemler arasındaki etkileşimin nasıl olduğu yönündeki bilgiler oldukça sınırlıdır. Bu çalışmada kombinasyonlar arasında belirlenen epi-markörlerin bireye özgü veya hibrite özgü farklı gen anlatımlarını açıklamada bir ipucu olabileceği ve epigenetik varyantların seçiminde bundan sonra yapılacak araştırmalara veri sağlayacağı düşünülmektedir.

Tüm bunlar göz önünde bulundurularak; genetik ve epigenetik polimorfizm oranlarının çeşitlere özgü olduğu ve moleküler markörler yardımıyla epigenetik polimorfizmin belirlenebileceği söylenebilir.

KAYNAKLAR

- [1] Adams, K.L.; Wendel, J.F.: “Exploring the genomic mysteries of polyploidy in cotton”, *Biological Journal of the Linnean Society*, 82 (2004) 573–581.
- [2] Akar, T.: “Türkiye’de Yetiştirilen Yerel Makarnalık Buğday Çeşitlerinde Genetik Farklılığın Polimorfik DNA Analizi İle Belirlenmesi”, *Yayınlanmamış Doktora Tezi*, Ankara Üniv., Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, (2002).
- [3] Akar,T.; Yazar, S.; Dönmez, E.; Avcı M.; Düşünceli F.: “Current Status Of National Winter Wheat Breeding in Turkey”, *J. Agric. Res.*, 1 (2007) 45.
- [4] Arnholdt-Schmitt, B.: “Stress-Induced Cell Reprogramming: A Role For Global Genome Regulation?”, *Plant Physiol.*, 136 (2004) 2579–2586.
- [5] Armstrong, J.S.; Gibbs, A.J.; Peakall, R.; Weiller, G.: The rapdistance package, (1994).
- [6] Ashikawa, I.: “Surveying CpG Methylation at 50-CCGG in The Genomes of Rice Cultivars”, *Plant Mol. Biol.* 45 (2001) 31–39.
- [7] Babaoğlu, S.; Açık, L.; Çelebi, A.; Adıgüzel, N.: Molecular Analysis of Turkish *Alyssum* L. (*Brassicaceae*) Species By RAPD-PCR and SDS-PAGE Methods, *G.Ü. Fen Bilimleri Dergisi*, 3 (2004) 17.
- [8] Başibüyük, H.H.; Bardakçı, F.; Belshaw, R.; Quicke, D.L.J.: “*Phylogenetic Systematics: A Practical Guide to Theory and Practice*”, Önder Matbaa, Sivas, Türkiye, (2000) 134.

- [9] Bernard, R.B.; Nevo, E.; Douglas, A.J.; Beiles, A.: “Genetic Diversity in Wild Barley (*Hordeum Spontaneum* C. Koch) in The Near East: A Molecular Analysis Using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers”, *Genetic Resources and Crop Evolution*, 44 (1997) 147-157.
- [10] Bilgin, O.; Korkut, K.Z.: “Bazı Ekmeklik Buğday (*Triticum aestivum* L.) Çeşit ve Hatlarının Genetik Uzaklıklarının Belirlenmesi”, *Journal of Tekirdag Agricultural Faculty*, 1 (2005) 2.
- [11] Boyko, A.; Kovalchuk, I.: “Epigenetic Control of Plant Stress Response”, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 49 (2008) 61-72.
- [12] Budak, H.; Shearman, R.C.; Gulsen, O.; Dweikat, I.: “Understanding Ploidy Complex And Geographic Origin Of *Buchloe Dactyloides* Genome Using Cytoplasmic And Nuclear Marker Systems”, *Theoretical and Applied Genetics*, 111 (2004) 1545-1552.
- [13] Cai, Q.; Guy, C.L.; Moore, G.A.: “Detection of Cytosine Methylation and Mapping of A Gene Insequencing Cytosine Methylation In The Genome of *Citrus*”, *Genome*, 39 (1996) 235-242.
- [14] Cao, W.; Hucl, P.; Scoles, G.; Chibbar, R.N.: “Genetic Diversity Within *T. Spelta* And *T. Macha* Based on RAPD Analysis”, *Euphytica*, 104 (1998) 181-189.
- [15] Cao, W.; Scoles, G.; Hucl, P.; Chibbar, R.N.: “The Use of RAPD Analysis To Classify *Triticum* Accessions”, *Theoretical and Applied Genetics*, 98 (1999) 602-607.
- [16] Cervera, M.T.; Ruiz-Garcia, L.; Martinez-Zapater, J.M.: “Analysis of DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* based on methylation sensitive AFLP markers”, *Mol. Genet. Genomics*, 268 (2002) 543-552.

- [17] Chan, S.W.; Henderson, I.R.; Jacobsen, S.E.: “Gardening the genome: DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*”, *Nat. Rev. Genet.*, 6 (2005) 351–360.
- [18] Chen, X.M.: “Epidemiology and Control of Stripe Rust (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*) On Wheat”, *Can. J. Plant Pathol*, 27 (2005) 314–337.
- [19] Christiansen, M. J.; Feenstra, B.; Skovgaard, I.M.; Andersen, S.B.: “Genetic Analysis of Resistance to Yellow Rust in Hexaploid Wheat Using A Mixture Model For Multiple Crosses”, *Theor Appl. Genet*, 112 (2006) 581–591.
- [20] Clemens, S.; Palmgren, M.G.; Krämer, U.: “A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation”, *Trends in Plant Science*, 7 (2002) 309-315.
- [21] Comai, L.; Madlung, A.: “The effect of stress on genome regulation and structure”, *Annals of Botany*, (2004) 481-495.
- [22] Curtis, B.C.; Macpherson, H.G.; Rajaram, S.: “Bread Wheat Improvement and Production, Food and Agriculture Organization of The United Nations”, (2002).
- [23] Dai, Y.; Ni, Z.; Dai, J.; Zhao, T.; Sun, O.: “Isolation and Expression Analysis of Genes Encoding DNA Methyltransferase in Wheat (*Triticum aestivum* L.)”, *Biochemica et Biophysica Acta.*, 1729 (2005) 118-125.
- [24] Dakir, E.H.; Ruiz, M.L.; Garcia, P.; Perez De La Vega M.: “ Genetic Variability Evaluation in A Moroccan Collection of Barley, *Hordeum vulgare* L., by Means of Storage Proteins and RAPDs”, *Genetic Resources and Crop Evolution*, 49 (2002) 619-631.
- [25] Dangl, J.L.: “Piece De Resistance: Novel Classes of Plant Disease Resistance Genes”, *Cell*, 80 (1995) 363-366.

- [26] D'Ennequin, M.L.T.; Panaud, O.; Robert, T.; Ricroch, A.: "Assesment of Genetic Relationships Among Sexual and Asexual Forms of *Allium cepa* Using Morphological Traits and RAPD markers", *Heredity*, 78 (1997) 403-409.
- [27] Devos K.M.; Gale M.D.: "The Use of Random Amplified Polymorphic DNA Markers in Wheat", *Theor. Appl. Genet.*, 84 (1992) 567-572.
- [28] Divaret, I., Margale E., Thomas. G.: "RAPD Markers on Seed Bulks Efficiently Assess The Genetic Diversity of a *Brassica oleracea* L. Collection", *Theor. Appl. Genet.*, 98 (1999) 1029-1035.
- [29] Downton, R. T. and Dickinson H. G.: "Epigenetics and its Implications for Plant Biology 2. The 'Epigenetic Epiphany': Epigenetics, Evolution and Beyond", *Annals of Botany*, 97 (2005) 11–27.
- [30] Düşünceli, F.; Çetin, L.; Albustan, S.: "Orta Anadolu Buğday Ekilişlerinde Pas Hastalıklarının (*Puccinia* spp.) Yaygınlığı, Önemi ve Alınması Gereken Tedbirler", *Hububat tarımının sorunları ve çözüm yolları sempozyumu*, Konya, Türkiye (1999).
- [31] Echeverria-Peraza, S.; Hen'era-Valencia, V.A.; James-Kay, A.: "Detection of DNA Methylation Changes in Micropropagated Banana Plants Using Methylation-Sensitive Amplification Polymorphism (MSAP)", *Plant Sci.*, 161 (2001) 359-367.
- [32] Fernandez, M.E.; Figueiras, A.M.; Benito, A.M.: "The Use of ISSR and RAPD Markers For Detecting DNA Polymorphism", *Theoretical and Applied Genetics*, 104 (2002) 845-851.
- [33] Finnegan, E.J.; Genger, R.K.; Peacock, W.J.; Dennis, E.S.: "DNA Methylation in Plants", *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 49 (1998) 223–247.

- [34] Flor, H.H.: "Current Status of The Gene-For-Gene Concept", *Annu. Rev. Phytopathol.*, 9 (1971) 275–276.
- [35] Glick B.R.; Pasternak J.J.; "Molecular Biotechnology (Principles and Applications of Recombinant DNA)", *ASM Press.*, Washington, (1998).
- [36] Gourmet, C.; Rayburn, A.L.: "Identification of RAPD Markers Associated With The Presence of B Chromosomes in Maize", *Heredity*, 77 (1996) 240-244.
- [37] Göcmen, B.; Keskin, S.; Kaya, Z.; Taskın, V.: "Development of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) markers in 150 F6-inbred durum wheat (*Triticum durum*) lines derived from Kunderu-1149xCham-1 cross", *Israel Journal of Plant Sciences Vol.*, 51 (2003) 245–249.
- [38] Guo, P.G.; Bai, G.H.; Shaner, G.E.: "AFLP and STS Tagging of A Major QTL For Fusarium Head Blight Resistance in Wheat", *Theor. Appl. Genet.*, 106 (2007) 1011–1017.
- [39] Gupta, P. K.; Mir, R. R.; Mohan, A.; Kumar, J.: "Wheat Genomics: Present Status and Future Prospects", *Hindawi Publishing Corporation International Journal of Plant Genomics*, (2008) 36.
- [40] Hafız, I. A.; Abbasi, N. A.; Hussain, A.; Waheed, A.; Naqvi, S.S.M.: "The Methylation-Sensitive Amplification Polymorphism in Juvenile and Adult Phase Crab Apple (*Malus Micromalus*), *Pak. J. Bot.*, 38 (2006) 1149-1157.
- [41] Halldén, C.; Nilsson, N.O.; Rading, I.M.; Sall T.: "Evaluation of RFLP and RAPD Markers in A Comparison of Brassica Napus Breeding Lines", *Theor Appl. Genet.*, 88 (1994) 123-128.
- [42] Hayatsu, H.; Wataya, Y.; Kai, K.; Lida, S.: "Reaction of Sodium Bisulfite With Uracil, Cytosine, and Their Derivatives", *Biochemistry*, 9 (1970) 2858–2865.

- [43] Hollingsworth W.O.; Christie C.B.; Nichols M.A.; Neilson H.F.: "Detection of Variation Among and Within *Asparagus* Hybrids Using Random Amplified DNA (RAPD) markers", *New Zealand J. Crop Hortic. Sci.*, 26 (1998).
- [44] Huff D.R.; Peakall R.; Smouse P.E.: "RAPD Variation Within and Among Natural Populations of Outcrossing Buffalograss [(*Buchloe dactyloides* (Nutt.) Engelm)]", *Theor. Appl. Genet.*, 86 (1993) 927-934.
- [45] Iqbal, M.J.; Aziz, N.; Saeed, N.A.; Zafar, Y.; Malik, K.A.: "Genetic Diversity Evaluation of Some Elite Cotton Varieties by RAPD Analysis", *Theor. Appl. Genet.*, 94 (1997) 139-144.
- [46] İpekdal, K.: "Microarray Teknolojisi Evrimsel ve Ekolojik Çalışmalarda Kullanımı", *Proteomik ve Genomik*, (2006).
- [47] Jaligot, E.; Rival, A.; Beulé, T.; Dussert, S.; Verdeil, J.L.: "Somaclonal Variation in Oil Palm (*Elaeis guineensis* Jacq.): The DNA Methylation Hypothesis", *Plant Cell Rep.*, 19 (2000) 684-690.
- [48] Kaeppler, S.M.; Phillips, R.I.: "Tissue Culture-Induced DNA Methylation Variation in Maize", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90 (1993) 8773-8776.
- [49] Keyte, A.L.; Percifield, R.; Liu, B.; Wendel, J.F.: "Intraspecific DNA Methylation Polymorphism in Cotton (*Gossypium hirsutum*)", *J. Hered.*, 97 (2006) 444-450.
- [50] Khanuja, S.P.S.; Shasany, A.K.; Srivastava, A.; Kumar, S.: "Assessment of Genetic Relationships in *Mentha* Species", *Euphytica*, 111 (2000).
- [51] Knox, M.R.; Ellis, T.H.N.: "Stability and Inheritance of Methylation States at *PstI* Sites in *Pisum*", *Mol. Genet. Genomics*, 265 (2001) 497-507.

- [52] Kohjyouma, M.; Nakajima, S.; Namer, A.; Shimizu, R.; Mizukami, H.; Kohda, H.: "Random Amplified Polymorphic DNA Analysis and Variation of Essential Oil Components of *Atractylodes* Plant", *Biol. Pharm. Bull.*, 20 (1997) 502-506.
- [53] Korzun V.: "Use of Molecular Markers in Cereal Breeding", *Cellular and Molecular Biology Letters*, 7 (2003) 811–820.
- [54] Kuznetsova, O.I.; Ash, O.A.; Hartina, G.A.; Gostimskij, S.A.: "RAPD and ISSR Analyses of Regenerated Pea *Pisum sativum* L. Plants", *Russian Journal of Genetics*, 41 (2005) 60–65.
- [55] Laroche, A.; Demeke, T.; Gaudet, D.A.; Puchalski, B.; Frick, M.; McKenzie, R.: "Development of a PCR Marker For Rapid Identification of The Bt-10 Gene For Common Bunt Resistance in Wheat", *Genome*, 43 (2000) 217-223.
- [56] Levanic-Leljok, D.; Bauer, N.; Mihaljevic, S.; Jelaska, S.: "Somatic Embryogenesis in Pumpkin (*Cucurbita pepo* L.): Control of Somatic Embryo Development by Nitrogen Compounds", *J. Plant Physiol.*, 161 (2004) 229–236.
- [57] Li, X.; Yu, X.; Wang, N.; Feng, Q.; Dong, Z.; Liu, L.; Shen, J.; Liu, B.: "Genetic and Epigenetic Instabilities Induced By Tissue Culture in Wild Barley (*Hordeum brevisubulatum* (Trin.) Link)", *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 90 (2007) 153-168.
- [58] Lindsay, J.P.; Lamb, C.J.; Dixon, R.A.: "Microbial Recognition and Activation of Plant Defense Systems", *Trends in Microbiology*, 4 (1993) 181-187.
- [59] Lira-Medeiros, C. F., Parisod, C., Fernandes, R. A., Mata, C. S., Cardoso, M. A., Ferreira, P. C. G.: "Epigenetic Variation in Mangrove Plants Occurring in Contrasting Natural Environment", *Plos One*, 5 (2010) 1-8.

- [60] Lopez-Reyna, G.E.; Simpson, J.; Ruiz-Herrera, J.: “Differences in DNA Methylation Patterns Are Detectable During The Dimorphic Transition of Fungi by Amplification of Restriction Polymorphism”, *Mol. Gene Genet.*, 253 (1997) 703-10.
- [61] Lukens, L.N.; Zhan, S.: “The Plant Genome's Methylation Status and Response To Stress: Implications For Plant Improvement”, *Curr. Opin Plant Biol.*, 10 (2007) 317-322.
- [62] Magdalena, I. T.; Ivelin, Y. P.: “DNA Methylation and Somatic Embryogenesis of Orchardgrass (*Dactylis Glomerata* L.)”, *Bulg. J. Plant Physiol*, 30 (2004) 3-13.
- [63] Maric, S.; Bolaric, S.; Martincic, J.; Pejic, I.; Kozumplik, V.: “Genetic Diversity of Hexaploid Wheat Cultivars Estimated By RAPD Markers, Morphological Traits and Coefficients of Parentage”, *Plant Breeding*, 123 (2004) 366-369.
- [64] Marfil, F. C.; Camadro, L. E.; Masuelli, W. R.: “Phenotypic instability and epigenetic variability in a diploid potato of hybrid origin, *Solanum ruiz-lealii*, *BMC Plant Biology*, 9 (2009) 21.
- [65] Marsalis, M.A.; Goldberg, N.P.: “Leaf, Stem and Stripe Rust Diseases of Wheat”, New Mexico State University, Guide (2006) A-415.
- [66] Martienssen, R. A.; Colot, V.: “DNA Methylation and Epigenetic Inheritance in Plants and Filamentous Fungi”, *Science*, 293 (2001) 1070- 1074.
- [67] Martins-Lopes, P.; Lima-Brito, J.; Gomes, S.; Meirintos, J.; Santos, L.; Guedes-Pinto, H.: “RAPD and ISSR Molecular Markers in *Olea Europaea* L.: Genetic Variability and Molecular Multivar Identification”, *Genetic Resources and Crop Evolution*, 54 (2007) 117-128.

- [68] McClelland, M.; Nelson, M.; Raschke, E.: "Effect of Site-Specific Modification on Restriction Endonucleases and DNA Modification Methyltransferases", *Nucleic Acids Res.*, 22 (1994) 3640-3659.
- [69] Micheli M.R.; Bova R.; Pascale E.; D'Ambrosio E.: "Reproducible DNA Fingerprinting With The Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Method", *Nucleic Acids Res.*, 22 (1994) 1921-1922.
- [70] Milner, M.; Scrimshaw, N.; Wang, D.I.C.: "Protein Resources and Technology", *AVI Publishing*, Westport, USA (1978).
- [71] Motavei, M.I.; A.A. Al-Doss; K.A. Moustafa: "Genetic Diversity Among Selected Wheat Lines Differing In Heat Tolerance Using Molecular Markers", *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 1 (2007) 180-183.
- [72] Nocelli, E.; Giovannini, T.; Bioni, M.; Alicchio, R.: "RFLP- and RAPD- Based Genetic Relationships of Seven Diploid Species of Avena With The A Genome", *Genome*, 42 (1999) 950-959.
- [73] Öz Aydın S.: "RAPD (Rastgele Arttırılmış Polimorfik DNA) Belirleyicileri ve Bitki Sistematiği", *Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, Dumlupınar Üniversitesi, 6 (2004).
- [74] Peredo, E.L.; Revilla, M.A.; Arroyo-Garcia, R.: "Assessment of Genetic and Epigenetic Variation in Hop Plants Regenerated From Sequential Subcultures of Organic Cali", *J. Plant Physiol.*, 163 (2006) 1071-1079.
- [75] Persson, H.A.; Gustavsson, B.A.: "The Extent of Clonality and Genetic Diversity in Lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.) Revealed By RAPDs and Leaf-Shape Analysis", *Molecular Ecology*, 10 (2001) 1385-1397.
- [76] Pillay M.; Kenny S.T.: "Anomalies in Direct Pairwise Comparisons of RAPD Fragments For Genetic Analysis", *Biotechniques*, 19 (1995) 694-698.

- [77] Prakash, A.P.; Kumar, P.P.: “Inhibition of Shoot Induction by 5-azacytidine and 5-aza-20-deoxycytidine in *Petunia* Involves DNA Hypomethylation”, *Plant Cell Rep.*, 16 (1997) 719–724.
- [78] Prakash, P.; Kush, A.; Lakshmanan, P.; Kumar, P. P.: “Cytosine Methylation Occurs in A CDC48 Homologue and A MADS-Box Gene During Adventitious Shoot Induction in *Petunia* Leaf Explants”, *Journal of Experimental Botany*, 54 (2003) 1361-1371.
- [79] Pryor, T.: “The Origin and Structure of Fungal Disease Resistance Genes in Plants”, *TIG*, 6 (1987) 157-161.
- [80] Qin, Y.; Li, H.L.; Guo, Y.D.: “High-Frequency Embryogenesis, Regeneration Of Broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) and Analysis of Genetic Stability by RAPD”, *Sci. Hortic.*, 111 (2007) 203-208.
- [81] Rani, V.; Raina, S.N.: “Genetic Fidelity of Organized Meristem-Derived Micropropagated Plants: A Critical Reappraisal”, *In Vitro Cell Dev. Bio-Plant*, 36 (2000) 319-330.
- [82] Rabouam, C.; Comes, A.M.; Bretagnolle, V.; Humbert, J.F.; Periquet, G.; Bigot, Y.: “Features of DNA Fragments Obtained by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) assays”, *Mol. Ecol.*, 8 (1999) 493-503.
- [83] Reddy, O.U.K.; Pepper, A.E.; Abdurakhmonov, I.; Saha, S.; Jenkins, J.N.; Brooks, T.; Bolek Y.; El-Zik, K.M.: “New Dinucleotide and Trinucleotide Microsatellite Marker Resources for Cotton Genome Research”, *The Journal of Cotton Science*, 5 (2001) 103-113.
- [84] Salmon, A.; Ainouche, M.L.; Wendel, J.F.: “Genetic and Epigenetic Consequences of Recent Hybridization and Polyploidy in *Spartina* (Poaceae)”, *Mol. Ecol.*, 14 (2005) 1163–1175.

- [85] Santos, D.; Fevereiro, P.: “Loss of DNA Methylation Affects Somatic Embryogenesis in *Medicago truncatula*”, *Plant Cell Tis.s Org. Cult.*, 70 (2002) 155-161.
- [86] Schellenbaum, P.; Mohler, V.; Wenzel, G.; Walter, B.: “Variation in DNA Methylation Patterns of Grapevine Somaclones (*Vitis vinifera* L.)”, *BMC Plant Biology*, 8 (2008) 78.
- [87] Semang, K.; Bjørnstad, Å.; Ndjiondjop, M.N.: “An Overview of Molecular Marker Methods For Plants”, *African Journal of Biotechnology*, 5 (2006) 2540-2568.
- [88] Sharma, K. S.; Bryan, G.J.; Winfield, M.O.; Millam, S.: “Stability of Potato (*Solanum tuberosum* L.) Plants Regenerated Via Somatic Embryos, Axillary Bud Proliferated Shoots, Microtubers and True Potato Seeds: A Comparative Phenotypic, Cytogenetic and Molecular Assessment”, *Planta*, 226 (2007) 1449-1458.
- [89] Shoyama, Y.; Zhu, X.X.; Nakai, R.; Shiraishi, S.; Kohda, H.: “Micropropagation of *Panax notoginseng* by Somatic Embryogenesis and RAPD Analysis of Regenerated Plantlets”, *Plant Cell Reports*, 16 (1997) 450-453.
- [90] Singh, R. P.; Rajaram, S.: “Breeding For Disease Resistance in Wheat”, *FAO Corporate Document Repository*, (2002).
- [91] Skroch P.; Nienhuis J.: “Impact of Scoring Error and Reproducibility of RAPD Data on RAPD Based Estimates of Genetic Distance”, *Theor. Appl. Genet.*, 91 (1995) 1086-1091.
- [92] Stojalowski, S.; Goral, H.: “The Use Of RAPD And ISSR Markers For Differentiation of Cms-Lines of Winter Triticale With *T. Timopheevii* Cytoplasm”, *Folia Universitat Agriculturae Stetinensis, Agricultura*, 91 (2002) 161-166.

- [93] Takata, M.; Kishima, Y.; Sano, Y.: "DNA Methylation Polymorphisms in Rice Strains: Detection of Epigenetic Markers", *Breeding Science*, 55 (2005) 57-63.
- [94] Takeda, S.; Paszkowski, J.: "DNA Methylation and Epigenetic Inheritance During Plant Gametogenesis", *Chromosoma*, 115 (2006) 27-35.
- [95] Tanyolaç, B.: "Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) And RAPD Variation Among Wild Barley (*Hordeum. Vulgare* Subsp *Spontaneum*) Populations From West Turkey", *Genetic Resources and Crop Evolution*, 50 (2003) 611-614.
- [96] Temel, A.; Kartal, G.; Gozukirmizi, N.: "Genetic and Epigenetic Variations in Barley Callı Cultures, *Biotechnol. & Biotechnol. Eq.* (2008).
- [97] Tör, M.: "Bitkilerde Moleküler Konukçu-Patojen İlişkilerindeki Son Gelişmeler", *Tr. J. of Biology*, 22 (1998) 271-285.
- [98] Vanyushin, B.F.: "Enzymatic DNA Methylation is An Epigenetic Control For Genetic Function of The Cell", *Russ. J. Biochem.*, 70 (2005) 488-99.
- [99] Venkatachalam, L.; Sreedhar, R.V.; Bhagyalakshmi, N.: "Micropropagation in Banana Using High Levels of Cytokinins Does Not Involve Any Genetic Changes As Revealed by RAPD and ISSR Markers", *Plant Growth Regul.*, 51 (2007) 193-205.
- [100] Wang, Y.; Lin, X.; Dong, B.; Wang Y.; Liu, B.: "DNA Methylation Polymorphism In A Set Of Elite Rice Cultivars and Its Possible Contribution to Intercultivar Differential Gene Expression", *Cellular & Molecular Biology Letters*, 9 (2004) 543-556.
- [101] Welsh, J.; Petersen, C.: "Polymorphisms Generated by Arbitrarily Primed PCR in The Mouse: Application To Strain Identification and Genetic Mapping", *Nucleic Acids Research*, 19 (1991) 303-306.

- [102] Whitkus, R.; Doebley, J.; Wendel, J.F.: "DNA-Based Markers in Plants", *Kluwer Academic Publishers*, Netherlands, (1994).
- [103] Williams, J.G.K.; Kubelik, A.R.; Livak, K.J.; Rafalski, J.A.; Tingey, S.V.: "DNA Polimorphism Amplified By Arbitrary Primers Are Useful As Genetic Markers", *Nucleic Acids Research*, (1990) 6531-6535 (18).
- [104] Wolff K.; Schoen E.D.; Peters-Van Rijn J.: "Optimizing The Generation of Random Amplified Polymorphic DNA in Chrysanthemum", *Theor. Appl. Genet.*, 86 (1993) 1033-1037.
- [105] Xiong, L.Z.; Xu, C.G.; Maroof, M.A.S.; Zhang, Q.: "Patterns of Cytosine Methylation in An Elite Rice Hybrid and Its Parental Lines, Detected By A Methylationsensitive Amplification Polymorphism Technique", *Mol. Gen. Genet.*, 261 (1999) 439-446.
- [106] Xu, M.; Li, X.; Korban, S.S.: "DNA-Methylation Alterations and exchanges During in Vitro Cellular Differentiation in Rose (*Rosa hybrida* L.)", *Theor. Appl. Genet.*, 109 (2004) 899-910.
- [107] Yang X.; Quiros C.: "Identification and Classification of Celery Cultivars With RAPD Markers", *Theor. Appl. Genet.*, 86 (1993) 205-212.
- [108] Yong Z.; ZhaoHui, L.; Cheng, L.; ZuJun, Y.; KeJun, D.; JinHua, P.; JianPing, Z.; GuangRong, L.; ZongXian, T.; ZhengLong, R.: "Analysis of DNA Methylation Variation in Wheat Genetic Background After Alien Chromatin Introduction Based on Methylation-Sensitive Amplification Polymorphism", *Chinese Science Bulletin*, 53 (2008) 58-69.
- [109] Yu, I.; Parker, J.; Bent, A.F.: "Gene-For-Gene Disease Resistance Without The Hypersensitive Response in Arabidopsis dnd1 Mutant", *Plant Biology*, 13 (1998) 7819-7824.

- [110] Zeybek A.; Yiğit F.: “Determination of Virulence Genes Frequencies in Wheat Stripe Rust (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*) Populations During Natural Epidemics in the Regions of Southern Aegean and Western Mediterranean in Turkey”, *Pakistan J.l of Biol. Sci.*, (2004) 7.
- [111] Zhao, X.; Chai, Y.; Liu, B.: “Epigenetic Inheritance and Variation of DNA Methylation Level and Pattern In Maize Intra-Specific Hybrids”, *Plant Science*, 172 (2007) 930–938.
- [112] (<http://www.tugem.gov.tr>, erişim tarihi; 10 Nisan 2009).
- [113] (www.gap.gov.tr, erişim tarihi; 25 Nisan 2009)
- [114] (www.ziraatcim.net, erişim tarihi; 5 Mayıs 2009).
- [115] (<http://faostat.fao.org.>, erişim tarihi; 18 August 2008).
- [116] (<http://www.ziraatci.com/>, erişim tarihi; 6 Mayıs 2009).
- [117] (<http://www.hgca.com>, erişim tarihi; 25 Nisan 2009).
- [118] (<http://www.ipsalatarim.gov.tr>, erişim tarihi; 25 Nisan 2009)
- [119] (<http://www.cabicompendium.org.>, CABI: Crop Protection Compendium, 2005, erişim tarihi; 05 Nisan 2010).
- [120] (yunus.hacettepe.edu.tr/~mergen/derleme/d_epigenetik.pdf, erişim tarihi; 20 Nisan 2010)

ÖZGEÇMİŞ

22 Mart 1985 tarihinde İstanbul'da doğdum. İlk öğrenimimi 1991-1996 yılları arasında Ataköseoğlu İlkokulu'nda ve orta öğrenimimi 1996-1999 yılları arasında Bostancı Ortaokulu'nda tamamladım. Lise öğrenimimi 2003 yılında Hayrullah Kefoğlu Süper Lisesi'nde bitirdikten sonra, 2007 yılında İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden biyolog ünvanı alarak mezun oldum. Aynı yıl içinde Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimime başladım. 2 yıl boyunca TÜBİTAK-MAM Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü'nde bursiyer olarak görev aldım.

BİLİMSEL ÇALIŞMALARIM:

Dilek Tok, Funda Şentürk-Akfırat, Yıldız Aydın, Kadir Akan, Zafer Mert, Necmettin Bolat, Ahu Altinkut-Uncuoğlu: “ Sarı Pas Hastalığına Dayanıklı ve Duyarlı Buğday *Triticum aestivum* L.) Çeşitlerinde DNA Metilasyon Polimorfizminin İncelenmesi”, Türkiye VIII. Tarla Bitkileri Kongresi, 19-22 Ekim 2009, Antakya-Hatay.

Dilek Tok, Funda Senturk-Akfırat , Yıldız Aydın, Necmettin Bolat, Ahu Altinkut-Uncuoğlu: “DNA Methylation Pattern in Turkish Bread Wheat (*Triticum aestivum* L.) Genotypes With CRED-RA Analysis”, 2nd International Symposium on Genomics of Plant Genetic Resources, April24 - April27 2010, Bologna-Italy.