

ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ

DOKTORA TEZİ

EKMEKLİK BUĞDAYDA (*Triticum aestivum* L.) KURAKLIK VE YÜKSEK  
SICAKLIK STRESİNE TOLERANSLILIĞA YÖNELİK MARKÖR GELİŞTİRİLMESİ,  
BU STRES FAKTÖRLERİNİN NİŞASTA BİYOSENTEZ YOLAĞINDA ROL ALAN  
GENLERİN İFADE DÜZEYLERİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Deniz KÖM

Danışman Öğretim Üyesi

Prof. Dr. Serkan URANBEY

Haziran

2017

## ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının; akademik kural ve etik ilkelere bağılı kalınarak hazırlandığını, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgiler için kaynak yayınlara atıfta bulunulmuş olduğunu beyan ederim.

Deniz KÖM

İmzası

## ONAY

Prof. Dr. Serkan URANBEY danışmanlığında Deniz KÖM tarafından hazırlanan bu çalışma 20.06.2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Serkan URANBEY

İmza:

Üye: Prof. Dr. Ali ERGÜL

İmza:

Üye: Prof. Dr. Ş. Şebnem ELLİALTIOĞLU

İmza:

Üye: Doç. Dr. Selma ONARICI

İmza:

Üye: Doç. Dr. Mehmet Cengiz BALOĞLU

İmza

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Aykut ÖZKUL

Enstitü Müdürü

## ÖZET

Doktora Tezi

Ekmeklik Buğdayda (*Triticum aestivum* L.) Kuraklık ve Yüksek Sıcaklık Stresine Toleranslılığa Yönelik Markör Geliştirilmesi, Bu Stres Faktörlerinin Nişasta Biyosentez Yolağında Rol Alan Genlerin İfade Düzeyleri Üzerine Etkileri

Deniz KÖM

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Prof. Dr. Serkan URANBEY

Bu çalışmanın amacı; ekmeklik buğdayda kuraklık ve yüksek sıcaklık stresine toleranslılığa yönelik moleküler markör geliştirilmesi, kuraklık, yüksek sıcaklık ve kuraklık+sıcaklık stres koşulları altında buğdayda nişasta biyosentezinde meydana gelen değişimlerin moleküler düzeyde araştırılmasıdır. Bu amaçla çalışmada, kuraklık ve yüksek sıcaklık stresine toleranslı Zubkov ile bu stres koşullarına hassas olan Atay 85 buğday çeşidi çalışmada kullanılmıştır. Nişasta sentez yolağında AGPaz, nişasta sentez, nişasta dallanma enzimi, dallanma bozucu enzim, amilaz enzimlerinin yanı sıra sukroz mekanizması için önemli bazı genlerin ifade düzeyleri RT-PCR yöntemiyle belirlenmiştir. Stres koşulları altında Atay 85 ve Zubkov çeşitleri arasında önemli nişasta biyosentezi ile ilgili genlerde ifade farklılıkları saptanmıştır. Atay 85 çeşidi kontrol bireylerinde nişasta biyosentezinin yüksek olduğu, ancak tüm test edilen stres koşullarından oldukça olumsuz etkilendiği, Zubkov çeşidinin tüm stres koşullarına daha toleranslı olduğu, nişasta biyosentez mekanizmasında büyük bir gerileme olmadan, fotosentetik aktivitesine devam ettiği görülmüştür. Benzer olarak, total nişasta ve şeker içeriklerinin hassas Atay 85 çeşidinde kıyasla toleranslı Zubkov çeşidinde stresten daha az etkilendiği belirlenmiştir.

Markör geliştirme çalışmalarında kuraklık, sıcaklık, kuraklık+sıcaklık streslerine toleranslılığı ve hassasiyeti temsil edecek ve KASP genotipleme analizlerinde kullanılacak markör geliştirme çalışmaları kapsamında, sıcaklık stresine hassasiyeti temsil eden 1 adet ve sıcaklık stresine toleransı temsil eden 1 adet olmak üzere 2 adet ümit var markör dizisi elde edilmiştir.

Bu çalışma TÜBİTAK 2211-C bursu 1649B031500550 başvuru numarası ve 16H0447001 numaralı Ankara Üniversitesi BAP projesi ile desteklenmiştir.

2017, 150 sayfa

**Anahtar kelimeler:** Buğday, sıcaklık ve kuraklık stresi, nişasta, KASP markör, gen ifadesi

## ABSTRACT

PhD Thesis

Development of Molecular Markers for Identifying Tolerance to Drought and High Temperature Stress on Bread Wheat (*Triticum aestivum* L.) And Effects of The Stress Factors on Starch Biosynthesis Pathway

Deniz KÖM

Ankara University Biotechnology Institute

Prof. Dr. Serkan URANBEY

The purpose of the study is to develop efficient molecular markers for drought, high temperature and both drought+high temperature stresses and to investigate molecular alterations on starch biosynthesis pathway under these stress conditions. . Stress tolerant Zubkov bread wheat variety and a stress sensitive Atay 85 bread wheat variety were used in this study. Expression levels of the genes coding enzymes AGPases, Starch synthases, Starch branching enzymes, Debranching enzymes, Amylases and some important genes involved in sucrose mechanism were determined under stress conditions by qRT-PCR.

Important expression differences of genes involved in starch biosynthesis were detected between tolerant Zubkov variety and sensitive Atay 85 variety. Starch biosynthesis level was higher in control plants of Atay 85 variety and adversely affected by all tested stress conditions. However, Zubkov variety was found to be more tolerant to all stress conditions and continued to exhibit photosynthetically activity without major regression of the starch biosynthesis mechanism. Similarly, total starch and sugar contents were determined to be less affected in the tolerant Zubkov variety compared to Atay 85 variety. It has been found that total starch and sucrose contents were less affected at tolerant Zubkov variety in comparison with Atay 85 variety.

Marker development studies have been carried out for both tolerance and sensitivity against drought, heat and both drought and heat stress conditions. Total two putative markers that can be used in KASP (Kompetitive Allele Specific PCR) genotyping analyzes (one marker sequence representing heat tolerance and one marker sequence representing heat sensitivity)) were obtained.

This study was supported by TÜBİTAK 2211-C scholarship with 1649B031500550 application number, and Ankara University BAP with project number 16H0447001

2017, 150 pages

**Keywords:** Wheat, heat and drought stress, starch, KASP marker, gene expression

## TEŞEKKÜR

Bu zorlu doktora sürecimde her zaman bana destek olan, çalışmalarım konusunda beni destekleyerek merak ettiğim konuları incelememe fırsat tanıyan danışmanım Prof. Dr. Serkan URANBEY'e çok teşekkür ederim.

Tezimin henüz fikir aşamasından başlayarak bu haline gelmesinde çok büyük emeği ve desteği olan, bu süreçte başım her sıkıştığında yardımını esirgemeyen değerli hocam Dr. Güray AKDOĞAN'a büyük bir teşekkür borçluyum. Kendisinin destekleri olmasaydı bu tezi bitirmem mümkün olmazdı.

Yapıcı eleştirileri ve yardımları ile beni yönlendiren tez izleme komitesi üyeleri Prof. Dr. Ali ERGÜL ve Prof. Dr. Şebnem Ellialtıoğlu'na, tezim süresince ihtiyaç duyduğum altyapı ve sarf konusunda desteklerini esirgemeyen Prof. Dr. Mustafa YILDIZ'a, tezimin fizyolojik analizleri kısmında bana yardımcı olan Yard. Doç. Dr. Yakup ÇIKILI'ya çalışmalarım süresince gerek gece boyu, gerekse hafta sonları benimle laboratuvarında kalarak yardımlarını esirgemeyen değerli arkadaşlarım Murat AYCAN, Mustafa KAYAN ve Burak ÖNOL'a, tez çalışmamın başlangıcında bana önerileri ile yardımcı olan Ebru TÜFEKÇİ'ye, tez süresince karşılaştığım zorlukları aşmamda yardımcı olan değerli arkadaşlarım Araş. Gör. Canan ULUSOY ve Ilgın AKPINAR'a, çalışmalarımın yoğunluğundan bunaldığım zamanlarda moral ve enerji desteği olan arkadaşlarım Araş. Gör. Yasin ÖZGEN, Araş. Gör. Dr. Berk BENLİOĞLU ve Araş. Gör. Dr. Uğur ÖZKAN'a, doktora eğitimimi aldığım Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü'ne mensup tüm hocalarıma ve personeline, tezimi tamamlayabilmem için TARBIYOTEK binasını kullanmama izin veren ve sürdürülebilirliğini sağlayan Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü'ndeki bütün hocalarıma ve idari personele teşekkürü bir borç bilirim.

Bu alanda beni en başından beri eğiten, sorularıma yanıt bulmamda her daim yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Selma ONARICI'ya hayat boyu müteşekkir olacağım.

Doktora eğitimimin en zorlu zamanlarında bana hep destek olan kıymetli aileme büyük bir teşekkür borçluyum.

Doktora eğitimimin en başından beri yanımda yer alıp, en zorlu zamanlarımda bana destek olan Şenay BOYACIGİL'e çok teşekkürler.

## İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN .....	i
ÖZET .....	iii
ABSTRACT .....	iv
TEŞEKKÜR .....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xvii
SİMGELER DİZİNİ.....	xix
1. GİRİŞ .....	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	3
2.1. Ekmeklik Buğday ( <i>Triticum aestivum</i> L.) .....	3
2.2. Buğday Nişastası .....	4
2.3. Buğday Tarımında Karşılaşılan Abiyotik Stres Koşulları ve Etkileri .....	11
2.4. Stres Koşullarına Dayanıklılığı Geliştirmek İçin Yapılan Biyoteknolojik Çalışmalar.....	17
2.5. Stres Koşullarına Yönelik Moleküler Çalışmalar, QTL ve MAS .....	18
2.6. SNP Teknolojisi ve Bu Alandaki Gelişmeler .....	20
2.7. KASP Sistemi ve SNP Analizleri.....	22
3. GEREKÇE VE AMAÇ .....	26
4. MATERYAL VE YÖNTEM .....	27

4.1.	Bitki Materyali.....	27
4.2.	DNA İzolasyonu .....	30
4.3.	RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi .....	31
4.4.	Eş Zamanlı PCR Uygulamaları .....	34
4.5.	KASP PCR Uygulamaları .....	38
4.6.	Fizyolojik Analizler.....	41
4.6.1.	Fotosentez Etkinliğinin Belirlenmesi .....	41
4.6.2.	Klorofil Miktar Tayini.....	41
4.6.3.	Prolin Tayini.....	42
4.6.4.	Nişasta ve Şeker Analizleri .....	42
5.	ARAŞTIRMA BULGULARI .....	47
5.1.	Stres Uygulamalarının Etkileri .....	47
5.2.	DNA İzolasyonu .....	47
5.3.	RNA İzolasyonu .....	51
5.4.	RT-PCR Primerleri, Reaksiyon Koşulları .....	52
5.5.	Nişasta Yolağında Yer Alan Genlerin Tane Dokusunda İfade Profilleri .....	53
5.5.1.	AGPaz Gen İfade Profilleri .....	53
5.5.2.	Nişasta Sentaz (Starch Synthase) Grubu .....	57
5.5.3.	Nişasta Dallanma Enzimi (Starch Branching Enzyme) Grubu .....	63
5.5.4.	Dallanma Bozucu Enzim (DBE) Kodlayan Genlerin İfade Değişimleri .....	67
5.5.5.	Amilaz Grubu Enzimleri .....	71



5.5.6.	Sukroz Grubu Enzimleri.....	73
5.6.	Nişasta Yolağında Yer Alan Genlerin Yaprak Dokusunda İfade Profilleri .....	77
5.6.1.	AGPaz Gen İfade Profilleri .....	77
5.6.2.	Nişasta Sentaz (Starch Synthase) Grubu .....	78
5.6.3.	Nişasta Dallanma Enzimi (Starch Branching Enzyme) Grubu .....	81
5.6.4.	Dallanma Bozucu Enzim (DBE) Kodlayan Genlerin İfade Değişimleri .....	81
5.6.5.	Sukroz Grubu Enzimleri.....	83
5.7.	KASP PCR Reaksiyonları .....	85
5.7.1.	KASP Primerleri ve Bağlanma Sıcaklıklarının Belirlenmesi.....	85
5.7.2.	KASP Genotiplleme Analizleri .....	92
5.8.	Fizyolojik Analiz Sonuçları.....	95
5.8.1.	Fotosentez Etkinliğinin Belirlenmesi .....	95
5.8.2.	Klorofil Miktar Tayini Sonuçları .....	98
5.8.3.	Prolin Miktarı Değişimleri .....	100
5.8.4.	Nişasta ve şeker Analizleri .....	100
6.	TARTIşMA VE SONUç.....	106
6.1.	Tartışma .....	106
6.2.	Sonuç .....	123
7.	KAYNAKLAR.....	124
8.	EKLER .....	138
8.1.	EK 1. DNA LADDER .....	138

8.2.	EK 2. RT-PCR Analizlerinde Kullanılan Primerlerin Melting Curve Grafikleri....	139
8.3.	EK 3. KASP Genotipleme Reaksiyonlarında Kullanılan Primerlerin Dizileri.....	142
9.	ÖZGEÇMİŞ .....	146
10.	YAYINLAR.....	147
10.1.	Ulusal Kongreler ve Bilimsel Toplantılarda Sunulan Bildiriler .....	147
10.2.	Uluslararası Kongreler ve Bilimsel Toplantılarda Sunulan Bildiriler .....	149
10.3.	Uluslararası Hakemli Dergilerde Yayımlanan Makaleler.....	150



## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Türkiye’de buğday bitkisinin doğal yayılım alanı .....	3
Şekil 2.2 Buğday tanesinin bileşenleri .....	4
Şekil 2.3 Nişastayı oluşturan amiloz ve amilopektin molekülleri.....	5
Şekil 2.4. Nişasta biyosentezinin aşamaları .....	7
Şekil 2.5. Fotosentetik olmayan hücrelerde nişasta biyosentezi 1.a- Tipik fotosentetik olmayan hücre, 1.b- Tahıl endosperm hücresi, 2- Tahıl endosperminin detaylandırılmış gösterimi.....	7
Şekil 2.6. Nişasta biyosentezinde görev alan enzim grupları.....	9
Şekil 2.7. 1990 -2015 yılları arası Ankara iline ait yağış, sıcaklık ve verim değerleri. Sütunlar Nisan (mavi), Mayıs (mor) ve Haziran (yeşil) ayı toplam yağış miktarı ile bu aylarda sıcak geçen gün sayılarını (kırmızı) göstermektedir. ....	13
Şekil 2.8. Abiyotik stres sinyali reseptörlerce algılanır. İyon kanallarında meydana gelen değişimler ilk uyarıları oluşturur. MAPK, CDPK, ABA gibi mekanizmalar ilk yanıtları oluştururken ikincil yanıtlar transkripsiyon faktörlerince aktive edilir. LEA proteinleri, antioksidan ve ozmolit sentezi gerçekleşir. Bu yanıtlar sonrasında da bitki nihai yanıt oluşturarak ya tolerans gösterir ya da ölüme gider. Xiong ve arkadaşlarından değiştirilerek alınmıştır.....	15
Şekil 2.9. KASP sisteminde hedef organizmadan yüksek saflıkta DNA izolasyonu önemlidir. Reaksiyonda 10-50 ng arası DNA kullanılmaktadır. Her bir SNP için 2 adet allele özel F ve bir adet ortak R olmak üzere 3 adet spesifik primer tasarlanır. Reaksiyon içeriğinde standart PCR reaksiyonlarına ilave olarak FRET belirteç sistemi ve ROX bulunur. Işıma kontrolü için kullanılmaktadır. Ürünün tedarikçisi LGC grup sitesinden alınarak sadeleştirilmiş ve Türkçeleştirilmiştir. ....	23
Şekil 2.10. FRET analizi sonucunda analiz yazılımları verileri X ve Y eksenlerine yayarak incelenen örneklerin genotiplemesini yaparlar. Mavi ve kırmızı yığılmalar homozigot bireyleri	

gösterirken yeşil yığılma ise heterozigot bireyleri gösterir. Gri yığılma ise DNA içermeyen negatif kontrollerdir. Görsel LGC grup sitesinden alınmış ve Türkçeleştirilmiştir .....	24
Şekil 4.1. Atay 85 ve Zubkov çeşitlerine stres uygulamaları. a- 24°C/14 °C kontrol ve kuraklık karışık. b- 36°C/22°C yüksek sıcaklık ve kuraklık + yüksek sıcaklık karışık.....	27
Şekil 4.2 Tez çalışmasında kullanılacak her bitki stres uygulamaları öncesinde seçilmiş ve işaretlenmiştir. ....	28
Şekil 4.3. Stres uygulamalarının 14. gününde çeşitlerin durumlarını gösteren fotoğraf.....	28
Şekil 4.4. Bitkilerden örneklemeler yapılmış ve izolasyon gününe kadar muhafaza edilmiştir. ....	29
Şekil 4.5. DNA izolasyonunda kullanılacak Atay 85, Zubkov çeşitleri ve melez hatların ekimi, vernalizasyonu ve sera koşullarında gelişimi.....	29
Şekil 4.6. Amiloz zincirleri iyodin molekülünü 6'lı helikal yapıda sararak güçlü kompleksler oluşturur. Bu durum mavi renk açığa çıkmasına neden olur.....	45
Şekil 4.7. Amiloz miktar tayini için hazırlanan kör okuma ve standart örneklerin renk farklılıklarını belirtir görsel. B: Kör okuma, 0-40: Hazırlanan standart numunelerin % amiloz içeriklerini göstermektedir. ....	45
Şekil 5.1. İzole edilen DNA numuneleri 1/50 oranında seyreltilip agaroz jel elektroforezinde yürütülerek kalite kontrolü yapılmıştır.....	47
Şekil 5.2. Rastgele seçilen 4 adet RNA örneği agaroz jelde yürütülmüştür. Y: Yaprak, T: Tane DNA Ladder: 50 bç (EK 1). ....	52
Şekil 5.3. Gen ifadesi analizlerinde kullanılan primerlerin agaroz jel elektroforezi görüntüleri, DNA Ladder: 50 bç. ....	52
Şekil 5.4. Nişasta biyosentezinde AGPaz evresi.....	54
Şekil 5.5. Tane dokusunda dönemler arası kontrol bireylerinde <i>AGPaz_L</i> ve <i>APGaz_s</i> genlerinin ifade kıyaslaması.....	55

Şekil 5.6. Atay 85 çeşidinde tane dokusunda <i>AGPaz_L</i> ve <i>AGPaz_s</i> genlerinin stres uygulamaları altında ifadelerini gösterir grafik.....	56
Şekil 5.7. Zubkov çeşidinde tane dokusunda <i>AGPaz_L</i> ve <i>AGPaz_s</i> genlerinin stres uygulamaları altında ifadelerini gösterir grafik.....	56
Şekil 5.8. Nişasta biyosentez yolağında GBSS enzimi .....	57
Şekil 5.9. Nişasta biyosentez yolağında SS (nişasta sentaz) enzim grubu.....	57
Şekil 5.10. Tane dokusunda dönemler arası kontrol bireylerinde <i>GBSSI</i> geninin ifade kıyaslaması.....	58
Şekil 5.11. Atay 85 çeşidi tane dokusunda <i>GBSSI</i> genine özel primerler ile kurulan PCR reaksiyonunun agaroz jel elektroforez görseli. L: 50 bç Ladder, c: kontrol, d: kuraklık, h: sıcaklık, dh: kuraklık+sıcaklık, 7-14-21: örnekleme dönemleri. ....	59
Şekil 5.12. Atay 85 çeşidi tane dokusunda <i>actin</i> genine özel primerler ile kurulan PCR reaksiyonunun agaroz jel elektroforez görseli. L: 50 bç Ladder, c: kontrol, d: kuraklık, h: sıcaklık, dh: kuraklık+sıcaklık, 7-14-21: örnekleme dönemleri. ....	59
Şekil 5.13. Atay 85 ve Zubkov çeşitlerinde tane dokusunda <i>GBSSI</i> geninin stres uygulamaları altında ifadelerini gösterir grafik.....	60
Şekil 5.14. Tane dokusunda dönemler arası kontrol bireylerinde <i>SSI</i> , <i>SSIIaII</i> ve <i>SSIII</i> genlerinin ifade kıyaslaması.....	62
Şekil 5.15. Atay 85 çeşidinde tane dokusunda <i>SSI</i> , <i>SSIIaII</i> ve <i>SSIII</i> genlerinin stres uygulamaları altında ifadelerini gösterir grafik.....	62
Şekil 5.16. Zubkov çeşidinde tane dokusunda <i>SSI</i> , <i>SSIIaII</i> ve <i>SSIII</i> genlerinin stres uygulamaları altında ifadelerini gösterir grafik.....	63
Şekil 5.17. Nişasta biyosentezinde SBE evresi.....	63
Şekil 5.18. Tane dokusunda dönemler arası kontrol bireylerinde <i>SBEIIa</i> ve <i>SBEIIb</i> genlerinin ifade kıyaslaması.....	65

Şekil 5.19. Atay 85 çeşidinde tane dokusunda <i>SBEIIa</i> ve <i>SBEIIb</i> genlerinin stres uygulamaları altında ifadelerini gösterir grafik. ....	66
Şekil 5.20. Zubkov çeşidinde tane dokusunda <i>SBEIIa</i> ve <i>SBEIIb</i> genlerinin stres uygulamaları altında ifadelerini gösterir grafik. ....	66
Şekil 5.21. Nişasta biyosentez yolağında DBE .....	67
Şekil 5.22. Tane dokusunda dönemler arası kontrol bireylerinde <i>IsoI</i> , <i>IsoII</i> , <i>IsoIII</i> ve <i>Pul</i> genlerinin ifade kıyaslaması. ....	69
Şekil 5.23. Atay 85 çeşidinde tane dokusunda <i>IsoI</i> , <i>IsoII</i> , <i>IsoIII</i> ve <i>Pul</i> genlerinin stres uygulamaları altında ifadelerini gösterir grafik. ....	70
Şekil 5.24. Zubkov çeşidinde tane dokusunda <i>IsoI</i> , <i>IsoII</i> , <i>IsoIII</i> ve <i>Pul</i> genlerinin stres uygulamaları altında ifadelerini gösterir grafik. ....	70
Şekil 5.25. Tane dokusunda dönemler arası kontrol bireylerinde <i>AA</i> geninin ifade kıyaslaması. ....	72
Şekil 5.26. Atay 85 ve Zubkov çeşitlerinde tane dokusunda <i>AA</i> geninin stres uygulamaları altında ifadelerini gösterir grafik. ....	72
Şekil 5.27. Tane dokusunda dönemler arası kontrol bireylerinde <i>SucSI</i> , <i>SucSII</i> , <i>SucSc</i> ve <i>SucTII</i> genlerinin ifade kıyaslaması. ....	75
Şekil 5.28. Atay 85 çeşidinde tane dokusunda <i>SucSI</i> , <i>SucSII</i> , <i>SucSc</i> ve <i>SucTII</i> genlerinin stres uygulamaları altında ifadelerini gösterir grafik. ....	76
Şekil 5.29. Zubkov çeşidinde tane dokusunda <i>SucSI</i> , <i>SucSII</i> , <i>SucSc</i> ve <i>SucTII</i> genlerinin stres uygulamaları altında ifadelerini gösterir grafik. ....	76
Şekil 5.30. Yaprak dokusunda Atay 85 ve Zubkov çeşitlerinde <i>AGPaz_L</i> ve <i>AGPaz_s</i> genlerinin ifade kıyaslaması. ....	78
Şekil 5.31. Yaprak dokusunda Atay 85 ve Zubkov çeşitlerinde <i>GBSSII</i> geninin ifade kıyaslaması. ....	80

Şekil 5.32. Yaprak dokusunda Atay 85 ve Zubkov çeşitlerinde <i>SSI</i> , <i>SSIIc</i> , <i>SSIII</i> , <i>SSIIIb</i> ve <i>SSIV</i> genlerinin ifade kıyaslaması.....	80
Şekil 5.33. Yaprak dokusunda Atay 85 ve Zubkov çeşitlerinde <i>SBEIIa</i> genlerinin ifade kıyaslaması.....	81
Şekil 5.34. Yaprak dokusunda Atay 85 ve Zubkov çeşitlerinde <i>IsoI</i> , <i>IsoII</i> , <i>IsoIII</i> ve <i>Pul</i> genlerinin ifade kıyaslaması.....	83
Şekil 5.35. Yaprak dokusunda Atay 85 ve Zubkov çeşitlerinde <i>SucSI</i> , <i>SucSII</i> , <i>SucSc</i> ve <i>SucTI</i> genlerinin ifade kıyaslaması.....	84
Şekil 5.36. Primer setlerine ait PCR ürünleri %2'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülmüştür. DNA ladder: 50 bç . A: Atay 85, Z: Zubkov.....	85
Şekil 5.37. 2 ve 5 numaralı primer setlerine ait %2'lik agaroz jel elektroforezi görüntüsü. Atay: Atay 85, Zubkov: Zubkov, DH: Double haploid çeşitler. 50 bç'lik DNA ladder kullanılmıştır. ....	86
Şekil 5.38. 6, 8 14 ve 16 numaralı primer setlerine ait %2'lik agaroz jel elektroforezi görüntüsü. Atay: Atay 85, Zubkov: Zubkov, DH: Double haploid çeşitler. 50 bç'lik DNA ladder kullanılmıştır. ....	86
Şekil 5.39. 21, 24, 11 ve 3 numaralı primer setlerine ait %2'lik agaroz jel elektroforezi görüntüsü. Atay: Atay 85, Zubkov: Zubkov, DH: Double haploid çeşitler. 50 bç'lik DNA ladder kullanılmıştır. ....	87
Şekil 5.40. 10, 12, 13, 20 numaralı primer setlerine ait %2'lik agaroz jel elektroforezi görüntüsü. Atay: Atay 85, Zubkov: Zubkov, DH: Double haploid çeşitler. 50 bç'lik DNA ladder kullanılmıştır. ....	87
Şekil 5.41. 25, 26, 27, 29 numaralı primer setlerine ait %2'lik agaroz jel elektroforezi görüntüsü. Atay: Atay 85, Zubkov: Zubkov, DH: Double haploid çeşitler. 50 bç'lik DNA ladder kullanılmıştır. ....	88

Şekil 5.42. 30, 31, 32 ve 33 numaralı primer setlerine ait %2'lik agaroz jel elektroforezi görüntüsü. Atay: Atay 85, Zubkov: Zubkov, DH: Double haploid çeşitler. 50 bç'lik DNA ladder kullanılmıştır. ....	88
Şekil 5.43. 34, 35, 36 ve 37 numaralı primer setlerine ait %2'lik agaroz jel elektroforezi görüntüsü. Atay: Atay 85, Zubkov: Zubkov, DH: Double haploid çeşitler. 50 bç'lik DNA ladder kullanılmıştır. ....	89
Şekil 5.44. 38, 39, 40 ve 41 numaralı primer setlerine ait %2'lik agaroz jel elektroforezi görüntüsü. Atay: Atay 85, Zubkov: Zubkov, DH: Double haploid çeşitler. 50 bç'lik DNA ladder kullanılmıştır. ....	89
Şekil 5.45. 2, 5, 6, 8, 14 numaralı primerler ile yapılan touchdown PCR denemesine ait agaroz jel elektroforezi görseli. NTC: Negatif Kontrol, A: Atay 85, Z: Zubkov, DH: Double haploid bireyler. 50 bç'lik DNA ladder kullanılmıştır. ....	90
Şekil 5.46. 26, 27, 29, 33, 35, 36, 37, 38, 39, 41 numaralı primerler ile yapılan touchdown PCR denemesine ait agaroz jel elektroforezi görseli. (+): DNA içeren örnekler, (-): DNA içermeyen örnekler. 50 bç'lik DNA ladder kullanılmıştır. ....	91
Şekil 5.47. 30, 31, 32, 34, 40 numaralı primerler ile yapılan touchdown PCR denemesine ait agaroz jel elektroforezi görseli. (+): DNA içeren örnekler, (-): DNA içermeyen örnekler. 50 bç'lik DNA ladder kullanılmıştır. ....	91
Şekil 5.48. 1-24 primer setinden seçilen 6 primer grubunun KASP analizleri sonucunu gösterir grafik. ....	92
Şekil 5.49. Primer setlerinde Atay 85 ve Zubkov çeşitlerinde yapılan KASP analizi sonucu. 93	
Şekil 5.50. 26 ve 30 numaralı primer setlerinde yapılan KASP analizi sonucunu gösterir grafik. ....	93
Şekil 5.51. 39 Numaralı primer setinde yapılan KASP analizi sonucunu gösterir grafik. ....	94
Şekil 5.52. 39 numaralı primer setinde Atay 85 ve Zubkov çeşitlerinde yapılan analiz sonucunu gösterir grafik. ....	94



Şekil 5.53. 8 ve 21 numaralı primer setleri kullanılarak mevcut tüm çeşitlerde yapılan genotipleme analizinin sonucu. Allelik dağılım haritalarında RR: Dayanıklı homozigot, Rr: Heterozigot, rr: Hassas homozigot çeşitleri ifade etmektedir. ....	95
Şekil 5.54. Çeşitler, dönemler ve uygulamalar arası fotosentez etkinliği değişimlerini gösterir grafik. ....	97
Şekil 5.55. Çeşitler, dönemler ve uygulamalar arası klorofil miktarı değişimlerini gösterir grafik. Değerler SPAD Birimidir. ....	99
Şekil 5.56. 14. gün tohumlarında stres uygulamalarında çeşitler arası ortalama nişasta oranlarını % olarak gösterir grafik. ....	101
Şekil 5.57. Hasat sonrası tohumlarında stres uygulamalarında çeşitler arası ortalama nişasta oranlarını % olarak gösterir grafik. ....	102
Şekil 5.58. Sukroz standartlarından alınan sonuçlarla oluşturulan standart eğri grafiği. ....	102
Şekil 5.59. 14 gün tohumlarında stres uygulamalarında çeşitler arası sukroz analizini gösterir grafik. ....	103
Şekil 5.60. Hasat sonrası tohumlarında stres uygulamalarında çeşitler arası sukroz analizini gösterir grafik. ....	104
Şekil 5.61. Amiloz standartları kullanılarak oluşturulan grafik. ....	104
Şekil 5.62. Kuru numunede tespit edilen amiloz oranını (%) gösterir grafik. ....	105
Şekil 5.63. Tanede tespit edilen amilozun total nişasta miktarına orantılanması ile elde edilen grafik. ....	105
Şekil 6.1. Bitki sıcaklığı ölçümü sonuçları .....	108
Şekil 6.2. Tez çalışması kapsamında incelenen ve nişasta sentezinde yer alan enzimleri kodlayan genlerin ifade değişimlerini gösterir heatmap grafiği. ....	118

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. cDNA sentezi reaksiyon koşulları.....	34
Çizelge 4.2. q-RT PCR reaksiyon koşulları .....	35
Çizelge 4.3. PCR reaksiyon koşulları.....	36
Çizelge 4.4. Nişasta biyosentezinde yer alan genlerin ifade analizlerinde kullanılan primerler .....	37
Çizelge 4.5. RT-PCR reaksiyon karışımı .....	38
Çizelge 4.6. Analizlerde kullanılan RT-PCR reaksiyon koşulları. ....	38
Çizelge 4.7. Kullanılan primer setlerinin temsil ettiği özellikler. ....	39
Çizelge 4.8. KASP reaksiyon karışımı.....	40
Çizelge 4.9. KASP reaksiyonu döngüleri.....	40
Çizelge 4.10. Amiloz tayininde kullanılan standart çözeltilerin hazırlanması.....	44
Çizelge 5.1. Zubkov X Atay 85 melezlerinden elde edilen double haploid bitkilerden DNA izolasyonu sonuçları. ....	48
Çizelge 5.2. Melez bitkilerden DNA izolasyonu sonucu numune miktar ve saflığını gösterir tablo. A: Atay 85, Z: Zubkov çeşitlerini temsil etmektedir. Tablonun devamı bir sonraki sayfadadır. ....	49
Çizelge 5.3. RNA izolasyonu, DNaz uygulaması ve saflaştırma sonrasında numunelerin miktar ve kalite tayinlerini gösterir tablo. A: Atay 85, Z: Zubkov, NS: kontrol, NK: kuraklık, YS: sıcaklık, YK: kuraklık+sıcaklık uygulamasını gösterir. 7-14-21 rakamları örneklemelerin yapıldığı dönemi belirtmektedir. ....	51
Çizelge 5.4. Gen ifadesi analizlerinde kullanılan primer setlerinin isim karşılıkları, PCR ürün boyutunu ve erime sıcaklığını gösterir tablo. ....	53

Çizelge 5.5. Touchdown PCR optimizasyon denemeleri sonucunda her bir gen seti için belirlenen bağlanma ve touchdown başlangıcı sıcaklıklarını gösterir çizelge. ....	92
Çizelge 5.6. Yüksek sıcaklık, kuraklık ve kuraklık+sıcaklık stresinin ekmeklik buğday çeşitlerine ait fotosentez etkinliği değerlerine ilişkin verilerle yapılan varyans analiz tablosu. *: $p<0.05$ ; <i>ns</i> : incelenen özellikler arasındaki farklılıklar önemsiz .....	96
Çizelge 5.7. Yüksek sıcaklık, kuraklık ve yüksek sıcaklık-kuraklık stresinin ekmeklik buğday çeşitlerine ait klorofil miktarına ilişkin verilerle yapılan varyans analiz tablosu. *: $p<0.05$ ; **: $p<0.01$ ; <i>ns</i> : incelenen özellikler arasındaki farklılıklar önemsiz kabul edilmiştir. ....	98
Çizelge 5.8. Stres koşulları altında yetiştirilmiş olan buğday çeşitlerinde prolin aktivitesine ait ortalamalar ile ortalamalar arasındaki farklılıkların önem düzeyi. ....	100

## SİMGELER DİZİNİ

### Simgeler

rpm	Dakikada devir
g	Gram
kg	Kilogram
$\mu$ l	Mikro litre
$\mu$ g	Mikrogram
$\mu$ M	Mikromolar
mg	Miligram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
M	Molar
ng	Nanogram
nm	Nanometre
rxn	Reaksiyon
$^{\circ}$ C	Santigrat derece
G	Yerçekimi kuvvetine karşılık gelen güç
%	Yüzde

## Kısaltmalar

ABA	Absisik asit
AAPK	Absisik asit ile aktif olan protein kinaz
ATP	Adenozin tri fosfat
AGPaz	Adp-glukoz-pirofosfataz
AGPaz_L	Adp-glukoz-pirofosfataz büyük alt birim
AGPaz_s	Adp-glukoz-pirofosfataz küçük alt birim
RFU	Bağlantılı floresans birimi
SSR	Basit dizi tekrarları
bç	Baz çifti
<i>BetA</i>	Betain geni
MCBT	Çoklu çip teknolojisi
DBE	Dallanma bozucu enzim
<i>DRE1</i>	Deeper rooting 1 geni
da	Dekar
DNA	Deoksibonükleik asit
E.coli	Escherichia coli
qRT-PCR	Eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
FRET	Floresans ışımanın rezonansından açığa çıkan enerji transferi
LEA	Geç embriyogenez proteinleri
GBSS	Granül bağlayan nişasta sentez
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hidrojen peroksit
HSP	Isı şoku proteinleri
EST	İfade edilmiş dizi etiketleri
Iso	İzoamilaz
QC	Kalite kontrol

Ca <sup>2+</sup>	Kalsiyum
CAPK	Kalsiyum bağımlı protein kinaz
QTL	Kantitatif özellik lokusu
KASP	Karşılıklı allele özgü polimeraz zincir reaksiyonu
cDNA	Komplementer deoksiribonükleik asit
MnSOD	Manganaz süper oksit dismutaz
MAS	Markör temelli seleksiyon
mRNA	Mesajcı ribonükleik asit
MAPK	Mitojenle bağımlı protein kinaz
SBE	Nişasta dallanma enzimi
SS	Nişasta sentaz
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
P5CS	Prolin-5-karboksilat
PUL	Pullulanaz
RNA	Ribonükleik asit
Rubisco	Rubiloz 1-5 bifosfat
SucS	Sukroz sentez
SucT	Sukroz taşıyıcı enzim
SNP	Tekli nükleotid polimorfizmi
NCBI	Ulusal biyoteknoloji bilişim merkezi
NGS	Yeni nesil dizileme sistemleri

## 1. GİRİŞ

Buğday, buğdaygiller (Poaceae) familyasında yer alan *Triticum* L. cinsine dâhil tek yıllık, otsu, tek çenekli bir bitkidir. Dünyada tahıllar arasında çeltikten sonra insan tüketiminde ikinci sırada yer almaktadır. Çevre koşullarına gösterdiği yüksek adaptasyon yeteneği sayesinde dünya üzerindeki tüm ekili alanların yaklaşık % 16'sını oluşturmaktadır (1). Önemli bir protein, vitamin ve mineral kaynağı olmasının yanı sıra karbonhidrat içeriği ile insanların günlük kalori tüketiminin % 20'sini karşılamaktadır (2). 2014 yılı verilerine göre dünya genelinde yıllık 220 milyon ha ekim alanı ile tahıllar içerisinde birinci; 729 milyon ton üretim ile mısır ve çeltikten sonra üçüncü sırada yer almaktadır. 709 milyon ton üretimi ile diğer tahıllara göre daha geniş ekim alanlarına sahiptir (1). Ülkemizde ise, 2014 yılı verilerine göre, buğdayda 7,8 milyon hektar ekili alan ve buna karşılık olarak 19 milyon ton üretim gerçekleştirilmiştir. Buğday dünyada üretim açısından en önde gelen tahıl türüdür ve Türkiye buğday üretiminde dünyada 10. sırada yer almaktadır (3).

Tahıllarda en hassas büyüme basamakları; kök uzaması, sapa kalkma, tohum oluşması ve embriyoların oluşmasıdır. Embriyo oluşumundan sonra yüksek sıcaklığa maruz kalan bitkilerde tane dolum süresi kısaldığından, nişasta ve protein içeriğinde düşüşler meydana gelmektedir (4). Türkiye' de 2014 yılı yağış oranları 2013 yılına oranla %39 oranında düşüş göstermiştir. Artan kuraklık ve geciken yağışlar nedeniyle ekim alanlarında buğday çıkışı olmadığı, çürümeler olduğu, çıkış gösteren bireylerin zayıf kaldığı ve kuruduğu görülmüştür. Bu durum nedeniyle 2014 yılı buğday verimi 2013 yılına kıyasla %14,3 oranında gerilemiştir (5).

Tarımsal üretimde temel amaç, belli bir girdi kullanarak birim alandan maksimum ürün elde etmektir. Dolayısıyla birim alandan elde edilecek verim, tarımsal faaliyetin en önemli unsurudur. Bitkiler ekimlerinden hasat dönemlerine kadar çok sayıda ve farklı abiyotik ve biyotik strese maruz kalırlar. Karşılaşılan her bir stres faktörü ise verimi farklı şekillerde ve her zaman olumsuz yönde etkiler. Bitki ıslahçılarının temel hedefi, stres faktörlerinin meydana getirdiği bu verim kaybını tolare edebilecek, çeşitli stres faktörlerine karşı toleransı yüksek çeşitler geliştirmektir (6,7).

Buğday ve diğler pek çok tahıl, taneleri için yetiştirilmektedir. Hasat edilen buğday tanesinden elde edilen un yeryüzündeki milyarlarca kişi tarafından tüketilmektedir. Tahıl tanesinin %65-70 oranında nişastadan oluştuğı düşünöldüğünde, hasat edilen temel ürünün nişasta olduğunu söyleyebiliriz. Dolayısıyla strese maruz kalmış bir tahılda meydana gelen verim kaybının en büyük nedeninin tane içerisinde depo edilen nişasta miktarındaki azalış olduğu düşünölebilir.

İnsan ve hayvan beslenmesi için çok büyük önem taşıyan ve dünyada en çok tarımı yapılan bitki olan buğdayın, kuraklık ve yüksek sıcaklık nedeniyle üretimi kısıtlanabilmektedir. Ülkemizde 2007-2009 yılları arasında egemen olmuş olan kurak ve sıcak sezonda buğday üretiminin önemli miktarda düştüğü görölmüşür (5). Yeterli üretim yapılamadığı zaman, ölkemizdeki ihtiyacı karşılayabilmek amacıyla yurt dışından temin yoluna başvurmak kaçınılmaz bir sonuçtur. Artan taleple doğru orantılı olarak son yıllarda buğday üretimimizin yaklaşık %20'sini ithalat yoluyla temin ettiğimiz bilinen bir gerçektir (8). Kuraklık ve yüksek sıcaklık streslerine toleranslı buğday bitkilerini seçmeye olanak sağlayabilecek markörlerin geliştirilmesi ve bunların ıslah çalışmalarına entegre edilmesi anaç bitkilerin seçiminde kullanılması ıslah sürecini kısaltırken başarı şansını da artıracaktır.

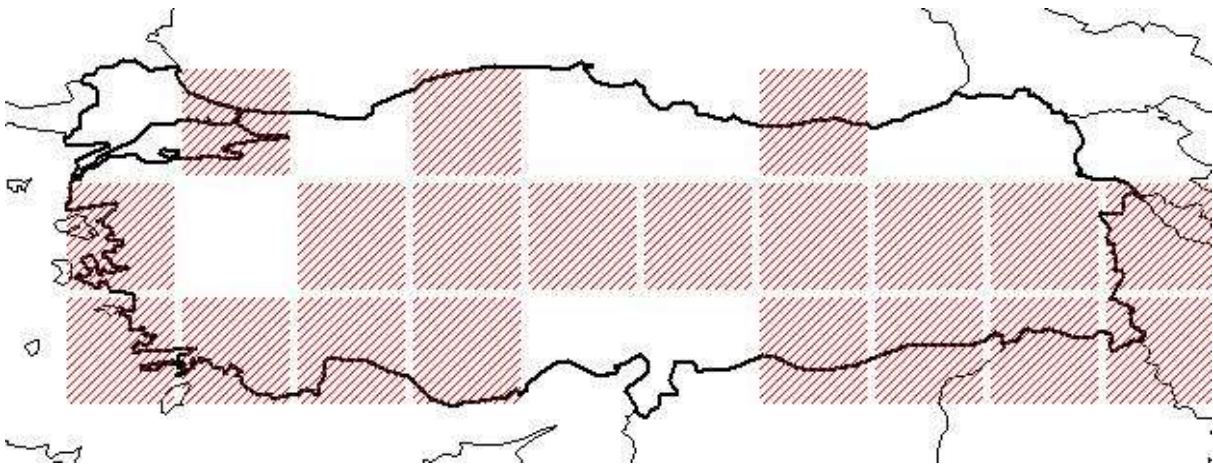


## 2. KURAMSAL TEMELLER

### 2.1. Ekmeklik Buğday (*Triticum aestivum* L.)

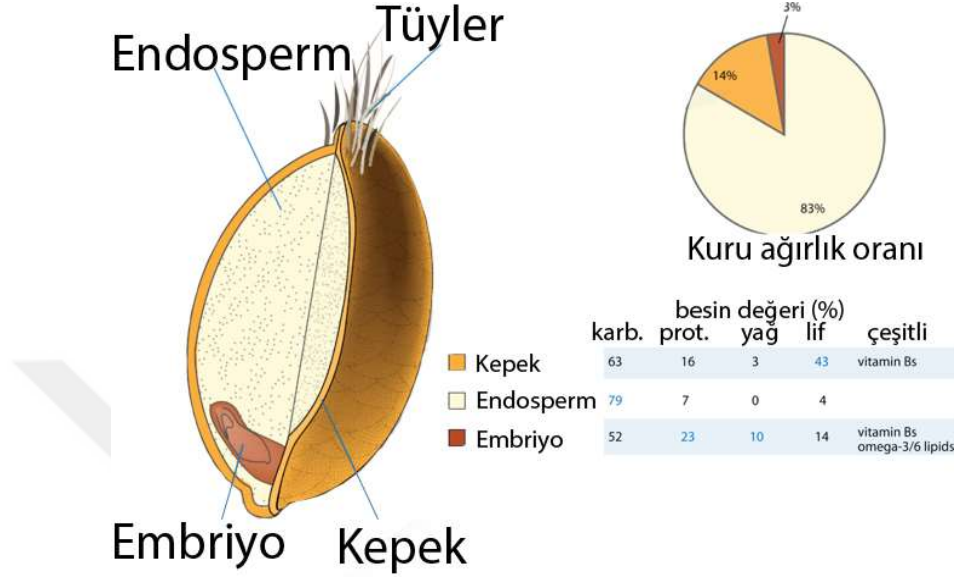
Buğday, Graminae (Poaceae) familyasına isim veren (buğdaygiller), *Triticum* L. cinsine dâhil monokotil (tek çenekli) bir bitkidir. Tek yıllık, otsu bir bitki olan buğday kendi kendini dölleyebilme yeteneğine sahiptir (9). *T. aestivum* L., genom hibridizasyon ve duplikasyonları ile oluşmuş, yüksek tekrarlı dizi içeriğine sahip, heksaploid (AABBDD) bir genoma sahiptir. Türkiye'nin hemen her ekolojik bölgesinde yetişebilme özelliği olan buğday bitkisinin gen merkezi "Verimli Hilal" olarak literatüre geçen Anadolu, Batı İran ve Kafkasya olarak kabul edilir. Tarımsal açıdan en önemli türü *Triticum aestivum* L. (ekmeklik buğday)'dır (10,11). Yaklaşık 8.000 yıl önce tetraploid (AABB) *Triticum dicoccoides* (Körn. ex Asch. & Graebn.) Aarons. ile diploid *Aegilops tauschii* Coss.'nin çaprazlanmasıyla oluşan heksaploid ekmeklik buğday, üç diploid genom (A, B ve D) taşımaktadır. AA genomu *T. urartu* Gand.' dan, BB genomu kesin olmamakla birlikte *Aegilops speltoides* Tausch'in de içinde bulunduğu bir sitopsis bitkisinden, DD genomu ise *A. Tauschii* Coss.'den gelmiştir (2).

Değişen iklim, coğrafya, toprak koşullarında yetiştirilebilmesi nedeniyle ülkemizin neredeyse tamamında tarımı yapılırken, en yaygın görülen doğal yetişme alanı İç Anadolu ve Güney Doğu Anadolu Bölgeleridir. Ülkemizde ağırlıklı olarak floristik dağılımı Şekil 2.1'de A2, A4, A7, B1, B3, B4, B5, B6, B7, B8, B9, B10, C1, C2, C3, C4, C7, C8, C9, C10 grid karelerinde görülmektedir.



Şekil 2.1 Türkiye'de buğday bitkisinin doğal yayılım alanı (12)

Buğday tanesinin fiziksel yapısı Şekil 2.2’ de gösterilmiştir. Kuru ağırlığın %83’ü endosperm, %14’ü kepek, %3’ü ise embriyoya aittir. Buğday tanesinin bileşimi, çeşitlerine ve bölgesel özelliklere göre değişse de ortalama %12 su, %70 karbonhidrat, %12 protein, %2 yağ, %2,2 selüloz, %1,8 kül içermektedir (13).



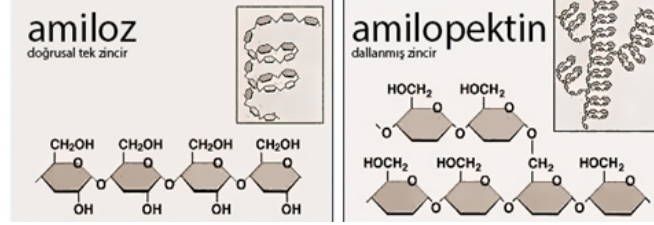
Şekil 2.2 Buğday tanesinin bileşenleri (14)

Türkiye’de buğday ekili alanlar toplam işlenen tarım alanlarının %33’ünü, tahıl ekili alanların ise %68’ini kaplarken bu yüz ölçümü dünyadaki buğday ekili alanların %3,5’ini ifade eder. 2011–2013 yılları arasında ortalama buğday verimi 2740 kg/hektar iken 2014 yılı üretimi bir önceki yıla göre yaklaşık %15 oranında azalarak 2429 kg/hektar olmuştur (13).

## 2.2. Buğday Nişastası

Nişasta, yüksek yapılı (damarlı) bitkilerde fotosentez sonucu üretilen karbon materyallerinin en yaygın depolanma şeklidir (15,16). Dünya’nın tahıllardan nişasta üretimi yıllık yaklaşık olarak 2 milyar tondur. Bu rakamı, 700 milyon ton ile yumrudan ve köklerden üretim takip eder (16). Nişasta piyasasında üretilen nişastanın %90’lık kısmı pirinç, buğday, mısır, arpa, kocadarı gibi tahılların endospermelerinden elde edilir (17). Nişasta, insan günlük kalori ihtiyacının yaklaşık olarak %80’ini karşılar. İnsan ve hayvan beslenmesinde temel olarak tüketilen bir gıda olmakla kalmayıp, yiyecek endüstrisi başta olmak üzere tekstil, plastik, eczacılık, kozmetik, inşaat ve kâğıt endüstrilerinde de geniş kullanım alanı bulur.

Nişasta bitkilerdeki temel doku karbonhidratıdır ve birkaç milyon amilopektin molekülüne eşlik eden, sayıca daha fazla ama çok daha küçük amiloz molekülünden oluşmuş granüller halinde bulunur (Şekil 2.3). Amilopektin (amiloz içermeyen) waxy olarak tabir edilen bitkilerin nişastasından izole edilebilirken, amiloz (amilopektin içermeyen) izole etmek için total nişastayı pullulanaz enzimi ile muamele etmek gerekir.



Şekil 2.3 Nişastayı oluşturan amiloz ve amilopektin molekülleri (18)

Gün ışığında yapraklarda fotosentetik olarak fikse edilen karbondan üretilen nişastanın gece ise mobilizasyonu gerçekleşir (19). Nişasta, amiloz ve amilopektin olmak üzere iki makromolekülden oluşmaktadır. Nişasta sentezi esnasında glikoz üniteleri α(1-4) bağları ile birbirlerine bağlanarak bir zincir meydana getirir. Amiloz genellikle dallanma görülmeyen tek zincirli bir yapıdadır. Buna karşın amilopektin çok yoğun şekilde dallanmış ve çift zincirli bir şekildedir. Nişasta bitki plastitlerinde sentezlenirken geçici (transient) nişasta ve depo (storage/sink) nişasta olmak üzere 2 türü vardır (20). Yapraklar gibi fotosentetik dokularda yer alan kloroplastlar ışık periyodu süresinde geçici nişastayı üretirler ve kısa süreli de olsa depolarlar. Geçici nişasta karanlıkta sukroza çevrilerek bitkinin büyüme ve gelişme süreçlerinde enerji ihtiyacını karşılamak için kullanılır. Depo nişastası ise bitkilerin fotosentetik olmayan kısımlarında yer alan amiloplastlarda üretilir ve nişastanın uzun süreli depolanması için çevrilen şeklidir (20,21).

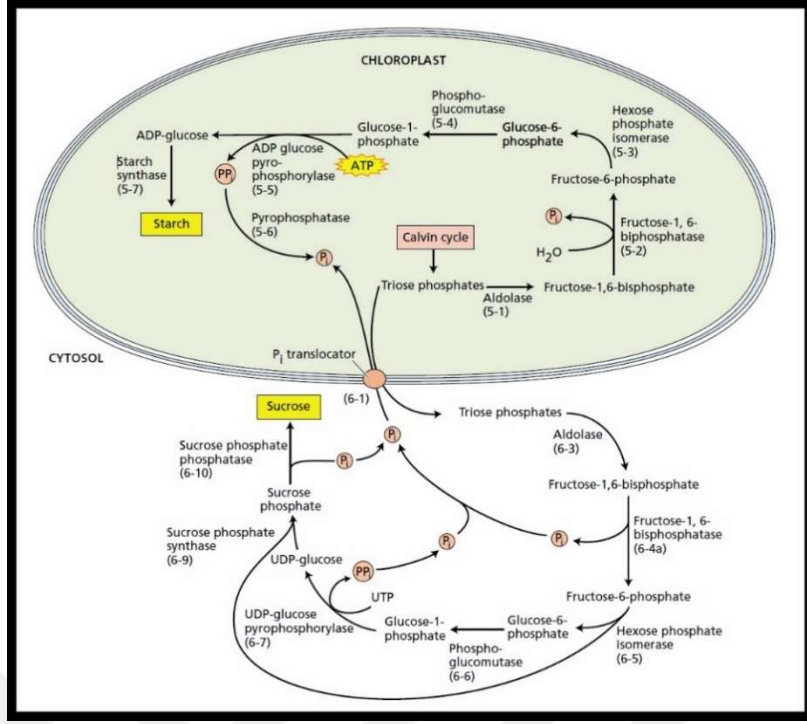
Nişasta, çok sayıda ve farklı enzim grubunun koordinasyonlu bir şekilde çalışması ile hücrelerdeki plastit adı verilen organellerde sentezlenmektedir. Yeşil bitkilerde fotosentez sonucu kloroplastta üretilen glikoz, kısa süreli olarak yine aynı organel (kloroplast) içerisinde nişasta olarak depo edilmektedir. Tane dolum döneminde ise yapraklarda depo edilen bu nişasta parçalanarak sukroza dönüştürülmekte ve sukroz, endosperm hücrelerine gönderilmektedir. Endosperm hücrelerine gelen bu sukroz, çok sayıda enzimatik işlemde sonra endosperm ana hücrelerinde bulunan amiloplastlarda uzun süreli depolama için nişastaya dönüştürülmektedir (15,20).

Nişasta suda, çözünmeyen glukon polimerleri halinde bulunurken, plastitler içerisinde yarı kristal granüler bir hal alır.

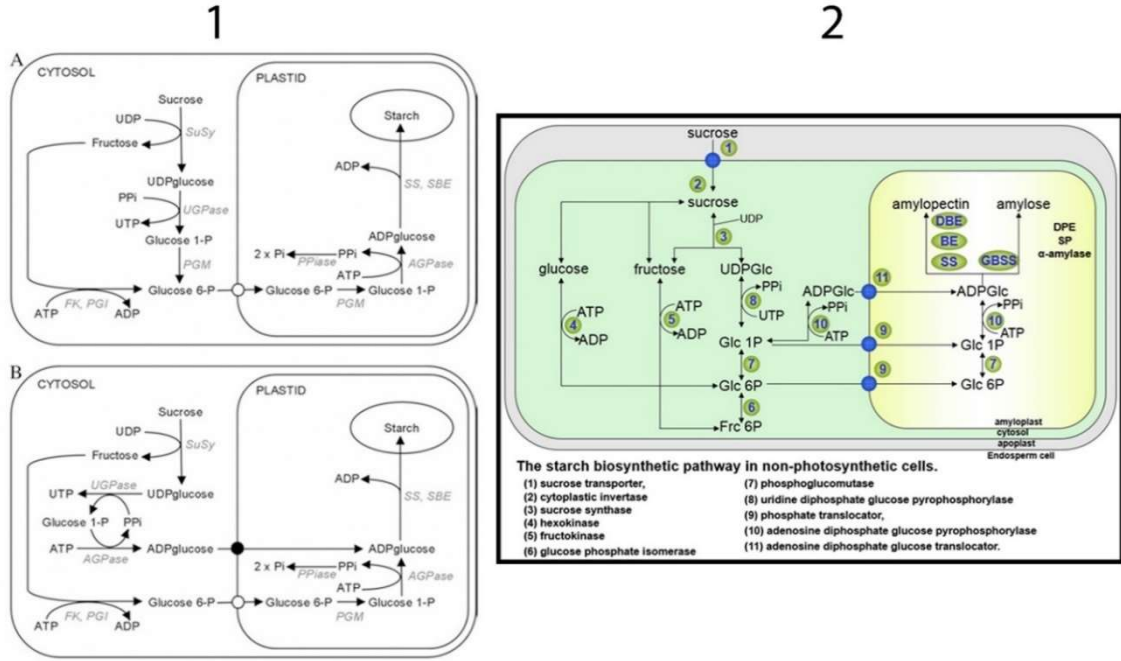
Bitkisel organizmalarda biyosentez yolağı genellikle ortaktır. Fotosentez tepkimesinin son ürünü olan sukroz, nişasta sentezinin ise başlangıç materyalidir. Sitoplazma içerisine gelen sukroz, çeşitli enzimatik reaksiyonlar sonucu Glukoz-1-fosfat'a (G1P) dönüştürölür. Bu tepkimeden sonra ADP-glukoz-pirofosfataz ve pirofosfataz enzimlerinin yürüttüğü tepkimeler ile ADP-glukoz açığa çıkar. Oluşturulan ADP-glukoz nişasta sentezinin ilk adımıdır. Nişasta, 4 enzim sınıfının (AGPaz'lar, SS (nişasta sentaz)lar, SBE (nişasta dallanma enzim)ler, DBE (dallanma bozucu enzim)ler ) katalizlediği reaksiyonlar bütünüünün sonucunda oluşur (15). Calvin döngüsünden çıkan trioz fosfatlar fruktoz-1,6-bifosfat aldolaz enzimi aracılığıyla fruktoz 1,6-bifosfata dönüştürölürler. Bu evrede bir defosforilasyon tepkimesi gerçekleşir ve fruktoz 1,6-bifosfat, 1 adet fosfat kaybederek fruktoz-6-fosfat'a dönüşür. Heksoz fosfat izomeraz enzimi bu yapıyı glukoz-6-fosfat'a çevirir. Fosfoglikomutaz enzimi glukoz-6-fosfat'ı glukoz-1-fosfat'a çevirir. Bu tepkimeden sonra ADP-glukoz-pirofosfataz ve pirofosfataz enzimlerinin yürüttüğü tepkimeler ile ADP-glukoz açığa çıkar. Nişasta sentaz enzimi, ADP-glukoz'u nişastaya çevirir (şekil 2.5)(22).

Bitkiler bu her enzim grubunda birkaç izoenzime sahiptir. Nişasta sentezinde rol oynayan bu izozim genlerinin 14 formu olduğu (2 AGPaz, 5 SS, 3 SBE, 4 DBE) ve bunlardan 13 genin tüm bitkilerde homoloji gösterdiği bildirilmiştir (16,23,24).

Nişasta biyosentezi yaprak gibi yeşil dokularda gerçekleştiği gibi, yeşil olmayan (fotosentetik olmayan) depo organlarda da gerçekleşebilir. Tahılların endosperm dokusunda gerçekleşen nişasta biyosentezinde tipik fotosentetik olmayan hücrelerde gerçekleşen sentez reaksiyonlarından farklı basamaklar mevcuttur. Tahıl endospermelerinde sitozolik tepkime basamaklarına eklenen AGPaz tepkimesi, endosperm nişastasının üretimini mümkün kılar (şekil 2.5) (15,25).



Şekil 2.4. Nişasta biyosentezinin aşamaları (22).



Şekil 2.5. Fotosentetik olmayan hücrelerde nişasta biyosentezi (15,25) 1.a- Tipik fotosentetik olmayan hücre, 1.b- Tahıl endosperm hücresi, 2- Tahıl endosperminin detaylandırılmış gösterimi.

Amiloz, birbirlerine  $\alpha(1-4)$  glikozidik bağlarıyla bağlanan D-glukoz birimlerinden oluşan helikal bir polimerdir. Sıkı paketlenmiş yapısı nedeniyle sindirilmeye karşı daha dirençlidir. Amiloz zincirleri kendi etrafında bir çifte sarmal (Double helix A-B formu) oluşturabildiği gibi kendisini başka bir hidrofobik aracı moleküle bağlayabilir. Bu form V yapısı olarak bilinir ve amilopektinin amilozu nişastaya bağladığı formdur. Amilozun uzun doğrusal zincir yapısı onu amilopektine kıyasla kristallenmeye daha uygun hale getirir. Böylece yüksek amiloz içerikli nişasta sindirilmeye karşı daha dirençli hale gelir. Amilopektinin aksine amiloz soğuk suda çözünebilir değildir. Yüksek amiloz içeriği, aynı miktardaki total nişastada diğerine oranla düşük yayılma potansiyeli ve daha düşük jel gücü sağlar. Bitkilerde enerji depolanması açısından amilopektine kıyasla daha değerlidir. Amiloz, amilopektinden daha zor sindirilir, çünkü amilopektine kıyasla çok daha lineer yapıdadır. Buna karşın daha az yer kaplar. Bu nedenle bitkiler için daha çok tercih edilen bir depolama biçimidir.  $\alpha$ -amilaz enzimi  $\alpha(1-4)$  glikozidik bağını parçalayarak nişastayı maltoz ve maltotrioza indirgeyerek enerji ihtiyacını gidermek amacıyla kullanır. Amiloz önemli bir sertleştirici, su bağlayıcı, emülsiyon stabilizatörü ve jelleştirici ajan olarak kullanılır. Gevşek helikal amiloz zincirleri iç taraflarında yer alan hidrofobik bölge sayesinde lipidler ve aromatik bileşenler gibi diğer hidrofobik bileşenlere bağlanabilir. Kristallendiği zaman stabilite kaybına uğrar. Amiloz miktarı arttığında jel yapışkanlığı düşerken dayanıklılığı artar. Yüksek amiloz içerikli tahıllar ve bunlardan elde edilen nişasta düşük glisemik etkileri sayesinde diyabetikler için daha uygundur (15,26–28).

Amilopektin, nişastanın bitkilerdeki diğer yapı taşıdır. Glukozlar  $\alpha(1-4)$  glikozidik bağlarıyla lineer bir yapı oluştururken, her 24-30 glukoz ünitesinde bir  $\alpha(1\rightarrow6)$  bağlarıyla dallanma meydana gelir. Bu yapı pek çok uç noktası olan, enzimlerin kolaylıkla bağlanabileceği, kolay çözünebilir bir oluşum halini alır. Amilozla kıyasla daha kolay hidrolize olur, daha az yoğundur ve çözünebilir. Hayvan hücrelerindeki karşılığı glikojendir, glikojen her 8-12 glukozda bir dallanma yapar (23,29).

Nişasta biyosentezinde endospermde 4 gen grubunun aktivite biçimleri belirlenmiştir (30).

Grup 1 genleri, tane yapılanmasının çok erken evrelerinde ifade olur ve yapısal hücre mekanizmalarında rol aldıkları düşünülmektedir.

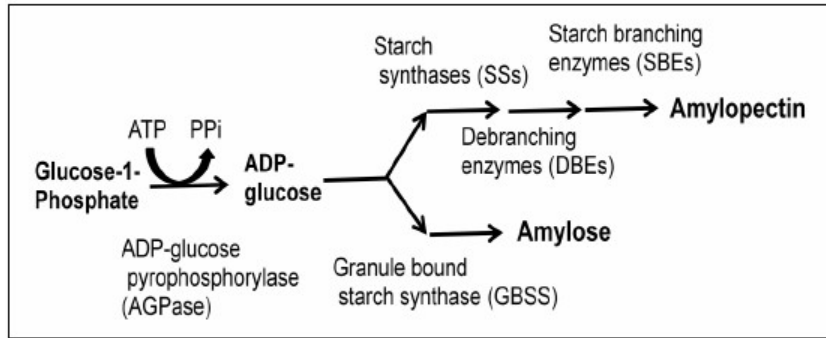
Grup 2 genleri, endosperm gelişimi sırasında yüksek aktivite göstermektedir.

Grup 3 genleri, başlangıçta ifade düzeyi çok düşük olmasına rağmen endospermde nişasta sentezinin başlamasıyla beraber çok yüksek miktarda ifade olunur. Endospermde nişasta sentezinde temel görevler aldıkları düşünülmektedir.

Grup 4 genleri, çok düşük miktarlarda ifade olurlar. Genel olarak tane gelişiminin başlangıcında görev alırlarken, perikarpıda nişasta senteziyle ilgili oldukları da düşünülmektedir.

Amiloz, AGPaz ve GBSS ile sentez edilirken; amilopektin ise AGPaz (ADPGP), çözülebilir nişasta sentaz (Soluble starch synthase - SSS), nişasta dallanma enzimi (Starch branching enzyme - SBE) ve dallanma bozucu enzim (Starch debranching enzyme - DBE) gruplarının koordineli reaksiyonlarıyla üretilir. Disproportioning enzimi (DISP) ve fosforilaz genellikle nişasta yıkımıyla alakalı olsa da henüz kesinleşmemekle birlikte bazı çalışmalarda çok hassas yapım mekanizmalarında da görev alabileceği belirtilmiştir (31).

Amiloplastlarda nişasta biyosentezi için son derece karmaşık ve organize enzim gruplarının faaliyetleri gereklidir. Bu büyük enzim gruplarının çeşitli izoformları mevcuttur. Bitkilerde adenozin 5' difosfat glukoz pirofosforilaz (AGPaz), nişasta sentaz (starch synthase - SS), nişasta dallanma enzimi (starch branching enzyme - SBE) ve dallanma bozucu enzim (starch debranching enzyme - DBE) olmak üzere 4 ana grup enzim nişasta biyosentezine katılır. Bu enzim grupları nişasta üreten organellerin tamamında çeşitli izoformlar şeklinde bulunmaktadır (32). Ana enzim gruplarının katıldığı nişasta biyosentezi temsili olarak Şekil 2.6' da verilmiştir.



Şekil 2.6. Nişasta biyosentezinde görev alan enzim grupları (31).

AGPaz (ADPGP) yüksek bitkilerde geçici ve depo nişastası biyosentezinde  $\alpha$ -glukan zincirlerinin uzamasıyla alakalı değişik nişasta sentaz (SS) enzimleri için bir prekürsör ve glikozil donörü olarak görev alır (33). ADP-Glukoz, ADPGP aktivitesi tarafından glukoz-1-fosfat (G-1-P) ve adenzin trifosfat (ATP) kullanılarak üretilir.



AGPaz, yüksek bitkilerin nişasta sentezleyen bütün dokularında bulunur. 2 alt üniteden (küçük; AGPaz\_s ve büyük; AGPaz\_L) oluşan heterotetramerik bir yapıdır. Buğdayın gelişen endospermde sırasıyla 55 ve 58 kDa büyüklüktedir (34). AGPaz enzimi tahıllarda genellikle sitozolde (sitoplazmada) bulunur; örneğin buğday endospermde AGPaz aktivitesinin % 60-70’lik kısmı sitozoliktir (34,35).

Nişasta sentaz (SS) enzimleri, ADP-glukoz yapısındaki glukoz parçasının  $\alpha(1-4)$  bağlı glukan öncüsünün indirgenmeyen ucuna bağlanmasını katalizler. Bütün nişasta biyosentez enzim aileleri içerisinde SS grubu en çok izoforma sahip gruptur (36). SS grubu temel olarak 2 ana gruba ayrılır. Bu gruplardan bir tanesi *Waxy* (*Wx*) geni tarafından kodlanan GBSS’dir ve amiloz biyosentezinde görev alırken, diğer grup SS ailesi SSI, SSII, SSIII ve SSIV olmak üzere 4 ana gruba ayrılır ve amilopektin biyosentezinde görev alır (37–39).

GBSS enziminin, GBSSI ve GBSSII olmak üzere 2 izoformu vardır. Her ikisi de yalnızca nişasta biyosentezinde görev alan dokuların granül matrisinde yer alır. GBSSI depo dokularda amilozun uzatılmasında görev alırken, GBSSII aynı görevi meyve kabuğu, yaprak, gövde ve kökte sürdürür (32,40). Amiloz üretimi eksikliğinde waxy olarak tabir edilen nişasta açığa çıkar (32,41).

SSI, 10 kadar glukozilleri birbirine bağlayarak kısa glukan zincirlerin oluşturulmasından sorumludur. SSI total SS aktivitesinin %70’inden sorumludur (42). SSI’ in aktivitesi tozlaşmayı takip eden 5-10 günlük süreçte en yüksek seviyededir. İlerleyen dönemlerde endospermdeki ifade düşer (43). SSI’ in dokudaki fazla birikimi nişasta granülü yapısında bir değişikliğe neden olmaz. Tek görevi kısa glukan zinciri oluşturmaktır.

SSII enziminin, SSIIa ve SSIIb olmak üzere 2 formu vardır. SSIIa tahıl endospermde yoğun görülürken SSIIb fotosentetik dokularda işlev görür (44). SSII orta uzunluktaki zincir oluşumunda görev alır. SSI’den oluşan kısa zinciri uzatır. En yüksek aktivitesi tozlaşmayı



takiben 12.-25. günler arasındadır (45). *SSIIa* ifadesi düşük olan genotiplerde amilopektin üretiminin %20'nin altına düştüğü görülmüştür (46).

SSIII geçici nişasta oluşumunda yer alan en önemli enzimdir (32). *SSIII* ifadesi endosperm oluşumunun en başından orta evresine kadar olan süreçte yapraklarda, tozlaşma öncesi çiçek durumunda gözlemlenmiştir (47).

SSIV sadece plastitlerin stromasında yer alır (48,49). SSIV' ün görevi tam olarak kesin olmamakla birlikte nişasta granül yapısının başlangıcı olabileceği düşünülmektedir (49). Buğday *SSIV* cDNA sekansı çeltik *SSIV*'e çok fazla benzerlik göstermektedir. Bu durum yapraklarda ve endospermde birden fazla SSIV izoformu olabileceğine işaret etmektedir (48).

SBE, amilopektin'in dallanmasında yapısal düzenlemenin sorumlusu olan enzim grubudur. Bu enzimler  $\alpha(1-4)$  glikozidik bağlarının kıvrım noktalarına  $\alpha(1-6)$  bağlantılarını oluşturur. Diğer nişasta biyosentez enzim aileleri gibi SBE'ler de SBEI, SBEII, SBEIIa gibi izoformlara sahiptir ve bu izoformlar bitkiye, dokuya ve gelişimsel döneme spesifik türlerdir (50,51). SBEI ve SBEII farklı uzunluklarda glukoz zincirleri meydana getirirler. SBEI amiloz ile çok daha fazla dallanma kapasitesi gösterip daha uzun zincirler oluştururken, SBEII amilopektine afinite gösterir (52,53). SBEI bitkilerde yüksek oranda korunmuştur (54). Monokotlarda iki SBEII gen ürünü (*SBEIIa* ve *SBEIIb*) yakından ilişkilidir (55), ancak buğday endospermde *SBEIIa*, *SBEIIb*'ye kıyasla çok daha fazla ifade olur (50).

DBE amilopektin kristallerinin oluşumunda önemli rol oynar. 2 ana tip DBE vardır. İzoamilaz (Iso1, Iso2, Iso3) ve Pullulanaz. Bu enzimler amilopektinin  $\alpha(1-6)$  bağlantılarını hidrolize ederek yapının formasyonunu değiştirir.

DISP, dallanmamış malto oligosakkaritlerinin  $\alpha(1-4)$  bağlantılarının hidrolizini katalizler.

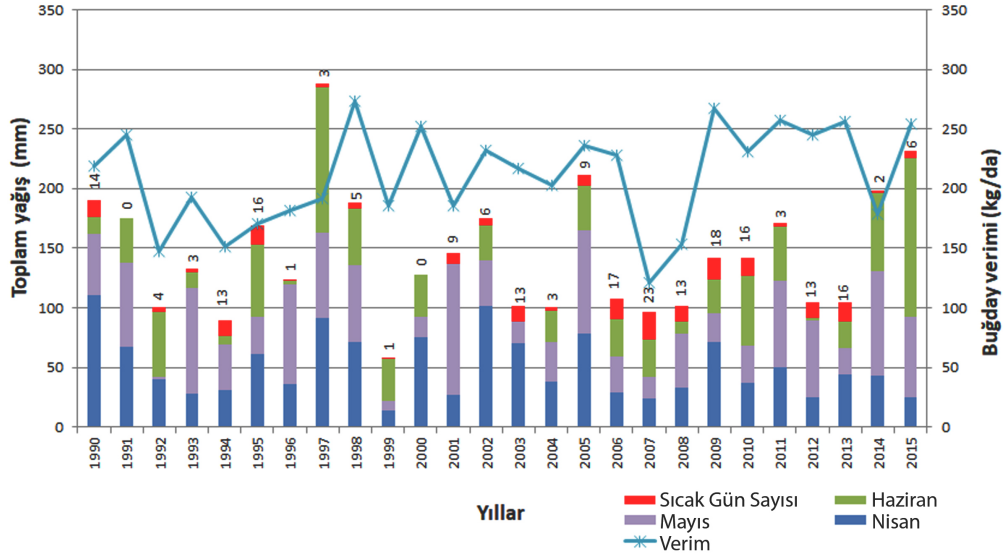
### **2.3. Buğday Tarımında Karşılaşılan Abiyotik Stres Koşulları ve Etkileri**

Dünyadaki ekmeklik buğday verimi ve ürün kalitesi iklim koşullarına bağlı olarak yıldan yıla önemli farklılıklar göstermektedir. Bu farklılığın ortaya çıkışında çeşidin genetik yapısı, iklim koşulları, toprak yapısı, topraktaki azot miktarı ve azotun kullanılabilirliği ile uygulanan yetiştirme teknikleri büyük rol oynamaktadır. Verim ve kaliteyi etkileyen, bitkide metabolizmayı, büyüme ve gelişmeyi engelleyen uygun olmayan herhangi bir durum veya

madde stres olarak kabul edilir ve bitki toleransı ile yakından ilişkilidir. İklim koşullarına bağlı olarak ortaya çıkan kuraklık, yüksek sıcaklık gibi stres faktörleri bitkilerdeki tüm metabolizmayı olumsuz yönde etkilemektedir.

Dünyadaki ekili alanların stres faktörlerine göre sınıflandırılması yapıldığında; %29 sıcaklık, %26 kuraklık, %10 mineral kirliliği, %15 soğuk/don koşullarına maruz kaldığı, sadece %10'luk bir kısmının stressiz kabul edildiği görülmektedir (56,57).

İnsan ve hayvan beslenmesi için çok büyük önem taşıyan ve dünyada en çok tarımı yapılan bitki olan buğdayın kuraklık ve yüksek sıcaklık nedeniyle üretimi kısıtlanabilmektedir. Abiyotik stres koşulları nedeniyle dünya genelinde tarım ürünlerinin veriminde %50'den fazla kayıp görülebilmektedir (6). Şekil 2.7'de ülkemizde önemli buğday ekim alanına sahip Ankara ilinin 1990 – 2015 yılları arasındaki buğday verimi ile buğday bitkisinin generatif dönemindeki toplam yağış miktarı ile sıcak geçen (>30°C) gün sayıları verilmiştir. Şekilden rahatlıkla görülebileceği üzere buğday verimi yıldan yıla çok büyük farklılıklar göstermiştir ve bu farklılığın en önemli nedeninin de generatif dönemde aldığı yağış miktarından kaynaklandığıdır. Kuraklıkla birlikte zaman zaman meydana gelen yüksek sıcaklıklar verim üzerine çok daha fazla olumsuz etki yapmaktadır. Ülkemizde 2007-2009 yılları arasında egemen olmuş olan kuraklık ile birlikte oluşan yüksek sıcaklık buğday-verimini önemli miktarda düşüğü görülmüştür (5). Yeterli üretim yapılamadığı zaman, ülkemizde sürdürülebilirliği sağlamak adına yurt dışından temin yoluna başvurmak kaçınılmaz bir sonuçtur. Artan taleple doğru orantılı olarak son yıllarda buğday ihtiyacımızın yaklaşık %20'sini ithalat yoluyla temin ettiğimiz bilinen bir gerçektir (8).



Şekil 2.7. 1990 -2015 yılları arası Ankara iline ait yağış, sıcaklık ve verim değerleri (1,58). Sütunlar Nisan (mavi), Mayıs (mor) ve Haziran (yeşil) ayı toplam yağış miktarı ile bu aylarda sıcak geçen gün sayılarını (kırmızı) göstermektedir.

Kuraklık, yüksek sıcaklık, don, tuzluluk ve ağır metaller gibi stres faktörlerine maruz kalan bitkilerde büyüme ve gelişme kısıtlanırken, verimde de önemli kayıplar görülmektedir (59). Bu stres faktörleri hücrede ozmotik ve iyonik dengenin bozulması, yapısal ve işlevsel proteinlerde deformasyon ve membran yapısında hasarlara neden olur. Bitki hücresi buna yanıt olarak bozulan hücre içi dengeyi düzeltmeye, membran hasarlarını onarmaya çalışır. Hücreler, bozulan, miktarı değişen protein ve enzimlerin miktarlarını dengeleyebilmek için gen ifadesini değiştirir (60).

Buğday bitkisinde en hassas büyüme basamakları kök uzaması, eşey hücrelerinin oluşumu ve tohum dolumu dönemleridir. Embriyo oluşumundan sonra yüksek sıcaklığa maruz kalan bitkilerde tane dolum süresi kısalmıştır. Bunun sonucu tane ağırlığı ve kalitesi düşer.

Abiyotik stres uyarılarının algılanması ve stres iletimi bitkilerde çeşitli yanıtlara neden olur. Kuraklık stresinde bitki su kaybını engellemek için stomalarını kapatarak fotosentez oranını düşürür. Sıcaklık yükseldiğinde hücre içi protein yapısı bozulur, bitki ölüm sinyali verir ama öncesinde tohum verebilmek adına yaşam döngüsünü kısaltır. Tuz stresinde hücre içerisinde etkilendiği minerale bağlı olarak sodyum, magnezyum ya da potasyum iyonu oranı ölümcül

düzeyde yükselir. Bitki bu durumu tolare edebilmek adına mümkün olduğunca fazla su tüketmeye çalışır.

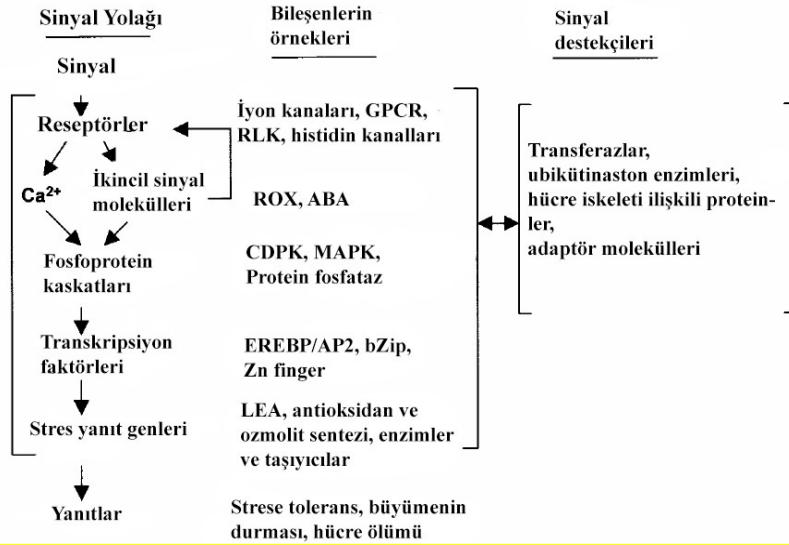
Bitkilerde stresin algılanması ve yanıt oluşumunda çeşitli mekanizmalar mevcuttur. Stres koşullarına karşı yanıt genleri genel olarak erken yanıt ve geç yanıt olmak üzere iki grupta incelenebilir. Erken yanıt genleri stresin algılandığı anda indüklenir ve etkisi kısa sürelidir. Çoğu transkripsiyon faktörü, kinazlar ve fosfolipazlar bu grupta yer alırlar ve geç yanıt genlerini de aktive ederler. Bu genlerin aktive olması için protein sentezi gerekmemektedir. İfadeyi başlatacak bileşikler her daim hazır olarak bulunmaktadır. Geç yanıt genleri su geçişi ile ilgili kanal proteinleri, ozmotik koruyucuların (prolin, sukroz vb.) sentezinde görev alan enzimler, LEA proteinleri, şaperonlar, detoksifikasyon enzimleridir (61). Bunlardan  $Ca^{+2}$  bağımlı kinazlar (CDPK)(62), mitojenle aktif olan protein kinazlar (MAPK) (63), fosfolipidler (64) ve fosfatazlar (65) en yaygın görülenlerdir. Ayrıca ABA tarafından aktive edilen protein kinaz (AAPK) yapıları da mevcuttur (22). Bu sistem stoma hücrelerinde S tipi anyonların ABA aktivasyonu için gereklidir. Bu enzim  $Ca^{+2}$  bağımsız kinazların her iki formundan köken alan bir otofosforilasyon sistemidir.

Bitkilerde  $Ca^{+2}$ , abiyotik stres altında sinyal iletiminde ikincil mesajcı olarak görev alır. Hücre içi  $Ca^{+2}$  seviyesi stresin tipine, şiddetine, daha önceden maruz kalınan streslere ve doku tipine göre değişiklik gösterebilir. Stres altında aktif olan CDPK'lar hücre bölünmesinin düzenlenmesinde, strese karşı transkripsiyonal ya da translasyon sonrası düzenlemelerin gerçekleşmesinde görev alırken, fosfoproteinlere  $Ca^{+2}$  sinyali ulaştığında geç embriyogenez (LEA) proteinlerini şifreleyen genlerin ifadesini düzenleyen transkripsiyon faktörlerini aktif hale getirir (66). LEA proteinleri ile su kaybının minimal seviyede gerçekleşmesi sağlanırken, protein ve zar sistemlerinin sürekliliğinin korunması, iyon geçişlerinin dengelenmesi ve reaktif oksijenlerin indirgenmesi sağlanır (61).

MAPK mekanizması stres koşulları altında ozmolit ve antioksidanlar üreterek hücre yapısını korumaya yönelik çalışır. MAPK sistemi kuraklık, sıcaklık ve diğer abiyotik stresler ile karşılaşıldığında transkripsiyon faktörlerinin fosforilasyonunu gerçekleştirir. Bu işlemin sonucu olarak stres koşullarına yanıt verecek genlerin ifadesi artar. Aktif olan ya da ifadesi olan genlerin ürünü olan antioksidanlar ya da ozmolitler (prolin, glisin, artan sukroz miktarı vs.) strese yanıt olarak üretilir. Prolin, serbest radikallerin uzaklaştırılmasında ve membran

bütünlüğünün korunmasında görev alırken, glisin hücredeki protein ve enzimlerin yapısını koruma görevini üstlenir. Hücre içi sukroz miktarının yükseltilmesi ile hücre içi artan basınç dengelenir (67–70).

Bitki stres ile karşılaştığında ortaya çıkan değişiklikler, devreye giren sinyal mekanizmaları, etkileri ve sonuçları şekil 2.8’deki grafikte gösterilmiştir.



Şekil 2.8. Abiyotik stres sinyali reseptörlerce algılanır. İyon kanallarında meydana gelen değişimler ilk uyarıları oluşturur. MAPK, CDPK, ABA gibi mekanizmalar ilk yanıtları oluştururken ikincil yanıtlar transkripsiyon faktörlerince aktive edilir. LEA proteinleri, antioksidan ve ozmolit sentezi gerçekleşir. Bu yanıtlar sonrasında da bitki nihai yanıtı oluşturarak ya tolerans gösterir ya da ölüme gider. Xiong ve arkadaşlarından (66) değiştirilerek alınmıştır.

Kuraklık stresi; su içeriğinin azalması, yaprak su potansiyelinin kısıtlanması ve turgor kaybı, stoma kapanması, hücre büyüme ve gelişmesinin azalmasıyla karakterize edilmektedir. Kuraklık stresi altında bitkilerde yaprak nispi nemi ve su potansiyeli azalır. Arabidopsis, domates ve çeltikte yapılan çalışmalar rubisco (rubiloz 1-5 bifosfat) enziminin küçük alt biriminin kuraklık stresinden etkilendiği ve bu nedenle sentez reaksiyonlarının indirgeniği gözlemlenmiştir (71). Kuraklık stresine karşı dayanıksız buğday çeşitleri ile yapılan güncel bir çalışmada rubisco enziminin büyük alt biriminin sentezinin stres koşulu altında %70'e varan oranda düşüş gösterdiği gözlemlenmiştir (72). Türkiye' de 2014 yılı yağış oranları 2013 yılına

oranla %39 oranında düşüş göstermiştir. Artan kuraklık ve geciken yağışlar nedeniyle ekim alanlarında buğday çıkışı olmadığı, çürümeler olduğu, çıkış gösteren bireylerin zayıf kaldığı ve kuruduğu görülmüştür. Bu durum nedeniyle 2014 yılı buğday verimi 2013 yılına kıyasla %14,3 oranında gerilemiştir (5).

Sıcaklık stresi, ortam sıcaklığının belirli bir süre boyunca bitki büyüme ve gelişiminde geri dönüşümsüz zararlara neden olan eşik seviyesinin üzerine çıkması olarak tanımlanır. Normal sıcaklık değerlerinin üzerinde bir strese maruz kalan bitkide hücrede protein denatürasyonunun gerçekleşmesi, zar akışkanlığının bozulması, enzim formasyonu ve işlevinin bozulması söz konusu olmaktadır. Sıcaklık stresi ile artan hücre içi reaktif oksijen türevleri ile H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reaksiyonlara girerek oksidatif strese yol açar. Kloroplast tilakoid membranları sıcaklık stresine oldukça hassastır. Ortam sıcaklığının artması yapısını bozarak fotosentez miktarını azaltmaktadır. Bu durum sonucunda fotofosforilasyon da engellenmekte, ATP miktarı düşmektedir (61). Bitkiler sıcaklık stresi ile baş edebilmek için sıcaklık stresinde görev alan ve stresin etkisiyle aktive olan moleküler şaperonlar içerir. Bu yapıya ısı şoku proteinleri (Heat Shock Protein – HSP) adı da verilir. Isı şoku altında sentezleri azalan diğer proteinlerin durumunu düzeltmek amacıyla bu proteinler sentezlenir ve bir noktaya kadar hücre içi savunma mekanizması olarak görev alır (6,22). Buğdayda nişasta biyosentezi çevresel koşullardan önemli derecede etkilenir. Hava sıcaklığında gerçekleşecek 5°C'lik bir artış, bazı buğday varyetelerinde nişasta veriminde %10-15 oranlarında düşüğe neden olabilmektedir. Bunun başlıca nedeni, bazı nişasta enzimlerinin 20°C'nin üzerindeki sıcaklıklara hassas olmasıdır (16).

Her iki stres koşulunun kombinasyonunda bitki için hücresel düzeyde ozmotik ve oksidatif stres görülmektedir (73). Yüksek sıcaklık ve kuraklık stresinin kombine uygulandığı bitkilerde klorofil içeriğinin, ayrı ayrı uygulanan numunelere kıyasla tane gelişimi tamamlanmadan yok olduğu, fotosentez hızının stresi takiben 3. hafta içerisinde durmaya yakın olduğu, tane ağırlığının ve miktarının kontrol şartlarında yetişen bitkilere kıyasla %80'lere varan oranlarda düşüş gösterdiği gözlemlenmiştir (74).

## 2.4. Stres Koşullarına Dayanıklılığı Geliştirmek İçin Yapılan Biyoteknolojik Çalışmalar

Biyotik ve abiyotik stres koşullarının etkilerini tolare edebilen bitkiler elde edebilmek amacıyla biyoteknolojik çalışmalar yapılmaktadır. Gen aktarımı ve modifikasyonu çalışmalarının başladığı 1980'lerden itibaren bu çalışmalara ağırlık verildiği görülmektedir. Son yıllarda yapılan ve dikkat çeken bir takım çalışmalar mevcuttur. İklim değişikliğinin hızlanması tüm dünyada bu konuda yapılan çalışmaların büyük önem kazanmasına neden olmuştur.

Buğdayda önemli kayıplara neden olan *Fusarium graminearum* zararlısına karşılık turpgillerden *defensin* geni izole edilmiş ve buğdaya aktarılmıştır (75). Elde edilen transgenik buğdayların bu zararlıdan etkilenmediği görülmüştür.

Glisin betain sentezinde *betA* geni modifikasyonu ile buğdaya tuzluluk toleransı kazandırılmıştır (76). Yine benzer stres koşuluna dayanıklılık için çeltik bitkisinden NAC geni izole edilerek transgenik buğdaylarda kuraklık ve tuzluluğa dayanıklılık sağlanmıştır (77).

Leguminosae familyasına mensup Hint fasulyesi (*Vigna aconitifolia* (Jacq.) Marechal – syn. *Phaseolus aconitifolius* Jacq.) bitkisinden prolin kodlayan *P5CS* geni izole edilip ekmeklik buğdaya aktarılmış ve artırılan prolin sentezi sayesinde oksidatif stresin önüne geçilerek kuraklık koşullarına dayanıklılık artırılmıştır (78).

2003 yılında yapılan bir çalışmada *E. coli* bakterisinden *mtlD* (mannitol-1-fosfat dehidrogenaz) geni izole edilerek buğdaya aktarılmış ve bu sayede taze ve kuru ağırlıkta artış, bitkinin yaprak alanında büyüme sağlanarak bitkilerin zor koşullarda veriminin düşmesi durumu telafi edilmiştir (79). Mannitol normalde yeşil bitkilerin çoğunda sentezlenirken buğday bitkisinde sentezlenmemektedir. Mannitol, su potansiyelinin düşük olduğu durumlarda bitkinin ozmotik basıncını düzenleyerek su alınmasını sağlar.

2005 yılında bezelye bitkisinden (*Pisum sativum* L.) *MnSOD* (Manganaz süper oksit dismutaz) geni izole edilip buğdaya aktarılmıştır (80). Bu çalışma sonucunda stres sonucu ortaya çıkan elektrolit kayıpları (leakage), oksidatif hasar gibi durumların önüne geçilirken aynı zamanda fotosentez oranı yükseltilmiş ve süper oksit dismutaz aktivitesi ile kuraklık toleransı da artırılmıştır.

Yukarıda belirtilen çalışmalar son 15 yılda ön plana çıkan çalışmalardan yalnızca birkaç tanesini göstermektedir. Transgenik bitkilerin üretimi ile ilgili yasal engellemeler nedeniyle bu tarz çalışmalar arzu edilen / ihtiyaç duyulan düzeylerde değildir. Bu nedenle araştırmacılar biyoteknolojik ıslah ile klasik ıslahı birleştirme yoluna gitmiştir.

Bu tip araştırmalarda stres koşullarına dayanıklı olduğu belirlenen doğal/yabani ya da kültür çeşitleri çok önemlidir. Double haploid (tamamen homozigot bitkilerdir) bitkilerden elde edilen fenotipteki özelliği kodlayan lokus (QTL) verileri ile araştırmacılar çalışmaya konu olan stres çeşidi ve arzu edilen fizyolojik karakter seçimlerini yapabilmektedir. Kuraklık stresi altında tane verimini belirtecek QTL lokusları 2007 yılında yayınlanmıştır (81). 2008 yılında farklı coğrafyalarda yapılan kuraklık denemelerinde, farklı genotiplerde kullanılacak QTL setleri araştırılıp ortak markörler ve hesaplama yöntemleri yayınlanmıştır (82). Araştırmacılar fenotipik karakterlerini QTL analizleriyle doğruladıkları bitkileri anaç kabul ederek, arzu edilen karakterlere sahip bitkileri melezleyerek yeni çeşitler oluşturma yoluna gitmiştir. Yıllar süren ve başarı garantisi olmayan klasik ıslah çalışmaları moleküler analiz yöntemleri ile birleştirilerek süreç ve maliyet düşürülürken başarı yüzdesi artırılmıştır.

Ayrıca son yıllarda araştırma grupları yeni nesil dizileme teknolojileri kullanarak genom düzeyinde detaylı araştırmalar yapmaktadır. Bu araştırmalar sonucunda genom boyunca tür içi ve türler arası araştırmalarda kullanılacak moleküler markörlerin geliştirilmesi hedeflenmektedir.

## **2.5. Stres Koşullarına Yönelik Moleküler Çalışmalar, QTL ve MAS**

Son yıllarda moleküler markörler; bağımsız türler arasında akrabalık analizlerinin yanı sıra hedef genlerin haritalanması, bağlantı haritalarının hazırlanması, markör temelli seleksiyon (MAS) ve geri çaprazlamalar, popülasyon genetiği analizleri ve filogenetik çalışmalarda sıkça kullanılmaktadır (83). Mikrosatellitler yalnızca birkaç baz çiftinden (1 ile 6 arası) oluşan basit tekrar dizileridir ve ökaryotik genomlarında son derece yaygındırlar (84). DNA replikasyonu sırasında gerçekleşen kaymalar nedeniyle mikrosatellit tekrarlarında farklılıklar görülmektedir. Mikrosatellitlerin kökenlenmelerinin evrimsel dinamik bir süreç olduğu ve son derece karmaşık olduğu kanıtlanmıştır. Mikrosatellit oluşumunun muhtemel yolları; tek zincirli DNA kayması, eşit olmayan krossing over, çift zincir kırılmaları ve retrotranspozonlardır. DNA replikasyonu sırasında *DNA polimeraz III*'ün DNA kalıbında tekrar bölgesine yerleşmesi nedeniyle daha



uzun ya da yeni oluşmuş zincir kopyalarına neden olabilir (83). Akkaya ve arkadaşlarının yaptığı çalışma (85) sayesinde SSR polimorfizmlerinin PCR tabanlı moleküler markörler olarak bütün bitki türleri için kullanılabilmesinin yolu açılmıştır. Buğday genomunda her 270 kb'da (GA)<sub>n</sub>/(GT)<sub>n</sub> mikrosatellit bölgelerinin (86), her 292 kb'da (AC)<sub>n</sub> ve her 212 kb'da (AG)<sub>n</sub> mikrosatellit bölgelerinin (87) olduğu belirtilmiştir. Mikrosatellitlerdeki tekrarlar bitkilerde yoğunlukla AAG tripleti olarak görülürken yüksek GC tekrarına sahip tek çeneklilerde yaygın olarak CCG tripleti görülmektedir. Buğday genomunda farklı kromozomlarda ve kromozom kollarında mikrosatellit lokuslarının dağılımı rastgeledir ve en fazla yayılmanın B genomunda olduğu görülmüştür (86). Özel bir bölgedeki bu tarz bir polimorfizm, özel tasarlanmış primerlerden faydalanılarak kolaylıkla ve kesin olarak saptanabilir (88). Moleküler markörlerin çevresel koşullardan etkilenmemesi ve bitki gelişiminin her evresinde saptanabilmesi sayesinde QTL ile ilişkilendirilmiş markörler kullanılarak yüksek doğrulukla hedefin seleksiyonu yapılabilir ve bu sayede, konvansiyonel tarımda istenilen özellikleri taşıyan bitkilerin teşhisi sağlanabilir (84).

Tekrar bölgelerinin genomdaki konumlanmaları onların fonksiyonel rollerinin belirlenmesinde de önem taşır. Mikrosatellitlerin kodlanan bölgedeki yerleşimi gen ifadesini etkileyebilmektedir. Bu amaçla fonksiyonel markör geliştirmek için EST veri tabanlarından yararlanılır. EST'ler 300-500 baz uzunluğunda olan, uzun ve tekil mRNA sekanslarıdır ve cDNA kütüphanelerinin rastgele sekanslanmasından elde edilirler. Spesifik organlarda ya da tüm organizmada gen ifadesini belirtirler. Dünya çapında yürüyen genom sekanslama projeleri sayesinde çok zengin bir cDNA kütüphanesi verisi mevcuttur. Bu kütüphaneler kullanılarak eksiksiz cDNA verilerine ulaşmak çok kolaydır. Bu sekanslar muhtemel markörlerin belirlenmesi amacıyla kullanılabilirler. EST verilerinden markörler türetmek amacıyla SSR tanımlama programları kullanılmaktadır. Bu programlar taranan dizilerde muhtemel SSR sekanslarını tanımlamaktadırlar. EST-SSR'lar, genoma dayalı SSR'lara göre çeşitli avantajlar sunmaktadır. Bu markörler genomun ifade olan bölgelerindeki çeşitliliği tanımlayabilirler. Bu sebeple belirli bir özellik için belirteç olarak kullanılabilirler (83). Bu bağlamda pek çok fizyolojik özelliği temsil eden markör geliştirilmiştir (89).

Genomun bir noktasında tek bir nükleotid üzerinde meydana gelen değişikliklere tekli nükleotid polimorfizmi (SNP- Single Nucleotide Polymorphism) adı verilir. Bu değişiklik aynı türün bireyleri arasında olabileceği gibi aynı bireyde kromozom çifti üzerinde de meydana gelebilir

(90). SNP'ler ökaryotik genomlarında en yaygın görülen polimorfizm çeşididir. Genomun kodlanan bölgelerinin büyük kısmı da dâhil olmak üzere genom boyunca yaygın olarak bulunurlar. Küçük delesyonlar ya da insersiyonlar şeklinde meydana gelebilirler (91). Genetik analizlerde bir haritalama kaynağı olarak kullanılabilceği, yüksek işlevsel özelliğe sahip olduğu belirtilmiştir (92,93). Bu sebeple akrabalık ilişkileri, doğal genetik mirasın korunması, genetik çeşitlilik analizi ve MAS gibi pek çok çalışma alanında kullanılmaktadır (94).

Moleküler markörlerin ıslah ve üretimde diğer yöntemlere göre avantajı bitkinin yaşam döngüsünün herhangi bir evresinde kullanılabilmeleri (95), analiz sonuçlarının kesinliği ve sürecin ekonomik olmasıdır.

## 2.6. SNP Teknolojisi ve Bu Alandaki Gelişmeler

SNP'lerin laboratuvar çalışmalarında belirli bir özelliği işaret eden moleküler markörler olarak kullanılabilceğinin anlaşılmasından sonra bu konuda pek çok çalışma başlamış ve araştırma yöntemleri geliştirilmiştir.

Bitki genomlarında SNP markör geliştirme çalışmalarında bitkilerin büyük bir genoma sahip olmaları, yüksek poliploidi seviyeleri (4n, 6n gibi), genom yapıları (farklı türler değişik sayılarda gen kopyaları içerebilmektedir) gibi nedenlerden ötürü zorluklar çıkabilmektedir (96).

SNP markörlerin geliştirilmesi temelde 3 aşamalı bir süreçtir (91,96,97):

- 1- Az sayıda bireyde sekanslama işlemi sonrasında sekansların bireyler arasında hizalama analizlerine alınarak taranması ve muhtemel tüm SNP'lerin çıkartılması ile SNP markör geliştirilmesi çalışmaları başlar. Bu aşama biyoinformatik ve moleküler genetik çalışmaların kombinasyonu ile *de novo* polimorfizmlerin belirlenmesi esasına dayanır.
- 2- Bulunan SNP'ler sekans hataları ve/veya homolog/paralog genlerden dolayı ortaya çıkabilecek hatalı pozitiflerin elenmesi için belli kriterlerde biyoinformatik genotipleme analizleri yapılır. Genotipleme analizlerinde belirlenen kriterlerden bazıları sekans okuma derinliği, SNP'lerin homozigot allellere sahip olması, mümkün olan en fazla aksesyonda taranabilirliği, kalıtım oranı, birbirlerine yakınlıklarıdır. Bu değerleri karşılamayan SNP'ler veri setinden uzaklaştırılırlar.
- 3- Veri setinde kalan SNP'ler kullanılarak geniş bir popülasyonda genotipleme analizi yapılır ve SNP'lerin işlevsellikleri test edilir. Yüksek polimorfizm gösterme

kapasitesine sahip SNP'ler ile karakterizasyon çalışmalarına devam edilir ve çalışma sonucunda kullanılabilecek markörler belirlenir.

SNP çalışmalarında kurulan reaksiyonların temelinde allele özgü oligonükleotid hibridizasyonu, oligonükleotid ligasyonu, SNP–primer amplifikasyonu veya enzimatik ayrılma yöntemleri yer alır. SNP belirleme sistemleri de bu yöntemlerle kurulan reaksiyonların analizi için jel elektroforez sistemleri, floresan okuyucular, flow sitometri, kütle spektrofotometresi ya da oligonükleotid tabanlı mikroarray çipleri yöntemlerine dayanır (96). Buralardan elde edilen veriler allelik dağılım haritalarında analiz edilerek sonuca ulaşılır.

Kısaca; SNP araştırmaları için yeni nesil dizileme (NGS) sistemleri, çoklu yonga teknolojisi (MCTB- multiplexed chip based technology), karşılıklı allel spesifik PCR (KASP – Kompetitive allele specific PCR) gibi sistemler mevcuttur. Kullanım kolaylığı, maliyet, ekipman gereksinimi, zaman gibi etmenler göz önünde bulundurulduğunda;

- Muhtemel yeni SNP'lerin ortaya çıkartılması için NGS,
- Yüksek sayıda örnekte SNP taramaları için MCBT,
- Az sayıda SNP'lerin taranması için ise KASP sistemi yaygın olarak kullanılmaktadır (90).

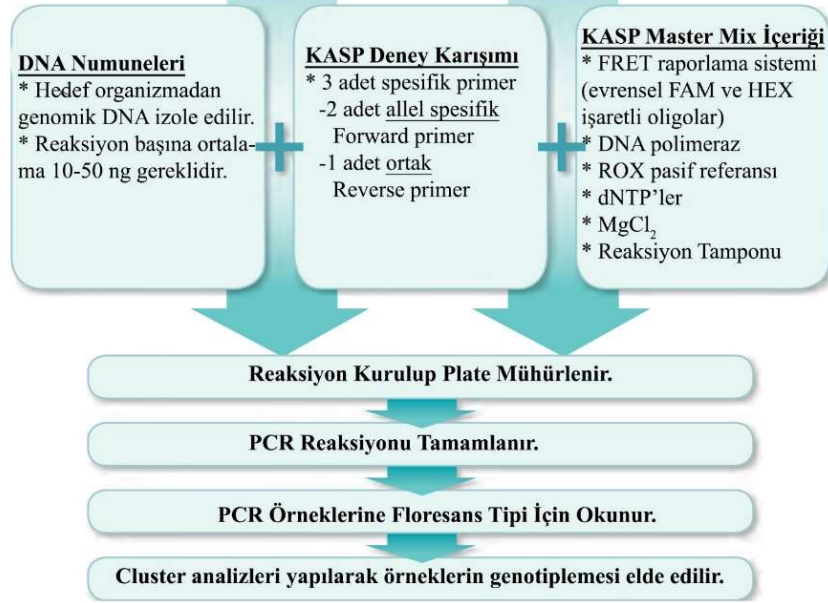
## 2.7. KASP Sistemi ve SNP Analizleri

Allele özgü PCR sistemi, Rust ve arkadaşları (100) tarafından 1993 yılında geliştirilen ve MS-PCR (Mutagenically Seperated PCR) olarak adlandırdıkları bir yöntemdir. Bu yöntemde nokta mutasyonu belirleme çalışmaları, hedeflenen allele yalnızca 1 tanesinin bağlanabildiği 2 adet özel forward primer ve 1 adet ortak reverse primer ile reaksiyon kurulması, mevcut polimorfizme göre uygun primerin bağlanması ile farklı boyutlarda ürünlerin oluşması temeline dayanır. Bu sayede incelenen DNA örneklerinde hangi mutasyonun mevcut olduğu jel elektroforezi ile anlaşılabilir.

KASP, SNP çalışmalarında kullanılan, allele özgü oligo uzamasına dayalı bir sistemdir. Jel elektroforezi yerine, floresans ışımaya değişimlerini okuyan sistem, sinyal analizi için floresans ışımının rezonansından açığa çıkan enerji değişimlerini (FRET–Flourescence resonance energy transfer) kullanır.

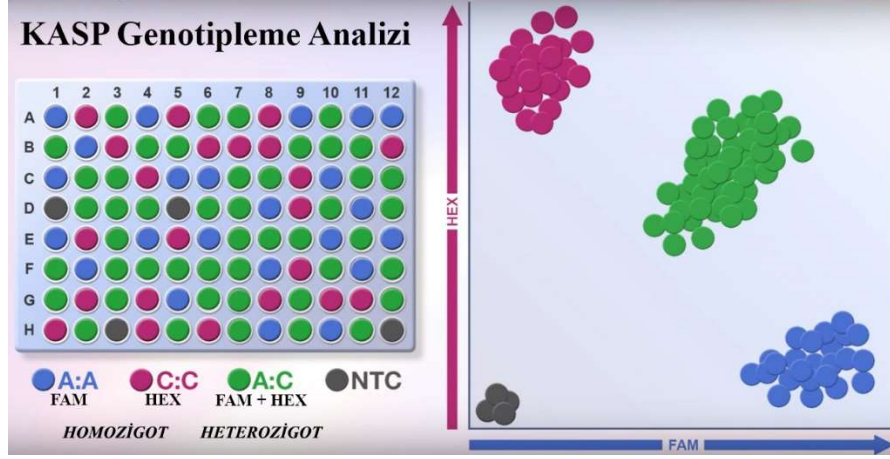
KASP sisteminde önemli nokta, incelenecek bireyin genetik materyalinin saf halde elde bulunmasıdır. Sistem, incelenecek allele özgü 2 adet forward (F) primer ile ortak 1 adet reverse (R) primer kullanılmasıyla işler. Her bir F primer reaksiyon karışımındaki 2 evrensel FRET kasetinden (FAM ve HEX) birine karşılık gelen ilave bir kuyruk sekansı içerir. Reaksiyon konvansiyonel PCR cihazlarında yürütülüp, okumanın FRET analizi sistemlerinde gerçekleştirilebileceği gibi baştan sonra FRET okuma özellikli bir RT-PCR da kullanılabilir. PCR reaksiyonunda bulunan 2 F primerin özgün yapısı gereği primer yalnızca bir tanesi araştırılan SNP bölgesine bağlanır ve DNA polimerazın işini yapmasına izin verir. Bunu sağlayan ise uygunsuzluk (mismatch) nedeniyle sistemde yer alan özel polimerazın diğerinin bağlanmasına izin vermemesidir. Bu süreçte ortak R primer ise karşı zincirden bir kalıp ürün sentezler. Bu süreçte PCR reaksiyonunun 1. evresi tamamlanır. 2. evrede oluşturulan zincirler ana zincirden ayrılır ve bağlanan F primerin komplementeri sentezlenir. Bu aşamada uygun olan FRET bağlanma kaseti tanımlanır ve bağlanır. Bu 2. PCR evresinin sonudur. Reaksiyon devam ederken komplementer zincirler ayrılır. FAM ya da HEX ışımalarını sağlayan oligo artık serbest kaldığından floresans ışımaya yapabilir. Döngüler devam ederken PCR ürününün 2<sup>n</sup> şeklinde katlanarak sayısının artması sağlanır. KASP sisteminin akış şeması şekil 2.9’ da gösterilmiştir.

## KASP Sistemi İş Akış Şeması



Şekil 2.9. KASP sisteminde hedef organizmadan yüksek saflıkta DNA izolasyonu önemlidir. Reaksiyonda 10-50 ng arası DNA kullanılmaktadır. Her bir SNP için 2 adet allele özel F ve bir adet ortak R olmak üzere 3 adet spesifik primer tasarlanır. Reaksiyon içeriğinde standart PCR reaksiyonlarına ilave olarak FRET belirteç sistemi ve ROX bulunur. Işıma kontrolü için kullanılmaktadır. Ürünün tedarikçisi LGC grup sitesinden (101) alınarak sadeleştirilmiş ve Türkçeleştirilmiştir.

KASP sisteminde primerler tasarlanırken polimorfizm gösteren allellerden birisi FAM, diğeri HEX olarak işaretlenir. Eğer DNA numuneleri polimorfizm çeşitlerinden birisine homozigot ise sonuca bağılı olarak yalnızca FAM ya da yalnızca HEX ışımaya yaparlar. Eğer bu polimorfizmi heterozigot olarak bulunduruyorsa her iki ışımayı da yapar (Şekil 2.10).



Şekil 2.10. FRET analizi sonucunda analiz yazılımları verileri X ve Y eksenlerine yayarak incelenen örneklerin genotiplemesini yaparlar. Mavi ve kırmızı yığılmalar homozigot bireyleri gösterirken yeşil yığılma ise heterozigot bireyleri gösterir. Gri yığılma ise DNA içermeyen negatif kontrollerdir. Görsel LGC grup sitesinden alınmış ve Türkçeleştirilmiştir (101).

KASP sisteminin en büyük avantajı örnek başına maliyetidir. Genel olarak örnek başı analiz tutarı diğer yöntemlerin 1/3'ünden daha düşüktür. Sonuç alma süresi de ortalama 1 gün olarak belirlendiğinden diğer yöntemlere nazaran daha hızlı kabul edilir.

KASP genel olarak kalite kontrol (QC) genotiplerinde, QTL analizlerinde ve allel tanımlamalarında kullanılmaktadır. İslah çalışmalarında üretilmesi gereken tohumların homojen olması büyük önem taşır. Farklı allellerin bulunması tozlaşmada meydana gelebilecek çaprazlamalardan ötürü ürün verimi ve kalitesini etkileyebilir. Bu sebeple ekilecek materyalde QC analizleri yapılır. QC analizleri sayesinde soy içi üretimde (inbred line) meydana gelebilecek genetik varyasyonlar incelenebilir.

QTL analizlerinde fenotipik özelliği belirtecek markörün taranmasında yüksek işletim maliyetlerinden kurtulmak için çeşitler üzerinde KASP analizi yapılması tercih edilmektedir. Bu araştırmalarda parental bitkiler ve F1 melezleri taranır. Polimorfizm gözlenen SNP'ler belirlenir ve tüm popülasyonda bu SNP'ler taranır.

KASP sistemi transkriptom verilerinden üretilecek SNP'lerin taranmasında yüksek başarı ile kullanılan bir sistemdir. Bu sistemle buğday üzerinde çok sayıda yayın yoktur, bunun sebebi ise buğdayın heksaploid yapısıdır. 2011 yılında yayınlanan bir çalışmada (102) araştırmacılar KASP sisteminin modern kültürlerde işlevselliğini incelemiş, bağlantı (linkage) analizlerini

yapmış ve sonucu sunmuşlardır. Bunun için açık veri tabanlarından (NCBI) Chinese spring gibi popüler ve tamamen sekanslanmış buğday çeşitlerine ait EST verilerini çekmişler ve 1659 SNP tasarımı yapmışlardır. 23 buğday varyetesinde yaptıkları analizler neticesinde geliştirdikleri SNP markörlerini denemişler ve sonuçları, Avalon ve Cadenza çeşitleri arasında oluşturdukları double haploid haritalama popülasyonu içerisinde yaptıkları SNP taramalarında doğrulamışlardır. Geliştirdikleri markörlerden 1114 tanesinin polimorfizm gösterdiği, bunların içerisinde 213 tanesinin 23 çeşidin tamamında polimorfizm gösterdiği gözlemlenmiştir.

KASP sisteminin çok yeni ve yeterince duyulmamış bir teknoloji olması nedeniyle tahıl ıslahında yaygın olarak kullanımının henüz başlamamış olması ve bu sistemin başarıları üzerine yazılan bir makalede (103) araştırmacılar bu sistemin çok başarılı olarak çalışabileceğini, yüksek kapasite ile QTL analizi yapılabileceğini belirtmişlerdir.

2016 yılında yayınlanan bir makalede (97) araştırmacılar domates bitkisinde zarara neden olan birkaç nematod çeşidine dirençliliği belirtecek bir QTL markörü oluşturma amacıyla *Mi-1* genine özgü geliştirilmiş moleküler markörlerin çeşitler üzerinde işlevselliğinin denemelerini yapmışlardır. 26 domates çeşidi ve 4 kontrol melezinde yapılan araştırmalar neticesinde KASP sisteminin bitkilerde ıslah çalışmalarında erken tanı amacıyla kullanılacak bir QTL analiz sistemi olduğunu belirtmişlerdir.

### 3. GEREKÇE VE AMAÇ

Bu tez çalışması, insan ve hayvan beslenmesinin vazgeçilmez bir kaynağı olan buğdayın, dünyada yaygın olarak görülen yüksek sıcaklık ve kuraklık stresi altında üretilebilmesinin yolunu açacak ıslah çalışmalarında kullanılmak üzere, markör tasarlanması ve bu stres koşullarının nişasta biyosentezine olan etkisinin gen ifadesi düzeyince incelenmesi üzerine odaklanmıştır.

Bu çalışma sonucunda 2 temel amaç hedeflenmiştir.

- 1- Ekmeklik buğday bitkisinde yüksek sıcaklık ve kuraklık stres faktörlerine toleransı gösteren moleküler markörlerin belirlenmesi, ıslah programlarında MAS yöntemi kullanılarak kuraklık ve yüksek sıcaklık stresine toleranslı bireylerin çeşitli kademelerde doğru seçimini sağlayabilecek moleküler markörlerin geliştirilmesi.
- 2- Tez çalışmasına konu olan stres faktörlerinin kombine olarak uygulandığı koşullarda nişasta biyosentezinden sorumlu olan genlerin ifadelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu tez çalışması kapsamında nişasta biyosentezini kontrol eden genler her aşamada kontrol edilerek, ifade değişimleri ve değişimlerdeki kantitatif farklılıkların hesaplanması planlanmıştır.

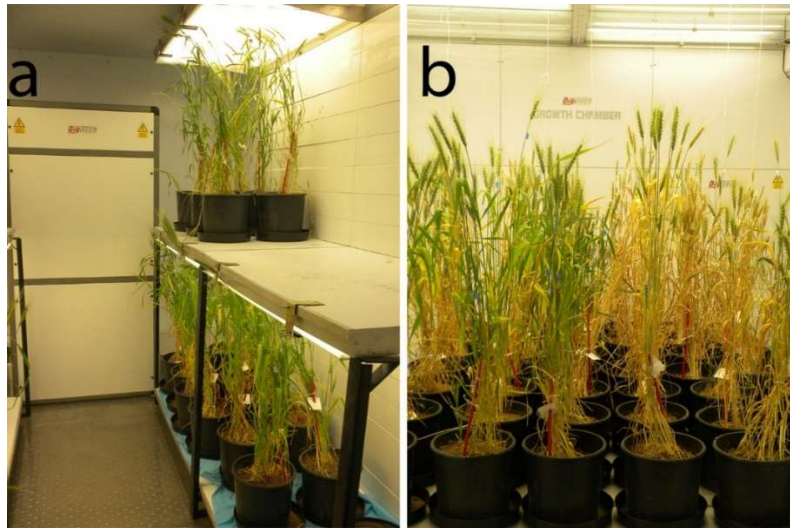


## 4. MATERYAL VE YÖNTEM

### 4.1. Bitki Materyali

Bitki materyali olarak ekmeklik buğday (*Triticum aestivum* L.) çeşitlerinden, kuraklığa ve yüksek sıcaklığa toleranslı olduğu bilinen yabancı orijinli Zubkov (Kırgızistan) çeşidi ile bu stres koşullarına karşı hassas olduğu bilinen Atay 85 çeşitleri kullanılmıştır. Bitkiler doğal koşulda vernalizasyon için Ekim 2014 döneminde tarla ortamına ekilip başaklanma öncesinde kontrollü iklim odalarına alınmıştır. İklim odalarında 16:8 fotoperiyot ve %60 nemlilikte yetiştirilen bitkiler stres türüne göre kontrol, kuraklık, yüksek sıcaklık ve yüksek sıcaklık-kuraklık uygulamaları için 4 uygulama grubuna ayrılmıştır.

Kontrol grubunda 24°C gündüz ve 14 °C gece sıcaklıkları uygulanırken düzenli olarak sulama yapılmıştır. Kuraklık grubunda 24°C gündüz ve 14°C gece sıcaklıkları uygulanırken stres uygulamalarının başlangıcından itibaren hiç sulama yapılmamıştır. Yüksek sıcaklık stresi grubunda 36°C gündüz ve 22°C gece sıcaklıkları uygulaması yapılmış ve saksıların tümü düzenli olarak sulanmıştır. Yüksek sıcaklık-kuraklık grubunda 36°C gündüz ve 22°C gece sıcaklıkları uygulaması yapılmış ve stres uygulamasının başlangıcından itibaren hiç sulama yapılmamıştır (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Atay 85 ve Zubkov çeşitlerine stres uygulamaları. a- 24°C/14 °C kontrol ve kuraklık karışık. b- 36°C/22°C yüksek sıcaklık ve kuraklık + yüksek sıcaklık karışık.

Stres uygulaması sonuçlarının araştırılması için her uygulama grubundan bitkiler seçilmiş ve işaretlenmiştir (Şekil 4.2). Örneklemeler ve ölçümler bu seçilen bitkiler üzerinden yapılmıştır.



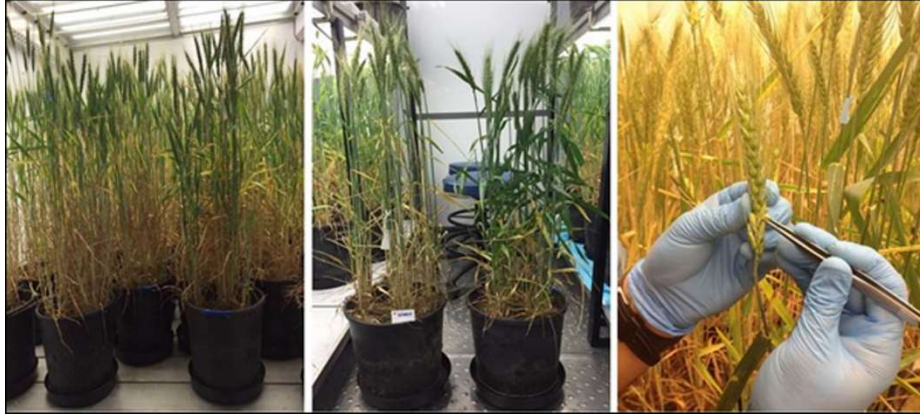
Şekil 4.2 Tez çalışmasında kullanılacak her bitki stres uygulamaları öncesinde seçilmiş ve işaretlenmiştir.

Çeşitlerin görselleri şekil 4.3’de ayrıntılı olarak verilmiştir.



Şekil 4.3. Stres uygulamalarının 14. gününde çeşitlerin durumlarını gösteren fotoğraf.

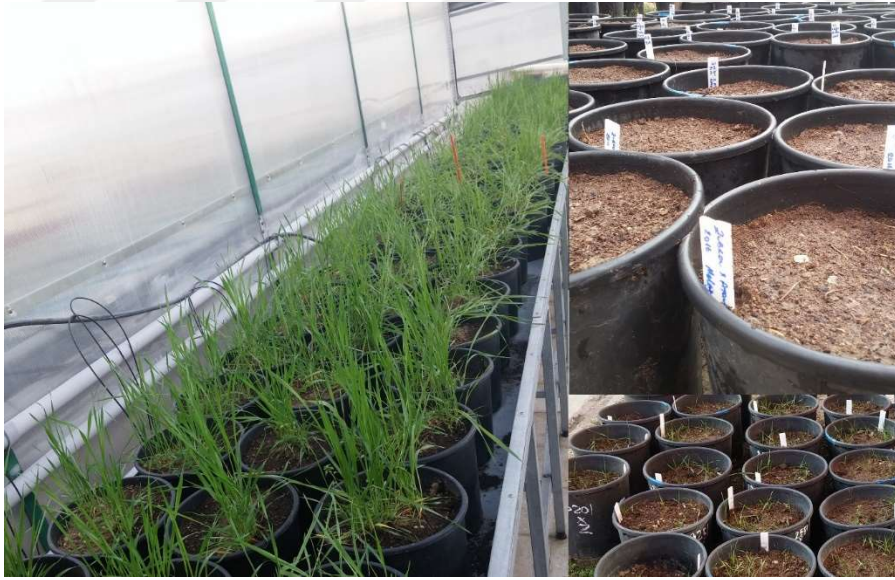
Gen ifadesi analizleri için tane ve yaprak örnekleri kullanılmıştır. RNA izolasyonu için tane örnekleri 7., 14. ve 21. günlerde alınırken, yaprak numunesi 14. günde her bir uygulama ve çeşit için en az 3 farklı bitkiden rastgele toplanmıştır (Şekil 4.4). Örnekler sıvı azot ile dondurulmuş ve izolasyon zamanına kadar hiç çözünmeden -86°C derin dondurucuda muhafaza edilmiştir.



Şekil 4.4. Bitkilerden örneklemeler yapılmış ve izolasyon gününe kadar muhafaza edilmiştir.

DNA izolasyonu yapılacak Atay 85 ve Zubkov çeşitleri ile melezler saksılara ekilmiş (Şekil 4.5), kış koşullarında vernalizasyon şartları sağlandıktan sonra Mart 2016 döneminde seralara aktarılmış ve büyümeleri sağlanmıştır.

Bitkiler başaklanma dönemine geldiklerinde bayrak yaprak haricinde her bir bireyden 2'şer adet yaprak toplanıp sıvı azot ile dondurulmuş ve DNA izolasyonu zamanına kadar hiç çözünmeden -86°C derin dondurucuda muhafaza edilmiştir.



Şekil 4.5. DNA izolasyonunda kullanılacak Atay 85, Zubkov çeşitleri ve melez hatların ekimi, vernalizasyonu ve sera koşullarında gelişimi.

## 4.2. DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu için daha önceden mısır bitkisi için optimize edilen Cornell Yöntemi (104) üzerinde ihtiyaca göre değişiklikler denenmiş ve aşağıdaki yöntem optimize edilerek kullanılmıştır.

İzolasyon protokolü:

- 1- İzolasyon tamponu (0,1M Tris-HCL pH:8, 0,05M EDTA pH:8, 0,5M NaCl, %1,25 SDS) kullanımdan önce 55°C'ye ısıtılmıştır. Isıtıldıktan sonra kullanılacak kadarı steril cam şişeye alınmış ve içerisine her 10 ml tampon için 60 µl ProteinazK (20mg/ml) ve 50µl 2-merkaptoetanol eklenip karıştırılmıştır.
- 2- Taze yaprak dokusu havanda sıvı azot ile ezilmiştir. Ezilen dokulardan 0.2 gram tartılarak steril mikrosantrifüj tüpüne aktarılmış, üzerine 800 µl izolasyon tamponu eklenip, vorteks ile iyice karıştırılmıştır. Tüp 15 dakika 55°C'de akabinde 45 dakika boyunca 65°C'de bekletilmiştir. Bekleme süresince her 15 dakikada bir tüpler karıştırılmıştır.
- 3- İnkübasyon süresi tamamlanınca tüplere 250 µl 5M KOAc eklenmiş, ters düz edilerek homojen hale getirilmiştir. Buz içerisinde 20 dakika bekletilmiştir.
- 4- Süre tamamlandığında tüpler 18000 G hızla, 4°C'de, 15 dakika santrifüj edilmiştir.
- 5- Süpernatant yeni tüpe aktarılmış, üzerine 1:1 oranında kloroform:izoamil alkol (24:1) eklenmiş, ters düz edilerek homojen hale getirilmiş ve 5 dakika oda sıcaklığında fazların ayrılması beklenmiştir. Süre tamamlandığında tüpler 18000 G hızla, 4°C'de, 15 dakika santrifüj edilmiştir. Bu işlem 2 defa tekrarlanmıştır.
- 6- Son yıkamadan elde edilen üst faz yeni tüpe aktarılmış, üzerine 1:1 oranında izopropanol eklenmiştir. Tüpler ters düz edilerek DNA yığını görülünceye kadar karıştırılmış, gece boyu -20 °C' de bekletilmiştir.
- 7- Gece boyu bekleyen numuneler 18000 G hızla, 4°C'de, 15 dakika santrifüj edilmiştir. Sıvı fazın tamamı uzaklaştırılmıştır.
- 8- Dipte biriken DNA pelletine 700 µl %70 Etanol (oda sıcaklığı) eklenmiş, pellet kaldırılarak tüm yüzeye temas sağlanmıştır. Örnekler 10 dakika 15000 G' de oda sıcaklığında çöktürülmüştür.

- 9- Sıvı faz uzaklaştırıldıktan sonra örnekler oda sıcaklığında kurumaya bırakılmış, tamamen kuruduktan sonra su ile çözülmüştür. Örnekler tamamen çözüldükten sonra içlerine her 50 µl çözücü için 2 µl RNaz (10 mg/ml) eklenmiş, 37°C'de 2 saat, 65°C'de 20 dakika bekletilerek muhtemel RNA bulaşıklığı temizlenmiştir. Numunelerin nanodrop okumaları yapılmış ve PCR işlemlerinde kullanılmak üzere 100 ng/µl stokları hazırlanmıştır.

#### 4.3. RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi

Yaprak dokusundan RNA izolasyonu için Trizol (105), CTAB (106) yöntemleri ile GeneJET Plant RNA Purification Kit (Thermo Scientific) yöntemi denenmiştir.

Kit kullanılarak yapılan izolasyonlarda RNA elde edilmiş ancak miktar olarak yetersiz (yaklaşık 60ng/µl) bulunmuş olduğundan bu yöntem terk edilmiştir.

Trizol metodu ile yönteme bağlı kalınarak yapılan izolasyonda RNA miktar ve kalitesi yetersiz bulunmuş olup, yapılan denemeler sonrasında yöntemde bir takım değişiklikler yapılmış ve sonuç olarak total RNA ortalama 30-50 µg/100 mg numune, 260/280: 2,02-2.12 ve 260/230: 1,70-2 saflıkta izole edilmiştir. Protokolün son hali aşağıdaki gibi uygulanmıştır:

1. 100 mg yaprak dokusu sıvı azot kullanılarak homojen hale getirilmiştir.
2. Örnekler önceden soğutulmuş mikrosantrifüj tüplerine alınıp üzerlerine 1 ml Trizol (Invitrogen) eklenmiştir. Tüpler 5'er saniye süreyle olmak üzere 5 defa vorteks ile tamamen homojen hale gelinceye kadar karıştırılmış ve 5 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir.
3. İçerisine 0,2 ml kloroform eklenmiş, 15 saniye boyunca sertçe karıştırılmıştır.
4. 5 dakika oda sıcaklığında bırakılan tüpler 30.000 G'de, 4 °C'de 20 dakika santrifüj edilmiştir.
5. Üst faz yeni tüpe aktarılıp üzerine 0,5 ml soğuk izopropanol eklenmiştir. Ters düz edilerek iyice karıştırılan tüpler oda sıcaklığında 10 dakika bekletildikten sonra 30.000 G ve 4°C'de 20 dakika santrifüj edilmiştir.
6. Süpernatant uzaklaştırılmış, pellet 2 defa %75 etanol ile yıkanmıştır.
7. Oda sıcaklığında 15 dakika kurutulan pellet 30µl DEPC muamelesi yapılmış RNA suyu ile çözülmüş ve nanodrop okumaları yapılmıştır.

Tane dokusundan RNA izolasyonu için Trizol (107), MMY (108), CTAB (106), Fenol-SDS (15), GeneJET Plant RNA Purification Kit (#K0801, Thermo Scientific) yöntemleri denenmiş olup, tatminkâr kalite ve miktarda RNA izolasyonu Fenol-SDS yönteminde yapılan modifikasyonlar neticesinde elde edilmiştir. Taneden izolasyon için kullanılan yöntem aşağıdaki gibidir:

#### 1.Gün Protokol:

1. 0,1- 0,3 gram taze doku (buğday tanesi) sıvı azotla birkaç dakika boyunca ezilip soğuk ve temiz bir spatül yardımıyla önceden soğutulmuş mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır. Üzerine 840 µl izolasyon tamponu (0,1M Tris-HCl, pH:9.0, 0,1M NaCl, %1 SDS) ve 170 µl 2-merkaptoetanol eklenip vorteksle iyice karıştırılmış ve 5 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir.
2. Üzerine 500 µl trisle doyurulmuş fenol eklenip vorteksle karıştırılmıştır. Aynı tüpün üzerine 500 µl kloroform:izoamilalkol (49:1) eklenip vorteks ile karıştırıldıktan sonra 15 dakika süre ile buzda bekletilmiştir. Ardından 8000 G'de, 4°C'de 30 dakika çöktürülmüştür.
3. Süpernatant yeni tüpe aktarılıp üzerine 500 µl trisle doyurulmuş fenol ve 500 µl kloroform:izoamilalkol (49:1) eklenip vorteks ile karıştırıldıktan sonra 15 dakika süre ile buzda bekletilmiştir. Ardından 10000 G'de, 4°C'de 15 dakika çöktürülmüştür.
4. Süpernatant yeni tüpe aktarılıp üzerine 1/10 oranında 5M NaCl eklendikten sonra üzerine 1:1 oranında izopropanol eklenip, ters düz ederek karıştırıldıktan sonra gece boyu -20°C'de bekletilmiştir.

#### 2. Gün Protokol:

1. -20°C'den alınan numune 26000 G, 4°C'de 40 dakika boyunca çöktürülmüştür.
2. Süpernatant uzaklaştırılıp pellete 1 ml %80 Etanol eklenmiştir. Tüpler 17500 G, 4°C'de 20 dakika boyunca çöktürülmüştür.
3. Süpernatant uzaklaştırılıp pellet oda sıcaklığında 1 saat kurutulmaya bırakılmıştır.
4. Tamamen kuruyan pellet 100 µl TENS (0,1M Tris-HCl pH:7.4, 0,05M NaCl, 10mM EDTA pH:8.0, %0,1 SDS) içerisinde çözülüp üzerine 1 µl ProteinazK (20mg/ml) eklenip 1 saat süre ile 37°C'de inkübe edilmiştir.
5. Üzerine 5 µl sodyum asetat (3M, ph:5.2), 25 µl su ile doyurulmuş fenol ve 25 µl kloroform:izoamilalkol (49:1) eklenmiş ve her bir ekleme sonrası kısa süre vorteksle karıştırılmıştır.

6. Örnekler 60°C'de 15 dakika bekletilmiştir. Bekleme süresince her dakikada bir kısaca vortekslenmiştir. Bekleme süresi tamamlanan örnekler faz oluşumu için 15 dakika süre ile buzda tutulmuştur.
7. Bekleme süresini dolduran örnekler 18000 G, 4°C'de, 15 dakika çöktürülmüştür.
8. Süpernatantı yeni tüpe aktarılıp üzerine 1:1 oranında izopropanol eklenmiş, ters düz edilerek karıştırılmış ve gece boyu -20°C'de bekletilmiştir.

### 3. Gün Protokol:

1. -20°C'den alınan numune 17500G, 4°C'de 30 dakika boyunca çöktürülmüştür.
2. Süpernatant uzaklaştırılıp pellete 500 µl %80 Etanol eklenmiştir. Tüpler 17500 G, 4°C'de 20 dakika boyunca çöktürülmüştür.
3. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra dipte kalan pellet oda sıcaklığında 15 dakika kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan pellet 600 µl DEPC ile muamele edilmiş su (DEPC-ddH<sub>2</sub>O) ile çözülmüştür.
4. Üzerine 200ul, 10M LiCl eklendikten sonra ters düz edilerek karıştırılan örnekler 4°C'de, 6-8 saat bekletilmiştir.
5. Tüpler 20000 G, 4°C'de, 1 saat çöktürülmüştür. Süpernatant uzaklaştırılıp üzerine 500 µl %80 Etanol eklenmiştir. Akabinde örnekler 20000 G, 4°C'de, 15 dakika çöktürülmüştür. Pellet 15 dakika oda sıcaklığında kurutulup 50 µl DEPC-ddH<sub>2</sub>O ile çözülmüştür.
6. Nanodrop ile miktar ve kalite tayininden sonra DNaz uygulamasına geçilmiştir.

Yaprak ve tane dokularından izole edilen Total RNA numuneleri DNazI enzimi (#EN0521, Thermo Scientific) ile muamele edilerek muhtemel DNA kontaminasyonları ortadan kaldırılmış olup bu uygulamada enzimin satın alındığı firmanın verdiği protokol takip edilmiştir.

DNaz uygulamasını takiben numuneler kolon bazlı temizleme sistemi (#K0842, Thermo Scientific) ile kit protokollerine sadık kalınarak saflaştırılmış ve cDNA'ya çevirmeye hazır hale getirilmiştir.

cDNA sentezi için Reverseaid First Strand cDNA sentez kiti (#K1622 Thermo Scientific) kullanılmış olup çizelge 4.1 yer alan reaksiyon koşulları uygulanmıştır.

#### Çizelge 4.1. cDNA sentezi reaksiyon koşulları

OligodT Primerleri	1,5 µl
Total RNA	4000 ng
ddH <sub>2</sub> O ile 18 µl hacme tamamlandıktan sonra 5 dakika 65°C'de inkübasyonun ardından buza alınmıştır. Akabinde aşağıdaki kimyasallar eklenmiştir.	
5X Reaksiyon Tamponu	6 µl
RNaz inhibitörü	1,5 µl
dNTP karışımı	3 µl
Reverz Transkriptaz	1,5 µl
42°C'de 1 saat, 70°C'de 5 dakika bekletilmiştir. Süreç tamamlandıktan sonra örnekler seri dilüsyonları hazırlanıp -86°C derin dondurucuda muhafaza edilmiştir.	

#### 4.4. Eş Zamanlı PCR Uygulamaları

Eş zamanlı PCR (qRT-PCR) uygulamaları tane ve yaprakta gen ifadesi profillemeleri amacıyla yapılmıştır. Bu analizler için literatür taramalarında her bir geni temsil etmesi amacıyla primer listesi oluşturulamadığı için tüm primerler tez önerisinde sunulan enzim/erişim kodu tablosunda yer alan tüm genler için en az 2 çift primer olmak üzere toplam 46 çift primer tasarlanmıştır. Primer tasarımında Primer3 yazılımı kullanılmış olup aşağıdaki kriterler izlenmiştir:

- Tcoffee (<http://tcoffee.crg.cat/>) ve Muscle (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>) yazılımları kullanılarak yapılan hizalama (alignment) analizleri sonucunda izoenzimleri kodlayan genler arasında en fazla farklılığın kodlanan sekansların son 400-500 bazlık bölümünde görüldüğü anlaşılmış olup, tasarımlarda bu bölgeler kullanılmıştır.
- Primer uzunluklarında 18-22 bazlık skala denenmiş olup, BLASTn (NCBI-<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) analizlerinde düşük spesifite görüldüğünden tasarım için 22-26 bazlık skala kullanılmıştır. Primerler ortalama 24 bazlık uzunluğa sahiptir. Primerlerin %GC oranı 45-60 arası tutulmuş olup tüm primerler 60 °C bağlanma sıcaklığına göre tasarlanmıştır.
- Ürün boyutları 100-200 baz çiftlik skalada tutulmuştur.

Tasarlanan tüm primer çiftlerinde BLASTn analizi yapılarak hedef noktaya spesifik olduğu kontrol edilmiş, her bir primer dizisi için SMS2 PCR Products uygulaması (Sequence Manipulation Suite / Pcr Products -[http://www.bioinformatics.org/sms2/pcr\\_products.html](http://www.bioinformatics.org/sms2/pcr_products.html)) kullanılarak doğruluk sağlanması yapılmıştır.



Tasarlanan ve sentez ettirilen *actin* genine özel primerler (L:CAAAGAGATCACGGCCCTTG, R:ACTTCATGTGGACAATGCCG) kullanılarak cDNA' nın işlevselliğinin ve primerlerin tasarlandığı sıcaklıkta beklenildiği gibi çalışıp çalışmadığının kontrolü için 62°C ve 55°C arasında gradient PCR kurulmuştur.

PCR reaksiyonları için ortak çalışma sıcaklıkları belirlendikten sonra Eş zamanlı PCR uygulamalarında kullanılmak üzere hazırlanmış olan cDNA kütüphanelerinden seri dilüsyonlar yaparak sırasıyla 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000 oranlarında numuneler hazırlanmıştır. Maxima Sybrgreen (Thermo Scientific #K0251) kullanılarak *actin* geni primeri ile reaksiyon kurulmuştur. Reaksiyon koşulları çizelge 4.2'de verildiği gibidir.

Çizelge 4.2. q-RT PCR reaksiyon koşulları

İşlem	Sıcaklık	Süre	Ramp değeri (°C/sn)
Ön hazırlık	50 °C	2 dk	5
Denatürasyon	95 °C	10 dk	5
3-aşamalı amplifikasyon (40 döngü)	95 °C	15 sn	5
	60 °C	30 sn	4
	72 °C	30 sn	5
Melting Curve	60 °C	20 sn	4
	95 °C	20 sn	0.1

Melting curve sonucunda yapılan Tm analizi işleminde hiçbir istenmeyen (nonspecific) bant oluşumu görülmemiş olup, PCR ürününün Tm değerleri birbirine son derece yakındır. Melting curve analizi tüm primer setleri için tekrarlanmış, bireyler arası farklılık göstermeyen primerler kullanılmıştır.

Ön denemeler sonrasında Eş Zamanlı PCR analizlerinde tüm primerlerin işlevselliğinin kontrolü amacıyla cDNA karışımları (tane ve yaprak ayrı olarak) kullanılarak PCR analizleri yapılmış, araştırılacak her bir geni temsil edecek primer çiftleri belirlenmiştir.

PCR reaksiyonlarının qRT-PCR ile uyum göstermesi amacıyla içeriği aynı olan Dream Taq Master Mix (Thermo Scientific #K1081) kullanılmıştır. PCR koşulları çizelge 4.3'de verilmiştir.

Çizelge 4.3. PCR reaksiyon koşulları

İşlem	Sıcaklık	Süre
Denatürasyon	95 °C	10 dk
3-aşamalı amplifikasyon (40 döngü)	95 °C	1 dk
	60 °C	30 sn
	72 °C	1 dk
Son aşama	72 °C	10 dk
	12 °C	Bekleme

Araştırılan genlerin NCBI erişim kodları ve adlarına tasarlanan primerlerin listesi çizelge 4.4’de verilmiştir.



#### Çizelge 4.4. Nişasta biyosentezinde yer alan genlerin ifade analizlerinde kullanılan primerler

Gen – Enzim	Primer Dizisi	NCBI Erişim Kodu
<i>AGPaz küçük alt birim</i>	L:CGGAAGGCGCAGTAATAGAGGA R:GGAATGCCGCCACTTTCAGAAA	AY727927
<i>AGPaz büyük alt birim</i>	L:CCACCATCTATGATCAGCGGTA R:GCCTCTTCCATGTCAGTTTCA	DQ406820
<i>SSI</i>	L:GTACGAGCAGATCTTCAATGG R:ACATGTCTTCAGAGCTCAAGGA	AF091803
<i>SS2a3</i>	L:GACTACAAGGAGAGCTGGAGG R:AATTCCATCCTGTCATGCAGC	AJ269504
<i>SS2a2</i>	L:CATGCATGAGAGGGTGAAGT R:CACCTCTCATGTCACTGCAC	AJ269503
<i>SS2C</i>	L:CGCTATGAGGAGGTTCTTGTTG R:CAACCAACGTGCTCTACTTAGG	EU307274
<i>SS3</i>	L:CCTCTTCAGTTAGTTCCAAGCG R:TGCAGGGAAGGAAAAGAAAAGG	AF258608
<i>SS3B</i>	L:GGAATCATCAGTCGGCTTACAG R:TGAGCCTAGTAAAACCACCTGT	EU333946
<i>SSS</i>	L:GTTTGGGGAATAAGGAAGGGATG R:CACTAAGGCTAAAGAGTCACCAGT	U48227
<i>SBE 2</i>	L:GTTTGGACTATCGCTTGATATGG R:CACCAACTAGTGCTTGATCATGAC	Y11282
<i>SBE2bs</i>	L:GTAGATGCGGTCGTTTACTTGATG R:CTTGAACAGGAAGGGCAAATGTAG	AY740401
<i>GBSSI</i>	L:CTTGTTGTAGTGAAGGGCCGATAT R:CAAGCACAAACCCTAACTTCTTAC	AF286320
<i>GBSSII</i>	L:CTAGAAGCGAAGTACCACAGAAT R:ATCACTCCATATCTCATCCCTGTC	AF109395
<i>ISO1</i>	L:ATTCCTCAACTCCAACCTCTACC R:CACACTGATAATACGCCAAAGGAC	AJ301647
<i>ISO2</i>	L:CTCCAGGTTTCTTTACAACCGAG R:AGTACAGACCAACTTATCCGACC	JX473824
<i>ISO3</i>	L:ATGTATTAGCTCTGCGTTCGAGAC R:CATACTTCTTTCCGCCAACTGTC	JN412069
<i>PUL</i>	L:CGCAAGGATCTGTTCTACAAGTTG R:GCTTCTTATTCTGGGTTTGTTC	AF359460
<i>SUCT2</i>	L:AGAACCTGGATTATGGACCTAGTG R:CTAGCCCAAGATTTTCAACACGAC	KJ812203
<i>SUCS1</i>	L:AGATGTTCTACGCTCTGAAGTACC R:CGGTAGACAGACAAATCATAACGC	A001117
<i>SUCS2</i>	L:TTCTATGAGGCTTTCGGTCTTACC R:TCATTCTGGTAAGGATCGATGTGG	AJ000153
<i>SUCSC</i>	L:CCAAGATTGCAGACTTCTCCAGA R:GATCCCATGTTACAGCACTTTAGTC	AK332338
<i>ALPHA AMYLASE (109)</i>	L:TCGATGTGGGCGACCTCATTC R:TCGTAATATGTGGACAACATGAC	CJ590327
<i>ACTIN</i>	L:CAAAGAGATCAGGCCCTTG R:ACTTCATGTGGACAATGCCG	AB181991

RT-PCR reaksiyonları için Sybr Green I 2x Master Mix (#04707516001, ROCHE) kullanılmıştır. Reaksiyonlar 13µl hacim için optimize edilmiş ve 96 well plate (LightCycler480 Multiwell Plate 98, White, Roche, #04729692001) kullanılarak kurulmuştur. Tüm reaksiyonlar önceden temizlenmiş ve PCR için ayrılmış Class II kabinlerde (ESCO) hazırlanmış ve kontaminasyon olasılığının önüne geçilmiştir. Her bir örnek 3 tekerrür içermektedir. Reaksiyon karışımının içeriği çizelge 4.5 ve reaksiyon koşulları çizelge 4.6’da verilmiştir.

Çizelge 4.5. RT-PCR reaksiyon karışımı

Bileşen	Miktar (1x)
2x Master mix	6,5 µl
Primer L. (10µM)	0,4 µM
Primer R. (10µM)	0,4 µM
H <sub>2</sub> O	13 µl’ye tamamlanır.
cDNA (1/50 dil.)	2 µl

Çizelge 4.6. Analizlerde kullanılan RT-PCR reaksiyon koşulları.

İşlem	Sıcaklık	Süre	Ramp değeri (°C/sn)
Denatürasyon	95 °C	10 dk	4
3-aşamalı amplifikasyon (40 döngü)	95 °C	20 sn	5
	60 °C	20 sn	4
	72 °C	20 sn	4
Melting Curve	65 °C	20 sn	4
	95 °C	20 sn	0.1

RT-PCR reaksiyonları yaprak numuneleri için Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü’nde bulunan LightCycler 480 (ROCHE), tane numuneleri için ise Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Tarbiyotek Laboratuvarı’nda yer alan CFX Connect 96 (BIORAD) sistemleri kullanılmıştır.

#### 4.5. KASP PCR Uygulamaları

KASP reaksiyonları için kullanılan primerler 113O061 ve 113O661 numaralı TÜBİTAK 1003 projesi kapsamında transkriptom analizi yapılan gen içi SNP’ler üzerinden tasarlanmıştır. Reaksiyon koşullarının oluşturulması için KASP V4.0 2X Master mix (KBS-1016-002, LGC Group) kullanılmıştır. Reaksiyon koşullarının gerektirdiği reaksiyon karışımı taranacak primer sayısı fazla olduğundan maliyeti düşürmek adına FRET primerler sentez ettirilip (SENTEGEN,

Ankara) haricen hazırlanmış ve reaksiyonlara eklenmiştir. Çalışmada kullanılan primerlerin isim listesi ve temsil ettikleri özellikler çizelge 4.7’de, primer sekansları EK 3’de sunulmuştur.

Çizelge 4.7. Kullanılan primer setlerinin temsil ettiği özellikler.

Primer Seti Adı	Temsil Edilen Özellik	
	Atay 85	Zubkov
1	-	Kuraklık
2	-	Kuraklık
3	-	Kuraklık
4	-	Kuraklık
5	-	Kuraklık
6	-	Sıcaklık
7	-	Sıcaklık
8	-	Sıcaklık
9	-	Sıcaklık
10	-	Sıcaklık
11	-	Sıcaklık
12	-	Sıcaklık
13	-	Kuraklık + Sıcaklık
14	-	Kuraklık + Sıcaklık
15	-	Kuraklık + Sıcaklık
16	Kuraklık	-
17	Kuraklık	-
18	Kuraklık	-
19	Kuraklık	-
20	Sıcaklık	-
21	Sıcaklık	-
22	Kuraklık + Sıcaklık	-
24	Kuraklık + Sıcaklık	-
25	-	Kuraklık
26	-	Kuraklık
27	-	Kuraklık
29	-	Sıcaklık
30	-	Sıcaklık
31	-	Kuraklık + Sıcaklık
32	-	Kuraklık + Sıcaklık
33	-	Kuraklık + Sıcaklık
34	Kuraklık	-
35	Kuraklık	-
36	Kuraklık	-
37	Sıcaklık	-
38	Sıcaklık	-
39	Sıcaklık	-
40	Kuraklık + Sıcaklık	-
41	Kuraklık + Sıcaklık	-

Primer setlerinin tamamı buğday genomunda optimizasyonu rapor eden makaleye (110) bağlı kalınarak sulandırılmış ve reaksiyon karışımları hazırlanmıştır.

İki set halinde teslim edilen (1-24 ve 25-41) primer setleri sıcaklık ve reaksiyon optimizasyonu öncesi Atay 85 ve Zubkov bireylerinde sinyal durumu incelenmesi amacıyla KASP reaksiyonuna alınmıştır. Reaksiyonlar çizelge 4.8’ de açıklandığı şekilde kurulmuştur.

Çizelge 4.8. KASP reaksiyon karışımı

2x KASP Master Mix	5 µl
Reaksiyon karışımı (11,5 µl ddH <sub>2</sub> O + 7,7 µl ortak reverse primer + 3 µl FRET Primer /Her biri)	0,14 µl
DNA (10 ng/ µl)	5 µl
<b>Toplam</b>	<b>10,14 µl</b>

Reaksiyon için kit tarafından önerilen sıcaklık ve döngü değerleri çizelge 4.9’ deki gibidir.

Çizelge 4.9. KASP reaksiyonu döngüleri

Enzim aktivasyonu	94°C	15 dk	1 döngü
PCR 1	94°C	20 sn	10 döngü
	61-55°C touchdown	1 dk	
PCR 2	94°C	20 sn	26 döngü
	55°C	1 dk	
Okuma	37°C	1 dk	1 döngü

Sonuçlarda herhangi bir sinyal (Allel 1, Allel 2 ya da her iki allel) veren primerlerin sıcaklıklarının belirlenmesi için optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Primerlerin ideal bağlanma sıcaklıklarının belirlenebilmesi için 55-63°C sıcaklıklar arasında gradient PCR reaksiyonları kurulmuştur. Kabul edilebilir PCR ürünü veren ve sinyal oluşturan primer setlerinin PCR 1 döngüsünde yer alan touchdown aşamasının optimizasyonu için belirlenen bağlanma sıcaklıklarının üzerine 5, 8 ve 10°C eklenerek denemeler yapılmıştır. Tüm PCR ürünleri %2’lik agaroz jel elektroforezine tabi tutularak görüntülenmiştir.

Uygun sıcaklıklar belirlendikten sonra seçilen primerlerle KASP reaksiyonları kurulmuş, allel ayrımları belirlenmiş, allelik dağılım haritaları incelenerek primerlerin performansları ve işlevsellikleri incelenmiştir.

Bazı primerlerin KASP reaksiyonları sonucunda bağlantılı floresans birimi (Relative fluorescence unit - RFU) değerlerinin düşük çıkması nedeniyle çeşitli modifikasyonlar denenmiştir.

#### **4.6. Fizyolojik Analizler**

Tez çalışması kapsamında bitkilerde belirli aralıklarla fotosentez etkinliği ölçülmüş, klorofil tayini yapılmış ve 14. gün toplanan örneklerde prolin analizi yapılmıştır.

##### **4.6.1. Fotosentez Etkinliğinin Belirlenmesi**

Döllenmeden sonra yüksek sıcaklık, kuraklık ve hem yüksek sıcaklık hem de kuraklık stresi uygulanan ekmeklik buğday çeşitleri ile bunların kontrollerinde fotosentez etkinliği stres uygulamasından sonraki 4., 9. ve 14. günlerde belirlenmiştir. Bitkilerin fotosentez etkinliği ölçümleri taşınabilir fotosentez metre (LCi-SD, ADC Bio Scientific) ile yapılmıştır. Ölçümler her bir uygulama için daha önceden belirlenmiş 4 saksıda 2 ana sapın bayrak yaprağında yapılmıştır. Fotosentez etkinliği ölçümleri sabah saatlerinde 9:30 ile 12:30 saatleri arasında gerçekleştirilmiştir. Ancak fotosentez etkinliği ölçümleri kabin içerisindeki bitkiler üzerinde yapılması nedeniyle açık havada yetiştirilen bitkilere göre daha düşük değerler ölçülmüştür. Stres uygulamasının 15. gününden sonraki dönemlerde özellikle kuraklık+sıcaklık stresinin uygulandığı bitkilerin yapraklarında yoğun kurumalar gözlemlendiğinden dolayı fotosentez etkinliği ölçümü yapılamamıştır.

##### **4.6.2. Klorofil Miktar Tayini**

Döllenmeden sonra yüksek sıcaklık, kuraklık ve kuraklık+sıcaklık stresi uygulanan ekmeklik buğday çeşitleri ile bunların kontrollerinde klorofil miktarı, stres uygulamasının hemen öncesinde ve takip eden 5 gün aralıklarla 4 dönemde ölçülmüştür. Ölçümler Konica Minolta markalı SPAD-502 Plus klorofil metre cihazı ile yapılmıştır. Stres uygulamasının 15. gününden sonraki dönemlerde özellikle yüksek sıcaklık ve kuraklık stresinin birlikte uygulandığı bitkilerin yapraklarında yoğun kurumalar gözlemlendiğinden klorofil miktarı tayini yapılamamıştır. Ölçümler her bir saksıda işaretlenmiş olan 4 bitkinin ana sapına ait bayrak yaprağında yapılmıştır. Ölçüm yapılan yaprağın en az 5 farklı noktasından ölçümler alınmış ve ortalamaları ölçüm değeri olarak kabul edilmiştir.

### 4.6.3. Prolin Tayini

Prolin analizi 113O661 numaralı TÜBİTAK projesi kapsamında da tamamlanması gerektiğinden tüm materyal proje yürütücüsüne sağlanmış ve analizler Düzce Üniversitesi'nden Yard. Doç. Dr. Yakup ÇIKILI tarafından yapılarak sonuçlar sunulmuştur. Kullanılan protokol aşağıdaki gibidir.

Prolin ekstraksiyonu ve tayini Bates ve arkadaşlarının protokolüne (111) sadık kalınarak yapılmıştır. 0,5 gram yaprak 5 ml %3 sülfosalisilik asit içerisinde homojen hale getirildikten sonra Whatman No:2 filtre kâğıdından süzölmüştür. Filtratın 1 mililitresi cam bir test tüpüne aktarılmış ve üzerine 1 ml asit ninhidrin (1,25 gram ninhidrin 30 ml glasiyel asetik asit içerisinde homojen hale getirilir) eklenmiştir. Karışım 100°C'deki su banyosunda 1 saat bekletilmiş ve ardından buza gömölerek reaksiyon durdurulmuştur. Soğumakta olan tüplere 4 ml tolüen eklenmiş ve 15 -20 saniye süre ile vortekslenerek karıştırılmıştır. Faz oluşumunu takiben prolin içeren faz absorbansın okunması için kuvars küvetlere alınmış ve 520 nm dalga boyunda okutulmuştur. Aynı prosedür kör (blank) okumalar için de 2 ml tolüen ile tekrarlanmıştır. Standart eğrinin hazırlanması için 2 ml tolüende çözülmüş 10, 20, 40, 50 µg prolin içeren örnekler hazırlanmıştır.

Prolin miktarının hesaplanmasında aşağıdaki formül kullanılmıştır:

$$\text{Prolin } (\mu\text{mol})/ \text{ g taze ağırlık} = [(\mu\text{g prolin/mL} \times \text{mL tolüen})] / [115.5 \mu\text{g}/\mu\text{mol}] / [(g \text{ örnek}/5)]$$

### 4.6.4. Nişasta ve Şeker Analizleri

#### 4.6.4.1. Nişasta Analizleri

Stres koşullarından etkilenerek ifadesinde değişmeler oluştuğu anlaşılan nişasta biyosentez genleri ile yapılan Real time PCR analizlerinin doğrulaması amacıyla çeşitli dönemlerde alınan numunelerden nişasta miktar analizi yapılmıştır. Nişasta analizleri amiloglukozidaz/ $\alpha$ -amilaz yöntemini kullanan Total Starch Assay Kit (K-TSTA 09/14, Megazyme, İrlanda) kullanılarak yapılmıştır.

Kitin çalışma prensibi total nişastanın glukoza kadar parçalanarak renk tepkimesine girmesi şeklindedir. Nişasta  $\alpha$ -amilaz enzimi ile muamele edilerek maltodekstrinlere parçalanır. Bu reaksiyonu takiben ortama amiloglukozidaz enzimi eklenerek maltodekstrinler D-glukoza



parçalanır. D-glukozun hidrojen peroksit varlığında D-glukonat formuna oksitlenmesi ve peroksidaz varlığında renk reaksiyonu oluşturması temeline dayanır.

Kit protokolleri incelenip örneklere uygun hale getirilmek için hacimler yeniden düzenlenmiştir.

Kullanılan protokol aşağıdaki gibidir:

- 1- 10-15 mg arası öğütülmüş örnek tüplere eklenmiştir. Her bir numune tartılarak not edilmiştir.
- 2- Üzerlerine 10 µl %80 etanol eklenip, tüpler tüm örneklerin dipte toplanması için 20 saniye 10000 rpm hızda çöktürülmüştür.
- 3- Dipte toplanan örnekler vorteks ile homojen şekilde karıştırılmıştır.
- 4- Tüplere 300 µl α-amilaz (şişe 1) eklenip vorteks ile karıştırıldıktan sonra 12 dakika kaynar suda bekletilmiştir. Her 4 dakikada bir vorteks ile karıştırılmıştır.
- 5- Örnekler 50°C'ye alınıp, üzerlerine 10 µl amiloglukozidaz (şişe 2) eklenip kısa süreli vorteks ile karıştırıldı. 30 dakika 50°C'de inkübe edilmiştir.
- 6- Örneklerin üzerine 670 µl distile su eklenip 3000 rpm hızda 10 dakika çöktürülmüştür.
- 7- Süpernatant yeni tüplere aktarıldıktan sonra saf su ile 1:10 seyreltilmiştir.
- 8- Yeni tüplere 50 µl örnek, 1,5 ml GOPOD kimyasalı eklendikten sonra örnekler 50°C'de 20 dakika bekletilmiştir. İnkübasyon sürecinde hesaplamalar için kör okuma (50 µl su + 1,5 ml GOPOD) ve glukoz standardı (1 mg/ml stoktan 50 µl + 1,5 ml GOPOD = 50 µg) hazırlanmıştır.
- 9- 510 nm dalga boyunda kör okuma ile cihaz kalibrasyonu yapıldıktan sonra tüm örneklerin absorbans değerleri okunmuştur. Tüm örnekler için (tekerrürler dâhil) her bir örnek 2 defa hazırlanıp okutulmuştur.
- 10- Hesaplama formülü kullanılıp tüm örnekler için yüzde nişasta içeriği bilgisi elde edilmiştir.

#### **4.6.4.2. Amiloz Miktar Tayini**

Amiloz, iyodin kimyasalı ile her 6 alt birimlik helikal yapıda bir kompleks oluşturur (Şekil 4.6). Bu reaksiyon güçlü bir mavi rengin ortaya çıkmasına neden olur. Amilopektin yüksek dallanmaya sahiptir ve bu tip kompleksler oluşturamaz. Bu nedenle mor-kırmızı bir renk oluşumu gözlemlenir (112).

Stres koşullarının amiloz / amilopektin oranını nasıl etkilediğini araştırmak için hasat sonrası örneklerde iyodin testi yapılmıştır. Akademik yayınlarda bulunan iyodin yöntemleri (113,114) incelenmiş ve bir protokol çıkartılmıştır.

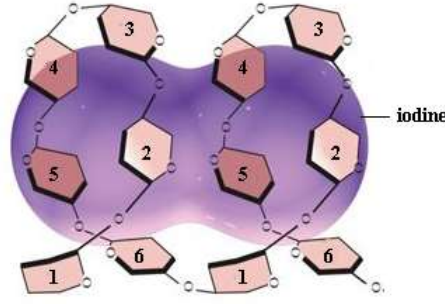
Geliştirilen protokol aşağıdaki gibidir:

- 1- 4 farklı bitkiden rastgele 5'er tane olmak üzere toplanan 20 adet buğday tohumu, embriyoları uzaklaştırıldıktan sonra sıvı azotta iyice öğütülüp 15 ml'lik falkon tüplere aktarılmıştır.
  - i. Bu tüpler numunelerin nem oranlarının eşitlenmesi amacıyla 2 gün oda sıcaklığında kapakları açık olarak bekletilmiştir.
- 2- Cam tüplere (50 ml'lik) 50 mg numune tartılmış dip kısma toplanmıştır.
  - i. Amiloz ve amilopektin standart örneği de (1mg/ml) aynı aşamada başlatılmıştır.
- 3- Üzerlerine 500 µl %95 Etanol eklenmiştir. Örnekler vorteks ile iyice karıştırılmıştır.
- 4- Üzerlerine 4,5 ml 1N NaOH eklenmiş ve tüpler elle hafif çalkalandıktan sonra 15-24 saat oda sıcaklığında, kapakları kapatılarak inkübasyona alınmıştır.
- 5- Süre dolduktan sonra saf su ile 50 ml'ye tamamlanmıştır.
- 6- 50 ml'lik temiz cam tüplere 25 ml saf su eklenmiştir.
- 7- Standart ve örnek numunelerinden her bir tüpe 2,5 ml eklenmiştir. Kör okuma için 2,5 ml 0,09N NaOH eklenmiştir.
- 8- 500µl 1N asetik asit eklenmiş, tüpler karıştırılmıştır.
- 9- 1 ml iyodin solüsyonu (distile suda %0,2 I<sub>2</sub> + %2 KI) tüplere eklenmiştir.
- 10- Örnekler saf su ile 50 ml'ye tamamlanmıştır (21 ml saf su eklenmiştir). İyice karıştırılan tüpler oda sıcaklığında 20 dakika bekletilmiştir.
- 11- Amiloz için spektrofotometrik okumalar 620 nm dalga boyunda yapılmıştır.
- 12- Tüm çalışmalar duplike olarak yapılmıştır.

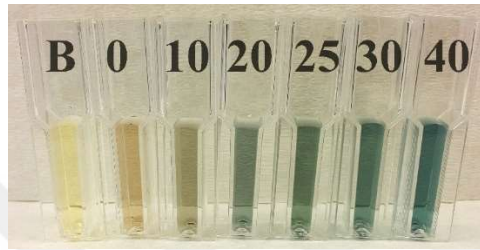
Amiloz oranı tayini için gerekli standartlar çizelge 4.10'deki gibi hazırlanmıştır (Şekil 4.7).

Çizelge 4.10. Amiloz tayininde kullanılan standart çözeltilerin hazırlanması.

Standart karışımı için eklenen hacimler (ml) ( toplam 10 ml / her biri)			
% Amiloz	1 mg/ml amiloz	1 mg/ml amilopektin	0,09 N NaOH
0	-	7	3
10	1	6	3
20	2	5	3
25	2,5	4,5	3
30	3	4,	3
40	4	3	3



Şekil 4.6. Amiloz zincirleri iyodin molekülünü 6'lı helikal yapıda sararak güçlü kompleksler oluşturur. Bu durum mavi renk açığa çıkmasına neden olur.



Şekil 4.7. Amiloz miktar tayini için hazırlanan kör okuma ve standart örneklerin renk farklılıklarını belirtir görsel. B: Kör okuma, 0-40: Hazırlanan standart numunelerin % amiloz içeriklerini göstermektedir.

#### 4.6.4.3. Şeker Analizleri

Şeker analizleri Sucrose, D-Fructose and D-Glucose Kit (K-SUFRG 06/14, Megazyme, İrlanda) kullanılarak yapılmıştır. Kitin çalışma prensibi sukrozun invertaz ( $\beta$ -frukozidaz) enzimi ile parçalanmasıdır. Parçalanma öncesi ve sonrası ortamda bulunan D-glukoz miktarlarının hesaplanmasıyla sukroz içeriği öğrenilir. Kullanılan protokol ve ön hazırlığı aşağıdaki gibidir.

#### Ön hazırlık:

- 1- Embriyoları çıkartılan ve tartılan 3 adet buğday tanesi 300 µl HEPES-NaOH (pH: 7.0) tampon içerisinde ezilmiştir. Vorteks ile iyice homojenize edildikten sonra 12.000 rpm, +4°C'de 10 dakika çöktürülmüştür.
- 2- Süpernatant fazı yeni tüpe aktarıldıktan sonra pellet yine 300 µl HEPES-NaOH (pH: 7.0) ile homojen hale getirilip 12.000 rpm, +4 °C'de 10 dakika çöktürülmüştür. Pellet atılmadan, içerisine 1 ml %80 etanol eklenerek -20°C'de saklanmıştır.
- 3- Önceki süpernatant ve yeni süpernatant birleştirilmiş 100°C'de 10 dakika kaynatılmıştır. Süre tamamlandıktan sonra 5 dakika oda sıcaklığına gelmesi beklenmiştir.
- 4- Oda sıcaklığında ve 15.000 rpm'de 10 dakika çöktürülmüştür.
- 5- Süpernatant yeni bir tüpe aktarıldıktan sonra 120 µl/tüp şeklinde tüplere ayrılarak -20°C'de saklanmıştır.

#### Şeker tayini protokolü:

Kitin standardını oluşturmak için 0-50-100-200 µg/ml sukroz serisi hazırlanmıştır.

Bütün okumalar 340 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir. Kör okuma havaya karşı yapılmıştır.

- 1- Taneden izole edilen sukroz örneğinden spektrofotometre küvetine 100 µl eklenmiştir.
- 2- Üzerine 200 µl solüsyon-6 (β-frukozidaz) eklenmiş ve karıştırılmıştır. 5 dakika 25-30 °C'de bekletilmiştir. Solüsyon-6 şişesi numunelere eklenmeden önce 25 °C'ye ısıtılmıştır.
- 3- Ardından sırasıyla 1,9 ml distile su, 100 µl solüsyon-1 (tampon), 100 µl solüsyon-2 (NADP<sup>+</sup>/ATP) eklenmiştir. Küvet ters düz edilerek karıştırılmış ve 3 dakika beklemeye bırakılmıştır. Süre tamamlanınca spektrofotometrede okuma yapılmıştır. (A1)
- 4- Üzerine 20 µl süspansiyon-3 (HK/G6P-DH) eklenmiştir. Ters düz edilerek karıştırılmış ve 5 dakika beklemeye bırakılmıştır. Süre tamamlandığında okuma yapılmıştır (A2). Reaksiyonun durduğundan emin olmak için 2 dakika arayla kontrol edilmiştir. Absorbans değerlerinin sabitlendiği nokta kesin sonuç olarak alınmıştır.

Sukroz analizleri 14. gün toplanan numunelerde ve hasat sonrası numunelerinde yapılmıştır.

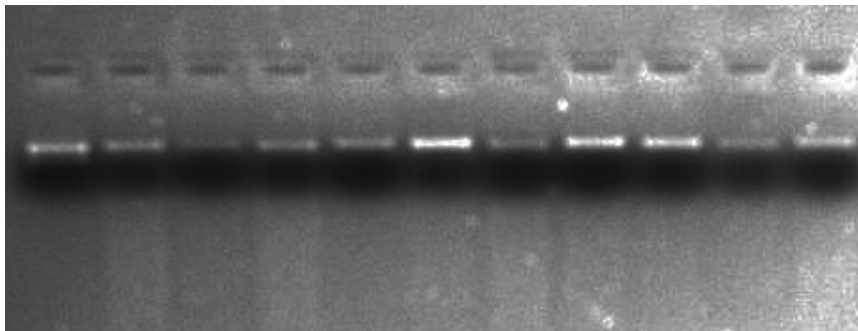
## 5. ARAŞTIRMA BULGULARI

### 5.1. Stres Uygulamalarının Etkileri

Tez kapsamında stres uygulamalarına tabi tutulan bitkilerde 15. günden itibaren gözle görülen farklılıklar ortaya çıkmaya başlamıştır. Kuraklık ve yüksek sıcaklık streslerinin kombine uygulandığı bitkilerde bayrak yaprak 15. gün itibariyle hızla kurumaya başladığından ölçümler alınamamıştır. Kontrol ve kuraklık uygulamalarında bitkilerin 25 güne kadar ölçüm yapılabilecek düzeyde yeşil aksamalarını koruduğu, yüksek sıcaklık uygulaması ile yüksek sıcaklık ve kuraklık kombinasyonunda bitkilerin 15-17 gün arası tüm yeşil aksamalarını kaybettikleri, hızla tohum oluşumuna gittikleri gözlemlenmiştir.

### 5.2. DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu optimizasyon çalışmalarında tamponların tuz içeriğinin, bitkilerin yaprak yapısının (lifli, damarlı), gelişim evrelerinin izolasyon sonucunu etkilediği gözlemlenmiş olup bu nedenle (104) izlenen yöntemde çeşitli değişiklikler yapılmıştır. İzolasyon tamponuna ProteinazK eklenmiş, 2-merkaptoetanol oranı artırılmış, sodyum bisüfit tuzları çıkartılmıştır. Bu içerik değişikliklerine ilave olarak yıkama sayısı ve protokolda bazı basamakların yeri değiştirilip materyal metot kısmında sunulan protokol elde edilmiştir. Sonuç olarak yüksek miktar ve saflıkta DNA elde edilmiştir. Örnek çokluğu nedeniyle DNA numunelerinden rastgele seçilen 11 tanesi 1/50 oranında seyreltilip okuma doğruluğu ve materyal kalitesinin kontrolü amacıyla %1' lik agaroz jel elektroforezine tabi tutulmuştur. Elektroforez sonucunda tüm örneklerin analizlerde kullanılmaya uygun olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 5.1).



Şekil 5.1. İzole edilen DNA numuneleri 1/50 oranında seyreltilip agaroz jel elektroforezinde yürütülerek kalite kontrolü yapılmıştır.

SNP markörlerin işlevselliğinin doğrulanması amacıyla 113O661 numaralı TÜBİTAK projesi kapsamında Zubkov X Atay 85 hibritlerinden elde edilen double haploid çeşitlerden DNA izolasyonu yapılmıştır. DNA izolasyonu sonucu örneklerin miktar ve kalitelerini gösteren nanodrop ölçüm sonuçları çizelge 5.1’de verilmiştir. Tüm numunelerden KASP analizlerinde kullanılmak üzere 10 ng/µl konsantrasyonunda çalışma örnekleri hazırlanmıştır.

Çizelge 5.1. Zubkov X Atay 85 melezlerinden elde edilen double haploid bitkilerden DNA izolasyonu sonuçları.

Örnek adı	ng/µl	260/280	260/230
2x3	1259	1,81	1,89
18x1	977	1,8	1,86
19x4	670	1,81	1,7
19x5	779	1,76	1,82
20x1	1690	1,87	2
20x6	548	1,7	1,76
19x1	2522	1,79	2,18
20x2	2573	1,77	2,22
20x4	3192	1,76	2,18
22x2	3175	1,79	2,02
20x3	1726	1,86	2,14
Atay 85	2274	1,8	2,8
Zubkov	2050	1,85	2,15
20x5	1404	1,78	2,09
1x3	2140	1,78	2,11
18x2	1756	1,8	2,14
19x2	2350	1,93	2,18
1x5	2525	1,91	2,1
2x2	2228	1,96	2,16

Markör taramalarında kullanılmak üzere yetiştirilen melez bitkiler saksılara numara verilmek suretiyle gruplandırılmış, saksılarda yetişen ana bireylerden numuneler alınmıştır. Tüm melezler Atay 85 ve Zubkov çeşitlerinin F6 düzeyindeki hatlarla çaprazlanmasıyla elde edilmiştir. DNA izolasyonu sonucu nanodrop ölçümleri çizelge 5.2’de verilmiştir.

Çizelge 5.2. Melez bitkilerden DNA izolasyonu sonucu numune miktar ve saflığını gösterir tablo. A: Atay 85, Z: Zubkov çeşitlerini temsil etmektedir. Tablonun devamı bir sonraki sayfadadır.

Melez ADI	Numune Adı	ng/ul	260/280	260/230
	1-1	2017,46	1,95	2,31
	1-2	1334,77	1,96	2,03
<b>16351xZ (1)</b>	1-3	1651,32	1,91	2,14
	1-4	1068,64	1,97	2,07
	1-5	780,85	1,99	2,02
	2-1	1138,97	1,97	2,05
<b>16351XA(2)</b>	2-2	1423,54	1,93	2,13
	2-3	1582,19	1,97	2,12
	3-1	916,44	1,99	2,06
<b>16351XZ(3)</b>	3-2	1277,57	1,94	2,06
	3-3	722,59	1,96	1,94
	3-4	1333,91	1,99	2,14
	4-1	961,44	1,99	2,02
<b>2951XA(4)</b>	4-2	1158,83	1,95	2,03
	4-3	1337,28	1,95	2,07
	5-1	1502,15	1,99	2,1
<b>16351XZ(5)</b>	5-2	1381,96	2,02	2,15
	5-3	1282,96	1,97	2,1
	6-1	1959,33	1,97	2,05
<b>2951XA(6)</b>	6-2	1220,66	1,97	2,03
	6-3	1704,42	1,89	2,07
<b>7751XA(7)</b>	7-1	745,03	1,94	1,98
<b>2851XA(8)</b>	8-1	1179,26	1,99	2,07
<b>6351XA(9)</b>	9-1	1810,39	1,98	2,14
	9-2	1130,86	1,94	2,08
	10-1	885,15	1,98	2,08
<b>5201XZ(10)</b>	10-2	1171,5	1,89	2,14
	10-3	1299,87	1,97	2,02
	10-4	801,19	1,97	2,02
	11-1	1310,96	1,97	1,98
<b>ZXA(11)</b>	11-2	1532,37	1,97	2,13
	11-3	1382,68	1,96	2,15
	12-1	1127,69	1,98	2,1
<b>5201XZ(12)</b>	12-2	1700,54	1,93	2,18
	12-3	1821,41	1,99	2,11
	12-4	1759,87	1,94	2,16
	13-1	2046,2	1,98	2,15
<b>AXZ(13)</b>	13-2	1510,36	1,98	2
	13-3	1065,36	1,98	2,12
	13-4	695,17	1,89	2,05
	14-1	918,17	1,97	1,98
<b>ZXA(14)</b>	14-2	1441,46	2,01	2,11
	14-3	825,5	1,94	1,97
	14-4	1059,55	1,99	2,07
	15-1	1035,04	1,98	2
<b>16701XZ(15)</b>	15-2	1224,78	1,91	2,21
	15-3	1169,45	1,88	2,12
	17-1	1823,21	1,96	2,13
<b>ZXA(17)</b>	17-2	1398,68	1,98	2,14
	17-3	1568,23	1,98	2,13
	18-1	1455,86	1,9	2,14
<b>AXZ(18)</b>	18-2	1130,81	1,96	2,05

Melez ADI	Numune Adı	ng/ul	260/280	260/230
	18-3	1470,69	1,96	2,07
	19-1	1483,66	1,99	1,97
<b>6601XZ(19)</b>	19-2	1160,77	1,99	2,06
	19-3	1347,58	1,97	2,07
	19-4	1099,72	1,99	1,88
<b>16501XA(20)</b>	20-1	1153,44	1,98	2,07
	21-1	1389,75	1,97	2,1
<b>2951XA(21)</b>	21-2	1647,67	1,99	2,15
	21-3	1346,7	1,99	20,8
	22-1	1497,99	1,86	2,16
<b>3801XA(22)</b>	22-2	717,69	1,96	1,99
<b>2551XA(23)</b>	23-1	1135,04	1,83	2,13
	23-2	1527,12	1,96	2,11
	24-1	669,42	1,98	2,12
<b>6601XZ(24)</b>	24-2	1082,9	1,96	2,06
	24-3	1690,23	1,99	2,16
	24-4	1970,78	1,97	2,13
	25-1	1098,36	2	2,06
<b>2551XA(25)</b>	25-2	925,73	1,97	2,02
	25-3	1432,54	1,96	2,11
	25-4	693,72	1,98	1,93
<b>6601XZ(26)</b>	26-1	923,5	1,96	2,03
	26-2	872,36	1,97	1,99
<b>AXZ(27)</b>	27-1	832,54	1,97	2,01
	27-2	1781,6	1,89	2,18
	27-3	1422,97	1,91	2,14
<b>16701XZ(28)</b>	28-1	960,84	1,93	2,12
	28-2	883,94	1,98	1,98
	28-3	1759,1	1,9	2,11
<b>2551XA(29)</b>	29-1	735,68	1,92	1,89
	29-2	1864,9	1,99	2,16
<b>6351XA(30)</b>	30-1	1020,9	1,92	2,09
	30-2	878,2	1,97	1,98
	31-1	2066,06	1,89	2,19
<b>AXZ(31)</b>	31-2	1545,57	1,97	2,13
	31-3	728,47	1,94	1,95
	31-4	1735,62	1,88	2,18
<b>5651XA(32)</b>	32-1	459,72	1,95	1,86
	33-1	718,84	1,97	2,06
<b>15901XZ(33)</b>	33-2	1641,27	1,97	2,3
	33-3	271,57	1,93	1,67
	33-4	1652,75	1,97	2,11
<b>2551XA(34)</b>	34-1	1912,67	1,99	2,16
	34-2	795,04	1,97	1,97
	35-1	1030,13	1,98	2,07
<b>16501XA(35)</b>	35-2	856,11	1,98	1,99
	35-3	826,48	1,98	2
	35-4	728,6	1,95	1,95
<b>AXZ(36)</b>	36-1	939,42	1,97	1,97
	36-2	2007,48	1,94	2,08
	37-1	1234,63	1,97	1,98
<b>ZXA(37)</b>	37-2	711,55	1,99	1,95
	37-3	1615,54	1,91	2



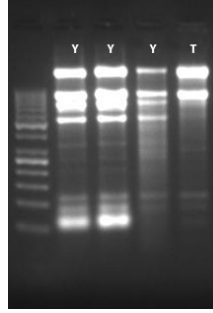
### 5.3. RNA İzolasyonu

RNA izolasyonunun optimizasyon çalışmaları sonucu materyal yöntem kısmında belirtilen yöntemler kullanılmış ve çizelge 5.3’de verilen değerler elde edilmiştir.

Çizelge 5.3. RNA izolasyonu, DNaz uygulaması ve saflaştırma sonrasında numunelerin miktar ve kalite tayinlerini gösterir tablo. A: Atay 85, Z: Zubkov, NS: kontrol, NK: kuraklık, YS: sıcaklık, YK: kuraklık+sıcaklık uygulamasını gösterir. 7-14-21 rakamları örneklemelerin yapıldığı dönemi belirtmektedir.

Tane	ng/ul	260/280	260/230
A-7-NS	675,79	2,12	1,66
A-7-NK	572,99	2,11	2,1
A-7-YS	364,46	2,13	2,24
A-7-YK	438,14	2,08	2,13
Z-7-NS	923,5	2,05	1,99
Z-7-NK	430,78	2,14	2,08
Z-7-YS	789,54	2,16	2,15
Z-7-YK	625,01	2,14	2,06
A-14-NS	1228,38	2,13	1,98
A-14-NK	261,18	2,08	2,13
A-14-YS	746,51	2,11	2,24
A-14-YK	801,27	2,09	2,01
Z-14-NS	1129,79	2,12	1,98
Z-14-NK	1275,32	2,12	1,92
Z-14-YS	918,71	2,12	2,14
Z-14-YK	1911,78	2,09	2,07
A-21-NS	422,68	2,1	2,1
A-21-NK	882,46	2,13	2,24
A-21-YS	1085,38	2,17	2,01
A-21-YK	554,92	2,16	1,91
Z-21-NS	423,48	2,12	2,02
Z-21-NK	718,36	2,14	2,17
Z-21-YS	851,96	2,14	2,14
Z-21-YK	390,35	2,06	1,98
<b>Yaprak</b>	<b>ng/ul</b>	<b>260/280</b>	<b>260/230</b>
ANS	538,07	2,11	1,92
ANK	910,36	2	1,98
AYS	455,54	2,13	2,13
AYK	334,28	2,04	2,04
ZNS	1139,82	2,11	2,11
ZNK	637,02	2,16	2,16
ZYS	545,62	2,13	2,13
ZYK	593,99	2,12	2,12

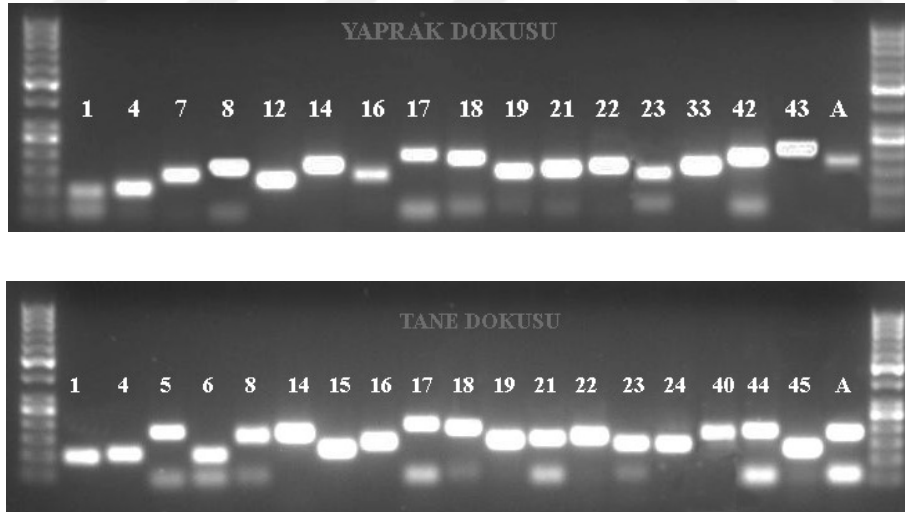
Tane ve yaprak RNA numunelerinden rastgele seçilen 4 adedi MOPS ile hazırlanmış jelde yürütülüp kalitesi kontrol edilmiştir (Şekil 5.2). Örneklerde DNA kirliliği olmadığı ve analiz çalışmalarına uygun olduğu belirlenmiştir.



Şekil 5.2. Rastgele seçilen 4 adet RNA örneği agaroz jelde yürütülmüştür. Y: Yaprak, T: Tane DNA Ladder: 50 bç (EK 1).

#### 5.4. RT-PCR Primerleri, Reaksiyon Koşulları

Nişasta biyosentezinde yer alan genlerin ifadelerinin incelenmesi amacıyla çalışma kapsamında tasarlanan ve sentez ettirilen primer çiftleri işlevsellikleri bakımından kontrol edilmiştir (Şekil 5.3).



Şekil 5.3. Gen ifadesi analizlerinde kullanılan primerlerin agaroz jel elektroforezi görüntüleri, DNA Ladder: 50 bç.

Primerlerin isim karşılıkları, oluşan PCR ürünlerinin baz uzunlukları ve PCR ürünlerinin erime sıcaklıkları çizelge 5.4’de verilmiştir. PCR ürünlerinin erime sıcaklık grafikleri EK 2’de verilmiştir.

Çizelge 5.4. Gen ifadesi analizlerinde kullanılan primer setlerinin isim karşılıkları, PCR ürün boyutunu ve erime sıcaklığını gösterir tablo.

KODU	Gen Adı	PCR Ürünü Boyutu(bç)	Melting Temp °C (Ürün)
1	<i>AGPaz küçük alt birim</i>	97	78,5
4	<i>SS1</i>	104	83
5	<i>SS2a3</i>	150	87,5
6	<i>SS2a2</i>	100	85,5
7	<i>SS2c</i>	141	81,5-82
8	<i>SS3</i>	153	80,5
12	<i>SSS</i>	126	81
14	<i>SBE2</i>	168	79,5
15	<i>SBE2b</i>	118	78
16	<i>ISO1</i>	134	79
17	<i>ISO2</i>	199	78,5
18	<i>ISO3</i>	186	78-78,5
19	<i>PUL</i>	147	79,5
21	<i>SUCT2</i>	150	82,5
22	<i>SUCS1</i>	159	86,5
23	<i>SUCS2</i>	137	82,5
24	<i>SUCSc</i>	136	82
33	<i>GBSS II</i>	155	A: 81 – Z: 81,5
40	<i>ALPH_AMY</i>	183	81,5
42	<i>AGPaz büyük alt birim</i>	183	80,5
43	<i>SS3b</i>	102	78
44	<i>SUCS1</i>	185	
45	<i>GBSS I</i>	148	75
A	<i>ACTIN</i>	178	82

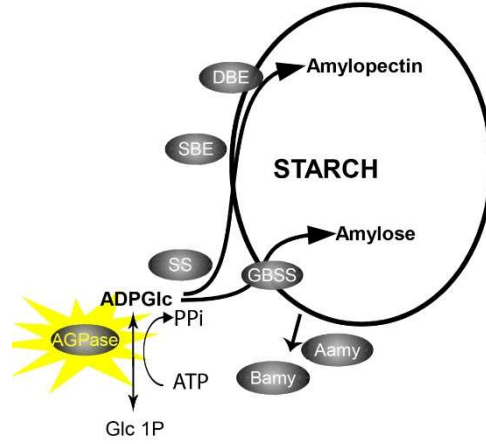
## 5.5. Nişasta Yolağında Yer Alan Genlerin Tane Dokusunda İfade Profilleri

Gen ifadesi profillemelerinde anlamlı eşik değeri olarak %50 ve üzeri farklılıklar dikkate alınmıştır.

### 5.5.1. AGPaz Gen İfade Profilleri

AGPaz enzimi nişasta biyosentezinde öncü enzimdir (Şekil 5.4). G-1-P’den ADP-glukoz kompleksini oluşturur. Bu kompleks de ilerleyen aşamalarda amiloz ya da amilopektine dönüşür. Buğday endospermünde AGPaz aktivitesinin büyük kısmı sitozoliktir. Bu kapsamda

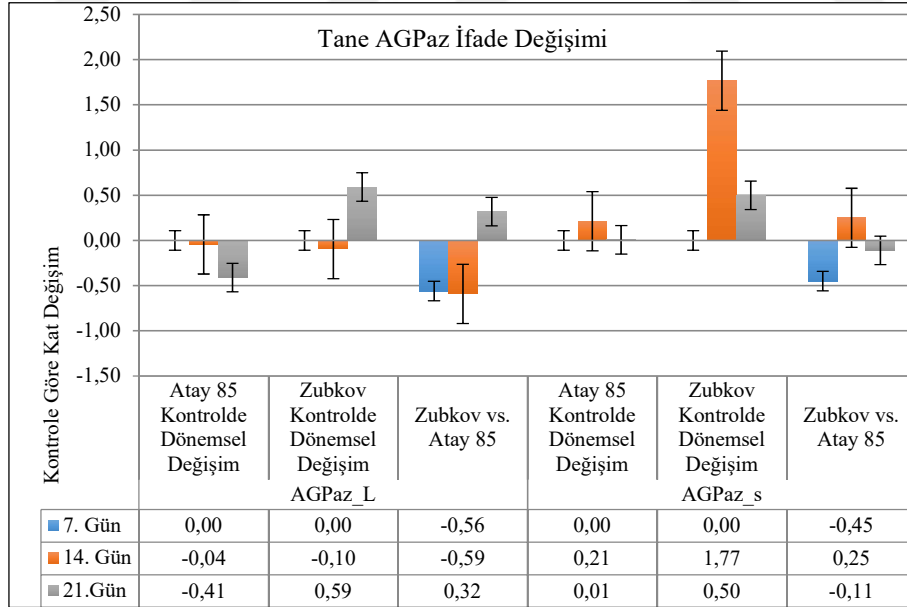
stres faktörleri altında bitkilerin tepkisinin incelenmesi amacıyla AGPaz enziminin büyük (AGPaz\_L) ve küçük (AGPaz\_s) alt birimlerini kodlayan genlerin ifadeleri araştırılmıştır.



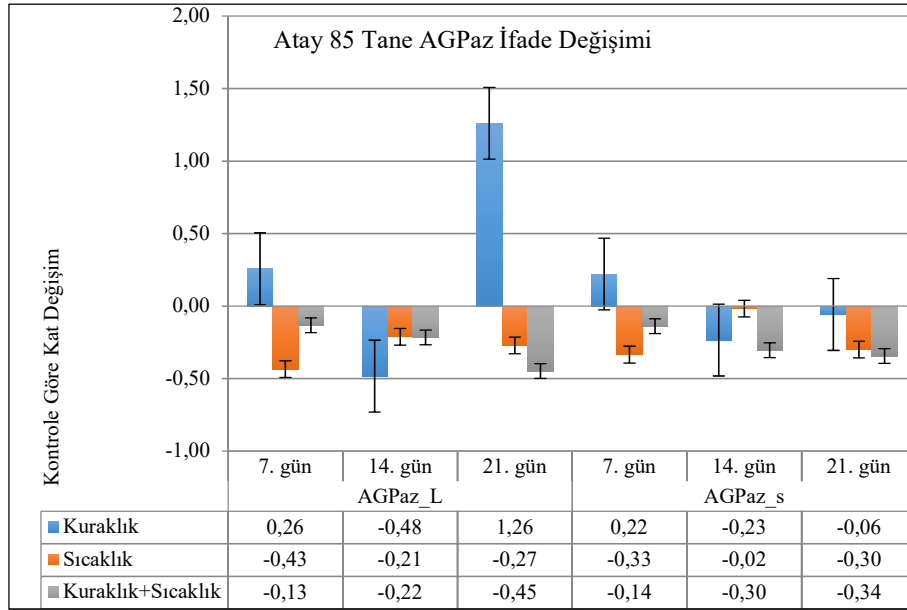
Şekil 5.4. Nişasta biyosentezinde AGPaz evresi.

AGPaz alt birimlerini kodlayan genlerin ifade profilleri öncelikle çeşitler arasında kontrol bireyleri üzerinden dönemlere göre incelenmiştir. Bu inceleme sonucuna göre büyük alt birimin (AGPaz\_L) Atay 85 çeşidinde gen ifadesinin 7. ve 14. gün örneklerinde Zubkov çeşidine göre %56 ve %59 oranlarında daha yüksek olduğu, 21. günde ise %32 daha az ifade gösterdiği belirlenmiştir. Kontrol bireyleri arasında ifade kıyaslamaları yapıldığında tohum gelişimi tamamlanana kadar olan süreçte her iki çeşitte ifadenin 14. günde aynı kaldığı, 21. günde Atay 85 çeşidinde %41 azalmaya karşın Zubkov çeşidinde %59 artış gösterdiği görülmüştür. Bununla beraber Atay 85 çeşidinde gen ifadesinin dönemsel azalan, Zubkov çeşidinde ise dönemsel artan bir grafik çizdiği belirlenmiştir (Şekil 5.5). Stres koşulları altında ifade incelendiğinde *AGPaz\_L* geninde Atay 85 çeşidinde sıcaklık ve kuraklık+sıcaklık streslerinin tamamında ifade düşüşü gözlenmiş olup, bu değerlerin kritik %50 sınırına ulaşmadığı görülmüştür. Kuraklık stresi uygulamasında 7. gün değişmeyen, 14. gün %48 azalma ile eşik sınıra yaklaşan, 21. günde ise %126 artış gösteren bir tepki oluşturmuştur (Şekil 5.6). Zubkov çeşidinde gen ifadesinin kuraklık stresinden olumsuz etkilenmediği, 7. gün örneklerinde %82, 14. gün örneklerinde %42 artış gösterirken, 21. gün örneklerinde eşik değere ulaşmayan %23 ifade düşüşü gözlenmiştir. Yalnızca sıcaklık içeren stres koşulunun Zubkov çeşidinde ifade düşüşlerine sebep olsa da kritik değeri %73 ile 21. gün örneklerinde gördüğü belirlenmiştir. Kuraklık+sıcaklık uygulamasında ise 7. ve 14. günlerde önemli ifade değişimleri gözlenmez iken, 21. günde %50 ifade düşüşü görülmüştür (Şekil 5.7).

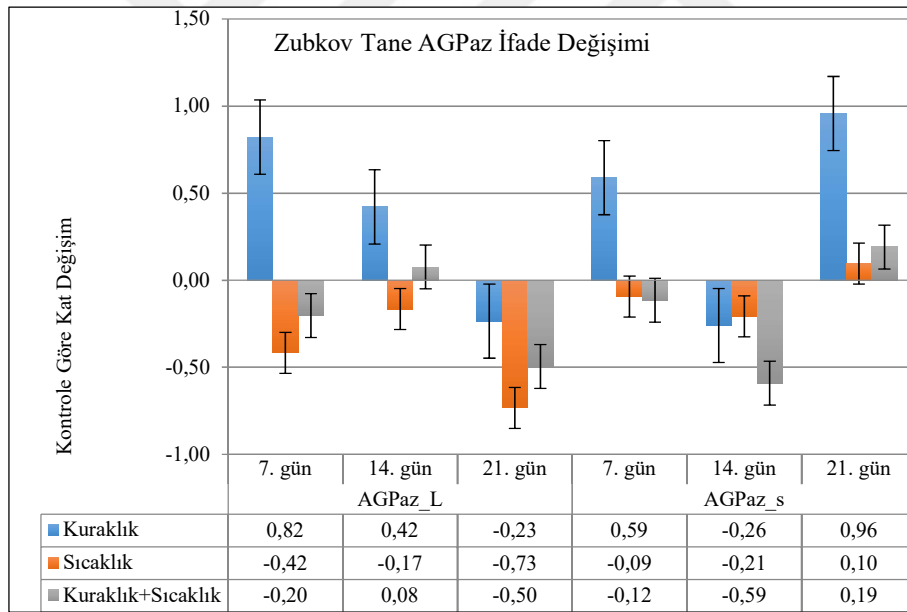
AGPaz küçük alt birimini kodlayan genin ifadesi öncelikle kontrol bireyleri arasında 7. 14. ve 21. günlerde kıyaslanmıştır. 7. gün kontrol bireylerinde Atay 85'in gen ifadesi Zubkov'dan %45 daha yüksek ölçülürken, 14. gün örneklerinde Zubkov %25 daha yüksek, 21. gün örneklerinde ise Atay 85 %11 daha yüksek ölçülmüştür. Her iki genotipin dönemsel ifade değişimleri incelendiğinde ikisinde de 14. günde artan, 21. günde ise azalan bir ifade sergiledikleri görülmüştür. Bu oranlar Atay 85 çeşidi için %50 sınırına ulaşmamışken, Zubkov çeşidinde 14. günde ifadenin 7. güne oranla %177 artış gösterdiği, 21. günde ise azalma göstermesine rağmen 7. günden %50 yüksek olduğu gözlenmiştir (Şekil 5.5). Stres uygulanmış örnekler incelendiğinde Atay 85 çeşidinde gen ifadesinin uygulama ve dönemden istatistiki açıdan önemli kabul edilecek düzeyde etkilenmediği görülmüştür (Şekil 5.6). Zubkov çeşidinde AGPaz küçük alt biriminin gen ifadesinin kuraklık stresinde 7. ve 21. günlerde sırasıyla %59 ve %96 ifade artışı gösterdiği, 14. günde ise önemsiz kabul edilen bir ifade düşüşü olduğu belirlenmiştir. Sıcaklık uygulaması içeren koşullarında ifadenin değişmediği, kuraklık+sıcaklık uygulamasında 14. günde kontrolün %59 ifade düşüşü gözlenirken diğer dönemlerde değişim olmadığı belirlenmiştir (Şekil 5.7).



Şekil 5.5. Tane dokusunda dönemler arası kontrol bireylerinde *AGPaz\_L* ve *APGaz\_s* genlerinin ifade kıyaslaması.



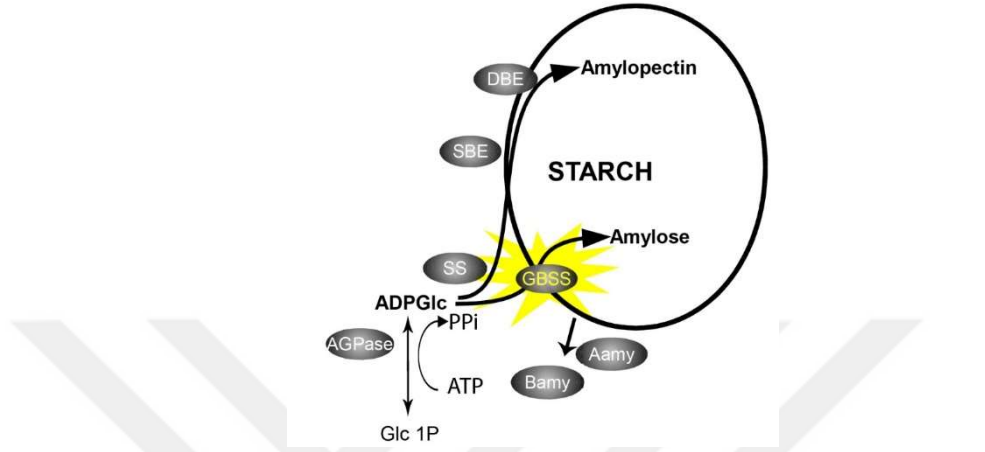
Şekil 5.6. Atay 85 çeşidinde tane dokusunda *AGPaz\_L* ve *AGPaz\_s* genlerinin stres uygulamaları altında ifadelerini gösterir grafik.



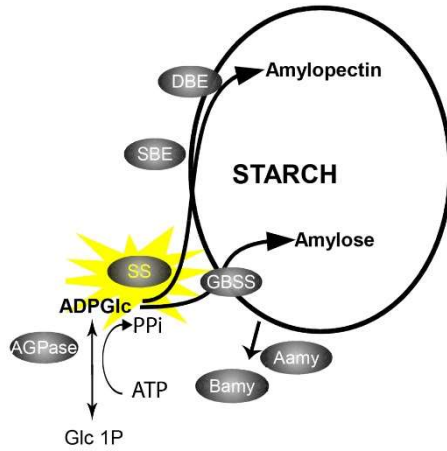
Şekil 5.7. Zubkov çeşidinde tane dokusunda *AGPaz\_L* ve *AGPaz\_s* genlerinin stres uygulamaları altında ifadelerini gösterir grafik.

### 5.5.2. Nişasta Sentaz (Starch Synthase) Grubu

SS grubu incelenirken bu başlık altındaki *GBSSI*, *SSI*, *SSII*, *SSIII*, *SSIV* genleri incelenecektir. GBSS enzimi amiloz yolağına yönelirken (Şekil 5.8), diğer SS enzimleri amilopektin yolağına yönelir (Şekil 5.9).



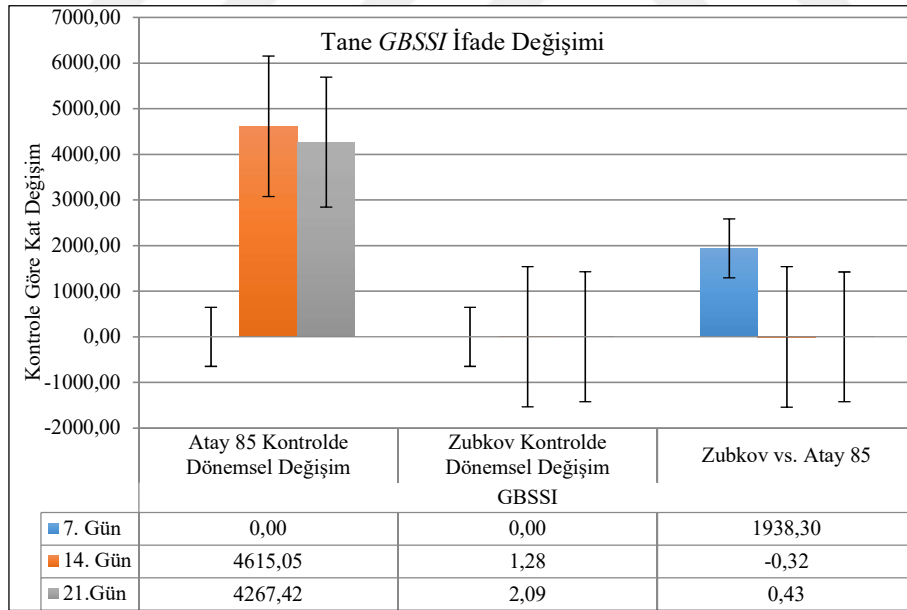
Şekil 5.8. Nişasta biyosentez yolağında GBSS enzimi



Şekil 5.9. Nişasta biyosentez yolağında SS (nişasta sentaz) enzim grubu

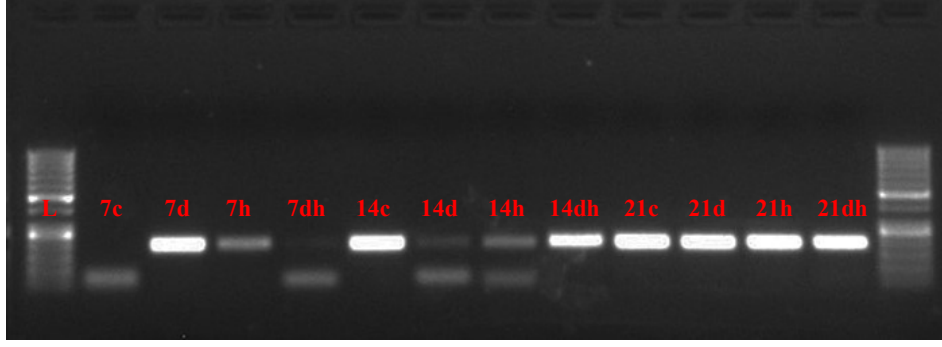
Tane dokusunda GBSSI enzimi görev almaktadır. Bu enzim, AGPaz aktivitesinden elde edilen ADP-glukoz kompleksini amiloza çevirir. Bu tez çalışması kapsamında tanede *GBSSI* gen ifadesi de incelenmiştir. Atay 85 ve Zubkov çeşitlerinde kontrol bireyleri ifadeleri birbirleri ile karşılaştırılmış (Şekil 5.10), 7. gün örneklerinde Atay 85 çeşidinde ifadenin Zubkov çeşidinden 1938 kat düşük ölçülmüş olup, yok sayılmıştır. 14. gün kontrol örneklerinde Atay 85 *GBSSI* ifadesi kritik bir yükseliş göstermiş ve Zubkov ile dengelenmiştir. 21. günde de denge

korunmuştur. Atay 85 çeşidinde gen ifadesinin 7. günde çok düşük olduğu, RT-PCR ile tespitinde zorlanıldığı görülmüştür. 7. gün kontrol grubunda Cq değeri 38,47 ortalamaya sahiptir. Gözlemlenen bu düşük değerler sonrasında reaksiyondaki cDNA miktarı 100 kat artırılarak kurulan PCR reaksiyonu sonucu agaroz jel elektroforezinde koşturulmuş ve bu durum jelde de gözlemlenmiştir (Şekil 5.11). cDNA örneklerinde sorun olmadığı yapılan housekeeping *actin* geni ile yapılan reaksiyonların tamamının sorunsuz çalışması ile anlaşılmıştır (Şekil 5.12). Her 2 genotip de başlangıçta düşük gen ifadesi gösterip, ilerleyen dönemlerde artış profili sergilemiştir. Strese maruz kalan bireylerde Atay 85 çeşidinde *GBSSI* ifadesi 7. gün kuraklık uygulamasında %159 oranında bir artış göstermiş olsa da çok düşük bir ifade olarak ele alınacaktır. 14. gün örneklerinde tüm stres koşulları ifade düşüşüne neden olurken bu değerler kuraklık ve sıcaklık streslerinde %100, kuraklık+sıcaklık stresinde %45 oranında ölçülmüştür. 21. gün örneklerinde sıcaklık stresinde %65 artış, kuraklık+sıcaklık stresinde ise %82 ifade düşüşü gözlemlenmiştir. Zubkov çeşidinde 7. ve 14. günlerde kuraklık uygulamasında sırasıyla %158 ve %105 oranlarında artış gösterirken, sıcaklık stresinde 14. gün %61, 21. gün %55 ifade düşüşü gözlemlenmiştir. Kuraklık+sıcaklık stresinde 7. gün %49 artış, 14. gün %49 ve 21. gün %63 azalış gözlemlenmiştir (Şekil 5.13).

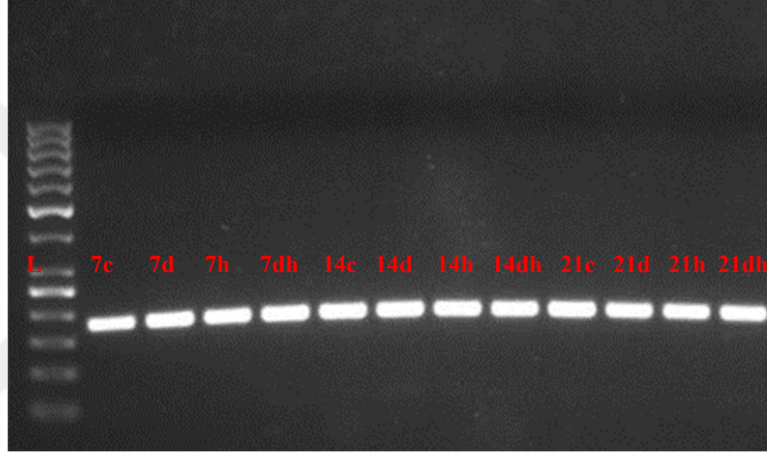


Şekil 5.10. Tane dokusunda dönemler arası kontrol bireylerinde *GBSSI* geninin ifade kıyaslaması.

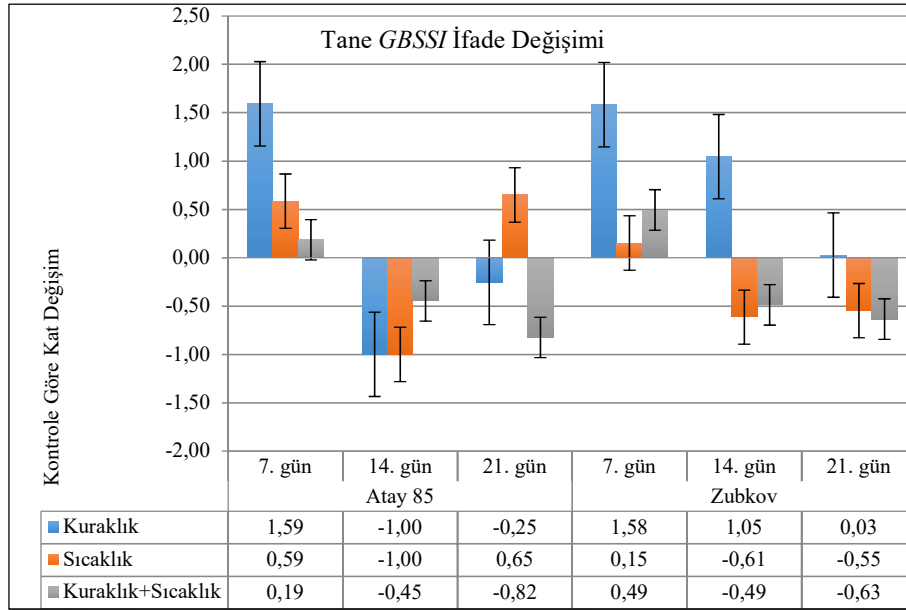




Şekil 5.11. Atay 85 çeşidi tane dokusunda *GBSSI* genine özel primerler ile kurulan PCR reaksiyonunun agaroz jel elektroforez görseli. L: 50 bç Ladder, c: kontrol, d: kuraklık, h: sıcaklık, dh: kuraklık+sıcaklık, 7-14-21: örnekleme dönemleri.



Şekil 5.12. Atay 85 çeşidi tane dokusunda *actin* genine özel primerler ile kurulan PCR reaksiyonunun agaroz jel elektroforez görseli. L: 50 bç Ladder, c: kontrol, d: kuraklık, h: sıcaklık, dh: kuraklık+sıcaklık, 7-14-21: örnekleme dönemleri.



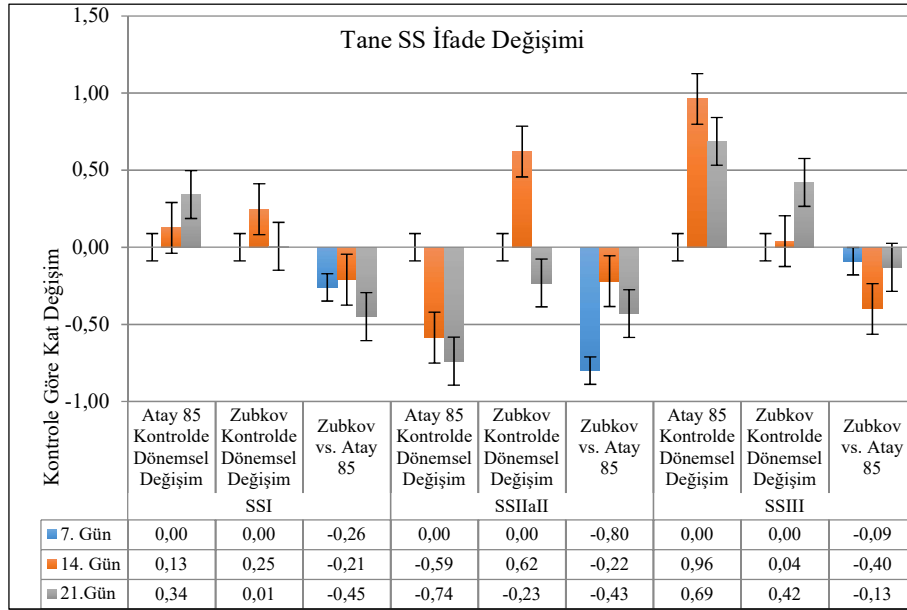
Şekil 5.13. Atay 85 ve Zubkov çeşitlerinde tane dokusunda *GBSSI* geninin stres uygulamaları altında ifadelerini gösterir grafik.

*SSI* enzimi total *SS* aktivitesinin %70'inden sorumludur. Her iki genotipte de yapılan analizler neticesinde tüm dönemlerde kontrol bireylerinde gen ifadesinin Atay 85 çeşidinde sırasıyla %26, %21 ve %45 oranlarında daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Kontrol bireyleri arasında yapılan kıyaslamada dönemler arası anlamlı fark görülmemiştir (Şekil 5.14). Atay 85 çeşidinde kuraklık stresinden etkilenmediği, sıcaklık stresinde 21. gün uygulamasında kontrole göre %60 ifaede azalışı, kuraklık+sıcaklık uygulamasında ise 14. gün %59, 21. gün %76 oranlarında gen ifadesinde azalış gözlemlenmiştir (Şekil 5.15). Zubkov çeşidinde *SSI* gen ifadesi tüm stres koşulları altında korunma şeklinde görülürken 21 gün kuraklık uygulaması kendi kontrolüne göre %71'lik bir artış göstermiştir (Şekil 5.16).

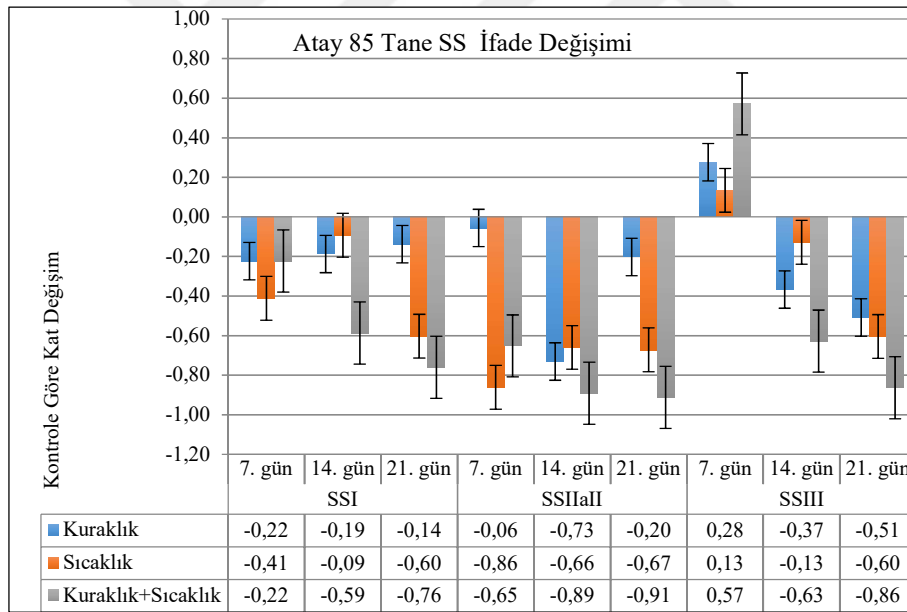
*SSII* enziminin birkaç formu vardır. Tahıl endosperminde *SSIIa* görülür. Her iki genotip için incelendiğinde Atay 85 çeşidinde gen ifadesinin kontrol bireylerinde Zubkov çeşidine ait örneklerden yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu farklar 7. gün %80, 14. gün %22, 21. gün ise %43 olarak belirlenmiştir. Atay 85 çeşidinde ifadenin dönemsel olarak azalan bir grafik çizdiği bu rakamların ise 14. ve 21. günlerde sırasıyla 7. güne oranla %59 ve %74 olduğu belirlenirken, Zubkov çeşidinde ifadenin 14. günde %62 artış gösterdiği, 21. günde ise 7. güne kıyasla %23 azalış gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 5.14). Atay 85 çeşidinde kuraklık stresinde 7. ve 21. günlerde ifadede önemli değişim gözlenmezken 14. günde %73 düşüş gözlenmiştir. Sıcaklık

stresinde her 3 dönemde de ifade düşüşleri gözlenmiş olup, bu oranlar sırasıyla %86, %66 ve %67 olarak belirlenmiştir. Kuraklık+sıcaklık stresinde 3 dönemde de ifadede düşüş gözlenmiş olup, bu oranlar sırasıyla %65, %89, %91 olarak belirlenmiştir (Şekil 5.15). Zubkov çeşidi kuraklık uygulamasında 7. günde kontrole kıyasla %210'luk dikkat çekici bir ifade artışı gözlenirken, 14. günde eşik değere ulaşmayan %37'lik artış, 21. günde ise %98 artış gözlenmiştir. Sıcaklık stresi altında 7. günde ifade değişimi önemsiz kabul edilirken, 14. günde %51, 21. günde %68 ifade düşüşü gözlenmiştir. Kuraklık+sıcaklık stresinde 7. günde ifadede önemli bir değişim belirlenmez iken, 14. günde %61, 21. günde %52 ifade azalması belirlenmiştir (Şekil 5.16).

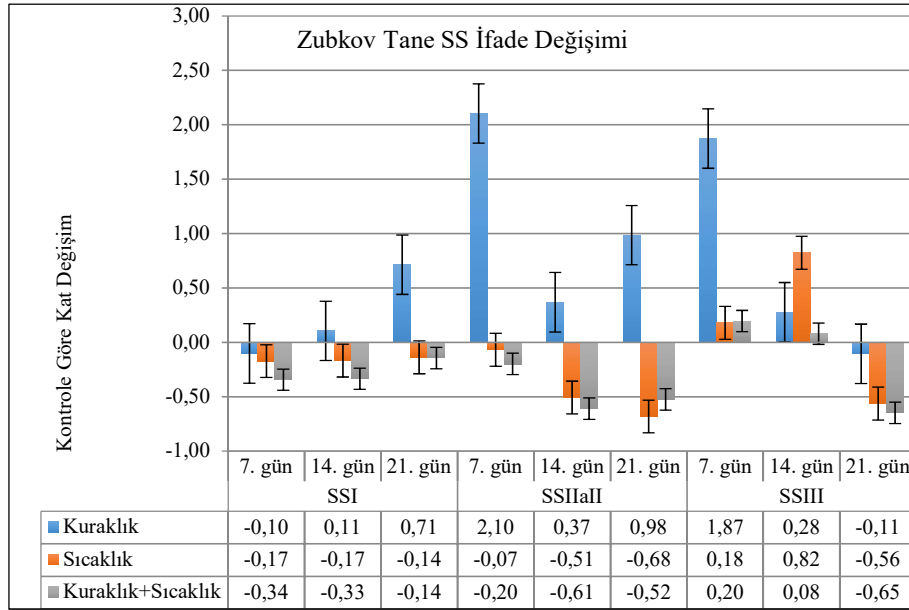
SSIII geçici nişasta üretimi için önemli bir enzimdir. Tüm dönem boyunca görülür. Çeşitler arası kontrol bireylerinde gen ifadesi karşılaştırıldığında Atay 85 çeşidinde ifadenin sırasıyla %0,9, %40 ve %1,3 oranlarında Zubkov çeşidinden daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Dönemler arası kontrol bireyleri kıyaslandığında Atay 85 çeşidinde ifadesin 14. günde en yüksek seviyeye ulaştığı, 21. günde ise azaldığı ancak 7. günden yüksek olduğu belirlenmiştir. Buna karşın Zubkov çeşidinde ifade en yüksek seviyesine 21. günde ulaşmaktadır (Şekil 5.14). SSIII geni Atay 85 çeşidinde kuraklık stresinde 7. ve 14. günlerde önemsiz değişimler gösterirken, 21. günde %51 ifade düşüşü göstermiştir. Sıcaklık stresinde 7. ve 14. günlerde gözlenen değişimler önemsiz kabul edilmiş, 21. günde ifadede %60 azalma gözlenmiştir. Kuraklık+sıcaklık stresinde 7. günde ifadede %57 artış, 14. ve 21. günlerde sırasıyla %63 ve %86 ifade düşüşü gözlenmiştir (Şekil 5.15). Zubkov çeşidinde kuraklık stresi altında 7. gün örneklerinde %187 artış gösterirken, 14. ve 21. günlerde ifadede önemli bir değişim göstermemiştir. Sıcaklık stresinde 7. günde ifadede değişim gözlenmezken, 14. günde %82 artış, 21. günde ise %56 azalış gözlenmiştir. Kuraklık+sıcaklık stresi için 7. ve 14. günlerde ifadede değişim gözlenmemiş olup, 21. günde %65 ifadede azalma görülmüştür (Şekil 5.16).



Şekil 5.14. Tane dokusunda dönemler arası kontrol bireylerinde *SSI*, *SSIIaII* ve *SSIII* genlerinin ifade kıyaslaması.



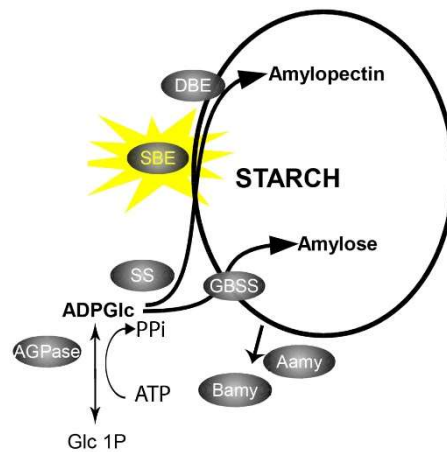
Şekil 5.15. Atay 85 çeşidinde tane dokusunda *SSI*, *SSIIaII* ve *SSIII* genlerinin stres uygulamaları altında ifadelerini gösterir grafik.



Şekil 5.16. Zubkov çeşidinde tane dokusunda *SSI*, *SSIIaII* ve *SSIII* genlerinin stres uygulamaları altında ifadelerini gösterir grafik.

### 5.5.3. Nişasta Dallanma Enzimi (Starch Branching Enzyme) Grubu

SBE, amilopektin'in dallanmasında yapısal düzenlemenin sorumlusu olan enzim grubudur (şekil 5.17). SBE'ler SBEI, SBEII, SBEIIa gibi izoformlara sahiptir ve bu izoformlar bitkiye, dokuya ve gelişimsel döneme spesifiktir. SBEI ve SBEII farklı uzunluklarda glukoz zincirleri meydana getirirler. SBEI amiloz ile çok daha fazla dallanma kapasitesi gösterip daha uzun zincirler oluştururken SBEII amilopektine afinite gösterir.



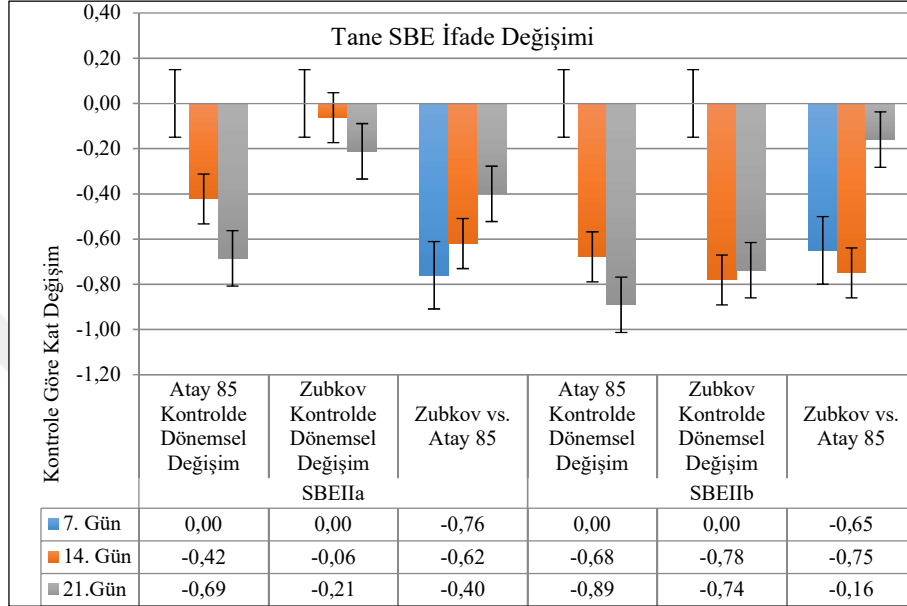
Şekil 5.17. Nişasta biyosentezinde SBE evresi

Tane analizlerinde *SBEIIa* ve *SBEIIb* enzimlerini kodlayan genlerin ifadeleri incelenmiştir.

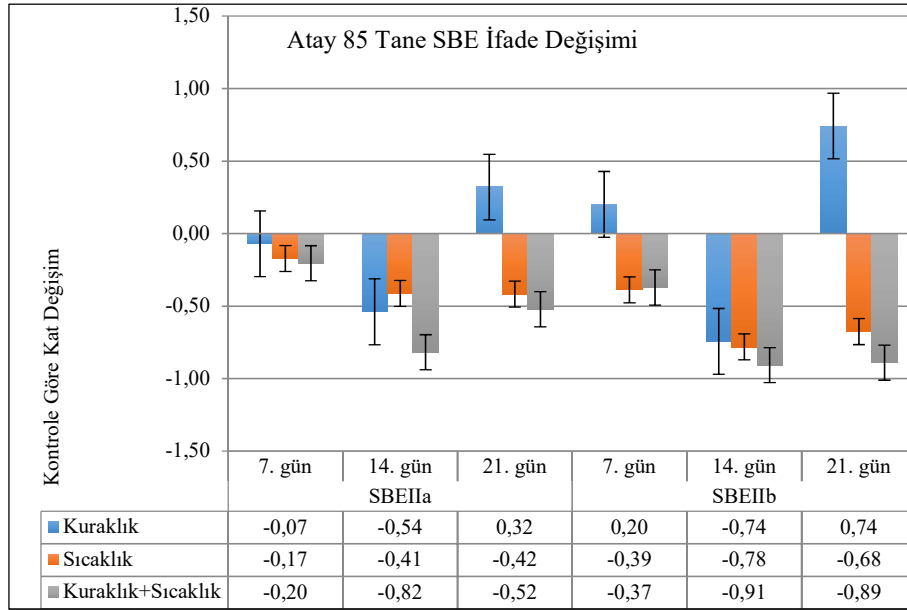
Her iki genotip için *SBEIIa* gen ifadesi öncelikle kontrol örnekleri üzerinden kıyaslanmıştır. Bu kıyaslamada Atay 85 çeşidinde gen ifadesi her 3 dönemde de yüksek bulunurken bu oranlar sırasıyla 7. gün için %76, 14. gün için %62 ve 21. gün için ise %40 olarak belirlenmiştir. Atay 85 çeşidinde ifadenin dönemsel olarak düşüş gösterdiği belirlenmiş olup bu oranlar 7. güne kıyasla sırasıyla %42 ve %69 olarak belirlenmiştir. Zubkov çeşidinde ifadenin dönemsel olarak düştüğü ancak bu düşüşün önemsiz miktarlarda olması nedeniyle ifadenin değişmediği kabul edilmiştir (Şekil 5.18). Stres koşulları altında yapılan incelemelerde Atay 85 çeşidinde kuraklık stresinde 14. gün ifadede %54 düşüş gözlenmiş olup, 7. ve 21. günlerdeki değişimler eşik değere ulaşmamıştır. Sıcaklık stresi altında her 3 dönemde de ifade düşüşü gözlenirse de bu değerler eşik değerinin altında kalmıştır. Kuraklık+sıcaklık stresinde 7. günde ifadede önemli değişim gözlenmezken, 14. günde %82, 21. günde %52 ifade düşüşleri gözlenmiştir (Şekil 5.19). Zubkov çeşidinde kuraklık stresi altında 7. günde %168 ve 14. günde %129'luk ifade artışları gözlenirken, 21. günde ifadede değişim gözlenmemiştir. Sıcaklık stresi altında 7. ve 21. günlerde gözlenen ifade değişimleri önemsiz kabul edilmiş, 14. günde %57 ifade artışı gözlenmiştir. Kuraklık+sıcaklık stresi altında 7. ve 21. günlerde gözlenen ifade değişimleri önemsiz kabul edilmiş, 14. günde %68 ifade artışı gözlenmiştir (Şekil 5.20).

Her iki genotip için *SBEIIb* gen ifadesi öncelikle kontrol bireyleri arasında kıyaslanmış olup, her 3 dönemde de gen ifadesinin Atay 85 çeşidinde yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu oranlar sırasıyla 7. gün %65, 14. gün %75, 21. gün %16 olarak belirlenmiştir. Genotiler kendi içlerinde dönemsel incelendiğinde iki genotipte de 7. güne kıyasla ifade düşüşleri gözlenmiştir. Bu oranlar Atay 85 için 14. gün %68, 21. gün %89 olarak belirlenirken, Zubkov çeşidi için 14. Gün %78, 21. gün %74 olarak belirlenmiştir (Şekil 5.18). Buna göre Atay 85 çeşidinde ifade dönemsel olarak düşüş göstermekte iken, Zubkov çeşidinde ifade 14. günde düşmekte ve bu oranda sabit kalmaktadır. Stresin etkileri incelendiğinde Atay 85 çeşidinde kuraklık stresi altında 7. günde *SBEIIb* geni ifadesinde değişim önemsiz kalırken, 14. günde %74 ifade düşüşü, 21. günde ise %74 ifade artışı gözlenmiştir. Sıcaklık stresi altında 3 dönemde de ifade düşüşleri gözlenirken 7. günde eşik değere ulaşılmamış, 14. Günde %78, 21. günde %68 ifade düşüşü belirlenmiştir. Kuraklık+sıcaklık stresi altında 3 dönemde de ifade düşüşleri gözlenirken 7. günde eşik değere ulaşılmamış, 14. Günde %91, 21. günde %89 ifade düşüşü belirlenmiştir (Şekil 5.19). Zubkov çeşidinde kuraklık stresinde 7. ve 14. günlerde ifadede artış gözlenmiş

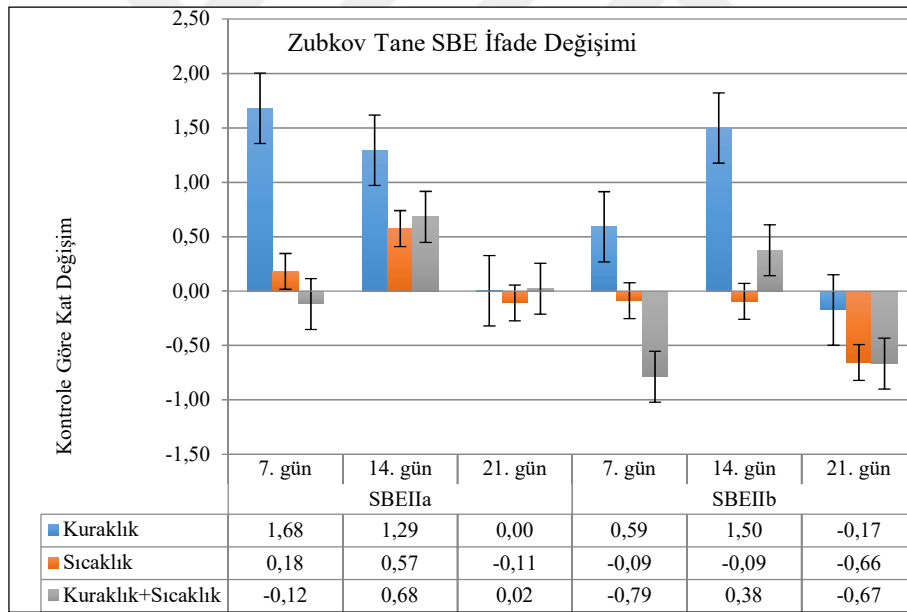
olup bu değerler sırasıyla %59 ve %150 olarak belirlenirken, 21. günde gözlenen değişim önemsiz kabul edilmiştir. Sıcaklık stresi altında 7. ve 14. günlerde gözlenen ifade düşüşleri önemsiz kabul edilmiş olup, 21. günde %66 ifade düşüşü belirlenmiştir. Kuraklık +sıcaklık stresi altında 7. ve 21. günlerde ifadede düşüş gözlenip, bu değerler sırası ile %79 ve %67 olarak belirlenirken, 14. günde gözlenen ifade artışı eşik değere ulaşmamıştır (Şekil 5.20).



Şekil 5.18. Tane dokusunda dönemler arası kontrol bireylerinde *SBEIIa* ve *SBEIIb* genlerinin ifade kıyaslaması.



Şekil 5.19. Atay 85 çeşidinde tane dokusunda *SBEIIa* ve *SBEIIb* genlerinin stres uygulamaları altında ifadelerini gösterir grafik.

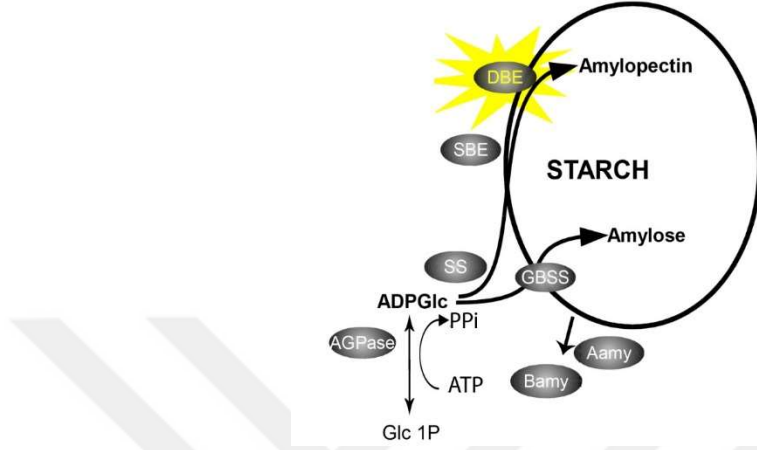


Şekil 5.20. Zubkov çeşidinde tane dokusunda *SBEIIa* ve *SBEIIb* genlerinin stres uygulamaları altında ifadelerini gösterir grafik.



#### 5.5.4. Dallanma Bozucu Enzim (DBE) Kodlayan Genlerin İfade Değişimleri

Nişasta sentez yolağında (Şekil 5.21) yer alan (DBE) ailesinde 2 farklı enzim grubu incelenmiştir. İzoamilaz (Iso) grubu ve Pullulanaz (Pul) enzimini kodlayan genlerin ifade düzeylerindeki değişiklikler incelenmiştir.



Şekil 5.21. Nişasta biyosentez yolağında DBE

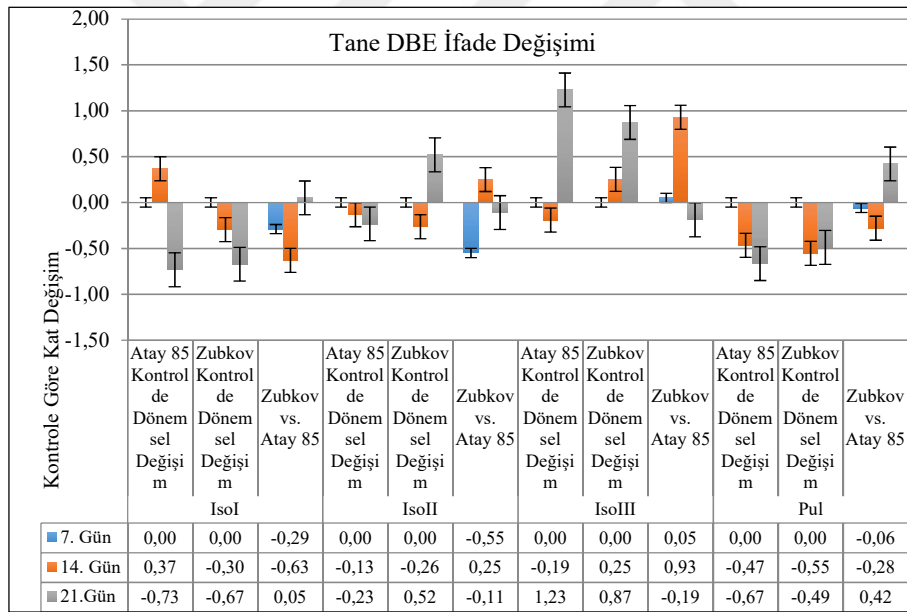
*IsoI* gen ifadesi kontrol bireylerinde her iki genotip arasında kıyaslandığında 7. ve 14. günlerde ifadenin Atay 85 çeşidinde sırasıyla %29 ve %63 oranlarında daha yüksek olduğu, 21. günde ise %0,5 oranında daha düşük olduğu gözlenmiştir. Genotipler kendi içlerinde dönemsel olarak kıyaslandığında Atay 85 çeşidinde önce artan, sonra azalan bir ifade gözlenirken, Zubkov çeşidinde sürekli azalan bir ifade gözlenmiştir. Bu değerler 7. güne kıyasla sırasıyla Atay 85 için %37 ve %73 olarak belirlenirken, Zubkov çeşidi için %30 ve %67 olarak belirlenmiştir (Şekil 5.22). Atay 85 çeşidinde kuraklık stresi altında 7. gün gözlenen ifade artışı önemsiz kabul edilirken, 14. gün %57 düşüş, 21. gün ise %201 artış gözlenmiştir. Sıcaklık stresi altında 3 dönemde de ifade düşüşü gözlenirken 7. gün değeri önemsiz kabul edilmiş, 14. ve 21. gün düşüş değerleri de sırasıyla %57 ve %55 olarak belirlenmiştir. Kuraklık+sıcaklık stresi altında 3 dönemde de ifade düşüşleri gözlenirken 7. ve 21. günkü ifade değişimleri önemsiz kabul edilmiş, 14. gün %79 ifade düşüşü belirlenmiştir (Şekil 5.23). Zubkov çeşidi için kuraklık stresinde 3 dönemde de ifade artışı gözlenmiş olup, bu değerler sırasıyla %40, %101 ve %102 olarak belirlenmiştir. Sıcaklık stresinde 7. gün ifade artışı, 14. ve 21. günlerde ifadede azalış gözlenmiş olup, bu değişim değerleri önemsiz kabul edilmiştir. Kuraklık+sıcaklık stresinde 7.

gün örneklerinde %82 ifade artışı gözlenmiş olup, 14. ve 21. günlerde önemsiz kabul edilen oranlarda ifade düşüşü gözlenmiştir (Şekil 5.24).

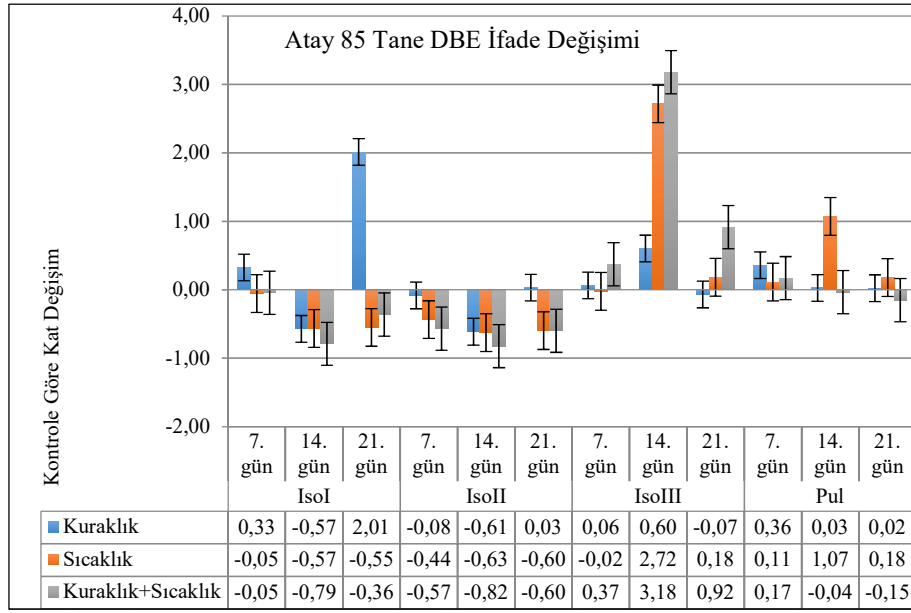
*IsoII* geninin ifade değişimi kontrol bireyleri kıyaslandığında Zubkov çeşidinde ifadenin 7. günde %55 daha düşük olduğu, 14. ve 21. günlerde ise denk oldukları gözlenmiştir. Atay 85 çeşidinde dönemsel olarak azalma gözlenmiş olsa da bu oran önemsiz kabul edilirken, Zubkov çeşidinde 7. güne kıyasla 14. günde %26 azalış, 21. günde ise %52 artış gözlenmiştir (Şekil 5.22). Atay 85 çeşidinde kuraklık stresi altında 7. ve 21. günlerde ifade değişimi önemsiz kabul edilirken, 14. günde ifadede %61 azalma gözlenmiştir. Sıcaklık stresi altında 3 dönemde de ifade düşüşleri gözlenmiş olup, 7. günde eşik değere ulaşılmamış, 14. ve 21. günlerde ise sırasıyla %63 ve %60 değerleri bulunmuştur. Kuraklık+sıcaklık stresinde 3 dönemde de ifadede düşüşler gözlenmiş olup, bu değerler sırasıyla %57, %82 ve %60 olarak belirlenmiştir (Şekil 5.23). Zubkov çeşidinde kuraklık stresi altında ifade artışları gözlenmiş olup, bu değerler sırasıyla 7. gün için %72, 14. gün için %97 olarak belirlenirken 21. gün değer önemsiz kabul edilmiştir. Sıcaklık stresi altında her 3 dönemde de ifadede düşüşler gözlenmiş olsa da değerler eşik değere ulaşmamıştır. Kuraklık+sıcaklık stresinde ifadede 3 dönemde de artışlar gözlenmiş olup, bu değerler önemsiz kabul edilmiştir (Şekil 5.24).

*IsoIII* gen ifadesinin kontrol bireylerinde her iki genotip için de dönemsel olarak artan grafik çizdiği belirlenmiştir. Genotipler birbirleriyle kıyaslandığında 7. ve 21. günlerde ifadeler denk bulunmuş, 14. gün örneklerinde Zubkov çeşidinde ifade %93 daha yüksek bulunmuştur. (Şekil 5.22). Atay 85 çeşidinde kuraklık stresi altında 7. ve 21. günlerde gen ifadesinde değişim gözlenmez iken, 14. gün uygulamalarında gen ifadesinin %60 artış gösterdiği belirlenmiştir. Sıcaklık stresi uygulamasında 7. ve 21. günlerde gerçekleşen ifade değişimleri önemsiz kabul edilmiş, 14. gün %272 ifade artışı gözlenmiştir. Kuraklık+sıcaklık stresinde ifadede 3 dönemde de artış gözlenirken 7. gün değişimi eşik değere ulaşmamış, 14. gün %318, 21. gün %92 değerleri bulunmuştur (Şekil 5.23). Zubkov çeşidinde kuraklık stresi altında 7. gün %48 ile eşik değere çok yakın ifade düşüşü, 14. gün %55 azalma gözlenirken, 21. gün %41 ifade artışı gözlenmiştir ancak bu değer de eşik değere ulaşmamıştır. Sıcaklık stresi altında 7. ve 14. günlerde ifade düşüşleri gözlenmiş olup, bu değerler önemsiz kabul edilirken, 21. gün gerçekleşen ifade artışı eşik değere erişmemiştir. Kuraklık+sıcaklık stresi altında 7. günde gerçekleşen ifade düşüşü eşik değerinin altında kalırken, 14. gün %72 azalma gözlenmiş ve 21. gün ifadede değişim bulunmamıştır (Şekil 5.24).

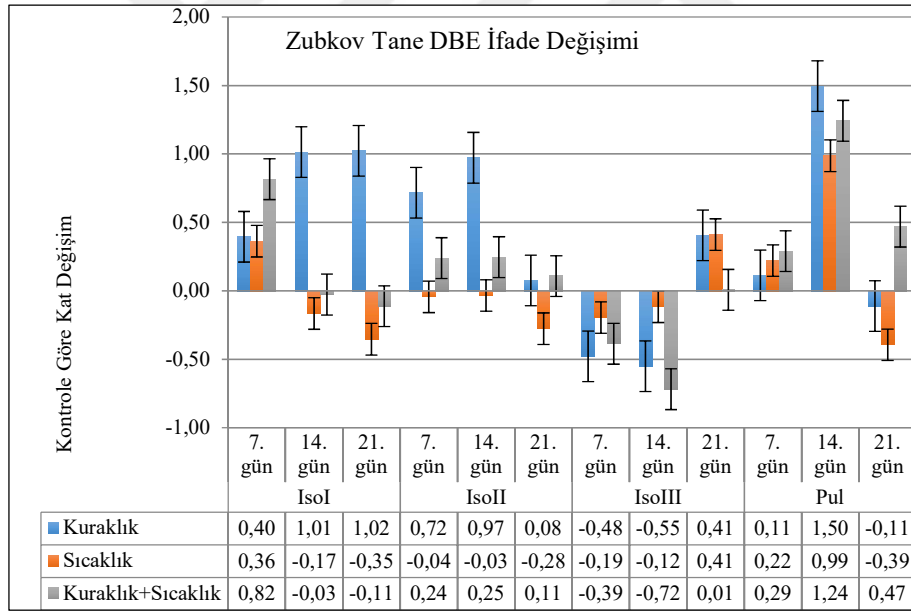
Her iki genotip için *Pul* geni incelendiğinde Atay 85 çeşidinde ifadenin 7 ve 14. günlerde sırasıyla %0,6 ve %28 oranlarında daha fazla, 21. günde ise %42 daha düşük olduğu gözlenmiştir. Genotipler kendi içlerinde dönemsel olarak incelendiğinde Atay 85 çeşidinde her dönem azalan, Zubkov çeşidinde ise 14. günde azalan ve sonra dengede kalan bir ifade gözlenmiştir (Şekil 5.22). Atay 85 çeşidinde kuraklık stresi altında ifadede yükselmeler gözlenmiş olsa da bu değerler eşik değerin altında kalmıştır. Sıcaklık stresinde 3 dönemde de ifade artışı gözlenirken, 7. ve 21. günlerde gerçekleşen artışlar önemsiz kabul edilmiş, 14. gün artış oranı %107 olarak belirlenmiştir. Kuraklık+sıcaklık stresi altında ifadede 3 dönemde de değişim gözlenmemiştir (Şekil 5.23). Zubkov çeşidinde kuraklık stresi altında 7. ve 21. günlerde ifadede önemli değişim gözlenmezken, 14. günde %150 oranında artış belirlenmiştir. Sıcaklık stresi altında 7. gün eşik değere ulaşmayan bir artış, 14. gün %99 artış gözlenirken, 21. gün %39 değerinde ancak yine eşik değerin altında kalan bir azalış gözlenmiştir. Kuraklık+sıcaklık stresi altında 3 dönemde de artış gözlenmiş olup, 7. ve 21. günlerde eşik değerin altında kalırken, 14. gün örneklerinde %124 artış oranı belirlenmiştir (Şekil 5.24).



Şekil 5.22. Tane dokusunda dönemler arası kontrol bireylerinde *IsoI*, *IsoII*, *IsoIII* ve *Pul* genlerinin ifade kıyaslaması.



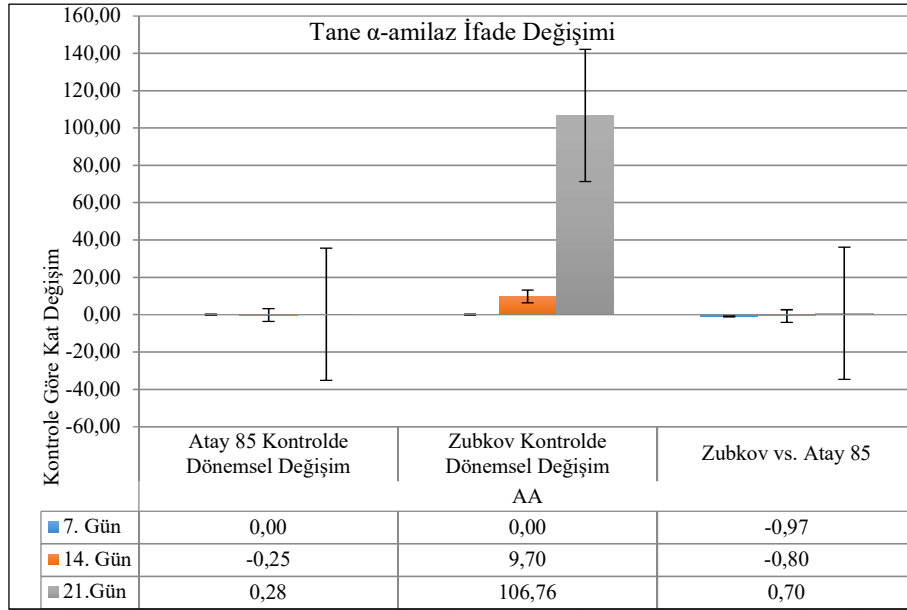
Şekil 5.23. Atay 85 çeşidinde tane dokusunda *IsoI*, *IsoII*, *IsoIII* ve *Pul* genlerinin stres uygulamaları altında ifadelerini gösterir grafik.



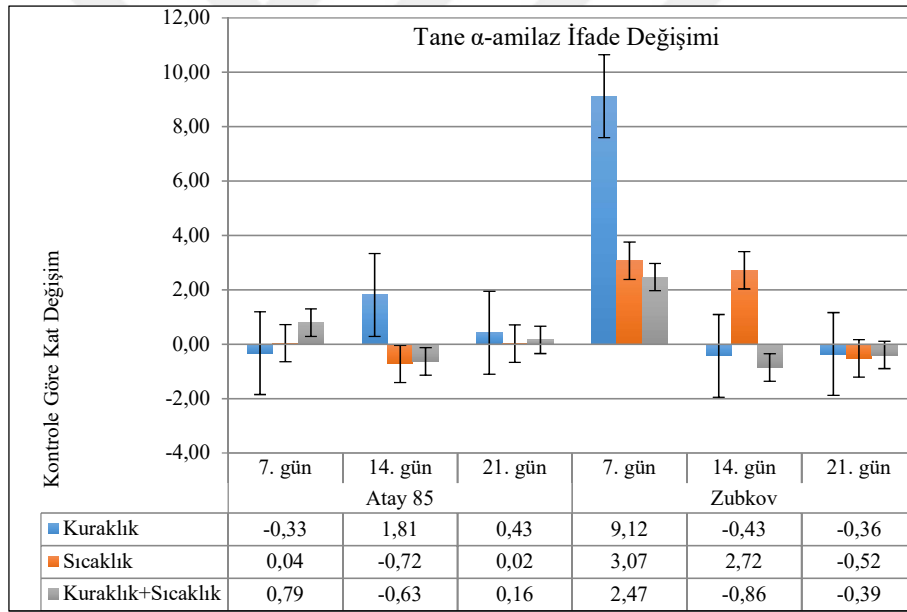
Şekil 5.24. Zubkov çeşidinde tane dokusunda *IsoI*, *IsoII*, *IsoIII* ve *Pul* genlerinin stres uygulamaları altında ifadelerini gösterir grafik.

### 5.5.5. Amilaz Grubu Enzimleri

Tane dokusunda  $\alpha$ -amilaz enzimini kodlayan *AA* geninin ifadesi kontrol bireylerinde karşılaştırılmış olup, Atay 85 çeşidinde 7. ve 14. günlerde sırasıyla %97 ve %80 oranlarında daha yüksek bulunmuşken, 21. günde Zubkov çeşidinde ifade %70 oranında daha yüksek olarak belirlenmiştir. Genotipler kendi içlerinde dönemsel davranışlarına göre incelendiğinde Atay 85 çeşidinde ifadenin dönemlere dayalı olarak önemli değişim göstermediği, Zubkov çeşidinin ise önemli miktarlarda artış gösteren bir grafik çizerek 7. güne kıyasla 14. günde 9,7 kat, 21. günde ise 107 kat artış gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 5.25). Atay 85 çeşidinde kuraklık stresi altında 7. gün gözlenen düşüş ve 21. gün gözlenen yükseliş değerleri eşik sınıra ulaşmadığından önemsiz kabul edilirken, 14. gün %181 oranında artış gözlenmiştir. Sıcaklık stresi altında 7. ve 21. günlerde ifadelerde değişim gözlenmezken, 14. gün örneklerinde %72'lik ifade düşüşü gözlenmiştir. Kuraklık+sıcaklık stresi altında 7. gün örneklerinde %79 ifade artışı, 14. gün örneklerinde %63 ifade düşüşü gözlenirken 21. günde ifade değişimi önemsiz kabul edilmiştir. Zubkov çeşidinde kuraklık stresi altında 7. gün örneklerinde 9,12 kat artış gözlenirken, 14. ve 21. günlerde meydana gelen ifade azalmaları eşik değerinin altında kalmıştır. Sıcaklık stresi altında 7. ve 14. günlerde sırasıyla 3,07 ve 2,72 kat artış gözlenirken, 21. gün örneklerinde %52 ifade düşüşü gözlenmiştir. Kuraklık+sıcaklık stresi altında 7. gün örneklerinde 2,47 kat artış gözlenirken, 14. gün örneklerinde %86 ifade düşüşü, 21. gün örneklerinde ise eşik değerinin altında kalan %39 ifade düşüşü gözlenmiştir (Şekil 5.26).



Şekil 5.25. Tane dokusunda dönemler arası kontrol bireylerinde AA geninin ifade kıyaslaması.



Şekil 5.26. Atay 85 ve Zubkov çeşitlerinde tane dokusunda AA geninin stres uygulamaları altında ifadelerini gösterir grafik.

### 5.5.6. Sukroz Grubu Enzimleri

*SucSI* geni kontrol bireyleri arasında karşılaştırılmış olup, 7. gün örneklerinde Atay 85 çeşidi %43, 14. gün örneklerinde Zubkov çeşidi %26, 21. gün örneklerinde Atay 85 çeşidi %16 ifade yüksekliği göstermiştir. Genotipler kendi içlerinde incelendiğinde Atay 85 çeşidinde *SucSI* ifadesinin dönemsel olarak düşüş gösterdiği, Zubkov çeşidinde ise ifadenin 14. gün artış gösterdiği, sonra ilk seviyeye döndüğü gözlenmiştir (Şekil 5.27). *SucSI* geni Atay 85 çeşidinde kuraklık stresi altında 7. gün örneklerinde önemsiz kabul edilen ifade artışı gösterirken, 14. ve 21. gün örneklerinde önemsiz kabul edilen ifade düşüşleri belirlenmiştir. Sıcaklık stresi altında 7. ve 14. günlerde ifadede değişim gözlenmezken, 21. gün örneklerinde %31 ile eşik değere ulaşmayan ifade artışı gözlenmiştir. Kuraklık+sıcaklık stresi altında 7. gün ifadede değişim gözlenmez iken, 14. ve 21. gün örneklerinde önemsiz kabul edilen ifade düşüşleri belirlenmiştir (Şekil 5.28). Zubkov çeşidinde kuraklık stresi altında 7. gün örneklerinde %150 oranında ifade artışı gösterirken, 14. ve 21. günlerde gözlenen yükseliş oranları eşik değere ulaşmamıştır. Sıcaklık stresi altında 7. ve 14. günlerde ifadelerde eşik değere ulaşmadığı için önemsiz kabul edilen ifade düşüşleri belirlenmiş olup, 21. günde eşik sınıra ulaşmayan bir ifade artışı gözlenmiştir. Kuraklık+sıcaklık stresi altında 7. ve 14. günlerde meydana gelen değişimler önemsiz kabul edilirken, 21. gün örneklerinde %199 oranında ifade artışı gözlenmiştir (Şekil 5.29).

Her iki çeşitte tane dokusunda *SucSII* enzimini kodlayan *SucSII* gen ifadesi öncelikle kontrol bireyleri arasında incelenmiştir. 7. gün örneklerinde Zubkov çeşidinde gen ifadesi %90 daha düşük bulunmuşken, 14. gün %15 daha yüksek, 21. gün ise %0,2 daha düşük bulunmuştur. Genotipler içi kıyaslamalarda Atay 85 çeşidinde *SucSII* ifadesinin dönemsel olarak düşüş gösterirken, Zubkov çeşidinin 14. günde ifadesini %167 arttırdığı ve sonrasında ilk değere dönüş yaptığı belirlenmiştir (Şekil 5.27). Atay 85 çeşidinde kuraklık stresi altında 7. ve 21. gün örneklemelerinde gözlenen ifade değişimleri önemsiz kabul edilirken, 14. gün örneklerinde %62 ifade düşüşü gözlenmiştir. Sıcaklık stresi altında 3 dönemde de ifade düşüşü gözlenmiş olup, 7. gün örnekleri eşik değere yaklaşmaz iken, 14. ve 21. gün örneklerinde her iki dönemde de %58'lik ifade düşüşleri gözlenmiştir. Kuraklık+sıcaklık stresi altında 3 dönemde de ifade düşüşleri gözlenmiş olup, bu değerler sırasıyla 7. gün için %54, 14. gün için %95, 21. gün için ise %98 olarak belirlenmiştir (Şekil 5.28). Zubkov çeşidinde kuraklık stresi *SucSII* gen ifadesi 7. gün örneklerinde önemsiz kabul edilen artış gösterirken, 14. gün örneklerinde %52 ifade

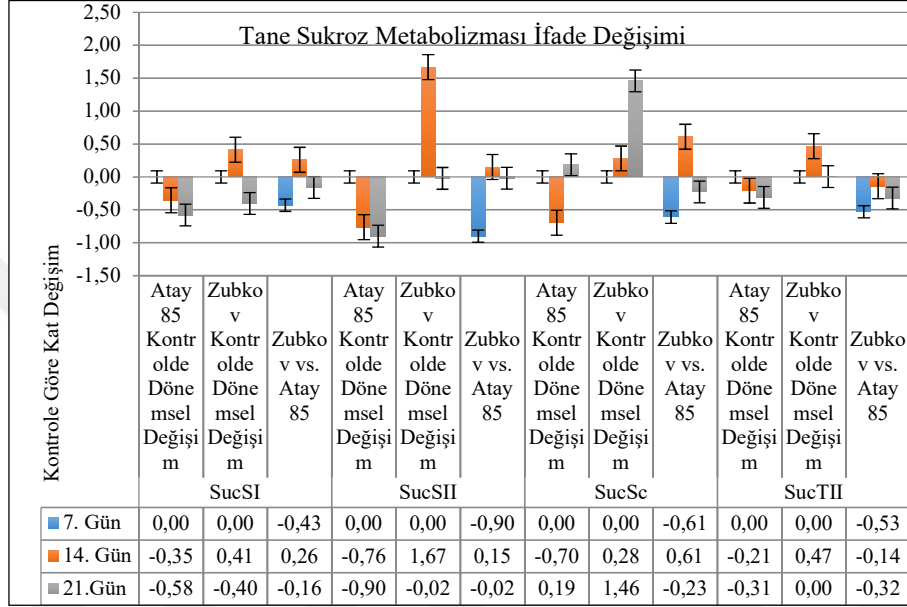
düşüşü ve 21. gün örneklerinde %31 ile eşik değere ulaşmayan bir ifade düşüşü gözlenmiştir. Sıcaklık stresi altında 7. gün örneklerinde önemsiz kabul edilen ifade artışı gözlenmiş olup, 14. ve 21. günlerde sırasıyla %84 ve %94 oranlarında ifade düşüşü belirlenmiştir. Kuraklık+sıcaklık stresi altında 7. gün önemsiz kabul edilen ifade artışı gözlenirken, 14. ve 21. günlerde sırasıyla %60 ve %89 oranlarında ifade düşüşü belirlenmiştir (Şekil 5.29).

*SucSc* gen ifadesi kontrol örnekleri arasında kıyaslandığında 7. ve 21. günlerde Atay 85 çeşidi sırasıyla %61 ve %23, 14. günde ise Zubkov çeşidi %61 ifade yüksekliği göstermektedir. Genotipler kendi içlerinde incelendiğinde Atay 85 çeşidinde gen ifadesinin önce artış, sonra da orijinal seviyeye dönüş eğilimi gösterdiği belirlenirken, Zubkov çeşidinin gen ifadesini sürekli artırıp, 21. günde 7. gün örneklerinden %146 kat fazla duruma getirdiği belirlenmiştir (Şekil 5.27). Atay 85 çeşidinde kuraklık stresi altında 7. gün eşik değerin altında kalan %46 oranında ifade düşüşü gözlenmiş olup, 14. gün %149 ifade artışı, 21. gün eşik değere ulaşmayan %40 ifade artışı gözlenmiştir. Sıcaklık stresi altında 7. gün ifade değişimi önemsiz kabul edilmiş olup, 14. gün örneklerinde %151 oranında ifade artışı ve 21. gün örneklerinde ise eşik değere ulaşmayan %41 ifade düşüşü gözlenmiştir. Kuraklık+sıcaklık stresi altında 7. ve 14. gün ifade değişimleri önemsiz kabul edilmiş olup, 21. gün örneklerinde %58'lik ifade düşüşü gözlenmiştir (Şekil 5.28). Zubkov çeşidinde kuraklık stresi altında 7. gün örneklerinde ifade değişimi gözlenmez iken, 14. gün %53'lük ifade düşüşü, 21. gün eşik değerin altında kalan %34 ifade artışı belirlenmiştir. Sıcaklık stresi altında tüm dönemlerde ifade değişimleri önemsiz kabul edilmiştir. Kuraklık+sıcaklık stresi altında 7. ve 21. günlerde ifade değişimleri önemsiz kabul edilirken, 14. gün örneklerinde %87 ifade azalması gözlenmiştir (Şekil 5.29).

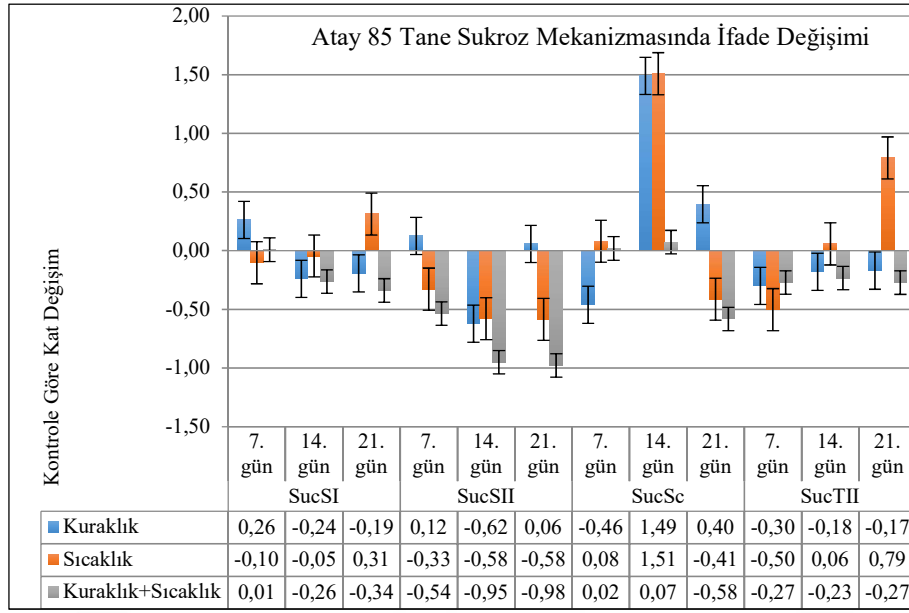
Her iki çeşit için *SucTII* enzimini kodlayan genin ifadesi incelenmiştir. Kontrol bireyleri kendi aralarında kıyaslandığında her 3 dönemde de Atay 85 çeşidinde ifadenin yüksek olduğu gözlenmiş olup, değerler sırasıyla %53, %14 ve %32 olarak belirlenmiştir. Genotipler kendi içlerinde *SucTII* geni ifadesi için dönemsel incelendiğinde Atay 85 çeşidinde azalan bir gen ifadesi gözlenirken, Zubkov çeşidinde ifadenin önce artış gösterdiği, sonra ilk seviyeye döndüğü gözlenmiştir (Şekil 5.27). Atay 85 çeşidinde kuraklık stresi altında 3 dönemde de gözlenen ifade düşüşleri önemsiz kabul edilmiştir. Sıcaklık stresi altında 7. gün örneklerinde %50 ifade düşüşü, 21. gün örneklerinde ise %79 ifade artışı gözlenirken, 14. gün ifade değişimi önemsiz kabul edilmiştir. Kuraklık+sıcaklık stresi altında 3 dönemde de ifade düşüşleri gözlenmiş olup, bu değerler eşik sınıra ulaşmadığından önemsiz kabul edilmiştir (Şekil 5.28).



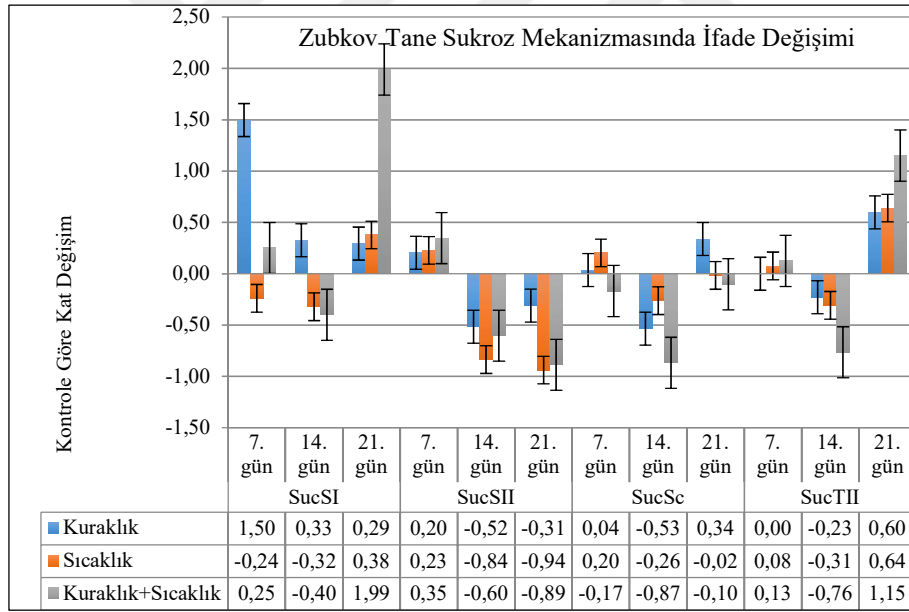
Zubkov çeşidinde kuraklık stresi altında 7. gün ifade değişimi olmaz iken, 14. gün gözlenen düşüş önemsiz kabul edilmiş, 21. gün ise %60 ifade artışı belirlenmiştir. Sıcaklık stresi altında 7. günde ifadede değişim gözlenmemiş olup, 14. gün eşik değere ulaşmayan %31 ifade düşüşü, 21. gün ise %64 ifade artışı gözlenmiştir. Kuraklık+sıcaklık stresi altında 7. gün ifade değişimi önemsiz kabul edilmiş, 14. gün ifadede %76 azalma, 21. gün ise %115 artış gözlenmiştir (Şekil 5.29).



Şekil 5.27. Tane dokusunda dönemler arası kontrol bireylerinde *SucSI*, *SucSII*, *SucSc* ve *SucTII* genlerinin ifade kıyaslaması.



Şekil 5.28. Atay 85 çeşidinde tane dokusunda *SucSI*, *SucSII*, *SucSc* ve *SucTII* genlerinin stres uygulamaları altında ifadelerini gösterir grafik.



Şekil 5.29. Zubkov çeşidinde tane dokusunda *SucSI*, *SucSII*, *SucSc* ve *SucTII* genlerinin stres uygulamaları altında ifadelerini gösterir grafik.

## 5.6. Nişasta Yolağında Yer Alan Genlerin Yaprak Dokusunda İfade Profilleri

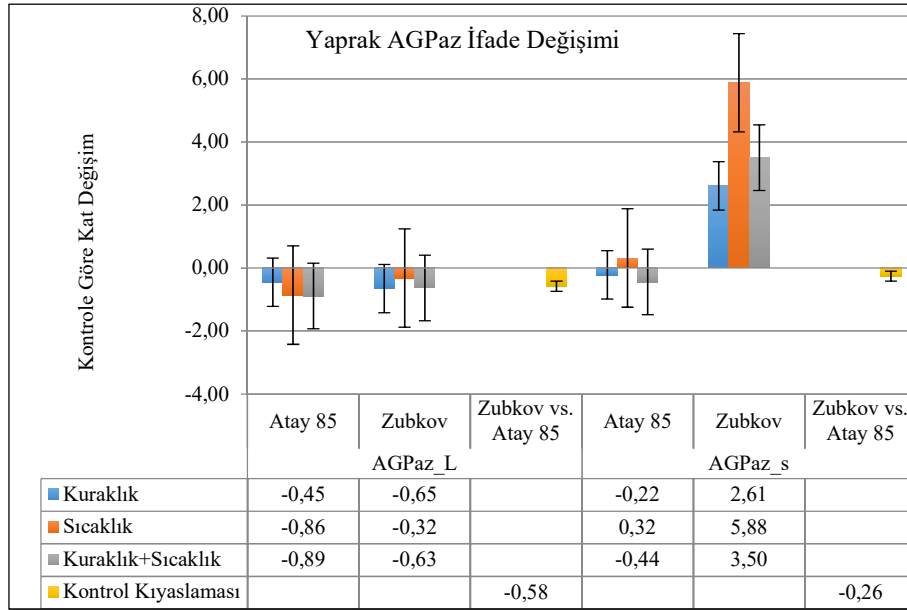
Yaprak dokusunda gen ifadesi profillemesi 14. gün örneklerinde yapılmıştır. Bu kapsamda AGPaz, SS, SBE, DBE ve SucS gruplarına dahil enzimleri kodlayan genlerin ifadeleri incelenmiştir.

### 5.6.1. AGPaz Gen İfade Profilleri

Yaprak dokusunda *AGPaz\_L* ve *AGPaz\_s* genlerinin ifadesi incelenmiştir (Şekil 5.30).

*AGPaz\_L* ifadesi genotipler arasında kıyaslandığında Atay 85 çeşidinde kontrol bireylerinde gen ifadesinin, Zubkov çeşidinden %58 daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Atay 85 çeşidinde tüm stres koşulları altında ifade düşüşü gözlenmiştir. Kuraklık stresinde eşik değere ulaşmayan %45, sıcaklık stresinde %86 ve kuraklık+sıcaklık stresinde ise %89 ifade düşüşü gözlenmiştir. Zubkov çeşidinde de stres koşullarının tümünde ifade düşüşü gözlenirken bu değerler kuraklık stresinde %65, sıcaklık stresinde eşik değerin altında kalan %32 ve kuraklık+sıcaklık stresi altında %62 ifade düşüşü gözlenmiştir.

*AGPaz\_s* geni ifadesi genotipler arasında kıyaslandığında Atay 85 çeşidinde kontrol bireylerinde gen ifadesinin, Zubkov çeşidinden %26 daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Atay 85 çeşidinde stres koşulları altında meydana gelen değişimler eşik değere ulaşmamıştır. Kuraklık ve kuraklık+sıcaklık stresleri altında ifade düşüşleri gözlenirken, sıcaklık stresinde ifadede artış gözlenmiştir. Zubkov çeşidinde gen ifadesi tüm stres koşulları altında dikkat çeken miktarlarda artış göstermiştir. Kuraklık stresi altında %251, sıcaklık stresi altında %588, kuraklık+sıcaklık stresi altında ise %350 oranında ifade artışları gözlenmiştir.



Şekil 5.30. Yaprak dokusunda Atay 85 ve Zubkov çeşitlerinde *AGPaz\_L* ve *AGPaz\_s* genlerinin ifade kıyaslaması.

### 5.6.2. Nişasta Sentaz (Starch Synthase) Grubu

Yaprak dokusunda SS enzim grubunu kodlayan *GBSSII* geni ile (Şekil 5.31) *SSI*, *SSIIc*, *SSIII*, *SSIIIb* ve *SSIV* genlerinin ifadeleri incelenmiştir (Şekil 5.32).

*GBSSII* geni ifadesi kontrol bireyleri arasında kıyaslandığında Atay 85 çeşidinde ifadenin %35 daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Atay 85 çeşidinde her 3 stres koşulunda da ifadede azalmalar gözlenirken bu değerler kuraklık için %10 ve sıcaklık için %38 ile eşik değerinin altında kalırken, kuraklık+sıcaklık için %82 olarak belirlenmiştir. Zubkov çeşidinde kuraklık stresinde gen ifadesi %57 oranında ifade düşüşü gözlenirken, sıcaklık stresinde %113 oranında ifade artışı belirlenmiştir. Kuraklık+sıcaklık stresi altında %38'lik ifade düşüşü eşik değerinin altında kalmıştır.

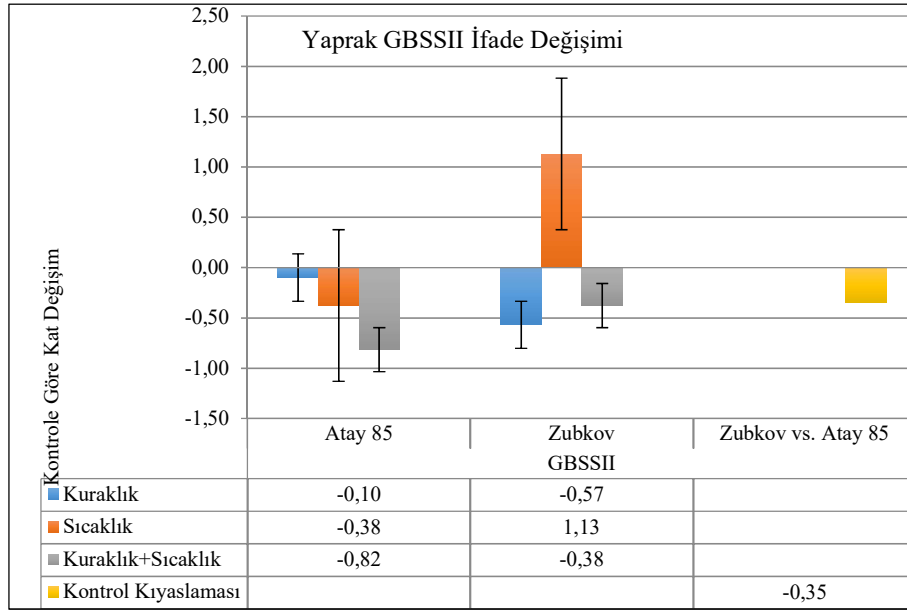
*SSI* geni ifadesi kontrol bireyleri arasında kıyaslandığında Zubkov çeşidinde ifade düzeyinin %28 daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Atay 85 çeşidinde kuraklık stresi altında gen ifadesinde değişim olmazken, sıcaklık stresinde eşik değerinin altında kalan %48, kuraklık+sıcaklık stresinde ise %65 oranlarında ifade düşüşleri gözlenmiştir. Zubkov çeşidinde kuraklık stresi altında %56 oranında ifade düşüşü gözlenirken, sıcaklık ve kuraklık+sıcaklık streslerinde eşik değerinin altında kalan %36 oranında ifade düşüşü belirlenmiştir.

*SSIIc* geni ifadesi kontrol bireyleri arasında kıyaslandığında Atay 85 çeşidinde ifadenin %15 daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Atay 85 çeşidinde kuraklık ve sıcaklık streslerinde gözlenen ifade değişimleri önemsiz kabul edilirken, kuraklık+sıcaklık stresi altında %67 ifade düşüşü gözlenmiştir. Zubkov çeşidinde kuraklık stresi altında ifade değişimi önemsiz kabul edilirken sıcaklık stresindeki düşüş de eşik değere ulaşmamıştır. Kuraklık+sıcaklık stresi altında %52 oranında ifade düşüşü gözlenmiştir.

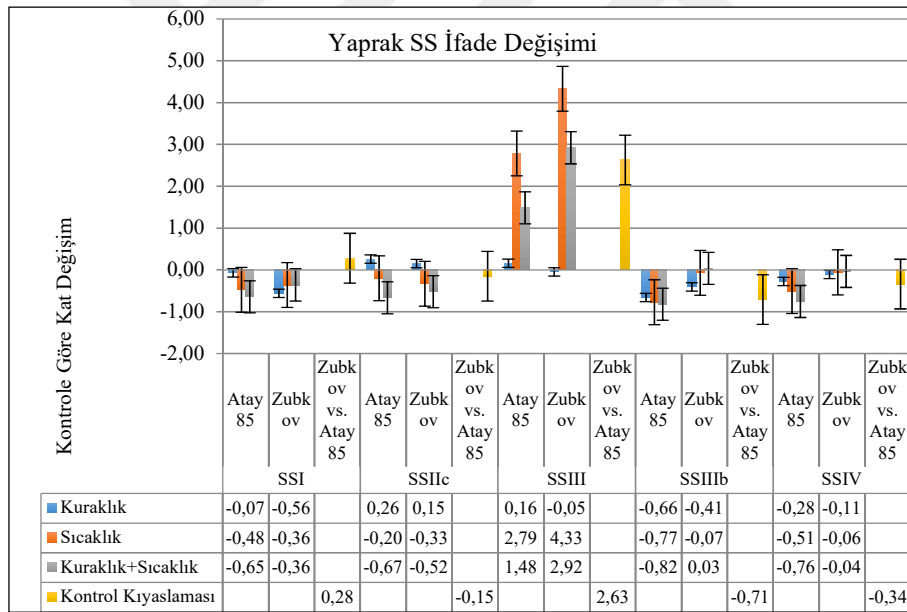
*SSIII* geni ifadesi kontrol bireyleri arasında kıyaslandığında Zubkov çeşidinde ifade düzeyinin 2,62 kat daha fazla olduğu gözlenmiştir. Her iki genotip için de kuraklık stresi altında gen ifadesinde değişim önemsiz kabul edilirken sıcaklık stresi altında Atay 85 çeşidinde %279, Zubkov çeşidinde %433 ifade artışı gözlenmiştir. Kuraklık+sıcaklık stresi altında Atay 85 çeşidinde %148, Zubkov çeşidinde %292 oranlarında artış gözlenmiştir.

*SSIIIb* geni kontrol bireyleri arasında kıyaslandığında Atay 85 çeşidinde ifadenin %71 daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Atay 85 çeşidinde her 3 stres koşulunda da ifadede azalmalar gözlenirken bu değerler kuraklık için %66, sıcaklık için %77 ve kuraklık+sıcaklık için %82 olarak belirlenmiştir. Zubkov çeşidinde hiçbir stres koşulu altında ifade değişimi eşik değere ulaşmamıştır.

*SSIV* geni kontrol bireyleri arasında kıyaslandığında Atay 85 çeşidinde ifadenin %34 daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Atay 85 çeşidinde her 3 stres koşulunda da ifadede azalmalar gözlenirken bu değerler kuraklık için %26 ile eşik değerinin altında kalırken, sıcaklık için %51 ve kuraklık+sıcaklık için %76 olarak belirlenmiştir. Zubkov çeşidinde hiçbir stres koşulu altında ifade değişimi önemli kabul edilmemiştir.



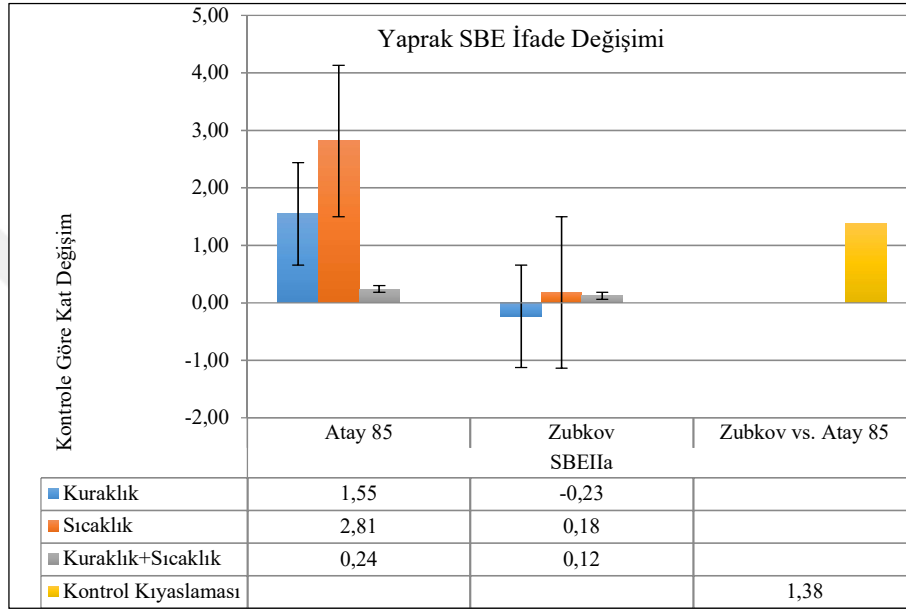
Şekil 5.31. Yaprak dokusunda Atay 85 ve Zubkov çeşitlerinde *GBSSII* geninin ifade kıyaslaması.



Şekil 5.32. Yaprak dokusunda Atay 85 ve Zubkov çeşitlerinde *SSI*, *SSIIc*, *SSIII*, *SSIIIb* ve *SSIV* genlerinin ifade kıyaslaması.

### 5.6.3. Nişasta Dallanma Enzimi (Starch Branching Enzyme) Grubu

*SBEIIa* geni kontrol bireyleri arasında kıyaslandığında Zubkov çeşidinde ifadenin %138 daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Atay 85 çeşidinde her 3 stres koşulunda da ifadede artışlar gözlenirken bu değerler kuraklık için %155, sıcaklık için %281 artış gösterirken, kuraklık+sıcaklık için %24 ile eşik değerinin altında kalmıştı. Zubkov çeşidinde hiçbir stres koşulu altında ifade değişimi önemli kabul edilmemiştir (Şekil 5.33).



Şekil 5.33. Yaprak dokusunda Atay 85 ve Zubkov çeşitlerinde *SBEIIa* genlerinin ifade kıyaslaması.

### 5.6.4. Dallanma Bozucu Enzim (DBE) Kodlayan Genlerin İfade Değişimleri

Yaprakta DBE grubu enzimleri kodlayan *Isol*, *IsolI*, *IsolII* ve *Pul* genlerinin ifadeleri incelenmiştir (Şekil 5.34).

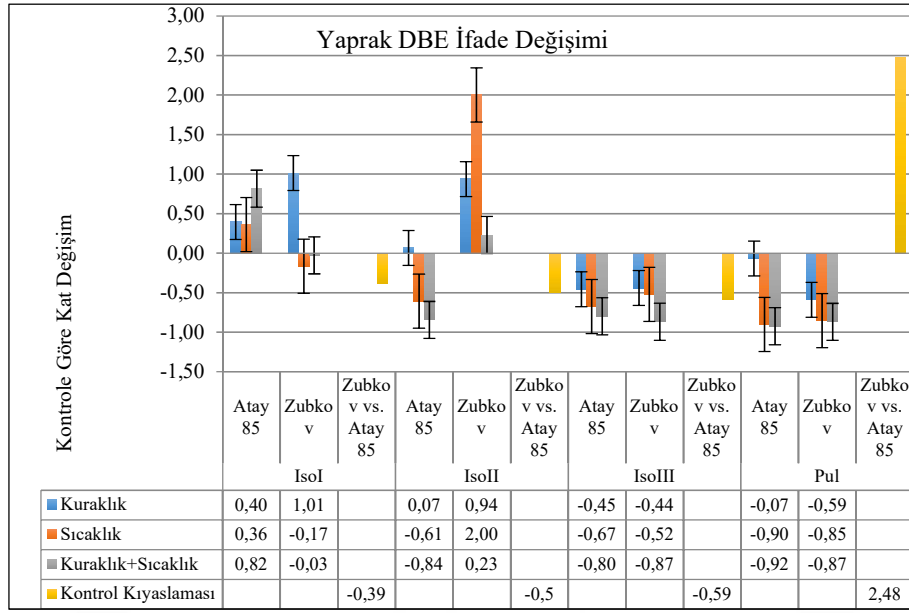
*Isol* geni kontrol bireyleri arasında kıyaslandığında Atay 85 çeşidinde ifadenin %39 daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Atay 85 çeşidinde her 3 stres koşulunda da ifadede artışlar gözlenirken bu değerler kuraklık için %40 ve sıcaklık için %36 ile eşik değerinin altında kalmış olup, kuraklık+sıcaklık için %82 olarak belirlenmiştir. Zubkov çeşidinde kuraklık stresinde %101 ifade artışı gözlenirken, sıcaklık ve kuraklık+sıcaklık streslerinde ifadelere meydana gelen değişimler önemsiz kabul edilmiştir.

*IsoII* geni kontrol bireyleri arasında kıyaslandığında Atay 85 çeşidinde ifadenin %50 daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Atay 85 çeşidinde kuraklık stresinde ifadede değişim gözlenmez iken, sıcaklık stresinde %61, kuraklık+sıcaklık stresinde %84 ifade düşüşleri gözlenmiştir. Zubkov çeşidinde kuraklık stresinde %94, sıcaklık stresinde %200 ifade artışı gözlenirken, kuraklık+sıcaklık stresinde ifadelerde meydana gelen değişim önemsiz kabul edilmiştir.

*IsoIII* geni kontrol bireyleri arasında kıyaslandığında Atay 85 çeşidinde ifadenin %59 daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Bu genin stres koşulları altında ifadelerinde her iki genotip de aynı yanıtları değişen miktarlarla oluşturmuştur. Kuraklık stresi altında Atay 85 çeşidinde %45, Zubkov çeşidinde %44 oranlarında azalma gözlenirken bu değerler eşik değerinin altında kalmıştır. Sıcaklık stresi altında Atay 85 çeşidinde %67, Zubkov çeşidinde %52 ifade düşüşlerine neden olmuştur. Kuraklık+sıcaklık stresi Atay 85 çeşidinde %80, Zubkov çeşidinde %87 ifade düşüşlerine neden olmuştur.

*Pul* geni kontrol bireyleri arasında kıyaslandığında Atay 85 çeşidinde ifadenin %248 daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Bu genin stres koşulları altında ifadelerinde her iki genotip de aynı yanıtları değişen miktarlarla oluşturmuştur. Kuraklık stresi altında Atay 85 çeşidinde %7, Zubkov çeşidinde %59 oranlarında azalma gözlenirken, Atay 85 için bu oran eşik değerinin altında kalmıştır. Sıcaklık stresi altında Atay 85 çeşidinde %90, Zubkov çeşidinde %85 ifade düşüşlerine neden olmuştur. Kuraklık+sıcaklık stresi Atay 85 çeşidinde %92, Zubkov çeşidinde %87 ifade düşüşlerine neden olmuştur.





Şekil 5.34. Yaprak dokusunda Atay 85 ve Zubkov çeşitlerinde *IsoI*, *IsoII*, *IsoIII* ve *Pul* genlerinin ifade kıyaslaması.

### 5.6.5. Sukroz Grubu Enzimleri

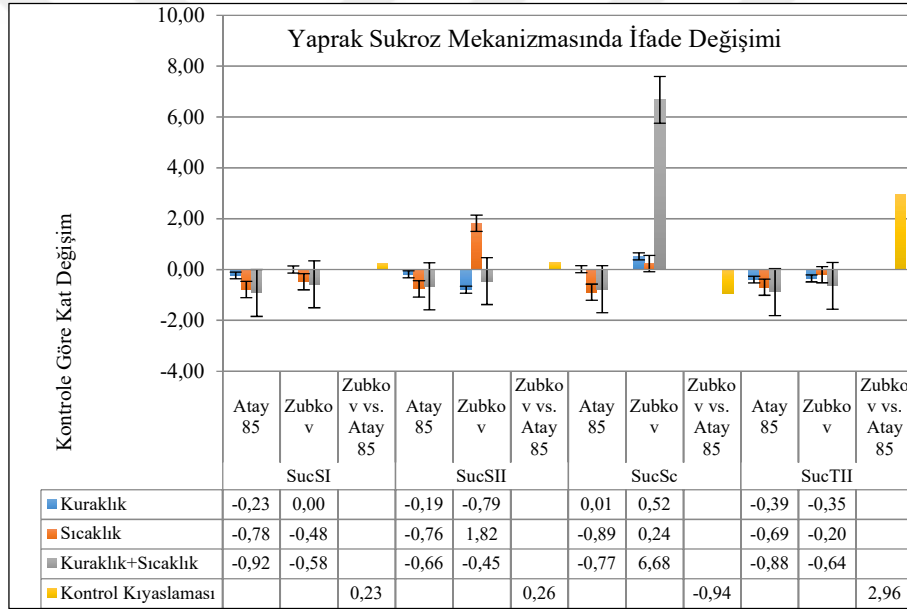
Yaprakta Suc grubu enzimleri kodlayan *SucSI*, *SucSII*, *SucSc* ve *SucTI* genlerinin ifadeleri incelenmiştir (Şekil 5.35).

*SucSI* geni kontrol bireyleri arasında kıyaslandığında Zubkov çeşidinde ifadenin %23 daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Atay 85 çeşidinde kuraklık stresi altında %23 ifade düşüşü gözlenirken bu değer eşik sınırın altında kalmıştır. Sıcaklık stresi altında %78, kuraklık+sıcaklık stresi altında ise %92 ifade düşüşleri gözlenmiştir. Zubkov çeşidinde kuraklık stresi altında ifadede değişim gözlenmemiş olup, sıcaklık stresi altında ifade düşüşü %48 ile eşik değerinin altında kalmış, kuraklık+sıcaklık stresinde ise %58 ifade düşüşü gözlenmiştir.

*SucSII* geni kontrol bireyleri arasında kıyaslandığında Zubkov çeşidinde ifadenin %26 daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Atay 85 çeşidinde kuraklık stresi altında %19 ifade düşüşü gözlenirken bu değer eşik sınırın altında kalmıştır. Sıcaklık stresi altında %76, kuraklık+sıcaklık stresi altında ise %66 ifade düşüşleri gözlenmiştir. Zubkov çeşidinde kuraklık stresi altında %79 ifade düşüşü gözlenmiş olup, sıcaklık stresi altında %182 ifade artışı ve kuraklık+sıcaklık stresinde ise %45 ile eşik değere erişmeyen ifade düşüşü gözlenmiştir.

*SucSc* geni kontrol bireyleri arasında kıyaslandığında Atay 85 çeşidinde ifadenin %94 daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Atay 85 çeşidinde kuraklık stresi altında ifade değişimi gözlenmemiştir. Sıcaklık stresi altında %89, kuraklık+sıcaklık stresi altında ise %77 ifade düşüşleri gözlenmiştir. Zubkov çeşidinde kuraklık stresi altında %52, sıcaklık stresi altında eşik değerin altında kalan %24, kuraklık+sıcaklık stresinde %688 ifade artışları gözlenmiştir.

*SucTII* geni kontrol bireyleri arasında kıyaslandığında Zubkov çeşidinde ifadenin %296 daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Atay 85 çeşidinde kuraklık stresi altında %39 ifade düşüşü gözlenirken bu değer eşik sınırın altında kalmıştır. Sıcaklık stresi altında %69, kuraklık+sıcaklık stresi altında ise %88 ifade düşüşleri gözlenmiştir. Zubkov çeşidinde kuraklık ve sıcaklık streslerinde gözlenen ifade düşüşleri eşik değerin altında kalmış olup, sırasıyla %35 ve %20 oranları elde edilmiştir. Kuraklık+sıcaklık stresinde ise %64 ifade düşüşü gözlenmiştir.

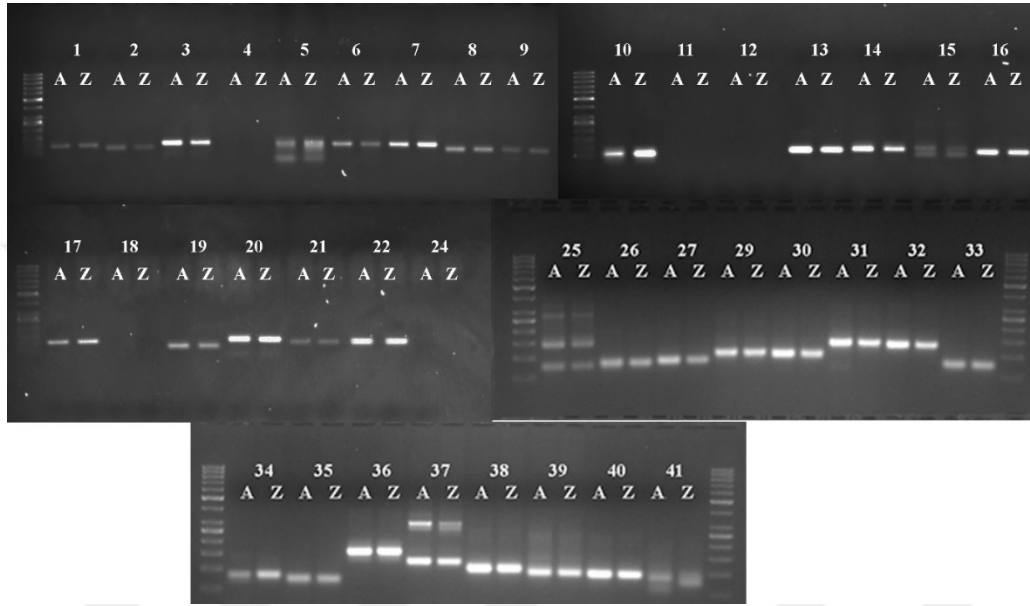


Şekil 5.35. Yaprak dokusunda Atay 85 ve Zubkov çeşitlerinde *SucSI*, *SucSII*, *SucSc* ve *SucTII* genlerinin ifade kıyaslaması.

## 5.7. KASP PCR Reaksiyonları

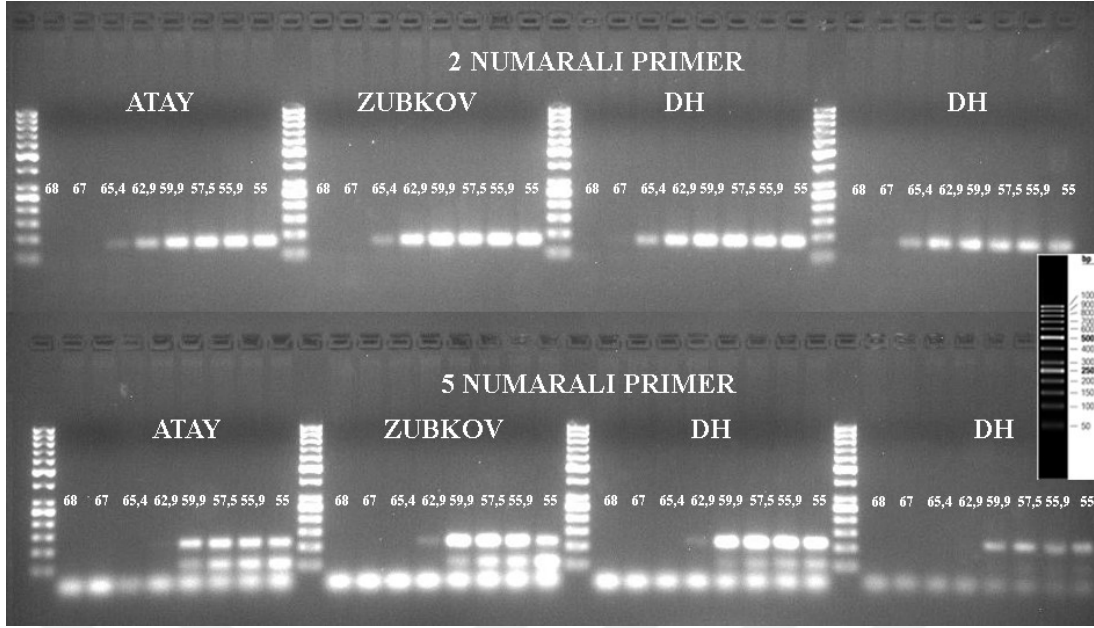
### 5.7.1. KASP Primerleri ve Bağlanma Sıcaklıklarının Belirlenmesi

Optimizasyon çalışmalarında tüm primerler kullanılarak Atay 85 ve Zubkov çeşitlerinde 61-55°C touchdown ve 55 °C bağlanma sıcaklığıyla PCR reaksiyonları kurulup agaroz jel elektroforezinde yürütülerek, PCR ürünleri kontrol edilmiştir (Şekil 5.36).

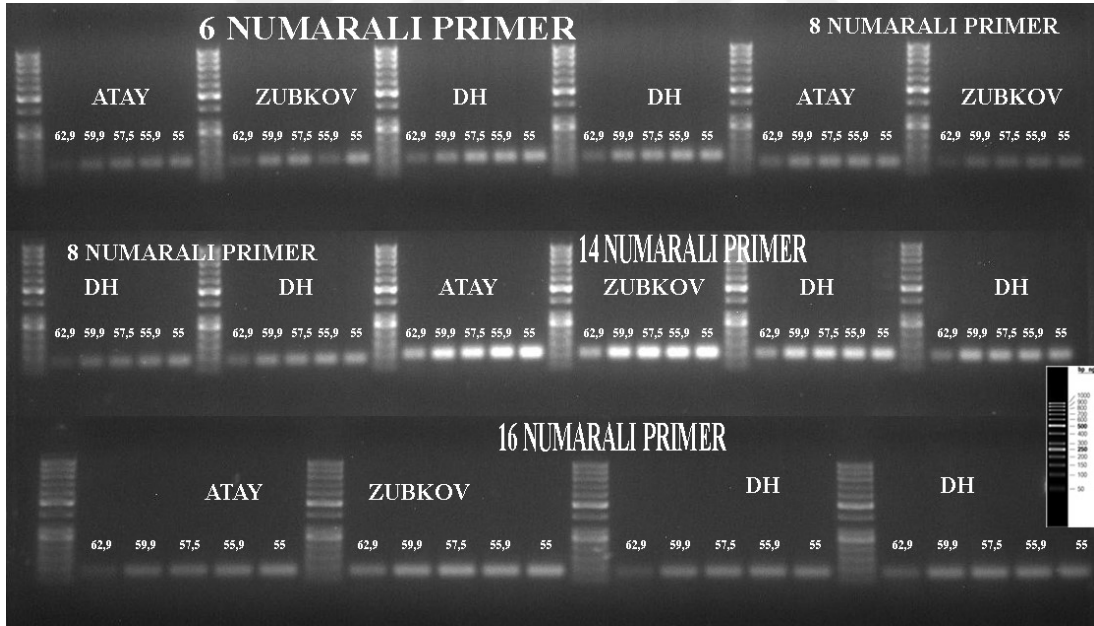


Şekil 5.36. Primer setlerine ait PCR ürünleri %2'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülmüştür. DNA ladder: 50 bç . A: Atay 85, Z: Zubkov.

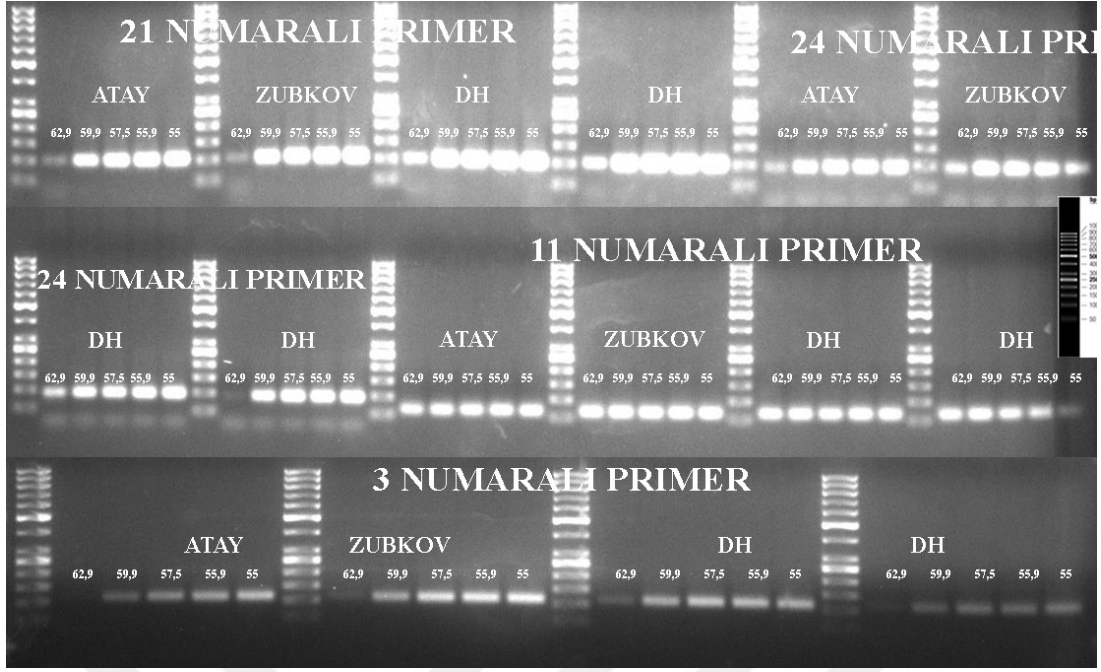
İlk denemede herhangi bir sinyal oluşturan (görseli sunulmamıştır) primerler ile 55–63°C arası gradient PCR yapılmıştır. Örnekler %2'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülmüştür (Şekil 5.37 – 5.44 sırasıyla).



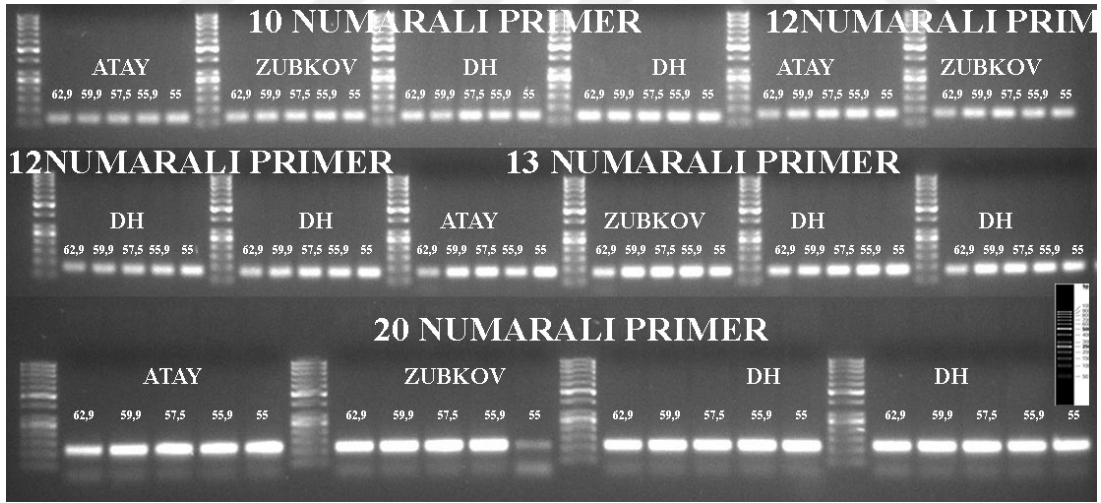
Şekil 5.37. 2 ve 5 numaralı primer setlerine ait %2'lik agaroz jel elektroforezi görüntüsü. Atay: Atay 85, Zubkov: Zubkov, DH: Double haploid çeşitler. 50 bç'lik DNA ladder kullanılmıştır.



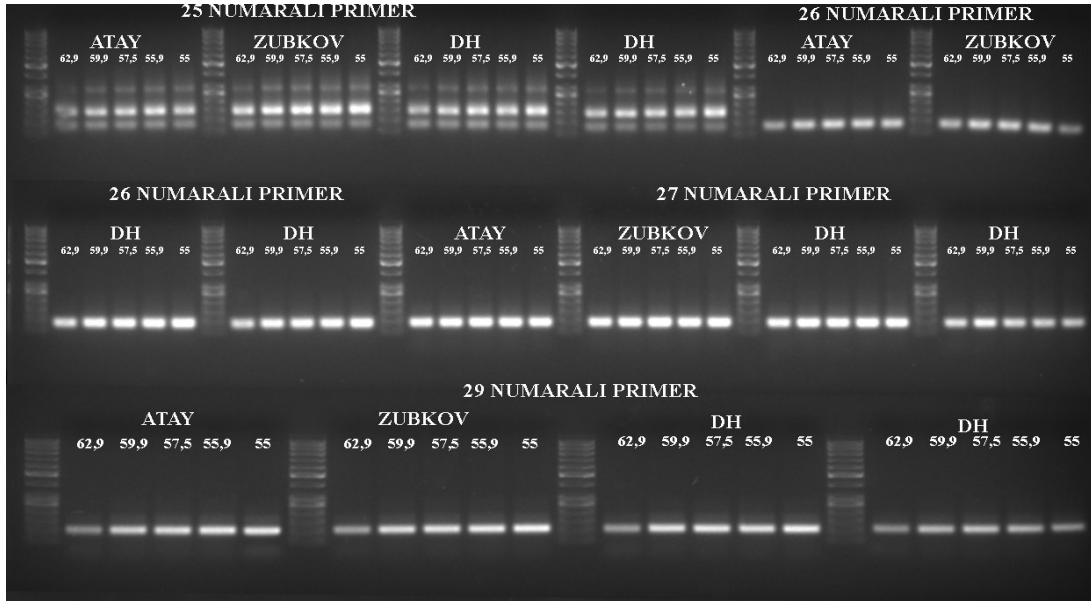
Şekil 5.38. 6, 8 14 ve 16 numaralı primer setlerine ait %2'lik agaroz jel elektroforezi görüntüsü. Atay: Atay 85, Zubkov: Zubkov, DH: Double haploid çeşitler. 50 bç'lik DNA ladder kullanılmıştır.



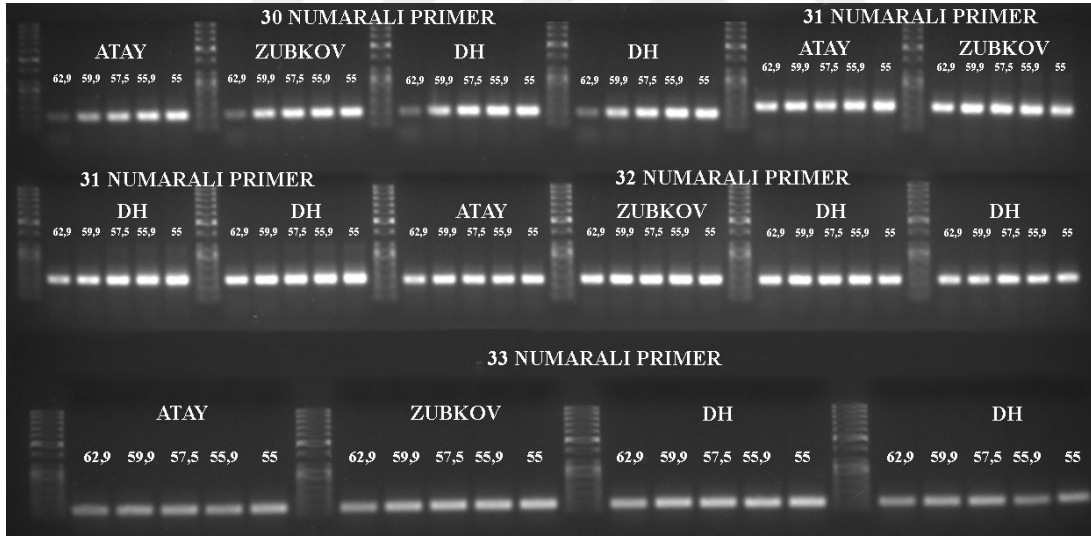
Şekil 5.39. 21, 24, 11 ve 3 numaralı primer setlerine ait %2'lik agaroz jel elektroforezi görüntüsü. Atay: Atay 85, Zubkov: Zubkov, DH: Double haploid çeşitler. 50 bç'lik DNA ladder kullanılmıştır.



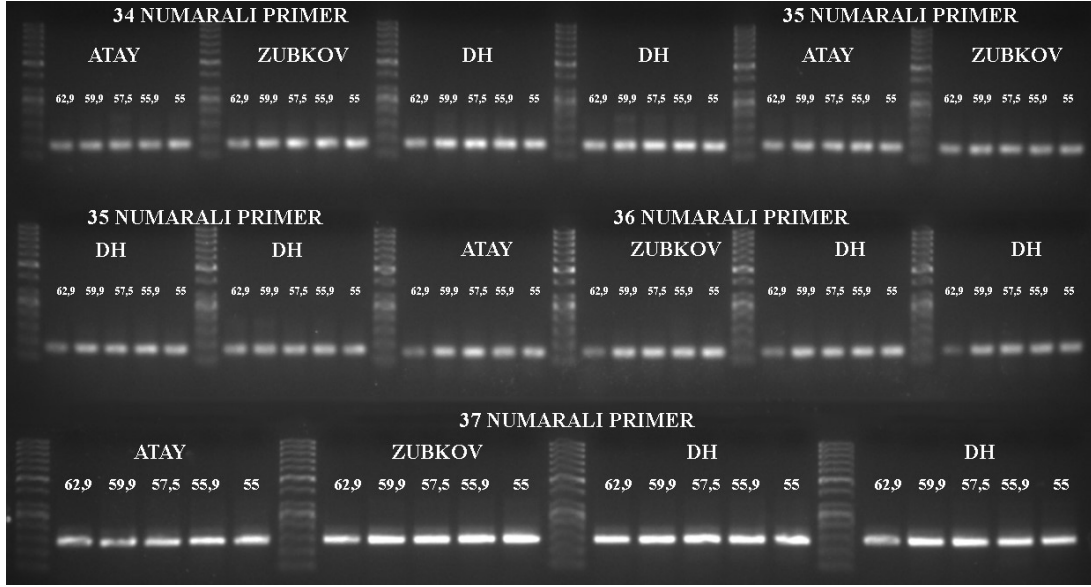
Şekil 5.40. 10, 12, 13, 20 numaralı primer setlerine ait %2'lik agaroz jel elektroforezi görüntüsü. Atay: Atay 85, Zubkov: Zubkov, DH: Double haploid çeşitler. 50 bç'lik DNA ladder kullanılmıştır.



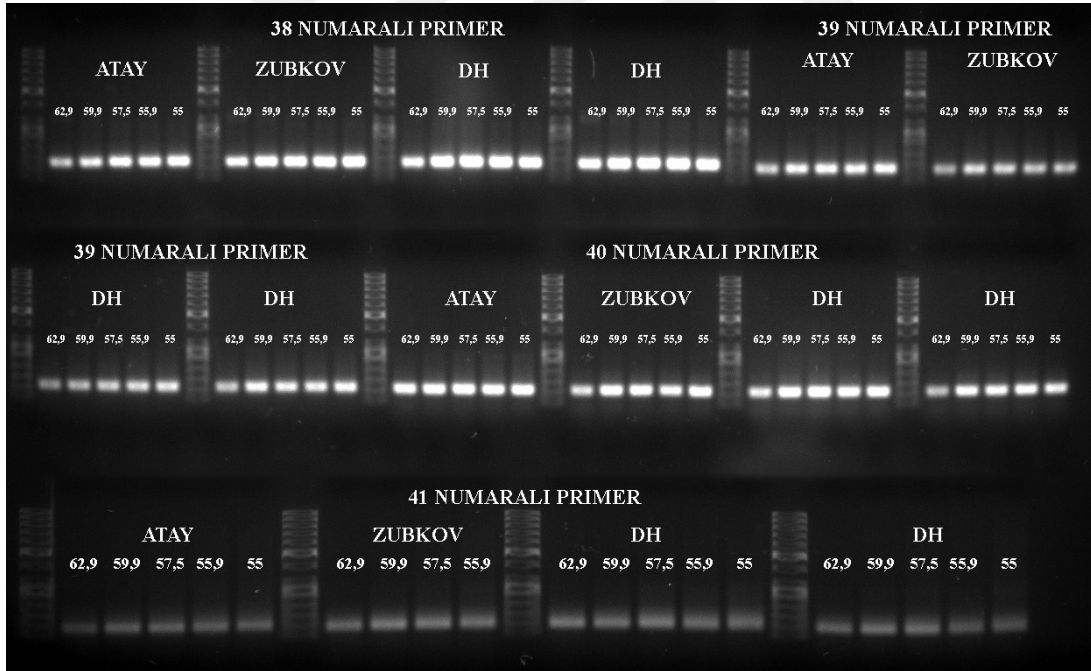
Şekil 5.41. 25, 26, 27, 29 numaralı primer setlerine ait %2'lik agaroz jel elektroforezi görüntüsü. Atay: Atay 85, Zubkov: Zubkov, DH: Double haploid çeşitler. 50 bç'lik DNA ladder kullanılmıştır.



Şekil 5.42. 30, 31, 32 ve 33 numaralı primer setlerine ait %2'lik agaroz jel elektroforezi görüntüsü. Atay: Atay 85, Zubkov: Zubkov, DH: Double haploid çeşitler. 50 bç'lik DNA ladder kullanılmıştır.

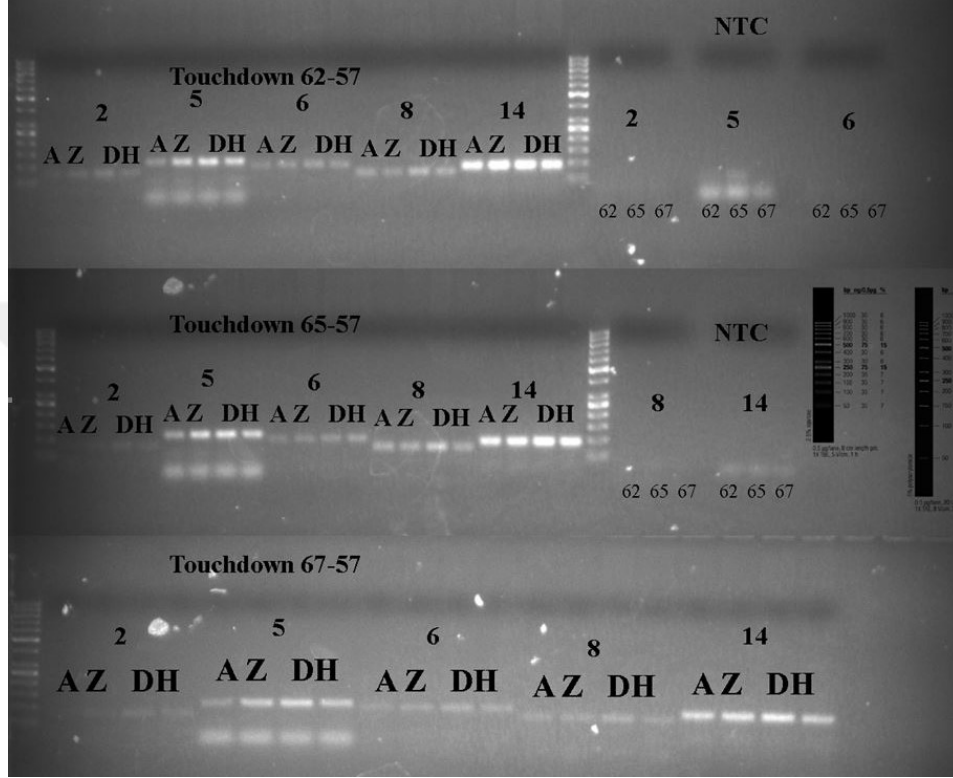


Şekil 5.43. 34, 35, 36 ve 37 numaralı primer setlerine ait %2'lik agaroz jel elektroforezi görüntüsü. Atay: Atay 85, Zubkov: Zubkov, DH: Double haploid çeşitler. 50 bç'lik DNA ladder kullanılmıştır.



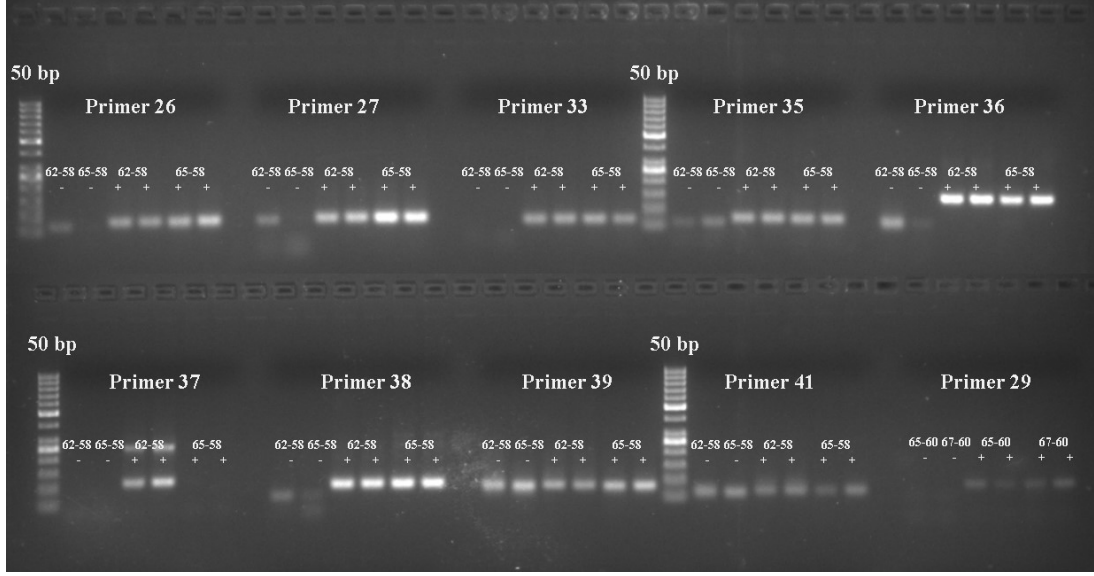
Şekil 5.44. 38, 39, 40 ve 41 numaralı primer setlerine ait %2'lik agaroz jel elektroforezi görüntüsü. Atay: Atay 85, Zubkov: Zubkov, DH: Double haploid çeşitler. 50 bç'lik DNA ladder kullanılmıştır.

Bağlanma sıcaklığı ve KASP sinyal denemeleri sonucunda 2, 5, 6, 8, 14 (görseli sunulmamıştır), 26, 27, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40 ve 41 numaralı primer setleri ile belirlenen bağlanma sıcaklığının üzerine 5–8°C arasında farklılıklar eklenerek touchdown PCR optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Agaroz jel elektroforez görüntüleri (Şekil 5.45–5.47 arası) ve primer setleri için belirlenen sıcaklıklar çizelge 5.5’de verilmiştir.

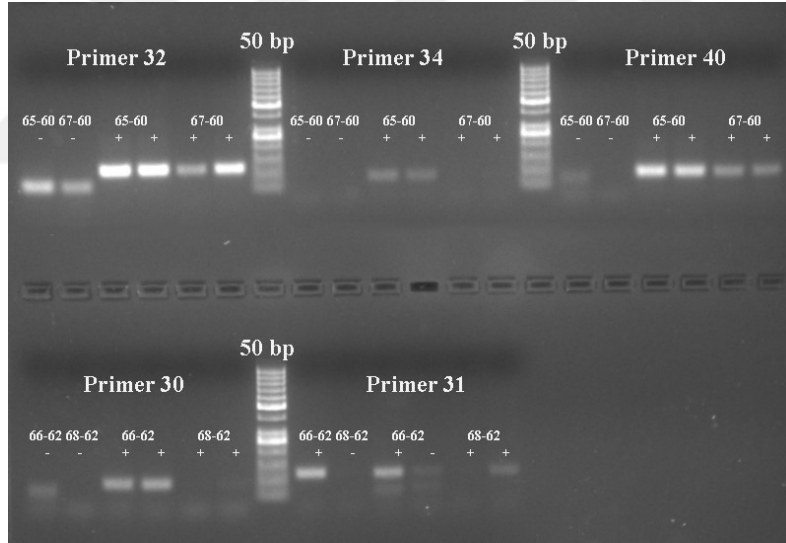


Şekil 5.45. 2, 5, 6, 8, 14 numaralı primerler ile yapılan touchdown PCR denemesine ait agaroz jel elektroforezi görseli. NTC: Negatif Kontrol, A: Atay 85, Z: Zubkov, DH: Double haploid bireyler. 50 bp’lik DNA ladder kullanılmıştır.





Şekil 5.46. 26, 27, 29, 33, 35, 36, 37, 38, 39, 41 numaralı primerler ile yapılan touchdown PCR denemesine ait agaroz jel elektroforezi görseli. (+): DNA içeren örnekler, (-): DNA içermeyen örnekler. 50 bç'lik DNA ladder kullanılmıştır.



Şekil 5.47. 30, 31, 32, 34, 40 numaralı primerler ile yapılan touchdown PCR denemesine ait agaroz jel elektroforezi görseli. (+): DNA içeren örnekler, (-): DNA içermeyen örnekler. 50 bç'lik DNA ladder kullanılmıştır.

Çizelge 5.5. Touchdown PCR optimizasyon denemeleri sonucunda her bir gen seti için belirlenen bağlanma ve touchdown başlangıcı sıcaklıklarını gösterir çizelge.

Primer Seti	Bağlanma Sıcaklığı (°C)	Belirlenen touchdown başlangıcı (°C)
2	57	62
5	57	67
6	57	62
8	57	62
14	57	62
21	57	62
26	58	65
27	58	65
29	60	65
30	60	66
31	62	66
32	60	65
33	58	62
34	60	65
35	58	62
36	58	65
37	58	62
38	58	65
39	58	65
40	60	67
41	58	65

### 5.7.2. KASP Genotipleme Analizleri

Belirlenen sıcaklıklar ile KASP genotipleme analizlerine geçilmiş ve primerlerin işlevselliği araştırılmıştır. Reaksiyon koşulları kitte anlatıldığı şekilde, modifikasyon yapılmadan oluşturulmuştur. İlk seferde 1-24 arası primer setinden seçilen 6 adet (2, 5, 6, 8, 14, 21) primer seti denenmiş ve allelik ayrımları gözlemlenmiştir (Şekil 5.48). Bu sonuca göre 1-24 serisinden 8 ve 21 numaralı primer setlerinin allelleri ayırdıkları gözlemlenmiştir.

Primer 2	Primer 5	Primer 6	Primer 8	Primer 14	Primer 21		
ATAY 85	ATAY 85	ATAY 85	ATAY 85	ATAY 85	ATAY 85		ALLEL 1
ZUBKOV	ZUBKOV	ZUBKOV	ZUBKOV	ZUBKOV	ZUBKOV		ALLEL 2
AxZ	AxZ	AxZ	AxZ	AxZ	AxZ		BOTH ALLEL
ZxA	ZxA	ZxA	ZxA	ZxA	ZxA		NO CALL
DH (18x2)	DH (18x2)	DH (18x2)	DH (18x2)	DH (18x2)	DH (18x2)		NTC
DH (20x1)	DH (20x1)	DH (20x1)	DH (20x1)	DH (20x1)	DH (20x1)		

Şekil 5.48. 1-24 primer setinden seçilen 6 primer grubunun KASP analizleri sonucunu gösterir grafik.

25-40 serisinde seçilen (nonspecifik bant oluşturmeyen) primer setleri ile KASP analizi kurulmuştur (Şekil 5.49). Analiz sonucunda 26, 30, 39 numaralı primer setlerinin allelleri ayırdığı gözlenmiştir.

Primer 33	Primer 35	Primer 37	Primer 39	Primer 26	Primer 27	Primer 36	Primer 38	Primer 39	Primer 41	Primer 29	Primer 32	Primer 34	Primer 40	Primer 30	Primer 31
Atay	Atay	Atay	Atay	Atay	Atay	Atay	Atay	Atay	Atay	Atay	Atay	Atay	Atay	Atay	Atay
Zubkov	Zubkov	Zubkov	Zubkov	Zubkov	Zubkov	Zubkov	Zubkov	Zubkov	Zubkov	Zubkov	Zubkov	Zubkov	Zubkov	Zubkov	Zubkov
NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC	NTC

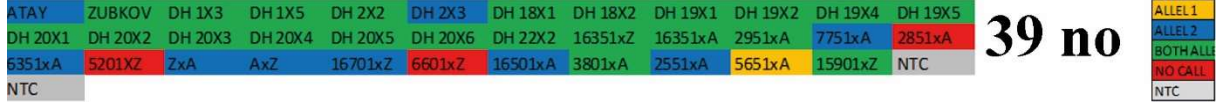
Şekil 5.49. Primer setlerinde Atay 85 ve Zubkov çeşitlerinde yapılan KASP analizi sonucu.

Ancak bu sette yapılan denemelerin sonucunda RFU değerleri düşük çıktığından (2700-3500 arası görsel sunulmamıştır) düzeltme amacıyla araştırma yapılmış ve Gonzales ve arkadaşlarının makalesinde (110) önerilen çözüm yolları denenmiştir. Bu amaçla reaksiyonda kullanılan DNA miktarı 50ng/rxn'dan, 20ng/rxn'a çekilmiş, ikinci PCR döngülerinde denatürasyon süresi 20 saniyeden 10 saniyeye düşürülmüş ve ikinci PCR döngü sayısı 10 döngü artırılmıştır. Bu koşullar ile tüm bileşenler yenilenerek reaksiyon kurulmuş ve arzu edilen RFU derecelerine (5000 üzeri) ulaşılmıştır. 26, 30 ve 39 numaralı primerler ile tekrar PCR reaksiyonları kurulmuştur. 26 ve 30 numaralı primerler ile yapılan reaksiyonlarda hiçbir bireyde allel ayrımı gözlenmemiş olup (Şekil 5.50) tekrarlanan analizlerde de aynı sonuca ulaşılmıştır.

ATAY	ZUBKOV	DH 1X3	DH 1X5	DH 2X2	DH 2X3	DH 18X1	DH 18X2	DH 19X1	DH 19X2	DH 19X4	DH 19X5		26 no	ALLEL 1
DH 20X1	DH 20X2	DH 20X3	DH 20X4	DH 20X5	DH 20X6	DH 22X2	16351xZ	16351xA	2951xA	7751xA	2851xA			ALLEL 2
6351xA	5201XZ	ZxA	AxZ	16701xZ	6601xZ	16501xA	3801xA	2551xA	5651xA	15901xZ	NTC			BOTH ALLEL
NTC														NO CALL
ATAY	ZUBKOV	DH 1X3	DH 1X5	DH 2X2	DH 2X3	DH 18X1	DH 18X2	DH 19X1	DH 19X2	DH 19X4	DH 19X5		30 no	ALLEL 1
DH 20X1	DH 20X2	DH 20X3	DH 20X4	DH 20X5	DH 20X6	DH 22X2	16351xZ	16351xA	2951xA	7751xA	2851xA			ALLEL 2
6351xA	5201XZ	ZxA	AxZ	16701xZ	6601xZ	16501xA	3801xA	2551xA	5651xA	15901xZ	NTC			BOTH ALLEL
NTC														NO CALL

Şekil 5.50. 26 ve 30 numaralı primer setlerinde yapılan KASP analizi sonucunu gösterir grafik.

39 numaralı primer setinde yapılan analizde Atay 85 ve Zubkov ayrımı belirlenmiştir (Şekil 5.51). Ancak allelik dağılım haritasında bireylerin çok yakın olduğu gözlemlenmiş olup RFU değerleri 2500'ün altında kaldığından DNA miktarı düşürülüp döngü sayısı artırılmış, yalnızca ATAY 85 ve Zubkov bireyleri ile deneme reaksiyonu kurulmuştur. Bu reaksiyon sonucunda yapılan incelemede Atay 85 ve Zubkov çeşitlerine ait allellerin ayrılmadığı kesin olarak anlaşılmıştır (Şekil 5.52).

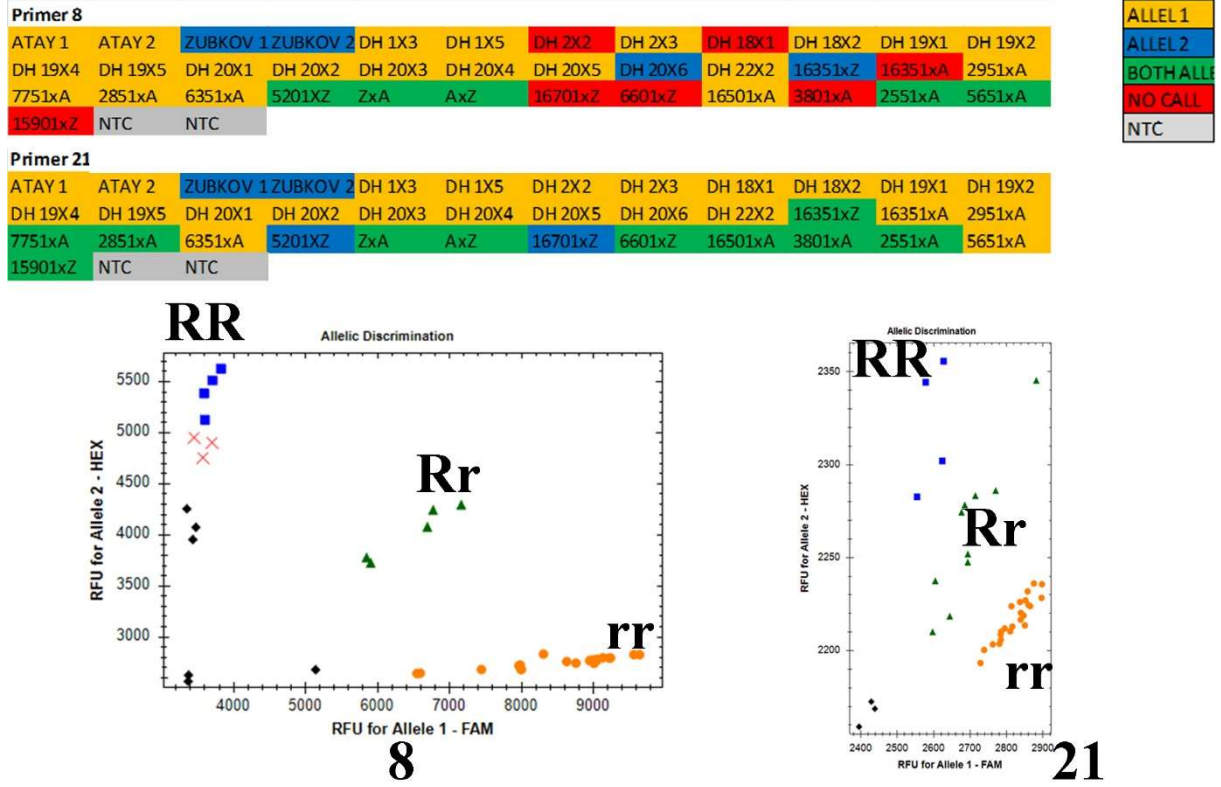


Şekil 5.51. 39 Numaralı primer setinde yapılan KASP analizi sonucunu gösterir grafik.

Atay	ALLEL 1
Zubkov	ALLEL 2
	BOTH ALLEL
NTC	NO CALL
	NTC

Şekil 5.52. 39 numaralı primer setinde Atay 85 ve Zubkov çeşitlerinde yapılan analiz sonucunu gösterir grafik.

1-41 primer setlerinde yapılan taramaların ardından allelleri ayırdığı belirlenen 8 ve 21 numaralı primerler ile mevcut tüm genotipler taranmıştır. Bu taramalarda hata olmadığından emin olmak amacıyla Atay 85 ve Zubkov çeşitlerinden 2 farklı bireyden DNA izolasyonu yapılmış ve reaksiyona Atay 1-2, Zubkov 1-2 adlarıyla eklenmiştir. Reaksiyon sonuçları önceki sonuçlarla tam uyumluluk göstermiş olup 8 ve 21 numaralı primer setlerinin allelleri ayırdığı tespit edilmiştir. Şekil 5.53'de primerlerin KASP reaksiyon sonuçları ve allelik dağılımları belirtilmiştir.



Şekil 5.53. 8 ve 21 numaralı primer setleri kullanılarak mevcut tüm çeşitlerde yapılan genotipleme analizinin sonucu. Allelik dağılım haritalarında RR: Dayanıklı homozigot, Rr: Heterozigot, rr: Hassas homozigot çeşitleri ifade etmektedir.

## 5.8. Fizyolojik Analiz Sonuçları

### 5.8.1. Fotosentez Etkinliğinin Belirlenmesi

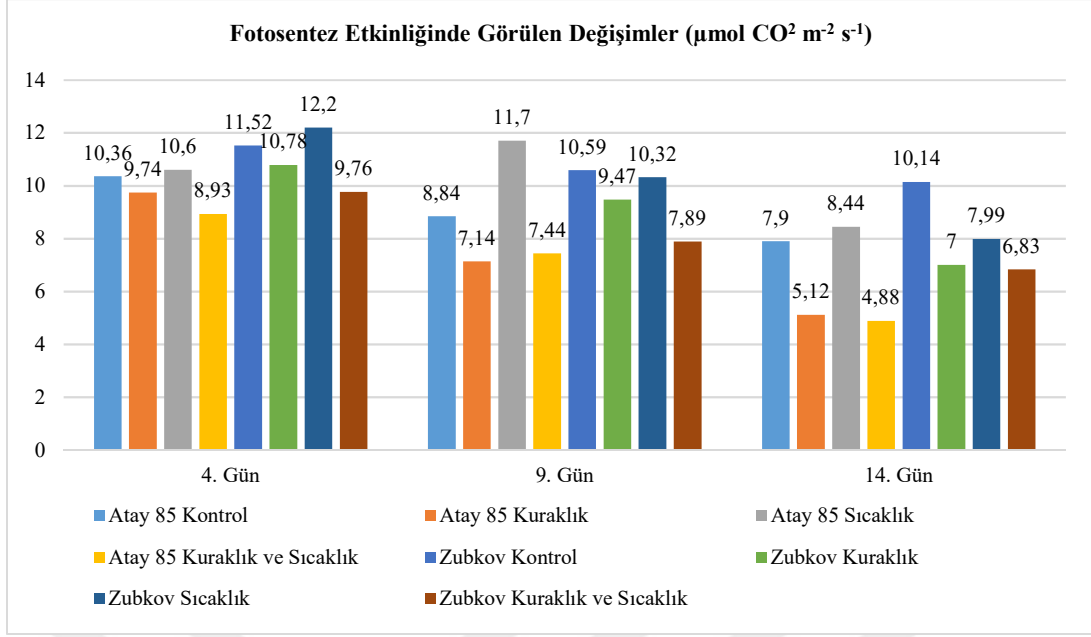
Fotosentez etkinliğine ilişkin verilerle yapılan varyans analizi sonuçları çizelge 5.6'de verilmiştir.

Çizelge 5.6. Yüksek sıcaklık, kuraklık ve kuraklık+sıcaklık stresinin ekmeklik buğday çeşitlerine ait fotosentez etkinliği değerlerine ilişkin verilerle yapılan varyans analiz tablosu.

\*:  $p < 0.05$ ; *ns*: incelenen özellikler arasındaki farklılıklar önemsiz

Varyasyon Kaynağı	S.D.	4. gün	9. gün	14. gün
Tekerrür	4	–	–	–
Sıcaklık (A)	1	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
<b>Hata<sub>1</sub></b>	<b>4</b>	–	–	–
Kuraklık (B)	1	<i>ns</i>	**	*
A X B	1	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
<b>Hata<sub>2</sub></b>	<b>8</b>	–	–	–
Çeşit (C)	1	*	<i>ns</i>	*
A X C	1	<i>ns</i>	*	<i>ns</i>
B X C	1	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
A X B X C	1	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
<b>Hata<sub>3</sub></b>	<b>16</b>	–	–	–

Varyans analiz tablosu incelendiğinde stres uygulamasının 4. gününde fotosentez etkinliği bakımından çeşitler arasındaki farklılık %5 düzeyinde önemli bulunmuştur. Stres uygulamasının 9. gününde ise kuraklık faktörü ile birlikte sıcaklık x çeşit etkileşimi fotosentez etkinliği bakımından önemli çıkmıştır. Stres uygulamasının 14. gününde fotosentez etkinliği değerlerine ait verilerle yapılan varyans analizi sonucuna göre birbirinden bağımsız olarak kuraklık stresi ve çeşit faktörü önemli çıkmıştır. Değişimler Şekil 5.54' de gösterilmiştir.



Şekil 5.54. Çeşitler, dönemler ve uygulamalar arası fotosentez etkinliği değişimlerini gösterir grafik.

Analiz sonuçlarına göre fotosentez etkinliğinin 4. gün ölçümlerinde Atay 85 çeşidinde kuraklık stresi altında %5,98 oranında düşüş gösterdiği, sıcaklık stresinde %1,92 artış, kuraklık+sıcaklık stresinde ise %13,8 oranında düşüş gösterdiği belirlenirken; Zubkov çeşidinde kuraklık stresi altında %6,42 düşüş gözlemlenirken, sıcaklık stresinde %5,9 artış, kuraklık+sıcaklık stresinde %15,28'lik azalma tespit edilmiştir. 9. gün ölçümlerinde Atay 85 çeşidinde kuraklık stresi altında %19,23 azalma gözlemlenirken sıcaklık stresinde %32,25 artış, kuraklık+sıcaklık stresinde %15,84 düşüş belirlenmiş olup; Zubkov çeşidinde kuraklık stresinde %10,58, sıcaklık stresinde %2,5, kuraklık+sıcaklık stresinde ise %22,19 oranlarında azalma gözlenmiştir. 14. gün ölçümlerinde Atay 85 çeşidinde kuraklık stresinde %35,19 azalma, sıcaklık stresinde %6,84 artış, kuraklık+sıcaklık stresinde %38,23 azalma gözlenmiştir. Buna karşın Zubkov çeşidinde kuraklık stresinde %30,97, sıcaklık stresinde %21,2, kuraklık+sıcaklık stresinde ise %32,64 oranlarında düşüş gözlenmiştir.

## 5.8.2. Klorofil Miktar Tayini Sonuçları

Klorofil miktarına ilişkin verilerle yapılan varyans analizi sonuçları çizelge 5.7’de verilmiştir.

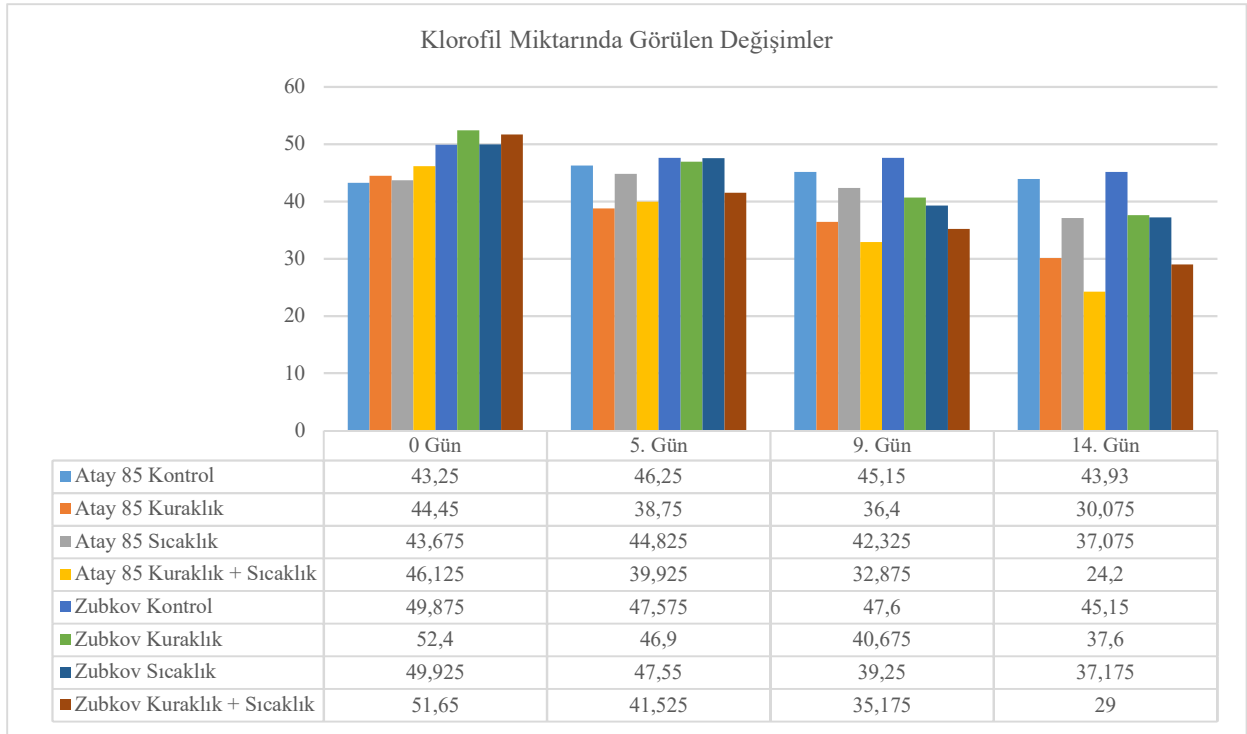
Çizelge 5.7. Yüksek sıcaklık, kuraklık ve yüksek sıcaklık-kuraklık stresinin ekmeklik buğday çeşitlerine ait klorofil miktarına ilişkin verilerle yapılan varyans analiz tablosu.

\*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; *ns*: incelenen özellikler arasındaki farklılıklar önemsiz kabul edilmiştir.

Varyasyon Kaynağı	S.D.	Stres öncesi	5 gün	10. gün	15. gün
Tekerrür	4	—	—	—	—
Sıcaklık (A)	1	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	**
<b>Hata<sub>1</sub></b>	<b>4</b>	—	—	—	—
Kuraklık (B)	1	<i>ns</i>	**	**	**
A X B	1	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
<b>Hata<sub>2</sub></b>	<b>8</b>	—	—	—	—
Çeşit (C)	1	**	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
A X C	1	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
B X C	1	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
A X B X C	1	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>	<i>ns</i>
<b>Hata<sub>3</sub></b>	<b>16</b>	—	—	—	—

Stres uygulama öncesinde çeşitlerin klorofil miktarları arasındaki fark istatistiki olarak önemli bulunmuştur. Stres uygulama boyunca ise özellikle kuraklık stresinin bitkilerin klorofil miktarları üzerinde önemli derecede etkisinin olduğu belirlenmiştir. Stres uygulamasının ilerleyen dönemlerinde ise yüksek sıcaklık stresi de bitkilerin klorofil miktarını önemli derecede etkilemiştir. Stres uygulamaları altında yetiştirilen buğday çeşitlerinde stres uygulama süresince belirlenen klorofil miktarları açıklamalarıyla Şekil 5.55’de belirtilmiştir.





Şekil 5.55. Çeşitler, dönemler ve uygulamalar arası klorofil miktarı değişimlerini gösterir grafik. Değerler SPAD Birimidir.

5. gün yapılan klorofil miktarı ölçümlerinde Atay 85 kuraklık stresinde %16,21, sıcaklık stresinde %7,08, kuraklık+sıcaklık stresinde %13,68 azalma gösterirken; Zubkov çeşidinde bu oran kuraklık stresinde %1,41, sıcaklık stresinde %0,05, kuraklık+sıcaklık stresinde de %12,71 olarak belirlenmiştir. 9. gün ölçümlerinde Atay 85 çeşidinde kuraklık stresinde %19,38, sıcaklık stresinde %6,26, kuraklık+sıcaklık stresinde %27,19 oranlarında düşüş gözlenirken; Zubkov çeşidinde kuraklık stresinde %14,55, sıcaklık stresinde %17,54, kuraklık+sıcaklık stresinde %26,1 oranlarında düşüş belirlenmiştir. 14. gün ölçümlerinde Atay 85 çeşidinde kuraklık stresi altında %31,54, sıcaklık stresi altında %15,6, kuraklık+sıcaklık stresi altında %44,9 oranlarında düşüş gözlenmiş olup; Zubkov çeşidinde kuraklık stresi altında %16,72, sıcaklık stresi altında %17,66, kuraklık+sıcaklık stresi altında %35,77 oranlarında azalma belirlenmiştir.

### 5.8.3. Prolin Miktarı Değişimleri

Uygulamalarda belirlenen prolin miktarına ait ortalamalar ile ortalamalar arasındaki farklılıklar çizelge 5.8'de verilmiştir.

Çizelge 5.8. Stres koşulları altında yetiştirilmiş olan buğday çeşitlerinde prolin aktivitesine ait ortalamalar ile ortalamalar arasındaki farklılıkların önem düzeyi.

Kuraklık		Prolin $\mu\text{mol}/\text{gram}$ yaş ağırlık	
		Atay 85	Zubkov
NS (24/14)	Kontrol	0,25	0,63
	Kurak	0,53	3,91
	<u>Ortalama</u>	<u>0,39</u>	<u>2,27</u>
YS (36/24)	Kontrol	0,83	1,3
	Kurak	2,87	16,27
	<u>Ortalama</u>	<u>1,85</u>	<u>8,79</u>
Ortalama		1,12	5,53

Analizler sonucu, kontrol koşullarında toleranslı Zubkov çeşidinin ( $0,63\mu\text{mol}/\text{g}$  (yaş ağırlık) ) hassas Atay 85 çeşidine ( $0,25\mu\text{mol}/\text{g}$  YA ) göre yaklaşık 2,5 kat daha fazla prolin ürettiği saptanmıştır. Hassas Atay 85 çeşidinin kontrole göre stres koşullarında prolin miktarlarındaki artışlar, kuraklık stresinde 2,1 kat, yüksek sıcaklık stresinde 3,3 kat ve hem kuraklık hem de yüksek sıcaklık stresinde ise 11,5 kat olarak bulunmuştur. Dayanıklı Zubkov çeşidinde prolin miktarındaki bu artışlar; kuraklık stresinde 6,2 kat, yüksek sıcaklık stresinde 2,1 kat ve hem kuraklık hem de yüksek sıcaklık stresinde ise 26 kat olarak belirlenmiştir.

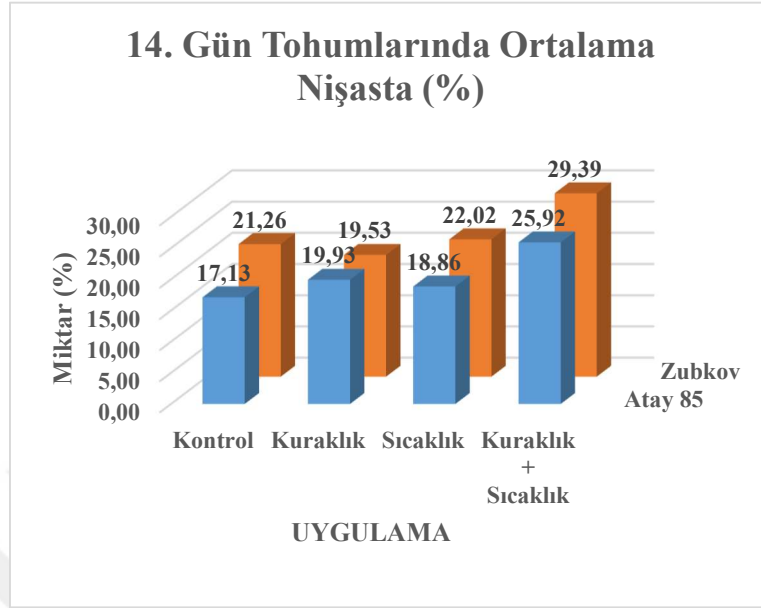
### 5.8.4. Nişasta ve Şeker Analizleri

#### 5.8.4.1. Nişasta Analizleri

Nişasta analizleri 14. gün toplanan numunelerden ve hasat sonrası numunelerinden yapılmıştır.

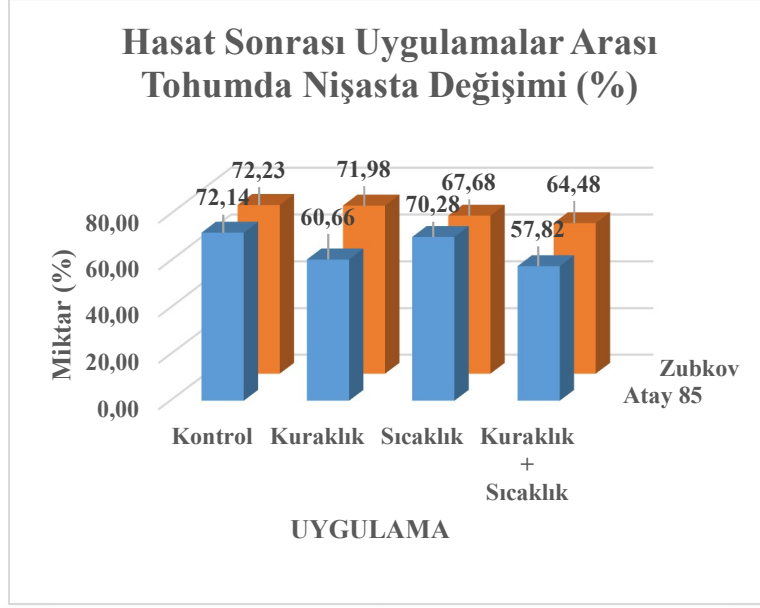
14. gün kontrol numunelerinde Zubkov çeşidinde total nişasta oranının Atay 85 çeşidinden %4,13 daha fazla olduğu, kuraklık numunelerinde dikkate değer bir farklılık olmadığı, sıcaklık ve kuraklık+sıcaklık streslerinde total nişasta oranlarının kontrol çeşitlerini geçtiği gözlemlenmiştir. Sıcaklık stresi uygulaması yapılan Atay 85 çeşidinde total nişasta oranı %18,86 iken Zubkov çeşidinde %22,02 olarak gözlenmiştir. Kuraklık+sıcaklık stresi

uygulamalarında total nişasta oranı Atay 85 çeşidinde %25,92, Zubkov çeşidinde %29,39 gözlemlenmiştir (Şekil 5.56).



Şekil 5.56. 14. gün tohumlarında stres uygulamalarında çeşitler arası ortalama nişasta oranlarını % olarak gösterir grafik.

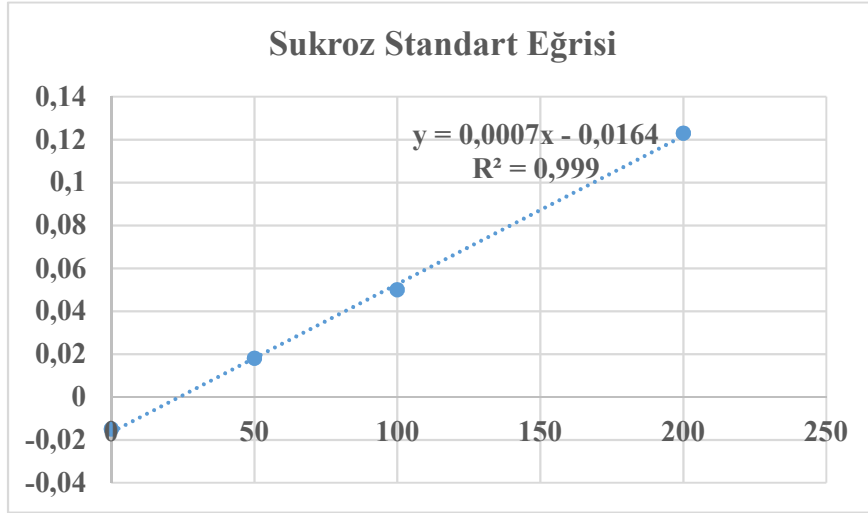
21. gün numunelerinde kontrol numunelerinde Atay 85 ve Zubkov çeşitlerinde total nişasta oranları arasında %0,8'lik önemsiz bir fark vardır. Kuraklık numunelerinde Atay 85 çeşidinde %11,48'lik bir düşüş gözlemlenirken Zubkov çeşidinde %0,25'lik bir düşüş olduğu gözlemlenmiştir. Sıcaklık stresi uygulamasına ait numunelerde Atay 85 çeşidinde %1,86 oranında, Zubkov çeşidinde %4,55 oranında düşüş gözlemlenmiştir. Kuraklık ve sıcaklık stresi kombinasyonu uygulanmış numunelerde Atay 85 çeşidinde % 57,82 oranı (%14,32 düşüş), Zubkov çeşidinde %64,48 oranı (%7,35 düşüş) gözlemlenmiştir (Şekil 5.57).



Şekil 5.57. Hasat sonrası tohumlarında stres uygulamalarında çeşitler arası ortalama nişasta oranlarını % olarak gösterir grafik.

#### 5.8.4.2. Şeker Analizleri

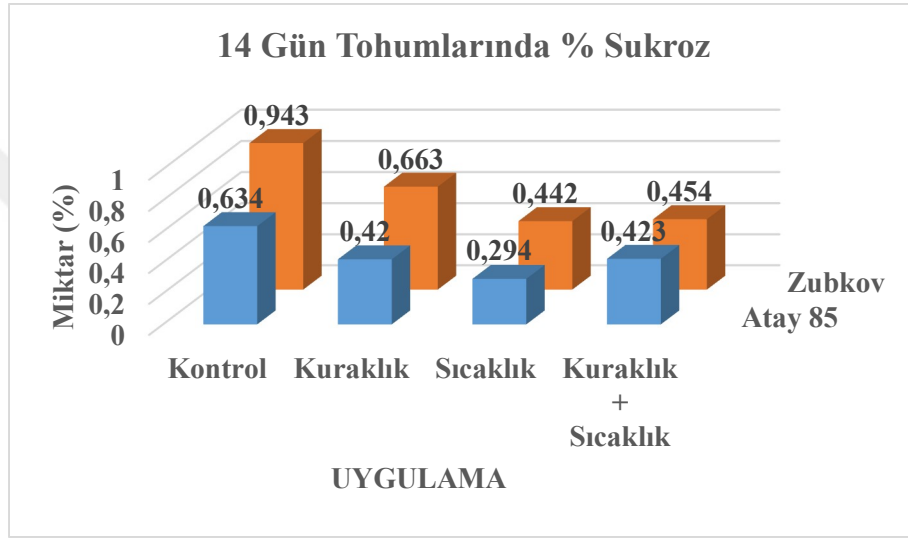
Sukroz analizleri için hazırlanan standartların doğruluğunun araştırılması ve sukroz hesaplamalarının yapılabilmesi için standart eğri hazırlanmıştır (Şekil 5.58).



Şekil 5.58. Sukroz standartlarından alınan sonuçlarla oluşturulan standart eğri grafiği.

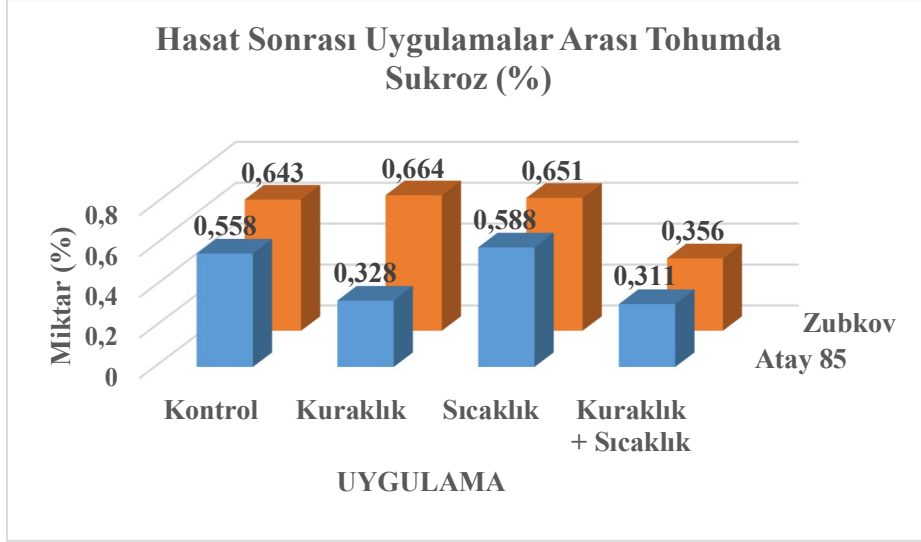
14 gün tohumlarında sukroz analizi yapıldığında uygulamalar ve çeşitler arası strese verilen yanıtlarda farklılıklar olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 5.59). Kontrol çeşitlerinde sukroz içeriği

Atay 85 çeşidinde %0,634 oranında ölçülürken, Zubkov çeşidinde %0,943 oranı ölçülmüştür. Kuraklık stresi altında Atay 85 çeşidinde %0,214 oranında azalma gösterip %0,42 oranı ölçülmüştür. Zubkov çeşidinde kontrolden % 0,28 oranında bir azalma görülüp %0,663 oranı ölçülmüştür. Sıcaklık stresinde Atay 85 çeşidinde kontrole oranla %0,34 azalma gösterip %0,294 oranı ölçülürken, Zubkov çeşidinde kontrolden %0,5 oranında azalma görülüp %0, 442 oranı ölçülmüştür. Kuraklık-sıcaklık kombine stresinde Atay 85 çeşidinde sukroz oranı kontrol örneklerine kıyasla %0,211 düşüş gösterip %0,423 oranı ölçülürken, Zubkov çeşidinde kontrole kıyasla %0,489 azalma görülüp %0,454 sukroz oranı ölçülmüştür.



Şekil 5.59. 14 gün tohumlarında stres uygulamalarında çeşitler arası sukroz analizini gösterir grafik.

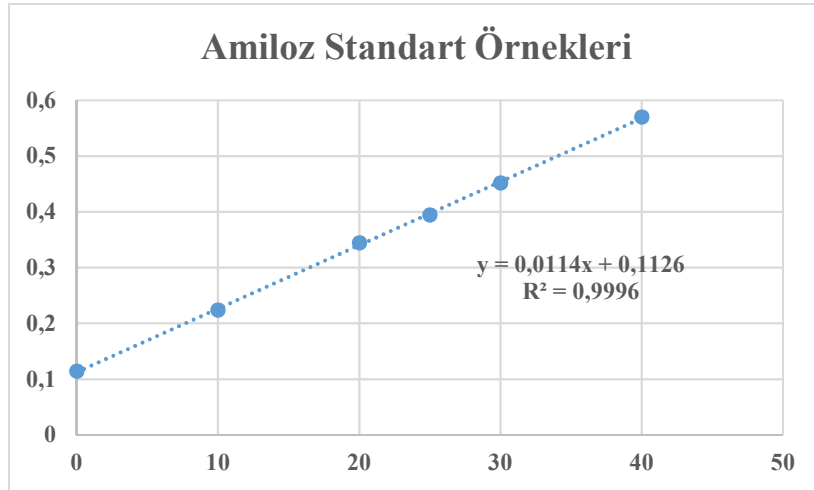
Hasat sonrası tohumlarında sukroz analizi yapıldığında uygulamalar ve çeşitler arası strese verilen yanıtlarda farklılıklar olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 5.60). Kontrol çeşitlerinde sukroz içeriği Atay 85 çeşidinde %0,558 oranında ölçülürken, Zubkov çeşidinde %0,643 oranı ölçülmüştür. Kuraklık stresi altında Atay 85 çeşidinde %0,230 oranında azalma gösterip %0,328 oranı ölçülmüştür. Zubkov çeşidinde kontrole oranla %0,021 oranında bir artış görülüp %0,664 oranı ölçülmüştür. Sıcaklık stresinde Atay 85 çeşidinde kontrole oranla %0,03 artış gösterip %0,588 oranı ölçülürken, Zubkov çeşidinde kontrolden %0,08 oranında artış görülüp %0,651 oranı ölçülmüştür. Kuraklık ve sıcaklık kombine stresinde Atay 85 çeşidinde sukroz oranı kontrol örneklerine kıyasla %0,247 düşüş gösterip %0,311 oranı ölçülürken, Zubkov çeşidinde kontrole kıyasla %0,287 azalma görülüp %0,356 sukroz oranı ölçülmüştür.



Şekil 5.60. Hasat sonrası tohumlarında stres uygulamalarında çeşitler arası sukroz analizini gösterir grafik.

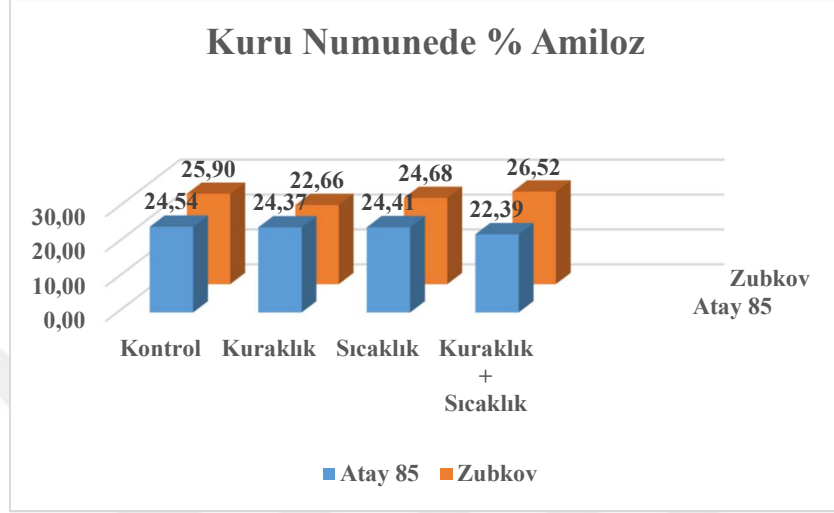
#### 5.8.4.3. Hasat Sonrası Amiloz Miktar Tayini

Amiloz analizleri için %0, %10, %20, %25, %30, %40 amiloz içeren standartlar hazırlanmış ve spektrofotometre okumaları sonucu elde edilen absorbans değerleri kullanılarak bir grafik oluşturulmuştur (şekil 5.61). Hesaplamalar neticesinde  $y=0,0114x+0,1126$  formülü bulunurken,  $R^2$  değeri 0,9996 olarak tespit edilmiştir.

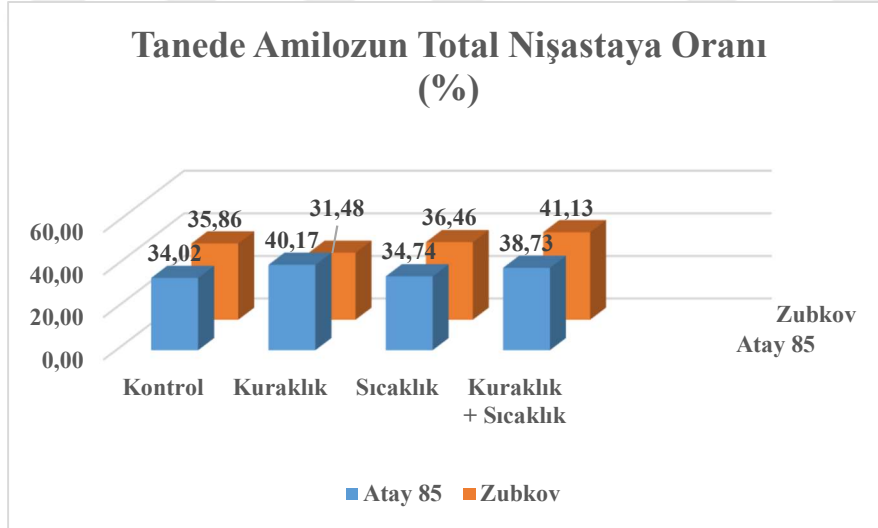


Şekil 5.61. Amiloz standartları kullanılarak oluşturulan grafik.

Öğütülmüş numuneler ile yapılan analiz sonuçlarında tohumda yer alan %amiloz oranları belirlenmiştir (Şekil 5.62). Nişasta analizlerinde çeşitler ve uygulamalar arası nişasta oranlarının büyük farklılıklar gösterdiği başlık 5.7.4.1’de belirtilmiştir. Bunun üzerine tespit edilen kuru numunede amiloz miktarları ve tohumda yer alan nişastadaki oranları dikkate alınarak nişasta amiloz oranı (%) hesaplanmıştır (Şekil 5.63).



Şekil 5.62. Kuru numunede tespit edilen amiloz oranını (%) gösterir grafik.



Şekil 5.63. Tanede tespit edilen amilozun total nişasta miktarına orantılanması ile elde edilen grafik.

## 6. TARTIŞMA VE SONUÇ

### 6.1. Tartışma

Yüksek adaptasyon yeteneğine sahip bir bitki olan ekmeklik buğday (*Triticum aestivum* L.), ülkemizde de hemen her ekolojik bölgede ve ilde yetiştirilebilen bir türdür. Buğdayın biyotik ve abiyotik faktörlere karşı dirençli bir ürün olmasının altında, uzun yıllardır yetiştirilen bir ürün olarak sürekli bir seleksiyon baskısı altında kalması ve evrimsel süreçte diğer türlerden aldığı kazanımlar yatmaktadır. Günümüzde ıslah edilerek geliştirilen çeşitlerde yüksek tohum verimi daha çok göz önünde bulundurulduğundan, çeşidin genetik potansiyelini ortaya koyabilmesi bakımından yetiştirme koşullarının optimize edilmesi gerekmektedir. Buğdayın gelişim sürecindeki özellikle abiyotik olumsuz koşulların önemli ölçüde verim kaybına yol açtığı bilinmektedir. Sulama suyu ihtiyacı diğer ürünlere göre çok daha az bir ürün olmasına rağmen kuraklık ve sıcaklık gibi stres koşullarından fazlaca etkilenerek ciddi bir verim kaybı yaşar.

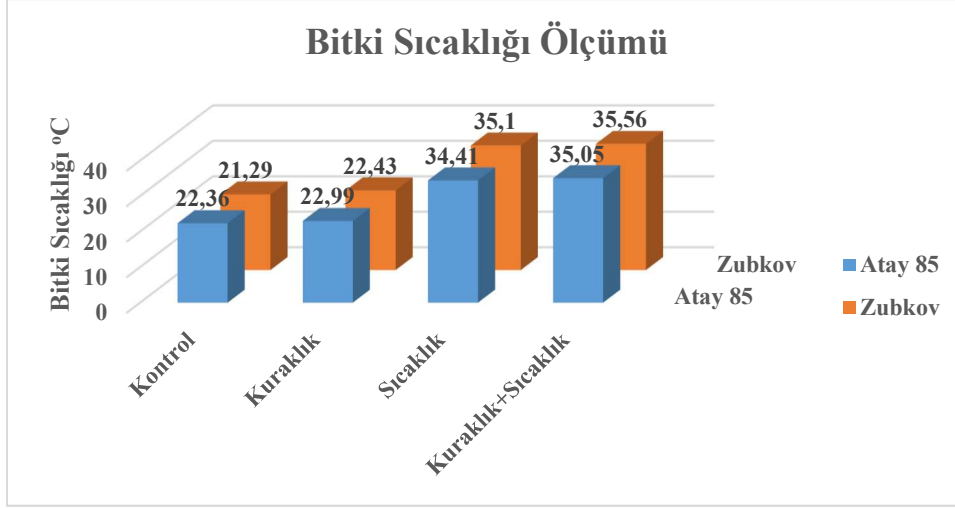
Verim kaybının ortaya çıkışında çeşidin genetik yapısı, iklim koşulları, toprak yapısı, topraktaki kullanılabilir azot miktarı ile uygulanan yetiştirme teknikleri büyük rol oynamaktadır. İklim koşullarına bağlı olarak ortaya çıkan kuraklık, yüksek sıcaklık gibi stres faktörleri bitkilerdeki tüm metabolizmayı olumsuz yönde etkilemektedir. Verim ve kaliteyi etkileyen, bitkide metabolizmayı, büyüme ve gelişmeyi engelleyen uygun olmayan herhangi bir durum veya madde stres olarak kabul edilir ve bitki toleransı ile yakından ilişkilidir.

Farklı ekmeklik buğday genotipleri kuraklık, sıcaklık ve her iki faktörün kombine edildiği çevresel stres koşullarına tabi tutulmuş ve çeşitlerin anatomik ve fizyolojik tepkileri 113O061 ve 113O661 numaralı TÜBİTAK projeleri kapsamında incelenmiştir. Her iki stres koşuluna en hassas çeşit olarak Atay 85, en toleranslı çeşit olarak da Zubkov çeşitleri belirlenmiş ve bu tez çalışmasında da bu çeşitlerin kullanılmasına karar verilmiştir. Çeşitler tez konusu kapsamında kontrol, kuraklık, sıcaklık, kuraklık+sıcaklık stresi olmak üzere 4 farklı yetiştirme ortamında büyütülmüş, kuraklık+sıcaklık stresinin bitkiler üzerinde en zorlayıcı stres koşulu olduğu belirlenmiştir. Kombine edilmiş strese maruz kalan her iki çeşide ait bitkilerin 15. günlerinde yapraklarının kuruduğu, bitki boyu olarak diğer stres koşullarına oranla daha kısa olduğu görülmüştür. Yalnızca kuraklık stresi uygulanan bitkilerin yapraklarını 21. güne kadar koruduğu, bölgesel kurumalar olsa da yaprak yüzeyinin %25'ini geçmediği gözlemlenirken;



yalnızca sıcaklık stresi uygulanan bitkilerin yapraklarında sararmalar gözlenmesine rağmen tam kuruma olmadığı, stres uygulaması sonlandırılanına kadar genel görünümünü muhafaza ettiği gözlenmiştir. Yapılan farklı çalışmalarda bu stres faktörü kombinasyonunun tahıllarda en yıkıcı etkiyi göstereceği belirtilmiş olup (73,113–116), elde edilen sonuçlarla uyumlu olduğu gözlenmiştir.

Sıcaklık stresine maruz kalan bitkiler yapraklarını soğutabilmek için stomalarını açarak transpirasyon yapmakta, kuraklık stresi altında ise su kaybını en aza indirmek için stomalarını kapatmaktadır. Kuraklık ve sıcaklık stresinin kombine uygulandığı durumlarda bitkiler stomalarını açmayıp, yaprak sıcaklıklarını azaltamamaktadır (73). Arabidopsis'te sıcaklık stresine maruz kalan bitkilerde stoma iletkenliğinin %17 artış gösterdiği, kuraklık stresinde %77 oranında azalma, kuraklık+sıcaklık stresinde ise bu azalmanın %70 oranında olduğu, buna karşın fotosentezin sıcaklık stresinde artış göstermesine rağmen, kuraklık stresinde %63 civarında, kuraklık+sıcaklık stresinde %67 oranında düşüş gösterdiği bildirilmiştir. Aynı bitkilerde solunum incelendiğinde yalnızca sıcaklık stresine maruz bırakılan bitkilerin solunumunu da artırdığı, bununla birlikte topraktan su alınımını da artırdığı için bünyesindeki nem miktarını koruduğu, kuraklık stresinde bitkilerin azalan iç sularını muhafaza edebilmek adına solunumu yavaşlatarak kendisini korumaya aldığı, kuraklık+sıcaklık kombinasyonunda solunum yapmaya çalıştığı ancak bununla beraber düşen iç su kapasitesini koruyamadığı görülmüştür (117). Yapılan başka bir çalışmada, mısır bitkisinde kuraklık stresi altında hassas çeşitlerde fotosentez oranının %87 oranında düşüş gösterdiği gözlemlenirken, bu oranın strese dayanıklı çeşitlerde %46 civarı belirtilmiştir. Stres uygulaması sonlandırılıp bitkiler sulandığında ise bitkiler 1 hafta sonunda kontrol bireylerinin fotosentez hızına yakın değerlere kavuşmuştur (118). Aynı anda kuraklık ve sıcaklık stresinin görüldüğü durumlarda bitkilerin metabolik yanıtlarının yalnızca tek bir stres faktörüne maruz kalan bitkilere strese verdiği cevaba göre değişebildiği ve bitkilerin alternatif biyolojik yollara yöneldiği çalışmalarla ortaya konmuştur (73,117,119). Bu tez çalışmasında klorofil miktarı belirlenmesi için 5., 9. ve 14., fotosentez etkinliğinin belirlenmesi için de 4., 9. ve 14. günlerde ölçümler alınmıştır. Çalışmanın 14. gününde tez çalışmasının sonuçlarını yayınlarla karşılaştırmak adına bitki sıcaklığı ölçülmüş (Şekil 6.1) ve çıkan sonuçlarda yalnızca sıcaklık stresine maruz bırakılan bitkilerin, kuraklık+sıcaklık stresine maruz bırakılanlardan daha soğuk olduğu saptanmış olup, sonucun yukarıda verilen literatürle uyumlu olduğu görülmüştür.



Şekil 6.1. Bitki sıcaklığı ölçümü sonuçları

Benzer olarak, klorofil miktarı ve fotosentez etkinliği bakımından yapılan incelemelerde her iki çeşit için de kuraklık+sıcaklık kombinasyonunun en yıkıcı etkiyi gösterdiği belirlenmiştir. Atay 85 çeşidine ait klorofil miktarının kuraklık stresinde önemli derecede düştüğü görülmektedir. Stres uygulamasının ilerleyen dönemlerinde kuraklık stresi ile birlikte yüksek sıcaklık stresi uygulandığında, bitkilerde klorofil miktarında çarpıcı düşüşler gözlemlenmiş olup, yaprakta klorofil miktarı değeri 24'e kadar düşmüştür. Zubkov çeşidine ait klorofil miktarı hem kuraklık hem de yüksek sıcaklık stresinden etkilendiği görülmektedir. Ancak klorofil miktarındaki azalış Atay 85 çeşidine göre dönemsel olarak daha yavaş ve az olmuştur. Zubkov çeşidinde en düşük klorofil miktarı stres uygulamasının 14. gününde 29 birim ile kuraklık ve yüksek sıcaklık stresinin birlikte uygulandığı bitkilerde belirlenmiştir. Stres uygulamasının 4., 9. ve 14. gününde ölçülen fotosentez etkinlik değerleri incelendiğinde stres uygulamasının 4. gününde genel olarak Zubkov çeşidinde fotosentez etkinliğinin Atay 85 çeşidine göre daha yüksek olduğu görülmektedir. Atay 85 çeşidinin kuraklık stresinden önemli derecede etkilendiği ve fotosentez etkinliğinin stres uygulamasının sonlarına doğru önemli derecede azaldığı görülmektedir. Atay 85 çeşidinde yüksek sıcaklığın fotosentez etkinliği üzerine etkisi 9. günden sonra arttığı ve fotosentez etkinliğinde önemli bir azalmaya neden olduğu söylenebilir. Zubkov çeşidinde stresin fotosentezi olumsuz etkilemeye başladığı dönemin 14. gün sonrası olduğu görülmüştür. Klorofil miktarı ve fotosentez etkinliği değerlerinin birbiri ile uyumlu ve tutarlı olduğu görülmüş olup, sonuçlar farklı bitkilerde yapılan benzer çalışmalarla benzerlik göstermektedir (73,117–119). Stres koşullarına hassas bireylerde klorofil miktarı ve fotosentez etkinliği, toleranslı çeşitlere oranla daha yüksek miktarda ve hızlı düşüş göstermektedir.

Kuraklık stresinin her iki parametre için sıcaklık stresine göre daha baskılayıcı bir faktör olduğu belirlenmiş, kuraklık+sıcaklık stres kombinasyonunun ise bitki üzerine her iki stresin ayrı ayrı uygulamalarından çok daha yıkıcı bir etki gösterdiği görülmüştür.

Abiyotik stres koşullarına yanıt mekanizmalarından birisi de prolin ve sukroz miktarlarında meydana gelen değişimlerdir. Prolin, özellikle abiyotik stres koşullarında aktif olan genlerin ürünü bir aminoasittir (61). Kuraklık stresinde serbest radikallerin indirgenmesinde ve membran bütünlüğünün korunmasında görev alır (67). Prolin amino asidinin stres koşullarına yanıt olarak değişen miktarlarının ve etkilerinin incelenmesine yönelik pek çok çalışma yayınlanmıştır. Mısır bitkisinde kuraklık stresine hassas ve tolerant çeşitlerde yapılan çalışmada, hassas çeşitlerde prolin içeriğinin kontrole oranla 4 kat artış gösterdiği belirtilirken, bu oran dayanıklı çeşitlerde 14 kat olarak rapor edilmiştir (118). Sıcaklık stresi altında prolin üretiminin yerini sukrozun aldığı, ozmotik dengenin bu şekilde sağlanmaya çalışıldığı belirtilmiştir (117,119). Çalışmamızda, kuraklık, sıcaklık, kuraklık+sıcaklık streslerine maruz bırakılan Atay 85 ve Zubkov çeşitlerine ait bitkilerde 14. gün yapraklarında yapılan prolin analizi sonucunda uygulanan her türlü stres koşullarında prolin üretiminin kontrole göre değişen oranlarda artış gösterdiği gözlemlenmiş, . prolin içeriğinin kuraklık stresi altında dikkat çekici miktarda artış gösterdiği belirlenmiştir. Stres koşullarına adaptasyonun bir göstergesi olarak bilinen prolin miktarının, stres koşullarında dayanıklı Zubkov çeşidinde hassas Atay 85 çeşidine göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçların yukarıdaki literatürler ile uyumlu olduğu görülmüştür.

Buğday gibi pek çok tahılın yüksek nişasta içeriğine sahip olmaları nedeniyle ülkemizde ve dünyada geniş alanlarda üretimi yapılmaktadır. Geniş bir adaptasyon kabiliyetine sahip olan buğday, nişasta içeriği en yüksek ürünlerden biri olduğundan dünya beslenmesinde anahtar role sahiptir. Buğday olumsuz stres koşullarında bile nişasta üretimini devam edecek şekilde evrimsel sürecini devam ettiren aynı zamanda çok uzun yıllardır ıslah materyali olarak insanoğlu tarafından seleksiyon baskısı altında olan bir üründür. Oldukça geniş bir ekolojik yelpazede yetişmesine rağmen, nişasta biyosentez mekanizması oldukça karmaşık olup, bu yolaktaki pek çok enzimin kuraklık ve sıcaklık gibi abiyotik stres faktörlerinden önemli miktarda etkilendiği bilinmektedir.

Nişasta biyosentez yolağında yer alan genler genel olarak AGPaz grubu, SS grubu (GBSS dâhil), SBE grubu, DBE grubu olarak sınıflandırılabilirken, stres koşullarında üretimin düşmesinin yanı sıra yıkımında da rol oynayan amilaz enzimleri de bu biyosentez yolağının sonuna, total nişasta miktarında belirleyici olarak eklenebilir. Kuraklık stresi altında mısır bitkisinde embriyo gelişiminin durabileceği ve tane oluşumunun negatif etkilenecek %75'e kadar tane kaybı ile sonuçlanabileceği bildirilmiştir (120).

Faklı bitki türlerinde nişasta biyosentez yolağının stres koşullarında nasıl etkilendiği ile ilgili yapılan çalışmalarda, kuraklık stresine maruz kalan bitkiler için nişasta üretim yolağının başında öncü olarak yer alan AGPaz enzimlerinde ifade düşüşü gözlenirken (120,121), bu stres koşullarına tolerans gösterebilen bitkilerde ise bu durumun tersinin görülebileceği, AGPaz aktivitesinin artış gösterdiği belirtilmiştir (73). AGPaz aktivitesi sonucu elde edilen ADP-glukoz kompleksi ya GBSS ile amiloza ya da diğer SS enzimleri yoluyla amilopektine dönüşür. Normal koşullar altında tanede GBSSI enzimini kodlayan genlerin ifadesi başlangıçta çok düşük iken, ilerleyen dönemlerde dikkat çekici bir artış göstermektedir (30). Bu ifade artışı biyosentez süresince sürekli devam etmez. Nişasta depolanması döneminin ortasında artan ifade başlangıcı, son dönemlerde azalış gösterir (122). Kuraklık stresi altında incelenen hassas mısır bitkilerinde GBSSI ve GBSSII enzimlerini kodlayan genlerin ifadelerinde dikkat çekici düşüşler rapor edilmiştir (120). SS grubunda yer alan *SSI* ifadesi dolum döneminin başlangıcında düşük, ortasında en yüksek, sonunda ise düşük iken, *SSII* grubunun ifade düzeyleri dolum döneminin başlangıcında çok yüksek, orta-sonlarında yüksek ve sonlarında ise azdır (122). Tahıl endospermünde aktivitesi en yüksek SS türü *SSIIa*'dır. Buna karşın en büyük görevleri *SSI* ve *SSIII* enzimleri alır (30). Normal şartlarda SBE grubu enzimlerin tüm dolum döneminde aktivitelerinin mevcut olduğu, dolum dönemi ortasında artış geçse de sonrasında yine ilk seviyeye döndüğu rapor edilmiştir (122). Kuraklık ve/veya sıcaklık streslerinde SS grubu tüm enzimlerin yanı sıra AGPaz, SBE ve DBE grubu enzimlerin ifade düşüşleri gösterdiği (73,123),  $\alpha$  ve  $\beta$  amilaz içeriklerinin ise artış gösterdiği rapor edilirken (120) buna bağlı olarak nişasta üretim ve depolanmasının azaldığı bilinmektedir. Sıcaklıkta meydana gelebilecek 5°C'lik bir artışın bazı varyetelerde nişasta verimini %10-15 oranında düşürebileceği (16) buna gerekçe olarak da biyosentez yolağındaki bazı enzimlerin 20°C'nin üzerindeki sıcaklıklara fazlasıyla hassas olmasından kaynaklandığı belirtilmiştir. Sıcaklık stresinin buğdayda nişasta birikimi üzerine etkilerinin araştırılması üzerine yapılan bir çalışmada (123) gece sıcaklıkları kontrol bireyleri ile aynı olan, yalnızca gündüz zamanında

sıcaklık stresine maruz kalan bireylerde nişasta depolanmasının daha erken başlayıp, sonlandığı gözlenmiştir. Kontrol bireylerinde nişasta depolanması 26, gündüz sıcaklık stresine maruz kalan bitkilerde ise 21 gün süre ile gözlenmiş olup, nişasta oranında %20 düşüş rapor edilmiştir. Bu çalışmada diğer bir grup ise sıcaklık stresine tüm gün döngüsü boyunca maruz kalan bitkiler, kontrol bitkileri ile kıyaslanmış olup nişasta depolanmasının kontrolden 3 gün önce başladığı ve yalnızca 11 gün sürdüğü belirlenirken, depolanan nişasta miktarında ise %58'lik bir azalış rapor edilmiştir. Gündüz döngüsünde karşılaşılan kuraklık stresinde nişastanın parçalandığı, sukroz olarak yapraklara taşınarak bitkiye direnç kazandırıldığı rapor edilmiştir (120,124). Bu durumun sıcaklık stresinde prolin yerine şeker türevlerinin turgor dengeleme özellikleri ve membran proteinlerini oksidatif stresten koruyabilme yetenekleri ile bağıntılı olduğu düşünülmektedir. Stres koşullarına toleranslı ve hassas bitkiler ile yapılan başka bir çalışmada (118) stres koşulları altında strese toleranslı bitkilerin sukroz içeriklerinde artış gözlenirken, hassas bireylerde %50'ye yakın düşüş rapor edilmiştir.

Bu tez çalışması kapsamında da kuraklık, sıcaklık ve kuraklık+sıcaklık streslerine maruz bırakılan Atay 85 ve Zubkov çeşitlerine ait bitkilerde stres koşulları uygulamaları, çeşitler arası ve farklı gelişim dönemler arasında gen ifadeleri incelenerek kontrol bireyleriyle karşılaştırılmıştır. Karşılaştırmalar, her bir enzim grubuna dâhil başlıca enzimleri kodlayan genlerin tane ve yaprak dokusunda gen ifadesinde meydana gelen değişimler incelenerek yapılmıştır. Her bir gene özgün primerler dizayn edilerek qRT-PCR sistemiyle gen ifadeleri belirlenmiştir. Gen ifadesi çalışmalarında nişasta biyosentezi için incelenen enzim grupları: AGPaz, SS'ler, SBE, DBE ve Amilaz iken, sukroz metabolizması için başlıca birkaç genin ifadesi de araştırmaya konu olmuştur.

AGPaz enzim grubunda yapılan inceleme sonucunda, stres koşullarına hassas olan Atay 85 çeşidinde enzim aktivitesinin Zubkov çeşidinden daha erken başladığı görülmüştür. AGPaz enzim grubunu kodlayan *AGPaz\_L* ve *AGPaz\_S* genlerinin ifadelerinin Atay 85 çeşidinde 7. ve 14. gün dönemlerinde nispeten daha yüksek olduğu belirlenirken, daha sonraki dönemde azalan bir ifade sergilediği görülmüştür. Zubkov çeşidinde gen ifadesinin nişasta biyosentezinin orta-son aşamalarına doğru önemli miktarda artış göstermesi enzim aktivitesinin Atay 85 çeşidinde daha erken başladığını bize gösterdiği düşünülmektedir. Atay 85 çeşidinde AGPaz enzimlerini kodlayan genlerin stres koşullarından negatif etkilendiği ve verilen tepkinin genellikle gen ifadesinde düşüşe neden olduğu düşünülmekte olup, elde edilen sonuçlar bu enzim grubu ile

yapılan diğerk çalışmalara benzerlik göstermektedir (73,120,121,123). Buna karşın Zubkov eşidinde bu stres koşullarından negatif olarak etkilendiği tek durumun 21. gün örneklerinde *AGPaz\_L* geninde meydana gelen ifade düşüşleri olduğu görülmüştür. Bu değişimler de yalnızca sıcaklık içeren stres uygulamalarında olmuştur. Bu sonuçlar AGPaz enzimleri açısından genel olarak kıyaslandığında, Zubkov eşidinin kuraklık stresi altında AGPaz enzimlerini kodlayan genlerin ifadelerini artırdığı ya da koruduğu gözlenirken, bu durumu stres koşullarına tolerans geliştirme mekanizmalarından birisi olarak kullanabileceği fikrini oluşturmuştur. Stres koşullarında AGPaz enzimlerinin yüksek aktivite gösterebilmesi arzu edilen ve biyoteknolojik çalışmalara hedef gösterilen bir özellik olmakla beraber (73), bu bağlamda Zubkov eşidinin bu özelliği sağladığı gözlenmiştir.

SS grubunda GBSS enzimini kodlayan genler, diğerk SS grubu enzimlerini kodlayan genlerden ayrı olarak incelenmiştir. Bunun sebebi ise GBSS enziminin son ürününün amiloz, diğerk SS yolağının ise amilopektin olmasıdır. GBSS enzimini tane dokusunda kodlayan gen *GBSSI* iken yaprak dokusunda kodlayan ise *GBSSII* genidir. *GBSSI* geninin ifadesinin incelendiğinde, Atay 85 eşidinde 7. gün kontrol örneklerinde gen ifadesinin henüz başlamadığı, ancak kuraklık stresi koşullarında ise genin ifade olmaya başladığı görülmüştür. Bu durum öncelikle deney hatası olarak algılanmış olsa da, tekrarlı analizler ve kullanılan cDNA ile yapılan doğrulama PCR'ları ile deney hatasından kaynaklanma olasılığının çok düşük olduğu sonucuna varılmıştır. Buna karşın, Zubkov eşidinde *GBSSI* geni ifadesi üzerine kontrol bireylerinde yapılan incelemeler tamamen yukarıda bahsedilen literatürlere uygun olarak sonuçlanmıştır. Kontrol bireyleri üzerinde yapılan analizlere göre Atay 85 eşidinde *GBSSI* aktivitesinin 14. günde başladığı, buna karşın Zubkov eşidinde ise 7. günde devam ettiği görülmektedir. Sıcaklık içeren stres koşulları altında her iki genotip de dönemlerde (7.- 14.- 21. günlerde) benzer tepkileri değişen oranlarda vermişlerdir. Bu durum ise *GBSSI* gen ifadesinin kuraklıktan ziyade sıcaklıktan daha fazla etkilendiğini, test edilen stres koşullarına toleranslı genotiplerde ifadenin korunma eğilimi gösterirken, hassas genotiplerde ise gen ifadesinde daha sert düşüş ve yükselişlere neden olduğunu göstermiştir. *GBSSII* geni ifadesi yaprak dokusunda incelenmiş olup, kontrol bireylerinde ifade Atay 85 eşidinde daha yüksek bulunmuştur. *GBSSII* ifadesi stres koşulları altında Atay 85 eşidinde sürekli düşüş eğilimi göstermiş olup, literatürlerle uyumlu bir tepki verirken, Zubkov eşidinde en yüksek değişimi sıcaklık stresi altında ifadenin %113 artması ve kuraklık stresinde ise %57 ifade azalışı literatürlerle bağdaşmayan bir durum ortaya çıkarmıştır. Bu durum ise Atay 85 eşidinde stresle azalan bir amiloz sentezi olduğunu,

Zubkov çeşidinde ise amiloz üretiminin stres koşulları altında korunma eğiliminde olduğu düşüncesini pekiştirmiştir. GBSS enzim grubunu kodlayan genlerde stres altında ifade düşüşü gözlenmesi hassas bitkiler için ortak kanı (73,120) olup bu durum Atay 85 için anlamlı iken, toleranslı Zubkov çeşidinin literatürlerde belirtilenlere aksi sonuçlar gösterip, genel kanıya istisnai bir tolerans oluşturduğu gözlenmiştir. SS grubuna dâhil diğer bir enzim olan SSI'i kodlayan genlerin ifadesi her iki genotipte tane ve yaprak dokusunda incelenmiştir. Tane dokusunda SSI ifadesi her dönemde kontrol bireylerinde Atay 85 çeşidinde daha yüksek iken, stres koşulları ile karşılaşıldığında Zubkov çeşidinde gen ifadesinin korunduğu, Atay 85 çeşidinde ise gen ifadesinin düşüş eğiliminde olduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte SSI ifadesinin her iki genotip için de kuraklık+sıcaklık stres kombinasyonundan etkilendiği görülmüş olup, sonuçlar literatürle uyumludur. Yaprak dokusunda incelenen SSI geni ifadesi kontrol bireylerinde Zubkov çeşidinde %28 daha yüksek bulunurken, her iki genotipin de stres koşullarında gen ifadesinde düşüş eğilimi şeklinde tepki verdiği görülmüştür. Buna karşın, Zubkov çeşidinde kuraklık stresinde meydana gelen ifade düşüşü, Atay 85 çeşidinden çok daha yüksek bulunurken bu durum, GBSSII ifadesi de göz önüne alındığında kuraklık stresinde nişasta üretiminin azaltılıp, şeker türevlerinin korunması yoluyla bitkiye bir turgor basıncı kazandırma girişimine işaret etmektedir. SSII enzim grubunda 2 adet gen (*SSIIaII* ve *SSIIc*) incelenmiştir. *SSIIa* ifadesi tanede kontrol bireylerinde incelendiğinde 7. gün örneklerinde Atay 85 çeşidinde gen ifadesinin dikkat çekici miktarda daha fazla olduğu, diğer dönemlerde ise neredeyse yakın oldukları gözlenmiştir. Atay 85 çeşidinde ifade kontrol bireylerinde 3 dönemde de literatürlere aykırı bir düşüş eğilimi gösterirken, Zubkov çeşidinde 14. günde %62'lik dikkat çekici bir artış ve sonrasında azalış göstererek literatüre uygun bir yanıt oluşturmuştur. Stres koşulları altında *SSIIa* ifadesi tüm koşul ve dönemlerde Atay 85 çeşidinde ifade düşüşüne neden olurken, Zubkov çeşidinde kuraklık stresinde artış, kuraklık+sıcaklık kombinasyonunda ise azalmaya rağmen gen ifadesinde koruma yönünde bir yanıt oluşturduğu belirlenmiştir. Bu durum ise tanede *SSIIa* ifadesinin kuraklıktan ziyade sıcaklık ve sıcaklık içeren diğer stres kombinasyonlarına karşı daha hassas olduğunu göstermektedir. Yaprak dokusunda *SSIIc* gen ifadesi gen ifadesi kıyaslamaları sonucunda her iki çeşidin de ifade düzeylerinin birbirlerine yakın oldukları, stres koşulları altında ise aynı tepkileri değişen ancak önemli bir fark oluşturmayacak oranlarda verdikleri gözlenmiştir. Bu durum da SSII enzimini kodlayan genlerin ifadesinin yaprak dokusunda kuraklıktan olumsuz etkilenmediğini, buna karşın sıcaklık faktöründen negatif etkilendiğini belirtmektedir. SSIII enzimi tane dokusunda geçici

nişasta üretimi için önemlidir. Tane dolumu sürecinde yüksek aktivite gösterdiği bilinmektedir. Tez çalışması kapsamında *SSIII* genini inceleyebilmeye fırsat veren primerler kullanılarak tanede 3 farklı dönemde ifadeler karşılaştırılmış ve 2 genotip arasında bir takım dikkat çeken farklılıklar bulunmuştur. Atay 85 çeşidi 7. günde tüm stres koşullarını tolare edebilirken, 14. ve 21. günlerde tüm stres koşullarında ifade düşüşleri göstermiştir. Kontrolleri ise 14. günden itibaren artış ve sonrasında stabil bir görünüm sergilemiştir. Zubkov çeşidi ise en fazla sıcaklık içeren stres faktörlerinden negatif etkilenirken bu değişimlerin hiçbirisinin negatif yönde %65'i geçmediği gözlenmiştir. Sonuçlara göre Zubkov çeşidi *SSIII* gen ifadesi kuraklık stresinden etkilenmemekte, sıcaklık ve sıcaklık içeren stres koşullarına karşı hassasiyeti 21. gün döneminde başlamaktadır. Çeşitlerde stres faktörlerine bağımlı *SSIII* aktivitesi literatürlere (73,120,123) uygun olmakla beraber, stres koşullarına karşı tanede hassas bireylerde ifade düşüşü, toleranslı bireylerde ise ifade korunması şeklinde olup, nişasta oluşumunun/yıkımının döngüsünün korunduğuna işaret etmektedir. Yaprak dokusunda *SSIII* enzimini kodlayan 2 farklı gen ifadesi (*SSIII* ve *SSIIIb*) incelenmiş, *SSIII* geninin Zubkov kontrol örneğinde Atay 85'den yaklaşık %263 fazla sentezlenip, stres koşulları altında aynı tepkileri önemli düzey farklılıklarıyla verdikleri gözlenmiştir. *SSIIIb* geni için ise Zubkov çeşidinde kontrol bireylerinde ifade %34'e yakın daha düşük bulunmuş olup, stres koşulları altında Atay 85 çeşidi her 3 stres koşulunda da ortalama %70 civarı ifade düşüşü gösterirken, Zubkov çeşidinde ifade korunmuştur. Bu durum ise yaprakta *SSIII* genlerinin strese hassas çeşitlerde önemli ifade kayıplarıyla karşılaşırken, toleranslı çeşitlerde ise ifadenin korunma ya da artış eğilimi gösterdiğini işaret etmiştir. Elde edilen bulgular, hassas çeşitler için belirtilen tüm literatürlere uyumlu olup, Zubkov çeşidi için istisnai bir durum göstermiş ve stres koşullarında nişasta döngüsünün korunarak bitkiye direnç kazandırılma çabasının bir sonucu olarak yorumlanmıştır. *SSIV* enzimini kodlayan genin ifadesi yalnızca yaprakta incelenmiş olup, çeşitler arasında kontrolde önemli ifade farklılığına rastlanmaz iken, stres koşullarında toleranslı Zubkov çeşidinin ifadesini koruduğu, Atay 85 çeşidinin ise stres koşullarının artmasıyla orantılı olarak ifade kaybına uğradığı belirlenmiştir. Ancak literatürlere de *SSIV* enziminin fonksiyonu tam olarak ortaya konamadığı için bu konuda yorumlama yapılamamıştır.

SBE grubu enzimlerin ifadelerinin incelenmesi için tane dokusunda *SBEIIa* ve *SBEIIb*, yaprakta ise *SBEIIa* enzimini kodlayan genlerin ifadesi incelenmiştir. Tanede *SBEIIa* gen ifadesi Atay 85 için her 3 dönemde de Zubkov çeşidinden daha yüksek bulunmuş olup, kontrol bireyleri kendi içinde kıyaslandığında Zubkov çeşidinde ifadenin değişim göstermediği, Atay



85 çeşidinde ise ifadenin dönemsel olarak düşüş gösterdiği görülmüştür. Bu durum, amilopektin oluşumunun 21. gün civarı Atay 85 çeşidinde yavaşlamaya başladığını düşündürmüş olup, Zubkov için ise değişmeden devam ettiğini düşündürmüştür.

Stres koşullarının Atay 85 çeşidini *SBEIIa* ifadesi açısından olumsuz etkilediği gözlenirken en zorlayıcı stres faktörünün kuraklık+sıcaklık olduğu belirlenmiştir. Zubkov çeşidinin ise stres koşullarından etkilenmediği gözlenmiştir. *SBEIIb* ifadesinde her iki çeşit için de kontrol bireyleri incelendiğinde gen ifadelerinin 14. gün düşüş göstermeye başladığı ve bu şekilde sürdüğü belirlenmiş olup ifade değişim oranları denk bulunmuştur. Ancak stres koşullarında yapılan incelemede 7. gün örneklerinde her 2 çeşit de aynı tepkileri verirken, 14. gün örneklerinde kuraklık stresi Atay 85 çeşidinde %74 ifade düşüşüne, Zubkov çeşidinde ise %150 ifade artışına neden olmuştur. Genel olarak Zubkov çeşidi stres faktörlerinden olumsuz etkilenmez iken, Atay 85 çeşidinin tüm stres koşullarından negatif etkilendiği belirlenmiştir. Yaprak dokusunda yapılan incelemede *SBEIIa* geninin ifadesi kontrol edilmiştir. Kontrol bireylerinin kıyaslanmasında Zubkov çeşidinde ifadenin %138 daha yüksek olduğu gözlenirken yine Zubkov çeşidinde stres koşullarının hiç birinde ifadede değişim gözlenmemiştir. Atay 85 çeşidinde stres koşullarından sadece biri uygulandığında gen ifadesinde kuraklık stresinde %155, sıcaklık stresinde %281 artış gözlenmiş olup, kuraklık+sıcaklık stresinde değişim gözlenmemiştir. SBE enzim ailesi için genel görüş, strese toleranslı genotiplerin ifadesinin değişim göstermediği, hassas genotiplerde dikkat çeken gen ifadesi değişimleri olduğu yönünde olup, hassas çeşitlerin gösterdiği tepkiler genel literatürlerle uyumludur. Stres koşulları altında SBE grubu enzimleri kodlayan genlerin ifadesinin düştüğü bazı araştırmacılar tarafından da bildirilmiş olup (123), hassas Atay 85 bu tanıma uymaktadır. Zubkov çeşidi tolerant bir bitki olarak gen ifadesini korumasıyla dikkat çekmiştir.

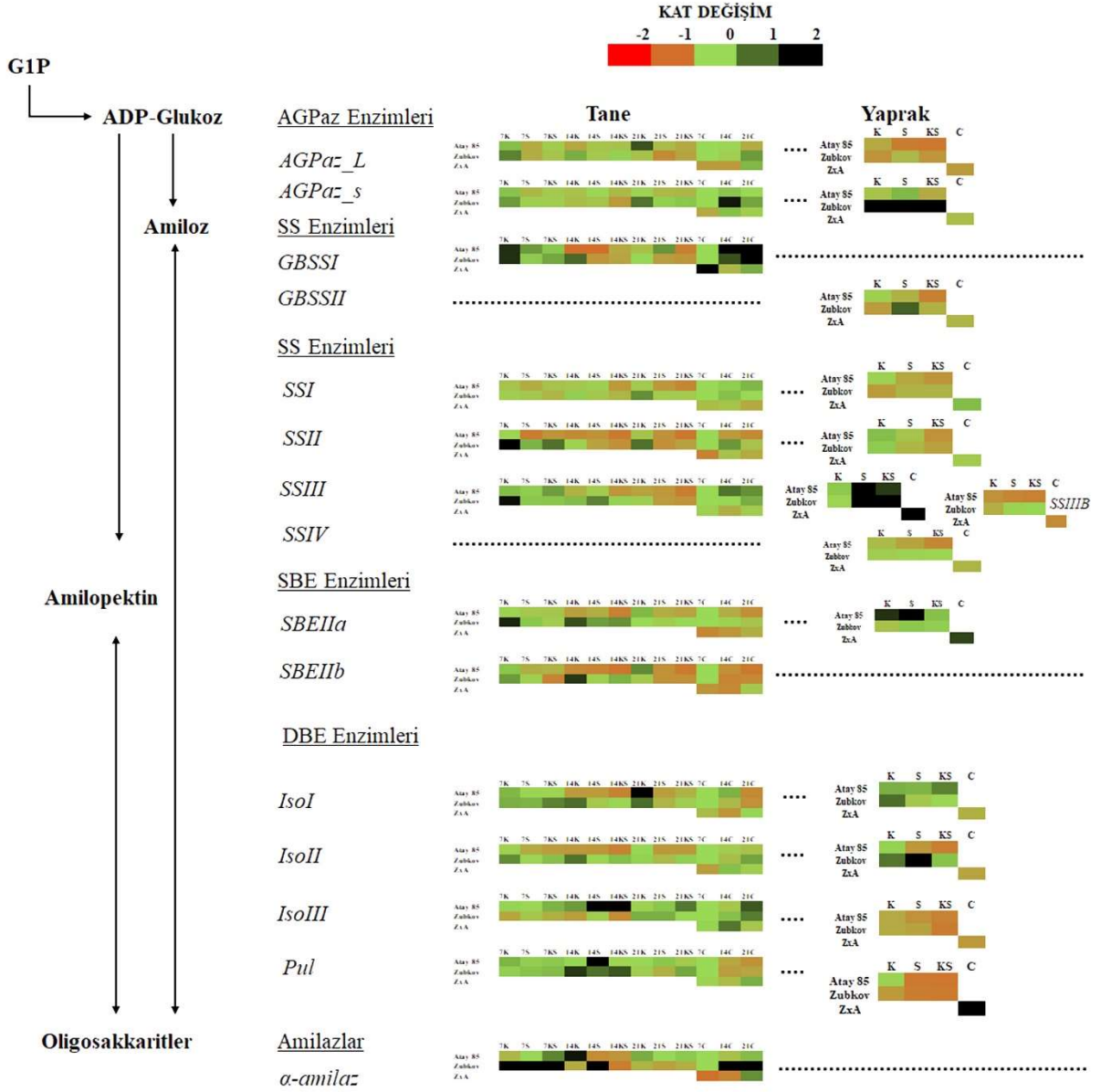
DBE grubunda İzomilaz (ISO) grubu ve Pullulanaz (PUL) enzimlerini kodlayan genlerin ifadeleri incelenmiştir. Yapılan bir çalışmaya göre (30) DBE enzimlerini kodlayan genlerden *IsoII* ve *IsoIII* gen ifadesinin tüm süreçte çok düşük olduğu ve değişim göstermediği belirtilmiştir. Buna karşın *IsoI* ve *Pul* genlerinin ifadelerinin tohum gelişiminin 2. haftasında dikkat çeken miktarlarda (12 ve 56 kat civarı) artış gösterdiği, sonlarında düşüşe geçtiği ancak yine de ilk seviyelerden yüksek olduğu belirtilmiştir. Buna karşın, çalışılan 2 çeşidin hiçbir kontrol örneğinde *IsoI* ve *Pul* ifadelerinde bu seviye değişimlerine rastlanmamıştır. Bu durum literatürde belirtilen duruma istisna bir durum olarak dikkat çekmiştir. Her 4 genin ifadelerinin

7. gün kontrol örneklerinde birbirlerine denk olduğu gözlenmiş olup ifade seviyelerinin düşüklüğü literatürde bahsedilen ilk döneme dair verilere uyumlu bulunmuştur. Bu enzim grubuna ait genler ile mevcut stres kombinasyonunu içeren bir çalışmaya rastlanılamamış olup, *IsoI* ifadesi tane dokusunda tüm dönemlerde her 2 genotip için de kuraklık stresinde dikkate değer bir ifade düşüşüne neden olmaz iken, Atay 85 çeşidinde 21. gün, Zubkov çeşidinde ise 14. ve 21. gün kuraklık örneklerinde önemli ifade artışları gözlenmiştir. Bunun yanı sıra Atay 85 çeşidi için diğer tüm stres koşulları ve dönemlerde *IsoI* geni ifadesinde dikkat çeken ifade düşüşleri gözlenirken, Zubkov çeşidinde hiçbir stres koşulu ve döneminde ifadede düşüş gözlenmemiştir. Yaprak dokusunda incelenen *IsoI* geni ifadesi sonuçlarına göre Atay 85 çeşidinin tüm stres koşulları altında gen ifadesinin önemli düşüşler yaşadığı, en kritik düşüşleri ise sıcaklık ve kuraklık+sıcaklık streslerinde gördüğü, Zubkov çeşidinin ise kuraklık stresinden etkilenmediği ve bu genin ifadesi için diğer stres koşullarını da tolare edebildiği gözlenmiştir. *IsoII* geninin ifadesi tane dokusunda incelendiğinde Atay 85 çeşidinde ifadenin 3 dönemde de Zubkov çeşidinden yüksek olduğu belirlenmiştir. Stres koşulları altında gen ifadesinde düşüş ile yanıt oluşturan Atay 85 çeşidine karşın, Zubkov çeşidinde ifadenin 7. ve 14. günlerde kuraklık stresinde artış gösterip, diğer tüm örneklerde değişmemesi nişasta biyosentezinin başlarında karşılaşılan kuraklık stresinin Zubkov genotipi için tanede teşvik edici bir durum olabileceği fikrini desteklemiştir. Yaprak dokusunda incelenen *IsoII* ifadesinde Atay 85 çeşidinin sıcaklık stresine hassasiyeti gen ifadesi sonuçlarıyla doğrulanmıştır. Kuraklık içeren stres koşulunu tolare edebilirken, sıcaklık ve kuraklık+sıcaklık stresinde ifade düzeyinde dikkat çekici bir düşüş belirlenmiştir. Buna karşın, toleranslı kabul edilen Zubkov çeşidi ise tekil stres koşullarında gen ifadesini dikkat çekici miktarda artırmış, kuraklık+sıcaklık kombinasyonunda ise korumuştur. *IsoIII* geni ifadesi tane dokusunda daha önceki çalışmalarda da bahsedildiği gibi dönemsel olarak dikkat çekici değişimler yapmamıştır. Her 2 genotip için de kontrol bireylerinde gen ifadesi 21. gün örneklerinde artış göstermiş olup, bu artış oranı literatüre uyumlu olarak 2 katın altında kalmıştır. Atay 85 ve Zubkov çeşitleri birbirleriyle kıyaslandığında ise ifadelerde dikkat çekici bir farklılık gözlenmemiştir. Stres koşulları altında ise genotipler birbirlerinden farklı yanıtlar oluşturmuş, bu durum ise *IsoIII* enziminin farklı genotiplerde, farklı stres koşulları altındaki tepkisinde meydana gelen çeşitlilik olarak dikkat çekmiştir. Stres koşulları altında Atay 85 çeşidinde *IsoIII* geninin tanede en çok değişim gösterdiği dönem, nişasta üretimi için en önemli dönem olarak kabul edilen 14. gün periyodu olmuştur. Stres koşulları arttıkça genin ifadesi de dikkat çekici olarak artış göstermiştir. Zubkov

çeşidinde ise gen ifadesi hiçbir koşul altında eşik değerine ulaşacak kadar değişim göstermemiştir. Yaprak dokusunda ise her iki genotip de *IsoIII* ifadesinde çok yakın tepkiler oluşturmuştur. Bu durum ise *IsoIII* ifadesinin yaprakta hassas ve tolerant çeşitler arasında stres koşulları altında aynı tepkiyi oluştururken, tane dokusunda hassas çeşitlerde nişasta olumunun en yoğun olduğu dönemde ifadenin dikkat çekici miktarda artış gösterdiğini, tolerant çeşitlerde ise korunduğunu göstermiştir. *IsoIII* enziminin nişasta yıkımı ile ilgili olduğu düşünüldüğünden (125), tanede artan *IsoIII* ifadesi, stres koşulları altında nişasta yıkımını işaret etmektedir. PUL enzimini kodlayan genlerin ifadesi tane ve yaprak dokularında incelenmiştir. Tanede genotipler arası kontrol bireyleri kıyaslamasında ifade farklılığı gözlenmemiştir. Her iki çeşidin de kontrol bireyleri dönemler arası ifade kıyaslamalarında azalan bir ifade grafiği çizmiştir. Bu azalış grafiği ise literatüre uygun bulunmamıştır. Bu durumun sebebi olarak literatürlerin bu çalışmadaki genotipleri kapsamaması nedeniyle oluşabilecek bir istisnai durum olması ya da buğday genomunda yer alan farklı kromozomlar olabileceği düşünülmektedir. Stres koşulları altında ise çeşitlerin farklı tepkiler vermesi, hassas ve tolerant çeşitlerde PUL enziminin tanede farklı tepkiler meydana getirerek, strese yanıtta oluşturduğu çeşitliliği göstermektedir. Yaprak dokusunda PUL enziminin nişasta biyosentezinde görev almakla birlikte fonksiyonel kritik bir görevi olmadığı düşünülse de tez kapsamında ifade analizine tabi tutulmuştur. Analiz sonuçlarına göre toleranslı çeşitte stressiz koşullar altında genin ifadesinin, hassas çeşide oranla %185 daha fazla olduğu, stres koşulları altında ise gen ifadesinde ifade farklılığı olmadığı, hem hassas hem de tolerant çeşidin gen ifadesinde düşüş gösterdiği belirlenmiştir.

Amilaz grubu enzimlerden  $\alpha$ -amilaz enziminin ifadesi yalnızca tane dokusunda incelenmiştir. Her iki genotipte de 21. günde dikkat çekici miktarda artan  $\alpha$ -amilaz gen ifadesi görülmüş, 7. ve 14. günlerde Atay 85 çeşidinde *AA* geni ifadesi yüksek iken, 21. gün örneklerinde Zubkov çeşidinde gen ifadesinde önemli artışlar saptanmıştır. Bu durum ise hasat sonrası nişasta miktarının kontrol bitkilerinde Atay 85 çeşidinde daha yüksek olabileceği fikrini oluşturmuştur. Gen ifadesi hassas çeşitlerde literatürlere uygun olarak stres koşulları altında artış gösterirken tolerant çeşitte 7. gün gözlenen artış, önemsiz kabul edilmiştir. Bunun sebebi ise 7. gün kontrol örneklerinde gen ifadesinin yok kabul edilecek kadar düşük olmasıdır. Stres koşulları altında hassas çeşitte *AA* ifadesinin gen ifadesinde artışlar gözlenirken, tolerant çeşit *AA* ifadesinde düşüş ya da korunma görülmüştür.

Nişasta biyosentezinde yer alan tüm genleri içeren değişim haritası şekil 6.2'de verilmiştir.



Şekil 6.2. Tez çalışması kapsamında incelenen ve nişasta sentezinde yer alan enzimleri kodlayan genlerin ifade değişimlerini gösterir heatmap grafiği.

Nişasta biyosentezinde görev alan enzimlerin yanı sıra sukroz metabolizmasında yer alan bazı enzimlerin de ifadesi tez kapsamında incelenmiştir. Bu amaçla SucSI, SucSII, SucSc ve SucTII enzimlerini kodlayan genlerin ifadeleri incelenmiştir. *SucSI* gen ifadesi tane ve yaprak dokusunda incelenmiştir. Tane dokusunda yapılan analiz sonucunda gen ifadesinin kontrol bireylerinde 3 dönemde de genotipler arasında ifade düzeylerinin aynı olduğunu, nişasta olum döneminin sonuna doğru ifadenin her iki genotipte de düşüş gösterdiği, stres koşullarından fazla etkilenmediğini göstermiştir. Yaprak dokusunda da her iki genotipte incelenmiş olup, kontrol

bireyleri arasında ifade farklılığı olmadığı, stres koşullarından her iki genotipin de etkilendiği, kuraklığı her iki genotipin de bu gen ifadesi için tolare edebilirken, sıcaklık ve kuraklık+sıcaklık streslerinden olumsuz etkilendiği ve ifadelerde düşüş olduğu gözlenmiştir. Ancak her iki genotip ifade düşüşleri açısından kıyaslandığında Atay 85 çeşidinde gen ifadesi düşüşleri %50 barajını aşarken, Zubkov çeşidinde bu orana ulaşılmamıştır. Yaprak dokusu için önemli bir enzim olan SucSI'in özellikle sıcaklık ve sıcaklık içerek stres kombinasyonlarından önemli miktarda etkilendiği, hassas çeşitlerde gen ifadesi önemli miktarda düşüş gösterirken, toleranslı çeşitlerde ise düşüşün sınırlı olduğu belirlenmiştir. Gen ifadesinde stres koşullarında meydana gelen bu değişim literatürlerle (73,123) ile uyumludur. *SucSII* geni ifadesi tane ve yaprak dokusunda incelenmiş olup, sonuçları tez bulgularında sunulmuştur. Bu sonuçlara göre Zubkov çeşidinde *SucSII* geni ifadesinin tanede başlangıçta düşük, orta dönemde yüksek, son dönemde ise yine eski seviyeye döndüğü gözlenirken, Atay 85 çeşidinde ise en yüksek seviyenin başlangıçta olduğu, daha sonra düşüşe geçtiği belirlenmiştir. Bu durumun sebebinin genotipik özelliklerden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Farklı ebeveynlerden melezlenilerek elde edilen bu tip çeşitlerin fotosentetik kapasitelerinin farklılık gösterebileceği bilinen bir durumdur. Stres koşulları altında bu gen bakımından her iki genotipin sergilediği tepkiler birbirine çok benzerdir. *SucSII* ifadesinin kuraklık ve sıcaklık streslerinden etkilendiğini bildiren literatürlerle (73,120) ile tez sonuçları son derece uyumludur. Yaprak dokusunda *SucSII* gen ifadesi kontrol bitkilerinde çok düşük olması nedeniyle ( $Cq \geq 34$ ) ifade değişim miktarları yüksek olsa da bu enzimin yapraktaki aktivitesinin taneye göre çok düşük olması nedeniyle değerlendirmemiştir. SucSc enzimini kodlayan genlerin ifadesi tane ve yaprak dokusunda incelenmiş, SucSc enzimine dair abiyotik stres faktörleri ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Tanede çeşitler arası gen ifadesi farkı önemsiz iken, Atay 85 çeşidi kontrol bireylerinde 3 dönemde de gen ifade değişimi önemsiz bulunmuştur. Buna karşın Zubkov çeşidinde gen ifade düzeyinin 21. günde önemli miktarda artış göstermesi, bu genin tane dokusunda ifadesinin geç başladığını göstermektedir. Her iki genotipe ait SucSc enzimini kodlayan genin birbirinden farklı seviyelerde ve stres koşullarına farklı ifade olmaları genel olarak farklı ebeveynlere sahip olmaları ile açıklanabilir. Yaprak dokusunda *SucSc* ifadesi incelendiğinde ise Atay 85 çeşidinde kontrol bireyinde bu genin ifadesinin yüksek olması buna karşın farklı stres koşullarında karşılaştırıldığında önemli düşüşler görülmüştür. Zubkov çeşidi *SucSc* geni ifadesinde stres koşullarında değişim göstermemiştir. Bu durumun çeşidin test edilen stres koşullarını tolare kabiliyetinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Sukroz metabolizmasında yer alan bazı enzimlerden bir diğeri de SucTII enzimi olup, bu enzim bitki bünyesinde sukroz taşınması için önemlidir. Atay 85 çeşidinde tane dokusunda gen ifadesinin Zubkov çeşidinden başlangıçta daha yüksek olduğu gözlenirken, 14. günden itibaren durumun denk hale geldiği görülmüştür. Bunun yanı sıra Atay 85 çeşidinde *SucTII* ifadesinin yüksek başlayıp, azalan bir eğilimde olduğu gözlenirken, Zubkov çeşidinde ifadenin 14. gün itibari ile artış gösterip daha sonra düşüşe geçtiği gözlenmiştir. Stres koşullarına yanıt olarak Atay 85 çeşidinde genel durum ifade düşüşü olarak gözlenirken 21. gün kuraklık stresi bu duruma istisna oluşturarak ifadede artışa neden olmuştur. Zubkov çeşidinde ise ifade genel olarak korunma ya da artış grafiği çizerken buna tek istisna 14. gün kuraklık+sıcaklık stresi olarak gözlenmiştir. Bu durum Atay 85 çeşidinde nişasta biyosentezinin Zubkov çeşidinden daha önce başladığı düşüncesini kuvvetlendiren sukroz transferine işaret etmektedir. Toleranslı kabul edilen çeşitte gen ifadesinin stres koşullarında korunma ya da artış tepkisi oluşturarak, stresin neden olduğu etkilerin tanede en aza indirgenmesi durumu gözlenmiştir. Yaprak dokusunda ise *SucTII* geni ifadesinin genel olarak Zubkov çeşidinde %300'e yakın bir oranda daha yüksek olduğu gözlenirken, stres koşullarında Atay 85 çeşidinde gözlenen kritik ifade kayıplarına karşın, Zubkov çeşidi bu durumu kuraklık+sıcaklık stresi dışında tolare edebildiği görülmüştür. Sıcaklık stresi altında tolerant bitkilerin yüksek sukroz içeriklerine sahip oldukları ve stresin olumsuz etkilerini bu sayede tolare edebildikleri bilinen bir durumdur (126,127). Bu durum ise Zubkov çeşidinde sukroz mobilizasyonunun yüksek olduğu fikrini güçlendirdiği bu çeşidin sıcaklığa toleransını bu sayede artırabildiği düşünülmektedir.

Stres koşulları altında, nişasta biyosentezine yönelik gen ifadesi çalışmaları verileri genel olarak değerlendirildiğinde, Atay 85 çeşidinde kontrol şartlarında nişasta biyosentezinin yüksek olduğu gözlenmiştir. Buna karşın test edilen tüm stres koşullarından oldukça olumsuz etkilendiği, Zubkov çeşidinin tüm stres koşullarına daha toleranslı olduğu, nişasta biyosentez mekanizmasında büyük bir gerileme olmadan fotosentetik aktivitesine devam ettiği görülmüştür. Bu hipotezin doğrulamasını yapmak amacıyla alışma kapsamına nişasta ve şeker analizlerinin de eklenmesine karar verilmiş olup, 14. gün ve hasat sonrası tohumlarda nişasta, sukroz miktar analizleri yapılırken, hasat sonrası tohumlarda amiloz miktarları da saptanmıştır. Nişasta biyosentezinin, özellikle sarı olum döneminin başlarında stres altında yüksek olacağı beklenen bir durumdur. Çünkü bitki evrimsel kazanımlarının bir sonucu olarak türünü sürdürebilmek adına metabolik ve fizyolojik aktivitesini tohum oluşturmaya yöneltecektir. Bu durum ise 14. gün tohumlarında yapılan nişasta miktar tayini ile doğrulanmış olup, en yıkıcı

stres olarak görülen kuraklık+sıcaklık stresinde nişasta miktarları her iki çeşitte de kontrol bitkilerinin yaklaşık %40 üzerinde bulunmuştur. Buna karşın hasat sonrası tohumlarda yapılan analiz sonucunda her iki çeşitte kontrol örneklerinde nişasta oranları birbirine yakın bulunurken, stres koşulları altında nişasta miktarlarında önemli düşüşler gözlenmiştir. Zubkov çeşidinin nişasta biyosentezinde görev alan genlerinin stres koşullarından Atay 85 çeşidine oranla daha az etkilendiği gen ifadesi sonuçları ile doğrulanmıştır. 14. gün ve hasat sonrası örneklerde yapılan sukroz miktar tayinlerine göre sukroz içeriği her koşul altında Zubkov çeşidinde daha yüksek bulunmuş olup, bu durum bitkinin toleranslılığı açıklanabilmektedir. *GBSSI* geninin ifadesinde gözlenen istisnai durum Zubkov çeşidinde gen ifadesinin Atay 85 çeşidinden daha yüksek başlayıp daha sonra dengelendiği sonucu ile birleşince kuru numunede amiloz analizi yapılmıştır. Bu sonuçlar gen ifadesi çalışmalarında elde edilen veriler ile uyum göstermiş olup, genel amiloz oranının Zubkov çeşidinde daha fazla olması görüşünü doğrulamıştır.

Kuraklık ve sıcaklığa toleranslı buğday çeşidi elde edilmesine yönelik ıslah programlarında kullanılmak üzere etkili ve güvenli bir markör sisteminin geliştirilmesi, tez konusunun diğer önemli bir amacıdır. Yeni nesil dizileme ile elde edilen transkriptom verilerinden yararlanarak KASP yöntemine uygun moleküler markörler geliştirmek amacıyla çok sayıda analiz yapılmıştır. 14. gün örneklerinde yapılan transkriptom analizlerden elde edilen SNP verilerinden türetilen olası markör dizilerinden çeşitli özellikleri temsil eden 39 adet set tez çalışması kapsamında temin edilmiştir. Bilindiği üzere oldukça yeni bir sistem olan KASP genotipleme sistemi, ülkemizde az sayıda araştırma grubu tarafından çalışılmakta olup, bitki ıslahına tam anlamı ile entegre edilmiş yürüyen bir program yoktur. Bu bağlamda çalışma sürecinde KASP genotipleme yöntemi detaylıca araştırılmış olup, çalışma yöntemi, karşılaşılan hatalara çözüm arama, metod optimizasyonu hakkında deneyimler edinilmiştir. Yapılan denemelerde öncelikle primer setlerinin optimizasyonu tamamlanmış, KASP gibi 3'lü oligonükleotid kullanan sistemlerde başarılı bir amplifikasyon için bağlanma sıcaklığının çok kritik olduğu anlaşılmıştır. Bağlanma sıcaklıkları saptanan ve çalışılmaya uygun bulunan primer setleri ile daha detaylı PCR optimizasyonları tamamlanmıştır. Bunun sonucunda 21 adet primer seti ile genotipleme çalışmalarına başlanmıştır. Çalışmada öncelikle mevcut primer setlerinin sinyal oluşturma yetenekleri incelenmiş ve bir kısmının çok düşük düzeyde sinyal oluşturduğu ya da hiç sinyal oluşturmadığı gözlenmiştir. Düşük sinyal oluşumuna PCR için kullanılan DNA miktarı ve seçilen reaksiyon döngü sayısının neden olabileceği düşünülmüş ve

bu konuda yayınlanan bir çalışma (108) ile bu düşünce doğrulanmış yaşanan problemler büyük ölçüde çözülmüştür. Ancak bazı primer setlerinin sinyal oluşturmama durumu yapılan çeşitli ve tekrarlı denemeler sonucunda da çözülememiş olup, bu primer setleri çalışma dışı bırakılmıştır. Bu durumun mevcut primer setlerinin erime sıcaklığı (T<sub>m</sub>) sıcaklıkları arasında var olan büyük farklılıktan ya da olası biyoinformatik işlem hataları nedeniyle hatalı primer dizi verilerinin kullanılmasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Verimli ve güçlü sinyal oluşturan primer setleri içinde Atay 85 ve Zubkov çeşitleri arasında allel ayrımı yapabilen yalnızca 8 ve 21 numaralı primer setleri tespit edilmiştir. Bu primer setleri ile yapılan tekrarlı çalışmalarda da aynı sonuçların alınması üzerine işlevselliklerinin test edilmiştir. Bu amaçla, Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Buğday Islah biriminden temin edilen Atay 85 x Zubkov melezleri, bu melezlerden elde edilen double haploid bitkiler ve Atay 85 ile Zubkov çeşitlerinin diğer elit çeşitler ile melezlenmesi sonucu elde edilen bitkiler kullanılarak primer setleri taranmıştır. Yapılan tarama sonunda, double haploid bitkilerde beklenen aynı sinyal düzeyi alınmış, melezlerde ise farklı sinyaller gözlenmiştir. Bu durum primerlerin işlevsel olarak kullanılabilmesi için kanısını güçlendirmiştir. Çalışan her iki primerin de bitkinin sıcaklık stresine tepkisi ile ilişkili olduğu, 8 numaralı primerin sıcaklık stresine toleransı, 21 numaralı primerin ise sıcaklık stresine hassasiyeti ifade ettiği düşünülmektedir. Bu çalışma sonucunda sıcaklık stresine yanıtı temsil eden 2 olası primer seti elde edilmiş olup, kesinleştirilerek daha etkin kullanımı için daha ileri deneylere ihtiyaç duyulabileceği düşünülmektedir. Atay 85 ve Zubkov melezlerinin ve bu melezlerden elde edilen/edilecek double haploid bitkilerin karşılaştırmalı dizi analizleri bu primerlerin doğruluğunu ve etkinliğini kuvvetlendirebilir. Ancak bu çalışma için yeterli bütçe bulunamadığından biyoinformatik doğrulama analizleri yapılamamış, yalnızca laboratuvar ortamında mevcut bireyler ile ön analizler yapılarak bitkiler test edilmiştir. Bu doğrulamaların tamamlanması için uzun yıllardır devam eden melezleme çalışmaları sonucu elde edilecek bireyler kullanılarak KASP genotipleme analizleri de kullanılabilir.



## 6.2. Sonuç

Bu tez kapsamında, dünyada ve ülkemizde üretim alanlarının büyük bir kısmı yarı kurak alanlarda bulunan buğday bitkisinde kuraklık ve sıcaklık stresine toleranslılığa yönelik yeni nesil dizileme ile elde edilen transkriptom verilerinden yararlanarak etkili markör sistemi geliştirilmesi birincil amacımız olmuştur. Bu bağlamda, çalışma sonunda Atay 85 ve Zubkov çeşitleri arasında allel ayrımı yapabilen yalnızca iki adet, sonuçları tekrarlanabilir primer seti tespit edilmiştir. Her iki primerin de bitkinin sıcaklık stresine tepkisi ile ilişkili olduğu, 8 numaralı primerin sıcaklık stresine toleransı, 21 numaralı primerin ise sıcaklık stresine hassasiyeti ifade ettiği görülmüş olup, bu markör adaylarının daha etkin kullanımı için daha ileri deneylere ihtiyaç duyulabileceği düşünülmektedir. Geliştirilen olası markörlerin doğrulanarak, hassasiyetinin artırılması ve böylece ıslah çalışmalarında kullanılmasının önemli faydalar sağlayacağı kanaatindeyiz.

Bu çalışma kapsamında ayrıca, kuraklık ve sıcaklık faktörlerinin nişasta biyosentez yolağında rol alan genlerin ifade düzeyleri üzerine etkileri incelenerek, nişasta biyosentezinde meydana gelen değişimlerin moleküler düzeyinde araştırılması amaçlanmıştır. Amiloplastlarda nişasta biyosentezi son derece karmaşık ve çok sayıda organize enzimlerin rol aldığı bir süreçtir. Yapılan çalışmalarda, nişasta yolağı boyunca görev alan çok farklı yapıda ve fonksiyondaki enzimlerden sorumlu genlerde stres faktörlerine bağlı olarak önemli ifade farklılıkları ortaya konmuştur. Bu çalışmada elde edilen bulgular doğrultusunda stres koşulları altında nişasta biyosentezinde meydana gelen değişimlerin moleküler düzeyinde araştırılması ile ülkemizde yaygın olarak görülen kuraklık ve yüksek sıcaklık stresinde buğdayda nişasta veriminde meydana gelecek değişimlerin genom düzeyinde incelenebilmesine yardımcı olunacağı ve gelecekte abiyotik stres koşulları altında nişasta yollarının manipüle edilmesine yönelik yeni projelerin geliştirilmesi için temel bir yol oluşturulabileceği düşünülmektedir.

## 7. KAYNAKLAR

1. FAOSTAT. <http://faostat3.fao.org/>. Accessed March 6, 2015.
2. Brenchley R, Spannagl M, Pfeifer M, et al. Analysis of the bread wheat genome using whole-genome shotgun sequencing. *Nature*. 2012;491(7426):705-710. doi:10.1038/nature11650.
3. Türkiye İstatistik Kurumu. <http://www.tuik.gov.tr/>. Accessed March 6, 2015.
4. Yang F, Jensen JD, Svensson B, Jørgensen HJL, Collinge DB, Finnie C. Secretomics identifies *Fusarium graminearum* proteins involved in the interaction with barley and wheat. *Mol Plant Pathol*. 2012;13(5):445-453. doi:10.1111/j.1364-3703.2011.00759.x.
5. Anonymus. TÜRKİYE ZİRAAT ODALARI BİRLİĞİ (TZOB) 2013-2014 TARIMSAL ÜRETİM DÖNEMİ KURAKLIK RİSK TAHMİN RAPORU. <http://www.tzob.org.tr/Basın-Odası/Haberler/ArtMID/470/ArticleID/885/TZOB-Kuraklık-Risk-Tahmin-Raporu>. Published 2014.
6. Wang W, Vinocur B, Altman A. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*. 2003;218(1):1-14. doi:10.1007/s00425-003-1105-5.
7. Tollenaar M, Lee EA. Yield potential, yield stability and stress tolerance in maize. *F Crop Res*. 2002;75(2-3):161-169. doi:10.1016/S0378-4290(02)00024-2.
8. TMO. *TMO 2013 Hububat Sektör Raporu*.; 2014.
9. Mehmood Z, Ashiq M, Noorka IR, Ali A, Tabasum S, Iqbal MS. Chemical Control of Monocot Weeds in Wheat ( *Triticum aestivum* L .). *Am J Plant Sci*. 2014;5(April):1272-1276. doi:10.4236/ajps.2014.59140.
10. Anonymus. Buğday. Wikipedia. <http://tr.wikipedia.org/wiki/Buğday>. Published 2014.
11. Anonymus. *Triticum* L. Van Gölü Havzası Sanal Herbariyumu. <http://www.vanherbariyum.yyu.edu.tr/flora/famgenustur/poa/tri/ae/index.htm>. Published 2012.

12. TBVES *Triticum aestivum*. Turkish Plants Data Service (TÜBİVES). [http://www.tubives.com/index.php?sayfa=1&tax\\_id=9943](http://www.tubives.com/index.php?sayfa=1&tax_id=9943). Accessed June 8, 2016.
13. TMO. *2014 Hububat Raporu.*; 2015.
14. Anonymous. Wheat flour. Wikipedia. [https://en.wikipedia.org/wiki/Wheat\\_flour](https://en.wikipedia.org/wiki/Wheat_flour). Published 2016. Accessed June 7, 2016.
15. Akdogan G. Effects of double mutation of the waxy and amylose-extender genes on gene expression profiles and tetabolites in the rice. 2011.
16. Ölçer H, Akın B. Nişasta: Biyosentezi, granül yapısı ve genetik modifikasyonlar. *DPÜ Fen Bilim Enstitüsü Derg.* 2008;16.
17. Burrell MM. Starch: The need for improved quality or quantity - An overview. *J Exp Bot.* 2003;54(382):451-456. doi:10.1093/jxb/erg049.
18. Carbohydrate chemistry. <http://www.azaquar.com/en/doc/carbohydrate-chemistry>. Published 2011. Accessed June 7, 2016.
19. Martin C, Smith AM. Starch biosynthesis. *Plant Cell.* 1995;7(7):971-985. doi:10.1105/tpc.7.7.971.
20. Tetlow IJ. Understanding storage starch biosynthesis in plants: a means to quality improvement. *Can J Bot.* 2006;84(8):1167-1185. doi:10.1139/b06-089.
21. Tetlow IJ. Starch biosynthesis in developing seeds. *Seed Sci Res.* 2011;21(1):5-32. doi:10.1017/S0960258510000292.
22. Taiz L, Zeiger A. *Plant Physiology*. 3rd ed. Sinauer Associates; 2002.
23. Jeon J-S, Ryoo N, Hahn T-R, Walia H, Nakamura Y. Starch biosynthesis in cereal endosperm. *Plant Physiol Biochem.* 2010;48(6):383-392. doi:10.1016/j.plaphy.2010.03.006.
24. Morell MK, Myers AM. Towards the rational design of cereal starches. *Curr Opin Plant Biol.* 2005;8(2):204-210. doi:10.1016/j.pbi.2005.01.009.

25. Comparot-Moss S, Denyer K. The evolution of the starch biosynthetic pathway in cereals and other grasses. *J Exp Bot.* 2009;60(9):2481-2492. doi:10.1093/jxb/erp141.
26. Birt DF, Boylston T, Hendrich S, et al. Resistant starch: promise for improving human health. *Adv Nutr.* 2013;4(6):587-601. doi:10.3945/an.113.004325.
27. Anonymus. Amylose. <https://en.wikipedia.org/wiki/Amylose>. Published 2016. Accessed February 24, 2016.
28. Cohen R, Orlova Y, Kovalev M, Ungar Y, Shimoni E. Structural and functional properties of amylose complexes with genistein. *J Agric Food Chem.* 2008;56(11):4212-4218. doi:10.1021/jf800255c.
29. Anonymus. Amylopectin. <https://en.wikipedia.org/wiki/Amylopectin>. Published 2016. Accessed March 13, 2016.
30. Ohdan T, Francisco PB, Sawada T, et al. Expression profiling of genes involved in starch synthesis in sink and source organs of rice. *J Exp Bot.* 2005;56(422):3229-3244. doi:10.1093/jxb/eri292.
31. Subasinghe RM. Role and Regulation of Starch Phosphorylase and Starch Synthase IV in Starch Biosynthesis in Maize Endosperm Amyloplasts. 2013.
32. Vrinten PL, Nakamura T. Wheat granule-bound starch synthase I and II are encoded by separate genes that are expressed in different tissues. *Plant Physiol.* 2000;122(1):255-264. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10631269>. Accessed June 14, 2016.
33. Preiss J. Biosynthesis of starch and its regulation. *Biochem Plants.* 1988;14:181-254.
34. Tetlow IJ, Davies EJ, Vardy KA, Bowsher CG, Burrell MM, Emes MJ. Subcellular localization of ADPglucose pyrophosphorylase in developing wheat endosperm and analysis of the properties of a plastidial isoform. *J Exp Bot.* 2003;54(383):715-725. doi:10.1093/jxb/erg088.
35. Geigenberger P. Regulation of Starch Biosynthesis in Response to a Fluctuating Environment. *PLANT Physiol.* 2011;155(4):1566-1577. doi:10.1104/pp.110.170399.

36. Fujita N, Satoh R, Hayashi A, et al. Starch biosynthesis in rice endosperm requires the presence of either starch synthase I or IIIa. *J Exp Bot.* 2011;62(14):4819-4831. doi:10.1093/jxb/err125.
37. Nakamura T, Yamamori M, Hirano H, Hidaka S. Identification of three Wx proteins in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Biochem Genet.* 1993;31(1):75-86. doi:10.1007/PL00020387.
38. Sano Y. Differential regulation of waxy gene expression in rice endosperm. *Theor Appl Genet.* 1984;68(5):467-473. doi:10.1007/BF00254822.
39. Echt CS, Schwartz D. Evidence for the Inclusion of Controlling Elements within the Structural Gene at the Waxy Locus in Maize. *Genetics.* 1981;99(2):275-284. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17249118>. Accessed June 15, 2016.
40. Yandea-Nelson MD, Laurens L, Shi Z, Xia H, Smith AM, Guiltinan MJ. Starch-branching enzyme IIa is required for proper diurnal cycling of starch in leaves of maize. *Plant Physiol.* 2011;156(2):479-490. doi:10.1104/pp.111.174094.
41. Vrinten P, Nakamura T, Yamamori M. Molecular characterization of waxy mutations in wheat. *Mol Gen Genet.* 1999;261(3):463-471. doi:10.1007/s004380050989.
42. Fujita N, Yoshida M, Asakura N, et al. Function and characterization of starch synthase I using mutants in rice. *Plant Physiol.* 2006;140(3):1070-1084. doi:10.1104/pp.105.071845.
43. Peng M, Hucl P, Chibbar RN. Isolation, characterization and expression analysis of starch synthase I from wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Sci.* 2001;161(6):1055-1062. doi:10.1016/S0168-9452(01)00481-2.
44. Morell MK, Kosar-Hashemi B, Cmiel M, et al. Barley *sex6* mutants lack starch synthase IIa activity and contain a starch with novel properties. *Plant J.* 2003;34(2):173-185. doi:10.1046/j.1365-313X.2003.01712.x.
45. Konik-Rose C, Thistleton J, Chanvrier H, et al. Effects of starch synthase IIa gene dosage on grain, protein and starch in endosperm of wheat. *Theor Appl Genet.*

2007;115(8):1053-1065. doi:10.1007/s00122-007-0631-0.

46. Clarke B, Liang R, Morell MK, Bird AR, Jenkins CLD, Li Z. Gene expression in a starch synthase IIa mutant of barley: Changes in the level of gene transcription and grain composition. *Funct Integr Genomics*. 2008;8(3):211-221. doi:10.1007/s10142-007-0070-7.
47. Li Z, Mouille G, Kosar-Hashemi B, et al. The Structure and Expression of the Wheat Starch Synthase III Gene. Motifs in the Expressed Gene Define the Lineage of the Starch Synthase III Gene Family. *Plant Physiol*. 2000;123(2):613-624. doi:10.1104/pp.123.2.613.
48. Leterrier M, Holappa LD, Broglie KE, et al. Cloning, characterisation and comparative analysis of a starch synthase IV gene in wheat: functional and evolutionary implications. *BMC Plant Biol*. 2008;8(1):98. doi:10.1186/1471-2229-8-98.
49. Roldán I, Wattedled F, Mercedes Lucas M, et al. The phenotype of soluble starch synthase IV defective mutants of *Arabidopsis thaliana* suggests a novel function of elongation enzymes in the control of starch granule formation. *Plant J*. 2007;49(3):492-504. doi:10.1111/j.1365-313X.2006.02968.x.
50. Regina A, Kosar-Hashemi B, Li Z, et al. Starch branching enzyme IIb in wheat is expressed at low levels in the endosperm compared to other cereals and encoded at a non-syntenic locus. *Planta*. 2005;222(5):899-909. doi:10.1007/s00425-005-0032-z.
51. Gao M, Fisher DK, Kim KN, Shannon JC, Gultinan MJ. Independent genetic control of maize starch-branching enzymes IIa and IIb. Isolation and characterization of a Sbe2a cDNA. *Plant Physiol*. 1997;114(1):69-78. doi:10.1104/pp.114.1.69.
52. Guan HP, Preiss J. Differentiation of the Properties of the Branching Isozymes from Maize (*Zea mays*). *Plant Physiol*. 1993;102(4):1269-1273. doi:10.1104/pp.102.4.1269.
53. Takeda Y, Guan HP, Preiss J. Branching of amylose by the branching isoenzymes of maize endosperm. *Carbohydr Res*. 1993;240(C):253-263. doi:10.1016/0008-6215(93)84188-C.

54. Liu F, Makhmoudova A, Lee EA, Wait R, Emes MJ, Tetlow IJ. The amylose extender mutant of maize conditions novel protein-protein interactions between starch biosynthetic enzymes in amyloplasts. *J Exp Bot.* 2009;60(15):4423-4440. doi:10.1093/jxb/erp297.
55. Rahman S. Comparison of Starch-Branching Enzyme Genes Reveals Evolutionary Relationships Among Isoforms. Characterization of a Gene for Starch-Branching Enzyme IIa from the Wheat D Genome Donor *Aegilops tauschii*. *Plant Physiol.* 2001;125(3):1314-1324. doi:10.1104/pp.125.3.1314.
56. Blum A, Jordan WR. Breeding crop varieties for stress environments. *CRC Crit Rev Plant Sci.* 1985;2(3):199-238. doi:10.1080/07352688509382196.
57. Kalefetoglu T, Ekmekci Y. The Effects of Drought on Plants and Tolerance Mechanisms. *GU J Sci.* 2005;18(4):723-740.
58. Meteoroloji Genel Müdürlüğü. Yağış ve Sıcaklık Bilgileri. <https://www.mgm.gov.tr/>. Accessed March 10, 2016.
59. Vinocur B, Altman A. *Recent Advances in Engineering Plant Tolerance to Abiotic Stress: Achievements and Limitations.* Vol 16.; 2005:123-132. doi:10.1016/j.copbio.2005.02.001.
60. Mahajan S, Mahajan S, Tuteja N, Tuteja N. Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Arch Biochem Biophys.* 2005;444(2):139-158. doi:10.1016/j.abb.2005.10.018.
61. Derelli Tüfekçi E. TRANSCRIPTOME ANALYSIS IN BREAD WHEAT (*Triticum aestivum* L.) EXPOSED TO SOME ABIOTIC STRESS FACTORS USING NEXT GENERATION SEQUENCING TECHNOLOGY. 2016.
62. Schulz P, Herde M, Romeis T. Calcium-dependent protein kinases: hubs in plant stress signaling and development. *Plant Physiol.* 2013;163(2):523-530. doi:10.1104/pp.113.222539.
63. Sinha AK, Jaggi M, Raghuram B, Tuteja N. Mitogen-activated protein kinase signaling

- in plants under abiotic stress. *Plant Signal Behav.* 2011;6(2):196-203. doi:10.4161/psb.6.2.14701.
64. Ruelland E, Kravets V, Derevyanchuk M, Martinec J, Zachowski A, Pokotylo I. Role of phospholipid signalling in plant environmental responses. *Environ Exp Bot.* 2014;114:129-143. doi:10.1016/j.envexpbot.2014.08.009.
  65. Singh A, Giri J, Kapoor S, Tyagi AK, Pandey GK. Protein phosphatase complement in rice: genome-wide identification and transcriptional analysis under abiotic stress conditions and reproductive development. *BMC Genomics.* 2010;11:435. doi:10.1186/1471-2164-11-435.
  66. Xiong LM, Schumaker KS, Zhu JK. Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *Plant Cell.* 2002;14(suppl 1):S165-S183. doi:10.1105/tpc.000596.
  67. Moustafa K, AbuQamar S, Jarrar M, Al-Rajab AJ, Trémouillaux-Guiller J. MAPK cascades and major abiotic stresses. *Plant Cell Rep.* 2014;33(8):1217-1225. doi:10.1007/s00299-014-1629-0.
  68. Ishihama N, Yoshioka H. Post-translational regulation of WRKY transcription factors in plant immunity. *Curr Opin Plant Biol.* 2012;15(4):431-437.
  69. Huang GT, Ma SL, Bai LP, et al. Signal transduction during cold, salt, and drought stresses in plants. *Mol Biol Rep.* 2012;39(2):969-987.
  70. Mazzucotelli E, Mastrangelo AM, Crosatti C, Guerra D, Stanca AM, Cattivelli L. Abiotic stress response in plants: When post-transcriptional and post-translational regulations control transcription. *Plant Sci.* 2008;174(4):420-431. doi:10.1016/j.plantsci.2008.02.005.
  71. PARRY MAJ. Rubisco Activity: Effects of Drought Stress. *Ann Bot.* 2002;89(7):833-839. doi:10.1093/aob/mcf103.
  72. Demirevska K, Zasheva D, Dimitrov R, Simova-Stoilova L, Stamenova M, Feller U. Drought stress effects on Rubisco in wheat: Changes in the Rubisco large subunit. *Acta Physiol Plant.* 2009;31(6):1129-1138. doi:10.1007/s11738-009-0331-2.



73. Barnabás B, Jäger K, Fehér A. The effect of drought and heat stress on reproductive processes in cereals. *Plant Cell Environ.* 2008;31(1):11-38. doi:10.1111/j.1365-3040.2007.01727.x.
74. Prasad PV V., Pisipati SR, Momčilović I, Ristic Z. Independent and Combined Effects of High Temperature and Drought Stress During Grain Filling on Plant Yield and Chloroplast EF-Tu Expression in Spring Wheat. *J Agron Crop Sci.* 2011;197(6):430-441. doi:10.1111/j.1439-037X.2011.00477.x.
75. Li Z, Zhou M, Zhang Z, et al. Expression of a radish defensin in transgenic wheat confers increased resistance to *Fusarium graminearum* and *Rhizoctonia cerealis*. *Funct Integr Genomics.* 2011;11(1):63-70. doi:10.1007/s10142-011-0211-x.
76. He C, Yang A, Zhang W, Gao Q, Zhang J. Improved salt tolerance of transgenic wheat by introducing betA gene for glycine betaine synthesis. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2010;101(1):65-78. doi:10.1007/s11240-009-9665-0.
77. Saad ASI, Li X, Li HP, et al. A rice stress-responsive NAC gene enhances tolerance of transgenic wheat to drought and salt stresses. *Plant Sci.* 2013;203-204:33-40. doi:10.1016/j.plantsci.2012.12.016.
78. Vendruscolo ECG, Schuster I, Pileggi M, et al. Stress-induced synthesis of proline confers tolerance to water deficit in transgenic wheat. *J Plant Physiol.* 2007;164(10):1367-1376. doi:10.1016/j.jplph.2007.05.001.
79. Abebe T, Guenzi AC, Martin B, Cushman JC. Tolerance of mannitol-accumulating transgenic wheat to water stress and salinity. *Plant Physiol.* 2003;131(4):1748-1755. doi:10.1104/pp.102.003616.
80. Wang Y-J, Hao Y-J, Zhang Z-G, Chen T, Zhang J-S, Chen S-Y. Isolation of trehalose-6-phosphate phosphatase gene from tobacco and its functional analysis in yeast cells. *J Plant Physiol.* 2005;162(2):215-223. doi:10.1016/j.jplph.2004.06.014.
81. Uga Y, Sugimoto K, Ogawa S, et al. Control of root system architecture by DEEPER ROOTING 1 increases rice yield under drought conditions. *Nat Genet.* 2013;45:1097-1102. doi:10.1038/ng.2725.

82. Mickelbart M V., Hasegawa PM, Bailey-Serres J. Genetic mechanisms of abiotic stress tolerance that translate to crop yield stability. *Nat Rev Genet.* 2015;16(4):237-251. doi:10.1038/nrg3901.
83. Kirigwi FM, Van Ginkel M, Brown-Guedira G, Gill BS, Paulsen GM, Fritz AK. Markers associated with a QTL for grain yield in wheat under drought. *Mol Breed.* 2007;20(4):401-413. doi:10.1007/s11032-007-9100-3.
84. Mathews KL, Malosetti M, Chapman S, et al. Multi-environment QTL mixed models for drought stress adaptation in wheat. *Theor Appl Genet.* 2008;117(7):1077-1091. doi:10.1007/s00122-008-0846-8.
85. Kalia RK, Rai MK, Kalia S, Singh R, Dhawan AK. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. *Euphytica.* 2010;177(3):309-334. doi:10.1007/s10681-010-0286-9.
86. Gupta PK, Varshney RK, Sharma PC, Ramesh B. Molecular markers and their applications in wheat breeding. *Plant Breed.* 1999;118(5):369-390. doi:10.1046/j.1439-0523.1999.00401.x.
87. Akkaya MS, Bhagwat AA, Cregan PB. Length Polymorphisms of Simple Sequence Repeat DNA in Soybean. *Genetics.* 1992;132(4):1131-1139. <http://www.genetics.org/content/132/4/1131.short>. Accessed December 10, 2014.
88. Plaschke J, Ganai MW, Röder MS. Detection of genetic diversity in closely related bread wheat using microsatellite markers. *Theor Appl Genet.* 1995;91(6-7):1001-1007. doi:10.1007/BF00223912.
89. Ma Z-Q, Lapitan NL V. A comparison of amplified and restriction fragment length polymorphism in wheat. *Cereal Res Commun.* 1998;26(1):7-13.
90. Röder MS, Plaschke J, König SU, et al. Abundance, variability and chromosomal location of microsatellites in wheat. *MGG Mol Gen Genet.* 1995;246(3):327-333. doi:10.1007/BF00288605.
91. Holton TA, Christopher JT, McClure L, Harker N, Henry RJ. Identification and mapping

- of polymorphic SSR markers from expressed gene sequences of barley and wheat. *Mol Breed.* 2002;9(2):63-71. doi:10.1023/A:1026785207878.
92. Kompetitive Allele Specific PCR (KASP). Wikipedia. [https://en.wikipedia.org/wiki/Kompetitive\\_Allele\\_Specific\\_PCR\\_\(KASP\)](https://en.wikipedia.org/wiki/Kompetitive_Allele_Specific_PCR_(KASP)). Published 2014. Accessed July 30, 2016.
  93. Chagn?? D, Gasic K, Crowhurst RN, et al. Development of a set of SNP markers present in expressed genes of the apple. *Genomics.* 2008;92(5):353-358. doi:10.1016/j.ygeno.2008.07.008.
  94. Marth GT, Kwok P-Y, Korf I, et al. A general approach to single-nucleotide polymorphism discovery. *Nat Genet.* 1999;23(4):452-456. doi:10.1038/70570.
  95. Ahmadian A, Gharizadeh B, Gustafsson AC, et al. Single-Nucleotide Polymorphism Analysis by Pyrosequencing. *Anal Biochem.* 2000;280(1):103-110. doi:10.1006/abio.2000.4493.
  96. Smith SM, Maughan PJ. SNP Genotyping Using KASPar Assays. In: ; 2015:243-256. doi:10.1007/978-1-4939-1966-6\_18.
  97. Devran Z, Göknur A, Mesci L. Development of molecular markers for the Mi-1 gene in tomato using the KASP genotyping assay. *Hortic Environ Biotechnol.* 2016;57(2):156-160. doi:10.1007/s13580-016-0028-6.
  98. Chagné D, Batley J, Edwards D, Forster JW. Single Nucleotide Polymorphism Genotyping in Plants. In: *Association Mapping in Plants*. New York, NY: Springer New York; 2007:77-94. doi:10.1007/978-0-387-36011-9\_5.
  99. Kim J, Kim DS, Park S, et al. Development of a high-throughput SNP marker set by transcriptome sequencing to accelerate genetic background selection in Brassica rapa. *Hortic Environ Biotechnol.* 2016;57(3):280-290. doi:10.1007/s13580-016-1036-2.
  100. Rust S, Funke H, Assmann G. Mutagenically separated PCR (MS-PCR): a highly specific one step procedure for easy mutation detection. *Nucleic Acids Res.* 1993;21(16):3623-3629. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8367277>. Accessed

February 21, 2017.

101. LgcGroup. KASP genotyping chemistry. <http://www.lgcgroup.com/products/kasp-genotyping-chemistry/>. Accessed July 26, 2016.
102. Allen AM, Barker GLA, Berry ST, et al. Transcript-specific, single-nucleotide polymorphism discovery and linkage analysis in hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Biotechnol J*. 2011;9(9):1086-1099. doi:10.1111/j.1467-7652.2011.00628.x.
103. Semagn K, Babu R, Hearne S, Olsen M. Single nucleotide polymorphism genotyping using Kompetitive Allele Specific PCR (KASP): overview of the technology and its application in crop improvement. *Mol Breed*. 2014;33(1):1-14. doi:10.1007/s11032-013-9917-x.
104. Köm D. PARTİKÜL BOMBARDIMANI YÖNTEMİ İLE MISIR (*Zea mays* L.) BİTKİSİNE GEN AKTARIMI. 2013.
105. Chomczynski P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques*. 1993;15(3):532-534, 536-537. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7692896>. Accessed June 12, 2015.
106. Jaakola L, Pirttilä AM, Halonen M, Hohtola A. Isolation of High Quality RNA from Bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) Fruit. *Mol Biotechnol*. 2001;19(2):201-204. doi:10.1385/MB:19:2:201.
107. Wang G, Wang G, Zhang X, Wang F, Song R. Isolation of high quality RNA from cereal seeds containing high levels of starch. *Phytochem Anal*. 2011;23(2):159-163. doi:10.1002/pca.1337.
108. Mornkham T, Wangsomnuk P, Fu Y-B, Wangsomnuk P, Jogloy S, Patanothai A. Extractions of High Quality RNA from the Seeds of Jerusalem Artichoke and Other Plant Species with High Levels of Starch and Lipid. *Plants*. 2013;2(2):302-316. doi:10.3390/plants2020302.
109. Barrero JM, Mrva K, Talbot MJ, et al. Genetic, hormonal, and physiological analysis of

- late maturity  $\alpha$ -amylase in wheat. *Plant Physiol.* 2013;161(3):1265-1277. doi:10.1104/pp.112.209502.
110. Ramirez-Gonzalez RH, Segovia V, Bird N, et al. RNA-Seq bulked segregant analysis enables the identification of high-resolution genetic markers for breeding in hexaploid wheat. *Plant Biotechnol J.* 2015;13(5):613-624. doi:10.1111/pbi.12281.
111. Bates LS, Waldren RP, Teare ID. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil.* 1973;39(1):205-207. doi:10.1007/BF00018060.
112. Jarvis CE, Walker JRL. Simultaneous, rapid, spectrophotometric determination of total starch, amylose and amylopectin. *J Sci Food Agric.* 1993;63(1):53-57. doi:10.1002/jsfa.2740630109.
113. Anonymous. Amylose Content of Milled Rice. AACC International Approved Methods. <http://methods.aaccnet.org/summaries/61-03-01.aspx>. Published 1999. Accessed December 21, 2016.
114. Kaufman RC, Wilson JD, Bean SR, Herald TJ, Shi Y-C. *Development of a 96-Well Plate Iodine Binding Assay for Amylose Content Determination*. Vol 115.; 2015. doi:10.1016/j.carbpol.2014.09.015.
115. HEYNE EG, BRUNSON AM. Genetic studies of heat and drought tolerance in maize. *J Am Soc Agron.* 1940;32:803-814.
116. Craufurd PQ, Peacock JM. Effect of heat and drought stress on sorghum (*Sorghum bicolor*). II. Grain yield. *Exp Agric.* 1993;29:77-86. <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201301786781>. Accessed April 26, 2017.
117. Savin R, Nicolas M. Effects of Short Periods of Drought and High Temperature on Grain Growth and Starch Accumulation of Two Malting Barley Cultivars. *Aust J Plant Physiol.* 1996;23(2):201. doi:10.1071/PP9960201.
118. Wang Z, Huang B. Physiological Recovery of Kentucky Bluegrass from Simultaneous Drought and Heat Stress. *Crop Sci.* 2004;44(5):1729. doi:10.2135/cropsci2004.1729.

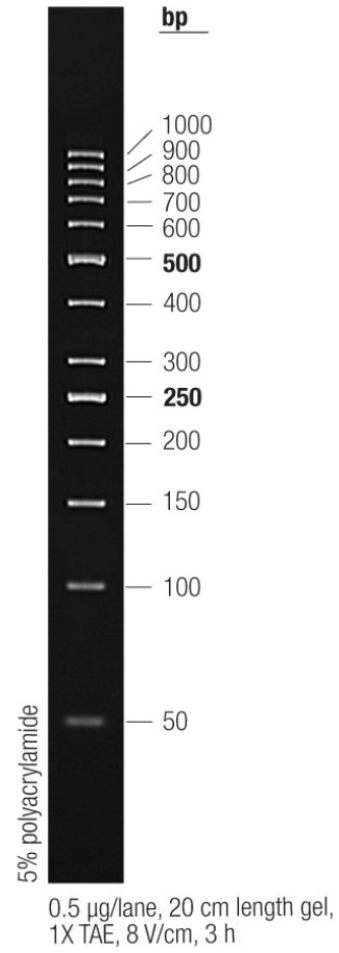
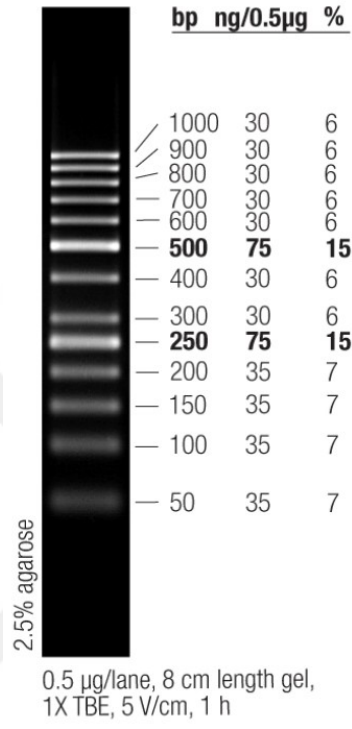
119. Rizhsky L, Liang H, Shuman J, et al. When Defense Pathways Collide. The Response of Arabidopsis to a Combination of Drought and Heat Stress. *Plant Physiol.* 2004;134(April):1683-1696. doi:10.1104/pp.103.033431.1.
120. Hayano-Kanashiro C, Calderón-Vázquez C, Ibarra-Laclette E, Herrera-Estrella L, Simpson J. Analysis of Gene Expression and Physiological Responses in Three Mexican Maize Landraces under Drought Stress and Recovery Irrigation. Dilkes BP, ed. *PLoS One.* 2009;4(10):e7531. doi:10.1371/journal.pone.0007531.
121. Rizhsky L, Liang H, Mittler R. The Combined Effect of Drought Stress and Heat Shock on Gene Expression in Tobacco. *Plant Physiol.* 2002;130(3):1143-1151. doi:10.1104/pp.006858.
122. Jaarsma R, de Vries RSM, de Boer AH. Effect of salt stress on growth, Na<sup>+</sup> accumulation and proline metabolism in potato (*Solanum tuberosum*) cultivars. *PLoS One.* 2013;8(3):e60183. doi:10.1371/journal.pone.0060183.
123. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983;65(1-2):55-63.
124. Aprile A, Mastrangelo AM, De Leonardis AM, et al. Transcriptional profiling in response to terminal drought stress reveals differential responses along the wheat genome. *BMC Genomics.* 2009;10(1):279. doi:10.1186/1471-2164-10-279.
125. Kakumanu A, Ambavaram MMR, Klumas C, et al. Effects of drought on gene expression in maize reproductive and leaf meristem tissue revealed by RNA-Seq. *Plant Physiol.* 2012;160(2):846-867. doi:10.1104/pp.112.200444.
126. Lalonde S, Morse D, Saini HS. Expression of a wheat ADP-glucose pyrophosphorylase gene during development of normal and water-stress-affected anthers. *Plant Mol Biol.* 1997;34(3):445-453. doi:10.1023/A:1005882118506.
127. Park YJ, Nishikawa T. Characterization and expression analysis of the starch synthase gene family in grain amaranth (*Amaranthus cruentus* L.). *Genes Genet Syst.* 2012;87(5):281-289. doi:10.1266/ggs.87.281.

128. Hurkman WJ, McCue KF, Altenbach SB, et al. Effect of temperature on expression of genes encoding enzymes for starch biosynthesis in developing wheat endosperm. *Plant Sci.* 2003;164(5):873-881. doi:10.1016/S0168-9452(03)00076-1.
129. Krasensky J, Jonak C. Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. *J Exp Bot.* 2012;63(4):1593. doi:10.1093/jxb/err460.
130. Dinges JR, Colleoni C, James MG, Myers AM. Mutational analysis of the pullulanase-type debranching enzyme of maize indicates multiple functions in starch metabolism. *Plant Cell.* 2003;15(3):666-680. doi:10.1105/TPC.007575.
131. Saeedipour S, Moradi F. Comparison of the Drought Stress Responses of Tolerant and Sensitive Wheat Cultivars during Grain Filling: Impact of Invertase Activity on Carbon Metabolism during Kernel Development. *J Agric Sci.* 2011;3(2). doi:10.5539/jas.v3n2p32.
132. Sharbatkhari M, Shobbar Z-S, Galeshi S, Nakhoda B. Wheat stem reserves and salinity tolerance: molecular dissection of fructan biosynthesis and remobilization to grains. *Planta.* 2016;244(1):191-202. doi:10.1007/s00425-016-2497-3.

## 8. EKLER

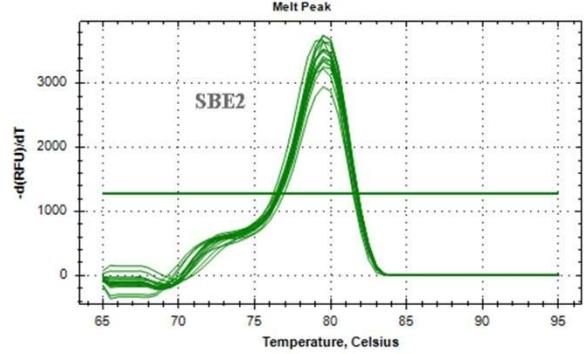
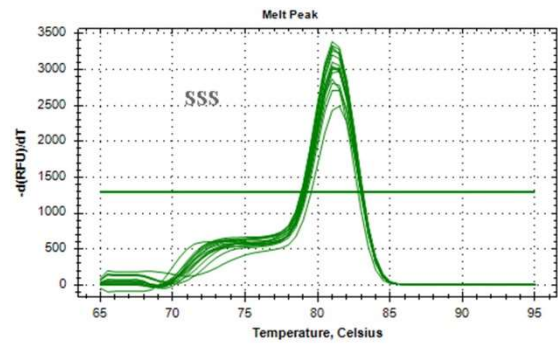
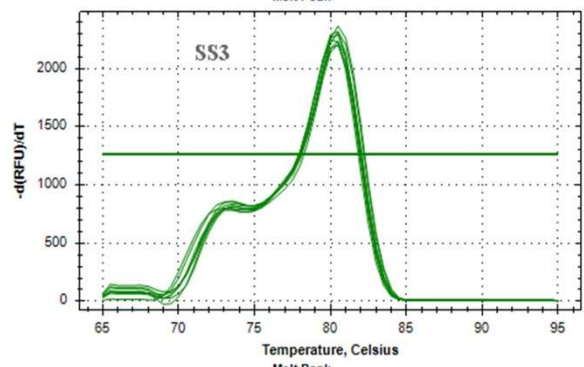
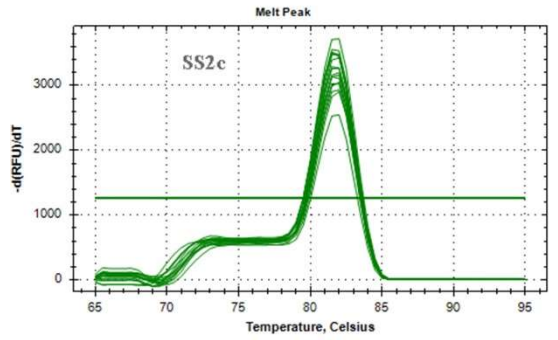
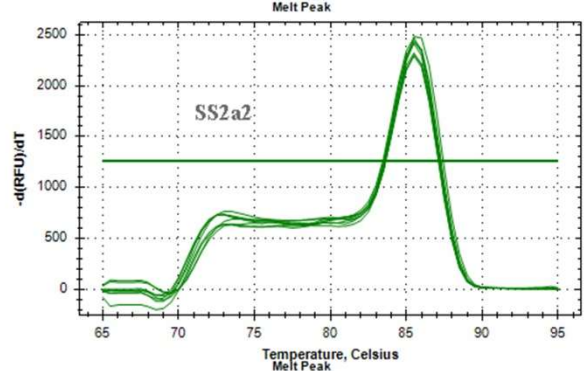
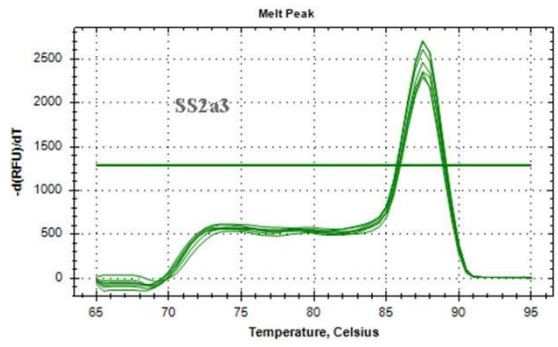
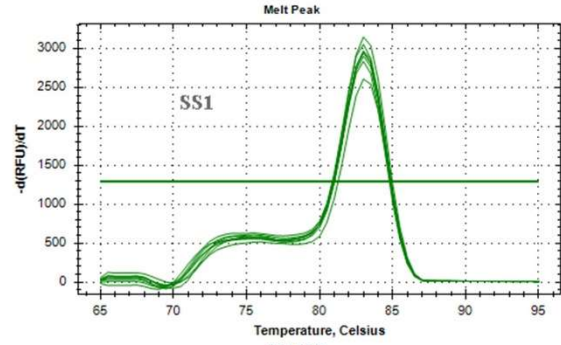
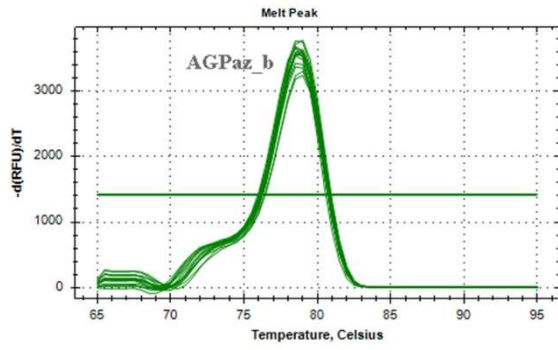
### 8.1. EK 1. DNA LADDER

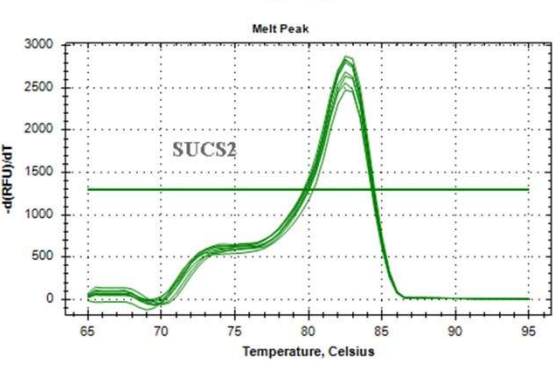
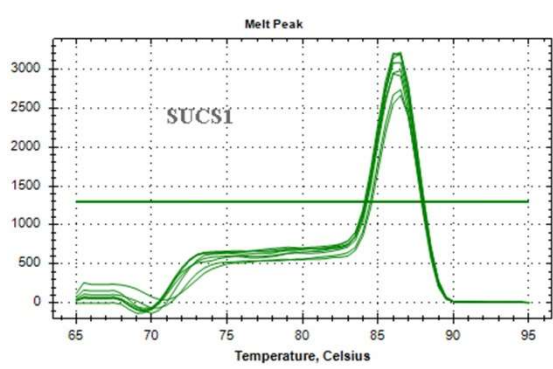
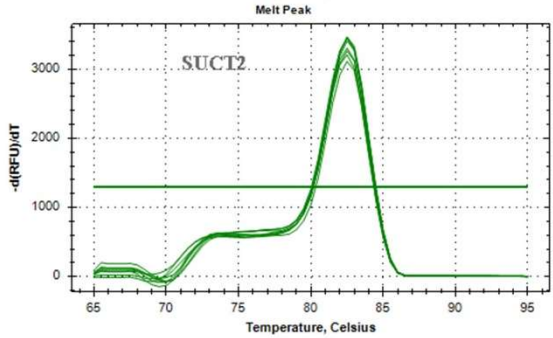
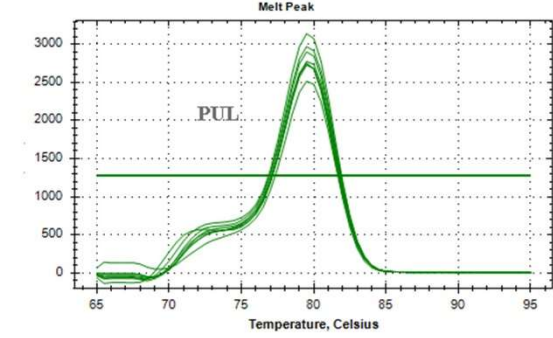
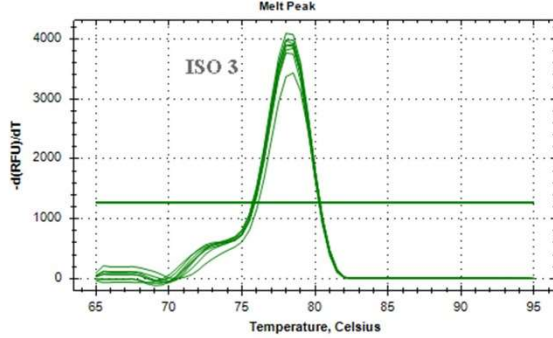
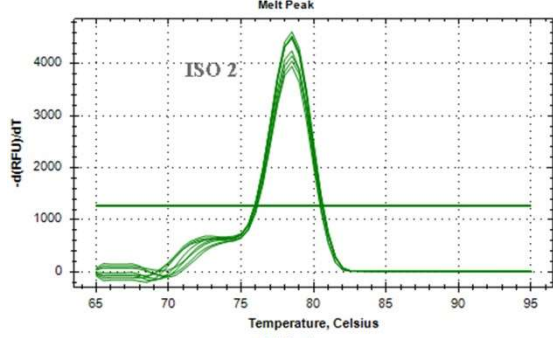
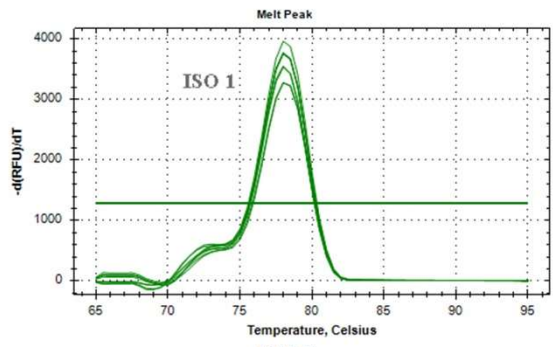
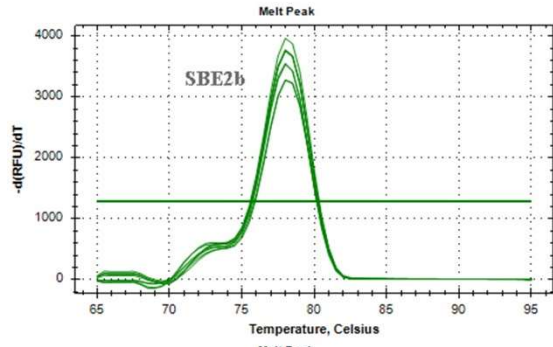
Bu çalışmada 50 bp DNA Ladder Thermo Scientific GeneRuler 50 bp DNA Ladder (#SM0373) kullanılmıştır.

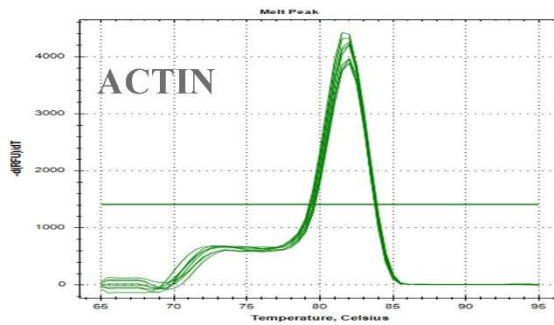
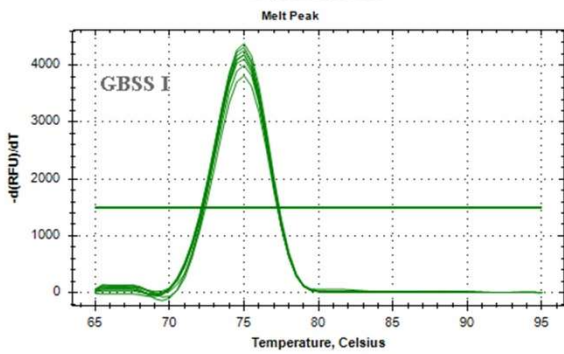
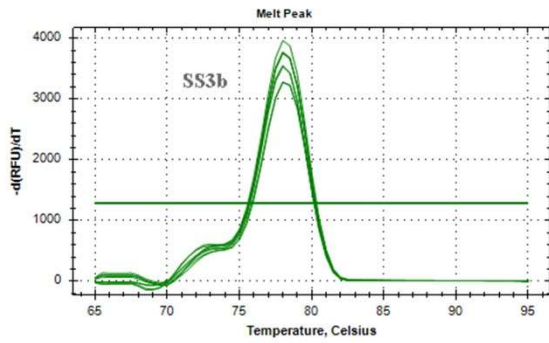
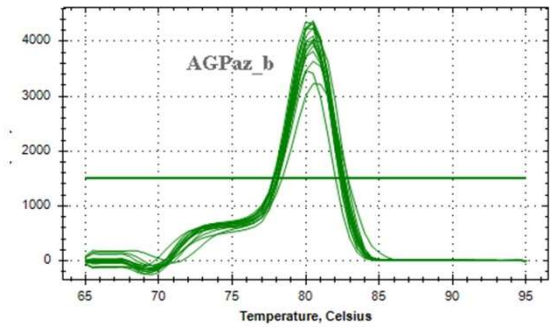
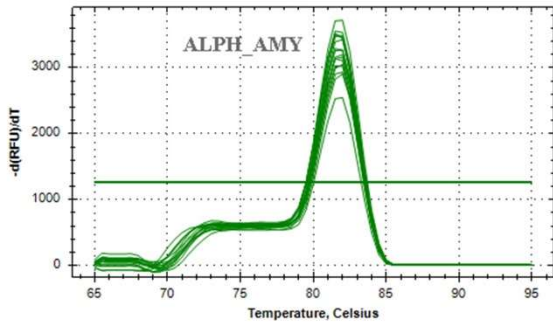
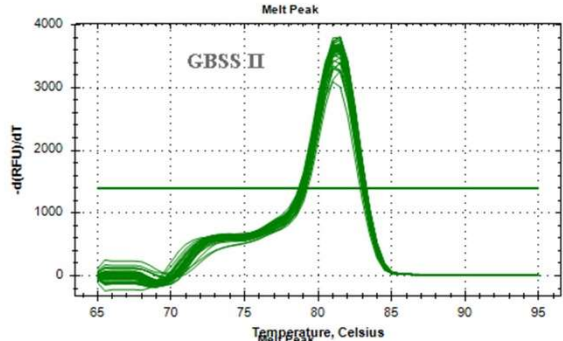
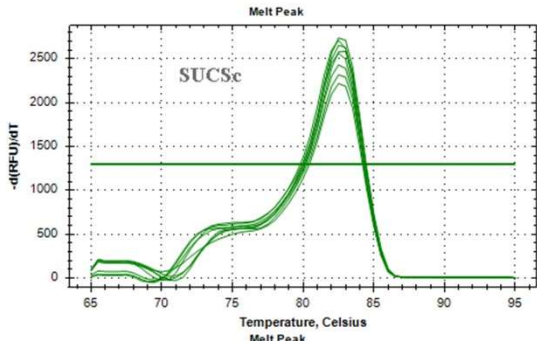




## 8.2. EK 2. RT-PCR Analizlerinde Kullanılan Primerlerin Melting Curve Grafikleri







### 8.3. EK 3. KASP Genotipleme Reaksiyonlarında Kullanılan Primerlerin Dizileri

Primer Adı	Dizisi 5' - 3'	% GC	TM
1	GCACATTGCTTCTACCATGGAAT	43	53
	/FAM/GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGGTAGACTTGTGGAGTATCGGT	49	69
	/HEX/GAAGGTCGGAGTCAACGGATTGGTAGACTTGTGGAGTATCGGC	53	71
2	CATCTCAACCGAGCTGCAA	53	51
	/FAM/GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGGAGGACCATGAGAAGCAAGA	50	69
	/HEX/GAAGGTCGGAGTCAACGGATTGGAGGACCATGAGAAGCAAGA	52	70
3	TGGACAAGGGAATAAACCCACAC	45	53
	/FAM/GAAGGTGACCAAGTTCATGCTCTTGCTGATAGTCCGAAGCTT	48	68
	/HEX/GAAGGTCGGAGTCAACGGATTCTTGCTGATAGTCCGAAGCTC	52	70
4	CCCTTGAGATTGAGACACCTC	52	54
	/FAM/GAAGGTGACCAAGTTCATGCTTTAACACTAGAGGAGCAAGCAT	44	67
	/HEX/GAAGGTCGGAGTCAACGGATTTAACACTAGAGGAGCAAGCAC	49	69
5	CTACAAGATCCTGCCGTCG	58	53
	/FAM/GAAGGTGACCAAGTTCATGCTCATCCCTTGGCGTTGACA	51	69
	/HEX/GAAGGTCGGAGTCAACGGATTCATCCCTTGGCGTTGACG	56	71
6	TCGAGAGTCTCCTTTGACCT	50	52
	/FAM/GAAGGTGACCAAGTTCATGCTTCCAGGTCGGGAAGATGA	50	69
	/HEX/GAAGGTCGGAGTCAACGGATTTCCAGGTCGGGAAGATGG	55	71
7	TGGCGTCGACATCACACA	56	50
	/FAM/GAAGGTGACCAAGTTCATGCTCCAACCATCCTTTATCGTCTCT	47	68
	/HEX/GAAGGTCGGAGTCAACGGATTCCAACCATCCTTTATCGTCTCC	51	70
8	TCGTCCACGTATCCCCATAG	55	54
	/FAM/GAAGGTGACCAAGTTCATGCTATCTCCCCAGCCTCCTTAAA	49	69
	/HEX/GAAGGTCGGAGTCAACGGATTATCTCCCCAGCCTCCTTAAG	54	71
9	AATAAGAACTGATAGACGTGCTGCT	40	54
	/FAM/GAAGGTGACCAAGTTCATGCTATGAATTAGGCGCCGGAATT	48	68
	/HEX/GAAGGTCGGAGTCAACGGATTATGAATTAGGCGCCGGAATC	52	70
10	CTGCGTCCATCATTGTTTGTAT	39	52
	/FAM/GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGGAGATGTGGAAGGACGCA	53	70
	/HEX/GAAGGTCGGAGTCAACGGATTGGAGATGTGGAAGGACGCG	58	72

11	CTGCGTCCATCATTGTTTGT	42	50
	/FAM/GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGGAGATGTGGAAGGACGCA	53	70
	/HEX/GAAGGTCGGAGTCAACGGATTGGAGATGTGGAAGGACGCG	58	72
12	AGCAGTACGAGGAGGACCC	63	55
	/FAM/GAAGGTGACCAAGTTCATGCTTCCATCCGTCCATTAGCTA	46	69
	/HEX/GAAGGTCGGAGTCAACGGATTCCATCCGTCCATTAGCTG	54	71
13	GGAACTCTTACCCCTCTGTA	45	53
	/FAM/GAAGGTGACCAAGTTCATGCTTTGTGATCATGTGCTTCCGT	46	68
	/HEX/GAAGGTCGGAGTCAACGGATTTGTGATCATGTGCTTCCGC	51	70
14	CCTGTGTTCTTGGGGATCTT	48	52
	/FAM/GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGGTCAGGCTGATGCTTCTTT	49	69
	/HEX/GAAGGTCGGAGTCAACGGATTGGTCAGGCTGATGCTTCTTC	54	71
15	ATGGACGGCAAGCTCGGG	67	55
	/FAM/GAAGGTGACCAAGTTCATGCTCCGTTCTCGAGCTCCCCA	56	71
	/HEX/GAAGGTCGGAGTCAACGGATTCCGTTCTCGAGCTCCCCG	62	73
16	GGCAGTTGTGATCAACTATTCT	39	52
	/FAM/GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGACACTCAATAGTAGAAGATGTTCA	41	67
	/HEX/GAAGGTCGGAGTCAACGGATTGACACTCAATAGTAGAAGATGTTTCG	46	69
17	TTGGGGAGCCATCATCGAC	58	53
	/FAM/GAAGGTGACCAAGTTCATGCTACCTGACTGTAGACCATTAACAA	43	67
	/HEX/GAAGGTCGGAGTCAACGGATTACCTGACTGTAGACCATTAACAG	48	69
18	GGACTACGCTGAAGCAGATT	50	52
	/FAM/GAAGGTGACCAAGTTCATGCTTCTTCTGTTTTCTCTCAAGGTCTT	42	67
	/HEX/GAAGGTCGGAGTCAACGGATTTCTTCTGTTTTCTCTCAAGGTCTG	47	69
19	AGCTGCAGTGTGGATTGAAG	50	52
	/FAM/GAAGGTGACCAAGTTCATGCTTCTGCCATAAGTATCTCTCTTTT	41	67
	/HEX/GAAGGTCGGAGTCAACGGATTTCTGCCATAAGTATCTCTCTTTC	46	69
20	GAGTTCATGCATCTCTGGCAT	48	52
	/FAM/GAAGGTGACCAAGTTCATGCTTTCGTGTGATGGCTCCAGT	50	69
	/HEX/GAAGGTCGGAGTCAACGGATTTTCGTGTGATGGCTCCAGC	55	71
21	AGAGAGCACAATAAGTTTGTTCAG	38	52
	/FAM/GAAGGTGACCAAGTTCATGCTCCGCATATTACACAACGACGT	48	68
	/HEX/GAAGGTCGGAGTCAACGGATTCCGCATATTACACAACGACGC	52	70

22	AACCATCGCCTAATTATGACATTT	33	51
	/FAM/GAAGGTGACCAAGTTCATGCTCACTGTCAGAACCTGCTTGA	49	69
	/HEX/GAAGGTCGGAGTCAACGGATTCACTGTCAGAACCTGCTTGC	54	71
24	GGCTGTGTTGTAGACTATATACTCG	44	56
	/FAM/GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGCAAGCCAGTGCCAGCAT	54	70
	/HEX/GAAGGTCGGAGTCAACGGATTGCAAGCCAGTGCCAGCAG	59	72
25	GAGCACTACTATGTAACGATCCAC	48	55
	/FAM/GAAGGTGACCAAGTTCATGCTTCTGAATTTCTGCCAAAGTGTT	41	66
	/HEX/GAAGGTCGGAGTCAACGGATTTCTGAATTTCTGCCAAAGTGTC	46	68
26	CCCTTGAGATTGAGACACCTC	52	54
	/FAM/GAAGGTGACCAAGTTCATGCTTAACTAGAGGAGCAAGCAT	44	67
	/HEX/GAAGGTCGGAGTCAACGGATTTAACTAGAGGAGCAAGCAC	49	69
27	CATCTCAACCGAGCTGCAA	53	51
	/FAM/GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGGAGGACCATGAGAAGCAAGA	50	69
	/HEX/GAAGGTCGGAGTCAACGGATTGGAGGACCATGAGAAGCAAGG	55	71
29	TCGAGAGTCTCCTTTGACCT	50	52
	/FAM/GAAGGTGACCAAGTTCATGCTTCCAGGTCGGGAAGATGA	50	69
	/HEX/GAAGGTCGGAGTCAACGGATTTTCAGGTCGGGAAGATGG	55	71
30	GCATTCTTGCTAGTGTGTCG	50	52
	/FAM/GAAGGTGACCAAGTTCATGCTTCATTGGAGAGCTGACAGAGA	48	68
	/HEX/GAAGGTCGGAGTCAACGGATTTTCATTGGAGAGCTGACAGAGG	52	70
31	GCTGGTCGTACACCCATGAC	60	56
	/FAM/GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGTACAGCTTCGGGATGTTGT	49	69
	/HEX/GAAGGTCGGAGTCAACGGATTGTACAGCTTCGGGATGTTGC	54	71
32	AAGGTCAGGCTGGTCTCG	61	53
	/FAM/GAAGGTGACCAAGTTCATGCTCTGCTGTTCCGGTCT	51	69
	/HEX/GAAGGTCGGAGTCAACGGATTCTGCTGTTCCGGTCTCG	56	71
33	CTCCACCGTGACGATCCAGA	60	56
	/FAM/GAAGGTGACCAAGTTCATGCTTCAACGTGTCATACCCATAGAAT	51	69
	/HEX/GAAGGTCGGAGTCAACGGATTTCAACGTGTCATACCCATAGAAG	56	71
34	CCTGATTGGAGCCCCTGATA	55	54
	/FAM/GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGGAATGATGTTTCATCGCTGACA	45	68
	/HEX/GAAGGTCGGAGTCAACGGATTGGATGATGTTTCATCGCTGACG	51	70

35	TGTGCAATGACTGTAACCTACA	39	52
	/FAM/GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGCCGCATATATGCCGTATA	49	69
	/HEX/GAAGGTCGGAGTCAACGGATTGCCGCATATATGCCGTATG	54	71
36	GAAGCACGAGAGGCGGAAA	58	53
	/FAM/GAAGGTGACCAAGTTCATGCTATCATGCATCACGGGTCA	50	69
	/HEX/GAAGGTCGGAGTCAACGGATTATCATGCATCACGGGTTCG	55	71
37	CAAAAACACGAAATACTCAGAAACA	32	51
	/FAM/GAAGGTGACCAAGTTCATGCTAGGTAACATTTTTCGTCATCACAA	40	66
	/HEX/GAAGGTCGGAGTCAACGGATTAGGTAACATTTTTCGTCATCACAG	44	68
38	ATGTGCCATCTCTCGTTATCT	41	51
	/FAM/GAAGGTGACCAAGTTCATGCTCCGCTCTTGAGAGTGTC	52	70
	/HEX/GAAGGTCGGAGTCAACGGATTCCGCTCTTGAGAGTGTCG	58	72
39	GCCCAAGACCTTAGAAACATTGAA	42	54
	/FAM/GAAGGTGACCAAGTTCATGCTACACAACAATCAAAGTTACATGCT	40	66
	/HEX/GAAGGTCGGAGTCAACGGATTACACAACAATCAAAGTTACATGCC	44	68
40	GGCTGTGTTGTAGACTATATACTCG	44	56
	/FAM/GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGCAAGCAAGTGCCAGCAT	54	70
	/HEX/GAAGGTCGGAGTCAACGGATTGCAAGCAAGTGCCAGCAG	59	72
41	CAAGCACCGGGGATCCT	67	55
	/FAM/GAAGGTGACCAAGTTCATGCTATCTCCACCATCTCGCCA	51	69
	/HEX/GAAGGTCGGAGTCAACGGATTATCTCCACCATCTCGCCG	56	71

## 9. ÖZGEÇMİŞ

**Adı Soyadı:** Deniz KÖM

**Doğum Yeri:** İSTANBUL

**Doğum Tarihi:** 21.08.1988

**Medeni Hali:** Bekâr

**Yabancı Dili:** İngilizce

### **Eğitim Durumu**

**Lise:** Üsküdar Burhan Felek Yabancı Dil Ağırlıklı Lisesi (2002-2006)

**Lisans:** İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü (2006-2010)

**Yüksek Lisans:** İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Botanik Ana Bilim Dalı (2010-2013)

### **İş Tecrübesi**

- **Kurumu:** İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ

**Pozisyon:** Yarı zamanlı asistan öğrenci

**Yılları:** 2008-2010

- **Kurumu:** TÜBİTAK MARMARA ARAŞTIRMA MERKEZİ

**Departman:** Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü

**Pozisyon:** Proje bursiyer araştırmacısı (TÜBİTAK 109O664)

**Yılları:** 2010-2013

- **Kurumu:** Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü

**Pozisyon:** Proje bursiyer araştırmacısı (TÜBİTAK 111O254)

**Yılları:** 2013-2014

- **Kurumu:** Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü

**Pozisyon:** Proje bursiyer araştırmacısı (TÜBİTAK 113O661)

**Yılları:** (2015)



## 10. YAYINLAR

### 10.1. Ulusal Kongreler ve Bilimsel Toplantılarda Sunulan Bildiriler

Ebrahim Pour Mokhtari, N., Allahverdikhani Vaziri, P., Barpete, S., Mahmood Khawar, K., **Köm, D.**, 2013, ZnSO<sub>4</sub> Osmoprimering Uygulamasının Lathyrus sativus cv. Gürbüz Tohumlarının Çimlenme Hızı ve Gücü Üzerine Olan Etkisi. Türkiye 10. Tarla Bitkileri Kongresi, Konya - Bildiri

**KÖM D.**, MIRZAPOUR M., DERELLİ, E., ALLAHVERDİKHAN VAZİRİ P., KAYAN M., AYCAN, M., YILDIZ M., Ketende (*Linum usitatissimum* L.) Yüzey Sterilizasyonu Süresinin In Vitro Fide Gelişimi, Sürgün Rejenerasyonu ve Bitkicik Gelişimi Üzerine Etkisi, Ulusal Botanik Kongresi, 2014, Antalya, Türkiye

DARÇIN S., AYCAN M., KAYAN M., **KÖM D.**, TAHER M., YILDIZ M., Acı Kavun (*Ecballium elaterium* (L.) A. Rich.) Meyve Özsuyunun Kolzada (*Brassica napus* L.) Tohum Çimlenmesi ve Fide Gelişimi Üzerine Etkisi, Ulusal Botanik Kongresi, 2014, Antalya, Türkiye

AYCAN M., KAYAN M., **KÖM D.**, TAHER M., ALIZADEH B., DARÇIN S. YILDIZ M., Buğdayda (*Triticum* sp.) In vitro Tohum Çimlenmesi, Fide Gelişimi Ve Kallustan Doku Kültürü Tepkisi Üzerine Tohum Büyüklüğünün Etkisi, Ulusal Botanik Kongresi, 2014, Antalya, Türkiye

KAYAN M., AYCAN M., **KÖM D.**, TAHER M., YILDIZ M., Bitkilerin Doku Kültürü Tepkisinin Bir Göstergesi: Klorofil Kapsamı, Ulusal Botanik Kongresi, 2014, Antalya, Türkiye

Yıldız, M., Aycan, M., Kayan, M., **Köm, D.**, Mirici, S., Acı Kavun (*Ecballium elaterium* (L.) A. Rich.) Meyve Özsuyunun Kolzada (*Brassica napus* L.) *Agrobacterium tumefaciens* Aracılığıyla Aktarımı Üzerine Etkisi, Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi, 2015, Afyonkarahisar, Türkiye

Kayan, M., Aycan, M., **Köm, D.**, Yıldız, M., Özcan S. F., S., Acı Kavun (*Ecballium elaterium* (L.) A. Rich.) Meyve Özsuyunun Patateste (*Solanum tuberosum* L.) *Agrobacterium tumefaciens* Aracılığıyla Aktarımı Üzerine Etkisi, Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi, 2015, Afyonkarahisar, Türkiye

Yıldız, M., Onarıcı, S., Aycan, M., **Köm, D.**, Kayan, M., Bialaphos Herbisitinin Makarnalık Buğdayda (*Triticum durum* Desf.) Çimlenme ve Fide Gelişimi Etkisi, 2. Ulusal Botanik Kongresi, 2015, Afyonkarahisar, Türkiye

Sebahattin Özcan, Emine Anayol, Ömer Karakoç, Allahbaksh Joiya, Selma Onarıcı, **Deniz Köm**, Muhammad Aasim, Sancar Fatih Özcan, Burak Öno, M. Çağrı Oğuz, Khalid Mahmood Khawar, Levent Ünlü., Toksik Cry Endotoksin Proteinlerinin Sınırlandırıldığı Böceklerle Dayanıklı ve Herbisite Toleranslı Transgenik Pamuk Hatlarının Geliştirilmesi, 11. Tarla Bitkileri Kongresi, 7-10 Eylül 2015 Çanakkale

Hussein A. Ahmed, Selma Onarıcı, Ömer Karakoç, **Deniz Köm**, Gülsüm Aydın, Güray Akdoğan, Levent Ünlü, Cengiz Sancak, Sebahattin Özcan., Hibrit Cry Geni Aktararak Coleoptera ve Lepidoptera Takımındaki Böceklerle Dayanıklı Transgenik Patates Hatlarının Geliştirilmesi, 11. Tarla Bitkileri Kongresi, 7-10 Eylül 2015 Çanakkale

Murat Aycan, Mustafa Kayan, Burak Öno, Çiğdem Yıldız, **Deniz Köm**, Mustafa Yıldız., Markör Destekli Seleksiyon Yöntemi ve Islah Çalışmalarında Kullanımı, 11. Tarla Bitkileri Kongresi, 7-10 Eylül 2015 Çanakkale

Aycan, M., Darçın, E. S., Kayan, M., Dünder, E., Yıldız, Ç., Yıldız, M., **Köm, D.**, Bitkilerde Tuz Stresine Karşı Moleküler Savunma Mekanizmaları ve Genler, 11. Tarla Bitkileri Kongresi, 2015, Çanakkale, Türkiye

Mustafa Kayan, Murat Aycan, Mustafa Yıldız, **Deniz Köm**, Burak Öno, Yusuf Koç., Bitkilerde Tuz Stresi ve Tuzluluğun Fotosentez Üzerine Etkisi, 11. Tarla Bitkileri Kongresi, 7-10 Eylül 2015 Çanakkale

## 10.2. Uluslararası Kongreler ve Bilimsel Toplantılarda Sunulan Bildiriler

Barpete S., Anayol E., Ahmed HA., Özcan SF., **Köm D.**, Delpasand S., Aasim M., Khawar KM and Özcan S (2013): Optimization of in-vitro culture condition for genetic transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L) at International Plant Breeding Congress (IPBC), Antalya Turkey on November 10-14, 2013.

Murat AYCAN, Mustafa KAYAN, Selcen DARÇIN, **Deniz KÖM**, Mustafa YILDIZ: Shoot Regeneration from Hypocotyl Explants of Flax (*Linum usitatissimum* L.) on Hormone-Free Growth Medium : at 3rd International Molecular Biology and Biotechnology Congress, Sarajevo- Bosnia and Herzegovina on June 2-6, 2014

Emine ANAYOL, Ömer KARAKOÇ, **Deniz KÖM**, Allahbakhsh JOIYA, Surendra BARPETA, SELMA ONARICI, Saber Delpasand KHABBAZI, Sancar Fatih ÖZCAN, Muhammet Çağrı OĞUZ, Muhammad AASIM, Levent ÜNLÜ, Sebahattin ÖZCAN., Yaralanmayla aktif olan AoPR1 promotörünün kontrolü altında Cry1Ac geninin aktarıldığı transgenik pamuk elde edilmesi ve gereksiz toksik cry protein üretiminin engellenmesi at International Mesopotamia Agriculture Congress, Diyarbakır on 22-25 September, 2014

Hussein Abdullah AHMED, Selma ONARICI, Ömer KARAKOÇ, **Deniz KÖM**, Gülsüm AYDIN, Levent ÜNLÜ, Sebahattin ÖZCAN: Gıda amaçlı kullanım potansiyeli daha yüksek olan böceklere dayanıklı transgenik patates elde edilmesi at International Mesopotamia Agriculture Congress, Diyarbakır on 22-25 September, 2014

AKDOGAN GÜRAY, ÜNVER TURGAY, TÜRKTAŞ MINE, DERELLI TÜFEKÇİ EBRU, GÜRKÖK TUGBA, ÖZDEMİR BAYRAM, ÇIKILI YAKUP, **KÖM DENİZ**, ÖZCAN SANCAR FATİH, BABAĞLU GÜNSELİ, İPEK ARIF (2016). Transcriptomic and metabolic responses of bread wheat against heat and drought stress. 2nd General Meeting of COST Action FA1306 The quest for tolerant varieties – Phenotyping at plant and cellular level, 13-13. 2016 (Sözlü Bildiri)(Yayın No:2837546)

### 10.3. Uluslararası Hakemli Dergilerde Yayımlanan Makaleler

Anayol, E., Bakhsh, A., Karakoç, Ö. C., Onarıcı, S., **Köm, D.**, Aasim, M., Özcan, F., Barpete, S., Khabbazi D, S., Önel, B., Sancak, C., Khawar, Khalid M., Ünlü, L., Özcan, S. (2016). Towards better insect management strategy: restriction of insecticidal gene expression to biting sites in transgenic cotton. *Plant Biotechnology Reports*, 10(2), 83–94. <http://doi.org/10.1007/s11816-016-0388-5>

