T.C.

AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ

ÇÖLYAK HASTALIĞINA YOL AÇAN İMMÜNOJENİK EPİTOPLAR BAKIMINDAN TARİHSEL VE TESCİLLİ KIŞLIK EKMEKLİK BUĞDAY ÇEŞİTLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Sude KEŞCİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ

ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

TEMMUZ 2025

ANTALYA

T.C.

AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ

ÇÖLYAK HASTALIĞINA YOL AÇAN İMMÜNOJENİK EPİTOPLAR BAKIMINDAN TARİHSEL VE TESCİLLİ KIŞLIK EKMEKLİK BUĞDAY ÇEŞİTLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Sude KEŞCİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ

ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

TEMMUZ 2025

ANTALYA

T.C.

AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ÇÖLYAK HASTALIĞINA YOL AÇAN İMMÜNOJENİK EPİTOPLAR BAKIMINDAN TARİHSEL VE TESCİLLİ KIŞLIK EKMEKLİK BUĞDAY ÇEŞİTLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Sude KEŞCİ

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ

ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

Bu tez TÜBİTAK tarafından 122O333 nolu proje ile desteklenmiştir.

TEMMUZ 2025

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ÇÖLYAK HASTALIĞINA YOL AÇAN İMMÜNOJENİK EPİTOPLAR BAKIMINDAN TARİHSEL VE TESCİLLİ KIŞLIK EKMEKLİK BUĞDAY ÇEŞİTLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Sude KEŞCİ

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ

ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

Bu tez 19/06/2025 tarihinde jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Mehmet Fatih CENGİZ (Danışman)
Prof. Dr. Muharrem CERTEL
Prof. Dr. Nedim MUTLU
Prof. Dr. Taner AKAR
Doç. Dr. Onur ŞENOL

ÖZET

ÇÖLYAK HASTALIĞINA YOL AÇAN İMMÜNOJENİK EPİTOPLAR BAKIMINDAN TARİHSEL VE TESCİLLİ KIŞLIK EKMEKLİK BUĞDAY ÇEŞİTLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Sude KEŞCİ

Doktora Tezi, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mehmet Fatih CENGİZ

Temmuz 2025; 137 sayfa

Çölyak hastalığı, dünya genelinde toplum sağlığını tehdit eden en yaygın gıda intoleranslarından biridir. Literatür verilerine göre, hastalığın küresel görülme sıklığı %0.7 ile %1.4 arasında değişmektedir. Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı'nın 2022 raporuna göre ise, ülkemizde çölyak hastalığı 154027 vaka ile rapor edilmiştir. Bu hastalık, glüten olarak adlandırılan bir protein kompleksine karşı gelişen bağışıklık tepkisi sonucunda ortaya çıkmaktadır. Bu çalışmada, Türkiye'de farklı dönemlerde yetiştirilen modern ve geleneksel buğday çeşitlerinin, çölyak hastalığını tetikleyebilecek immünojenik epitop düzeyleri incelenmiş; çeşitler arasındaki farklılıklar ile yetiştirme koşullarının bu düzeyler üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Araştırma kapsamında, 1930-2022 yılları arasında geliştirilen 24 farklı buğday çeşidi, Konya'nın Ilgın ilçesinde, sulu ve kuru tarım koşullarında, tesadüf blokları deneme desenine göre üç tekrarlı olarak yetiştirilmiştir. Numuneler, tescil dönemlerine göre Tarihsel (<1930), Yeşil devrim öncesi seleksiyon ıslahı ile yetiştirilen (2. Grup), ve melezleme ıslahıyla yetiştirilen diğer çeşitlerinde tarihsel olarak gruplandırıldığı Yeşil devrim öncesi 1968-1970 (3. Grup), Yeşil devrim sonrası 1979-2000 (4. Grup), Yeşil devrim sonrası 2001- 2010 (5.Grup), Yeşil devrim sonrası 2010- 2022 (6.Grup) olmak üzere altı gruba ayrılmıştır.

Buğday genotiplerine ait kalite parametrelerinin değerlendirilmesinde; ağırlık, dane nemi, hektolitre ağırlığı, sedimantasyon, miksograf değeri ve yaş glüten düzeyleri analiz edilmiştir. İmmünojenik epitop düzeylerini belirlemek amacıyla, öncelikle buğday numuneleri öğütülerek un fraksiyonu elde edilmiştir. Bu fraksiyondan toplam protein ve gliadin konsantrasyonları belirlenmiş, ardından gliadin fraksiyonlarına ayrılması için sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) yöntemi kullanılmıştır. Gliadin fraksiyonlarının niteliksel ve niceliksel analizi ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi (RP-HPLC) ile gerçekleştirilmiştir. Elde edilen kromatogramlarda alıkonma sürelerine göre dört ana gliadin bölgesi tanımlanmıştır: ω5 gliadin (3–15. dakikalar), ω1,2 gliadin (18–24. dakikalar), α/β gliadin (25–39. dakikalar) ve γ gliadin (40–65. dakikalar). Son olarak, gliadin protein fraksiyonlarının çölyak hastalığına neden olabilecek bağışıklık yanıtı oluşturma potansiyelleri, immünojenik katsayılarla ağırlıklandırılmış ve bu doğrultuda epitop skor analizi yapılmıştır.

RP-HPLC analizlerinden elde edilen bulgular, tescil yılı ilerledikçe özellikle sulu koşullarda α-/β-gliadin ve γ gliadin fraksiyonlarının çölyak hastalığıyla ilişkili immünojenik katkısının arttığını, buna karşılık kurak koşullarda ise eski dönem buğday

çeşitlerinin epitop düzeylerinin modern çeşitlere kıyasla daha yüksek olduğunu ortaya koymaktadır. Bu çalışma kapsamında hesaplanan epitop skorları hem tarihsel hem de modern ekmeklik buğday çeşitleri arasında çölyakla ilişkili epitop düzeylerinde anlamlı farklılıklar olmadığını göstermektedir. Sulu koşullarda modern grupların skorları daha yüksekken, kuru koşullarda en yüksek skorun tarihsel grupta bulunması, çölyakla ilişkili immünojenik yükün yalnızca modern ıslahın bir sonucu olmadığını ortaya koymaktadır. Dolayısıyla bu veriler, modern buğday ıslah çalışmalarının çölyak hastalığına neden olan epitopların artışına sistematik bir katkı yapmadığını ve çölyak riski açısından hem tarihsel hem modern çeşitlerin birbirinden bağımsız olarak değerlendirilmesi gerektiğini desteklemektedir. LC-QTOF analizleri ile elde edilen yüksek çözünürlüklü kütle spektrometrisi verileri, HPLC'den elde edilen gliadin fraksiyonlarına ait peptit yapılarının daha ileri düzeyde karakterizasyonunu mümkün kılmıştır. Bu analizlerde α-gliadin kaynaklı ve benzeri çölyak epitopları aranmış, kütle/yük (m/z) oranları literatürde belirtilen değerlere göre ±0.8 toleransla taranarak bu peptitler değerlendirilmiştir. Buğday genotiplerine ait gliadin protein profillerinin değerlendirilmesi amacıyla MALDI-TOF-MS tekniği kullanılmış 144 spektrum üzerinden 600–5000 m/z aralığında yer alan, pikler analiz edilmiştir. Genel olarak, MALDI-TOF MS bulguları tescil yılı, genetik köken ve çevresel koşulların gliadin protein kompozisyonuna ve çölyakla ilişkili immünojenik profilin şekillenmesine doğrudan etki yaptığı görülmekle birlikte hem herhangi bir melezleme ıslahı sürecinden geçmemiş tarihsel ve köy çeşitlerinde ve hem de melezleme ıslahı ile geliştirilen modern ekmeklik buğday çeşitlerinde çölyağa neden olan epitoplar bakımından önemli farklılıklar gözlenmiştir. Bu da ekmeklik buğdayı çalışmalarının çölyağa neden epitopların artışına bir katkı yapmadığının önemli bir göstergesidir.

Kalite analizleri sonuçlarına göre, kuru ve sulu koşullarda yetiştirilen buğday çeşitleri arasında farklılıklar gözlemlenmiştir. Sulu koşullarda genel olarak dane verimi, protein oranı, yaş gluten miktarı, sedimantasyon ve miksograf enerjisi gibi kalite parametrelerinin daha yüksek değerlere ulaştığı, buna karşın kuru koşullarda özellikle bazı antik çeşitlerin daha düşük gluten ve protein içeriğiyle öne çıktığı görülmüştür. Dane verimi 301.80–956.90 kg/da, bin dane ağırlığı 24.30–49.50 g, hektolitre ağırlığı 42.10–87.00 kg/hl aralığında değişmiştir. Yaş gluten oranı %15.40–%43.30, protein oranı %9.60–%14.95, gluten indeksi %41.70–%95.70 arasında ölçülmüş; sedimantasyon 17.10–72.00 ml aralığında bulunmuştur. Tarihsel çeşitler çoğunlukla düşük protein, gluten ve enerji değerleriyle öne çıkarken, 5. ve 6. grup modern çeşitler yüksek kalite parametreleriyle un teknolojisi açısından üstünlük göstermiştir.

ANAHTAR KELİMELER: Çölyak hastalığı, Gliadin, İmmünojenik epitop, Kromatografik ayırma, Protein saflaştırma,

JÜRİ: Prof. Dr. Mehmet Fatih CENGİZ

Prof. Dr. Muharrem CERTEL

Prof. Dr. Nedim MUTLU

Prof. Dr. Taner AKAR

Doç. Dr. Onur ŞENOL

ABSTRACT

COMPARISON OF HISTORICAL AND REGISTERED WINTER BREAD WHEAT VARIETIES IN TERMS OF IMMUNOGENIC EPITOPES CAUSING CELIAC DISEASE

Sude KEŞCİ

PhD Thesis in Agricultural Biotechnology

Supervisor: Prof. Dr. Mehmet Fatih CENGİZ

July 2025; 137 pages

Celiac disease is one of the most common food intolerances that poses a threat to public health worldwide. According to literature data, the global prevalence of the disease ranges between 0.7% and 1.4%. According to the 2022 report by the Ministry of Health of the Republic of Turkey, celiac disease has been reported in 154,027 cases in the country. This disease emerges as a result of an immune response to a protein complex called gluten. In this study, the levels of immunogenic epitopes that may trigger celiac disease were examined in modern and traditional wheat varieties grown in Turkey at different periods; the differences between the varieties and the effects of cultivation conditions on these levels were evaluated. Within the scope of the research, 24 different wheat varieties developed between 1930 and 2022 were cultivated under irrigated and rainfed conditions in Ilgın district of Konya using a randomized complete block design with three replications. Samples were classified into six groups based on registration periods as Historical (<1930), Pre-Green Revolution selection breeding (2nd Group), and varieties developed by hybridization and historically grouped as Pre-Green Revolution 1968–1970 (3rd Group), Post-Green Revolution 1979–2000 (4th Group), Post-Green Revolution 2001–2010 (5th Group), and Post-Green Revolution 2010-2022 onwards (6th Group).

In the evaluation of quality parameters of wheat genotypes, weight, grain moisture, hectoliter weight, sedimentation, mixograph value, and wet gluten levels were analyzed. To determine immunogenic epitope levels, wheat samples were first milled to obtain the flour fraction. From this fraction, total protein and gliadin concentrations were measured, and the samples were subjected to sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) to separate gliadin fractions. The qualitative and quantitative analysis of gliadin fractions was performed using reverse-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC). Based on the retention times obtained from chromatograms, four main gliadin regions were defined: ω5 gliadin (3–15 min), ω1,2 gliadin (18–24 min), α/β gliadin (25–39 min), and γ gliadin (40–65 min). Finally, the potential of gliadin protein fractions to elicit immune responses associated with celiac disease was weighted using immunogenic coefficients, and an epitope score analysis was performed.

The findings from RP-HPLC analyses revealed that as the registration year progressed, especially under irrigated conditions, the immunogenic contribution of α-/β-gliadin and γ gliadin fractions associated with celiac disease increased, whereas under

drought conditions, older wheat varieties exhibited higher epitope levels compared to modern ones. The epitope scores calculated within the scope of this study indicated that there were no significant differences in celiac-related epitope levels between historical and modern bread wheat varieties. Although the scores of modern groups were higher under irrigated conditions, the highest score under drought conditions was observed in the historical group, suggesting that the immunogenic load associated with celiac disease is not solely a consequence of modern breeding. Therefore, these data support that modern wheat breeding has not made a systematic contribution to the increase in celiac-triggering epitopes and that historical and modern varieties should be evaluated independently in terms of celiac risk. High-resolution mass spectrometry data obtained through LC-QTOF analyses enabled a more advanced characterization of peptide structures belonging to gliadin fractions identified by HPLC. In these analyses, α-gliadin-derived and similar celiac epitopes were screened, and peptides were evaluated by scanning the mass-to-charge (m/z) ratios with a ±0.8 tolerance based on values reported in the literature. To evaluate the gliadin protein profiles of wheat genotypes, the MALDI-TOF-MS technique was employed; peaks in the range of 600–5000 m/z were analyzed across 144 spectra. Overall, the MALDI-TOF-MS findings demonstrated that registration year, genetic background, and environmental conditions directly influence gliadin protein composition and the formation of the celiac-related immunogenic profile. Significant differences in terms of celiac-triggering epitopes were observed both in historical and landrace varieties that had not undergone any hybrid breeding process and in modern bread wheat cultivars developed through hybrid breeding. This is a significant indication that bread wheat breeding efforts have not contributed to the increase in celiac-triggering epitopes. According to the quality analysis results, differences were observed between wheat varieties grown under irrigated and rainfed conditions. In general, quality parameters such as grain yield, protein content, wet gluten amount, sedimentation, and mixograph energy reached higher values under irrigated conditions, whereas under rainfed conditions, particularly some ancient varieties stood out with lower gluten and protein content. Grain yield ranged between 301.80 and 956.90 kg/da, thousand kernel weight between 24.30 and 49.50 g, and hectoliter weight between 42.10 and 87.00 kg/hl. Wet gluten content ranged from 15.40% to 43.30%, protein content from 9.60% to 14.95%, and gluten index from 41.70% to 95.70%; sedimentation values ranged between 17.10 and 72.00 ml. Historical varieties generally stood out with lower protein, gluten, and energy values, while 5th and 6th group modern varieties exhibited superior quality parameters, showing advantage in terms of flour technology.

KEYWORDS: Celiac disease, Chromatographic separation, Gliadin, Immunogenic epitopes, Protein purification

COMMITTEE: Prof. Dr. Mehmet Fatih CENGİZ

Prof. Dr. Muharrem CERTEL

Prof. Dr. Taner AKAR

Prof. Dr. Nedim MUTLU

Assoc. Prof. Dr. Onur ŞENOL

ÖNSÖZ

Bu araştırma, çölyak hastalığıyla ilişkili glüten fraksiyonlarını incelemek amacıyla gerçekleştirilmiştir. Çalışmada, hastalığı tetikleyen antijenik bileşenlerden biri olan α-gliadin proteinlerinin farklı buğday çeşitlerindeki varlığı ve miktarı belirlenmiştir. Türkiye'nin bir buğday gen merkezi olması nedeniyle, yerel buğday çeşitleri üzerinde yürütülen bu çalışma, ülkemizdeki buğday ıslah çalışmalarının glüten protein yapısına olan etkilerini ortaya koymuştur.

Bu tez çalışması, bilimsel merakımı besleyen ve bana ilham veren değerli kişilerin rehberliğiyle mümkün hale gelmiştir. Çünkü bilimsel araştırmalar, bireysel bir çabadan ziyade, iş birliği ve destekle büyüyen ortak bir emeğin ürünüdür.

Bu çalışmanın tamamlanmasında, tez danışmanım ve bu yolculuğumdaki en önemli rehberim olan Prof. Dr. Mehmet Fatih CENGİZ'e en içten teşekkürlerimi sunarım. Bilgisi, sabrı ve vizyonu sayesinde, çalışmam her adımda daha sağlam temeller üzerine kuruldu. Aynı zamanda, deney materyallerinin temininde ve metodolojik planlamalarda sağladıkları değerli katkılar için Prof. Dr. Taner AKAR'a ve Doç. Dr. Mehmet TEKİN'e çok teşekkür ederim.

Bu süreçte, laboratuvarda bana destek olan bilgilerini benimle paylaşarak çalışmalarımı kolaylaştıran laboratuvar arkadaşlarım, Mariem BOUALİ, Damla YÜKSEL ve diğer arkadaşlarıma teşekkür ederim. Sizlerle birlikte çalışmak bu zorlu yolculuğu daha keyifli ve anlamlı hale getirdi. Ayrıca tezim sırasında hem bilimsel hem de manevi olarak bana destek olan, kıymetli dostlarım Serra KARADAL ve Hatice ÜN'e içtenlikle teşekkür ederim. Bu çalışma sırasında bilimsel destek sağlayan ve TÜBİTAK projesi kapsamında gerekli kaynakları sunarak araştırmamın gerçekleştirilmesine olanak tanıyan TÜBİTAK'a teşekkür ederim. Tez çalışmasının yürütülmesinde arazi ve kalite analizleri için verdikleri desteklerden dolayı TASACO Tarım A.Ş. çalışanlarına arazi ve laboratuvar çalışmaları için teşekkür ederim. Sağladığınız bu destek, çalışmanın başarıyla tamamlanmasında çok önemli bir rol oynamıştır.

Hayatım boyunca üzerimde büyük emeği olan, annem Hatice TUNCER'e, babam Mustafa TUNCER'e ve bu süreçte en büyük destekçim sevgili eşim Onur KEŞCİ'ye, bu süreçte bana karşı gösterdikleri anlayış ve sabırları için kızlarım Göksu ve Nilsu'ya içtenlikle teşekkür ederim.

Bu çalışmanın bilimsel ilerlemenin sonsuz döngüsünde yeni başlangıçlar için bir temel olmasını dilerim. Elde edilen bulguların hem akademik çevrelerde hem de biyoteknoloji ve tarım alanındaki uygulamalarda faydalı olmasını temenni ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET i
ABSTRACT iii
ÖNSÖZ v
AKADEMİK BEYAN viii
SİMGELER VE KISALTMALAR ix
ŞEKİLLER DİZİNİ xii
ÇİZELGELER DİZİNİ xv
1. GİRİŞ 1
2. KAYNAK TARAMASI 4
2.1. Çölyak Hastalığı ve Önemi 4
2.2. Çölyak Hastalığı Mekanizması ve Buğday Etkileşimi 9
2.3. Buğday Genetiği ve Islahı 12
2.3.1. Buğdayın Tarihsel Gelişimi 15
2.3.2. Buğday Yetiştiriciliği 17
2.3.3. Dünyada ve Türkiye'de Buğday Üretimi 18
2.3.4. Ülkemizde Yerel Buğday Çeşitleri ve Islah Çalışmaları 20
2.4. Buğday Tanesinin Yapısı 27
2.4.1. Buğdayda Protein Fraksiyonları 27
2.4.2. Gliadin Proteinleri ve Alt Grupları 29
2.4.3. Epitop Türleri 30
2.4.4. İmmunojenik Epitoplar 31
2.5. Epitopların Tanımlama Yöntemleri 35
2.5.1. İmmünoassay (ELİSA) yöntemi 35
2.5.2. Western blot yöntemi 35
2.5.3. Radyo binding yöntemi 36
2.5.4. Kütle spektrometrisi tabanlı yöntemler 36
3. MATERYAL VE YÖNTEM 41
3.1. Genetik Materyal 42
3.2. Kullanılan Laboratuvar Cihazları 44
3.3. Yöntem 45
3.3.1. Buğday kalite özellikleri 45

3.3.2. Gliadin proteini düzeylerinin belirlenmesi 48
3.3.3. İmmünojenik epitopların tayini ve analizi 52
3.3.4. İstatistiksel çalışmalar 60
4. BULGULAR ve TARTIŞMA 61
4.1. Buğday Kalite Analizleri 62
4.1.1. Bin dane ağırlığı 62
4.1.2. Dane Nemi 63
4.1.3. Hektolitre ağırlığı 64
4.1.4. Dane verimi 65
4.1.5. Yaş glüten oranı 66
4.1.6. Glüten indeksi 67
4.1.7. Sedimantasyon analizi 68
4.1.8. Miksograf değeri analizi 69
4.1.9. Protein Miktarı 70
4.2. Gliadin Proteinleri ve Alt Fraksiyonlarının Dağılımları 71
4.2.1. Gliadin protein düzeyleri 71
4.2.2. Gliadin alt fraksiyonlarının çeşitlere göre değişimi 72
4.2.3. Buğday çeşitlerindeki gliadin alt fraksiyonlarının dağılımı 80
4.3. Buğday Çeşitlerindeki İmmonojenik Epitop Dağılımları 97
4.3.1. Gliadin fraksiyonlarının SDS-PAGE yöntemi ile dağılımları 97
4.3.2. Sıvı kromatografisi kütle kütle spektrometrisi (LC-MS MS) analiz bulguları 99
4.3.3. Sıvı kromatografisi kuadrupol uçuş zamanı kütle spektrometrisi (LC QTOF MS) analiz bulguları 105
4.3.4. Matriks-destekli lazer desorpsiyon/iyonizasyonu (MALDİ) analiz bulguları 107
5. SONUÇLAR 110
6. KAYNAKLAR 113
7. EKLER 125
ÖZGEÇMİŞ

AKADEMİK BEYAN

Doktora Tezi olarak sunduğum "*Çölyak Hastalığına Yol Açan İmmünojenik Epitoplar Bakımından Tarihsel ve Tescilli Kışlık Ekmeklik Buğday Çeşitlerinin Karşılaştırılması"* adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

19/06/2025

SUDE KEŞCİ

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

% : Yüzdelik

± : Artı-eksi

Da : Dekar

Ha : Hektar

Kg : Kilogram

L : Litre

M : Molarite

Mg : Miligram

ml : Mililitre

ppm : Milyonda bir

rpm : Dakikadaki devir sayısı

ºC : Santigrat

α : Alfa

β : Beta

γ : Gamma

ω : Omega

Kısaltmalar

BDUTAEM : Bahri Dağdaş Uluslararası Tarımsal Araştırma Enstitüsü

CIMMYT : International Maize and Wheat Improvement Center/ Uluslararası Mısır ve Buğday Islah Merkezi

ÇH : Çölyak Hastalığı

DATAEM : Doğu Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü

EC : Elektriksel Kondüktivite Tuzluluk Değeri

FAO : Food and Agriculture Organization of the United Nations

GP-HPLC-FLD : Jel Geçirgenlikli Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi - Floresans Dedeksiyon

GKTAEM : Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü

ICARDA : International Center for Agricultural Research in the Dry Areas/ Kurak Alanlar için Uluslararası Tarımsal Araştırma Merkezi

LC QTOF MS: Sıvı Kromatografisi Kuadrupol Uçuş Zamanı Kütle Spektrometrisi

LOD : Tespit Sınırı

LOQ : Ölçüm Sınırı

MAEM : Mısır Araştırma Merkezi

MALDI QTOF MS: Matriks Yardımlı Lazer Desorpsiyon/İyonizasyon – Kuadrupol Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometrisi

NHANES : National Health and Nutrition Examination Survey

RP- HPLC : Ters Faz Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

TARM : Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü

TTAEM : Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü

TÜİK : Türkiye İstatistik Kurumu

Tezde ondalık ayracı olarak nokta "." kullanılmıştır.

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Küresel çölyak hastalığı dağılımı (Bradauskiene vd. 2023) 6

Şekil 2.2. Sağlıklı bağırsak kesiti ve çölyak hastalığı sonrası bağırsak dokusunun kesiti (Clinic 2025) 8

Şekil 2.3. *Triticum aestivum*'daki (AABBDD) gliadin ve glutenin lokusleri (Sharma vd. 2020) 10

Şekil 2.4. Triticeae'ya ait türleri içeren ve kromozom sayılarını gösteren şema (Golovnina vd. 2007) 13

Şekil 2.5. Buğdayın kökeni (Chantret vd. 2005) 16

Şekil 2.6. Türkiye'de buğday üretimi verileri (USDA 2025) 18

Şekil 2.7. Türkiye'deki buğday üretiminin bölgesel dağılımı (USDA 2025) 19

Şekil 2.8. Kıtalara göre buğday üretiminin dağılımı 20

Şekil 2.9. Buğday tanesinin yapısal bileşenleri 28

Şekil 2.10. Epitopların farklı seviyelerde tanımlanması (Meresse vd. 2009) 33

Şekil 3.1. Tez kapsamında ekilen buğdayların görüntüsü 44

Şekil 3.2. Dane nemi ölçümü 46

Şekil 3.3. Sedimantasyon için kullanılan çalkalayıcı sistemi 47

Şekil 3.4. Buğday tanelerinin valsli öğütücü öğütülmesi, un ve kepek olarak ayrıştırılması aşamaları 49

Şekil 3.5. Numunelerin ekstraksiyonu ve sonrasında filtreden geçirilmiş gliadin içeren supernatantı 49

Şekil 3.6. BCA reaktifi eklenmiş numunelerin spektrofotometre ölçümü 50

Şekil 3.7. Analizlerde kullanılan HPLC cihazı 52

Şekil 3.8. a) Numunelerin jele yüklenmiş hali; **b)** jelin yıkama sonrası görüntüsü 53

Şekil 3.9. Farklı protein miktarlarının jel görüntüsü 54

Şekil 3.10. a) Moleküler ağırlıklarına göre bantların ayrıştırılması; **b)** Gliadin alt gruplarının ait olduğu bölgeye göre işaretlenmesi; **c)** Jelden kesim işlemi; **d)** Kesilen jel parçaları; **e)** Jel parçalarının soğuk koşullarda saklanması ve sindirim öncesi hazırlanması **f)** Her bir gliadin fraksiyonuna ait jel parçaları, digestion tamamlanmış son hali 55

Şekil 3.11. a) C18 ve SCX disklerinin pipet ucuna sıralı yerleştirildiği yapı; **b)** C18 diskinin steril cam ortamda yerleştirilme aşaması; **c)** Uygulama çubuğu yardımıyla diskin pipet ucuna sabitlenmiş son hali.....56

Şekil 3. 12 MALDI-TOF cihazı ve flex kontrol ölçüm ekranı görüntüsü 59

Şekil 4.1. Tescil dönemlerine göre bin dane ağırlığının kuru ve sulu yetiştirme koşullarındaki karşılaştırma grafiği.....62
Şekil 4.2. Tescil dönemlerine göre dane nemi değerlerinin kuru ve sulu yetiştirme koşullarındaki karşılaştırma grafiği.....63

Şekil 4.3. Tescil dönemlerine göre hektolitre ağırlığının kuru ve sulu yetiştirme koşullarındaki karşılaştırma grafiği.....64

Şekil 4.4. Tescil dönemlerine göre dane verimi özelliğinin kuru ve sulu yetiştirme koşullarındaki karşılaştırma grafiği.....65

Şekil 4.5. Tescil dönemlerine göre yaş glüten oranının kuru ve sulu yetiştirme koşullarındaki karşılaştırma grafiği.....66

Şekil 4.6. Tescil dönemlerine göre glüten indeksinin kuru ve sulu yetiştirme koşullarındaki karşılaştırma grafiği.....67

Şekil 4.7. Tescil dönemlerine göre sedimantasyon değerinin kuru ve sulu yetiştirme koşullarındaki karşılaştırma grafiği.....68

Şekil 4.8. Tescil dönemlerine göre miksograf enerji değerinin kuru ve sulu yetiştirme koşullarındaki karşılaştırma grafiği.....69

Şekil 4.9. Tescil dönemlerine göre protein miktarının kuru ve sulu yetiştirme koşullarındaki karşılaştırma grafiği.....70

Şekil 4.10. Tescil dönemlerine göre gliadin miktarlarının kuru ve sulu yetiştirme koşullarındaki karşılaştırma grafiği.....72

Şekil 4.11. Kuru koşullarda yetiştirilen Galinda çeşidinin tekrarları ölçümü.....73

Şekil 4.12. Sulu koşullarda yetiştirilen Esperia çeşidinin tekrarlı ölçümü 74

Şekil 4.13. Sulu ve kuru koşullarda yetiştirilen farklı buğday çeşitlerine ait epitop skor grafiği 84

Şekil 4.14. Sulu koşullarda yetiştirilen farklı tescil dönemlerine ait buğday çeşitlerine ait epitop skor grafiği 85

Şekil 4.15. Kuru koşullarda yetiştirilen farklı tescil dönemlerine ait buğday çeşitlerine ait epitop skor grafiği 86

Şekil 4.16. Sulu koşullarda yetiştirilen buğday çeşitlerinin toplam pik sayısı 88

Şekil 4.17. Sulu koşullarda yetiştirilen buğday çeşitlerinin ortalama pik sayıları.....89

Şekil 4.18. Kuru koşullarda yetiştirilen buğday çeşitlerinin toplam pik sayıları.....90

Şekil 4. 19. Kuru koşullarda yetiştirilen buğday çeşitlerinin ortalama pik sayıları.....91

Şekil 4.20. Sulu koşullarda yetiştirilen buğday çeşitlerinin ortalama pik alanı.....92

Şekil 4.21. Kuru koşullarda yetiştirilen buğday çeşitlerinin ortalama pik alanları.....93

Şekil 4.22. Sulu koşullardaki gliadin alt fraksiyonlarına ait pik alanlarının ısı haritası .94

Şekil 4.23. Kuru koşullardaki gliadin alt fraksiyonlarına ait pik alanlarının ısı haritası 95

Şekil 4.24. Sulu koşullarda yetişen buğday çeşitlerinin gliadin alt üniteleri arasındaki korelasyon 96

Şekil 4.25. Kuru koşullarda yetişen buğday çeşitlerinin gliadin alt üniteleri arasındaki korelasyon 96

Şekil 4.26. Buğday çeşitlerinin moleküler ağırlıklarına göre dağılımı.....97

Şekil 4.27. Gliadin alt fraksiyonlarına ait SDS PAGE görüntüleri.....98

Şekil 4.28. LC-MS MS cihazından elde edilen α, β, γ ve Ω gliadinlere ait spektrumlar 100

Şekil 4.29. Ak702 örneğine ait LC-QTOF MS sonuçlarının Proteinscape yazımı ile elde edilen peptit sekansları.....101

Şekil 4.30. Bezostaja-1 örneğine ait LC-QTOF MS sonuçlarının Proteinscape yazımı ile elde edilen peptit sekansları 102

Şekil 4.31. TIC kromatogramları.....104

Şekil 4.32. LC-QTOF verilerinin çok değişkenli OPLS-DA ile elde edilmiş skor grafikleri.....106

Şekil 4.33. Buğday çeşitlerinden Bora, Gernik, Ak702 ve Kırkpınar'a ait örnek MALDI-TOF spektrumları.....107

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. 2022 ve 2023 Tahıllar ve diğer bitkisel ürünlerin üretim miktarları (TÜİK 2022) 19

Çizelge 2.2. İlkel kültür buğdayları, çeşit grupları ve ploidi seviyeleri.....21

Çizelge 2.3. Türkiye'de 1970 öncesi ve sonrası geliştirilen buğdaylar (Ozberk vd. 2016) 24

Çizelge 2.4. Türkiye'de 1970 sonrası geliştirilen buğdaylar (Özberk vd. 2016b).....25

Çizelge 2.5. Gliadin proteinlerinin yüzdesel dağılımı (Wieser 2007) 30

Çizelge 2.6. T-hücre uyarıcı peptit dizileri 34

Çizelge 3.1. Tez kapsamında kullanılan buğday çeşitlerinin listesi 41

Çizelge 3.2. Buğday örneklerinin yetiştirildiği deneme arazisi toprak özellikleri 43

Çizelge 3.3. Tez kapsamında kullanılan cihazlar,marka bilgileri ve kullanım amaçları 44

Çizelge 3.4. Yaş gluten oranı ve gluten indeksinin değerlendirilmesinde kullanılan ölçek 47

Çizelge 3.5. Zeleny sedimantasyon değerinin değerlendirilmesinde kullanılan ölçek...48

Çizelge 3.6. BCA protein miktarı tayininde kullanılan standart BSA'nın hazırlanışı....51

Çizelge 3.7. Gliadin ekstraksiyonu için HPLC cihazı analitik koşulları 51

Çizelge 3.8. LC-QTOF MS analizinde kullanılan kromatografik ve spektrometrik parametreler.....58

Çizelge 4.1. Tez kapsamında incelenen buğdayların tescil dönemlerine göre sınıflandırılması.....61

Çizelge 4.2. Kuru ve sulu koşullarda yetiştirilen 1. Grup (Tarihsel) Gliadin protein fraksiyonlarının toplam ve ortalama pik sayıları ile pik alanları 75

Çizelge 4. 3. Kuru ve sulu koşullarda yetiştirilen 2. Grup (yeşil devrim öncesi seleksiyon ıslahıyla geliştirilen) gliadin fraksiyonlarının toplam ve ortalama pik sayıları ile pik alanları.....76

Çizelge 4.4. Kuru ve sulu koşullarda yetiştirilen 3. Grup (yeşil devrim öncesi 1968 - 1970) gliadin fraksiyonlarının gliadin fraksiyonlarının toplam ve ortalama pik sayıları ile pik alanları.....77

Çizelge 4.5. Kuru ve sulu koşullarda yetiştirilen 4. Grup (yeşil devrim sonrası) gliadin proteinlerinin fraksiyonlarının pik miktarları.....78

Çizelge 4. 6. Kuru ve sulu koşullarda yetiştirilen 5. Grup (yeşil devrim sonrası) gliadin proteinlerinin fraksiyonlarının pik miktarları.....79

Çizelge 4.7. Kuru ve sulu koşullarda yetiştirilen 6. Grup (yeşil devrim sonrası) gliadin proteinlerinin fraksiyonlarının pik miktarları.....80

Çizelge 4.8. Kuru ve sulu koşullarda yetiştirilen buğday çeşitlerindeki gliadin alt fraksiyonları (ortalama pik alanı (mAU*dk)) 82

Çizelge 4.9. Ak702 örneğine ait MS/MS peptit eşleşmeleri.....103

Çizelge 4.10. Sulu ve kuru koşullarda yetişen buğday çeşitlerinin tespit edilen gliadin alt fraksiyonlarının LC QTOF dağılımı 105

1. GİRİŞ

Buğday, dünya genelinde en yaygın yetiştirilen ve tüketilen tahıllardan biri olup, dünya genelinde 2.5 milyar insanın beslenmesine katkı sağlayarak küresel gıda güvenliğinin korunmasında hayati bir rol oynamaktadır Ramadas vd. (2019). Hem doğrudan tüketilen unlu mamuller hem de işlenmiş gıdalarda kullanılan çeşitli türevleri sayesinde, buğday modern gıda endüstrisinin en önemli hammaddelerinden biri haline gelmiştir. Besin değeri açısından zengin bir kaynak olan bu tahıl, karbonhidrat, protein, lif, vitamin ve mineraller açısından önemli bir bileşime sahiptir (Shewry vd. 2002). Buğday, pirinçten sonra en çok tüketilen temel gıda maddesidir ve kalori ihtiyacının yaklaşık %20'sini ve diyet proteininin %25'ini karşılamaktadır (Shewry 2009). Karbonhidratların yanı sıra buğday %10-15 protein ile önemli miktarda diyet lifi ve mikro besin içermektedir (Ling vd. 2013). Buğdaydan elde edilen un, ekmek, makarna, bulgur, irmik, bisküvi, kraker, kahvaltılık gevrekler ve çeşitli atıştırmalıklar gibi çok sayıda gıda ürününün üretiminde temel malzeme olarak kullanılmaktadır. Yüksek verimliliği, besleyici bileşenleri ve geniş kullanım alanı nedeniyle buğday, dünya çapında tarım ekonomisinin temel taşlarından biri olarak kabul edilmektedir.

Buğdayın en çok bilinen sağlıkla ilişkili sorunlarından biri çölyak hastalığıdır. Son yıllarda yapılan araştırmalar, çölyak hastalığının görülme sıklığının arttığını ve seroprevalansın kıtalara göre farklılık gösterdiğini ortaya koymaktadır. Avrupa ve Kuzey Amerika'da çölyak hastalığının görülme oranı yaklaşık %1 civarında olup, İskandinav ülkelerinde bu oran %2-3'e kadar çıkabilmektedir. Kuzey Afrika'da seroprevalans %1.1, Asya'da ise %1.8 olarak belirlenmiştir. Ancak, Sahra Altı Afrika ve Asya'nın büyük bir bölümünde yapılan epidemiyolojik çalışmaların azlığı nedeniyle bu bölgelerde hastalığın gerçek görülme sıklığı hakkında yeterli veri bulunmamaktadır. Çölyak hastalığı, kadınlarda erkeklere oranla yaklaşık 2 kat daha sık görülmektedir ve çocukluk çağında daha yüksek insidansa sahiptir. Yeni doğanlarda genetik yatkınlık taramalarında, çölyak hastalığına özgü antikorların en sık 2-5 yaş arasında geliştiği gösterilmiştir. Bununla birlikte, erişkin yaşta da çölyak hastalığının yeni başlangıçlı olarak ortaya çıkabileceği belirlenmiştir (Fasano vd. 2012a).

Çölyak hastalığının temel mekanizması, glütenin sindirimi sırasında ortaya çıkan belirli peptitlerin bağışıklık sistemi tarafından yanlış bir şekilde tanınması ve yabancı bir tehdit olarak algılanmasıyla başlar. Normal şartlar altında sindirim enzimleri tarafından tam olarak parçalanamayan bu glüten peptitleri, bağırsak epiteline nüfuz eder ve burada immün sistemin T hücrelerini aktive eder (Fasano vd. 2003). Bu süreçte özellikle gliadin adı verilen glüten alt birimlerinin rolü büyüktür. Gliadin peptitleri, transglutaminaz enzimi tarafından kimyasal bir dönüşüme uğrayarak deamine edilir ve bu yeni yapı, bağışıklık sisteminin kilit oyuncularından biri olan HLA-DQ2 veya HLA-DQ8 moleküllerine bağlanır. Bu bağlanma sonucunda immün sistem aşırı bir tepki vererek inflamatuar bir süreç başlatır (Molberg vd. 1998; Sollid 2002). Bunun sonucunda villus atrofisi, kript hiperplazisi ve mukozal bozulma gibi yapısal değişiklikler meydana gelir (Shan vd. 2002b). Sürecin devam etmesi, çölyak hastalığına bağlı malabsorbsiyon ve beslenme bozukluklarına yol açar (Fasano vd. 2003). Bu inflamatuar yanıtın ilerlemesiyle bağırsak mukozasında ciddi yapısal değişiklikler meydana gelir. Özellikle bağırsaktaki besin emiliminden sorumlu olan villus yapıları giderek incelir ve zamanla tamamen kaybolabilir. Buna bağlı olarak villus atrofisi, kript hiperplazisi ve mukozal bozulma gibi histopatolojik değişiklikler gözlemlenir (L. Shan vd., 2002). Bu yapısal hasar, bağırsakta

emilim yüzeyinin azalmasına neden olarak, karbonhidrat, protein, yağ, vitamin ve minerallerin emiliminde ciddi bozulmalara yol açar. Uzun vadede, bu durum malabsorbsiyon sendromu ile sonuçlanabilir ve hastalarda demir eksikliği anemisi, osteoporoz, kilo kaybı, büyüme geriliği gibi çeşitli sağlık sorunlarının ortaya çıkmasına neden olabilir (Fasano vd. 2012a). Çölyak hastalığının oluşturduğu bu zincirleme reaksiyon, yalnızca sindirim sistemini değil, vücudun genel sağlığını da etkileyen multisistemik bir bozukluk olarak değerlendirilmesini gerektirmektedir. Bu nedenle, çölyak hastalığının patofizyolojisinin daha iyi anlaşılması ve çölyak dostu ürünlerin geliştirilmesi için yapılan araştırmalar büyük önem taşımaktadır. Çölyak hastalığı, buğday alerjisi ve çölyak dışı buğday duyarlılığı, klinik belirtiler açısından benzerlikler gösterebilse de bu hastalıkların epidemiyolojisi, tanısı ve tedavi yaklaşımları farklılık göstermektedir.

Çölyak hastalığında önemli bir role sahip glüten, buğdayın iki ana protein fraksiyonundan biri olan prolaminler ve glutelinlerden oluşur. Prolaminler, özellikle çölyak hastalığını tetikleyen peptit dizilerine sahiptir ve bu dizilerin immünojenik özellikleri gliadin proteinlerinde yoğunlaşmıştır (Sollid 2002). Gliadin proteinleri, buğdayın α-, γ- ve ω- sınıflarına ayrılan çeşitli alt gruplarına sahiptir. Bu alt gruplar arasında en çok ilgi gören, çölyak hastalığıyla güçlü ilişkisi nedeniyle α-gliadindir (Kim vd. 2004). α-gliadin proteini, sindirim sırasında çölyak hastalığını tetikleyen spesifik peptitler içerir ve bu peptitler bağışıklık sisteminde spesifik T hücre yanıtlarını aktive ederek inflamasyona neden olur (Shan vd. 2002b). Yapılan araştırmalara göre, özellikle α-gliadin türevli peptitler, çölyak hastalığında en güçlü immünojenik etkinin kaynağı olarak tanımlanmıştır (Qiao vd. 2004). 33 amino asitlik bu α-gliadin peptiti, özellikle HLA-DQ2 molekülüne yüksek afiniteyle bağlanır ve bu bağlanma, çölyak hastalığında gözlenen otoimmün reaksiyonun başlamasında merkezi bir rol oynar (Kim vd. 2004).

Modern buğday çeşitleri, tarımsal üretkenliği artırmak ve un kalitesini iyileştirmek amacıyla seleksiyon ve ıslah çalışmalarına tabi tutulmuştur. Bu çalışmaların bir sonucu olarak, glüten proteinlerinin yapısında, özellikle çölyak hastalığını tetikleyebilecek bileşenlerde değişiklikler gözlemlenmiştir. 20. yüzyılın ortalarında Yeşil Devrim sonrasında geliştirilen buğday çeşitleri, genellikle daha yüksek glüten içeriğine sahiptir. Bu durum, glüten duyarlılığı ve çölyak hastalığı gibi sağlık sorunlarına yatkın bireylerde daha fazla probleme neden olabilmektedir (Shewry vd. 2016). Yeşil devrim öncesi buğday çeşitleri, daha düşük glüten içeriği ile bilinirken, modern çeşitler daha yüksek glüten seviyelerine sahip olabilir. Bunun nedeni, tarımda artan verim ve kalite beklentileri doğrultusunda yapılan ıslah çalışmalarıdır. Ancak bu durum, çölyak hastalığı gibi otoimmün hastalıkların görülme sıklığında artışa neden olabileceği endişesini beraberinde getirmektedir (Arentz-Hansen vd. 2000).

Türkiye, buğdayın genetik çeşitliliği açısından dünya çapında önemli bir merkez olarak kabul edilmektedir. Türkiye'nin bulunduğu bölge, buğdayın ilk evcilleştirildiği ve tarıma başlandığı alanlardan biri olup, Anadolu topraklarında yaklaşık 10000 yıldır buğday tarımı yapılmaktadır (Özberk vd. 2016a). Türkiye'deki buğday çeşitliliği, yerel ve modern genotipler bakımından büyük zenginlik sunar. Ülkede yetiştirilen yerli buğday türleri arasında Songar, Mokan ve Kılçık (Kavuzlu Buğday) gibi eski çeşitler, farklı iklim ve coğrafi koşullara uyum sağlamış ve genetik çeşitliliğin korunmasında önemli bir rol oynamaktadır (Karagöz vd. 2005).

Türkiye'de toplam buğday ekim alanı 7.5 milyon hektar civarında olup, yıllık buğday üretimi ortalama 19-21 milyon ton arasında değişmektedir (TÜİK 2022). Buğday üretiminde yerel çeşitler önemli bir paya sahiptir. Örneğin, Songar buğdayı, Karadeniz bölgesinin yüksek rakımlı ve zor tarım yapılan bölgelerinde yetişmekte olup, düşük glüten içeriği ile modern buğday çeşitlerinden ayrılmaktadır (Karagöz 2014). Songar ve Mokan gibi tarihsel yerel buğday çeşitlerinin daha düşük glüten içeriğine sahip olduğu buna karşın modern buğday çeşitlerinin bu hastalığa yol açabilecek protein dizilimlerini daha fazla barındırdığına dönük Türk kamuoyunda bir ön yargı bulunmaktadır. Bu bağlamda, bu araştırmanın amacı, farklı buğday çeşitlerinin çölyak hastalığını tetikleyen immünojenik epitoplar açısından karşılaştırmalı bir analizini yapmaktır. Bu çalışma, buğday ıslahı ve tarım politikalarının çölyak hastalığı üzerindeki olası etkilerini de değerlendirmeyi hedeflemektedir.

Tez çalışması kapsamında;

I. Sulu ve kuru şartlar olmak üzere farklı yetiştirme koşullarında son 100 yıl içinde tescil edilen tarihsel ve modern ekmeklik buğday çeşitlerinin gliadin protein miktarlarında meydana gelen değişiklikler incelenmiş ve bu değişikliklerin kalite özellikleriyle olan ilişkisi değerlendirilmiştir.

II. Tarihsel ve modern buğday çeşitlerinin yıllara bağlı olarak 5 farklı dönem olacak şekilde gruplandırılması yapılmış ve bu grupların kalite özellikleri ile HPLC'deki α/β, γ ve ω-gliadin bölgeleri açısından nasıl farklılık gösterdiği ortaya konmuştur.

III. Proteomik yaklaşımlar kullanılarak çölyak hastalığına neden olan immünojenik peptitler, tescilli tarihsel ve modern buğdayı çeşitlerinde tespit edilmiştir.

Bu hedefler doğrultusunda çalışmada, buğdayın kalite özelliklerini ve sağlık üzerindeki etkilerini daha iyi anlamaya yönelik bilimsel bulgular sunmuştur. Elde edilen bulguların hem bilimsel araştırmalar hem de tarım politikaları açısından önemli katkılar sunması ümit edilmektedir

2. KAYNAK TARAMASI

2.1. Çölyak Hastalığı ve Önemi

Çölyak hastalığı, buğday, çavdar ve arpada bulunan bir protein olan glütenin tüketilmesiyle genetik olarak yatkın kişilerde ortaya çıkan sistemik bir bağışıklık hastalığıdır (Green vd. 2003). Çölyak hastalığının doğal seyri hastalar arasında değişkenlik göstermektedir. Uzun vadeli takip çalışmaları, çölyak hastalığının belirli bir sıra doğrultusunda ilerlediğini ortaya koymuştur. Öncelikli olarak, çölyak hastalığına özgü antikorların serumda tespit edilmesiyle süreç başlamaktadır. Bunu takiben, bağırsak mukozasında enteropati gelişimi, klinik semptomların ortaya çıkışı ve bazı hastalarda komplikasyonların gelişimi izlenmektedir. Ancak, bu aşamaların tümü her hastada aynı şekilde gözlemlenmemiştir (Fasano vd. 2012a). Hastalığın her bir evresi bireyler arasında değişkenlik göstermekte olup, ilerleme süresi haftalardan onlarca yıla kadar farklılık arz etmektedir. Potansiyel çölyak hastalığı, bağırsak biyopsisi sonucunda normal mukoza yapısına sahip bireylerin serumunda çölyak oto antikorlarının tespit edilmesiyle tanımlanmaktadır. Bu bireylerin belirli bir alt grubunda, zaman içerisinde ilerleyici bağırsak hasarı geliştiği gözlemlenmiştir.

Önceki teoriler, immünolojik ve mukozal değişikliklerin genellikle yaşamın erken döneminde, sütten kesilme sürecinde glüten maruziyetinin ardından geliştiğini öne sürmüştür. Ancak, güncel uzun vadeli çalışmalar çölyak otoimmünitesine hastalığın herhangi bir yaşta gerçekleşebileceğini ortaya koymuştur. Bu bulgular, genetik yatkınlık ve glüten içeren tahılların tüketiminin, glüten toleransının kaybı ve çölyak hastalığının gelişimi için gerekli ancak tek başına yeterli olmadığını göstermiştir (Simell vd. 2007). Bazı hastalarda glüten toleransının geri kazanılabildiği belirlenmiştir. Finlandiya'da yürütülen bir takip çalışmasında, çölyak hastalığı açısından genetik risk taşıyan çocukların %49'unda, glütene maruz kalmaya devam etmelerine rağmen, IgA anti-doku transglutaminaz antikorları için pozitif olan test sonuçlarının zamanla negatif hale geldiği gözlemlenmiştir. Ek olarak, çocukluk döneminde çölyak hastalığı tanısı almış bazı yetişkinlerin daha sonraki yıllarda diyetlerine glüteni yeniden dahil ettikleri, ancak serolojik testlerinin negatif kaldığı ve bağırsak mukozasının normal yapısını koruduğu bildirilmiştir (Husby vd. 2012). Serolojik bulguları negatif değerlere dönen hastaların izlenmeye devam edilmesi gerektiği vurgulanmıştır. Zira serolojik durum ve bağırsak hasarının zaman içinde değişiklik gösterebileceği belirlenmiştir (Fasano vd. 2012a).

Otoimmün bir hastalık olarak çölyak hastalığı, bağırsak mukozasında glüten tüketimiyle tetiklenen bir immün yanıt sonucunda ortaya çıkar. Bu süreçte, genetik yatkınlığı olan bireylerde HLA-DQ2 ve HLA-DQ8 antijenleri kritik bir rol oynar. Glütenin sindirimi sonucunda oluşan deamine gliadin peptitleri, antijen sunan hücrelerin yüzeyinde HLA-DQ2/DQ8 molekülleri ile CD4+ T-hücrelerine sunulur. Bu etkileşim, IFN-γ (interferon-gamma) gibi proinflamatuar sitokinlerin salınımını tetikler, bu da epitel hücrelerinin yıkılmasına, villus atrofisi ve kript hiperplazisi gibi ince bağırsak hasarına neden olmaktadır (Wieser vd. 2008).

Çölyak hastalığı, başlangıçta sadece Kuzey ve Batı Avrupa'ya özgü olduğu düşünülen ancak günümüzde tüm kıtaları etkileyen küresel bir sağlık sorunu haline gelmiş olup dünya çapında yaygınlığı son yıllarda artmıştır. 2018 yılında yapılan bir

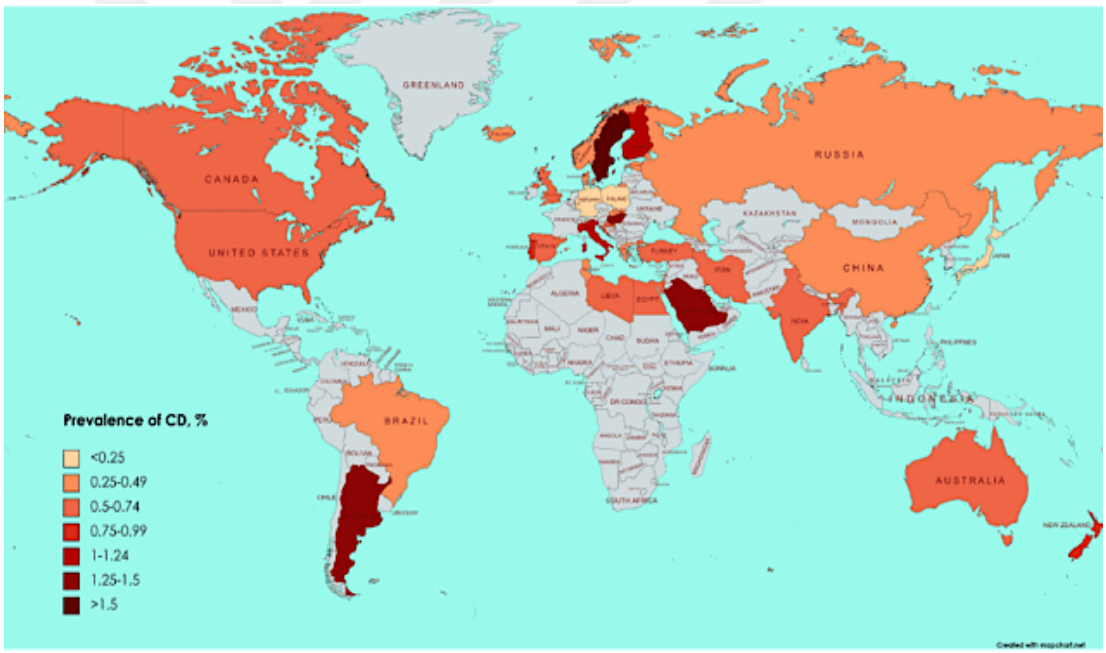
çalışmada, araştırmacılar çölyak hastalığının küresel yaygınlığını tahmin etmek ve farklı bölgeler ve popülasyonlar arasındaki yaygınlıktaki olası farklılıkları belirlemek için 1991 ile Mart 2016 arasında Asya, Avrupa, Afrika, Güney Amerika, Kuzey Amerika ve Avustralya'da yayınlanmış 96 çalışmanın meta-analizini gerçekleştirdiler. Çölyak hastalığı tanısı, pozitif çölyak-spesifik kan testi, anormallikleri ortaya çıkaran ince bağırsak biyopsisi veya her ikisinin bir kombinasyonuna dayanmaktadır. Meta-analizin sonuçları, kan testlerine göre çölyak hastalığının dünya çapındaki yaygınlığının %1.4 ve biyopsi sonuçlarına göre %0.7 olduğunu bulunmuştur (Singh vd. 2018). Çölyak hastalığının yaygınlığı Güney Amerika'da %0.4, Afrika ve Kuzey Amerika'da %0.5, Asya'da %0.6 ve Avrupa ve Okyanusya'da %0.8 olarak belirlenmiştir. Biyopsi ile doğrulanmış Çölyak hastalığının kadınlarda erkeklere göre 1.5 kat daha yaygın olduğunu ve çocuklarda yetişkinlere göre yaklaşık iki kat daha yaygın olduğunu doğrulamaktadır. Ayrıca çocuklarda yetişkinlerden önemli ölçüde daha fazladır. Sonuç olarak, çölyak hastalığının yaygınlığı cinsiyete, yaşa ve yere göre değişmektedir (Rubio-Tapia vd. 2012).

Çölyak hastalığı, dünya genelinde giderek artan bir halk sağlığı sorunu olarak farklı kıtalarda, ülkelerde ve toplumsal gruplarda değişken prevalans oranları göstermektedir. Bu farklılıklar, genetik yatkınlık, glüten içeren besinlere maruziyet düzeyi, çevresel faktörler, sağlık hizmetlerine erişim ve tanı araçlarının gelişmişliği ile yakından ilişkilidir (Unalp-Arida vd. 2017). 2024 yılına ait küresel veriler, çölyak hastalığı prevalansının %0.7 ile %2.9 arasında değiştiğini ve bu oranların coğrafi olarak önemli düzeyde farklılaştığını ortaya koymaktadır. Amerika kıtasında genel prevalans %0.7 civarındadır; örneğin Kanada'nın Alberta bölgesinde çölyak otoimmünitesi insidansı 100000 kişi-yıl başına 33.8 olarak bildirilmiştir (Gatti vd. 2024).

Mustalahti ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği bu merkezi tarama çalışması kapsamında Finlandiya, Almanya, İtalya ve Birleşik Krallık'tan 29212 kişi serolojik olarak taranmış ve çölyak prevalansı %1.0 (EMA ve tTG pozitifliği esas alınarak) ile %1.5 (yalnızca tTG pozitifliklerine dayalı geniş tanım) arasında hesaplanmıştır (Mustalahti vd. 2010). Ülkeler arasında anlamlı farklar gözlemlenmiş; örneğin 30–64 yaş arası yetişkinlerde Finlandiya'da prevalans %2.4, Almanya'da %0.3, İtalya'da %0.7 olarak bulunmuştur. Çalışma, çölyak hastalığının Avrupa genelinde yaygın olduğunu ancak tanı oranlarının ülkeden ülkeye büyük farklılıklar gösterdiğini ve bu farkların hem genetik hem çevresel nedenlerle açıklanabileceğini belirtmektedir.

Asya kıtasında ise çölyak hastalığı prevalansı bölgesel buğday tüketimi ile doğrudan ilişkili olarak önemli düzeyde farklılık göstermektedir. Hindistan'da kuzey bölgelerde prevalans %1.23, kuzeydoğuda %0.87, güneyde ise yalnızca %0.10'dur. Bu bölgesel farkın, genetik yatkınlık oranları benzer olmasına rağmen günlük buğday tüketiminin kuzeyde 455 g, kuzeydoğuda 37 g, güneyde ise 25 g olmasıyla açıklanabileceği öne sürülmektedir (Tharunika vd. 2025). Çin'de 19778 genç yetişkinin incelendiği çalışmada çölyak seropozitifliği %2.19, TTG IgA pozitifliği %0.36 olarak belirlenmiş; özellikle buğday tüketiminin yaygın olduğu kuzey eyaletlerinde çölyak antikorlarının pozitiflik oranı 12 kat daha fazla bulunmuştur (Yuan vd. 2017). Japonya'da çölyak hastalığı oldukça nadir olup, 2055 kişilik bir örneklemde yalnızca iki biyopsiyle doğrulanmış vakaya rastlanmıştır (Fukunaga vd. 2018).

427146 kişiyi kapsayan derleme çalışmasında biyopsiyle doğrulanan çölyak prevalansı Asya'da %0.69, Suudi Arabistan'da %1.42, İsrail'de %0.70, İran ve Hindistan'da %0.64, Türkiye'de ise %0.53 olarak belirlenmiştir. Çin (%0.35) ve Japonya (%0.05) gibi ülkelerde ise daha düşük oranlar raporlanmıştır (El-Metwally vd. 2020). Aynı çalışmada 41 ülke ve 120 çalışma üzerinden gerçekleştirdiği sistematik derlemesinde çölyak prevalansının %0.35–1.22 aralığında değiştiğini belirtmiş; prevalans oranlarındaki farklılığın glüten bulunabilirliğinden ziyade kişi başına düşen GDP ve HLA-DQ2/DQ8 genetik yatkınlığı gibi faktörlerle ilişkili olduğunu ortaya koymuştur. Örneğin İsveç (%3.1) ve İspanya (%3.03) gibi glüten tüketimi ve GDP yüksek olan ülkelerde çölyak prevalansı daha yüksekken, Letonya ve Estonya gibi arpa-çavdar tüketiminin yaygın olduğu ülkelerde bu oranlar daha düşüktür. Günlük fazladan 15 g buğday tüketiminin çölyak prevalansını yalnızca küçük bir oranda artırabileceği, önemli bir artış için 667 g/gün gibi yüksek glüten maruziyeti gerektiği belirtilmiştir. Bu bulgular, çölyak hastalığı gelişiminde glüten miktarından çok glütenin yapısal özellikleri, mikrobiyal maruziyet ve fermantasyon süreçleri gibi çevresel etkenlerin daha belirleyici olduğunu göstermektedir (Bradauskiene vd. 2023). Orta Doğu ülkelerinde çölyak hastalığı prevalansının genellikle %1.5–3 arasında değiştiği ve Suudi Arabistan'da %3'e kadar çıkabildiği rapor edilmiştir (Singh vd. 2018).



Şekil 2.1. Küresel çölyak hastalığı dağılımı (Bradauskiene vd. 2023)

Türkiye'de tanı genellikle IgA anti-doku transglutaminaz antikorları gibi belirli Tarihselorlar için serolojik testler ve ardından mukozal hasarı doğrulamak için bağırsak biyopsisini içermektedir. Türkiye'de çölyak hastalığı tanısı konulan kişi sayısı, Sağlık Bakanlığı'nın Sağlık Bilgi Sistemleri verilerine göre 2022 yılı sonu itibarıyla 154027 olarak bildirilmiştir. Bu rakam, 2021 yılı sonunda bildirilen 138230 vakaya göre artış göstermektedir. Görülme sıklığı %0.003 – 1 arasında değişmekte olup Türkiye'de 250 bin ile 750 bin arasında çölyak hastası tahmin edilmekte iken ancak %10'nuna tanı konulmuştur Anonim (2024).

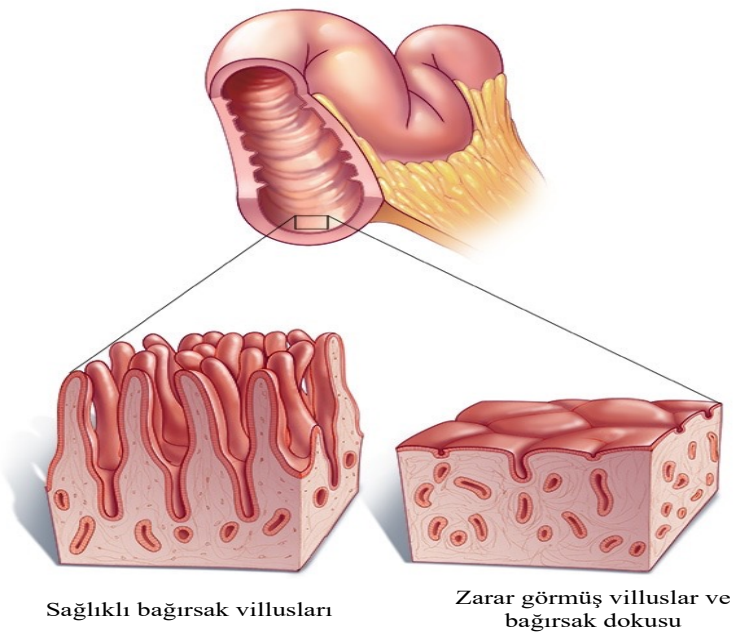
Elsürer (2005)'in yaptığı klinik araştırmada Türkiye'de çölyak hastalığı tanısı alan 60 yetişkin hastanın (39 kadın, 21 erkek) klinik ve laboratuvar özellikleri incelenmiştir. Kadın hastaların ortalama tanı yaşı erkeklerden biraz daha yüksek olup, hastalığın yıllar içinde kadınlarda daha sık görüldüğü gözlemlenmiştir. En sık semptomlar ishal (%66.7), kilo kaybı (%50) ve gaz şikayetleri (%48.3) olarak raporlanmıştır. Diğer hastalıkları taşıyanların oranları ise, anemi (%33.3), osteoporoz (%16.7), Tip-1 diyabet (%6.7) ve steatohepatittir (karaciğerde iltihaplanma ve eş zamanlı olarak karaciğerde yağ birikmesi ile karakterize edilen bir tür yağlı karaciğer hastalığıdır) (%6.7). Hastaların %10'u aile öyküsünde diyabet bulunurken, yalnızca bir hasta (%1.7) aile öyküsünde çölyak hastalığına sahiptir. Endoskopik bulgular gastrit ve mukozal hiperemi gibi değişiklikler içerirken, histopatolojik incelemelerde lamina propriadaki lenfosit artışı (%76.2) ve villöz epitelde intraepitelyal lenfosit birikimi (%59.5) en yaygın bulgular olmuştur. Çölyak hastalığına dayalı mortalite oranı %3.3 olarak belirlenmiştir. Bu bulgular, Türkiye'de çölyak hastalığı yaygınlığı, klinik görünümü ve tanı dinamiklerini anlamada önemli bir katkı sağlasa da geniş bir kitlede çalışmalar yetersizdir (Elsurer vd. 2005).

2008 yılında, Türkiye'deki sağlıklı okul çocuklarında çölyak hastalığı prevalansını belirlemek amacıyla yapılan tarama çalışmasında 2006-2008 yılları arasında 62 şehirden 139 okulda 20190 çocuğun serolojik taraması yapılmış ve pozitif bulunan 215 çocuğa biyopsi uygulanmıştır. Çalışmada biyopsi ile kanıtlanmış çölyak hastalığı prevalansı %0.47 olarak hesaplanmıştır. IgA-tTG ve IgA-EMA testlerinin birlikte kullanılması, tanıdaki pozitif öngörü değerini %75.9'a yükseltmiştir. Çalışma, serolojik testlerin duyarlılık ve özgüllüğünü artırmak için eşik değerlerinin optimize edilmesi gerektiğini ortaya koymuştur. Ayrıca, yüksek serolojik pozitiflik ve histopatolojik korelasyon göz önünde bulundurulduğunda, bazı durumlarda biyopsinin zorunlu olmayabileceği belirtilmiştir. Bu bulgular, Türkiye'de çölyak hastalığı farkındalığını artırmak ve tarama stratejilerini geliştirmek için önemli bir temel oluşturmaktadır (Dalgic vd. 2011).

Çölyak hastalığının klinik belirtileri gastrointestinal ile ekstra intestinal olmak üzere iki ana kategori altında değerlendirilir. Gastrointestinal belirtiler, hastalığın klasik formunda sık görülen semptomlardır ve bu grupta kronik ishal, karın ağrısı, şişkinlik ve malabsorbsiyon nedeniyle kilo kaybı öne çıkar (Green vd. 2007). Malabsorbsiyonun (alınan besinlerin vücutta etkili bir şekilde emilmesini engelleyen bir sindirim bozukluğu) ilerlemesiyle birlikte, yağ, karbonhidrat, protein ve diğer mikro besinlerin emilimi bozulur, bu da sistemik komplikasyonlara zemin hazırlar. Örneğin, ince bağırsak villüslerindeki hasar nedeniyle yağ emilimindeki bozukluk, enerji kaybına yol açar (Ludvigsson vd. 2013). Ekstra intestinal belirtiler, çölyak hastalığının sindirim sistemi dışında görülen belirtileridir ve genellikle hastalığın alışılmadık (atipik) formlarında daha yaygındır. Bu durum, çölyak hastalığının sadece bağırsakları değil, vücudun diğer organ ve sistemlerini de etkileyen bir hastalık olduğunu gösterir. Demir eksikliği anemisi, özellikle glütenle tetiklenen ince bağırsak hasarına bağlı olarak demir emiliminin bozulması sonucu ortaya çıkar ve çölyak hastalarında sık karşılaşılan ilk bulgudur (Mahadev vd. 2018). Osteoporoz ve D vitamini eksikliği de malabsorbsiyonla ilişkilidir ve kemik mineral yoğunluğunda azalma ile sonuçlanır. Dermatolojik olarak, dermatitis herpetiformis çölyak hastalığının karakteristik deri bulgusudur ve immünolojik yanıtın deri altı dokularda IgA birikimi ile ortaya çıkar (Collin vd. 2017). Nörolojik semptomlar arasında ise periferik nöropati, ataksi ve depresyon dikkat çeker; bu bulgular hem malabsorbsiyona bağlı besin eksiklikleri hem de glütenin nörolojik dokulara olan

etkileriyle ilişkilendirilmiştir (Hadjivassiliou vd. 2015). Bu klinik tablo, çölyak hastalığının yalnızca sindirim sistemini değil, diğer organ sistemlerini de etkileyen kompleks bir hastalık olduğunu ortaya koymaktadır. Tanı sürecinde bu çeşitli belirtilerin dikkatlice değerlendirilmesi, özellikle atipik belirtiler gösteren hastalarda erken tanı ve tedavi açısından kritik öneme sahiptir.

Çölyak hastalığı, ince bağırsağın üst kısmındaki bağırsak epitel tabakasını etkiler ancak gastrointestinal sistem dışındaki birçok vücut sisteminde görülen komplikasyonların çeşitliliği ve bunun sonucunda ortaya çıkan emilim bozukluğu nedeniyle sistemik bir hastalık olarak kabul edilir (Caio vd. 2019). Çölyak hastalığının tanısında birinci basamak test olarak TTG-IgA analizleridir. Bu analiz, hastanın test sırasında gluten içeren bir diyette olması koşuluyla, %95 duyarlılık ve özgüllükle çölyak hastalığı olan kişileri (glutensiz diyet yapmayan) tespit eder (Lebwohl vd. 2021). Tüm sistemi etkileyen bir hastalık olduğundan tanısı için, Çölyak hastalığında, bağırsak biyopsisinde görülen bulgular; villüs atrofisi, kript hiperplazisi ve intraepitelyal lenfosit (IEL) artışıdır. Villüs atrofisi durumunda, Şekil 2.2.'de gösterildiği gibi normalde ince bağırsak mukozasında bulunan besin emilimini sağlayan parmak şeklindeki villüsler çölyak hastalığında kısalır veya tamamen kaybolur. Buna karşılık, villüslerin kaybına tepki olarak tabanda bulunan kriptlerde büyüme ve çoğalma meydana gelir ki bu da kript hiperplazisi olarak tanımlanır. Ayrıca çölyak hastalığında, epitel hücreleri arasında bulunan intraepitelyal lenfositlerin sayısında belirgin bir artış gözlenir ve tanı için 100 epitel hücresinde 40'tan fazla lenfosit bulunması dikkate alınır. Bu üç temel bulgu, çölyak hastalığının tanısında önemli bir yer tutar ve hastalığın derecesini belirlemede kullanılır.

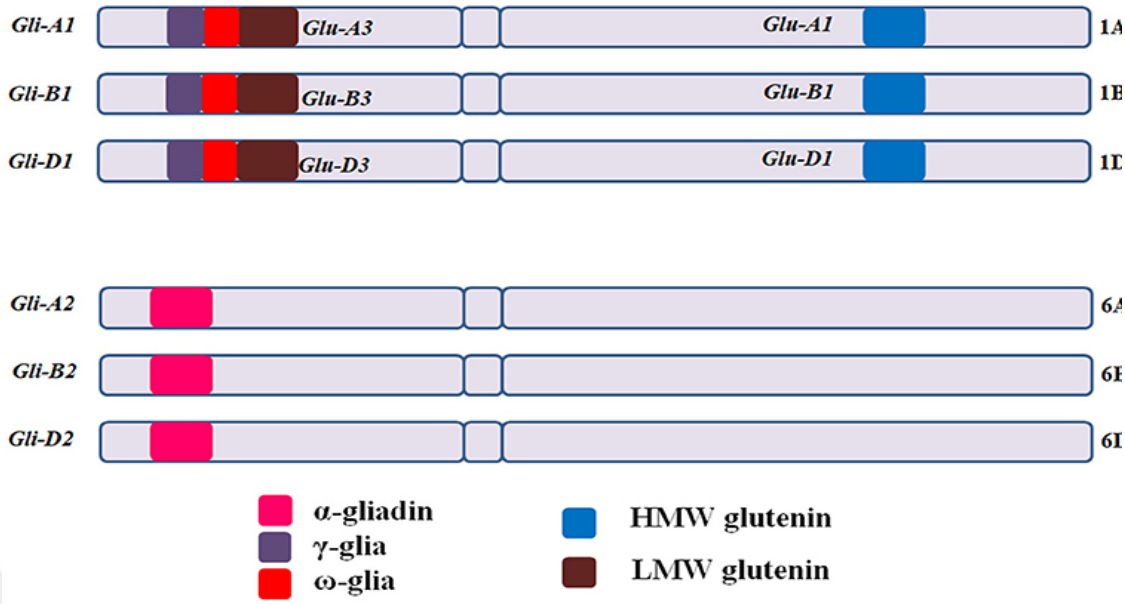


Şekil 2.2. Sağlıklı bağırsak kesiti ve çölyak hastalığı sonrası bağırsak dokusunun kesiti (Clinic 2025)

2.2. Çölyak Hastalığı Mekanizması ve Buğday Etkileşimi

Buğday, dünya genelinde 2.14×10^6 km²'lik bir alanda 7.34×10^8 tonluk üretimi ile tarımsal üretimin önemli bir bileşenidir. Günümüzde gelişmekte olan ülkelerde, buğdayın sağladığı makro ve mikro besin öğeleri, günlük toplam alımın %15-20'sine kadar çıkabilmektedir. Dünya çapındaki çoğu diyette tahıl tüketiminin ve özellikle tam tahıllı buğdayın yüksek tüketimi, Tip-2 diyabet, koroner kalp hastalığı ve obezite riskinin azalmasıyla ilişkilendirilmiştir (Aune vd. 2016). Tam tahıllardan sağlanan lif ve diğer biyoaktif bileşenler, bağırsak sağlığı ve metabolik denge için önemlidir. Tam tahıllar, rafine tahıllardan farklı olarak endosperm, tohum ve kepeği bir arada bulundurur. Rafine tahılların öğütme işlemi sırasında özü ve kepeği çıkarılırken, tam tahıllar lif, B vitaminleri ve demir, magnezyum, çinko gibi önemli mineraller açısından zengindir. Bu besin ögeleri, tahılın dış tabakasında yani kepekte bulunur ve tohum ile endospermi dış etkenlerden koruyan bir kalkan görevi görür. Tohum, bitkinin büyümesi için gerekli olan antioksidanlar, E vitamini ve bazı B vitaminlerini içerirken; endosperm, vücuda karbonhidrat, protein ve enerji sağlar (Slavin vd. 2001). Tüm bu veriler, buğdayın besleyici ve ekonomik olarak kıymetli bir gıda kaynağı olduğunu göstermektedir.

Hexaploid ekmeklik buğday (Triticum aestivum L.) genomunda yer alan gluten proteinleri, özellikle gliadinler ve gluteninler, çölyak hastalığını tetikleyen immünojenik epitopları içermektedir. Gliadin proteinlerini kodlayan gen bölgeleri, Grup 1 ve Grup 6 kromozomlarının kısa kollarında yer alan Gli-1 (Gli-A1, Gli-B1, Gli-D1) ve Gli-2 (Gli-A2, Gli-B2, Gli-D2) lokuslarında bulunmaktadır. Gluteninler ise yüksek moleküler ağırlıklı (HMW-GS) ve düşük moleküler ağırlıklı (LMW-GS) alt birimleri şeklinde sınıflandırılır ve sırasıyla Glu-1 (Glu-A1, Glu-B1, Glu-D1) ve Glu-3 (Glu-A3, Glu-B3, Glu-D3) lokuslarında (bir genin veya belirli bir DNA dizisinin bir kromozom üzerindeki fiziksel konumunu ifade eder) konumlanmaktadır (Sollid vd. 2012). Çölyak hastalığı bağlamında, özellikle α-gliadinlerin 33-mer peptit dizilimi (LQLQPFPQPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQPF) bağışıklık sistemini en güçlü şekilde aktive eden peptit olarak tanımlanmıştır (Camarca vd. 2009). Bu peptit, içerdiği yüksek prolin ve glutamin oranı nedeniyle doku transglutaminaz (TG2) enzimi tarafından deamidasyona uğrayarak bağışıklık tepkisini artırmakta ve T hücrelerini uyarmaktadır (Shan vd. 2002a). 33-mer bölgesi, çölyak hastalığını tetikleyen üç önemli T hücre epitopunu (PFPQPQLPY, PYPQPQLPY ve PQPQLPYPQ) içermekte olup, bu epitoplar HLA-DQ2.5 molekülü aracılığıyla immünojenik yanıtı güçlendirmektedir (Van Herpen vd. 2006).



Şekil 2.3. *Triticum aestivum*'daki (AABBDD) gliadin ve glutenin lokusleri (Sharma vd. 2020)

Çölyak hastalığını tetikleyen tahıllarda bulunan toksik proteinler arasında gliadinler, yüksek moleküler ağırlıklı (HMW) glutenin alt birimleri ve düşük moleküler ağırlıklı (LMW) glutenin alt birimleri yer almaktadır. Bu proteinlerin en belirgin özelliği, glutamin ve prolin amino asitleri açısından zengin bir yapıya sahip olmalarıdır (Wieser vd. 2008). Özellikle yüksek prolin içeriği, gluten proteinlerinin gastrointestinal sistemde tam olarak sindirilememesine neden olur. Bunun sonucunda bağışıklık sistemini tetikleyebilen immünojenik peptitler ortaya çıkar. Bu peptitler, toksik peptitler veya T-hücre uyarıcı epitoplar olarak adlandırılır. Çölyak hastalığı ile ilişkili olarak, saf peptitlerin izole edilmesi ve toksisite düzeylerinin belirlenmesi amacıyla çeşitli bilimsel araştırmalar gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmaların sonuçları, toksik dizilimlerin büyük bir kısmının α-/β- gliadinlerin tekrar eden N-terminal bölgesinde yoğunlaştığını ortaya koymuştur (Wieser vd. 2008). Bu bölge, glutamin, prolin ve aromatik amino asitler olan fenilalanin ve tirozin açısından zengindir. Gliadinlerin yüksek prolin içeriği nedeniyle, bu proteinler sindirim enzimleri tarafından tam olarak parçalanamaz ve bağırsak lümeninde immünojenik özellik gösteren toksik peptitler oluşur. Bu peptitler, bağışıklık sisteminin anormal bir tepki vermesine neden olarak çölyak hastalığının temel patogenezine katkıda bulunur. Ayrıca, yapılan araştırmalar farklı toksik proteinlerde T-hücre uyarıcı epitopların bulunduğunu göstermektedir (Jabri vd. 2009). Bu epitoplar, bağışıklık sistemindeki HLA-DQ2 ve HLA-DQ8 molekülleri tarafından tanınarak, hastalığın ortaya çıkmasında ve ilerlemesinde önemli bir rol oynar. Bu bulgular, çölyak hastalığının yalnızca gliadin kaynaklı olmadığını, diğer gluten bileşenlerinin de hastalığın oluşumuna katkıda bulunabileceğini göstermektedir.

20. yüzyılın ikinci yarısında çölyak hastalığının görülme sıklığının arttığına dair çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmalar, seçilmiş serum örneklerinde doku transglutaminaz antikorlarının (çölyak hastalığı için bir belirteç) varlığına dayanarak görülme sıklığının değiştiğini göstermektedir. Buna ek olarak, diğer glütenle ilişkili rahatsızlıklar, özellikle buğday alerjisi ve çölyak dışı glüten duyarlılığına olan ilgi artmaktadır. Bazı bilim insanları, yıllar içinde uygulanan tarımsal ıslah ve genetik seçilim

yöntemlerinin buğday proteinlerinin bileşimini önemli ölçüde değiştirmiş olabileceğini öne sürmektedir. Özellikle modern buğday çeşitlerinin, çölyak hastalığı ile ilişkili bağışıklık tepkisini tetikleme potansiyeline sahip toksik proteinler açısından geçmişte yetiştirilen geleneksel buğday türlerine kıyasla daha yüksek seviyelere ulaşmış olabileceği iddia edilmektedir (Van den Broeck vd. 2015). Bu hipotez, çölyak hastalığının görülme sıklığındaki artış ile modern buğday türlerinin tüketimi arasındaki olası bağlantıyı sorgulayan çeşitli çalışmaların ortaya çıkmasına neden olmuştur. Buğdayın ıslah edilmesi sürecinde, daha yüksek verim, hastalıklara karşı direnç ve işlenebilirlik özellikleri öncelikli olarak hedeflenmiş, ancak bu değişimlerin buğday proteini kimyası üzerindeki etkileri yeterince incelenmemiştir. Özellikle gliadin ve glutenin gibi gluten proteinlerinin içeriği ve yapısındaki farklılıkların, bağışıklık sisteminde daha güçlü bir tepkiyi tetikleyebileceği düşünülmektedir. Öte yandan, popüler medya ve bazı sağlık odaklı söylemler modern buğdayın toksik ve sağlıksız olduğu fikrini giderek daha fazla ön plana çıkarmaktadır. Bu tür iddiaların bilimsel veriler ışığında değerlendirilmesi, toplum sağlığını etkileyen yanlış yönlendirmelerin önüne geçilmesi açısından kritik öneme sahiptir. Bu bağlamda, buğday türlerinde zamanla meydana gelen değişimlerin yalnızca tarımsal verimlilik ve gıda işleme açısından değil, aynı zamanda insan sağlığı üzerindeki etkileri yönünden de ele alınması gerekmektedir. Modern buğday çeşitlerinde yer alan protein bileşiminin ayrıntılı analizlerinin yapılması, buğday proteini kimyasındaki değişimlerin çölyak hastalığı ve diğer glutenle ilişkili bozukluklarla olan potansiyel bağlantılarının net bir şekilde ortaya konulmasına katkı sağlayacaktır. Bu doğrultuda, geçmişte kullanılan geleneksel buğday türleri ile günümüzde yaygın olarak tüketilen modern buğday türlerinin kapsamlı karşılaştırmalı çalışmalara tabi tutulması gerekmektedir. Çölyak hastalığındaki artışın, buğday ıslahı sonucu buğday proteinlerinde meydana gelen değişikliklerden özellikle protein içeriği ile doğru orantılı olan glüten içeriğindeki artıştan kaynaklanmış olabileceği öne sürülmüştür (Sapone vd. 2012).

Buğday tüketimi ile çölyak hastalığı yaygınlığı arasındaki korelasyonu değerlendirmek için çok seviyeli bir analiz gerçekleştirilmiştir. Kıta bazında yapılan analizlerde, buğday tüketimi ile biyopsiyle kanıtlanmış çölyak hastalığı yaygınlığı arasında yüksek bir pozitif korelasyon ($r=0.88$, $p<0.05$) bulunmuş, ancak ülke bazında yapılan karşılaştırmalarda anlamlı bir korelasyon bulunamamıştır ($r=-0.036$, $p>0.50$). Kısa vadeli buğday tüketimindeki artış/azalış ile çölyak hastalığı yaygınlığı arasında doğrudan bir korelasyon ($r=0.10$) ve uzun vadeli buğday tüketimindeki artış/azalış ile çölyak hastalığı arasında negatif bir korelasyon ($r=-0.39$) saptanmış, ancak bu farklar her iki durumda da anlamlı bulunmamıştır ($p>0.5$). Değişen buğday tüketimi ile çölyak hastalığı yaygınlığı arasındaki ilişki yalnızca kısa vadeli olarak ülke bazında değerlendirilmiş, ancak bu korelasyon da anlamlı bulunmamıştır ($r=0.10$, $p>0.5$) (Bradauskiene vd. 2023). Glüten bulunabilirliği ile çölyak hastalığı prevalansı arasındaki ilişkiyi küresel ölçekte sistematik olarak inceleyen, , (El-Metwally vd. 2020)'nin yapmış olduğu çalışma coğrafi epidemiyolojik bir sistematik derleme olup glüten içeren tahıl bulunabilirliğinin genel popülasyondaki çölyak hastalığı prevalansı ile nasıl ilişkili olduğunu araştırırken, aynı zamanda genetik yatkınlık (HLA-DQ2/DQ8) ve kişi başına düşen gayrisafi yurt içi hasıla (GDP) gibi sosyoekonomik faktörleri analiz etmektedir. 120 akademik çalışma, 41 ülke ve 427146 kişi üzerinde yapılan analiz sonucunda küresel çölyak hastalığı prevalansı %0 ile %3.1 arasında değişmekte olup, prevalans %0.35–%1.22 olarak belirlenmiştir; çalışmaların çoğunluğu Avrupa'dan gelmiş ve bölgesel değişkenlikler görülmüştür. Yüksek GSH (kişi başına düşen gayrisafi yurt içi hasılası)'ye

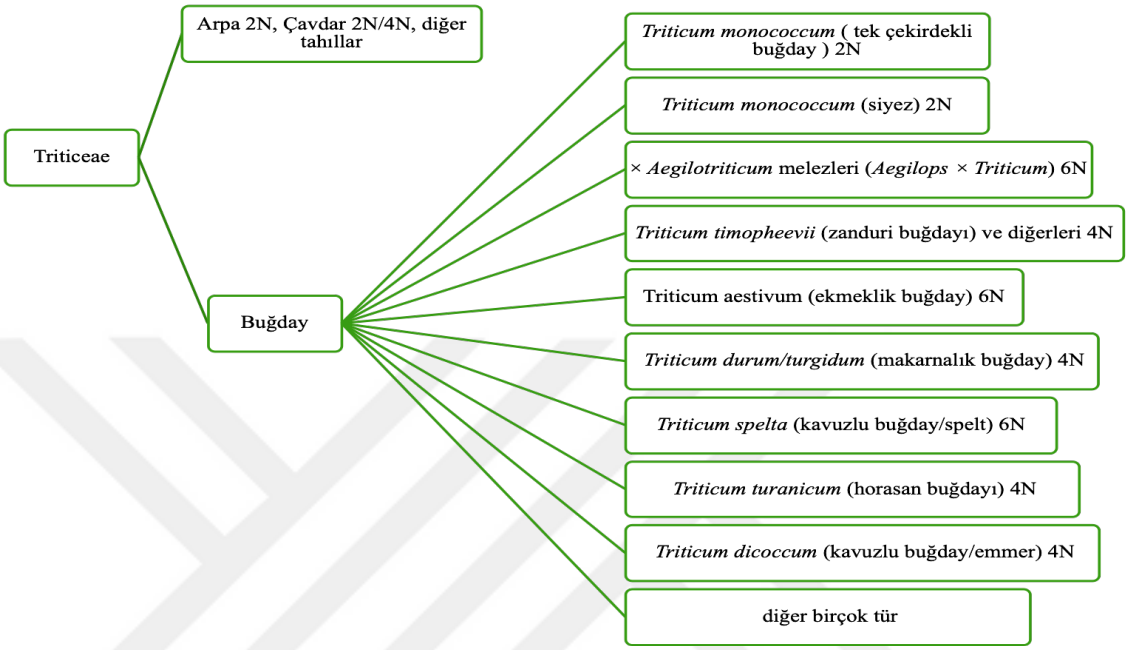
sahip ülkelerde çölyak hastalığı prevalansı daha yüksek bulunmuş; GSH'deki her 1000 dolarlık artış, çölyak hastalığı prevalansını %0.9 oranında artırmakta olup bu artış, sağlık hizmetlerine daha iyi erişim, teşhis araçları ve farkındalık ile ilişkilendirilmektedir. Buğday bulunabilirliği ve çölyak hastalığı prevalansının her ikisinin de yüksek olduğu İsveç ve Türkiye gibi ülkelerde, çevresel faktörlerin riski artırdığı düşünülmektedir; buna karşılık, arpa/çavdar bulunabilirliğinin yüksek olduğu Letonya ve Estonya gibi bölgelerde daha düşük çölyak hastalığı oranları görülmüş ve bu durum, buğday tüketiminin azalmasına bağlanmıştır. Çalışma, günlük fazladan 15 gram buğday ekmeği tüketiminin yıllık olarak çölyak hastalığı prevalansını küçük bir oranda (örneğin, %1.2'den %1.236'ya) artırabileceğini ancak çölyak hastalığı prevalansını önemli ölçüde etkilemek için glüten bulunabilirliğinde (örneğin, 667 g/gün) büyük bir artış gerektiğini tahmin etmiş ve bu durum, glüten arzının çölyak hastalığı gelişiminde yalnızca küçük bir role sahip olduğunu göstermektedir. Sonuç olarak, bu kapsamlı coğrafi epidemiyolojik derleme, glüten bulunabilirliğinin küresel çölyak hastalığı prevalansı üzerinde minimal ve tutarsız bir etkiye sahip olduğunu ortaya koymakta; zenginlik, genetik yatkınlık ve çevresel maruziyetin daha önemli katkı sağladığını vurgulamaktadır; gelecekteki araştırmalar, glüten kalitesi, mikrobiyom değişiklikleri ve fermantasyon uygulamaları gibi faktörleri ele alarak çölyak hastalığı riskini daha iyi anlamaya yönelik çalışmalar yapmalıdır.

2.3. Buğday Genetiği ve Islahı

Buğday, Poaceae familyasına ait olup, bu aile içinde en ekonomik açıdan önemli tahılların yer aldığı Triticeae'ya aittir (Şekil 2.4.). Triticeae, Triticinae ve Hordeinae alt gruplarından ayrılan 14 cins içerir. Orta Doğu'daki Bereketli Hilal'de yetiştirildiği düşünülen en eski buğday türleri, kavuzlu buğdaylardır ve Triticum türlerinde bilinen üç poliploidi düzeyinin hepsini (diploid, tetraploid ve hekzaploid) içermektedir (Arzani vd. 2017). Bu türler siyez (Triticum monococcum L.), gernik (Triticum dicoccum) ve tespih buğdayı (Triticum spelta). Ancak, bu üç türün evcilleştirilmesi, o zamandan beri modern ıslah uygulamalarıyla güçlendirilen ve istenmeyen çevresel streslere, zararlılara ve hastalıklara karşı artan duyarlılık veya hassasiyet sonucuyla önemli bir genetik erozyona neden olmuştur (de Sousa vd. 2021).

Farklı türler arasında yapılan melezlemeler ve amfiploid üretimleri, bu cinsler arasında genetik ya da sitoplazmik uyumluluk olduğunu göstermektedir. Burada en önemli buğday türleri Şekil 2.4'te kromozom sayılarının gösterildiği, hekzaploid T. aestivum L. (AuAuBBDD; 2n = 6x = 42), tetraploid Triticum turgidum L. (AuAuBB; 2n = 4x = 28) ve diploid einkorn T. monococcum L. (AmAm; 2n = 2x = 14) türleridir. Günümüzde ekonomik olarak en önemli türler arasında tetraploid makarnalık buğday (T.turgidum subsp. Durum (AuAuBB; 2n = 4x = 28)) ve hekzaploid ekmeklik buğday bulunmaktadır (de Sousa vd. 2021; Peng vd. 2011). Buğday türleri arasında evrimsel açıdan gelişmeler, özellikle poliploidiye dayalı türleşme ve genom katkıları ile açıklanmaktadır. Diploid *T. monococcum* L. (AmAm), tetraploid *T. turgidum* (AuAuBB) türlerinin A genomu donörü olarak uzun süre kabul edilmiştir; ancak moleküler veriler A genomunun *T. urartu*'ya daha yakın olduğunu ortaya koymuştur (Ling vd. 2013). D genomunun kaynağı ise Orta Asya'ya özgü *Aegilops tauschii* türüdür (Shewry 2009). Bu türün genetik katkısı, özellikle daha sert iklimlere uyum sağlamış hekzaploid *T. aestivum* L.'nin yaygınlaşmasında kilit rol oynamıştır. Ayrıca, genom birleşimleri sonucunda ortaya çıkan allopoliploid yapılar, genetik çeşitliliği artırmış ve buğdayın tarımsal

seleksiyona yanıtını hızlandırmıştır. Özellikle 5A kromozomundaki *Q* lokusu ve *Br* (brittle rachis) gibi başlıca lokuslarda meydana gelen mutasyonlar, serbest harman edilebilir başaklı modern çeşitlerin oluşumunu sağlamış; böylece kavuzlu formlar yerini kolay işlenebilir türlere bırakmıştır.



Şekil 2.4. Triticeae'ya ait türleri içeren ve kromozom sayılarını gösteren şema (Golovnina vd. 2007)

Buğdayın ilk dönemlerdeki evcilleşme sürecinde etkili olan iki ana mekanizma açıklanmıştır. İlk olarak, allopoliploidizasyon süreci, farklı türlere ait genomların birleşerek yeni bir tür oluşturması ve bununla beraber buğdayın evrimini hızlanmıştır (Sabot vd. 2005). Bu süreçte gen kaybı (özellikle işlevsiz veya gereksiz hale gelen genlerin ortadan kalkması), gen susturulması (bazı genlerin işlevsel olarak sessizleştirilmesi), gen aktivasyonu (önceden aktif olmayan bazı genlerin etkin hale gelmesi) ve gen duplikasyonları (bazı genlerin kopyalanarak çeşitlilik sağlaması) gibi moleküler değişiklikler meydana gelmiştir (Levy vd. 2002). Bu değişimler, buğdayın çevresel streslere, insan seleksiyonuna ve tarımsal işlenebilirliğe daha uygun hale gelmesine katkı sağlamıştır.

İkinci olarak, evcilleşme sürecinde kritik öneme sahip iki özel mutasyon süreci öne çıkmaktadır. Bunlardan ilki, 5A kromozomundaki Q lokusunda meydana gelen doğal bir mutasyondur. Bu mutasyon, Tg (tenacious glume – yapışkan kavuz) lokusundaki çekinik mutasyonların etkisini değiştirerek başakların kavuzlarından daha kolay ayrılmasını sağlamıştır (Peng vd. 2011). Böylece yabani Gernik (Triticum dicoccon) ve erken dönem siyez (T.monoccum) buğdayları daha kolay harmanlanabilir hale gelmiş, bu özellik zamanla kolay harmanlanabilir sert buğday sert buğday (T. durum) ve ekmeklik buğday (T. aestivum) türlerine evrilmiştir. Bu dönüşüm, ilkel buğday formlarından modern türlere geçişte bir genetik köprü işlevi görmüştür (Arzani vd. 2017). Ayrıca, bu

iki modern buğday türünün kavuzlarının kırılgan olması, tanelerin kolayca ayrılıp un haline getirilebilmesi açısından teknolojik bir avantaj yaratmıştır. İkinci özel mutasyon süreci ise başakların olgunlukta doğal olarak parçalanma (disartikulasyon) özelliğinin ortadan kalkması olmuştur (Feuillet vd. 2008). Bu özellik, doğada tohumların yayılmasını sağlarken, tarımda istenmeyen bir özelliktir. Bu özelliğin ortadan kalkması, Br (brittle rachis – kırılgan başakçık ekseni) olarak adlandırılan gen lokuslarında gerçekleşen mutasyonlarla ilişkilidir. Gernik buğdayında bu genin 3A ve 3B kromozomlarında bulunduğu bilinmektedir (Feuillet vd. 2008). Evcilleştirme sürecinde, kırılmayan başak ekseni özelliğinin seçilmesiyle birlikte, başak parçalanması engellenmiş ve böylece ürün kaybı azaltılmıştır. Bu seçilim sayesinde modern buğday çeşitleri, doğrudan dökülen tohumlara sahip olan einkorn, Gernik ve siyez gibi ilkel türlerin yerini almıştır. Bu evrimsel-genetik süreçler, buğdayın tarımsal verimliliği ve işlenebilirliği açısından büyük bir sıçrama yaratmış, modern buğday formlarının temelini oluşturmuştur (de Sousa vd. 2021; Levy vd. 2002; Sabot vd. 2005).

Türkiye, buğdayın genetik çeşitliliği açısından zengin bir ülkedir. Türkiye'de yüzlerce yerel çeşit, 28 yabani buğday, 198 ekmeklik, 61 makarnalık tescilli çeşit bulunmaktadır (Özberk vd. 2016a). Modern buğday çeşitleri (makarnalık buğday ve ekmeklik buğday) daha yüksek verim potansiyeline sahip olmalarına rağmen, özellikle hastalıklar, zararlılar, kuraklık, sıcak, soğuk, tuzluluk, kirlilik ve toprak besin maddelerinin kıtlığı gibi streslere karşı daha az tolerans göstermeleri açısından eski çeşitlere kıyasla dezavantajlara sahiptirler (Arzani vd. 2017). Buğdayın evrimi, genetik çeşitlilikteki azalma ve bu süreçteki modern ıslah tekniklerinin etkileri, buğdayın çevresel faktörlere duyarlılığını artırmış ve bu da tarımda yeni zorluklar ortaya çıkarmıştır. Bu nedenle buğdayın genetiğini, evrimleşme sürecini ve ıslahını araştırmada hem genetik yapısı tarihi kritik bir rol oynamaktadır.

Buğdayın taksonomik sınıflandırmasında ise, fiziksel özelliklerinden dane, kavuz rengi ve kılçık gibi başak yapısı temel bir kriter olarak değerlendirilmiştir. Başak sıklığı ise sınıflandırmada önemli bir parametre olarak öne çıkmıştır. Bilim insanları, buğday türlerinin sınıflandırılması amacıyla farklı yöntemler geliştirmiş ve biyotipler ile ekotipler üzerinde kapsamlı çalışmalar yapmıştır. Ekotipler, belirli bir coğrafyada doğal olarak yetişen türleri tanımlarken, biyotipler belirli bir alanda yetişen grupları ifade eder. Ancak bu morfolojik temelli sınıflandırma yöntemleri zamanla yetersiz görülmüştür.

Klasik dönem botanikçileri, Columella gibi ve 16. ile 17. yüzyıl bitkisel kitapları, buğdayları iki gruba ayırmıştır: Serbest dövülebilen buğdaylar (Triticum) ve kabuklu (kavuzlu) buğdaylar (Zea). Carl Linnaeus, evcilleştirilmiş beş buğday türünü tanımlamıştır: Sakallı bahar buğdayı (T. aestivum), sakalsız kışlık buğday (T. hybernum), perçin buğdayı (T. turgidum), kavuzlu buğday (T. spelta) ve einkorn buğdayıdır (T. monococcum) (Morrison 2001). Daha sonraki sınıflandırmalarda tanımlanan tür sayısı artırılmış, ancak kışlık ve ilkbaharlık formlar gibi küçük varyasyonlar tür olarak kabul edilmeye devam etmiştir. Yakın Doğu'da yetişen yabani buğdaylar ise, bölgedeki botanik araştırmaların yetersizliği nedeniyle 19. yüzyıl ortalarına kadar tanımlanamamıştır. Modern buğday sınıflandırmasının gelişimi ise 1920'lerde, buğdayın üç farklı ploidi seviyesine ayrıldığının keşfedilmesiyle gerçekleşmiştir (Percival 1921).

Sitolojik yaklaşımlar, buğday türlerini kromozom sayılarına göre gruplandırmıştır. Buğdaylar bu bağlamda diploid ve alloploid olarak iki ana gruba

ayrılmıştır (Dvorak vd. 2005). Diploid buğdaylar, 2n=14 kromozom sayısına sahiptir ve kromozom setlerinden biri, ana türlerden biri olan Triticum boeoticum'dan gelir. Bu grupta yer alan en önemli tür, siyez buğdayı olarak bilinen Triticum monococcum'dur. Alloploid buğdaylar ise 2n>14 kromozom sayısına sahiptir ve kromozom setleri iki ya da daha fazla ana türden kaynaklanır. Bu grupta en dikkat çeken türler, Triticum aestivum (ekmeklik buğday) ve Triticum durum (makarnalık buğday) olarak sıralanabilir. Kromozom sayıları ve genom formülleri, buğday sınıflandırmasında önemli bir yer tutmaktadır. Genom formülleri, ana türlerin kromozom setlerini büyük harflerle ifade eder. Örneğin, Triticum aestivum AABBDD olarak ifade edilirken, Triticum boeoticum yalnızca A kromozom setine, Triticum turgidum ise AABB kromozom setine sahiptir. Bu bilgiler ışığında, buğdaylar genetik yapılarına göre daha detaylı ve güvenilir bir şekilde sınıflandırılabilmiştir. Bütün bu çalışmalar sonucunda, buğdayın fiziksel, biyokimyasal ve genetik özellikleri değerlendirilerek üç temel grup belirlenmiştir (Bálint vd. 2000). Kaplıca buğdayları; genellikle dağlık bölgelerde yetişir ve kışa dayanıklıdır. Makarnalık buğdaylar; makarna ve bulgur yapımı için uygun özellikler taşırken, ekmeklik buğdaylar daha çok ekmek üretiminde kullanılır. Her grup, yabani formları ile kavuzlu ve çıplak kültür formlarını içermektedir. (Wrigley 2009).

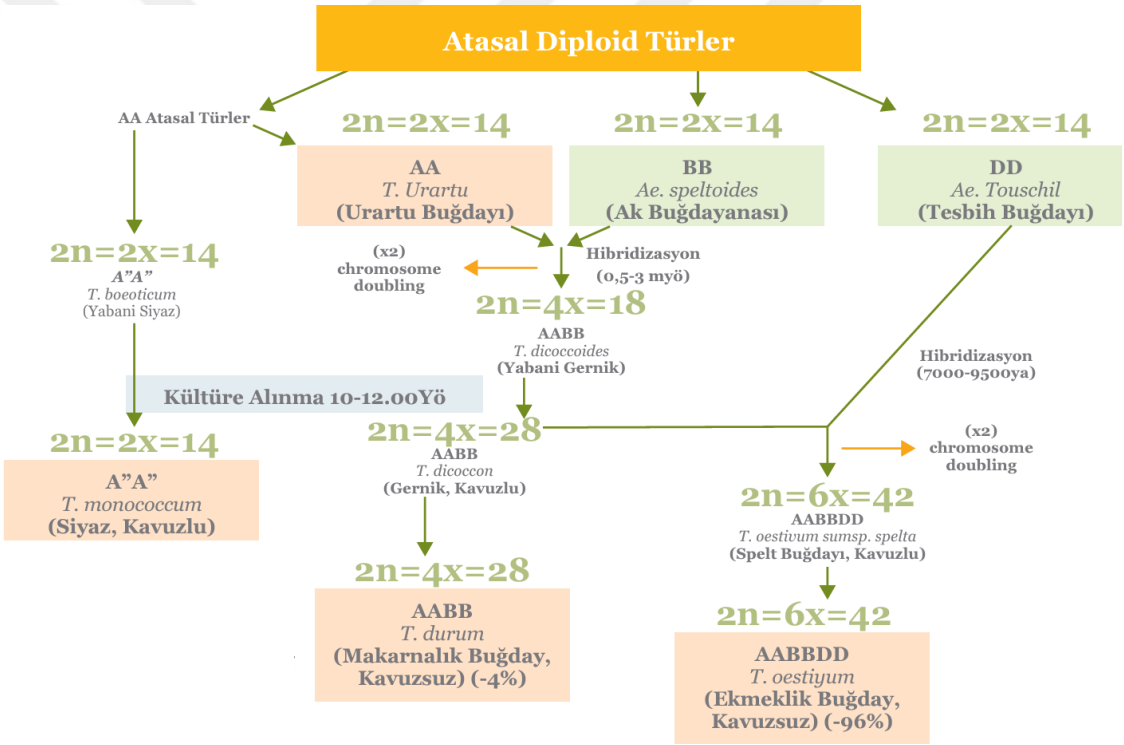
Ekmeklik buğdaylar; kırmızı sert kışlık, kırmızı yumuşak kışlık, kırmızı sert yazlık ve beyaz buğday olmak üzere 4 temek ticari sınıfa ayrılmışlardır. Kışlık buğdaylar, generatif gelişmelerini tamamlayabilmeleri için vernalizasyon (soğuklanma ihtiyacı) ihtiyacı duyarlar. Bu amaçla gelişmelerinin başlangıç döneminde belirli bir süre düşük sıcaklığa maruz bırakılmaları gerekir. Kışlık buğdaylar, önemli ölçüde soğuğa dayanıklıdırlar. Kırmızı veya Beyaz Buğdaylar, tohum kabuğundaki kırmızı renk oluşumunu sağlayan genlerin etkileri sonucu oluşur. Dolayısıyla tohumun aldığı renk itibariyle buğdaylar sınıflara ayrılabilir.

Günümüzde genom dizileme teknolojilerindeki ilerlemeler, buğdayın karmaşık poliploid yapısının çözülmesini ve genetik haritalar ile referans genomların oluşturulmasını mümkün kılmış, böylece buğday ıslahında moleküler yaklaşımların etkinliği büyük ölçüde artmıştır (Alaux vd. 2018). Özellikle QTL haritalama, SNP tabanlı marker destekli seleksiyon ve genomik seleksiyon gibi teknikler, hem abiyotik stres toleransı (kuraklık, tuzluluk, sıcaklık) hem de biyotik streslere (pas hastalıkları, septorya vb.) dirençli genotiplerin geliştirilmesini hızlandırmıştır (Juliana vd. 2022; Zhang vd. 2022). Ayrıca, CRISPR/Cas9 gibi gen düzenleme teknolojileri ile hedef gen bölgelerine yönelik hassas değişiklikler yapılabilmekte, bu da örneğin çölyak hastalığına neden olan gliadin epitoplarının baskılanması gibi sağlıkla ilişkili özelliklerin ıslah programlarına dahil edilmesini sağlamaktadır (Sánchez-León vd. 2018). Bu gelişmeler, antik ve yerel buğday çeşitlerinin taşıdığı genetik çeşitliliğin modern kültür çeşitlerine entegre edilmesiyle birlikte hem verim hem de besin kalitesi bakımından daha dengeli ve dayanıklı buğday hatlarının geliştirilmesine olanak tanımaktadır (Zhao vd. 2019).

2.3.1. Buğdayın tarihsel gelişimi

Ekmeklik buğday (Triticum aestivum), üç ilişkili diploid genomun birleşimiyle oluşan bir alloheksaploid türdür (2n = 6× = 42, AABBDD). Şekil 2.5, buğdayın evrimsel kökenini genetik ve sitogenetik ilişkiler çerçevesinde özetlemektedir. Şemada, üç ana diploid ata tür (T. urartu, Ae. speltoides ve Ae. tauschii) farklı renklerde vurgulanarak buğday genomlarının (A, B ve D) filogenetik kaynakları açık biçimde gösterilmiştir. T.

urartu (AA, 2n=2x=14) A genomunun; Ae. speltoides (BB) B genomunun; Ae. tauschii (DD, 2n=2x=14) ise D genomunun kaynağını oluşturur. Şekilde, yeşil oklarla gösterilen hibridizasyon ve kromozom sayısı iki katına çıkma (chromosome doubling) olayları, allotetraploid (AABB) ve ardından allohekzaploid (AABBDD) türlerin nasıl meydana geldiğini net şekilde ifade eder. Önce AA ve BB atalarından 2n=4x=28 kromozomlu T. turgidum (Gernik buğdayı) ortaya çıkmış; daha sonra bu tür ile Ae. tauschii arasında gerçekleşen ikinci bir melezleşme ve kromozom duplikasyonu sonucu, 2n=6x=42 kromozom sayısına sahip T. aestivum (ekmeklik buğday) oluşmuştur. Ayrıca şekil, siyez (T. monococcum, 2n=2x=14) ve tespih buğdayı (T. spelta, 2n=6x=42) gibi kavuzlu formların da bu evrimsel sürece nasıl entegre olduğunu göstermesi açısından önemlidir. Bu sistematik yaklaşım, poliploidizasyonun buğday türleşmesindeki merkezi rolünü vurgulamakta ve modern buğdayın doğrudan bir yabani formdan değil, tarımda kullanılan kültür türlerinin yeniden melezleşmesiyle ortaya çıktığını görsel olarak da desteklemektedir. Şekil 2.5.'te şematik olarak gösterildiği gibi, A genomunun kaynağı T. urartu, B genomunun kaynağı ise Aegilops speltoides ile yakın akraba olan bir türdür ve bu iki tür yaklaşık 7 milyon yıl önce ortak atalarından ayrılmıştır (El Baidouri vd. 2017).



Şekil 2.5. Buğdayın kökeni (Chantret vd. 2005)

Yaklaşık 5.5 milyon yıl önce bu türler melezleşerek ve homoploid türleşme yoluyla D genomunun kaynağı olan Ae. tauschii'yi oluşturmuştur (Petersen vd. 2006) (Marcussen vd. 2014). Bir milyon yıldan kısa bir süre önce, AABB genomlarına sahip allotetraploid bir tür olan Gernik buğdayı (T. turgidum) ortaya çıkmış, ardından yaklaşık 8000 ila 10000 yıl önce, Bereketli Hilal bölgesinde, T. turgidum ile Ae. Tauschii'nin melezleşmesi sonucu hekzaploid Triticum aestivum oluşmuştur. Evcilleştirilerek yüzyıllar süren yetiştirme ve seçilim sürecinden geçen bu tür, günümüzde yetiştirilen ekmeklik buğdayın atası olmuştur. Diğer kültür bitkilerinden farklı olarak, hekzaploid

buğday yabani bir türden seçilmemiş, zaten insan eliyle yetiştirilen bir tür olan Gernik buğdayının melezleşmesi sonucu ortaya çıkmıştır; bu nedenle doğada yabani T. aestivum'un hiç var olmamış olabileceği öne sürülebilir. Buğdayın yaygın şekilde benimsenmesinin temel nedenlerinden biri, allopoliploid yapısının sağladığı "genomik esneklik" sayesinde yüksek çevresel uyumluluğa sahip olmasıdır (Shewry 2009).

Buğday, evcilleştirildikten sonra hızla Batı Asya, Avrupa ve Kuzey Afrika'ya yayılmıştır. MÖ 6500'de Yunanistan'a, MÖ 5000'de Almanya'ya ulaşmıştır. Günümüzde Avrupa Birliği, en çok buğday üreten bölgelerden biridir. Çin'de ise buğday kalıntıları MÖ 2600-1600 yıllarına ait bulunmuştur. Amerika kıtasına buğday, İspanyollar tarafından 1529 yılında Meksika'ya getirilmiş, ABD'de ise 1602 yılında ilk olarak Elizabeth Adası'nda ekilmiştir (Kislev 1984).

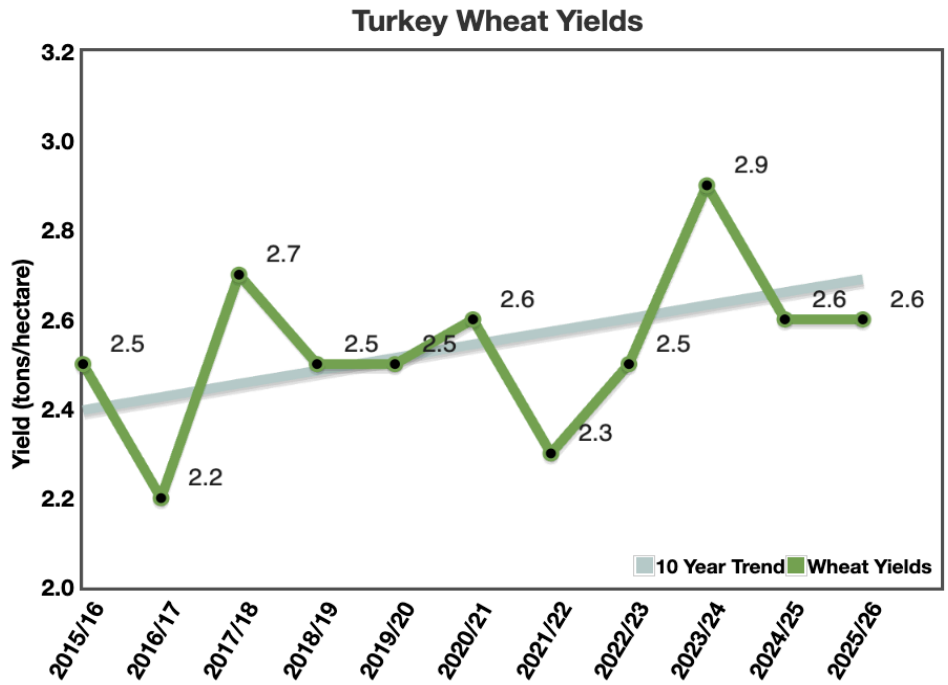
2.3.2. Buğday yetiştiriciliği

Buğday yetiştiriciliği, iklim, toprak tipi, su kaynakları ve seçilen çeşitlerin adaptasyon kapasitesi gibi pek çok agronomik faktöre bağlı olarak şekillenmekte olup, buğday genetik çeşitliliği sayesinde hem kurak hem de nemli ekolojik koşullarda üretilebilmektedir. Modern buğday tarımı, geleneksel yöntemlerin yanı sıra gelişmiş mekanizasyon, bitki besleme stratejileri ve hastalık-yabancı ot kontrol teknikleriyle desteklenerek yüksek verimlilik hedeflenmekte; ayrıca son yıllarda iklim değişikliği, su kıtlığı ve gıda güvenliği gibi küresel sorunlara karşı dirençli çeşitlerin geliştirilmesi amacıyla moleküler ıslah, genom düzenleme ve hassas tarım teknolojileri gibi ileri biyoteknolojik yaklaşımlar benimsenmektedir. Bu bağlamda, buğday yetiştiriciliği yalnızca tarımsal üretim açısından değil, aynı zamanda ekonomik kalkınma, besin güvenliği ve sürdürülebilir arazi kullanımı açısından da stratejik öneme sahip çok yönlü bir üretim faaliyetidir.

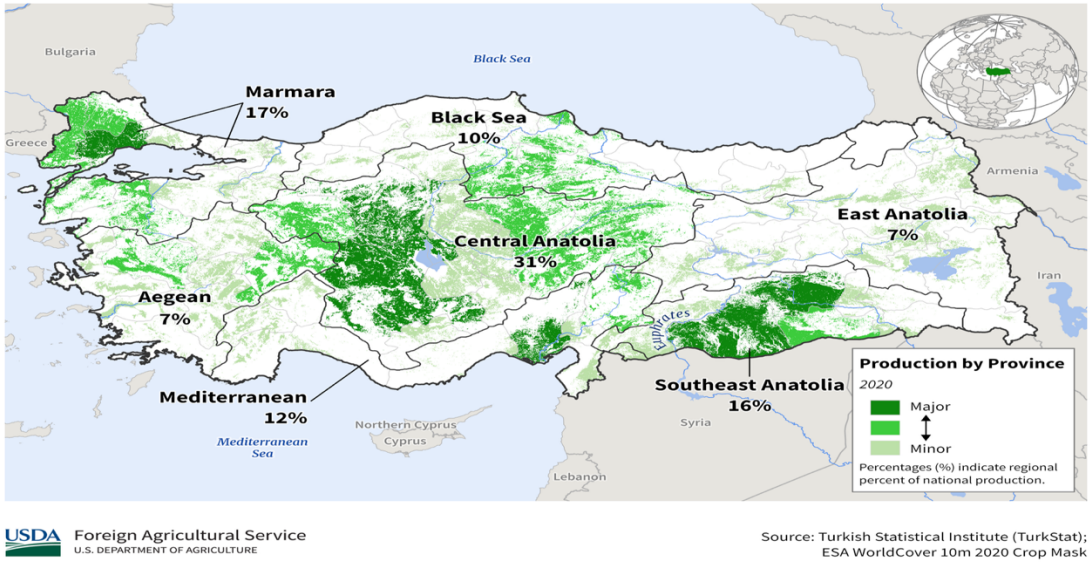
Buğday yetiştiriciliği, genetik varyasyonu yönlendirme ve seçici çoğaltım yoluyla üstün agronomik özelliklere sahip çeşitlerin geliştirilmesini amaçlayan sistematik bir süreçtir ve tarihsel olarak kitlesel seleksiyonla başlayıp günümüzde moleküler düzeyde hassas tekniklerle yürütülmektedir. Geleneksel ıslah yöntemleri, fenotipik gözleme dayalı seleksiyon ve melezleme tekniklerini içerirken, 20. yüzyıl ortalarında Yeşil Devrim kapsamında Norin 10 gibi kısa boylu genleri taşıyan buğday hatlarının kullanımıyla verim artışı sağlanmış, hastalık direnci ve dayanıklılık da öncelikli hedefler olmuştur. Modern dönemde ıslah programları, marker-assisted selection (MAS) (Orabi vd. 2018), genom-wide association studies (GWAS) (Sukumaran vd. 2015), doubled haploid teknolojisi (Tadesse vd. 2012), mutasyon ıslahı (Uauy vd. 2009) ve transgenik/genom düzenleme (Kim vd. 2018) yaklaşımları gibi moleküler biyolojiye dayalı yöntemlerle desteklenmekte; bu sayede kuraklık toleransı, ısıya dayanıklılık, hastalık ve zararlı dirençleri, kalite parametreleri (gluten içeriği, protein profili) ve çölyak gibi immünolojik hassasiyetlerle ilişkili özellikler hedeflenmektedir. Örneğin, Glu-D1 lokusundaki yüksek moleküler ağırlıklı glutenin alelleri ile ekmeklik kalite ilişkisi net bir şekilde gösterilmiş; ayrıca α-gliadin epitoplarını kodlayan D-genom kaynaklı bölgelerin çölyak hastalığı riskiyle ilişkisi nedeniyle modern buğday çeşitlerinin dikkatle izlenmesi gerektiği vurgulanmıştır. Uluslararası kurumlar (CIMMYT, ICARDA) ve ulusal araştırma enstitüleri, iklim değişikliğine dirençli ve yüksek kaliteli buğday hatlarının geliştirilmesi amacıyla entegre ıslah stratejileri yürütmektedir (Reynolds vd. 2017).

2.3.3. Dünyada ve Türkiye'de buğday üretimi

Türkiye'de buğday tarımı, 2024 yılında yaklaşık 7 milyon hektarlık ekim alanında gerçekleştirilmiş ve toplam üretim miktarı 20.8 milyon ton olarak kaydedilmiştir. Bu üretim, bir önceki yıla göre %5.5'lik bir azalmayı ifade etmekte olup, özellikle İç Anadolu ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinde yaşanan kuraklık, verim düşüşünün başlıca nedeni olmuştur (TÜİK). Şekil 2.6'daki USDA verilerine göre Türkiye'de buğday üretimi yıllara bağlı olarak dalgalı bir seyir izlemekte olup, 2024/2025 sezonunda 21 milyon tonluk üretimle son 10 yılın en yüksek seviyelerinden birine ulaşılmıştır. Bu üretim, yaklaşık 7.25 milyon hektarlık bir alanda gerçekleştirilmiş ve hektar başına ortalama verim 2.92 ton olarak kaydedilmiştir. Şekil 2.7'deki bölgesel dağılıma bakıldığında, en yüksek üretim oranları Orta Anadolu (%38), Güneydoğu Anadolu (%16) ve Marmara (%17) bölgelerinde yoğunlaşmakta; bu da Türkiye buğday üretiminin coğrafi olarak daha çok iç kesimlerde yoğunlaştığını göstermektedir. Verimlilikte özellikle 2021/22 sezonunda kuraklık etkisiyle ciddi bir düşüş yaşanmış ve verim 2.3 ton/ha'a kadar gerilemiştir. Ancak takip eden yıllarda, uygun iklim koşulları ve modern tarım uygulamaları sayesinde 2023/24 ve 2024/25 sezonlarında bu değer sırasıyla 2.92 ve 2.6 ton/ha olarak yükselmiştir. Son beş yıl ortalaması dikkate alındığında (2020/21–2024/25), üretim miktarı 18.3 milyon ton, verim ise 2.58 ton/ha'dır. Bu veriler, Türkiye'de buğday üretiminin iklim koşullarına oldukça duyarlı olduğunu ve sürdürülebilir verim artışı için adaptif tarım stratejilerinin gerekliliğini ortaya koymaktadır.



Şekil 2.6. Türkiye'de buğday üretimi verileri (USDA 2025)



Şekil 2.7. Türkiye'deki buğday üretiminin bölgesel dağılımı (USDA 2025)

Çizelge 2.1'de, 2022 ve 2023 yıllarına ait Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) verilerinin, buğday ve diğer tahıl ürünlerinin üretim miktarlarını ton bazında gösterilmiştir. Buğday üretimi 2022 yılında 19 milyon 750 ton iken, %11.4 oranında bir artışla 2023 yılında 22 milyon tona yükselmiştir. 2023 yılında, buğdayın toplam tahıl üretimindeki payı %28.6 ile oldukça önemli bir seviye ile toplam tahıl üretimi içinde buğday, en büyük paya sahip ürün olarak öne çıkmıştır. Genel tahıl üretimi de 2023 yılında %9.1 oranında artmış, ancak buğdaydaki %11.4'lük artış, ortalamanın üstünde bir büyüme göstermiştir. Buğdayın toplam bitkisel üretim içindeki payı %28 civarındadır.

Çizelge 2.1. 2022 ve 2023 Tahıllar ve diğer bitkisel ürünlerin üretim miktarları (TÜİK 2022)

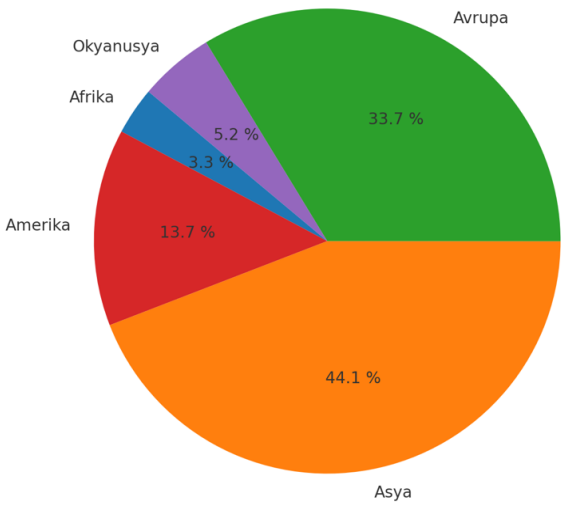
Tahıllar	**Üretim**				
	2022 (Ton)	**Pay (%)**	**2023 (Ton)**	**Pay (%)**	**Değişim (%)**
Toplam	70458413	100.0	77686237	100.0	10.3
Tahıllar	38671839	54.9	42198659	54.3	9.1
Buğday	19750000	28.0	22000000	28.3	+11.4
Mısır (dane)	8500000	12.1	9000000	11.6	+5.9
Çeltik	950000	1.3	900000	1.2	- 5.3
Arpa	8500000	12.1	9200000	11.8	+8.2
Çavdar	273000	0.4	305000	0.4	+11.7
Yulaf	365000	0.5	410000	0.5	+12.3
Kaplıca	3447	0.0	2818	0.0	-18.2
Darı	4168	0.0	4101	0.0	-1.6

(Devamı Arkada)

Çizelge 2.1'in devamı

Kuş yemi	4848	0.0	4192	0.0	-13.5
Mahlut	0	0.0	0	0.0	0.0
Tritikale	320000	0.5	370000	0.5	+15.6
Sorgum	17	0.0	18	0.0	+ 5.9
Karabuğday	1359	0.0	2530	0.0	+86.2

Buğday, 2023 yılı itibarıyla yaklaşık 800 milyon tonluk üretimiyle en çok üretilen dördüncü tarımsal emtia konumundadır (FAOSTAT, 2025). FAO verilerine göre buğday üretiminde ilk üç sırada Çin (yaklaşık 137 milyon ton), Hindistan (yaklaşık 112 milyon ton) ve Rusya Federasyonu (yaklaşık 91 milyon ton) yer almakta olup, bu ülkeler küresel üretimin yaklaşık %42'sini karşılamaktadır. Türkiye ise 21 milyon ton üretimle ilk 10 ülke arasında yer almakta, bu yönüyle bölgesel gıda arzında önemli bir rol üstlenmektedir. Kıtalar ölçeğinde değerlendirildiğinde Asya, toplam üretimin %44.1'ini gerçekleştirerek lider konumda bulunmakta; onu %33.7 ile Avrupa, %13.7 ile Amerika, %5.2 ile Okyanusya ve %3.3 ile Afrika takip etmektedir. Bu dağılım, buğdayın iklimsel ve agronomik adaptasyon kabiliyetinin en çok ılıman ve yarı kurak bölgelerde değerlendirildiğini göstermektedir. Bununla birlikte, küresel iklim değişikliği, su stresi, toprak verimliliği azalması ve biyotik stres faktörleri, buğday üretiminin sürdürülebilirliğini tehdit eden başlıca etmenler olarak öne çıkmaktadır (Reynolds vd. 2017). Bu bağlamda, uluslararası araştırma merkezleri (ör. CIMMYT, ICARDA) ve ulusal programlar, özellikle iklim değişikliğine dirençli, yüksek verimli ve kaliteli çeşitlerin geliştirilmesine odaklanan entegre ıslah stratejileri ile küresel buğday üretimini desteklemektedir (Morgounov vd. 2019).



Şekil 2.8. Kıtalara göre buğday üretiminin dağılımı

2.3.4. Ülkemizde yerel buğday çeşitleri ve ıslah çalışmaları

Türkiye, başta Güneydoğu Anadolu olmak üzere, önemli bir genetik buğday çeşitliliğine ev sahipliği yapmaktadır (Cabi vd. 2009; Karagöz 2014). Kavuzlu kültür

formları, örneğin Triticum monococcum (einkorn) ve Triticum dicoccum (Gernik) gibi türler, Türkiye'de doğal yayılış gösteren yabani buğday akrabalarından – başta Triticum boeoticum ve Triticum dicoccoides olmak üzere – doğal evrim, insan eliyle yapılan seleksiyonlar ve bu türler arasında gerçekleşen doğal melezlenmeler sonucunda ortaya çıkmıştır; bu süreçlerin ilerlemesiyle, kavuzların dövme işlemiyle ayrılabildiği çıplak taneli kültür formlarına, yani modern Triticum durum (makarnalık buğday) ve Triticum aestivum (ekmeklik buğday) türlerine geçiş sağlanmıştır. Bu evrimsel çizgi, buğdayın hem genetik çeşitliliğini hem de tarımsal üretime uygunluk düzeyini artırarak Anadolu'nun bitki evcilleştirme tarihinde merkezi bir rol oynamasını sağlamıştır (Ozkan vd. 2002). Tarımı yapılan ilkel kültür buğdayları, çeşit grupları ve ploidi seviyeleri Çizelge 2.2'de verilmiştir. Ülkemizde yetiştirilen yerel buğday çeşitleri, yüzyıllar boyunca doğal seçilimle varlığını sürdürmüş, geniş adaptasyon yeteneğine sahip ve yüksek tane kalitesine ulaşabilen genetik kaynaklardır. Bu çeşitler, kuraklık ve sıcaklık gibi zorlu koşullara dayanıklılıkları ile bilinirler. Türkiye kökenli bazı yerel buğday çeşitleri, dünya çapında buğday üretiminde önemli bir yere sahip olan ABD ve Rusya'nın buğday üretimine kayda değer katkılar sağlamıştır. Rus bilim insanları Vavilov ve Zhukovski, 1925-1950 yılları arasında Türkiye'den 10000'den fazla buğday örneği topladılar. Hakkâri kökenli bir yazlık makarnalık buğday çeşidi olan Horanek, erkenciliği, yüksek verimi, sıcağa, fusaryum hastalığına ve frit sineğine karşı dayanıklılığıyla öne çıkarak 1951 yılında Rusya'daki birçok modern buğday çeşidine üstün gelmiştir (Tarım ve Orman 2014).

Çizelge 2.2. İlkel kültür buğdayları, çeşit grupları ve ploidi seviyeleri

Türler	**Türkçe İsimleri**	**Çeşit Grubu**	**Ploidi Seviyesi**
T. monococcum L.	Kaplıca=Songar	Songar	Diploid
T. turgidum L.	Mokan=Çatal Kaplıca, Çatal Songar	Dicoccon	Tetraploid
T. turgidum L.	Makarnalık buğday	Durum	Tetraploid
T. turgidum L.	Asıl makarnalık	Durum Ssp. Commune	Tetraploid
T. turgidum L.	Makarnalık topbaş buğday	Durum Ssp. Duro-Compactum	Tetraploid
T. turgidum L.	Kaba buğday (=Kaba tahl)	Turgidum	Tetraploid
T. turgidum L.	Turna ağası buğday	Polonicum	Tetraploid
T. turgidum L.	Doğu buğdayı	Carthlicum	Tetraploid
T. timopheevi	Rus buğdayı	Rus Buğdayı	Tetraploid
T. aestivum L. *em Thell spelta*	Kavuzlu buğday	Spelt	Hekzaploid
T. aestivum L.	Dallı buğday	Vavilovi	Hekzaploid

(Devamı Arkada)

Çizelge 2.2'nin devamı

T. aestivum L.	Ekmeklik buğday	Aestivum	Hekzaploid
T. aestivum L.	Topbaş ekmeklik buğday	Compactum	Hekzaploid
T. aestivum L.	Cüce buğday	Sphaerococcum	Hekzaploid
T. aestivum L.	Maha buğday	Macha	Hekzaploid

ABD'li araştırmacı Harlan'ın 1948–1964 yılları arasında topladığı 2121 yerel çeşitten biri olan PI 178383 hattı ise, gen bankasında uzun süre saklandıktan sonra sarı pas hastalığına karşı dirençli olduğu tespit edilmiş ve bu hatlardan türetilen yeni çeşitler ABD buğday ıslahında milyarlarca dolarlık katkı sağlamıştır (Damania vd. 1996). 19. yüzyılda Osmanlı topraklarından ABD'ye göç eden Mennonitler aracılığıyla taşınan "Turkey Red" buğdayı ise, Kansas başta olmak üzere ABD'nin kışlık buğday kuşağının temel genetik materyali haline gelmiş; yüksek verimi, kuraklığa ve dona dayanıklılığı nedeniyle 1902'ye kadar denenen binden fazla çeşit arasında en uygun tip olarak kabul edilmiştir (Quisenberry vd. 1974).

Yeşil Devrim, 20. yüzyılın ortalarında tarımda verimliliği artırmak amacıyla yüksek verimli tohum çeşitleri, kimyasal gübreler, tarım ilaçları, modern sulama teknikleri ve makineleşmenin yaygın kullanımıyla tarımsal üretimi büyük ölçüde artıran bir dönüşüm sürecidir. 1940'lı yıllarda başlayan ve özellikle 1960'larda hız kazanan bu süreç, Hindistan ve Meksika gibi ülkelerde açlıkla mücadelede önemli bir rol oynayarak gıda güvenliğini sağlamıştır. Yeşil Devrim'in öncülerinden Norman Borlaug, geliştirdiği yüksek verimli buğday türleriyle Nobel Barış Ödülü kazanmış ve dünya çapında tarımsal üretimin artmasına büyük katkı sağlamıştır (Evans vd. 2020). Borlaug, buğdayda verim artışını sağlayacak genetik özellikleri geliştirmek için çalışmalara başlayıp özellikle kısa saplı ve yüksek verimli buğday çeşitleri geliştirme üzerinde yoğunlaşmıştır (Hurt 2003). Borlaug'un geliştirdiği kısa boylu buğday çeşitleri, sapların uzun olmasına göre rüzgâr ve yağmurdan daha az etkilenmiş ve gübreye daha iyi yanıt verdiğinden, üretimde büyük bir artış sağlanmıştır (Hurt 2003). Yüksek verimli buğday çeşitleri, daha etkin besin elementi alımı ve gelişmiş fizyolojik özellikleri sayesinde kimyasal gübrelerden daha yüksek düzeyde yararlanabilmekte, aynı zamanda daha düşük su gereksinimi ile verim potansiyelini koruyabilmektedir (Hedden, 2003). Bu durum hem tarım alanlarının genişletilmesine hem de mevcut ekim alanlarında birim alan başına üretimin artırılmasına imkân tanımıştır. Nitekim 1966–1968 yılları arasında azot (N), fosfor (P) ve potasyum (K) gübre tüketimi yaklaşık 1 milyon tondan 2.1 milyon tona çıkarak Yeşil Devrim'in girdi kullanımındaki etkisini açıkça yansıtmıştır. Türkiye'de bu dönemde buğday ekim alanı 8.2 milyon hektara ulaşmış, toplam üretim 9.9 milyon ton, birim alan verimi ise 120.6 kg/da olarak kaydedilmiştir (Ziraat Mühendisleri Odası Yayınları 1970). 1950'li yılların başından itibaren CIMMYT kökenli yüksek verimli çeşitlerin ülkeye girişinin yanı sıra, Marshall Planı çerçevesinde traktör ve tarımsal ekipman sayısındaki artış ile kimyasal gübre ve herbisit kullanımının yaygınlaşması, geleneksel yerel çeşitlerin tarım sistemindeki ağırlığını önemli ölçüde azaltmıştır. Bu yapısal dönüşümü desteklemek amacıyla 21 Ağustos 1963 tarihinde yürürlüğe giren 308 sayılı "Tohumlukların Tescil, Kontrol ve Sertifikasyonu Hakkında Kanun", tescile esas çeşitlerin saf hat olması zorunluluğunu getirmiş ve böylece daha önce geliştirilen köy çeşitleri ile kompozit ve multiline genotiplerin yerini, homojen ve selektif ıslah edilmiş saf hat çeşitler almıştır.

Bu düzenleme, aynı zamanda modern tarım sistemine uygun sertifikalı tohumluk üretimini teşvik eden kurumsal çerçevenin oluşturulmasına zemin hazırlamıştır.

Yeşilköy Zirai Araştırma Enstitüsü'nden sağlanan Mentana x Aegilops ovata E. pedigrisine sahip bir hat, 1968 yılında Emcet Yektay adına "Yektay 406" adıyla tescil edilmiştir. Bu çeşidin pedigrisi başlangıçta Mentana x Aegilops ovata E. olarak bildirilmiş olsa da sonradan yapılan incelemeler bu genotipin aslında İtalya Sanmarino çeşidinin bir seleksiyonu olduğunu ortaya koymuştur. Kılçıklı, kahverengi başaklı, kırmızı dane rengine sahip, uzun boylu ve sap sağlamlığı yüksek olan bu çeşit, özellikle sulanabilir alanlarda hızla yayılmış ve yüksek verimiyle dikkat çekmiştir (Bağcı vd. 2021).

Türkiye'de modern buğday ıslahı çalışmaları, özellikle 1930'lu yıllardan itibaren hız kazanmış ve hem ekmeklik hem de makarnalık buğday çeşitleri bakımından önemli genetik kaynakların geliştirilmesini sağlamıştır. 1970 öncesinde geliştirilen buğday çeşitleri genellikle yerel genetik materyallerin seçilmesi, yerli hatların melezlenmesi ve adaptasyon özellikleri dikkate alınarak yürütülen seleksiyon programları ile elde edilmiştir (Çizelge 2.3). Örneğin, 1931 yılında tescil edilen Makarnalık Sarı Buğday 710 ve Ekmeklik Ak 702 çeşitleri, Eskişehir yöresindeki yerel buğdayların karışımından türetilmiştir. Benzer şekilde, Sertak 52 (1936), Sivas 111/33 (1936), Yayla 305 (1939) ve Köse 220/33 (1939) gibi çeşitler, belirli coğrafi bölgelerde seçilmiş saf hatların karışımıyla geliştirilmiş; çoğunlukla kırsal bölgelerdeki çiftçi popülasyonlarının içinden geleneksel ıslah yöntemleriyle ayrılmıştır.

Çizelge 2.3'te verilen, 1940'lı ve 1950'li yıllarda ise buğday ıslahında melezleme yöntemlerinin ön plana çıktığı görülmektedir. Melez 13, Yetkay-406 ve 4-9, 4-11 gibi çeşitler, Mentana gibi yabancı kökenli genotiplerle yerli çeşitlerin melezlenmesi sonucu geliştirilmiş; bu sayede hem verim hem de hastalık direnci açısından iyileştirmeler sağlanmıştır. 1960'lı yıllarda ise adaptasyon bölgelerine özgü önerilerle birlikte, bölgeye özel iklim ve toprak koşullarına uyum sağlayabilen çeşitlerin yaygınlaştırıldığı dikkat çekmektedir. Örneğin, Fata "S"18-1 (1963) Burdur yöresine, P8-6 ve P8-8 (1966) ise Trakya ve İç Anadolu geçit bölgelerine önerilmiştir. 1970 yılı itibarıyla geliştirilen çeşitlerde, modern ıslah tekniklerinin daha belirgin olduğu gözlemlenmektedir. Kıraç-66, Bolal 2973 ve Bezostaja-1 gibi çeşitler, yüksek verim, kaliteli ekmeklik özellikler ve çevresel stres koşullarına tolerans bakımından öne çıkmıştır. Özellikle Bezostaja-1 çeşidi, Rusya kökenli bir kışlık buğday olup Türkiye'de kırmızı sert tip buğdaylar arasında en kaliteli çeşitlerden biri olarak kabul edilmiştir.

Buğday ıslahındaki bu evrimsel süreç, yalnızca verim artışı ya da hastalık direnci gibi özelliklerin iyileştirilmesiyle sınırlı kalmamış, aynı zamanda genetik materyalin uluslararası dolaşımı ve stratejik paylaşımı açısından da dikkate değer örnekler ortaya koymuştur. Türkiye'den ABD'ye taşınan genetik kaynakların, yıllar sonra ABD'nin modern ıslah programlarında milyarlarca dolarlık ekonomik katkı sağlaması, genetik kaynakların korunması ve değerlendirilmesinin küresel tarım için ne denli kritik olduğunu göstermektedir. Bu durum, yerel çeşitlerin gen bankalarında muhafaza edilmesinin yalnızca biyolojik çeşitliliği korumakla kalmayıp, aynı zamanda gelecekteki ıslah programları için bir rezerv işlevi gördüğünü ortaya koymaktadır.

Çizelge 2.3. Türkiye'de 1970 öncesi ve sonrası geliştirilen buğdaylar (Ozberk vd. 2016)

Tescil Yılı	Buğday Çeşidi	Açıklama
1931	Makarnalık Sarı buğday 710	Eskişehir civarındaki çeşitlerden elde edilmiştir.
1931	Ekmeklik Ak 702	Eskişehir civarındaki ekmeklik buğdayların iki hattın karışımından elde edilmiştir.
1936	Ekmeklik Sertak 52	Kayseri'de Yamula Köyü ve Kelik Vadisi'nde Karahisar Köyü'nden elde edilen iki saf hattın karışımından elde edilmiştir.
1936	Ekmeklik Sivas 111/33	Bisküvilik için uygundur.
1939	Ekmeklik Yayla 305	Doğu Anadolu'da üç saf hattın melezlenmesinden elde edilmiştir; kompozit (birleşik) bir çeşittir.
1939	Ekmeklik Melez 13	Mentana x Kızıldil 706 ile Mentana x Akdil 707 melezlerinden oluşan 5 saf hattın karışımından elde edilmiştir.
1939	Ekmeklik Köse 220/33	Sivas'ta Erzurum ve Erzurum'da Kırik olarak bilinir; ekmeklik kalitesi çok iyidir.
1950	Ekmeklik 4-9, 4-11, 4-22	Melez 13 popülasyonundan elde edilmiştir.
1955	Ekmeklik Yetkay-406	Mentana x Ae. ovata E. melezinden elde edilmiştir. Sulu alanlar için uygundur, sapının ince oluşu ve yüksek verim potansiyeli nedeniyle hızla yaygınlaşmıştır.
1963	Makarnalık Fata "S"18-1	Burdur civarında yetiştirilen Fata buğdayından seçilmiştir.
1966	Ekmeklik P8-6, P8-8	Anadolu iklim geçit bölümleri ve Trakya için tavsiye edilir.
1967	Makarnalık Kunduru 1149	Konya Kadınhanı'da bir pazar yerinden alınan ve Bolvadin buğdayı adıyla bilinen köy çeşidi buğdayı seçilmiştir.
1970	Kıraç-66	Yayla-305 x Floransa melezinden elde edilmiştir. Orta Anadolu'nun nispeten fakir topraklarına çok iyi uyum sağlamıştır. Ekmeklik kalitesi çok iyi, beyaz tanelidir.
1970	Bolal 2973	Kıraç-66 ile Kenya-menşeli bir melezden elde edilmiştir. Orta Anadolu'nun bol yağışlı, sulanan alanlarına ve serin vadilerine önerilmektedir.
1970	Bezostaja-1	Rusya kökenli, kışları soğuk hemen her yerde yetiştirilebilen kışlık ekmeklik buğday çeşididir. Diğer çeşitlere göre sık dikimi tolere edebilir; kırmızı sert tip ekmeklik buğday sınıfında Türkiye'deki en kaliteli buğdaydır.

Çizelge 2.4'te verilen buğdaylar için, 1970 sonrası dönemde Türkiye'de ıslah çalışmaları, bölgesel iklim koşullarına uyum, hastalık direnci, verimlilik ve kalite parametreleri temelinde daha sistematiktir. Bu dönemde geliştirilen çeşitlerde, özellikle kuraklık, soğuk, pas hastalıkları ve yatmaya karşı dayanıklılık gibi çevresel stres faktörlerine tolerans ön plana çıkarken; verimlilik ve ekmeklik/makarnalık kalite kriterleri de önemli ıslah hedefleri arasında yer almıştır. 1976 yılında tescillenen Cumhuriyet-75, Gediz-75 ve Dicle-74 gibi çeşitler, beyaz taneli yüksek ekmeklik kalite ya da kurağa dayanıklılık gibi özellikleriyle dikkate değer bulunmuştur. 1980'li ve 1990'lı yıllarda geliştirilen Diyarbakır-81, Katea-1, Ege-88 ve Gün-91 gibi çeşitlerde ise hem verim potansiyeli hem de biyotik streslere karşı direnç özellikleri geliştirilmiştir. Bu dönemde ıslah edilen Sham-1, Kaşifbey-95 ve Kızıltan-91 gibi genotipler, sulanan alanlara uygunluklarıyla dikkat çekerken; kurak ve soğuk iklim koşullarına adapte olabilen Amonos-97, Pamukova-97 ve Ankara-98 gibi çeşitler, özellikle İç Anadolu ve Doğu Anadolu bölgeleri için değerli birer kaynak niteliğindedir. 1998–2002 yılları arasında geliştirilen Ziyabey-98, Sarıçanak-98, Adana-99, Bayraktar-2000 ve Meta-2002 gibi birçok buğday çeşidi, sadece verimlilik açısından değil, aynı zamanda irmik rengi, hastalık dayanıklılığı ve fizyolojik olgunlaşma süresi gibi teknolojik ve agronomik özelliklerle de ön plana çıkmıştır. Alternatif gelişme tabiatına sahip Mirzabey-2000 gibi çeşitler ise yazlık ve kışlık tipler arasında esneklik sağlayarak çiftçilere adaptasyon avantajı sunmuştur.

2000 sonrası dönemde ıslah edilen Tosunbey (2004) ve Burgos (2011) gibi çeşitler, modern buğday üretiminde yüksek kalite standartlarını ve stabil verimliliği bir arada sağlayabilme potansiyeliyle önemli katkılar sunmuştur. Bu gelişmeler, Türkiye buğday ıslahının yalnızca verimlilik odaklı değil, aynı zamanda çevresel stres yönetimi, endüstriyel kalite ve adaptasyon genişliği gibi çok boyutlu hedeflerle sürdürüldüğünü göstermektedir.

Çizelge 2.4. Türkiye'de 1970 sonrası geliştirilen buğdaylar (Özberk vd. 2016b)

Tescil Yılı	Buğday Çeşidi	Açıklama
1976	Cumhuriyet-75	Beyaz taneli, iyi ekmeklik kalite, sarı pasa hassastır.
1976	Gediz-75	Kuruya uygun, koyu kahve renkli taneli ve yüksek verimlidir.
1976	Dicle-74	Yüksek verimli, çok kardeşlenen, kurağa dayanıklıdır.
1979	Gerek-79	Beyaz taneli, kırmızı başaklı, kışa ve kurağa dayanıklıdır.
1979	Çalmak-79	Yüksek verimli, kahve pasa orta hassastır.
1988	Ege-88	Yüksek verimli, sulu tarıma uygundur.
1991	Gün-91	Kırmızı taneli, kışa ve kuraklığa dayanıklıdır.
1991	Seri-82	Beyaz taneli, yüksek verimli, sarı pasa hassas, sulu tarıma uygundur.
1991	Kızıltan-91	Kışa ve kuraklığa dayanıklı, kahve pasa orta dayanıklıdır.

(Devamı Arkada)

Çizelge 2.4'ün devamı

1991	Sham-1	Yüksek verimlidir, sarı ve kahve pasa dayanıklıdır sulu sulama uygundur.
1995	Kaşifbey-95	Beyaz taneli, verimli ve sulu tarıma uygundur.
1997	Pamukova-97	Kırmızı tanelidir, kurağa ve sahil kuşağında soğuğa dayanıklıdır.
1997	Amonos-97	Soğuğa ve kuraklığa dayanıklı, koyu kahverengi tanelidir.
1998	Gönen-98	Beyaz tanelidir, sahil kuşağında soğuğa dayanıklıdır ve kuralığa biraz hassastır.
1998	Pehlivan	Kırmızı taneli, verimi yüksek, soğuğa, kuraklığa ve sarı pasa orta dayanıklıdır.
1999	Adana-99	Beyaz taneli, yüksek verimli, sulu tarıma uygun, yatmaz, sarı pasa orta hassastır.
1999	Ceyhan-99	Beyaz taneli, yüksek verimli, paslara kışa ve kurağa orta düzeyde dayanıklıdır.
1999	Golia	Kırmızı taneli, soğuğa dayanıklı, kurağa orta dayanıklı, sulu tarıma uygundur.
1999	Flamura-85	Kırmızı taneli, soğuğa ve yatmaya dayanıklıdır.
1999	Çeşit -1252	Kışa ve paslara dayanıklı, kurağa orta dayanıklı, yağışı iyi taban alanlara uygundur.
2000	Bayraktar-2000	Beyaz taneli, kışa, kuraklığa ve sarı pasa dayanıklıdır.
2000	Fuatbey -2000	İlave sulamaya uygun, verimlidir ve yatmaya dayanıklıdır.
2000	Mirzabey-2000	Alternatif gelişme tabiatlı (ne yazlık ne kışlık tip buğday, ikisinin arasında yer alır), soğuğa ve kurağa dayanıklıdır.
2000	Yelken-2000	Orta geçici, kışlık ve yüksek verimlidir, yatmaya dayanıklıdır.
2001	Panda	Kırmızı taneli, erkenci, kurağa ve soğuğa dayanıklı, stabil verimlidir.
2001	Nurkent	Beyaz taneli, kuraklığa dayanıklıdır.
2001	Zenit	Verimli ve paslara dayanıklıdır, irmik rengi iyidir.
2001	Svevo	Verimli, paslara dayanıklı, irmik rengi iyi.
2002	Meta-2002	Beyaz taneli, orta erkenci, yatmaya soğuğa ve kurağa, sarı, kahverengi ve kara pasa dayanıklı, yarık gelişme tabiatlı.
2002	Sakin	Kırmızı taneli, yatmaya dayanıklı.
2002	Fırat-93	İri taneli, kışa ve kurağa dayanıklı.
2002	Tüten-2002	Yüksek verimli, orta erkenci; yatmaya, soğuğa ve kurağa dayanıklı.
2004	Tosunbey	Beyaz taneli, soğuğa, sarı ve kahve pasa dayanıklı.
2011	Burgos	Yüksek verimli, iyi kaliteli, irmik rengi iyidir.

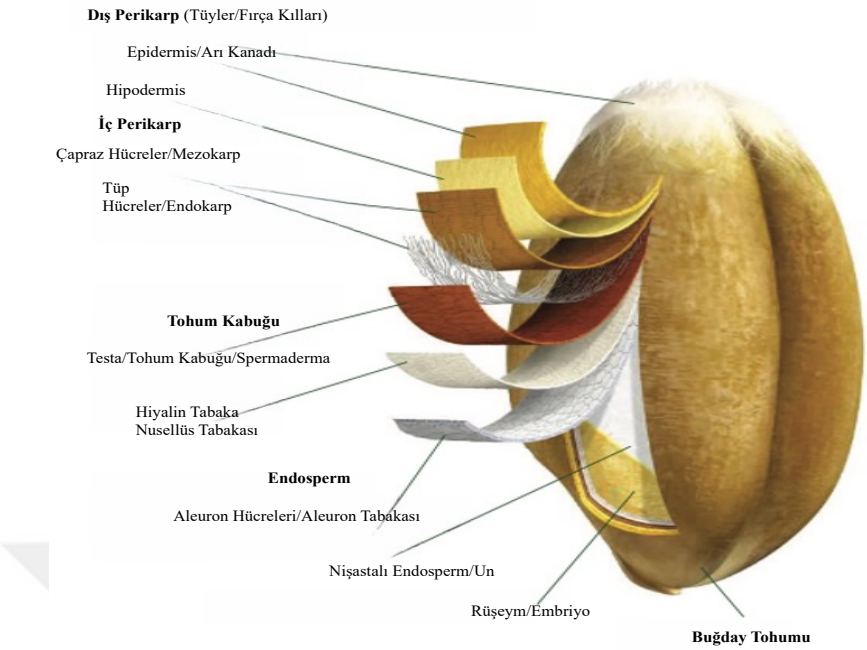
2.4. Buğday Tanesinin Yapısı

Buğday, insan beslenmesinde önemli bir yer tutan temel bir gıda maddesidir ve içerdiği proteinler, buğdayın besin değeri, işleme özellikleri ve sağlık üzerindeki etkileri açısından büyük öneme sahiptir. Şekil 2.3'te şematik gösterimi olan buğday tanesi, endosperm, embriyo ve kepekten oluşur. Endosperm, toplam ağırlığın yaklaşık %82'sini, embriyo yaklaşık %3'ünü ve kepek yaklaşık %15'ini oluşturur. Kepek, epikarp, endokarp, testa, nucellar epidermis ve aleuron tabakasından meydana gelir. Aleuron tabakası, endospermi çevreleyen ve kepeğin ağırlığının yaklaşık %50'sini oluşturan dış hücre tabakasıdır (Zhong vd. 2023). Buğday tanesindeki en büyük kimyasal bileşen, tahıl ağırlığının yaklaşık %70'ini oluşturan ve insan vücuduna enerji sağlayan nişastadır. Nişastayı takiben, tahılın yaklaşık %8 ila %20'sini oluşturan protein gelir (Shewry 2009).

Ekmeklik buğday olarak da bilinen buğdaygiller familyasından buğday, Triticum cinsine bağlı bütün dünyada ıslahı yapılmış, tek yıllık otsu bitki türüdür (Bonjean vd. 2001). Buğday endospermi, bir aleuron tabakası ve nişastalı bir çekirdekten oluşur. Buğday tanesinin protein ve nişasta açısından en zengin kısmıdır. Aleuron tabakası, bir hücre kalınlığında olup tüm buğday tanesini çevreler. Nişastalı endosperm, uygun parçacık boyutuna indirildiğinde un, irmik veya semolina üretir. Endospermdeki hücreler, protein matriksine gömülü nişasta granülleri içerir. Buğday tanesinin olgunlaşması sırasında glüten oluşturan proteinler sentezlenir ve protein taneleri olarak depolanır. Kepek, birkaç hücre tabakasından oluşur: perikarp, tohum kabuğu ve nükleer epidermis. Öğütme sırasında un külünün ana kaynağıdır. Ruşeym, buğday tanesinin %2.5-3.5'ini oluşturur ve embriyonik aks ile scutellumdan oluşur. Ruşeym, en yüksek lipid içeriğine sahiptir ve nispeten yüksek miktarda protein içerir ancak nişasta içermez (Brouns vd. 2012).

2.4.1. Buğdayda protein fraksiyonları

Buğday tanesi morfolojik olarak üç temel bileşenden oluşur: kepek, endosperm ve embriyo (Şekil 2.9). Her bir yapı, tohumun fizyolojik işlevlerinde ve endüstriyel kullanım alanlarında kendine özgü biyokimyasal ve yapısal özellikler taşır (Shewry 2009). Kepek, tanenin dış katmanlarını oluşturan dış perikarp (epidermis, hipodermis), iç perikarp (mezo- ve endokarp) ve tohum kabuğu (testa, nusellus ve hiyalin tabaka) gibi katmanlardan meydana gelir. Bu çok katmanlı yapı, hem fiziksel koruma sağlar hem de yüksek düzeyde diyet lifi, fenolik bileşikler ve bazı B grubu vitaminler içerir (Hemery vd. 2007). Endosperm, buğday tanesinin hacimsel olarak en büyük bölümünü oluşturur ve büyük oranda nişasta granülleri ile gluten oluşturan depo proteinlerden (gliadin ve glutenin) meydana gelir. Endospermde bulunan aleuron tabakası, mineral, enzim ve protein içeriği bakımından zengindir; bu yapı öğütme sırasında genellikle kepek fraksiyonuna dahil edilir. Endospermin iç kısmında yer alan nişastalı doku ise un üretiminin ana kaynağını teşkil eder ve ekmekçilikte hamur özelliklerini belirleyen kritik birimdir (Shewry 2009). Rüşeym (embriyo), tanenin canlılık yeteneğini barındıran kısmıdır ve çimlenme sürecinin merkezidir. Biyokimyasal olarak yüksek miktarda yağ, protein, vitamin (özellikle E vitamini) ve enzim içerir. Ancak, yüksek lipid içeriği nedeniyle oksidatif bozulmaya yatkın olduğundan un üretiminde çoğunlukla ayrılır (Graveland vd. 1982; Wrigley 1988).



Şekil 2.9. Buğday tanesinin yapısal bileşenleri

Buğdaydaki glüten proteinlerinin analizi, uzun bir geçmişe sahiptir ve bu alandaki ilk çalışmalar 1745 yılına kadar uzanmaktadır. Buğday unundan suda çözünmeyen bir protein fraksiyonu hazırlayan Giacomo Beccari, bu bileşiği "glutinis" olarak adlandırmıştır. Ancak, bitki proteinlerinin bilimsel bir temele oturtulması, 1886-1928 yılları arasında çalışan T.B. Osborne'un çalışmalarıyla gerçekleştirilmiştir. Osborne, proteinleri çözünürlük özelliklerine göre sınıflandırmış ve buğday proteinlerini dört ana gruba ayırmıştır: albüminler (suda çözünebilen), globulinler (seyreltik tuzlu çözeltilerde çözünebilen), prolaminler (alkol-su karışımlarında çözünebilen) ve glutelinler (seyreltilmiş asit veya alkali çözeltilerde çözünebilen). Osborne'un çalışmaları ayrıca prolaminlerin buğday ve diğer tahıllara özgü olduğunu ortaya koymuştur (Shewry vd., 2003).

Glüten, beyaz undan suyla yıkama sonucu elde edilen bir protein fraksiyonu olup, yaklaşık %70 oranında protein içermektedir. Glütenin geri kalan kısmı nişasta, lipidler ve diğer bileşenlerden oluşmaktadır. Glüten, klasik olarak alkolde çözünebilen gliadinler ve çözünmeyen glüteninler olmak üzere iki ana fraksiyona ayrılır. Gliadinler, monomerik proteinlerden oluşurken glüteninler, inter zincir disülfit bağlarıyla stabilize edilen polimerik proteinlerdir. Bu bağların indirgenmesiyle glüteninler, yüksek moleküler ağırlıklı (HMW) ve düşük moleküler ağırlıklı (LMW) alt birimlere ayrılır. Düşük moleküler ağırlıklı alt birimler ise B-, C- ve D-tipi alt gruplar olarak sınıflandırılmaktadır (Jackson vd., 1983).

Buğday proteinleri, yapı ve işlevlerine göre dört ana gruba ayrılmaktadır. Albüminler, suya çözünebilen proteinler olup toplam buğday proteinlerinin yaklaşık %10'unu oluşturur ve bitkinin büyüme süreçlerine katkı sağlar. Globulinler ise seyreltik tuz çözeltilerinde çözünebilen proteinlerdir ve tohumun savunma mekanizmalarında rol oynar. Ancak, hamur özelliklerine etkileri sınırlıdır. Gliadinler, alkolde çözünebilen

temel depolama proteinleridir. Hamurun uzama kabiliyetini artırarak viskoz özellik sağlar, ancak elastikiyete katkıda bulunmaz. Gliadinler, çölyak hastalığına neden olabilecek immünojenik epitoplar içermekte ve toplam buğday proteinlerinin %30-40'ını oluşturmaktadır (Graveland vd., 1982). Gluteninler ise gliadinlerle birlikte hamurun elastikiyet ve dayanıklılık özelliklerini belirler. Bu proteinler, hamurun yoğurulması sırasında gazların hapsedilmesine olanak tanıyarak kabarma ve şekil alma yeteneğini artırır. Gluteninler, toplam buğday proteinlerinin %30-40'ını oluşturmaktadır ve ekmek yapımında kritik bir rol oynamaktadır (Wrigley, 1988). Sonuç olarak, gluten proteinleri (gliadin ve glütenin) buğdayın eşsiz viskoelastik özelliklerini oluşturan ana bileşenlerdir. Gluten, buğday unundan yapılan hamurun güçlü ve kohezyonlu bir yapı oluşturmasını sağlayarak ekmek yapımı gibi işlemlerde temel bir rol oynar. Ancak, glütenin çölyak hastalığı ve gluten intoleransı gibi sağlık sorunlarına neden olabilecek potansiyel etkileri de bulunmaktadır. Bu nedenle, farklı buğday çeşitleri arasındaki gluten proteinlerinin bileşimsel ve fonksiyonel farklılıklarını anlamak hem gıda teknolojisi hem de sağlık açısından kritik öneme sahiptir.

2.4.2. Gliadin proteinleri ve alt grupları

Gliadin proteinleri, moleküler ağırlığı 28000 ile 55000 kDa arasında değişen, önemli bir buğday depolama proteinidir(Bonomi vd. 2013). Çoğunlukla monomerik yapıda bulunan gliadinler, başlangıçta düşük pH koşullarında jel elektroforezinde hareketliliklerine göre α-, β-, γ- ve ω-gliadinler olmak üzere dört temel gruba ayrılmıştır. Ancak, amino asit dizilimlerine ilişkin yapılan ileri çalışmalar, elektroforetik hareketliliğin her zaman proteinler arasındaki ilişkileri doğru bir şekilde yansıtmadığını ve α- ile β-gliadinlerin tek bir grupta (α/β-tipi) sınıflandırılması gerektiğini ortaya koymuştur (Wieser 1996).

Günümüzde kullanılan modern analitik yöntemler, örneğin iki boyutlu elektroforez ve RP-HPLC, gliadin fraksiyonlarının yüzlerce bileşene ayrılmasını mümkün kılmaktadır (Wieser 2007). Bu yöntemler temelinde, tam ya da kısmi amino asit dizileri, amino asit bileşimleri ve moleküler ağırlıkları dikkate alınarak, ω5 , ω1,2-, α/β- ve γ gliadinler olmak üzere dört ana türe ayrılmaktadır: Her bir gliadin alt grubu, belirli amino asit dizilimlerine sahip olmasına rağmen, bu dizilimlerde zaman zaman küçük ölçekli değişiklikler meydana gelebilmektedir. Bu değişiklikler, amino asitlerin yer değiştirmesi (ikameler), amino asitlerin dizilimden çıkarılması (silinmeler) veya yeni amino asitlerin eklenmesi şeklinde gerçekleşebilir. Bu tür değişiklikler, proteinlerin birincil yapısında küçük farklılıklar yaratır. Ancak, bu farklılıklar genellikle proteinlerin genel fonksiyonlarını ve fizikokimyasal özelliklerini belirgin şekilde etkilemez. Dolayısıyla, alt gruplar arasında amino asit düzeyinde küçük yapısal varyasyonlar bulunsa da bu değişiklikler, gliadin alt gruplarının temel kimyasal ve biyolojik özelliklerini değiştirmeyecek düzeyde sınırlı kalmaktadır. Bu durum, gliadinlerin sınıflandırılmasında moleküler özelliklerin sabit kalmasını ve alt gruplar arasında genel bir tutarlılığın korunmasını sağlar.

Gliadinlerin alt gruplarının yüzdesel oranı ve içerisindeki aminoasit çeşitlerine miktarları Çizelge 2.6'da verilmiştir. ω-gliadinler, toplam gliadin fraksiyonunun yaklaşık %8'ini oluşturmakta ve yüksek glutamin, prolin ve fenilalanin içeriği ile karakterize edilmektedir. Bu grup içinde yer alan ω5 gliadinler (≈55000 kDa), ω1,2-gliadinlere (≈40000 kDa) kıyasla daha yüksek moleküler ağırlığa sahiptir. Çoğu ω-gliadin sistein

içermediğinden dolayı disülfür bağları oluşturma yeteneğine sahip değildir. Bu proteinler büyük oranda glutamin ve prolin açısından zengin, tekrarlayan dizilerden oluşmaktadır (örneğin, PQQPFPQQ). Öte yandan, α/β- ve γ gliadinler, moleküler ağırlıklarının örtüşmesi (≈28000–35000 kDa) ve görece düşük glutamin ile prolin oranları nedeniyle ω-gliadinlerden ayrılmaktadır (National Center for Biotechnology Information 2024).

Gliadin ve glütenin alt gruplarının moleküler ağırlıkları (MW), yüzdesel oranları ve amino asit içerikleri, buğday proteinlerinin işlevsel ve teknolojik özelliklerini anlamada temel bir rol oynamaktadır. Gliadinler içinde, α/β-gliadinler (%28–33) ve γ gliadinler (%23–31) toplam gliadin fraksiyonunun büyük bir kısmını oluşturarak glüten ağının esnekliği ve yapışkanlık özelliklerini önemli ölçüde etkilemektedir. Buna karşılık, ω5 gliadinler (%3–6) ve ω1,2-gliadinler (%4–7) daha düşük oranlarda bulunmakla birlikte, özellikle çölyak hastalığı gibi bağışıklıkla ilişkili süreçlerde spesifik işlevler üstlenmektedir. Glutamin (%35–56) ve prolin (%11–26) gibi amino asitlerin yüksek oranları, gliadin proteinlerinin yapısal stabilitesine ve esneklik sağlayıcı özelliklerine katkıda bulunurken, fenilalanin (%0–9), tirozin (%0–6) ve glisin (%1–19) gibi amino asitler, glütenin ve gliadin alt gruplarının işlevsel çeşitliliğine destek sağlamaktadır (Baloch vd. 2022). Ayrıca, yüksek moleküler ağırlıklı glütenin alt üniteleri (HMW-GS), özellikle x-HMW-GS (%4–9), glüten ağının dayanıklılığını ve ekmek yapımında hacim artırıcı özelliklerini desteklerken, düşük moleküler ağırlıklı glütenin alt üniteleri (LMW-GS, %19–25), glütenin genişleme ve stabilizasyon kabiliyetine önemli katkılar sağlamaktadır.

Çizelge 2.5. Gliadin proteinlerinin yüzdesel dağılımı (Wieser 2007)

Gliadin Türü	MW×10^{-3}	Oranı (%)	Glutamin (%)	Prolin (%)	Fenilalanin (%)	Tirozin (%)	Glisin (%)
ω5 Gliadinler	49–55	3–6	56	20	9	1	1
ω1,2-Gliadinler	39–44	4–7	44	26	8	1	2
α/β-Gliadinler	28–35	28–33	37	16	4	3	2
γ gliadinler	31–35	23–31	35	17	5	1	3
x-HMW-GS	83–88	4–9	37	13	0	6	19
γ-HMW-GS	67–74	3–4	36	11	0	5	18
LMW-GS	32–39	19–25	38	13	4	1	3

2.4.3. Epitop türleri

Epitoplar, yapılarına ve bağışıklık sisteminde nasıl tanındıklarına bağlı olarak iki ana gruba ayrılır. Lineer epitoplar; proteinlerin birincil amino asit diziliminde ardışık olan amino asitlerin oluşturduğu bölgelerdir. Bu epitoplar, antijenin denatüre olduğu durumlarda bile tanınabilir, çünkü amino asit dizisi değişmez. Konformasyonel epitoplar ise, proteinlerin üç boyutlu yapısına bağlı olarak ortaya çıkan epitoplardır. Bu epitoplar, proteinin üç boyutlu yapısındaki uzak amino asitlerin bir araya gelmesiyle oluşur (Rammensee vd. 1995). Bu tip epitoplar, antijen denatüre olduğunda üç boyutlu yapıları bozulduğu için kaybolmaktadırlar. Optimal ve minimal epitoplarda HLA (Human Leukocyte Antigen) sınıf I ve HLA sınıf II'nin bağlanma oluğu, epitopların tanınmasında önemli farklılıklar gösterir (Buus vd. 2012; Van Regenmortel 1996).

HLA sınıf I bağlanma oluğu, kapalı bir yapıya sahip olduğu için, epitop olarak sunulan peptitlerin belirli bir uzunlukta olması gerekir. Bu uzunluk genellikle 8-10 amino asit kalıntısıdır. Eğer peptit daha uzun ise, doğru tanınabilmesi için bu peptit vücutta veya laboratuvar koşullarında doğru uzunluğa kadar parçalanmalıdır. Bu yüzden, HLA sınıf I için en uygun (optimal) büyüklük, aynı zamanda minimal büyüklüğü de ifade eder. Yani, tam olarak bu doğru uzunlukta olan peptitler bağlanır ve bağışıklık sisteminde daha güçlü bir yanıt tetiklenir.

HLA sınıf II bağlanma oluğu ise açık uçlu bir yapıya sahiptir, bu da peptitlerin daha esnek bir şekilde bağlanmasına olanak tanır. Peptitler HLA sınıf II'ye bağlandıklarında, bağlanma oluğunun her iki ucundan da birkaç amino asit "sarkabilir". Bu yüzden, HLA sınıf II ile bağlanacak peptitlerin kesin bir büyüklükte olması gerekmez. Peptitlerin tam olarak kaç amino asit uzunluğunda olduğu önemli değildir, çünkü bağlanma oluğu daha uzun peptitleri de kabul edebilir. Ancak bu peptitlerin ortasında, HLA ile güçlü bir şekilde etkileşen 9 amino asitlik bir "çekirdek" sekans bulunur. Etrafındaki sarkan amino asitler bağlanma etkinliğini etkileyebilir, ancak çekirdek dizilimi asıl belirleyici olandır.

Sonuç olarak, HLA sınıf I bağlanma oluğunun kapalı yapısından dolayı belirli bir uzunlukta peptitlerin gerekli olduğu durumlarda optimal boyut aynı zamanda minimal boyuttur. Buna karşın, HLA sınıf II'de daha esnek bir yapıya sahip bağlanma olduğundan, tam bir optimal boyut belirlemek zor olup, bağlanma etkinliğinde çekirdek dizilimi önem taşır.

2.4.4. İmmunojenik epitoplar

Epitop veya antijenik determinant, bir antijenin, bağışıklık sistemindeki Tarihselorlar veya T hücre reseptörleri tarafından tanınan küçük bir parçasıdır. Yani epitop, antijenin spesifik bir kısmıdır ve bu kısım bağışıklık yanıtını tetikler. Bağışıklık sistemi, epitopları tanıyarak antijenlere karşı savunma mekanizmalarını harekete geçirir. Epitoplar, protein, polisakkarit veya lipit gibi moleküllerin belirli bölgelerinde bulunabilir ve bağışıklık sistemiyle etkileşime giren bu bölgeler oldukça önemlidir.

İmmünojenik epitop, bağışıklık sistemini harekete geçirerek immün yanıt başlatan epitoplardır. Bu epitoplar, antijen sunan hücreler tarafından işlenir ve bağışıklık sistemi hücrelerine (örneğin, T hücreleri) sunulur. İmmünojenik epitoplar, genellikle yabancı proteinlerin bir parçasıdır ve bağışıklık sisteminin onları tanıyarak bir savunma tepkisi üretmesine neden olurlar (Ruiz-Carnicer vd. 2019). Bir epitop, T hücreleri, B hücreleri ve çözünür Tarihselorlar tarafından tanınan, adaptif bağışıklık tepkileri tarafından tanımlanan moleküler bir yapıdır. T hücreleri tarafından tanınan epitoplar, genellikle daha büyük antijenlerin işlenmesinden türetilmiş kısa peptitlerdir. Bu T- hücreleri ile ilgili olarak, CD4 "yardımcı" T hücreleri, HLA sınıf II'ye bağlı genellikle 13–17 kalıntı uzunluğundaki peptitleri tanırken, CD8 "sitotoksik" T hücreleri, HLA sınıf I'e bağlı genellikle 8–10 kalıntı uzunluğundaki peptitleri tanırlar (Sidney vd. 2020).

İmmünojenik epitoplar, çölyak hastalığının patogenezinde merkezi bir rol oynayan, bağışıklık sistemini tetikleyen peptit dizileridir. Çölyak hastalığı glüten proteinlerine karşı gelişen otoimmün bir bozukluktur ve bu proteinler arasında özellikle gliadin, çölyak hastaları için en toksik bileşen olarak tanımlanmaktadır (Wieser vd.

2008). Gliadin ve glütenin proteinlerinde yüksek oranda bulunan glutamin ve prolin amino asitleri, bu proteinlerin sindirilmesini zorlaştırmakta ve bağışıklık sistemi tarafından tanınan immünojenik peptitlerin üretimine yol açmaktadır. Bu immünojenik peptitler, T-hücrelerini uyararak otoimmün bir tepki başlatan epitoplar olarak bilinirler (Ruiz-Carnicer vd. 2019).

Gliadin proteini ve çölyak hastalığı arasındaki ilişki, glüten tüketimine karşı bağışıklık sisteminin verdiği anormal tepkiden kaynaklanmaktadır. Glüten, buğday, arpa ve çavdar gibi tahıllarda bulunan bir protein grubudur ve çölyak hastalığında otoimmün bir reaksiyonu tetikler (Green vd. 2007). Glütenin iki ana bileşeni olan gliadin ve glütenin, çölyak hastalığında rol oynayan başlıca proteinlerdir ve özellikle gliadin, bu hastalığın temel tetikleyicilerinden biri olarak tanımlanır (Sollid 2002). Çölyak hastalığı, glütenin bir bileşeni olan gliadin proteinine karşı anormal bir bağışıklık yanıtı ile karakterizedir. Glüten, buğday, arpa ve çavdarda bulunan bir protein kompleksidir ve çölyak hastalığında immünojenik bir reaksiyon tetikleyen başlıca protein gliadindir. Çölyak hastalığındaki gliadin epitopları, HLA-DQ2 ve HLA-DQ8 molekülleri tarafından sunulan ve T hücreleri tarafından tanınan peptit dizilimleridir. Bu epitoplar bağışıklık sistemi tarafından patojenik kabul edilir ve vücutta inflamatuar bir yanıt başlatır. Gliadin epitoplarının çölyak hastalığındaki rolü şu şekildedir:

Deamidasyon: Gliadindeki glutamin kalıntıları, enzim doku transglutaminazı (tTG) tarafından deamidasyona uğratılır. Bu işlem, glutamin kalıntılarını glutamik asite çevirerek antijenin HLA-DQ2 veya HLA-DQ8 tarafından daha iyi tanınmasını sağlar.

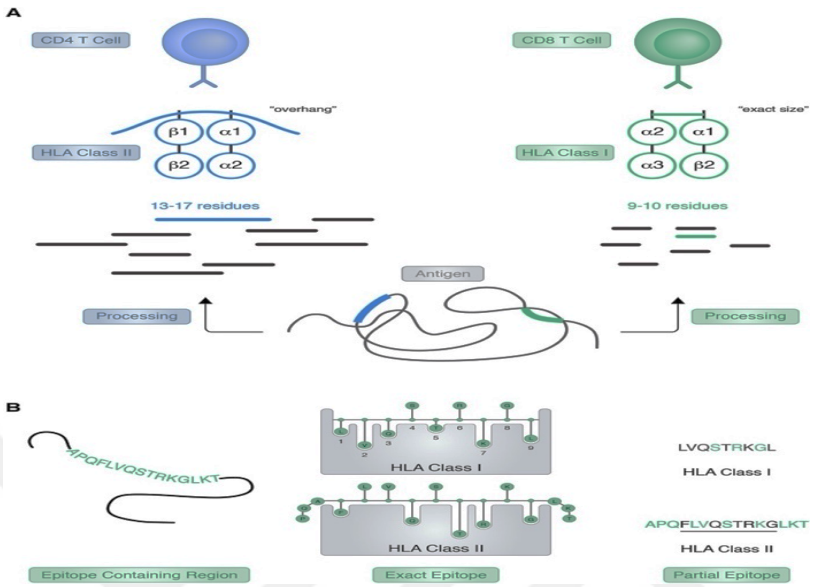
T Hücre Tepkisi: Deamidasyona uğramış gliadin peptitleri, HLA-DQ2 ve HLA-DQ8 molekülleri tarafından sunulur. Bu sunum, bağırsakta CD4+ T hücrelerini aktive eder ve bu da sitokinlerin salgılanmasına, inflamasyona ve bağırsak villüslarının zarar görmesine yol açar.

Patolojik Epitoplar: Çölyak hastalığında, gliadinin özellikle belirli bölgeleri immünojenik olarak kabul edilir. Bu epitoplar arasında: α-gliadin epitopları (örneğin, 33-mer peptiti), γ gliadin epitopları, ω-gliadin epitopları bulunur. Özellikle, α-gliadinin 33-mer bölgesi, çölyak hastalarında güçlü bir bağışıklık yanıtı tetikleyen iyi bilinen bir epitoptur (Schaart vd. 2021; Schalk vd. 2017).

Gliadin proteini ince bağırsakta sindirildiğinde ortaya çıkan peptitler, çölyak hastalarında bağışıklık sistemi tarafından anormal bir şekilde tanınır. Özellikle transglutaminaz 2 (TG2) enzimi, gliadindeki glutamin kalıntılarını glutamik asitlere dönüştürerek peptitleri deamine eder. Bu deamine gliadin peptitleri, çölyak hastalarında HLA-DQ2 veya HLA-DQ8 genleri ile ilişkili bağışıklık hücreleri tarafından tanınarak otoimmün bir tepkiye yol açar (Schuppan vd. 2009). HLA-DQ2 ve HLA-DQ8 gen varyantları, çölyak hastalarının büyük çoğunluğunda bulunur ve hastalığa genetik yatkınlığı artıran önemli faktörlerdir (Trynka vd. 2011).

Bağışıklık sisteminin gliadin peptitlerine verdiği tepki hem hücresel hem de humoral düzeyde gerçekleşir. Hücresel bağışıklık tepkisinde, yardımcı T hücreleri (CD4+) deamine gliadin peptitlerini tanıyarak sitokin salınımını artırır ve bağırsak mukozasında enflamatuvar bir tepki başlar (Jabri vd. 2009). Bu tepki, ince bağırsak villüslarının tahrip olmasına ve besin emilim bozukluklarına yol açar. Humoral bağışıklık

tepkisinde ise B-hücreleri gliadin ve TG2'ye karşı Tarihselor üretir. Anti-gliadin antikorları (AGA) ve anti-transglutaminaz antikorları (anti-TG2) çölyak hastalarının serumunda sıklıkla tespit edilir ve hastalığın tanısında önemli biyo belirteçlerdir (Hill vd. 2005).



Şekil 2.10. Epitopların farklı seviyelerde tanımlanması (Meresse vd. 2009)

Şekil 2.10, antijenlerin işlenmesi ve sunumu sürecinde HLA sınıf I ve II moleküllerinin epitop tanıma mekanizmalarını şematik olarak göstermektedir (Meresse et al., 2009). Şekil A'da, CD4+ T hücrelerinin HLA sınıf II moleküllerine bağlanan 13–17 amino asitlik peptitleri tanıdığı, bu epitopların uç kısımlarında taşma (overhang) gösterdiği vurgulanmaktadır. Buna karşın CD8+ T hücreleri, HLA sınıf I ile sunulan ve genellikle 8–10 amino asitten oluşan daha kısa peptitleri tanır ve bu epitoplar bağlanma oluklarına sıkı şekilde oturur. Şekil B'de ise epitop tanımlamasının üç farklı düzeyi sunulmuştur: epitop içeren bölge (epitope-containing region), tam tanımlı epitop (exact epitope) ve kısmi epitop (partial epitope). Bu ayrım, deneysel verilerin doğruluğuna göre epitopların hangi bağlamda tanımlandığını göstermekte ve bağışıklık yanıtının moleküler hassasiyetini anlamak açısından önem taşımaktadır. Bu yapı, özellikle çölyak hastalığı gibi T hücre aracılı bağışıklık tepkilerinde, gliadin peptitlerinin HLA-DQ2/DQ8 ile sunumu bağlamında kritik öneme sahiptir

Gliadin kaynaklı bağışıklık tepkisi, çölyak hastalarında bağırsak epitelinin ciddi şekilde hasar görmesine ve villus yapısının düzleşmesine neden olur. Bu yapısal bozukluk, besinlerin emilimini engeller ve malnütrisyon (beslenmede bozukluk), ishal, kilo kaybı gibi semptomlara yol açar (Fasano vd. 2012b). Tedavi edilmediğinde çölyak hastalığı, uzun vadede osteoporoz, anemi ve bağırsak lenfoması gibi ciddi komplikasyonlara neden olabilir. Çölyak hastalığının tek etkin tedavisi, glütensiz bir diyet uygulamaktır. Bu diyet, gliadin ve diğer glüten proteinlerine maruziyeti ortadan kaldırarak bağışıklık tepkisini durdurur ve bağırsak mukozasının iyileşmesini sağlar

Sonuç olarak, gliadin proteini çölyak hastalığının gelişiminde kritik bir rol oynar. Gliadin peptitlerine karşı gelişen anormal bağışıklık tepkisi, bağırsak dokusunda ciddi hasara yol açarak çölyak hastalığının karakteristik semptomlarını tetikler. Bu nedenle, çölyak hastalarının glütensiz bir diyet uygulamaları, hastalığın yönetiminde temel bir yaklaşımdır (Rubio-Tapia vd. 2012).

Çizelge 2.6' da gösterilen T-hücre uyarıcı peptit dizileri, çölyak hastalarında aktif olan belirli epitopları temsil etmektedir. DQ2.5-glia-α1a (DQA10501/DQB10201) epitopu, çölyak hastalarının büyük çoğunluğunda bulunur ve özellikle α9 epitop dizisi (PFPQPQLPY) çölyak patogenezinde önemli bir rol oynamaktadır (Paolella vd. 2022). Bu epitoplar, glütenden türeyen peptitlerin deaminasyonu sonucunda daha immünojenik hale gelirler. Transglutaminaz 2 enzimi bu süreçte glutamin kalıntılarını glutamik asitlere çevirerek epitopların MHC sınıf II molekülleri tarafından sunulmasını kolaylaştırır (Schuppan vd. 2009).

Çizelge 2.6. T-hücre uyarıcı peptit dizileri

Gliadin Epitopu	**Diğer İsmi**	**Sekans**
DQ2.5-glia-α1a	DQ2-α-I, α9	PFPQPQLPY
DQ2.5-glia-α1b	DQ2-α-III	PYPQPQLPY
DQ2.5-glia-α2	DQ2-α-II, α2	PQPQLPYPQ
DQ2.5-glia-α3	glia-α20	FRPQQPYPQ
DQ2.5-glia-γ1	DQ2-γ-I	PQQSFPQQQ
DQ2.5-glia-γ2	DQ2-γII, γ30	IQPQQPAQL
DQ2.5-glia-ω1	DQ2-ω-I	PFPQQPQQPF
DQ2.5-glia-ω2	DQ2-ω-II	PQPQQPFPW
DQ8-glia-α1	DQ8-α-I	QGSFQPSQQ
DQ8.5-glia-α1	DQ8-α-I	QGSFQPSQQ

Çölyak hastalığındaki immün yanıtın temelinde, özellikle DQ2 ve DQ8 haplotiplerine sahip bireylerin bu epitopları tanıması yatmaktadır. DQ2.5-glia-α1a ve DQ2.5-glia-α2 epitopları, çölyak hastalarının bağışıklık sistemi tarafından tanınan ve güçlü bir T-hücresi yanıtı oluşturan anahtar peptit sekanslarıdır. Bunun yanında, DQ8-glia epitopları da (örneğin, DQ8-glia-α1: QGSFQPSQQ) çölyak hastalığına yatkınlığı artıran faktörler arasında yer alır (Wilson 2010). Modern buğdayda yapılan seleksiyon çalışmaları ve ıslah yöntemlerinin, bu immünojenik epitopların varlığını ve yoğunluğunu artırmış olabileceği yönünde görüşler de mevcuttur. Bu konuda, son yıllarda popüler medya tarafından modern buğdayın daha toksik ve sağlıksız olduğu iddiaları desteklenmiş ve buğday proteinlerindeki değişimlerin çölyak hastalığı üzerindeki etkileri araştırılmaya başlanmıştır (Van den Broeck vd. 2009). Bu araştırmalar, özellikle çölyak hastalığıyla ilişkili immünojenik epitopların buğdayın protein kimyası üzerindeki etkilerini anlamaya yönelik çalışmalardır. Sonuç olarak, immünojenik epitoplar çölyak hastalığının gelişiminde kritik bir rol oynamaktadır. Özellikle gliadin kaynaklı epitoplar, çölyak hastalarında bağışıklık sisteminin anormal şekilde aktifleşmesine neden olarak

ince bağırsak mukozasında ciddi hasara yol açar. Bu yüzden çölyak hastalarının glütensiz bir diyet uygulamaları hayati önemdedir.

2.5. Epitopların Tanımlama Yöntemleri

İmmünojenik epitopların belirlenmesi için hem deneysel hem de hesaplamalı (in silico) yaklaşımlar kullanılmaktadır. Bu kapsamda kullanılan başlıca yöntemler aşağıda sunulmaktadır:

2.5.1. İmmünoassay (ELİSA) yöntemi

İmmünoassay temelli analizler, epitopların laboratuvar ortamında doğrudan tespit edilmesini sağlayan hassas teknikler arasında yer almakta olup, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) yöntemi, özellikle çölyak hastalarına yönelik gıdalarda gliadin varlığının kantitatif olarak belirlenmesinde en yaygın kullanılan yöntemdir (Doña vd. 2008). İmmünokimyasal kantifikasyon, spesifik Tarihselorlar aracılığıyla gliadin proteinlerinin tanınmasını sağlar ve hem örnek hem de standartlarda benzer antijen-Tarihselor etkileşimlerinin gerçekleşmesini hedefler. Ancak, gliadinin ekstraksiyon sürecinde uygulanan denatüran ajanlar (örneğin 2-ME ve GuHCl), prolamin fraksiyonlarının daha yüksek oranda geri kazanımını desteklese de antijen ve Tarihselor yapılarında denatürasyona yol açarak analitik doğruluğu olumsuz etkileyebilmektedir. Son dönemde geliştirilen ve tespit sınırı 1.5 ppm seviyesine kadar düşürülen ELISA sistemlerinde, R5 olarak adlandırılan monoklonal Tarihselor kullanılmakta ve bu Tarihselor; gliadin, secalin ve hordein proteinlerinde yaygın bulunan QQPFP, QQQFP, LQPFP ve QLPFP motiflerini tanımaktadır (Valdés vd. 2003). Isıl işlem görmüş örneklerde gliadinin verimli şekilde ekstrakte edilebilmesi amacıyla 250 mmol/L 2-merkaptoetanol (2-ME) ve 2 mol/L guanidin hidroklorür (GuHCl) içeren ekstraksiyon tamponları önerilmekte ve bu kombinasyonun gliadin fraksiyonlarının %98–100'ünü etkin şekilde ayırabildiği raporlanmaktadır. Bununla birlikte, Ellis ve arkadaşlarının (1998) çalışmasında, bu tür indirgeyici ajanların, 100 kat seyreltme sonrasında dahi immünoassay performansını bozabildiği ve bu etkinin, muhtemelen antijenin veya bağlayıcı Tarihselorun yapısal bozulmasından kaynaklandığı bildirilmiştir (Ellis vd. 1998).

2.5.2. Western blot yöntemi

Western blot yöntemi ile immünojenik epitopların özellikle gliadinin tespiti, numune hazırlığı, SDS-PAGE (sodyum dodesil sülfat–poliakrilamid jel) elektroforezi, protein transferi, Tarihselor ile tanımlama ve görüntüleme aşamalarını içerir. İlk olarak, buğday veya gluten içeren gıdalardan gliadin proteini alkol bazlı ekstraksiyon yöntemi ile izole edilir. Elde edilen süpernatant, SDS-PAGE jeli üzerinde proteinlerin moleküler ağırlıklarına göre ayrılması için elektroforeze tabi tutulur ve gliadin fraksiyonları genellikle 30-50 kDa arasında gözlemlenir. Daha sonra proteinler nitroselüloz veya PVDF membranına transfer edilerek bloklama işlemi yapılır ve spesifik anti-gliadin primer Tarihseloru ile inkübasyon gerçekleştirilir. Bunu, HRP veya fluorofor ile işaretlenmiş sekonder Tarihselor uygulaması takip eder. Kimyasal substrat (ECL) veya floresan dedektörler kullanılarak membran üzerindeki gliadin varlığı görselleştirilir ve hedef moleküler ağırlıkta parlak bir bant oluşumu gliadin pozitifliği olarak değerlendirilir. Sonuçlar, dijital analiz yazılımları kullanılarak bant yoğunluğu açısından

doğrulanabilir ve böylece gluten kontaminasyonu veya varlığı hassas bir şekilde belirlenebilir.

2.5.3. Radyo binding yöntemi

Radio Binding Assay (RBA), antijen-Tarihselor etkileşimlerinin hassas ve kantitatif bir şekilde ölçülmesini sağlayan güçlü bir immünokimyasal yöntemdir. Bu teknik, özellikle otoimmün hastalıkların tanısında, biyomarker keşfinde ve protein-ligand etkileşimlerinin analizinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Radyo Bağlanma Testi (Radio Binding Assay - RBA), buğday proteinlerine karşı antikorların saptanmasında kullanılan hassas bir yöntemdir. RBA, radyoaktif olarak işaretlenmiş peptit veya proteinlerin spesifik Tarihselorlarla bağlanmasını ölçerek çalışan bir yöntemdir. Öncelikle, hedef protein veya peptit genellikle ^{125}I gibi bir radyoizotop ile işaretlenir. Daha sonra, radyoaktif antijen test edilen serum veya saflaştırılmış Tarihselor ile inkübe edilir. Oluşan antijen-Tarihselor kompleksleri fiziksel yöntemlerle (örneğin filtreleme veya çöktürme) serbest antijenden ayrılır ve bağlanmış antijen miktarı gama sayacı ile ölçülerek kantitatif analiz yapılır (Agardh vd. 2005). RBA'nın en önemli avantajları arasında yüksek hassasiyet ve özgüllük, düşük antijen konsantrasyonlarında bile güvenilir sonuçlar sağlama ve kantitatif analiz imkânı sunma yer alır. Ancak, radyoaktif madde kullanımı özel laboratuvar gereksinimleri doğurur ve güvenlik ile atık yönetimi açısından ek önlemler gerektirir. RBA, özellikle otoimmün hastalıkların teşhisinde (örneğin, myastenia gravis hastalarında anti-aketilkolin reseptör ntikorlarının tespiti), ilaç keşfi ve biyomarker geliştirme süreçlerinde, ayrıca multiple skleroz gibi nörodejeneratif hastalıklarda Tarihselor profillemesi amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. Candon vd. (2012) bir çalışmalarında çölyak hastalığı tanı ve takibinde bu analiz yöntemi ile ticari ELİSA kitinin karşılaştırmasını yapmışlardır. Her iki test de (RBA ve ELISA) yüksek duyarlılık göstermiştir. RBA testinin duyarlılığı %93, özgüllüğü %100 olarak bulunmuştur. RBA testi, ELISA'ya göre daha uzun süre pozitif kalmıştır. Hastaların normale dönmesi için gereken süre ortalama 46 ay olmuştur. RBA testi, düşük Tarihselor seviyelerini tespit etmede daha başarılı bulunmuştur (Candon vd. 2012).

2.5.4. Kütle spektrometrisi tabanlı yöntemler

Bu kapsamda daha çok peptitlerin ayrılması ve tanımlanması için LC-MS/MS (Sıvı Kromatografisi-Kütle/Kütle Spektrometrisi), yöntemi kullanılmaktadır. Kütle spektrometrisine bağlı LC (LC-MS), immünoreaktif tahıl proteinlerinin tanımlanması ve miktarlarının belirlenmesi için en önemli araçtır (Alves vd. 2017). LC-MS yöntemlerinin uygulanması, tahıl türlerini, protein alt birimini tanımlamayı ve aynı deneyde binlerce peptit ve proteini ölçmeyi mümkün kılar. Bu organizmada mevcut tüm olası proteinleri içeren iyi düzenlenmiş bir veri tabanına sahip olmak, dizilerin tanımlanması için büyük bir avantajdır (Ferreira vd. 2014).

İyonizasyon kaynağı ve MS analizörünün türü gibi diğer hususlar da proteinlerin analizini ve dolayısıyla tanımlanmasını ve miktarını etkiler. Bu bilgilerin kullanımıyla, bu proteinlerin proteolize karşı direnci ve tahıl işlemenin etkisi gibi mekanizmalarının anlaşılmasında önemli ilerlemeler açıklığa kavuşturulabilir ve bu da peptit tespiti ve miktar belirleme yöntemlerinin geliştirilmesinden bu tahılların daha iyi tolere edilebilirliği için daha az reaktif genotiplerin seçimine kadar çeşitli hususlara katkıda bulunabilir.

Gluten tespiti için LC-MS/MS kullanıldığında iki farklı yaklaşım benimsenebilir. İlk yöntem, glutenin immünojenitesini değerlendirmek amacıyla bilinen çölyak hastalığı immünojenik peptitlerinin spesifik olarak tespit edilmesine yöneliktir. Bu yaklaşım, belirli α- ve γ gliadin peptitleri (Sealey-Voyksner vd. 2010) α-gliadin peptitleri (Van den Broeck vd. 2015), 33-mer peptit (Schalk vd. 2017) ve çeşitli gluten türevi peptitler (Alves vd. 2017; Chantret vd. 2005; Malalgoda vd. 2018) için uygulanmıştır. İkinci yöntem ise glutenin genel varlığını tespit etmeye odaklanır, ancak spesifik olarak CD-immünojenik peptitleri hedeflemez. En az dokuz amino asit uzunluğuna sahip olmaları, düşük enzimatik sindirilebilirlikleri ve yüksek glutamin-prolin içerikleri nedeniyle CD-immünojenik peptitlerin MS ile tespit edilmesi zor olabilirken, diğer gluten peptitleri daha bol bulunabilir. Bu yöntem, buğday, çavdar, arpa ve yulaftaki belirteç peptitlerini belirlemek için kullanılmıştır (Manfredi vd. 2015). Gluten belirteç peptitlerinin proteomik yöntemlerle tespit edilmesine dair örnekler arasında, biralardaki gluten varlığının belirlenmesi bulunmaktadır (Tanner vd. 2013) LC-MS/MS'in ELISA'ya kıyasla daha yüksek duyarlılık gösterdiğini ve hem glutelin hem de prolaminleri tespit edebildiğini raporlamıştır. Bönick vd. (2017), ekmek ürünlerinde buğday, siyez ve çavdar katkısını doğrulamak için in silico analizler ve LC-MS/MS tabanlı bir yöntem geliştirmiştir (Bönick vd. 2017).

Peptit dizilerinin proteomik araçlarla doğru şekilde tanımlanabilmesi için, bu dizilerin veri tabanlarında yer alması ve analiz sonuçlarının mevcut verilerle karşılaştırılabilir olması gerekmektedir. Ancak buğday üzerine yapılan proteomik çalışmalar, buğday genomunun uzun süre boyunca tam olarak dizilenmemiş olması nedeniyle bazı sınırlamalarla karşılaşmıştır (Bromilow vd. 2017). Bu eksiklik, proteinlerin işlevlerini belirlemek için kullanılan gen ontolojisi tabanlı sınıflandırmaları zorlaştırmıştır. Örneğin, sıradan buğday unlarında farklı şekilde ifade edilen 414 çözünür proteinin %85'inin biyolojik işlevi hâlâ bilinmemektedir (Victorio vd. 2018). Peptit dizilerinin yanlış tanımlanmasını önlemek için, buğday glütenine ait gen dizilerini birleştirmede de novo dizileme tekniği (yeni bir referans genom veya bilinen bir dizi olmadan, bir organizmanın DNA veya protein dizisini sıfırdan belirlemek için kullanılan bir tekniktir. Bu yöntemde, tamamen ham verilerden hareketle genetik veya protein dizileri inşa edilir.) önerilmektedir (Zhang vd. 2014).

Schalk vd. (2017)'de, çölyak hastalığında önemli bir rol oynayan 33-mer peptitinin buğday unlarındaki miktarını belirlemek amacıyla bir çalışma yapılmıştır. 33-mer peptiti, α2-gliadin proteininden türeyen, sindirime karşı oldukça dirençli ve çölyak hastalarının bağışıklık sistemini güçlü bir şekilde tetikleyen bir peptittir. Araştırmacılar, bu peptitin hangi buğday türlerinde ve hangi miktarlarda bulunduğunu belirlemek için kararlı izotop seyreltilmiş analiz (SIDA) ve LC-MS/MS yöntemlerini kullanmıştır. Toplamda 57 farklı buğday örneği incelenmiştir. Çalışma da farklı buğday çeşitlerindeki 33-mer peptitinin miktarı, kararlı izotop seyreltme testi ile LC-MS/MS'nin birleştirilmesiyle belirlenmiştir. Araştırmacılar, bu peptitin 23 sıradan buğday ununda ve iki siyez ununda (*T. spelta*) bulunduğunu, ancak tetraploid ve diploid buğday unlarında tespit edilmediğini belirlemiştir. Ayrıca, modern ve eski buğday çeşitleri arasında belirgin bir kümelenme gözlemlenmemiştir. 33-mer peptitinin içeriği ile α-gliadinler, gliadinler, glüten veya ham protein içerikleri arasında doğrudan bir korelasyon bulunamamıştır. Bununla birlikte, hasat yılının, çeşitten daha fazla etkiye sahip olduğu görülmüştür. Bu

çalışma, buğday unlarındaki 33-mer peptitini doğru bir şekilde ölçen ilk araştırmalardan biri olarak öne çıkmaktadır.

Son araştırmalar, tahıllardaki gluten belirteç peptitlerini ölçmek ve farklı tipteki örneklerde gluten konsantrasyonlarını belirlemek için hedefli (targeted) ve hedefsiz (untargeted) yöntemlerin birleşimini kullanmaktadır. Schalk vd. (2018), iç standart olarak etiketli bir peptit kullanarak, LC-MS/MS'nin MRM modunda buğday için 16, çavdar için yedi, arpa için yedi ve yulaf için üç olmak üzere toplam 33 belirteç peptitin eş zamanlı olarak belirlenmesini sağlayan bir metodoloji geliştirmiştir (Schalk vd. 2018). LC-MS/MS sonuçları, R5 ELISA, RP-HPLC ve GP-HPLC-FLD yöntemleriyle karşılaştırılmış ve LC-MS/MS ile diğer yöntemler arasında güçlü bir korelasyon olduğu bulunmuştur. Yöntemler arasında yapılan karşılaştırmada, LC-MS/MS ile GP-HPLC-FLD ($r = 0.909$, $p < 0.005$) ve LC-MS/MS ile R5 ELISA ($r = 0.919$, $p < 0.005$) arasında pozitif korelasyon gözlenmiştir. Yüksek gluten içerikli örneklerde üç yöntem de benzer sonuçlar verirken, düşük gluten içerikli (<100 µg/g) örneklerde LC-MS/MS yöntemi duyarlılık sorunları göstermiştir. Yöntemlerin uygulama süreleri ve maliyetleri karşılaştırıldığında, R5 ELISA en hızlı (2 saat) ve ekonomik yöntem olarak öne çıkarken, LC-MS/MS en uzun süren (39 saat) ve en pahalı yöntem olarak belirlenmiştir. LC-MS/MS yöntemi, özellikle işlenmiş gıdalarda glutenin bir kısmının uzaklaştırıldığı durumlarda kullanışlı olmakla birlikte, yüksek düzeyde uzmanlık gerektirmesi ve rutin analizlerde uygulanabilirliğinin sınırlı olması nedeniyle, şu an için R5 ELISA yöntemi "altın standart" olarak kabul edilmektedir. Çalışma aynı zamanda, çölyak hastalığı ile ilişkili peptitlerin (P10, P11 ve P13) tespitine de odaklanmış ve gelecekte LC-MS/MS yöntemine daha fazla çölyak hastalığı-aktif peptit eklenerek, çölyak hastaları için gıdaların glutensiz durumunun daha kapsamlı bir şekilde izlenebileceği öngörülmüştür. Bu çalışma, 16 buğday belirteç peptitinin konsantrasyonları ile gluten içerikleri arasında bağlantı kuran ilk çalışma olması ve farklı analiz yöntemlerinin detaylı karşılaştırmasını sunması açısından önemli bir referans niteliğindedir.

Hedeflenen LC-MS/MS kullanılırken dikkat edilmesi gereken en önemli hususlardan biri, gluten belirteç peptitlerinin dikkatli seçilmesidir. Tek bir amino asit değişimi, silinmesi, eklenmesi veya translasyon sonrası modifikasyonu, numunenin diğer gluten türevlerini ve muhtemelen immünojenik peptitleri içermesine rağmen belirteç peptitin tespit edilememesine neden olabilir. Bu yöntemlerden uygun olanları bir arada kullanarak daha güvenilir ve doğru sonuçlar elde etmek mümkündür. Belirli bir çalışma için hangi yöntemin en uygun olduğu, çalışmanın kapsamına ve hedef organizmaya bağlıdır.

Son on yılda, iyon hareketlilik spektrometrisi (IMS), yüksek düzeyde homolog birincil yapıları analiz etmek için önemli bir analitik ayırma tekniği olarak öne çıkmıştır. Özellikle gluten proteinleri gibi yapısal benzerliği yüksek moleküllerin ayrıştırılmasında kritik bir rol oynayan IMS, her m/z (kütle/yük) değeri için bir sürüklenme süresi spektrumunun eklendiği ortogonal bir ayırma yöntemine dayanır. (Michaelevski vd. 2010). Bu teknik, iyonların boyut, şekil ve yük gibi fizikokimyasal özelliklerine göre daha detaylı bir şekilde ayrıştırılmasını mümkün kılar. Böylece, aynı m/z değerine sahip peptitlerin veya ters dizilim gösteren peptitlerin üç boyutlu konformasyonlarına göre ayrılması sağlanır. IMS, ilgi duyulan bileşikleri arka plan gürültüsünden ayırt ederek yöntem duyarlılığını artırır ve hem hedefli hem de hedefsiz yaklaşımlarda tanımlama

güvenilirliğini yükselttiği için LC-MS ve GC-MS iş akışlarını destekleyici bir teknik olarak kullanılabilir (Hernández-Mesa vd. 2019).

Yakın zamanda gerçekleştirilen bir çalışmada, MSE ve IMS'in birlikte kullanıldığı Ultra Tanımlı Kütle Spektrometrisi (UDMSE) yöntemi ile farklı buğday unu genotiplerinden elde edilen albümin ve globulinler analiz edilmiştir. Çalışmada, farklı buğday unu genotiplerinden elde edilen albümin ve globulin fraksiyonları, MSE ve IMS tekniklerinin entegre edildiği Ultra Tanımlı Kütle Spektrometrisi (UDMSE) yöntemi ile analiz edilmiştir. MSE (Elevated Energy Mass Spectrometry), tüm iyonları ön seçimsiz şekilde fragmente ederek paralel veri toplama imkânı sunan, hedeflenmemiş peptitlerin taranmasında etkili bir DIA (data-independent acquisition) yöntemidir. IMS (Ion Mobility Separation) ise iyonları yalnızca kütle/yük oranlarına göre değil, aynı zamanda iyonların boyut, şekil ve yük gibi fizikokimyasal özelliklerine göre ayrıştırarak ayırma kapasitesini önemli ölçüde artırmaktadır. Bu iki teknolojinin bir arada kullanılması hem izomerik peptitlerin ayrılmasını sağlamış hem de arka plan sinyalinden kaynaklanan parazitleri azaltarak tanımlama güvenilirliğini yükseltmiştir. Çalışma sonucunda yaklaşık 5900 protein ve 45000 peptit tanımlanmış, 8 peptit/protein için nispeten niceliksel veriler elde edilmiştir. Ayrıca tanımlanan bazı proteinlerin daha önce fırıncı astımı gibi solunum yolu alerjileriyle ilişkilendirildiği bildirilmiştir (Victorio vd. 2018). Bu proteinlerin bazılarının daha önce tanımlandığını ve fırıncı astımı gibi solunum yolu alerjileriyle ilişkili olduğunu bildirmiştir.

Malalgoda vd. (2018) tarafından yürütülen bir çalışmada, son 100 yılda tescillenmiş 30 farklı sert kırmızı yazlık buğday çeşidinde çölyak hastalığı ile ilişkili α-gliadin epitoplarının varlığı ve miktarı araştırılmıştır. Çalışmada, ilk olarak RP-HPLC ile gliadin fraksiyonlarının ayrımı ve zamana bağlı değişimi incelenmiş, ardından Orbitrap Velos sisteminde gerçekleştirilen LC-MS analizleriyle α-gliadin proteinlerine ait immünojenik epitoplar (özellikle glia-α9 ve glia-α20) hem nitel hem nicel olarak belirlenmiştir. Kullanılan cihazlar ve uygulanan analiz prosedürleri şu şekildedir; (1) RP-HPLC yöntemi, gliadin fraksiyonlarının ayrıştırılması ve yarı-kantitatif analizlerinin gerçekleştirilmesi amacıyla uygulanmış; bu analizlerde Agilent Zorbax 300SB-C18 kolonu (4.6 × 250 mm, 5 µm) ve Agilent 1100 dedektör sistemi kullanılmış, ölçümler 210 nm dalga boyunda yapılmıştır. İkincil olarak LC-MS yöntemi, gliadin fraksiyonlarının nitel düzeyde karakterizasyonu için tercih edilmiş ve analizler Thermo Fisher Scientific firmasına ait Orbitrap Velos sistemiyle yürütülmüştür. Bu kapsamda protein sindirimi sonrasında elde edilen peptitler üzerinden spektrumlar elde edilerek kalitatif veri üretilmiştir. Sonrasında seçilmiş tepki izleme (SRM) yöntemiyle özellikle glia-α9 ve glia-α20 epitoplarının göreli kantifikasyonu gerçekleştirilmiş; analizler QTRAP 5500 kütle spektrometresi ile yapılmış ve iyon geçişlerinin optimizasyonu Skyline ile Analyst yazılımları aracılığıyla sağlanmıştır. Son olarak mutlak kantifikasyon çalışmalarında ise ağır izotopla etiketlenmiş sentetik peptitler yardımıyla kalibrasyon eğrileri oluşturulmuş ve peptit miktarları fmol/2 µg protein cinsinden hesaplanmıştır.

Benzer bir yaklaşımla Alves vd. (2018), farklı teknolojik özelliklere sahip dokuz buğday ununun alerjenik potansiyelini, immünojenik profillerini değerlendirerek araştırmıştır. Çalışmada hem glüten hem de çözünür protein fraksiyonlarında çölyak hastalığı ve diğer buğday kaynaklı alerjilerin gelişimine neden olabilecek peptitler tespit edilmiştir. Bulgular, alerjen ekspresyonundaki değişkenliğin buğday ununun teknolojik kalitesi ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur. Düşük kaliteli unların belirgin bir

proteomik profili olduğu ve serpin protein ailesine ait iki izoformun yüksek ekspresyonu nedeniyle daha immünoreaktif olabileceği belirlenmiştir (Alves vd. 2018).

Yukarıda sunulan bilgiler doğrultusunda, bu tez çalışmasında gliadin proteinlerinin immünojenik özelliklerini belirlemeye yönelik kapsamlı bir proteomik analiz süreci yürütülmüştür. Bu süreçte gliadin proteinlerinin ekstraksiyonu, miktar tayini ve alt fraksiyonlarının kromatografik yöntemlerle ayrımı yapılmış; ardından bu fraksiyonlara ait proteinlerin SDS-PAGE ile ayrıştırılması, in-gel sindirimi ve peptit izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen peptitlerin LC-QTOF MS ve MALDI-TOF MS yöntemleriyle spektral analizi yapılarak çölyak hastalığıyla ilişkili immünojenik epitoplar belirlenmiştir. Ayrıca elde edilen veriler istatistiksel yöntemlerle değerlendirilerek genotipler arası farklar ortaya konmuştur. Söz konusu analiz adımları, tez çalışmasının materyal ve yöntem bölümünde sunulmuştur.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Tez çalışması kapsamında, kullanılan 24 farklı buğday çeşidi, tescil dönemlerine göre altı farklı gruba ayrılmıştır. Tez içerisinde buğday danelerinde ve ununda yapılan kalite özelliklerinin sonuçları, grafik olarak ve istatistiksel analiz çizelgelerinde verilmiştir. Bunun yanında buğday çeşitlerinin yetiştirme koşullarının da kalite özellikleri ve epitop düzeylerinine etkisi bulgu olarak verilmiş ve sonuçlar karşılaştırılmıştır. Bulgular verilirken, doğal koşullarda yetiştirilen buğdaylar, *''kuru koşullar''*; düzenli sulama yapılarak yetiştirilen buğdaylar *''sulu koşullar''* olarak isimlendirilmiştir.

Buğday çeşitlerinin un formu ile yapılan proteinlerin karakterizasyonu ve immunojenik epitop düzeylerinin belirlenmesi çalışmalarında Tarihsel dönem, yeşil devrim öncesi köy çeşitler seleksiyon ıslahı ile yetiştirilen grup (1931-1936), yeşil devrim öncesi dönem (1968 - 1970) ve yeşil devrim sonrası üç ayrıç dönem olacak şekilde 1979-2000, 2001 – 2010, 2010-2022 sonrası olarak ve ıslah çeşitlerine göre gruplandırma yapılmış tarihsel süreç içerisindeki değişimler değerlendirilmiştir. Bu kapsamda belirlenen gruplar Çizelge 3.1'de sunulmaktadır.

Çizelge 3.1. Tez kapsamında kullanılan buğday çeşitlerinin listesi

Çeşit/Çeşit Adayı	**Tescil Tarihi**	**Tescil Eden Kurum/Kuruluş**	**Tescil Dönemi**	**Tescil Dönemi Grubu**
Mokan (gernik)	1930 < (2019)	AKDENİZ UNI/TASACO A.Ş	Tarihsel	Tarihsel (1930<)
Songar (siyez)	1930 < (2019)	AKDENİZ UNI/TASACO A.Ş	Tarihsel	
Ak 702	1931	GKTAEM	1931-1950	Yeşil devrim öncesi seleksiyon ıslahı ile yetiştirilen
Sertak	1936	GKTAEM	1931-1950	
Bezostaja 1	1968	MAEM	1951-1970	Yeşil devrim öncesi (1968-1970)
Yektay	1968	GKTAEM	1951-1970	
Bolal 2973	1970	GKTAEM	1951-1970	
Gerek 79	1979	GKTAEM	1971-2000	Yeşil devrim sonrası 1979-2000
Kırkpınar 79	1979	TTAEM	1971-2000	
Sultan 95	1995	GKTAEM	1971-2000	
İkizce 96	1996	TARM	1971-2000	
Pehlivan	1998	TTAEM	1971-2000	
Karahan 99	1999	BDUTAEM	1971-2000	
Alparslan	2001	DATAEM	2001-2010	Yeşil devrim sonrası 2001- 2010
Nenehatun	2001	DATAEM	2001-2010	
Konya 2002	2002	BDUTAEM	2001-2010	
Ahmetağa	2004	BDUTAEM	2001-2010	

(Devamı Arkada)

Çizelge 3.1'in devamı

Tosunbey	2004	TARM	2001-2010	Yeşil devrim sonrası 2010-2022
Sönmez 2001	2001	Yeni çeşit adayı	2010- 2022	
Esperia	2011	TASACO A.Ş	2011-2020	
Bora	2014	TASACO A.Ş	2011-2020	
Genesi	2014	TASACO A.Ş	2010- 2022	
Soana	2020	TASACO A.Ş.	2010- 2022	
Galinda	2022	Yeni çeşit adayı	2010- 2022	

3.1.Genetik Materyal

Bu çalışmada, kavuzlu buğday türlerinden Siyez (Songar / Triticum monococcum ssp. monococcum) ve Gernik (Mokan / *Triticum dicoccum* Schrank) türlerine ait, TÜBİTAK 214O401 numaralı proje kapsamında geliştirilen ve üretim izni bulunan çeşit adayları kullanılmıştır. Ayrıca, seleksiyon ıslahıyla seçilen yerel ekmeklik buğday (*Triticum aestivum* L.) çeşitleri ile Yeşil Devrim öncesi (1970 yılı) ve sonrası melezleme ıslahıyla geliştirilen çeşitler dahil edilmiştir. Çalışma kapsamında toplam 24 genotipten oluşan bir genetik materyal seti (Çizelge 3.2) değerlendirilmiştir.

Denemeler, Ilgın/ Konya'da 2022 yılı Ekim ayı ortasında tesadüf blokları deneme desenine göre, her biri üç tekerrürlü olacak şekilde düzenlenmiştir. Yetiştirme işlemleri hem sulu hem de kuru koşullarda gerçekleştirilmiştir. Deneme parselleri, 5 metre uzunluğunda ve 6 sıra olacak şekilde hazırlanmıştır. Sıralar arası mesafe 18 cm olarak belirlenmiş ve ekimler, parsel mibzeri kullanılarak yapılmıştır. Her metrekareye 450 adet tohum ekilmiştir.

Buğday çeşitlerinin yetiştirilmesi için ekim öncesi toprak analizi arazinin farklı yerlerinden toprak örnekleri alınarak yapılmıştır ve sonuçları Çizelge 3.3'te sunulmuştur. Analizler de dikkate alınarak ekimle beraber kuru koşullarda 7 kg N ve 7 kg P_2O_5 ve sulu koşullarda ise 14 kg N ve 14 kg P_2O_5 saf olarak uygulanmıştır. Kuru koşullarda fosforun tamamı ve azotun yarısı ekimle birlikte diğer yarısı ise sapa kalkma öncesi uygulanırken sulu koşullarda fosforun tamamı ile azotun 1/3 ekimle, 1/3 ü sapa kalkma öncesi ve 1/3 ise başaklanma öncesi verilmiştir. Yine sapa kalkma dönemi öncesi 3 g/da metilamin karbonil içerikli ilaçlarla yabancı ot yoğunluğu göz önüne alınarak yabancı ot mücadelesi yapılmıştır.

Çizelge 3.2. Buğday örneklerinin yetiştirildiği deneme arazisi toprak özellikleri

Özellikler	**Birim**	**Analiz sonuçları**	**Değerlendirme**
Bünye	-	Killi tın	-
pH	-	8.22	Hafif alkalin
EC	mS/cm	0.30	Tuzsuz
Kireç	%	46.80	Çok fazla kireçli
Organik madde	%	2.41	Orta
Azot (N)	%	0.12	Orta
Fosfor (P)	ppm	16.53	Az
Potasyum (K)	ppm	302.00	Orta
Kalsiyum (Ca)	ppm	5.25	Fazla
Magnezyum (Mg)	ppm	366.00	Orta
Sodyum (Na)	ppm	120.00	Çok fazla
Değişebilir Na yüzdesi	%	1.71	Alkalilik
Demir (Fe)	ppm	3.40	Az
Mangan (Mn) (ppm)	ppm	9.09	Az
Çinko (Zn) (ppm)	ppm	0.66	Az
Bakır (Cu) (ppm)	ppm	0.72	Yüksek

Tez kapsamında yetiştirilen buğdaylardan doğal koşullarda yetiştirilen buğdaylar, *''kuru koşullar''*; düzenli sulama yapılarak yetiştirilen buğdaylar *''sulu koşullar''* olarak isimlendirilmiştir.

Kuru koşullarda yürütülen denemede çimlenme çıkış ve fide dönemi için yeterli yağış olmadığı için sadece çimlenme, çıkış ve fide dönemi gelişimi için bir sulama yapılmış ve bunun dışında herhangi bir sulama yapılmamıştır. Destek sulu koşullarda farklılık oluşturmak için destek sulu koşullarda çimlenme ve çıkış suyuna ek olarak İç Anadolu ve Geçit Bölgelerinde dane verimi için iki kritik fenolojik dönemde (sapa kalkma, başaklanma) 2 defa yağmurlama sulama yöntemi ile her defada 100 mm/m2 destek sulama gerçekleştirilmiştir. Çalışmalar kapsamında ekimi yapılın buğdayın görüntüleri Şekil 3.1'de verilmiştir.

Şekil 3.1. Tez kapsamında ekilen buğdayların görüntüsü

3.2. Kullanılan Laboratuvar Cihazları

Çalışmalar kapsamında kullanılan enstrümanlar ve bu enstrümanların kullanım amaçları detaylı olarak Çizelge 3.3'te sunulmuştur. Tez çalışmasında kullanılan plastik malzemeler, cam malzemeler, HPLC analiz şişeleri, metal kaşıklar, tek kullanımlık 10 mL'lik steril pipetler ve şarjlı otomatik pipetler ISOLAB / Almanya markalıdır.

Çizelge 3.3. Tez kapsamında kullanılan cihazlar,marka bilgileri ve kullanım amaçları

Cihazlar	**Marka, Model, Ülke**	**Kullanım Amacı**
Etüv	Thermo scientific, ABD	Numunelerin inkübasyon veya kurutma işlemleri için sıcaklık kontrollü ortam
Glutomatik sistem yıkama cihazı	Bastak, 6100, Türkiye	Buğday ve unda ıslak glutenin otomatik yıkanmasıyla gluten miktarının belirlenmesi
Hassas terazi	Ohaus Pioneer, Çin	Kimyasal maddelerin yüksek hassasiyetle tartılması
HPLC cihazı	Agilent, ABD	Gliadin proteininin tanımlanması
Isıtıcılı çalkalayıcı	Biosan, TS-100, Letonya	Buğday numunelerinin sabit sıcaklıkta homojen karıştırılması ve ekstraksiyonu
Isıtıcılı manyetik karıştırıcı	MTOPS, Güney Kore	Çözeltilerin hazırlanması aşamasında çözündürülmesi ve karıştırılması
Laboratuvar tipi öğütücü	IKA, MF10 Basic, Almanya	Buğday tanelerinin un haline getirilmesi
LC-QTOF-MS	Agilent 1290 Infinity LC & G6530B QTOF, ABD	Gliadin peptitlerinin yüksek çözünürlüklü sıvı kromatografisi-kütle spektrometrisi ile analizi
MALDI TOF MS	Bruker Daltonik, Rapiflex, Almanya	Gliadin ve peptitlerin kütle tayini; hedeflenen peptitlerin moleküler ağırlıklarının belirlenmesi

(Devamı Arkada)

Çizelge 3.3'ün devamı

Nem ve Hektolitre Ölçer	Kett, PM 650, Japonya	Buğdaydaki nem oranı ve hektolitre ağırlığının belirlenmesi
pH Metre	Ohaus Starter 3100M, Çin	Sıvıların pH değerlerinin hassas ölçümü
Protein Analiz Cihazı	VELP, NDA 701, ABD	Dumas yöntemine göre toplam azot ve protein oranının belirlenmesi
Santrifüj	Hettich, Rotina 420R, Almanya	Numunelerin ekstraksiyon sonrası çözücüsünden ayrılması
Sedimentasyon (Zeleny) Cihazı	Bastak Instruments, Türkiye	Undaki gluten kalitesi ve çökme indeksinin belirlenmesi
Spektrofotometre	Thermo Fisher Scientific, Multiskan GO, Finlandiya	Mikroplaka bazlı absorbans ölçümleri (BCA aktiviteleri)
Spektrofotometre	Shimadzu, Carry 60, Japonya	Çözeltilerin absorbans ve konsantrasyon analizleri
Su banyosu	Mikrotest, Türkiye	Numunelerin sabit sıcaklıkta inkübasyonu
Tohum Sayıcı	Sinüs Elektronik, SNT 1025, Türkiye	Tohumların sayısal olarak otomatik şekilde sayılması
Ultra Saf Su Sistemi	MES, MP Minipure Super, Türkiye	Ekstraksiyon, HPLC, LC-MS analizlerindede kullanılmak üzere ultra saf su üretimi
Vakum Konsantratör	Thermo Fisher Scientific, Speed vac, ABD	Numune hacminin düşürülmesi için çözücülerin düşük basınç altında uzaklaştırılması
Vorteks cihazı	Isolab, Almanya	Tüplerdeki sıvıların hızlı ve etkili şekilde karıştırılması

3.3. Yöntem

3.3.1. Buğday kalite özellikleri

Buğdayın kalitesinin belirlenmesi amacıyla, bin dane ağırlığı, dane nemi, hektolitre ağırlığı, yaş gluten oranı ve gluten indeksi, protein içeriği, sedimantasyon ve enerji değeri analizleri yapılmıştır. Analizler Tasaco Tarım ve Sanayi A.Ş.'nin kalite kontrol laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.3.1.1. Bin dane ağırlığı

Buğdayda bin dane ağırlığı ölçümü, kalite kontrolü ve ürün verimliliğini değerlendirmek için kullanılan yaygın bir yöntemdir. Bin tane buğdayın ağırlığı, gram cinsinden ölçülerek hesaplanmıştır. Bin dane ağırlığı analizinde, SNT-1025 tohum sayıcı cihazı ile sayılan 1000 adet tohumun ağırlığı tartılarak belirlenmiştir. Sayılan 1000 tane buğday, hassas bir teraziyle gram cinsinden tartılmış ve tartım işlemi sırasında cihazın

hassasiyeti (en az 0.01 g) ayarlanmıştır. Ölçülen değer, doğrudan bin dane ağırlığı olarak kaydedilmiştir.

3.3.1.2. Dane nemi ve hektolitre ölçümü

Hektolitre ağırlığı ve dane nem oranı belirlenmesi için KETT marka PM 650 nem ve hektolitre ölçüm cihazı kullanılmıştır. Alınan dane örnekleri, ölçüm cihazına ait numune kabına Şekil 3.2'de görüldüğü miktarda yerleştirilmiş ve analiz başlatılmıştır. İlk olarak kg/hl cinsinden hektolitre ağırlığı belirlenmiş, ardından nem oranı % olarak tespit edilerek kayıt altına alınmıştır. Her bir buğday çeşidine ait tekrarlı numunelerden danede nem oranı (%), hektolitre ağırlığı (kg/l) değerleri belirlenmiştir.

Şekil 3.2. Dane nemi ölçümü

3.3.1.3. Yaş gluten analizi ve gluten indeksi

Numunelerdeki yaş gluten analizleri, AACC metot 38-12'ye göre gerçekleştirilmiştir. İlgili yönteme göre, 10 g un tartılarak numune kabında %2'lik NaCl içeren 5 ml su ile karıştırılmıştır. Glutomatik sistem yıkama cihazı çalıştırılarak ilk 45 sn. numune yoğurulmuş ve 2 dk boyunca yine %2'lik NaCl ile yıkaması yapılmıştır. Yıkama sonrası, karışım 1400 rpm'de santrifüjlenmiş, sonucunda zayıf gluten kısmı ile sağlam gluten kısmı hassas terazide tartılmıştır. Yaş gluten oranı ve gluten indeksi aşağıda belirtilen Eşitlik 1 ve Eşitlik 2'ye göre hesaplanmıştır. Elde edilen yaş gluten ve gluten indeksi değerleri Tahıl Ürünlerinde Analitik Kalite Kontrolü ve Laboratuar Uygulama Klavuzu'na (Elgün vd. 2012) göre değerlendirilmiştir (Çizelge 3.4).

Yaş gluten miktarı (%) = Sağlam elde edilen gluten miktarı × 10 (Eşitlik 1)

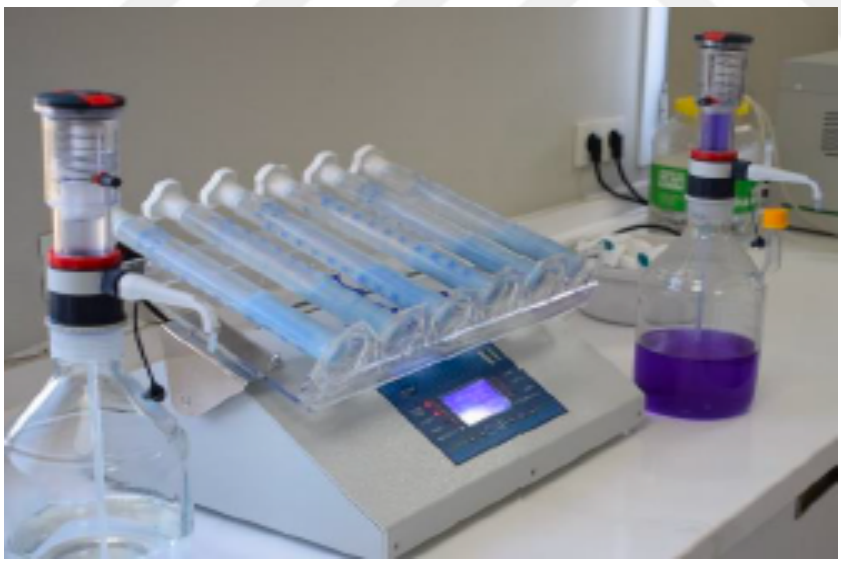
Gluten indeksi (%) = [(Toplam gluten − Zayıf gluten) × 100] / Toplam gluten (Eşitlik 2)

Çizelge 3.4. Yaş glüten oranı ve glüten indeksinin değerlendirilmesinde kullanılan ölçek

Yaş Glüten (%)	Değerlendirme (Yaş Glüten)	Glüten İndeksi (%)	Değerlendirme (Glüten İndeksi)
>27	Yüksek	>80	Kuvvetli hamur
20-27	Orta	50-80	Orta kuvvetli hamur
<20	Düşük	<50	Zayıf ve yapışkan hamur

3.3.1.4. Sedimantasyon analizi

Sedimantasyon analizi için her bir örnekten 3.6 g un tartılarak analiz tüplerine konulmuş ve üzerine 50 ml bromfenol blue çözeltisi eklenip yaklaşık 10 saniye el ile çalkalanmıştır. Sonrasında analiz tüpleri Şekil 3.3'te gösterildiği gibi sedimantasyon cihazına yerleştirilmiş ve salınım frekansı dakikada 40 devir, her devri 60° ve yatay durumdan 30° aşağı 30° yukarı olacak şekilde ayarlanmıştır. Bu ayarlar ile 5 dakika boyunca salınım işlemi gerçekleştirilen analiz tüplerinin üzerine 25 ml SDS test çözeltisi eklenmiş ve 5 dakika daha süreyle cihaza yerleştirilip salınım gerçekleştirilmiştir. Salınım işleminin ardından tüpler hareketsiz ve düz bir ortamda 5 dakika dinlendirilmiş ve dibe çöken çökelti hacmi okunarak sedimantasyon değeri ml olarak kaydedilmiştir. Elde edilen sedimantasyon değerleri Köksel vd. (2000)'ne göre değerlendirilmiştir (Çizelge 3.6).



Şekil 3.3. Sedimantasyon için kullanılan çalkalayıcı sistemi

Çizelge 3.5. Zeleny sedimantasyon değerinin değerlendirilmesinde kullanılan ölçek

Zeleny Sedimantasyon Değeri (ml)	Glüten Miktarı ve Kalitesi
>36	Çok iyi
25-36	İyi
15-24	Zayıf
<15	Yararsız

3.3.1.5. Miksograf analizi

Miksograf analizi AACC 54-40 göre miksograf cihazı kullanılarak yapılmıştır (Anonim 2025). Öncelikle, protein oranları belirlenmiş numuneler cihazın programına kaydedilmiştir ve girilen değerlere göre programın belirlediği ölçekte un ve su hazırlanmıştır (örneğin: 9.77 g un ve 5.87 ml su). Sonrasında, cihazın haznesine belirlenen miktarda un ve su eklenmiştir ve çalışılan numuneye göre cihazın yay seviyesi ayarlanmıştır. Bu işlemlerin ardından, mixer butonuna basılarak analiz başlatılmıştır. Ekranda numuneye ait direnç grafiğinin sona ermesiyle analiz tamamlanmış ve su kaldırma kapasitesi, yumuşama değeri ve % tork*dakika cinsinden enerji değeri kaydedilmiştir.

3.3.1.6. Protein analizi

Numunelerdeki protein düzeyleri Dumas metodu kullanılarak belirlenmiştir. Azot/protein analizörü, öncelikle açılıp stabilizasyon için yaklaşık 1 saat bekletildikten sonra boş yakma yapılmıştır. Numunedeki organik bileşikler yanarak CO_2, H_2O ve NOx gazlarına dönüşmesi için 2-3 saat beklenmiş ve analiz işlemlerine başlanmıştır. Numune iyice karıştırılarak homojen hale getirilip 0.20-0.25 g tartılıp cihaza yüklenmiştir. Her bir analiz 4 dak sürmüş olup sonuç % azot olarak verilmiştir. Daha sonra alınan veriler 5.7 protein faktörü ile çarpılarak % protein miktarı olarak ifade edilmiştir (Beljkaš vd. 2010)

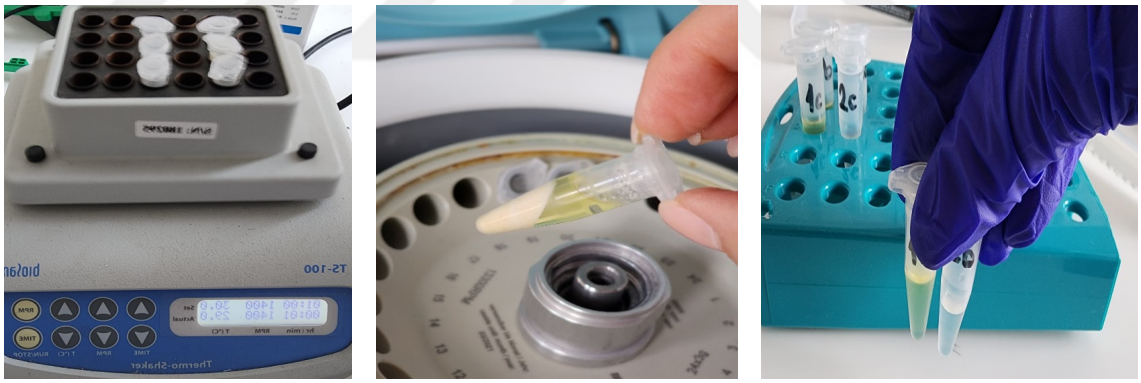
3.3.2. Gliadin proteini düzeylerinin belirlenmesi

3.3.2.1. Gliadin proteinlerinin ekstraksiyonu

Hasat sonrası temel kalite analizleri tamamlanan buğday numunelerinin öğütme işlemi yapılmıştır. Bu amaçla buğday numunelerinden 20 g alınmış ve un ve kepek fraksiyonlarını birbirinden ayırabilmek amacıyla Şekil 3.4'te gösterildiği gibi valsli tip öğütücü ile öğütme işlemi gerçekleştirilmiştir. Un ve kepekler öğütme işlemi sonrasında ekstraksiyon için ayrı ayrı tüplerde +4°C'de muhafaza edilmiştir.

Şekil 3.4. Buğday tanelerinin valsli öğütücü öğütülmesi, un ve kepek olarak ayrıştırılması aşamaları

Literatür çalışmalarında önerilen protokole (Malalgoda vd. 2018) göre gliadin proteinlerinin undan ayrıştırılması için, her un numunesi, steril 1.5 mL'lik eppendorf tüplere yaklaşık 250 mg olacak şekilde tartılmış, üzerine 750 µL %70'lik etil alkol eklenmiş ve ardından 1.5 saat 1400 rpm çalkalama hızında ve 30°C'de ekstrakte edilmiştir. Numuneler daha sonra 10 dakika 4550 devir/dakikada santrifüjlenerek, gliadin içeren süpernatant, yeni bir tüpe 0.45 µm'lik filtreden geçirilerek aktarılmıştır (Şekil 3.5). Her örnekten 3 tekrarlı çalışmalar yapılmış olup, tekrarların sonucunda alınan ekstraktlar ayrı tüplerde -18°C'de saklanmıştır.



Şekil 3.5. Numunelerin ekstraksiyonu ve sonrasında filtreden geçirilmiş gliadin içeren supernatantı

3.3.2.2.Gliadin proteinlerinin miktar analizi

HPLC analizleri öncesinde, örneklerdeki sabit protein miktarının belirlenmesi için Bicinchoninic Acid (BCA) testi (Kits 2025) uygulanmıştır. Protein miktarı ölçümünde birden fazla örnek ve çoklu ölçüm yapıldığından, BCA testi protokolünde belirtilen mikroplaka prosedürü tercih edilmiştir.

Protein standardı hazırlamak amacıyla, 2 mg/mL konsantrasyondaki albümin çözeltisinden Çizelge 3.7'de verilen konsantrasyonlarda seyreltilmiş standartlar hazırlanmıştır. Hazırlanan standartlar ve ölçümü yapılacak örnekler, mikroplakada uygun

kuyucuklara yerleştirilmiştir. Her kuyucuğa 200 µL BCA reaktifi eklenmiş, ardından plaka 30 saniye süreyle çalkalanmış ve 37°C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. Reaksiyon sonrası, absorbans değerleri 562 nm dalga boyunda spektrofotometre ile ölçülmüştür. Örnekler üç tekrarlı olarak analiz edilmiş ve ölçüm değerlerinin ortalamalarına dayalı olarak bir standart eğri grafiği oluşturulmuştur.

Şekil 3.6. BCA reaktifi eklenmiş numunelerin spektrofotometre ölçümü

Gliadin içeren ekstraktlar, ölçüm aralığına uygunluk sağlamak amacıyla 50 kat seyreltme ile hazırlanmıştır. Her ekstrakttan 25 µL mikroplaka kuyucuklarına pipetlenmiştir. Standartlar ile aynı şekilde, her kuyucuğa 200 µL reaktif ajan eklenmiş ve plaka 37°C'de 30 dakika süreyle inkübe edilmiştir. Absorbans ölçümleri, Şekil 3.6'da görüldüğü gibi mikroplaka spektrofotometresinde 562 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir. Protein tayini sırasında, tekrarlı ölçümlerde farklılıklar gözlemlenmiştir. Bu farklılıkları minimize etmek için, BCA kit çözeltilerinin her kullanım öncesinde taze hazırlanması gerektiği, reaktif eklenmesi sonrasında çalkalama ve inkübasyon süreçlerinin eş zamanlı yürütülmesinin önem taşıdığı tespit edilmiştir. Ek olarak, başlangıçta un ekstraktları 10 kat seyreltme ile analiz edilmiş olsa da referans aralıkta daha tutarlı sonuçlar elde edebilmek için 50 kat seyreltme tercih edilmiştir. Deney sırasında, absorbans ölçümleri sadece 562 nm'de değil, aynı zamanda 560 ve 564 nm dalga boylarında da yapılmıştır. Ancak, 562 nm'deki sonuçların diğer dalga boylarıyla uyumlu olduğu ve tutarlı ölçümler sağladığı görülerek analizlerde 562 nm dalga boyunda ölçümlere devam edilmiştir.

Ayrıca, ölçüm sonuçlarının doğruluğunu artırmak amacıyla, her ekstrakt için üçlü teknik replikasyon uygulanmış ve ortalama absorbans değerleri hesaplanarak değerlendirme yapılmıştır. Kullanılan BCA yöntemi, proteinlerin peptid bağlarıyla reaksiyona girerek morumsu bir kompleks oluşturması esasına dayandığından, optik yoğunluk ölçümlerinde reaktiflerin kararlılığı ve mikroplaka yüzeyinin temizliği de ölçüm kalitesini etkileyen faktörler arasında yer almıştır. Bu nedenle, çalışma boyunca aynı marka ve lot numarasına sahip mikroplakalar kullanılmış ve deneyler boyunca sıcaklık değişimlerinin reaktif stabilitesini olumsuz etkilememesi için inkübasyon süresince cihaz kapağı kapalı tutulmuştur.

Çizelge 3.6. BCA protein miktarı tayininde kullanılan standart BSA'nın hazırlanışı

Vial	Seyreltme Hacmi (µL)	BSA Standart Hacmi (µL)	Son BSA Konsantrasyonu (µg/mL)
A	0	300 µL BSA Stogu	2000
B	125	301 µL BSA Stogu	1500
C	325	302 µL BSA Stogu	1000
D	175	Seyreltilmiş B vialinden 175	750
E	325	Seyreltilmiş C vialinden 325	500
F	325	Seyreltilmiş E vialinden 325	250
G	325	Seyreltilmiş F vialinden 325	125
H	400	Seyreltilmiş G vialinden 100	25
I	400	0	0

3.3.2.3. Gliadin alt fraksiyonlarının kromatografik analizi

Bu çalışmada gliadin proteinlerinin kromatografik analizi, Malalgoda vd. (2018) tarafından geliştirilen yöntem esas alınarak gerçekleştirilmiş olup, hem sabit un kütlesine hem de sabit protein miktarına dayalı ekstraksiyon yaklaşımları uygulanmıştır. İlk aşamada, 250 mg sabit un kütlesi ile %70 etanol çözeltisi kullanılarak gliadin proteinleri ekstrakte edilmiş, ardından Pierce BCA yöntemiyle her ekstraktın protein miktarı belirlenmiştir. Sabit protein yaklaşımı doğrultusunda, her örnek 13 µg/µL protein konsantrasyonuna seyreltilerek HPLC analizine alınmıştır. Bu uygulama, Malalgoda ve ark. (2018) çalışmasında vurgulanan normalize enjeksiyon yükü ilkesine paralel olarak, kantitatif karşılaştırmalarda teknik varyasyonları azaltmak amacıyla tercih edilmiştir. Bu bağlamda, her bir enjeksiyonda yaklaşık 300 µg proteine karşılık gelecek şekilde 18–40 µL arasında değişen hacimlerde yükleme yapılmıştır. Ekstraktlar, enjeksiyon öncesinde %50 oranında saf su ile seyreltilmiş, ardından 5 dakika 500 rpm'de karıştırılmış ve 80°C'de 3 dakika süreyle ısıtılmıştır. Bu analizler Çizelge 3.8'de belirtilen analitik koşullarda yürütülmüştür. Ayrıca, analizler için A ve B olmak üzere iki farklı mobil faz hazırlanmıştır. Koşullar belirlenerek, gliadinlerin ayrıştırılması için gradient elüsyon uygulanarak analiz süresi ayarlanmıştır. Bunun sonucunda da toplam kromatografik analiz süresi 70 dakika olarak belirlenmiştir.

Çizelge 3.7. Gliadin ekstraksiyonu için HPLC cihazı analitik koşulları

Cihaz	Agilent 1200
Dedektör	Diode array detector
Kolon	Agilent Zorbax 300SB-C18 (4.6 × 250 mm × 5 µm)
Akış oranı	1 mL/dak
Enjeksiyon hacmi	18- 40 µl
Dalga boyu	210 nm
Hareketli faz	A mobil fazı: %95 su, %5 asetonitril ve %0.1 TFA B mobil fazı: %100 asetonitril ve %0.08 TFA
Kolon Sıcaklığı	55℃

RP-HPLC analizlerinin yanı sıra, ekstraksiyon işlemleri sırasında kullanılan çözücülerin bileşimi ve kullanım koşulları da dikkate alınmıştır. Çözücülerin bileşimi, konsantrasyonu ve pH değerleri kontrol edilerek belirli standartlara uygunluğu sağlanmıştır. Mobil fazlara eklenen TFA miktarının ayarlanması ve stabilizasyonu için, spektrofotometrede dalga boyları eşitlenmiştir. A mobil fazı; %95 su, %5 asetonitril ve %0.1 trifluoro asetik asit (TFA) karışımı ve B mobil fazı ise %0.08 TFA içeren %100 asetonitril karışımı şeklinde hazırlanmıştır (Qian vd. 2008). Buğday çeşitlerinden her birisi 3 tekrarlı ekstraksiyonla elde edildiğinden, HPLC analizleri de tüm tekrarları içerecek şekilde yapılmıştır. Sulu ve kuru koşullarda yetiştirilen 24 çeşidin kuru ve sulu denmelerden gelen farklı unlarından 48 örnek üç tekrarlarıyla birlikte toplam 144 HPLC analizi yapılmıştır.

Şekil 3.7. Analizlerde kullanılan HPLC cihazı

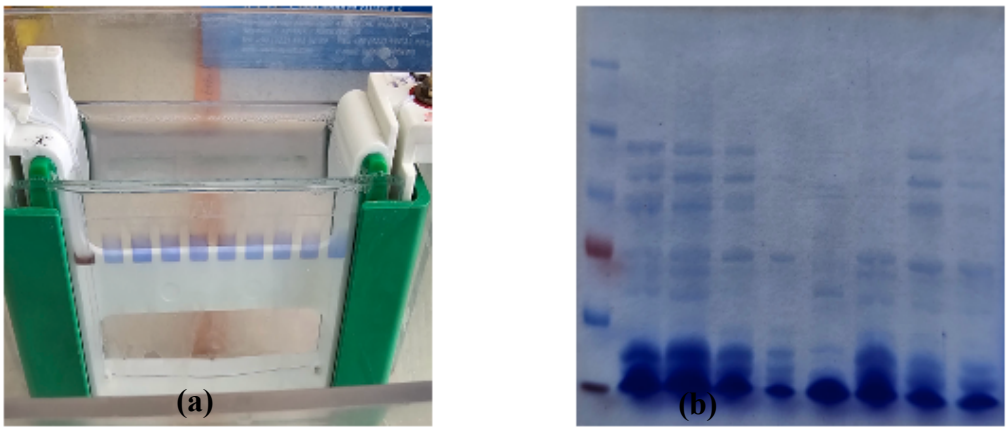
3.3.3. İmmünojenik epitopların tayini ve analizi

3.3.3.1. Gliadin alt fraksiyonlarının jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile elde edilmesi

Ekstraksiyon işlemiyle elde edilen gliadin proteinlerine ait protein bantlarının elde edilmesi ve böylelikle gliadinin alt gruplarının belirlenmesi çalışmaları SDS-PAGE yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda, her bir örnekten 25 µL jel kuyucuklarına yüklenmiş ve proteinlerin moleküler ağırlıklarına göre ayrıştırılması sağlanmıştır. Ayrıştırma işlemi için kullanılan jel iki katmandan oluşmuş olup, ayırma ve

yükleme jelleri ayrı formülasyonlarda hazırlanmıştır. Başlangıçta (Shevchenko vd. 1996) tarafından önerilen Tris-Tricine jel protokolü uygulanmış, ancak bu yöntemle gliadin proteinlerinin etkin biçimde ayrıştırılması mümkün olmamıştır. Bu nedenle, mevcut gliadin proteinlerinin tespiti amacıyla (Shevchenko vd. 1996) çalışmasında bildirilen yöntemin temel parametreleri esas alınarak optimizasyon yapılmış ve bu doğrultuda jel koşulları yeniden düzenlenmiştir. Böylece, gliadin fraksiyonlarının daha net ayrımını sağlayan, amaca özel bir jel elektroforezi yöntemi geliştirilmiştir.

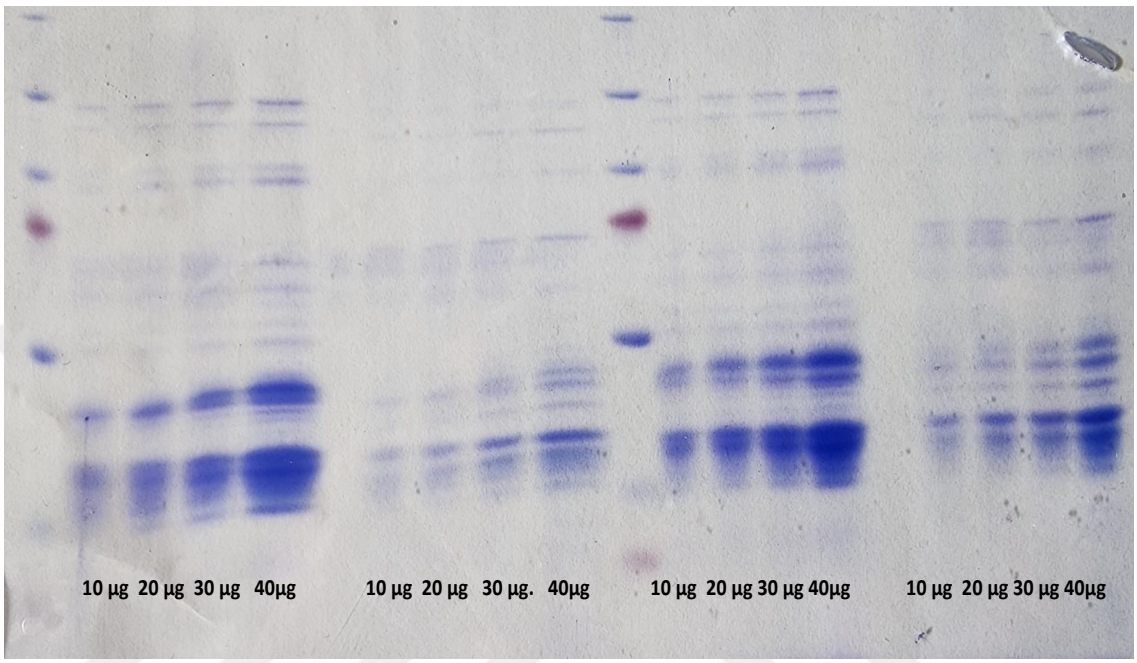
Ayrıştırma jeli, %10 akrilamid içerecek şekilde hazırlanmış olup, 1.5 M Tris-HCl (pH 8.8), %30'luk Bis-akrilamid çözeltisi, SDS (sodyum dodesil sülfat), APS (amonyum persülfat), TEMED (N,N,N′,N′-tetrametiletilendiamin) ve distile su bileşenlerinden oluşturulmuştur. Ayrıştırma jeli, elektroforez tankının jel dökme haznesine aktarılmış, yüzeyi izopropil alkol ile düzlenmiş ve polimerizasyonun tamamlanması amacıyla yaklaşık 30 dakika bekletilmiştir. Alkol uzaklaştırıldıktan sonra, yükleme jeli hazırlanarak ayrıştırma jelinin üzerine dökülmüş ve örnek kuyucuklarının oluşmasını sağlamak üzere tarak yerleştirilmiştir. Yükleme jeli formülasyonu, %30'luk Bis-akrilamid çözeltisi, 0.5 M Tris-Cl (pH 6.8), APS, TEMED ve distile su içermektedir. Örnek hazırlığı sırasında, Tris-Cl tampon çözeltisi kullanılmış ve bu tampon 100 mM Tris-Cl (pH 6.8), gliserol, SDS, Coomassie Blue G-250 ve DTT (ditiyotreitol) içerecek şekilde hazırlanmıştır. Gliadin ekstraktları, 25 µg protein içerecek şekilde seyreltilmiş ve her bir örnek, hazırlanan kuyucuklara dikkatli şekilde yüklenmiştir. Denatürasyon işlemi için örnekler, DTT içeren tampon eşliğinde 5 dakika süreyle 100°C'de su banyosunda ısıtılmıştır. Elektroforez işlemi, öncelikle 100 V'de 30 dakika, ardından 150 V'de 60 dakika olacak şekilde iki aşamalı gerilim programı ile yürütülmüştür. Moleküler ağırlık tayini amacıyla referans olarak PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (10–250 kDa; Thermo Fisher Scientific) kullanılmıştır. Elektroforezin tamamlanmasının ardından jel, Colloidal Coomassie Blue boyası ile gece boyunca boyanmış ve ardından boyanın giderilmesi amacıyla %45 metanol, %45 distile su ve %10 asetik asit içeren çözelti ile yıkanmıştır.



Şekil 3.8. a) Numunelerin jele yüklenmiş hali; **b)** jelin yıkama sonrası görüntüsü

Çalışmalar sırasında, protein miktarının 40 µg olarak jele yüklenmesi sonucu α/β gliadin bölgesinde proteinlerin yoğun şekilde birikmesiyle (aglomerasyon) karakterize edilen bir problem gözlenmiştir (Şekil 3.8.b). Bu durumu optimize etmek ve protein yükleme miktarını ideal seviyeye getirmek amacıyla, farklı miktarlarda (10, 20, 30 ve 40

µg) protein yüklemesi ile SDS-PAGE analizi gerçekleştirilmiş ve denemeler iki farklı un numunesi ile tekrarlanmıştır (Şekil 3.9). Bu analizlerin sonucunda, jelde düzgün ve net bantların elde edilmesi için en uygun yükleme miktarının 25 µg olduğu belirlenmiştir. SDS-PAGE sonrasında, gliadin proteinlerinin uygun moleküler ağırlıklara (kDa) göre ayrıştırılması sağlanmış ve bu süreçte protein ladderi dikkatlice takip edilerek α/β gliadin bölgeleri net bir şekilde tanımlanıp işaretlenmiştir.

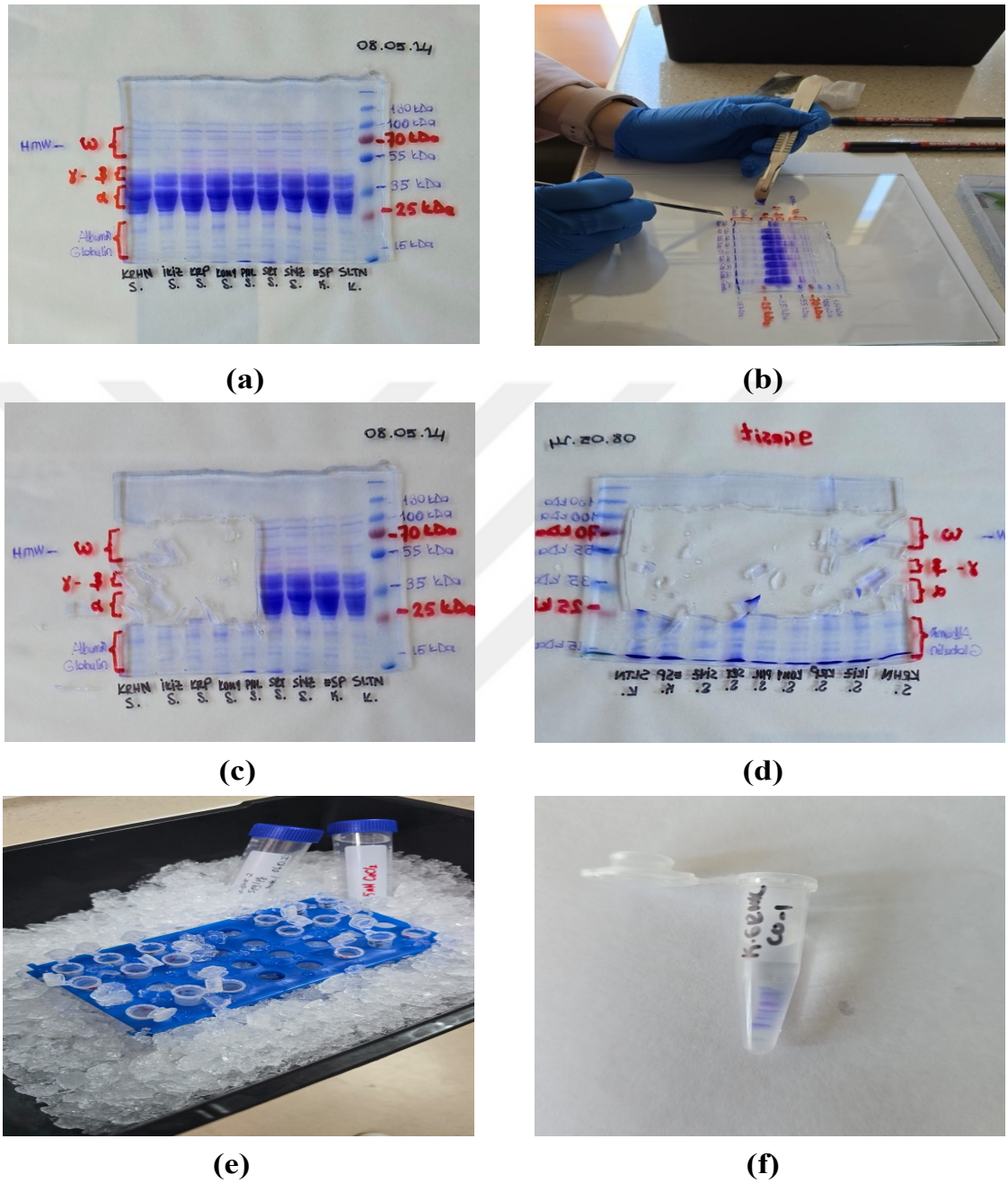


Şekil 3.9. Farklı protein miktarlarının jel görüntüsü

3.3.3.2. Fraksiyonların sindirme (in-gel digestion) işlemleri ve peptit eldesi

SDS-PAGE işlemi ile elde edilen jeller steril bir camın üzerinde Şekil 3.9'da gösterildiği şekilde, ladder yardımı ile ilgili kısımlarından bantlar halinde kesilerek eppendorflara alınmıştır. Kesilen bu bantlar, Shevchenko vd. (1996) ve Van den Broeck vd. (2015) tarafından önerilen protokole göre α- kimotripsin enzimi ile jel parçalamaya tabi tutulmuştur. SDS-PAGE işlemi ile elde edilen jeller steril bir camın üzerinde, proteinlerin moleküler ağırlıklarına göre ayrıştırıldığı (Şekil 3.10.a) şekilde, protein ladder yardımı ile ilgili kısımlarından bantlar halinde kesilmek üzere önceden işaretlenmiştir (Şekil 3.10.b). Bu bantlar dikkatli biçimde kesilerek Eppendorf tüplere alınmış ve her bir gliadin alt fraksiyonu ayrılmıştır (Şekil 3.10.c). Kesilen jel parçaları, net olarak ayrılmış ve sindirime hazır hale getirilmiştir (Şekil 3.10.d). Önerilen in-gel digestion protokolüne uygun olarak, 100 mM NH_4HCO_3 içinde hazırlanan 10 mM DTT çözeltisi ile inkübasyona bırakılmıştır. Bu aşamada tüpler buz üzerinde tutulmuş ve her örnek kontrollü koşullarda korunmuştur (Şekil 3.10.e). DTT ile indirgeme sonrası IAA (55 mM iodoasetamid) ile alkilasyon işlemi gerçekleştirilmiş, ardından jel parçaları yıkanmış ve asetonitril ile dehidre edilmiştir. Tamamen kurutulan jel parçaları, 50 mM NH_4HCO_3, 5 mM $CaCl_2$ ve 12,5 ng/µL α-kimotripsin içeren sindirim tamponuyla parçalanmaya bırakılmıştır. İlk 45 dakika sonrası üst faz uzaklaştırılarak yerine kimotripsinsiz tampon eklenmiş ve sindirim, 37 °C'de gece boyunca sürdürülmüştür. Bu işlem tamamlandığında, her örnek tüpü sindirimi tamamlanmış protein fraksiyonlarını

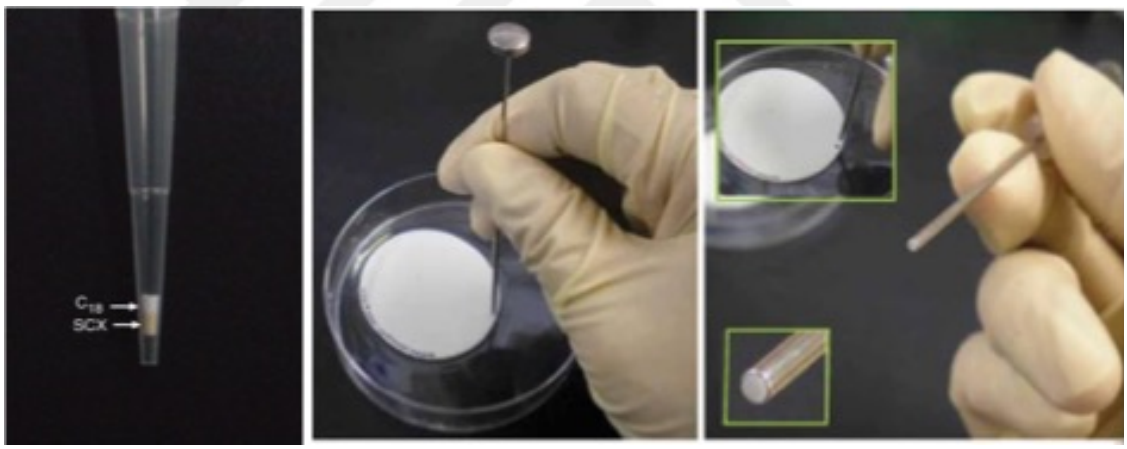
içeren son haline ulaşmıştır (Şekil 3.10.f). Jel parçaları santrifüjlenmiş ve elde edilen peptitler formik asit/asetonitril içeren çözeltilerle izole edilerek LC-MS/MS analizlerine kadar -80°C'de saklanmıştır.



Şekil 3.10. a) Moleküler ağırlıklarına göre bantların ayrıştırılması; **b)** Gliadin alt gruplarının ait olduğu bölgeye göre işaretlenmesi; **c)** Jelden kesim işlemi; **d)** Kesilen jel parçaları; **e)** Jel parçalarının soğuk koşullarda saklanması ve sindirim öncesi hazırlanması **f)** Her bir gliadin fraksiyonuna ait jel parçaları, digestion tamamlanmış son hali

3.3.3.3.Peptitlerden tuzun uzaklaştırılması

Stage (Stop and Go Extraction) tip yöntemi, LC/MS analizine hazırlık sürecinde protein numunelerinin saflaştırılması, konsantre edilmesi ve tuzlardan arındırılması amacıyla geliştirilmiş bir protokoldür. Bu yöntem, numunelerin proteomik analizlerde kullanılmadan önce kalite ve doğruluklarını artırmak amacıyla optimize edilmiştir. Protokol kapsamında numune işleme işlemleri sırasında dört farklı tampon çözeltisi kullanılmıştır: Buffer A (%100 metanol), Buffer B (%0.5 asetik asit), Buffer C (%0.5 asetik asit, %60 asetonitril ve %40 su) ve Buffer D (%0.5 asetik asit, %80 asetonitril ve %20 su). Bu tampon çözeltiler haftalık olarak taze hazırlanmış ve özellikle triflorasetik asit gibi uçucu bileşiklerin cam şırınga ile pipetlenmesine dikkat edilmiştir. Bu husus, solvent stabilitesini korumak ve kontaminasyonu önlemek açısından önem arz etmektedir. Vakum santrifüjde kurutulmuş peptit numuneleri, pipet uçlarına yerleştirilmiş C18 disklerine uygulanmıştır. Şekil 3.11.a'da görüldüğü gibi C18 ve SCX (strong cation exchange) diskleri uç uca yerleştirilmiş biçimde pipet ucuna sabitlenmiştir. Bu sistem, hem ters faz (C18) hem de iyon değişim temizliği için kombine bir yapı sunmaktadır. Şekil 3.11.b'de, steril ortamda C18 diskinin eldivenli bir el yardımıyla yerleştirildiği ve hazırlanmakta olduğu aşama görülmektedir. Bu diskler, analitik doğruluk açısından partikül kaçışı olmayan kontrollü bir ortamda hazırlanmıştır. Şekil 3.11.c ise, hazırlanmış C18 disklerinin metal bir uygulayıcı yardımıyla pipet uçlarına dikkatlice yerleştirildiği nihai hali göstermektedir.



Şekil 3.11. a) C18 ve SCX disklerinin pipet ucuna sıralı yerleştirildiği yapı; **b)** C18 diskinin steril cam ortamda yerleştirilme aşaması; **c)** Uygulama çubuğu yardımıyla diskin pipet ucuna sabitlenmiş son hali

Numunelerin yüklenmesi öncesinde C18 diskleri 100 µL Buffer B ile çözülerek ön şartlama uygulanmıştır. Bu işlemin ardından sırasıyla 200 µL Buffer A ve 200 µL Buffer D çözeltileri C18 disklerinden geçirilmiştir. Her iki işlem de 4000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilerek tamamlanmıştır. Şartlama adımı, ters faz kolonunun aktivasyonunu sağlayarak numunenin daha etkin bağlanmasını kolaylaştırmıştır. Daha sonra dengeleme aşamasında 200 µL Buffer B, aynı santrifüj koşulları altında uygulanmıştır. Bu adım, C18 disklerinin numuneyle uyumlu hale getirilmesini sağlamış ve numunelerin kolon üzerinde dengeli bir şekilde tutulmasına olanak tanımıştır. İşlem tamamlandıktan sonra, numuneler dikkatlice etiketlenmiş Eppendorf tüplerine aktarılmıştır. Yükleme aşamasında, her bir

numune 100 µL hacminde hazırlanarak C18 disklerine dikkatlice uygulanmış ve 4000 rpm'de 1.5 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Alta geçen çözelti yeniden toplanarak bu işlem toplamda üç kez tekrarlanmıştır. Bu tekrarlar, numunenin tam bağlanmasını ve olası kontaminasyonların minimum düzeye indirilmesini sağlamıştır. Yıkama aşamasında, disklerden 200 µL Buffer B geçirilmiş ve 4000 rpm'de 2.5 dakika santrifüj edilmiştir. Bu adımda yeni ve steril Eppendorf tüpler kullanılmıştır. Yıkama işlemi, protein dışı bileşenlerin ve kirleticilerin uzaklaştırılmasını sağlayarak numunenin yüksek saflık düzeyine ulaşmasına katkı sunmuştur.

Elüsyon aşamasında, numunelere sırasıyla 200 µL Buffer C ve ardından iki kez 200 µL Buffer D uygulanmıştır. Her bir elüsyon işlemi, 4000 rpm'de 2 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Bu uygulamalar sonucunda toplamda 600 µL elüsyon hacmi elde edilmiştir. Elüsyon koşulları, proteinlerin kolon üzerinden verimli şekilde çözünmesini sağlayacak şekilde optimize edilmiştir. Peptitlerin eldesi tamamlandıktan sonra, tüm elüsyonlar bir gece boyunca 30°C'de SpeedVac cihazında kurutulmuş ve analiz öncesine kadar -80°C'de muhafaza edilmiştir. Bu düşük sıcaklıkta depolama, numune stabilitesini ve analitik doğruluğu korumak açısından kritik öneme sahiptir.

Ek olarak, protokoldeki tuz giderme işlemleri, numunelerin yüksek kalitede proteomik analizlere uygun hale getirilmesinde temel bir aşamadır. Numuneler hazırlanırken pH ≤ 3 olacak şekilde ayarlanmış, aşırı viskoz çözeltiler (örneğin gliserol ve deterjan içerenler) uzaklaştırılmıştır. C18 disklerinin bağlanma kapasitesinin çekirdek başına 2–4 µg olduğu dikkate alınarak, numune yüklemeleri titizlikle yapılmıştır. Santrifüj süresinin aşılmamasına ve disklerin tamamen yıkanmasına özen gösterilmiştir. Tüm bu aşamalar, proteomik analizlerde kullanılacak numunelerin güvenilirliğini ve tekrarlanabilirliğini artırmak amacıyla dikkatle uygulanmıştır.

3.3.3.4. İmmunogenik epitopların sıvı kromatografisi kuadrupol uçuş zamanı kütle spektrometrisi (LC-QTOF MS) analizi

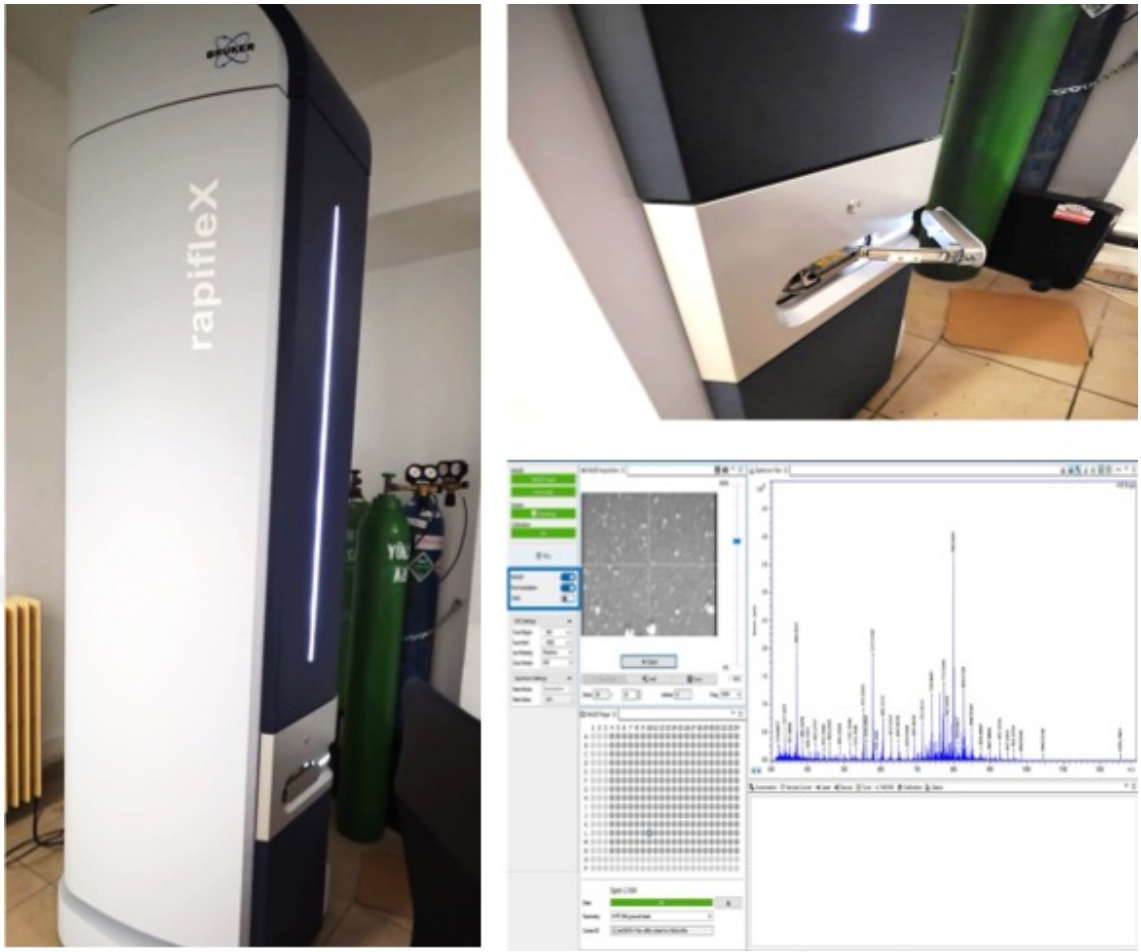
Bu çalışmada, gliadin protein fraksiyonlarının ayrıştırılması ve tanımlanması amacıyla yüksek çözünürlüklü sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi (LC-QTOF MS) yöntemi kullanılmıştır. Analizler, Agilent Technologies G6530B model Q-TOF kütle spektrometresi ve Agilent 1290 Infinity LC sistemi ile Çizelge 3.9'daki parametrelere göre yürütülmüştür. İyonizasyon, Dual Agilent Jet Stream (AJS) elektrospray iyonizasyon (ESI) kaynağı kullanılarak pozitif iyon modunda gerçekleştirilmiştir. LC sistemi, %95 su (H_2O) ve %5 asetonitril (ACN) içeren mobil faz ile çalıştırılmış, kromatografik ayrım 0.300 mL/dk sabit akış hızında, 45°C'de termostatlanmış kolonda yapılmıştır (Schalk vd. 2017). Her örnek için enjeksiyon hacmi 5 µL olarak belirlenmiş, analizler AutoMS² modunda yürütülmüştür. MS tarama aralığı 300–1800 m/z (3 spektrum/sn), MS/MS tarama aralığı ise 100–1700 m/z (2 spektrum/sn) olarak ayarlanmıştır. Çarpışma enerjileri 10 ve 40 eV olarak sabitlenmiş, izolasyon genişliği orta düzeyde (~4 amu) tutulmuştur. Taşıyıcı gaz sıcaklığı 250°C, örtü gazı sıcaklığı ise 300°C olarak belirlenmiş; her iki gaz için de 11 L/dk debi kullanılmıştır. Numune hazırlığında her bir buğday örneğinden 300 mg un alınmış ve bu örneklerden elde edilen toplam protein çözeltileri üzerinden çalışılmıştır. Pik dağılımlarının zaman içinde güvenilir şekilde tanımlanabilmesi amacıyla kromatogramlar ile elde edilen alıkonma zamanları LC-QTOF MS sonuçlarıyla eşleştirilmiş ve fraksiyonel ayrımlar bu zaman pencerelerine göre değerlendirilmiştir (Malalgoda vd. 2018).

Çizelge 3.8. LC-QTOF MS analizinde kullanılan kromatografik ve spektrometrik parametreler

Parametre	**Optimum değer / ayar**
Fragmentor voltajı	175 V
Nozzle voltajı	0 V
Kapiler voltaj	4000 V
Skimmer voltajı	65 V
Drying gas sıcaklığı	250°C
Sheath gas sıcaklığı	300°C
Nebulizer basıncı	40 psi
Akış hızı	0.3 mL/dak
Mobil faz tipi	Gradient elüsyon (%95 H_2O → %100 ACN)
Kolon sıcaklığı	45°C
Tarama modu	AutoMS² (MS/MS)
MS tarama aralığı	300–1800 m/z
MS/MS tarama aralığı	100–1700 m/z
İzolasyon aralığı	Orta (~4 amu)
İyonizasyon modu	Pozitif iyon
İyon kaynağı	Dual AJS ESI
Enjeksiyon hacmi	5 µL
Yazılım	Agilent MassHunter & Skyline
Veritabanı	UniProtKB (peptit tanımlamaları için)

3.3.3.5. İmmunogenik epitopların matris destekli lazer desorpsiyon iyonizasyon uçuş süresi kütle spektrometrisi (MALDI-TOF MS) ile analizi

Numune hazırlığı aşamasında, MALDI matriksi olarak kullanılan α-siyano-4-hidroksisinamik asit (CHCA), %0.1 triflorasetik asit içeren asetonitril:su (30:70, v/v) çözeltisi içerisinde 10 mg/mL konsantrasyonda hazırlanmıştır. MALDI analizleri için, örnekler matriks çözeltisiyle 1:5 (v/v) oranında karıştırılmıştır. Elde edilen karışımdan 1.5 µL'lik bir hacim MALDI hedef plakasına damlatılmış ve oda sıcaklığında kurutulmuştur. Tüm kütle spektrumları, pozitif iyon reflektron modda Bruker Rapiflex MALDI TOF cihazı kullanılarak elde edilmiştir. İyon ekstraksiyonu için kaynak bölgesinde 20 kV'lık ivmelendirme potansiyeli kullanılmıştır. Her bir spektrum, 1000 lazer atımının ortalaması alınarak elde edilmiş olup, toplamda 10000 atım gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3. 12 MALDI-TOF cihazı ve flex kontrol ölçüm ekranı görüntüsü

Gliadin numunelerinin MALDI-TOF kütle spektrometrik analizi, FlexControl 3.4 yazılımı ile yönetilen Rapiflex cihazı (Bruker Daltonik, Bremen, Almanya) kullanılarak reflektron modda gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.12). Kütle spektrumlarının harici kütle kalibrasyonu ovalbumin triptik parçalama ürünleri standardı kullanılarak yapılmıştır. İyon kaynağı voltaj ayarları, tespit edilen bileşiklerin kütle aralığına göre farklılık göstermiştir. Kütle spektrumları Flex Analysis (sürüm 3.4; Bruker Daltonik) yazılımı kullanılarak işlenmiş, spektrumlar yumuşatılmış, taban çizgisi çıkarılmış ve en yoğun sinyale normalize edilmiştir. 600–5000 kDa aralığında, sinyal-gürültü oranı 3'ün üzerinde olan spektrum başına maksimum 100 pik değerlendirmeye alınmıştır. Kümeleme analizine girdi olarak, her buğday örneğine ait toplam dokuz tekrardan en az üçünde tespit edilen sinyaller (Biotyper MSP – main spectra projections formatında) dikkate alınmıştır. MALDI-TOF kütle spektrumlarına dayalı dendrogram, Biotyper yazılımında bulunan ortalama bağlantı algoritması (UPGMA – unweighted pair group method with arithmetic mean) kullanılarak ve Pearson korelasyon katsayısının bir eksiğiyle tanımlanan korelasyon mesafesi metriği temel alınarak oluşturulmuştur.

3.3.4. İstatistiksel çalışmalar

Araştırma sırasında elde edilen tüm veriler, Minitab istatistik analiz yazılımı kullanılarak üç tekrarlı tesadüf blokları deneme düzenine göre analiz edilmiştir. Verilerin değerlendirilmesinde istatistiksel testler, %5'lik anlamlılık düzeyi esas alınarak gerçekleştirilmiştir. Farklı değişkenlerin analiz edilmesi için varyans analizi (ANOVA) yöntemi kullanılmıştır. Analiz sürecinde istatistiksel işlemler Minitab 18 programı ve/veya Microsoft Excel 365 araçları ile yürütülmüştür. Sonuçlar, istatistiksel anlamlılık seviyesini karşılayacak şekilde detaylı bir şekilde incelenmiş ve verilerin güvenilirliği bu yöntemlerle doğrulanmıştır.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

Tez çalışması kapsamında, kullanılan 24 farklı buğday çeşidi, tescil dönemlerine göre altı farklı gruba ayrılmıştır. Tez içerisinde buğday danelerinde ve ununda yapılan kalite özelliklerinin sonuçları, grafik olarak ve istatistiksel analiz çizelgelerinde verilmiştir. Bunun yanında buğday çeşitlerinin yetiştirme koşullarının da kalite özellikleri ve epitop düzeylerinine etkisi bulgu olarak verilmiş ve sonuçlar karşılaştırılmıştır. Bulgular verilirken, doğal koşullarda yetiştirilen buğdaylar, *''kuru koşullar''*; düzenli sulama yapılarak yetiştirilen buğdaylar *''sulu koşullar''* olarak isimlendirilmiştir.

Buğday çeşitlerinin un formu ile yapılan proteinlerin karakterizasyonu ve immunojenik epitop düzeylerinin belirlenmesi çalışmalarında 1968- antik dönem, Yeşil devrim öncesi seleksiyon ıslahı ile yetiştirilen grup, yeşil devrim öncesi dönem (1968 - 1970) ve yeşil devrim sonrası üç ayrıç dönem olacak şekilde 1979-2000, 2001 – 2010, 2010-2022 sonrası olarak ve ıslah çeşitlerine göre gruplandırma yapılmış tarihsel süreç içerisindeki değişimler değerlendirilmiştir. Bu kapsamda belirlenen gruplar Çizelge 4.1'de sunulmaktadır.

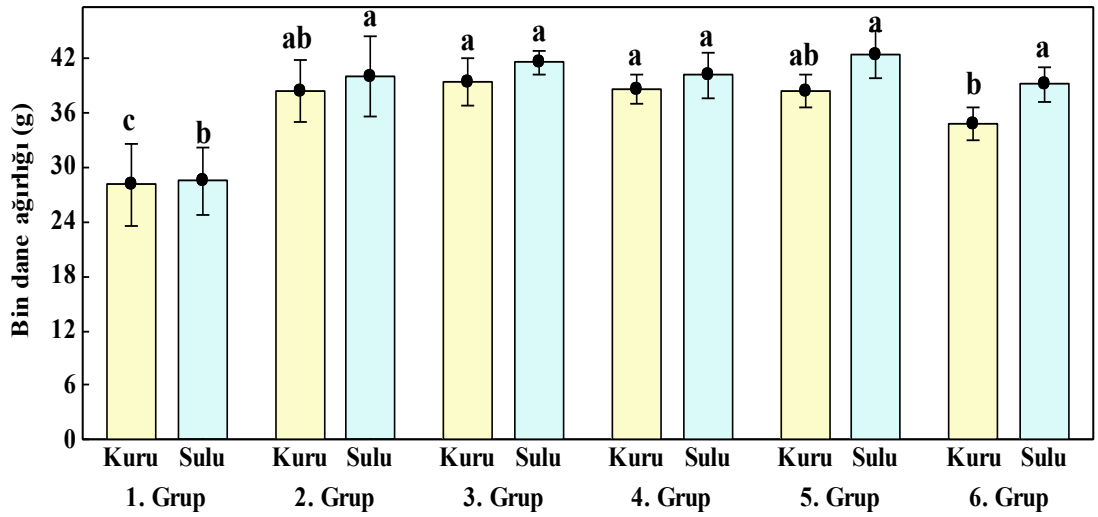
Çizelge 4.1. Tez kapsamında incelenen buğdayların tescil dönemlerine göre sınıflandırılması

Grup No	Tescil Dönemi	Çeşit Sayısı	Çeşit İsimleri
1	Tarihsel <1930	2	Mokan (Gernik), Songar (Siyez)
2	Yeşil devrim öncesi seleksiyon ıslahı <1968	2	Ak702, Sertak
3	Yeşil devrim öncesi melezleme Islahı 1968 - 1970	3	Bezostaja 1, Yektay, Bolal,
4	Yeşil devrim sonrası melezleme ıslahı 1970-2000	6	Gerek 79, Kırkpınar 79, Sultan 95, İkizce 96, Pehlivan, Karahan 99
5	Yeşil devrim sonrası melezleme ıslahı 2001 - 2010	6	Alparslan, Nenehatun, Konya 2002, Ahmetağa, Tosunbey, Sönmez 2001
6	Yeşil devrim sonrası melezleme ıslahı 2011 - 2022	5	Esperia, Bora, Genesi, Soana, Galinda

4.1.Buğday Kalite Analizleri

4.1.1. Bin dane ağırlığı

Bin dane ağırlığı, buğdayda verim ve teknolojik kaliteyi belirleyen temel parametrelerden biridir ve hem genetik yapıya hem de çevresel koşullara bağlı olarak önemli varyasyonlar göstermektedir. EK-26'da buğday çeşitlerinin tescil dönemine göre kuru ve sulu koşullardaki performanslarını karşılaştırmalı olarak sunulmuş, Şekil 4.1'de grafiksel olarak ve istatistiksel anlamlılıklar harf gruplarıyla gösterilmiştir.



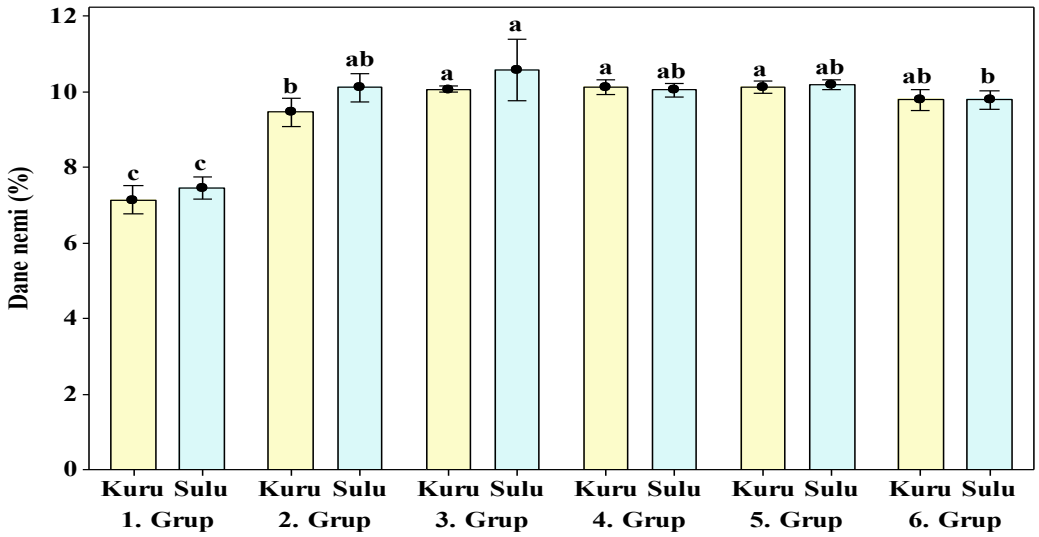
Şekil 4.1. Tescil dönemlerine göre bin dane ağırlığının kuru ve sulu yetiştirme koşullarındaki karşılaştırma grafiği

Antik buğdayları temsil eden 1. grup, her iki koşulda da en düşük bin dane ağırlığına sahip olmuş ve istatistiksel olarak "c" grubunda yer alarak küçük taneli yapılarını yansıtmıştır. Yeşil Devrim öncesini temsil eden 2. grup kuru koşullarda "b", sulu koşullarda "b" grubunda kalmış ve erken melezleme çalışmalarının tane iriliğini artırma yönündeki sınırlı etkisini ortaya koymuştur. 3. grup (1968–1970), her iki koşulda da "b" grubunda yer alarak ıslah sürecinde önemli bir geçiş dönemini temsil etmiştir. 4. grup, özellikle sulu koşullarda "ab" harf grubunda yer alarak, modern çeşitlerle kıyaslandığında daha düşük stabilite göstermiştir. Buna karşılık, 5. ve 6. gruplar hem kuru hem sulu koşullarda en yüksek bin dane ağırlığına ulaşmış ve istatistiksel olarak "a" grubunda yer alarak modern ıslahın verim artırıcı etkisini açık biçimde ortaya koymuştur. Sulu koşullar genel olarak tüm gruplarda bin dane ağırlığını artırmış olmakla birlikte, bu artış modern gruplarda daha belirgin ve istikrarlı gerçekleşmiştir. Nitekim, çalışmamızda %9.5–11.8 arasında değişen dane nemi koşullarında, antik çeşitlerde bin dane ağırlığı 28–29 g düzeyinde kalırken, modern gruplarda 41–43 g'a ulaşmıştır. Yıldırım vd. (2020) tarafından GAP bölgesinde yürütülen çalışmada ise, dane nemi %9.10 ile %10.05 arasında değişen durum buğdayı çeşitlerinde bin dane ağırlığı 47.18–53.82 g arasında saptanmış ve özellikle Massimo ve Burgos gibi çeşitlerin genetik olarak iri ve yoğun daneli yapıya sahip olduğu belirtilmiştir. Her iki çalışmanın bulguları, dane neminin

optimal sınırlarda tutulduğu koşullarda genetik yapının bin dane ağırlığı üzerindeki belirleyici etkisini ve modern çeşitlerin bu açıdan avantajını ortaya koymaktadır.

4.1.2. Dane nemi

Çeşitli tescil dönemlerine ait buğday genotiplerinin dane nemi düzeyleri hem kuru hem de sulu koşullarda incelenmiş ve sonuçlar Şekil 4.2'de sunulmuştur. Dane nemi parametresi, buğdayın fizyolojik olgunluk düzeyini, hasat zamanlamasını ve depo stabilitesini doğrudan etkileyen önemli bir kalite göstergedir. EK-28'de buğday çeşitlerinin tescil dönemine göre kuru ve sulu koşullardaki dane nemi istatistik tablosu verilmiştir.



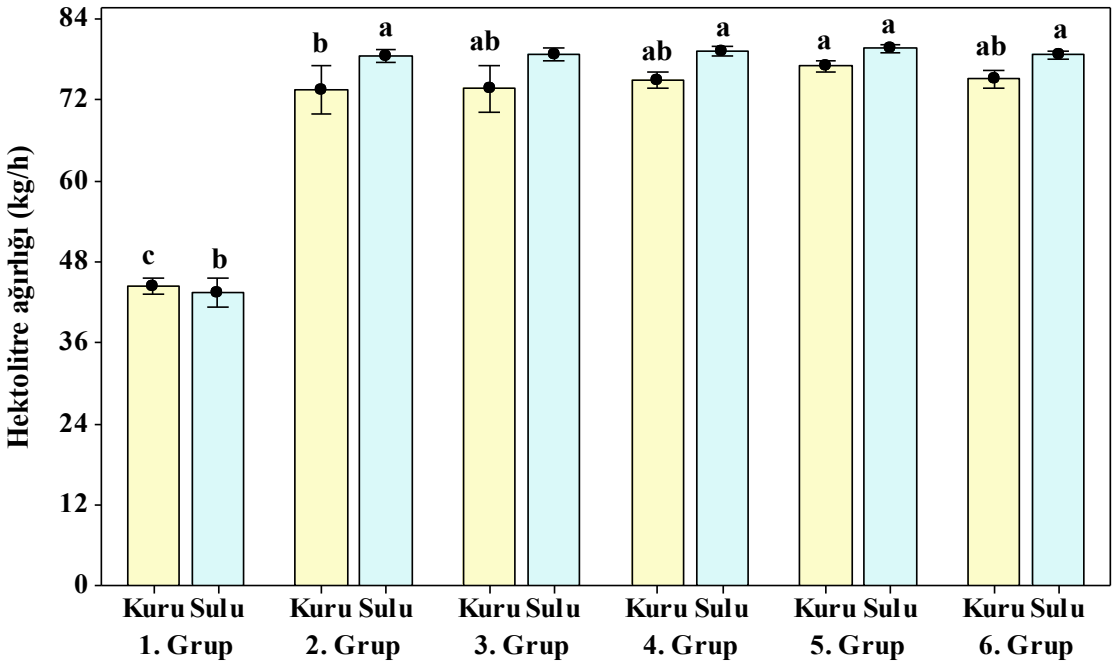
Şekil 4.2. Tescil dönemlerine göre dane nemi değerlerinin kuru ve sulu yetiştirme koşullarındaki karşılaştırma grafiği

Tarihsel çeşitlerin yer aldığı 1. grup, hem kuru (%8.02±0.19) hem sulu koşullarda (%8.25±0.14) en düşük dane nemi değerlerine sahip olmuş ve istatistiksel olarak her iki koşulda da "c" grubunda yer almıştır; bu durum, Tarihsel çeşitlerin düşük nem tutma kapasitesine ve fizyolojik sınırlılıklarına işaret etmektedir. 2. grup, kuru koşullarda %9.76±0.20, sulu koşullarda ise %10.40±0.18 ile anlamlı düzeyde artış göstermiş ve sulu koşullarda "b" grubunda yer almıştır. 3. grup, kuru koşullarda %10.67±0.21 ile tüm gruplar içinde en yüksek ortalamaya ulaşırken, sulu koşullarda %10.76±0.17 değerine ulaşarak "a" grubunda yer almış ve erken dönem ıslah materyallerinin yüksek su tutma eğilimi taşıdığını ortaya koymuştur. Modern tescil dönemlerine ait 4., 5. ve 6. gruplar ise hem kuru hem de sulu koşullarda birbirine oldukça yakın ortalama nem düzeyleri göstermiştir; örneğin 4. grup sırasıyla %10.30±0.17 ve %10.28±0.14, 5. grup %10.25±0.19 ve %10.31±0.22, 6. grup ise %10.18±0.24 ve %10.44±0.15 değerlerine ulaşmıştır. Bu gruplar, istatistiksel olarak "a" veya "ab" harf gruplarında yer almakta olup, dane nemi bakımından belirgin bir stabilite ve standardizasyon eğilimi göstermektedir. Grafik üzerinde yapılan çoklu karşılaştırma analizine göre, modern gruplar arasında nem düzeyi açısından anlamlı bir fark bulunmamakta; bu da modern buğday çeşitlerinin çevresel koşullardan daha az etkilenerek homojen bir nem içeriği profili sunduğunu ortaya koymaktadır.

Bu bulgular tarafından literatürde yürütülen çalışmayla da paralellik göstermektedir (Moya vd. 2024). Söz konusu çalışmada, buğday tanelerinin %7.5 ile %15.5 arası nem düzeylerinde fiziksel ve mekanik özelliklerinin test edildiği ve %13.4'e kadar nem artışının fiziksel parametreleri artırdığı, ancak %15.5 sonrası düşüş gösterdiği belirtilmiştir. Bu kapsamda, bizim çalışmamızda 3. grubun %10.57 ile en yüksek nem düzeyine ulaşması, optimum fizyolojik olgunlukla ilişkili olabileceği gibi, daha yüksek nemin kalite ve depolama açısından risk oluşturabileceğine de işaret etmektedir. Genel olarak, elde edilen bulgular, Türkiye'deki buğday ıslah sürecinin dane nemi açısından hem fizyolojik hem de teknolojik kaliteyi hedefleyen yönde evrildiğini göstermektedir.

4.1.3. Hektolitre ağırlığı

Hektolitre ağırlığı, birim hacimdeki tane kütlesini ifade eder ve buğdayın işlenme kalitesi, öğütme verimi ve depolama dayanımı gibi birçok teknolojik özelliği doğrudan etkiler. Bu çalışmada, hektolitre ağırlığı değerleri kuru ve sulu koşullarda olmak üzere altı farklı tescil grubunda değerlendirilmiş ve sonuçlar Şekil 4.3'te anlamlı harf gruplamaları ile EK-27'de de istatistiksel olarak sunulmuştur.



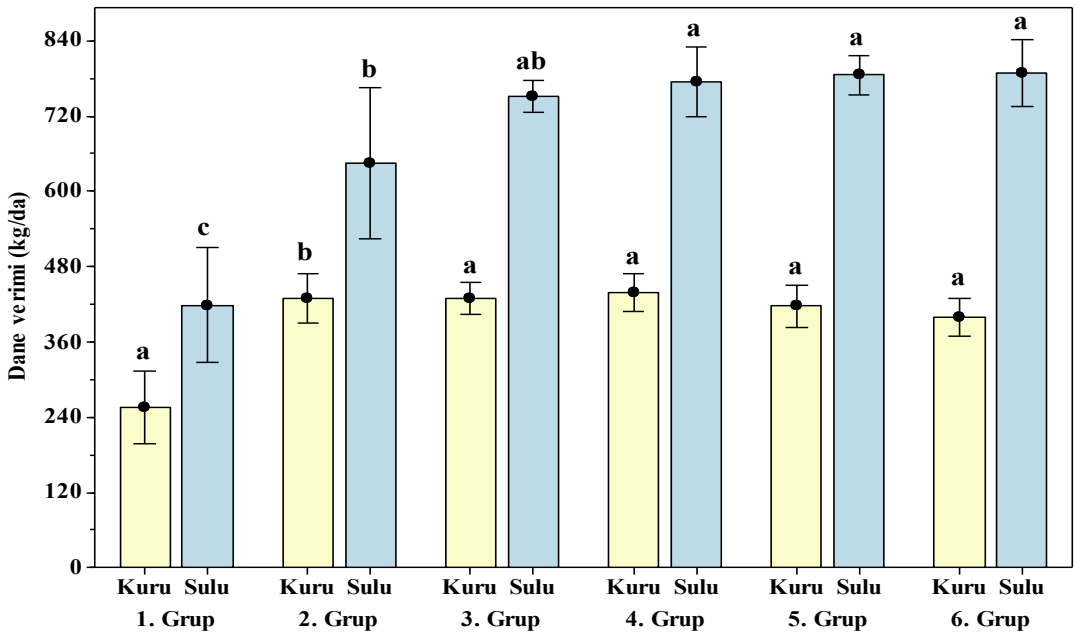
Şekil 4.3. Tescil dönemlerine göre hektolitre ağırlığının kuru ve sulu yetiştirme koşullarındaki karşılaştırma grafiği

Tarihsel buğdayları temsil eden 1. grup, hem kuru (48.02±0.49 kg/hL) hem de sulu koşullarda (49.39±0.56 kg/hL) en düşük hektolitre ağırlıklarına sahip olmuş ve her iki koşulda da "c" istatistiksel grubunda yer almıştır. Yeşil Devrim öncesi seleksiyon ile geliştirilen 2. grup, kuru koşullarda 70.56±0.52 kg/hL, sulu koşullarda ise 73.55±0.48 kg/hL ile "b" grubunda yer almış, bu da ıslah faaliyetlerinin fiziksel kalite parametrelerine olumlu yansımalarını göstermektedir. 3. grup (1968–1970) ise, kuru koşullarda 74.51±0.40 kg/hL, sulu koşullarda ise 76.56±0.82 kg/hL ile daha yüksek hektolitre

ağırlıklarına ulaşmış ve "a" ve "ab" gruplarında yer almıştır. Yeşil Devrim sonrası modern çeşitleri temsil eden 4., 5. ve 6. gruplar ise hektolitre ağırlığı bakımından en yüksek değerleri sunmuştur; bu gruplarda kuru koşullarda sırasıyla 75.15, 75.50 ve 74.20 kg/hL, sulu koşullarda ise 76.63, 76.97 ve 76.32 kg/hL değerlerine ulaşılmıştır. Bu gruplar, istatistiksel olarak genellikle "a" grubunda sınıflanarak birbirlerinden anlamlı düzeyde farklılaşmamış ve homojen kalite düzeyi sergilemişlerdir. Bu sonuçlar, Yeken vd. (2023) tarafından Trakya Bölgesi'nde yürütülen çalışmada da doğrulanmıştır; bu çalışmada farklı çevrelerde değerlendirilen ekmeklik buğday genotiplerinin hektolitre ağırlığı 71–79.1 kg/hL aralığında ölçülmüş, modern çeşitlerin bu parametre bakımından daha istikrarlı ve yüksek değerlere sahip olduğu bildirilmiştir. Aynı şekilde, Morgounov vd. (2013) tarafından Sibirya'da yürütülen uzun dönemli bir çalışmada da, 1900 sonrası geliştirilen modern buğday çeşitlerinde test weight değerlerinin anlamlı biçimde artış gösterdiği, eski genotiplere göre daha kompakt yapılı, yoğun taneli ve fiziksel kalite açısından üstün formların elde edildiği belirtilmiştir. Bu iki bağımsız çalışma, bu tez kapsamında elde edilen hektolitre ağırlığı verilerinin hem ülkemizde hem de uluslararası literatürde bildirilen modern buğday ıslah eğilimleriyle örtüştüğünü göstermektedir.

4.1.4. Dane verimi

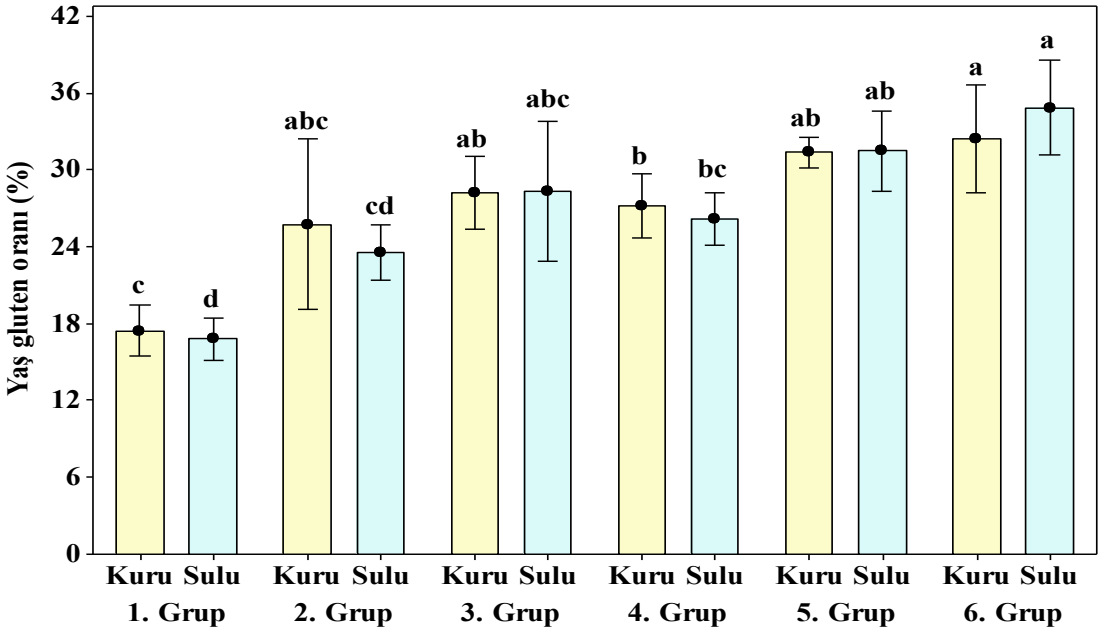
Bu çalışmada, farklı tescil dönemlerine ait buğday çeşitlerinin dane verimi (kg/da) değerleri, Kırtok (1988)'e göre her bir parselden elde edilen dane ürünlerinin tartılması ve kg/da'ya çevrilmesi yöntemiyle hesaplanmış; elde edilen veriler tescil dönemleri ve sulama koşullarına göre karşılaştırmalı olarak analiz edilmiş, bulgular Şekil 4.4'te ve EK-25'te sunulmuştur.



Şekil 4.4. Tescil dönemlerine göre dane verimi özelliğinin kuru ve sulu yetiştirme koşullarındaki karşılaştırma grafiği

4.1.5. Yaş glüten oranı

Bu çalışmada, farklı tescil dönemlerini temsil eden altı buğday grubunun yaş glüten oranları, kuru ve sulu yetiştirme koşullarında karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiş; elde edilen bulgular Şekil 4.5'te ve tablo olarak EK-29'da sunulmuştur.



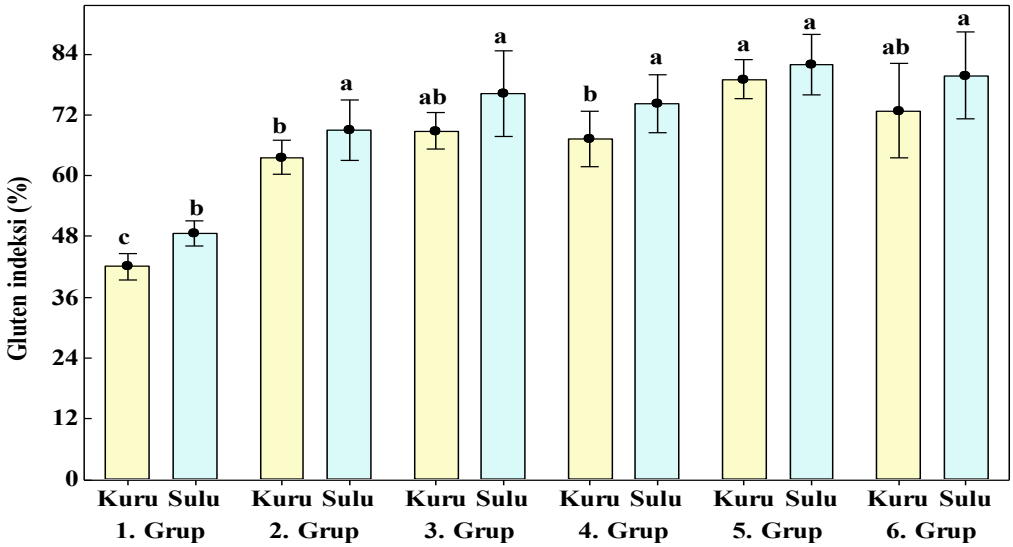
Şekil 4.5. Tescil dönemlerine göre yaş glüten oranının kuru ve sulu yetiştirme koşullarındaki karşılaştırma grafiği

Yaş glüten oranı, unun su tutma kapasitesini ve elastikiyetini belirleyen temel bir kalite göstergesidir. Yapılan varyans analizine göre tescil grupları arasında yaş glüten oranı bakımından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmış ($p<0.05$), bu farkların yönünü belirlemek amacıyla yapılan Tukey testi ile gruplar harf etiketleriyle sınıflandırılmıştır. Tarihsel çeşitleri içeren 1. grup, hem kuru (17.45±2.33) hem sulu (16.80±1.98) koşullarda en düşük yaş glüten oranlarına sahip olmuş ve istatistiksel olarak "c" grubunda yer almıştır. Yeşil Devrim öncesi seleksiyon ıslahı ile geliştirilen 2. grup, kuru koşullarda 25.75±7.99 ve sulu koşullarda 23.55±2.62 yaş glüten oranlarıyla "b" grubuna dahil olmuş; bu düzey, Tarihsel gruba kıyasla belirgin bir artışa işaret etmekle birlikte, modern tescil gruplarının altında kalmaktadır. Geçiş dönemi niteliği taşıyan 3. ve 4. gruplar, kuru koşullarda sırasıyla 28.20±4.16 ve 27.22±5.12; sulu koşullarda ise 28.33±7.85 ve 26.13±4.38 yaş glüten oranlarıyla "ab" istatistiksel grubunda yer almış; modern tescil gruplarına yaklaşan, ancak yüksek varyasyona sahip değerler sunmuştur. Modern döneme ait 5. ve 6. gruplar ise yaş glüten oranı bakımından en yüksek düzeylere ulaşmış, 5. grup kuru koşullarda 31.35±2.31 ve sulu koşullarda 31.47±6.63; 6. grup ise sırasıyla 32.42±6.70 ve 34.82±6.06 oranlarıyla "a" grubunda yer almıştır. Özellikle 6. grubun sulu koşullarda ulaştığı %34.82 oranı, Bodor vd. (2024) tarafından yürütülen Romanya pazarındaki unlarda bildirdiği %30–34 yaş glüten içeriği aralığını aşarak, yüksek kaliteli un tanımını karşılayan bir düzeye ulaşmıştır. Ayrıca, Kaushik vd. (2015) yaş glütenin yalnızca miktar olarak değil, aynı zamanda fonksiyonel bütünlük ve reolojik direnç yönünden de değerlendirilmesi

gerektiğini vurgulamış; bu bağlamda modern çeşitlerde saptanan yüksek yaş gluten değerleri, kantitatif artışın yanı sıra teknolojik kalite hedeflerine ulaşılmış olduğunu da göstermektedir. Grafik üzerindeki hata çubukları varyasyonu temsil etmekte olup, özellikle 5. grupta kuru koşullarda varyasyonun düşük olması, bu grubun genetik olarak daha stabil olduğunu göstermektedir. Sonuç olarak, elde edilen bulgular, yaş gluten oranının genetik seleksiyon ve çevresel etmenlerle birlikte şekillendiğini, modern tescil gruplarında bu özelliğin hem nicel hem işlevsel olarak anlamlı şekilde iyileştirildiğini ortaya koymaktadır.

4.1.6. Glüten indeksi

Bu çalışmada, farklı tescil dönemlerine ait altı buğday grubunun kuru ve sulu koşullardaki gluten indeks değerleri karşılaştırılmış ve bulgular Şekil 4.6'da grafiksel olarak, Ek-30'da istatiksel sunulmuştur.



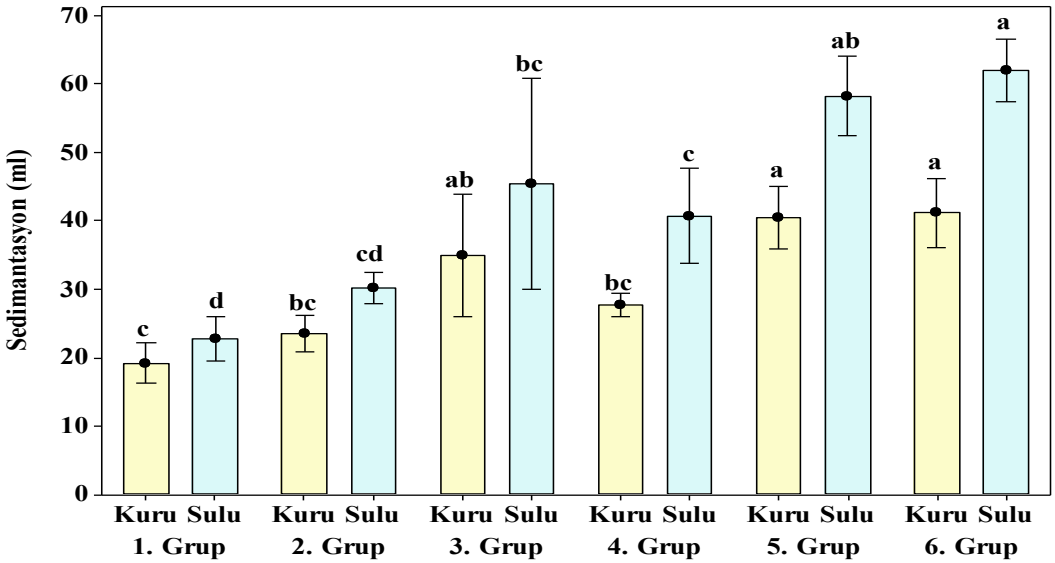
Şekil 4.6. Tescil dönemlerine göre glüten indeksinin kuru ve sulu yetiştirme koşullarındaki karşılaştırma grafiği

ANOVA ve ardından yapılan çoklu karşılaştırma testi (Tukey) sonucunda tescil grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptanmış, bu farklar harf grupları ile gösterilmiştir. Tarihsel genetik yapıya sahip çeşitleri içeren 1. grup, kuru koşullarda %42.00±0.42 ve sulu koşullarda %48.50±2.12 ortalama değerleri ile tüm gruplar içinde en düşük gluten indeksine sahip olmuş ve bu durum "c" istatistiksel grubu ile ifade edilmiştir. Bu sonuçlar, kavuzlu ve tetraploid yapıya sahip Tarihsel çeşitlerin gluten ağ yapısının gevşek ve düşük dayanımlı olmasından kaynaklı olarak modern teknolojik süreçlerde sınırlı kullanıma uygun olduğunu göstermektedir. 2. grup (Yeşil Devrim öncesi seleksiyon ıslahı), kuru koşullarda %63.50±2.55, sulu koşullarda ise %69.00±5.66 değerlerine ulaşarak "b" grubunda yer almış; bu da gluten kalitesinde önceki gruba kıyasla iyileşme olduğunu ancak modern seviyeye erişilemediğini ortaya koymuştur. 3. ve 4. gruplar ise sırasıyla %68.77±4.74 – %76.10±11.15 (3. grup) ve %67.22±11.17 – %74.12±12.16 (4. grup) değer aralıklarıyla "ab" grubunda yer alarak gluten indeksinde belirgin ilerlemeyi yansıtmaktadır. Modern ıslah gruplarını temsil eden 5. ve 6. gruplar ise gluten indeksi açısından en yüksek değerlere sahip olmuştur. 5. grup kuru koşullarda

%78.97±7.81, sulu koşullarda %81.83±12.37 oranlarıyla "a" grubunda yer alırken; 6. grup sırasıyla %72.74±17.82 ve %79.66±16.26 ile yine yüksek değerlere ulaşmış ancak daha geniş varyasyon göstermiştir. Bu bulgular, T. (2021) tarafından bildirilen ve Tarihsel kavuzlu buğdayların düşük, modern çeşitlerin ise yüksek gluten indeksine sahip olduğunu ortaya koyan sonuçlarla tutarlıdır. Ayrıca Yeken vd. (2023), Batı Türkiye'de yürüttükleri araştırmada modern çeşitlerin gluten indeksinin %62–97 aralığında seyrettiğini ve bu değerlerin bazı genotiplerde %80'in üzerine çıktığını bildirmiştir. De Santis vd. (2017) tarafından modern İtalyan makarnalık buğday üzerine yapılan bir çalışmada ise modern genotiplerde gluten indeksinin %75'e kadar yükseldiği, Tarihsel çeşitlerde ise bu değerin %5–13 gibi oldukça düşük seviyelerde kaldığı belirtilmiştir. Bu bağlamda, mevcut çalışmada elde edilen gluten indeksi verileri hem ulusal hem uluslararası literatürle uyumluluk göstermektedir.

4.1.7. Sedimantasyon analizi

Zeleny sedimentasyon analizi, buğday ununun gluten kalitesi ve su tutma kapasitesini değerlendiren önemli bir fiziksel parametre olup, bu çalışmada farklı tescil dönemlerine ait buğday çeşitlerinin kuru ve sulu koşullardaki sedimentasyon değerleri analiz edilmiş ve elde edilen bulgular Şekil 4.7'de ve EK-32'de sunulmuştur.



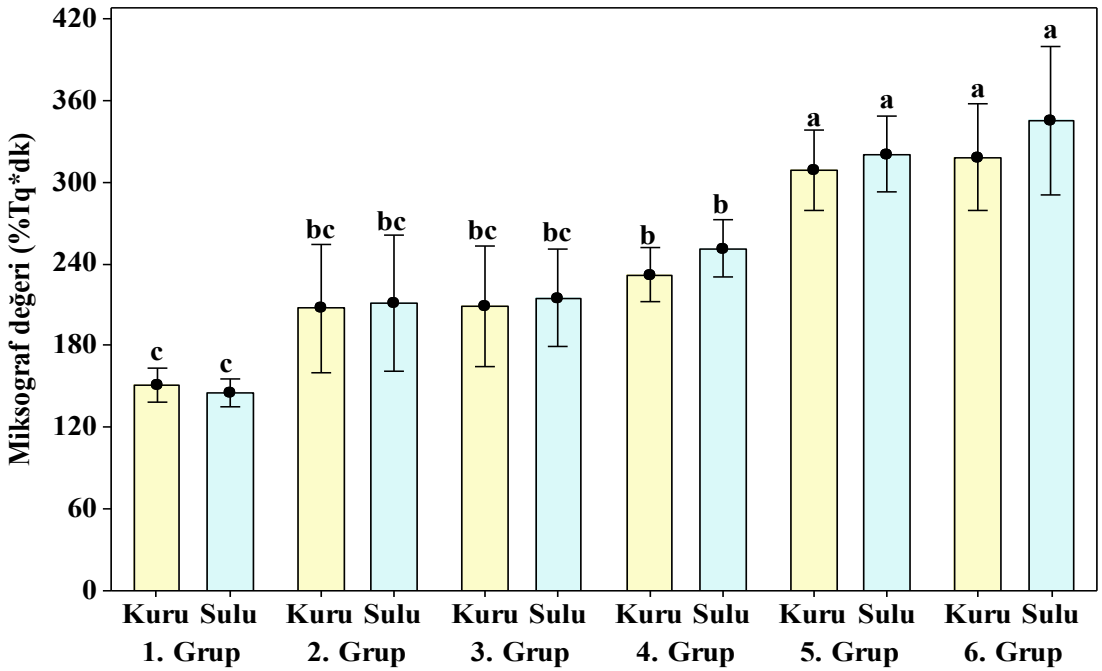
Şekil 4.7. Tescil dönemlerine göre sedimantasyon değerinin kuru ve sulu yetiştirme koşullarındaki karşılaştırma grafiği

Yeşil Devrim öncesi döneme ait 2. grup, kuru koşullarda 27.50±2.55 mL, sulu koşullarda ise 30.15±1.63 mL değerleri ile "c" harfiyle işaretlenmiş, gluten kalitesinde Tarihsel gruba göre ilerleme göstermiştir. 1968–1970 yılları arasında tescil edilen 3. grup ise, kuru koşullarda 34.93±12.81 mL, sulu koşullarda 45.33±23.12 mL ile daha yüksek değerlere ulaşmış, "b" grubuna dahil olmuştur; ancak özellikle sulu koşullarda gözlenen yüksek varyasyon, bu döneme ait genotiplerin kalite yönünden heterojen bir yapıya sahip olduğunu ortaya koymaktadır. Yeşil Devrim sonrası modern çeşitleri içeren 4., 5. ve 6. gruplar ise sedimentasyon değeri açısından belirgin üstünlük göstermiştir. Trakya bölgesinde yürütülen iki yıllık bir çalışmada sedimantasyon değerlerinin 17–33 mL

aralığında değiştiği ve bazı modern genotiplerin 30 mL'nin üzerine çıktığı belirtilmiştir (Erekul vd. 2009). Benzer şekilde, Yilmaz vd. (2024) tarafından Erzincan'da yürütülen üç yıllık çok çevreli bir çalışmada sedimantasyon değerlerinin 36.44–36.78 mL aralığında olduğu rapor edilmiştir. Mevcut çalışmada kuru koşullarda elde edilen 29.30 mL (5. grup) ve 35.66±7.82 mL (6. grup) düzeyleri, söz konusu literatürle büyük oranda uyum göstermektedir. Bu artış, çevresel faktörlerin gluten proteinlerinin şişme kapasitesi ve ağ yapısı üzerinde doğrudan etkili olduğunu, bunun da sedimantasyon değerlerine yansıdığını ortaya koymaktadır. Sonuç olarak, bu çalışma, modern buğday çeşitlerinin sadece verim yönünden değil, gluten kalitesi bakımından da optimize edildiğini; Zeleny sedimentasyon analizinin ise bu gelişimi nicel olarak değerlendirmede etkin bir araç olduğunu ortaya koymaktadır.

4.1.8. Miksograf değeri analizi

Miksograf enerji değeri, buğday ununun reolojik davranışını, elastikiyet ve mukavemet gibi teknolojik kalite parametrelerini yansıtan bir ölçüttür. Şekil 4.8'de, tescil dönemlerine göre sınıflandırılmış buğday grupları arasında miksograf enerji değerleri sunulmuştur.



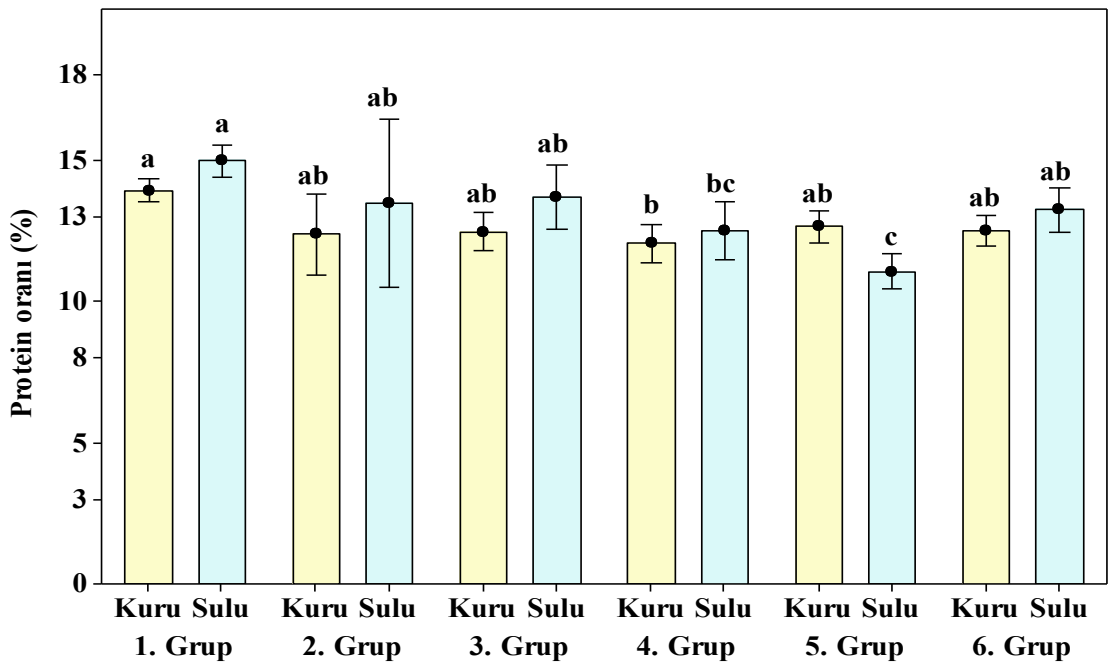
Şekil 4.8. Tescil dönemlerine göre miksograf enerji değerinin kuru ve sulu yetiştirme koşullarındaki karşılaştırma grafiği

EK-33'teki tabloda verilen değerlere göre Tarihsel buğdayları temsil eden 1. grup, kuru koşullarda 145.30±9.48 %Tq*min, sulu koşullarda 151.30±11.74 %Tq*min ile tüm gruplar içerisinde en düşük değerlere sahip olmuş ve "d" istatistiksel grubunda yer almıştır. Yeşil Devrim öncesi döneme ait 2. grup, kuru koşullarda 211.40±50.77 ve sulu koşullarda 207.20±53.74 %Tq*min değerleri ile "c" grubuna dahil olmuş, Tarihsel gruba göre belirgin bir gelişim sergilemiş ancak standart sapmaların yüksek olması, kalite parametrelerinde homojenliğin sınırlı kaldığını ortaya koymuştur. 3. ve 4. gruplar

ise sırasıyla 244.37±58.82 – 208.90±63.59 ve 251.37±39.89 – 231.80±39.81 (kuru-sulu) değerleriyle gluten gelişimi açısından daha yüksek ortalamalara ulaşmış, "b" grubunda yer almıştır. Modern tescil gruplarını temsil eden 5. ve 6. gruplar ise miksograf enerji değerlerinde belirgin üstünlük sağlamıştır. 5. grup kuru koşullarda 320.57±55.54, sulu koşullarda 308.93±60.16 %Tq*min; 6. grup ise sırasıyla 344.68±102.12 ve 318.36±75.69 %Tq*min değerlerine ulaşmış ve her iki grup da "a" istatistiksel grubu içerisinde yer almıştır. Özellikle 6. grup içerisindeki yüksek standart sapma, bu dönemde genetik varyasyonun arttığını ve bazı çeşitlerin üstün gluten gelişimi kapasitesine sahip olduğunu göstermektedir. Şahin vd. (2019) tarafından yürütülen çalışmada makarnalık buğday genotiplerinde miksograf enerji değerleri 231.80–409.22 %Tq*min aralığında raporlanmış olup, bu değerler, modern çeşitleri temsil eden 5. ve 6. gruplarda sırasıyla 308.93–344.68 %Tq*min özellikle Tarihsel buğdayları temsil eden 1. grup çeşitlerinde gözlenen düşük miksograf enerji düzeyleri, literatürde bildirilen Gernik, einkorn ve spelta gibi Tarihsel buğdayların miksograf profillerinde düşük enerji değerleri sergiledikleri bilgisi ile örtüşmektedir (Ruibal-Mendieta vd. 2005).

4.1.9. Protein miktarı

Bu çalışmada, tescil dönemlerine göre sınıflandırılmış altı buğday grubunun kuru ve sulu koşullarda toplam tane protein miktarları analiz edilmiş; elde edilen veriler Şekil 4.9'da grafiksel olarak sunulmuştur.



Şekil 4.9. Tescil dönemlerine göre protein miktarının kuru ve sulu yetiştirme koşullarındaki karşılaştırma grafiği

Tarihsel çeşitleri temsil eden 1. grup, kuru koşullarda %13.05±1.63 ve sulu koşullarda %14.95±0.07 ile çalışmanın en yüksek ortalama protein değerlerine ulaşmış ve istatistiksel olarak "a" harfiyle gösterilmiştir. Bu durum, düşük verimli ancak yüksek

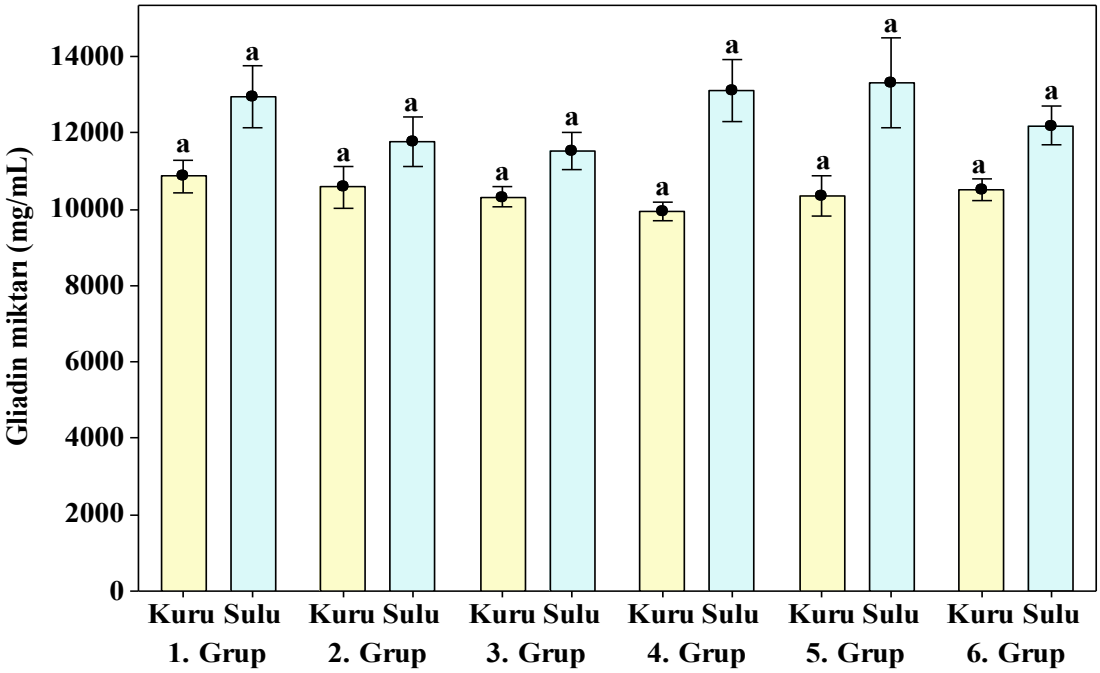
protein sentez kapasitesine sahip olan saf genetik yapıdaki Tarihsel çeşitlerin, özellikle sulu koşullarda üstün performans sergilediğini ortaya koymaktadır. Yeşil Devrim öncesi seleksiyon ıslahı ile geliştirilen 2. grup, kuru koşullarda %12.40±1.70 ve sulu koşullarda %13.50±3.54 düzeylerinde protein içeriği göstermiş ve bu grup "ab" harf grubunda yer alarak Tarihsel gruptan sonra gelen orta düzey bir protein potansiyeline işaret etmiştir. 1968–1970 dönemini temsil eden 3. grup ise kuru koşullarda %12.50±0.92 ve sulu koşullarda %13.70±1.68 oranlarıyla benzer bir performans göstermiş, bu da iki grubun protein sentezi bakımından istatistiksel olarak farklılaşmadığını ortaya koymuştur. 4. grup ise kuru koşullarda %12.07±1.40 ve sulu koşullarda %12.53±2.15 değerleriyle "b" grubu içerisinde yer almış ve modernleşme sürecinde protein oranında düşüş eğiliminin başladığını göstermiştir. 5. grup, modern ıslah dönemini temsil etmekte olup sulu koşullarda %11.07±1.32 ile tüm gruplar arasında en düşük protein düzeyine sahip olmuş hem kuru hem sulu koşullarda "c" istatistiksel harfi ile temsil edilmiştir. Bu düşüş, yüksek verim hedefiyle yürütülen modern ıslah çalışmalarında protein içeriği gibi kalite özelliklerinin görece geri planda kalabileceğini düşündürmektedir.

Tüm gruplar değerlendirildiğinde, genel eğilim tescil yılı ilerledikçe protein oranında bir azalma olduğunu göstermektedir. Bu bulgular, Wieser vd. (2023) tarafından bildirilen ve Dumas yöntemi ile ölçülen ham protein oranlarıyla (%12.8–14.0) tutarlılık göstermektedir. Tarihsel gruptaki yüksek protein düzeyleri bu aralıkla büyük ölçüde örtüşmektedir. Ayrıca Malalgoda vd. (2018) tarafından sert kırmızı baharlık buğdaylarda bildirilen %11.0–14.7 aralığı, bu çalışmada 2., 3. ve 4. gruplarda saptanan değerlerle örtüşmektedir. Özellikle 5. gruptaki düşük protein değerleri (%11.07±1.32), modern ıslah uygulamalarında verim artışı sağlanırken protein miktarında kalite kayıpları yaşanabileceğine işaret etmektedir.

4.2. Gliadin Proteinleri ve Alt Fraksiyonlarının Dağılımları

4.2.1. Gliadin protein düzeyleri

Şekil 4.10'da sunulan verilere göre, farklı tescil dönemlerine ait buğday çeşitlerinin kuru ve sulu koşullarda ölçülen gliadin konsantrasyonları hem genetik ilerlemeyi hem de çevresel koşulların gliadin üretimi üzerindeki etkisini niceliksel olarak ortaya koymaktadır. Tarihsel buğday çeşitlerini temsil eden 1. grup, kuru koşullarda 10861.24±387.60 µg/ml, sulu koşullarda ise 13051.65±1086.62 µg/ml değerleriyle, tüm gruplar arasında istatistiksel olarak "b" harfi ile farklılaşmış ve daha düşük ama stabil gliadin profili sergilemiştir. Bu durum, Tarihsel çeşitlerin genetik olarak daha sabit ve sınırlı gliadin üretim kapasitesine sahip olduğunu göstermektedir.

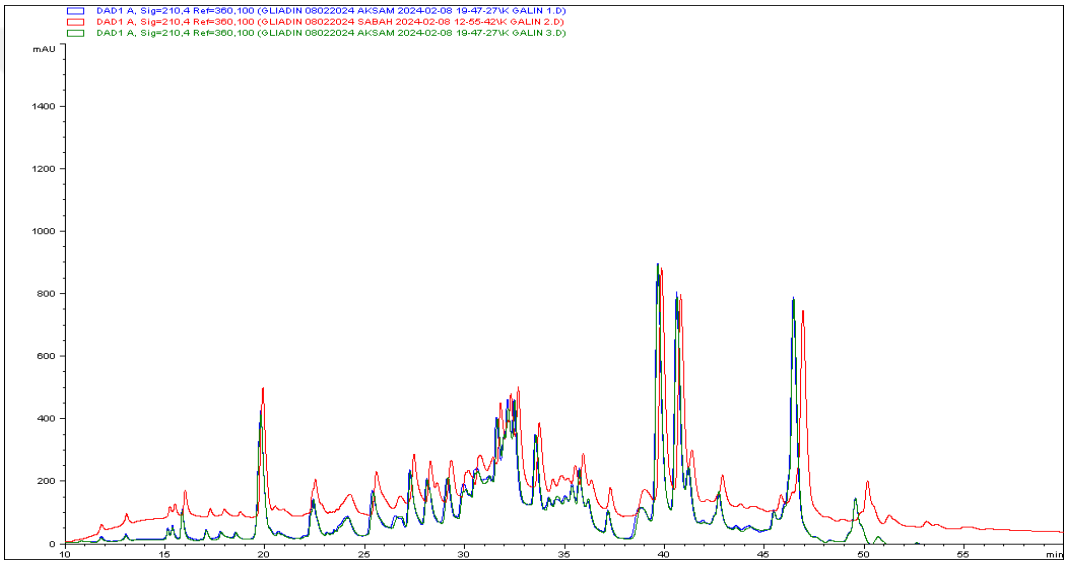


Şekil 4.10. Tescil dönemlerine göre gliadin miktarlarının kuru ve sulu yetiştirme koşullarındaki karşılaştırma grafiği

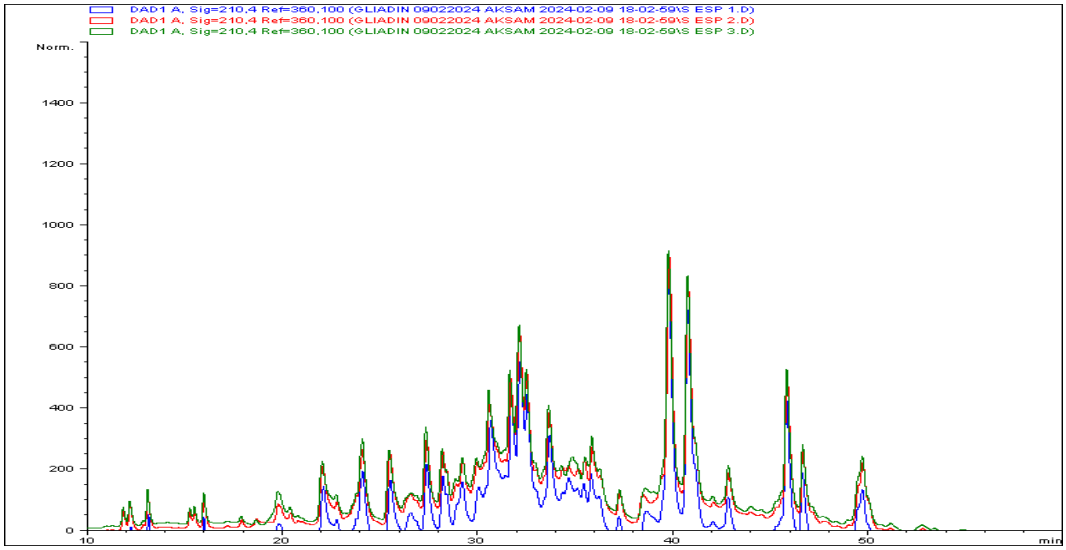
Yeşil Devrim öncesi seleksiyon ıslahı ile yetiştirilen 2. grup (%10.59±0.53 mg/ml kuru, %11.68±0.85 mg/ml sulu) ve 3. grup (10331.55±248.78 µg/ml kuru, 11555.80±1000.00 µg/ml sulu) gliadin düzeylerinde benzer bir eğilim göstermiş; bu gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamakla birlikte, modern gruplara göre daha düşük düzeyde kalmışlardır. Yeşil Devrim sonrası modern tescilli çeşitleri temsil eden 4., 5. ve 6. gruplarda ise sulu koşullarda belirgin bir artış gözlenmiştir. 4. grup sulu koşullarda 13210.73±1594.40 µg/ml ile tüm gruplar içinde en yüksek değere ulaşmış, 5. grup 13194.45±2492.82 µg/ml ve 6. grup 12252.35±977.75 µg/ml ile bu düzeyleri desteklemiştir. Her üç grup da Tukey çoklu karşılaştırma testinde "a" harfi ile işaretlenmiş ve yüksek gliadin konsantrasyonları bakımından birbirine yakın bir profil sunmuştur. Grafik üzerinde yer alan hata çubukları, özellikle modern çeşitlerde sulu koşullarda varyasyonun arttığını göstermekte, bu da modern ıslah materyallerinin çevresel koşullara daha duyarlı gliadin ekspresyon profiline sahip olduğunu ortaya koymaktadır. Bu durum, seleksiyon sürecinde glüten kalitesinin artırılması amacıyla genetik çeşitliliğin genişletildiğini ve bu genişliğin gliadin üretim düzeyine yansıdığını düşündürmektedir. Ayrıca sulu koşullarda elde edilen yüksek gliadin değerleri, nem ve sıcaklık gibi çevresel girdilerin gliadin sentezini teşvik ettiğini ve bu etkinin modern genotiplerde daha güçlü bir yanıtla sonuçlandığını göstermektedir. Sonuç olarak, gliadin miktarları bakımından elde edilen bu bulgular, Tarihsel çeşitlerin sabit ama düşük içerikli, modern çeşitlerin ise yüksek ama varyasyonlu gliadin profilleri sunduğunu ortaya koymaktadır. Bu durum, modern ıslah süreçlerinde gluten kalitesini artırma yönündeki hedeflerin genetik ve çevresel faktörlerle başarıyla bütünleştirildiğini göstermekte ve gluten yapısının fonksiyonel özellikleri açısından önemli bir gelişimi yansıtmaktadır.

4.2.2. Gliadin alt fraksiyonlarının çeşitlere göre değişimi

Bu bölümde, HPLC yöntemiyle gerçekleştirilen gliadin alt fraksiyon analizlerinin sonuçları sunulmaktadır. Her bir buğday çeşidi üç tekrarlı ekstraksiyonla analiz kapsamına alınmış olup, kuru ve sulu koşullarda yetiştirilen 24 farklı buğday çeşidinden elde edilen toplam 48 un örneği, her biri üçer tekrarla olmak üzere toplam 144 ayrı HPLC çalışmasına tabi tutulmuştur. Bu analizlerin kromatogramları EK 1–26 arasında yer almaktadır. Elde edilen sonuçlara göre, kuru koşullarda yetiştirilen örneklerde gliadin fraksiyonlarının pik alanları genellikle daha düşük düzeyde gözlemlenirken, sulu koşullarda yetiştirilen örneklerde daha yüksek pik değerleri tespit edilmiştir. Analizin tekrarlanabilirliğini ve kromatografik ayrımın çeşitlere göre tutarlılığını göstermek amacıyla, Şekil 4.10'da kuru koşullarda yetiştirilen Galinda çeşidine ait üç tekrarlı ölçüme ait HPLC kromatogramı; Şekil 4.11'de ise sulu koşullarda yetiştirilen Esperia çeşidinin üç tekrarına ait kromatogram sunulmuştur. Her iki şekil de aynı koşullar altında elde edilen örneklerin benzer pik profilleri sergilediğini ve yöntemsel kararlılığın sağlandığını ortaya koymaktadır.



Şekil 4.11. Kuru koşullarda yetiştirilen Galinda çeşidinin tekrarları ölçümü



Şekil 4.12. Sulu koşullarda yetiştirilen Esperia çeşidinin tekrarlı ölçümü

Her örnek kendine özgü bir dağılım sergilemiş olup, özellikle α/β- ve γ gliadin bölgelerinde protein profilleri açısından belirgin farklılıklar gözlemlenmiştir. Bu durum, her bir buğday çeşidinin gliadin yapısı bakımından ayırt edici özelliklere sahip olduğunu göstermektedir. Literatürde Qian vd. (2008) ve Malalgoda vd. (2018) tarafından da belirtildiği üzere, alıkonma zamanları esas alındığında; ω-5 gliadin fraksiyonuna ait pikler genellikle 3–15. dakikalar arasında, ω1-2-gliadin 25–40. dakikalar arasında, α/β-gliadin fraksiyonları 25–40. dakikalar arasında ve γ gliadin fraksiyonu ise 40–60. dakikalar arasında kromatogram üzerinde tanımlanmaktadır. Çalışmada birçok örnek tekrarlı olarak analiz edilmiş olsa da bazı kromatogramlarda alıkonma zamanlarında küçük sapmalar tespit edilmiştir. Bu varyasyonları minimize etmek amacıyla farklı enjeksiyon hacimleri denenmiş ve analizlerin standardize edilmesine özen gösterilmiştir. Protein analizinde her örneğin içerdiği toplam protein miktarının 300 mg olacak şekilde sabitlenmesi esas alınmış ve bu doğrultuda enjeksiyon hacimleri 18–48 µL arasında değişkenlik göstermiştir. Gliadin alt fraksiyonlarının alıkonma zamanlarının daha doğru belirlenebilmesi amacıyla, LC QTOF MS analizleri ile paralel yürütülen oransal hesaplamalar kullanılarak fraksiyonel ayrışmalar daha net biçimde tanımlanmıştır.

Gliadin fraksiyonlarının çeşit gruplarına göre kromatografik ayrımını ve bu ayrımın kantitatif karşılıklarını detaylandırmak amacıyla, her bir tescil grubuna ait sonuçlar ayrı çizelgelerde sunulmuş; aynı çizelgede hem sulu hem de kuru koşullarda elde edilen ölçüm değerlerine birlikte yer verilmiştir. Bu doğrultuda, Çizelge 4.1'den başlayarak altı ayrı grup için düzenlenen tablolar; ilgili gruptaki her bir çeşide ait ω5 , ω1-2-, α-/β- ve γ gliadin fraksiyonlarına karşılık gelen toplam pik sayısı, ortalama pik sayısı, toplam pik alanı ve ortalama pik alanı gibi temel parametreleri içermektedir. Gruplandırma, çeşitlerin tescil yılına göre yapılmış olup; 1. grup Tarihsel buğdaylar (ör. Mokan, Songar), 2. Grup, yeşil devrim öncesi seleksiyon ıslahıyla geliştirilen, 3. grup 1968–1970 yılları arasındaki çeşitler, 4. grup yeşil devrim sonrası 1971–2000 dönemini temsil edenler, 5. grup 2001–2010 tescilli çeşitler ve 6. grup 2011–2022 dönemini kapsayan modern çeşitlerden oluşmaktadır. Her bir çizelgede gliadin fraksiyonlarına karşılık gelen zaman aralıkları da belirtilmiş ve kantitatif değerlendirmeler bu zaman

dilimlerine göre yapılmıştır. Böylelikle hem genetik geçmiş hem de yetiştirme koşullarının fraksiyonel gliadin dağılımları üzerindeki etkisi doğrudan karşılaştırmalı olarak incelenmiştir.

Çizelge 4.2'de, 1. grup tarihsel buğday çeşitlerine (Mokan ve Songar) ait gliadin protein fraksiyonlarının kantitatif ve niteliksel dağılımları hem sulu hem de kuru yetiştirme koşulları altında karşılaştırmalı olarak sunulmuştur.

Çizelge 4.2. Kuru ve sulu koşullarda yetiştirilen 1. Grup (Tarihsel) Gliadin protein fraksiyonlarının toplam ve ortalama pik sayıları ile pik alanları

Gliadin fraksiyonu	Zaman aralığı (dk)	Yetiştirme şekli	Toplam pik sayısı	Ortalama pik sayısı ± SS	Toplam pik alanı (mAU*dk)	Ort. pik alanı± SS (mAU*dk)
ω5 gliadin	3-15	Kuru	41	7±4	87399	14567±7358
		Sulu	20	3±2	32653	5442±1180
ω1, 2 gliadin	18-24	Kuru	30	5±2	34730	5788±2970
		Sulu	33	6±2	28058	4676±3343
α/ β gliadin	25-39	Kuru	78	13±7	265551	44259±31898
		Sulu	90	15±8	185212	30869±26879
γ gliadin	40-60	Kuru	55	9±4	344405	57401±43016
		Sulu	62	10±4	216929	36155±38075

Fraksiyonlara göre pik sayısı ve pik alanı verileri birlikte incelendiğinde, özellikle α-/β- ve γ gliadin fraksiyonlarının hem pik sayısı hem de toplam pik alanı bakımından diğer fraksiyonlara kıyasla daha yüksek değerlere görülmüştür. Kuru koşullarda α /β gliadin fraksiyonu 265551 mAU*dk toplam pik alanı ve 13 ± 7 ortalama pik sayısı ile, γ gliadin ise 344405 mAU*dk toplam pik alanı ve 9 ± 4 ortalama pik sayısı ile öne çıkmıştır; bu durum, bu iki fraksiyonun kuru koşullar altında daha yoğun sentezlendiğini göstermektedir. Sulu koşullarda da benzer şekilde en yüksek ortalama pik sayısı α /β gliadin fraksiyonunda (15 ± 8), en yüksek ortalama pik alanı ise γ gliadin fraksiyonunda (36155 ± 38075 mAU*dk) tespit edilmiştir. ω5 gliadin fraksiyonu ise özellikle kuru koşullarda 87399 mAU*dk toplam pik alanı ve 7 ± 4 ortalama pik sayısı ile, sulu koşullara göre anlamlı bir artış göstermiştir; bu da kuraklık stresinin bu fraksiyonun ekspresyonunu tetiklediğine işaret etmektedir. Diğer yandan ω1,2-gliadin fraksiyonu toplam pik sayısında sulu koşullarda daha yüksek bir değere (33 pik) sahip olsa da her iki koşulda da diğer fraksiyonlara kıyasla görece düşük toplam pik alanına (kuru: 34730 mAU*dk; sulu: 28058 mAU*dk) sahiptir. Sonuç olarak, genotipik olarak tarihsel karakterdeki buğdayların fraksiyonel gliadin dağılımları, çevresel koşullara duyarlılık göstermekte; özellikle kuru koşullarda α-/β- ve γ gliadin fraksiyonlarında belirgin artışlar gözlenmektedir.

Çizelge 4.3'te, 2. grup buğday genotiplerinin (Ak 702 ve Sertak) gliadin protein fraksiyonlarına ait pik sayısı ve pik alanı verileri hem sulu hem de kuru yetiştirme koşulları altında karşılaştırmalı biçimde sunulmuştur.

Çizelge 4. 3. Kuru ve sulu koşullarda yetiştirilen 2. Grup (yeşil devrim öncesi seleksiyon ıslahıyla geliştirilen) gliadin fraksiyonlarının toplam ve ortalama pik sayıları ile pik alanları

Gliadin fraksiyonu	Zaman aralığı (dk)	Yetiştirme şekli	Toplam pik sayısı	Ort. pik sayısı ± SS	Toplam pik alanı (mAU*dk)	Ort. pik alanı± SS (mAU*dk)
ω5 gliadin	3-15	Kuru	17	3±2	26468	4411±2057
		Sulu	38	6±5	74511	12419±12134
ω1, 2 gliadin	18-24	Kuru	13	2±3	8356	1393±2300
		Sulu	19	3±3	43008	7168±13952
α/ β gliadin	25-39	Kuru	60	10±2	60389	10065±6145
		Sulu	86	14±10	109023	18171±15373
γ gliadin	40-60	Kuru	61	10±5	83952	13992±10137
		Sulu	55	9±6	184004	30667±28391

Hem kuru hem sulu koşullarda α /β gliadin fraksiyonu en yüksek toplam pik sayısına ulaşmıştır. Sulu koşullarda 86 (14 ± 10), kuru koşullarda ise 60 (10 ± 2) toplam pik sayısı vermiştir. γ gliadin fraksiyonu da benzer şekilde, özellikle kuru koşullarda 61 (10 ± 5) toplam pik sayısı ile yüksek düzeydedir. ω5 gliadin ve ω1,2-gliadin fraksiyonları ise daha sınırlı çeşitlilik göstermekte olup, kuru koşullarda sırasıyla 17 ve 13 pik ile düşük seviyelerde kalmış, sulu koşullarda ise bu sayılar artış göstermiştir (sırasıyla 38 ve 19 pik). Pik alanları üzerine yapılan değerlendirmede ise, γ gliadin fraksiyonu sulu koşullarda 184004 mAU*dk (30667 ± 28391 mAU*dk), kuru koşullarda 83952 mAU*dk (13992 ± 10137 mAU*dk) toplam pik alanı ile en yüksek seviyeye ulaşmış, bu fraksiyonu α /β gliadin fraksiyonu takip etmiştir (sulu: 109023 mAU*dk; kuru: 60389 mAU*dk). ω5 gliadin fraksiyonu sulu koşullarda 74511 mAU*dk (12419 ± 12134 mAU*dk) ile kuru koşullara göre daha yüksek ifade düzeyi sergilemiş, ω1,2-gliadin fraksiyonu ise sadece sulu koşullarda anlamlı bir artış göstermiştir (43008 mAU*dk).

Çizelge 4.4'te, 3. grup buğday genotiplerinin (Bezostaja 1, Yektay ve Bolal) gliadin protein fraksiyonlarına ait pik sayısı ve pik alanı verileri hem sulu hem de kuru yetiştirme koşulları altında karşılaştırmalı biçimde sunulmuştur.

Çizelge 4.4. Kuru ve sulu koşullarda yetiştirilen 3. Grup (yeşil devrim öncesi 1968 - 1970) gliadin fraksiyonlarının gliadin fraksiyonlarının toplam ve ortalama pik sayıları ile pik alanları

Gliadin fraksiyonu	Zaman aralığı (dk)	Yetiştirme şekli	Toplam pik sayısı	Ort. pik sayısı ± SS	Toplam pik alanı (mAU*dk)	Ort. pik alanı± SS (mAU*dk)
ω5 gliadin	3-15	Kuru	28	3±1	46439	4157±2256
		Sulu	37	4±3	61985	9774±10505
ω1, 2 gliadin	18-24	Kuru	20	2±2	11461	1910±1732
		Sulu	34	4±2	65861	8886±11592
α/ β gliadin	25-39	Kuru	91	10±5	94208	14089±8688
		Sulu	82	9±6	141874	13339±11561
γ gliadin	40-60	Kuru	92	10±8	157960	23450±22311
		Sulu	52	6±4	118556	10707±14218

Çizelge 4.4'te 3. grup (1968–1970 yılları arası tescillenmiş buğdaylar) gliadin fraksiyonlarının farklı yetiştirme koşullarında gösterdiği toplam ve ortalama pik değerleri analiz edilmiştir. Verilere göre, α-/β- ve γ gliadin fraksiyonları her iki koşulda da diğer fraksiyonlara kıyasla daha yüksek toplam pik alanlarına sahiptir. Kuru koşullarda γ gliadin fraksiyonu 157960 mAU*dk toplam pik alanı ve 10 ± 8 ortalama pik sayısı ile öne çıkarken, α /β gliadin fraksiyonu 94208 mAU*dk pik alanı ve 10 ± 5 ortalama pik sayısı ile onu takip etmektedir. Sulu koşullarda ise α /β gliadin fraksiyonu 141874 mAU*dk ile en yüksek toplam pik alanına ulaşmış, γ gliadin 118556 mAU*dk değerle ikinci sırada yer almıştır. Öte yandan ω5 gliadin fraksiyonu sulu koşullarda kuruya göre hem toplam pik sayısı (sırasıyla 37 ve 28) hem de ortalama pik alanı (9774 ± 10505 mAU*dk ve 4157 ± 2256 mAU*dk) açısından belirgin artış göstermiştir. Benzer şekilde ω1,2-gliadin fraksiyonu da sulu koşullarda daha yüksek ortalama pik sayısı (4 ± 2) ve pik alanı (8886 ± 11592 mAU*dk) sergilemiştir. Bu durum, sulu tarım koşullarının özellikle ω-gliadin fraksiyonlarının ifadesini artırdığını, ancak α-/β- ve γ gliadin fraksiyonlarının genetik olarak yüksek düzeyde sentezlendiğini ve çevresel strese göre daha istikrarlı seyrettiğini düşündürmektedir.

Çizelge 4.5'te, 4. grup buğday genotiplerinin (Gerek 79, Kırkpınar, Sultan 95, İkizce 96, Pehlivan, Karahan) gliadin protein fraksiyonlarına ait pik sayısı ve pik alanı

verileri hem sulu hem de kuru yetiştirme koşulları altında karşılaştırmalı biçimde sunulmuştur.

Çizelge 4.5. Kuru ve sulu koşullarda yetiştirilen 4. Grup (yeşil devrim sonrası) gliadin proteinlerinin fraksiyonlarının pik miktarları

Gliadin fraksiyonu	Zaman aralığı (dk)	Yetiştirme şekli	Toplam pik sayısı	Ortalama pik sayısı ± SS	Toplam pik alanı (mAU*dk)	Ort. pik alanı± SS (mAU*dk)
ω5 gliadin	3-15	Kuru	52	3±2	66921	3718±2113
		Sulu	114	6±5	702808	39045±71864
ω1, 2 gliadin	18-24	Kuru	19	1±1	10254	570±1128
		Sulu	78	4±3	149710	8317±12555
α/ β gliadin	25-39	Kuru	189	11±5	194106	10784±9452
		Sulu	273	15±8	729495	40528±31905
γ gliadin	40-60	Kuru	184	10±5	337131	18730±18937
		Sulu	181	10±6	502322	27907±20563

Veriler fraksiyonel dağılımlar açısından değerlendirildiğinde, özellikle α-/β- ve γ gliadin fraksiyonlarının hem toplam pik sayısı hem de toplam pik alanı bakımından diğer fraksiyonlara kıyasla öne çıktığı görülmektedir. Sulu koşullarda α /β gliadin fraksiyonu 273 toplam pik sayısı ve 729495 mAU*dk toplam pik alanı ile tüm fraksiyonlar arasında maksimum değerlere ulaşmış, ortalama pik alanı da 40528 ± 31905 mAU*dk olarak hesaplanmıştır. Aynı şekilde γ gliadin fraksiyonu da sulu koşullarda 502322 mAU*dk toplam pik alanı ve 27907 ± 20563 mAU*dk ortalama değeri ile yüksek düzeyde ekspresyon göstermiştir. Kuru koşullarda ise γ gliadin 337131 mAU*dk toplam pik alanı ile en yüksek değeri sergilerken, α /β gliadin fraksiyonu 194106 mAU*dk toplam pik alanı ve 11 ± 5 ortalama pik sayısı ile onu takip etmiştir. ω5 gliadin fraksiyonu sulu koşullarda 702808 mAU*dk toplam pik alanı ve 39045 ± 71864 ortalama pik alanı ile dikkat çekici bir artış göstermiş, bu durum sulamanın özellikle bu fraksiyonun ifadesini kuvvetle artırdığını ortaya koymuştur. Diğer yandan ω1,2-gliadin fraksiyonu hem kuru (10254 mAU*dk) hem de sulu (149710 mAU*dk) koşullarda toplam pik alanı bakımından en düşük değerlere sahiptir; ortalama pik alanı kuru koşullarda yalnızca 570 ± 1128 mAU*dk ile minimum düzeyde kalmıştır. Pik sayıları açısından minimum değer ω1,2-gliadin'in kuru koşullardaki 1 ± 1 ortalama pik sayısı ve 19 toplam piki ile gözlenmiş, maksimum değer ise α /β gliadin in sulu koşullarda gösterdiği 273 toplam pik ile tespit edilmiştir. Bu bulgular, yeşil devrim sonrası buğday çeşitlerinde sulama uygulamasının gliadin fraksiyonlarının sentez düzeyini özellikle α-/β- ve γ gliadinlerde anlamlı şekilde artırdığını, ω1,2-gliadin'in ise daha düşük düzeylerde kaldığını göstermektedir.

Çizelge 4.6, Yeşil Devrim sonrası 2001–2010 döneminde geliştirilmiş altı modern buğday çeşidinin (Alparslan, Nenehatun, Konya 2002, Ahmetağa, Tosunbey, Sönmez

2001) kuru ve sulu koşullarda elde edilen gliadin fraksiyonlarına ait pik sayısı ve pik alanı verilerini kapsamaktadır.

Çizelge 4. 6. Kuru ve sulu koşullarda yetiştirilen 5. Grup (yeşil devrim sonrası) gliadin proteinlerinin fraksiyonlarının pik miktarları

Gliadin fraksiyonu	Zaman aralığı (dk)	Yetiştirme şekli	Toplam pik sayısı	Ortalama pik sayısı ± SS	Toplam pik alanı (mAU*dk)	Ort. pik alanı± SS (mAU*dk)
ω5 gliadin	3-15	Kuru	40	2±1	78588	4366±3507
		Sulu	119	7±5	303048	16836±18573
ω1, 2 gliadin	18-24	Kuru	45	3±2	64356	3575±3736
		Sulu	77	4±3	196179	10899±13394
α/ β gliadin	25-39	Kuru	270	15±6	492195	27344±18920
		Sulu	197	11±7	505999	28111±29326
γ gliadin	40-60	Kuru	164	9±4	496464	27581±20086
		Sulu	150	8±6	272007	15112±13435

Pik sayıları incelendiğinde, α /β gliadin fraksiyonu her iki koşulda da en yüksek çeşitliliğe sahip olup sulu koşullarda 197 (ort. 11±7), kuru koşullarda ise 270 (ort. 15±6) toplam pik ile öne çıkmaktadır. γ gliadin fraksiyonu ise kuru koşullarda 164 pik (ort. 9±4), sulu koşullarda ise 150 pik (ort. 8±6) ile bu fraksiyonu takip etmektedir. Buna karşın, ω5 ve ω1, 2 gliadin fraksiyonlarında kuru koşullarda belirgin bir düşüş gözlenmiş; özellikle ω5 gliadin kuru koşullarda 40 pik (ort. 2±1) ile sınırlı kalırken, sulu koşullarda bu sayı 119'a (ort. 7±5) yükselmiştir.

Pik alanı bakımından değerlendirildiğinde, sulu koşullarda en yüksek toplam pik alanı α /β gliadin fraksiyonunda gerçekleşmiş ve bu fraksiyon 505999 mAU*dk (ortalama 28111 ± 29326 mAU*dk) ile ilk sırada yer almıştır. Onu ω5 gliadin fraksiyonu 303048 mAU*dk toplam ve 16836 ± 18573 mAU*dk ortalama pik alanı ile, ardından γ gliadin fraksiyonu 272007 mAU*dk toplam ve 15112 ± 13435 mAU*dk ortalama pik alanı ile izlemiştir. Kuru koşullarda ise en yüksek toplam pik alanı 496464 mAU*dk ile γ gliadin fraksiyonunda, en yüksek ortalama pik alanı ise 27581 ± 20086 mAU*dk ile yine aynı fraksiyonda saptanmıştır. Kuru koşullarda α /β gliadin fraksiyonu da 492195 mAU*dk toplam pik alanı ve 27344 ± 18920 m*AUdk ortalama değeri ile dikkat çekmiş, ω5 gliadin ise toplam 78588 mAU*dk pik alanı ile daha sınırlı bir düzeyde kalmıştır.

Genel olarak değerlendirildiğinde, 5. grup çeşitler özellikle α-/β- ve γ gliadin fraksiyonlarında yoğun bir protein birikimi sergilemiş, ancak çevresel koşullara bağlı olarak fraksiyonlar arası ekspresyon dengesi değişmiştir. Özellikle γ gliadin fraksiyonunun kuru koşullarda daha yüksek düzeyde ifade edilmesi, bu fraksiyonun su stresi altında tolere edici bir rol üstlenebileceğini düşündürmektedir. Modern çeşitlerde genotipe özgü farklılaşma, hem niteliksel (pik sayısı) hem de kantitatif (pik alanı) olarak net şekilde gözlemlenmiştir.

Çizelge 4.7, 2010–2022 yılları arasında geliştirilen modern buğday çeşitlerinden oluşan 6. grubun (Esperia, Bora, Genesi, Soana, Galinda) gliadin fraksiyonlarına ait pik sayısı ve pik alanı verilerini sunmakta, bu çeşitlerin gliadin profili bakımından çevresel yanıtlarını detaylı bir şekilde ortaya koymaktadır.

Çizelge 4.7. Kuru ve sulu koşullarda yetiştirilen 6. Grup (yeşil devrim sonrası) gliadin proteinlerinin fraksiyonlarının pik miktarları

Gliadin fraksiyonu	Zaman aralığı (dk)	Yetiştirme şekli	Toplam pik sayısı	Ortalama pik sayısı ± SS	Toplam pik alanı (mAU*dk)	Ort. pik alanı± SS (mAU*dk)
ω5 gliadin	3-15	Kuru	37	2±2	83136	5542±4258
		Sulu	57	4±2	98517	6568±5794
ω1, 2 gliadin	18-24	Kuru	65	4±3	137762	9184±6419
		Sulu	72	5±5	130853	8724±10574
α/ β gliadin	25-39	Kuru	247	16±7	657932	43862±27256
		Sulu	213	14±7	612698	40847±30769
γ gliadin	40-60	Kuru	133	9±3	501029	33402±20473
		Sulu	94	6±4	254193	16946±15864

Pik sayıları açısından en fazla pik α /β gliadin fraksiyonunda kaydedilmiş olup, kuru koşullarda 247, sulu koşullarda ise 213 pik ile bu fraksiyon belirgin şekilde öne çıkmıştır. Genel olarak değerlendirildiğinde, 6. grup modern buğday çeşitleri hem kuru hem de sulu koşullarda α-/β- ve γ gliadin fraksiyonlarında yüksek düzeyde protein birikimi göstermiştir. Özellikle kuru koşullarda γ gliadin ifadesinin artması, bu fraksiyonun kuraklık stresine karşı toleransla ilişkili olabileceğini desteklemektedir. Ayrıca pik sayısı ve alanı bakımından genotiplerin çevresel koşullara duyarlılığının belirgin olduğu, fraksiyonel düzeyde farklılaşmanın sürdüğü gözlemlenmektedir.

Pik alanı verilerine göre değerlendirildiğinde, kuru koşullarda en yüksek toplam pik alanı 657932 mAU*dk ile α /β gliadin fraksiyonunda gözlenmiş, bu değeri 501029 mAU*dk ile γ gliadin ve 137762 mAU*dk ile ω1,2-gliadin fraksiyonları takip etmiştir. Ortalama pik alanı bakımından da kuru koşullarda α /β gliadin (43862 ± 27256 mAU*dk) ve γ gliadin (33402 ± 20473 mAU*dk) fraksiyonları ön plana çıkmıştır. Sulu koşullarda ise α /β gliadin fraksiyonu 612698 mAU*dk toplam pik alanı ve 40847 ± 30769 mAU*dk ortalama değeri ile ilk sırada yer almış, onu 254193 mAU*dk toplam pik alanı ve 16946 ± 15864 mAU*dk ortalama değeriyle γ gliadin takip etmiştir. ω5 gliadin fraksiyonu sulu koşullarda 98517 mAU*dk toplam ve 6568 ± 5794 mAU*dk ortalama pik alanı ile önceki gruplara kıyasla daha düşük düzeyde kalmış, kuru koşullarda ise bu değerler 83136 mAU*dk ve 5542 ± 4258 mAU*dk olmuştur. Minimum toplam pik alanı 83136 mAU*dk ile kuru koşullarda ω5 gliadin fraksiyonuna aitken, maksimum toplam pik alanı kuru koşullarda α /β gliadin fraksiyonunda tespit edilmiştir (657932 mAU*dk).

4.2.3. Buğday çeşitlerindeki gliadin alt fraksiyonlarının dağılımı

Çölyak hastalığıyla ilişkili immünojenik epitoplar bakımından yapılan karşılaştırmalı değerlendirmede, altı buğday grubu arasında özellikle α-gliadin ve bazı γ gliadin alt fraksiyonlarının ekspresyon düzeyi ve yapısal bileşimi belirleyici rol oynamaktadır. 1. grup (Tarihsel çeşitler) Mokan ve Songar, özellikle düşük α-gliadin ve ω1-2/ω5 gliadin ekspresyonları ile tanınmakta ve bu çeşitlerin literatürde 33-mer gibi immunodominant α-gliadin peptitlerini düşük düzeyde taşıdığı rapor edilmiştir (Schalk vd. 2017); dolayısıyla bu grup çölyak açısından en düşük immünojenik risk profiline sahiptir. 2. ve 3. gruplar (Yeşil Devrim öncesi ve 1968–1970 arası çeşitler), özellikle α-/β- ve γ gliadin fraksiyonlarında orta düzeyde ekspresyon göstermektedir; bu fraksiyonlar DQ2.5 ve DQ8 bağlayıcı T-hücre epitoplarını taşıyabilmektedir, ancak modern çeşitlere kıyasla bu epitoplar daha az sıklıkta ve daha az modifiye formlardadır. 4. grup (Yeşil Devrim sonrası) modern çeşitlerinde α-gliadin fraksiyonu sulu koşullarda belirgin şekilde yüksek olup, bu durum epitop yoğunluğunu artırmakta ve çölyak hastaları için daha immünojenik bir ortam oluşturmaktadır; özellikle Gerek 79 ve Sultan 95 çeşitlerinde bu fraksiyon baskındır. 5. ve 6. gruplar (2001 sonrası çeşitler), hem α-gliadin hem de γ gliadin fraksiyonlarında yüksek pik sayısı ve alanı göstermekte; ayrıca LC-MS/MS gibi tekniklerle yapılan çalışmalarda bu dönem modern çeşitlerinin çölyakla ilişkili epitoplar (özellikle PFPQPQLPY, PQPQLPYPQ, QGSFQPSQQ gibi) yönünden daha yüksek yoğunlukta olduğu saptanmıştır (Van den Broeck vd. 2015; Van den Broeck vd. 2009). Özellikle 6. grupta Soana ve Galinda gibi çeşitler, hem α-gliadin pik sayısı hem de γ gliadin ekspresyon düzeyi açısından yüksek değerler sunarak immünojenik potansiyelin en fazla olduğu genotipler arasında yer almaktadır. Bu bağlamda, immünojenik epitop riski bakımından sıralama 1. grup < 2./3. gruplar < 4. grup < 5. grup < 6. grup şeklinde olup, bu artış süreci modern buğday ıslahının ürün kalitesi ve verim odaklı seçimlerinin istem dışı olarak antijenik yükü artırmış olabileceğini düşündürmektedir.

Çizelge 4.8'de yer alan verilere göre kuru ve sulu koşullarda yetiştirilen buğday çeşitlerinin gliadin alt fraksiyonlarına ait ortalama pik alanları (mAU*dk), çölyak hastalığı açısından immünojenik epitop yükünün çeşitler ve çevresel koşullar temelinde anlamlı farklılıklar gösterdiğini ortaya koymaktadır. α /β gliadin fraksiyonu genel olarak en yüksek değerlere ulaşan fraksiyon olup, sulu koşullarda maksimum değer Soana çeşidinde 79713 mAU*dk, minimum değer Pehlivan'da 825 mAU*dk olarak belirlenmiştir; kuru koşullarda ise bu aralık Esperia'da 71022 ile Genesi'de 3358 mAU*dk arasında değişmiştir. γ gliadin fraksiyonu ise sulu koşullarda en yüksek Ak 702'de 50028, en düşük Konya 2002'de 681 mAU*dk olarak ölçülmüş; kuru koşullarda ise Mokan 97966 ile en yüksek, Genesi 3100 ile en düşük değeri göstermiştir. Bu veriler, hem α- hem de γ gliadin alt fraksiyonlarının modern çeşitlerde çölyakla ilişkili epitopları yüksek oranda taşıyabildiğini ve su stresi gibi çevresel faktörlere rağmen düzeylerini koruyabildiğini göstermektedir. ω1,2-gliadin fraksiyonunda sulu koşullarda Pehlivan 35895 mAU*dk ile maksimum değeri gösterirken, en düşük değer 428 ile İkizce 96'da kaydedilmiştir; kuru koşullarda ise Esperia 17200 ile en yüksek, Bolal, Gerek 79 ve Karahan 99 ise 0 değeriyle en düşük seviyede yer almıştır. ω5 gliadin fraksiyonunda sulu koşullarda Pehlivan açık ara farkla 197089 mAU*dk ile en yüksek değere ulaşırken, en düşük değer Galinda'da 3516 olarak belirlenmiştir; kuru koşullarda ise Mokan 21115 ile en yüksek, Galinda ise sadece 287 mAU*dk ile en düşük değere sahiptir. Geleneksel çeşitlerden Mokan ve Songar, kuru koşullarda sırasıyla 72674 ve 15843 mAU*dk α /β gliadin , 97966 ve 16835 mAU*dk γ gliadin düzeyleriyle orta seviyede değerlere sahip olup, tarihsel çeşitlerin çölyakla ilişkili immünojenik yük bakımından daha düşük risk

taşıdığını desteklemektedir. Buna karşılık 5. ve 6. grup modern çeşitlerde özellikle α- ve γ gliadin fraksiyonlarında belirgin artışlar gözlenmekte olup, Soana, Esperia, Nenehatun ve Galinda gibi genotiplerde çölyakla ilişkili epitopların daha yoğun taşındığı anlaşılmaktadır. Elde edilen bulgular, çölyak hastalığı açısından immünojenik epitop risk sıralamasının 1. grup < 2./3. grup < 4. grup < 5. grup < 6. grup şeklinde ilerlediğini ve modern ıslah uygulamalarının ürün kalitesi ve verim odaklı seleksiyonları sırasında istem dışı olarak antijenik yükü artırmış olabileceğini göstermektedir. Ayrıca sulu koşulların özellikle α /β gliadin fraksiyon ekspresyonunu artırdığı ve bu durumun çölyakla ilişkili epitop yükünü çevresel etkenlerin de şekillendirebileceğini ortaya koyduğu değerlendirilmiştir.

Çizelge 4.8. Kuru ve sulu koşullarda yetiştirilen buğday çeşitlerindeki gliadin alt fraksiyonları (ortalama pik alanı (mAU*dk))

Buğday çeşidi	**Yetiştirme şekli**	**Tescil *y*ılı**	**ω5 *g*liadin ortalama pik alanı (mAU*dk) ± SS**	**ω1, 2 *g*liadin ortalama pik alanı (mAU*dk) ± SS**	**α/ β gliadin ortalama pik alanı (mAU*dk) ± SS**	**γ gliadin ortalama pik alanı (mAU*dk) ± SS**
Mokan (gernik)	Kuru	1900	21115 ± 97	6466 ± 2214	72674 ± 6443	97966 ± 8890
	Sulu	1900	6104 ±1432	2922 ±520	40084 ±39113	48159 ±59772
Songar (siyez)	Kuru	1900	8018 ± 5812	5111 ± 4492	15843 ± 24263	16835 ± 23140
	Sulu	1900	4781 ±901	6430 ±4902	21653 ±19565	24151 ±18552
Ak 702	Kuru	1931	5754 ± 977	2149 ± 3722	8984 ± 7790	7923 ± 2131
	Sulu	1931	4329 ±947	1392 ±256	26211 ±16154	50028 ±31906
Sertak	Kuru	1936	3069 ± 2516	637 ± 555	11145 ± 7007	20061 ± 13901
	Sulu	1936	20508 ±15635	19416 ±26765	15194 ±18822	11307 ±16600
Bezostaja 1	Kuru	1968	3816 ± 3282	813 ± 332	7918 ± 7747	12559 ± 17275
	Sulu	1968	3245 ±3431	737 ±61	12658 ±12365	17109 ±21416
Yektay	Kuru	1968	4498 ± 1377	3008 ± 2474	20261 ± 6790	34341 ± 35625
	Sulu	1968	16303 ±16758	17036 ±19344	14019 ±14775	4304 ±3165
Bolal	Kuru	1970	7165 ± 914	0 ±0	3224 ± 1115	5754 ± 1864
	Sulu	1970	1670 ±609	4181 ±3020	20614 ±13266	18105 ±16227
Gerek 79	Kuru	1979	2132 ± 1537	0 ±0	13544 ± 6509	41643 ± 29033
	Sulu	1979	7322 ±499	7548 ±6125	63352 ±52096	37970 ±30371
Kırkpınar	Kuru	1979	2290 ± 740	115 ± 199	7309 ± 3494	6726 ± 2352
	Sulu	1979	9752 ±8517	9658 ±1802	74284 ±11860	35550 ±11648
Sultan 95	Kuru	1995	4522 ± 3031	1974 ± 2486	23579 ± 16108	25490 ± 13261
	Sulu	1995	7465 ±2840	1189 ±260	37395 ±1700	32784 ±3644
İkizce 96	Kuru	1996	4473 ± 2820	428 ± 423	3997 ± 3124	8633 ± 5242
	Sulu	1996	9086 ±4571	3803 ±3218	31017 ±19924	18366 ±19476

(Devamı Arkada)

Çizelge 4.8'nin devamı

Pehlivan	Kuru	1998	5044 ± 2555	901 ± 784	8269 ± 5726	19726 ± 26122

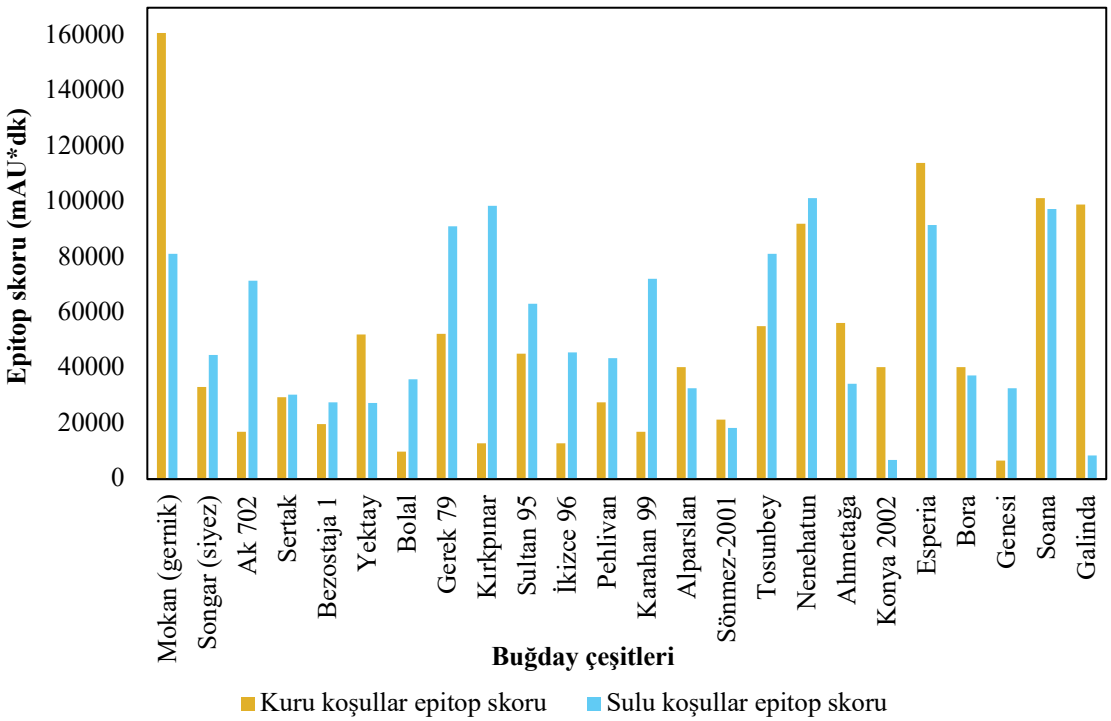
	Sulu	1998	197089 ±37149	35895 ±29055	825 ±531	662 ±166
Karahan 99	Kuru	1999	3845 ± 1507	0 ±0	8004 ± 9062	10158 ± 12503
	Sulu	1999	3556 ±1837	3776 ±2977	36292 ±29562	42329 ±22347
Alparslan	Kuru	2001	5618 ± 1764	3187 ± 3764	25779 ± 28175	18099 ± 22236
	Sulu	2001	6347 ±1316	1339 ±665	11698 ±4062	21943 ±2945
Sönmez-2001	Kuru	2001	1710 ± 1502	1147 ± 1987	11986 ± 15003	11539 ± 12987
	Sulu	2001	16204 ±18550	11130 ±13734	3822 ±5452	7831 ±12296
Tosunbey	Kuru	2001	3368 ± 2019	3452 ± 5274	31938 ± 2118	28605 ± 23236
	Sulu	2001	51942 ±18719	30461 ±16431	53719 ±23016	12681 ±10038
Nenehatun	Kuru	2002	11153 ± 799	9399 ± 1448	54776 ± 6554	43539 ± 8242
	Sulu	2002	9188 ±5585	21157 ±9417	75400 ±18600	31997 ±9114
Ahmetağa	Kuru	2004	1893 ± 1354	3649 ± 2007	31938 ± 2118	30038 ± 3783
	Sulu	2004	4916 ±2721	2598 ±2967	21398 ±11627	15763 ±19280
Konya 2002	Kuru	2004	2454 ± 783	617 ± 667	7647 ± 4384	33669 ± 37105
	Sulu	2004	12419 ±5036	4296 ±2891	2629 ±3826	681 ±55
Esperia	Kuru	2011	11318 ± 1222	17200 ± 489	71022 ± 1986	49250 ± 17113
	Sulu	2011	9620 ±4900	13860 ±5581	62799 ±27144	35260 ±21077
Bora	Kuru	2014	2649 ± 854	4464 ± 4204	20726 ± 13631	21847 ± 19143
	Sulu	2014	2782 ±1525	4220 ±6139	34193 ±9967	13544 ±14614
Genesi	Kuru	2014	4343 ± 2554	0 ±0	3358 ± 1857	3100 ± 955
	Sulu	2014	1976 ±1711	1063 ±0	33956 ±24201	23080 ±12398
Soana	Kuru	2020	9116 ± 1298	10425 ± 129	62231 ± 1007	47230 ± 2365
	Sulu	2020	15604 ±2896	24679 ±10541	79713 ±9081	21283 ±11200
Galinda	Kuru	2022	287 ± 497	13832 ± 179	61973 ± 3021	45583 ± 3763
	Sulu	2022	3516 ±1024	505 ±71	4890 ±3606	3772 ±2501

Bu çalışmada çölyak hastalığıyla ilişkili immünojenik epitopların buğday genotipleri arasında karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesi amacıyla, gliadin protein fraksiyonlarına ait toplam pik alanları kullanılarak ağırlıklandırılmış bir "epitop skoru matrisi" oluşturulmuştur. Söz konusu yaklaşımda, α-, γ-, ω1, 2 ve ω5 gliadin fraksiyonlarının çölyak epitopu taşıma potansiyelleri literatür temelli bağışıklık etkilerine göre derecelendirilmiş ve her fraksiyona ait toplam kantitatif veri (mAU*dk cinsinden) bu bağışıklık katsayısı ile çarpılarak normalize toplam skor hesaplanmıştır. Literatürde en yüksek bağışıklık aktivitesine sahip epitopların α-gliadin içinde yer aldığı bildirilmiştir. Özellikle 33-mer peptiti (LQLQPFPQPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQPF) ve bu yapı içerisindeki PFPQPQLPY ile PQPQLPYPQ motifleri, HLA-DQ2.5 ile yüksek afiniteli bağlanarak CD4+ T hücre yanıtını güçlü biçimde tetiklemektedir; bu nedenle α-gliadin fraksiyonu tam skorla (1.00) değerlendirilmiştir (Mamone vd. 2023; Schaart vd. 2021; Schalk vd. 2017; Shan vd. 2005). γ gliadin fraksiyonunda da çölyak hastalığı ile ilişkili DQ2/DQ8-restriktif epitoplar (örneğin QGSFQPSQQ, QQPFPQQPQ) tespit edilmiş olup, bu epitoplar α-gliadin kadar baskın olmamakla birlikte çölyak hastalarının T hücre repertuarında önemli bir yer tutmaktadır; bu nedenle bu fraksiyona 0.75 katsayısı

verilmiştir (Molberg vd. 1998; Shan vd. 2002a). ω1, 2 gliadin fraksiyonu ise daha az sayıda çölyakla ilişkili epitop taşımakta olup, bazı DQ8-restriktif motiflerin varlığı bildirilse de bağışıklık yanıtı oluşturma kapasitesi sınırlıdır; bu fraksiyon 0.50 katsayısı ile değerlendirilmiştir (Bodd vd. 2012; Koning 2003). Son olarak, ω-5 gliadin fraksiyonu esas olarak buğdaya bağlı egzersizle tetiklenen anafilaksi (WDEIA) ile ilişkili bir IgE-aracılı alerjende tanımlanmıştır; Matsuo ve arkadaşlarının (2005) çalışmasında bu fraksiyonun çok sayıda IgE epitopu taşıdığı ancak çölyak hastalığının tipik T-hücre yanıtında rol almadığı gösterilmiştir. Bu nedenle, çölyakla ilişkili epitop yüküne katkısı sınırlı görülmüş ve skorlama sisteminde 0.25 gibi düşük bir ağırlık katsayısı ile değerlendirilmiştir (Matsuo vd. 2005).

Toplam Epitop Skoru = (α-/β × 1.00) + (γ × 0.75) + (ω1, 2 × 0.50) + (ω5 × 0.25)
Bu yöntem, farklı buğday gruplarının çölyakla ilişkili epitop yükünü kantitatif düzeyde karşılaştırmaya olanak sağlamakta ve modern ıslahın antijenik içerik üzerindeki potansiyel etkilerini değerlendirmek için işlevsel bir araç sunmaktadır.

Tez çalışmaları kapsamında buğday çeşitlerinin ortalama pik alanları üzerinden oluşturulan epitop skor grafikleri Şekil 4.13'te sunulmaktadır.

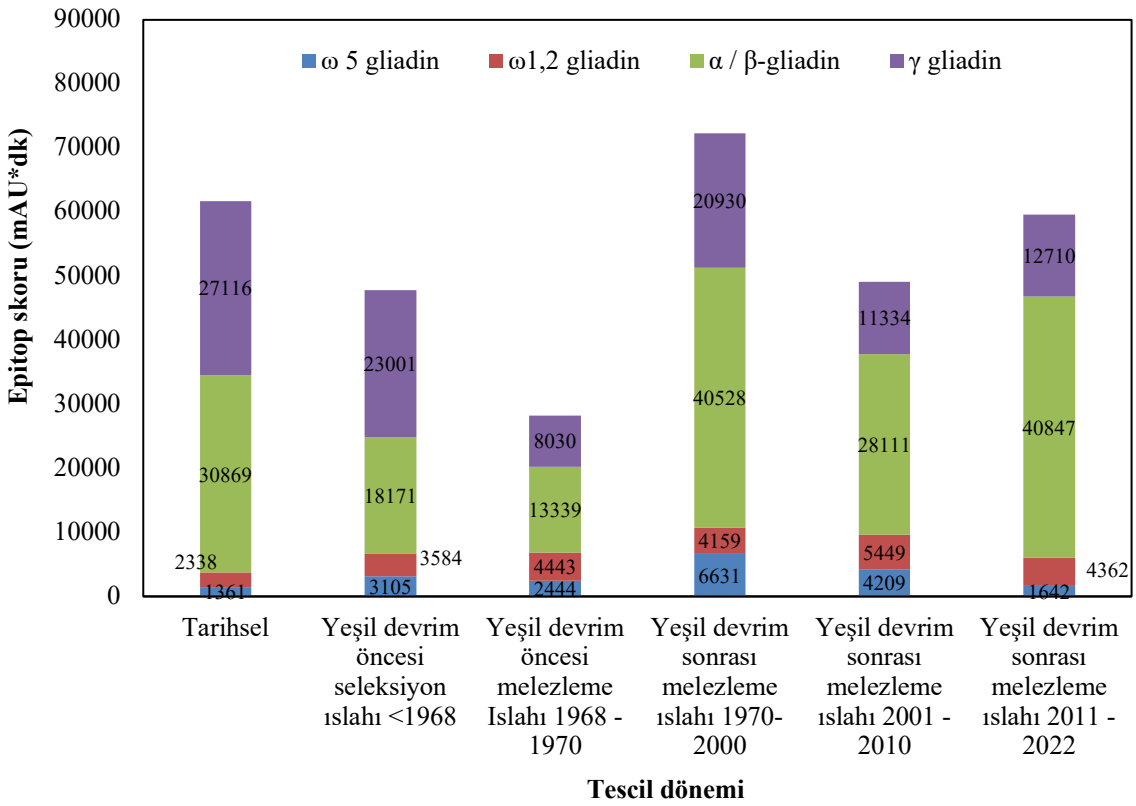


Şekil 4.13. Sulu ve kuru koşullarda yetiştirilen farklı buğday çeşitlerine ait epitop skor grafiği

24 farklı buğday çeşidinin kuru ve sulu koşullardaki toplam epitop skorları karşılaştırıldığında, yetiştirme koşullarının antijenik potansiyel üzerinde anlamlı farklılıklara yol açtığı görülmektedir; kuru koşullarda en yüksek skor Mokan (gernik) çeşidinde 160983 mAU*dk olarak kaydedilirken, en düşük değer Genesi çeşidinde 6704 mAU*dk'dır; sulu koşullarda ise maksimum değer 101423 mAU*dk ile Nenehatun çeşidine, minimum değer ise 6963 mAU*dk ile Konya 2002 çeşidine aittir. Epitop

skorunun, α-/β gliadin (1.00 katsayı), γ gliadin (0.75), ω1,2 gliadin (0.50) ve ω5 gliadin (0.25) fraksiyonlarının bağışıklık yanıtı oluşturma potansiyellerine göre ağırlıklandırıldığı bu yaklaşım, çölyak hastalığını tetikleme riskinin kantitatif olarak değerlendirilmesine olanak tanımaktadır. Bazı çeşitlerde (örneğin Ak 702, Karahan 99, Gerek 79) sulu koşullarda kuru koşullara göre daha yüksek epitop skorları gözlemlenirken, özellikle Mokan, Galinda ve Esperia gibi çeşitlerde bu durum tersine dönmekte ve kuru koşullarda çok daha yüksek skorlar elde edilmektedir.

Şekil 4.14'te sulu koşullarda yetiştirilen buğday çeşitlerinin tescil dönemlerine göre gruplandırılarak, α-/β-, γ-, ω1,2- ve ω5 gliadin fraksiyonlarının ortalama pik alanları üzerinden hesaplanan toplam epitop skorları karşılaştırılmıştır.

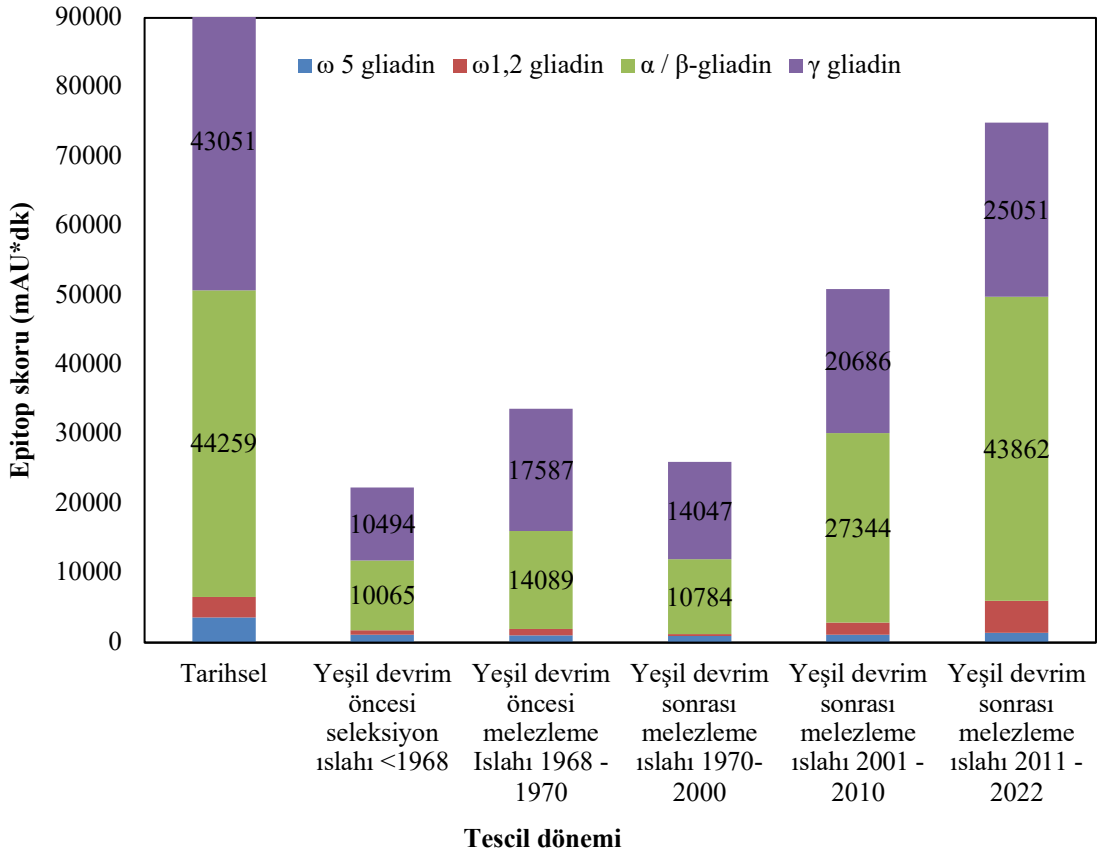


Şekil 4.14. Sulu koşullarda yetiştirilen farklı tescil dönemlerine ait buğday çeşitlerine ait epitop skor grafiği

En yüksek toplam skor, 40847 mAU*dk α/β gliadin ve 12710 mAU*dk γ gliadin içeriğiyle Yeşil Devrim sonrası (2011–2022) dönemine ait modern çeşitleri içeren 6.grupta kaydedilmiştir (toplam skor: 68853 mAU*dk); bu grubu, 40528 mAU*dk α/β gliadin ve 20930 mAU*dk γ gliadin düzeyleriyle 1970–2000 dönemini kapsayan 4.grup takip etmektedir (toplam skor: 68509 mAU*dk). Üçüncü sırada 30869 mAU*dk α/β gliadin ve 27116 mAU*dk γ gliadin seviyeleriyle Tarihsel grup yer almakta olup, toplam epitop skoru 61684 mAU*dk olarak hesaplanmıştır. Bu grupta, düşük ω katkısına rağmen yüksek α ve γ gliadin içerikleri nedeniyle dengeli bir immünojenik profil gözlenmiştir. En düşük toplam skor ise 28255 mAU*dk ile 1968–1970 yılları arasında tescillenen çeşitlerden oluşan Yeşil Devrim öncesi melezleme grubuna ait olup, özellikle α/β gliadin

(13339 mAU*dk) ve γ gliadin (8030 mAU*dk) düzeylerinin düşüklüğüyle öne çıkmaktadır. Genel olarak veriler, α/β ve γ gliadin fraksiyonlarının epitop skorundaki baskın rolünü vurgulamakta ve özellikle modern ıslah dönemlerine ait çeşitlerde bu fraksiyonların belirgin şekilde arttığını göstermektedir; bu durum, literatürde çölyakla ilişkili immunodominant epitoplar olarak tanımlanan PFPQPQLPY ve PQPQLPYPQ gibi peptitlerin bu çeşitlerde daha yoğun bulunduğuna işaret etmektedir.

Şekil 4.15, kuru koşullarda yetiştirilen buğday çeşitlerinin tescil dönemlerine göre gruplanarak gliadin alt fraksiyonlarının ortalama pik alanı (mAU*dk) üzerinden hesaplanan epitop skorlarını göstermektedir.



Şekil 4.15. Kuru koşullarda yetiştirilen farklı tescil dönemlerine ait buğday çeşitlerine ait epitop skor grafiği

Verilere göre en yüksek toplam epitop skoru 93845 ile Tarihsel grup buğdaylara aittir ve bu yüksekliğin temel nedeni 44259 α-/β gliadin ve 43051 γ gliadin katkısıdır. Bu bulgu, tarihsel çeşitlerin sanılanın aksine çölyakla ilişkili epitopları yüksek düzeyde taşıyabildiğini, özellikle α- ve γ gliadin fraksiyonlarının baskın ifade edildiğini göstermektedir. İkinci en yüksek skor 74891 ile 2011–2022 yılları arasında tescillenen modern çeşitlerde görülmüş olup, bu grupta özellikle α /β gliadin (43862) ve γ gliadin (25051) düzeyleri ön plandadır. Bu durum, modern ıslah materyallerinde çölyakla ilişkili epitop yükünün yüksekliğini koruduğunu göstermektedir. En düşük epitop skoru 22358 ile Yeşil Devrim öncesi seleksiyon ıslahı grubuna aittir; bu grupta α /β gliadin 10065 ve γ gliadin 10494 ile minimum değerlere yakın seyretmiştir. Toplam skorlar küçükten

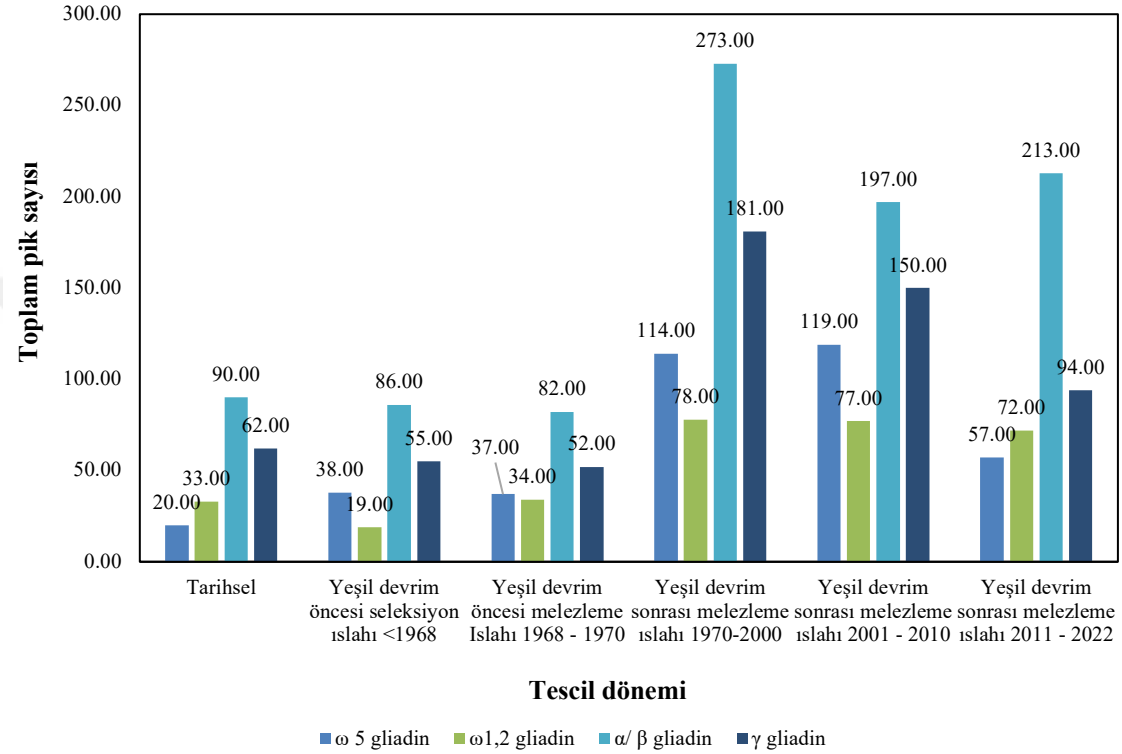
büyüğe sıralandığında 2. grup < 4. grup < 3. grup < 5. grup < 6. grup < 1. grup şeklinde bir eğilim izlenmektedir. 1970–2000 yılları arasında geliştirilen çeşitler (4. grup) α /β gliadin (10784) ve γ gliadin (14047) düzeylerinde görece düşük olup, bu dönemdeki melezleme ıslah çalışmalarının immünojenik yükü kısmen azalttığı düşünülmektedir. Buna karşın modern çeşitlerde α /β gliadin düzeylerinin 40000 bandına yaklaşması, çölyakla ilişkili immunodominant epitopların (örneğin PFPQPQLPY, PQPQLPYPQ) yoğunlaştığını göstermektedir. ω1,2-gliadin ve ω5 gliadin fraksiyonları tüm gruplarda görece daha düşük seviyelerde kalmış olup, en yüksek ω1,2 değeri 4592 ile 6. grupta, en düşük ise 285 ile 4. grupta saptanmıştır. Bu veriler, α-/β- ve γ gliadin fraksiyonlarının toplam epitop skoruna en fazla katkıyı sağladığını göstermektedir.

Elde edilen veriler doğrultusunda her bir grup için ortalama pik alanları kullanılarak oluşturulan epitop skorları, çölyak hastalığıyla ilişkili immünojenik yükün dönemsel olarak nasıl değiştiğini göstermektedir. Sulu koşullarda hesaplanan skorlar küçükten büyüğe sırasıyla 3. Grup (1968–1970) < 2. Grup Yeşil devrim öncesi seleksiyon ıslahı ile geliştirilen (<1968) < 5. Grup Yeşil devrim sonrası (2001–2010) < 1. Grup (Tarihsel) < 6. Grup (2011–2022) < 4. Grup (Yeşil Devrim sonrası) şeklinde sıralanmaktadır. Skorlar, literatürde tanımlanan çölyak immünogenik aktivitesi düzeylerine göre ağırlıklandırılarak hesaplanmış olup ((Bodd vd. 2012; Schaart vd. 2021), α-/β gliadin için 1.00, γ gliadin için 0.75, ω1,2 gliadin için 0.50 ve çölyak patogeneziyle ilişkisi sınırlı olan ω5 gliadin için 0.25 katsayısı kullanılmıştır. Şekil 4.13'e göre sulu koşullarda yetiştirilen buğday çeşitlerinin çölyak hastalığı ile ilişkili toplam epitop skorlarında en yüksek ortalama skor 72247 mAU*dk ile 4. gruba (1971–2000) ait olup, burada özellikle α-/β gliadin (40527 mAU*dk) ve γ gliadin (20930 mAU*dk) fraksiyonlarının baskınlığı çölyakla ilişkili T hücre yanıtını tetikleyen immünojenik epitopların yoğunlaştığını göstermektedir. Buna karşılık en düşük skor, 28255 mAU*dk ile 3. grupta (1968–1970 tescilli çeşitler) gözlenmiş olup, α-/β gliadin ve γ gliadin fraksiyonlarının bu dönemde daha düşük düzeyde olduğu görülmektedir.

Kuru koşullarda ise skorlar küçükten büyüğe sırasıyla 2. Grup (Yeşil devrim öncesi seleksiyon ıslahı <1968) < 4. Grup (Yeşil devrim sonrası melezleme ıslahı 1970-2000) < 3. Grup (Yeşil devrim öncesi melezleme Islahı 1968–1970) < 5. Grup (Yeşil devrim sonrası melezleme ıslahı 2001 - 2010) < 6. Grup (Yeşil devrim sonrası melezleme ıslahı 2011–2022) < 1. Grup (Tarihsel) olarak sıralanmaktadır. İmmünojenik epitopların varlığı (α-/β gliadin: 1.00, γ gliadin: 0.75, ω1,2 gliadin: 0.50, ω5 gliadin: 0.25) temelinde yapılan hesaplamalara göre en yüksek toplam skor 93845 mAU*dk ile Tarihsel döneme aittir; bu yüksek değer α-/β gliadin (44259 mAU*dk) ve γ gliadin (43051 mAU*dk) fraksiyonlarının baskın katkısından kaynaklanmaktadır. Tarihsel çeşitlerin bu fraksiyonlar bakımından gösterdiği yüksek düzey, çölyak hastalığına neden olan epitopların tarihsel çeşitlerde de yoğun olabileceğini, ancak bu yükün IgA yerine daha çok IgE ve farklı bağışıklık profillerine katkı yapabileceğini düşündürmektedir (Matsuo vd. 2005). 6. Grup (2011–2022), modern ıslah döneminin en yüksek skoru olan 74891 mAU*dk ile dikkat çekmiş ve bu yük özellikle α-/β gliadin (43862 mAU*dk) ve γ gliadin (25051 mAU*dk) seviyelerine dayanmaktadır. 5. Grup ise 20686 mAU*dk γ gliadin katkısıyla 50909 mAU*dk skora ulaşmıştır. Bu veriler, modern çeşitlerin α ve γ gliadin içeriklerinin yüksek olduğunu ve immunodominant epitopların (örneğin PFPQPQLPY) bu dönemlerde daha yoğun taşındığını göstermektedir. Öte yandan 2. ve 4. gruplarda daha düşük α ve γ gliadin seviyeleri nedeniyle toplam skorlar da sınırlı kalmıştır. Genel olarak

modern ıslah dönemlerinde çölyakla ilişkili epitop yükünde bir artış eğilimi gözlenmekle birlikte, tarihsel çeşitlerin de bu bağlamda yüksek immünojenik potansiyel taşıdığı ve yalnızca modern ıslahın bağışıklık risklerini açıklamakta yetersiz kalabileceği ortaya konmuştur.

Şekil 4.16'da sulu koşullarda yetiştirilen buğday çeşitlerinin gliadin fraksiyonlarına göre toplam pik sayıları tescil dönemlerine göre sunulmuştur.

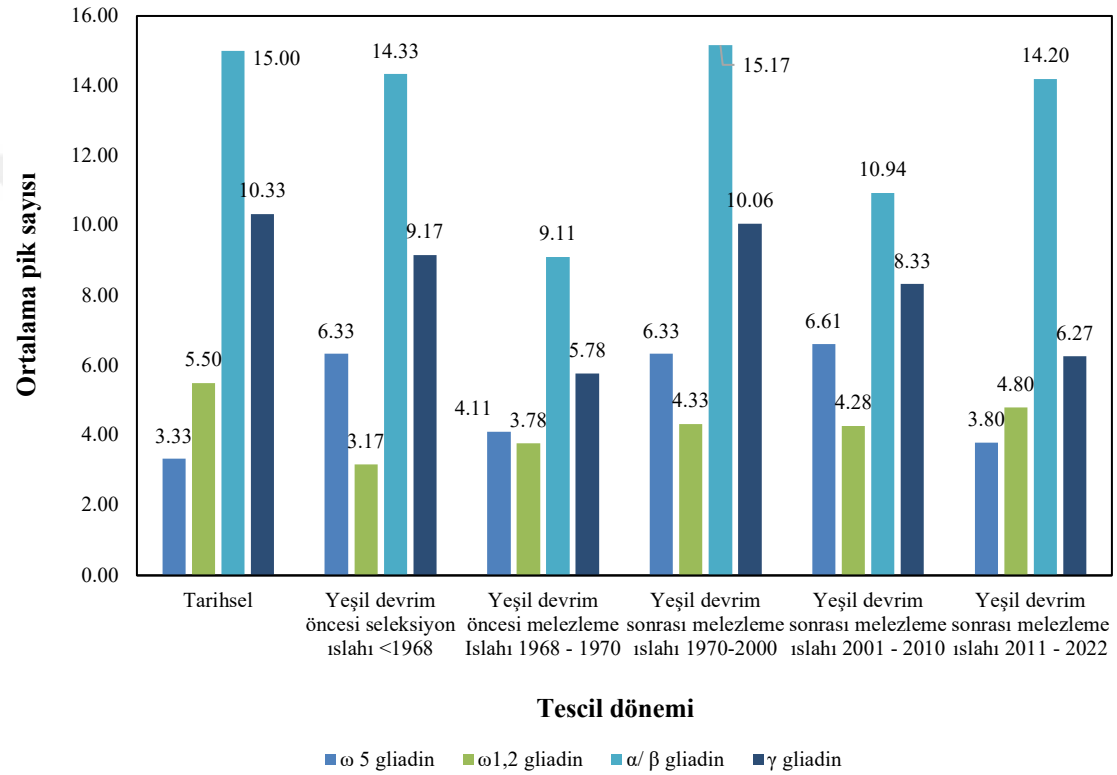


Şekil 4.16. Sulu koşullarda yetiştirilen buğday çeşitlerinin toplam pik sayısı

Verilere göre en yüksek toplam pik sayısı 4. gruba (1971–2000 tescilli modern çeşitler) aittir; bu grupta α/ β gliadin için 273 ve γ gliadin için 181 olmak üzere toplamda yüksek frekanslı immünojenik bölge zenginliği gözlenmiştir. 6. grup (2011–2022) 213 α/ β gliadin ve 94.00 γ gliadin ile ikinci sırada yer almaktadır. 5. grup (2001–2010) 197 adet α- / β gliadin piki ve 150 γ gliadin piki ile devam etmiştir. Bu durum modern dönemlerde gliadin pik çeşitliliğinin özellikle çölyakla ilişkili α- ve γ gliadin bölgelerinde belirgin şekilde arttığını göstermektedir. Buna karşılık 3. grup (1968–1970) ve 2. grup (melez öncesi dönem) düşük sayıda pik taşımaktadır; örneğin 3. grupta γ gliadin piki yalnızca 43.00'tür. Tarihsel dönem ise 90.00 α/ β gliadin ve 62.00 γ gliadin piki ile pik sayısı bakımından daha mütevazı bir düzeyde seyretmektedir. Malalgoda vd. (2018) tarafından yapılan benzer bir çalışmada, modern ve tarihsel buğday çeşitleri karşılaştırılmış ve α-gliadin epitoplarının miktarlarının salınım gösterdiği, ancak pik sayısı bazında anlamlı bir yıl korelasyonu bulunmadığı belirtilmiştir. Ancak, ω-gliadin ve bazı γ gliadin bölgeleri için yıl ile pozitif korelasyon saptanmıştır. Bu bağlamda çalışmada da 4., 5. ve 6. gruplarda özellikle ω5 gliadin ve γ gliadin pik sayılarının daha yüksek olduğu dikkat çekmektedir. Örneğin, 5. grupta 119 ω5 gliadin piki ile bu fraksiyonda en yüksek çeşitliliğe ulaşılmıştır. Malalgoda vd. (2018)'nin çalışmasında da belirtildiği gibi,

immunojenik epitoplar hem tarihsel hem de modern çeşitlerde bulunmakta olup, pik varlığı sergilenmekle birlikte, sayısal dağılım tescil yılına göre düzensizdir. Bununla birlikte, bizim bulgularımız modernleşmeyle birlikte hem α- hem γ gliadin fraksiyonlarında pik sayısı artış eğilimini ortaya koymakta, bu da çeşitlerin protein çeşitliliği ve potansiyel bağışıklık uyarıcılığı açısından daha karmaşık bir profil taşıdığını düşündürmektedir.

Şekil 4.17'de sulu koşullarda yetiştirilen buğday çeşitlerinin ortalama gliadin pik sayıları tescil dönemlerine göre karşılaştırılmış ve gliadin alt fraksiyonlarının dağılımı gösterilmektedir.

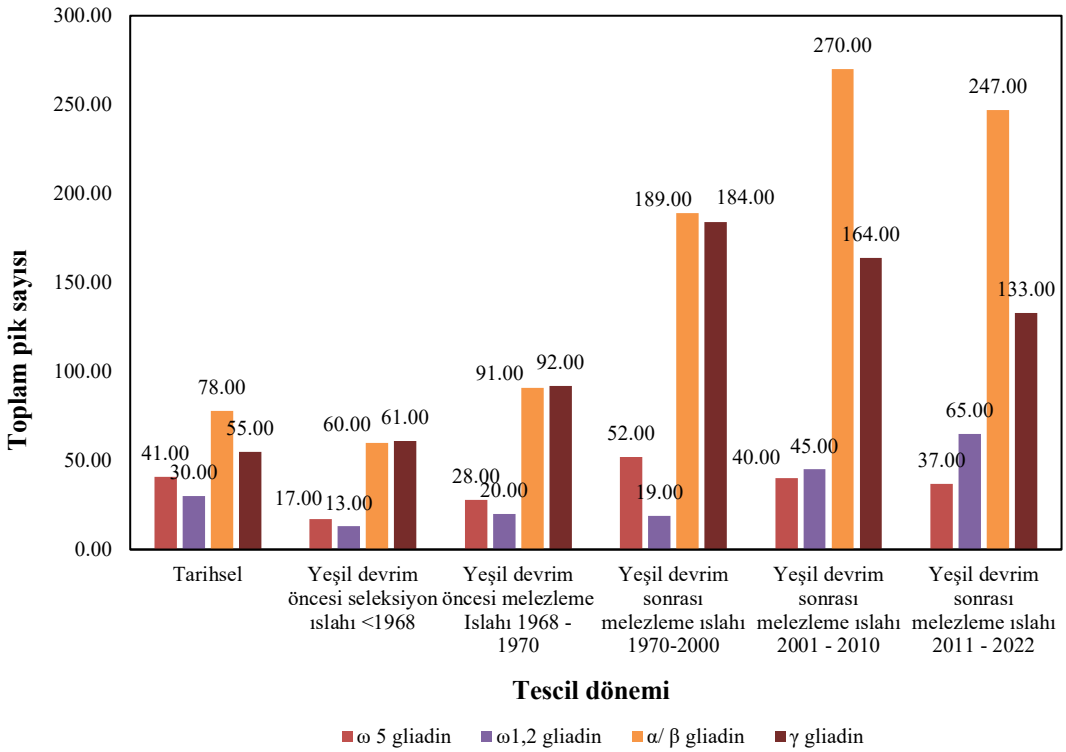


Şekil 4.17. Sulu koşullarda yetiştirilen buğday çeşitlerinin ortalama pik sayıları

Grafikteki veriler, özellikle α-/β ve γ gliadin fraksiyonlarında zamanla artan pik sayısı ile immünojenik potansiyelin modern dönemlerde belirgin biçimde arttığını ortaya koymaktadır. α-/β gliadin ortalama pik sayısı bakımından en yüksek değerin 4. grupta (1970–2000 yılları arası tescil edilen çeşitler) 273.00 ile gözlendiği, bu grubu 213.00 ile 6. grup (2011–2022) ve 197.00 ile 5. grup (2001–2010) çeşitlerinin izlediği görülmektedir. γ gliadin fraksiyonunda da benzer bir eğilim izlenmiş ve sırasıyla 181.00, 150.00 ve 94.00 ortalama pik sayıları ile bu modern gruplar öne çıkmıştır. Buna karşılık tarihsel çeşitler (90.00 α-/β-, 62.00 γ gliadin) ve Yeşil Devrim öncesi seleksiyon/melezleme dönemi çeşitleri daha düşük ortalama değerlere sahip olup, 2. ve 3. gruplarda α-/β-gliadin ortalaması sırasıyla 57.00 ve 82.00, γ gliadin ise sırasıyla 34.00 ve 43.00 olarak belirlenmiştir. Ayrıca, ω5 gliadin ortalama pik sayısı modern çeşitlerde belirgin bir artış sergileyerek 5. grupta 119.00 ve 4. grupta 114.00 ile zirveye ulaşmıştır. Bu durum, Malalgoda vd. (2018) tarafından bildirilen yıl ile ω- ve γ gliadin fraksiyonları arasındaki korelasyonla tutarlılık göstermektedir. Özellikle α-/β-gliadin fraksiyonu,

çölyak hastalığıyla doğrudan ilişkili epitopları (ör. glia-α9 ve glia-α20) taşıması nedeniyle klinik açıdan önemlidir ve modern çeşitlerde bu fraksiyonun pik sayısındaki belirgin artış, immunojenik protein repertuvarının genişlediğine ve bağışıklık sistemini uyarma potansiyelinin arttığına işaret etmektedir. Bu bulgular, modern buğday ıslahı sürecinde hem teknolojik kaliteyi artırmak hem de hastalık riskini gözetmek adına protein içeriğinin niteliksel değerlendirilmesinin önemini vurgulamaktadır.

Şekil 4.18'de kuru koşullarda yetiştirilen buğday çeşitlerinin gliadin fraksiyonlarına ait toplam pik sayıları gösterilmektedir.

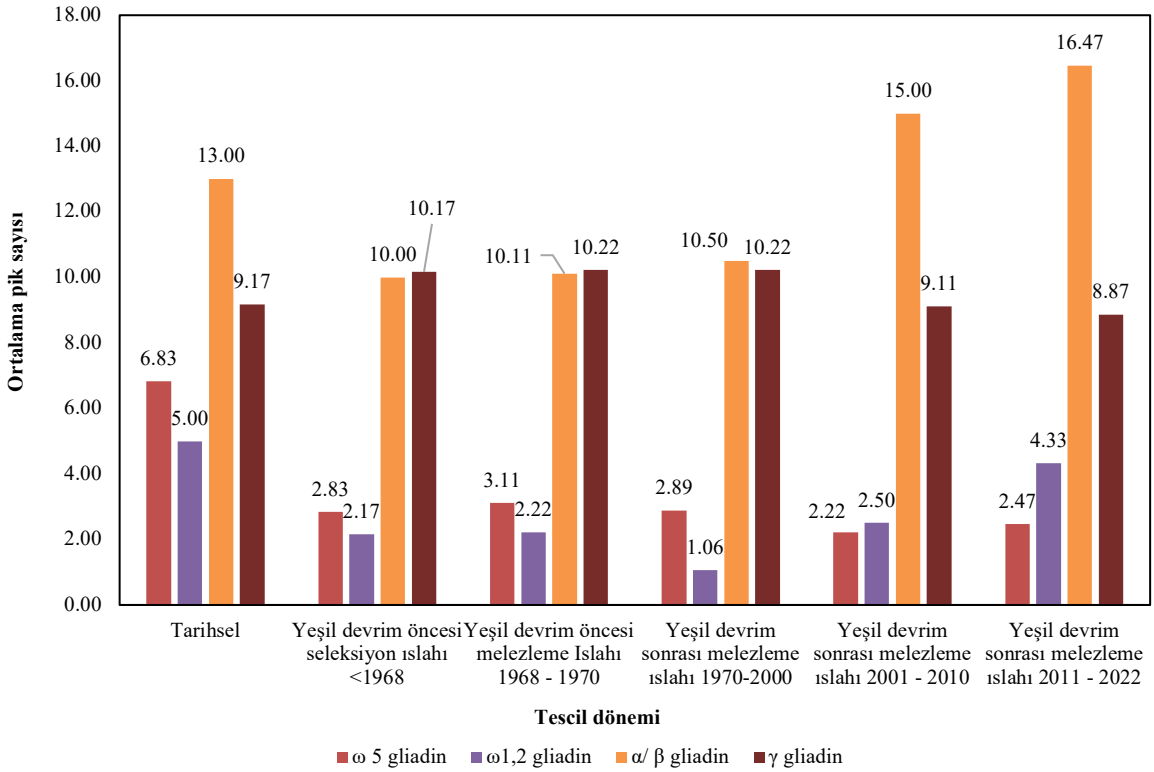


Şekil 4.18. Kuru koşullarda yetiştirilen buğday çeşitlerinin toplam pik sayıları

α-/β-gliadin fraksiyonunda en yüksek ortalama pik sayısı 16.47 ile Yeşil Devrim sonrası melezleme ıslahı 2011–2022 grubuna aittir; bu değerin yüksekliği, Soana gibi α-gliadin yoğunluğu yüksek modern çeşitlerin katkısıyla ilişkilendirilebilir. Aynı fraksiyonda ikinci sırada 15.00 ile 2001–2010 grubu, üçüncü sırada ise 13.00 ile Tarihsel grup yer almakta olup, en düşük değer yalnızca 10.00 ile 1968 öncesi seleksiyon grubuna aittir. γ gliadin fraksiyonunda en yüksek ortalama 10.22 ile hem 1968–1970 melezleme öncesi grubu hem de 1970–2000 dönemi tarafından paylaşılmakta, bunu 10.17 ile seleksiyon grubu ve 9.17 ile Tarihsel dönem izlemektedir; bu fraksiyonda en düşük ortalama 8.87 ile son grup olan 2011–2022 döneminde gözlenmiştir. ω1,2-gliadin fraksiyonu açısından en yüksek değer 5.00 ile Tarihsel grupta belirlenmiş, en düşük ortalama ise 1.06 ile 1970–2000 grubu tarafından sunulmuştur. ω5 gliadin fraksiyonunda ise 6.83 ile Tarihsel grup ilk sırada yer almakta, 4.33 ile 2011–2022 grubu ve 3.11 ile 1968–1970 dönemi bunu takip etmektedir; bu fraksiyonda en düşük değer 2.22 ile 2001–2010 döneminde tespit edilmiştir. Elde edilen bulgular, α-/β-gliadin çeşitliliğinin modern ıslah dönemlerinde, özellikle 6. grupta, belirgin şekilde arttığını ve çölyakla ilişkili epitop

yükünün bu gruplarda daha fazla çeşitlilik gösterebileceğini ortaya koymaktadır. Öte yandan, ω ve γ gliadin fraksiyonlarında Tarihsel ve erken dönem grupların daha yüksek pik sayısına sahip olması, bu fraksiyonların zamanla daha dar bir profile yönelmiş olabileceğini ve modern ıslah sürecinin bazı gliadin türlerini baskılarken α-gliadin gibi fraksiyonlarda birikime yol açtığını düşündürmektedir. Bu durum, modern çeşitlerin antijenik yük bakımından daha özgül ancak daha yoğun epitop profili taşıyabileceğini göstermektedir.

Şekil 4.19'da kuru koşullarda yetiştirilen buğday çeşitlerinin ortalama gliadin pik sayıları, tescil dönemlerine göre gliadin alt fraksiyonları özelinde sunulmuştur.

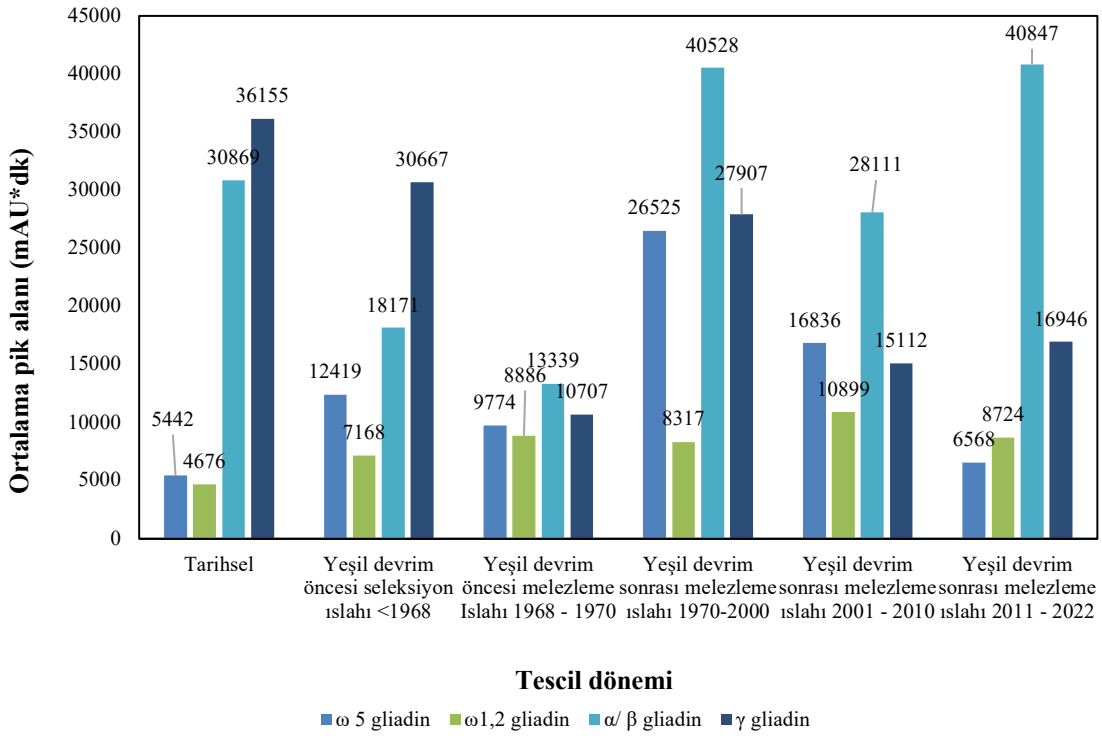


Şekil 4.19. Kuru koşullarda yetiştirilen buğday çeşitlerinin ortalama pik sayıları

Elde edilen bulgular, α-/β-gliadin ve γ gliadin fraksiyonlarının modern dönemlere doğru belirgin bir artış gösterdiğini ortaya koymaktadır. Özellikle α-/β-gliadin fraksiyonunda 6. grup (2011–2022) 16.47 ortalama pik sayısı ile tüm dönemler arasında en yüksek değeri göstermiştir; bu değeri sırasıyla 15.00 (5. grup, 2001–2010) ve 13.00 (tarihsel grup) takip etmektedir. γ gliadin fraksiyonunda ise modern gruplar olan 6. (8.87) ve 5. grup (9.11) yine öne çıkmakta, bu da çölyak hastalığı açısından kritik olan bu iki fraksiyonda modern buğdayların immünojenik epitop barındırma potansiyelinin yükseldiğini düşündürmektedir. Buna karşın ω5- ve ω1,2-gliadin fraksiyonları, özellikle 4. grup (1970–2000) itibariyle ortalama pik sayısında düşüş göstermekte olup, 1.06 (ω5) ve 2.89 (ω1,2) gibi düşük seviyelere gerilemiştir. Bu durum, ıslah sürecinde bu fraksiyonların piksel çeşitliliği bakımından sınırlı katkı sağladığını ima etmektedir. Özellikle α-/β-gliadin fraksiyonundaki pik sayısındaki modernleşmeyle birlikte gözlenen artış, glia-α9 ve glia-α20 gibi epitopların potansiyel varlığı açısından önemlidir.

Malalgoda vd. (2018) çalışmasında da α-gliadin pik sayısında yıl bazlı bir korelasyonun bulunmadığı belirtilse de bu çalışmada modern gruplarda artış eğilimi gözlenmiştir. Sonuç olarak, grafik kuru koşullarda bile modern çeşitlerin daha yüksek ortalama pik sayısına sahip olduğunu ve bunun özellikle immünojenik fraksiyonlarda yoğunlaştığını göstererek, modern buğdayların çölyak riski açısından daha karmaşık bir protein profiline sahip olabileceğini desteklemektedir.

Şekil 4.20'de sulu koşullarda yetiştirilen buğday çeşitlerinin gliadin fraksiyonlarına ait ortalama pik alanları (mAU*dk), tescil dönemlerine göre sınıflandırılarak değerlendirilmiştir.

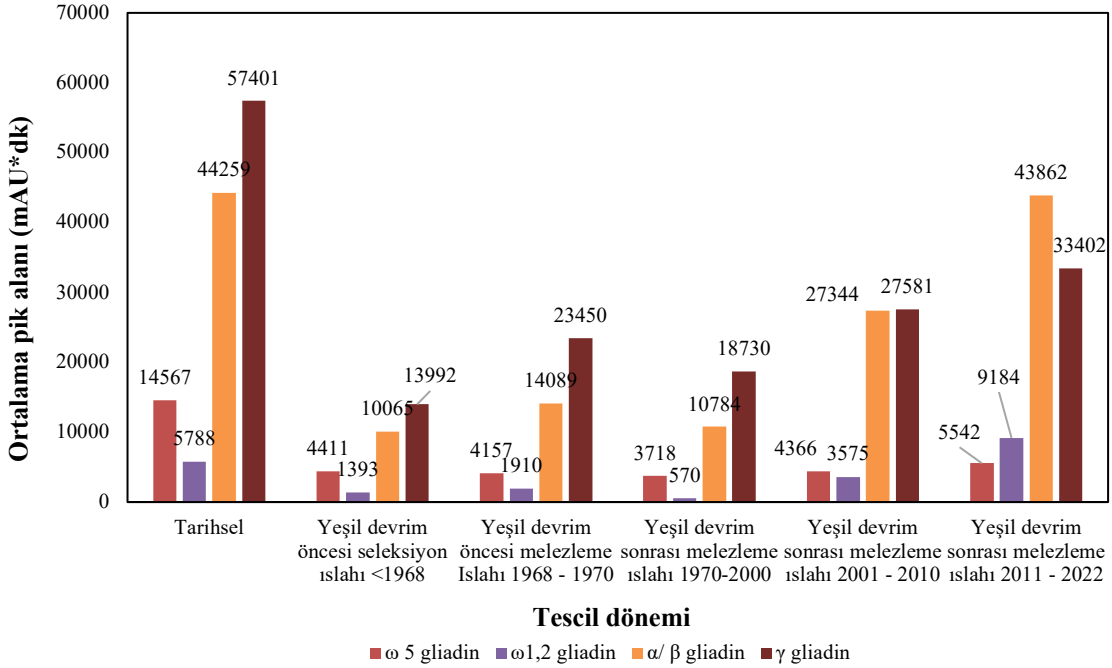


Şekil 4.20. Sulu koşullarda yetiştirilen buğday çeşitlerinin ortalama pik alanı

Özellikle modern tescilli çeşitlerde (5. ve 6. gruplar) α-/β-gliadin ve γ gliadin fraksiyonlarının pik alanlarının belirgin şekilde arttığını ortaya koymaktadır. 6. grup (2011–2022), α-/β-gliadin için 40847 mAU*dk ile en yüksek ortalama pik alanına sahip olup bu değeri 40528 mAU*dk ile 4. grup (1970–2000) ve 36155 mAU*dk ile tarihsel grup takip etmektedir. γ gliadin fraksiyonunda da en yüksek ortalama pik alanı 27907 mAU*dk ile 4. grupta gözlenirken, 6. grup 16946 mAU*dk ve 3. grup 13339 mAU*dk ile öne çıkmaktadır. Buna karşın ω1,2- ve ω5 gliadin fraksiyonlarında pik alanları görece daha düşüktür; örneğin ω5 gliadin fraksiyonu 6. grupta 8724 mAU*dk iken tarihsel grupta sadece 5442 mAU*dk'dır. Bu bulgular, α-/β-gliadin fraksiyonunun modern çeşitlerde sadece pik sayısı değil, aynı zamanda pik alanı bakımından da artış gösterdiğini ve bu artışın potansiyel immünojenik yükü artırabileceğini göstermektedir. Malalgoda vd. (2018) çalışması, pik sayısı bazında korelasyonun zayıf olabileceğini, ancak bazı fraksiyonların miktar yönünden önemli farklılıklar taşıyabileceğini vurgulamıştır; bu bağlamda elde edilen veriler, sulu koşullar altında modern tescilli buğday çeşitleri,

immünojenik potansiyeli yüksek gliadin fraksiyonlarında hem çeşitlilik hem de miktar açısından daha zengin bir protein profili sunmaktadır.

Şekil 4.21'de kuru koşullarda yetiştirilen buğday çeşitlerinin ortalama gliadin pik alanları tescil dönemlerine göre verilmiştir.

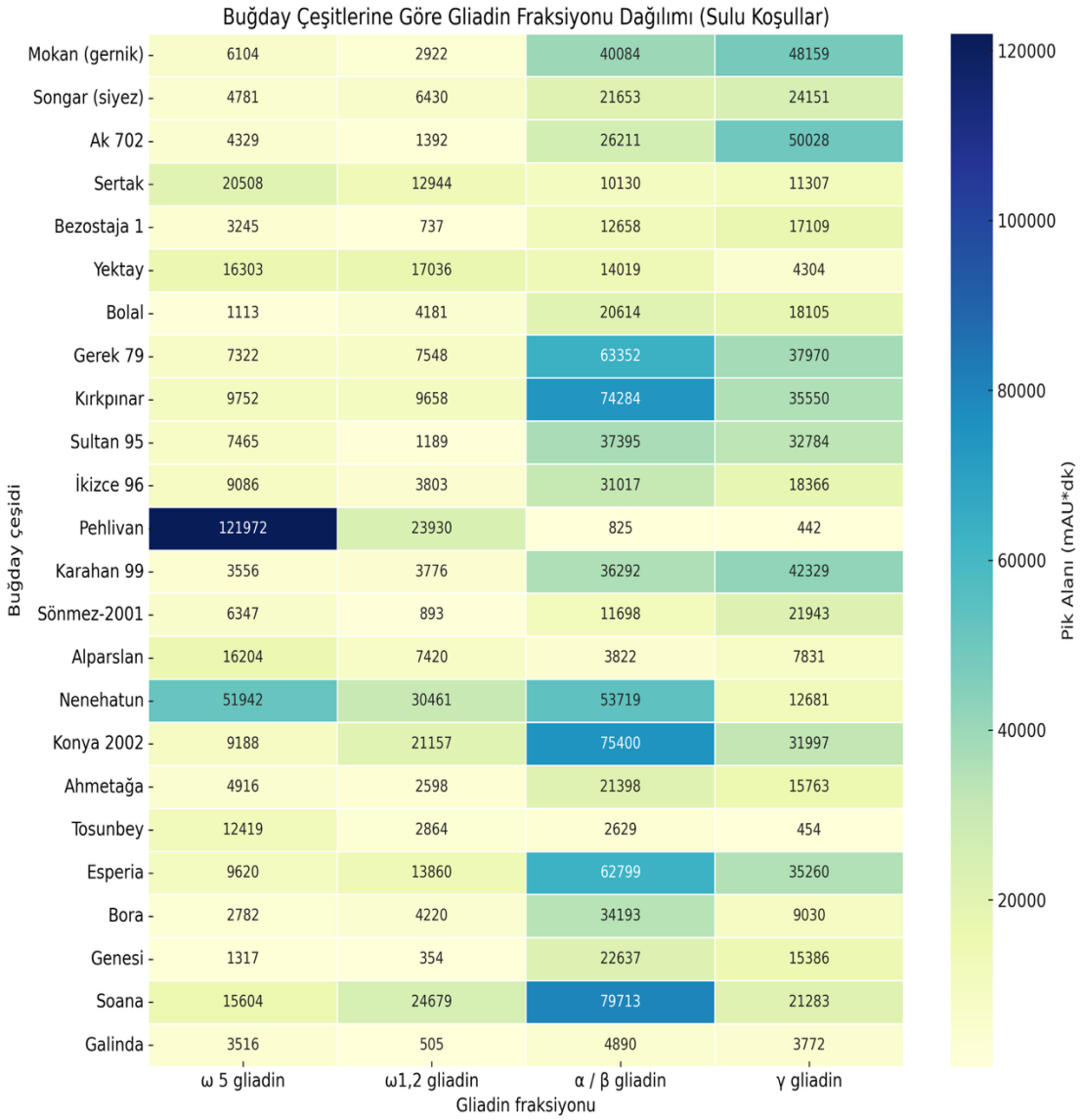


Şekil 4.21. Kuru koşullarda yetiştirilen buğday çeşitlerinin ortalama pik alanları

Yukarıdaki grafiğe göre, α-/β-gliadin fraksiyonunda en yüksek ortalama pik alanı 57401 mAU*dk ile Tarihsel grupta saptanmış, bu değeri 43862 mAU*dk ile 6. grup (2011–2022) ve 27344 mAU*dk ile 5. grup (2001–2010) takip etmiştir. Şekil 4.21'e göre yapılan ayrıntılı analizde, bu fraksiyonda 3404.51 mAU*dk ile Tarihsel dönem yine ilk sırada yer almakta, ancak daha sonra 3. grup (1968–1970) 1039.44 mAU*dk ve 4. grup (1971–2000) 1027.01 mAU*dk gibi görece daha düşük değerler göstermektedir; modern 5. grup (2001–2010) ise yalnızca 86.24 mAU*dk ile en düşük α-/β-gliadin içeriğine sahip olup bu grup dışında kalan modern 6. grup (2011–2022) 800.89 mAU*dk ile yeniden artış göstermektedir. Literatürde α-gliadin fraksiyonu, çölyak hastalığını tetikleyen başlıca epitopları (özellikle glia-α9 ve glia-α20) taşıyan protein grubu olarak tanımlanmakta olup, HLA-DQ2.5 molekülüne yüksek afiniteli bağlanan immünojenik peptitlerin büyük kısmı bu fraksiyondan kaynaklanmaktadır (Kim vd. 2004); Qiao vd. (2004) tarafından yapılan çalışmada da α-gliadin epitoplarının hem tarihsel hem de modern çeşitlerde tespit edildiği, ancak bu epitopların miktarlarının genotipler arasında anlamlı farklılıklar gösterdiği ve tescil yılı ile doğrudan korelasyon göstermediği ifade edilmiştir. Bu bulgu, tez çalışması verileriyle örtüşmekte olup α-/β-gliadin ekspresyonunun dönemsel dalgalanmalarla birlikte bazı modern genotiplere özgü olarak yeniden artış gösterebildiğini ortaya koymaktadır. γ gliadin fraksiyonu ise 44259 mAU*dk ile yine Tarihsel dönemde en yüksek değeri sunarken, 33402 mAU*dk ile 6. grup da dikkat çeken yüksekliğe sahiptir. Özellikle QQPFPQQPQ gibi DQ2/DQ8-restriktif epitopları taşıyan γ gliadin fraksiyonu çölyak hastalığı açısından göz ardı edilmemelidir (Qiao vd. 2004). Sonuç olarak, α-/β-gliadin fraksiyonunda gözlenen miktarsal dalgalanmaların sadece

tescil yılına değil, genetik varyasyon ve ıslah süreçlerindeki seçilim baskılarına da bağlı olduğu anlaşılmaktadır.

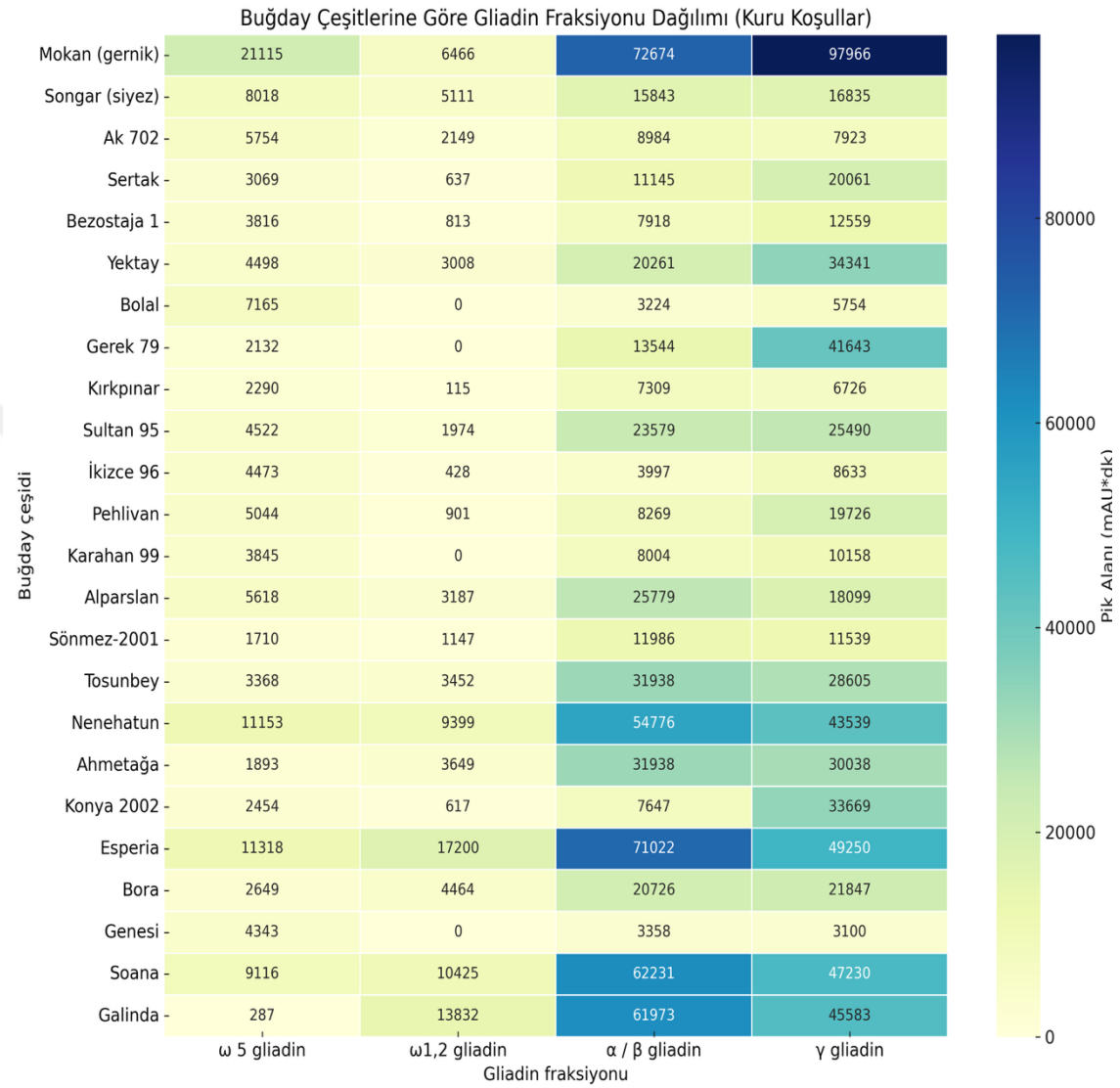
Şekil 4.22'de sunulan ısı haritası, sulu koşullarda yetiştirilen 24 farklı buğday çeşidinden elde edilen gliadin fraksiyonlarının (ω5 gliadin , ω1,2-gliadin, α/β-gliadin ve γ gliadin) ortalama pik alanlarına (mAU*dk) dayanmaktadır.



Şekil 4.22. Sulu koşullardaki gliadin alt fraksiyonlarına ait pik alanlarının ısı haritası

Özellikle α/β-gliadin fraksiyonu bakımından bazı buğday çeşitlerinin belirgin şekilde öne çıktığı gözlemlenmiştir. Bu fraksiyonda en yüksek değerlere sahip çeşitler sırasıyla Soana (79713 mAU*dk), Konya 2002 (75400 mAU*dk), Kırkpınar (74284 mAU*dk) ve Esperia (62799 mAU*dk) olmuştur. Bu durum, söz konusu çeşitlerin çölyak hastalığı gibi gliadin kaynaklı immün yanıtlarla ilişkili epitopları taşıma potansiyelinin yüksek olabileceğine işaret etmektedir. Bu nedenle, bu çeşitlerin immünojenite potansiyeli açısından daha dikkatli ve ayrıntılı şekilde değerlendirilmesi önerilmektedir.

Şekil 4.23'te sunulan ısı haritası, kuru koşullarda yetiştirilen 24 farklı buğday çeşidinden elde edilen gliadin alt fraksiyonlarına (ω5 gliadin , ω1,2-gliadin, α/β-gliadin, γ gliadin) ait ortalama pik alanlarını (mAU*dk) göstermektedir.

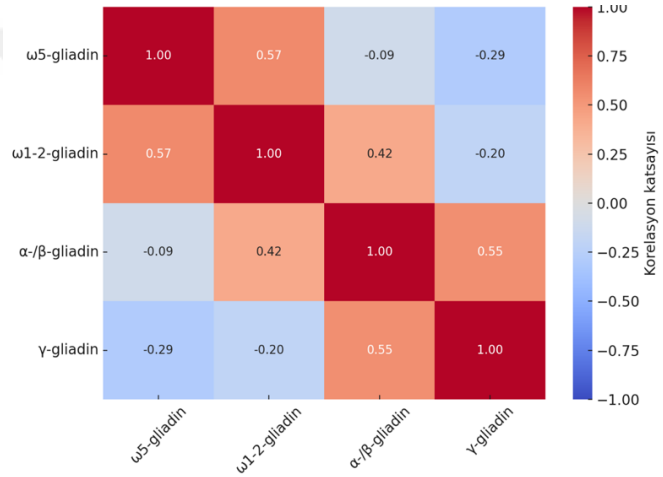


Şekil 4.23. Kuru koşullardaki gliadin alt fraksiyonlarına ait pik alanlarının ısı haritası

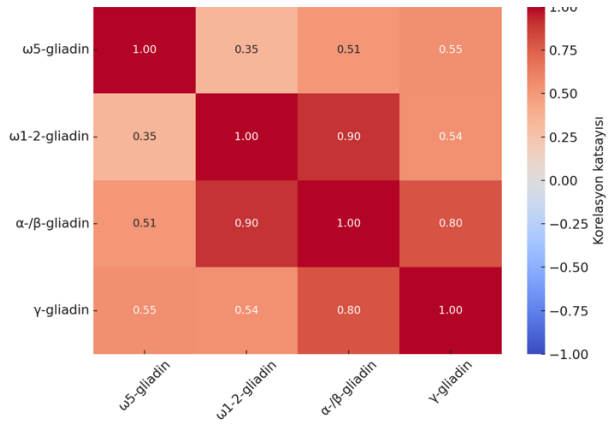
Harita, çeşitler arasında hem toplam gliadin düzeyi hem de fraksiyonlara göre dağılım açısından önemli düzeyde varyasyon olduğunu ortaya koymaktadır. Özellikle α/β-gliadin fraksiyonu açısından en yüksek değerlere sahip çeşitler arasında Esperia (71022 mAU*dk), Soana (62231 mAU*dk) ve Galinda (61973 mAU*dk) yer almakta ve bu çeşitler immünojenite açısından dikkatle değerlendirilmesi gereken adaylar olarak öne çıkmaktadır. Bu fraksiyon, çölyak hastalığında önemli rol oynayan epitopların büyük bir kısmını taşıyan fraksiyon olması nedeniyle özel önem arz etmektedir. Benzer şekilde, γ gliadin düzeyleri açısından da Mokan (gernik) (97966 mAU*dk), Galinda (45583 mAU*dk), Soana (47230 mAU*dk) ve Esperia (49250 mAU*dk) gibi çeşitlerin öne çıktığı görülmektedir. γ gliadin, α-gliadin kadar olmasa da çölyakla ilişkili bazı epitopları barındırabilir ve aynı zamanda protein kalitesi üzerinde de etkili olabilir. ω1,2-gliadin

düzeyi bakımından Esperia (17200 mAU*dk), Soana (10425 mAU*dk), Galinda (13832 mAU*dk) ve Nenehatun (9399 mAU*dk) gibi çeşitlerde yüksek seviyeler gözlenmiştir. Bu fraksiyonların çölyakla doğrudan ilişkisi sınırlı olmakla birlikte, bazı immün yanıtlarla bağlantılı olabileceği bildirilmiştir. ω5 gliadin , literatürde buğday alerjilerinin (özellikle buğday bağımlı egzersizle tetiklenen anafilaksi – WDEIA) en güçlü tetikleyici proteinlerinden biri olarak tanımlanmıştır. Kuru koşullarda bu fraksiyon açısından yüksek değerlere sahip olan çeşitler arasında Nenehatun (11153 mAU*dk), Esperia (11318 mAU*dk), Mokan (21115 mAU*dk) ve Soana (9116 mAU*dk) öne çıkmaktadır. Bu durum, bu çeşitlerin sadece çölyak değil, aynı zamanda buğdaya bağlı alerjik riskler açısından da değerlendirilmesi gerektiğini ortaya koymaktadır.

Şekil 4.24 ve Şekil 4.25'te yapılan korelasyon analizi, sulu ve kuru koşullar altında gliadin fraksiyonları arasında gözlenen ilişkilerin ortam koşullarına bağlı olarak belirgin biçimde farklılık gösterdiğini ortaya koymaktadır.



Şekil 4.24. Sulu koşullarda yetişen buğday çeşitlerinin gliadin alt üniteleri arasındaki korelasyon



Şekil 4.25. Kuru koşullarda yetişen buğday çeşitlerinin gliadin alt üniteleri arasındaki korelasyon

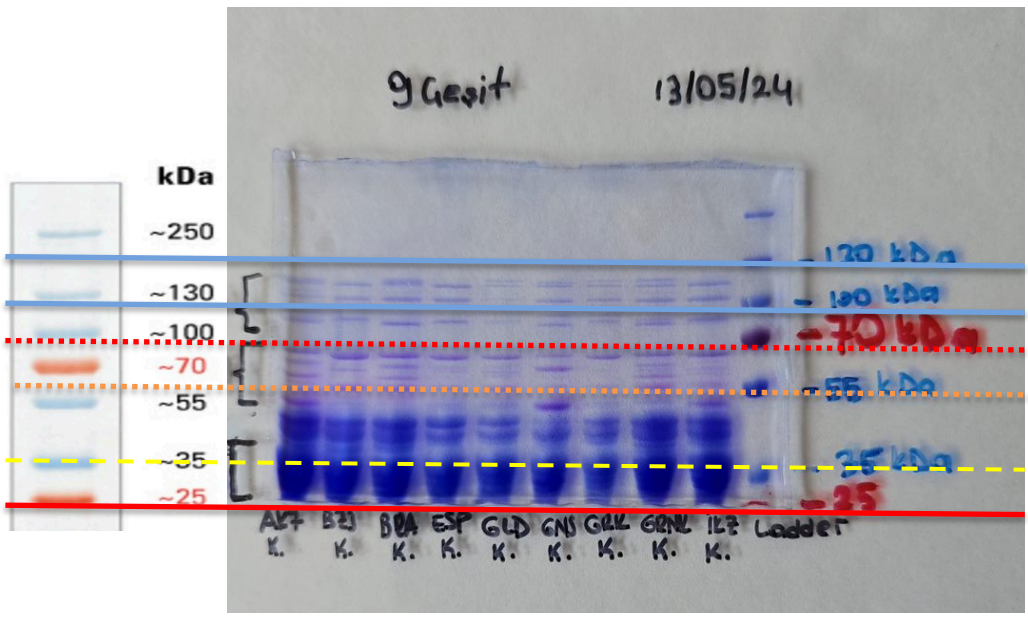
Sulu koşullarda (Şekil 4.24) yapılan analizde α-/β-gliadin ile γ gliadin arasında güçlü bir pozitif korelasyon (r = 0.55), ω1,2-gliadin ile α-/β-gliadin arasında ise orta

düzeyde pozitif korelasyon (r = 0.42) tespit edilmiştir; bu durum özellikle çölyakla ilişkili immünojenik epitopları barındıran fraksiyonlar arasında bir eş yönelimi işaret ederken, ω5 gliadin ile α-/β-gliadin (r = –0.09) ve γ gliadin (r = –0.29) arasında negatif korelasyonlar saptanmıştır. Kuru koşullarda (Şekil 4.25) ise tüm fraksiyonlar arasında pozitif korelasyonlar dikkat çekmekte olup α-/β-gliadin ile γ gliadin arasında r = 0.84, α-/β-gliadin ile ω1,2-gliadin arasında r = 0.59 gibi yüksek düzeyde anlamlı ilişkiler belirlenmiştir. Ayrıca kuru ortamda ω5 gliadin ile α-/β-gliadin (r = 0.51) ve γ gliadin (r = 0.55) arasındaki korelasyonlar da kuvvetli olup bu fraksiyonların birlikte artış eğilimi gösterdiğini göstermektedir. Bu farklılıklar, protein ekspresyon profillerinin çevresel streslere (su kısıtı, sıcaklık gibi) duyarlı olduğunu, dolayısıyla epitop içeriği ve dağılımının sadece genetik değil, yetiştirme koşullarıyla da şekillendiğini ortaya koymaktadır. Bu bağlamda, çölyak hastalığı açısından riskli peptitlerin tanımlanmasında çevresel faktörlerin göz önünde bulundurulması gerektiği, yalnızca genotipik değerlendirmelerle sınırlı kalınmaması gerektiği sonucuna varılabilir.

4.3. Buğday Çeşitlerindeki İmmonojenik Epitop Dağılımları

4.3.1. Gliadin fraksiyonlarının SDS-PAGE yöntemi ile dağılımları

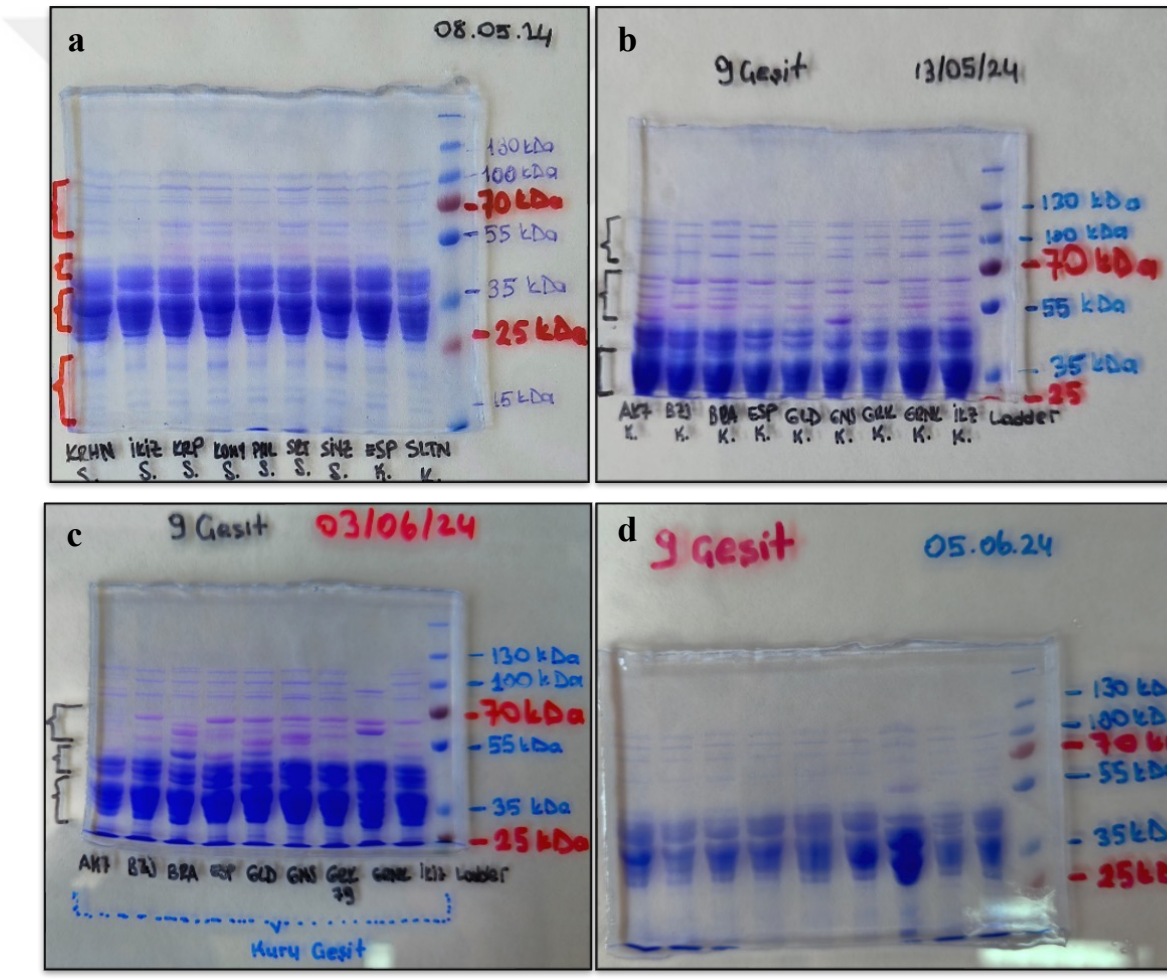
Bu çalışmada, farklı buğday çeşitlerinin protein profilleri, SDS-PAGE yöntemi kullanılarak analiz edilmiştir. Her bir kuyuda farklı bir buğday çeşidi yer almakta olup, çeşitlerin moleküler ağırlıklarına göre protein bant desenleri incelenmiş ve aralarındaki benzerlikler ile farklılıklar değerlendirilmiştir (Şekil 4.26). Proteinlerin moleküler ağırlıklarına göre dağılımı şu şekilde yorumlanmıştır: 55–70 kDa aralığında yer alan bantlar, özellikle ω5 gliadin ve ω1,2-gliadin miktarını temsil etmektedir.



Şekil 4.26. Buğday çeşitlerinin moleküler ağırlıklarına göre dağılımı

Çeşitler arasında bu bölgede gözlenen bant yoğunluğu farklılıkları, gliadin içeriklerinin değişkenlik gösterdiğini ortaya koymaktadır. Örneğin, sulu koşullarda

yetişen Karahan ve İkizce çeşitlerinde bu bölgede belirgin yoğunluk gözlenirken, Pehlivan gibi bazı çeşitlerde daha zayıf bantlar görülmüştür. Bu durum, sulu koşullarda yetişen Karahan ve İkizce çeşitlerinin daha yüksek gliadin içeriğine sahip olduğunu ve çölyak hastalığıyla ilişkili antijenik epitopları barındırabileceğini göstermektedir. 28–35 kDa aralığında gözlenen bantlar, α /β gliadin ve γ gliadinlerin varlığını işaret etmektedir. Özellikle yoğun bantların bulunduğu çeşitler, bu gliadin türlerinin yüksek oranda ifade edildiğini göstermektedir. Şekil 4.27.'de, Sultan 95 çeşidinde bu bölgede yoğun bantlar tespit edilmiş olup, bu durum antijenik gliadin miktarının fazla olduğunu düşündürmektedir. Daha zayıf bant yoğunlukları ise düşük gliadin içeriklerini işaret edebilir. Çeşitlerin protein profilleri arasındaki farklılıklar şu şekilde özetlenebilir: Sultan 95 ve Esperia çeşitlerinde yoğun bantların tespit edilmesi, özellikle α /β gliadin fraksiyonlarının yüksek miktarda olduğunu göstermektedir. Tarihsel buğday çeşitleri (örneğin Siyez ve Gernik) ile modern buğday çeşitleri karşılaştırıldığında, özellikle 55-70 kDa bölgesinde daha yoğun bantlara sahip olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.27.a ve b).



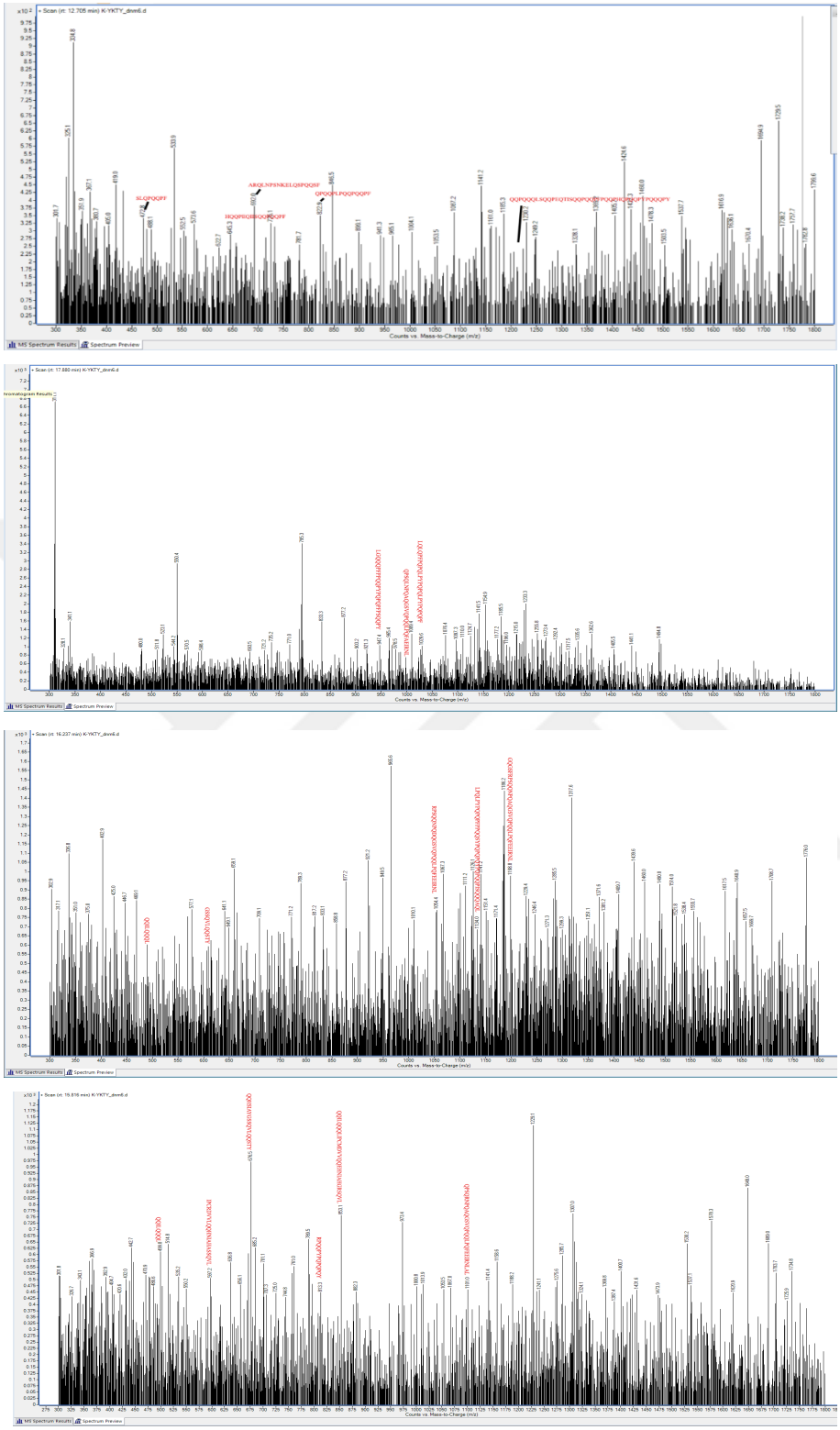
Şekil 4.27. Gliadin alt fraksiyonlarına ait SDS PAGE görüntüleri

Şekil 4.27.c'de ise SDS-PAGE jeli, 9 farklı buğday çeşidinin protein bant desenlerini içermektedir. Görseldeki protein bantlarının moleküler ağırlıkları ve yoğunlukları incelenerek çeşitler arasındaki benzerlik ve farklılıklar analiz edilmiştir. Jel

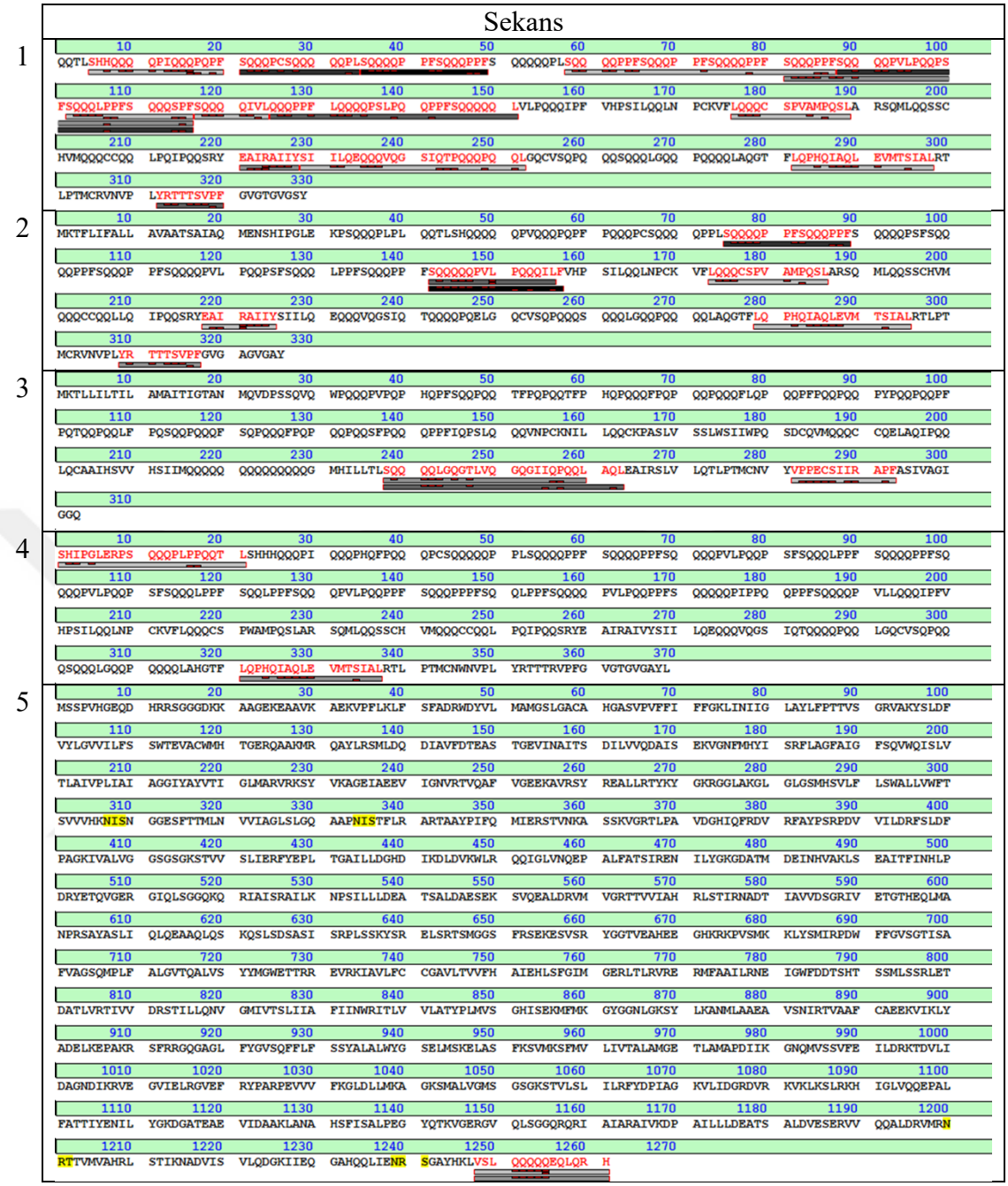
kuyuları sırasıyla sulu koşullarda yetiştirilen Ak702, Bezostaja 1, Bora, Esperia, Galinda, Genesi, Gerek79, Mokan (Gernik), İkizce 96 ve ladder içermektedir. Proteinlerin moleküler ağırlıklarına göre dağılımı şu şekilde yorumlanmıştır: 130 kDa ve 100 kDa aralığında belirgin bir bant gözlenmemektedir, bu durum bu moleküler ağırlığa sahip proteinlerin buğday çeşitlerinde düşük seviyelerde ifade edildiğini veya tamamen bulunmadığını gösterebilir. 70 kDa ve 55 kDa aralığında ise belirgin bantlar görülmektedir; bu bölgede bulunan bantlar özellikle ω5 gliadin ve ω1,2-gliadinlerin varlığını işaret eder. Ak702, Esperia ve Galinda kuyularında 70 kDa civarındaki bantlar oldukça yoğun görünmektedir ve bu durum bu çeşitlerin gliadin içeriklerinin yüksek olduğunu ve çölyak hastalığıyla ilişkili epitopları barındırabileceğini göstermektedir. Buna karşılık, Mokan (Gernik) ve İkizce96 kuyularında bu bölgede zayıf bantlar görülmekte, bu da bu çeşitlerde daha düşük ω-gliadin içeriğini işaret etmektedir. 35 kDa ve 25 kDa aralığında yoğun bantlar gözlenmekte olup, bu bantlar özellikle α /β gliadin ve γ gliadinlerin varlığını göstermektedir. Bezostaja 1, Galinda ve Gerek 79 kuyularında 28-35 kDa aralığındaki bantların yoğunluğu, α /β gliadinlerin yüksek oranda ifade edildiğini işaret ederken, GKE ve İkizce 96 kuyularında ise daha zayıf yoğunluklar görülmektedir; bu da düşük gliadin içeriğini göstermektedir. Çeşitler arasındaki farklılıklar detaylı bir şekilde incelendiğinde, Ak 702 ve Esperia çeşitleri hem 70 kDa hem de 28-35 kDa aralıklarında yoğun bantlara sahip olup gliadin açısından zengin ve çölyak hastalığı riski taşıyan antijenik epitoplar barındırmaktadır. Bezostaja 1 ve Galinda çeşitlerinde özellikle 28-35 kDa aralığında yoğun bantlar gözlenmiş olup, bu durum bu çeşitlerin antijenik özelliklerinin fazla olduğunu işaret etmektedir. Genesi ve Gerek 79 çeşitlerinde 55-70 kDa aralığındaki bantlar orta yoğunlukta olup, gliadin içeriklerinin diğer çeşitlere kıyasla orta seviyelerde olduğu düşünülmektedir. Mokan (Gernik) ve İkizce 96 çeşitleri özellikle 70 kDa ve 28-35 kDa aralıklarında daha zayıf bantlara sahip olup, gliadin içeriğinin düşük olduğunu ve çölyak hastalığı açısından daha az risk taşıyabileceğini göstermektedir. Protein bantlarının yoğunluğu incelendiğinde, kalın bantlar proteinlerin yüksek konsantrasyonlarda ifade edildiğini göstermekte ve bu durum, buğday çeşitlerinin çölyak hastalığı riskine neden olan antijenik epitoplar açısından dikkatle incelenmesini önemli kılmaktadır. Zayıf bantlar ise ilgili proteinin az miktarda bulunduğunu veya hiç ifade edilmediğini gösterebilir ve düşük gliadin içeriği bu tür çeşitlerin çölyak hastalığı açısından daha güvenli olabileceğini işaret etmektedir.

4.3.2. Sıvı kromatografisi kütle kütle spektrometrisi (LC-MS MS) analiz bulguları

α, β, γ ve ω gliadinlere ait kütle spektrometrisi verileri materyal ve yöntem kısmında açıklandığı üzere tespit edilmiş olup, yapılan çalışmalar ile optimizasyon süreçleri tamamlanmıştır. Son aşamada karşılaştırmalı analizlerle elde edilen gliadinlerin kantitatif değerlendirmeleri yapılarak ve istatistiksel analizlere yer verilmiştir. Bu çalışmada LC-MS MS cihazından elde edilen veriler UniprotKB veritabanı, Skyline ve Proteinscape yazılımları kullanılarak gliadin sekansları belirlenmiştir (Şekil 4.28). Bu kapsamda iki örneğe ait peptit sekansları Şekil 4.29 ve 30'da elde edilen cihaz total ion chromatogram (TIC) verileri Şekil 4.31'de sunulmuştur.



Şekil 4.28. LC-MS MS cihazından elde edilen α, β, γ ve Ω gliadinlere ait spektrumlar



Şekil 4.29. Ak702 örneğine ait LC-QTOF MS sonuçlarının Proteinscape yazımı ile elde edilen peptit sekansları

Şekil 4.30. Bezostaja-1 örneğine ait LC-QTOF MS sonuçlarının Proteinscape yazımı ile elde edilen peptit sekansları

Literatürde çölyak hastalığı ile ilişkilendirilen immünojenik epitoplar aşağıdaki şekilde bildirilmektedir (Van den Broeck vd. 2015).

- P1 (LQLQPFPQPQLPY): m/z = 784.9, 2+ yük
- P2 (LQLQPFPQPQLPYPQPQPF): m/z = 755.1, 3+
- P3 (LQLQPFPQPQLPYPQPQLPYPQPQPF): m/z = 1029.5, 3+
- P4 (LQLQPFPQPQLPYPQPHLPYPQPQPF): m/z = 1032.5, 3+
- P5 (LQLQPFPQPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQPF): m/z = 978.3, 4+
- P6 (RPQQPYPQPQPQY): m/z = 813.9, 2+

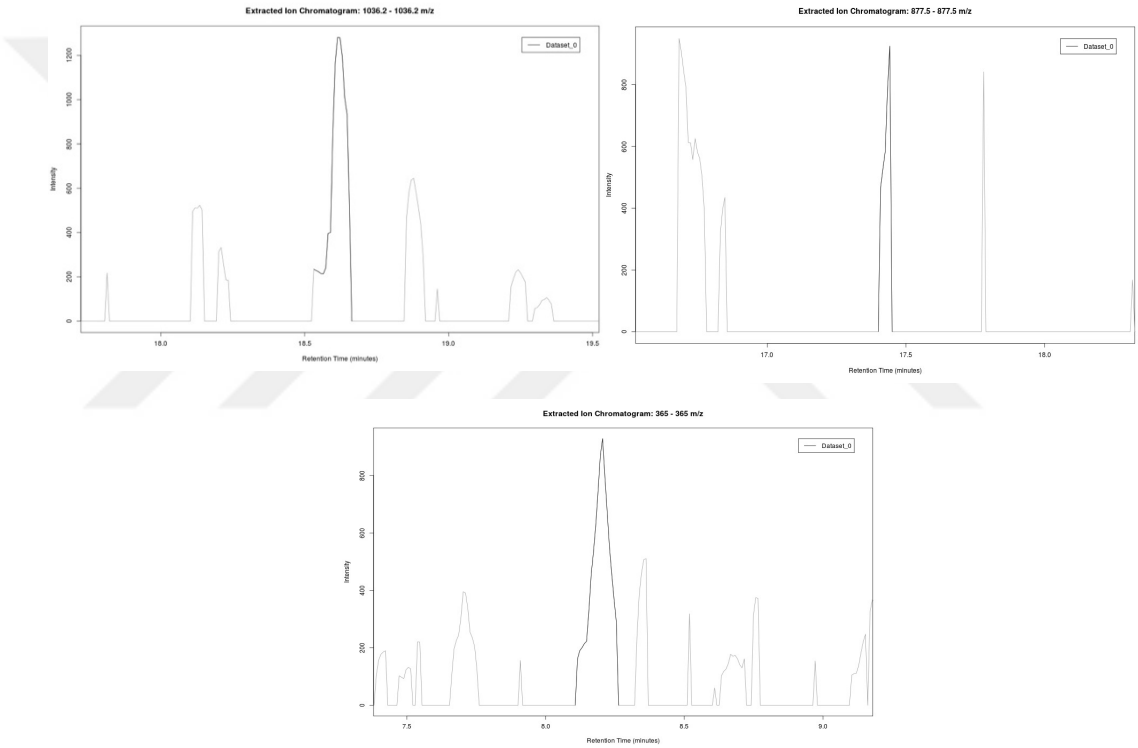
• P7 (RPQQPYPQSQPQY): m/z = 808.9, 2+ ve 539.6, 3+
• P8 (QQQLIPCRDVVL): m/z = 734.9, 2+ ve 490.3, 3+
• P9 (QQILQQQLIPCRDVVL): m/z = 976.0, 2+ ve 651.0, 3+

Yukarıda adı geçe immünojenik epitopların tez kapsamında incelenen buğday örneklerindeki varlıklarının belirlenebilmesi amacıyla LC-MS MS cihazı kullanılmış ve ardından elde edilen veriler Proteinscape yazılımı ile değerlendirilmiştir. Bu kapsamda incelenen buğday örnekleri içinde araştırılan immünojenik epitoplara rastlanılmamıştır. İncelenen buğday örneklerinden örnek bir peptit eşleme tablosu Çizelge 4.9'da sunulmaktadır.

Çizelge 4.9. Ak702 örneğine ait MS/MS peptit eşleşmeleri

Protein	Cmpd.	m/z meas.	No. of Cmpds.	Sequence	Modification	Range
1	19	652.6586	7	L.SHHQQQQPIQQQPQPF.S		5-20
	15	562.2661	1	F.SQQQPCSQQQQQPL.S	Carbamidomethyl: 6	21-34
	151	591.2887	5	L.SQQQQPPFSQQQPPF.S		35-49
	353	881.9261	5	L.SQQQQPPFSQQQPPFSQQQQPPFSQQQPPF.S		58-87
	458	1038.7665	5	F.SQQQPPFSQQQQPVLPQQPSFSQQQLPPFSQ QQSPF.S		81-116
	404	1113.8899	3	F.SQQQQPVLPQQPSFSQQQLPPFSQQQSPF.S		88-116
	69	472.2672	6	F.SQQQQIVL.Q		117-124
	341	1067.8796	7	L.QQQPPFLQQQQPSLPQQPPFSQQQQQL.V		125-151
	76	801.889	1	F.LQQQCSPVAMPQSL.A	Carbamidomethyl: 5; Oxidation: 10	176-189
	80	474.7822	7	Y.EAIRAIIY.S		221-228
	267	687.6181	2	Y.SIILQEQQQVQGSIQTPQQQPQQL.G		229-252
	287	954.521	1	F.LQPHQIAQLEVMTSIAL.R	Oxidation: 12	282-298
	48	536.2808	2	L.YRTTTSVPF.G		312-320
2	151	591.2887	5	L.SQQQQPPFSQQQPPF.S		75-89
	174	588.3236	1	F.SQQQQQPVLPQQQIL.F		142-156
	319	637.3466	5	F.SQQQQQPVLPQQQILF.V		142-157
	76	801.889	1	F.LQQQCSPVAMPQSL.A	Carbamidomethyl: 5; Oxidation: 10	173-186
	80	474.7822	7	Y.EAIRAIIY.S		218-225
	287	954.521	1	F.LQPHQIAQLEVMTSIAL.R	Oxidation: 12	279-295
	48	536.2808	2	L.YRTTTSVPF.G		309-317
3	295	826.4468	2	L.SQQQQLGQGTLVQGQGIIQPQQL.A		238-260
	391	930.5065	2	L.SQQQQLGQGTLVQGQGII		238-263

				QPQQLAQL.E		
	169	693.3702	6	Y.VPPECSIIRAPF.A	Carbamidomethyl: 5	282-293
4	108	588.5715	7	-.SHIPGLERPSQQQPLPPQQTL.S		1-21
	287	954.521	1	F.LQPHQIAQLEVMTSIAL.R	Oxidation: 12	321-337
5	178	678.0856	3	L.QELQRQQQLQQLDQGERQQNPL.S	Deamidated: 1, 4, 6, 20	110-131
6	362	585.2851	1	L.VSLQQQQQEQLQRH.-	Deamidated: 4, 8, 10, 12	1248-1261
7	130	623.3081	3	F.AEGSPQKVANPF.D		606-617



Şekil 4.31. TIC kromatogramları

4.3.3. Sıvı kromatografisi kuadrupol uçuş zamanı kütle spektrometrisi (LC QTOF MS) analiz bulguları

Tez çalışması kapsamında yapılan 24 farklı buğday çeşidinin LC QTOF MS analiz sonuçlarının Proteinscape yazılımı kullanılarak tespit edilen gliadin alt fraksiyonlarının sayısal dağılımı Çizelge 4.16'da sunulmuştur.

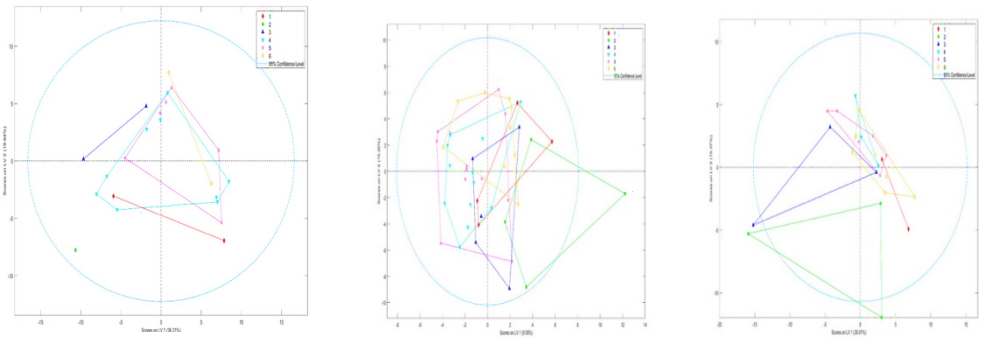
Çizelge 4.10. Sulu ve kuru koşullarda yetişen buğday çeşitlerinin tespit edilen gliadin alt fraksiyonlarının LC QTOF dağılımı

Buğday çeşidi	Tescil Tarihi	α/β-gliadin		γ gliadin		ω-gliadin		HMW glütenin		LMW glütenin	
		Sulu	Kuru	Sulu	Kuru	Sulu	Kuru	Sulu	Kuru	Sulu	Kuru
Mokan(gernik)	1930	0	0	1	1	0	0	2	1	0	1
Songar(siyez)	1930	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1
Ak 702	1931	0	0	3	2	0	0	0	0	0	0
Sertak	1936	0	0	4	2	0	0	0	1	1	1
Yektay	1968	0	0	3	1	1	1	0	0	0	0
Bezostaja 1	1968	0	0	2	2	0	0	0	0	2	2
Bolal	1970	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1
Kırkpınar	1979	0	0	1	1	0	0	2	2	2	2
Gerek 79	1979	0	0	2	2	0	0	1	1	0	0
Sultan 95	1995	0	0	1	2	0	0	1	1	0	0
İkizce 96	1996	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
Pehlivan	1998	0	0	1	1	0	0	2	2	1	1
Karahan	1999	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1
Sönmez-2001	2001	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1
Alparslan	2001	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1
Nenehatun	2001	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
Konya 2002	2002	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
Tosunbey	2004	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1
Ahmetağa	2004	0	0	1	3	0	0	1	1	1	1
Esperia	2011	0	0	3	3	0	0	0	0	0	0
Bora	2014	0	0	1	2	0	0	1	1	1	1
Genesi	2014	0	0	2	2	0	0	0	0	0	0
Soana	2019	0	0	4	2	0	0	0	0	0	0
Galinda	2022	0	0	3	1	0	0	0	0	0	0

Çizelge 4.10'da sunulan verilere göre tez kapsamında incelenen tüm buğday çeşitlerinde α/β-gliadin tespit edilememiştir. Bun karşılık numunelerde gliadin alt fraksiyonlarından γ gliadin ve ω-gliadin farklı sayılarda tespit edildiği belirlenmiştir.

Ayrıca gliadin alt fraksiyonu olup literatürde çölyak hastalığı ile ilişkilendirilmeyen HMW ve LMW glütenin de farklı sayılarda çeşitlerde rastlanılmıştır.

Elde edilen veriler genel olarak değerlendirildiğinde sulu koşularda yetiştirtilen buğday çeşitlerindeki gliadin alt fraksiyon sayılarının kuru koşullardaki sayılara göre daha yüksek olduğu ve ayrıca buğday çeşitlerinden Sertak ve Sona çeşitlerinde yüksek düzeyde gliadin alt fraksiyon sayıları tespit edilmiştir.



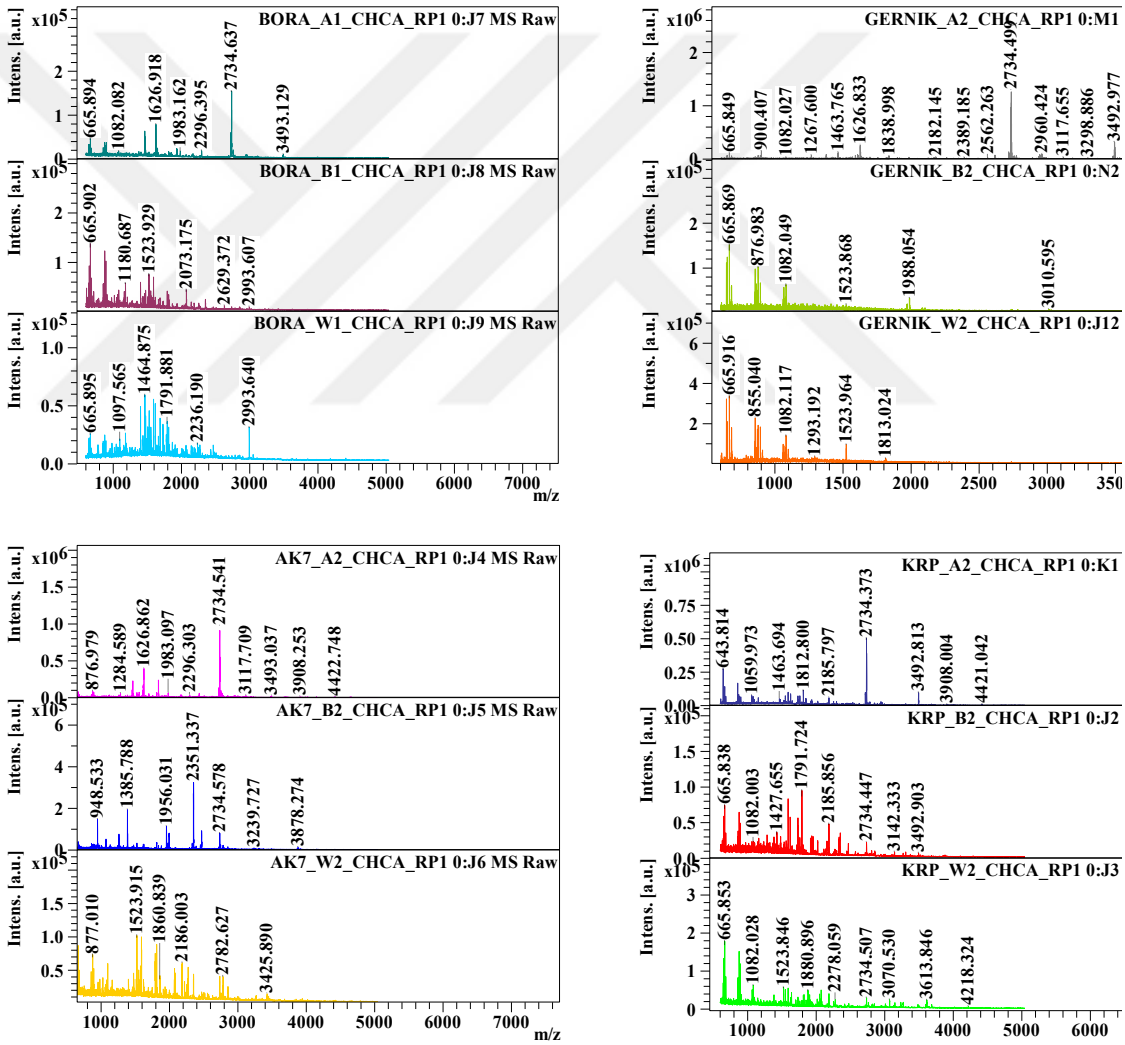
a b c

Şekil 4.32. LC-QTOF verilerinin çok değişkenli OPLS-DA ile elde edilmiş skor grafikleri

Şekil 4.32'de LC-QTOF kütle spektrometrisi ile elde edilen veriler üzerinden gerçekleştirilen çok değişkenli istatistiksel analizlerin (OPLS-DA) sonuçları altı farklı buğday grubunun ayrımına ilişkin projeksiyon skor grafikleri ile sunulmuştur. Gruplar, tescil yıllarına göre sınıflandırılmış olup, Tarihsel dönem, Yeşil Devrim öncesi melez ıslah dönemi (2. grup), Yeşil Devrim öncesi resmi çeşitler (3. grup, 1968–1970), Yeşil Devrim sonrası ilk dönem (4. grup, 1971–2000), ikinci dönem (5. grup, 2001–2010) ve son dönem (6. grup, 2011–2022) olarak tanımlanmıştır. Şekil 4.34.a'da, açıklanan varyansın yüksekliği (LV1: %36.21, LV2: %19.64) ayrım gücünün daha belirgin olduğunu göstermektedir; özellikle 1. grup (Tarihsel dönem) ve 2. grup, diğer gruplardan ayrışan bir konumda yer almakta ve kimyasal içerik bakımından belirgin farklılıklar sergilemektedir. Şekil 4.34.b'de açıklanan toplam varyans daha düşük olup (LV1: %9.58, LV2: %15.20), örneklerin daha dağınık yapısı bu analizde sınıflar arası ayrımın azaldığını göstermektedir. Bu dağılım, özellikle 3., 4. ve 5. gruplar arasında belirgin bir örtüşme olduğunu ve bu dönemlerde ıslah edilen çeşitlerin kimyasal profillerinin birbirine yakınlaştığını düşündürmektedir. Şekil 4.34.c'de ise LV1 ve LV2 bileşenleri sırasıyla %30.91 ve %15.27 varyansı açıklamakta olup, ilk şekle benzer şekilde Tarihsel ve 2. grup çeşitlerinin özellikle negatif LV1 skorlarıyla ayrıştığı, buna karşılık 5. ve 6. grup çeşitlerinin pozitif LV1 ekseninde kümelendiği görülmektedir. Bu durum, modern dönem buğday çeşitlerinin benzer peptit özelliklerine sahip olduğunu, Tarihsel çeşitlerin ise daha özgün ve ayrışmış bir peptit profiline sahip olduğunu göstermektedir. Tüm grafiklerdeki %95 güven elipsleri sınıflar arası varyansın istatistiksel anlamlılığını desteklemektedir. Elde edilen bu sonuçlar, buğdayın tarihsel gelişim sürecinde gliadin türevli peptitlerin ve muhtemel immünojenik yapıların ıslah dönemlerine bağlı olarak önemli değişim geçirdiğini göstermektedir.

4.3.4. Matriks-destekli lazer desorpsiyon/iyonizasyonu (MALDİ) analiz bulguları

Bu çalışmada, 24 buğday çeşidinden elde edilen gliadin proteinlerine ait peptit profilleri, matris destekli lazer desorpsiyon iyonizasyon uçuş süresi kütle spektrometrisi (MALDI-TOF-MS) ile analiz edilmiş ve tescil yıllarına göre altı gruba ayrılan buğday çeşitleri, Tarihsel (1. Grup), Yeşil Devrim öncesi seleksiyon ıslahı ile geliştirilen (2. Grup), Yeşil Devrim erken dönemi (3. Grup), Yeşil Devrim sonrası (4., 5. ve 6. Gruplar) şeklinde sınıflandırılmıştır. Çalışmada her örnek için üç farklı gliadin bölgesi (ω-, α-/β-, γ gliadin) ayrı ayrı ölçülmüş, toplamda 144 spektrum üzerinden değerlendirme yapılmıştır. Rapiflex MALDI-TOF cihazı ile elde edilen veriler, FlexAnalysis ve Biotyper yazılımları aracılığıyla işlenmiş, özellikle sinyal/gürültü oranı (S/N) 3'ün üzerinde olan ve 600–5000 m/z aralığında yer alan pikler istatistiksel analizlere dahil edilmiştir (Şekil 4.33).



Şekil 4.33. Buğday çeşitlerinden Bora, Gernik, Ak702 ve Kırkpınar'a ait örnek MALDI-TOF spektrumları

Bulgular, Tarihsel grubu temsil eden Mokan (gernik) ve Songar (siyez) çeşitlerinin özgün ve yüksek yoğunluklu sinyaller sergilediğini ortaya koymuştur. Özellikle Songar çeşidinde 2737.59 ve 2738.02 m/z değerlerinde yoğun sinyaller tespit edilmiştir; bu bölge γ gliadin epitopları açısından dikkat çekici olup, çölyak hastalığını tetikleyebilecek peptitlerin varlığına işaret etmektedir. Mokan çeşidinde ise daha düşük m/z aralıklarında (ör. 1464.03 ve 1627.11) gözlenen sinyaller, ω- ve α /β gliadin bölgelerinin baskınlığını göstermekte ve bu çeşitlerin genetik olarak gliadin üretimine olan yüksek eğilimini yansıtmaktadır. Sulu koşullarda bu sinyallerin daha şiddetli ve kararlı olduğu gözlenmiş, çevresel faktörlerin gliadin ekspresyonu üzerindeki etkisi vurgulanmıştır. Modern gruplarda yer alan Genesi, Soana ve Galinda gibi çeşitlerde ise 1500–2500 m/z aralığında kümelenmiş ve yüksek kaliteli pik yapıları gözlenmiş, bu durum modern ıslah programlarıyla çeşitlenen gliadin profillerini desteklemektedir.

Yüksek sinyal yoğunlukları (>1000000 mAU) genellikle sulu koşullarda alınan örneklerde elde edilmiştir. Örneğin 2731.81 m/z pikinde ölçülen 1.290.208 mAU'luk şiddetli sinyal, bu bölgedeki gliadin yapılarının hem bol miktarda hem de yüksek iyonizasyon verimiyle temsil edildiğini göstermektedir. Buna karşın, bazı kuru koşul örneklerinde gözlenen düşük yoğunluklu sinyaller (ör. 2786 mAU, 6 S/N oranıyla) çevresel stresin gliadin yapılarının oluşumu üzerindeki baskılayıcı etkisine işaret etmektedir. Spektral kalite faktörü ve çözünürlük değerleri de Tarihsel grupta geniş bir aralıkta değişkenlik göstermiştir; bu da doğal çeşitlerin daha heterojen bir protein profilinin olduğunu ortaya koymaktadır. Bu durum özellikle Mokan ve Songar gibi genetik olarak ilkel buğdayların, daha modern genotiplere göre farklı gliadin sentez yollarına sahip olduğunu düşündürmektedir.

Yeşil Devrim öncesi seleksiyon ıslahı dönemini temsil eden 2. grup buğday çeşitlerinden Ak 702 ve Sertak, elde edilen MALDI-TOF-MS spektrumları bakımından Tarihsel çeşitlere kıyasla daha sınırlı sayıda ve daha düşük sinyal yoğunluğuna sahip piklerle temsil edilmiştir. Ancak her iki çeşitte de belirli m/z bölgelerinde yüksek kaliteli ve istatistiksel olarak anlamlı sinyaller gözlenmiştir. Ak 702 örneklerinde özellikle 1627.18 m/z ve 1464.09 m/z bölgelerinde belirgin pikler saptanmış olup, bu sinyaller sırasıyla 161.975 mAU ve 148.102 mAU gibi yüksek intensite değerleriyle karakterize edilmiştir. Bu pikler aynı zamanda yüksek kalite faktörleri (138.132 ve 159.639) ve çözünürlük (22.644 ve 21.236) ile desteklenmiştir. Söz konusu m/z aralıkları, α /β gliadin bölgeleriyle örtüşmekte olup, çölyak hastalığı açısından immünojenik potansiyele sahip peptitlerin varlığını işaret etmektedir. Sertak çeşidinde ise benzer şekilde 1618.23 m/z bölgesinde 120.961 mAU intensiteye sahip yüksek kaliteli bir pik tanımlanmış olup, bu sinyal 137 S/N oranı ve 25.779 çözünürlük değeri ile desteklenmiştir. Ayrıca 2731–2738 m/z aralığında, Tarihsel çeşitlerde gözlenen γ gliadin ilişkili yüksek pikler 2. grup çeşitlerinde daha zayıf ya da hiç gözlenmemiştir. Bu durum, melezleme dönemine ait buğdayların genetik olarak daha düşük gliadin çeşitliliğine sahip olduğunu ve özellikle çölyak ile ilişkili epitopların ekspresyon düzeylerinin Tarihsel buğdaylara kıyasla sınırlı kaldığını göstermektedir. Buna karşın, α /β gliadin bölgelerinde gözlenen istikrarlı ve yoğun sinyaller, bu grubun spesifik gliadin alt fraksiyonlarını ifade etme kapasitesine sahip olduğunu ortaya koymaktadır.

Yeşil Devrim öncesi 1968–1970 döneminde tescil edilmiş 3. grup buğday çeşitlerinden Bezostaja 1, Yektay ve Bolal, elde edilen MALDI-TOF-MS verileri açısından Tarihsel ve erken dönem modern çeşitler arasında bir geçiş profili sergilemiştir.

Bu çeşitlerde saptanan spektral sinyaller, hem α /β gliadin hem de γ gliadin fraksiyonlarına ait m/z bölgelerinde dağılmış ve genetik olarak daha kararlı, ancak sınırlı çeşitlilikte bir gliadin ekspresyonunu yansıtmıştır. Özellikle Bezostaja 1 çeşidinde 1627.18 m/z bölgesinde 161.975 mAU'ya ulaşan yüksek sinyal şiddeti ve 125 S/N oranı kaydedilmiş; bu pik α /β gliadin bölgesine karşılık gelmekte olup, immünojenik potansiyele sahip epitopları temsil edebilecek düzeydedir. Yektay ve Bolal örneklerinde ise 1464.09 m/z (148.102 mAU) ve 1618.23 m/z (120.961 mAU) gibi orta-üst düzey sinyaller tanımlanmış, bu da buğdayların α /β gliadin bölgelerinde belirgin peptit kümeleri içerdiğini göstermiştir. Buna karşın, 2730–2750 m/z aralığında Tarihsel çeşitlerde görülen güçlü γ gliadin sinyalleri bu grupta zayıf ya da silik kalmış, bu da ıslah sürecinin çölyak ile ilişkili bazı epitopları baskılamış olabileceğini düşündürmektedir. 3. grup çeşitleri hem geleneksel hem de modern ıslah karakteristiklerini taşıyan, gliadin dağılımında görece dengeli ancak düşük çeşitlilikte bir profil sunmuştur.

Tescil dönemlerine göre yapılan karşılaştırmalı analizlerde, modern dönem grupları olan 5. ve 6. gruplarda (ör. Konya 2002, Tosunbey, Esperia, Genesi) elde edilen spektrumlar daha düzenli, yüksek çözünürlüklü ve keskin piklerle karakterize edilmiştir. Bu durum, ıslah programlarının gluten protein çeşitliliği ve ekspresyon yoğunluğu üzerinde sistematik bir yapı oluşturduğunu göstermektedir. Orta dönem gruplarda (3. ve 4. grup: Bezostaja 1, Gerek 79, Pehlivan) ise hem klasik hem de yeni gliadin tiplerine ait geçiş özellikleri gözlenmiştir. Özellikle 4. grup çeşitleri γ gliadin bölgesinde yüksek yoğunluklu sinyaller ile dikkat çekmiş, bu da Yeşil Devrim sonrası dönemin protein profili bakımından geçiş evresi niteliğinde olduğunu göstermektedir. Yeşil Devrim sonrası 1970–2000 yılları arasında tescil edilmiş buğday çeşitlerinden oluşan 4. grup (Gerek 79, Kırkpınar, Sultan 95, İkizce 96, Pehlivan, Karahan 99) genetik olarak verim ve adaptasyon odaklı ıslah çalışmalarının etkilerini taşıyan geçiş dönemi genotipleridir. MALDI-TOF-MS analizlerinden elde edilen genel spektral eğilimler bu çeşitlerin gliadin ekspresyon profillerinin hem klasik α-/β- hem de γ gliadin bölgelerinde belirgin sinyaller sunduğunu, ancak bu sinyallerin Tarihsel ve modern çeşitlere kıyasla daha orta seviyede ve daha yayılmış bir yapıda olduğunu göstermektedir. Özellikle Pehlivan ve Karahan 99 gibi çeşitlerde sulu koşullarda alınan spektrumlarda γ gliadin bölgesine (2730–2750 m/z) ait düşük çözünürlüklü ancak net biçimde tanımlanabilen pik kümeleri gözlemlenmiş, bu durum ilgili fraksiyonların çevresel koşullara duyarlılığını ortaya koymuştur. Gerek 79 ve Sultan 95 gibi çeşitlerde ise α /β gliadin bölgelerine karşılık gelen 1450–1650 m/z aralığında orta düzeyde ancak istikrarlı pikler tespit edilmiştir. Çeşitler, Tarihsel dönemden modern ıslah sürecine kadar olan tescil yıllarına göre altı grupta sınıflandırılmış ve her biri sulu ve kuru koşullarda ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Elde edilen bulgular, gliadin ekspresyonunun hem genetik temele hem de çevresel faktörlere duyarlı olduğunu ve bu değişkenliğin çölyak hastalığı açısından immünojenik epitop profilini etkileyebileceğini göstermektedir (Ferreira vd. 2014; Qian vd. 2008). Bu veriler, MALDI-TOF-MS tekniğinin gliadin alt fraksiyonlarının belirlenmesinde hızlı ve hassas bir tarama yöntemi olarak kullanılabileceğini göstermekte olup, çalışmanın genel bulguları Jang vd. (2020) tarafından geliştirilen ve gliadin kompozisyonundaki değişiklikleri saptamak üzere optimize edilen MALDI-TOF-MS protokolleriyle uyumludur; ilgili çalışmada da ω-gliadinlerin net ayrıştığı, ancak α- ve γ gliadinlerin olduğunu ortaya koymuştur.

5. SONUÇLAR

Bu doktora tezinde, tarihsel ve modern dönemlere ait kışlık ekmeklik buğday çeşitlerinin çölyak hastalığına yol açan gliadin epitopları bakımından karşılaştırılması hedeflenmiş ve elde edilen bulgular ışığında çeşitler arası protein profilleri, gliadin fraksiyon dağılımları ve kuru/sulu yetiştirme koşullarının etkileri kapsamlı bir şekilde değerlendirilmiştir. Araştırmada proteinlerin toplam miktar tayininden kromatografik ayırımına, SDS-PAGE'den LC-QTOF MS ve MALDI-TOF MS tabanlı kantitatif peptit analizlerine kadar çok yönlü bir metodolojik yaklaşım benimsenmiştir.

Kuru koşullarda yapılan analizlerde tarihsel grup çeşitlerinin ortalama dane verimi 255.75 ± 66.11 kg/da olarak belirlenmişken, modern dönem çeşitlerinde bu değer 478.15 ± 75.41 kg/da seviyesine ulaşmıştır. Sulu koşullarda ise verim değerleri daha yüksek olup, tarihsel grupta ortalama 418.15 ± 90.34 kg/da modern grupta ise 639.27 ± 102.68 kg/da olarak ölçülmüştür. 1. grup tarihsel çeşitler kuru koşullarda 255.75 ± 66.11 kg/da ortalama ile en düşük verime sahipken, 3. grup 1968–1970 tescilli çeşitler sulu koşullarda 727.30–781.80 kg/da aralığında en yüksek ve istikrarlı verim performansını göstermiştir. 6. grup ise sulu koşullarda 789.10 ± 96.71 kg/da ile en yüksek ortalamaya ulaşmasına rağmen, kuru koşullarda sadece 399.36 ± 55.07 kg/da ortalama verimle en düşük seviyeye gerilemiştir. Bu durum, 6. grubun sulamaya bağımlı olduğunu ve kuraklık toleransının sınırlı olabileceğini ortaya koymaktadır. Sedimantasyon hacmi incelendiğinde, kuru koşullarda tarihsel grupta ortalama 31.8 ± 4.42 ml, modern grupta ise 43.6 ± 6.17 ml olarak ölçülmüştür. Sulu koşullarda bu değerler sırasıyla 28.4 ± 3.93 ml ve 40.9 ± 5.25 ml olarak belirlenmiştir. Modern çeşitlerin daha yüksek sedimantasyon değerlerine sahip olması, gluten kalitesinin ve pişirme performansının artırıldığını göstermektedir. Dane verimi yönünden değerlendirildiğinde, kuru koşullarda tarihsel çeşitlerde ortalama 484.7 ± 50.2 cm^3, modern grupta ise 598.3 ± 55.6 cm^3 ekmek hacmi elde edilmiştir. Sulu koşullarda bu değerler sırasıyla 456.1 ± 46.3 cm^3 ve 574.6 ± 48.7 cm^3 olarak belirlenmiştir. Ekmeklik kalite açısından hacim artışı, protein yapısının yanı sıra nişasta–gluten matris etkileşimlerinin de daha kararlı hale geldiğine işaret etmektedir. Protein içeriği açısından incelendiğinde, kuru koşullarda ortalama protein yüzdesi Tarihsel grupta 11.90 ± 0.53 iken modern grupta bu değer 13.10 ± 0.74 olarak tespit edilmiştir. Sulu koşullarda ise protein oranları genel olarak düşme eğiliminde olup, Tarihsel grupta 11.30 ± 0.44, modern grupta ise 12.50 ± 0.63 seviyesinde ölçülmüştür. Bu bulgular, çevresel su varlığının protein sentezini seyreltici etkisine işaret etmektedir.

Çalışma kapsamında, sulu ve kuru koşullarda yetiştirilen buğday çeşitlerinden elde edilen un örneklerinde toplam protein ve gliadin konsantrasyonları belirlenmiştir. Dumas yanma yöntemi ile yapılan protein tayinleri sonucunda, tescil yılı ilerledikçe genel olarak protein yüzdesinde artış eğilimi gözlenmiş, bu durum ıslah programlarının kalite odaklı yöneliminin bir göstergesi olarak değerlendirilmiştir. Gliadin miktarının ölçümü için uygulanan BCA yöntemi sonucunda ise, modern çeşitlerin çoğunlukla daha yüksek gliadin seviyelerine sahip olduğu ve bu durumun özellikle sulu koşullarda daha belirginleştiği tespit edilmiştir. Kuru koşullarda Tarihsel grupta toplam gliadin miktarı 10587.16 µg/ml iken, modern grupta bu değer 10441.12 µg/ml olarak belirlenmiştir. Sulu koşullarda ise tarihsel grup ortalama 9986.25 µg/ml, modern grup ise 10748.35 µg/ml seviyesinde ölçülmüştür. Modern çeşitlerin çoğunlukla daha yüksek gliadin seviyelerine sahip olduğu ve bu durumun özellikle sulu koşullarda daha belirginleştiği tespit edilmiştir. Örneğin, sulu koşullarda 5. grupta ortalama gliadin konsantrasyonu 13194.45

µg/ml ile en yüksek düzeye ulaşırken, 1. grup tarihsel çeşitlerde bu değer 13051.65 µg/ml olarak ölçülmüştür. En düşük değerler ise 3. grupta (1968–1970) saptanmıştır.

Tez çalışmasının ikinci aşamasında, farklı tescil dönemlerine ait buğday çeşitlerinin çölyak hastalığıyla ilişkili immünojenik potansiyelini kantitatif düzeyde karşılaştırmak amacıyla HPLC temelli gliadin fraksiyon analizleri gerçekleştirilmiş ve elde edilen toplam pik alanları kullanılarak literatür kaynaklı immünojenik katsayılarla ağırlıklandırılmış "epitop skorları" hesaplanmıştır. α-gliadin fraksiyonuna 1.00, γ gliadine 0.75, ω1,2 gliadine 0.50 ve çölyakla ilişkisi sınırlı olan ω5 gliadine 0.25 katsayısı verilmiş; bu bağlamda sulu koşullarda en yüksek ortalama epitop skoru 72247 mAU*dk ile 4. grupta (Yeşil devrim sonrası melezleme ıslahı 1970-2000) belirlenmiş, α- ve γ gliadin yoğunluğunun 40528 mAU*dk ile bu durumu etkilediği saptanmıştır. En düşük skor ise 3. grupta (Yeşil devrim öncesi melezleme Islahı 1968–1970) 28255 mAU*dk olarak ölçülmüştür. Kuru koşullarda ise en yüksek ortalama skor 93845mAU*dk ile Tarihsel çeşitlerde (1. grup) elde edilmiş; özellikle α/ β gliadin (44259 mAU*dk) ve γ gliadin (43051 mAU*dk) fraksiyonlarının baskınlığı bu sonucu şekillendirmiştir. Buna karşın modern döneme ait 6. grup (Yeşil devrim sonrası melezleme ıslahı 2011 - 2022) ise 74891 mAU*dk toplam skorla ikinci sırada yer almıştır. Bu bulgular, modern çeşitlerde belirli fraksiyonlarda epitop yükü artışı olduğunu göstermekte ancak tarihsel çeşitlerin de yüksek immünojenik içeriğe sahip olduğunu ortaya koyarak, çölyak hastalığı risk değerlendirmelerinde yalnızca melezleme ıslah yöntemleri ile geliştirilen modern çeşitlerin değil tarihsel çeşitlerin de dikkate alınması gerektiğini vurgulamaktadır. Sulu koşullar altında hesaplanan epitop skorlarına göre gruplar küçükten büyüğe sıralandığında: 3. Grup (1968–1970) < 2. Grup (<1968 seleksiyon) < 5. Grup (2001–2010) < 6. Grup (2011–2022) < 1. Grup (Tarihsel) < 4. Grup (1970–2000) şeklinde sıralanmaktadır (3 < 2 < 5 < 6 < 1 < 4); bu dağılım, özellikle modern dönem çeşitlerinin α-/β-gliadin fraksiyonunda yeniden yükseliş gösterdiğini ortaya koymakta olup, literatürde bağışıklık sistemini doğrudan aktive eden 33-mer gibi immünojenik epitopları içeren α-gliadinlerin çölyak hastalığındaki merkezi rolüyle (Shan et al., 2002; Vader et al., 2002) tutarlıdır. Kuru koşullar altında hesaplanan epitop skorlarına göre gruplar küçükten büyüğe sıralandığında: 2. Grup (<1968 seleksiyon) < 4. Grup (1970–2000) < 3. Grup (1968–1970) < 5. Grup (2001–2010) < 6. Grup (2011–2022) < 1. Grup (Tarihsel) şeklinde sıralanmaktadır (2 < 4 < 3 < 5 < 6 < 1); bu sıralama, antik grupların α-/β-gliadin ve γ gliadin fraksiyonları bakımından yüksek değerlere sahip olduğunu ve özellikle tarihsel çeşitlerin 93845 birimle en yüksek epitop skorunu taşıdığını göstermektedir. Bu durum, modern ıslah dönemlerinde çölyak açısından daha düşük immünojeniteye sahip çeşitlerin geliştirildiğini düşündürse de, 2011–2022 yıllarını kapsayan 6. grubun skoru 74891 birimle tekrar yükselme eğilimi göstermektedir.

Sulu ve kuru koşullarda yetiştirilen 24 farklı buğday çeşidinde elde edilen HPLC verilerine dayalı olarak gliadin fraksiyonlarının dağılımını gösteren ısı haritaları değerlendirilmiş ve korelasyon analizleriyle desteklenmiştir. Sulu koşullarda α /β gliadin düzeyi açısından Konya 2002 (226199 mAU*dk), Soana (239138 mAU*dk), Kırkpınar (222850 mAU*dk) ve Esperia (188397 mAU*dk) çeşitlerinin yüksek değerlere ulaştığı gözlemlenmiştir. α /β gliadin ile tescil yılı arasında pozitif ancak zayıf bir korelasyon (r = 0.14) gözlenmiş; bu durum, modern çeşitlerde bağışıklık açısından önemli fraksiyonlarda kısmi bir artış eğilimine işaret etse de istatistiksel olarak anlamlı değildir. γ gliadin ile tescil yılı arasında gözlenen negatif korelasyon (r = -0.37), bu fraksiyonun

zamanla azalma eğiliminde olduğunu düşündürmektedir. Kuru koşullarda ise özellikle tarihsel çeşitlerden Songar (218021 mAU*dk) ile Esperia (213067 mAU*dk), Soana (188694 mAU*dk) ve Galinda (185918 mAU*dk) gibi modern çeşitlerde α /β gliadin fraksiyonu yüksek bulunmuş, ancak korelasyon analizi bu artışın tescil yılıyla zayıf ilişkili olduğunu (r = 0.08) göstermiştir. Korelasyon matrisleri ayrıca çevresel koşulların gliadin fraksiyonları arasındaki ilişkileri değiştirdiğini ortaya koymuştur: sulu koşullarda α /β gliadin ile ω1,2-gliadin (r = 0.90) ve γ gliadin (r = 0.80) arasında güçlü pozitif ilişkiler varken, kuru koşullarda bu ilişkiler daha zayıf ya da negatif yönlü seyretmiştir.

SDS-PAGE analizleri ile buğday çeşitlerinin protein parmak izleri elde edilmiştir. Moleküler ağırlık spektrumunda 55–70 kDa aralığı ω5 ve ω1, 2 gliadinleri temsil ederken, α /β gliadin ve γ gliadin bölgelerinde yoğun bant dağılımları gözlemlenmiştir. Karahan, İkizce ve Konya 2002 gibi çeşitlerin gliadin bölgelerinde yoğun bantlara sahip olması, bu çeşitlerin çölyakla ilişkili epitoplar açısından dikkatle değerlendirilmesi gerektiğini göstermektedir.

LC-QTOF MS analizleri, SDS-PAGE ile ayrılan gliadin bantlarının in-gel digestion yöntemiyle sindirilmesi sonrasında, her bir peptidin kantitatif analizine olanak tanımıştır. OPLS-DA analizinde altı farklı buğday grubunun yer aldığı çok değişkenli skor grafiklerinde, özellikle tarihsel dönem ve 2. grup çeşitlerin modern dönem çeşitlerinden (4.–6. grup) anlamlı düzeyde ayrıldığı gözlemlenmiştir. Bu ayrışma, LV1 ve LV2 bileşenleri tarafından açıklanan varyans oranlarının yüksekliği ve %95 güven elipslerinin belirginliği ile desteklenmiştir.

MALDI-TOF-MS yöntemiyle değerlendirilmiş ve elde edilen bulgular hem genetik kökenin hem de yetiştirme koşullarının gliadin ekspresyonu ve immünojenik potansiyel üzerindeki belirleyici etkisini ortaya koymuştur. Tarihsel çeşitler, özellikle Mokan ve Songar, geniş m/z aralıklarında yoğun ve özgün sinyaller sunarak gliadin profili bakımından yüksek çeşitliliğe sahip genotipler olarak öne çıkarken; modern çeşitler (örneğin Soana, Genesi, Galinda) ise dar m/z aralığında kümelenmiş, yüksek çözünürlüklü ve belirgin pik yapılarıyla sistematik ıslah süreçlerinin yansımasını sergilemiştir. α-/β- ve γ gliadin bölgelerinde ölçülen yüksek sinyaller, çölyakla ilişkili epitopların varlığına işaret etmekte olup, modern çeşitlerde bu bölgelerdeki ekspresyonun belirgin biçimde arttığı gözlemlenmiştir. Özellikle 2730–2740 m/z bölgesinde yoğun sinyallerin tespit edilmesi, γ gliadin fraksiyonunun çölyak hastalığı açısından önemini vurgulamakta, çevresel etkenlerin (sulu/kuru koşullar) bu ekspresyon düzeylerini etkilediği gözlenmektedir.

Elde edilen tüm bu sonuçlar, buğday kalite parametrelerinin tescil yılı ve çevresel koşullara bağlı olarak anlamlı düzeyde farklılık gösterdiğini ortaya koymuştur. Modern çeşitler genel olarak hem verim hem de kalite parametreleri bakımından daha yüksek ortalamalara ulaşırken, Tarihsel çeşitlerin düşük dış girdili sistemlerde üretim potansiyeli taşıdığı ve aynı zamanda genetik çeşitlilik bakımından ıslah programları için değerli bir kaynak sunabileceği sonucuna varılmıştır.

6. KAYNAKLAR

Agardh, D., Roth, B., Lernmark, Å. and Stenberg, P. 2005. Calcium activation of tissue transglutaminase in radioligand binding and enzyme-linked autoantibody immunoassays in childhood celiac disease. *Clinica Chimica Acta*, 358 (1): 95-103.

Alves, T.O., D'Almeida, C. and Ferreira, M.S. 2017. Determination of Gluten Peptides Associated with Celiac Disease by Mass Spectrometry. In *Celiac Disease and Non-Celiac Gluten Sensitivity*. Intech.

Alves, T.O., D'Almeida, C.T.S., Victorio, V.C.M., Souza, G.H.M.F., Cameron, L.C. and Ferreira, M.S.L. 2018. Immunogenic and allergenic profile of wheat flours from different technological qualities revealed by ion mobility mass spectrometry. *Journal of Food Composition and Analysis*, 73 67-75.

Anonim: Çölyak ve Görülme Sıklığı. https://hsgm.saglik.gov.tr/tr/metabolizma-ve-colyak/colyak-gorulme-sikligi.html [Son erişim tarihi: 18.12.2024].

Anonim: 54-40.02 Mixograph Method. https://www.cerealsgrains.org/resources/Methods/Pages/54PhysicalDoughTests.aspx [Son erişim tarihi: 20.06.2025.

Arentz-Hansen, H., Körner, R., Molberg, O., Quarsten, H., Vader, W., Kooy, Y. M., Lundin, K. E., Koning, F., Roepstorff, P., Sollid, L. M., vd.McAdam, S. N. 2000. The intestinal T cell response to alpha-gliadin in adult celiac disease is focused on a single deamidated glutamine targeted by tissue transglutaminase. *Journal of Experimental Medicine*, 191 (4): 603-612.

Arzani, A., and Muhammad, A. 2017. Cultivated ancient wheats (Triticum spp.): A potential source of health-beneficial food products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16 (3): 477-488.

Aune, D., Keum, N., Giovannucci, E., Fadnes, L.T., Boffetta, P., Greenwood, D.C., Tonstad, S., Vatten, L.J., Riboli, E., vd.Norat, T. 2016. Whole grain consumption and risk of cardiovascular disease, cancer, and all cause and cause specific mortality: systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies. *Bmj*, 353 i2716.

Bağcı, S. A. and Özer, İ. 2021. Türkiye Tohumculuğunun Tarihsel Gelişimi, Mevcut Durumu, Problemleri ve Çözüm Önerileri. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 11 (özel sayı): 3559-3572.

Bálint, A.F., Kovács, G. and Sutka, J. 2000. Origin and taxonomy of wheat in the light of recent research. *Acta Agronomica Hungarica*, 48 (3): 301-313.

Baloch F.S., Aktaş H., Rasheed A., Nadeem M.A., Cabi E., Hatipoğlu R., Sajjad M. 2022. Origin, taxonomy, and distribution of ancient wheats in Turkey. In: *Ancient Wheats*, 37–53.

Beljkaš B, Matić J, Milovanović I, Jovanov P, Mišan A, Šarić Lj. (2010). Rapid method for determination of protein content in cereals and oilseeds: validation, measurement uncertainty and comparison with the Kjeldahl method. *Accreditation and Quality Assurance*, 15: 555–561.

Bodd, M., Kim, C. Y., Lundin, K. E. and Sollid, L. M. 2012. T-cell response to gluten in patients with HLA-DQ2.2 reveals requirement of peptide-MHC stability in celiac disease. *Gastroenterology*, 142 (3): 552-561.

Bodor, K., Szilágyi, J., Salamon, B., Szakács, O. and Bodor, Z. 2024. Physical–chemical analysis of different types of flours available in the Romanian market. *Scientific Reports*, 14 (1): 881.

Bonjean, A. P., Angus, W. J. and Sági, F. 2001. The World Wheat Book: A History of Wheat Breeding. *Cereal Research Communications*, 29 (3): 459-459.

Bonomi, F., Iametti, S., Mamone, G. and Ferranti, P. 2013. The performing protein: beyond wheat proteomics? *Cereal Chemistry*, 90 (4): 358-366.

Bönick, J., Huschek, G. and Rawel, H.M. 2017. Determination of wheat, rye and spelt authenticity in bread by targeted peptide biomarkers. *Journal of Food Composition and Analysis*, 58 82-91.

Bradauskiene, Vi., Vaiciulyte-Funk, L., Martinaitiene, D., Andruskiene, J., Verma, A. K., Lima, João P. M., Serin, Y. and Catassi, C. 2023. Wheat consumption and prevalence of celiac disease: Correlation from a multilevel analysis. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 63 (1): 18-32.

Bromilow, S., Gethings, L., Langridge, J. I., Shewry, P. R, Buckley, M., Bromley, M. J. and Mills, C. 2017. Comprehensive proteomic profiling of wheat gluten using a combination of data-independent and data-dependent acquisition. *Frontiers in Plant Science*, 7 2020.

Brouns, F., Hemery, Y., Price, R. and Anson, N. M. 2012. Wheat Aleurone: Separation, Composition, Health Aspects, and Potential Food Use. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52 (6): 553-568.

Buus, S., Rockberg, J., Forsström, B., Nilsson, P., Uhlen, M. and Schafer-Nielsen, C. 2012. High-resolution mapping of linear antibody epitopes using ultrahigh-density peptide microarrays. *Molecular & Cellular Proteomics,* 11 (12): 1790-1800.

Cabi, E. and Doğan, M. 2009. A first vouchered wild record for the flora of Turkey: Aegilops juvenalis (Thell.) Eig (Poaceae). *Turkish Journal of Botany*, 33 (6): 447-452.

Caio, G., Volta, U., Sapone, A., Leffler, D.A., De G., R., Catassi, C. and Fasano, A. 2019. Celiac disease: a comprehensive current review. *BMC Medicine*, 17 1-20.

Camarca, A., Anderson, R., Mamone, G., Fierro, O., Facchiano, A., Costantini, S., Zanzi, D., Sidney, J., Auricchio, S., vd.Sette, A. 2009. Intestinal T cell responses to gluten peptides are largely heterogeneous: implications for a peptide-based therapy in celiac disease. *The Journal of Immunology*, 182 (7): 4158-4166.

Candon, S., Mauvais, F. X., Garnier-Lengliné, H., Chatenoud, L. and Schmitz, J. 2012. Monitoring of anti-transglutaminase autoantibodies in pediatric celiac disease using a sensitive radiobinding assay. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 54 (3): 392-396.

Chantret, N., Salse, J., Sabot, F., Rahman, S., Bellec, A., Laubin, B., Dubois, I., Dossat, C., Sourdille, P., Joudrier, P., Gautier, M. F., Cattolico, L., Beckert, M., Aubourg, S., Weissenbach, J., Caboche, M., Bernard, M., Leroy, P., vd.Chalhoub, B. 2005. Molecular basis of evolutionary events that shaped the hardness locus in diploid and polyploid wheat species (Triticum and Aegilops). *Plant Cell*, 17 (4): 1033-1045.

Clinic, Mayo: Celiac disease. https://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/celiac-disease/symptoms-causes/syc-20352220 [Son erişim tarihi: 03.07.2025].

Collin, P., Salmi, T. T., Hervonen, K., Kaukinen, K. and Reunala, T. 2017. Dermatitis herpetiformis: a cutaneous manifestation of coeliac disease. *Annals of Medicine*, 49 (1): 23-31.

Dalgic B., Sari S, Basturk B., Ensari A., Egritas O., Bukulmez A., Baris Z. 2011. Prevalence of celiac disease in healthy Turkish school children. *Official Journal of the American College of Gastroenterology*, 106(8).

Damania A.B., Pecetti L, Qualset C..O, Humeid B.O.. 1996. Diversity and geographic distribution of adaptive traits in Triticum turgidum L. (durum group) wheat landraces from Turkey. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 43(5): 409–422.

De Santis MA, Giuliani MM, Giuzio L, De Vita P, Lovegrove A, Shewry PR, Flagella Z. (2017). Differences in gluten protein composition between old and modern durum wheat genotypes in relation to 20th century breeding in Italy. *European Journal of Agronomy*, 87: 19–29.

de Sousa, T., Ribeiro, M., Sabença, C. and Igrejas, G. 2021. The 10,000-Year Success Story of Wheat!. *Foods*, 10 (9).

Doña, V. V., Fossati, C. A. and Chirdo, F. G. 2008. Interference of denaturing and reducing agents on the antigen/antibody interaction. Impact on the performance of quantitative immunoassays in gliadin analysis. *European Food Research and Technology*, 226 (3): 591-602.

Dvorak, J. and Akhunov, E. D. 2005. Tempos of gene locus deletions and duplications and their relationship to recombination rate during diploid and polyploid evolution in the Aegilops-Triticum alliance. *Genetics*, 171 (1): 323-332.

El Baidouri, M., Murat, F., Veyssiere, M., Molinier, M., Flores, R., Burlot, L., Alaux, M., Quesneville, H., Pont, C., and Salse, J. 2017. Reconciling the evolutionary origin of bread wheat (Triticum aestivum). *New Phytologist*, 213 (3): 1477-1486.

El-Metwally, A., Toivola, P., AlAhmary, K., Bahkali, S., AlKhathaami, A., Al Saqabi, M.K., Al Ammar, S.A., Jawed, M., Alosaimi, S.M. 2020. The Epidemiology of Celiac Disease in the General Population and High-Risk Groups in Arab Countries: A Systematic Review. *BioMed Research International*, 2020 (1): 6865917.

Elgün, A., Ertugay, Z., Kotancılar, H. G. and Certel, M. 2012. Tahıl Ürünlerinde Analitik Kalite Kontrolü Ve Laboratuar Uygulama Klavuzu.

Ellis, H.J., Rosen-Bronson, S., O'Reilly, N. and Ciclitira, P.J. 1998. Measurement of gluten using a monoclonal antibody to a coeliac toxic peptide of A gliadin. *Gut*, 43 (2): 190-195.

Elsurer, R., Tatar, G., Simsek, H., Balaban, Y.H., Aydinli, M. and Sokmensuer, C. 2005. Celiac Disease in the Turkish Population. *Digestive Diseases and Sciences*, 50 (1): 136-142.

Erekul, O., T., Kautz, F., Ellmer and Turgut, I. 2009. Yield and bread-making quality of different wheat (Triticum aestivum L.) genotypes grown in Western Turkey. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 55 (2): 169-182.

Evans, J. R. and Lawson, T. (2020). From green to gold: agricultural revolution for food security. *Journal of Experimental Botany,* 71(7), 2211–2215.

Fasano, A., Berti, I., Gerarduzzi, T., Not, T., Colletti, R. B., Drago, S., Elitsur, Y., Green, P. H., Guandalini, S., Hill, I. D., Pietzak, M., Ventura, A., Thorpe, M., Kryszak, D., Fornaroli, F., Wasserman, S. S., Murray, J. A., vd.Horvath, K. 2003. Prevalence of celiac disease in at-risk and not-at-risk groups in the United States: a large multicenter study. *Archives of Internal Medicine*, 163 (3): 286-292.

Fasano, A. and Catassi, C. 2012a. Celiac disease. *The New England Journal of Medicine*, 367 (25): 2419-2426.

Fasano, A. and Catassi, C. 2012b. Clinical practice. Celiac disease. *The New England Journal of Medicine*, 367 (25): 2419-2426.

Ferreira, Mariana SL, Mangavel, Cecile, Rogniaux, Hélène, Bonicel, Joelle, Samson, Marie-Francoise and Morel, Marie-Hélène 2014. A MALDI-TOF based study of the in-vivo assembly of glutenin polymers of durum wheat. *Food Research International*, 63 89-99.

Feuillet, C., Langridge, P. and Waugh, R. 2008. Cereal breeding takes a walk on the wild side. *Trends in Genetics*, 24 (1): 24-32.

Fukunaga, M., Ishimura, N., Fukuyama, C., Izumi, D., Ishikawa, N., Araki, A., Oka, A., Mishiro, T., Ishihara, S., vd.Maruyama, R. 2018. Celiac disease in non-clinical populations of Japan. *Journal of Gastroenterology*, 53 208-214.

Gatti, S., Rubio, A., Makharia, G. K. and Catassi, C. 2024. Patient and Community Health Global Burden in a World With More Celiac Disease. *Gastroenterology*, 167 (1): 23-33.

Golovnina, K. A., Glushkov, S. A., Blinov, A. G., Mayorov, V. I., Adkison, L. R. and Goncharov, N. P. 2007. Molecular phylogeny of the genus Triticum L. *Plant Systematics and Evolution*, 264 (3): 195-216.

Graveland, A. , Bosveld, P. , Lichtendonk, W.J. , Moonen, H.E.H. and Scheepstra, A. 1982. Extraction and fractionation of wheat flour proteins. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 33 (11): 1117-1128.

Green, P. H. and Cellier, C. 2007. Celiac disease. *New England Journal of Medicine*, 357 (17): 1731-1743.

Green, P. H. and Jabri, B. 2003. Coeliac disease. *Lancet*, 362 (9381): 383-391.

Hadjivassiliou, M., Sanders, D. D. and Aeschlimann, D. P. 2015. Gluten-related disorders: gluten ataxia. *Digestive Diseases*, 33 (2): 264-268.

Hemery, Y., Rouau, X., Lullien-Pellerin, V., Barron, C. and Abecassis, J. 2007. Dry processes to develop wheat fractions and products with enhanced nutritional quality. *Journal of Cereal Science*, 46 (3): 327-347.

Hernández-Mesa, M., Ropartz, D., García-Campaña, A., Rogniaux, H., Dervilly-Pinel, G. and Le Bizec, B. 2019. Ion mobility spectrometry in food analysis: Principles, current applications and future trends. *Molecules*, 24 (15): 2706.

Hill, I. D., Dirks, M. H., Liptak, G. S., Colletti, R. B., Fasano, A., Guandalini, S., Hoffenberg, E. J., Horvath, K., Murray, J. A., Pivor, M., vd.Seidman, E. G. 2005. Guideline for the diagnosis and treatment of celiac disease in children: recommendations of the North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 40 (1): 1-19.

Hurt, R.D. 2003. Norman Borlaug: Geneticist of the Green Revolution. *Iowa Heritage Illustrated*, 84 (2).

Husby, S., Koletzko, S., Korponay-Szabó, I. R., Mearin, M. L., Phillips, A. and Shamir, R. 2012. European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition guidelines for the diagnosis of coeliac disease. *Journal of Pediatri Gastroenterol Nutrigene*, 54 (1): 136-160.

Jabri, B. and Sollid, L. M. 2009. Tissue-mediated control of immunopathology in coeliac disease. *Nature Reviews Immunology,* 9 (12): 858-870.

Jang, Y., Cho, K., Kim, S., Sim, J., Lee, S., Kim, B., Gu, Y., Altenbach, S.B., Lim, S.H., vd.Goo, T.W. 2020. Comparison of MALDI-TOF-MS and RP-HPLC as rapid screening methods for wheat lines with altered gliadin compositions. *Frontiers in Plant Science*, 11 600489.

Karagöz, A. 2014. Wheat Landraces of Turkey. *Emirates Journal of Food & Agriculture (EJFA)*, 26 (2).

Karagöz, A. and Zencirci, N. 2005. Variation in Wheat (Triticum spp.) Landraces from Different Altitudes of Three Regions of Turkey. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 52 (6): 775-785.

Kaushik, R., Kumar, N., Sihag, M. K. and Ray, A. 2015. Isolation, characterization of wheat gluten and its regeneration properties. *Journal of Food Science and Technology*, 52 (9): 5930-5937.

Kim, C. Y., Quarsten, H., Bergseng, E., Khosla, C. and Sollid, L. M. 2004. Structural basis for HLA-DQ2-mediated presentation of gluten epitopes in celiac disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101 (12): 4175-4179.

Kim, D., Alptekin, B. and Budak, H. 2018. CRISPR/Cas9 genome editing in wheat. *Functional & Integrative Genomics*, 18 (1): 31-41.

Kırtok, Y., Genç, İ., Yağbasanlar, T., Çölkesen, M., Kılınç, M. 1988. Tescilli Bazı Ekmeklik (T. aestivum L. Em Thell) ve Makarnalık (T. durum Desf.) Buğday Çeşitlerinin Çukurova Koşullarında Başlıca Özellikleri Üzerinde Bir Araştırma. *Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 3 96 - 105.

Kislev, M. E. 1984. Emergence of Wheat Agriculture *Paléorient*, 10 (2): 61-70.

Kits, Pierce™ BCA Protein Assay: Pierce™ BCA Protein Assay Kits. https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/23225 [Son erişim tarihi: 26.05.2025].

Koning, F. 2003. The molecular basis of celiac disease. *Journal of Molecular Recognit*, 16 (5): 333-336.

Lebwohl, B. and Rubio-Tapia, A. 2021. Epidemiology, Presentation, and Diagnosis of Celiac Disease. *Gastroenterology*, 160 (1): 63-75.

Levy, A.A. and Feldman, M. 2002. The impact of polyploidy on grass genome evolution. *Plant Physiology*, 130 (4): 1587-1593.

Ling, H.-Q., Zhao, S., Liu, D., Wang, J., Sun, H., Zhang, C., Fan, H., Li, D., Dong, L., vd.Tao, Y. 2013. Draft genome of the wheat A-genome progenitor Triticum urartu. *Nature*, 496 (7443): 87-90.

Ludvigsson, J. F., Leffler, D. A., Bai, J. C., Biagi, F., Fasano, A., Green, P. H., Hadjivassiliou, M., Kaukinen, K., Kelly, C. P., Leonard, J. N., Lundin, K. E., Murray, J. A., Sanders, D. S., Walker, M. M., Zingone, F., vd.Ciacci, C. 2013. The Oslo definitions for coeliac disease and related terms. *Gut*, 62 (1): 43-52.

Mahadev, S., Laszkowska, M., Sundström, J., Björkholm, M., Lebwohl, B., Green, P. H. R. and Ludvigsson, J. F. 2018. Prevalence of Celiac Disease in Patients With Iron Deficiency Anemia-A Systematic Review With Meta-analysis. *Gastroenterology*, 155 (2): 374-382.e371.

Malalgoda, M., Ohm, J., Meinhardt, S. and Simsek, S. 2018. Association between gluten protein composition and breadmaking quality characteristics in historical and modern spring wheat. *Cereal Chemistry*, 95 (2): 226-238.

Mamone, G., Di Stasio, L., Vitale, S., Picascia, S. and Gianfrani, C. 2023. Analytical and functional approaches to assess the immunogenicity of gluten proteins. *Frontiers in Nutrition*, 9 1049623.

Manfredi, A., Mattarozzi, M., Giannetto, M. and Careri, M. 2015. Multiplex liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the detection of wheat, oat, barley and rye prolamins towards the assessment of gluten-free product safety. *Analytica Chimica Acta*, 895 62-70.

Marcussen, T., Sandve, S. R., Heier, L., Spannagl, M., Pfeifer, M., Jakobsen, K. S., Wulff, B. B., Steuernagel, B., Mayer, K. F., vd.Olsen, O. A. 2014. Ancient hybridizations among the ancestral genomes of bread wheat. *Science*, 345 (6194): 1250092.

Matsuo, H., Kohno, K. and Morita, E. 2005. Molecular cloning, recombinant expression and IgE-binding epitope of ω-5 gliadin, a major allergen in wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. *The FEBS journal*, 272 (17): 4431-4438.

Meresse, B., Ripoche, J., Heyman, M. and Cerf-Bensussan, N. 2009. Celiac disease: from oral tolerance to intestinal inflammation, autoimmunity and lymphomagenesis. *Mucosal Immunology*, 2 (1): 8-23.

Michaelevski, I., Kirshenbaum, N. and Sharon, M. 2010. T-wave ion mobility-mass spectrometry: basic experimental procedures for protein complex analysis. *Journal of Visualized Experiments*, (41): 1985.

Molberg, O., McAdam, S. N., Körner, R., Quarsten, H., Kristiansen, C., Madsen, L., Fugger, L., Scott, H., Norén, O., Roepstorff, P., Lundin, K. E., Sjöström, H., vd.Sollid, L. M. 1998. Tissue transglutaminase selectively modifies gliadin peptides that are recognized by gut-derived T cells in celiac disease. *Natural Medicine*, 4 (6): 713-717.

Morgounov, A., Ozdemir, F., Keser, M., Akin, B., Payne, T. and Braun, H.J. 2019. International Winter Wheat Improvement Program: history, activities, impact and future. *Frontiers of Agricultural Science and Engineering*, 6 (3): 240-250.

Morgounov, A.I., Belan, I., Zelenskiy, Y., Roseeva, L., Tömösközi, S., Békés, F., Abugalieva, A., Cakmak, I., Vargas, M., and Crossa, J. 2013. Historical changes in grain yield and quality of spring wheat varieties cultivated in Siberia from 1900 to 2010. *Canadian Journal of Plant Science*, 93 (3): 425-433.

Morrison, L.A. 2001. The Legacy of John Percival. *The Linnean: Newsletter and Proceedings of the Linnean Society of London*, (3): 65.

Moya, M., Sánchez, D., Romero, J.Á. and Villar-García, J.R. 2024. Influence of Moisture Content on Some Mechanical Properties of Wheat. *Agronomy*, 14 (2).

Mustalahti, K., Catassi, C., Reunanen, A., Fabiani, E., Heier, M., McMillan, S., Murray, L., Metzger, M. H., Gasparin, M., Bravi, E., vd.Mäki, M. 2010. The prevalence of celiac disease in Europe: results of a centralized, international mass screening project. *Annals of Medicine*, 42 (8): 587-595.

National Center for Biotechnology Information. 2024. *CID 17787981, Gliadin*.

Orabi, J., Vagndorf, N., Kristensen, P.S., Andersen, J.R. and Jahoor, A. 2018. Marker-Assisted Breeding in Wheat. In Y. Ozden Çiftçi (Ed.), *Next Generation Plant Breeding*. Intech Open.

Ozberk, I., Atay, S., Altay, F., Cabi, E., Ozkan, H., Atli, A. and Kalem, D. 2016. *Türkiye'nin Buğday Atlası / Wheat Atlas of Turkey*.

Ozkan, H., Brandolini, A., Schäfer-Pregl, R. and Salamini, F. 2002. AFLP analysis of a collection of tetraploid wheats indicates the origin of emmer and hard wheat domestication in southeast Turkey. *Mol Biol Evol*, 19 (10): 1797-1801.

Özberk, F., Karagöz, A., Özberk, İ. and Atlı, A. 2016a. *Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 25 (2): 218-233.

Özberk, F., Karagöz, A., Özberk, İ. and Atlı, A. 2016b. Buğday genetik kaynaklarından yerel ve kültür çeşitlerine; Türkiye'de buğday ve ekmek. *Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 25 (2): 218-233.

Paolella, G., Sposito, S., Romanelli, A. M. and Caputo, I. 2022. Type 2 Transglutaminase in Coeliac Disease: A Key Player in Pathogenesis, Diagnosis and Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 23 (14).

Peng, J.H., Sun, D. and Nevo, E. 2011. Domestication evolution, genetics and genomics in wheat. *Molecular Breeding*, 28 281-301.

Percival, J. 1921. *The wheat plant*. Duckworth.

Petersen, G., Seberg, O., Yde, M. and Berthelsen, K. 2006. Phylogenetic relationships of Triticum and Aegilops and evidence for the origin of the A, B, and D genomes of

common wheat (Triticum aestivum). *Molecular phylogenetics and evolution*, 39 (1): 70-82.

Qian, Y., Preston, K., Krokhin, O., Mellish, J. and Ens, W. 2008. Characterization of wheat gluten proteins by HPLC and MALDI TOF mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 19 (10): 1542-1550.

Qiao, S. W., Bergseng, E., Molberg, Ø, Xia, J., Fleckenstein, B., Khosla, C. and Sollid, L. M. 2004. Antigen presentation to celiac lesion-derived T cells of a 33-mer gliadin peptide naturally formed by gastrointestinal digestion. *J Immunol*, 173 (3): 1757-1762.

Quisenberry, K. S. and Reitz, L. P. 1974. Turkey Wheat: The Cornerstone of an Empire. *Agricultural History*, 48 (1): 98-110.

Ramadas, S., Kumar, T.M . and Singh, G. P. 2019. Wheat production in India: Trends and prospects. In *Recent advances in grain crops research*. Intech Open.

Rammensee, H., Friede, T. and Stevanović, S. 1995. MHC ligands and peptide motifs: first listing. *Immunogenetics*, 41 (4): 178-228.

Reynolds, M. P., Braun, H. J., Cavalieri, A. J., Chapotin, S., Davies, W. J., Ellul, P., Feuillet, C., Govaerts, B., Kropff, M. J., Lucas, H., Nelson, J., Powell, W., Quilligan, E., Rosegrant, M. W., Singh, R. P., Sonder, K., Tang, H., Visscher, S., vd.Wang, R. 2017. Improving global integration of crop research. *Science*, 357 (6349): 359-360.

Rubio-Tapia, A., Ludvigsson, J. F., Brantner, T. L., Murray, J. A. and Everhart, J. E. 2012. The prevalence of celiac disease in the United States. *Am J Gastroenterol*, 107 (10): 1538-1544; quiz 1537, 1545.

Ruibal-Mendieta, N. L., Delacroix, D. L., Mignolet, E., Petitjean, G., Dardenne, P., Meurens, M. and Marlier, M. 2005. Spelt (Triticum spelta L.) as a source of breadmaking flours and bran naturally enriched in oleic acid and tocopherols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (7): 2751-2759.

Ruiz-Carnicer, Á, Comino, I., Segura, V., Ozuna, C. V., Moreno, M. L., López-Casado, MÁ, Torres, M. I., Barro, F., vd.Sousa, C. 2019. Celiac Immunogenic Potential of α-Gliadin Epitope Variants from Triticum and Aegilops Species. *Nutrients*, 11 (2).

Sabot, F., Guyot, R., Wicker, T., Chantret, N., Laubin, B., Chalhoub, B., Leroy, P., Sourdille, P. and Bernard, M. 2005. Updating of transposable element annotations from large wheat genomic sequences reveals diverse activities and gene associations. *Molecular Genetics and Genomics*, 274 119-130.

Sapone, A., Bai, J.C., Ciacci, C., Dolinsek, J., Green, P.H.R., Hadjivassiliou, M., Kaukinen, K., Rostami, K., Sanders, D.S., Schumann, M., Ullrich, R., Villalta, D. , Volta, U., Catassi, C. and Fasano, A. 2012. Spectrum of gluten-related disorders: consensus on new nomenclature and classification. *BMC Medicine*, 10 (1): 13.

Schaart, J.G., Salentijn, E.M.J., Goryunova, S.V., Chidzanga, C., Esselink, D.G., Gosman, N., Bentley, A.R., Gilissen, L.J.W.J., vd.Smulders, M.J.M. 2021. Exploring the alpha-gliadin locus: the 33-mer peptide with six overlapping coeliac

disease epitopes in Triticum aestivum is derived from a subgroup of Aegilops tauschii. *The Plant Journal*, 106 (1): 86-94.

Schalk, K., Lang, C., Wieser, H., Koehler, P. and Scherf, K.A. 2017. Quantitation of the immunodominant 33-mer peptide from α-gliadin in wheat flours by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Scientific reports*, 7 (1): 45092.

Schalk, K. , Koehler, P. and Scherf, K.A. 2018. Targeted liquid chromatography tandem mass spectrometry to quantitate wheat gluten using well-defined reference proteins. *PLoS One*, 13 (2): 192.

Schuppan, D., Junker, Y. and Barisani, D. 2009. Celiac disease: from pathogenesis to novel therapies. *Gastroenterology*, 137 (6): 1912-1933.

Sealey-Voyksner, J.A. , Khosla, C. , Voyksner, R.D. and Jorgenson, J.W. 2010. Novel aspects of quantitation of immunogenic wheat gluten peptides by liquid chromatography–mass spectrometry/mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1217 (25): 4167-4183.

Shan, L., Qiao, S.W., Arentz-Hansen, H., Molberg, Ø., Gray, G.M., Sollid, L.M. and Khosla, C. 2005. Identification and analysis of multivalent proteolytically resistant peptides from gluten: implications for celiac sprue. *Journal of proteome research*, 4 (5): 1732-1741.

Shan, L., Molberg, Ø, Parrot, I., Hausch, F., Filiz, F., Gray, G. M., Sollid, L. M. and Khosla, C. 2002a. Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. *Science*, 297 (5590): 2275-2279.

Shan, L., Molberg, Ø, Parrot, I., Hausch, F., Filiz, F., Gray, G. M., Sollid, L. M. and Khosla, C. 2002b. Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. *Science*, 297 (5590): 2275-2279.

Sharma, N., Bhatia, S., Chunduri, V., Kaur, S., Sharma, S., Kapoor, P., Kumari, A. and Garg, M. 2020. Pathogenesis of celiac disease and other gluten related disorders in wheat and strategies for mitigating them. *Frontiers in Nutrition*, 7 6.

Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O. and Mann, M. 1996. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem*, 68 (5): 850-858.

Shewry, P. R. 2009. Wheat. *Journal of Experimental Botany*, 60 (6): 1537-1553.

Shewry, P. R., Halford, N. G., Belton, P. S. and Tatham, A. S. 2002. The structure and properties of gluten: an elastic protein from wheat grain. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B*, 357 (1418): 133-142.

Shewry, P.R. and Tatham, A.S. 2016. Improving wheat to remove coeliac epitopes but retain functionality. *Journal of Cereal Science*, 67 12-21.

Sidney, J., Peters, B. and Sette, A. 2020. Epitope prediction and identification- adaptive T cell responses in humans. *Seminars in Immunology*, 50 101418.

Simell, S., Hoppu, S., Hekkala, A., Simell, T., Ståhlberg, M. R., Viander, M., Yrjänäinen, H., Grönlund, J., Markula, P., Simell, V., Knip, M., Ilonen, J., Hyöty, H., vd.Simell, O. 2007. Fate of five celiac disease-associated antibodies during

normal diet in genetically at-risk children observed from birth in a natural history study. *Am J Gastroenterology*, 102 (9): 2026-2035.

Singh, P., Arora, A., Strand, T. A., Leffler, D. A., Catassi, C., Green, P. H., Kelly, C. P., Ahuja, V., vd.Makharia, G. K. 2018. Global Prevalence of Celiac Disease: Systematic Review and Meta-analysis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 16 (6): 823-836.e822.

Slavin, J.L., Jacobs, D., Marquart, L.E.N. and Wiemer, K. 2001. The role of whole grains in disease prevention. *Journal of the American Dietetic Association*, 101 (7): 780-785.

Sollid, L. M. 2002. Coeliac disease: dissecting a complex inflammatory disorder. *Nature Reviews Immunology,* 2 (9): 647-655.

Sollid, L.M., Qiao, S.-W., Anderson, R.P., Gianfrani, C. and Koning, F. 2012. Nomenclature and listing of celiac disease relevant gluten T-cell epitopes restricted by HLA-DQ molecules. *Immunogenetics*, 64 455-460.

Sukumaran, S., Dreisigacker, S., Lopes, M., Chavez, P. and Reynolds, M. P. 2015. Genome-wide association study for grain yield and related traits in an elite spring wheat population grown in temperate irrigated environments. *Theory Application Genetic*, 128 (2): 353-363.

Şahin, M., Aydoğan, S., Göçmen Akçacık, A. and Hamzaoğlu, S. 2019. Using Mixograph Parameters in Selection Of Durum Wheat Genotypes.

T., Mehmet. 2021. Eski ve Modern Ekmeklik Buğday Çeşitlerinin Tarımsal Ve Kalite Özellikleri Bakımından Genotipik Ve Fenotipik Tanımlanması Doktora tezi, Akdeniz Üniversitesi Antalya.

Tadesse, W., Inagaki, M., Tawkaz, S., Baum, M. and Van Ginkel, M. 2012. Recent advances and application of doubled haploids in wheat breeding. *African Journal of Biotechnology*, 11 (89): 15484-15492.

Tanner G.J., Colgrave M.L., Blundell M.J., Goswami H.P., Howitt C.A. 2013. Measuring hordein (gluten) in beer – a comparison of ELISA and mass spectrometry. *PLoS One*, 8(2): 52–56.

Tarım ve Orman Bakanlığı. 2014. *Wheat Landraces Inventory of Turkey*.

Tharunika, S., Mohan, V., Anjana, R.M. and Amutha, A. 2025. A Narrative Review of Celiac Disease in India with a Focus on its Link with Type 1 Diabetes. *Journal of Diabetology*, 16 (1): 14-21.

Trynka, G., Hunt, K. A., Bockett, N. A., Romanos, J., Mistry, V., Szperl, A., Bakker, S. F. and Bardella, M. T. 2011. Dense genotyping identifies and localizes multiple common and rare variant association signals in celiac disease. *Nature Genetics*, 43 (12): 1193-1201.

TÜİK. (2022). *Tarım İstatistikleri*.

Uauy, C., Paraiso, F., Colasuonno, P., Tran, R.K., Tsai, H., Berardi, S., Comai, L. and Dubcovsky, J. 2009. A modified TILLING approach to detect induced mutations in tetraploid and hexaploid wheat. *BMC plant Biology*, 9 1-14.

Unalp-Arida, A., Ruhl, C. E., Choung, R. S., Brantner, T. L. and Murray, J. A. 2017. Lower Prevalence of Celiac Disease and Gluten-Related Disorders in Persons Living in Southern vs Northern Latitudes of the United States. *Gastroenterology*, 152 (8): 1922-1932.e1922.

USDA. 2025. *USDA Foreign Agricultural Service*

Valdés, I., García, E., Llorente, M. and Méndez, E. 2003. Innovative approach to low-level gluten determination in foods using a novel sandwich enzyme-linked immunosorbent assay protocol. *European journal of gastroenterology & hepatology*, 15 (5): 465-747.

Van den Broeck, H. C., Van Herpen, T. W., Schuit, C., Salentijn, E. M., Dekking, L., Bosch, D., Hamer, R. J., Smulders, M. J., vd.Gilissen, L. J. 2009. Removing celiac disease-related gluten proteins from bread wheat while retaining technological properties: a study with Chinese Spring deletion lines. *BMC plant Biology*, 9 41.

Van den Broeck, H.C., Cordewener, J.H.G., Nessen, M.A., America, A.H.P. and van der Meer, I.M. 2015. Label free targeted detection and quantification of celiac disease immunogenic epitopes by mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1391 60-71.

Van Herpen, T.W.J.M., Goryunova, S.V., Van der Schoot, J., Mitreva, M., Salentijn, E. , Vorst, O., Schenk, M.F., Van Veelen, P.A., Koning, F., vd.Van Soest, L.J.M. 2006. Alpha-gliadin genes from the A, B, and D genomes of wheat contain different sets of celiac disease epitopes. *BMC genomics*, 7 1-13.

Van Regenmortel, M. H. V. 1996. Mapping Epitope Structure and Activity: From One-Dimensional Prediction to Four-Dimensional Description of Antigenic Specificity. *Methods*, 9 (3): 465-472.

Victorio V.C.M., Souza G.H.M..F., Santos M.C.B., Rodríguez V. A., Cameron L.C., Ferreira M.S.L. 2018. Differential expression of albumins and globulins of wheat flours of different technological qualities revealed by nanoUPLC-UDMSE. *Food Chemistry*, 239: 1027–1036.

Wieser, H 1996. Relation between gliadin structure and coeliac toxicity. *Acta Paediatrica*, 85 3-9.

Wieser, H. 2007. Chemistry of gluten proteins. *Food microbiology*, 24 (2): 115-119.

Wieser, H. and Koehler, P. 2008. The Biochemical Basis of Celiac Disease. *Cereal Chemistry*, 85 (1): 1-13.

Wieser, H., Koehler, P. and Scherf, K.A. 2023. Chemistry of wheat gluten proteins: Qualitative composition. *Cereal Chemistry*, 100 (1): 23-35.

Wilson, B.W. 2010. Chapter 68 - Cholinesterases. In R. Krieger (Ed.), *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology (Third Edition)* (pp. 1457-1478). Academic Press.

Wrigley, C. W. 2009. Wheat: A Unique Grain for the World. In K. KhanvdP. R. Shewry (Eds.), *Wheat (Fourth Edition)* (pp. 1-17). AACC International Press.

Wrigley, C.W. 1988. Proteins and amino acids. *American Association of Cereal Chemists (AACC International)*.

Yeken M. Z., Gökdere H.İ., Yılmaz A..B., Tekin M, Çiftçi V. 2023. Ekmeklik Buğday (Triticum aestivum L.) Genotiplerinin Dane Verimi ve Bazı Önemli Kalite Özellikleri için Trakya Bölgesinde Bulunan Farklı Çevrelerde Testlenmesi. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 13 (4): 3040-3052.

Yıldırım, A. and Atasoy, A. 2020. Quality characteristics of some durum wheat varieties grown in Southeastern Anatolia Region of Turkey (GAP). *Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 24 (4): 420-431.

Yilmaz H, Karatas R, Demirel F, Soysal S, Türkoğlu A, Yilmaz A, Ciftci V. 2024. Variations in protein, gluten, Zeleny sedimentation and yield of certain wheat (Triticum aestivum L.) cultivars under different climatic conditions. *Euphytica*, 220 (12): 190.

Yuan, J. , Zhou, C. , Gao, J. , Li, J. , Yu, F. , Lu, J. , Li, X. and Wang, X. 2017. Prevalence of Celiac Disease Autoimmunity Among Adolescents and Young Adults in China. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 15 (10): 1572-1579.e1571.

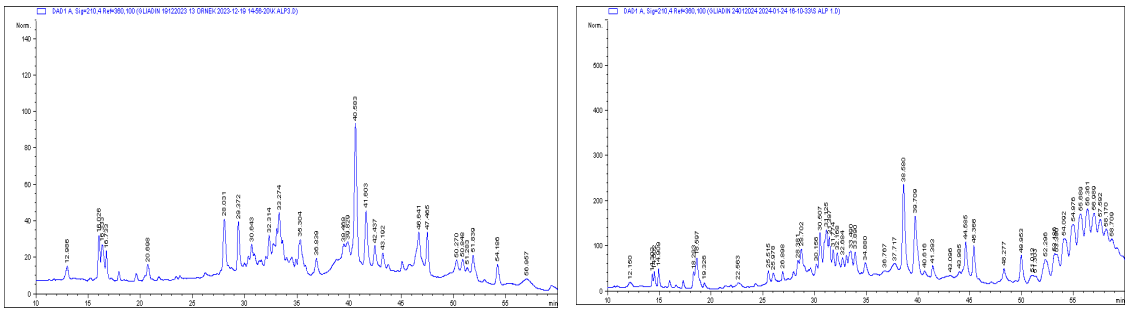
Zhang, W., Ciclitira, P. J. and Messing, J. 2014. PacBio sequencing of gene families:A case study with wheat gluten genes. *Gene*, 533 (2): 541-546.

Zhong, Y., Chen, Y., Pan, M., Wang, H., Sun, J., Chen, Y., Cai, J., Zhou, Q., Wang, X., vd.Jiang, D. 2023. Insights into the Functional Components in Wheat Grain: Spatial Pattern, Underlying Mechanism and Cultivation Regulation. *Plants (Basel)*, 12 (11).

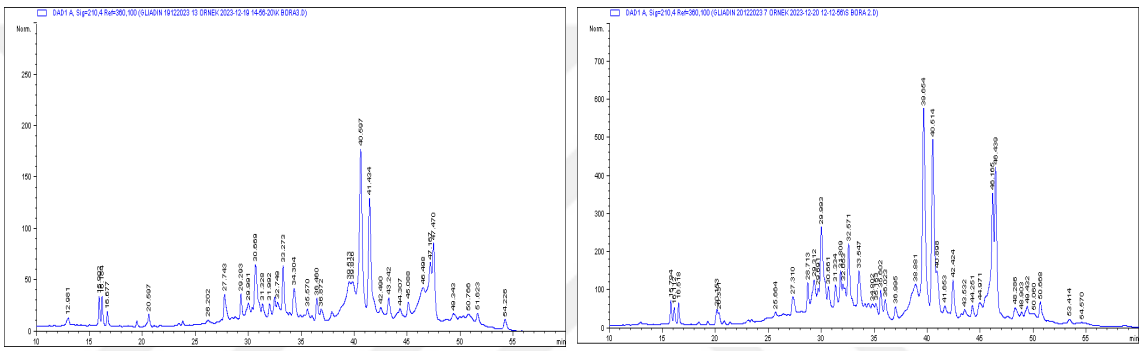
Ziraat Mühendisleri Odası Yayınları. (1970). *Yabancı Menşeli Buğday Tohumluklarının Durumu*.

7. EKLER

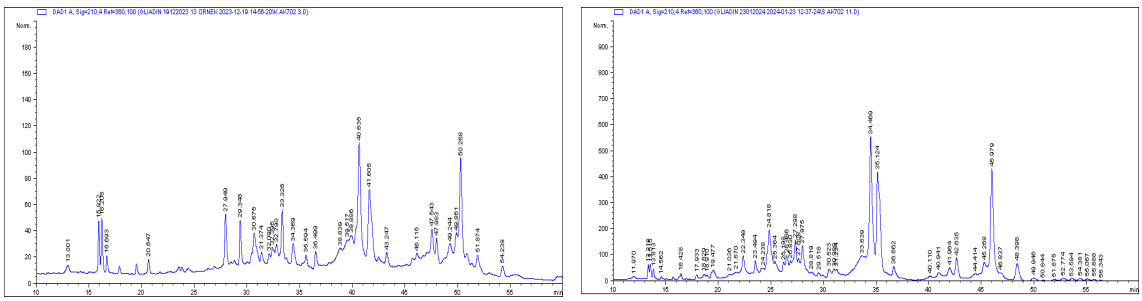
EK-1. Alparslan çeşidinin sulu ve kuru koşullardaki HPLC görüntüleri



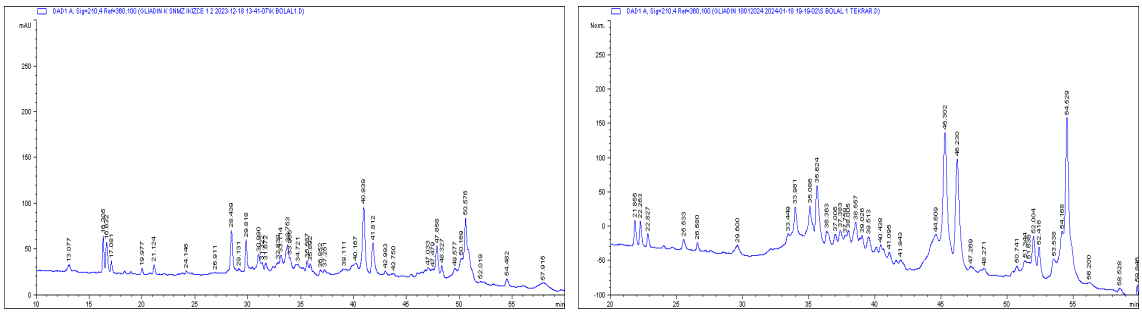
EK-2. Bora çeşidinin kuru ve sulu yöntemle yetiştirilen HPLC görüntüleri



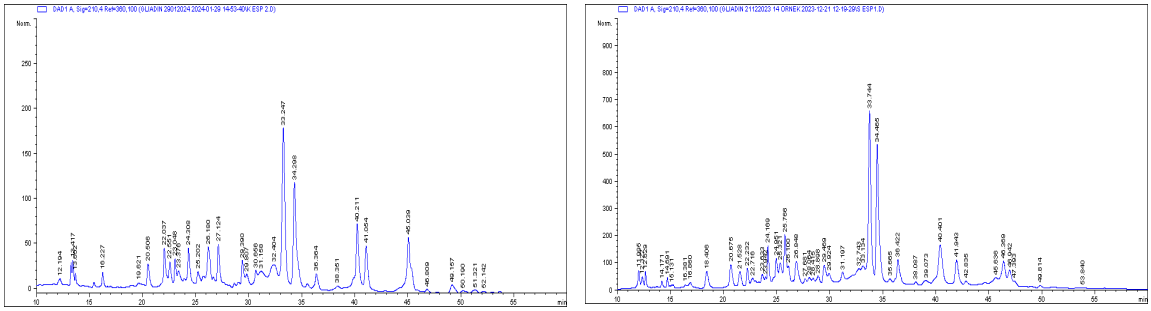
EK-3. Ak702 çeşidinin kuru ve sulu yöntemle yetiştirilen HPLC görüntüleri



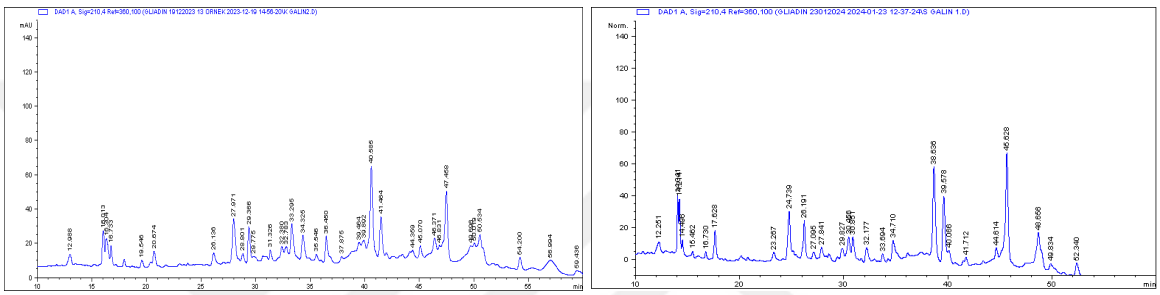
EK-4. Bolal çeşidinin kuru ve sulu yöntemle yetiştirilen HPLC görüntüleri



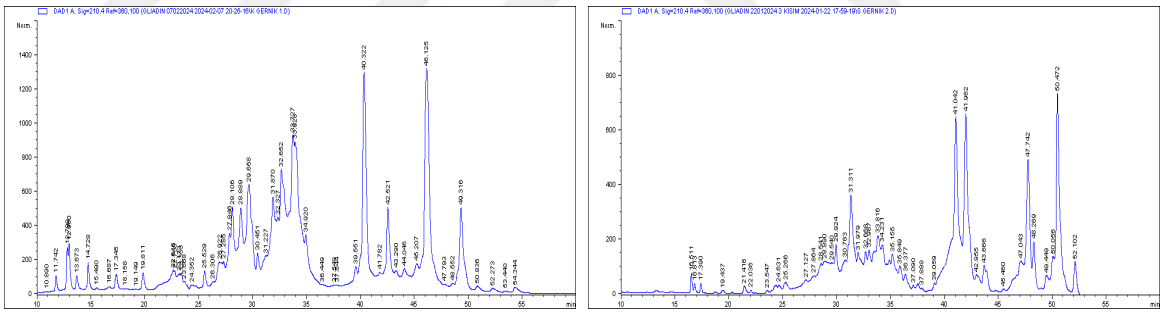
EK-5. Esperia çeşidinin kuru ve sulu yöntemle yetiştirilen HPLC görüntüleri



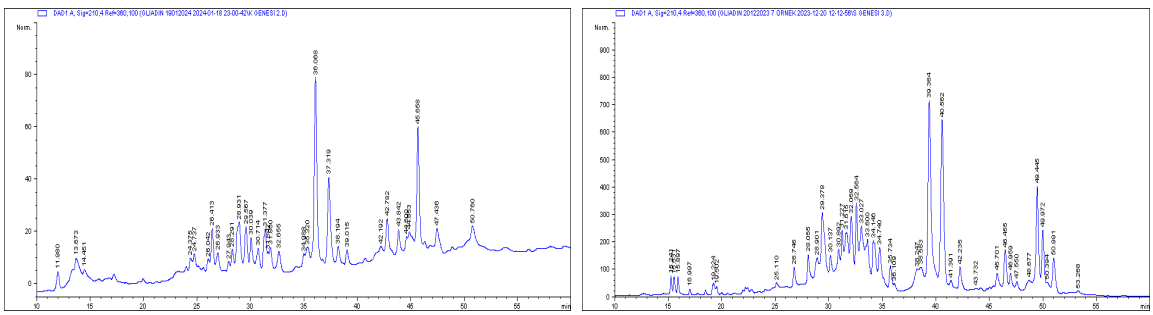
EK-6. Galinda çeşidinin kuru ve sulu yöntemle yetiştirilen HPLC görüntüleri



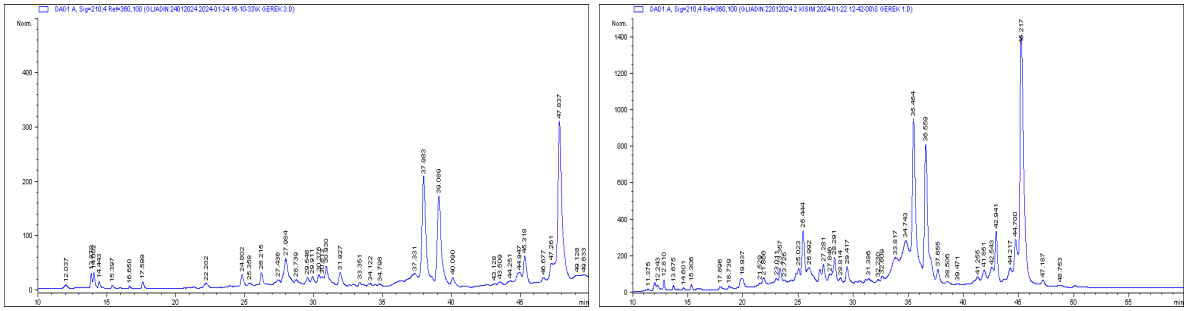
EK-7. Mokan (Gernik) çeşidinin kuru ve sulu yöntemle yetiştirilen HPLC görüntüleri



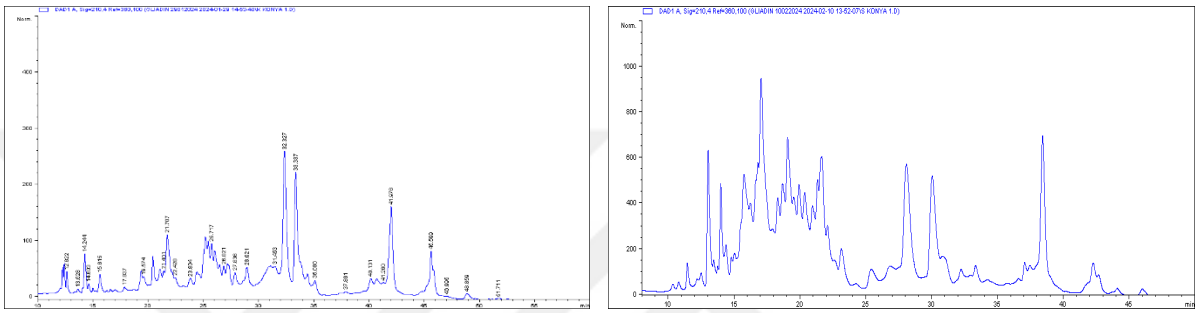
EK-8. Genesi çeşidinin kuru ve sulu yöntemle yetiştirilen HPLC görüntüleri



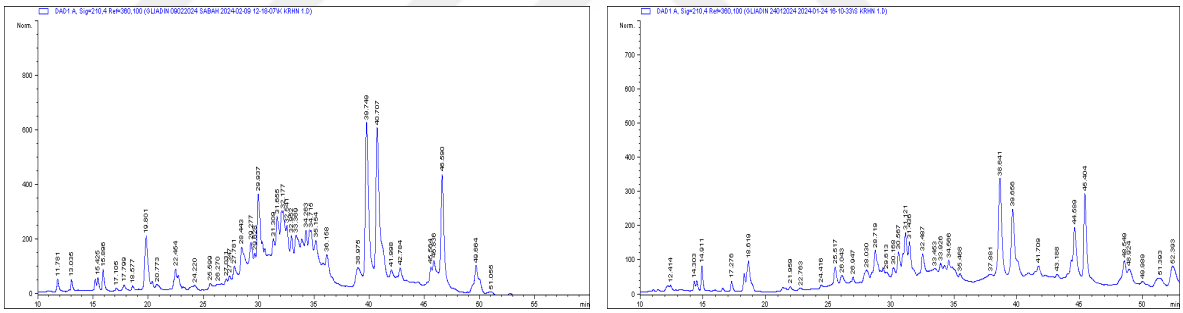
EK-9. Gerek 79 çeşidinin kuru ve sulu yöntemle yetiştirilen HPLC görüntüleri



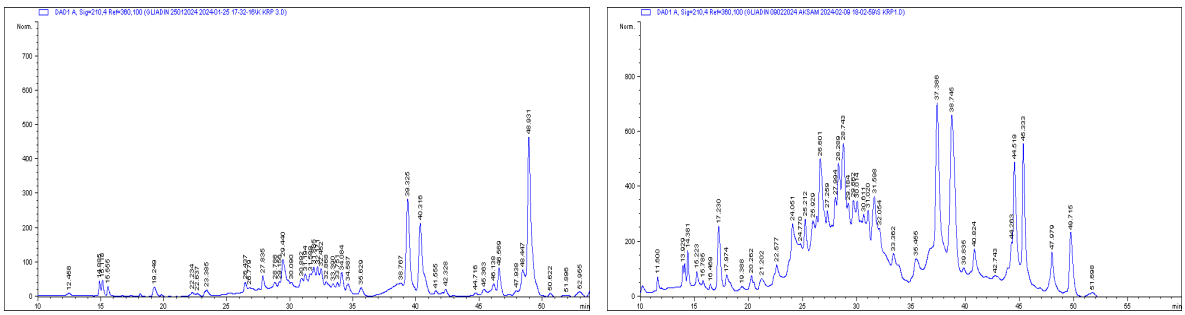
EK-10. Konya 2002 çeşidinin kuru ve sulu yöntemle yetiştirilen HPLC görüntüleri



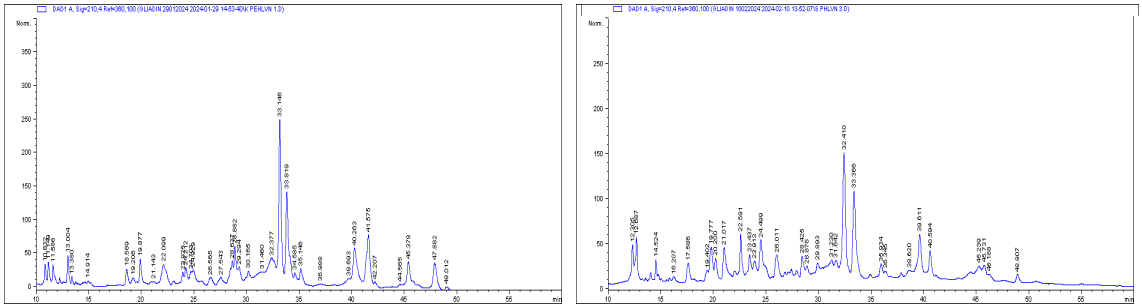
EK-11. Karahan çeşidinin kuru ve sulu yöntemle yetiştirilen HPLC görüntüleri



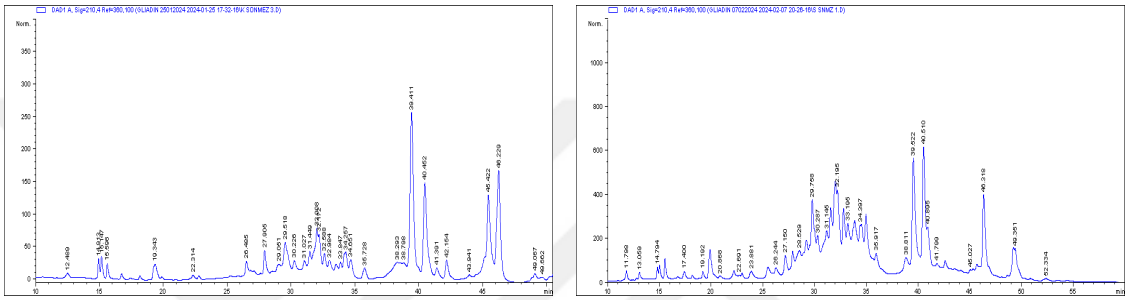
EK-12. Kırkpınar çeşidinin kuru ve sulu koşullardaki HPLC görüntüleri



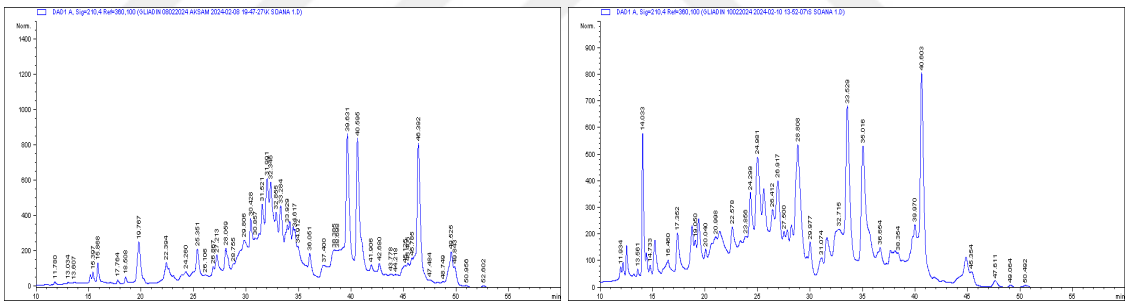
EK-13. Pehlivan çeşidinin kuru ve sulu koşullardaki HPLC görüntüleri



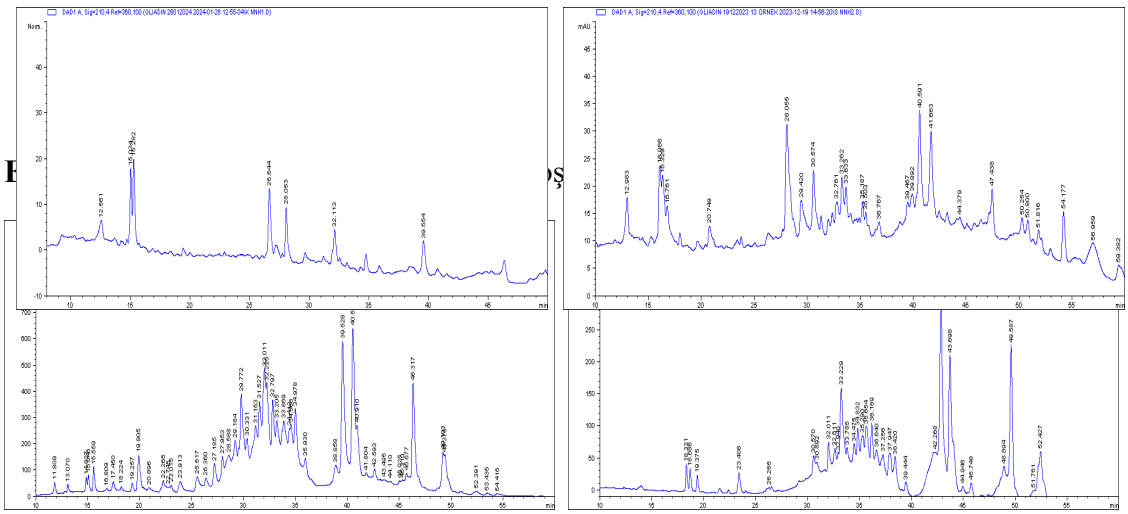
EK-14. Sönmez çeşidinin kuru ve sulu koşullardaki HPLC görüntüleri



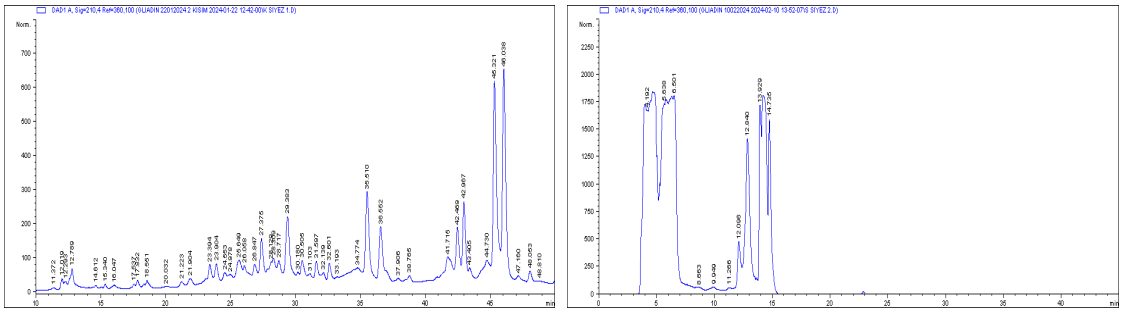
EK-15. Soana çeşidinin kuru ve sulu koşullardaki HPLC görüntüleri



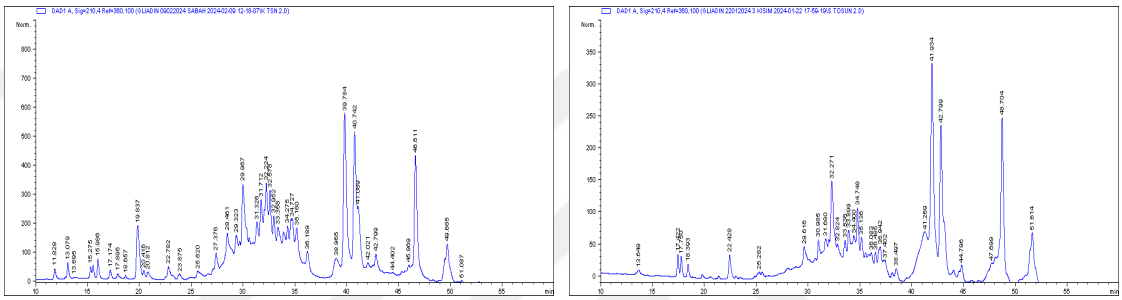
EK-16. Nenehatun çeşidinin kuru ve sulu yöntemle yetiştirilen HPLC görüntüleri



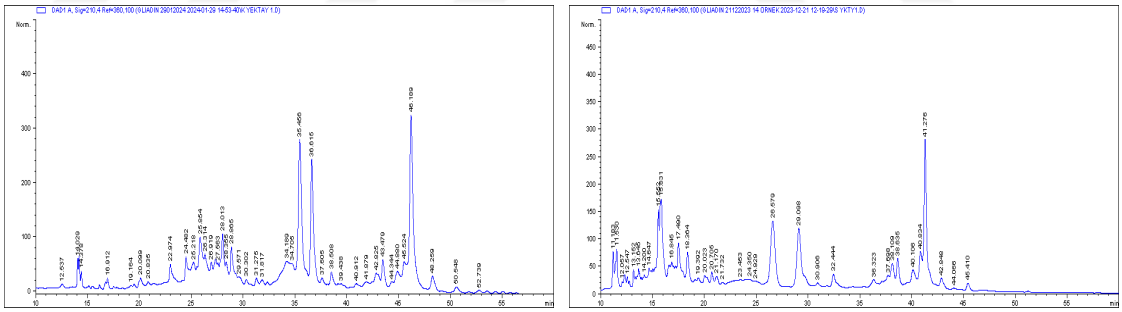
EK-18. Songar (Siyez) çeşidinin kuru ve sulu koşullardaki HPLC görüntüleri



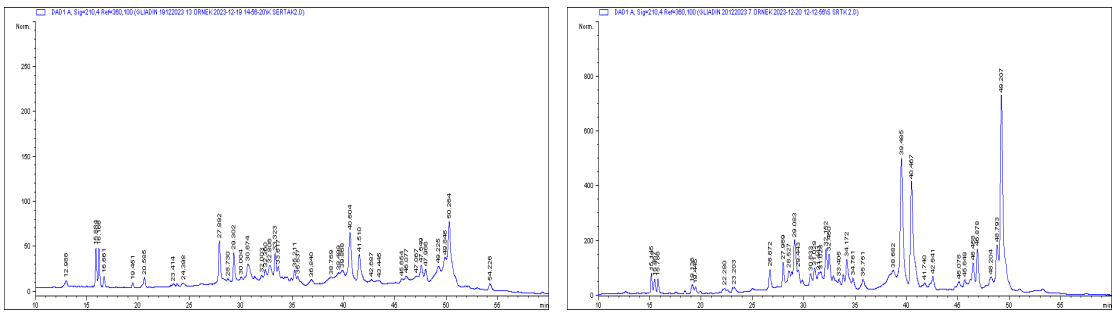
EK-19. Tosunbey çeşidinin kuru ve sulu koşullardaki HPLC görüntüleri



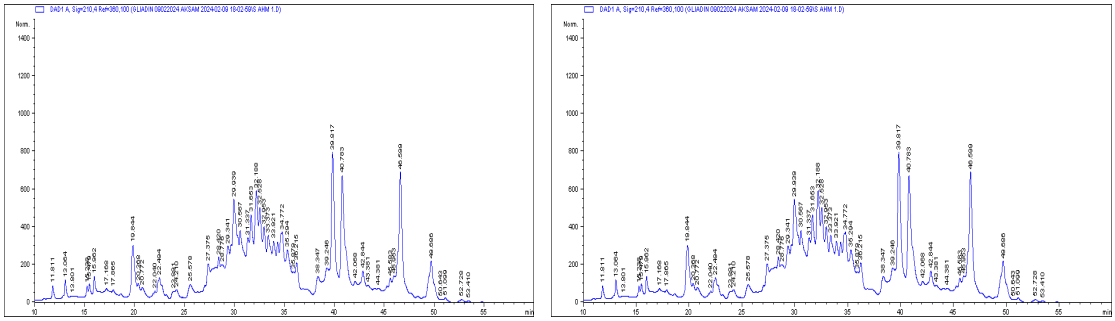
EK-20. Yektay çeşidinin kuru ve sulu koşullardaki HPLC görüntüleri



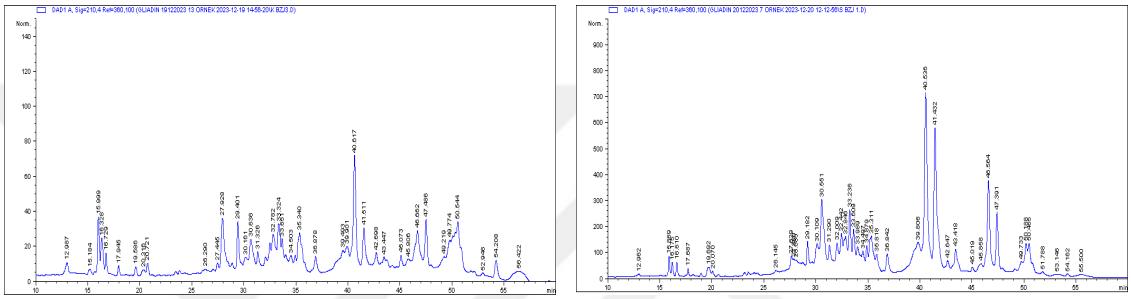
EK-21. Sertak çeşidinin kuru ve sulu koşullardaki HPLC görüntüleri



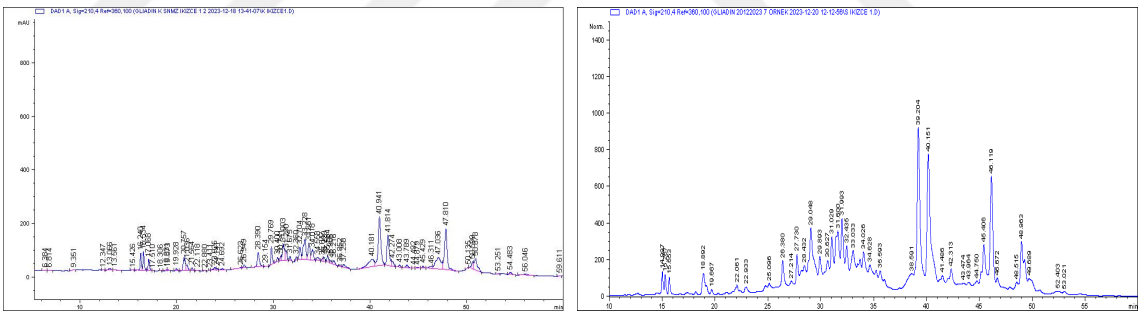
EK-22. Ahmetağa çeşidinin kuru ve sulu koşullardaki HPLC görüntüleri



EK-23. Bezostaja 1 çeşidinin kuru ve sulu koşullardaki HPLC görüntüleri



EK-24. İkizce 96 çeşidinin kuru ve sulu koşullardaki HPLC görüntüleri



EK-25. Kuru ve sulu yetiştirme koşullarında genotiplerin dane verimi ağırlıkları

Grup	Tescil dönemi	Kuru koşullar ortalama± ss	Değişim aralığı	Sulu koşullar ortalama± ss	Değişim aralığı
1. Grup	Tarihsel	255.75±66.11	209.00-302.50	418.15±102.88	345.40-490.90
2. Grup	Yeşil devrim öncesi seleksiyon ıslahı <1968	429.90±38.75	402.50-457.30	645.50±141.42	545.50-745.50
3. Grup	Yeşil devrim öncesi melezleme Islahı 1968 - 1970	429.27±22.22	413.60-454.70	751.53±27.75	727.30-781.80
4. Grup	Yeşil devrim sonrası melezleme ıslahı 1970-2000	439.17±63.91	340.70-512.90	775.77±114.82	654.50-945.50
5. Grup	Yeşil devrim sonrası melezleme ıslahı 2001 - 2010	416.90±67.84	337.30-534.90	786.40±58.52	736.50-890.90
6. Grup	Yeşil devrim sonrası melezleme ıslahı 2011 - 2022	399.36±55.07	332.50-454.90	789.10±96.71	709.10-927.30

EK-26. Kuru ve sulu yetiştirme koşullarında genotiplerin bin dane ağırlıkları

Grup	Tescil dönemi	Kuru koşullar ortalama± ss	Değişim aralığı	Sulu koşullar ortalama± ss	Değişim aralığı
1. Grup	Tarihsel	28.00±5.23	24.30 - 31.70	28.40±3.82	25.70 - 31.10
2. Grup	Yeşil devrim öncesi seleksiyon ıslahı <1968	38.30±3.82	35.60 - 41.00	39.95±5.44	36.10 - 43.80
3. Grup	Yeşil devrim öncesi melezleme Islahı 1968 - 1970	39.27±3.58	37.10 - 43.40	41.47±1.96	39.30 - 43.10
4. Grup	Yeşil devrim sonrası melezleme ıslahı 1970-2000	38.15±2.77	34.60 - 42.50	40.22±5.51	34.90 - 49.50
5. Grup	Yeşil devrim sonrası melezleme ıslahı 2001 - 2010	37.92±3.62	32.90 - 42.80	41.25±4.27	36.80 - 48.00
6. Grup	Yeşil devrim sonrası melezleme ıslahı 2011 - 2022	35.60±4.88	29.90 - 42.30	40.08±5.46	34.00 - 48.50

EK-27. Kuru ve sulu yetiştirme koşullarında genotiplerin hektolitre ağırlıkları

Grup	Tescil dönemi	Kuru koşullar ortalama± ss	Değişim aralığı	Sulu koşullar ortalama± ss	Değişim aralığı
1. Grup	Tarihsel	44.40±0.85	43.80 - 45.00	43.40±1.84	42.10 - 44.70
2. Grup	Yeşil devrim öncesi seleksiyon ıslahı <1968	70.75±1.34	69.80 - 71.70	78.10±1.70	76.90 - 79.30
3. Grup	Yeşil devrim öncesi melezleme Islahı 1968 - 1970	75.37±3.89	71.20 - 78.90	78.80±0.82	77.90 - 79.50
4. Grup	Yeşil devrim sonrası melezleme ıslahı 1970-2000	74.85±1.29	74.00 - 77.30	79.15±1.15	77.50 - 80.30
5. Grup	Yeşil devrim sonrası melezleme ıslahı 2001 - 2010	76.95±1.55	75.30 - 79.10	79.62±1.21	77.50 - 80.70
6. Grup	Yeşil devrim sonrası melezleme ıslahı 2011 - 2022	75.00±2.66	70.80 - 77.90	78.58±1.15	77.30 - 80.30

EK-28. Kuru ve sulu yetiştirme koşullarında genotiplerin dane nemi değeri

Grup	Tescil dönemi	Kuru koşullar ortalama± ss	Değişim aralığı	Sulu koşullar ortalama± ss	Değişim aralığı
1. Grup	Tarihsel	8.55±1.63	7.40 - 9.70	7.45±0.35	7.20 - 7.70
2. Grup	Yeşil devrim öncesi seleksiyon ıslahı <1968	9.45±0.49	9.10 - 9.80	10.10±0.42	9.80 - 10.40
3. Grup	Yeşil devrim öncesi melezleme Islahı 1968 - 1970	10.07±0.06	10.00 - 10.10	10.57±1.16	9.80 - 11.90
4. Grup	Yeşil devrim sonrası melezleme ıslahı 1970-2000	10.12±0.39	9.60 - 10.60	10.03±0.37	9.60 - 10.40
5. Grup	Yeşil devrim sonrası melezleme ıslahı 2001 - 2010	10.10±0.32	9.70 - 10.60	10.17±0.25	9.70 - 10.40
6. Grup	Yeşil devrim sonrası melezleme ıslahı 2011 - 2022	9.78±0.54	9.30 - 10.60	9.78±0.45	9.10 - 10.30

EK-29. Kuru ve sulu yetiştirme koşullarında genotiplerin yaş glüten oranları

Grup	Tescil dönemi	Kuru koşullar ortalama± ss	Değişim aralığı	Sulu koşullar ortalama± ss	Değişim aralığı
1. Grup	Tarihsel	17.45±2.33	15.80 - 19.10	16.80±1.98	15.40 - 18.20
2. Grup	Yeşil devrim öncesi seleksiyon ıslahı <1968	25.75±7.99	20.10 - 31.40	23.55±2.62	21.70 - 25.40
3. Grup	Yeşil devrim öncesi melezleme Islahı 1968 - 1970	28.20±4.16	23.60 - 31.70	28.33±7.85	21.70 - 37.00
4. Grup	Yeşil devrim sonrası melezleme ıslahı 1970-2000	27.22±5.12	22.40 - 34.00	26.13±4.38	20.70 - 30.70
5. Grup	Yeşil devrim sonrası melezleme ıslahı 2001 - 2010	31.35±2.31	27.20 - 34.10	31.47±6.63	23.00 - 39.10
6. Grup	Yeşil devrim sonrası melezleme ıslahı 2011 - 2022	32.42±8.06	22.70 - 41.90	34.82±7.07	27.30 - 43.30

EK-30. Kuru ve sulu yetiştirme koşullarında genotiplerin gluten indeksi

Grup	Tescil dönemi	Kuru koşullar ortalama± ss	Değişim aralığı	Sulu koşullar ortalama± ss	Değişim aralığı
1. Grup	Tarihsel	42.00±0.42	41.70 - 42.30	48.50±2.12	47.00 - 50.00
2. Grup	Yeşil devrim öncesi seleksiyon ıslahı <1968	63.50±2.55	61.70 - 65.30	69.00±5.66	65.00 - 73.00
3. Grup	Yeşil devrim öncesi melezleme Islahı 1968 - 1970	68.77±4.74	63.30 - 71.70	76.10±11.15	65.00 - 87.30
4. Grup	Yeşil devrim sonrası melezleme ıslahı 1970-2000	67.22±11.17	50.00 - 83.30	74.12±12.16	60.00 - 89.00
5. Grup	Yeşil devrim sonrası melezleme ıslahı 2001 - 2010	78.97±7.81	71.70 - 92.70	81.83±12.37	70.00 - 95.00
6. Grup	Yeşil devrim sonrası melezleme ıslahı 2011 - 2022	72.74±17.82	53.30 - 92.00	79.66±16.26	63.30 - 100.00

EK-31. Kuru ve sulu yetiştirme koşullarında buğdaydaki protein miktarları

Grup	Tescil dönemi	Kuru koşullar ortalama± ss	Değişim aralığı	Sulu koşullar ortalama± ss	Değişim aralığı
1. Grup	Tarihsel	13.05±1.63	11.90 - 14.20	14.95±0.07	14.90 - 15.00
2. Grup	Yeşil devrim öncesi seleksiyon ıslahı <1968	12.40±1.70	11.20 - 13.60	13.50±3.54	11.00 - 16.00
3. Grup	Yeşil devrim öncesi melezleme Islahı 1968 - 1970	12.50±0.92	11.70 - 13.50	13.70±1.68	11.80 - 15.00
4. Grup	Yeşil devrim sonrası melezleme ıslahı 1970-2000	12.07±1.40	10.00 - 14.00	12.53±2.15	9.60 - 15.70
5. Grup	Yeşil devrim sonrası melezleme ıslahı 2001 - 2010	12.65±1.09	11.50 - 14.60	11.07±1.32	10.00 - 13.10
6. Grup	Yeşil devrim sonrası melezleme ıslahı 2011 - 2022	12.48±0.95	11.10 - 13.50	13.26±1.45	11.50 - 15.20

EK-32. Kuru ve sulu yetiştirme koşullarında genotiplerin sedimantasyon değerleri

Grup	Tescil dönemi	Kuru koşullar ortalama± ss	Değişim aralığı	Sulu koşullar ortalama± ss	Değişim aralığı
1. Grup	Tarihsel	19.15±2.90	17.10 - 21.20	22.75±2.47	21.00 - 24.50
2. Grup	Yeşil devrim öncesi seleksiyon ıslahı <1968	27.50±2.55	25.70 - 29.30	30.15±1.63	29.00 - 31.30
3. Grup	Yeşil devrim öncesi melezleme Islahı 1968 - 1970	34.93±12.81	25.90 - 49.60	45.33±23.12	31.00 - 72.00
4. Grup	Yeşil devrim sonrası melezleme ıslahı 1970-2000	29.30±0.00	29.30 - 29.30	40.70±14.69	25.00 - 62.50
5. Grup	Yeşil devrim sonrası melezleme ıslahı 2001 - 2010	29.30±0.00	29.30 - 29.30	58.25±12.20	41.50 - 71.00
6. Grup	Yeşil devrim sonrası melezleme ıslahı 2011 - 2022	29.30±0.00	29.30 - 29.30	62.00±8.68	54.00 - 72.00

EK-33. Kuru ve sulu yetiştirme koşullarında genotiplerin miksograf değerleri

Grup	Tescil dönemi	Kuru koşullar ortalama± ss	Değişim aralığı	Sulu koşullar ortalama± ss	Değişim aralığı
1. Grup	Tarihsel	145.30±9.48	138.60 - 152.00	151.30±11.74	143.00 - 159.60
2. Grup	Yeşil devrim öncesi seleksiyon ıslahı <1968	211.40±50.77	175.50 - 247.30	207.20±53.74	169.20 - 245.20
3. Grup	Yeşil devrim öncesi melezleme Islahı 1968 - 1970	244.37±58.82	176.50 - 280.50	208.90±63.59	170.60 - 282.30
4. Grup	Yeşil devrim sonrası melezleme ıslahı 1970-2000	251.37±39.89	205.80 - 318.30	231.80±39.81	198.90 - 309.10
5. Grup	Yeşil devrim sonrası melezleme ıslahı 2001 - 2010	320.57±55.54	255.10 - 402.70	308.93±60.16	242.10 - 397.90
6. Grup	Yeşil devrim sonrası melezleme ıslahı 2011 - 2022	344.68±102.12	250.60 - 467.70	318.36±75.69	233.40 - 399.70

EK-34. Kuru ve sulu yetiştirme koşullarında genotiplerin gliadin miktarları

Grup	Tescil dönemi	Kuru koşullar ortalama± ss	Değişim aralığı	Sulu koşullar ortalama± ss	Değişim aralığı
1. Grup	Tarihsel	10861±387	10587- 11135	13051±1086	12283 - 13820
2. Grup	Yeşil devrim öncesi seleksiyon ıslahı <1968	10586±535	10207- 10964	11684±846	11085 - 12283
3. Grup	Yeşil devrim öncesi melezleme Islahı 1968 - 1970	10331±248	10078 - 10575	11555±1000	10555 - 12555
4. Grup	Yeşil devrim sonrası melezleme ıslahı 1970-2000	9841±363	9226 - 10243	13210±1594	11795- 16329
5. Grup	Yeşil devrim sonrası melezleme ıslahı 2001 - 2010	10446±1063	9820- 12598.66	13194±2492	10628 - 16920
6. Grup	Yeşil devrim sonrası melezleme ıslahı 2011 - 2022	10500±209	10252 - 10745	12252±977	11319 - 13820

ÖZGEÇMİŞ

Sude KEŞCİ

ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Doktora 2019-2025	Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Antalya
Yüksek Lisans 2012-2014	Akdeniz Üniversitesi Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Antalya
Lisans 2008-2012	Akdeniz Üniversitesi Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Antalya
Ön Lisans 2013-2015	Anadolu Üniversitesi Sağlık Kurumları İşletmeciliği, Eskişehir

MESLEKİ VE İDARİ GÖREVLER

Uzman 2016- 2022	Akdeniz Üniversitesi Teknoloji Transfer Ofisi
Proje Yazım Personeli 2012	Akdeniz Üniversitesi Girişimcilik İş Geliştirme Uyg. ve Araş. Merkezi
Stajyer 2011-2012	Mathur’s Group, Köln Üniversitesi, Almanya

ESERLER

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

1- Kesci, S., Tekin, M., Cengiz, M. F., Akar,T. 2024. Quantification and comparison of gliadin proteins in ancient wheats grown in rainfed and irrigated conditions. *Mediterranean Agricultural Sciences*, 37 (3):129-136. Doi: 10.29136/mediterranean.1551068.

2- Cengiz, M. F., Babacan, U., Akıncı, E., Kesci, S., Kaba, A. 2021. Extraction of phenolic acids from ancient wheat bran samples by ultrasound application. *Journal Of Chemıcal Technology And Biotechnology*. 96(1):134-141. Doi: 10.1002/jctb.6519.

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler

1- Babacan, U., Cengiz, M. F., Bouali M., Kesci, S., Evaluation of Plant Ingredients Obtained from Cannabis Species for Use as Food Additives. *International Conference on Raw Materials to Processed Foods* (Basılı Sözlü Bildiri), 2021, İstanbul.

2- Kesci, S., Cengiz, M. F., Babacan, U., Bouali M., Kenevirden elde edilen kanabinoidlerin enkapsüllenmesi ve ilaç sektöründe uygulaması. *9. Uluslararası İlaç Kimyası Kongresi* (Basılı Sözlü Bildiri). 2021 Antalya.

3- Babacan Ü., Akıncı, E., Kesci, S., Cengiz, M. F., Kaba, A., Akar, T. Variations of Ferulic Acid in Traditional Turkish Wheat Species. *9. Uluslarası İlaç Kimyası Kongresi.* 2020. Antalya.

Fikri Mülkiyet

1- Patent- Kenevir Bitkisinden Kannabinoidlerin Yüksek Verimlilikte Ekstraksiyonu İçin Yeni Bir Yöntem. Patent Numarası: 2021/010987