

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

---

**1BL.1RS Translokasyonuna Sahip Mv179 Ekmeklik Buğday  
Hattının 1RS Kromozom Kolunun Sekanslanması ve 1RS  
Kromozom Kolu için DNA Markörlerinin Geliştirilmesi**

---

**Mehmet Alper GÖKÇE**

*Biyoteknoloji Anabilim Dalı*  
Aralık, 2025

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZ ONAYI

**1BL.1RS Translokasyonuna Sahip Mv179 Ekmeklik Buğday  
Hattının 1RS Kromozom Kolunun Sekanslanması ve 1RS  
Kromozom Kolu için DNA Markörlerinin Geliştirilmesi**

**Mehmet Alper GÖKÇE**

*Biyoteknoloji Anabilim Dalı*

Bu Doktora Tezi 05/12/2025 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Üyeleri Tarafından Değerlendirilmiş ve Oy Birliği ile Kabul Edilmiştir.

Jüri : Prof. Dr. Hakan ÖZKAN (Danışman) .....  
: Prof. Dr. Faruk TOKLU .....  
: Prof. Dr. Rüştü HATİPOĞLU .....  
: Prof. Dr. Tolga KARAKÖY .....  
: Doç. Dr. Uğur SESİZ .....

**Bu Tez Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalında Hazırlanmıştır.**

**Tez No:**

**Prof. Dr. Sadık DİNÇER**  
Enstitü Müdürü

**Bu çalışma Ç.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinasyon Birimi Tarafından Desteklenmiştir.  
Proje No: FDK-2022-15063**

**Not:** Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir

## İÇİNDEKİLER

|                                                                                                     |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Öz.....                                                                                             | I   |
| ABSTRACT.....                                                                                       | II  |
| TEŞEKKÜR.....                                                                                       | III |
| ÇİZELGELER DİZİNİ .....                                                                             | IV  |
| ŞEKİLLER DİZİNİ.....                                                                                | V   |
| SİMGELER VE KISALTMALAR.....                                                                        | VII |
| 1. GİRİŞ .....                                                                                      | 1   |
| 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....                                                                           | 5   |
| 2.1. Çavdar Kromatininin Buğdaya Transferi.....                                                     | 6   |
| 2.2. Buğdayda Biyotik Streslere Karşı Direnç Kaynağı Olarak Çavdar .....                            | 8   |
| 2.2.1. Hastalıklara Karşı Direnç .....                                                              | 9   |
| 2.2.2. Zararlılara Karşı Direnç.....                                                                | 10  |
| 2.3. Abiyotik Faktörlere Karşı Dayanıklılık .....                                                   | 12  |
| 2.4. Tarımsal Özellikler Üzerine Etkisi.....                                                        | 12  |
| 2.5. 1BL.1RS Translokasyonunun Ekmeklik Kalite Özellikleri Üzerindeki Etkileri .....                | 13  |
| 2.5.1. Nişasta ve $\alpha$ -amilaz Aktivitesi.....                                                  | 14  |
| 2.5.2. Nişasta Dışı Polisakkaritler ve Diyet Lifı .....                                             | 14  |
| 2.5.3. Dane Sertliği .....                                                                          | 15  |
| 2.5.4. Lipitler .....                                                                               | 16  |
| 2.6. Çavdar Genomunun Dizilenmesi .....                                                             | 16  |
| 2.7. Çavdar İntrogresyonlarının Yüksek Verimli ve Yüksek Çözünürlüklü Tespit<br>Teknolojileri ..... | 19  |
| 2.8. Geleceğe Yönelik Perspektifler.....                                                            | 19  |
| 2.9. Çavdar Translokasyonları Konusunda Yapılan Çalışmalar .....                                    | 21  |
| 3. MATERYAL VE METOD .....                                                                          | 25  |
| 3.1. Bitki Materyali .....                                                                          | 25  |
| 3.2. DNA Sekans Verisi ve Biyoinformatik Çalışmalar .....                                           | 26  |
| 3.2.1. Ham Sekans Verisinin Kalite Analizi ve Filtrelenmesi .....                                   | 27  |
| 3.2.2. K-mer Analizi .....                                                                          | 28  |
| 3.2.3. De novo Birleştirme (De novo assembly).....                                                  | 28  |
| 3.2.4. De novo Birleştirme Kalitesinin Değerlendirilmesi.....                                       | 28  |
| 3.2.5. Tekrarlayan Dizilerin Kümeleme Analizi.....                                                  | 28  |
| 3.2.6. Tekrarlayan Dizilerin "De novo" Tanımlanması .....                                           | 29  |
| 3.2.7. NLR Genlerinin Tanımlanması ve Filogenetik Analizi .....                                     | 30  |
| 3.2.7. Mv179 1BL.1RS Kromozomunun Homoloji Tabanlı Karşılaştırma Analizleri ..                      | 31  |

|                                                                                                                            |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.2.8. Sekansın Çavdar ( <i>Secale cereale</i> ) Referansına Hizalanması ve Varyant Analizi                                | 31  |
| 3.2.9. Varyantların Anotasyonu .....                                                                                       | 32  |
| 3.3. InDEL Markör Analizi .....                                                                                            | 33  |
| 3.3.1. Yaprak Örneklerinin Alınması ve DNA İzolasyonu .....                                                                | 33  |
| 3.3.2. DNA Miktarının ve Kalitesinin Belirlenmesi .....                                                                    | 37  |
| 3.3.3. PCR Optimizasyon Çalışmaları .....                                                                                  | 37  |
| 3.3.4. Genotiplerin InDel Markörleri ile Taranması .....                                                                   | 38  |
| 3.4. Genetik Çeşitlilik Analizleri .....                                                                                   | 39  |
| 4. BULGULAR VE TARTIŞMA .....                                                                                              | 41  |
| 4.1. DNA Sekans Verisi ve Biyoinformatik Çalışmalar .....                                                                  | 41  |
| 4.1.1. Mv179 1BL.1RS Sekansının De novo Birleştirilmesi(De novo Assembly) ve Kalitesinin Değerlendirilmesi .....           | 42  |
| 4.1.2. Mv179 1BL1RS Kromozomal Bölgesinde Tekrarlayan DNA Yapısının Karakterizasyonu .....                                 | 44  |
| 4.1.3. NLR Genlerinin Tanımlanması ve Filogenetik Analizi .....                                                            | 51  |
| 4.1.4. Mv179 1BL1RS Kromozomunun Homoloji Tabanlı Karşılaştırma Analizleri ...                                             | 53  |
| 4.1.5. Sekansın Çavdar ( <i>Secale cereale</i> ) Referansına Hizalanması, Varyant Analizi ve Varyantların Anotasyonu ..... | 63  |
| 4.2. InDel Primerlerinin Geliştirilmesi ve Genetik Çeşitlilik Analizleri .....                                             | 75  |
| 4.2.1. InDel Primerlerinin Validasyonu .....                                                                               | 75  |
| 4.2.2. Genetik Çeşitlilik ve Filogenetik Analiz .....                                                                      | 80  |
| 4.2.3. InDel Markörlerinin Polimorfizmlerinin Değerlendirilmesi .....                                                      | 84  |
| 5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER .....                                                                                              | 89  |
| KAYNAKLAR .....                                                                                                            | 93  |
| ÖZGEÇMİŞ .....                                                                                                             | 109 |

---

**1BL.1RS Translokasyonuna Sahip Mv179 Ekmeklik Buğday  
Hattının 1RS Kromozom Kolunun Sekanslanması ve 1RS  
Kromozom Kolu için DNA Markörlerinin Geliştirilmesi**

---

Mehmet Alper GÖKÇE

*Danışman: Prof. Dr. Hakan ÖZKAN*

*Biyoteknoloji Anabilim Dalı*

**Öz**

Çavdar (*Secale cereale* L.) 1RS kromozom kolu, ekmeklik buğdayda (*Triticum aestivum* L.) hastalık dayanımı, verim ve stres toleransı açısından önemli bir gen kaynağıdır. Bundan dolayı bu çalışmanın amacı, Kriszta çavdar çeşidi kökenli 1BL.1RS translokasyonuna sahip Mv179 ekmeklik buğday hattının 1RS kromozom kolunu sekanslamak, bu bölgeyi buğday ve çavdar genomlarıyla karşılaştırmak ve 1RS koluna özgü DNA markörleri geliştirmektir.

Bu kapsamda Mv179 1BL.1RS kromozomu "*de novo*" sekans birleştirme (*de novo assembly*), tekrar analizi, homoloji karşılaştırmaları, varyant çağırımı ve fonksiyonel anotasyon basamaklarını içeren bütüncül bir yaklaşımla ayrıntılı olarak karakterize edilmiştir. Elde edilen bulgular, 1RS kısa kolunun yüksek oranda LTR retrotranspozon içeren heterokromatik yapısını koruduğunu ve *Ty3/Gypsy* ile *Ty1/Copia* süper ailelerinin bu bölgede baskın olduğunu göstermiştir. Homoloji ve anotasyon analizleri, 1BL.1RS kromozomunda hem buğday 1B hem de çavdar 1R kromozomlarından taşınan, metabolik süreçler, sinyal iletimi, stres yanıtı ve savunma mekanizmalarıyla ilişkili geniş bir gen repertuarının yer aldığını ortaya koymuştur.

NLR genlerinin filogenetik analizi, Mv179 1BL.1RS kromozomunun 1 RS bölgesindeki birçok genin çavdar NLR genlerine ve bilinen dayanıklılık genlerine (ör. *Lr21*, *Pm2*, *Sr21*, *Lr34*, *Yr36*, *Pm21*, *Sr35*, *Sr50*) filogenetik olarak yakın konumlandığını göstermiştir. Bu sonuç, 1RS kolunda yeni dayanıklılık allellerinin bulunabileceğini göstermiştir. Mv179 1RS bölgesine özgü varyantlara dayanarak geliştirilen 30 adet InDel primeri çiftinin 24'ü güvenilir bulunmuş, bu markörlerin 18'i genetik çeşitliliği belirlemede ve 6'sı yalnızca 1BL.1RS translokasyonunun doğrulanmasında etkili olduğu belirlenmiştir.

Sonuç olarak, bu çalışma ile 1RS kromozomunun sekans bilgisi elde edilmiş, bu bölgenin abiyotik ve biyotik stres faktörleri karşısında buğday ıslahında kullanılabilirliği değerlendirilmiş ve bu gen kaynağının ekmeklik buğday ıslahı programlarında hızlı ve etkin biçimde değerlendirilmesi gerektiği sonucuna varılmıştır.

**Anahtar kelimeler:** Buğday, sekans, markör, translokasyon, çavdar

---

**Sequencing of the 1RS Chromosome Arm of the Mv179  
Bread Wheat Line Carrying the 1BL.1RS Translocation and  
Development of DNA Markers for the 1RS Chromosome  
Arm**

---

**Mehmet Alper GÖKÇE**

*Advisor: Prof. Dr. Hakan ÖZKAN*

*Department of Biotechnology*

**ABSTRACT**

The 1RS chromosome arm of rye (*Secale cereale* L.) is an important genetic source for improving disease resistance, yield, and stress tolerance in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). The aim of this study was to sequence the 1RS chromosome arm of the bread wheat line Mv179, which carries a Kriszta rye-derived 1BL.1RS translocation, to compare this region with wheat and rye genomes, and to develop DNA markers specific to the 1RS arm.

In this context, the Mv179 1BL.1RS chromosome was comprehensively characterized through an integrated approach including de novo sequence assembly, repeat analysis, homology comparison, variant calling, and functional annotation. The results revealed that the 1RS short arm retained its heterochromatic structure, rich in LTR retrotransposons, with the Ty3/Gypsy and Ty1/Copia superfamilies being predominant in this region. Homology and annotation analyses showed that the 1BL.1RS chromosome contained a wide repertoire of genes originating from both wheat 1B and rye 1R chromosomes, associated with metabolic processes, signal transduction, stress response, and defense mechanisms.

Phylogenetic analysis of NLR genes indicated that many genes from the Mv179 1RS region of the 1BL.1RS chromosome were closely related to rye NLR genes and known resistance genes (e.g., *Lr21*, *Pm2*, *Sr21*, *Lr34*, *Yr36*, *Pm21*, *Sr35*, *Sr50*), suggesting the presence of novel resistance alleles within the 1RS arm. Based on Mv179-specific variants, 30 InDel primer pairs were developed, 24 of which were validated as reliable markers. Among them, 18 were effective in detecting genetic diversity, while 6 were specific for confirming the presence of the 1BL.1RS translocation.

In conclusion, this study generated the sequence information of the 1RS chromosome, evaluated the potential use of this region in wheat breeding under abiotic and biotic stress factors, and demonstrated that this genetic resource should be rapidly and effectively utilized in bread wheat improvement programs.

**Keywords:** Wheat, sequence, marker, translocation, rye

## TEŞEKKÜR

Doktora çalışmam süresince bilgi ve tecrübeleriyle yolumu aydınlatan, teşvik eden, her zaman desteklerini yanımda hissettiğim danışman hocam Sayın Prof. Dr. Hakan ÖZKAN'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Hocamın rehberliği bilime bakışımın şekillenmesinde en önemli yol göstericim oldu.

Bilgi ve tecrübeleriyle hem eğitim hayatıma hem de kişisel gelişimime derin katkılar sunan; aynı zamanda tez jürimde yer alarak bu sürece değer katan saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Rüştü HATİPOĞLU, Prof. Dr. Faruk Toklu, Prof. Dr. Tolga Karaköy, Doç. Dr. Uğur SESİZ ve Dr. Öğr. Üyesi Esra ÇAKIR'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Doktora süreci boyunca her zaman yanımda olan, destekleriyle güç veren Operasyon Koordinatörüm Sayın Hasan Yener başta olmak üzere tüm ekip arkadaşlarıma ve Toros Tarım ailesine en içten teşekkür ve şükranlarımı sunarım.

Doktora süreci boyunca desteğini, güvenini ve inancını her zaman hissettiren, tanımaktan gurur duyduğum tüm yol arkadaşlarıma en içten teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca, hayatımın her döneminde koşulsuz destekleriyle yanımda olan, bana her zaman inanan ve güvenen sevgili babam Bülend GÖKÇE, annem Medine GÖKÇE, kardeşlerim Esra GÖKÇE ve Ahmet Ersin GÖKÇE'ye, sevgili dayım Hamdi ÇELİK başta olmak üzere tüm geniş aileme; varlıklarıyla güç verdikleri, sevgileriyle yolumu aydınlattıkları için sonsuz teşekkür ve şükranlarımı sunarım.

Ayrıca bu Doktora tez çalışmasını BİDEB-2244 Üniversite-Sanayi iş birliği (Proje no: 119C136) kapsamında burslu olarak desteklediği için TÜBİTAK'a teşekkürlerimi sunarım.

## ÇİZELGELER DİZİNİ

|                                                                                                                                                       |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan Macaristan orijinli ekmeklik buğday hatları i ve tanımları .....                                                    | 25 |
| Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan çavdar ve tritikale koleksiyonunun listesi .....                                                                    | 34 |
| Çizelge 4.1. Mv179 1BL1RS kromozomuna ait de novo birleştirme istatistikleri .....                                                                    | 42 |
| Çizelge 4.2. BUSCO kalite analizlerinin karşılaştırılması .....                                                                                       | 43 |
| Çizelge 4.3. Mv179 1BL.1RS kromozomunda tekrarlayan elementlerin sınıflandırılması ve genomdaki oranı (RepeatExplorer2) .....                         | 46 |
| Çizelge 4.4. Mv179 1BL.1RS kromozomunda tekrarlayan elementlerin sınıflandırılması ve genomdaki oranı(RepeatModeler2).....                            | 49 |
| Çizelge 4.5. Ortolog grup küme sınıflarına ait dağılım .....                                                                                          | 57 |
| Çizelge 4.6. İncelenen Kalite metrikleri.....                                                                                                         | 64 |
| Çizelge 4.7. Anotasyon sonuçlarının genel istatistik sonuçları .....                                                                                  | 67 |
| Çizelge 4.8. Varyant tiplerinin sayısı ve oranı.....                                                                                                  | 67 |
| Çizelge 4.9. Varyantların etki derecelerinin sınıflandırması .....                                                                                    | 69 |
| Çizelge 4.10. Varyantların fonksiyonel etki türlerine göre sınıflandırması.....                                                                       | 70 |
| Çizelge 4.11. Varyantların bölgelere göre sınıflandırması .....                                                                                       | 71 |
| Çizelge 4.12. Varyantların baz değişim tiplerine göre sınıflandırılması .....                                                                         | 72 |
| Çizelge 4.13. Varyantların anotasyon türlerine göre sınıflandırılması .....                                                                           | 74 |
| Çizelge 4.14. Çalışmada kullanılan Indel primerlerinin listesi ve amplifikasyon bilgileri .....                                                       | 77 |
| Çizelge 4.15. Tasarlanan InDel primerlerinin genetik çeşitlilik analizi, translokasyon tespiti ve gen bölgesi ilişkisine göre sınıflandırılması ..... | 78 |
| Çizelge 4.16. Genetik Çeşitlilik Parametreleri.....                                                                                                   | 80 |
| Çizelge 4.17. Primerlerin markör performans parametre bulguları .....                                                                                 | 85 |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

|                                                                                                                                                                                                          |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 3.1. Mv179 T1BL.1RS translokasyon hattının geliştirilme sürecinin akış diyagramı ...                                                                                                               | 26 |
| Şekil 3.2. Çalışmada kullanılan iş akış şeması.....                                                                                                                                                      | 27 |
| Şekil 3.3. Hizalama, varyant çağırımı ve anotasyon işlemlerinin iş akış grafiği .....                                                                                                                    | 33 |
| Şekil 3.4. Genotiplerin ekilmesi ve genç yaprak örneklerinin toplanması.....                                                                                                                             | 35 |
| Şekil 3.5. Yapak örneklerinin öğütülmesi ve CTAB ve Kloroform basamakları.....                                                                                                                           | 36 |
| Şekil 3.6. DNA izolasyon aşamalarına ait görüntüler .....                                                                                                                                                | 37 |
| Şekil 3.7. DNA örneklerinin kantitatif miktarının ve kalitesinin belirlenmesi.....                                                                                                                       | 37 |
| Şekil 3.8. PCR Çalışmalarına ait görüntüler .....                                                                                                                                                        | 39 |
| Şekil 4.1. Mv179 1BL1RS kromozomunun flow sorting (Akış sitometrisiyle ayrıştırılmış 1BL1RS kromozomu) değerlendirmesi .....                                                                             | 41 |
| Şekil 4.2. Ham sekansların FastQC raporları.....                                                                                                                                                         | 41 |
| Şekil 4.3. Mv179 1BL1RS kromozomunun kapsama analizi .....                                                                                                                                               | 42 |
| Şekil 4.4. Mv179 1BL.1RS kromozomunda tekrarlayan elementlerin sınıflandırılması ve genomdaki oranına ait grafik .....                                                                                   | 46 |
| Şekil 4.5. NLR Genlerinin filogenetik ağacı(Yeşil: Dayanıklılık Genleri Kırmızı: Mv179 1BL1RS Sarı: Çavdar(Lo7) Mavi: Ekmeklik Buğday(IWGSC).....                                                        | 51 |
| Şekil 4.6. Karşılaştırma analizinin buğday 1B ve çavdar 1B kromozomlarına eşleşme oranlarına ait grafik.....                                                                                             | 53 |
| Şekil 4.7. Buğday ve çavdar dizi eşleşmelerinin bitskor grafiği .....                                                                                                                                    | 54 |
| Şekil 4.8. Buğday ve Çavdar dizi eşleşmelerinin benzerlik yüzdeleri .....                                                                                                                                | 55 |
| Şekil 4.9. E-değeri bazında hizalama anlamlılık karşılaştırılması .....                                                                                                                                  | 56 |
| Şekil 4.10. COG fonksiyon dağılım grafiği .....                                                                                                                                                          | 57 |
| Şekil 4.11. En sık bulunan 20 GO terimi .....                                                                                                                                                            | 59 |
| Şekil 4.12. En sık 20 KEGG yolağı .....                                                                                                                                                                  | 60 |
| Şekil 4.13. En sık 20 InterPro Domaini .....                                                                                                                                                             | 61 |
| Şekil 4.14. Kapsamanın(covrage) referans boyunca dağılımı .....                                                                                                                                          | 65 |
| Şekil 4.15. Hizalama kalitesinin referans boyunca dağılımı .....                                                                                                                                         | 65 |
| Şekil 4.16. Anotasyon sonuçlarının varyant tiplerine göre dağılım grafiği.....                                                                                                                           | 68 |
| Şekil 4.17. Anotasyon sonuçlarının varyant tiplerine göre dağılım grafiği.....                                                                                                                           | 70 |
| Şekil 4.18. PCR sonuçlarına ait bazı agaroz jel görüntüleri (1,2: Mv179 3: Mv9kr1(translokasyon içermeyen ekmeklik buğday çeşidi), 4: MvMagdalena 5,6,7,8,9: Çavdar çeşitleri M: 100 bp DNA Ladder)..... | 79 |
| Şekil 4.19. T101 primerine ait IGV(Integrative Genomics Viewer) görüntüsü.....                                                                                                                           | 79 |

|                                                                                                                                                                                                                        |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 4.20. Analiz edilen genotiplerin filogenetik ağacı (Kırmızı: Geçiş Formu Çavdar<br>Genotipleri Mavi: Mav179 ve Mv Magdalena Siyah: Kültür formu çavdar<br>çeşitleri Yeşil: Tritikale Mor: Ekmeklik Buğday) ..... | 81 |
| Şekil 4.21. PCoA(Principal Coordinate Analysis) grafiği (Kırmızı: Geçiş Formu Çavdar<br>Genotipleri Mavi: Mav179 ve Mv Magdalena Siyah: Çavdar çeşitleri Yeşil:<br>Tritikale Mor: Ekmeklik Buğday).....                | 83 |



## **SİMGELER VE KISALTMALAR**

|       |                                               |
|-------|-----------------------------------------------|
| CTAB  | : Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide            |
| EDTA  | : Etilen Diamin Tetra Asetik Asit             |
| GO    | : Onthology                                   |
| INDEL | : İnsersiyon/Delesyon                         |
| KEGG  | : Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes     |
| NLR   | : Nucleotide-binding site Leucine-rich repeat |
| PCR   | : Polimeraz Zincir Reaksiyon                  |
| PIC   | : Polymorphism Information Content            |
| PVP   | : Polivinil Prolidon                          |
| QTL   | : Quantitative Trait Loci                     |
| SnEff | : SNP Effect Predictor                        |
| SSR   | : Simple Sequence Repeat                      |
| SSR   | : Simple Sequence Repeat                      |
| TAE   | : Tris-Acetate-EDTA                           |
| VCF   | : Variant Call Format                         |

## 1. GİRİŞ

Buğday ‘Verimli Hilal’ olarak adlandırılan (Türkiye’nin Güneydoğusu, Irak, İran, Suriye, Filistin, İsrail ve Ürdün) bölgede ‘avcı toplayıcı’ şeklinde yaşayan bir grup insan tarafından yetiştirilmeye başlanmış ve yaklaşık 12 bin yıl önce ilk defa kültüre alınmıştır (Salamini ve ark., 2002). Tahıl türlerinin yabani ataları olan yabani buğdaylar (*Triticum urartu*, *T. boeoticum* ve *T. dicoccoides*), yabani arpa (*Hordeum spontaneum*) ve yabani çavdar (*Secale vavilovii*) “Verimli Hilal” bölgesinde dağılım göstermiştir (Salamini ve ark., 2002). Kültürü yapılan buğdaylar; diploid (*T. monococcum ssp. monococcum* (2n=14, AA)), tetraploid ((*T. turgidum ssp. dicoccoides* (2n=28, AABB) ve *T. timopheevii* (2n=28, AAGG)) ve hekzaploid (*T. aestivum* (2n=42, AABBDD)) olarak üç grup altında toplanır. Ekmeklik buğday yaklaşık 10 bin yıl önce insanlar tarafından kültüre alınmış, bugüne kadar yapılan seleksiyon ve ıslahın sonucunda günümüze kadar gelmiştir (Brown ve ark., 2009; Feldman ve Levy., 2012; Pont ve ark., 2019).

Çavdar (*Secale cereale* L.), ekmeklik buğday (*Triticum aestivum*) ıslahı için kullanılan önemli bir gen kaynağıdır. Çavdar genetik materyalinin buğday genomuna dahil edilmesi, bitki ıslahçıların yıllardır ilgi odağı olmuştur. Buğday ve çavdarın ilk melezleme girişimleri 1873 yılına dayanmasına rağmen, ilk başarılı tritikale (x *Triticosecale Wittmack*) melezi 1888 yılında Rimpau tarafından elde edilmiştir (Ammar ve ark., 2004). Buğday ıslahında en önemli ve yaygın olarak kullanılan ve çavdardan aktarılan gen kaynağı 1R kromozomunun kısa koludur (Szakács ve ark., 2020). 1920 ile 1930 arasında çavdarın 1R kromozomunun kısa kolu ile ekmeklik buğdayın 1B kromozomunun kısa kolunun translokasyona uğradığı tespit edilmiştir (Rabinovich., 1998). Bu translokasyon üzerinde yapılan sitogenetik incelemeler, bu translokasyondaki 1RS kromozomunun orijininin Alman çavdar çeşidi Petkus olduğunu göstermiştir (Schlegel ve Korzun, 1997; Szakács ve ark., 2020). Yapılan bilimsel çalışmalar, 1RS kromozom kolunun bazı pas hastalıklarına dayanıklılığı sağladığı, bunun dışında ekmeklik buğdayda yüksek dane verimi ve verim stabilitesi özelliklerini olumlu etkilediği rapor edilmiştir (Mettin ve ark., 1973; Rajaram ve ark., 1983; Carver ve Rayburn, 1994; Villareal ve ark., 1995; Barbeau ve ark., 2003). Ayrıca çavdarın 1RS kolunun ekmeklik buğdayda abiyotik strese koşullarına toleransını artırdığı bildirilmiştir (Ehdaie ve ark., 2003; Hoffman, 2008). Yukarıda ifade edilen nedenlerden dolayı 1BL.1RS translokasyonu buğday ıslahçıları tarafından yoğun olarak kullanılmaya başlanmıştır. 1BL.1RS translokasyonu buğday ıslahında yoğun kullanılmasına rağmen bu translokasyonun sadece Petkus çeşidinden elde edilmesi, bu translokasyondaki genetik çeşitliliği azaltmış bu durumda bu translokasyon bölgesi için – özellikle 1RS kolu - genetik tabanın daralmasına neden olmuştur (Lelley ve ark., 2004). Bu nedenle, yeni çavdar gen kaynakları kullanılarak farklı translokasyon hatlarının geliştirilmesine ve geliştirilen bu translokasyon hatlarının da buğday ıslahında kullanılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

Çavdar (*Secale cereal* L.) Poaceae familyasının Triticeae oymağında bulunan diploid (2n=14, RR) bir bitkidir (Bauer ve ark., 2017). Çavdarın yabani progenitörü hakkında farklı

araştırmacıların farklı görüşleri bulunmaktadır. Yaklaşık 12 bin yıl önce Verimli Hilal bölgesinde kültürü yapılan bitkilerin yetiştiği tarlalar içerisinde çavdarın yabani progenitörü olan tek yıllık yabani çavdar (*S. cereale* spp. *vavilovii*) bitkisinin yabancı ot olarak yetiştiği ve buradan kültür formunu kazandığı düşünülmektedir. Ayrıca kültür çavdarının yabani progenitörünün *S. ancestrale* veya *S. Sstrictum*' da olabileceği öne sürülmüştür (Frederiksen ve Petersen., 1998; Maraci ve ark., 2018; Schreiber ve ark., 2018) . Kültür çavdarının tam coğrafi kökeni bilinmemekle birlikte Güneybatı Asya olduğu düşünülmektedir. Abiyotik ve biyotik strese toleransı ile bilinen çavdar, ekstrem koşullar altında üstün bir yüksek verim potansiyeli sergilemektedir (Schlegel, 2016). Çavdar üretimi 20. yüzyılda dünya çapında azalmasına rağmen Kuzey ve Orta Avrupa'da özellikle diğer hububatların yetiştirilmesine uygun olmayan soğuk bölgelerinde uzun süredir önemli bir ürün olmuştur (Grabowski, 2011). Çavdar yabancı döllenen bir bitki olmasından dolayı kendine döllenen bitkilere göre tür içi çeşitliliği yüksektir (Schlegel, 2006). Kültür çavdar çeşitleri, diğer birçok tahıl ürünü gibi güçlü seleksiyon baskısı nedeniyle geniş bir genetik darboğaz yaşıyor olsa da yerel türlerde ve yabani formlarında genetik çeşitliliğin önemli bir kısmı korunmaktadır (Matos, 2001; Burger, 2006; Gailite, 2013; Targońska, 2016)

Çavdar (*Secale cereale* L.) kullanılarak elde edilmiş olan buğday-çavdar translokasyonları uzun bir zamandan beri buğday ıslahında hem biyotik hem de abiyotik stres faktörlerine dayanıklılık kaynağı olarak kullanılmaktadır. 1950'lerde çavdarın 1RS kromozom kolu ilk kez Alman çavdar çeşidi 'Petkus' çeşidinden melezleme yolu ile ekmeklik buğdaya aktarılmıştır (Mettin ve ark., 1973; Schlegel ve Korzun., 1997). Birçok hastalığa dayanıklılık geni (Yr9, Pm8, Lr26 ve Sr31) melezleme ıslahı ile ekmeklik buğdaya aktarılmıştır (Mago ve ark., 2005; Ren ve ark., 2009). 1RS kromozom kolunun hem buğdayın verim potansiyelini hem de çevresel adaptasyon kabiliyetini yükselttiği bildirilmiştir (Kumlay ve ark., 2003; Ren ve ark., 2012; Howell ve ark., 2014). Bu nedenle, 1BL.1RS çavdar-buğday translokasyonu buğday ıslah programlarında yoğun olarak kullanılmış ve halen kullanılmaya devam edilmektedir (Rabinovich, 1998). Şu anda, çavdar translokasyonu taşıyan buğday çeşitlerinin oranı ülkelere göre değişmekte olup bu oran bazı ülkelerde % 50'ye kadar ulaşmaktadır (Zhou ve ark., 2004; Landjeva ve ark., 2006).

1BL.1RS buğday-çavdar translokasyonu, buğday ıslahı için çok önemli olmasına rağmen bazı riskleri de taşımaktadır. Bu risklerden en önemlisi 1RS kaynağının sadece Petkus çavdar çeşidinden gelmesidir (Lelley ve ark., 2004). Diğer bir risk faktörü ise 1BL.1RS translokasyonunun secalinin proteinini - *Sec-1 lokusu tarafından kodlanan çavdar depo proteini* - taşımasıdır. Bu lokusu taşıdığından Glu-B3/Gli-B1 lokusunu taşımamakta ve bu durum da ekmeklik buğdayda ekmeklik kaliteyi olumsuz yönde etkilemektedir. Özellikle, secalin varlığı hamurun yapışkanlığını artırması nedeni ile tercih edilmemektedir (Howell ve ark., 2014). Günümüze kadar farklı ülkelerde farklı çavdar çeşitleri/genotipleri kullanılarak çavdar translokasyonları geliştirilmeye çalışılmış, bazılarında başarılı da olunmuştur. Ancak bunların hiç birisi Petkus'dan elde edilen 1BL.1RS buğday

– çavdar translokasyonu kadar başarılı olamamıştır (Ren ve ark., 2017). Bu nedenle, yeni çavdar gen kaynakları kullanılarak buğday – çavdar translokasyonlarının ivedilikle geliştirilmesi gerekmektedir.

Diploid yabani dağ çavdarı *Secale strictum* ((C. Presl) C. Presl (syn. *Secale montanum* Guss.)) *S. cereale*'nin yakın akrabasıdır. Çavdar ve buğday ıslahında kullanılacak önemli bir gen kaynağıdır. Kültür çavdarı ile karşılaştırıldığında, güçlü kardeşlenme kabiliyetine, soğuğa ve kuraklığa, ağır metal ve alüminyum streslerine, hastalıklara ve zararlılara daha dayanıklıdır (Culvenor ve ark., 1986; Lukaszewski ve ark., 2001; Bálint ve ark., 2002; Akgün ve Tosun, 2004; Moameri ve ark., 2019).

Macaristan’da 1960’lı yıllarda yapılan *S. cereale* cv. *Várda* x *S. strictum* ssp. *anatolicum* melezi ile iki çavdarın olumlu özelliklerinin bir araya getirilmesi hedeflenmiştir (Kotvics, 1970). Bu melezleme sonucu elde edilen ve tescil ettirilen çok yıllık çavdar (*S. cereanum*) çeşidi Kriszta’nın; abiyotik ve biyotik stress faktörlerine dayanıklı olduğu, aynı zamanda yüksek diyet lifi içeriğine sahip olduğu bildirilmiştir (Kruppa, 2001). Mendis ve Simsek (2014) buğday ve çavdardaki diyet liflerinin (DF) ana bileşeni olan arabinoksilan gibi nişasta içermeyen hücre duvarı polisakkaritlerinin çözünmeyen formlarının kanserojenlerin emilimini azalttığı için birçok sağlık yararı sağladığını, çözünür diyet liflerinin koroner kalp hastalığı ve tip II diyabet olasılığını azalttığı rapor etmişlerdir. Yukarıda ifade edilmeye çalışan nedenlerden dolayı çok yıllık çavdar çeşidi Kriszta’nın buğday ıslahında ivedilikle kullanılması gerekmektedir.

Rabanus-Wallace ve ark (2021) tarafından ilk kez kromozom boyutunda çavdar genomu (7.9 Gb) sekanslanmıştır. Aynı dönemde Li ve ark (2021) tarafından bir Çin çeşidi olan Weining çavdar genomunun %98.67’lik bölümü sekanslanmıştır. Elde edilen bulguların çavdar ıslahının yanı sıra buğday ıslahı için de önemli olduğu her iki çalışmada da rapor edilmiştir.

Flow kromozom sorting yöntemi hem özel bir kromozomun sekanslanması hem de o kromozom için DNA markörlerinin geliştirilmesinde kullanılan bir yöntemdir (Doležel ve ark., 2014; Vrána ve ark., 2016). Flow kromozom sorting yönteminin fasulye, buğday, çavdar, arpa, bezelye ve nohutta belirli kromozomlar için DNA moleküler markörlerin geliştirilmesinde kullanılabileceği bildirilmiştir.

Dünyanın birçok ülkesinde 1BL.1RS translokasyonunun kullanımına büyük ilgi olmasına rağmen bazı ülkelerde bu kullanım oldukça sınırlı kalmıştır. Örneğin, Yediay ve ark (2010) 107 adet Türkiye orijinli buğday çeşidi ve genotipini çavdar translokasyonu bakımından incelediklerinde, incelenen çeşit ve genotipler içinde sadece 3 adet çeşidin 1BL.1RS translokasyonunu taşıdığını diğerlerinin taşımadığını, 1BL.1RS buğday-çavdar translokasyonunun abiyotik ve biyotik stress faktörleri için iyi bir gen kaynağı olduğundan dolayı ülkemizde yapılmakta olan buğday ıslah programlarına entegre edilmesi gerektiğini bildirmişlerdir.

Çok yıllık çavdar (*S. cereanum*) çeşidi Kriszta hem abiyotik hem de biyotik stress faktörlerine dayanıklılığı, aynı zamanda yüksek diyet lifi içeriğine sahip olmasından dolayı son yıllarda buğday ıslahçılarının dikkatini çekmiştir. Özellikle Kriszta çeşidi kullanılarak ekmeklik

buğdayda translokasyonların geliştirilmesi buğday ıslahında genetik tabanın – özellikle mevcut çavdar translokasyonları için – genişletilmesine olanak sağlayacaktır. Szakács ve ark (2020) çavdar çeşidi Kriszta ve ekmeklik buğday çeşidi Mv9kr1'i melezledikten sonra, melezlerin 2 kez Mv9kr1 ile geri melezlenmesi ve daha sonra geri melezlerin 8 kez kendilemeleri sonucunda BC<sub>2</sub>F<sub>8</sub> kademesinde yeni 1BL.1RS translokasyonuna sahip 'Mv179' ekmeklik buğday hattını geliştirmişlerdir. 'Mv179' hattı, ebeveyn buğday genotipinden daha iyi başak morfolojisi özellikleri, çizgili pas ve yaprak pasına karşı direncin yanı sıra daha yüksek kardeşlenme kapasitesi, fertilite ve diyet lifi (arabynoxylan) içeriği sergilemiştir. Bundan dolayı yeni geliştirilen çavdar translokasyonunun mutlaka buğday ıslahında kullanılması gerektiğini bildirmişlerdir.

Bu çalışmanın amacı; (a) çok yıllık *Secale cereale* 'Kriszta' kökenli 1RS kolunu taşıyan, diğer bir ifadeyle 1BL.1RS translokasyona sahip Mv179 ekmeklik buğday hattına ait 1BL1RS kromozomal bölgenin dizilenmesi, (b) elde edilen sekans verilerinin referans çavdar genomları ile karşılaştırılması yoluyla 1RS bölgesine özgü InDel tabanlı DNA markörlerinin geliştirilmesi ve (c) geliştirilen markörlerin farklı coğrafi bölgelerden toplanmış yabani çavdar genotipleri ile kültüre alınmış çavdar çeşitlerinde doğrulanmasıdır.

## 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

İklim değişikliği, hızla artan dünya nüfusu ve küresel gıda güvenliği sorunu, bitki ıslahçıların yüksek verimli ve stres koşullarına dayanıklı bitki çeşitleri geliştirmeye zorlamaktadır (Suneja ve ark., 2019). Modern bitki ıslahı tekniklerinin artan kullanımı, dar genetik temellere olan bağımlılığı beraberinde getirmiş ve bu durum, kültüre alınmış bitkilerde önemli ölçüde genetik erozyona yol açmıştır (Frankel ve Soule, 1981). Sonuç olarak, genetik çeşitlilikteki bu azalma, tarım ürünlerinin hastalıklara, zararlılara ve çevresel stres faktörlerine karşı daha hassas hâle gelmesine neden olmuştur. Çeşitli araştırmacılar, kültüre alınmış bitkilerin yabani akrabalarının stres faktörlerine karşı daha yüksek direnç gösterdiğini ve bu türlerin bitki ıslah programlarında değerli kaynaklar olarak kullanılabileceğini vurgulamıştır (Richards ve ark., 2010).

Buğday verimi, çeşitli biyotik ve abiyotik stres faktörleri tarafından sınırlandırılmaktadır. Bu streslere karşı koymak amacıyla, bitki ıslahçıları sürekli olarak kültür buğdayının ve onun yabani akrabalarının sahip olduğu genetik çeşitliliği kullanarak yeni çeşitlere dayanıklılık/tolerans özellikleri kazandırmaya çalışmaktadır. Bu çabalarda en yaygın şekilde kullanılan buğday akrabalarından biri çavdardır (*Secale cereale* L.). Çavdarın kromozomları veya kromozom parçaları; buğdaya yedekli hatlar olarak veya translokasyon hatları aracılığıyla aktarılmıştır. Nitekim, yapılan çalışmalar 1R kromozomunun buğdayda verim artışına katkı sağladığını ortaya koymuştur (Villareal ve ark., 1998; Kim ve ark., 2004; Zhou ve ark., 2007).

Buğday ile çavdarın melezlenmesine yönelik ilk girişimler, 1873 yılında Stephen Wilson tarafından sunulan deneylere dayanmaktadır (Wilson, 1873). Her ne kadar Wilson sonuçlarını olumsuz olarak değerlendirmiş olsa da başarısızlığın uygunsuz yöntemlerden kaynaklanmış olabileceğini belirtmiştir. İlk stabil amfiploid tritikale (*Triticosecale* Wittmack), 1888 yılında Rimpau tarafından elde edilmiştir (Oettler, 2005). Bu gelişmeden sonra buğday-çavdar melezlerinin üretilmesine yönelik çabalar artmıştır. 20. yüzyılın başlarında kolhisin uygulamaları ve doku kültürü tekniklerinin geliştirilmesi tritikale elde edilmesini önemli ölçüde kolaylaştırmıştır (Audenaert ve ark., 2014). Tarihsel olarak, çavdar kromatinini buğdaya aktarmak amacıyla başlıca üç farklı çavdar kaynağı kullanılmıştır; bunlar genellikle (1B)1R yedekli hatları, 1BL.1RS ve 1AL.1RS translokasyon hatları şeklindedir. Bunlar arasında en eski ve en yaygın kullanılan kaynak Petkus çavdarı kökenli 1R kromozomudur. 1BL.1RS translokasyonuna sahip genotipler ilk olarak Almanya'da Riebesel tarafından, buğday ve çavdar arasında yapılan yoğun melezleme çalışmalarıyla geliştirilmiştir (Rabinovich, 1998). Petkus kökenli bu translokasyon, Batı Avrupa, Rusya, Meksika, Şili ve diğer ülkelerde tescil edilen buğday çeşitlerinin atası olmuştur. Ayrıca tritikaleden, çavdar kromatinini taşıyan buğday genotipleri geliştirmek mümkündür. Japonya, Almanya ve ABD'de geliştirilen diğer üç tarihi kaynak da bu yolla oluşturulmuştur (Rabinovic, 1988). 1960 ile 1990 yılları arasında, (1B)1R yedekli hatları veya 1BL.1RS ve 1AL.1RS translokasyonlarına sahip bir çok buğday çeşidi tescil edilmiştir. Uluslararası Mısır ve Buğday Islah Merkezi'nde (CIMMYT), 1990'lı

yıllarda geliştirilen buğday hatlarının %60'ı 1BL.1RS genotiplerinden oluştuğu rapor edilmiştir (Rabinovic, 1988). Çin'de ise, 1960-2000 yılları arasında tescil edilen buğday çeşitlerinin yaklaşık %40'ının 1B.1R translokasyonuna sahip olduğu ve yıllar içinde elde edilen verim artışlarının bir kısmının bu translokasyonlardan kaynaklandığı bildirilmiştir (Zhou ve ark., 2004). Schlegel (2014) yaptığı bir araştırmada, 2470 buğday çeşidi veya genotipinin çavdar translokasyonu içerdiğini bildirmiştir.

Uluslararası Yeni Bitki Çeşitlerini Koruma Birliği (UPOV) tarafından yayımlanan çeşit listelerine göre, örneğin Şili'de 2000–2013 yılları arasında tescil edilen ticari çeşitlerin %34'ü çavdar introgresyonu taşımaktadır (UPOV, 2013). Öte yandan, Rusya ve Avustralya gibi bazı UPOV ülkelerinde bu oran %1–2 seviyesindedir. ABD'de ise, *Journal of Plant Registrations* veri tabanına ve Schlegel (2014)'in bildirdiğine göre, çavdar kromatini taşıyan ticari buğday çeşitlerinin oranı yaklaşık %15'tir. Bu örnekler, çavdar introgresyonlarının günümüzde ülkeden ülkeye değişen önemini açıkça ortaya koymaktadır. Son yıllarda, özellikle Afrika, Kuzey Avrupa ve Çin'de buğdayda yaygın olarak görülen yeni kara pas ve sarı pas patotipleri nedeniyle, çavdarın dayanıklılık kaynağı olarak kullanımına olan ilgi yeniden artmıştır.

## 2.1. Çavdar Kromatininin Buğdaya Transferi

Buğday 'Verimli Hilal' olarak adlandırılan (Türkiye'nin Güneydoğusu, Irak, İran, Suriye, Filistin, İsrail ve Ürdün) bölgede 'avcı toplayıcı' şeklinde yaşayan bir grup insan tarafından yetiştirilmeye başlanmış ve yaklaşık 12 bin yıl önce ilk defa kültüre alınmıştır (Salamini ve ark., 2002). Tahıl türlerinin yabani ataları olan yabani buğdaylar (*Triticum urartu*, *T. boeoticum* ve *T. dicoccoides*) ve yabani arpa (*Hordeum spontaneum*) "Verimli Hilal" bölgesinde dağılım göstermektedir (Salamini ve ark., 2002). Kültürü yapılan buğdaylar; diploid (*T. monococcum* ssp. *monococcum* (2n=14, AA)), tetraploid ((*T. turgidum* ssp. *dicoccoides* (2n=28, AABB) ve *T. timopheevii* (2n=28, AAGG)) ve hekzaploid (*T. aestivum* (2n=42, AABBDD)) olarak üç grup altında toplanır. Ekmeklik buğday yaklaşık 10 bin yıl önce kültüre alınmış, bugüne kadar yapılan seleksiyon ve ıslahın sonucunda günümüze kadar gelmiştir (Brown ve ark., 2009; Feldman ve Levy., 2012; Pont ve ark., 2019).

Çavdar (*Secale cereal* L.) Poaceae familyasının Triticeae oymağında bulunan diploid (2n=14, RR) bir bitkidir (Bauer ve ark., 2017). Çavdarın yabani progenitörü hakkında farklı araştırmacılar tarafından farklı görüşler öne sürülmüştür. Yaklaşık 12 bin yıl önce Verimli Hilal bölgesinde kültürü yapılan bitkilerin yetiştiği tarlalar içerisinde çavdarın yabani progenitörü olan tek yıllık yabani çavdar (*S. cereale* ssp. *vavilovii*) bitkisinin yabancı ot olarak yetiştiği ve buradan kültür formunu kazandığı düşünülmektedir. Ayrıca kültür çavdarının yabani progenitörünün *S. ancestrale* veya *S. strictum*' da olabileceği öne sürülmüştür (Frederiksen ve Petersen, 1998; Maraci ve ark., 2018; Schreiber ve ark., 2018). Kültür çavdarının tam coğrafi kökeni bilinmemekle birlikte güneybatı Asya olduğu düşünülmektedir (Schlegel, 2016). Buğdayın 1, 2, 3, 5 ve 6 numaralı kromozom

grupları, çavdarın sırasıyla 1R, 2R, 3R, 5R ve 6R kromozomları ile esasen homologdur. Buğdayın 4 ve 7 numaralı kromozomları ise, çavdarın 4R ve 7R kromozom gruplarıyla kısmi karşılıklı homoloji göstermektedir (Bauer ve ark. 2017). Buğdayın allopoloid doğası, genomik yapısındaki değişikliklere karşı yüksek düzeyde tolerans göstermesini sağlamaktadır. Çavdar ve buğday arasındaki homolog eşleşme, çavdardan buğdaya tarımsal açıdan arzu edilen özelliklerin – belirli zararlılara ve hastalıklara karşı direnç, çeşitli abiyotik streslere tolerans gibi – aktarımını mümkün kılmıştır. Ayrıca buğdayın genetik tamponlama kapasitesi, genomunda önemli değişiklikler yapılmasına olanak sağlamış ve monozomik, telosentrik, delesyon ve nullizomik hatlar gibi çeşitli aneuploid materyallerin geliştirilmesine imkân tanımıştır. Bu bitki materyalleri, moleküler markörlerin ve genlerin fiziksel konumlarının belirlenmesi gibi genetik araştırmalarda önemli rol oynamıştır (Sourdille ve ark., 2004; Lukaszewski, 2015). Hedeflenen bir çavdar kromozomunun buğday genomuna aktarımı, uygun bir aneuploid buğday hattı seçilerek ve bu hattın çavdar ya da önceden geliştirilmiş bir amphiploid (bu durumda tritikale) ile melezlenmesi yoluyla gerçekleştirilmektedir. Yapılan çalışmalarda buğday–yabancı kromozom yedekli hatları, buğday–yabancı translokasyon hatlarının üretiminde sıklıkla köprü olarak kullanılmıştır (Jiang ve ark., 1994; Faris ve ark., 2003; Lukaszewski, 2015).

Translokasyon hatlarının elde edilmesinde bir diğer yöntem ise, buğday ve çavdar arasında spontan olarak meydana gelen translokasyonların geri kazanılmasıdır. Bu durum, kromozom kollarının sentromer bölgesinin kırılması ve tekrar kaynaşması ile gerçekleşmektedir. Mayozun metafaz I evresinde kromozomlar sentromer bölgelerinden kırılarak oluşan telosentrik yapılar ile farklı telosentrikler kromozomlar yeniden kaynaşarak kromozom segmentlerinin değişimini sağlamaktadır (Lukaszewski ve Gustafson, 1983; Jiang ve ark., 1994). Bir başka strateji ise, yedekli hatlarında homolog eşleşmenin olmaması durumunda radyasyon kullanarak rastgele translokasyonları indüklemektir. Ancak bu yöntem oldukça zahmetlidir ve birçok istenmeyen etkiye yol açabildiği bildirilmiştir (Jauhar ve Chibbar, 1999). Örneğin, 1AL.1RS translokasyonuna sahip Amigo adlı kışlık buğday çeşidi bu yöntemle geliştirilmiştir (Sebesta ve Wood, 1978). Ancak bu sentrik translokasyonun gerçekten radyasyonla mı oluştuğu konusunda bazı şüpheler bildirilmiştir (Lukaszewski, 2015).

Lapitan ve ark (1984) bildirdiği protokole göre buğday–çavdar melezlerinin embriyoları kullanılarak translokasyon hatları elde edilebilmektedir. Bu yöntemde, melez embriyolar yüksek oksin içeriğine sahip bir besiyerinde doku kültürüne alınarak kallus oluşumu teşvik edilmiştir. Elde edilen bitkiler, kolhisin uygulamasıyla kromozom sayısı iki katına çıkarılmıştır. Doku kültürü aşaması, kromozomal düzeyde çeşitli yapısal değişimlerin meydana gelmesini kolaylaştırmış ve bu da translokasyon hatlarının oluşumuna zemin hazırlamıştır. Bu teknikle elde edilen bitkilerde 4DL.1RS, 2BS.2RL ve 2BL.3RS gibi translokasyonlar başarıyla tanımlanmıştır (Lapitan ve ark., 1984; Friebe ve ark., 1990).



geninin bulunması durumunda, bu dirençlerin genetik aktarım sırasında bir blok halinde birlikte taşınabilmesidir. Bununla birlikte, eğer çavdar kromozomu istenmeyen agronomik özellikleri de içeriyorsa, bu durum dezavantaj oluşturmakta ve yabancı (alien) kromozom segmentlerinin uzunluğunun azaltılmasını zorunlu kılmaktadır.

### 2.2.1. Hastalıklara Karşı Direnç

Buğdaya aktarılan farklı çavdar kromozom parçalarının, yaprak pası (*Puccinia triticea* Erikss.), sarı pas (*Puccinia striiformis* var. *striiformis* Westend), kara pas (*Puccinia graminis* Pers. f. sp. *tritici* Erikss. and E. Henn.) ve külleme (*Blumeria graminis* [DC.] f. sp. *tritici* Em. Marchal) gibi önemli buğday hastalıklarına karşı direnç sağladığı rapor edilmiştir. 1960'lardan bu yana, çavdardan buğdaya direnç aktarımında en yaygın kullanılan kaynak Petkus çavdar çeşiti olmuştur. Bu kaynağa ait 1R kromozomu, buğdayın pek çok önemli hastalığına karşı direnç kazandırmıştır. Söz konusu kromozom, sırasıyla yaprak pası, sarı pas, kara pas ve külleme hastalıklarına karşı direnç sağlayan *Lr26*, *Yr9*, *Sr31* ve *Pm8* genlerini taşımaktadır. Ancak, bu genlerin patojen ırklarına özgü olması (ırk-spesifik direnç) nedeniyle, zamanla etkisini yitirmiştir. Bu bağlamda dikkat çekici bir istisna *Sr31* genidir. Petkus çavdar çeşidinden gelen bu gen, kara pasa karşı yaklaşık 30 yıl boyunca etkili kalmayı başarmıştır. Ne var ki, 1999 yılında Uganda'da bu genin etkisiz kaldığı ilk vaka bildirilmiş ve bu durum söz konusu genin dünya çapında çok sayıda çeşitte bulunması nedeniyle küresel buğday üretimi açısından ciddi bir tehdit oluşturmuştur (Pretorius ve ark., 2000; Singh ve ark., 2008).

Petkus çavdar çeşiti ve bu kaynaktan türeyen 1BL.1RS translokasyonuna sahip buğday çeşitlerinin (örneğin Kavkaz ve Veery) dışında da farklı çavdar kökenli 1R kromozomu kaynakları mevcuttur. Örneğin, Insave çavdar çeşidi, Amigo buğday çeşidinde 1AL.1RS translokasyonu olarak kullanılmıştır. Bu yapı, Sr1RSAmigo adıyla bilinen kara pasa direnç genini ve *Pm8* ile allelik olan *Pm17* külleme direnç genini taşımaktadır. Buna ek olarak, Imperial çavdar çeşidi, *Sr50* ya da *SrR* olarak bilinen güçlü bir kara pas direnç geninin kaynağıdır (Mago ve ark., 2002).

Çin'de ise çavdar kaynaklarından sarı pasa karşı yeni direnç genlerinin aktarılmasına yönelik son yıllarda yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Bu çalışmalarda, R12 olarak adlandırılan bodur (dwarf) çavdar hattından *YrR212* geçici isimli direnç geninin aktarıldığı, SW1862 hattından gelen 1BL.1RS translokasyonunun resesif sarı pas direnci sağladığı ve Aigan çavdar çeşidinin de henüz isimlendirilmemiş bir YR geni kazandırdığı bildirilmiştir (Luo ve ark., 2008). Yine Çin'de, Petkus kökenli olmakla birlikte *Yr9* ve *Pm8*'den farklı allellere sahip olan ve geçici olarak *YrCn17* ve *PmCn17* olarak adlandırılan direnç genlerini içeren 1RS taşıyan hat ve çeşitler geliştirilmiştir (Luo ve ark., 2008; Ren ve ark., 2009). Çavdarın yabancı döllen bir tür olması nedeniyle, aynı çeşit içinde bile allelik varyasyonların görülebileceği ifade edilmiştir (Ren ve ark., 2012).

1R kromozomu dışındaki çavdar kromozomlarında hastalık direnç allellerinin daha sınırlı sayıda olduğu bildirilmektedir. Bununla birlikte, 2R kromozomunda yaprak pası direnci sağlayan iki gen (*Lr25* ve *Lr45*) ile Ug99 dahil birçok kara pas ırkına karşı direnç sağlayan *Sr59* geni

tanımlanmıştır. Ayrıca, 2BS.2RL-SLU kaynaklı materyalin yaprak pası, kara pas ve külleme hastalıklarına karşı direnç sağladığı bildirilmiştir (Rahmatov ve ark., 2016).

2R kaynaklı introgresyonlarda, üç farklı külleme direnci daha tanımlanmış olup, bunlardan biri *Pm7* olarak isimlendirilmiştir. *Lr25* ve *Pm7* genlerinin her ikisinin de aynı çavdar kaynağı olan Rosen çeşidinden aktarıldığı belirtilmiştir (Friebe ve ark., 1996).

3R kromozomunda ise bugüne kadar yalnızca Imperial çavdar çeşidinden elde edilen *Sr27* geninin kara pasa karşı direnç sağladığı rapor edilmiştir (Marais ve Marais, 1994; Friebe ve ark., 1996). 4R ve 6R kromozomlarında ise sırasıyla Kustro ve Alman beyaz çavdarı kaynaklı külleme direnci olduğu; ayrıca 6R kromozomunda Prolific çavdar çeşidi kökenli *Pm20* geniyle tanımlanan bir külleme direnci daha bulunduğu bildirilmiştir (Friebe ve ark., 1996).

Rahmatov ve ark (2016a), farklı çavdar kaynaklarından elde edilen çok sayıda introgresyon hattını hem yazlık hem de kışlık buğday genetik materyalinde çeşitli virulent kara pas ırklarına karşı test etmiş ve bu hatlar arasında (1D)1R, (2D)2R ve (3D)3R yedekli veya translokasyon taşıyan bireylerin yeni direnç genlerini içerebileceği sonucuna varmışlardır. Aynı genotip seti daha sonra sarı pasa karşı da test edilmiş ve daha önce kullanılmamış tritikale kökenli çavdar materyallerinden umut verici direnç özellikleri elde edilmiştir (Rahmatov ve ark., 2016b).

Her ne kadar çavdar kromatininde direnç genleri bulunsun da bu genlerin her durumda ekspresyon göstermediği; bunun da buğday genomunda bulunan baskılayıcı (süpresör) faktörlerden kaynaklandığı bildirilmektedir. Hekzaploid buğdayın üç genomunda da yaprak pası direncini baskılayan genlerin varlığı rapor edilmiştir (Kolmer, 1996). Örneğin, *Pm8* külleme direnci geninin baskılanmasının, 1A kromozomunda yer alan *Pm3* allelleri ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. Başlangıçta bu baskılamının Gli-A1 ve Gli-A3 gliadin lokuslarından kaynaklandığı düşünülmüş; ancak daha sonra *Pm3* geninin klonlanması ve gliadin lokusu ile yakın bağlantılı olduğunun gösterilmesiyle, bu durumun aslında *Pm3*'e bağlı bir post-translasyonel süreç olduğu ortaya konmuştur (Hurni ve ark., 2014). Ayrıca *Pm8* geninin farklı ülkelerde farklı virülens/avirülens paternleri gösterdiği bildirilmiştir. Örneğin, Macaristan'da bu genin etkisiz olduğu, ancak Norveç'te Çin'e kıyasla daha etkili olduğu ifade edilmiştir (Purnhauser ve ark., 2011; Lu ve ark., 2012).

### 2.2.2. Zararlılara Karşı Direnç

Çavdardan buğdaya aktarılan genlerin buğdayın en önemli zararlılarından bazılarına karşı direnç sağladığı çeşitli araştırmalarla gösterilmiştir. Bu zararlılar arasında yaprak bitleri (*Schizaphis graminum* Rondani, *Diuraphis noxia* Mordvilko, *Rhopalosiphum padi* L. ve *Sitobion avenae* F.), gal sineği (*Mayetiola destructor* Say), nematodlar (*Heterodera avenae* Wollenweber ve *Heterodera filipjevi* Madzhidov Stelter) ve akar türü *Aceria tosichell* Keifer yer almaktadır.

Çavdardan buğdaya böceklerle karşı direnç aktarımıyla ilgili ilk çalışmalardan biri, *S. graminum*'un bazı biyotiplerine karşı etkili olan *Gb2* direnç geniyle gerçekleştirilmiştir. Bu gen, Insave çavdar çeşidinin 1RS kromozom kolunda yer almaktadır ve Amigo kışlık buğday çeşidinde

bulunmaktadır. *Gb2* geninin, *S. graminum*'un B, C ve J biyotiplerine karşı direnç sağladığı bildirilmiştir. Ancak, doğada *S. graminum*'un yüksek genetik çeşitlilik göstermesi nedeniyle bu direnç mekanizması zamanla etkisiz hâle gelmiştir. Daha sonra, yine Insave çavdar çeşidinin 1RS kromozom kolunda bulunan bir başka direnç geni olan *Gb6* tanımlanmıştır. Bu gen, E, G, I ve K biyotiplerine karşı da etkilidir. Özellikle E ve I biyotipleri, günümüzde ABD buğday üretim alanlarında en yaygın şekilde rastlanan biyotiplerdir ve diğer biyotiplere kıyasla daha fazla verim kaybına neden oldukları bildirilmektedir (Burd ve Porter, 2006; Lu ve ark., 2010; Weng ve ark., 2010).

Çavdardan buğdaya aktarılan böcek direncine ilişkin bir diğer önemli örnek, *Diuraphis noxia* zararlısına karşı direnç sağlayan *Dn7* genidir. Bu genin, Turkey 77 çavdar çeşidine ait 1RS kromozom kolundan köken aldığı bildirilmiştir. *D. noxia*, Amerika Birleşik Devletleri'nde ilk kez 1986 yılında tespit edilmiş ve 2003 yılına kadar yalnızca bir biyotip baskın olarak görülmüştür. Ancak 2003'te biyotip 2 olarak tanımlanan yeni bir varyant buğday üretim alanlarında ortaya çıkmıştır (Haley ve ark., 2004). Günümüze kadar tanımlanmış olan tüm *Dn* genleri arasında, yalnızca *Dn7* geni biyotip 2'ye karşı etkili bulunmuştur. Sonraki yıllarda *D. noxia*'nın birçok yeni biyotipi daha tanımlanmış olup, biyotip 3'e karşı buğdayda halen etkili bir direnç geni bulunmamaktadır (Burd ve Porter, 2006). Suriye'de yapılan çalışmalarda, *D. noxia*'ya karşı dayanıklılık bazı çavdar introgresyonlarında bulunmuş; bu introgresyonlar arasında (1D)1R, 3DL.3RS ve (5D)5R hatları yer almıştır. Ancak bu genetik bölgeler için henüz herhangi bir gen tanımı yapılmamıştır (Anderrson ve ark., 2015).

Sentromerik kırılma-kaynaşma mekanizması ve *Ph1* mutantlarının kullanımı, farklı çavdar kaynaklarından yedekli, translokasyon ve rekombinant hatların oluşturulması ve analiz edilmesi amacıyla kullanılmıştır. Bu çalışmalar, Pavon F76 çeşidi orijinli 61 farklı hat üzerinde yürütülmüştür. Bu hatlardan bazıları, özellikle tritikale kaynaklı Panda ve Presto çeşitlerine ait 1R veya 1RS taşıyan hatlar hem *Rhopalosiphum padi* hem de *Sitobion avenae* yaprak biti türlerine karşı fide döneminde direnç göstermiştir. Ancak, bu dirençlerin aynı çavdar geninden mi yoksa farklı genlerden mi kaynaklandığı henüz netlik kazanmamıştır. Amigo ekmeklik buğdayından türetilmiş bir 1RS taşıyan hattın, *S. avenae*'ye karşı hem erken hem de olgun bitki döneminde dirençli olduğu belirlenmiştir (Lukaszewski, 1993; Lukaszewski, 1997; Lukaszewski, 2000; Zhang ve ark., 2001; Lukaszewski ve ark., 2004; Lukaszewski, 2006; Lukaszewski, 2008)

Amigo buğday çeşidinde bulunan bir diğer çavdar kökenli gen olan *Cmc3*, 1AL.1RS translokasyonu içerisinde yer almakta olup, akar türü *Aceria tosichell*'e karşı direnç sağlamaktadır. Ayrıca, gal sineği (*Mayetiola destructor*)'ne karşı direnç 2RL ve 6RL kromozom segmentlerinde bulunmuş ve bu genler sırasıyla H21 ve H25 olarak adlandırılmıştır. *H. filipjevi* ve *H. avenae* nematodlarına karşı direnç ise 6R kaynaklı buğday hatlarında rapor edilmiştir (Crespo-Herrera ve ark., 2017).

### 2.3. Abiyotik Faktörlere Karşı Dayanıklılık

Translokasyon hattının 1RS kolu, buğdayın kuraklık stresine karşı dayanıklılığının artırılmasında fayda sağlamaktadır. Translokasyonun varlığı, kök uzunluğunda önemli bir artışa yol açar. Bu özellik, minerallerin ve suyun daha derin toprak katmanlarından daha verimli bir şekilde alınmasına yardımcı olur ve böylece kuraklık toleransını artırır (Liu ve ark., 2020). 1RS bölgesinin uç kısmındaki çavdar segmenti, kök biyokütlesini önemli ölçüde artıran kök özellikleri için dört QTL bölgesinden üçünü içermektedir (Sharma ve ark., 2018). 1RS.1BL translokasyon hatlarının performansı, özellikle büyüme hızı açısından, su kıtlığı koşullarında normal 1BL hatlara göre daha iyi bulunmuştur. Prolin içeriği de hem kuraklık stresinde hem de kontrol koşullarında translokasyon hattında daha yüksek bulunmuştur. Prolinin bitki stres toleransındaki rolü oldukça kritiktir. Reaktif oksijen türlerini ortadan kaldırarak ve moleküler bir şaperon olarak enzim aktivitelerini destekleyerek etki gösterir (Hoffman, 2008). İran'da kuru tarım alanlarında yetiştirilen buğday hatlarının 1RS.1BL translokasyonu taşıması, onların kuraklık stresine dayanıklılığının aktarılan çavdar genlerinden kaynaklandığını göstermektedir (Golkari ve Hasaniani, 2017).

### 2.4. Tarımsal Özellikler Üzerine Etkisi

1RS.1BL translokasyonunun varlığı, verimde dikkate değer bir artışa neden olmaktadır. Bu translokasyonu taşıyan hatlarda; başakçık başına tane sayısı, başak başına başakçık sayısı, olgunluk dönemindeki toprak üstü biyokütle, hektolitre ağırlığı ve bin tane ağırlığı gibi verimle ilişkili agronomik özelliklerin daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Moreno-Sevilla ve ark., 1995). Güncel çalışmalarda, söz konusu translokasyonun tane uzunluğunda da artışa yol açtığı ileri sürülmektedir. Ayrıca, çiçeklenme sonrası stres koşullarına karşı gösterilen toleransla birlikte gözlemlenen yüksek verim, tane ağırlığında da artış sağlamıştır (Moreno-Sevilla ve ark., 1995). Bununla birlikte, bazı araştırmalarda 1BL.1RS translokasyon hatlarının veriminde anlamlı bir artış tespit edilememiştir (Ren ve ark., 2017). Bu durum, ilgili özelliklerin yalnızca translokasyonun varlığına değil, aynı zamanda bulunduğu genetik arka plana da bağlı olduğunu göstermektedir (Ren ve ark., 2017). Farklı 1RS translokasyonları arasında yapılan karşılaştırmalarda ise 1RS.1BL hatlarının en yüksek verimi verdiği, buna karşılık 1RS.1DL hatlarının en düşük verime sahip olduğu bildirilmiştir. (Kumlay ve ark., 2003).

Ren ve ark (2009), yaptıkları bir araştırmada 1RS kromozom kolunda, buğday genetik arka planıyla etkileşime girerek tane doldurma evresinin ilerleyen dönemlerinde “stay-green” (yeşil kalma) özelliği oluşturan bir gen tanımlamıştır. Verim artışı, çiçeklenme sonrasında yaprak yaşlanmasının gecikmesi ve bunun sonucunda asimile edilen karbonun tane dokularına taşınmasının ertelenmesi ile ilişkilendirilmiştir.

## 2.5. 1BL.1RS Translokasyonunun Ekmeklik Kalite Özellikleri Üzerindeki Etkileri

Buğdayın ekmeklik kalitesi; genetik altyapı, çevresel koşullar ve tarımsal uygulamalar gibi çeşitli faktörlerin karmaşık etkileşiminden etkilenmektedir. Bu faktörler, özellikle tane protein konsantrasyonu ve protein bileşimlerinin düzenlenmesi yoluyla kalite üzerinde belirleyici rol oynadığı bildirilmiştir (Singh ve Khatkar, 2005). 1RS kromozom kolunun, 1RS.1BL translokasyon hatlarında protein içeriği üzerindeki etkisi oldukça çeşitlidir. Çavdarın kökenine ve buğday genetik arka planıyla olan etkileşimine bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Ren ve ark., 2012).

Bu translokasyonun en dikkat çekici olumsuz etkilerinden biri, ekmeklik kaliteyi belirgin şekilde düşürmesidir. Bu durum, çavdara özgü depo proteinlerini kodlayan Sec-1 lokusunun buğday genomuna introgresyonu ile ilişkilidir. Bu introgresyon, aynı zamanda gluteninleri kodlayan Glu-3 lokusu ile gliadinleri kodlayan Gli-1 lokusunun kaybına neden olmuştur. Sonuç olarak monomerik ve polimerik proteinler arasındaki denge bozulmuş, bu da genellikle hamurun zayıf yapısı ve yapışkanlığı şeklinde kendini göstermiştir (Oak ve Tamhankar, 2016). Gliadinler, ekmek hacmi potansiyeli ve hamur viskozitesi üzerinde etkili olurken; gluteninler, hamur gelişim süresi ve ekmek hacmini etkilemektedir. Ancak, hamur kalitesindeki düşüşün doğrudan çavdar kaynaklı secalinlerin varlığından mı, buğday glutenin ve gliadinlerinin yokluğundan mı, yoksa her ikisinin birleşiminden mi kaynaklandığını belirlemek zordur. Çünkü **Sec-1** lokusunun varlığı, **Gli-1** ve **Glu-3** lokuslarının yokluğu ile eş zamanlı olarak ortaya çıktığı bildirilmiştir (Blechl ve ark., 2016).

Yapılan çeşitli araştırmalar ekmeklik kalite açısından 1RS.1AL translokasyonunun olumsuz etkisinin, 1RS.1BL ve 1RS.1DL translokasyonlarına kıyasla daha düşük düzeyde olduğunu göstermiştir. Ayrıca glutenin seviyesindeki azalma, secalin varlığına bağlı azalma kadar belirgin değildir. Dolayısıyla hamur dayanıklılığındaki düşüş daha sınırlı kalmıştır (Sharma ve ark., 2018).

1RS.1BL translokasyonu, tane sertliği, hektolitre ağırlığı, sedimentasyon hacmi ve uzaya bilirlilik gibi kalite özelliklerini de olumsuz yönde etkilemiştir. 1R(1B) yedekli hatlarından elde edilen tanelerin, 1RS.1BL translokasyonunu taşıyan hatlara kıyasla daha yumuşak olduğu bildirilmiştir. Makarnalık buğdayda ise, 1RS.1BL translokasyonunun tane protein içeriği üzerinde anlamlı bir etkisi gözlenmemekle birlikte, gluten içeriğinde azalma, gluteninlerin şişme indeksinde düşüş ve mikro-SDS sedimentasyon hacminde azalma saptanmıştır (Moskal ve ark., 2020).

Çavdar genlerinin buğdaya aktarımı için çeşitli yöntemler yaygın biçimde kullanılmıştır. İlk yöntemler, buğday ve çavdara ait univalent kromozomların sentromer bölgelerinden kırılması ve sonrasında ilgili kromozom kollarının yer değiştirmesi ve kaynaşması esasına dayanmaktaydı (Graybosch, 2001). Daha sonrasında, Sec-1 lokusunun silinmesi yoluyla 1BL.1RS translokasyonunun manipülasyonu amacıyla radyasyon uygulamaları denenmiştir. Bu süreç sonucunda elde edilen rekombinant hatlar ya daha küçük 1RS segmentlerine sahip olmuş ya da değişen miktarda 1RS kromatini içermiştir. Ancak, bu yöntemlerin hiçbiri sorunun temelini, yani hamur kalitesindeki bozulmayı tam anlamıyla ortadan kaldıramamıştır. Hamur kalitesindeki bu olumsuzluğu gidermek amacıyla, çavdarın 1RS kromozom kolunun buğdayın grup 1

kromozomlarının kısa kollarıyla rekombinasyonunu sağlamak için *ph1* mutasyonları kullanılmıştır (Sarbarzeh ve ark., 2002).

### 2.5.1. Nişasta ve $\alpha$ -amilaz Aktivitesi

Buğdayın un kalitesi, nişastanın yapısal bileşimiyle, özellikle amiloz:amilopektin oranı ile yakından ilişkilidir. Düşük ya da sıfıra yakın amiloz içeriğine sahip unlar, kesit görünümündeki balmumuna benzerlik nedeniyle "waxy" (balmumu tipi) olarak tanımlanır. Waxy unlar, kompleks dallanmış yapıya sahip olan amilopektinin inter-moleküler çift bağlarla stabilize olmuş heliks yapıları oluşturma kapasitesinin düşük olması nedeniyle, yumuşak ve akışkan jeller oluşturur (Blazek ve Copeland, 2008). Waxy buğday ununun, normal unlarla yapılan karışımlarda, soğuma sürecinde çözünmeyen nişasta ağının oluşumunu baskıladığı gözlemlenmiştir (Morita ve ark., 2003). Sonuç olarak, düşük amiloz içeriği; daha yüksek su absorpsiyon kapasitesi (dolayısıyla daha yüksek şişme gücü), daha yüksek pik viskozite, daha düşük pik viskozite sıcaklığı, daha düşük son viskozite ve retrogradasyona karşı daha yüksek direnç ile ilişkilendirilir (Blazek ve Copeland, 2008). Bu özellikler, ürün kalitesi üzerinde çok yönlü etkiler oluşturmaktadır. Örneğin; daha iyi erişte dokusu (Morita ve ark., 2003), daha büyük ekmek hacmi, daha gözenekli iç yapı, gelişmiş iç yumuşaklığı ve daha yavaş bayatlama gibi olumlu sonuçlar elde edilmiştir (Morita ve ark., 2003). Pham ve ark. (2006) tarafından yapılan bir çalışmada nişasta özellikleri üzerinde amilaz içeriğinin etkileri viskozite gelişimi, su tutma kapasitesi ve termal özellikler açısından detaylı biçimde değerlendirilmiştir.

Çavdar kromozom segmentinin buğdaya aktarımı, nişasta bileşimi üzerinde anlamlı bir etki göstermemiştir. Bununla birlikte, çavdar kökenli örneklerde nişasta veriminde tutarlı bir azalma gözlenmiştir. Ayrıca, 60°C ve 80°C'de şişme gücünde azalma, 92°C'de 15 dakikalık bekletme sonrasında Brabender viskozitesinde düşüş, 1B.1R translokasyonu taşıyan buğdaylardan elde edilen nişasta için karakteristik özelliklerdir. Buna karşılık, 1B.1R translokasyonlu nişasta örneklerinin çözünürlüğü daha yüksek bulunmuştur. Çavdar kaynaklı buğday nişastası ile üretilen ekmeklerin doku puanlarının, kontrol ekmeklerinden daha iyi olduğu bildirilmiştir (Burnett, 1995).

### 2.5.2. Nişasta Dışı Polisakkaritler ve Diyet Lifi

Nişasta dışı polisakkaritler, özellikle yumuşak buğdayda (Bettge ve Morris, 2000) ve çavdarda (Peña, 2004) su tutma kapasitesi, ekmeklik kalite ve tane dokusu üzerinde önemli bir rol oynamaktadır (Bettge ve Morris, 2000; Peña, 2004). Bu gruptaki en güçlü etki, pentozan fraksiyonundan (arabinoksilanlar veya arabinogalaktanlar olarak da bilinir) kaynaklanmaktadır. Pentozanlar, oksidatif koşullar altında jel oluşturarak ekmek hacmi, iç doku özellikleri (crumb) ve bayatlama süreci gibi birçok hamur özelliğini etkilemektedir (Goesaert ve ark., 2005).

Pentozanlar, düşük düzeyde nişasta hasarı ve düşük protein kalitesi nedeniyle yumuşak buğday ve çavdar ürünlerinde belirgin bir rol oynamaktadır. Çavdarda pentozan içeriği; hamur

verimi, stabilitesi ve hacminin temel belirleyicisi olup, dolaylı olarak iç doku (crumb) yapısını ve ekmek hacmini etkilemektedir (Lorenz, 2000). Yumuşak buğdayda ise pentozan içeriği ve un protein miktarının, kurabiye çapındaki varyasyonun %87'sini açıkladığı bildirilmiştir (Bettge ve Morris, 2000).

Tahılın çözünür nişasta dışı polisakkarit içeriği, “diyet lifi” olarak tanımlanır ve bunun başlıca bileşenini çözünür arabinoksilanlar oluşturmaktadır (McGoverin ve ark., 2011). Arabinoksilan, buğday ve çavdar endosperm hücre duvarının temel bileşeni olup; öğütme sürecinde tanelerin davranışı, unun kalitesi, hamurun reolojik özellikleri ve ekmeğin kalitesi üzerinde önemli etkiler göstermektedir. Çavdar, buğdaya kıyasla daha yüksek toplam arabinoksilan içeriğine sahiptir (Morita ve ark., 2003).

Çavdarın translokasyonunun buğday hücre duvarı bileşimi üzerindeki etkisi, 1BL.1RS translokasyon genine sahip ve sahip olmayan 12 kışlık buğday örneğinde; ekstrakte edilebilir ve edilemez diyet lifi içeriği ile bileşimi, ayrıca nötral polisakkarit kalıntıları analiz edilerek incelenmiştir. Çavdar translokasyonu taşıyan ve taşımayan çeşitler arasında; ekstrakte edilebilir ksiloz kalıntıları, toplam ekstrakte edilebilir diyet lifi ve ekstrakte edilemeyen mannoz kalıntıları bakımından istatistiksel olarak anlamlı farklar bulunmuştur. Bununla birlikte, diğer diyet lifi bileşenleri açısından herhangi bir farklılık gözlenmemiştir. Ayrıca, Toronto çeşidinde ekstrakte edilebilir şeker kalıntısı miktarı, diğer translokasyon buğday çeşitlerinden daha düşük bulunmuştur (Selanere ve Andersson, 2002).

Endosperm hücre duvarındaki ekstrakte edilebilir arabinoksilanın daha ayrıntılı incelenmesi amacıyla; standart buğday, translokasyon buğdayı ve çavdar unları karşılaştırılmıştır. Bu üç unun kül içerikleri oldukça benzer bulunmuş, bu da endosperm hücre duvarı bileşimlerinin karşılaştırılmasına imkân tanımıştır. Bu unların diyet lifi analizleri hem ekstrakte edilebilir hem de ekstrakte edilemez ksiloz kalıntılarının (arabinoksilanı temsil eden) çavdar ve translokasyon buğdayında, standart buğdaya kıyasla daha yüksek olduğunu doğrulamıştır (Selanere ve Andersson, 2002).

### **2.5.3. Dane Sertliği**

Dane sertliği, pazarda buğday sınıflarını ayırt etmek için kullanılan en önemli tek özelliktir (Morris 2002). Bu özellik, su emilimi, zarar görmüş nişasta içeriği, diastatik aktivite, gaz tutma yeteneği, öğütme performansı ve fermantasyon kapasitesi üzerinde doğrudan bir etkiye sahiptir (Leon ve ark. 2007). Yumuşak buğdayın öğütülmesi daha kolaydır ve daha düzensiz şekillerde, daha küçük parçacık boyutuna sahip unlar elde edilir. Sert buğday unları ise, daha yüksek oranda zarar görmüş nişasta, daha kolay akışkanlık ve eleme sağlayan köşeli granüller içerir (Dendy ve Bogdan 2001). Dane sertliği, tanenin kırılmaya karşı gösterdiği direnç olarak tanımlanabilir (Anjum ve Walker, 1991). Sert buğday taneleri, büyük ve küçük nişasta granüllerinin içine gömülü olduğu kesintisiz bir protein matrisi ile karakterize edilir. Yumuşak buğdayda ise kesintisiz bir protein matrisi yoktur ve protein ile nişasta granülleri arasındaki yapışma zayıftır. Sertlik, buğdayın öğütme ve

fırıncılık özelliklerini ve dolayısıyla pazar değerini etkilemesi nedeniyle çok önemli bir tane özelliğidir (Pasha ve ark. 2010).

#### **2.5.4. Lipitler**

Lipitler, tahıllarda dane ağırlığının %2–5’ini oluşturan yağ fraksiyonudur (Chung ve Ohm, 2000). Lipitler; non-polar bileşenler, glikolipitler ve fosfolipitleri kapsar ve büyük ölçüde embriyoda yoğunlaşmıştır (Chung ve Ohm, 2000). Lipitler, amilozun helikal yapısıyla kompleksler oluşturur; bu nedenle amiloz içeriği genellikle lipit miktarı ile korelasyon gösterir (Goesaert ve ark., 2005). Dolayısıyla dane ağırlığında küçük bir orana sahip olmalarına rağmen lipitler, hamur özellikleri üzerinde önemli etkiler yaratabilmektedir. Düşük konsantrasyonlarda lipitler nişasta granüllerinin şişmesini sınırlar, protein ekstrakte edilebilirliğini azaltır ve ekmek hacmini düşürürken; yüksek konsantrasyonlarda ise gaz hücrelerinin stabilizasyonu yoluyla ekmek hacmini artırabilmektedir (Goesaert ve ark., 2005).

Yukarıda aktarılan literatür bulguları, buğday kalitesinin esasen depo proteinleri tarafından belirlendiğini göstermektedir. Herhangi bir buğday çeşidinin protein içeriği, ondan üretililecek nihai ürünün türünü belirlemektedir. Sert buğday unları yüksek protein içeriği ve ekmek yapımına elverişli elastik gluten yapısıyla güçlü iken; yumuşak buğday unları düşük protein içeriğine sahiptir ve daha çok bisküvi üretiminde kullanılmaktadır. Yüksek verim potansiyeline sahip çeşitlere yönelik eğilim uzun süredir devam etmekte olup, bu bağlamda 1BL.1RS translokasyonunun verimi artırma potansiyeli nedeniyle dünyanın birçok bölgesinde yaygın kullanımı söz konusudur. Ancak, glutenin kodlayan alt birimlerin kaybı nedeniyle bu translokasyon hatlarının kalite performansı geride kalmıştır (Oak ve Tamhankar, 2016). Ayrıca, bu translokasyon hatlarının kalite ile ilişkili sorunlarını gidermeye yönelik literatür oldukça sınırlıdır. Bu nedenle, doğrulanmış markörler kullanılarak 1BL.1RS rekombinant hatlarının geliştirilmesi, söz konusu kalite sorunlarının giderilmesinde umut vadeden bir yaklaşım olarak değerlendirilmektedir.

#### **2.6. Çavdar Genomunun Dizilenmesi**

Çavdarın buğday ıslahına sağladığı önemli faydalara karşın, genetik çeşitliliğin çözümlenmesi, genlerin tanımlanıp klonlanması, genetik mekanizmaların aydınlatılması ve ıslah çalışmalarının ilerletilmesi için kritik öneme sahip yüksek kaliteli bir referans genomunun bulunmaması, ilerlemeyi belirgin biçimde yavaşlatmıştır. Yaklaşık 7.9 Gb büyüklüğe sahip ve %90’dan fazlası tekrar dizilerinden oluşan genom yapısı ile çavdarın allogamiye (dış döllenmeye) bağımlı olması, referans düzeyde bir çavdar genomunun de novo olarak oluşturulmasını oldukça güç hale getirmektedir. İlk genomik çalışmalar kapsamında ifade edilen dizi etiketlerinden (EST) oluşan bir kütüphane geliştirilmiş ve bu çalışma Rye5K genotipleme dizisinin oluşturulmasına öncülük etmiştir (Haseneyer ve ark., 2011). 2013 yılında sanal bir gen sıralama haritasının yayımlanması, bu alandaki önemli bir dönüm noktası olarak kabul edilmiştir (Martis ve ark., 2013). 2017 yılında

yayımlanan ilk taslak genom ise, yaklaşık %35'lik bir kapsama oranı ile tahmin edilen genomun yaklaşık 2.8 Gb'lık bölümünü içermekte olup, muhtemelen gen bölgesinin büyük çoğunluğunu temsil ettiği düşünülmektedir. Bu gelişme, Rye600K genotipleme dizisinin geliştirilmesini mümkün kılmıştır (Bauer ve ark., 2017).

2021 yılında, çavdar genom çalışmaları alanında önemli bir ilerleme olarak, PacBio, Illumina ve Hi-C platformları kullanılarak iki yüksek kaliteli çavdar genomu sekanslamıştır (Rabanus-Wallace ve ark., 2021; Li ve ark., 2021). Kromozom ölçeğinde yapılan sekanslama, *Lo7* inbred hattı üzerinden gerçekleştirilmiş olup, bu çalışma aracılığıyla yapısal varyasyonlar (SV), stres toleransı genleri ve özellikle 1RS.1BL translokasyonu gibi kromozomal segmentlerin introgresyonu yoluyla çavdarın buğday ıslahındaki rolü hakkında önemli bilgiler elde edilmiştir (Rabanus-Wallace ve ark., 2021). Çin menşeli *Weining* çavdar çeşidi üzerine yapılan genom sekanslamasında ise transpozon kaynaklı genom genişlemesini ve çeşitli tarımsal özelliklerle ilişkili kilit genler ortaya koymuştur. Karşılaştırmalı genomik analizler sayesinde çavdarın evrimsel süreci ile buğday ve arpa ile olan sentenik ilişkileri izlenebilmiştir (Li ve ark., 2021). Buna ek olarak yabancı, yabancı ot (weedy) ve kültüre alınmış türleri temsil eden toplam 116 çavdar genotipine ait tüm genom yeniden dizileme (resequencing) çalışması sonucunda, kültüre alınmış çavdarın doğrudan yabancı türlerden değil, yabancı ot olarak yetişen çavdarlardan kültüre alındığı ortaya konmuştur (Sun ve ark., 2022).

Çavdar genomunun, özellikle 1R, 2R ve 3R kromozomları ile bu kromozomlara homolog olan buğday kromozomları arasında güçlü bir kolinearite (korelasyon) sergilediği bildirilmiştir (Rabanus-Wallace ve ark., 2021; Li ve ark., 2021). Ancak çavdar, megabaz büyüklüğündeki inversiyonlar ve translokasyonlar gibi daha büyük ölçekli yapısal varyasyonları (SV) da içeren kendine özgü genomik dinamikler sergilemektedir (Rabanus-Wallace ve ark., 2021; Li ve ark., 2021). Karşılaştırmalı tahıl genomik çalışmalarını mümkün kılan çavdar referans genomu, karmaşık özelliklerin genomik temellerinin aydınlatılmasında önemli bir rol oynamakta ve bu sayede gen keşfi ile fonksiyonel karakterizasyon süreçleri hızlandırılmaktadır. Ayrıca bu genom, genoma dayalı ıslah stratejilerinin geliştirilmesine olanak sağlayarak, buğdaya biyotik ve abiyotik stres toleransı, verim stabilitesi ve genel adaptasyon kazandıracak faydalı çavdar genlerinin tanımlanmasını kolaylaştırmaktadır (Han ve ark., 2025).

Özellikle, yakın zamanda yayımlanan çeşitli buğday genomları sayesinde 1RS kromozomu üzerine daha fazla bilgi elde edilmiş ve 1RS.1BL translokasyonunun buğday ıslahında yaygın olarak kullanılmasının genomik temelleri daha net biçimde ortaya konmuştur. Çavdar çeşitleri arasında ve kendi içlerinde gözlenen yüksek heterozigotluk dikkate alındığında, genomik varyasyonların bütüncül şekilde analiz edilmesi ve seçkin karmaşık özelliklerle ilişkili genlerin/lokusların çözülmesi amacıyla bir çavdar pan-genomu projesinin başlatılması önerilmektedir (Han ve ark., 2025).

*Lo7* ve *Weining* çavdar hatlarına ait yüksek kaliteli genom sekansları, 1RS kolu ile diğer Triticeae türlerinin homolog bölgeleri arasında anlamlı bir kolinearitenin bulunduğunu ortaya

koymuştur. 1RS kromozom kolunun gen bakımından zengin distal bölgeleri, özellikle stres toleransı ve hastalık direnciyle ilişkili fonksiyonel genler açısından, çeşitli Triticeae genomlarıyla kapsamlı bir kolinearite göstermektedir (Rabanus-Wallace ve ark., 2021; Li ve ark., 2021). Buna karşılık, sentromer çevresi (perisentromerik) bölgelerde gözlenen kolinearite düzeyinin düşük olması, büyük yapısal varyasyonlar (SV) ve baskılanmış rekombinasyon ile açıklanabilmektedir. Gerçekleştirilen genomik karşılaştırmalar, 1RS kolunun buğdayla yakın bir filogenetik ilişki içerisinde olduğunu da göstermiştir. Bu durum, 1RS kolunun buğday genomuna introgresyonu açısından yüksek bir genomik uyumluluğa sahip olduğunu ortaya koymaktadır (Rabanus-Wallace ve ark., 2021).

Buğday genotipleri üzerine yapılan güncel genomik çalışmalar, 1RS kromozomunun daha ayrıntılı bir şekilde karakterize edilmesini sağlamıştır. *Kenong 9204* buğday çeşidinde bulunan 1RS·1BL translokasyonu, patojen savunmasını artıran ATPaz inhibitör genleri de dâhil olmak üzere toplam 214 çavdara özgü geni içermektedir. Bu durum, söz konusu translokasyonun hastalık direnci bakımından buğday ıslahında yaygın olarak kullanılmasını desteklemektedir (Shi ve ark., 2022). 1RS·1BL translokasyonunu taşıyan *Aikang 58* çeşidine ait genom dizilemesi, buğdaydaki karşılıklarına kıyasla farklı transpozon kompozisyonu ve azalmış kromozomal etkileşimler ortaya koymuştur (Jia ve ark., 2023). Zhou8425B, Aikang 58, Kenong 9204, Lo7 ve Weining gibi farklı genetik arka planlara sahip hatlar arasında gerçekleştirilen karşılaştırmalı analizler, 1RS kollarının büyük ölçüde korunmuş yapılar sergilediğini; ancak inversiyonlar, translokasyonlar ve duplikasyonlar gibi karmaşık yeniden düzenlenmeler nedeniyle önemli farklılıklar barındırdığını göstermiştir (Li ve ark., 2025). Özellikle, *Zhou8425B* genotipinde bulunan 1RS kolunun, *Aikang 58* ve *Kenong 9204* gibi 1RS içeren buğday çeşitlerine, diploid çavdar hatları olan *Lo7* ve *Weining*'e göre daha geniş bir sentenik bölgeyle karşılık geldiği belirlenmiş ve bu durum, buğday genomuna taşınmış 1RS translokasyonlarının daha yüksek düzeyde korunmuş olabileceğini düşündürmüştür. Ayrıca, *Zhou8425B*'deki 1RS kolunun telomerik ucunda, yaklaşık 20.5 Mb uzunluğunda, diğer genom sekanslarında daha az miktarda bulunan satelit dizilerinden oluşan benzersiz bir kolinear olmayan fragment tespit edilmiştir (Li ve ark., 2025).

Yakın zamanda 17 buğday çeşidini kapsayan bir pan-genom çalışmasında, 1BL.1RS translokasyon bölgesinde buğday kromozomu 1BS ile karşılaştırıldığında sentenin kaybedildiği bölgeler(synteny-lost region) ve sentromerik lokuslara yakın yüksek okuma derinliğine sahip bölgeler dâhil olmak üzere önemli yapısal varyasyonlar (SV) tanımlanmıştır. Bu varyasyonların, introgresyon sonrası gerçekleşen genetik yeniden düzenlenmelerin (örneğin, insersiyonlar ve inversiyonlar) göstergesi olduğu düşünülmektedir. Ayrıca, 1RS·1BL translokasyonu içerisinde, özellikle 1RS kolunun terminal bölgesinde ve yaklaşık 20 Mb'lık bir fragmentte anlamlı düzeyde varlık/yokluk varyasyonları tespit edilmiştir. Gerçekleştirilen karşılaştırmalı analiz sonucunda 1RS kolları üç alt gruba ayrılmış ve bu yapı, 1RS'nin genetik çeşitliliği ile farklı ıslah programlarına uyum sağlayabilme kapasitesini yansıtmaktadır (Jiao ve ark., 2024). Bu kapsamlı bulgular, 1RS kolunun ıslah çalışmalarında daha etkin şekilde kullanılmasına yönelik değerli bilgiler sunmaktadır.

## 2.7. Çavdar İntrogresyonlarının Yüksek Verimli ve Yüksek Çözünürlüklü Tespit Teknolojileri

Çavdar kromatinlerinin buğday genetik yapısında izlenmesi ve karakterize edilmesi için etkin, doğru ve emek tasarrufu sağlayan teknolojilere ihtiyaç duyulmaktadır. Genomik *in situ* hibridizasyon (GISH) ve floresan *in situ* hibridizasyon (FISH) teknolojilerindeki ilerlemeler sayesinde çavdar kromatinlerinin tanımlanmasında önemli gelişmeler kaydedilmiştir; bu sayede yeni geliştirilmiş buğday–çavdar introgresyon hatlarında kromozomal yapının belirlenmesi mümkün hale gelmiştir (An ve ark., 2019; Han ve ark., 2024) Söz konusu teknolojiler aynı zamanda sentromerik bölgelerin yapısal ve fonksiyonel analizlerinde de başarıyla kullanılmıştır (Liu ve ark., 2024).

Ek olarak, oligonükleotid problemlerine dayanan denatürasyon gerektirmeyen floresan *in situ* hibridizasyon (ND-FISH) yöntemi sayesinde tespit süreci kolaylaştırılmış, zaman ve maliyet önemli ölçüde azaltılmıştır. Örneğin, çavdar da dâhil olmak üzere Triticeae türlerinin kromozom yeniden düzenlenmeleri ve poliploidizasyon olaylarını saptamak için yüksek verimli karyotipleme amacıyla etkili bir Oligo-FISH boyama sistemi kullanılmıştır (Li ve ark., 2020). Oligonükleotid problemlerine yönelik devam eden yenilikler, bireysel kromozomların ve özgül kromozomal segmentlerin ayırt edilmesini mümkün kılmakta ve bu sayede geniş ölçekli sitolojik tanımlamaları desteklemektedir (Fu ve ark., 2015; Xi ve ark., 2020).

DNA markör teknolojilerindeki ilerlemeler, tespit süreçlerinde verimliliği artırmıştır. Buğday genomu içerisinde çavdar kromatinini tespiti için çeşitli DNA markörleri geliştirilmiştir (Li ve ark., 2024). Özellikle yüksek verimli dizileme teknolojileri, polimorfizmlerin tespitinde çarpıcı bir genişleme sağlamıştır. Örneğin, özgül lokus amplifiye fragman dizilemesi (SLAF-seq) yöntemi, tüm çavdar kromozomlarını kapsayan çavdara özgü markör oluşturulmasına olanak tanımıştır (Han ve ark., 2020). Ayrıca, buğday ile çavdarı ayırt eden tek nükleotid polimorfizmine (SNP) dayalı Kompetitif alel-spesifik PCR (KASP) markörleri, çavdar kromatinlerinin buğday genetik yapısında yüksek verimle tespitini kolaylaştırmaktadır (Han ve ark., 2020).

Genomik ve dizileme teknolojilerindeki gelişmeler, çok sayıda markörün geliştirilmesini sağlayarak hassas introgresyon haritalaması ve hedefe yönelik seleksiyon süreçlerine katkı sunmuştur. Yüksek yoğunluklu SNP genotipleme dizileri, hexaploid buğday ve akrabalarında gen introgresyonlarının genotiplenmesi ve izlenmesini mümkün kılmakta olup, çavdar kromozomu 1RS translokasyonunu taşıyan örneklerin tanımlanmasında etkin rol oynamaktadır. Bu translokasyon, buğday 1B kromozomunun üzerinde kendine özgü bir haplotip sergilemektedir (Winfield ve ark., 2016). Genomik ve dizileme teknolojilerindeki sürekli ilerlemeler ışığında, çavdar kromatinini tespit yöntemlerinin daha da hassaslaştırılması ve yüksek verimliliğe kavuşturulması kaçınılmaz hale gelmiştir.

## 2.8. Geleceğe Yönelik Perspektifler

Çavdar, sahip olduğu geniş genetik çeşitlilik nedeniyle, buğday ıslahında uzun süredir önemli bir genetik kaynak olarak değerlendirilmiştir. Özellikle 1RS·1BL translokasyonunun dünya

genelinde yaygın bir şekilde kullanılmasıyla, çavdara ait genomik unsurların buğday genomuna başarılı biçimde aktarılabilirdiği gösterilmiştir. Bu durum, buğdayın yabancı akrabalarının ıslah sürecine katkı potansiyelini açıkça ortaya koymuştur. Buğday-çavdar introgresyon hatları aracılığıyla birçok yararlı özelliğin buğdaya kazandırıldığı bildirilmiştir. Kromozom mühendisliği, moleküler sitogenetik, fonksiyonel genomik ve modern ıslah teknolojilerinde yaşanan gelişmeler sayesinde, çavdar kökenli genlerin daha etkin bir biçimde kullanılabilmesine olanak sağlanmıştır. Ancak çavdarın buğday ıslahındaki tüm potansiyeli hâlen tam anlamıyla açığa çıkarılamamıştır. Bağlantı sürüklenmesi (Linkage drag), rekombinasyon baskılanması ve buğday ile çavdar arasındaki kompleks etkileşimler gibi sınırlayıcı unsurlar önemini korumaktadır (Han ve ark., 2025).

Büyük veri ve yapay zekâ destekli ıslah çağında, gelişmiş biyoteknolojik araçların ve çavdarın geniş genetik kaynaklarının bir arada kullanılması önerilmektedir. Germplazm materyalinin kapsamlı şekilde toplanması ve karakterize edilmesi için ileri düzey moleküler, sitolojik ve genomik yöntemlerin uygulanması hedeflenmektedir. Kromozom mühendisliği ve genom düzenleme teknolojilerinin, çavdar kaynaklarının yenilikçi uygulamalarının teşvik edilmesine katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Düşük maliyetli dizileme teknolojilerinin mutagenез temelli klonlama stratejileriyle birleştirilmesiyle, çavdardan değerli genlerin izole edilmesi ve seçkin allellerin tanımlanması mümkün kılınacaktır.

Kromozom mühendisliği, moleküler biyoloji ve çoklu omik dizileme yaklaşımlarının entegrasyonu ile çavdar kökenli genlerin buğday genetik tabanındaki düzenleyici mekanizmalarının ve işlevsel ağlarının derinlemesine çözümlenmesi mümkün olacaktır. Ayrıca, genotipik, fenotipik ve diğer yüksek boyutlu omik verilerin yapay zekâ tabanlı yöntemlerle analiz edilmesiyle hem temel araştırmalara hem de ıslah stratejilerine katkı sağlanabilecektir (Han ve ark., 2025).

Araştırma hızının artırılabilmesi ve genetik kaynaklar ile verilerin adil şekilde paylaşılabilmesi için uluslararası iş birliğinin sağlanması gerekmektedir. Çavdarın genetik kaynaklarının korunmasına, incelenmesine ve paylaşılmasına yönelik küresel girişimlerin, bu kaynakların etkin şekilde kullanılmasını destekleyeceği öngörülmektedir. Uluslararası iş birliğine dayalı bir çavdar pan-genom projesinin yürütülmesi durumunda, çavdara ait anahtar genotip ve fenotiplerin genetik temellerinin kapsamlı biçimde anlaşılması mümkün olabilecektir. Yüksek kaliteli genetik ve fenotipik verileri bir araya getiren küresel platformların oluşturulmasıyla, gen keşfi ve ıslah uygulamalarının kolaylaştırılması sağlanacaktır. Farklı çevresel koşullarda yürütülecek ortak arazi denemeleri sayesinde, çevreye özgü genetik adaptasyonlar belirlenebilecektir (Han ve ark., 2025).

Tüm bu kolektif çabalarla birlikte, çavdar germplazm kaynaklarının potansiyelinin en üst düzeye çıkarılması ve hedefe yönelik hassas ıslah uygulamalarının yönlendirilmesi sağlanabilecektir. Bu sayede, verimliliği artırılmış ve sürdürülebilir buğday çeşitlerinin geliştirilmesi mümkün olacaktır.

## 2.9. Çavdar Translokasyonları Konusunda Yapılan Çalışmalar

**Han ve ark (2020)** tarafından gerçekleştirilen çalışmada, *Imperial*, *German White*, *Jingzhouheimai*, *Baili* ve *Guyuan* olmak üzere beş çavdar çeşidi, SLAF-seq (specific-locus amplified fragment sequencing) yöntemiyle dizilenmiş ve geniş ölçekli çavdar-spesifik markörler geliştirilmiştir. SLAF-seq ve biyoinformatik analizler sonucunda, çavdarın 14 kromozom kolunun her biri için toplam 404 evrensel PCR-tabanlı markör ile tüm kolları kapsayan bir set KASP (Kompetitive allele-specific PCR) belirteci geliştirilmiş ve doğrulanmıştır. Geliştirilen markörler arasında, 1RS ve 2RL kromozom kollarına özgü iki KASP markörünün, doğal populasyonlarda 1RS translokasyonlarının ve buğday-çavdar türevi soylarında 2RL kromozom kollarının tespitinde başarıyla kullanıldığı, ayrıca bu kromozom segmentlerinin külleme hastalığına karşı yetişkin bitki döneminde direnç sağladığı belirlenmiştir. Çalışmada elde edilen 404 PCR-tabanlı markör ve 14 kromozom koluna özgü KASP markörü, çavdar kaynaklı genlerin buğday ıslahında kullanımını hızlandırabilecek potansiyele sahip bulunmuştur. Özellikle, KASP markörlerinin yüksek verimlilikte ve doğru şekilde buğday genomunda çavdar kromatini tespit edebildiği, bu nedenle markör destekli seleksiyon (MAS) çalışmalarında etkin biçimde kullanılabileceği ifade edilmiştir. Ayrıca, çavdar-spesifik PCR tabanlı markörlerin KASP markörlerine dönüştürülmesi stratejisinin, yüksek verimli ve düşük maliyetli bir yaklaşım olduğu; bu stratejinin, yabancı genlerin izlenmesinde ve diğer buğday akrabalıklarının incelenmesinde de kullanılabileceği vurgulanmıştır.

**Szakács ve ark. (2020)** tarafından yürütülen çalışmada Çin kökenli *Secale cereale* türüne ait 'Kriszta' hattı kaynaklı genetik temeli genişletilmiş bir 1BL.1RS translokasyon hattı geliştirilmiş ve detaylı moleküler ve fizyolojik analizlere tabi tutulmuştur. Elde edilen 'Mv179' numaralı hat, sarı pas ve kahverengi pas hastalıklarına karşı yüksek düzeyde direnç göstermiş; bununla birlikte başak morfolojisi, kardeşlenme kapasitesi, fertilité ve diyet lifi (arabinoksilan) içeriği gibi verimle ilişkili özellikler bakımından ebeveyn buğday genotipine kıyasla üstün performans sergilemiştir. Moleküler sitogenetik analizler ve SSR ile DArTseq markörlerine dayalı karşılaştırmalar sonucunda, '179' hattında bulunan 1RS kolunun, *S. cereale* ve *S. strictum* homologlarının bir rekombinantı olduğu belirlenmiştir. Bu kol üzerindeki lokusların yaklaşık %16'sının 'Petkus' kaynaklı 1RS kolundan farklı olduğu saptanmıştır. Çalışmada tespit edilen 1RS'ye özgü 162 markörden 112'si (%69.5) gen bölgeleriyle ilişkilendirilmiş; bunlar arasında 10 markörün, LRR domaini taşıyan ve hastalık direnciyle ilişkili olabileceği öngörülmüştür. Bu markörlerin büyük bir kısmının subtelomerik ve perisentromerik bölgelerde konumlandığı ifade edilmiştir. 'Mv179' hattının, hastalık direnci genlerinin haritaya dayalı klonlamasında önemli bir materyal olarak kullanılabileceği ve yüksek arabinoksilan içeriği sayesinde hem sağlıklı beslenmeye katkı sağlayabileceği, hem de ekonomik açıdan verimli bir buğday üretimini destekleyebileceği sonucuna varılmıştır.

**Rabanus-Wallace ve ark. (2021)** tarafından çavdarın ıslah potansiyelinin artırılması ve bu türün genetik kaynak olarak değerlendirilmesini kolaylaştırmak amacıyla gerçekleştirilen çalışmada; yaklaşık 7.9 gigabaz büyüklüğünde olan çavdar (*Secale cereale* L.) genomuna ait kromozom ölçekli

bir anotasyonlu genom dizisi oluşturulmuş ve bu genomun kalitesi, çok sayıda moleküler genetik kaynak yardımıyla kapsamlı şekilde doğrulanmıştır. Söz konusu genom dizisi, 'Lo7' hatlı saflaştırılmış çavdar hattı kullanılarak kısa okuma (short-read) tabanlı yöntemlerle elde edilmiş ve bu yeni genomik kaynağın potansiyeli, çavdarın yabani akrabalarından genetik olarak tam anlamıyla izole edilmemiş oluşunun ortaya konulması yoluyla gösterilmiştir. Ayrıca, stres toleransı ve polen fertilitesi ile ilişkili gen ailelerinin genomik organizasyonu ve yapısal karmaşıklığına dair ayrıntılı analizlere yer verilmiş, çavdarın hibrit ıslahındaki kullanılabilirliğine ve buğday ıslahında genetik kaynak olarak değerlendirilmesine ilişkin bazı avantaj-dezavantaj dengelerinin yönetilmesine olanak sağlayacak veriler sunulmuştur.

**Li ve ark. (2021)** tarafından yürütülen çalışmada; çavdarın (*Secale cereale* L.), gıda ve yem amacıyla değerlendirilmesinin yanı sıra, buğday ve tritikale ıslahında önemli bir genetik kaynak olması ve buğdaygiller (*Poaceae*) familyasında karşılaştırmalı genomik çalışmalarda vazgeçilmez bir materyal olarak kullanılması gibi çok yönlü değerine dikkat çekilmiştir. Bu kapsamda, Çin menşeli üstün nitelikli bir çavdar çeşidi olan Weining kullanılarak yüksek kaliteli bir genom dizilemesi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen genom dizisinin toplam uzunluğunun 7.74 Gb olduğu, bunun tahmini genom büyüklüğünün (%98.47) büyük kısmını kapsadığı ve dizilenmiş kontiglerin %93.67'sinin (yaklaşık 7.25 Gb) yedi kromozoma başarıyla yerleştirildiği bildirilmiştir. Dizide yer alan tekrar eden (repetitif) elementlerin, toplam genomun %90.31'ini oluşturduğu tespit edilmiştir. Önceki Triticeae genomlarıyla karşılaştırıldığında, *Daniela*, *Sumaya* ve *Sumana* retrotranspozonlarının çavdar genomunda belirgin düzeyde genişleme gösterdiği ortaya konmuştur. Weining genomunun detaylı analiziyle; tüm genom çapında gen duplikasyonlarına, bu duplikasyonların nişasta biyosentezinde görevli genler üzerindeki etkilerine, kompleks prolamin lokuslarının fiziksel organizasyonuna, erken başaklanma özelliğinin altında yatan gen ekspresyon kalıplarına ve çavdarda evcilleştirme ile ilişkili olduğu düşünülen kromozomal bölgeler ile aday lokuslara ilişkin yeni ve önemli bilgiler elde edilmiştir.

**Ren ve ark. (2022)** tarafından yürütülen çalışmada, dünya genelinde buğday üretimine önemli katkılar sağlayan ve Petkus çavdar çeşidi kökenli 1RS·1BL translokasyonlarının, özellikle hastalık direnci ve verim özellikleri bakımından öne çıktığı vurgulanmıştır. Ancak, 1RS kromozomu üzerinde yer alan direnç genlerinin, son yıllarda ortaya çıkan yeni patojen ırklarına karşı dirençlerini tamamen kaybettikleri belirtilmiştir. Bu bağlamda, doğal olarak yabancı döllenme gösteren ve buğday ile akraba olan çavdarın, 1RS varyasyonunu genişletme potansiyeli taşıdığı ifade edilmiştir. Bu amaç doğrultusunda, Çin yerel çavdar çeşidi Baili'den seçilmiş bir kendilenmiş hat olan BL1 ile buğday çeşidi Mianyang11'in melezlenmesi yoluyla üç yeni 1RS·1BL translokasyon hattı geliştirilmiştir. Geliştirilen bu üç yeni hat, Çin'de sarı pas hastalığının en şiddetli görüldüğü alanlarda yapılan tarla denemelerinde, en virülant ve sık rastlanan *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* patotiplerine karşı yüksek düzeyde direnç göstermiştir. Yeni translokasyon hatlarında 1RS kromozomu üzerinde konumlanan ve sarı pasa karşı direnç sağladığı belirlenen bir gen, geçici olarak *YrRt1054* olarak

adlandırılmıştır. Bu genin hem *Yr9* hem de *YrCn17* genlerine virülant olan *P. striiformis* patotiplerine karşı etkili direnç sağladığı bildirilmiştir. Söz konusu yeni direnç geninin, buğday ıslah programlarında doğrudan kullanım için uygun olduğu belirtilmiştir.

**Ji ve ark. (2024)** tarafından gerçekleştirilen çalışmada, uzak akrabalar arası melezleme yoluyla geliştirilen iki buğday-çavdar introgresyon hattı (SN21627-2 ve SN21627-6) detaylı şekilde karakterize edilmiştir. Genomik in situ hibridizasyon (GISH) analizi sonucunda, her iki hatta da yabancı kromozom segmentlerinin bulunmadığı belirlenmiş; ancak çok renkli floresan in situ hibridizasyon (mc-FISH) analiziyle her iki hatta da yapısal kromozom değişikliklerinin mevcut olduğu ortaya konmuştur. Fide ve olgun bitki dönemlerinde yapılan patojen testlerinde, SN21627-2 ve SN21627-6 hatlarının sarı pas (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*) ve külleme (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*) hastalıklarına karşı yüksek düzeyde direnç gösterdiği saptanmıştır. Her iki hatta ait genomik DNA, 86 adet PCR-tabanlı lokus-spesifik gen markörü ve 345 çavdar-spesifik SLAF (Specific-Locus Amplified Fragment) markörü ile analiz edilmiştir. Analiz sonucunda, çavdarın 2R kromozomuna özgü sekiz belirteç, her iki introgression hattında da tespit edilmiş; bu durum, söz konusu hatların 2R kromozomu segmentleri taşıdığını ve bu segmentlerin sarı pas ve küllemeye karşı direnç sağlayan genleri içerdiğini düşündürmüştür.

**Szöke-Pázsı ve ark. (2024)** tarafından yürütülen çalışmada *Triticum aestivum* (Mv9kr1) ile *S. cereanum* ('Kriszta'; *S. cereale* × *S. strictum* yapay melezi) arasındaki melezlemenin BC<sub>2</sub>F<sub>8</sub> generasyonu, in situ hibridizasyon (GISH ve FISH) yöntemleri ile taranmış ve DArTseq genotipleme ile analiz edilmiştir. Bu analizlerin amacı, ön ıslah çalışmalarında kullanılabilecek potansiyel agronomik değere sahip genotiplerin seçilmesi olmuştur. Toplam 329,267 yüksek kaliteli kısa dizi okuması üretilmiş; bunlardan 27,822 SilicoDArT ve 8,842 SNP markörü, *S. cereanum*'a ait 1R-7R kromozomlarına özgü olarak tanımlanmıştır. Marker yoğunluklarının 'Lo7' çavdar referans psödokromozomları boyunca dağılımı ısı haritalarıyla incelendiğinde, FISH ve DArTseq sonuçları arasında ince farklılıkların bulunduğu ortaya konmuştur. Bu bulgular, *S. cereanum*'a ait "egzotik" kromatinlerin buğday genomuna introgresyonunun, yüksek verimli DArTseq genotipleme ile güvenilir biçimde tespit edilebildiğini göstermiştir. Çalışmada elde edilen Mv9kr1-'Kriszta' ekleme ve translokasyon hatlarının, stres toleransı veya hastalık direnci yüksek buğday çeşitlerinin geliştirilmesinde önemli ön ıslah materyalleri olarak kullanılabileceği bildirilmiştir.

**Li ve ark. (2024)** tarafından gerçekleştirilen çalışmada, çavdar genomu çapında basit tekrarlı diziler (SSR) tanımlanmış ve özellikleri ortaya konmuştur. Toplam 997,027 SSR belirlenmiş olup, ortalama yoğunluğun 115.97 SSR/Mb olduğu bildirilmiştir. Kromozomlar arasındaki SSR sayısı bakımından anlamlı bir farklılık gözlenmemiş; 2R kromozomu %15.29 ile en yüksek, 1R kromozomu ise %13.02 ile en düşük orana sahip bulunmuştur. Ayrıca, kromozomlardaki SSR sayısının, kromozom uzunluğu ile anlamlı şekilde korelasyon gösterdiği tespit edilmiştir. SSR motif tiplerinin oldukça zengin olduğu ve tüm SSR tiplerinin çavdarın yedi kromozomu boyunca dağılım gösterdiği belirlenmiştir. Mononükleotid SSR'ler (MNRs), dinükleotid SSR'ler (DNRs) ve

trinükleotid SSR'ler (TNRs) en yüksek oranda bulunmuş olup, sırasıyla toplam SSR'lerin %46.90, %18.37 ve %22.64' n  oluşturmuştur. MNR'ler içerisinde, G/C tekrarlarının %26.24 ile en yüksek orana sahip olduğu, ayrıca 10 bp motiflerinin %31.32 oranında görüldüğü saptanmıştır. SSR dizilerine dayalı olarak toplam 657 primer çifti tasarlanmış; PCR sonuçları, bu primerlerden 119 çiftinin  avdar-spesifik olduğunu ve bu primerlerin buğday genomunda  avdar kromatini tespit etmede etkili şekilde kullanılabileceğini göstermiştir. Ayrıca, 86 primer çiftinin bir veya daha fazla spesifik  avdar kromozomunu ayırt edebildiği belirlenmiştir.



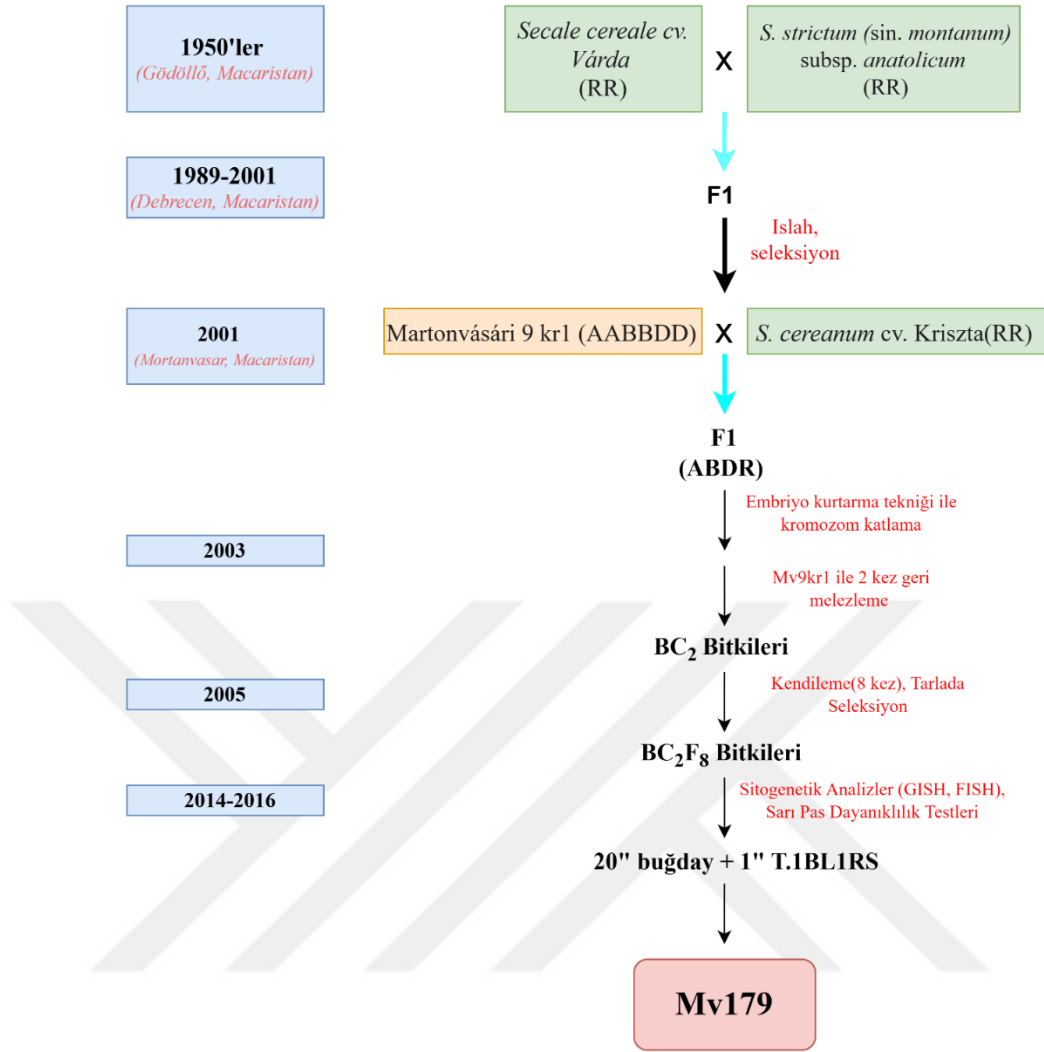
### 3. MATERYAL VE METOD

#### 3.1. Bitki Materyali

Bu çalışmada 3 adet Macar orijinli ekmeklik buğday hattı kullanılmış olup, söz konusu hatlarla ilgili detay bilgilerk Çizelge 3.1'de, Mv179 T1BL.1RS translokasyon hattının geliştirilme süreci ise Şekil 3.1.'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan Macaristan orijinli ekmeklik buğday hatları i ve tanımları

| Genotip                  | Tanım                                                                              |
|--------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| Mv179 ( Mv9kr1/ Kriszta) | Kriszta çavdar çeşidi orijinli 1BL.RS translokasyonuna sahip ekmeklik buğday hattı |
| Mv9kr1                   | Tranlokasyon içermeyen ekmeklik buğday çeşidi                                      |
| Mv Magdaléna             | Petkus çavdar çeşidi orijinli 1BL.RS translokasyonuna sahip ekmeklik buğday çeşidi |



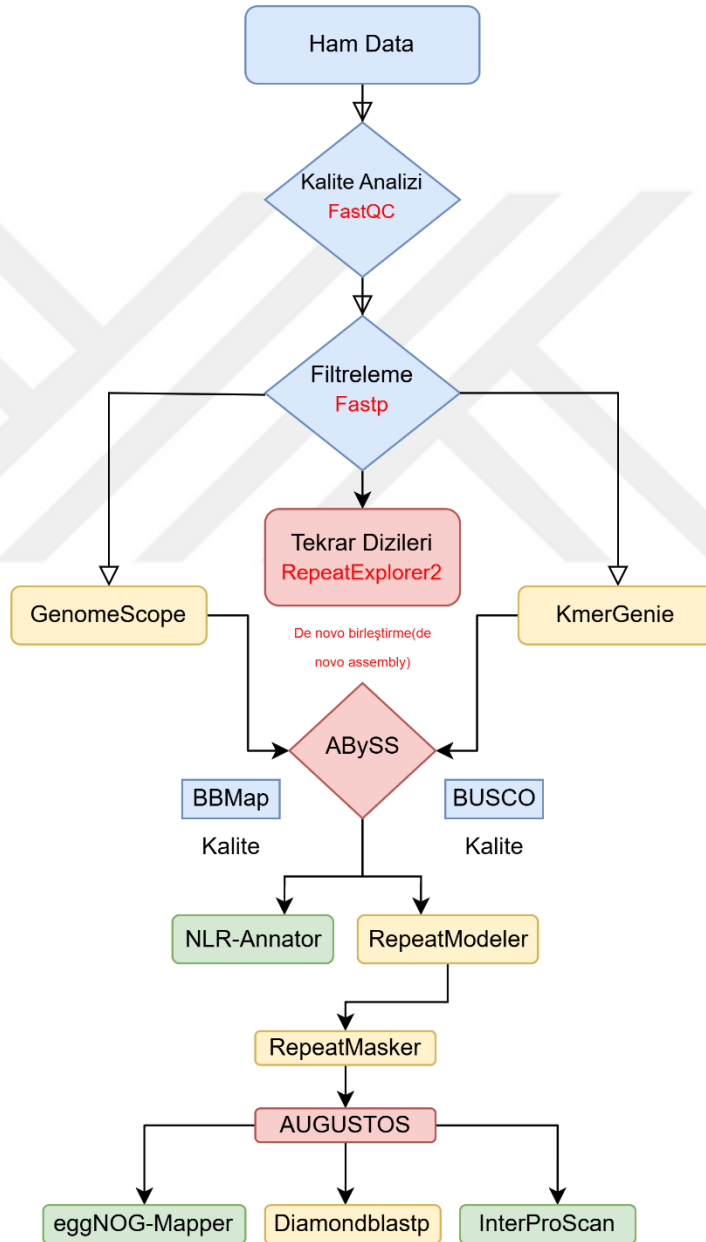
Şekil 3.1. Mv179 T1BL.1RS translokasyon hattının geliştirilme sürecinin akış diyagramı

### 3.2. DNA Sekans Verisi ve Biyoinformatik Çalışmalar

Bu çalışmada kullanılan 1BL.1RS translokasyon kromozomlarının ayrıştırılması ve dizileme işlemleri hizmet alımı yoluyla gerçekleştirilmiştir. Bu amaç için Mv179 tohumları çimlendirilmiş ve kök ucu meristem dokuları, Centre for Agricultural Research ELKH (Macaristan) bünyesinde standart protokoller doğrultusunda hazırlanmıştır. Senkronize meristem dokularından hazırlanan mitotik kromozom süspansiyonları, FITC işaretli GAA<sub>5</sub> oligonükleotid probu ve 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) kullanılarak FISHIS (Fluorescent In situ Hybridization in Suspension) yöntemiyle floresan işaretlenmiştir. Ardından, biparametrik akış karyotipleme (Flow Karyotyping) tekniği kullanılarak >%80 saflıkta 1BL.1RS kromozom fraksiyonu ayrıştırılmıştır (Giorgi ve ark., 2013). İzole edilen kromozom fraksiyonlarından DNA ekstraksiyonu yapılarak kütüphane hazırlığı gerçekleştirilmiş ve sekanslama işlemleri Illumina NovaSeq 6000 platformunda paired-end (2×150 bp) modunda tamamlanmıştır. Elde edilen ham FASTQ verileri biyoinformatik çalışmalarda kullanılmıştır.

### 3.2.1. Ham Sekans Verisinin Kalite Analizi ve Filtrelenmesi

Dizileme sonucunda elde edilen 1BL.1RS kromozomuna ait ham FASTQ verileri, analiz amacıyla Ubuntu tabanlı Linux ortamına aktarılmıştır. Ham okumaların kalite kontrolü FastQC v0.12.1 yazılımı ile yapılmış (Şekil 3.2), baz kalitesi, GC(Guanin+sitozin) oranı ve olası adaptör kontaminasyonları incelenmiştir. Ardından, adaptör sekanslarının ve düşük kaliteli bazların uzaklaştırılması için Fastp v0.23.2 aracı kullanılmıştır (Chen ve ark., 2018). Bu işlem sonrasında yüksek kaliteli okumalar montaj aşamasına aktarılmıştır.



Şekil 3.2. Çalışmada kullanılan iş akış şeması

### 3.2.2. K-mer Analizi

Montajdan önce, dizilerin temel istatistiksel özelliklerini belirlemek ve en uygun k-mer uzunluğunu tespit etmek amacıyla GenomeScope v2.0.1 ve KmerGenie v1.7051 yazılımları kullanılmıştır (Chikhi ve Medvedec, 2014; Vurture ve ark., 2017). K-mer frekans dağılımları analiz edilerek genomun tahmini büyüklüğü, heterozigotluk oranı ve tekrar içeriği değerlendirilmiştir. Her iki yazılımın önerdiği değerlere göre optimum k-mer uzunluğu 93 olarak belirlenmiştir (Vurture ve ark., 2017; Ranallo-Benavidez ve ark., 2020).

### 3.2.3. De novo Birleştirme (De novo assembly)

Belirlenen k-mer değeri kullanılarak ABySS v2.3.10 aracı ile "De novo" birleştirme( De novo assembly) işlemi gerçekleştirilmiştir (Jackman ve ark., 2017). De novo birleştirme çıktıları arasında bitişik diziler (contig) ve dizi iskeleleri (scaffold) yer almış, montajın genel istatistikleri BBMap v39.0 aracıyla hesaplanmıştır (<https://sourceforge.net/projects/bbmap/>). Bu kapsamda N50 değeri, toplam montaj uzunluğu, contig sayısı, L50 değeri ve GC içeriği gibi parametreler raporlanmıştır.

### 3.2.4. De novo Birleştirme Kalitesinin Değerlendirilmesi

De novo birleştirme(De novo assembly) kalitesinin değerlendirilmesi amacıyla BUSCO (Benchmarking Universal Single-Copy Ortholog) v5.8.0 yazılımı kullanılmış ve analizler iki farklı soy veri seti ile gerçekleştirilmiştir (Simão ve ark., 2015). İlk olarak bitkilere özgü 1614 korunmuş çekirdek geni içeren embryophyta\_odb10 veri seti (<https://busco.ezlab.org>) kullanılmıştır. Bu veri seti için iki farklı değerlendirme yaklaşımı uygulanmış olup bunlar: (i) AUGUSTUS tabanlı ab initio gen tahmin modu (euk\_genome\_aug) ve (ii) Miniprot tabanlı hizalama destekli tahmin modu (euk\_genome\_min)'dur (Manni ve ark., 2021). Böylece aynı biyolojik veri seti üzerinde hem tahmine dayalı hem de hizalamaya dayalı yaklaşımlar karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir. Çalışmada bir diğer değerlendirme ise 255 korunmuş geni içeren eukaryota\_odb10 veri seti (<https://busco.ezlab.org>) ile yapılmış ve bu analizde Miniprot tabanlı euk\_genome\_min modu kullanılmıştır. Her bir koşulda elde edilen tam (Complete), parçalı (Fragmented) ve eksik (Missing) BUSCO oranları raporlanmış ve montajın gen bütünlüğü bu metrikler üzerinden yorumlanmıştır.

### 3.2.5. Tekrarlayan Dizilerin Kümeleme Analizi

Tekrarlayan dizilerin tanımlanması amacıyla graf tabanlı kümeleme (graph-based clustering, RepeatExplorer2 modu) yaklaşımı kullanılmıştır (Novák ve ark, 2017). Analiz öncesinde, veri setini standartlaştırmak ve hesaplama süresini kısaltmak amacıyla her iki okuma yönünden (R1 ve R2) 1.000.000 okuma olacak şekilde rastgele örnekleme (subsampling) yapılmıştır. Bu işlem SeqTK (setq\_sample) aracı ile komut satırında gerçekleştirilmiştir.

Oluşturulan alt örneklem dosyaları, RepeatExplorer2 sisteminin kalite skorlarını kullanmaması nedeniyle FASTQ formatından FASTA formatına dönüştürülmüş, ardından okuma çiftlerinin sıralı bir biçimde tek bir dosyada yer alması için SeqTK mergepe aracı (<https://github.com/lh3/seqtk>) ile birleştirilmiş (birleştirilmiş çift uçlu dosya – merged paired-end fasta) ve analiz giriş dosyası haline getirilmiştir. Hazırlanan birleşik FASTA dosyası, RepeatExplorer2 kümeleme motoru ile işlenmiş ve diziler benzerlik grafiği üzerinden kümelere ayrılmıştır (Novák ve ark., 2010; Neumann ve ark., 2019). Kümeler daha sonra tekrarlı element sınıflandırma modülü (RepeatClassifier/REXdb referanslı) kullanılarak sınıflandırılmıştır. Bu aşamada retrotranspozonlar (Gypsy, Copia), DNA transpozonları, rDNA dizileri ve satellit tekrarlar belirlenmiştir. TAREAN modülü (Tandem Repeat Analyzer) ile satellit dizilere ait tekrar birimi uzunluğu (monomer), konsensus dizileri ve tekrar organizasyon yapısı analiz edilmiştir (Novák ve ark., 2017). Her kümenin genom içindeki oransal katkısı (%) hesaplanmış ve sonuçlar değerlendirilmiştir.

### 3.2.6. Tekrarlayan Dizilerin "De novo" Tanımlanması

Mv179 1BL1RS translokasyon hattına ait sekans dizisinde tekrarlayan DNA elemanlarının (repetitif dizilerin) tanımlanması amacıyla RepeatModeler v2.0.4 aracı kullanılmıştır (Flynn ve ark., 2020). Analiz, Linux ortamında varsayılan parametrelerle yürütülmüştür. RepeatModeler, RECON v1.08 ve RepeatScout v1.0.6 araçlarını entegre şekilde kullanarak genom dizisi üzerinde "De novo" tekrar ailelerini tanımlamaktadır (Bao ve Eddy., 2002; Price ve ark., 2005). Bu yaklaşım, önceden bilinen referans kütüphanelerine bağlı kalmadan, doğrudan sekans dizisinden hareketle genomun kendi tekrar yapısının ortaya çıkarılmasını sağlamaktadır.

Bu analiz sonucunda elde edilen konsensus diziler, Mv179 1BL1RS sekansında tanımlanan tüm tekrar ailelerinin temsili dizilerini içermektedir. Bu diziler, tekrarlı DNA içeriğinin genel bileşimini incelemek amacıyla sınıf düzeyinde değerlendirilmiştir. Bu amaçla retrotranspozon (Ty1/copia, Ty3/gypsy), LINE ve SINE elemanları ile DNA transpozon (CACTA, hAT, Helitron) aileleri belirlenmiştir. Ayrıca, genomun küçük bir bölümünü oluşturan rDNA, uydu (satellite) ve tanımlanamamış (unclassified) tekrar tipleri de tespit edilmiştir. Böylece translokasyon bölgesinin tekrarlayan dizi kompozisyonu niteliksel olarak ortaya konulmuştur. Bununla birlikte elde edilen "konsensus\_sekans.fasta" dosyası ise her tekrar ailesine karşılık gelen konsensus dizilerini (consensus sequences) FASTA formatında sunmaktadır. Bu diziler, 1BL1RS kromozomuna özgü de novo oluşturulmuş bir tekrar kütüphanesi (repeat library) niteliğindedir.

Bu analiz sonucunda elde edilen konsensus diziler, çalışmanın sonraki aşamalarında maskeleme veya gen tahmini süreçlerinde kullanılmıştır

### 3.2.7. NLR Genlerinin Tanımlanması ve Filogenetik Analizi

Bu çalışmada 1BL1RS translokasyon hattına ait Mv179 1BL1RS de novo birleştirme dizisi ile karşılaştırma amacıyla buğdayın 1B kromozomu (*Triticum aestivum*, IWGSC) ve çavdarın 1R kromozomu (*Secale cereale*, Lo7) üzerinde NLR (nucleotide-binding leucine-rich repeat) bölge tanımlaması yapılmıştır. NLR genlerinin belirlenmesi için NLR-Annotator v2.1b yazılımı kullanılmıştır (Steuernagel ve ark., 2020). Bu araç, NB-ARC(nükleotid bağlayıcı düzenleyici bölge) çekirdek bölgesi, TIR/CC(Toll/Interleukin-1 Receptor/Coiled-Coil) başlangıç motifleri ve LRR(Leucine-Rich Repeat) tekrarlarını tarayarak olası NLR adaylarını belirlemiş ve çıktı olarak GFF ile BED formatında sunmuştur. Böylece Mv179 1BL1RS sekansı, buğday 1B ve çavdar 1R kromozomları aynı parametre kümesiyle işlenmiş ve karşılaştırılabilir bir "NLR aday" listesi oluşturulmuştur. Elde edilen aday bölgelerin dizileri BEDTools v2.30.0 kullanılarak sekans dosyalarından çıkarılmış ve EMBOSS transeq aracı ile amino asit dizilerine çevrilmiştir (Quinlan ve Hall, 2010). Çeviri sonrası dur kodunu ("\*") içeren veya çok kısa olan diziler filtrelenmiş, böylece hatalı olabilecek NLR'ler elenmiştir. NB-ARC çekirdek domaininin varlığı, elde edilen NLR adaylarının doğrulanması amacıyla HMMER v3.3.2 paketinde yer alan hmmsearch aracı kullanılarak test edilmiştir (Eddy, 2011). Bu analizde Pfam veri tabanındaki NB-ARC (PF00931) protein ailesine ait HMM profili referans olarak alınmış ve tüm aday protein dizileri bu profile karşı hizalanmıştır. Analiz sonucunda tanımlanan bölgelerin tamamının NB-ARC domaini ile yüksek benzerlik gösterdiği doğrulanmıştır. Bu adım, NLR-Annotator tarafından belirlenen bölgelerin gerçekten NB-ARC çekirdek yapısını içerdiğini ve yanlış pozitif aday bulunmadığını göstermiştir.

Analizde yalnızca 1BL1RS hattından elde edilen NLR'ler değil, aynı zamanda RefPlantNLR veri tabanında yer alan fonksiyonu tanımlanmış R-genlerine ait protein dizileri de kullanılmıştır (Kourelis ve ark., 2021). Bu genler veri setine eklenmiş ve "RGENE" önekiyle yeniden adlandırılmıştır. Tüm protein dizileri tek bir FASTA dosyasında birleştirilerek çoklu hizalama aşamasına geçilmiştir.

Çoklu dizilim analizi MAFFT v7.520 yazılımı ile yapılmıştır (Katoh ve Standley, 2013). Yüksek doğruluk gerektiren bu analizde L-INS-i algoritması tercih edilmiştir. Ardından hizalama, boşluk oranını azaltmak ve düşük bilgi içeren bölgeleri çıkarmak amacıyla trimAl v1.5 aracıyla optimize edilmiştir (Capella-Gutiérrez ve ark., 2009).

Filogenetik analizler, IQ-TREE v2.3.5 yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Minh ve ark., 2020). Model seçimi, programın gömülü ModelFinder algoritması tarafından Bayesian Information Criterion (BIC) esas alınarak otomatik yapılmış ve JTT+F+G4 modeli en uygun amino asit ikame modeli olarak belirlenmiştir. Dal güvenilirliğini belirlemek için 1000 yinelemeli ultrafast bootstrap ve SH-aLRT testleri uygulanmıştır. Oluşturulan filogenetik ağaç, iTOL v6 platformu üzerinden görselleştirilmiş ve kladlar, tür kaynaklarına göre renklendirilmiştir (Letunic ve Bork, 2021).

Bu analizler sonucunda Mv179 1BL·1RS kromozomuna ait NLR adaylarının, buğday ve çavdar kökenli NLR'lerle ve literatürde fonksiyonu bilinen dayanıklılık genleriyle filogenetik ilişkileri ortaya konulmuştur. Böylece translokasyon segmentinin taşıdığı olası dayanıklılık gen aileleri ve bunların evrimsel kökenleri belirlenmiştir.

### 3.2.7. Mv179 1BL.1RS Kromozomunun Homoloji Tabanlı Karşılaştırma Analizleri

Maskelenmiş genom üzerinde gen tahmini AUGUSTUS (species=*triticum aestivum*) kullanılarak gerçekleştirilmiş ve protein çıktıları elde edilmiştir (Stanke ve ark., 2004). Tahmin edilen bu protein dizileri fonksiyonel anotasyon amacıyla eggNOG-mapper v2 (COG sınıfları, GO terimleri, KEGG yolları) ve InterProScan (IPR domainleri, GO anotasyonları) ile analiz edilmiştir (Jones ve ark., 2014; Cantalapiedra ve ark., 2021). Elde edilen anotasyon çıktıları Python tabanlı özel betikler ile özetlenmiş; en sık görülen InterPro domainleri, COG fonksiyon kategorileri ve GO terimleri grafiksel olarak görselleştirilmiştir. Ayrıca tahmin edilen Mv179 proteinleri DIAMOND BLASTP kullanılarak buğday (IWGSC RefSeq v1.0) ve çavdar (Lo7 v1) referans protein setlerine hizalanmış; her gen için en yüksek bitscore'a sahip eşleşme "best-hit" olarak seçilmiş ve tür bazlı ortolog dağılımı çıkarılmıştır. Bu veriler kullanılarak buğday-çavdar bitscore karşılaştırmaları, % benzerlik yoğunlukları, bitscore farkı histogramları ve log-E değerleri grafiksel olarak analiz edilmiştir.

### 3.2.8. Sekansın Çavdar (*Secale cereale*) Referansına Hizalanması ve Varyant Analizi

Mv179 hattına ait dizileme verilerinden elde edilen çift uçlu (paired-end) okumalar, Trimmomatic v0.39 yazılımı kullanılarak adaptör sekanslarından ve düşük kaliteli bazlardan arındırılmıştır (Bolger ve ark., 2014)(Şekil 3.3). Temizlenmiş okumalar, kısa okumalara uygun parametrelerle çalışan Minimap2 v2.22 aracı ile referans çavdar genomuna hizalanmıştır (Li, 2018). Elde edilen ".sam" uzantılı hizalama dosyaları, SAMtools v1.19 yazılımının view komutu ile ".bam" formatına dönüştürülmüş; sort komutu ile sıralanmış ve index komutu ile indekslenmiştir (Danecek ve ark., 2021). Ardından, Picard v3.1.1 yazılımının MarkDuplicates modülü kullanılarak tekrarlı (duplikat) okumalar filtrelenmiştir (<http://broadinstitute.github.io/picard/>). Qualimap v2.2.2 aracı ile hizalama kalitesi ve kapsama gibi istatistiksel parametreler elde edilmiştir (Okonechnikov ve ark., 2016). Varyant çağırımı, poliploid türlerde güvenilir sonuçlar vermesi nedeniyle FreeBayes v1.3.7 aracı ile gerçekleştirilmiş ve sonuçlar ".vcf" formatında elde edilmiştir (Garrison ve Marth., 2012). Bu dosya, Python betikleri kullanılarak işlenmiş ve tablo formatına (Excel/CSV) dönüştürülmüştür. Veri işleme aşamasında, yalnızca QUAL değeri  $\geq 100$  olan ve  $\geq 30$  bp uzunluğundaki "InDel" bölgeleri filtrelenerek ileri analizler için seçilmiştir. Filtrelenen InDel lokusları, IGV (Integrative Genomics Viewer) yazılımı kullanılarak ".bam" dosyalarıyla birlikte görsel olarak doğrulanmıştır. Doğruluğu onaylanan bölgelerden " $\pm 200$  - 800 bp" uzunluğunda flanking diziler çıkarılmış ve Primer3 aracı ile primer tasarımı yapılmıştır (Untergasser ve ark., 2012). Tasarlanan primer dizileri,

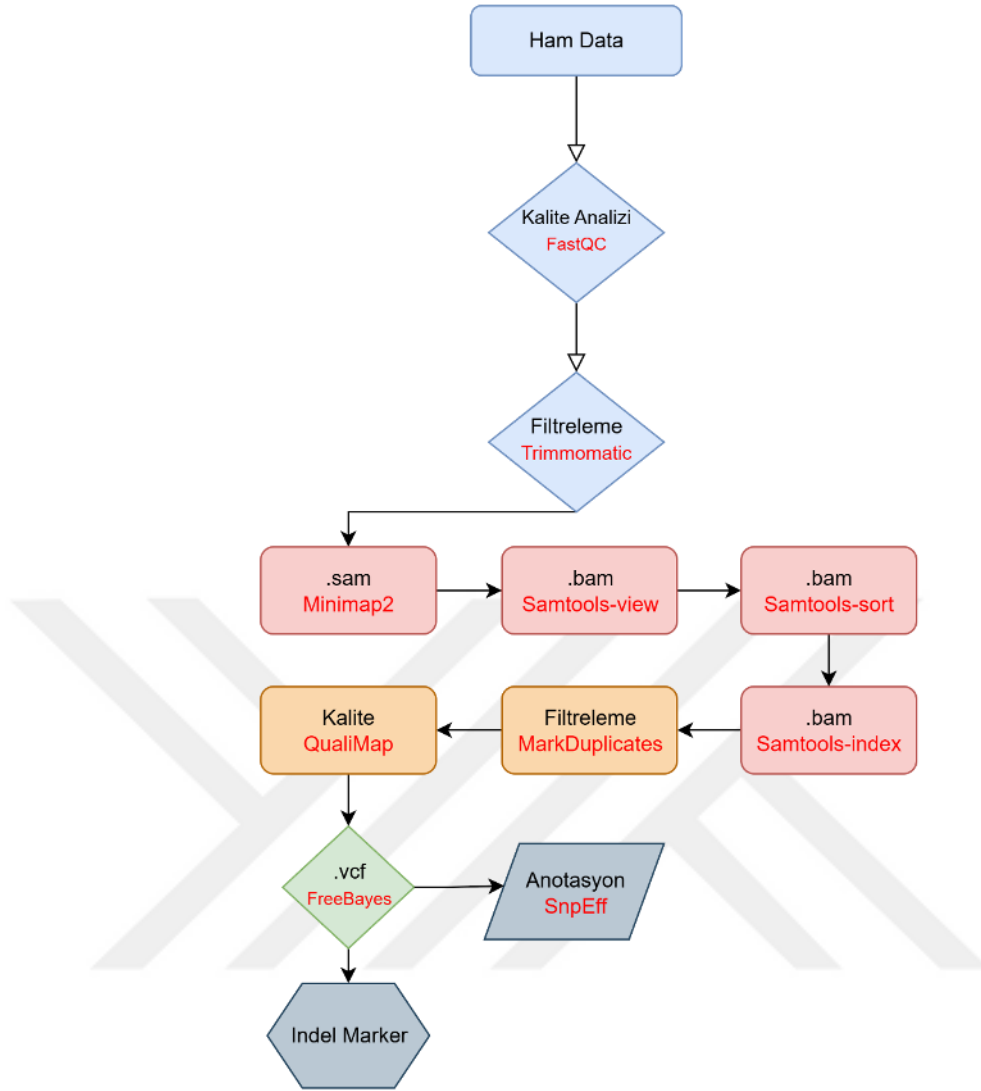
IDT OligoAnalyzer ile Tm, GC içeriği, saç tokası (hairpin) ve dimer yapısı açısından analiz edilmiştir. Uygun bulunan diziler için "in silico" özgüllük analizi gerçekleştirilmiş ve primer dizileri, Ensembl Plants BLAST platformu üzerinden hem buğday (IWGSC) hem de çavdar (Lo7) referans genomlarıyla hizalanarak karşılaştırılmıştır. Tekil ve hedef bölgeye özgü hizalanma gösteren primer çiftleri, InDel tabanlı markör geliştirme için yüksek güvenilirlikte adaylar olarak belirlenmiştir. Bu kapsamda, toplam 30 adet InDel markörü başarıyla tasarlanmıştır.

### 3.2.9. Varyantların Anotasyonu

Bu çalışmada FreeBayes yazılımı ile elde edilen VCF formatındaki varyant dosyasının genetik yapılara etkilerini belirlemek amacıyla anotasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, biyoinformatik analizlerde yaygın olarak kullanılan SnpEff v5.2c yazılımı tercih edilmiştir (Cingolani ve ark., 2012). Anotasyon sürecinde referans olarak çavdar (*Secale cereale*) Lo7 genomu kullanılmıştır. Bu referansa ait genom dizisi (FASTA formatında) ve gen yapısını tanımlayan anotasyon dosyası (GFF3 formatında) SnpEff veri tabanına entegre edilmiştir. Gerekli dosyalar data/ dizinine yerleştirilmiş ve "snpEff.config" yapılandırma dosyası düzenlenerek Lo7 genomuna ait bir referans profili tanımlanmıştır.

Ardından build komutu kullanılarak ilgili referans veri tabanı oluşturulmuş, anotasyon işlemi ise "ann" komutu ile başlatılmıştır. Anotasyon sonucunda elde edilen veriler ".vcf" uzantılı dosya formatında kaydedilmiştir. Her bir varyant için; bulunduğu genom bölgesi (örneğin ekzon, intron, upstream veya downstream), etkisinin türü (örneğin sessiz, anlam değiştirici, çerçeve kaydırıcı veya dur kodonu oluşturan), etkilediği gen ya da transkript kimliği ve amino asit düzeyinde meydana gelen değişim bilgisi belirlenmiştir.

Ayrıca SnpEff tarafından sağlanan "summary.html" formatındaki özet rapor ile varyant etkilerinin sınıflandırılması yapılmış ve varyantların yüksek, orta ya da düşük etkili olduğu kategoriler belirlenmiştir. Özellikle gen bölgelerinde yer alan ve protein yapısını değiştirme potansiyeli taşıyan InDel'ler belirlenmiştir. Buraya kadar yapılan tüm işlemleri gösteren akış şeması Şekil 3.3'de verilmiştir.



Şekil 3.3. Hizalama, varyant çağırımı ve anotasyon işlemlerinin iş akış grafiği

### 3.3. InDEL Markör Analizi

#### 3.3.1. Yaprak Örneklerinin Alınması ve DNA İzolasyonu

Bu çalışmada; biri Kriszta kökenli 1BL.1RS translokasyon hattı, biri translokasyon içermeyen buğday hattı, biri Petkus kökenli 1BL.1RS translokasyon hattı olmak üzere toplam üç buğday hattı kullanılmıştır. Ayrıca beş tescilli çavdar (*Secale cereale* L.) çeşidi, beş tritikale (*Triticosecale* Wittmack) çeşidi ve farklı ekolojik bölgelerden toplanan 82 çavdar genotipi de çalışmaya dahil edilmiştir. Tüm genotiplerin tohumları viyollere ekilmiştir. Bitkiler büyüme odasında 20°C sıcaklıkta, 18 saat aydınlık / 6 saat karanlık koşullarında yetiştirilmiştir. Çimlenmeden sonra fidelerin gelişimi günlük olarak izlenmiştir. Gelişimin 14. gününün sonunda, her genotipin genç yapraklarından DNA izolasyonu için yaprak örnekleri yapılmıştır. Örnekler elle hasat edilmiş ve kontaminasyonu önlemek amacıyla steril pens ve makaslar kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan tüm genotiplerin listesi Çizelge 3.2.'de verilmiştir. Tohumların ekimi ve yaprakların toplanması işlemi Şekil 3.4. de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan çavdar ve tritikale koleksiyonunun listesi

| Sıra No | Popülasyon Adı   | Tür    | Sıra No | Popülasyon Adı   | Tür             |
|---------|------------------|--------|---------|------------------|-----------------|
| 1       | 2006-6-25-3-1    | Çavdar | 49      | Mv179            | Ekmeklik Buğday |
| 2       | 2006-6-25-3-1    | Çavdar | 50      | Mv9kr1           | Ekmeklik Buğday |
| 3       | 2005-6-27-5-14   | Çavdar | 51      | MvMagdalena      | Ekmeklik Buğday |
| 4       | 2005-6-27-5-14   | Çavdar | 52      | Aramtes          | Çavdar          |
| 5       | 2006-6-17-5-1    | Çavdar | 53      | Muello           | Çavdar          |
| 6       | 2006-6-17-5-1    | Çavdar | 54      | Dukado           | Çavdar          |
| 7       | 2006-6-27-1-8    | Çavdar | 55      | Wiantes          | Çavdar          |
| 8       | 2006-6-27-1-8    | Çavdar | 56      | Ucrr-2001        | Çavdar          |
| 9       | 2004-6-21-4-7    | Çavdar | 57      | Pignos           | Tritikale       |
| 10      | 2004-6-21-4-7    | Çavdar | 58      | Dubleo           | Tritikale       |
| 11      | 2005-6-26-2-13-1 | Çavdar | 59      | Isflavius        | Tritikale       |
| 12      | 2005-6-26-2-13-1 | Çavdar | 60      | Logo             | Tritikale       |
| 13      | 2005-6-29-7-3    | Çavdar | 61      | Tacettin Bey     | Tritikale       |
| 14      | 2005-6-29-7-3    | Çavdar | 62      | 2005-6-28-12-7-1 | Çavdar          |
| 15      | 2006-6-20-11-12  | Çavdar | 63      | 2005-6-28-12-7-1 | Çavdar          |
| 16      | 2006-6-20-11-12  | Çavdar | 64      | 2005-6-28-12-7-2 | Çavdar          |
| 17      | 2005-6-28-5-7    | Çavdar | 65      | 2005-6-28-12-7-2 | Çavdar          |
| 18      | 2005-6-28-5-7    | Çavdar | 66      | 2006-6-25-9-6    | Çavdar          |
| 19      | 2004-7-3-11      | Çavdar | 67      | 2006-6-25-9-6    | Çavdar          |
| 20      | 2004-7-3-11      | Çavdar | 68      | 2006-6-24-1-9    | Çavdar          |
| 21      | 2006-6-26-6-5    | Çavdar | 69      | 2006-6-24-1-9    | Çavdar          |
| 22      | 2006-6-26-6-5    | Çavdar | 70      | 2006-6-20-4-3    | Çavdar          |
| 23      | 2004-6-21-3-1    | Çavdar | 71      | 2006-6-20-4-3    | Çavdar          |
| 24      | 2004-6-21-3-1    | Çavdar | 72      | 2006-6-27-4-6    | Çavdar          |
| 25      | 2004-6-21-3-2    | Çavdar | 73      | 2006-6-27-4-6    | Çavdar          |
| 26      | 2004-6-21-3-2    | Çavdar | 74      | 2005-6-26-7-6    | Çavdar          |
| 27      | 2005-6-25-11-9   | Çavdar | 75      | 2005-6-26-7-6    | Çavdar          |
| 28      | 2005-6-25-11-9   | Çavdar | 76      | 2006-6-26-2-10   | Çavdar          |
| 29      | 2005-6-30-3-6    | Çavdar | 77      | 2006-6-26-2-10   | Çavdar          |
| 30      | 2005-6-30-3-6    | Çavdar | 78      | 2004-6-23-2-7    | Çavdar          |
| 31      | 2005-7-5-7-5     | Çavdar | 79      | 2004-6-23-2-7    | Çavdar          |
| 32      | 2005-7-5-7-5     | Çavdar | 80      | 2004-6-23-3-5    | Çavdar          |
| 33      | 2005-6-27-5-13-1 | Çavdar | 81      | 2004-6-23-3-5    | Çavdar          |
| 34      | 2005-6-27-5-13-1 | Çavdar | 82      | 2006-6-25-2-6    | Çavdar          |
| 35      | 2005-6-27-5-13-2 | Çavdar | 83      | 2006-6-25-2-6    | Çavdar          |
| 36      | 2005-6-27-5-13-2 | Çavdar | 84      | 2005-6-26-3-8    | Çavdar          |
| 37      | 2006-6-25-8-8    | Çavdar | 85      | 2005-6-26-3-8    | Çavdar          |
| 38      | 2006-6-25-8-8    | Çavdar | 86      | 2005-26-3-8-2    | Çavdar          |
| 39      | 2005-6-27-2-9    | Çavdar | 87      | 2005-26-3-8-2    | Çavdar          |
| 40      | 2005-6-27-2-9    | Çavdar | 88      | 2005-6-26-3-8-2  | Çavdar          |
| 41      | 2005-6-27-4-9-2  | Çavdar | 89      | 2005-6-26-3-8-2  | Çavdar          |
| 42      | 2005-6-27-4-9-2  | Çavdar | 90      | 2005-6-28-8-6-1  | Çavdar          |
| 43      | 2005-6-29-7-3    | Çavdar | 91      | 2005-6-28-8-6-1  | Çavdar          |
| 44      | 2005-6-29-7-3    | Çavdar | 92      | 2005-6-28-8-6-2  | Çavdar          |
| 45      | 2005-6-20-10-1   | Çavdar | 93      | 2005-6-28-8-6-2  | Çavdar          |
| 46      | 2005-6-20-10-1   | Çavdar | 94      | 2005-6-28-8-6-3  | Çavdar          |
| 47      | 2006-6-26-2-11   | Çavdar | 95      | 2005-6-28-8-6-3  | Çavdar          |
| 48      | 2006-6-26-2-11   | Çavdar |         |                  |                 |



Şekil 3.4. Genotiplerin ekilmesi ve genç yaprak örneklerinin toplanması.

Genomik DNA izolasyonu için CTAB protokolü kullanılmıştır (Doyle ve Doyle, 1987). Bu yöntemde; yaş yaprak örneklerinin her birinden tartılarak alınan 0.8 g doku öğütücü (TissueLyser) kullanılarak öğütülmüştür.

Öğütülmüş yaprak örnekleri bulunan tüpler içerisine, 0.9 ml CTAB tampon çözeltisi (100 mM Tris-HCl, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, %2 CTAB, %2 PVP, %0.1 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) ilave edilmiş ve elle birkaç defa hafifçe çalkalanmıştır. Örnekler sıcaklığı 65°C olan su banyosuna yerleştirilmiştir. Örnekler her 10 dakikada bir hafifçe çalkalanmak suretiyle 1 saat 15 dakika boyunca su banyosunda bekletilmiştir.

Su banyosundan çıkarılan örnekler oda sıcaklığında 15 dk soğumaya bırakılmış ve daha sonra tüplerin içerisine ekstraksiyon tampon çözeltisi ile eşit oranda (0.9 ml), kloroform: isoamyl alkol (24:1) ilave edilmiştir.

Tüpler yavaşça ve sürekli olarak 15 dakika boyunca çalkalanmıştır. Tüpler 15 dakika boyunca 14000 rpm devirde santrifüj yapılmıştır. Santrifüjden sonra her tüp içerisindeki sıvı iki faz haline gelmiştir. Santrifüj olan örneklerin üst fazları alınarak (yaklaşık 0.7 ml) 1.5 ml'lik yeni bir tüpe aktarılmış, yeni tüpün içerisine soğuk (-25°C'de bekletilmiş) isopropanol (0.65 ml) ilavesi yapılmıştır. Tüpler çok yavaş bir şekilde pellet görülünceye kadar birkaç defa çalkalanmıştır. Yapılan işlemlere ait görseller Şekil 3.5.'de verilmiştir.



Şekil 3.5. Yapak örneklerinin öğütülmesi ve CTAB ve Kloroform basamakları

Tüpler 8000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilerek tüp içerisindeki DNA’nın çökmesi sağlanmış ve isopropanol tüpten boşaltılmıştır. Daha sonra tüpün içerisine, içerisinde 10 mM amonyum asetat bulunan %76’lık etanol’den 0.60 ml ilave edilmiş ve tüpler 30 dakika çalkalandıktan sonra 5000 rpm’de 2 dakika santrifüj edilmiştir. Daha sonra üst faz dökülerek gece boyunca doğal olarak kurumaya bırakılmıştır.

Kurutulan DNA’nın üzerine 500 µl ultra saf su (ddH<sub>2</sub>O) eklenerek çözündürme işlemi gerçekleştirilmiş ve çözdüren DNA örnekleri -25°C saklanmıştır. Yapılan işlemlere ait Görseller Şekil 3.6.’da verilmiştir.

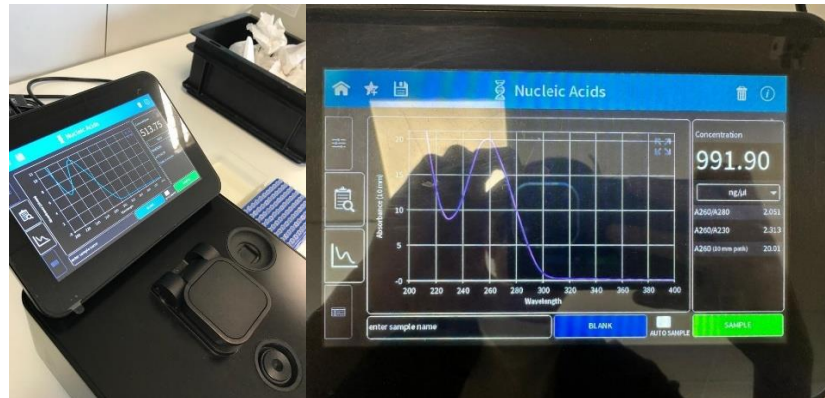


Şekil 3.6. DNA izolasyon aşamalarına ait görüntüler

### 3.3.2. DNA Miktarının ve Kalitesinin Belirlenmesi

DNA örneklerinin kantitatif miktarı ve kalitesi Implen NP80 NanoPhotometer cihazı ile ölçülmüştür. DNA miktarı 50ng/μl olacak şekilde ayarlanmıştır. DNA miktarı 400ng/μl ile 1500ng/μl arasında değişmiştir. Ayrıca 260/280 ve 260/230 değerleri de kontrol edilmiştir. Yapılan işlemlere ait görseller Şekil 3.7’de verilmiştir.

DNA’nın kalitatif analizi için 4 μl DNA 0.5 ml’lik tüplere konulmuş ve bunun üzerine 2 μl Loading Dye ve 6 μl ultra saf su eklenerek toplam hacim 12 μl’ye tamamlanmıştır. Hazırlanan örneklerden 12 μl alınarak 0.5X TAE solüsyonu içerisinde bulunan önceden hazırlanmış %1’lik agaroz jele yüklenmiş ve agaroz jele yüklenen bu örnekler 100 voltta 40 dakika koşturulmuştur. Kontrolü sağlayabilmek amacıyla son kuyucuklara 1 kbp ladder DNA yüklenmiştir. Agaroz jeldeki DNA örnekleri öncelikle ultraviyole transilluminatör yardımıyla görüntülenmiş, daha sonra ultraviyale jel dökümantasyon sisteminde görüntüsü kaydedilmiştir.



Şekil 3.7. DNA örneklerinin kantitatif miktarının ve kalitesinin belirlenmesi

### 3.3.3. PCR Optimizasyon Çalışmaları

Çalışmada kullanılan primerlerin optimum bağlanma sıcaklıklarını belirlemek amacıyla gradient PCR optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. PCR reaksiyonları toplam 15 μL hacimde hazırlanmıştır. Her reaksiyon karışımı; 1,5 μL 10× PCR tamponu (MgCl<sub>2</sub> içeren), 1,5 μL dNTP

karışımı (2.5 mM), 1 µL ileri (F) primeri, 1 µL geri (R) primeri (her biri 10 pmol/µL), 0,2 µL Taq DNA polimeraz (5 U/µL), 2 µL DNA şablonu (yaklaşık 50 ng/µL) ve 7,8 µL nükleazsız saf su (ddH<sub>2</sub>O) içerecek şekilde hazırlanmıştır.

Optimizasyon çalışmaları kapsamında gradient PCR yöntemiyle farklı bağlanma sıcaklıkları (52 °C, 54 °C, 56 °C, 58 °C, 60 °C ve 62 °C) test edilmiştir. PCR döngü koşulları; 95 °C’de 5 dakika ön denatürasyon adımının ardından 35 döngü boyunca 94 °C’de 30 saniye denatürasyon, değişken sıcaklıklarda 30 saniye annealing, 72 °C’de 1 dakika uzama şeklinde yürütülmüştür. Döngüler tamamlandıktan sonra 72 °C’de 10 dakika son uzama uygulanmış ve reaksiyonlar 4 °C’de beklemeye alınmıştır.

PCR ürünlerinin amplifikasyon başarısını ve bant özgüllüğünü değerlendirmek amacıyla agaroz jel elektroforezi uygulanmıştır. Bu amaçla, %1,5 agaroz jel hazırlanmış ve 1× TAE tamponu içerisinde çözülmüştür. Jel çözeltisine, DNA boyası olarak RedSafe Nükleik Asit Boyama Solüsyonu eklenmiş ve her 100 mL jel için 10 µL RedSafe kullanılmıştır. PCR ürünlerinden 5 µL, 1 µL yükleme tamponu (loading dye) ile karıştırılarak kuyucuklara yüklenmiştir. Elektroforez işlemi 100 V sabit voltajda, 1× TAE tamponu içerisinde yaklaşık 2 saat süreyle yürütülmüştür.

Elektroforez tamamlandıktan sonra jel, UV transluminatör altında görüntülenmiş ve bantların yoğunluğu ile özgüllüğü değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, her primer çifti için optimum bağlanma sıcaklığı ve amplifikasyon verimliliği belirlenmiştir.

### 3.3.4. Genotiplerin InDel Markörleri ile Taranması

Optimizasyonu tamamlanan primerler kullanılarak, çalışmada yer alan tüm genotiplerde hedef bölgelerin amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda biri Kriszta kökenli 1BL.1RS translokasyon hattı, biri Petkus kökenli 1BL.1RS translokasyon hattı, biri translokasyon içermeyen kontrol hattı, beş çavdar (*Secale cereale* L.) çeşidi, beş tritikale (× *Triticosecale* Wittmack) çeşidi ve farklı bölgelerden toplanan 82 yabani çavdar genotipi analiz edilmiştir.

PCR reaksiyonları toplam 15 µL hacimde hazırlanmıştır. Her reaksiyon; 1,5 µL 10× PCR tamponu (MgCl<sub>2</sub> içeren), 1,5 µL dNTP karışımı (2.5 mM), 1 µL ileri (F) primer, 1 µL geri (R) primer (her biri 10 pmol/µL), 0,2 µL Taq DNA polimeraz (5 U/µL), 2 µL DNA şablonu (yaklaşık 50 ng/µL) ve 7,8 µL nükleazsız saf su (ddH<sub>2</sub>O) içerecek şekilde hazırlanmıştır.

PCR koşulları, gradient PCR sonucu belirlenen optimum bağlanma sıcaklıkları kullanılarak uygulanmıştır. Reaksiyon döngüsü; 95 °C’de 5 dakika ön denatürasyon, ardından 35 döngü boyunca 94 °C’de 30 saniye denatürasyon, optimum bağlanma sıcaklığında 30 saniye annealing, 72 °C’de 1 dakika uzama ve son olarak 72 °C’de 10 dakika son uzama aşamalarını içermiştir. Reaksiyonlar tamamlandıktan sonra ürünler 4 °C’de beklemeye alınmıştır.

Amplifikasyon ürünleri, %3 agaroz jel kullanılarak 1× TAE tamponu içerisinde 100 V sabit voltajda yaklaşık 3 saat süreyle elektroforez edilmiştir. Jel çözeltisine DNA boyası olarak RedSafe Nükleik Asit Boyama Solüsyonu eklenmiş ve her 100 mL jel için 10 µL RedSafe kullanılmıştır.

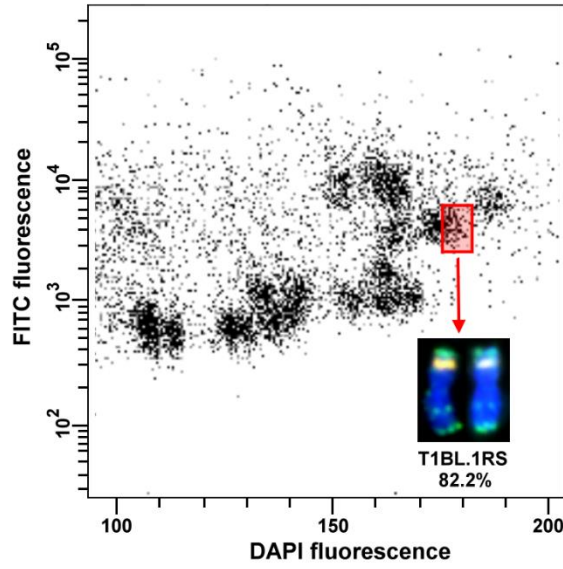
The figure consists of three panels illustrating laboratory procedures. The left panel shows a researcher in a white lab coat operating a thermal cycler. The middle panel is a close-up of a person wearing black gloves using a pipette to transfer liquid into a yellow microplate. The right panel shows a thermal cycler with a blue gel insert inside the reaction block.



## 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

### 4.1. DNA Sekans Verisi ve Biyoinformatik Çalışmalar

Elde edilen ham dizileme verileri, biyoinformatik analizlere geçilmeden önce kalite açısından ön değerlendirmeye tabi tutulmuştur. İlk olarak, flow-sorting işleminin doğruluğu FISHIS tabanlı akış karyotipleme çıktıları üzerinden teyit edilmiş ve 1BL1RS kromozomunun >%80 saflıkla ayrıştırıldığı gösterilmiştir (Şekil 4.1.). Bunu takiben, Illumina NovaSeq platformundan elde edilen FASTQ dosyalarına ait kalite metrikleri FastQC yazılımı ile incelenmiş; okuma uzunlukları, GC içeriği (Guanin + Sitosin içeriği) ve baz kalite profilleri açısından yüksek kaliteli bir veri seti elde edildiği doğrulanmıştır (Şekil 4.2). Ayrıca, temizlenmiş okuma verilerinin referans buğday 1B ve çavdar 1R kromozomlarına hizalanmasıyla oluşturulan normalize kapsama dağılımı incelenmiş ve “flow sorting” ile beklenen kromozomal özgüllüğün biyoinformatik düzeyde de tutarlı olduğu görülmüştür (Şekil 4.3.). Bu değerlendirmeler, dizileme verisinin kalite açısından ileri analizler için uygun olduğunu göstermiştir.



Şekil 4.1. Mv179 1BL1RS kromozomunun flow sorting (Akış sitometrisiyle ayrıştırılmış 1BL1RS kromozomu) değerlendirmesi

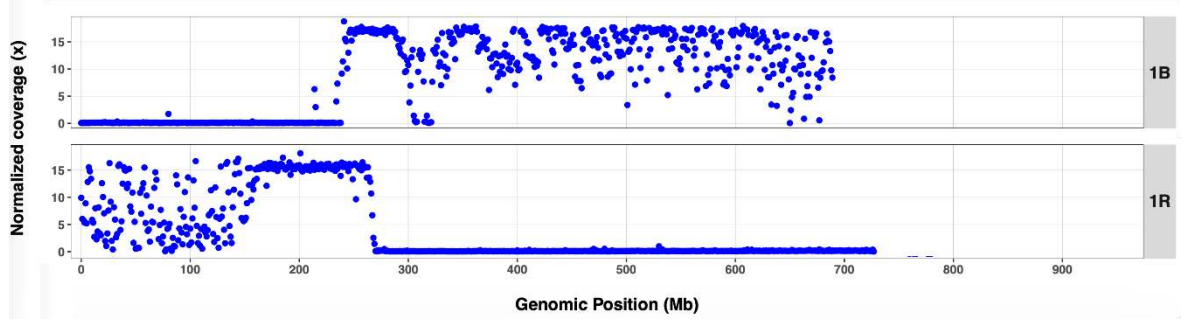
#### Basic Statistics

| Measure                           | Value                            |
|-----------------------------------|----------------------------------|
| Filename                          | 1RS-1BL_Mv179_S1_R1_001.fastq.gz |
| File type                         | Conventional base calls          |
| Encoding                          | Sanger / Illumina 1.9            |
| Total Sequences                   | 148771923                        |
| Sequences flagged as poor quality | 0                                |
| Sequence length                   | 35-261                           |
| %GC                               | 47                               |

#### Basic Statistics

| Measure                           | Value                         |
|-----------------------------------|-------------------------------|
| Filename                          | 1RS-1BL_Mv179_S1_R2_001.fastq |
| File type                         | Conventional base calls       |
| Encoding                          | Sanger / Illumina 1.9         |
| Total Sequences                   | 148771923                     |
| Sequences flagged as poor quality | 0                             |
| Sequence length                   | 35-261                        |
| %GC                               | 47                            |

Şekil 4.2. Ham sekansların FastQC raporları



Şekil 4.3. Mv179 1BL1RS kromozomunun kapsama analizi

#### 4.1.1 Mv179 1BL1RS Sekansının De novo Birleştirilmesi(De novo Assembly) ve Kalitesinin Değerlendirilmesi

Mv179 genotipine ait 1BL1RS kromozom fraksiyonundan elde edilen Illumina kısa okuma verileri, *de novo* birleştirme(De novo Assembly) sürecine tabi tutulmuş ve birleştirilmiş sekansın yapısal bütünlüğü ile genel kalitesi temel montaj istatistikleri üzerinden değerlendirilmiştir. Bu kapsamda, ABySS tabanlı montaj işlemi sonucunda üç ana çıktı türü (unitig, contig ve scaffold) elde edilmiş ve ilgili metrikler ayrıntılı olarak hesaplanmıştır. Her üç birleştirme seviyesine ait toplam dizi uzunluğu, N50/N75/N25 değerleri, L50 değerleri, maksimum dizi uzunlukları ve toplam dizisel içerik kapsamı Çizelge 4.1.'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Mv179 1BL1RS kromozomuna ait de novo birleştirme istatistikleri

| n              | n:500  | L50    | min | N75 | N50  | N25  | E-size | max   | sum    | Dosya adı                |
|----------------|--------|--------|-----|-----|------|------|--------|-------|--------|--------------------------|
| <b>9481489</b> | 873796 | 175860 | 500 | 778 | 1402 | 3370 | 2806   | 60535 | 1.07Gb | Mv1791BL1RS_unitigs.fa   |
| <b>7865718</b> | 798768 | 124527 | 500 | 931 | 2008 | 5578 | 4445   | 63129 | 1.19Gb | Mv1791BL1RS_contigs.fa   |
| <b>7786191</b> | 778926 | 116566 | 500 | 960 | 2139 | 6007 | 4778   | 75517 | 1.20Gb | Mv1791BL1RS_scaffolds.fa |

Çizelge 4.1 incelendiğinde, montajın aşamalar arasında kademeli olarak iyileştiği açıkça görülmektedir. "Unitig" düzeyinde 873 796 adet dizisel birim elde edilirken, "contig" aşamasında bu sayı 798.768'e, "scaffold" aşamasında ise 778 926'ya düşmüştür. Dizisel birim sayısındaki bu azalma, montajın ilerleyen basamaklarında parçaların daha büyük ve bütünlümlü yapılar halinde birleştirildiğini göstermektedir. Benzer şekilde, toplam montaj uzunluğu unitiglerde 1.07 Gb iken contiglerde 1.19 Gb'e ve scaffoldlarda 1.20 Gb'e yükselmiştir. Bu artış, montajın kapsayıcılığının ve genomik temsiliyetinin aşamalar arasında güçlendiğini işaret etmektedir.

Birleştirilmiş sekansın bütünlük göstergesi olan N50 değeri, unitig aşamasında 1402 bp iken contiglerde 2008 bp'ye, scaffoldlarda ise 2139 bp'ye ulaşmıştır. Bu artış, montajın daha uzun ve daha az parçalı diziler oluşturacak şekilde iyileştiğini göstermektedir. Benzer eğilim N25 ve N75 değerlerinde de ortaya çıkmış olup, N75 unitig aşamasında 778 bp iken contiglerde 931 bp'ye ve scaffoldlarda 960 bp'ye yükselmiştir. Bununla birlikte, büyük dizisel yapıların daha temsil edici

olduğu N25 değerinin unitiglerde 3370 bp, contiglerde 5578 bp ve scaffoldlarda 6007 bp olarak hesaplanmış olması, montajın ileri aşamalarında daha uzun genomik birimlerin başarıyla oluşturulduğunu göstermektedir.

Parçalanmışlığı gösteren L50 değeri, unitig aşamasında 175 860 iken contiglerde 124 527'ye, scaffold seviyesinde ise 116 566'ya düşmüştür. L50'nin azalması, daha az sayıdaki uzun dizinin toplam montajın yarısını oluşturduğunu ifade eder. Dolayısıyla söz konusu düşüş montaj kalitesinin artmış olduğunu göstermektedir. Ek olarak, en uzun dizinin scaffold aşamasında 75 517 bp'ye kadar ulaşması, montajın özellikle yapısal bütünleşme açısından başarılı olduğunu desteklemektedir.

Tüm bu veriler birlikte değerlendirildiğinde, Mv179 1BL1RS kromozomuna ait de novo sekans birleştirmenin aşamalar boyunca iyileştiği, daha uzun, daha bütünleşmiş ve daha az parçalı diziler oluşturduğu ve scaffold düzeyinde genomik yapının tatmin edici bir doğruluk ve bütünlükle temsil edildiği sonucuna varılmıştır.

De novo birleştirme(*De novo* Assembly) kalitesinin fonksiyonel düzeyde değerlendirilmesi amacıyla BUSCO (*Benchmarking Universal Single-Copy Orthologs*) v5.8.0 yazılımı kullanılmış ve analizler iki farklı soy veri seti üzerinde gerçekleştirilmiştir. İlk olarak bitkilere özgü 1 614 tek kopyalı çekirdek geni içeren "*embryophyta\_odb10*" veri seti kullanılmış, bu veri seti hem Miniprot tabanlı hizalama modunda (euk\_genome\_min) hem de AUGUSTUS tabanlı *ab initio* gen tahmin modunda (euk\_genome\_aug) çalıştırılmıştır. Böylece aynı genomik veri üzerinde iki farklı tahmin yaklaşımının performansı karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca, geniş taksonomik kapsama sahip 255 korunmuş geni içeren "*eukaryota\_odb10*" veri seti için Miniprot tabanlı analiz gerçekleştirilmiştir. Her üç koşula ait BUSCO sonuçları Çizelge 4.2.'de sunulmuştur.

Çizelge 4.2. BUSCO kalite analizlerinin karşılaştırılması

| Veri Seti (Lineage)             | embryophyta_odb10 | embryophyta_odb10 | eukaryota_odb10 |
|---------------------------------|-------------------|-------------------|-----------------|
| Araç/Mod                        | miniprot          | augustus          | miniprot        |
| <b>Complete (C)</b>             | 425               | 393               | 72              |
| <b>C (%)</b>                    | 26.3%             | 24.3%             | 28.2%           |
| <b>Complete Single-copy (S)</b> | 409               | 382               | 64              |
| <b>S (%)</b>                    | 25.3%             | 23.7%             | 25.1%           |
| <b>Complete Duplicated (D)</b>  | 16                | 11                | 8               |
| <b>D (%)</b>                    | 1%                | 0.7%              | 3.1%            |
| <b>Fragmented (F)</b>           | 192               | 146               | 50              |
| <b>F (%)</b>                    | 11.9%             | 9%                | 19.6%           |
| <b>Missing (M)</b>              | 997               | 1075              | 133             |
| <b>M (%)</b>                    | 61.8%             | 66.6%             | 52.2%           |
| <b>Total (n)</b>                | <b>1614</b>       | <b>1614</b>       | <b>255</b>      |

Çizelge 4.2 incelendiğinde, *embryophyta\_odb10* veri seti kullanılarak gerçekleştirilen analizlerde Miniprot modunun AUGUSTUS moduna kıyasla daha yüksek oranda tam (Complete)

BUSCO tespit ettiği görülmektedir. Miniprot ile 425 adet (%26.3) tam BUSCO belirlenirken, AUGUSTUS modunda bu sayı 393'e (%24.3) düşmektedir. Bununla birlikte Miniprot sonuçlarında tek kopyalı (Single-copy) tam BUSCO sayısının 409 (%25.3) olduğu, AUGUSTUS modunda ise bu değerin 382 (%23.7) olduğu görülmektedir. Bu durum, hizalama destekli yaklaşımın özellikle iyi korunmuş gen bölgelerini tespit etmede "*ab initio*" tahmine göre daha avantajlı olduğunu göstermektedir. Her iki yöntemde de yinelenmiş (Duplicated) BUSCO oranının oldukça düşük olması (%0.7–1), montajda yapay duplikasyon kaynaklı hataların yaygın olmadığını desteklemektedir.

Parçalı (Fragmented) BUSCO oranları karşılaştırıldığında, Miniprot analizinde 192 adet (%11.9), AUGUSTUS analizinde ise 146 adet (%9) parçalı BUSCO elde edilmiştir. Bu fark, hizalama tabanlı yöntemin daha fazla gen parçasını tespit etme eğiliminde olduğunu, ancak bu parçalı tespitlerin tam gen eksikliğiyle ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Eksik (Missing) gen sayıları ise her iki modda oldukça yüksektir. Miniprot analizinde 997 adet (%61.8), AUGUSTUS analizinde 1075 adet (%66.6) BUSCO'nun bulunamadığı tespit edilmiştir. Bu sonuç, 1BL.1RS bölgesinin büyük oranda tekrarlı dizilerden oluşması, montajın Illumina kısa okuma verilerine dayanması ve analiz edilen bölgelerin tüm genomu temsil etmemesi gibi faktörlerle uyumludur.

Daha geniş taksonomik kapsamlı "*eukaryota odb10*" veri seti ile yapılan analizde 72 adet tam BUSCO (%28.2) belirlenmiş, bunların büyük çoğunluğunu tek kopyalı genler (%25.1) oluşturmuştur. Bu analizde parçalı (fragmented) BUSCO oranının (%19.6) ve yinelenmiş (duplicated) oranının (%3.1) "*embryophyta*" analizlerine göre daha yüksek olduğu, eksik BUSCO oranının ise daha düşük olduğu (%52.2) saptanmıştır. Veri setinin toplam gen sayısının daha az olması nedeniyle daha küçük genomik özelliklerin bile "tam" olarak kabul edilebilmesi, bu farkın olası nedenleri arasında yer almaktadır.

Genel olarak BUSCO analizleri, çalışmada elde edilen 1BL.1RS montajının tam gen kapsamı açısından sınırlı olmakla birlikte, özellikle tek kopyalı korunmuş genlerin bir kısmının doğru biçimde temsil edildiğini göstermektedir. Ayrıca Miniprot "tabanlı analiz, yüksek tekrarlı içerik barındıran translokasyon bölgelerinde "*ab initio*" modellere kıyasla daha etkili olduğu görülmektedir. BUSCO oranlarının düşük olması, 1BL.1RS translokasyonunun tüm genomu temsil eden bir montaj olmaması, yalnızca bir kromozomdan elde edilmiş kısa okuma verilerine dayanması ve yapısal olarak büyük ölçüde tekrarlı elementlerden oluşmasıyla uyumludur.

#### **4.1.2. Mv179 1BL1RS Kromozomal Bölgesinde Tekrarlayan DNA Yapısının Karakterizasyonu**

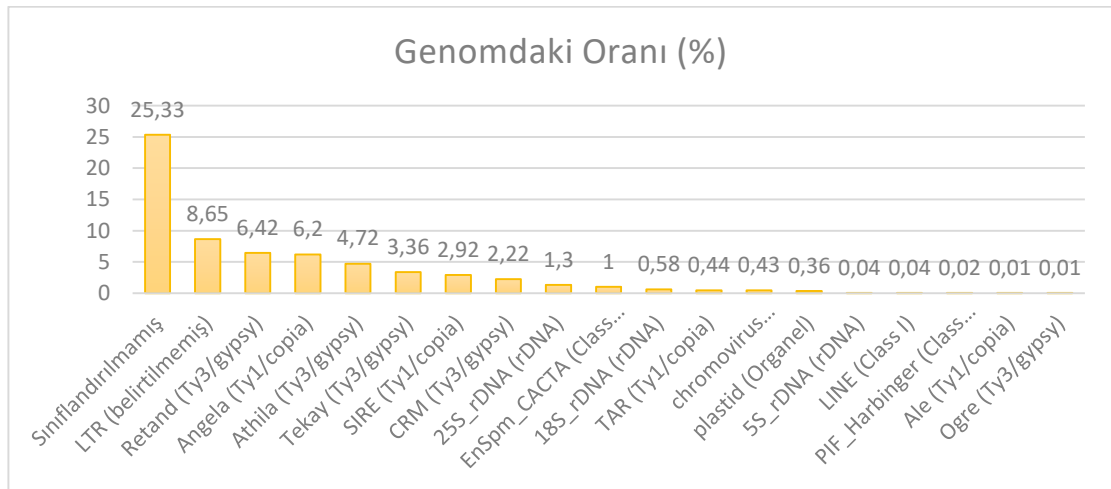
RepeatExplorer2 yazılımı, yüksek kopya sayılarına sahip tekrarlı DNA dizilerini belirlemek amacıyla grafik tabanlı bir kümeleme (clustering) yaklaşımı kullanmaktadır. Bu yöntem, ham sekans okumalarını benzerliklerine göre kümeler ayırarak, her bir kümenin belirli bir tekrar ailesini temsil etmesine olanak sağlamaktadır. Böylece, genomdaki baskın tekrar sınıfları, bu sınıfların göreceli bollukları ve yapısal organizasyonları kantitatif olarak ortaya konulabilmektedir.

Kümeleme analizi sonuçları incelendiğinde, toplam 625 598 okumanın %74.1'inin (463 763 okuma) 21 641 farklı süperküme içerisinde yer aldığı, geri kalan %25.9'unun (161 835 okuma) ise tekil (singlet) olarak kaldığı belirlenmiştir. Bu durum, analiz edilen 1BL1RS kromozomal segmentinde yüksek oranda tekrarlayan dizilerin bulunduğunu göstermektedir.

Süper kümelenme oranının yüksek olması, özellikle retrotranspozon kaynaklı LTR elemanlarının yoğunluğuna işaret ederken, singlet oranının ise genellikle düşük kopya sayılarına sahip gen bölgeleri veya nadir tekrar tiplerini temsil ettiği düşünülmektedir. Elde edilen bulgular, çavdar genomunun genelinde tekrarlayan dizilerin toplam genomun yaklaşık %85'ine kadar ulaşabildiğini bildiren önceki çalışmalarla uyum göstermektedir (Bartoš ve ark., 2008; Bauer ve ark., 2017). RepeatExplorer2 tabanlı analiz kapsamında toplam 1.997.104 ham okuma arasından 625.598 okumanın kümelenme sürecine dahil edildiği belirlenmiştir. Analiz sonuçlarına göre okumaların yaklaşık %64'ünün en büyük kümeler (top clusters) içerisinde yer aldığı saptanmıştır. Bu bulgu, incelenen 1BL.1RS kromozomal segmentinde yüksek oranda tekrarlayan DNA dizilerinin bulunduğunu ve az sayıdaki baskın tekrar ailesinin genomik içeriğin büyük bölümünü temsil ettiğini göstermektedir. Ayrıca, çift yönlü (paired-end) sekans verilerinin kullanılmış olması, tekrar kümelerinin yapısal organizasyonunun (örneğin LTR, satelit ve rDNA dizileri) daha doğru biçimde tanımlanmasına olanak sağlamıştır. Elde edilen bulgular Çizelge 4.3 ve Şekil 4.4'te verilmiştir.

Çizelge 4.3. Mv179 1BL.1RS kromozomunda tekrarlayan elementlerin sınıflandırılması ve genomdaki oranı (RepeatExplorer2)

| Tekrarlayan Element Sınıfı            | Genomdaki Oranı (%) |
|---------------------------------------|---------------------|
| <i>Sınıf I (Retrotranspozonlar)</i>   | 35.42               |
| LTR (Toplam)                          | 35.38               |
| <i>Ty1_copia</i> (Toplam)             | 9.57                |
| <i>Ty3_gypsy</i> (Toplam)             | 17.16               |
| LTR (Familyası Belirsiz)              | 8.65                |
| LINE                                  | 0.04                |
| <i>Sınıf II (DNA Transpozonları)</i>  | 1.02                |
| EnSpm_CACTA                           | 1.00                |
| PIF_Harbinger                         | 0.02                |
| <i>Ribozomal DNA (rDNA)</i>           | 1.92                |
| 45S (18S + 25S)                       | 1.88                |
| 5S                                    | 0.04                |
| <i>Diğer Sınıflandırılmış</i>         | 0.38                |
| Organel (Plastid)                     | 0.36                |
| Sınıflandırılmayan (Çelişkili Kanıt)  | 0.02                |
| <i>Sınıflandırılmayan (Kanıt Yok)</i> | 25.33               |
| <b>Toplam Kümelenen</b>               | <b>64.07</b>        |



Şekil 4.4. Mv179 1BL.1RS kromozomunda tekrarlayan elementlerin sınıflandırılması ve genomdaki oranına ait grafik

Çizelge 4.3 incelendiğinde Mv179 1BL.1RS kromozomundan elde edilen bulgular çavdar (*Secale cereale*) genomunun yüksek tekrar yoğunluğu ile karakterize edilen yapısıyla uyum göstermektedir. Daha önce yapılan çalışmalarda, çavdar genomunun yaklaşık %85-90'ının tekrarlayan dizilerden oluştuğu ve bu dizilerin büyük çoğunluğunu LTR retrotranspozonların, özellikle de *Ty1/Copia* ve *Ty3/Gypsy* sınıfı elementlerin oluşturduğu bildirilmiştir (Bartoš ve ark., 2008; Bauer ve ark., 2017). Bu elementlerin genellikle heterokromatik bölgelerde yoğunlaştığı, rekombinasyonun baskılanmasına ve genetik kararlılığın korunmasına katkı sağladığı belirtilmiştir (Flavell ve ark., 1974; Neumann ve ark., 2019).

Mv179 hattındaki 1BL.1RS kromozomunda çok sayıda tekrarlayan DNA dizisinin (repetitive sequences) bulunması, bu bölgenin çavdar kökenli heterokromatik (yoğun paketlenmiş ve gen bakımından daha az aktif) DNA segmentleri içerdiğini göstermektedir. Yapılan çalışmalarda bu durumun translokasyon bölgesinde rekombinasyonun baskılanmasına, genetik çeşitliliğin artmasına ve abiyotik stres koşullarına karşı dayanıklılığın desteklenmesine aracılık ettiği sonucuna varılmıştır. Tekrarlayan dizilerde gözlenen bu yoğunluğun, translokasyon segmentinin evrimsel olarak stabil kalmasına ve buğday genomu içerisinde uzun süre korunmasına olanak tanıdığı araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Molnár ve ark., 2015; Wang ve ark., 2023).

Önceki araştırmalar, çavdar kaynaklı translokasyonlarda özellikle *Ty3/Gypsy* retrotranspozonlarının baskın, *Ty1/Copia* elementlerinin ise daha sınırlı düzeyde olduğunu, bazı durumlarda ise satellit DNA kümelerinin kromozom uç bölgelerinde (telomerik ve subtelomerik alanlarda) yoğunlaştığını ortaya konulmuştur (Vershinin ve ark., 2002; Bartoš ve ark., 2008; Bauer ve ark., 2017).

RepeatExplorer2 analizinde tanımlanan kümelerin büyük çoğunluğunun Class I LTR retrotranspozonlara (%35,38) ait olduğu belirlenmiştir. Özellikle *Ty3/Gypsy* ve *Ty1/Copia* süper ailelerinin, 1BL.1RS kromozomal bölgesindeki tekrarlayan DNA içeriğinin önemli bir kısmını temsil ettiği saptanmıştır. Analiz sonucunda en fazla kümeye sahip tekrar gruplarının sırasıyla *Gypsy* (özellikle *OTA/Tat/Retand*, *Athila* ve *Tekay* alt aileleri) ile *Copia* (özellikle *Angela* ve *SIRE* alt aileleri) olduğu saptanmıştır.

*Gypsy* sınıfı elementlerin hem “non-chromovirus” (*OTA*, *Tat*, *Athila*) hem de “chromovirus” (*Tekay*, *CRM*) alt ailelerine ait üyelerinin geniş bir temsil oranına sahip olduğu belirlenmiştir. Bu bulgu, 1RS kolunun heterokromatik bölgelerinde *Gypsy* elemanlarının yoğunlaştığını bildiren önceki çalışmalarla uyum göstermektedir (Bauer ve ark., 2017; Neumann ve ark., 2019). *Copia* grubunda ise özellikle *Angela* ve *SIRE* elementlerinin belirgin olarak temsil edildiği görülmüştür.

Buna ek olarak, Class II DNA transpozonları arasında *EnSpm/CACTA*(%1) ve *PIF/Harbinger*(%0.02) elemanlarının düşük düzeyde tespit edildiği, dolayısıyla bu sınıfın toplam tekrar içeriğine katkısının sınırlı kaldığı belirlenmiştir. LINE tipi retrotranspozonların varlığı oldukça düşük düzeyde saptanmıştır. Ribozomal DNA (rDNA) kümeleri ise belirli cluster gruplarında

tanımlanmış, bu bulgu 1RS kolunun ribozomal DNA bölgeleri bakımından zengin olduğunu bildiren sitogenetik verilerle uyumlu bulunmuştur (Vershinin ve ark., 2002; Bartoš ve ark., 2008).

Sonuç olarak, 1BL.1RS kromozomal segmentinde retrotranspozon kökenli LTR elementlerinin baskın, DNA transpozonlarının ise oldukça sınırlı düzeyde temsil edildiği ortaya konmuştur. *Gypsy* ailesine ait *OTA/Tat/Retand* alt grubunun yüksek temsil oranı, bu kromozomal segmentin heterokromatik doğasıyla ilişkili olabileceğini göstermektedir. Bu durum, çavdar genomunda transpozonların özellikle heterokromatik bölgelerde birikim eğiliminde olduğunu ve buğday genomuna aktarılan 1RS segmentinin söz konusu özellikleri büyük ölçüde koruduğunu ortaya koymaktadır (Bauer ve ark., 2017; Molnár ve ark., 2015).

RepeatExplorer2 analizi, kısa okuma tabanlı “grafik temelli kümelenme” yaklaşımıyla tekrarlayan DNA elementlerinin hızlı biçimde sınıflandırılmasını ve bolluk oranlarının tahmin edilmesini sağlamaktadır. Ancak bu yöntem, ham dizileme verilerine dayanması nedeniyle yalnızca kümelenen tekrar dizilerinin birbirlerine göre genomda ne ölçüde temsil edildiğini gösterebilmekte, bu dizilerin mutlak (kesin) miktarlarını belirleyememektedir. Bu nedenle birleştirilmiş sekanstan(de novo assembly) elde edilen yüksek kaliteli 1BL.1RS kromozomal dizi üzerinde RepeatModeler2 ve RepeatMasker analizleri gerçekleştirilmiştir. RepeatModeler2, montaj verisinden türetilen tekrar dizilerini referans veri tabanlarından bağımsız biçimde tanımlayarak yeni bir “de novo” tekrar kütüphanesi oluşturmuştur. Bu kütüphane, tür veya soy-spesifik (lineage-specific) transpozon ailelerinin tanımlanmasında etkili olmuştur. Elde edilen konsensus tekrar dizileri, RepeatMasker aracı kullanılarak genom genelinde taranmış ve her bir tekrar sınıfının toplam genom içindeki oranı ile kapsadığı baz uzunluğu belirlenmiştir. Bu iki aşamalı yaklaşım sayesinde yalnızca tekrarlayan dizilerin bolluk oranları değil, aynı zamanda genom üzerindeki konumsal dağılımları, yapısal sınıfları ve genom organizasyonuna katkı oranları da ortaya konulmuştur. Ayrıca bu analiz süreci, gen tahmini (AUGUSTUS) aşamasında tekrarlayan bölgelerin maskeleymesi yoluyla yanlış pozitif tahminlerin engellenmesine katkı sağlamıştır. Elde edilen bulgular Çizelge 4.4.’de verilmiştir.

Repeat Modeler 2 ve Repeat Masker analizleri sonucunda, toplam uzunluğu 2.47 Gb olan 1BL.1RS kromozomal montajın %85.93’ünün tekrarlayan DNA dizilerinden oluştuğu belirlenmiştir. Maskelenen toplam baz uzunluğu 2.14 Gb olarak hesaplanmıştır. Bu durum, translokasyon segmentinin büyük oranda tekrarlayan elementlerle kaplı olduğunu göstermektedir. Elde edilen oran, çavdar (*Secale cereale*) genomu için bildirilen yüksek tekrar oranlarıyla uyum göstermektedir ve 1RS kökenli segmentin yapısal özelliklerinin 1BL.1RS translokasyonu içerisinde korunduğunu desteklemektedir (Bartoš ve ark., 2008; Bauer ve ark., 2017). Bartoš ve ark (2008) tarafından 1RS kromozom kolu üzerinde yürütülen BAC uç dizileme çalışmasında, elde edilen dizilerin en az %84’ünün tekrarlayan DNA elemanlarından oluştuğu bildirilmiştir. Bu bulgu, 1RS kolunun yoğun transpozon içeriğine sahip heterokromatik yapısını ortaya koymuştur. Bauer ve ark (2017) çavdar genomunun yaklaşık %90’ının tekrarlayan dizilerden oluştuğunu ve bu dizilerin büyük bölümünü

*Ty3/Gypsy* ve *Ty1/Copia* LTR retrotranspozonlarının oluşturduğunu bildirmiştir. Bu veriler, 1BL.1RS translokasyon hattında gözlenen yüksek tekrar oranının çavdar kökenli segmentlerin yapısal özellikleriyle tutarlı olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.4. Mv179 1BL.1RS kromozomunda tekrarlayan elementlerin sınıflandırılması ve genomdaki oranı(RepeatModeler2)

| <b>Tekrarlayan Element Sınıfı</b>     | <b>Genomdaki Oranı (%)</b> |
|---------------------------------------|----------------------------|
| <i>Sınıf I (Retrotranspozonlar)</i>   | 31.65                      |
| LTR (Toplam)                          | 30.21                      |
| <i>Ty1_copia</i> (Toplam)             | 9.84                       |
| <i>Ty3_gypsy</i> (Toplam)             | 20.27                      |
| LTR (Diğer)                           | 0.09                       |
| LINE                                  | 1.39                       |
| SINE                                  | 0.05                       |
| Penelope                              | 0.01                       |
| <i>Sınıf II (DNA Transpozonları)</i>  | 2.21                       |
| MULE-MuDR                             | 0.27                       |
| Tourist/Harbinger                     | 0.27                       |
| hobo-Activator                        | 0.02                       |
| DNA Transpozon(Familyası Belirsiz)    | 1.65                       |
| <i>Diğer Sınıflandırılmış</i>         | 0.38                       |
| Basit Tekrarlar                       | 0.44                       |
| Küçük RNA(Small RNA)                  | 0.33                       |
| Satellitler                           | 0.01                       |
| <i>Sınıflandırılmayan (Kanıt Yok)</i> | 52.06                      |
| <b>Toplam Kümelenen</b>               | <b>85.93</b>               |

Bauer ve ark (2017), tarafından gerçekleştirilen çavdar tam genom dizileme çalışmasında, tekrarlayan dizilerin genomun en az %72'sini oluşturduğu ve bu dizilerin büyük kısmını LTR retrotranspozonların (%60) meydana getirdiği bildirilmiştir. DNA transpozonlarının ise yaklaşık %7 oranında temsil edildiği saptanmıştır. Araştırmacılar, *Copia* ve *Gypsy* alt ailelerinin çavdar genomundaki baskın retrotranspozon gruplarını oluşturduğunu ve bu elementlerin Triticeae türlerinde görülen yoğun mobil element birikimiyle uyumlu olduğunu belirtmişlerdir. Li ve ark (2021), yüksek kaliteli Weining çavdar sekansının %90.31'inin tekrarlayan dizilerden oluştuğunu bildirmiştir. Bu bulgular, 1BL.1RS translokasyon hattında belirlenen %85.93'lik tekrar oranının, çavdar genomunun doğal yapısal özellikleriyle yüksek düzeyde uyum gösterdiğini ortaya koymaktadır. Toplam dizinin %85.93'ünün “dağının tekrarlar” olarak tanımlandığı saptanmıştır. Bu

tekrarların büyük çoğunluğunu Class I retrotranspozonlar, özellikle LTR elementleri oluşturmuştur. Retroelementler sınıfının toplam genomun %31.65'ini temsil ettiği, bunun %30.21'lik kısmının LTR elemanlarından oluştuğu belirlenmiştir. LTR elemanları içerisinde *Ty3/Gypsy* süper ailesinin (%20.27), *Ty1/Copia* süper ailesine (%9.84) kıyasla daha yüksek oranda temsil edildiği tespit edilmiştir. Bu dağılımın, *Gypsy* elementlerinin heterokromatik bölgelerde birikim eğilimi gösterdiğini bildiren önceki çalışmalarla uyum gösterdiği belirlenmiştir (Neumann ve ark., 2019).

*Ty3/Gypsy* grubuna ait elementlerin hem non-chromovirus (*OTA*, *Tat*, *Athila*) hem de chromovirus (*Tekay*, *CRM*) alt ailelerine ait üyelerinin genomun önemli bir kısmını oluşturduğu saptanmıştır. *Ty1/Copia* süper ailesinde ise *Angela* ve *SIRE* alt ailelerinin belirgin biçimde temsil edildiği görülmüştür. Bu sonuçların, RepeatExplorer2 analizinde tanımlanan baskın tekrar kümeleriyle yüksek düzeyde uyum gösterdiği ve iki farklı metodolojinin birbirini doğruladığı ortaya konulmuştur.

DNA transpozonlarının (Class II) toplam genomun %2,21'ini oluşturduğu, bu sınıf içerisinde *EnSpm/CACTA* ve *PIF/Harbinger* elementlerinin düşük düzeyde temsil edildiği belirlenmiştir. Bu elementlerin genom yapısında ikincil düzeyde rol oynadığı düşünülmektedir.

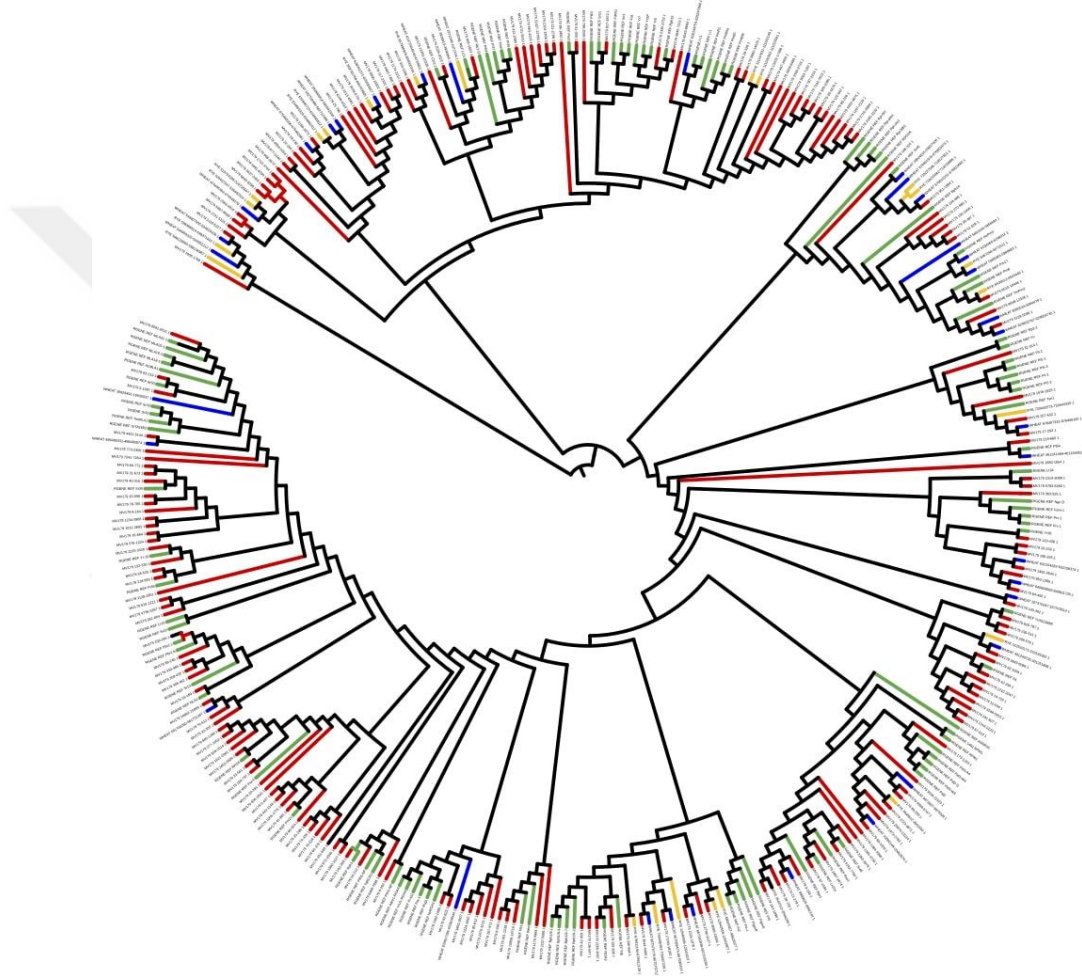
Analiz sonucunda, toplam dizinin %52,06'sının "sınıflandırılmayan" olarak tanımlandığı belirlenmiştir. Bu yüksek oran, mevcut tekrar veri tabanları (Dfam, Repbase) ve bilinen sınıflandırma şemalarıyla ilişkilendirilemeyen geniş bir tekrar fraksiyonunun varlığına işaret etmektedir. Bu durumun, 1BL.1RS kromozomal segmentinin soy-spesifik veya evrimsel olarak farklılaşmış transpozon aileleri içerdiğini göstermektedir.

RepeatExplorer2 analizinde tanımlanan "sınıflandırılmayan" kümelerin bu sonuçla paralellik gösterdiği belirlenmiştir. Ham okuma tabanlı kümeleme analizi ile montaj tabanlı maskeleye analizinin birbirini tamamladığı görülmüştür. RepeatExplorer2 analizinin, baskın tekrar ailelerinin göreceli bolluklarını nitel olarak ortaya koyduğu, RepeatModeler2–RepeatMasker kombinasyonunun ise bu tekrarların genom genelindeki konumsal kapsamını ve toplam oranlarını nicel olarak ortaya çıkardığı tespit edilmiştir.

Bu iki yaklaşımın birlikte uygulanmasıyla, 1BL.1RS translokasyon bölgesinin tekrar yapısının hem nicel (oran, yüzdelik kapsam) hem de nitel (sınıf, yapı, köken) yönleriyle bütüncül biçimde aydınlatıldığı sonucuna varılmıştır. Elde edilen bulgular, 1BL.1RS kromozomal segmentinin büyük ölçüde LTR retrotranspozonlarca yapılandırılmış, yüksek oranda heterokromatik, zengin fakat önemli bir kısmı henüz tanımlanmamış transpozonlardan oluşan karmaşık bir genomik yapıya sahip olduğunu göstermiştir. Bu özelliklerin, 1RS kolunun evrimsel olarak stabil kalmasına, rekombinasyonun baskılanmasına ve buğday genomu içerisinde uzun süre korunmasına katkı sağladığı değerlendirilmektedir (Molnár ve ark., 2015; Wang ve ark., 2023).

#### 4.1.3. NLR Genlerinin Tanımlanması ve Filogenetik Analizi

Mv179 1BL.1RS kromozomu ile birlikte ekmeklik buğday (*Triticum aestivum*) ve çavdar (*Secale cereale*) genomlarında yer alan NLR genlerinin evrimsel ilişkilerini ortaya koymak amacıyla yapılan filogenetik analiz sonuçları Şekil 4.5'te sunulmuştur. Bu analiz, üç farklı türden elde edilen NLR proteinlerinin karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesine olanak sağlayarak Mv179 1BL.1RS translokasyon bölgesinin NLR repertuarının kökenini ve diğer türlerle olan ilişkisini incelemek için kullanılmıştır.



Şekil 4.5. NLR Genlerinin filogenetik ağacı (Yeşil: Dayanıklılık Genleri Kırmızı: Mv179 1BL1RS Sarı: Çavdar(Lo7) Mavi: Ekmeklik Buğday(IWGSC))

Analiz kapsamında önce “NLR-Annotator” tarafından tanımlanan aday NLR lokusları genom koordinatları üzerinden “FASTA” formatında çıkarılmış, bu diziler “Transeq” aracılığıyla protein dizilerine dönüştürülmüştür. Erken durdurma kodonu içeren sekanslar elenmiş ve yalnızca tam uzunluklu, biyolojik olarak anlamlı olabilecek diziler analizlere dahil edilmiştir. Ardından, bu protein dizilerinde NB-ARC domaininin varlığı “HMMER” kullanılarak “Pfam NB-ARC” (PF00931) modeline karşı doğrulanmış ve yalnızca bu domaini yüksek güvenilirlikte taşıdığı belirlenen genler

filogenetik analiz için seçilmiştir. Böylece, tüm dizilerde ortak olan korunan işlevsel çekirdek domain üzerinden güvenilir bir hizalama sağlanmıştır.

Filogenetik ağacın oluşturulmasında NB-ARC domaini taşıdığı doğrulanan protein dizileri MAFFT ile hizalanmış, ardından IQ-TREE ile maksimum olabilirlik yaklaşımına dayalı filogenetik modelleme gerçekleştirilmiştir. Model seçimi ModelFinder tarafından otomatik olarak yapılmış ve yüksek bootstrap değerleri ağacın istatistiksel güvenilirliğini artırmıştır. Ortaya çıkan filogenetik yapı iTOL platformunda görselleştirilmiş, buğday NLR genleri mavi, çavdar NLR genleri sarı, Mv179 1BL1RS bölgesine ait NLR genleri kırmızı ve literatürde fonksiyonları bilinen direnç genleri yeşil renk ile belirtilmiştir.

Elde edilen filogenetik ağaç, NB-ARC domaininin bütün örneklerde korunduğunu ve genel topolojinin bu ortak domain üzerinden şekillendiğini göstermektedir. Bununla birlikte, tam uzunluklu NLR proteinlerinde yer alan LRR, CC veya TIR gibi daha değişken domainlerin dolaylı filogenetik sinyal sağlayarak belirli alt grupların ayrışmasına katkı sunduğu değerlendirilmiştir. Bu nedenle oluşturulan ağaç, yalnızca NB-ARC domainine indirgenmiş bir analizden daha kapsamlı bir evrimsel görünüm sunmaktadır. Ancak temel ayrımlar esas olarak NB-ARC domain dizisindeki farklılıklara dayanmaktadır. MV179 hattına ait 1BL.1RS kromozomu üzerinde tanımlanan NLR genlerinin bazı bilinen hastalık dayanıklılık genleriyle (Lr21, Pm2, Sr21, Lr34, Yr36, Sr46, Lr22a, Pm21, Yr10, Sr35 ve Sr50) aynı veya birbirine çok yakın filogenetik dallarda yer aldığı saptanmıştır. Bu yakınlık, MV179 1BL.1RS bölgesindeki genlerin söz konusu dayanıklılık genleriyle ortak bir evrimsel köken paylaşabileceğini ya da bu genlerin benzer işlevsel özellikler taşıyabileceğini düşündürmektedir.

Bu bulgu, 1BL.1RS bölgesinde yer alan NLR genlerinin, hastalık dayanıklılığıyla ilişkili çalışmalar için önemli bir genetik kaynak oluşturabileceğine işaret etmektedir. Özellikle bu bölgede yer alan ve dayanıklılık genleriyle yakın kümelenme gösteren diziler, fonksiyonel analizler veya dayanıklılık gen varyantlarının belirlenmesi gibi ileri çalışmalar için potansiyel aday genler olarak değerlendirilebilir.

Genel olarak sonuçlar, buğday ve çavdar NLR repertuarlarının belirgin biçimde ayrı alt gruplarda toplandığını, Mv179 örneğinin ise çoğunlukla çavdar kökenli alt gruplarda konumlandığını göstermektedir. Bu bulgu, 1BL.1RS translokasyon segmentinin yapısal bütünlüğünü koruduğunu ve Mv179'ın NLR içeriğinin evrimsel olarak çavdar genomu ile yüksek düzeyde uyumlu olduğunu doğrulamaktadır. Ayrıca, analizde yer alan fonksiyonel direnç genlerinin ağaç içindeki konumları, literatürde bildirilen evrimsel ilişkilerle tutarlılık göstermiştir.

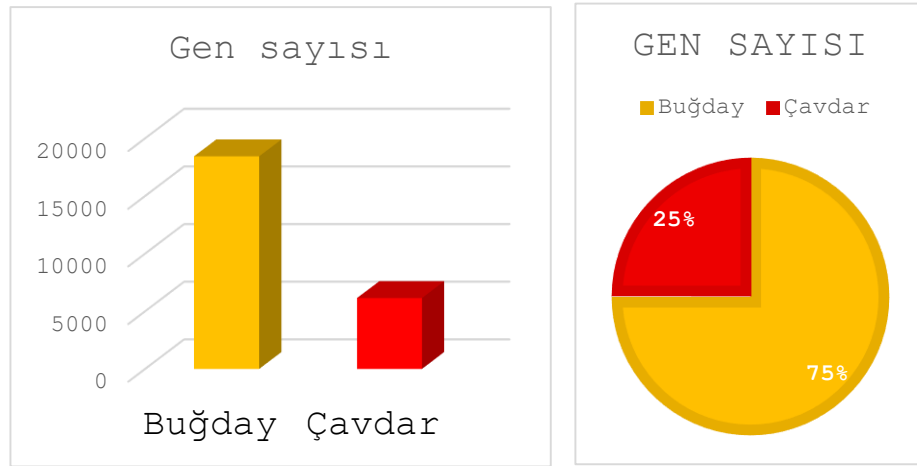
Bu kapsamlı filogenetik değerlendirme, Mv179 1BL.1RS bölgesinin NLR genetik peyzajını hem çavdar hem de buğday karşısında konumlandırmakta ve translokasyonun hastalık direnci açısından taşıdığı potansiyel katkıların daha ayrıntılı biçimde anlaşılmasına olanak sağlamaktadır.

#### 4.1.4. Mv179 1BL1RS Kromozomunun Homoloji Tabanlı Karşılaştırma Analizleri

1BL.1RS kromozom dizisi üzerinde yer alan gen bölgelerini belirlemek amacıyla gen tahmini analizi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla kullanılan yazılım aracılığıyla (AUGUSTOS) olası ekzon/intron yapıları tanımlanmış ve bu bölgelerden türetilen protein kodlayan diziler elde edilmiştir. Böylece Mv179 1BL.1RS kromozomunu temsil eden de novo birleştirilmiş sekans(de novo assembly) üzerinde işlevsel olma potansiyeli taşıyan aday gen seti oluşturulmuştur.

Elde edilen protein dizileri, köken ve benzerlik ilişkilerini ortaya koymak amacıyla hem ekmeklik buğdayın (*Triticum aestivum*, 1B kromozomu) hem de çavdarın (*Secale cereale*, Lo7 1R kromozomu) referans protein dizileriyle karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırmalarda her bir proteine ait çok sayıda hizalama sonucu elde edilmiştir. Ancak biyolojik olarak anlamlı eşleşmelerin belirlenebilmesi için benzerlik oranı, hizalama uzunluğu, kapsanan bölge oranı ve istatistiksel anlamlılık düzeyi gibi çeşitli kalite ölçütleri uygulanmıştır. Filtreleme adımı sonrasında, analizlerin sadeleştirilmesi ve kesinliğin artırılması amacıyla, her bir gen için en yüksek hizalama skoruna sahip olan kayıt "en iyi eşleşme" (best hit) olarak kabul edilmiştir.

Bu yaklaşım sonucunda 1BL.1RS bölgesindeki protein kodlayan dizilerden toplam 24.547 tanesinin referans genomlarda anlamlı bir karşılığının bulunduğu saptanmıştır. Bu genlerin 18.441'inde en güçlü eşleşmenin *Triticum aestivum* 1B kromozomuna, 6.106'sında ise *Secale cereale* 1R kromozomuna ait proteinlerle olduğu belirlenmiştir. Bu dağılım, 1BL.1RS kromozomundaki genlerin büyük bölümünün buğday genomuyla yüksek düzeyde benzerlik gösterdiğini (%75), buna karşın dikkate değer sayıda genin çavdar kökenine daha yakın (%25) olduğunu göstermektedir. Bu sonuçların genel görünümü Şekil 4.6'da verilmiştir.

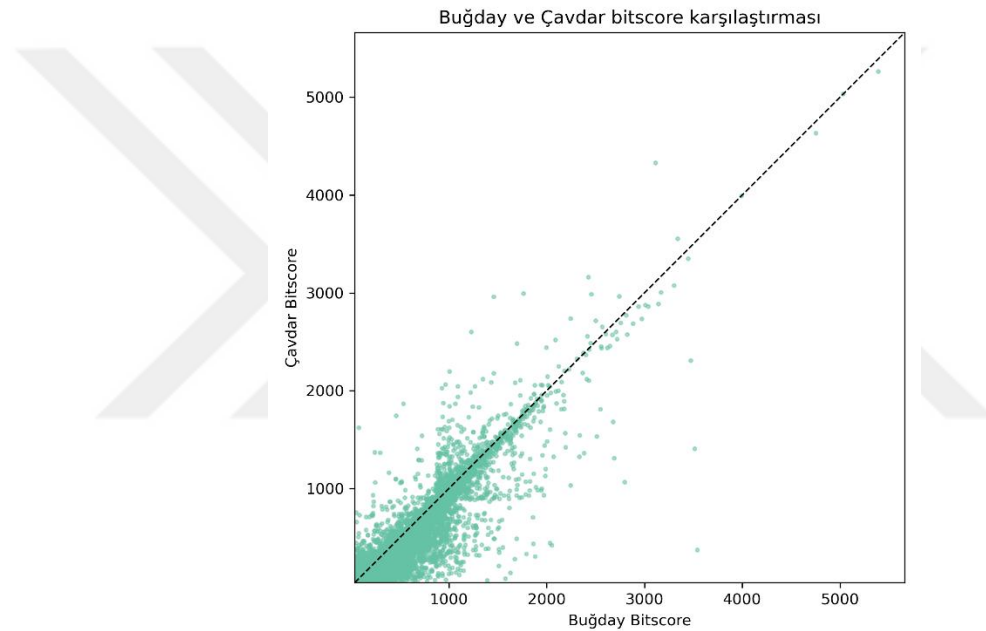


Şekil 4.6. Karşılaştırma analizinin buğday 1B ve çavdar 1R kromozomlarına eşleşme oranlarına ait grafik

Bu dağılım, segmentin bilinen yapısal kökeniyle uyumludur. Translokasyonun uzun kol (1BL) kısmı buğday kökenlidir ve bu bölgede yer alan genlerin büyük kısmı buğdaydaki homolog proteinlerle daha yüksek benzerlik göstermektedir. Kısa kolun (1RS) çavdar kökenli olması ise

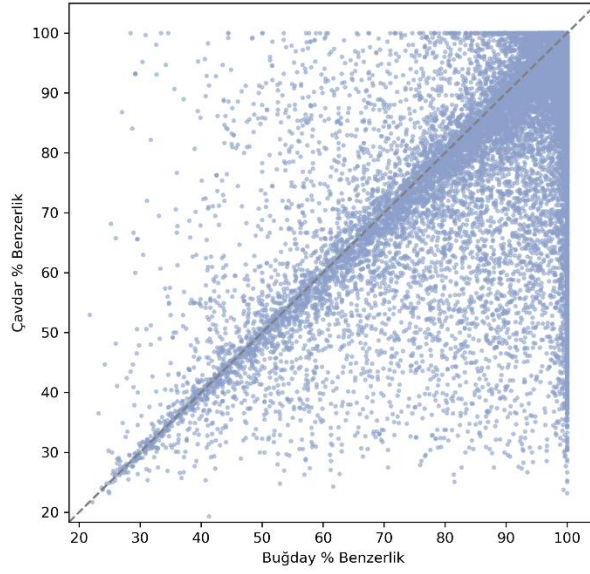
avdara en yakın eşleşmeye sahip genlerin genom içerisinde belirli bir oranda yoğunlaşmasıyla uyumludur. avdar homologlarının varlığı, IRS kökenli kısa kolun translokasyon sonrası genom içinde yapısal bütünlüğünü büyük ölçüde koruduğunu ve bu bölgeye özgü genetik içeriğın işlevsel olarak sürdürüldüğünü göstermektedir.

Buğday ve avdar dizi eşleşmelerinin bitskor grafiğı Şekil 4.7’de verilmiştir. Şekil 4.7 incelendiğinde buğday ve çavdara ait bitskor(iki dizinin benzerliğini istatistiksel olarak ölçen skor) değeri çoğunlukla köşegen çizgi etrafında toplanmıştır. Bu durum, genlerin büyük bölümünde iki tür için elde edilen hizalama kalitelerinin birbirine yakın olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, bazı genlerin bu çizgiden sapması, bu genlerin bir türde diğeriye kıyasla daha güçlü hizalama benzerliğı (daha yüksek bitskor) gösterdiğini ortaya koymaktadır.



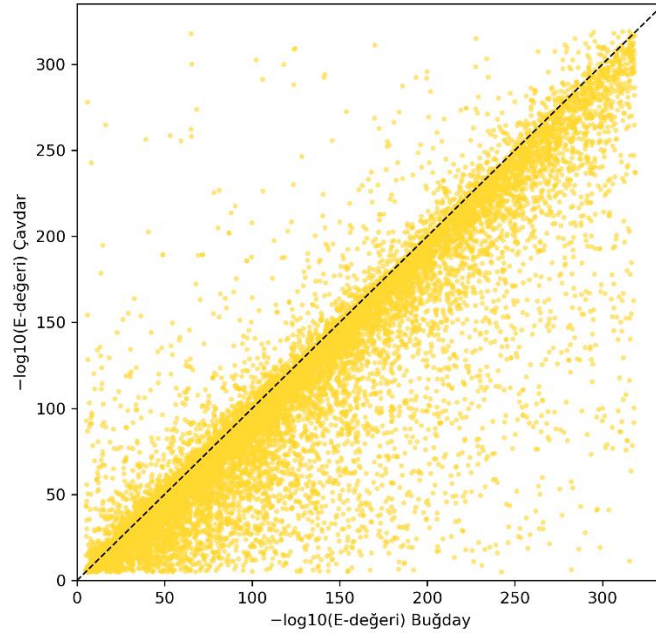
Şekil 4.7. Buğday ve avdar dizi eşleşmelerinin bitskor grafiğı

Buğday ve avdar dizi eşleşmelerinin benzerlik yüzdeleri Şekil 4.8’de verilmiştir. Şekil 4.8 incelendiğinde benzerlik oranları geniş ölçüde köşegen çevresinde kümelenmiştir. Bu desen, dizisel benzerliğın genel olarak her iki türde de benzer seviyede olduğunu ifade etmektedir. Köşegenden sapmalar, bazı genlerin buğdayda ya da çavdarda daha yüksek benzerlik değeriine sahip olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.8. Buğday ve Çavdar dizi eşleşmelerinin benzerlik yüzdeleri

E-değeri bazında hizalama anlamlılık karşılaştırılması Şekil 4.9’da verilmiştir. Şekil 4.9’da ifade edilen hizalama anlamlılığına ilişkin değerler incelendiğinde, genlerin çoğunun buğday ve çavdar arasında benzer anlamlılık düzeyleri sergilediği görülmektedir. Çizgiden yukarı veya aşağı yönlü sapmalar, bazı genlerin bir türde diğerine göre daha düşük E-değeri (daha anlamlı hizalama) gösterdiğini ifade etmektedir. Bu grafiklerin tümü birlikte değerlendirildiğinde, 1BL.1RS kromozomundaki genlerin büyük bölümünde buğday ve çavdar homologlarının benzer seviyede korunmuş olduğu, yalnızca sınırlı sayıda genin bir türde diğerine göre daha güçlü hizalamalar sergilediği anlaşılmaktadır. Bu durum, buğday ile çavdar genomlarının ortak genetik mirasına işaret etmektedir.

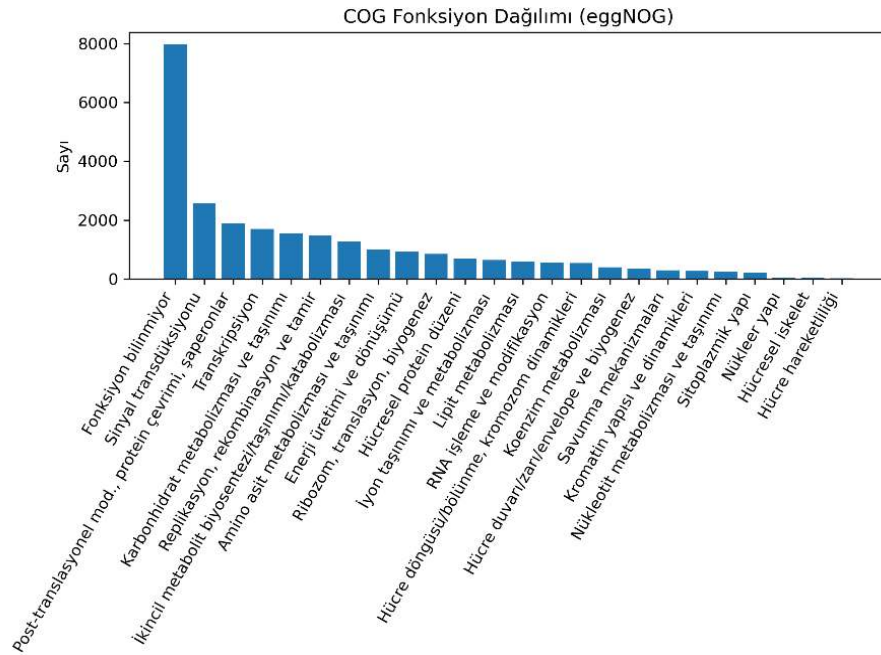


Şekil 4.9. E-değeri bazında hizalama anlamlılık karşılaştırılması

Fonksiyonel anotasyon sürecinde, kodlanan proteinlerin evrimsel olarak korunmuş biyolojik rollerinin belirlenmesi amacıyla ortoloji temelli bir yaklaşım kullanılmıştır. Bu kapsamda gerçekleştirilen “eggNOG-mapper” analizi, proteinlerin geniş ölçekli fonksiyonel sınıflandırılmasına olanak sağlamıştır. "eggNOG-mapper" analizinden elde edilen ortolog grup kümeleri (Clusters of Orthologous Groups) fonksiyon kategorileri, 1BL.1RS segmentine ait proteinlerin biyolojik süreçler, metabolik yollar ve hücrel mekanizmalar açısından geniş bir işlevsel çeşitlilik sergilediğini göstermektedir. COG sınıflarına ait dağılım Çizelge 4.5 ve Şekil 4.10’da sunulmuştur.

Çizelge 4.5. Ortolog grup küme sınıflarına ait dağılım

| COG | Kategori                                             | Sayı |
|-----|------------------------------------------------------|------|
| S   | Fonksiyon bilinmiyor                                 | 7990 |
| T   | Sinyal transdüksiyonu                                | 2580 |
| O   | Post-translasyonel mod., protein çevrimi, şaperonlar | 1895 |
| K   | Transkripsiyon                                       | 1700 |
| G   | Karbonhidrat metabolizması ve taşınımı               | 1547 |
| L   | Replikasyon, rekombinasyon ve tamir                  | 1470 |
| Q   | İkincil metabolit biyosentezi/taşınımı/katabolizması | 1278 |
| E   | Amino asit metabolizması ve taşınımı                 | 996  |
| C   | Enerji üretimi ve dönüşümü                           | 924  |
| J   | Ribozom, translasyon, biyogenez                      | 849  |
| U   | Hücrel protein düzeni                                | 676  |
| P   | İyon taşınımı ve metabolizması                       | 644  |
| I   | Lipit metabolizması                                  | 583  |
| A   | RNA işleme ve modifikasyon                           | 568  |
| D   | Hücre döngüsü/bölünme, kromozom dinamikleri          | 544  |
| H   | Koenzim metabolizması                                | 400  |
| M   | Hücre duvarı/zarı/envelope ve biyogenez              | 353  |
| V   | Savunma mekanizmaları                                | 299  |
| B   | Kromatin yapısı ve dinamikleri                       | 267  |
| F   | Nükleotit metabolizması ve taşınımı                  | 239  |
| Z   | Sitoplazmik yapı                                     | 209  |
| Y   | Nükleer yapı                                         | 52   |
| W   | Hücrel iskelet                                       | 43   |
| N   | Hücre hareketliliği                                  | 29   |



Şekil 4.10. COG fonksiyon dağılım grafiği

Analiz sonucunda en geniş grubu oluşturan kategori, “Fonksiyonu bilinmeyen proteinler” (COG-S  $n = 7.990$ ) olduğu belirlenmiştir. Bu durum, translokasyon bölgesinde henüz karakterize edilmemiş veya referans veri tabanlarında karşılığı bulunmayan proteinlerin yoğunluğunu göstermektedir. Literatürde, özellikle tekrar dizisi (repeat) içeriği yüksek olan kromozom bölgelerinde bu tip tanımlanamayan proteinlerin oranının arttığı bilinmektedir. *De novo* birleştirilmiş sekansın (De novo assembly) uzun okuma veya kromozomal iskeletleme yöntemleri kullanılmadan oluşturulmuş olması da bazı protein dizilerinin tam uzunlukta yakalanamamasına ve bu nedenle belirli fonksiyonel sınıflara atanamamasına katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Dolayısıyla “fonksiyonu bilinmeyen” kategorisinin yüksekliği hem segmentin genomik karmaşıklığıyla hem de mevcut anotasyon yöntemlerinin sınırlılıklarıyla uyumlu bir bulgudur.

İkinci en büyük kategori olan “Sinyal transdüksiyonu” (COG-T,  $n = 2580$ ) hücre içi iletişim, çevresel sinyallerin algılanması ve stres yanıtlarıyla ilişkili genlerin varlığını göstermektedir. Bu durum, özellikle çavdar kökenli IRS kısa kolunda bulunan savunma ve stres toleransı ile ilişkili gen kümelerinin varlığıyla uyum göstermiştir.

Bunu takip eden büyük kategoriler arasında post-translasyonel modifikasyon, şaperonlar (COG-O,  $n = 1895$ ), transkripsiyon (COG-K,  $n = 1700$ ), karbonhidrat metabolizması ve taşınımı (COG-G,  $n = 1547$ ) yer almaktadır. Bu gruplar, protein katlanması, gen ifade düzenlenmesi ve temel karbon metabolizması gibi hücre düzeyinde temel süreçlerin IRS segmentinde yaygın olduğunu göstermektedir.

Replikasyon, rekombinasyon ve tamir (COG-L,  $n = 1470$ ) kategorisinin önemli sayıda gen içermesi, özellikle translokasyon bölgelerinde sık gözlenen genetik istikrarı koruma mekanizmalarının varlığına işaret etmektedir. Aynı şekilde ikincil metabolit biyosentezi (COG-Q,  $n = 1278$ ) ve amino asit metabolizması (COG-E,  $n = 996$ ) gibi kategorilerin temsil edilmesi, segmentte çeşitli metabolik yollara katkı sağlayan gen gruplarının bulunduğunu göstermektedir.

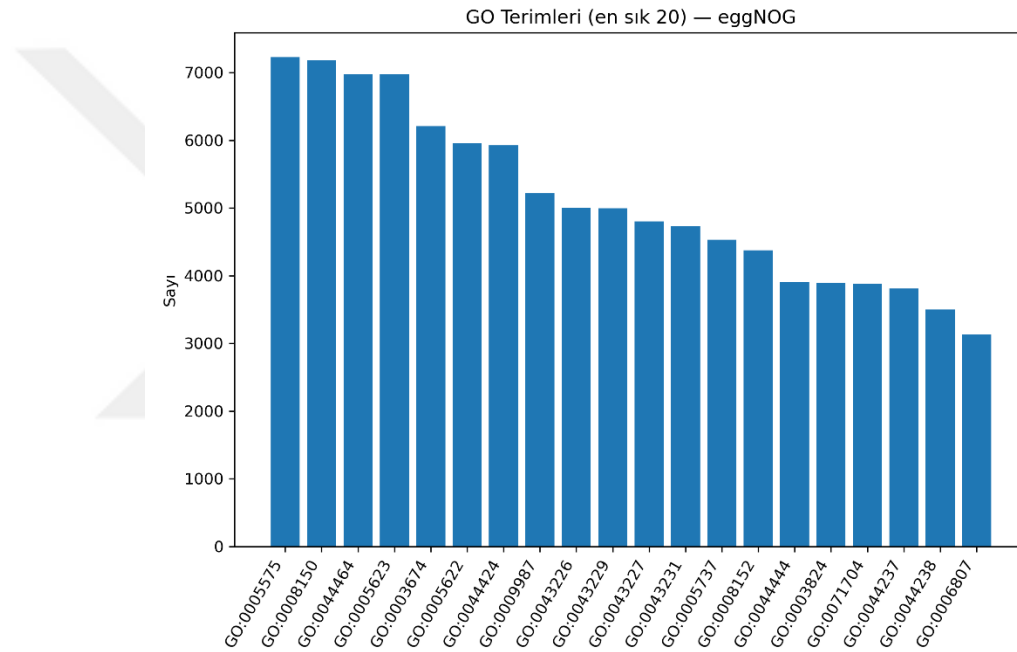
Daha düşük ancak anlamlı düzeyde temsil edilen kategoriler arasında enerji üretimi (COG-C), ribozomal biyogenez (COG-J) ve hücre protein düzenlenmesi (COG-U) bulunmaktadır. Bu kategoriler temel hücre işlevlerinin segment genelinde yaygın biçimde korunduğuna işaret etmektedir.

Fonksiyonel olarak daha özel alanlara karşılık gelen kategoriler ise daha düşük sayılarla temsil edilmiştir. Bunlar arasında lipit metabolizması (COG-I), RNA işleme ve modifikasyon (COG-A), koenzim metabolizması (COG-H) ve savunma mekanizmaları (COG-V) yer almaktadır. Özellikle savunma mekanizmalarına ilişkin genlerin bulunması, IRS kısa kolunun bilinen patojen direnç genleriyle ilişkili karakteristiğini desteklemektedir.

En düşük sayıda temsil edilen gruplar arasında nükleer yapı (COG-Y), hücre iskelet (COG-W) ve hücre hareketliliği (COG-N) bulunmaktadır. Bu durum, segmentin söz konusu hücre yapılarına daha sınırlı bir katkı sunduğunu göstermektedir.

Genel olarak, COG fonksiyonları 1BL.1RS kromozomunun hem buğday hem çavdar genomlarından gelen karma genetik yapısını yansıttığı saptanmıştır. Temel metabolizma, stres yanıtı, gen düzenlenmesi ve protein işleme gibi geniş bir yelpazeye yayılan biyolojik işlevlerin bu segmentte temsil edildiğini ortaya koymaktadır.

Mv179 1BL.1RS kromozomuna ait protein kodlayan dizilerin fonksiyonel özelliklerini belirlemek amacıyla gerçekleştirilen GO (Gene Ontology) ve KEGG(Kyoto Genler ve Genomlar Ansiklopedisi) yolak analizleri, bu bölgedeki genlerin geniş bir biyolojik işlev yelpazesine katkı sunduğunu göstermiştir. Elde edilen GO-BP(Biyolojik Süreç), GO-MF(Moleküler Fonksiyon) ve GO-CC(Hücreyel Bileşen) kategorileri içerisinde en sık bulunan ilk 20 terim Şekil 4.11’de sunulmuştur.

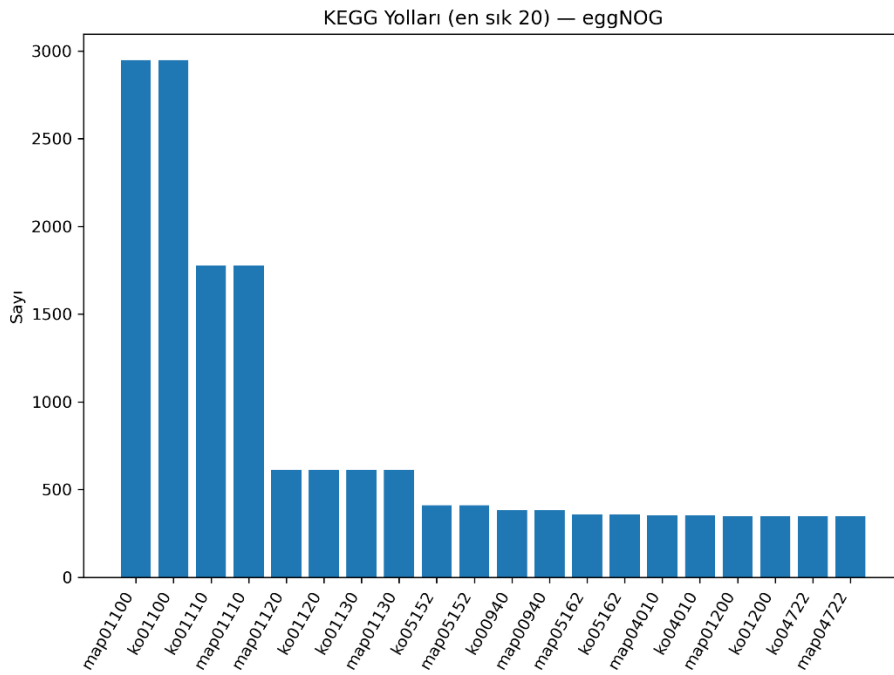


Şekil 4.11. En sık bulunan 20 GO terimi

Şekil 4.11 incelendiğinde, GO terimlerinin büyük ölçüde metabolik süreçler, organik bileşiklerin dönüşümü, hücreyel yapılar ve temel moleküler aktiviteler gibi kapsamlı fonksiyon gruplarında yoğunlaştığı görülmektedir. Özellikle “organik madde metabolizması” (GO:0071704), “hücreyel metabolik süreçler” (GO:0044237) ve “azotlu bileşik metabolizması” (GO:0006807) gibi kategorilerin yüksek düzeyde temsil edilmesi, segmentte metabolik adaptasyon ve hücreyel düzenleme ile ilişkili genlerin baskın olduğunu göstermektedir. GO-MF düzeyinde en sık görülen kategorilerin “katalitik aktivite” (GO:0003824) ile iyon/nükleotit bağlanması gibi temel moleküler işlevlere işaret etmesi, 1BL.1RS bölgesinde özellikle enzimatik reaksiyonları ve hücreyel metabolizmayı yöneten proteinlerin yaygın olduğunu göstermektedir. GO-CC kategorilerinde ise “sitoplazma” (GO:0005737), hücre içi organeller ve zarla çevrili organeller gibi terimlerin öne

çıkması, segmentteki proteinlerin büyük ölçüde hücre içi yapılarla ilişkili olduğunu ortaya koymaktadır.

KEGG yolak analizinin sonuçları Şekil 4.12’de özetlenmiştir. Şekil 4.12 incelendiğinde, en yüksek temsil oranlarının “genel metabolik yollar” (map01100/ko01100), “sekonder metabolit biyosentezi” (map01110/ko01110) ve “karbon metabolizması” (map01200/ko01200) gibi bitkinin temel metabolik işlevleriyle ilişkili geniş ölçekli yolaklarda toplandığı görülmektedir. Bu yolakların yüksek sıklıkla temsil edilmesi, 1BL.1RS segmentinin hem birincil metabolizma (örneğin glikoliz, karbon akışı ve amino asit biyosentezi) hem de ikincil metabolizma (fenolik bileşikler ve savunma metabolitleri) açısından önemli genler barındırdığını göstermektedir.

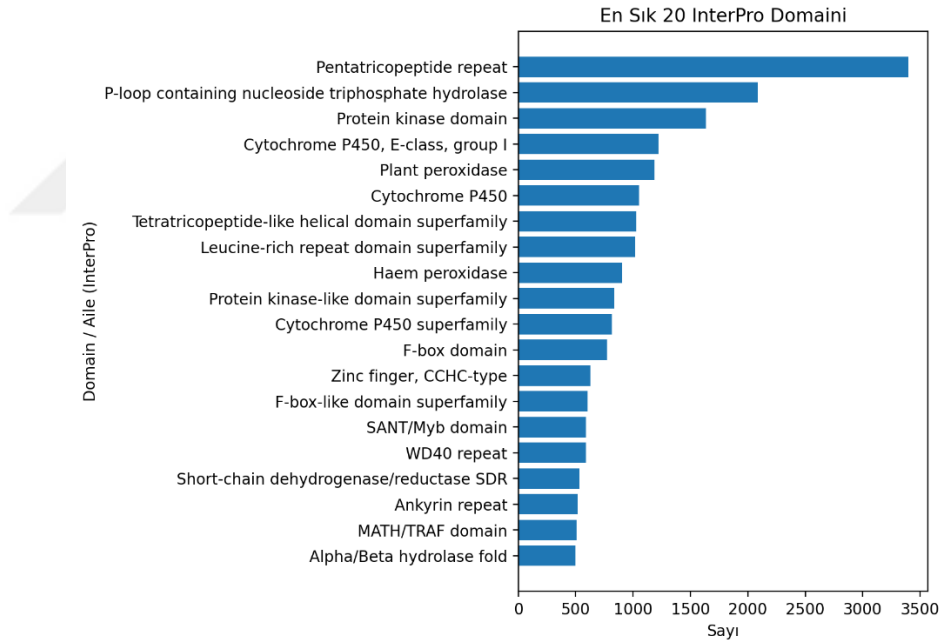


Şekil 4.12. En sık 20 KEGG yolağı

Ayrıca fenilpropanoid biyosentezi (ko00940) ve MAPK sinyal iletimi (ko04010) gibi stres ve savunma yanıtlarına doğrudan katkıda bulunan yolaklarda anotasyon bulunması dikkat çekicidir. Bu yolaklar, bitkilerde hem patojen tanıma hem de kuraklık ve tuzluluk gibi abiyotik stres koşullarında yeniden düzenlenen temel tepkileri içermektedir. Dolayısıyla 1BL.1RS segmentinde bu yolaklara ait genlerin belirlenmesi, translokasyon bölgesinin literatürde sıkça vurgulanan stres toleransı ve savunma ilişkili işlevleriyle uyum göstermektedir.

Bu bulgular genel olarak değerlendirildiğinde, GO ve KEGG analizlerinin 1BL.1RS segmentinin metabolik, yapısal ve adaptif (uyumsal) süreçlere katkı sunan farklı işlevsel gen gruplarını içerdiği tespit edilmiştir. Özellikle metabolik süreçlerin baskınlığı ve KEGG’deki sekonder metabolit yollarının yoğunluğu birlikte ele alındığında, segmentin hem temel hücresel işlevler hem de stres yanıt mekanizmaları açısından zengin bir genetik içerik taşıdığı saptanmıştır.

InterProScan analizi, proteinlerin filogenetik kökenlerinden bağımsız olarak doğrudan amino asit dizilerinden türetilen motif, domain ve süper aile yapılarını tanımlamak amacıyla gerçekleştirilmiştir. Bu yaklaşım, eggNOG-mapper tarafından sağlanan ortoloji temelli işlevsel tahminlerden farklı olarak, proteinin yapısal özelliklerine, korunmuş fonksiyonel bölgelerine ve evrimsel olarak korunmuş domain ailelerine odaklanmıştır. Dolayısıyla InterProScan, özellikle membran proteinleri, enzim aileleri, transkripsiyon faktörleri ve tekrarlayan motiflerden oluşan büyük protein süper ailelerinin tanımlanmasında daha yüksek çözünürlük sağlayarak, 1BL1RS segmentindeki proteinlerin yapısal ve işlevsel çeşitliliğinin daha ayrıntılı biçimde değerlendirilmesine olanak tanımaktadır. InterProScan analizinde en sık tanımlanan ilk 20 domain Şekil 4.13'te sunulmuştur. Şekil 4.13 incelendiğinde, 1BL1RS segmentindeki proteinlerin büyük bölümünün belirgin şekilde tekrarlayan motifler, enzimatik domainler, protein-protein etkileşim modülleri ve savunma/metabolizma ile ilişkili domain aileleri içerdiği görülmektedir. En yüksek sayıda temsil edilen grup, tetratrikopeptit tekrar (TPR) içeren pentatricopeptide repeat (IPR002885) proteinleridir (n = 3399). Bu domain ailesi bitkilerde RNA düzenlenmesi, kloroplast işlevleri ve stres yanıtlarında önemli rol oynamaktadır.



Şekil 4.13. En sık 20 InterPro Domaini

Bunun ardından gelen P-loop NTP hidrolaz ailesi (IPR027417), nükleotid bağlama ve enerji dönüşümü süreçlerinin segment genelinde yaygın olduğunu göstermektedir. Protein kinaz domaini (IPR000719) ve protein kinaz-benzeri süper aile (IPR011009) gibi sinyal iletiminde görev alan domainlerin yüksek temsil oranı ise 1BL1RS segmentinde hücrel sinyalizasyon ve düzenleyici mekanizmaların güçlü şekilde yer aldığını göstermiştir.

Çeşitli sitokrom P450 domainlerinin (IPR002401, IPR001128, IPR036396) geniş temsil edilmesi, özellikle sekonder metabolizma, fenilpropanoid türevleri ve oksidatif reaksiyonlara bağlı

savunma yanıtları açısından dikkat çekicidir. Bitkilerde hem reaktif oksijen türlerinin temizlenmesinde hem de patojenlere karşı savunmada önemli görevleri olan bitki peroksidaz (IPR000823, IPR002016) domainlerinin yüksek sayıda bulunması, 1BL.1RS segmentinde savunma ve stres yanıtlarında görev alan genlerin varlığıyla uyumludur.

Ayrıca LRR süper ailesi (IPR032675), F-box domainleri (IPR001810, IPR036047), zinc finger CCHC-type (IPR001878) ve ankyrin repeat (IPR002110) gibi domainlerin bulunması, segmentin düzenleyici ve adaptif süreçlere katkısını desteklemektedir. Tüm bu bulgular birlikte değerlendirildiğinde, InterProScan sonuçları 1BL.1RS segmentinin metabolik, düzenleyici ve savunma süreçlerinde etkin olan geniş ve çeşitli bir protein domain repertuarı içerdiğini göstermektedir.

1BL.1RS segmentine ait protein kodlayan diziler için elde edilen fonksiyonel anotasyonlar (InterProScan domainleri, GO terimleri, KEGG yolları ve ortolog eşleşmeleri), yalnızca mevcut çalışmanın biyolojik olarak yorumlanmasına katkı sunmakla kalmayıp, gelecekte gerçekleştirilecek genomik, fonksiyonel ve uygulamalı araştırmalar için kapsamlı bir referans veri seti oluşturmaktadır. Bu veriler aracılığıyla segmentin genetik yapısının daha ayrıntılı şekilde incelenmesi, yeni işlevsel gen adaylarının belirlenmesi ve translokasyon bölgesinin buğday ıslahındaki potansiyel katkılarının daha net ortaya konulması mümkün hale gelmektedir.

InterProScan analizlerinin ortaya koyduğu domain çeşitliliği sayesinde, ileride yapılacak gen ailesi odaklı çalışmaların (pentatrikopeptit tekrar içeren proteinler, F-box proteinleri, cytochrome P450 ailesi, peroksidazlar, LRR proteinleri, protein kinaz süper aileleri vb.) daha hedefe yönelik biçimde yürütülmesi için güçlü bir temel sağlanmıştır. Bu domain ailelerinin bitkilerde stres toleransı, savunma yanıtı, metabolik düzenleme, protein yıkımı, sinyal iletimi ve gelişimsel süreçlerde kritik roller üstlendiği bilindiğinden, söz konusu gen grupları ileride gerçekleştirilecek fonksiyonel genomik analizlerde öncelikli araştırma adayları arasında değerlendirilebilecektir.

1BL.1RS kromozomu içerisinde tespit edilen GO ve KEGG terimlerinin metabolik adaptasyon, stres yanıtı, enerji dönüşümü ve sinyal iletimi gibi süreçlerle ilişkili olması, özellikle biyotik ve abiyotik streslere dayanıklılık hedefleyen ıslah çalışmalarına katkı sağlayabilecek gen bölgelerinin belirlenmesini kolaylaştırmaktadır. Bu bilgiler ışığında, kuraklık, tuzluluk, sıcaklık stresi ve hastalık etmenlerine karşı dayanıklılık gibi agronomik açıdan kritik özelliklerle bağlantılı yeni moleküler markörlerin (KASP, InDel, SNP tabanlı marker'lar) geliştirilmesi için uygun altyapı oluşturulmuştur. Domain yapılarının detaylı olarak tanımlanmış olması, ileride gerçekleştirilecek gen bölgesi doğrulama, haplotip karakterizasyonu ve aday genlerin işlevsel validasyonu gibi çalışmaların da daha hızlı ve doğru biçimde planlanabilmesini mümkün kılmaktadır.

Bu çalışmada elde edilen DNA ve protein dizileri, 1BL.1RS kromozomunun gelecekte yüksek çözünürlüklü yaklaşımlarla (örneğin CRISPR/Cas9 hedef tasarımı, transkripsiyonel profil analizleri, protein-protein etkileşim ağlarının oluşturulması ve promotör motif taramaları) daha kapsamlı biçimde araştırılmasına imkân sunmaktadır. InterPro domainlerinin ayrıntılı olarak

tanımlanması sayesinde, reseptör benzeri proteinler (LRR, kinazlar), oksidatif stres enzimleri (peroksidaz, SDR), metabolik düzenleyiciler (cytochrome P450 ailesi) ve protein yıkım yollarında rol alan domainler (F-box, WD40, ankyrin repeat) gibi birçok önemli gen grubunun ileri analizler için güçlü adaylar arasında yer alması beklenmektedir.

Bu kapsamlı anotasyon seti aynı zamanda evrimsel açıdan da değer taşımaktadır. Mv179 1BL.1RS kromozomunun modern buğday genomu içerisinde nasıl korunduğu, rekombinasyonun hangi bölgelerde sınırlı olduğu ve çavdar kökenli genlerin hangi işlevsel alanlarda avantaj sağlayabileceği gibi soruların araştırılabilmesi için bir başlangıç noktası sunmuştur. Segmentte gözlenen işlevsel çeşitliliğin, buğday ve çavdardan taşınan genlerin birlikte uyumlu bir işleyiş sergilediğini göstermesi, translokasyonun agronomik özellikler ile ilişkilendirilen yönlerinin daha net biçimde ortaya konulmasına katkı sağlayacaktır.

Sonuç olarak bu çalışmada oluşturulan geniş çaplı fonksiyonel anotasyon veri seti, 1BL.1RS kromozomuna yönelik moleküler, evrimsel ve buğday ıslahı çalışmalarında doğrudan kullanılabilecek etkili bir biyoinformatik kaynak niteliği taşımıştır. Söz konusu veri setinin, özellikle dayanıklılık, verim ve adaptasyon gibi kritik tarımsal özelliklerle ilişkili yeni genlerin ve moleküler markörlerin geliştirilmesine önemli katkılar sunması beklenmektedir.

#### **4.1.5 Sekansın Çavdar (*Secale cereale*) Referansına Hizalanması, Varyant Analizi ve Varyantların Anotasyonu**

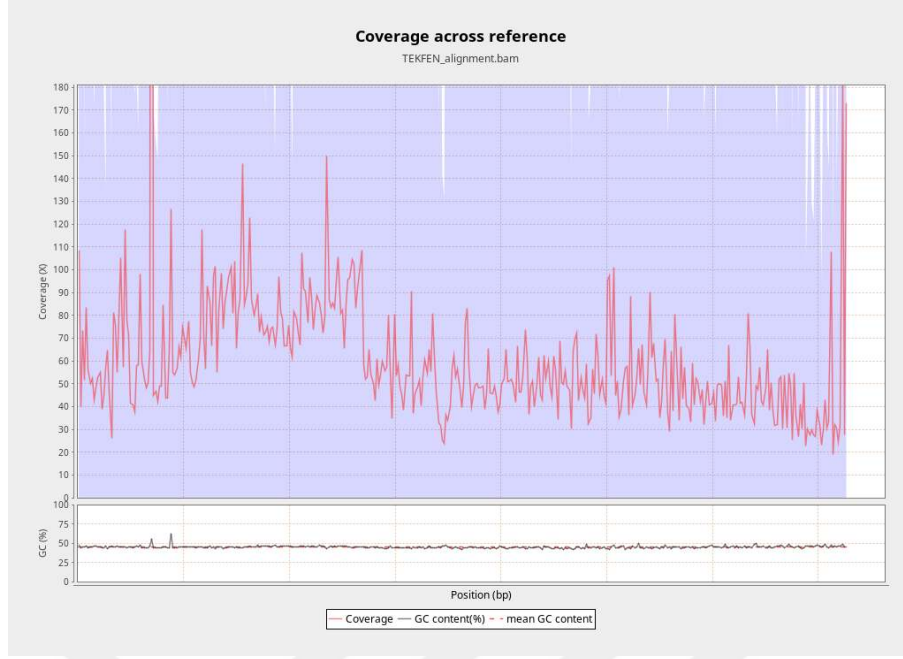
Mv179 1BL.1RS translokasyon kromozomuna ait kısa okuma verileri *Secale cereale* Lo7 genomunun 1R kromozomu üzerine hizalanmış ve hizalama kalitesi "Qualimap v2.3" yazılımı ile değerlendirilmiştir. Analiz sonucunda toplam 314 889 258 okumanın %74.41'inin (234 304 634 okuma) referans genom üzerine başarıyla hizalandığı saptanmıştır. Bu oran 1RS kolunun büyük ölçüde çavdar kökenli dizilerden oluştuğunu doğrulamaktadır. Bununla birlikte %25.59 oranındaki hizalanamayan okuma grubunun Lo7 referansı ile örtüşmeyen, buğday kökenli ve yapısal olarak farklılaşmış dizileri temsil ettiği değerlendirilmiştir. İncelenen kalite değerleri Çizelge 4.6'da detaylı olarak verilmiştir.

Çizelge 4.6. İncelenen Kalite metrikleri

| Metrik                                 | Değer                  |
|----------------------------------------|------------------------|
| Referans Büyüklüğü                     | 727 344 967            |
| Toplam Okuma Sayısı                    | 314 889 258            |
| Haritalanan Okumalar                   | 234 304 634 (%74.41)   |
| Haritalanmayan Okumalar                | 80 584 624 (%25.59)    |
| Duplikasyon Oranı                      | %37.49                 |
| Kırılmış Okumalar                      | 140 485 711 (%44.61)   |
| Haritalanan Eşli Okumalar              | 234 304 634 (%74.41)   |
|                                        | 214 387 023 (%68.08)   |
| Her İkisi de Haritalanan Eşli Okumalar |                        |
| Ortalama Kapsam                        | 61.6209x               |
| Kapsam Standart Sapma                  | 738.5077               |
| Ortalama Haritalama Kalitesi (MQ)      | 26.76                  |
| GC Yüzdesi                             | %45.54                 |
| Genel Hata Oranı                       | %6.54                  |
| İnseriyonlar (Toplam)                  | 76 358 730             |
| Delesyonlar (Toplam)                   | 80 514 807             |
| İnsert Boyutu (Ortalama)               | 57 417 951,77          |
| İnsert Boyutu (Standart Sapma)         | 118 059 301,75         |
| İnsert Boyutu (P25 / Medyan / P75)     | 342 / 510 / 39 898 730 |

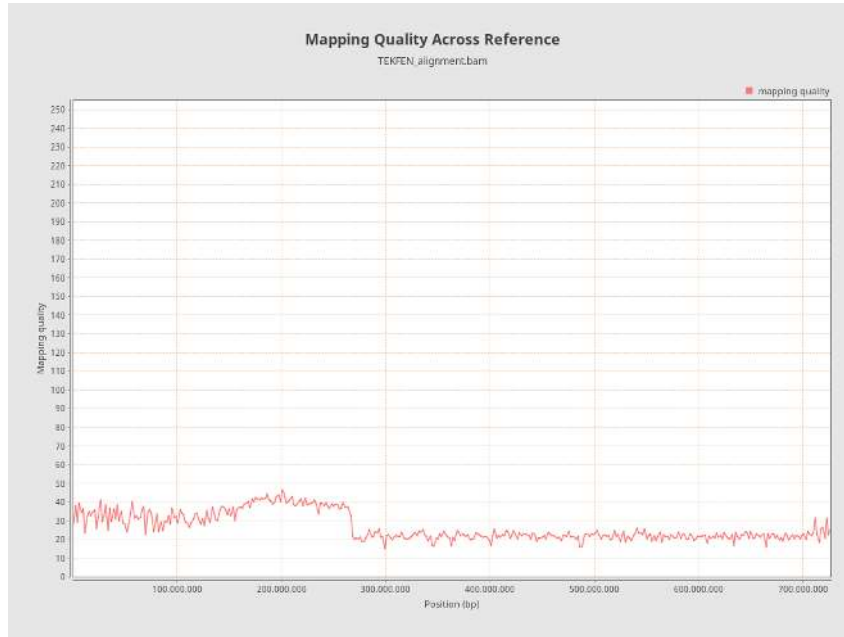
Çizelge 4.6. incelendiğinde haritalanan eşli okuma analizinde okumaların %68.08’inde her iki ucun da referansa başarılı biçimde hizalandığı belirlenmiştir. Okumaların %6.33’ünde tek uçlu hizalanma ve %5.29’unda alternatif hizalanma saptanmıştır. Bu bulgular IRS kolunda geniş yer kaplayan tekrarlayıcı elementlerin ve retrotranspozon kümelerinin hizalama yerleşimlerini etkilediğini göstermektedir.

Kapsamanın referans boyunca dağılımı Şekil 4.14’de verilmiştir. Kapsamanın(covrage) referans boyunca dağılımı incelendiğinde ortalama kapsama derinliğinin 61,62x olduğu hesaplanmıştır. Standart sapmanın 738,50 düzeyine ulaşması kapsamanın genom boyunca homojen dağılmadığını ortaya koymaktadır. Şekil 4.14 incelendiğinde Lo7 ile yüksek benzerlik gösteren IRS bölgelerinde kapsamanın daha dengeli olduğu, buna karşılık dizisel farklılaşmanın arttığı segmentlerde dalgalanmaların belirginleştiği anlaşılmaktadır. Bu kapsama profili IRS koluna özgü varyantların güvenilir biçimde tespit edilmesi için yeterli derinliğin elde edildiği sonucuna varılmıştır.



Şekil 4.14. Kapsamanın(covarage) referans boyunca dağılımı

Hizalama kalitesinin referans boyunca dağılımı Şekil 4.15’de verilmiştir. Hizalama kalitesi ortalama MAPQ değeri üzerinden analiz edilmiştir. Ortalama MAPQ değerinin 26,76 olduğu belirlenmiştir. Şekil 4.15 incelendiğinde kalite değerlerinin kromozom boyunca orta seviyede dağıldığı görülmektedir. Tekrarlayıcı alanlarda çoklu eşleşmelerin artması nedeniyle MAPQ değerlerinde düşüşler saptanmıştır. Buna karşın Lo7 referansına yüksek derecede benzeyen IRS bölgelerinde kalite değerlerinin yükseldiği saptanmıştır. Bu örüntünün çavdar ve buğday genomuna ait dizilerin aynı kromozomal bölgede birleşmesinden kaynaklandığı değerlendirilmektedir.



Şekil 4.15. Hizalama kalitesinin referans boyunca dağılımı

Indel profili değerlendirilmiş ve toplam 76 358 730 insersiyon(ekleme) ile 80.514.807 delesyonun(silinme) bulunduğu belirlenmiştir. Genel hata oranı %6,54 olarak hesaplanmıştır. Bu oranın sekanslama hatasından ziyade, Mv179 hattı ile Lo7 referansı arasındaki genetik varyasyonun (divergence) yüksekliğine işaret etmektedir. Homopolimer kaynaklı indel oranının %41.96 düzeyinde olduğu görülmektedir. Kopyalanmış (duplike) okumaların genel oranının %49.14 olduğu, ancak PCR duplikasyonları arındırıldığında net duplikasyon oranının %37.49 seviyesinde bulunduğu tespit edilmiştir. Ayrıca okumaların %44.61'inin kırpılmış (clipped) olduğu belirlenmiştir. Bu metrikler 1RS kolunun yüksek tekrar yoğunluğu taşıyan heterokromatik bölgeler içerdiğini ve Lo7 referansı ile dizisel uyumsuzluk içeren alanlarda hizalama kırılmalarının sık görüldüğünü göstermektedir. Analizde kullanılan 1BL.1RS translokasyon hattının (Mv179) *S. cereale* cv. 'Várda' ile *S. strictum* ssp. *anatolicum* varyantlarının melezlenmesi ve daha sonra Martonvásári 9kr1 buğday hattı ile melezlenmesi sonucu elde edilen ve geri melezleme adımlarıyla stabilize edilen bir hat olduğu bilinmektedir. Bu nedenle hizalama çıktılarında gözlenen yüksek kırpılma oranı, kapsama düzensizlikleri, duplikasyon yoğunluğu ve insert boyutu varyansı teknik hatalarla açıklanamamaktadır. Bu bulgular 1BL.1RS kromozomunun melez ve yapısal olarak karmaşık doğasını, Lo7 1R referans genomundan dizisel olarak ayrılan bölgelerin varlığını ve translokasyon sürecinde meydana gelen yeniden düzenlemeleri yansıtan biyolojik sonuçlar olarak değerlendirilmiştir.

Varyant çağırımı, poliploid türlerde güvenilir sonuçlar vermesi nedeniyle "FreeBayes v1.3.7" aracı ile gerçekleştirilmiş ve sonuçlar ".vcf" formatında elde edilmiştir. Hizalama işlemi sonrasında elde edilen varyant dosyaları, fonksiyonel anotasyon amacıyla "SnEff" yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir. Bu işlem sonucunda toplam 186 809 054 varyant başarıyla işlenmiştir. Bu sayı, 1BL.1RS kromozom segmentinin yüksek düzeyde genetik çeşitlilik içerdiğini göstermektedir. Anotasyon sonuçlarına ait özet bulgular Çizelge 4.7.'de verilmiştir.

Çizelge 4.7. Anotasyon sonuçlarının genel istatistik sonuçları

| Özellik                         | Değer            |
|---------------------------------|------------------|
| Toplam varyant sayısı (işlenen) | 186 809 054      |
| Multi-allelik varyantlar        | 3 927 083        |
| Toplam anotasyon sayısı         | 208 339 326      |
| Ortalama varyant sıklığı        | 1 varyant / 3 bp |
| Genomun etkili uzunluğu (bp)    | 727 344 967      |
| Uyarı (Warning)                 | 7 977            |
| Hata (Error)                    | 0                |

Analiz sürecinde 3 927 083 adet çoklu allelik varyant kaydedilmiştir. Çoklu allelik bölgeler, birden fazla alternatif baz değişiminin aynı konumda bulunduğu varyant tiplerini temsil etmektedir. Toplam anotasyon sayısının 208 339 326 olması, tek bir varyantın birden fazla gen veya transkript bölgesiyle ilişkili olabildiğini göstermektedir.

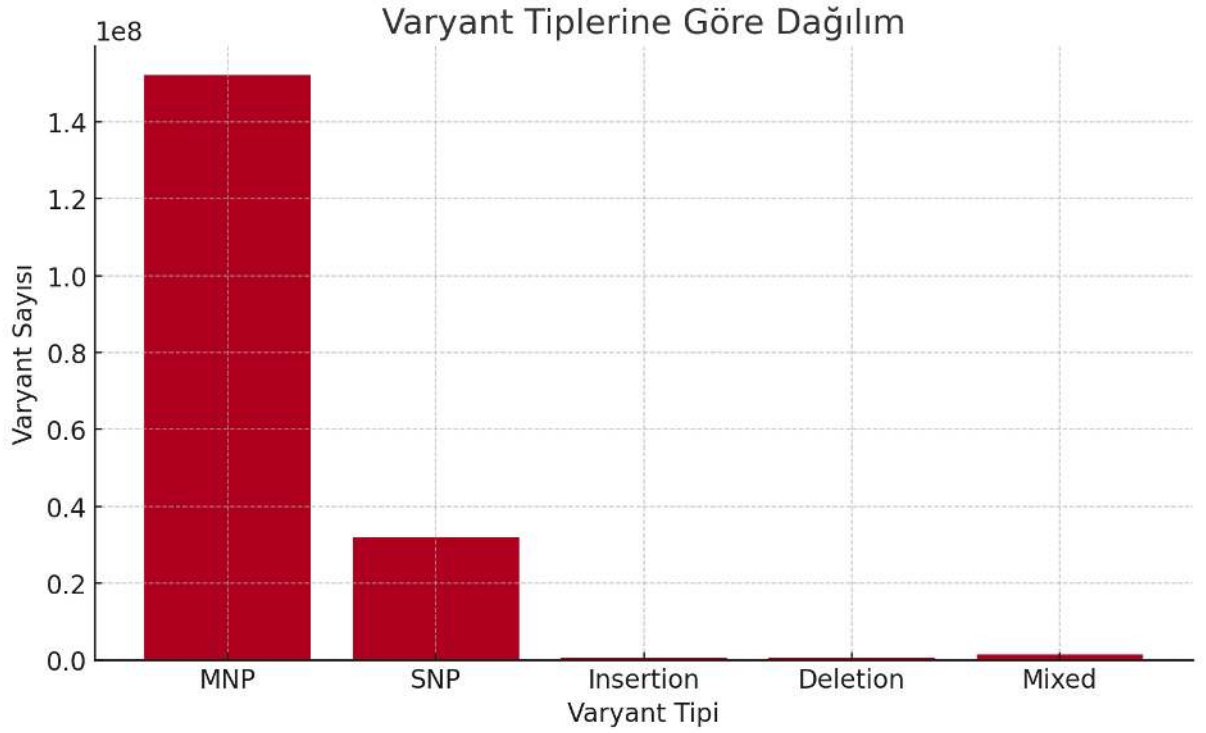
SnEff sonuçlarına göre etkili genom uzunluğu 727 344 967 bp olarak hesaplanmış ve bu uzunluk temel alınarak ortalama varyant sıklığı her 3 bazda bir varyant olacak şekilde belirlenmiştir. Bu yoğunluk, analiz edilen kromozomal bölgenin yüksek oranda polimorfik yapısını yansıtmaktadır.

Analiz süresince herhangi bir hata (error) raporlanmamış, yalnızca 7977 uyarı (warning) kaydedilmiştir. Bu uyarılar, genellikle anotasyon dosyalarında tanımlı olmayan bölgelerden veya meta veri eksikliğinden kaynaklanmaktadır. Hatalı kayıt bulunmaması, analiz sürecinin teknik olarak sorunsuz biçimde tamamlandığını göstermektedir.

Varyant tiplerinin sayısı ve oranı Çizelge 4.8’de ve anotasyon sonuçlarının varyant tiplerine göre dağılım grafiği Şekil 4.16’da verilmiştir.

Çizelge 4.8. Varyant tiplerinin sayısı ve oranı

| Varyant Tipi                           | Sayı        | Oran (%) |
|----------------------------------------|-------------|----------|
| MNP (Multiple Nucleotide Polymorphism) | 152 086 130 | 81.4     |
| SNP (Single Nucleotide Polymorphism)   | 32 029 408  | 17.1     |
| İnsersiyon (INS)                       | 643 251     | 0.34     |
| Delesyon (DEL)                         | 711 606     | 0.38     |
| Mixed                                  | 1 338 659   | 0.72     |



Şekil 4.16. Anotasyon sonuçlarının varyant tiplerine göre dağılım grafiği

Çizelge 4.8’de ifade edilen SnpEff tarafından sınıflandırılan varyant tipleri incelendiğinde, toplam varyantların %81.4’ünün MNP (Çoklu nükleotid poliforfizmi-Multiple Nucleotide Polymorphism) formunda raporlandığı belirlenmiştir. Bu varyant türünde tek baz yerine ardışık birden fazla baz pozisyonunda eş zamanlı değişim meydana gelmiştir. Bu dağılım, analizde kullanılan "FreeBayes" varyant çağırma algoritmasının, bağımsız tekli SNP’ler yerine bitişik varyantları blok halinde tanımlama eğiliminde olmasından kaynaklanmış olabileceğini düşündürmektedir.

Tek baz değişimlerini ifade eden SNP sayısı 32 029 408 olarak belirlenmiştir. Bu değer, MNP’lere kıyasla daha düşük görünse de genetik çeşitliliğin tekli baz seviyesinde de belirgin olduğunu göstermektedir. SNP’lerin bu düzeyde bulunması, ilerleyen aşamalarda spesifik gen-lokus temelli varyant analizlerine olanak sağlayabilecek niteliktedir.

Parça eklenmesi (Insertion) ve parça kaybolması (Deletion) olaylarını kapsayan InDel varyantlarının toplam sayısı ise 1.35 milyonun üzerindedir. Bu varyantlar arasında parça eklenmesi sayısı 643 251, parça kaybolması sayısı 711 606 olarak kaydedilmiştir. Bu yapı, InDel’lerin SNP’lere kıyasla daha düşük oranda bulunduğunu, ancak yapısal değişim içeren mutasyonlar açısından önemli bir kaynak olabileceğini göstermektedir. Özellikle bu çalışmanın hedefleri arasında yer alan moleküler markör geliştirme sürecinde, 30 bp ve üzeri uzunluğa sahip InDel varyantları ayırt edici özelliklerinden dolayı öncelikli adaylar olarak değerlendirilmiştir.

“Mixed” kategorisine giren varyantlar ise 1 338 659 adet olarak belirlenmiştir. Bu varyant grubu, hem baz değişimi hem de eş zamanlı ekleme/silme olaylarını içeren karma yapılu mutasyonları

temsil etmektedir. Bu tür varyantların genomik yapı üzerinde potansiyel olarak daha karmaşık etkiler oluşturabileceği ve biyolojik anlamlandırma aşamasında dikkatle incelenmesi gerektiği değerlendirilmiştir.

Daha karmaşık mutasyon desenlerini (baz değişimi ve ekleme/silme olaylarının bir arada olması) ifade eden "Mixed" kategorisinde ise 1 338 659 adet varyant saptanmıştır. Varyantların etkilerini belirlemek amacıyla varyant etki değerlendirmesi yapılmıştır. Elde edilen bulgular Çizelge 4.9’da verilmiştir.

Çizelge 4.9. Varyantların etki derecelerinin sınıflandırması

| Etki Derecesi                                | Sayı        | Oran (%) |
|----------------------------------------------|-------------|----------|
| <b>Modifier (<i>Düzenleyici/Etkisiz</i>)</b> | 207 581 655 | 99.63    |
| <b>Moderate (<i>Orta Etkili</i>)</b>         | 650 094     | 0.31     |
| <b>Low (<i>Düşük Etkili</i>)</b>             | 102 511     | 0.05     |
| <b>High (<i>Yüksek Etkili</i>)</b>           | 5 066       | 0.0027   |

SnEff tarafından gerçekleştirilen fonksiyonel etki analizi sonucunda, varyantların büyük çoğunluğunun Modifier kategorisinde sınıflandırıldığı belirlenmiştir. Bu sınıfa giren varyantların, gen kodlama bölgelerinden ziyade intergenik, intronik veya gen çevresi (upstream/downstream) bölgelerde konumlanmaktadır. Bu tür varyantların, protein yapısını doğrudan değiştirmemesi nedeniyle biyolojik etkilerinin daha sınırlı olabileceği değerlendirilmektedir. Protein kodlayan dizilerde doğrudan bir değişikliğe yol açmadıkları için biyolojik etkilerinin sınırlı olduğu varsayılrsa da, gen ekspresyon seviyelerini modüle etme potansiyelleri göz ardı edilmemelidir.

“Moderate”(Orta etkili) kategorisine giren varyantların sayısı 650.094 olarak kaydedilmiştir. Bu varyantların, aminoasit dizisinde değişim oluşturarak protein fonksiyonlarında kısmi değişikliklere neden olabileceği tahmin edilmektedir. Bu grupta yer alan varyantların yanlış anlamlı (missense) mutasyonlarla örtüşme olasılığı yüksektir ve bu nedenle, ilerleyen aşamalarda fonksiyonel gen adayı belirleme süreçlerinde değerlendirilmesi gerekmektedir.

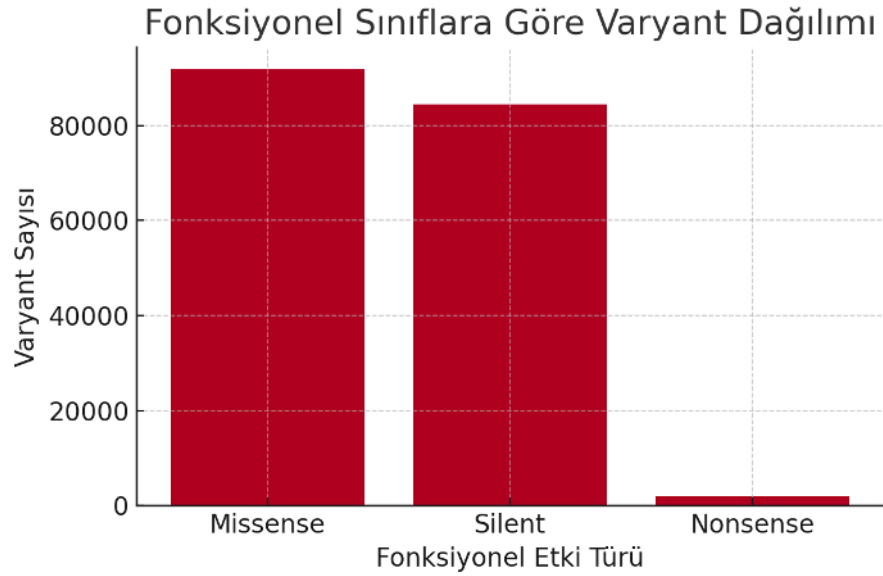
“Low”(düşük etkili) sınıfında yer alan varyantlar (102.511 adet), genellikle eş anlamlı (synonymous) değişimleri yansıtmaktadır. Bu tip değişimlerde kodon dizisi farklılık göstermesine rağmen kodlanan aminoasit değişmemekte, dolayısıyla protein yapısında doğrudan bir farklılık oluşmamaktadır. Ancak bazı durumlarda eş anlamlı mutasyonların translasyon verimliliği veya mRNA stabilitesi üzerinde etkili olabileceği bilinmekte olup, bu nedenle bu varyantlar da tamamen göz ardı edilmemesi gerektiği bildirilmiştir.

Analizin en kritik bulgusu, "High" (Yüksek Etkili) kategorisinde yer alan 5.066 adet varyanttır. Bu grup erken durdurma kodonu oluşumu (stop gained), okuma çerçevesi kayması (frameshift) veya kırılma bölgesi (splice site) kaybı gibi genin işlevini tamamen bozabilecek veya değiştirebilecek mutasyonları içermektedir. Sayıca az olmalarına rağmen, fenotipik etkileri bakımından en belirleyici grup oldukları değerlendirilmektedir. Bu nedenle, söz konusu 5.066 varyant; aday gen doğrulama, IGV tabanlı görsel inceleme ve KASP/InDel markör tasarım aşamalarında öncelikli hedef bölge olarak belirlenmiştir.

Varyantların etki derecelerinin sınıflandırması Çizelge 4.10'da, fonksiyonel sınıflara göre varyant dağılımı Şekil 4. 17'de verilmiştir.

Çizelge 4.10. Varyantların fonksiyonel etki türlerine göre sınıflandırması

| Fonksiyonel Etki Türü                   | Sayı   | Oran (%) |
|-----------------------------------------|--------|----------|
| <b>Missense (aminoasit değiştirici)</b> | 91.868 | 51,52    |
| <b>Silent (eş anlamlı)</b>              | 84.463 | 47,36    |
| <b>Nonsense (erken durma kodonu)</b>    | 1.977  | 1,11     |



Şekil 4.17. Anotasyon sonuçlarının varyant tiplerine göre dağılım grafiği

Varyantların protein kodlayan bölgeler üzerindeki etkileri değerlendirildiğinde, yanlış anlamlı ("missense") mutasyonların baskın olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.10 ve Şekil 4.17). Toplam 91868 adet yanlış anlamlı varyantın, kodon düzeyinde tek baz değişimine bağlı olarak farklı bir aminoasidin proteine dahil olmasına yol açtığı anlaşılmaktadır. Bu tür varyantların, protein yapısı üzerinde konformasyonel değişiklik, aktif bölge bozulması veya bağlanma bölgelerinde yapı kaymaları oluşturma potansiyeli bulunmaktadır. Bu nedenle "missense" sınıfındaki varyantlar,

biyolojik işlev açısından orta düzey etkili ancak olası fenotip yansımaları bakımından kritik kabul edilmektedir.

Etkisiz (Silent) varyantlar incelendiğinde 84463 adet mutasyonun, kodon değişmesine rağmen kodlanan aminoasidi değiştirmedeği belirlenmiştir. Bu tür değişimlerin doğrudan proteinin primer yapısını etkilememesi nedeniyle, gen ürününde yapısal bir farklılık oluşturmadığı düşünülebilir. Ancak kodon kullanım sıklığı (codon bias), mRNA stabilitesi ve translasyonel verimlilik gibi mekanizmalar üzerinden dolaylı etkiler meydana gelebileceği ihtimali göz ardı edilmemelidir. Bu nedenle bu varyant sınıfı, "düşük etkili" kategoride yer almakla birlikte transkripsiyon-sonrası düzenlenme süreçleri açısından incelemeye açık bir veri grubudur.

Anlamsız (Nonsense) mutasyonların sayısı 1977 olarak kaydedilmiştir. Bu varyantlar, stop kodunun erken oluşumuna yol açarak proteinin sentezinin tamamlanmadan kesilmesine neden olabilecek niteliktedir. Bu durum, kısaltılmış (trunkated) protein ürünlerinin oluşmasına yol açabileceği için biyolojik sonuçları yüksek derecede etkili olabilmektedir. Bu tür varyantlar özellikle hastalık direnci genleri, NLR gen aileleri veya sinyal iletim elemanları gibi fonksiyonel bölgelerde yer alıyorsa, genomik işlev üzerinde belirgin değişiklikler oluşturabilecek potansiyele sahiptir.

Varyantların bölgelere göre sınıflandırması Çizelge 4.11’de verilmiştir.

Çizelge 4.11. Varyantların bölgelere göre sınıflandırması

| Bölge                            | Sayı        | Oran (%) |
|----------------------------------|-------------|----------|
| <b>İntergenik</b>                | 183 532 255 | 88.09    |
| <b>Downstream</b>                | 14 140 614  | 6.78     |
| <b>Upstream</b>                  | 7 389 438   | 3.55     |
| <b>İntron</b>                    | 2 519 348   | 1.21     |
| <b>Ekzon</b>                     | 746 057     | 0.36     |
| <b>Splice bölgeleri (Toplam)</b> | ~11 600     | <0.01    |

Varyantların genomik konumlara göre dağılımı incelendiğinde, en yüksek yoğunluğun intergenik bölgelerde bulunduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.11). Bu bölgelerde 183 532 255 adet varyant kaydedilmiş olup, bu değer toplam varyantların %88.09’unu oluşturmaktadır. Bu durum, çalışılan 1BL.1RS bölgesinin büyük oranda kodlama dışı diziler ve tekrarlayıcı genetik elementlerden oluştuğunu düşündürmektedir. İntergenik varyantların büyük çoğunluğu doğrudan protein kodlayan genler üzerinde etkili olmamakla birlikte, gen ekspresyonunun üst düzey

düzenleyici mekanizmalarıyla ilişkili olabilecek uzak düzenleme bölgelerine etki etme potansiyeli taşımaktadır.

Downstream(aşağı akış bölgesi) ve upstream(yukarı akış bölgesi) bölgelerde yer alan varyantların sayısının sırasıyla 14 140 614 (%6.78) ve 7 389 438 (%3.55) olduğu belirlenmiştir. Bu bölgeler, genlerin transkripsiyon başlangıç ve bitiş noktalarına yakın konumlandıkları için promotör aktivitesi, transkripsiyonel düzenleme ve mRNA stabilitesi üzerinde etkili olabilecek stratejik alanlardır. Bu nedenle bu sınıfa giren varyantlar, her ne kadar protein düzeyinde doğrudan bir değişime neden olmasalar da transkripsiyon faktörü bağlanma bölgelerini etkileyerek gen ifadesi dinamiklerini dolaylı olarak değiştirebilir.

Intron bölgelerinde yer alan varyantların sayısı 2.519.348 (%1,21) olarak hesaplanmıştır. İntronik varyantlar, gen ürününü doğrudan etkilenmediği için düşük etkili mutasyon sınıfında değerlendirilmektedir. Ancak bazı durumlarda alternatif “splicing” bölgelerine yakın konumlanan intronik varyantların ekzon-intron geçişlerini etkileyebileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Bu nedenle, intron sınırlarına yakın varyantların splicing bozulması riski açısından ikincil analizlere dahil edilmesi uygun olacaktır.

Ekzon bölgelerinde bulunan varyantların toplam sayısı 746.057 (%0,36) olarak belirlenmiştir. Bu oran, genel varyant havuzu içinde küçük görünmekle birlikte, bu sınıfa giren her varyantın protein düzeyinde doğrudan etki oluşturma ihtimali nedeniyle biyolojik olarak anlamlı kabul edilmektedir. Bu varyant seti fonksiyonel gen adayı belirleme aşamalarında çekirdek veri grubu olarak değerlendirilebilecek nitelikte olduğu tespit edilmiştir.

Ekzon–intron birleşme(splice) bölgelerinde yer alan varyantların sayısı yaklaşık 11.600 olup, bu sınıfın toplam varyantlar içerisindeki oranı %0,01’in altındadır. Sayıca düşük olan bu varyantların, “splice donör” veya “acceptor” bölgelerinde yer alması durumunda, ekzon-intron sınırlarının tanınmasında bozulma, mRNA segmentlerinin yanlış birleştirilmesi veya kodlama çerçevesinin kayması gibi kritik moleküler sonuçlara yol açabileceği değerlendirilmektedir.

Varyantların baz değişim tiplerine göre sınıflandırılması Çizelge 4.12’de verilmiştir.

Çizelge 4.12. Varyantların baz değişim tiplerine göre sınıflandırılması

| Baz Değişim Tipi                   | Sayı      |
|------------------------------------|-----------|
| Transisyon (A↔G, C↔T)              | 8,000,262 |
| Transversiyon (A↔C, A↔T, G↔C, G↔T) | 4,906,260 |
| Ts/Tv Oranı                        | 1.63      |

SnEff anotasyonu sonucunda toplam 8 000 262 adet transisyon ( $A \leftrightarrow G$  ve  $C \leftrightarrow T$ ) ve 4 906 260 adet transversiyon ( $A \leftrightarrow C$ ,  $A \leftrightarrow T$ ,  $G \leftrightarrow C$ ,  $G \leftrightarrow T$ ) değişimi tespit edilmiştir. Bu dağılım sonucunda Ts/Tv oranı 1,63 olarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.12).

Genomik mutasyon süreçleri incelendiğinde, Transisyon (Ts) mutasyonlarının, kimyasal olarak daha olası dönüşümler olması sebebiyle doğada transversiyonlara (Tv) kıyasla daha yüksek frekansta gerçekleştiği bilinmektedir. Transisyon mutasyonları pürin-pürin ( $A \leftrightarrow G$ ) veya pirimidin-pirimidin ( $C \leftrightarrow T$ ) dönüşümlerinden oluştuğu için, DNA polimeraz tarafından daha tolere edilir. Bu nedenle daha az yapısal bozulmaya yol açtığı bilinmektedir.

Bu çalışmada  $C \rightarrow T$  geçişlerinin baskın olması, metillenmiş sitozinlerin deaminasyon yoluyla timine dönüşme eğilimi ile ilişkilendirilebilir. Bu tür bir dönüşüm, genellikle tekrarlayıcı bölgelerde veya epigenetik olarak baskılanmış heterokromatin bölgelerinde daha sık gözlenmektedir. Bu durumun, 1BL1RS bölgesinin çavdar kökenli yapısında genomik tekrar dizilerinin yoğun bulunması ile bağlantılı olabileceği düşünülmektedir.

Transversiyon mutasyonlarının yaklaşık 4.9 milyon adet olması, genomda daha rastlantısal ve kimyasal olarak daha nadir ancak potansiyel olarak protein yapısını değiştirebilecek etkiye sahip mutasyonların da bulunduğunu göstermektedir. Transversiyon değişimleri genellikle DNA sarmalında lokal yapısal kaymalara ve daha belirgin sterik gerilmelere neden olabileceği için, protein kodlayan bölgelerde görüldüğünde daha yoğun fenotipik etki oluşturma potansiyeline sahiptir.

Ts/Tv oranının 1.63 düzeyinde olması, verinin biyolojik gerçeklikle uyumlu olduğunu göstermektedir. Genomik analizlerde Ts/Tv oranının 1.5–2.0 aralığında olması, varyant çağırma kalitesinin optimum seviyede olduğunu işaret etmektedir. Eğer oran 1'in altına düşmüş olsaydı, bu durum hatalı çağrılmış, düşük güvenilirlikli transversion mutasyonlarının baskın olduğu bir veri setine işaret edecekti. Öte yandan 2'nin çok üzerine çıkan Ts/Tv oranları da aşırı filtrelenmiş veya gerçek biyolojik çeşitliliği yansıtmayan bir varyant seti anlamına gelebilirdi. Bu bağlamda 1,63 değeri, varyant çağırma aşamasının dengeli olduğunu ve veri setinin güvenilir nitelikte olduğunu göstermektedir (DePristo ve ark., 2011)

Varyantların anotasyon türlerine göre sınıflandırılması Çizelge 4.13'de verilmiştir.

Çizelge 4.13. Varyantların anotasyon türlerine göre sınıflandırılması

| Anotasyon Türü                            | Sayı        | Oran (%) |
|-------------------------------------------|-------------|----------|
| intergenik bölge                          | 183 532 255 | 88.08    |
| Downstream gen varyant                    | 14 140 614  | 6.78     |
| Upstream gen varyant                      | 7 389 438   | 3.55     |
| İntron variant                            | 2 529 756   | 1.21     |
| Missense(aminoasit değiştirici) varyant   | 647 735     | 0.31     |
| Eş anlamlı varyant (sessiz mutasyon)      | 93 257      | 0.045    |
| Çerçeve kayması varyantı                  | 1 510       | <0.01    |
| Başlangıç kodonu kaybı                    | 290         | <0.01    |
| Durma(stop) kodonu oluşumu                | 2339        | <0.01    |
| Durma kodonu kaybı(stop lost)             | 276         | <0.01    |
| Splice bölgesi varyantı                   | 10 774      | <0.01    |
| Splice alıcı bölgesi varyantı             | 387         | <0.01    |
| Splice verivi bölgesi varyantı            | 461         | <0.01    |
| Başlangıç kodonu varyantı                 | 189         | <0.01    |
| Koruyucu okuma çerçevesi içi ekleme/silme | ~1400       | <0.01    |
| Bozucu okuma çerçevesi içi ekleme/silme   | ~900        | <0.01    |

Çizelge 4.13'de sunulan veriler incelendiğinde, varyantların büyük bölümünün protein kodlayan bölgeler dışında yer aldığı görülmektedir. Özellikle “intergenic\_region” kategorisinde bulunan 183.532.255 varyant (%88,08), analiz edilen 1BL1RS bölgesinin yüksek oranda gen dışı diziler ve olasılıkla tekrar elementleri içerdiğini düşündürmektedir. Bu durum, genomun kodlamayan alanlarının varyasyon açısından oldukça dinamik olabileceğine işaret etmektedir.

“Downstream gen varyant” ve “upstream gen varyant” kategorilerinde yer alan 21 milyonu aşkın varyant, genlerin transkripsiyon başlangıç ve bitiş bölgelerine yakın konumlandıkları için kritik biyolojik öneme sahiptir. Bu bölgelerdeki varyasyonların promotör aktivitesini etkileyebildiği, transkripsiyon faktörü bağlanma motiflerini değiştirebildiği ve poliadenilasyon sinyallerinin tanınmasını modüle ederek gen ekspresyonunu yeniden şekillendirebildiği bilinmektedir (Andersson ve ark., 2020; Maston ve ark., 2006; Tian ve ark., 2017).

“Missense varyant” (647.735 adet) ve “eş anlamlı varyant” (~93.000 adet) kombinasyonu, protein kodlayan bölgelerdeki mutasyonların küçük bir kısmını oluşturmalarına rağmen, bu sınıfa giren varyantların fonksiyonel etkiler açısından en anlamlı grup olduğuna işaret etmektedir. “Missense” mutasyonların aminosit değişikliği yoluyla protein yapısında konformasyonel

değişikliklere yol açabilme ihtimali, bu varyant grubunu fonksiyonel analiz ve markör geliştirme aşamalarında öncelikli inceleme grubuna dönüştürmektedir.

Çerçeve kayması varyantı, kodon oluşumu, kodon kaybı ve başlangıç kodonu kaybı gibi okuma çerçevesini veya transkripsiyon bütünlüğünü etkileyebilecek nadir mutasyonlar, sayısal olarak az olmalarına rağmen biyolojik sonuç oluşturma potansiyeli en yüksek alt sınıf olarak değerlendirilmektedir. Bu mutasyonların protein sentezini erken durdurma, alternatif başlama kodonu kullanımı veya uzamış protein oluşumu gibi sonuçlara yol açabileceği göz önünde bulundurulmalıdır.

## **4.2. InDel Primerlerinin Geliştirilmesi ve Genetik Çeşitlilik Analizleri**

### **4.2.1. InDel Primerlerinin Validasyonu**

Bu çalışmada, Mv179 1BL.1RS translokasyon bölgesine özgü InDel varyantlarından yararlanılarak toplam 30 adet InDel primer çifti tasarlanmış ve bu primerlerin performansı farklı çavdar ve çavdar translokasyonuna sahip buğday materyali üzerinde değerlendirilmiştir. Primer setine ilişkin ayrıntılı liste ve amplifikasyon sonuçları Çizelge 4.14’de sunulmuştur. PCR amplifikasyonları, Mv179 buğday–çavdar translokasyon hattı, Petkus kökenli translokasyon taşıyan MvMagdalena, bir adet ekmeklik buğday çeşidi, 5 çavdar ve 5 tritikale genotipi ve farklı ekolojilerden toplanmış 82 geçiş formundaki çavdar genotipleri üzerinde yürütülmüştür. Elde edilen PCR ürünleri 2% agaroz jel elektroforezi ile değerlendirilmiş ve bant netliği, görünürlüğü ve türler arası ayırt ediciliği temel kriterler olarak kullanılmıştır.

PCR sonuçları, primer çiftlerinin farklı materyallerde değişen düzeylerde polimorfik olduklarını ortaya koymuştur. Tasarlanan 30 primerin 18’i açık biçimde polimorfik bulunmuştur. Bu primerler, özellikle çavdar çeşitliliğinin ortaya konmasında güçlü ayırt edicilik göstermiş olup genetik çeşitlilik analizlerine dahil edilmiştir. Primerlerden 1’i monomorfik bant oluşturmuş ve herhangi bir allelik farklılık göstermediği için popülasyon temelli çeşitlilik analizlerinden çıkarılmıştır.

Primer seti içerisinde 6 primer, çavdar genotiplerinde düşük bant verimliliğine veya zayıf amplifikasyon profillerine sahip olmuştur. Bu nedenle bu 6 primer (T107, T115, T121, T122, T123, T130), çeşitlilik analizlerinde kullanılmamış; ancak Mv179 hattına özgü 1RS segmentinin belirlenmesinde yüksek doğrulukla çalıştıkları için ıslah programlarında tanısal (diagnostik) markör olarak değerlendirilmeye uygun bulunmuştur. Bu primerler, çavdar segmentinin aktarımını tespit etmek amacıyla özellikle seleksiyon süreçlerinde hızlı tarama markörleri olarak kullanılabilecek niteliktedir.

Primer setinin geri kalan 5’i (T105, T106, T109, T112, T117) hiçbir materyalde amplifikasyon üretmemiş ve tekrar optimizasyonlara rağmen bant oluşturmadığı için çalışma kapsamından tamamen çıkarılmıştır. Genel değerlendirme sonucunda, monomorfik primer çıkarıldığında toplam 24 primer, hem translokasyonun doğrulanması hem de ıslah materyalinde

Mv179 allelinin moleküler olarak belirlenmesi açısından güvenilir bulunmuştur. Bu durum, tasarlanan InDel markörlerinin büyük bölümünün hem tür içi (çavdar genotipleri arasında polimorfizm tespiti) hem de türler arası(çavdar-buğdaay) kullanım potansiyeli sunduğunu göstermektedir.

Sonuç olarak, primer performansları değerlendirildiğinde amplifikasyon gösteren 24 primerden 18 polimorfik primerin çavdar çeşitliliğini ortaya koymada etkili, 6 primerin ise yalnızca 1BL.1RS translokasyonunu tanımlamada yüksek derecede güvenilir olduğu belirlenmiştir. Böylece tasarlanan primer seti hem genetik çeşitlilik çalışmalarında hem de ıslah sürecinde translokasyon kontrolüne yönelik kullanılabileceği değerlendirilmiştir.

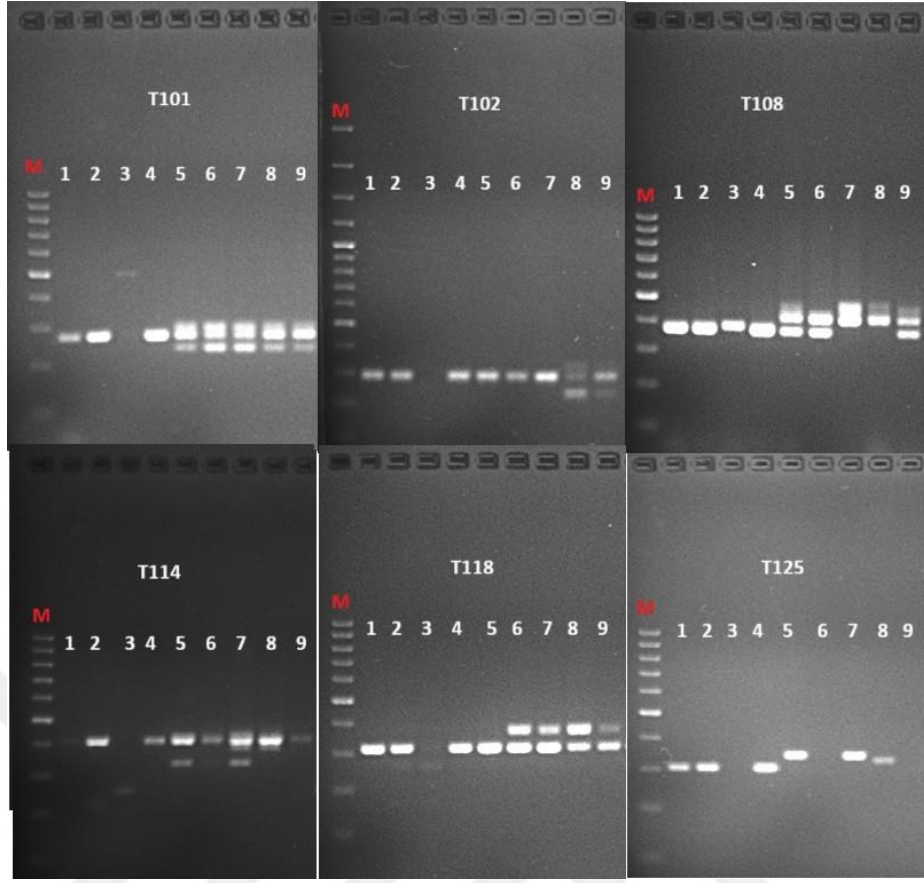
Buna ek olarak, tasarlanan primerlerden 7 tanesinin gen ile ilişkili bölgeler üzerinde konumlandığı belirlenmiş olup detaylı bilgi Çizelge 4.15’de verilmiştir. Ancak bu bölgelerin intron mu yoksa ekzon mu olduğuna yönelik ayrıntılı bir yapısal sınıflandırma bu çalışma kapsamında yapılmamıştır. Çizelge 4.15 incelendiğinde, bu 7 primerden 1’inin herhangi bir materyalde amplifikasyon üretmediği, buna karşılık 5 primerin hem 1BL.1RS translokasyonunun tespitinde hem de çavdar genetik çeşitliliğinin değerlendirilmesinde polimorfik bant profilleri verdiği saptanmıştır. Çalışmaya ait agaroz jel görüntüleri ve IGV (Integrative Genomics Viewer) görüntüsü Şekil 4.18 ve Şekil 4.19’da verilmiştir.

Çizelge 4.14. Çalışmada kullanılan Indel primerlerinin listesi ve amplifikasyon bilgileri

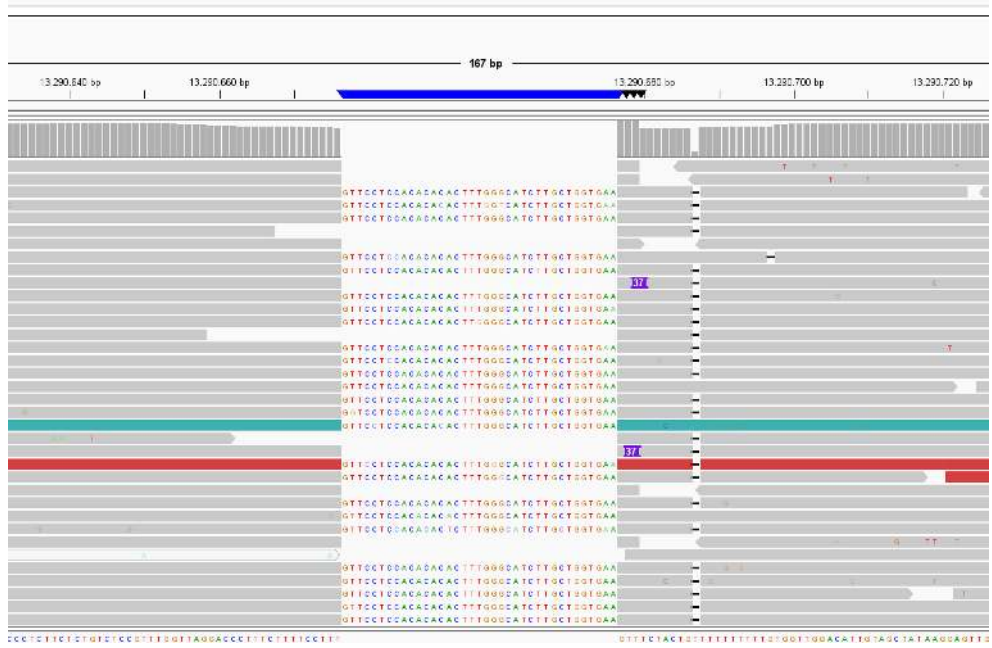
| Primer Kodu | Forward                 | Reverse                | Chr | Pos       | Mv179 | Lo7 |
|-------------|-------------------------|------------------------|-----|-----------|-------|-----|
| T101        | TGCATGACTGGTTATCAAAGGC  | AGCAAGCATGTGCAACCAAC   | 1R  | 13290676  | 272   | 236 |
| T102        | GCGGCAAATAGAAGCTCTCC    | GACCACAACTGCGGAACAAT   | 1R  | 54690630  | 233   | 291 |
| T103        | ACATCCAGATCCAACCGCTT    | CCCCAAGTGAGTAGGCAAGA   | 1R  | 12789006  | 212   | 272 |
| T104        | AGGCAAGAGAGATGAACGATC   | CTGCTCGTTCTCTAGTCGG    | 1R  | 15352984  | 466   | 400 |
| T105        | CCAACGCGCCCAGTGAAG      | TTCATTGCTGCTAACGAGGC   | 1R  | 15491506  | 222   | 316 |
| T106        | GAGATAGGCGTTGCACATAGT   | TTTGATCTGGACCAACTGCG   | 1R  | 15957292  | 168   | 261 |
| T107        | TGTCTCTCGTCATAAAACCCCT  | TGACCACATTCTTCAAAGTCGT | 1R  | 17154000  | 353   | 399 |
| T108        | GTGTCCGGACCATTTGTAACA   | AGAAAGAAAACAAGTGGCGACT | 1R  | 22350011  | 380   | 464 |
| T109        | GCTGGGATATTTGGCTGCTT    | AAATCCGACAAGCACACGAG   | 1R  | 24124839  | 424   | 494 |
| T110        | ACGAGAGCTTGAAGATGGGA    | ATATGAGTCTGTGGAGCCGG   | 1R  | 33014029  | 347   | 388 |
| T111        | TGAAAGGTAGCGGAGTTTGAG   | GGAGAGGTTGCCATCTAGCT   | 1R  | 38611757  | 384   | 474 |
| T112        | CACCTTCATCCCGTCGTCC     | GTGGTGGTGGCTGAGTCG     | 1R  | 46284636  | 234   | 292 |
| T113        | GACAGCATCGACCACAAGTG    | CCCGGGCCAGTTAAAATCAAA  | 1R  | 649581    | 239   | 277 |
| T114        | GCACACTTCCAAACCAGACC    | CCCTGTGGAAAACTCGACAC   | 1R  | 541456    | 420   | 340 |
| T115        | TTGCTGATTTGCTCGCCTAG    | GGAGCTCGACCCCAAGAC     | 1R  | 674204    | 643   | 682 |
| T116        | ATGATCGCTTAAACATGGCTATC | CGCATGGGGAAAGACATCAC   | 1R  | 2026781   | 188   | 248 |
| T117        | GAACATTTGAACCACGGAAACA  | GCTTTTCTTCCATGTTGTGCA  | 1R  | 2908643   | 421   | 462 |
| T118        | CATGTTATCGGATGCCTTGCT   | CCACCAAAGTTCACGCTCAA   | 1R  | 71627081  | 315   | 373 |
| T119        | AGGAGTTGCTGAGTCTAAGGT   | ACGCCACACCTCCCTATTC    | 1R  | 72760894  | 288   | 250 |
| T120        | CGCGTTTTGACACCCTAAGA    | TGCGAAGGTTGGACAAATTTCT | 1R  | 79675221  | 363   | 397 |
| T121        | AACCTCGATCCATCCCAGAG    | CAAAAGCAGTCCCACACGAA   | 1R  | 80352523  | 277   | 207 |
| T122        | GGTTGCTTTGTGATGAGTGC    | TCACTGATAATCAATTTACCGC | 1R  | 91822017  | 177   | 222 |
| T123        | TGAATCCTGCCCCTTCACAT    | GCAGATGCGGTTAGATCACC   | 1R  | 97560774  | 495   | 462 |
| T124        | CACTGCGCCCATCTTAAGAC    | TGTCCCTCTCATGTTCTCAAGA | 1R  | 97805858  | 317   | 377 |
| T125        | CACGCTGAGCTATGTCACAA    | TCCTTCTCGTGATCTATGCCA  | 1R  | 100576298 | 308   | 348 |
| T126        | GCCTTCACTATGTTATCGGGG   | CCTGCAACGAGGGCTTCT     | 1R  | 100734177 | 803   | 843 |
| T127        | ACCAAGCCCCAAGACAAGAT    | GACCTGCTCCATTTCCCTTG   | 1R  | 102359194 | 208   | 254 |
| T128        | GAGTCTCCACAGTAGGCACA    | CTGTACCTCGCCAGAACTCT   | 1R  | 106140400 | 408   | 346 |
| T129        | AACTCTAGCTCCATCCTTGCA   | CGTCTTGCGCGTCTTGATG    | 1R  | 107956976 | 191   | 150 |
| T130        | TTTCTCTCTGCCTCTCTCCA    | TGTGGTAAAGTGTGAATGGCA  | 1R  | 109963584 | 228   | 300 |

Çizelge 4.15. Tasarlanan InDel primerlerinin genetik çeşitlilik analizi, translokasyon tespiti ve gen bölgesi ilişkisine göre sınıflandırılması

| Primer Kodu | Genetik Çeşitlilik | Translokasyon Tespiti | Gen Bilgisi       |
|-------------|--------------------|-----------------------|-------------------|
| T101        | +                  | +                     | -                 |
| T102        | +                  | +                     | -                 |
| T103        | +                  | +                     | -                 |
| T104        | +                  | +                     | -                 |
| T107        | -                  | +                     | -                 |
| T108        | +                  | +                     | -                 |
| T110        | +                  | +                     | -                 |
| T111        | +                  | +                     | -                 |
| T113        | +                  | +                     | SECCE1Rv1G0000100 |
| T114        | +                  | +                     | -                 |
| T115        | -                  | +                     | SECCE1Rv1G0000120 |
| T116        | +                  | +                     | -                 |
| T118        | +                  | +                     | -                 |
| T119        | +                  | +                     | -                 |
| T120        | +                  | +                     | SECCE1Rv1G0011620 |
| T121        | -                  | +                     | -                 |
| T122        | -                  | +                     | -                 |
| T123        | -                  | +                     | -                 |
| T124        | -                  | +                     | -                 |
| T125        | +                  | +                     | -                 |
| T126        | +                  | +                     | SECCE1Rv1G0013110 |
| T127        | +                  | +                     | -                 |
| T128        | +                  | +                     | SECCE1Rv1G0013480 |
| T129        | +                  | +                     | SECCE1Rv1G0013710 |
| T130        | -                  | +                     | -                 |



Şekil 4.18. PCR sonuçlarına ait bazı agaroz jel görüntüleri (1,2: Mv179 3: Mv9kr1(translokasyon içermeyen ekmeklik buğday çeşidi), 4: MvMagdalena 5,6,7,8,9: Çavdar çeşitleri M: 100 bp DNA Ladder)



Şekil 4.19. T101 primerine ait IGV(Integrative Genomics Viewer) görüntüsü

#### 4.2.2. Genetik Çeşitlilik ve Filogenetik Analiz

Polimorfik olduğu belirlenen 18 InDel markörü için etkin allel sayısı (Ne), beklenen heterozigotluk (He), düzeltilmiş beklenen heterozigotluk (uHe) ve Shannon çeşitlilik indeksi (I) değerleri hesaplanmış olup ilgili değerler Çizelge 4.16'da verilmiştir. Analiz materyali; farklı ekolojilerden toplanmış çavdar genotipleri, kültüre alınmış çavdar çeşitleri, tritikale genotipleri ve 1BL.1RS translokasyonuna sahip Mv179 ile MvMagdalena hatlarını kapsamaktadır.

Çizelge 4.16. Genetik Çeşitlilik Parametreleri

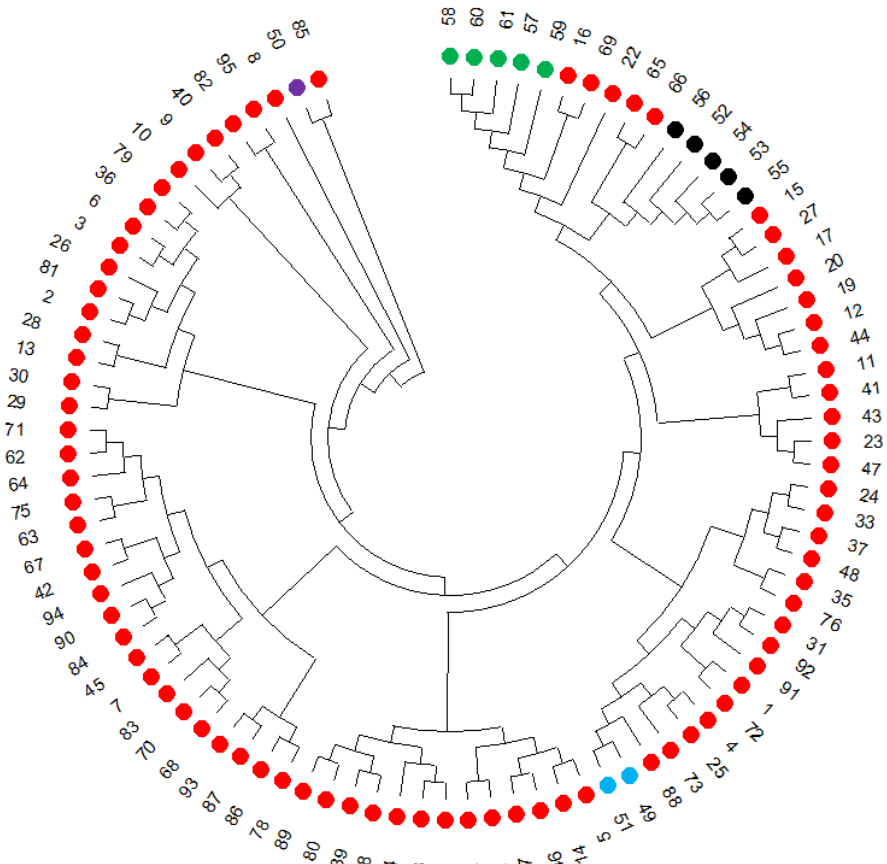
| Primer Kodu | N  | Ne    | I     | He    | uHe   |
|-------------|----|-------|-------|-------|-------|
| T101        | 95 | 1.359 | 0.414 | 0.252 | 0.254 |
| T102        | 95 | 1.248 | 0.207 | 0.134 | 0.135 |
| T103        | 95 | 1.689 | 0.574 | 0.390 | 0.392 |
| T104        | 95 | 1.715 | 0.586 | 0.401 | 0.403 |
| T108        | 95 | 1.541 | 0.489 | 0.324 | 0.326 |
| T110        | 95 | 1.556 | 0.451 | 0.301 | 0.302 |
| T111        | 95 | 1.348 | 0.371 | 0.230 | 0.231 |
| T113        | 95 | 1.527 | 0.447 | 0.296 | 0.298 |
| T114        | 95 | 1.215 | 0.227 | 0.133 | 0.134 |
| T116        | 95 | 1.490 | 0.440 | 0.286 | 0.288 |
| T118        | 95 | 1.985 | 0.689 | 0.496 | 0.499 |
| T119        | 95 | 1.262 | 0.319 | 0.191 | 0.192 |
| T120        | 95 | 1.589 | 0.526 | 0.350 | 0.352 |
| T125        | 95 | 1.326 | 0.364 | 0.225 | 0.226 |
| T126        | 95 | 1.457 | 0.423 | 0.280 | 0.281 |
| T127        | 95 | 1.281 | 0.310 | 0.187 | 0.188 |
| T128        | 95 | 1.608 | 0.558 | 0.373 | 0.375 |
| T129        | 95 | 1.842 | 0.647 | 0.455 | 0.458 |
| Ortalama    | 95 | 1.502 | 0.447 | 0.295 | 0.296 |

Çizelge 4.16. incelendiğinde, markörler arasında çeşitlilik parametrelerinde belirgin farklılıklar bulunduğu görülmektedir. Etkin allel sayısı (Ne), markörlere bağlı olarak 1.215 (T114) ile 1.985 (T118) arasında değiştiği görülmektedir. Ne değerlerinin yüksek olduğu markörler (T118, T129, T103 ve T104), analiz edilen materyaldeki allel frekansı dağılımının bu markörlerde daha belirgin farklılaştığını göstermektedir. Çavdar doğal popülasyonlarında geniş allelik çeşitliliğin bulunduğu önceki araştırmalarda rapor edilmiştir (Bolibok-Brągoszewska ve ark., 2014; Schreiber ve ark., 2019).

Shannon çeşitlilik indeksi (I) değerleri 0.207 (T102) ile 0.689 (T118) arasında değişmiştir. "I" değerlerinin yüksek olduğu markörler (T118, T129, T103, T104), popülasyonun genetik ayrışmasını daha net biçimde gösteren markörlerdir. Çavdar genomunun özellikle R1 (sentromere yakın) ve R3(uç) bölgelerinde yoğun varyasyon içerdiği rapor edilmiştir (Rabanus-Wallace ve ark., 2021). Bu nedenle yüksek "I" değerine sahip markörlerin, varyasyonun yoğunlaştığı bu tür genomik alanları temsil etme olasılığı göz ardı edilmemektedir.

Genetik çeşitlilik parametreleri birlikte değerlendirildiğinde, T118, T129, T103 ve T104 markörlerinin koleksiyon içerisindeki allel frekansının farklılaşmasını daha belirgin şekilde yansıttığı saptanmıştır. Buna karşılık T102, T114 ve T127 markörlerindeki değerlerin daha düşük olması, bu markörlerin koleksiyonun daha korunmuş veya varyasyon açısından sınırlı genomik bölgelerini temsil ettiğini düşündürmektedir. Doğal çavdar popülasyonlarının materyal içinde yer alması özellikle T118 ve T129 gibi markörlerde çeşitlilik parametrelerinde anlamlı artışa neden olmuş olup, bu bulgu doğal çavdar popülasyonlarında geniş allel çeşitliliği bulunduğunu gösteren araştırmalarla uyumludur (Bolibok-Brağoszewska ve ark., 2014; Schreiber ve ark., 2019).

Genotipler arasındaki genetik ilişkilerin belirlenmesi amacıyla polimorfik InDel markörleri kullanılarak Neighbor-Joining (NJ) algoritmasına dayalı bir filogenetik analiz gerçekleştirilmiştir. Bu yaklaşım, materyaldeki genetik uzaklıkların görselleştirilmesini sağlamış ve genotiplerin genetik benzerliklerine göre nasıl gruplaştığını ortaya koymuştur. Elde edilen filogenetik dendrogram, NJ dendrogramı Şekil 4.20’de vermiştir.



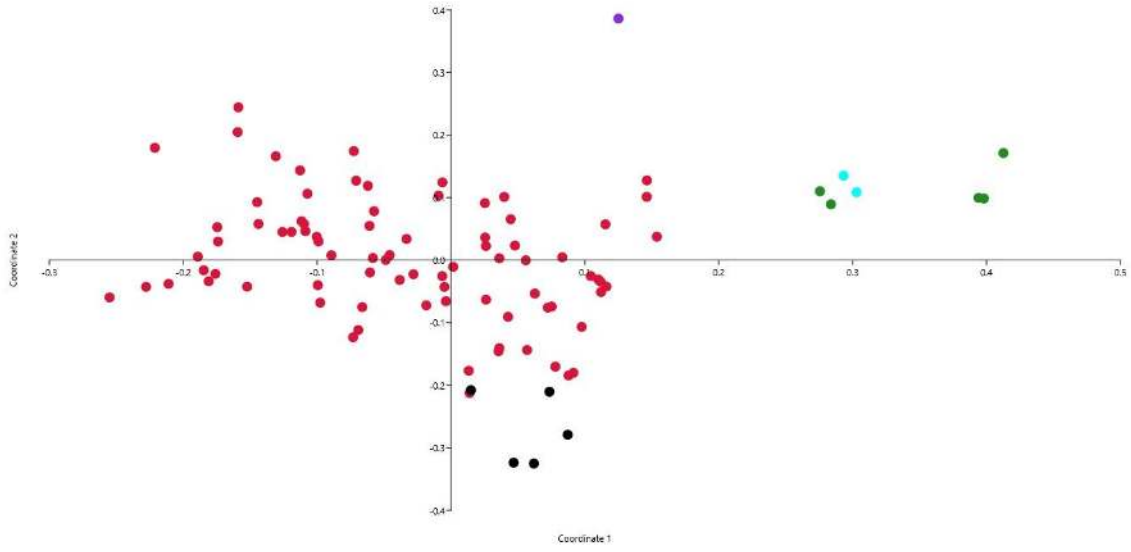
Şekil 4.20. Analiz edilen genotiplerin filogenetik ağacı (Kırmızı: Geçiş Formu Çavdar Genotipleri Mavi: Mav179 ve Mv Magdalena Siyah: Kültür formu çavdar çeşitleri Yeşil: Tritikale Mor: Ekmeklik Buğday)

Şekil 4.20 incelendiğinde, analiz edilen genotiplerin tür kökenlerine ve genetik benzerlik düzeylerine göre belirli kümeler oluşturduğu görülmektedir. Kırmızı renkle gösterilen geçiş formu çavdar genotipleri, filogenetik ağacın geniş bir bölümüne dağılmış olup, bu durum doğal populasyonlardan gelen genetik çeşitliliğin yüksek olduğunu yansıtmaktadır. Bu sonuç, çavdarın doğal populasyonlarında yüksek varyasyon gözlemlendiğini bildiren çalışmalarla uyumludur (Bolibok-Bragoszewska et al., 2014; Schreiber et al., 2019).

Mavi renkle temsil edilen *Mv179* ve *Mv Magdalena* genotipleri, kültür formu çavdar çeşitleriyle (siyah) yakın bir konumda yer alarak, translokasyon kökenli genetik benzerliklerin varlığını ortaya koymuştur. Yeşil renkle gösterilen tritikale genotipleri kendi içlerinde gruplanmış, bu da tür içi genetik yakınlığın korunduğunu göstermektedir. Dendrogramın sol üst kısmında yer alan ekmeklik buğday genotipi ise tüm gruplardan belirgin biçimde ayrılmakta ve bağımsız bir küme oluşturmaktadır. Bu ayrışma, ekmeklik buğdayın 1RS koluna sahip olmaması nedeniyle çavdar ve tritikale materyalinden genetik olarak uzak konumlandığını göstermektedir. Bu genotip, *Mv179*'un ebeveyn hattını temsil etmekle birlikte 1RS taşımadığı için, genetik olarak çavdar ve tritikale materyalinden uzak konumlanmıştır.

Genel olarak NJ dendrogramı; doğal dağılım gösteren geçiş formundaki çavdar genotipleri, kültür çavdarı, 1BL.1RS translokasyon hatları ve tritikale genotiplerinin birbirinden ayrıldığını, bundan dolayı da InDel markörlerinin farklı genetik grupları ayırt etmede etkili olduğunu ortaya koymaktadır.

Genetik uzaklıkların iki boyutlu düzlemde görselleştirilmesi amacıyla Principal Coordinate Analysis (PCoA) uygulanmıştır. Analiz sonucunda genotipler arası varyasyonun ilk iki eksen üzerinde toplandığı ve materyalin genel genetik yapısının ayırt edilebilir kümeler halinde dağıldığı görülmüştür. Elde edilen dağılım grafiği Şekil 4.21.'de sunulmuştur. Şekil 4.21 incelendiğinde, doğal yayılım gösteren geçiş formu çavdar genotiplerinin (kırmızı) geniş bir alana yayıldığı ve materyal içerisindeki en yüksek varyasyonun bu grup tarafından temsil edildiği görülmektedir. Bu genotiplerin hem yatay hem dikey eksen boyunca geniş bir aralığa dağılması, doğal yayılım gösteren geçiş formu çavdar populasyonlarında farklı allelik yapıların bulunduğunu açık biçimde ortaya koymaktadır.



Şekil 4.21. PCoA(Principal Coordinate Analysis) grafiği (Kırmızı: Geçiş Formu Çavdar Genotipleri Mavi: Mv179 ve Mv Magdalena Siyah: Çavdar çeşitleri Yeşil: Tritikale Mor: Ekmeklik Buğday)

Kültür çavdarı genotiplerinin (siyah) yabani çavdara kıyasla daha dar bir bölgede toplandığı ve varyasyon aralığının belirgin şekilde azaldığı tespit edilmiştir. Bu kümelenme, kültür çavdarının daha sınırlı bir allelik yapıya sahip olduğunu göstermektedir.

Mv179 ve MvMagdalena hatlarının, kültür çavdarı genotiplerinin bulunduğu bölge ile üst üste gelmediği ve yabani çavdar kümesinin kenarında konumlandığı belirlenmiştir. Bu konumlanma, 1RS kromozom kolunun varlığının genetik uzaklığı güçlü biçimde etkilediğini ve translokasyonlu hatların allelik profilini çavdar genetik havuzuna yaklaştırdığını göstermektedir.

Tritikale genotiplerinin (yeşil) grafik üzerinde diğer tüm gruplardan ayrılarak sağ tarafta kompakt bir küme oluşturduğu görülmektedir. Tritikale grubu toplam varyasyonun önemli bir kısmını ilk eksen üzerinde temsil ederek diğer materyallerden net biçimde ayrılmıştır.

Mor renkle gösterilen ekmeklik buğday genotipinin ise tüm gruplardan belirgin şekilde uzaklaştığı ve grafiğin üst orta bölümünde tek başına konumlandığı tespit edilmiştir. Bu genotipin Mv179'un atasını temsil etmesine rağmen 1RS kromozom kolunu taşıması nedeniyle çavdar temelli gruplardan ayrıldığı anlaşılmaktadır.

Yapılan filogenetik (Neighbor-Joining) ve Principal Coordinate Analysis (PCoA) değerlendirmeleri sonucunda, analiz materyalinin kendi içinde gruplandığını göstermektedir. Bunlar doğal yayılım gösteren çavdar(geçiş formu) genotipleri, kültür çavdarı, tritikale, 1BL.1RS translokasyon hatları (Mv179 ve MvMagdalena) ve ekmeklik buğday olarak değerlendirilmiştir. Doğal yayılım gösteren çavdar genotipleri geniş bir varyasyon aralığı sergileyerek en yüksek genetik çeşitliliği temsil etmiş, kültür çavdarı ise daha dar bir alanda kümelenmiştir. Mv179 ve MvMagdalena hatlarının kültür çavdarından ayrılarak yabani çavdar grubuna yakın bir konumda yer aldığı belirlenmiştir. Bu durum 1RS kromozom kolunun genetik uzaklığı belirgin ölçüde etkilediğini

ortaya koymuştur. Tritikale genotipleri, diğer tüm materyalden ayrı, kompakt bir küme oluşturarak melez genom yapısını yansıtmıştır. Ekmeklik buğday genotipi ise tüm gruplardan uzak bir konumda yer almış ve 1RS kolunu taşımamasının genetik olarak ayırt edici bir etki yarattığı doğrulanmıştır.

Bu analizler, Elde edilen sonuçlar, InDel markörlerinin genotipler arasındaki varyasyonu etkili biçimde ayırt edebildiğini ve 1RS kolunun genetik katkısını açıkça ortaya koyduğunu göstermiştir. Böylece söz konusu markörlerin ışlah programlarında genetik çeşitliliğin belirlenmesi, materyalin sınıflandırılması ve 1BL.1RS translokasyonunun izlenmesi gibi amaçlarla güvenle kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

#### **4.2.3. InDel Markörlerinin Polimorfizmlerinin Değerlendirilmesi**

InDel markörlerinin ayırt edicilik düzeylerini ve genetik varyasyonu yansıtmış kapasitelerini belirlemek amacıyla, markör performans parametreleri iMEC (Integrated Molecular Marker Effectiveness Calculator) yazılımı (<https://irscope.shinyapps.io/iMEC/>) kullanılarak hesaplanmıştır. iMEC, farklı DNA markörü tipleri için heterozigotluk (H), polimorfizm bilgi içeriği (PIC), ayırt edicilik gücü (D), etkileşim katsayısı (E), markör indeksi (MI) ve ayırma kapasitesi (R) gibi istatistiksel ltleri standartlaştırılmış şekilde hesaplayan bir platformdur. Bu analizler, çalışmada kullanılan InDel markörlerinin genetik çeşitliliği yansıtmış etkinliğinin nesnel ve istatistiksel olarak değerlendirilmesini sağlamaktadır. Bu analiz sonucunda elde edilen sonuçlar izelge 4.17’de verilmiştir.

Çizelge 4.17. Primerlerin markör performans parametre bulguları

| Index | H     | PIC   | E     | MI    | D     | R     |
|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| T101  | 0.405 | 0.387 | 1.126 | 0.001 | 0.921 | 2.253 |
| T102  | 0.290 | 0.427 | 0.705 | 0.001 | 0.969 | 0.800 |
| T103  | 0.500 | 0.344 | 1.011 | 0.003 | 0.746 | 1.242 |
| T104  | 0.494 | 0.347 | 1.105 | 0.003 | 0.696 | 1.137 |
| T108  | 0.492 | 0.348 | 2.811 | 0.003 | 0.685 | 2.274 |
| T110  | 0.492 | 0.348 | 0.874 | 0.002 | 0.810 | 0.674 |
| T111  | 0.441 | 0.372 | 1.642 | 0.002 | 0.893 | 1.747 |
| T113  | 0.485 | 0.351 | 2.074 | 0.002 | 0.829 | 1.958 |
| T114  | 0.307 | 0.422 | 1.137 | 0.001 | 0.964 | 0.989 |
| T116  | 0.457 | 0.365 | 0.705 | 0.002 | 0.877 | 1.053 |
| T118  | 0.332 | 0.414 | 1.579 | 0.003 | 0.378 | 0.842 |
| T119  | 0.489 | 0.350 | 1.274 | 0.002 | 0.821 | 0.674 |
| T120  | 0.489 | 0.350 | 1.274 | 0.002 | 0.821 | 2.147 |
| T125  | 0.378 | 0.398 | 1.263 | 0.001 | 0.937 | 2.526 |
| T126  | 0.443 | 0.371 | 1.326 | 0.002 | 0.891 | 2.463 |
| T127  | 0.428 | 0.377 | 1.242 | 0.001 | 0.904 | 0.863 |
| T128  | 0.493 | 0.347 | 1.326 | 0.002 | 0.805 | 2.379 |
| T129  | 0.484 | 0.352 | 1.179 | 0.003 | 0.654 | 1.642 |

Çizelge 4.17 incelendiğinde, markörler arasında polimorfizm gücü açısından belirgin farklılıklar bulunduğu görülmektedir. Heterozigotluk (H) değerlerinin 0.290 ile 0.500 arasında değiştiği belirlenmiştir. T103, T104, T108, T110 ve T128 markörlerinde diğer markörlere göre daha yüksek heterozigotluk değerlerinin gözlenmiş olması, bu markörlerin çalışılan materyaldeki allelik çeşitliliği daha etkili biçimde yansıttığını göstermektedir. Buna karşılık T102 ve T114 gibi markörlerde daha düşük H değerleri saptanmış olup bu markörlerin varyasyon yansıtma kapasitesinin sınırlı olabileceği anlaşılmaktadır.

Polimorfizm Bilgi İçeriği (PIC) değerleri 0.344–0.427 aralığında bulunmuştur. T102 ve T114 markörlerinin yüksek PIC değerlerine sahip olması, bu markörlerin genetik varyasyonun belirlenmesinde daha üst düzey ayırt edicilik sunduğunu göstermektedir. Tüm markörlerin PIC değerlerinin orta düzey polimorfizme karşılık gelen 0.25–0.50 aralığında yer alması, kullanılan InDel markörlerinin genel olarak güvenilir bir çeşitlilik analizi kapasitesine sahip olduğunu ortaya koymaktadır. Bolibok-Brağoszewska ve ark. (2014) tarafından çavdar genetik çeşitliliğinin değerlendirilmesine yönelik olarak yürütülen çalışmada, DArT markörlerine ait PIC değerlerinin 0,01 ile 0,50 aralığında olduğu ve ortalama PIC değerinin 0.34 olarak saptandığı rapor edilmiştir. Ayrıca, PIC > 0.41 değerine sahip markörlerin toplam markörlerin %51.7'sini oluşturduğu belirtilmiştir. Bu bulgular, çavdar genomunda yüksek düzeyde allelik çeşitlilik bulunduğunu göstermektedir. Balážová ve ark. (2016) tarafından yürütülen bir çalışmada, çavdar SSR markörlerinin tritikalede çeşitliliği ayırt etme gücü değerlendirilmiş ve altı polimorfik markör üzerinden toplam 22 allel tespit edilmiştir. Allel sayısının 2 ile 5 arasında değiştiği bildirilmiş,

ortalama allel sayısı 3,67 olarak hesaplanmıştır. Çalışmada polimorfizm bilgi içeriği (PIC) değerlerinin 0,282 (SCM43) ile 0,706 (SCM86) arasında değiştiği saptanmış, ortalama PIC değeri ise 0.505 olarak rapor edilmiştir. Bu sonuçlar, çavdar SSR markörlerinin tritikalede genetik farklılıkların belirlenmesinde yüksek ayırt edicilik sunduğunu göstermekte olup, markör performansının PIC değeri ile doğrudan ilişkili olduğunu ortaya koymaktadır. Vyhnanek ve ark. (2009) tarafından tritikalede genetik çeşitliliğin belirlenmesine yönelik yapılan çalışmada, 48 SSR markörü kullanılarak toplam 184 allel tespit edilmiştir. Markör başına ortalama allel sayısının 3.83 olduğu bildirilmiştir. Polimorfizm bilgi içeriği (PIC) değerlerinin 0 ile 0.85 arasında değiştiği ve ortalama PIC değerinin 0.48 olarak hesaplandığı belirtilmiştir. Bu sonuçlar, SSR markörlerinin tritikalede yüksek polimorfizm düzeyi ortaya koyduğunu göstermektedir. Balážová ve ark (2016) tarafından çavdar çeşitlerinin moleküler karakterizasyonuna yönelik olarak yürütülen çalışmada, Orta Avrupa ve eski SSCB (SUN) menşeli toplam 45 çavdar genotipi, altı SSR markörü kullanılarak değerlendirilmiştir. Çalışmada kullanılan altı spesifik SSR primeri toplam 58 polimorfik allel üretmiş ve markör başına ortalama allel sayısı 9,7 olarak bildirilmiştir. Allel sayısı 6 (SCM2) ile 14 (SCM86) arasında değişmiştir. Çeşitlilik indeksi (DI) değerlerinin 0.5478–0.887 aralığında olduğu, ortalama DI değerinin 0.778 olarak hesaplandığı belirtilmiştir. Polimorfizm bilgi içeriği (PIC) değerleri incelendiğinde, en düşük değer 0.484 (SCM2) ve en yüksek değer 0,885 (SCM86) olarak bildirilmiş, ortalama PIC değeri 0.760 olarak hesaplanmıştır. UPGMA algoritmasına dayalı olarak oluşturulan dendrogram, çavdar genotiplerini dört ana kümede toplamış ve kümelenmenin belirli ölçüde coğrafi köken ile ilişkili olduğu gözlenmiştir. Çalışma sonuçları, SSR markörlerinin çavdar çeşitlerinin genetik çeşitliliğini ortaya koymada yüksek bilgilendiriciliğe sahip olduğunu göstermektedir. Kuleung ve ark (2006), 80 tritikale genotipinde SSR markörleriyle ortalama gen çeşitliliği değerini 0.54 olarak rapor etmişlerdir.

Markörler arasındaki ayırt edicilik gücünü ifade eden D parametresinin 0.378 ile 0.969 arasında değiştiği belirlenmiştir (Çizelge 4.17). T102 ve T114 markörlerinde gözlenen yüksek D değerleri, bu markörlerin genotipleri birbirinden ayırma konusunda en yüksek performansı gösterdiğini ortaya koymaktadır. Etkileşim katsayısı (E) değerlerinin ise 0.705–2.811 gibi geniş bir aralıkta yer aldığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.18). T108, T113, T111 ve T118 markörlerinde yüksek etkileşim katsayılarının kaydedilmiş olması, bu markörlerin genotipler arasındaki varyasyonu daha güçlü biçimde ayırtabildiğini göstermektedir.

Ayırma kapasitesini ifade eden R parametresinin 0,674–2,526 arasında değiştiği görülmüş olup, T125, T126, T128 ve T108 markörlerinin en yüksek R değerlerine sahip olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.18). Bu markörlerin özellikle genotipleri ayırmada güçlü ayırma kapasitesi olduğu tespit edilmiştir.

Genel olarak değerlendirildiğinde, InDel markörlerinin önemli bir bölümünün çalışılan materyaldeki genetik çeşitliliği belirlemede başarılı olduğu saptanmıştır. T108, T113, T125, T126 ve T128 markörleri yüksek polimorfizm parametreleri ve ayırma güçleri ile öne çıkarken; T102 ve T114

markörlerinin özellikle ayırt edicilik gücü açısından daha baskın olduğu belirlenmiştir. Elde edilen bulgular, InDel markörlerinin hem genotipik ayrışmayı değerlendirme hem de genetik çeşitliliği ortaya koyma açısından etkili moleküler araçlar olduğunu göstermektedir.





## 5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Kriszta çavdar çeşidi kökenli 1BL.1RS translokasyonuna sahip Mv179 ekmeklik buğday hattının 1RS kromozom kolununun DNA sekans verisi ve biyoinformatik çalışmalar sonucu elde edilen sonuçlar aşağıda maddeler halinde ifade edilmiştir.

1. Flow-sorting ve FISHIS analizleri sonucunda 1BL.1RS kromozomu yüksek saflıkta (> %80) ayrıştırılmıştır. FastQC sonuçları, NovaSeq kısa okuma verisinin kalite, GC içeriği ve okuma uzunluğu açısından yüksek standarda sahip olduğunu göstermiştir.
2. Okumaların 1B ve 1R kromozomlarına hizalanması, flow-sorting ile elde edilen kromozomal özgüllüğün biyoinformatik olarak doğrulandığını ortaya koymuştur.
3. ABySS ile yapılan de novo montajda unitig–contig–scaffold kademeleri arasında yapısal bütünlüğün arttığı, toplam scaffold uzunluğunun 1.20 Gb olduğu belirlenmiştir.
4. Scaffold aşamasında en uzun dizisel birimin 75 517 bp olduğu tespit edilmiştir.
5. BUSCO analizleri, Illumina kısa okuma verileriyle üretilen Mv179 1BL1RS montajının yeterli yapısal bütünlük ve kapsayıcılığa sahip olduğunu göstermiştir.
6. RepeatExplorer2 ve RepeatModeler/RepeatMasker analizleri, 1BL1RS kromozomal segmentinin yüksek oranda tekrarlayan diziler içerdiğini göstermiştir. Okumaların %74'ü kümelerle dahil olmuş, baskın tekrar sınıfının Class I LTR retrotranspozonlar olduğu belirlenmiştir. Ty3/Gypsy elemanları Ty1/Copia'ya göre daha yoğun olup Gypsy ailesi içinde OTA, Tat, Athila, Tekay ve CRM alt aileleri; Copia içinde Angela ve SIRE alt aileleri belirgin temsil göstermiştir. Montajın %85.9'unun tekrarlayan dizilerden oluştuğu, LTR elementlerinin genomun ~%30'unu oluşturduğu ve analizlerin genel olarak birbiriyle tutarlı olduğu belirlenmiştir. Bu yapı, 1RS kökenli heterokromatik segmentin korunduğunu göstermektedir.
7. Mv179 1BL1RS üzerinde çok sayıda aday NLR geni tanımlanmıştır. NB-ARC domain dizileri hizalanmış ve maksimum olabilirlik temelli filogenetik analiz yapılmıştır. NLR genlerinin tür bazında kümelendiği, bu örneğin çoğunlukla çavdar gruplarında yer aldığı görülmüştür. Bazı NLR'lerin Lr21, Pm2, Sr21, Lr34, Yr36, Sr46, Lr22a, Pm21, Yr10, Sr35 ve Sr50 genleriyle yakın dallarda konumlandığı ve NB-ARC domaininin yüksek oranda korunduğu tespit edilmiştir.
8. AUGUSTUS ile yapılan gen tahmininde 24 547 protein elde edilmiş; bunların %75'inin T. aestivum 1B, %25'inin S. cereale 1R homologlarıyla en yüksek benzerliği gösterdiği belirlenmiştir.
9. eggNOG-mapper, GO, KEGG ve InterPro analizleri; proteinlerin geniş bir fonksiyonel çeşitliliğe sahip olduğunu göstermiştir. COG sınıflarında “fonksiyonu bilinmeyen proteinler” en büyük grubu oluşturmuş, metabolizma, sinyal iletimi, transkripsiyon ve

stres yanıtı ilişkili kategoriler yoğun temsil edilmiştir. GO analizinde metabolik süreçler ve katalitik aktivite ön planda olup KEGG yolları arasında genel metabolik yollar ve savunma mekanizmaları öne çıkmıştır. InterProScan, pentatrikopeptit tekrar, P-loop NTP hidrolaz ve protein kinaz gibi domainlerin yüksek oranlarda bulunduğunu göstermiştir.

10. Toplam 314,8 milyon okumanın %74.4'ü çavdar Lo7 1R referansına hizalanmıştır. Ortalama kapsama derinliği 61.6x olup genel indel hata oranı %6.5'tir. FreeBayes ve SnpEff analizlerinde 186,8 milyon varyant işlenmiş, varyantların büyük bölümü MNP formunda bulunmuştur. Toplam 32 milyon SNP, 643 bin insersiyon ve 711 bin delesyon tanımlanmış; Ts/Tv oranı 1.63 olarak hesaplanmıştır. Fonksiyonel etki sınıflarında çoğunluğun "modifier" kategorisinde olduğu, 647 bin missense ve 84 bin synonymous varyant bulunduğu belirlenmiştir. Genomik dağılımda intergenik varyantlar baskındır.
11. Tüm analizler birlikte değerlendirildiğinde, 1BL1RS kromozomunun yüksek oranda tekrar içeren, heterokromatik bir yapı sergilediği; geniş bir NLR gen repertuarı, güçlü metabolik/ savunma fonksiyonları ve yüksek varyasyon yoğunluğu barındırdığı ortaya konmuştur.

InDel primerlerin geliştirilmesi ve analizi sonucu elde edilen sonuçlar aşağıda verilmiştir.

1. Mv179 1BL1RS translokasyon bölgesine özgü tasarlanan 30 InDel primerin validasyonu sonucunda 5 primerin amplifikasyon üretmediği, 1 primerin ise monomorfik olduğu belirlenmiş ve bu primerler analizden çıkarılmıştır. Geriye kalan 24 primer translokasyonun doğrulanması ve genetik çeşitlilik analizlerinde güvenilir bulunmuştur. Bu set içindeki 18 polimorfik primer yabancı çavdar varyasyonunu ayırt etmede yüksek performans göstermiş, 6 primer ise 1BL1RS segmentini tanımlamada etkili markörler olarak değerlendirilmiştir. Ayrıca gen anotasyonu ile ilişkili 7 primerden 5'inin hem polimorfik özellik gösterdiği hem de translokasyon tespitinde çalıştığı doğrulanmıştır.
2. Gerçekleştirilen Neighbor-Joining (NJ) ve Principal Coordinate Analysis (PCoA) sonuçları, materyalin genetik yapısının Yabancı Çavdar, Kültür Çavdarı, Tritikale, 1BL1RS Translokasyon Hatları ve Ekmeklik Buğday şeklinde açık biçimde ayrılan alt gruplara dağıldığını göstermiştir. Analizler, bu gruplar arasındaki genetik farklılaşmanın istatistiksel olarak belirgin olduğunu ortaya koymuştur.
3. Mv179 ve MvMagdalena translokasyon hatlarının kültür çavdarından ayrılarak yabancı çavdar kümesine yakın konumlanması, 1RS kromozom kolunun genetik profili yabancı çavdar havuzuna kaydırıldığını göstermektedir. Bu bulgu, translokasyonun genetik uzaklığı belirleyen başlıca etmenlerden biri olduğunu desteklemektedir.

Bu çalışma ile Mv179 hattına ait 1BL.1RS kromozomu, sekans birleştirme (de novo assembly), tekrar analizi, homoloji karşılaştırmaları, varyant çağırımı ve fonksiyonel anotasyon aşamalarını içeren bütüncül ve çok katmanlı bir genomik yaklaşımla ayrıntılı şekilde karakterize edilmiştir. Elde edilen bulgular, Mv179 1BL.1RS kromozomunun yüksek oranda LTR retrotranspozon içeren ve belirgin heterokromatik organizasyonunu büyük ölçüde koruyan bir yapıya sahip olduğunu göstermiştir. Ty3/Gypsy ve Ty1/Copia gibi LTR süper ailelerinin bu yapı içinde baskın olduğu, ayrıca hem buğday 1B hem de çavdar 1R kromozomlarından taşınan gen açısından zengin olduğu belirlenmiştir. Yüksek allelik varyasyon yoğunluğu ve polimorfizm düzeyi, translokasyon bölgesinin evrimsel olarak dinamik ve genetik açıdan çeşitliliği yüksek bir segment olduğunu ortaya koymuştur.

Fonksiyonel anotasyon sonuçları, 1BL.1RS kromozomunun metabolik süreçler, sinyal iletimi, stres yanıtı ve savunma mekanizmalarıyla ilişkili gen bakımından geniş bir işlevsel çeşitlilik barındırdığını göstermiştir. NLR analizleri, Mv179 1BL.1RS bölgesine ait NLR genlerinin önemli bir kısmının çavdar NLR repertuarı ile aynı ya da çok yakın filogenetik gruplarda yer aldığını ortaya koymuştur. Bazı NLR dizilerinin bilinen dayanıklılık genleri (*Lr21*, *Pm2*, *Sr21*, *Lr34*, *Yr36*, *Sr46*, *Lr22a*, *Pm21*, *Yr10*, *Sr35*, *Sr50*) ile yakın filogenetik konumlarda kümelendiği belirlenmiştir. Bu sonuç, 1BL.1RS segmenti içinde hastalık dayanımıyla ilişkili yeni allellerin ve aday gen bölgelerinin bulunabileceğini ve bu araştırma kapsamında tanımlanan varyant setinin gelecekte yapılacak haritalama ve doğrulama çalışmalarına doğrudan katkı sağlayabilecek nitelikte olduğunu göstermiştir.

Mv179 1RS bölgesine özgü geliştirilen InDel markörlerinin, hem translokasyonun varlığının doğrulanmasında hem de çavdar, tritikale ve buğday materyalindeki genetik çeşitliliğin ortaya konmasında yüksek ayırt edicilik gösterdiği belirlenmiştir. Amplifikasyon veren 24 primerden 18'inin koleksiyon içerisindeki genetik çeşitliliği ayırt etmeye elverişli polimorfik markörler olduğu, 6 primerin ise 1RS translokasyon bölgesinin varlığını doğrulamada güvenilir birer tanılayıcı markör olarak kullanılabileceği göstermiştir. Neighbor-Joining ve PCoA analizleri, bu markörlerin çavdar, tritikale, 1BL.1RS translokasyon hatları ve ekmeklik buğday materyalini genetik olarak net biçimde ayırtılabildiğini ortaya koymuştur.

Sonuç olarak, bu çalışma ile kapsamlı bir genomik veri seti ve ıslah programlarında doğrudan uygulanabilir bir InDel markör paneli geliştirilmiştir. Elde edilen verilerin, Mv179 kökenli 1RS fragmentlerinin buğday gen havuzuna aktarılması yoluyla genetik çeşitliliğin genişletilmesi, biyotik ve abiyotik strese tolerans, genetik haritalama çalışmaları ve yeni dayanıklılık genlerinin tanımlanması gibi gelecekteki araştırmalar için önemli bir kaynak oluşturduğu sonucuna varılmıştır.



## KAYNAKLAR

- Akgün, D. ve Tosun, M. (2004). Agricultural and cytological characteristics of M1 perennial rye (*Secale montanum* Guss.) as effected by the application of different doses of gamma rays. *Pak. J. Biol. Sci.* 7, 827–833.
- Amiryousefi, A., Hyvönen, J., & Poczai, P. (2018). iMEC: Online marker efficiency calculator. *Applied Plant Science*, 6(6): e01159. <https://doi.org/10.1002/aps3.1159>
- Ammar K, Mergoum M, Rajaram S. (2004). The history of triticale. In: Mergoum M, Gomez-Macpherson H, editors. *Triticale: improvement and production*. FAO, Rome: Italy p. 1–9. 7. <http://www.fao.org/tempref/docrep/fao/009/y5553e/Y5553E00.pdf>
- An, D., Ma, P., Zheng, Q., Fu, S., Li, L., Han, F., ... & Zhang, X. (2019). Development and molecular cytogenetic identification of a new wheat-rye 4R chromosome disomic addition line with resistances to powdery mildew, stripe rust and sharp eyespot. *Theoretical and Applied Genetics*, 132(1), 257-272.
- Andersson SC, Johansson E, Baum M, Rihawi F, El Bouhssini M. (2015) New resistance sources to Russian wheat aphid (*Diuraphis noxia*) in Swedish wheat substitution and translocation lines with rye (*Secale cereale*) and *Leymus mollis*. *Czech J Genet Plant Breed.* 2015;51:162–5.
- Andersson, R., Sandelin, A., & Danko, C. G. (2020). Determinants of enhancer and promoter activities of regulatory elements. *Nature Reviews Genetics*, 21(2), 71–87.
- Anjum F M and Walker C E (1991) Review on the significance of starch and protein to wheat kernel hardness. *J Sci Food Agric* 56: 1-13.
- Audenaert, K., Troch, V., Landschoot, S., & Haesaert, G. (2014). Biotic stresses in the anthropogenic hybrid triticale ( $\times$  *Triticosecale* Wittmack): current knowledge and breeding challenges. *European journal of plant pathology*, 140(4), 615-630.
- Balázsová, Ž., Petrovičová, L., Gálová, Z., & Vivodík, M. (2016). Application of rye SSR markers for detection of genetic diversity in triticale. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 5(6), 623–626.
- Bálint, A. F., Kovács, G. & Sutka, J. (2002). Copper tolerance of *Aegilops*, *Triticum*, *Secale* and triticale seedlings and copper and iron content in their shoots. *Acta Biol. Szeged.* 46, 77–78.
- Bao, Z., & Eddy, S. R. (2002). Automated de novo identification of repeat sequence families in sequenced genomes. *Genome Research*, 12(8), 1269–1276.
- Barbeau, W. E., Schwarzlaff, S. S., Uriyo, M. G., Johnson, J. M., Harris, C. H., & Griffey, C. A. (2003). Origin and practical significance of the sticky dough factor in 1BL/1RS wheats. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83(1), 29–38. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1274>
- Bartoš, J., Paux, E., Kofler, R., Havránková, M., Kopecký, D., Suchánková, P., Šafař, J., Šimková, H., Town, C. D., Lelley, T., Feuillet, C., Doležel, J. (2008). A first survey of the rye (*Secale*

- cereale) genome composition through BAC end sequencing of the short arm of chromosome 1R. *BMC Plant Biology*, 8, 95. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-8-95>
- Bartoš, J., Paux, E., Kofler, R., Havránková, M., Kopecký, D., Suchánková, P., Šafář, J., Šimková, H., Town, C. D., Lelley, T., Feuillet, C., & Doležel, J. (2008). A first survey of the rye (*Secale cereale*) genome composition through BAC end sequencing of the short arm of chromosome 1R. *BMC Plant Biology*, 8, 95.
- Bauer E, Schmutzer T, Barilar I, Mascher M, Gundlach H, Martis MM, ve ark., Towards a whole-genome sequence for rye (*Secale cereale* L.). *The Plant Journal*. 2017; 89(5): 853–69. pmid:27888547
- Bauer, E., Schmutzer, T., Barilar, I., Mascher, M., Gundlach, H., Martis, M. M., ... & Scholz, U. (2017). Towards a whole-genome sequence for rye (*Secale cereale* L.). *The Plant Journal*, 89(5), 853-869.
- Bauer, E., Schmutzer, T., Barilar, I., Mascher, M., Gundlach, H., Martis, M. M., Twardziok, S. O., Hackauf, B., Gordillo, A., Wilde, P., Schmidt, M., Korzun, V., Mayer, K. F. X., Scholz, U., Stein, N., Martis, M. M., Mayer, K. F. X., & Scholz, U. (2017). Towards a whole-genome sequence for rye (*Secale cereale* L.). *The Plant Journal*, 89(5), 853–869. <https://doi.org/10.1111/tpj.13436>
- Bauer, E., Schmutzer, T., Barilar, I., Mascher, M., Gundlach, H., Martis, M. M., Twardziok, S. O., Hackauf, B., Gordillo, A., Wilde, P., Schmidt, M., Korzun, V., Mayer, K. F. X., Scholz, U., & Stein, N. (2017). Towards a whole-genome sequence for rye (*Secale cereale* L.). *The Plant Journal*, 89(5), 853–869.
- Bettge A D and Morris C F (2000) Relationships among grain hardness, pentosan fractions, and end-use quality of wheat. *Cereal Chem* 77: 241-47.
- Blazek J and Copeland L (2008) Pasting and swelling properties of wheat flour and starch in relation to amylose content. *Carbohydr Polym* 71: 380-87.
- Blechl A, Beecher B, Vensel W, Tanaka C and Altenbach S (2016) RNA interference targeting rye secalins alters flour protein composition in a wheat variety carrying a 1BL.1RS translocation. *J Cereal Sci* 68: 172-80.
- Bolger, A. M., Lohse, M., Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114-2120.
- Bolibok-Brągoszewska, H., Targońska, M., Bolibok, L., Rakoczy-Trojanowska, M. (2014). Genetic diversity in rye (*Secale cereale* L.) varieties and breeding materials based on SSR markers. *Plant Molecular Biology Reporter*, 32, 827–837.
- Brown, T. A., Jones, M. K., Powell, W. Allaby, R. G. The complex origins of domesticated crops in the Fertile Crescent. *Trends Ecol. Evol.* 24, 103–109 (2009).
- Burd JD, Porter DR. Biotypic diversity in greenbug (Hemiptera: Aphididae): characterizing new virulence and host associations. *J Econ Entomol.* 2006; 99:959–65.

- Burger JC, Lee S, Ellstrand NC. Origin and genetic structure of feral rye in the western United States. *Mol Ecol*. 2006;15(9):2527–39. pmid:16842424
- Burnett C J, Lorenz K J and Carver B F (1995) Effect of 1B/1R Translocation in Wheat on Physical and Chemical Properties of Starch. *Starch-Stärke* 47: 51-55.
- Cantalapiedra, C. P., Hernández-Plaza, A., Letunic, I., Bork, P., Huerta-Cepas, J. (2021). eggNOG-mapper v2: functional annotation, orthology assignments, and domain prediction at the metagenomic scale. *Molecular biology and evolution*, 38(12), 5825-5829.
- Capella-Gutiérrez, S., Silla-Martínez, J. M., Gabaldón, T. (2009). trimAl: A tool for automated alignment trimming. *Bioinformatics*, 25(15), 1972–1973.
- Carver, B. F., Rayburn, A. L. (1994). Comparison of related wheat stocks possessing 1B or 1RS.1BL chromosomes: Agronomic performance. *Crop Science*, 34(6), 1505–1510. <https://doi.org/10.2135/cropsci1994.0011183X0034000600017x>
- Chen, S., Zhou, Y., Chen, Y., Gu, J. (2018). *fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor*. *Bioinformatics*, 34(17), i884–i890.
- Chikhi, R., Medvedev, P. (2014). Informed and automated k-mer size selection for genome assembly. *Bioinformatics*, 30(1), 31-37.
- Chung O K ve Ohm J B (2000) Cereal Lipids. Pp. 417-477. In: K. Kulp, J. G. Ponte Jr., eds. *Handbook of cereal science and technology*, 2nd edn. Marcel Dekker, New York, NY.
- Cingolani, P., Platts, A., Wang, L. L., Coon, M., Nguyen, T., Wang, L., Ruden, D. M. (2012). A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3. *fly*, 6(2), 80-92.
- Crespo-Herrera LA, Garkava-Gustavsson L, Åhman I. A systematic review of rye (*Secale cereale* L.) as a source of resistance to pathogens and pests in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Hereditas*. 2017 May 25;154:14. doi: 10.1186/s41065-017-0033-5. PMID: 28559761; PMCID: PMC5445327.
- Culvenor, R. A., Oram, R. N. & Fazekas, deS. G. C. (1986). Variation in tolerance in *Phalaris aquatica* L. and a related species to aluminium in nutrient solution and soil. *Aust. J. Agric. Res.* 37, 383–395.
- Danecek, P., Bonfield, J. K., Liddle, J., Marshall, J., Ohan, V., Pollard, M. O., ... & Li, H. (2021). Twelve years of SAMtools and BCFtools. *Gigascience*, 10(2), giab008.
- Dendy D A and Bogdan J (2001) *Cereals and cereal products: Chemistry and technology.* (Springer: ebook).
- DePristo, M. A., Banks, E., Poplin, R., Garimella, K. V., Maguire, J. R., Hartl, C., et al. (2011). A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. *Nature Genetics*, 43(5), 491–498.

- Doležel, J., Vrána, J., Cápál, P., Kubaláková, M., Burešová, V., and Šimková, H. (2014). Advances in plant chromosome genomics. *Biotechnol. Adv.* 32, 122–136. doi: 10.1016/j.biotechadv.2013.12.011
- Doyle, J. J., & Doyle, J. L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical bulletin*.
- Eddy, S. R. (2011). Accelerated profile HMM searches. *PLoS computational biology*, 7(10), e1002195.
- Ehdaie B., Whitkus R.W., Waines J.G. (2003). Root biomass, water-use efficiency, and performance of wheat-rye translocations of chromosomes 1 and 2 in spring bread wheat ‘Pavon’. *Crop Sci* 43:710–717 Friebe
- Faris, J. D, Friebe, B., Gill, B. S. (2002). Wheat genomics: exploring the polyploid model. *Curr Genomics*. 2002;3:577–91.
- Faris, J. D., Friebe, B., Gill, B. S. (2003). Wheat genomics: exploring the polyploid model. *Current Opinion in Plant Biology*, 6(2), 128-133.
- Feldman, M., Levy, A. A. Genome evolution due to allopolyploidization in wheat. *Genetics* 192, 763–774 (2012).
- Flavell, R. B., Bennett, M. D., Smith, J. B., Smith, D. B. (1974). Genome size and the proportion of repeated nucleotide sequence DNA in plants. *Biochemical Genetics*, 12, 257–269. <https://doi.org/10.1007/BF00485947>
- Flynn, J. M., Hubley, R., Goubert, C., Rosen, J., Clark, A. G., Feschotte, C., & Smit, A. F. A. (2020). RepeatModeler2 for automated genomic discovery of transposable element families. *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)*, 117(17), 9451–9457.
- Frankel, O. H., Soulé, M. E. (1981). **Conservation and Evolution**. Cambridge University Press.
- Frederiksen S, Petersen G. A taxonomic revision of *Secale* (Triticea, Poaceae). *Nordic Journal of Botany*. 1998; 18(4): 399–420.
- Friebe B, Hatchett JH, Sears RG, Gill BS. Transfer of Hessian fly resistance from ‘Chappon’ rye to hexaploid wheat via a 2BS/2RL wheat-rye chromosome translocation. *Theor Appl Genet*. 1990;79:385–9. doi:10.1007/bf01186083.
- Friebe B, Jiang J, Raupp WJ, McIntosh RA, Gill BS. Characterization of wheat alien translocations conferring resistance to diseases and pests: current status. *Euphytica*. 1996;91:59–87.
- Fu S, Chen L, Wang Y, Li M, Yang Z, Qiu L, Yan B, Ren Z, Tang Z. Oligonucleotide Probes for ND-FISH Analysis to Identify Rye and Wheat Chromosomes. *Sci Rep*. 2015 May 21;5:10552. doi: 10.1038/srep10552. PMID: 25994088; PMCID: PMC4440213.
- Gailite A, Gaile A, Gaile I, Voronova A, Veinberga I, Kokare A, et al. Genotypic assessment of the Latvian rye (*Secale cereale* L.) Collection. *Proc Latv Acad Sci Sect B Nat Exact, Appl Sci*. 2013;67(3):264–7.

- Garrison, E., Marth, G. (2012). *Haplotype-based variant detection from short-read sequencing*. arXiv preprint arXiv:1207.3907.
- Giorgi D, Farina A, Grosso V, Gennaro A, Ceoloni C, Lucretti S (2013) FISHIS: Fluorescence *In Situ* Hybridization in Suspension and Chromosome Flow Sorting Made Easy. PLoS ONE 8(2): e57994. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057994>
- Goesaert H, Brijs K, Vereijken C M, Gebruers K and Delcour J A (2005) Wheat flour constituents: How they impact bread quality, and how to impact their functionality. Trends Food Sci Technol 16: 12-30.
- Golkari, S., Hasaniani, A. (2017). Molecular evaluation of 1RS-rye translocation distribution in the Iranian dryland wheat cultivars and elite promising lines. *Iranian Journal of Crop Science*, Special Issue, 119-128.
- Grabowski R. Changes in cereal cultivation during the Iron Age in southern Sweden: A compilation and interpretation of the archaeobotanical material. Vol. 20, Vegetation History and Archaeobotany. 2011. p. 479–94.
- Graybosch R A (2001) Quality effects of rye chromatin transfers to wheat. J Cereal Sci 33: 3 16.
- Haley SD, Peairs FB, Walker CB, Rudolph JB, Randolph TL. Occurrence of a new Russian wheat aphid biotype in Colorado. Crop Sci. 2004;44:1589–92.
- Hammer, Ø., Harper, D. A. (2001). Past: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia electronica*, 4(1), 1.
- Han, G., Liu, H., Zhu, S., Gu, T., Cao, L., Yan, H., An, D. (2024). Two functional CC-NBS-LRR proteins from rye chromosome 6RS confer differential age-related powdery mildew resistance to wheat. *Plant Biotechnology Journal*, 22(1), 66-81.
- Han, G., Liu, S., Jin, Y., Jia, M., Ma, P., Liu, H., An, D. (2020). Scale development and utilization of universal PCR-based and high-throughput KASP markers specific for chromosome arms of rye (*Secale cereale* L.). *BMC genomics*, 21(1), 206.
- Han, G., Yan, H., Li, L., An, D. (2025). Advancing wheat breeding using rye: a key contribution to wheat breeding history. *Trends in Biotechnology*.
- Haseneyer, G., Schmutzer, T., Seidel, M., Zhou, R., Mascher, M., Schön, C. C., Bauer, E. (2011). From RNA-seq to large-scale genotyping-genomics resources for rye (*Secale cereale* L.). *BMC Plant Biology*, 11(1), 131.
- Hoang, D. T., Chernomor, O., von Haeseler, A., Minh, B. Q., & Vinh, L. S. (2018). UFBoot2: Improving the ultrafast bootstrap approximation. *Molecular Biology and Evolution*, 35(2), 518–522.
- Hoffmann B. Alteration of drought tolerance of winter wheat caused by translocation of rye chromosome segment 1RS. Cereal Res Comm. 2008;36: 269–78. doi:10.1556/crc.36.2008.2.7.

- Hoffmann, B. (2008). Alteration of drought tolerance of winter wheat caused by translocation of rye chromosome segment 1RS. *Cereal Research Communications*, 36(2), 269–278. <https://doi.org/10.1556/CRC.36.2008.2.7>
- Howell, T., Hale, I., Jankuloski, L., Bonafede, M., Gilbert, M., and Dubcovsky, J. (2014). Mapping a region within the 1RS.1BL translocation in common wheat affecting grain yield and canopy water status. *Theor. Appl. Genet.* 127, 2695–2709. doi: 10.1007/s00122-014-2408-6
- Hurni S, Brunner S, Stirnweis D, Herren G, Peditto D, McIntosh RA, et al. The powdery mildew resistance gene Pm8 derived from rye is suppressed by its wheat ortholog Pm3. *Plant J.* 2014;79:904–13.
- Jackman, S. D., Vandervalk, B. P., Mohamadi, H., Chu, J., Yeo, S., Hammond, S. A., et al. (2017). ABySS 2.0: resource-efficient assembly of large genomes using a Bloom filter. *Genome Res.* 27, 768–777. doi: 10.1101/gr.214346.116
- Jauhar, P. P., Chibbar, R. N. (1999). Chromosome engineering in wheat: Chromosome-mediated gene transfer. In: *Molecular Improvement of Cereal Crops* (pp. 15-56). Springer, Dordrecht.
- Ji, Y., Han, G., Gong, W., Han, R., Wang, X., Bao, Y., ... & Liu, C. (2024). Development and characterization of a novel wheat-rye T2DS· 2DL-2RL translocation line with high stripe rust resistance. *Phytopathology Research*, 6(1), 57.
- Jia, J., Zhao, G., Li, D., Wang, K., Kong, C., Deng, P., ... & Gao, L. (2023). Genome resources for the elite bread wheat cultivar Aikang 58 and mining of elite homeologous haplotypes for accelerating wheat improvement. *Molecular Plant*, 16(12), 1893-1910.
- Jiang J, Friebe B, Gill BS. Recent advances in alien gene transfer in wheat. *Euphytica*. 1994;73:199–212.
- Jiang, J., Friebe, B., Gill, B. S. (1994). Recent advances in alien gene transfer in wheat. *Euphytica*, 73(3), 199-212.
- Jones, P., Binns, D., Chang, H. Y., Fraser, M., Li, W., McAnulla, C., Hunter, S. (2014). InterProScan 5: genome-scale protein function classification. *Bioinformatics*, 30(9), 1236-1240.
- Kalyaanamoorthy, S., Minh, B. Q., Wong, T. K. F., von Haeseler, A., Jermin, L. S. (2017). ModelFinder: Fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nature Methods*, 14(6), 587–589.
- Katoh, K., Standley, D. M. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*, 30(4), 772–780.
- Knight E, Greer E, Draeger T, Thole V, Reader S, Shaw P, et al. Inducing chromosome pairing through premature condensation: analysis of wheat interspecific hybrids. *Funct Integr Genomics*. 2010;10:603–8. doi:10.1007/s10142-010-0185-0.
- Kolmer JA. Genetics of resistance to wheat leaf rust. *Annu Rev Phytopathol*. 1996;34:435–55.

- Kotvics, G. (1970). in Protein growth by plant breeding, edited by A. Bálint (Akadémiai Kiadó, Budapest, Hungary, pp. 89–90.
- Kourelis, J., Sakai, T., Adachi, H., & Kamoun, S. (2021). RefPlantNLR is a comprehensive collection of experimentally validated plant disease resistance proteins from the NLR family. *PLOS Biology*, 19(10): e3001124. DOI:10.1371/journal.pbio.3001124.
- Kruppa, J. PhD. University of Debrecen, 2001.
- Kuleung, C., Baenziger, P. S., Kachman, S. D., Dweikat, I. (2006). Evaluating the genetic diversity of triticale with wheat and rye SSR markers. *Crop Science*, 46(1), 169–177.
- Kumlay A. M., Baenziger P. S., Gill K. S., Shelton D. R., Graybosch R. A., Lukaszewski A. J., Wesenberg D. M. (2003) Understanding the Effect of Rye Chromatin in Bread Wheat. *Crop sci* 43: 1643-51.
- Landjeva, S., Korzun, V., Tsanev, V., Vladova, R., Ganeva, G. (2006). Distribution of the wheat–rye translocation 1RS.1BL among bread wheat varieties of Bulgaria. *Plant Breed.* 125, 102–104.
- Lapitan NLV, Sears RG, Gill BS. Translocations and other karyotypic structural changes in wheat x rye hybrids regenerated from tissue culture. *Theor Appl Genet.* 1984;68:547–54. doi:10.1007/bf00285012.
- Lazaridou, T., Pankou, C., Xynias, I., Roupakias, D. (2017). Effect of 1BL/1RS translocation on anther culture response in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Australian Journal of Crop Science*, 11(2), 195-200. doi: 10.21475/ajcs.17.11.02.p265
- Lelley, T., Eder, C., Grausgruber, H. (2004). Influence of 1BL.1RS wheat-rye chromosome translocation on genotype by environment interaction. *Journal of Cereal Science*, 39(3), 313–320. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2003.11.003>
- Leon A. E., Barrera G. N., Perez G. T., Ribotta P. D., Rosell C. M. (2007) Effect of damaged starch levels on flour-thermal behaviour and bread staling. *Eur Food Res Technol* 224: 187-92.
- Letunic, I., Bork, P. (2021). Interactive Tree Of Life (iTOL) v6: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Research*, 49(W1), W293–W296.
- Li, G., Ren, Y., Yang, Y., Chen, S., Zheng, J., Zhang, X., ... & Yin, G. (2025). Genomic analysis of Zhou8425B, a key founder parent, reveals its genetic contributions to elite agronomic traits in wheat breeding. *Plant Communications*, 6(3).
- Li, G., Wang, L., Yang, J. *ve ark.*, (2021) A high-quality genome assembly highlights rye genomic characteristics and agronomically important genes. *Nat Genet* 53, 574–584. <https://doi.org/10.1038/s41588-021-00808-z>
- Li, G., Zhang, T., Yu, Z., Wang, H., Yang, E., Yang, Z. (2021). An efficient Oligo-FISH painting system for revealing chromosome rearrangements and polyploidization in Triticeae. *The Plant Journal*, 105(4), 978-993.
- Li, H. (2018). Minimap2: pairwise alignment for nucleotide sequences. *Bioinformatics*, 34(18), 3094-3100.

- Li, Z., Zhao, L., Yang, T., Tang, J., Miao, Y., Ren, T. (2024). Genome-wide simple sequence repeat analysis and specific molecular marker development of rye. *BMC genomics*, 25(1), 780.
- Liu, C., Huang, Y., Guo, X., Yi, C., Liu, Q., Zhang, K., Han, F. (2024). Young retrotransposons and non-B DNA structures promote the establishment of dominant rye centromere in the 1RS. 1BL fused centromere. *New Phytologist*, 241(2), 607-622.
- Lorenz K., (2000) Rye. In 'Handbook of Cereal Science and Technology, 2nd ed.' (Eds K Kulp, JG Ponte Jr.) pp. 223-256. (Marcel Dekker: New York).
- Lu H, Rudd JC, Burd JD, Weng Y. Molecular mapping of greenbug resistance genes Gb2 and Gb6 in T1AL.1RS wheat-rye translocations. *Plant Breed*. 2010; 129:472–6. doi:10.1111/j.1439-0523.2009.01722.x.
- Lu Q, Björnstad Å, Ren Y, Asad MA, Xia X, Chen X, et al. Partial resistance to powdery mildew in German spring wheat ‘Naxos’ is based on multiple genes with stable effects in diverse environments. *Theor Appl Genet*. 2012; 125:297–309. doi:10.1007/s00122-012-1834-6.
- Lukaszewski AJ, Rybka K, Korzun V, Malyshev SV, Lapinski B, Whitkus R. Genetic and physical mapping of homoeologous recombination points involving wheat chromosome 2B and rye chromosome 2R. *Genome*. 2004; 47:36–45. doi:10.1139/g03-089.
- Lukaszewski AJ. Cytogenetically engineered rye chromosomes 1R to improve bread-making quality of hexaploid triticales. *Crop Sci*. 2006;46: 2183–94. doi:10.2135/cropsci2006.03.0135.
- Lukaszewski AJ. Further manipulation by centric misdivision of the 1RS.1BL translocation in wheat. *Euphytica*. 1997;94:257–61. doi:10.1023/a:1002916323085.
- Lukaszewski AJ. Manipulation of the 1RS.1BL translocation in wheat by induced homoeologous recombination. *Crop Sci*. 2000;40:216–25.
- Lukaszewski AJ. Reconstruction in wheat of complete chromosomes 1B and 1R from the 1RS.1BL translocation of ‘Kavkaz’ origin. *Genome*. 1993;36:821–4.
- Lukaszewski AJ. Unexpected behavior of an inverted rye chromosome arm in wheat. *Chromosoma*. 2008;117:569–78. doi:10.1007/s00412-008-0174-4.
- Lukaszewski, A. J. (2015). Introgression of the Rye Genome into Wheat. In: Molnár-Láng M., Ceoloni C., Doležel J. (eds) *Alien Introgression in Wheat*. Springer, Cham. (Sayfa: 163-189).
- Lukaszewski, A. J., & Gustafson, J. P. (1983). Translocations and modifications of chromosomes in triticales and wheat. *Cytogenetic and Genome Research*, 35(4), 259-269.
- Lukaszewski, A. J., Porter, D. R., Baker, C. A., Rybka, K. & Lapinski, B. (2001). Attempts to transfer russian wheat aphid resistance from a rye chromosome in russian triticales to wheat. *Crop. Sci*. 41, 1743.
- Luo PG, Zhang HY, Shu K, Zhang HQ, Luo HY, Ren ZL. Stripe rust (*Puccinia striiformis* f. sp. tritici) resistance in wheat with the wheat-rye 1BL/1RS chromosomal translocation. *Can J Plant Pathol*. 2008;30:254–9.

- Mago R., Spielmeier W., Lawrence GJ., Lagudah ES., Ellis JG., Pryor A.. Identification and mapping of molecular markers linked to rust resistance genes located on chromosome 1RS of rye using wheat-rye translocation lines. *Theor Appl Genet.* 2002;104:1317–24. doi:10.1007/s00122-002-0879-3.
- Mago, R., Miah, H., Lawrence, G. J., Wellings, C. R., Spielmeier, W., Bariana, H. S., et al. (2005). High-resolution mapping and mutation analysis separate the rust resistance genes Sr31, Lr26 and Yr9 on the short arm of rye chromosome 1. *Theor. Appl. Genet.* 112, 41–50. doi: 10.1007/s00122-005-0098-9
- Manni M., Berkeley MR., Seppey M, Zdobnov EM. BUSCO: Assessing Genomic Data Quality and Beyond. *Curr Protoc.* 2021 Dec;1(12):e323. doi: 10.1002/cpz1.323. PMID: 34936221.
- Maraci O., Ozkan H., Bilgin R. Phylogeny and genetic structure in the genus *Secale*. *PLoS One.* 2018; 13(7): 1–21. pmid:30024916
- Marais GF, Marais AS. The derivation of compensating translocations involving homoeologous group 3 chromosomes of wheat and rye. *Euphytica.* 1994;79:75–80.
- Martis, M. M., Zhou, R., Haseneyer, G., Schmutzer, T., Vrána, J., Kubaláková, M., ... & Stein, N. (2013). Reticulate evolution of the rye genome. *The Plant Cell*, 25(10), 3685-3698.
- Maston, G. A., Evans, S. K., & Green, M. R. (2006). Transcriptional regulatory elements in the human genome. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 7, 29–59.
- Matos M, Pinto-Carnide O, Benito C. Phylogenetic relationships among Portuguese rye based on isozyme, RAPD and ISSR markers. *Hereditas.* 2001;134(3):229–36. pmid:11833286
- McGoverin C M, Snyders F, Muller N, Botes W, Fox G and Manley M (2011) A review of triticale uses and the effect of growth environment on grain quality. *J Sci Food Agric* 91: 1155-65.
- McIntosh RA, Dubcovsky J, Rogers WJ, Morris C, Appels R, Xia XC. Catalogue of Gene Symbols for Wheat 2013. <https://wheat.pw.usda.gov/GG2/Triticum/wgc/2013/>. Accessed 3 Jan 2017
- Mendis, M., & Simsek, S. (2014). Arabinoxylans and human health. *Food Hydrocolloids*, 42, 239–243. doi:10.1016/j.foodhyd.2013.07.022
- Mettin, D., Bluthner, W. D., and Schlegel, G. (1973). “Additional evidence on spontaneous 1B/1R wheat–rye substitutions and translocation,” in *Proceedings of the 4th International Wheat Genetics Symposium*, eds E. R. Sears and L. M. S. Sears (Columbia, MO: Agriculture Experiment Station), 179–184.
- Mettin, D., Bluthner, W. D., and Schlegel, G. (1973). “Additional evidence on spontaneous 1B/1R wheat–rye substitutions and translocation,” in *Proceedings of the 4th International Wheat Genetics Symposium*, eds E. R. Sears and L. M. S. Sears (Columbia, MO: Agriculture Experiment Station), 179–184.
- Minh, B. Q., Schmidt, H. A., Chernomor, O., Schrempf, D., Woodhams, M. D., von Haeseler, A., & Lanfear, R. (2020). IQ-TREE 2: New Models and Efficient Methods for Phylogenetic

- Inference in the Genomic Era. *Molecular Biology and Evolution*, 37(5), 1530–1534. DOI:10.1093/molbev/msaa015.
- Moameri, M., Abbasi Khalaki, M. (2019). Capability of *Secale montanum* trusted for phytoremediation of lead and cadmium in soils amended with nano-silica and municipal solid waste compost. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 26, 24315–24322.
- Molnár, I., Kubaláková, M., Šimková, H., Cseh, A., Molnár-Láng, M., & Doležel, J. (2015). Chromosome isolation by flow sorting in the Triticeae: Current status and future prospects. *Plant Methods*, 11, 40.
- Molnár-Láng, M., Cseh, A., Szakács, É., & Molnár, I. (2010). Development of a wheat genotype combining the recessive crossability alleles *kr1kr1kr2kr2* and the 1BL. 1RS translocation, for the rapid enrichment of 1RS with new allelic variation. *Theoretical and applied genetics*, 120(8), 1535-1545.
- Moreno-Sevilla B, Baenziger P, Peterson C, Graybosch R and McVey D (1995) The 1BL/1RS translocation: agronomic performance of F3-derived lines from a winter wheat cross. *Crop Sci* 35: 1051-55.
- Morita E., Matsuo H., Mihara S., Morimoto K., Savage A.W.J, Tatham A. S. (2003) Fast x-5 gliadin is a major allergen in wheat- dependent exercise-induced anaphylaxis. *J Dermatol Sci* 33: 99-104.
- Morris C F (2002) Puroindolines: the molecular genetic basis of wheat grain hardness. *Plant Mol Biol* 48: 633-47.
- Moskal K., Kowalik S., Podyma W., Łapiński B., Boczkowska M. (2020) The Pros and Cons of Rye Chromatin Introgression into Wheat Genome. *Agronomy* 11: 456-70.
- Neumann, P., Novák, P., Hošťáková, N., & Macas, J. (2019). Systematic survey of plant LTR-retrotransposons elucidates phylogenetic relationships of their polyprotein domains and provides a reference for comparative genomics. *The Plant Journal*, 99(3), 468–479.
- Neumann, P., Novák, P., Hošťáková, N., and Macas, J. (2019). Systematic survey of plant LTR-retrotransposons elucidates phylogenetic relationships of their polyprotein domains and provides a reference for element classification. *Mob. DNA* 10, 1. doi: 10.1186/s13100-018-0144-1
- Novák, P., Neumann, P., and Macas, J. (2010). Graph-based clustering and characterization of repetitive sequences in next-generation sequencing data. *BMC Bioinform.* 11, 378. doi: 10.1186/1471-2105-11-378
- Novák, P., Robledillo, L. Á., Koblízková, A., Vrbová, I., Neumann, P., and Macas, J. (2017). TAREAN: a computational tool for identification and characterization of satellite DNA from unassembled short reads. *Nucleic Acids Res.* 45, e111–e111. doi: 10.1093/nar/gkx257
- Oak M. D, Tamhankar S. A. (2016) 1BL/1RS translocation in durum wheat and its effect on end use quality traits. *J Plant Biochem Biotechnol* 5: 1-8.

- Oettler, G. "The fortune of a botanical curiosity—Triticale: past, present and future." *The Journal of Agricultural Science* 143.5 (2005): 329-346.
- Okonechnikov, K., Conesa, A., & García-Alcalde, F. (2016). Qualimap 2: advanced multi-sample quality control for high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*, 32(2), 292-294.
- Pasha I, Anjum F M and Morris C F (2010) Grain hardness: A major determinant of wheat quality. *Food Sci Technol Internat* 16: 511-22.
- Peakall, R. O. D., Smouse, P. E. (2006). GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular ecology notes*, 6(1), 288-295.
- Peña R J (2004) Food uses of triticale. In 'Triticale Improvement and Production.' (Eds M Mergoum, H Gómez-Macpherson.) pp. 37-48. (Food and Agriculture Organisation of the United Nations: Rome).
- Pham Van H, Maeda T and Morita N (2006) Waxy and high-amylose wheat starches and flours - characteristics, functionality and application. *Trends Food Sci Technol* 17: 448-56.
- Pont, C., Leroy, T., Seidel, M. *et al.* Tracing the ancestry of modern bread wheats. *Nat Genet* **51**, 905–911 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41588-019-0393-z>
- Pretorius Z.A., Singh R.P., Wagoire W.W., Payne T.S. Detection of virulence to wheat stem rust resistance gene Sr31 in *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* in Uganda. *Plant Dis.* 2000;84:203. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS.2000.84.2.203B>.
- Price, A. L., Jones, N. C., Pevzner, P. A. (2005). De novo identification of repeat families in large genomes. *Bioinformatics*, 21(Suppl 1), i351–i358.
- Purnhauser L., Bóna L., Láng L. Occurrence of 1BL.1RS wheat-rye chromosome translocation and of Sr36/Pm6 resistance gene cluster in wheat cultivars registered in Hungary. *Euphytica*. 2011;179:287–95. doi:10. 1007/s10681-010-0312-y.
- Quinlan, A. R., & Hall, I. M. (2010). BEDTools: A flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics*, 26(6), 841–842.
- Rabanus-Wallace, M. T., Hackauf, B., Mascher, M., Lux, T., Wicker, T., Gundlach, H., ... & Stein, N. (2021). Chromosome-scale genome assembly provides insights into rye biology, evolution and agronomic potential. *Nature genetics*, 53(4), 564-573.
- Rabanus-Wallace, M.T., Hackauf, B., Mascher, M. et al. Chromosome-scale genome assembly provides insights into rye biology, evolution and agronomic potential. *Nat Genet* 53, 564–573 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41588-021-00807-0>
- Rabinovich, S. V. (1998). Importance of wheat-rye translocations for breeding modern cultivars of *Triticum aestivum* L. (Reprinted from *Wheat: Prospects for global improvement*, 1998). *Euphytica*, 100, 323–340.
- Rahmatov M, Rouse MN, Nirmala J, Danilova T, Friebe B, Steffenson BJ, et al. A new 2DS.2RL Robertsonian translocation transfers stem rust resistance gene Sr59 into wheat. *Theor Appl Genet.* 2016;129:1383–92.

- Rahmatov M, Rouse MN, Steffenson BJ, Andersson SC, Wanyera R, Pretorius ZA, et al. Sources of stem rust resistance in wheat-alien introgression lines. *Plant Dis.* 2016;100:1101–9.
- Rajaram, S., Mann, C.E., Ortiz-Ferrara, G., Mujeeb-Kazi, A. (1983). Adaption, stability and high yield potential of certain 1B/1R CIMMYT wheats. In: Sakamoto, S., (Ed.), *Proceedings of the 6th International Wheat Genetics Symposium*, Plant Germplasm Institute, pp. 613–621, Faculty of Agriculture, Kyoto University.
- Ranallo-Benavidez, T. R., Jaron, K. S., and Schatz, M. C. (2020). GenomeScope 2.0 and Smudgeplot for reference-free profiling of polyploid genomes. *Nat. Commun.* 11, 1432. doi: 10.1038/s41467-020-14998-3
- Ren T-H, Chen F, Yan B-J, Zhang H-Q, Ren Z-L. Genetic diversity of wheat rye 1BL.1RS translocation lines derived from different wheat and rye sources. *Euphytica.* 2012;183:133–46.
- Ren TH, Yang ZJ, Yan BJ, Zhang HQ, Fu SL, Ren ZL (2009) Development and characterization of a new 1BL.1RS translocation line with resistance to stripe rust and powdery mildew of wheat. *Euphytica* 169:207–213
- Ren T-H, Yang Z-J, Yan B-J, Zhang H-Q, Fu S-L, Ren Z-L. Development and characterization of a new 1BL. 1RS translocation line with resistance to stripe rust and powdery mildew of wheat. *Euphytica.* 2009;169:207–13.
- Ren, T. H., Chen, F., Yan, B. J., Zhang, H. Q., & Ren, Z. L. (2012). Genetic diversity of wheat-rye 1BL.1RS translocation lines derived from different wheat and rye sources. *Euphytica*, 183(2), 133–146. <https://doi.org/10.1007/s10681-011-0412-3>
- Ren, T., Jiang, Q., Sun, Z., Ren, Z., Tan, F., Yang, W., & Li, Z. (2022). Development and characterization of novel wheat-rye 1RS· 1BL translocation lines with high resistance to *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. *Phytopathology®*, 112(6), 1310-1315.
- Ren, T., Tang, Z., Fu, S., Yan, B., Tan, F., Ren, Z., & Li, Z. (2017). Molecular cytogenetic characterization of novel wheat-rye T1RS.1BL translocation lines with high resistance to diseases and great agronomic traits. *Frontiers in Plant Science*, 8(May), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00799>
- Rice, P., Longden, I., & Bleasby, A. (2000). EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends in Genetics*, 16(6), 276–277.
- Richards, R. A., Rebetzke, G. J., Watt, M., Condon, A. G., Spielmeier, W., & Dolferus, R. (2010). Breeding for improved water productivity in temperate cereals: phenotyping, quantitative trait loci, markers and the selection environment. *Functional Plant Biology*, 37(2), 85-97.
- Saal, B., & Wricke, G. (2002). Evaluation of genetic diversity in rye (*Secale cereale* L.) using amplified fragment length polymorphism (AFLP). *Theoretical and Applied Genetics*, 104, 104–111.

- Salamini, F., Özkan, H., Brandolini, A., Schäfer-Pregl, R., & Martin, W. (2002). Genetics and geography of wild cereal domestication in the near east. *Nature Reviews Genetics*, 3(6), 429-441.
- Sarbarzeh M A, Ferrahi M, Singh S, Singh H, Friebe B, Gill B S and Dhaliwal H S (2002) PhI -induced transfer of leaf and stripe rust-resistance genes from *Aegilops triuncialis* and *Ae. geniculata* to bread wheat. *Euphytica* 127: 377-82.
- Schlegel R.(2016) Hybrid breeding boosted molecular genetics in rye. *Russian Journal of Genetics: Applied Research*. 2016; 6(5): 569–83.
- Schlegel R. 2006., Rye (*Secale cereale* L)—a younger crop plant with bright future. In: Sing R. J., Jauhar P, editor. *Genetic Resources, Chromosome Engineering, and Crop Improvement: Vol II Cereals*. Boca Raton: CRC Press; 2006. p. 365–94.
- Schlegel, R. (2014). *Rye-wheat introgression & alien translocations*. Available at: <http://www.rye-gene-map.de/rye-introgression/>
- Schlegel, R., and Korzun, V. (1997). About the origin of 1RS.1BL wheat– rye chromosome translocations from Germany. *Plant Breed.* 116, 537–540. doi: 10.1111/j.1439-0523.1997.tb02186.x
- Schlegel, R., and Korzun, V. (1997). About the origin of 1RS.1BL wheat– rye chromosome translocations from Germany. *Plant Breed.* 116, 537–540. doi: 10.1111/j.1439-0523.1997.tb02186.x
- Schreiber M., Himmelbach A., Börner A., Mascher M., 2018. Genetic diversity and relationship between domesticated rye and its wild relatives as revealed through genotyping-by-sequencing. *Evolutionary Applications*. 2018. pmid:30622636
- Schreiber, M., Stein, N., Mascher, M. (2019). Genetics, Genomics, and Breeding of Rye. Chapter in *The Rye Genome, Compendium of Plant Genomes*. Springer, Cham.
- Sebesta, E. E., & Wood, E. A. (1978). Transfer of greenbug resistance from rye to wheat with X-rays. *Agronomy Abstracts*, 61-62.
- Selanere M. L., Andersson R. (2002) Cell wall composition of 1B/1R translocation wheat grains. *J Sci Food Agric* 82: 538-45.
- Sharma A, Garg S, Sheikh I, Vyas P and Dhaliwal H. S. (2020) Effect of wheat grain protein composition on end-use quality. *J Food Sci Technol* 57: 2771-785.
- Shi, X., Cui, F., Han, X., He, Y., Zhao, L., Zhang, N., ... & Ling, H. Q. (2022). Comparative genomic and transcriptomic analyses uncover the molecular basis of high nitrogen-use efficiency in the wheat cultivar Kenong 9204. *Molecular Plant*, 15(9), 1440-1456.
- Simão, F. A., Waterhouse, R. M., Ioannidis, P., Kriventseva, E. V., & Zdobnov, E. M. (2015). BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. *Bioinformatics*, 31(19), 3210-3212.
- Singh M, Khatkar B S (2005) Structural and functional properties of wheat storage proteins: a review. *J Food Sci Technol* 42: 455-471

- Singh RP, Hodson D, Huerta-Espino J, Jin Y, Njau P, Wanyere R, et al. Will stem rust destroy the world's wheat crop? *Adv Agron*. 2008;98:271–309. doi: 10.1016/50065-2113(08)00205-8.
- Sourdille P, Singh S, Cadalen T, Brown-Guedira GL, Gay G, Qi L, Gill BS, Dufour P, Murigneux A, Bernard M. Microsatellite-based deletion bin system for the establishment of genetic-physical map relationships in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Funct Integr Genomics*. 2004 Mar;4(1):12-25. doi: 10.1007/s10142-004-0106-1. Epub 2004 Feb 13. PMID: 15004738.
- Stanke, M., Steinkamp, R., Waack, S., & Morgenstern, B. (2004). AUGUSTUS: a web server for gene finding in eukaryotes. *Nucleic acids research*, 32(suppl\_2), W309-W312.
- Steuernagel, B., Jupe, F., Witek, K., Jones, J. D., & Wulff, B. B. H. (2020). The NLR-Annotator tool enables annotation of the intracellular immune receptor repertoire. *Plant Physiology*, 183(2), 468–482. DOI:10.1104/pp.19.01273. [PubMed+1](#)
- Sun, Y., Shen, E., Hu, Y., Wu, D., Feng, Y., Lao, S., ... & Fan, L. (2022). Population genomic analysis reveals domestication of cultivated rye from weedy rye. *Molecular Plant*, 15(3), 552-561.
- Suneja, Y., Gupta, A. K., & Bains, N. S. (2019). Stress adaptive plasticity: *Aegilops tauschii* and *Triticum dicoccoides* as potential donors of drought associated morpho-physiological traits in wheat. *Frontiers in Plant Science*, 10, 211.
- Szakács, É., Szöke-Pázsik, K., Kalapos, B., Schneider, A., Ivanizs, L., Rakszegi, M., ... Molnár-Láng, M. (2020). 1RS arm of *Secale cereale* 'Kriszta' confers resistance to stripe rust, improved yield components and high arabinoxylan content in wheat. *Scientific Reports*, 10(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58419-3>
- Szöke-Pázsik, K., Kruppa, K., Tulpová, Z., Kalapos, B., Türkösi, E., Gaál, E., ... & Szakács, É. (2024). DArTseq genotyping facilitates the transfer of “exotic” chromatin from a *Secale cereale* × *S. strictum* hybrid into wheat. *Frontiers in Plant Science*, 15, 1407840.
- Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 38(7): 3022–3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
- Targońska M, Bolibok-Brągoszewska H, Rakoczy-Trojanowska M. Assessment of genetic diversity in *Secale cereale* based on SSR Markers. *Plant Mol Biol Report*. 2016;34(1):37–51.
- Tian, B., Manley, J. L., & others. (2017). Alternative polyadenylation of mRNA precursors. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 18(1), 18–30.
- Untergrasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M., & Rozen, S. G. (2012). Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*.
- UPOV. Plant variety database. 2013. <https://www3.wipo.int/pluto/user/en/index.jsp>.
- Vershinin, A. V., Schwarzacher, T., & Heslop-Harrison, J. S. (2002). The large-scale genomic organization of repetitive DNA families at the telomeres of rye chromosomes. *The Plant Cell*, 14(3), 515–527.

- Villareal, R. L., del Toro, E., Mujeeb-Kazi, A., & Rajaram, S. (1995). The 1BL/1RS chromosome translocation effect on yield characteristics in a *Triticum aestivum* L. cross. *Plant Breeding*, 114(6), 497–500. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.1995.tb00843.x>
- Vrána, J., Cápál, P., Šimková, H., Karafiátová, M., Čížková, J., and Doležel, J. (2016). Flow analysis and sorting of plant chromosomes. *Curr. Protoc. Cytom.* 78, 5.3.1–5.3.43. doi: 10.1002/cpcy.9
- Vurture, G. W., Sedlazeck, F. J., Nattestad, M., Underwood, C. J., Fang, H., Gurtowski, J., et al. (2017). GenomeScope: fast reference-free genome profiling from short reads. *Bioinformatics* 33, 2202–2204. doi: 10.1093/bioinformatics/btx153
- Vyhnánek, T., Trojan, V., & Langrová, T. (2009). Detection of the genetic variability of triticale using wheat and rye SSR markers. *Journal of Agrobiology*, 26(1), 23–30.
- Wang, K., Zhang, X., Zhou, Y., Zhang, M., & Zhang, H. (2023). Comparative genomics of wheat–rye 1BL.1RS translocation lines reveals structural variation and candidate genes associated with yield and stress tolerance. *BMC Genomics*, 24, 563.
- Weng Y, Perumal A, Burd JD, Rudd JC. Biotypic diversity in greenbug (Hemiptera: Aphididae): Microsatellite-based regional divergence and host adapted differentiation. *J Econ Entomol.* 2010;103:1454–63. doi:10.1603/ec09291.
- Wilson, S. (1873) Wheat and rye hybrids. *Trans. Bot. Soc. Edinburgh* 12, 286–288
- Winfield, M. O., Allen, A. M., Burrige, A. J., Barker, G. L., Benbow, H. R., Wilkinson, P. A., ... & Edwards, K. J. (2016). High-density SNP genotyping array for hexaploid wheat and its secondary and tertiary gene pool. *Plant biotechnology journal*, 14(5), 1195-1206.
- Xi, W., Tang, S., Du, H., Luo, J., Tang, Z., & Fu, S. (2020). ND-FISH-positive oligonucleotide probes for detecting specific segments of rye (*Secale cereale* L.) chromosomes and new tandem repeats in rye. *The Crop Journal*, 8(2), 171-181.
- Yediay, F. E., Baloch, F. S., Kilian, B., & Özkan, H. (2010). Testing of rye-specific markers located on 1RS chromosome and distribution of 1AL.RS and 1BL.RS translocations in Turkish wheat (*Triticum aestivum* L., *T. durum* Desf.) varieties and landraces. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 57(1), 119–129. <https://doi.org/10.1007/s10722-009-9456-9>
- Zhang P., Friebe B., Lukaszewski AJ, Gill BS. The centromere structure in Robertsonian wheat-rye translocation chromosomes indicates that centric breakage-fusion can occur at different positions within the primary constriction. *Chromosoma*. 2001;110:335–44.
- Zhao, C., Cui, F., Wang, X., Shan, S., Li, X., Bao, Y., & Wang, H. (2012). Effects of 1BL/1RS translocation in wheat on agronomic performance and quality characteristics. *Field Crops Research*, 127, 79-84.
- Zhou, Y., He, Z.H., Zhang, G.S., Xia, L.Q., Chen, X.M., Gao, Y.C., Jing, Z.B., Yu, G.J. (2004). Utilization of 1BL/1RS translocation in wheat breeding in China. *Acta Agron. Sin.* 30:531–535.



## ÖZGEÇMİŞ

Mehmet Alper GÖKÇE. İlkokul ve Ortaokul eğitimini Sarıseki Organize Sanayi İlköğretim Okulu ve Lise Eğitimini Sefa Atakaş Anadolu Denizcilik Meslek Lisesinde tamamladı. Lisans eğitimini Gümüşhane Üniversitesi Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi Genetik ve Biyomühendislik Bölümü'nde tamamladı. Yüksek Lisans eğitimini Çukurova Üniversitesi Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda tamamladı. Yüksek lisans eğitimi sürecince Ben Gurion University of the Negev'de Akademik Araştırma Staj programına dahil oldu. Manier Tohumculuk şirketinde genetik uzmanı olarak görev aldı. Toros Tarım şirketinde moleküler araştırma mühendisi ünvanıyla halen çalışmaktadır.

