

**YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KIŞLIK EKMEKLİK BUĞDAY (*Triticum aestivum* L.)'DA
Yr5 SARI PAS (*Puccinia Striiformis* f.sp *tritici*)
DAYANIKLILIK GENİNİN
MOLEKÜLER BELİRTEÇLER (MARKER) İLE
ARAŞTIRILMASI**

Biyolog U. Sinan Alp

**FBE Biyomühendislik Anabilim Dalı Biyokimya Programında
Hazırlanan**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Zeynep Akdeste

İSTANBUL, 2007

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGE LİSTESİ.....	i
KISALTMA LİSTESİ.....	ii
ŞEKİL LİSTESİ.....	iii
ÇİZELGE LİSTESİ.....	iv
ÖNSÖZ.....	v
ÖZET.....	vi
ABSTRACT.....	vii
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Buğday Genetiği.....	1
1.2 Buğday Hastalıklarında Biyotik Faktörlerin Etkisi.....	3
1.3 Bitkisel Gen Kaynaklarının Kullanımı.....	8
1.4 İslah Çalışmalarında Belirteç Yardımıyla Seleksiyon.....	10
1.5. Moleküler Belirteçler.....	11
1.5.1 DNA Melezleme Belirteçleri.....	12
1.5.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu Kullanımına Dayalı DNA Çoğaltım Belirteçleri... ..	12
1.5.3 STS"Sequence Tagged Site" (Dizisi Etiketlenmiş Alanlar).....	14
1.5.4 SSR"Simple Sequence Repeat" (Basit Dizi Tekrarları, Mikrosatellitler).....	14
1.6 Yr5 Geni.....	16
2. MATERYALLER.....	18
2.1 Bitki Materyali.....	18
2.2 Kullanılan Cihaz ve Malzemeler.....	19
3. DENEYSEL ÇALIŞMA.....	19
3.1 Genomik DNA İzolasyonu.....	19
3.2 Dayanıklı ve Hassas Kışlık Ekmeklik Buğday Çeşitlerinde Yr5 Geni ile İlişkili Moleküler Belirteçlerin Araştırılması.....	20
3.3 Dayanıklı ve Hassas Kışlık Ekmeklik Buğday Çeşitlerinde Yr5 Geni ile İlişkili RGAP ve STS Belirteçlerinin Araştırılması.....	23
3.4 Dayanıklı ve Hassas Kışlık Ekmeklik Buğday Çeşitlerinde Kromozom 2BL'de Yer Alan Mikosatellit Belirteçler ile Araştırılması.....	23
3.5. PCR Ürünlerinin İncelenmesi.....	23
3.5.1 PCR Ürünlerinin Agaroze Jel Elektroforezinde İncelenmesi.....	23
3.5.2 PCR Ürünlerinin Poliakrilamid Jel Elektroforezinde İncelenmesi.....	24
3.6 Örneklerin Agaroze Jelden Geri Kazanılması.....	28

4	SONUÇLAR	29
4.1	Dayanıklı ve Hassas Kışlık Ekmeklik Buğday Çeşitlerinde Yr5 Geni ile İlişkili Moleküler Belirteçlerin Araştırılması	29
4.1.1	RGAP Belirteçleri Kullanılarak Elde Edilen Polimorfik Bantların Agaroz ve Poliakrilamid Jel Elektroforezinde İncelenmesi.....	32
4.1.1.1	Xgwm 17 Belirteci ile Elde Edilen Sonuçlar	32
4.1.1.2	Xgwm 19 Belirteci ile Elde Edilen Sonuçlar	33
4.1.1.3	Xgwm 21 Belirteci ile Elde Edilen Sonuçlar	34
4.1.1.4	Xgwm 22 Belirteci ile Elde Edilen Sonuçlar	35
4.1.1.5	Xgwm 26 Belirteci ile Elde Edilen Sonuçlar	36
4.1.1.6	Xgwm 27 Belirteci ile Elde Edilen Sonuçlar	37
4.1.1.7	Xgwm 28 Belirteci ile Elde Edilen Sonuçlar	38
4.1.1.8	Xgwm 29 Belirteci ile Elde Edilen Sonuçlar	39
4.1.2	STS Belirteçleri Kullanılarak Elde Edilen Polimorfik Bantların Agaroz ve Poliakrilamid Jel Elektroforezinde İncelenmesi.....	40
4.1.2.1	STS7/8 Belirteci ile Elde Edilen Sonuçlar	40
4.1.2.2	STS9/10 Belirteci ile Elde Edilen Sonuçlar	40
4.1.2.3	STS11/13 Belirteci ile Elde Edilen Sonuçlar	41
4.1.2.4	STS5/8 Belirteci ile Elde Edilen Sonuçlar	41
4.1.2.5	STS5/12 Belirteci ile Elde Edilen Sonuçlar	42
4.1.2.6	STS5/13 Belirteci ile Elde Edilen Sonuçlar	42
4.1.2.7	STS5/16 Belirteci ile Elde Edilen Sonuçlar	43
4.1.2.8	STS7/12 Belirteci ile Elde Edilen Sonuçlar	43
4.1.2.9	STS7/16 Belirteci ile Elde Edilen Sonuçlar	44
4.1.2.10	STS9/13 Belirteci ile Elde Edilen Sonuçlar	44
4.1.2.11	STS9/16 Belirteci ile Elde Edilen Sonuçlar	45
4.1.2.12	STS11/8 Belirteci ile Elde Edilen Sonuçlar	45
4.1.2.13	STS11/12 Belirteci ile Elde Edilen Sonuçlar	46
4.1.2.14	STS11/14 Belirteci ile Elde Edilen Sonuçlar	46
4.1.3	Mikrosatellit Belirteçleri Kullanılarak Elde Edilen Polimorfik Bantların Agaroz ve Poliakrilamid Jel Elektroforezinde İncelenmesi.....	47
4.1.3.1	XGWM382 Belirteci ile Elde Edilen Sonuçlar	47
4.1.3.2	XGWM526 Belirteci ile Elde Edilen Sonuçlar	47
4.1.3.3	XGWM332 Belirteci ile Elde Edilen Sonuçlar	48
4.1.3.4	XGWM627 Belirteci ile Elde Edilen Sonuçlar	48
4.1.3.5	XGWM175 Belirteci ile Elde Edilen Sonuçlar	49
5.	TARTIŞMA VE DEĞERLENDİRME	50
KAYNAKLAR.....		
ÖZGEÇMİŞ		

SİMGE LİSTESİ

°C	Santigrat derece
g	gram
L	Litre
ml	mililitre
μ	mikro
μl	mikrolitre
cM	centimorgan uzaklık birimi
U	Ünite
pH	pH
mM	milimolar
M	Molar
ng	nanogram
OD	Optik Densite
F	İleri Primer “Forward”
R	Geri Primer “Reverse”
bp	base pair “baz çifti”

KISALTMA LİSTESİ

Yr	Yellow Rust “Sarı Pas”
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
DNA	Deoksiribonukleik Asit
dNTP	Deoksiribonükleotid trifosfat
EDTA	Etilendiamintetraasetikasit
FAO	Food and Agriculture Organization
GTP	Guanin trifosfat
RAPD	Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA
RGAP	Dayanıklılık Gen Analog Polimorfizmi
STS	Dizisi Etiketli Alanlar
SSR	Basit Dizi Tekrarları “Mikrosatellit”
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
AFLP	Çoğaltılmış Parça Uzunluğu Polimorfizmi
PAGE	Poliakrilamid Jel Elektroforezi

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1	2005 yılı dünya buğday üretim miktarları	3
Şekil 1.2	<i>Puccinia striiformis</i> 'e ait üreme dönemi	4
Şekil 1.3	<i>Puccinia striiformis</i> enfeksiyon aşamaları	5
Şekil 1.4	Bitki ıslahında yeni teknolojilerden yararlanılarak bitkisel gen kaynaklarının kullanımı	10
Şekil 1.5	Polimeraz Zincir Reaksiyonu	13
Şekil 1.6	Mikrosatellit PCR aşamaları	15
Şekil 1.7	SSR tekniğinin görünümü.....	15
Şekil 1.8	Yr5 geninin kromozom üzerinde çeşitli markırlara olan uzaklıkları.....	17
Şekil 1.9	Yr5 geni ile ilişkili RGAP markırlarının konumları	18
Şekil 3.1	PAGE sistemi.....	27
Şekil 4.1	Kullanılan DNA Uzunluk Belirleyici.....	31
Şekil 4.2	XWGP17 Belirteci ile elde edilen PCR ürünlerinin (a) %1,5'luk agaroz ve (b) %8'lik poliakrilamid jeldeki görünümleri	32
Şekil 4.3	XWGP19 Belirteci ile elde edilen PCR ürünlerinin (a) %1,5'luk agaroz ve (b) %8'lik poliakrilamid jeldeki görünümleri	33
Şekil 4.4	XWGP21 Belirteci ile elde edilen PCR ürünlerinin (a) %1,5'luk agaroz ve (b) %8'lik poliakrilamid jeldeki görünümleri	34
Şekil 4.5	XWGP22 Belirteci ile elde edilen PCR ürünlerinin (a) %1,5'luk agaroz ve (b) %8'lik poliakrilamid jeldeki görünümleri	35
Şekil 4.6	XWGP26 Belirteci ile elde edilen PCR ürünlerinin (a) %1,5'luk agaroz ve (b) %8'lik poliakrilamid jeldeki görünümleri	36
Şekil 4.7	XWGP27 Belirteci ile elde edilen PCR ürünlerinin (a) %1,5'luk agaroz ve (b) %8'lik poliakrilamid jeldeki görünümleri	37
Şekil 4.8	XWGP28 Belirteci ile elde edilen PCR ürünlerinin (a) %1,5'luk agaroz ve (b) %8'lik poliakrilamid jeldeki görünümleri	38
Şekil 4.9	XWGP29 Belirteci ile elde edilen PCR ürünlerinin (a) %1,5'luk agaroz ve (b) %8'lik poliakrilamid jeldeki görünümleri	39
Şekil 4.10	STS7/8 Belirteci ile elde edilen PCR ürünlerinin (a) %1,5'luk agaroz ve (b) %8'lik poliakrilamid jeldeki görünümleri	40
Şekil 4.11	STS9/10 Belirteci ile elde edilen PCR ürünlerinin (a) %1,5'luk agaroz ve (b) %8'lik poliakrilamid jeldeki görünümleri	40
Şekil 4.12	STS11/13 Belirteci ile elde edilen PCR ürünlerinin (a) %1,5'luk agaroz ve (b) %8'lik poliakrilamid jeldeki görünümleri	41
Şekil 4.13	STS5/8 Belirteci ile elde edilen PCR ürünlerinin (a) %1,5'luk agaroz ve (b) %8'lik poliakrilamid jeldeki görünümleri	41
Şekil 4.14	STS5/12 Belirteci ile elde edilen PCR ürünlerinin (a) %1,5'luk agaroz ve (b) %8'lik poliakrilamid jeldeki görünümleri	42
Şekil 4.15	STS5/13 Belirteci ile elde edilen PCR ürünlerinin (a) %1,5'luk agaroz ve (b) %8'lik poliakrilamid jeldeki görünümleri	42
Şekil 4.16	STS5/16 Belirteci ile elde edilen PCR ürünlerinin (a) %1,5'luk agaroz ve (b) %8'lik poliakrilamid jeldeki görünümleri	43
Şekil 4.17	STS7/12 Belirteci ile elde edilen PCR ürünlerinin (a) %1,5'luk agaroz ve (b) %8'lik poliakrilamid jeldeki görünümleri	43
Şekil 4.18	STS7/16 Belirteci ile elde edilen PCR ürünlerinin (a) %1,5'luk agaroz ve (b) %8'lik poliakrilamid jeldeki görünümleri	44
Şekil 4.19	STS9/13 Belirteci ile elde edilen PCR ürünlerinin (a) %1,5'luk agaroz ve (b) %8'lik poliakrilamid jeldeki görünümleri	44

Şekil 4.20	STS9/16 Belirteci ile elde edilen PCR ürünlerinin (a) %1,5'luk agaroz ve (b) %8'lik poliakrilamid jeldeki görünüşleri	45
Şekil 4.21	STS11/8 Belirteci ile elde edilen PCR ürünlerinin (a) %1,5'luk agaroz ve (b) %8'lik poliakrilamid jeldeki görünüşleri	45
Şekil 4.22	STS11/12 Belirteci ile elde edilen PCR ürünlerinin (a) %1,5'luk agaroz ve (b) %8'lik poliakrilamid jeldeki görünüşleri	46
Şekil 4.23	STS11/14 Belirteci ile elde edilen PCR ürünlerinin (a) %1,5'luk agaroz ve (b) %8'lik poliakrilamid jeldeki görünüşleri	46
Şekil 4.24	XGWM382 Belirteci ile elde edilen PCR ürünlerinin (a) %1,5'luk agaroz ve (b) %8'lik poliakrilamid jeldeki görünüşleri	47
Şekil 4.25	XWGP526 Belirteci ile elde edilen PCR ürünlerinin (a) %1,5'luk agaroz ve (b) %8'lik poliakrilamid jeldeki görünüşleri	47
Şekil 4.26	XWGP332 Belirteci ile elde edilen PCR ürünlerinin (a) %1,5'luk agaroz ve (b) %8'lik poliakrilamid jeldeki görünüşleri	48
Şekil 4.27	XWGP627 Belirteci ile elde edilen PCR ürünlerinin (a) %1,5'luk agaroz ve (b) %8'lik poliakrilamid jeldeki görünüşleri	48
Şekil 4.28	XWGP175 Belirteci ile elde edilen PCR ürünlerinin (a) %1,5'luk agaroz ve (b) %8'lik poliakrilamid jeldeki görünüşleri	49

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge 1.1 Çeşitli buğday türlerinin genomik ve karakter yapısına göre sınıflandırılması	2
Çizelge 1.2 Yr5 Genleri Çizelgesi.....	6
Çizelge 1.3 Puccinia Striiformis ile ilgili bugüne kadar rapor edilmiş moleküler belirteçler	7
Çizelge 1.4 Tahıllarda en çok kullanılan belirteç sistemlerinin karşılaştırılması.....	15
Çizelge 2.1 Çalışmada kullanılan ebeveyn ve kombinasyonlar.....	19
Çizelge 3.1 Genomik DNA izolasyonunda kullanılan çözeltiler.....	20
Çizelge 3.2 Genomik DNA'ların miktarları ve sulandırım oranları.....	20
Çizelge 3.3 Resistant gen analog polimorfizm belirteçleri ve bunlara ait primer dizileri.....	21
Çizelge 3.4 <i>Xwgp-17</i> ve <i>Xwgp-18</i> resistant gen analog polimorfizm belirteçlerine dayalı dizayn edilen dizisi etiketlenmiş alanlar (STS) belirteçleri.....	21
Çizelge 3.5 Basit dizi-tekrar belirteçleri (SSR veya Microsatellitler).....	22
Çizelge 3.6 Agaroz jel elektroforezinde kullanılan çözeltiler.....	24
Çizelge 3.7 Page jel elektroforezinde kullanılan solüsyonlar ve hazırlanışı.....	26
Çizelge 4.1 Çalışmada kullanılan belirteçlerin polimorfizm sonuçları.....	30

ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasında, Yr5 sarı pas dayanıklık geninin çeşitli ekmeklik buğday genotiplerinde moleküler belirteçler ile taranmasına yönelik çalışmalar yapılmıştır.

Yüksek lisans dönemim ve çalışmalarım süresince bana bilgi ve tecrübelerinden yararlanma imkanı sunan, ilgisini, özverisini ve yardımlarını benden eksik etmeyen her zaman sevgi ve saygıyla andığım hocam Prof. Dr. Mustafa Akdeste'ye, çalışmalarım sırasında bana her türlü yardımı sağlayan ve ilgisini hiç eksik etmeyen değerli hocam ve tez danışmanım Yrd. Doç Dr. Zeynep Akdeste'ye ; Tez çalışmamın yapılmasına Tubitak Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü Biyoteknoloji Laboratuvarında imkan sağlayan, bilgisinden yararlanma imkanı sunan sayın hocam Dr. Ahu Altinkut Uncuoğlu'na sonsuz teşekkür ederim.

Deneyisel çalışmalarımda yardımcı ve destek olan Dr. Funda Şentürk Akfırat'a, Dr. Fahriye Ertuğrul'a, Seval Ercan'a, Ayşen Yumurtacı'ya, Rahmi Büyükkeskin'e, Gonca Bulut'a çok teşekkür ederim.

Destegini ve sevgisini her zaman yanımda hissettiğim Burcu Cihangir'e ve tüm hayatım boyunca yanımda olan aileme yüksek lisans dönemim süresince gösterdikleri maddi ve manevi desteklerinden dolayı sonsuz teşekkür ederim.

Temmuz 2007

Uğur Sinan Alp

Bu alışma TÜBİTAK, MAM, Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü, Bitki Biyoteknolojisi Laboratuvar'ında yürütülmekte olan TARAL 1007 programı kapsamındaki 105G075 nolu “Kışlık Ekmeklik Buğday (*Triticum aestivum* L.)’da Sarı Pas Hastalığına Dayanıklılık için Moleküler Markörlerin Geliştirilmesi” isimli proje kapsamında gerçekleştirilmiştir.

ÖZET

Bu çalışmada, 7 farklı kışlık ekmeklik buğday çeşidi kullanılarak sarı pas hastalığına dayanıklılığı incelemek amacıyla 4 farklı dayanıklı x hassas melez kombinasyonları [Altay (dayanıklı) x Harmankaya99 (hassas); İzgi2001 (dayanıklı) x ES14 (hassas); Sönmez2001 (dayanıklı) x Aytın98 (hassas); PI178383 (dayanıklı) x Harmankaya99 (hassas)] yapılmış ve bu bireylerde Yr5 geni açısından polimorfizm gösteren moleküler belirteçlerin elde edilmesi amacıyla rezistant gen analog polimorfizmi (RGAP), dizisi etiketlenmiş alanlar (STS) ve mikrosatellit analizleri yapılmıştır. Bitkinin fide döneminde sarı pas hastalığına dayanıklılık sağlayan genlerden biri olan Yr5 geni buğday B genomu 2. kromozomunun uzun kolunda (2BL) bulunmaktadır. Kromozom 2BL yer alan ve bu gene belli uzaklıklarda bulunan değişik tipteki belirteçleri çoğaltan toplam 46 adet primer çifti (12 çift RGAP, 18 çift STS, 16 çift mikrosatelit) kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonları (PCR) yapılmıştır. Kombinasyonları oluşturan ebeveynler arasında polimorfizm gösteren moleküler belirteçler, sarı pas ırkları ile inokülasyondan sonra dayanıklı ve hassas olarak belirlenecek olan F₂ bireylerinde analiz edilecektir. Elde edilmesi hedeflenen Yr5 belirteçleri, fide dönemi dayanıklılık genlerine ve ergin dönem dayanıklılık genlerine bağlantı gösteren belirteçler ile beraber bitki ıslah çalışmalarında kararlı ve etkin bir biçimde kullanılarak dayanıklı buğday genotiplerinin seçimini sağlayacaktır.

Anahtar kelimeler: *Triticum aestivum* L., sarı pas, Yr5, PCR, DNA, RGAP, STS

ABSTRACT

In this study, seven different bread wheat genotypes were used for obtaining four resistant x susceptible hybrids [Altay (resistant) x Harmankaya99 (susceptible); İzgi2001 (resistant) x ES14 (susceptible); Sönmez2001 (resistant) x Aytın98 (susceptible); PI178383 (resistant) x Harmankaya99 (susceptible) regarding yellow rust resistance and polymerase chain reactions (PCR) were performed by using 12 RGAP, 18 STS and 16 microsatellites primers that amplified molecular markers containing polymorphisms in terms of Yr5 gene, one of the stripe rust resistance gene located on the centromeric region of chromosome 2BL and responsible for seedling-stage resistance. Polymorphic markers will be screened on the resistant and susceptible F₂ segregation analysis and mapping populations after the inoculation with the yellow rust races. Linkage of molecular markers to seedling-stage and adult plant stage resistant genes will be adapted to select durable wheat genotypes in plant breeding programs with marker assistant selection as a stable and effective method.

Keywords: *Triticum aestivum* L., yellow rust, Yr5, PCR, DNA, RGAP, STS

1. GİRİŞ

Buğday (*Triticum* spp.), buğdaygiller (*Poaceae*) familyasından bütün dünyada ıslahı yapılmış tek yıllık otsu bir bitkidir ve insan beslenmesindeki önemi nedeniyle günümüzde tarımı yapılan kültür bitkileri içerisinde ilk sırada yer almaktadır. Bütün dünyada yetişmekte olan buğday yeryüzeyinde diğer tahıl ürünlerinden daha fazla yer kaplamaktadır (Belderok vd.,2000). Ancak, tahıllardan daha fazla yer kaplamasına rağmen ortalama ürün bazında mısır ve pirincin hemen ardında yer almaktadır (Nevo, 2002). Buğday, değişik iklim ve toprak koşullarında yetiştirilebilmesi, bileşiminde karbonhidrat, nişasta, protein, bazı vitamin ve mineral maddeleri bulundurması, değerli ve ucuz bir besin kaynağı olması bakımından hızla artan dünya nüfusunun beslenmesinde vazgeçilmez bir ürün özelliği taşımaktadır. Yapılan kazılarda ortaya çıkarılan buğday tohumlarının incelenmesi sonucu buğdayın M.Ö 7000 yıllarında kültüre alındığı anlaşılmıştır. Buğday bitkisinin kökeninin Güneybatı Asya olduğu kabul edilmekle birlikte; Türkiye, Suriye, Irak ve Kafkasya’da yabani buğday türlerinin bulunduğu bu yüzden de bu bölgenin gen merkezi olarak kabul edilmesi gerektiği belirtilmektedir (Uncuoğlu, 2001). Nitekim buğday’ın ilk kez “Verimli Hilal” (İsrail, Filistin, Suriye’nin batı kısımları, Türkiye’nin güneydoğusu, kuzey Irak ve İran’ın batı kısmını kapsayan alan) olarak bilinen alanda kültüre alındığı yaygın şekilde kabul görmüştür. Bu bilgilere ek olarak son yıllarda yayınlanmış olan çok sayıdaki araştırma bulguları, buğday tarımının dünyada ilk kez Verimli Hilal içinde yer alan Karacadağ ve yöresinde başladığını vurgulamaktadır (Heun vd., 1977; Diamond, 1997; Nesbit ve Samuel, 1998; Lev-Yadun vd., 2000).

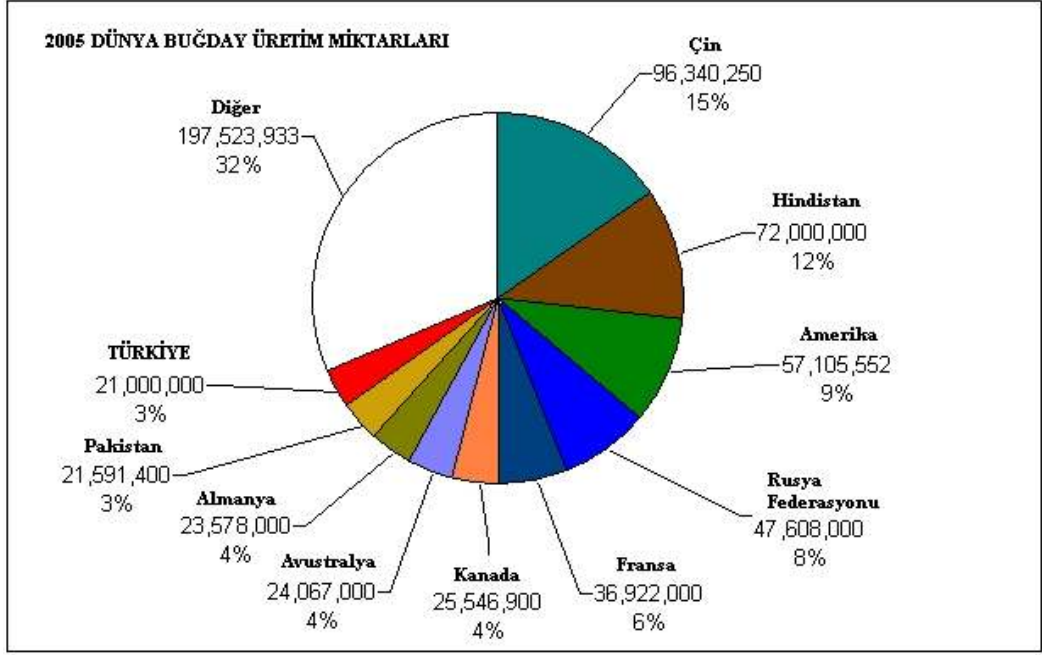
1.1. Buğday Genetiği:

Buğday genetiği diğer tarım ürünlerine nazaran karmaşık bir yapıya sahiptir. Bazı buğday türleri sabit ve kararlı bir poliploidi durumu göstermektedir (Hancock, James F., 2004). Buğday türleri ploidi seviyelerine göre 3 ana grupta toplanmaktadırlar; diploid ($2n=14$) *Triticum monococcum* AA, tetraploid ($2n=28$) *Triticum turgidum* ssp. *durum* AABB (makarnalık buğday, durum buğdayı) ve heksaploid ($2n=42$) *Triticum aestivum* ssp. *aestivum* AABBDD (ekmeklik buğday)’dır (Joppa, 1993). Çeşitli Buğday tiplerinin genomik ve karakter yapısına göre sınıflandırılması Çizelge 1.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 1.1 Çeşitli Buğday tiplerinin genomik ve karakter yapısına göre sınıflandırılması (Nesbitt, 2001).

Genomik Yapı	Genel Karakteri	Genel İsim	Latince İsim
AA	Kırılgan	Kızıl Buğday (Yabani)	<i>T. Urartu</i>
AA	Kırılgan	Kızıl Buğday (Yabani)	<i>T. boeoticum</i>
AA	Yarı-sert	Kızıl Buğday	<i>T. monococcum</i>
AABB	Sert	İran Buğdayı	<i>T. carthlicum</i>
AABB	Kırılgan	Düşük Kalite (Yabani)	<i>T. dicoccoides</i>
AABB	Kırılgan	Düşük Kalite	<i>T. dicoccum</i>
AABB	Sert	Makarnalık Buğday	<i>T. durum</i>
AABB	Yarı-sert	Polonya Buğdayı	<i>T. polonicum</i>
AABB	Sert	Horasan Buğdayı	<i>T. turanicum</i>
AABBDD	Sert	Ekmeklik Buğday	<i>T. aestivum</i>
AABBDD	Sert	Sık Buğday	<i>T. compactum</i>
AABBDD	Yarı-sert	Kılçıksız Buğday	<i>T. spelta</i>

Buğday ülkemizin iklim özelliklerine çok kolay uyum sağlamış bir tahıl türüdür. Hemen hemen her bölgemizde yetişen buğday, yazların ılık ve yağışlı geçtiği Karadeniz bölgesinde yerini mısıra, yazları kısa geçen Doğu Anadolu'nun yüksek yaylalarında yerini arpaya bırakır. Yaz ve kış buğdayı olarak ekilen buğdayın, kış buğdayı 270 günde, yaz buğdayı 135 günde olgunlaşır. Ülkemizde tahıla ayrılan 13 785 650 hektarlık alan ve bu alandan gerçekleştirilen 30 686 650 tonluk üretim içerisinde buğday 9 300 000 hektarlık ekim alanı ve 19 500 000 tonluk üretimi ile öncelikli ürün olma özelliğini korumaktadır (Anonim, 2002). Yıllık üretimin 20.400.000 ton olduğu ülkemiz, başlıca buğday üreticisi ülkeler arasındadır. Türkiye buğday ekim alanının 2006/2007 piyasa yılında 9,2 milyon hektar ve üretimin 20 milyon ton olacağı tahmin edilmektedir. Üretimdeki azalmaya, bir önceki üretim dönemine göre ekim alanındaki 50 bin hektarlık azalmadan ziyade Türkiye buğday üretiminde ağırlıklı yere sahip olan Trakya ve Orta ve Kuzey Anadolu üretim bölgelerindeki iklim şartlarına bağlı verimdeki düşüşlerin sebep olduğu tahmin edilmektedir (www.aeri.org.tr/YayinOzetleri). 2005 yılı dünya buğday üretim miktarları ve bu kapsamda Türkiye'nin %3'lük payı Şekil 1.1'de gösterilmiştir.



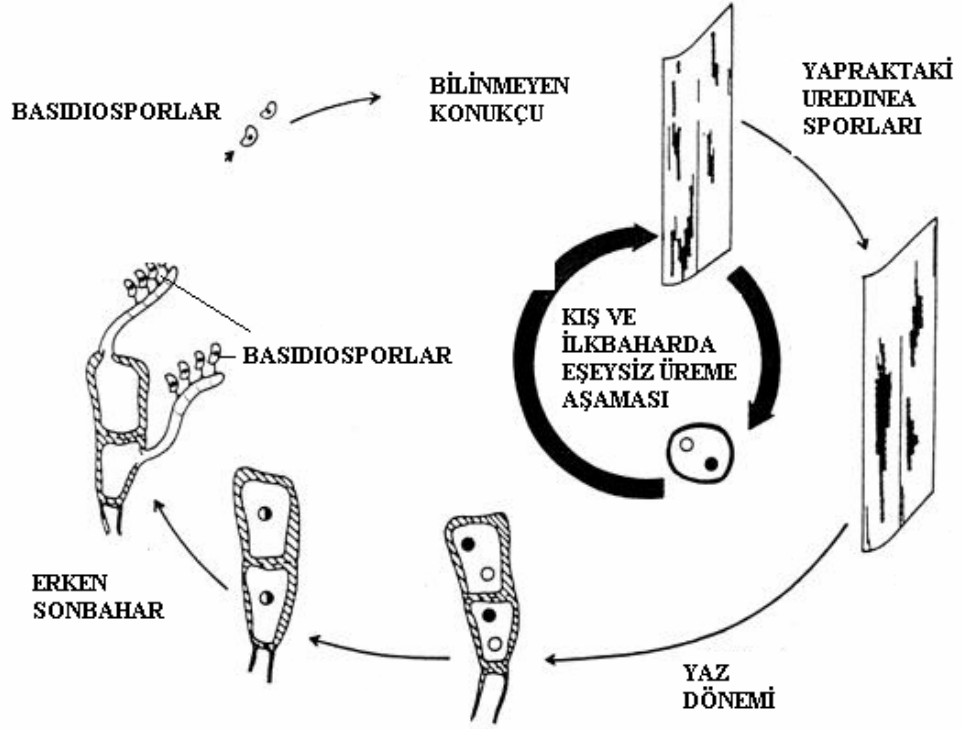
Şekil 1.1 2005 yılı dünya buğday üretim miktarları, (FAOSTAT, 2005)

Normal yıllarda ülkemiz, buğday üretiminde kendine yeterli ise de; özellikle hava koşullarının elverişsiz olduğu yıllarda üretimde düşüşler olurken, bazı yıllar hastalıklar (özellikle sarı pas), süne ve kımlı zararları buğdayın kalitesini büyük oranda düşürdüğünden, kaliteli ürün gereksinimi dışalım ile karşılanmaktadır (Kun E.,1996).

1.2. Buğday Hastalıklarında Biyotik Faktörlerin Etkisi:

Buğday hastalıklarının gelişiminde biyotik faktörlerin etkisi patojen, konukçu, bitki ve çevre üçgeninin birbiri ile olan etkileşimine bağlıdır. Hastalıklara değişik etmenler (canlı ya da cansız) neden olabilir ve hastalığın oluşumuna tek bir etmen veya birden fazla etmen birlikte etki edebilir. Hastalığa neden olan biyotik canlılar arasında funguslar (mantar etmenleri) en fazla hastalığa neden etmen ya da organizmalar olarak bilinir. Bunları bakteriler, virüsler ve diğer mikroorganizmalar takip eder. Buğday hastalıklarına neden olan mikroorganizmalar patojen olarak adlandırılır. Hastalık, bitkide bir ya da bir kaç seri fizyolojik metabolizma değişiklikleri sonucu ortaya çıkar ve sonuçta bitki morfolojik değişimlere ya da normal gelişiminden sapmalara neden olur. Buğdayda meydana gelen bu morfolojik değişimler ya da sapmalar “simptom” (hastalık belirtisi) olarak adlandırılır. Bazı durumlarda da patojenin varlığı bitkideki morfolojik değişikliklerden daha belirgindir ve patojenin bitki üzerinde gelişmesi hastalık işareti olarak da adlandırılabilir. Buna en güzel örnek, pas hastalıklarının bitki üzerindeki spor ve misel gelişmesinin görünümleridir (www.bitkisagligi.net). Buğdayda hastalık oluşturan organizmalar içerisinde en fazla ürün kaybına yol açan patojenler olup;

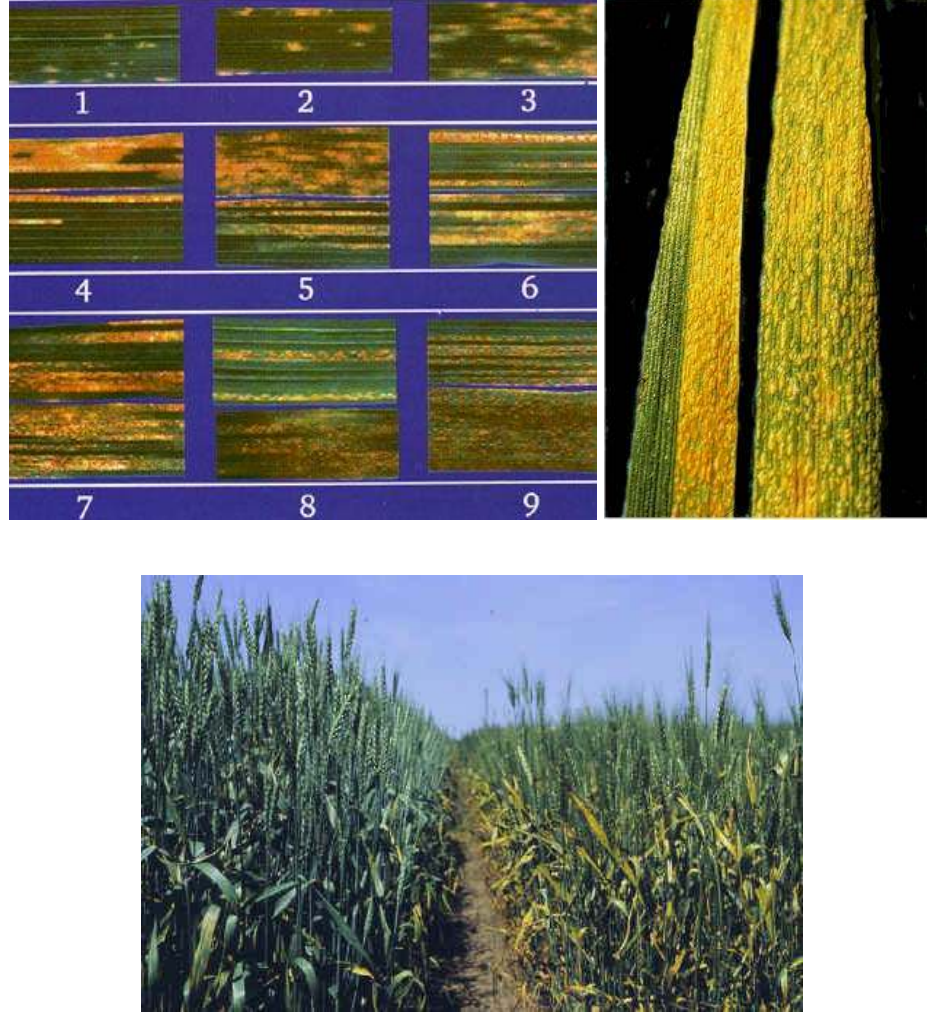
Puccinia (Pas), *Ustilago*, *Tilletia*, *Erysiphe*, *Septoria*, *Alternaria* ve *Fusarium* en yaygın olarak bulunan türlerdir (Stubbs vd., 1986). Pas hastalıkları, dünya genelinde buğday ekim alanlarında verimi azaltan en önemli biyotik etmenlerdendir (Düşünceli vd., 1999). Buğday pas mantarları, *Basidiomycetes* sınıfına, *Uredinales* takımına, *Pucciniaceae* ailesine ve *Puccinia* cinsine ait; konak aralığı oldukça dar olan biyotrof patojenlerdir (Curtis vd., 2002). *Puccinia striiformis*'e ait üreme dönemi Şekil 1.2'de özetlenmiştir.



Şekil 1.2 *Puccinia striiformis*'e ait üreme dönemi
(<http://www.cdl.umn.edu/gallery/images.html>)

Gövde pası veya kara pas hastalığının etmeni olan *Puccinia graminis*, yaprak pası veya kahverengi pas hastalığının etmeni olan *Puccinia recondita* ve çizgi pası da denilen sarı pas hastalığının etmeni olan *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* tüm dünyada buğday, arpa ve yulaf gibi tahıllarda ciddi ürün kaybına yol açan başlıca pas etmeni olan mantarlardır (Stubbs vd., 1986). İlk kez 1777 yılında gözlenmesine rağmen, 1896 yılında sarı pas hastalığına yol açan patojenin diğer pas mantarlarından farklı olduğu tanımlanmış ve *P. glumarum* olarak isimlendirilmiştir (Eriks ve E. Henn, 1896). 1953 yılında ise *P. striiformis* adı verilmiştir (Hylander vd., 1953). Yapraklarda ve başaklarda oluşan sarı renkli üredininin ip şeklindeki görüntüsünden dolayı “çizgi pası” da denir (Curtis vd., 2002). Birincil konakları arasında ekmeklik buğday, makarnalık buğday ve bazı arpa genotipleri bulunurken alternatif

konaklarına rastlanmamıştır. Sarı pas, buğday üretiminin yapıldığı alanlarda, % 10 ile % 70 arasında değişen oranlarda verim kaybına neden olur. Hassas genotiplerle yapılan tarla denemelerinde % 100'e varan kayıpların olduğu gözlenmiştir (Chen, 2005). (Şekil 1.3)



Şekil 1.3 *Puccinia striiformis* enfeksiyon aşamaları (www.wsu.edu:8080/~wheaties/rustpic.html) ve kayıp tarla görüntüsü (<http://pvo.planteinfo.dk>)

Sarı pas dayanıklılığı, fide dayanıklılığı ve ergin bitki dayanıklılığı olmak üzere ikiye ayrılır. Fide dayanıklılığı “seedling resistance” fide döneminde gözlenebilen ancak bitkinin tüm gelişim evresi boyunca aktif olan, ırka özgü dayanıklılıktır. Ergin bitki dayanıklılığı ise bitki gelişiminin ileri evrelerinde gözlenir. Ergin bitki dayanıklılığının bazı türleri ırka özgü iken, bazıları ırka özgü değildir. Sarı pas hastalığına dayanıklılığı sağlayan genlerin büyük çoğunluğu ırka özgüdür (Chen ve Line, 1995). *Puccinia striiformis* f.sp. *tritici*'nin neden olduğu sarı pas hastalığı buğday verimini doğrudan etkileyen önemli bir biyotik stres

etmenidir. Buğdayda sarı pasa dayanıklılığı sağladığı bilinen 40'ın üzerinde gen vardır (Macer, 1966) (Çizelge 1.2).

Çizelge 1.2 Yr5 genleri çizelgesi, (Boyd, 2005)

Dayanıklılık Geni	Kromozom Bölgesi	Kaynak Cins İsmi
Yr1	2AL	Chinese 166; Yr1/6*AvS
Yr2	7B	Kalyansona
Yr3	5B	Nord Desprez; Vilmorin 23
Yr4	3B	Hybrid 46
Yr5	2BL	Yr5/6*AvS
Yr6	7BS	Heines Kolben; Yr6/6*AvS
Yr7	2BL	Lee; Yr7/6*AvS
Yr8	2A/2M	<i>Aegilops comosum</i> ; Compair ; Yr8/6*AvS
Yr9	1B/1R	<i>Secale cereale</i> ; Clement; Yr9/6*AvS
Yr10	1BS	Moro; Yr10/6*AvS
Yr11 – APR	Bilinmiyor	Joss Cambier
Yr12 – APR	Bilinmiyor	Mega
Yr13 – APR	Bilinmiyor	Maris Huntsman
Yr14 – APR	Bilinmiyor	Hobbit
Yr15	1BS	<i>Triticum dicoccoides</i> ; Yr15/6*AvS
Yr16 – APR	2D	Cappelle-Desprez
Yr17	2AS-6M	VPM1/6*AvS
Yr18 – APR	7DS	Yr18/6*AvS
Yr19	5B	Compair (YrCom)
Yr20	6D	Fielder (YrFie)
Yr21	1B	Lemhi (YrLem)
Yr22	4D	Lee (YrLe1)
Yr23	6D	Lee (YrLe2)
Yr24	1BS	<i>Triticum turgidum</i> ; Yr24/6*AvS
Yr25	1D	Strubes Dickkopf; Heines Peko
Yr26	1BS	<i>Triticum turgidum</i>
Yr27	2BS	Ciano79; Selkirk
Yr28	4DS	<i>Aegilops tauschii</i>
Yr29 – APR	1BL	Pavon 76
Yr30 – APR	3BS	Parula; Pavon 76
Yr31	2BS	Pastor
Yr32	2AL	Carstens V
Yr33	7DL	Batavia
Yr34 – APR	5AL	WAWHT2046
Yr35	6BS	<i>Triticum dicoccoides</i>
Yr36 – APR	6BS	<i>Triticum turgidum</i> var. <i>dicoccoides</i> ; Glupro
Yr37	2DL	<i>Aegilops kotschy</i>

YrA\$	Bilinmiyor	Avocet R
YrCle	4B	Clement
YrDa1	1A	Daws
YrDa2	5D	Daws
YrD	6A	Druchamp
YrDru	5B/6B	Druchamp
YrDru2	6A	Druchamp
YrHVII	4A	HeinesVII
YrH46	6A	Hybrid 46
YrH52	1BS	<i>Triticum dicocoides</i>
YrMin	4A	Minister
YrMor	4B	Moro
YrND	4A	Nord Desprez
Yrns-B1	3BS	Lgst79-74
YrS	3B	Stephens
YrSte	2B	Stephens
YrSte2	3B	Stephens
YrTye	6D	Tyee
YrTr1	6D	Tres
YrTr2	3A	Tres
YrYam	4B	Yamhill
YrV23	2B	Vilmorin 23

Çizelge 1.3 *Puccinia striiformis* ile ilgili bugüne kadar rapor edilmiş moleküler belirteçler

Yr5 (2BL)	GWM501	Sun et al. 2002
	WGP17 and 18	Yan et al. 2003
Yr9 (1B/1R) W	GP4, 7, 8 and 9	Shi et al. 2001
Yr10 (1BS)	PSP3000	Wang et al. 2002
	S26M47-150	Smith et al. 2002
Yr15 (1BS)	GWM33	Chague' et al. 1999
	UBC199700	Chague' et al. 1999
Yr17 (2AS-6M)	SC-Y15	Robert et al. 1999
Yr18 (7DS)	GWM295	Suenaga et al. 2003
Yr26 (1BS)	GWM11	Ma et al. 2001
	GWM18	Ma et al. 2001
Yr28 (4DS)	BCD265	Singh et al. 2000
	MWG634	Singh et al. 2000
YrH52 (1BS)	GWM413	Peng et al. 2000
	GWM273a	Peng et al. 2000

1.3 Bitkisel Gen Kaynaklarının Kullanımı:

Tüm dünyanın sorunu haline gelen bitkisel gen kaynaklarının korunması, özellikle son 20 yıldan beri gündemde en çok kalan konulardan biri olmuştur. Bitkisel gen kaynaklarının, özellikle yabani türlerin korunması, gelecekte yapılacak olan bitki ıslahı çalışmaları için son derece önemlidir (Özgen vd., 1995). Biyoteknolojik karakterizasyon çalışmaları sayesinde aynı materyalin gen bankasına girişi engellenir, genotiplerin tam olarak “parmakizi” oluşturulur, gen bankasında ya da doğal koşullarda genetik çeşitlilik belirlenir ve büyük koleksiyonlarda çeşitliliğin önemli bir kısmını en az örnekle temsil edebilen çekirdek koleksiyonlar oluşturulur (Dodds ve Watanabe, 1990). Son yüzyılda klasik bitki ıslahı çalışmalarından yararlanılarak üstün verimli ve kaliteli birçok çeşit geliştirilerek insanlığın hizmetine sunulmasına karşın, başta hastalık ve zararlılar olmak üzere bazı biyotik ve abiyotik baskılara karşı dayanıklılıkta henüz istenilen sonuç alınamamıştır. Bu sorunların değişen ekolojik koşullar altında giderek büyümekte olduğu ve tür içi (intraspesifik) melezlemelerin varyasyon yaratmada yetersiz kaldığı görülmektedir. Uyumlu türlerin bulunması halinde klasik yöntemlerle yapılan melezlemeler sonucunda yeterli varyasyon oluşturulabilmektedir. Ancak, uygun anaçlarla sınırlı olan bu durum, değişen çevre koşulları ve tüketici istekleri karşısında yetersiz kalmakta, ıslah programlarında genetik tabanı artırmak için farklı cinslere ilişkin yeni gen kaynaklarına gereksinim duyulmaktadır. Bu gen kaynaklarının başında ise, kültür türlerinin yabani akrabaları gelmektedir (Özgen ve Akar, 1994). Islahçılar için çok önemli gen depolarını oluşturan ve dayanıklılık ıslahı çalışmaları için önemli genitörler durumunda olan yabani bitkisel gen kaynaklarının ise bu sorunu çözmede büyük potansiyele sahip olmalarına karşın, cinsler arasında ortaya çıkan kısırılık, melezleme zorluğu ve istenmeyen özelliklerin geçmesi gibi nedenlerle klasik melezleme teknikleriyle bu kaynaklardan yararlanılması son derece sınırlı olmaktadır. Son 10 yılda kullanım alanı giderek yaygınlaşan biyoteknoloji ve genetik mühendisliği teknikleriyle bu sorunların aşılması ve bitkisel gen kaynaklarının büyük bir kısmını kapsayan kültür bitkilerinin yabani akrabalarından daha fazla yararlanılması açısından önemli gelişmeler olmuştur.

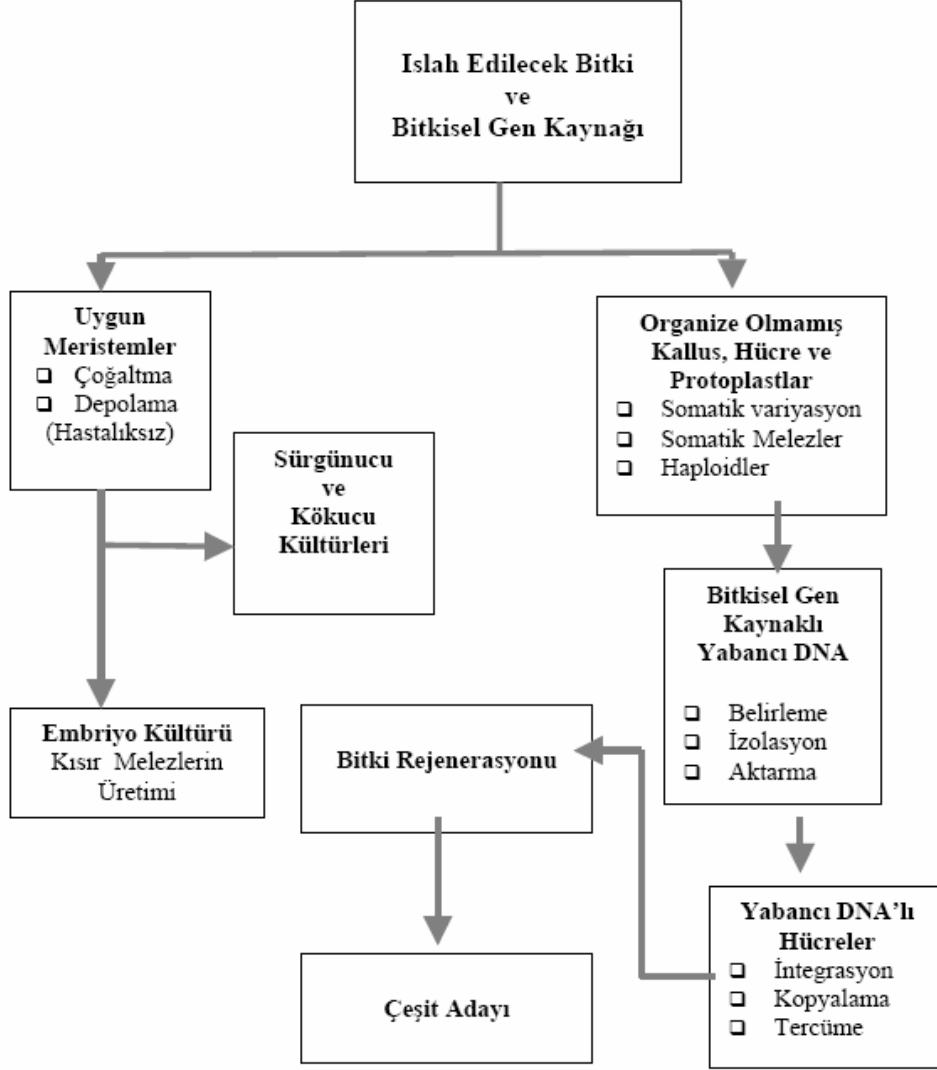
Islah çalışmalarında temel amaç, bitkilerin genetik yapılarında gerçekleştirilecek değişiklik ile ortaya çıkacak varyasyondan yararlanarak yapılacak seleksiyon yoluyla daha kaliteli, yüksek verimli, hastalık ve zararlılara dayanıklı ve adaptasyon yeteneği yüksek olan yeni çeşitlerin mümkün olduğunca kısa sürede elde edilmesidir (Bilgin ve Korkut, 2005). Bitki ıslahında melezlemeler yoluyla genetik işlemlerin ve seleksiyonun etkinliği arttırılmaya çalışılmaktadır. Bunlar çok uzun zaman alan, zahmetli ve yüksek maliyet isteyen işlemlerdir. Bitkilerin

genetik potansiyellerinin amaca uygun biçimde yönlendirilmesi açısından son yıllarda protein, izoenzim ve DNA belirteçleri gibi moleküler belirteçlerin gerek araştırma gerekse uygulamada kullanımı büyük önem kazanmakta ve bitki ıslahında bunlardan yararlanma olanakları araştırılmaktadır (Halward vd., 1992). Moleküler belirteçlerden genel olarak kalitatif ve kantitatif özelliklerin ıslahında, moleküler gen haritalama çalışmalarında, çeşit tanımlaması ve korunmasında, genotipler arası genetik uzaklığın belirlenmesinde yararlanılmaktadır. Bununla birlikte, Dünya’da ve ülkemizde yapılan ıslah çalışmalarıyla geliştirilen çeşitlerin üreticiye aktarılmasında ve üreticinin çeşit seçiminde zorluklar yaşanmaktadır. Çeşit tescil ve sertifikasyonunda, stabil yüksek verimli ve kaliteli çeşitlerin belirlenmesinde tarla denemeleri ve laboratuvar testleri yanında moleküler belirteçler özellikle DNA belirteçlerinin kullanılması ile bu sorunları aşmak olasıdır (Bilgin ve Korkut, 2005).

Bitkisel gen kaynaklarının kullanımında yeni teknolojiyen yararlanma olanakları aşağıdaki şekilde özetlenebilir:

- ◇ Bitki ıslah programlarının değişen çevre koşullarına (biyotik ve abiyotik) uygun olarak gelecekteki isteklerini karşılamak için moleküler belirteç tekniklerinden yararlanılarak genetik çeşitliliğin belirlenmesi,
- ◇ Melezlemeye gereksinim kalmadan vektör aracılığı ile ya da doğrudan gen aktarma teknikleriyle yabani türlerden gen aktarımı,
- ◇ Bitki ıslah programlarının kısaltılması,
- ◇ Yabancı gen taşıyan melezlerde hızlı ve güvenilir seleksiyon,
- ◇ Türlerin genotipik ve agronomik özelliklerinin belirlenmesi için genetik haritaların yapılması,
- ◇ Yabani kökenli DNA parçalarının yapılarının belirlenerek sadece istenilen kısımların kültür türlerine aktarılmasıyla bağlılığın “linkage” kırılması ve istenmeyen gen geçişlerinin önlenmesi,
- ◇ Antisens RNA tekniği ile özellikle bazı poliploid türler arasında doğal izolasyonun kaldırılmasıdır.

Bitki ıslahında yeni teknolojilerden yararlanılarak bitkisel gen kaynaklarının kullanımına ilişkin özet bilgi Şekil 1.4’de verilmiştir.



Şekil 1.4 Bitki ıslahında yeni teknolojilerden yararlanılarak bitkisel gen kaynaklarının kullanımı (Özgen ve Akar, 1994)

1.4. Islah Çalışmalarında Belirteç Yardımıyla Seleksiyon:

Seleksiyonda kullanılacak belirteç tipleri morfolojik, biyokimyasal ve moleküler olarak üç sınıfta toplanabilir. Morfolojik belirteçlerin genel yapısına bakılacak olursa bunlar az sayıdadır ve diğer lokuslardan etkilenebilmektedirler. Çoğunlukla dominant özelliktedirler, yani sadece dominant fenotipi (AA ve Aa) resesif fenotipten (aa) ayırabilirler. Bir avantaj olarak bu belirteç tipleri haritalama populasyonunda yapılacak bir gözlem ile kolayca belirlenirler. Örneğin; genetik haritalamada kullanılan bazı morfolojik belirteçler arasında, arpada gövde mumluluğu, kılçıgın kaba veya düz olması, "rachila" tüylülüğü gibi sayılabilir (Kleinhofs vd., 1993; Yıldırım ve Kandemir 2001).

Biyokimyasal belirteçler depo proteinleri ve enzim proteinleri olarak iki ana gruba ayrılırlar. Buğday tohumunda bulunan iki depo protein grubu olan gliadin ve glutenin, depo protein belirteçleri amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. Depo proteinlerinin en önemli avantajları analizlerinin çabuk, güvenilir ve tekrarlanabilir olmasıdır. En büyük dezavantajları ise sayıca çok az olmalarıdır. Enzim belirteçleri kendi içinde alloenzimler ve izoenzimler olarak iki ana grup altında incelenebilir. Enzim belirteçlerinin temel avantajları analizlerinin çabuk, ucuz ve güvenilir olmasıdır. Çevreden ve diğer lokuslardan etkilenmezler. En büyük dezavantajları sayılarının çok az olmasıdır. Ayrıca özel dokularda ve belli bir gelişme döneminde gözlenebilir olmaları da bir dezavantajdır.

1.5. Moleküler Belirteçler:

Nükleik asit temeline dayalı genetik belirteçlerin genom analizlerinde kullanımı ıslahçılar için ihtiyaç duyulan bir alandır. Bu belirteçler kullanılarak genetik varyasyon araştırılabilir. Örneğin birbirine çok yakın olan kültür çeşitleri ayrılabilir ve tanımlanabilir. Türlerin taksonomik tanımlaması yapıp, filogenetik akrabalıkları bulunabilir (Lowe vd., 1996). DNA melezleme belirteçleri (hibridizasyona dayalı) ve polimeraz zincir reaksiyonu kullanımına dayalı DNA çoğaltım belirteçleri olmak üzere iki grup altında incelenirler. Avantajları çok fazla sayıda olmaları, çevreden etkilenmemeleri, bitki gelişiminin herhangi bir evresinde gözlenebilmeleri, lokuslar arası interaksiyon oluşturmamaları olarak sayılabilir. Bugüne kadar bir çok çalışmada buğdaya ait spesifik genlere özel moleküler belirteçler belirlenmiş ve çalışılmıştır. Bu konuda yapılan araştırmalar belirteçler yardımıyla seleksiyon çalışmalarına hız kazandırmıştır (Devos vd., 1995; Schachermayr vd., 1997; Buerstmayer vd., 2002; Ellis vd., 2002). Moleküler belirteç çalışmaları aynı zamanda dayanıklı kültür gelişim çalışmalarında oldukça kullanışlı olup, gen piramitlerinin oluşturulmasında özellikle yararlanılmaktadır (Castro vd., 2003).

DNA profillerinin çıkarılması ve spesifik DNA parmakizlerinin elde edilmesi; bitkisel materyalin temini, bitkisel materyalden DNA izolasyonu, genetik materyalin çoğaltılması (Polimeraz Zincir Reaksiyonu), bireyler arasındaki polimorfizimin farklı moleküler belirteç teknikleri ile belirlenmesi (RAPD, RFLP, SSR, AFLP, SCAR, SSCP) ve DNA bant profillerinin spesifik bir programda analiz edilmesi şeklinde sıralanabilir.

Agronomik özelliklerin fenotipik seleksiyonu, ıslah çalışmalarında zaman alan bir yöntemdir. Morfolojik belirteçler yardımıyla seleksiyon gibi geleneksel yöntemlerde; belirteçlerin azlığı, pleiotropik ve epistatik etkilerin bulunması ve çevre koşullarının değişken

olması gibi sorunlarla karşı karşıya kalınmaktadır. Moleküler belirteçler yardımıyla seleksiyon ise, bu tür sorunlardan kaçınmak ya da çözmek için bir potansiyeldir. İki ebeveynin melezlemesinden oluşturulan bitki populasyonlarından yararlanılarak yürütülen çalışmalarda, istenilen genlerle ilişkili belirteçler tespit edilerek bunları ıslah çalışmalarında erken seleksiyon kriteri olarak kullanmak veya bu belirteçlerden hareketle ilgili genlerin klonlanmasını sağlamak amaçlanmaktadır (Melchinger, 1990). Moleküler belirteç teknolojilerinin bitki ıslahı ve gen kaynaklarının korunması konusunda çalışanlara pek çok türde yeni ufuklar açtığı bildirilmektedir (Bosković ve Tobutt, 1996). Bununla beraber bu teknolojilerin maliyetli olması tüm dünyada bazı türler için ortak projeler yapılarak istenilen hedeflere ulaşılmasını kolaylaştırmıştır (Beaver ve Lezzoni 1993).

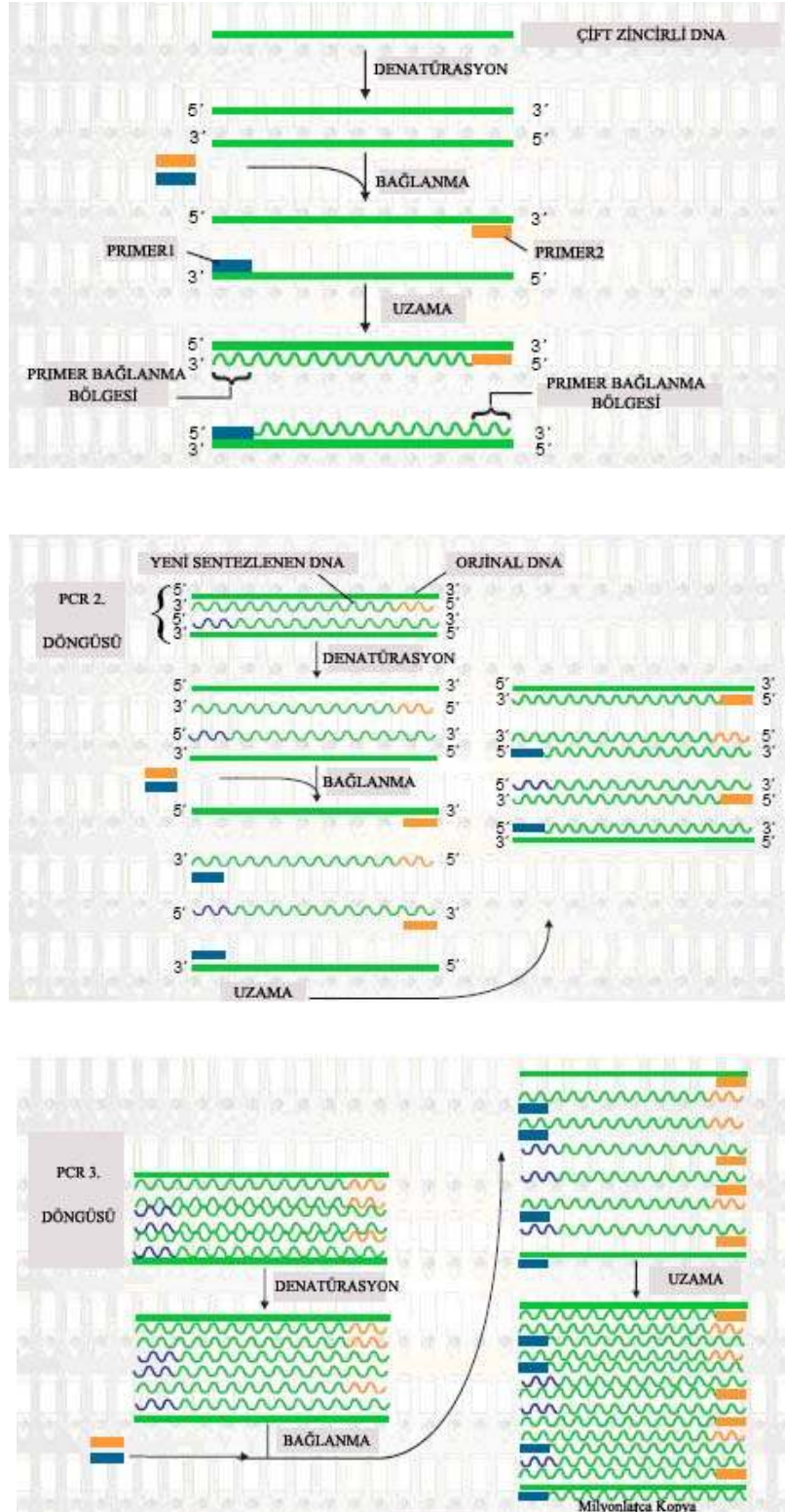
1.5.1. DNA Melezleme Belirteçleri (Hibridizasyona Dayalı):

Kesilmiş parçaların uzunluk polimorfizmi denilen ve çeşitli şekillerde kesici enzimler (restriksiyon enzimleri) ile kesilerek etiketlenmiş DNA parçalarının (prob) araştırılan DNA örneğindeki benzer veya aynı dizilişdeki DNA hibridizasyonuna dayalı bir sistemdir. RFLP “Restriction Fragment Length Polymorphism” kesilmiş parçaların uzunluk polimorfizmi) tekniği kesim enzimlerinin tanıdığı bölgedeki tek nükleik asit baz değişikliğini dahi tanır. Tanıma yerlerinin baz diziliş değişikliği farklı genotipler arasındaki polimorfizmin sebebi olabilir. Ancak bu polimorfizm daha yaygın olarak kesici enzimlerin tanıdığı iki kesim bölgesi arasında parça eklenmesi (insersiyon) veya çıkarılmasından (delesyon) kaynaklanmaktadır. RFLP belirteçleri kodominant belirteçlerdir. Herbir lokusta çok sayıda allel vardır. Sayıları morfolojik ve enzim belirteçlerinden çoktur (genellikle <100) (Bark ve Havey, 1995). Bu belirteçlere dayalı haritalarda yaygın olarak büyük boşluklar görülebilir (Walton 1993). Ancak buna rağmen sıkça kullanılmaktadır.

1.5.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Kullanımına Dayalı DNA Çoğaltım Belirteçleri:

PCR metodu adli tıptan ekolojiye ve DNA diagnostik çalışmalarından temel araştırmalara kadar her alanda uygulanma alanı bulmuştur. PCR tekniğinin hızlı bir şekilde kabul görmesinin sebebi onun basitliği, kolaylığı ve hızından dolayıdır (Kumar 1989). PCR'ın çalışma prensibi ardarda tekrarlanan üç basamaktan oluşur; çoğaltılacak DNA'nın yüksek sıcaklıklarda denatürasyonu ve bu işlem sonucunda tek sarmallı polinükleotid zincirinin oluşturulması, kullanılan primerlerin oluşturulan bu tek zincirli DNA molekülünde hedef

bölgelere bağlanması, DNA polimeraz enzimi kullanılarak primerlerin DNA zincirini tamamlayacak şekilde uzatılarak tekrar çift zincirli DNA oluşturulmasıdır (Şekil 1.5).



Şekil 1.5 Polimeraz Zincir Reaksiyonu, (Griffits vd. 1996)

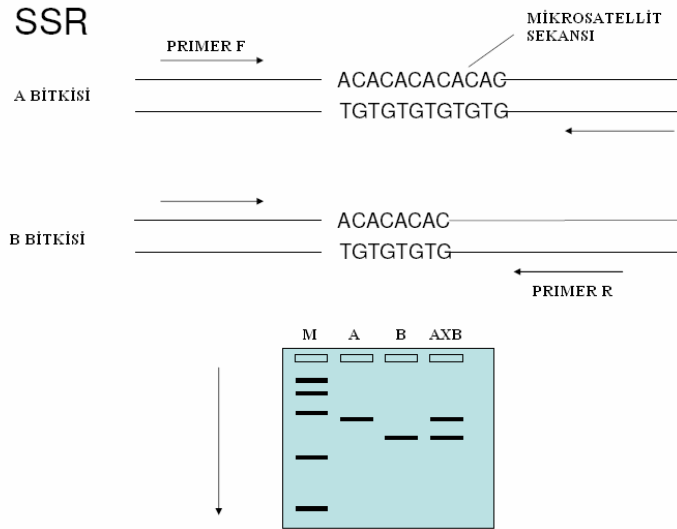
1.5.3. STS “Sequence Tagged Site” (Dizisi Etiketlenmiş Alanlar):

STS tekniği, RFLP güvenilirliğini ve PCR kolaylığını biraraya getiren bir tekniktir. Nükleotid dizilişi bilinen az kopyalı RFLP problemlerinden yeterli uzunlukta (16-24 nükleotid) başlatıcı DNA’lar geliştirilmektedir. Başlatıcı DNA’lar ile genomik DNA üzerinde çok spesifik şartlarda DNA üretimi yapılması ile RFLP probunun temsil ettiği lokus çoğaltılmaktadır. Farklı genotiplerden üretilen DNA’ların 4 nükleotid taşıyan bir seri kesim enzimi ile kesilmesi sonucu üretilen parçaların içindeki tek nükleotid değişikliği bile tanımlanabilmektedir. Avantajları; çoğunlukla kodominant özellikte belirteç üretmekte olmaları, kullanımı RFLP’ye göre çok daha kolay, ucuz ve hızlı olması, RAPD gibi az miktarda DNA’nın yeterliliği ve başlatıcı DNA’ların iyi seçilmesi şartı ile farklı haritalar arasında transferinin mümkünlüğüdür. Dezavantajları ise; ilgili RFLP probunun nükleik asit dizilişinin bilinmesini ve buna göre bir çift başlatıcı DNA geliştirilmesini gerektirmesi ve polimorfizm oranının orta düzeyde olmasıdır.

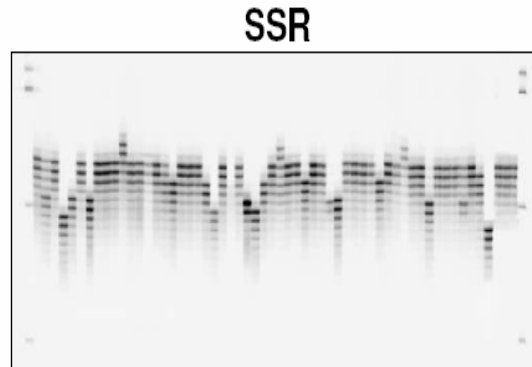
1.5.4. SSR “Simple Sequence Repeat” (Basit Dizi Tekrarları, Mikrosatellitler):

Ökaryotik genomlarda bulunan ardışık tekrarlanan 2-6 nükleotitli gruplara mikrosatellit denir. $(AT)_n$, $(GT)_n$, $(ATT)_n$ ve $(GACA)_n$ gibi. Burada “n” ardışık tekrar sayısıdır. SSR primerlerinin üretiminde genel olarak 3 farklı yaklaşım tercih edilmektedir. Bunlar; 1.Genomik DNA kütüphanelerinin SSR oligonükleotitlerinin hibridizasyonu yolu ile gözlemlenmesi, 2. DNA veri bankalarında SSR’ların araştırılması, 3.Akraba bitki türlerinde geliştirilmiş olan SSR’da spesifik primerlerin kullanımıdır. SSR ilk olarak insanlarda tanımlanmış (Litt ve Luty 1989, Weber ve May 1989) ve aynı bulgular hızlı bir şekilde memelilerden farelerde yapılan çalışmalarda gözlenmiş (Love vd., 1990) daha sonrada domuzlarda (Johansson vd., 1992) ve sığırlarda (Kemp vd., 1993) yapılan çalışmalarla devam etmiştir. Bu potansiyel ile bitkilerde birçok tür için oldukça önemli olan bu belirteçlerin başarılı olarak izole edilmesi ve uygulanması başlamıştır. Bitkilerde ilk çalışmalar tarla bitkileri ile olmuş; soya (Akkaya vd., 1992, Morgante ve Olivieri 1993), pirinç (Wu ve Tanksley 1993, Zhao ve Kochert 1993), arpa (Saghai Maroof vd., 1994) ve buğday (Roder vd., 1995) gibi bitkiler ile SSR’ların karakterizasyonu bahçe bitkileri türlerinde üzüm (Thomas ve Scott 1993) ile meşe (Dow vd., 1995), okalüptüs (Byrne vd., 1996), *Swietenia humilis* (White ve Powell 1997) gibi orman ağaçlarında gerçekleştirilmiştir. SSR belirteçlerinin lokus spesifik, kodominant, tekrarlanabilir özellikte ve oldukça polimorfik olmaları en önemli avantajlarıdır. Dezavantajları ise; yeni

belirteç geliştirilmesi için genomik DNA klonlarının tekrarlanan oligonükleotid içeren problemlarla hibridizasyon yolu ile bulunması ve nükleotid dizilerinin belirlenmesidir (Şekil 1.7). RAPD ve SSR tekniklerinin görünümünün karşılaştırılması Şekil 1.8’de, tahıllarda en çok kullanılan belirteç sistemlerinin karşılaştırılması ise Çizelge 1.4’de verilmiştir.



Şekil 1.6 Mikrosatellit PCR aşamaları (Jones vd., 1997 olarak yaz)



Şekil 1.7 SSR tekniğinin görünümü (Kumar LS, 1999)

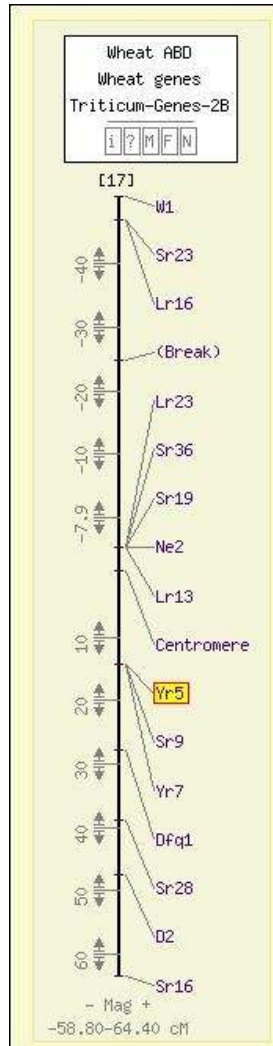
Çizelge 1.4 Tahıllarda en çok kullanılan belirteç sistemlerinin karşılaştırılması (Korzun, 2003)

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

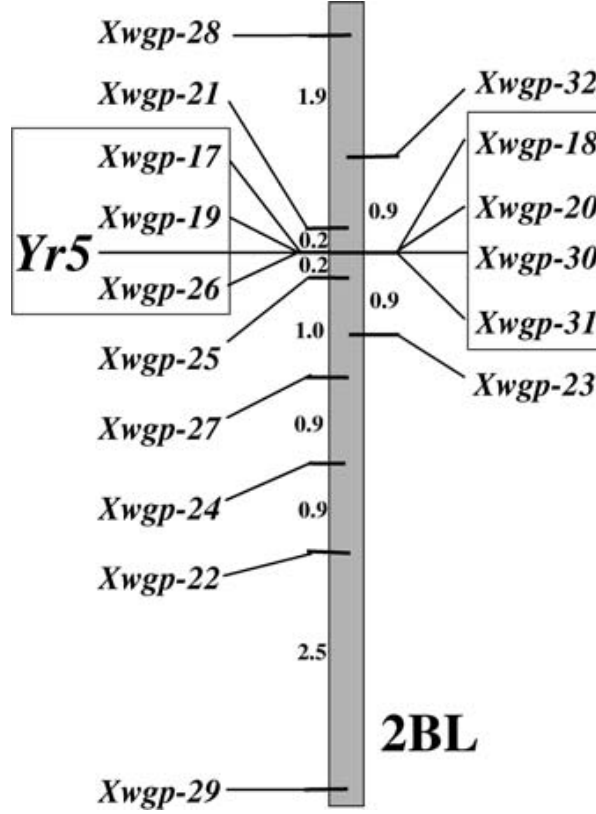
1.6. Yr5 Geni:

Bitkinin fide döneminde sarı pas hastalığına dayanıklılık sağlayan genlerden biri olan Yr5 geni buğday B genomu 2. kromozomunun uzun kolunda (2BL) bulunmaktadır ve ilk olarak Macer tarafından *Triticum spelta album* türünde tanımlanmıştır (Macer,1966). Yr5 geni geniş çaplı bir şekilde özellikle Çin, Hindistan, Avustralya ve Ortadoğu’da ıslah çalışmalarında kullanılmaktadır (Beaver ve Powelson, 1969; Stubbs 1985; Johnson 1988) Sitolojik olarak Yr5 geni, buğdayın 2B kromozomunun uzun kolunda (2BL) lokalize olmuştur ve sentromere 21 cM uzaklıkta olduğu bilinmektedir.(Law CN,1975) daha sonra yapılan çalışmalarda Yr5 geninin sentromere olan uzaklığı 15 cM olarak ifade edilmiştir (http://rye.pw.usda.gov/cgi-bin/cmap/feature?feature_aid=4634). Konuyla ilgili yapılan DNA bazlı moleküler belirteç çalışmaları, ıslah çalışmalarında belirteç yardımıyla seleksiyon ve gen piramidi oluşturmada hız sağlamaktadır. Yapılan çalışmalarda tamamen Yr5 geni ile ilişkili olarak (RGAP) belirteçleri tespit etmişlerdir (Yan vd., 2003). Bu belirteçlerin polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltımı sonucu Yr5 genine ait bir çok polimorfik bant elde edilebilmektedir (Yu vd., 1996). Ancak özellikle ıslah çalışmalarında bu tip belirteçlerden polimorfik bant ayırımı zordur ve bazı durumlarda birçok varyeteye doğru gidildiğinde polimorfik bantlar görülmeyebilir (<http://maswheat.ucdavis.edu/protocols/Yr5/index.htm>).

Yr5 sarı pas dayanıklılık geni için daha gelişmiş belirteçler elde edebilmek için iki RGAP belirteci olan xwgp17 ve xwgp19 temeline dayalı STS (dizini etiketlenmiş alanlar) primerleri dizayn edilmiştir (Chen vd., 2003). Yr5 geni için bir çok sayıda RGAP belirteci tanımlanmıştır ve bu belirteçler yüksek çözünürlüklü haritada lokusları belirtilmiştir (Yan vd., 2003) (Şekil 1.9). Yr5 geninin aydınlatılması için, RGAP belirteçlerinin tekrar ve direkt olarak kullanılabilir olmasına karşın, primerlerin birden fazla DNA fragmentlerini çoğaltabilmesi sebebiyle çok dikkatli bir şekilde skorlarının tespit edilmesi gerekmektedir. Bununla birlikte daha sağlam ve kolay olarak Yr5 genini tespit edebilecek belirteçlere ihtiyaç vardır. Yr5 geninin kromozom üzerinde çeşitli belirteçlere olan uzaklıkları Şekil 1.9’da verilmiştir.



Şekil 1.8 Yr5 geninin kromozom üzerinde çeşitli belirteçlere olan uzaklıkları
(<http://wheat.pw.usda.gov>)



Şekil 1.9 Yr5 geni ile ilişkili RGAP belirteçlerinin konumları (Yan vd., 2003)

2. MATERYALLER

2.1. Bitki Materyali

Bu çalışmada, Yr5 sarı pas (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*) dayanıklılık geninin araştırılması için 8 adet kışlık ekmeklik buğday (*Triticum aestivum* L.) çeşidi kullanıldı. Yerel bir çeşit olan PI178383 ve Anadolu Tarımsal Araştırma Enstitüsü tarafından geliştirilen Altay2000, Aytın98, ES14, İzgi01, Harmankaya99, Sönmez2001 çeşidi ile 1 adet yakın izogenik hat bitkisi Yr5/6*AVS (NIL2) materyal olarak seçildi. Yr5 sarı pas (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*) dayanıklılık geni ile ilişkili olarak polimorfizm gösteren moleküler belirteçler bulmak amacıyla ile belirtilen çeşitler arasındaki çaprazlamalar dikkate alındı (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1 Çalışmada kullanılan ebeveyn ve kombinasyonlar

Ebeveynler	Dayanıklı (PI178383, Altay2000, İzgi01, Sönmez2001) Hassas (Aytın98, ES14, Harmankaya99)			
Kombinasyonlar	Altay2000 x Harmankaya99	İzgi01 x ES14	Sönmez2001 x Aytın98	PI178383 x Harmankaya99

2.2 Kullanılan Cihaz ve Malzemeler:

Laboratuvar Karıştırıcısı: Vortex Genie 2 Scientific Ind.

Karıştırıcı Isıtıcı Blok: BIOER Mixing Blok MB102

PCR Cihazı: Gene Amp PCR SYSTEM 9700 AB.

Santrifüj Cihazları : Backman Coulter Microfuge 22R ve Allegra® X-22

Agaroz Jel Elektroforez Sistemi: Bio-Rad Widemini S.B Cell

Page Elektroforez Sistemi: Bio-Rad Sequi-Gen GT Sequencing Cell

Agaroz Jel UV Görüntüleme Sistemi: Vilber Lourmat

Otomatik Pipet : Eppendorf 10µl-20µl-100µl-200µl-1000µl-5000µl

3. DENEYSEL ÇALIŞMA

3.1 Genomik DNA İzolasyonu:

Song ve Henry (1995) tarafından değiştirilen, Weining ve Langridge (1991) miniprep DNA izolasyon yöntemi ile genomik DNA izolasyonu gerçekleştirildi. 8 ayrı genotipe ait yaprak örnekleri sıvı azotta (-196°C) dondurularak, -80°C’de saklamaya alındı. DNA izolasyonu için her bir yaprak örneğinden 0.18 g tartılarak, steril, soğuk havanda sıvı azot içerisinde toz haline getirildi. Buzda tutularak soğutulmuş 2 ml’lik steril tüplere alınan homojenatın üzerine 600 µl Ezme Tamponu (Çizelge 3.1) eklenerek parçalamaya devam edildi. Üzerine 600 µl soğuk fenol eklenen tüpler, birkaç kere tersyüz edilerek buzda 20 dakika bekletildi. 13000 devir/dakika’da 1 dakika santrifüj edildikten sonra tüpte oluşan üst sıvı dikkatlice çekilmeden ayrıldı. Üst faz yeni bir tüpe aktarılarak üzerine 600 µl kloroform eklenip iyice karıştırıldı. 13000 devir/dakika’da 1 dakika süren santrifüj işleminden sonra oluşan üst sıvı yeni bir tüpe aktarıldı. Üzerine 3 M 50 µl soğuk sodyum asetat (Çizelge 3.1) ve 1 ml soğuk saf etanol (EtOH) eklenen üst sıvı bir kaç kere yavaşça karıştırıldıktan sonra -70°C’de 30 dakika bekletildi. 13000 devir/dakika’da 1 dakika süren santrifüj işleminden sonra oluşan üst sıvı atılarak dipte kalan çökelti 1 ml %75’lik soğuk saf etanol ile 2 defa yıkandı. Yıkama işleminden sonra üst sıvısı atılan tüpler temiz bir filtre kağıdının üzerine ters çevrilerek kurumaya bırakıldı. Kuruyan çökelti 50 µl steril soğuk suda çözündürüldü. 2 µl 2U RNaz (RNase ONE Ribonuclease M4261 Promega) eklenen tüpler, 37°C’de 1 saat inkübe edildi. İzole edilen DNA’nın miktarının belirlenmesi ve PCR’da kullanılacak sulandırım

oranlarının hesaplanması için spektrofotometrede (Biorad Smartspec 3000) ölçüm yapıldı (Çizelge 3.2)

Çizelge 3.1 Genomik DNA izolasyonunda kullanılan çözeltiler

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

Çizelge 3.2 Genomik DNA'ların miktarları ve sulandırım oranları

Genotip	OD260	*DNA Miktarı (ng/ml)	Sulandırım Oranı (ng/ml/50)
PI178383	0,155	1555	31,1
ALTAY2000	0,091	910	18,2
İZGİ01	0,197	1970	39,4
SÖNMEZ2001	0,011	110	2,2
AYTIN98	0,252	2520	50,4
ES14	0,192	1920	38,4
HARMANKAYA99	0,029	290	5,8
NIL2	0,203	2030	40,6

*DNA miktarı (ng/μl) = OD₂₆₀ x 50 x sulandırım oranı (200)

3.2. Dayanıklı ve Hassas Kışlık Ekmeklik Buğday Çeşitlerinde Yr5 Geni İle İlişkili Moleküler Belirteçlerin Araştırılması

Yr5 sarı pas (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*) dayanıklılık geni ile genetik olarak bağlantı gösteren moleküler belirteçlerin araştırılması amacıyla kışlık ekmeklik buğday çeşitleri Yan vd., (2003) tarafından geliştirilen genetik haritada bulunan 12 adet Resistant Gen Analog Polimorfizm Belirteçleri (RGAP) (Çizelge 3.3), *Xwgp-17* ve *Xwgp-19* resistant gen analog polimorfizm belirteçleri temel alınarak dizayn edilen 18 adet dizisi etiketlenmiş alanlar (STS) (Çizelge 3.4) belirteçleri ile kromozom 2BL'de yer alan 16 adet basit dizi tekrar (SSR, Mikrosatellitler) belirteçleri (Röder vd., 1998) (Çizelge 3.5) ile taranmıştır.

Çizelge 3.3 Resistant gen analog polimorfizm belirteçleri ve bunlara ait primer dizileri

RGAP BELİRTEÇLERİ	PRİMER ÇİFTİ (5'-3')	PRİMER DİZİSİ
Xwgp-17	S2/AS3	5'GGIGGIGTIGGIAAIAACIAC3' 5'IAGIGCIAIGGGIAGICC3'
Xwgp-19	RLRR Rev/LM638	5'ACACTGGTCCATGAGGTT3' 5'GGIGGIGTIGGIAAIAACIAC3'
Xwgp-21	Pto kin1IN/Pto kin2IN	5'AAGTGGAACAAGGTTACG3' 5'GATGCACCACCAGGGGG3'
Xwgp-22	Cre3LR-R/Pto kin2	5'CAGGAGCCAAAAATACGTAAG3' 5'AGGGGGACCACCACGTAG3'
Xwgp-24	Xa1LR-F/Pto kin4	5'CTCACTCTCCTGAGAAAATTAC3' 5'AGTGTCTTGTAGGGTATC3'
Xwgp-25	XLRR Rev/Pto kin1	5'CCCATAGACCGGACTGTT3' 5'GCATTGGAACAAGGTGAA3'
Xwgp-26	Pto kin2/AS3-INV	5'AGGGGGACCACCACGTAG3' 5'CCIGAIGGIGAICGIG3'
Xwgp-27	CLRR-INV2/Pto kin1	5'TCTTCAGCTATCTGC3' 5'GCATTGGAACAAGGTGAA3'
Xwgp-28	RLRR Rev/Pto kin4	5'ACACTGGTCCATGAGGTT3' 5'AGTGTCTTGTAGGGTATC3'
Xwgp-29	RLK-Rev/Xa1NBS-F	5'TCYGGYGCRATRTANCCNGGITGICC3' 5'GGCAATGGAGGGATAGG3'
Xwgp-31	Pto kin2/RLK-For	5'AGGGGGACCACCACGTAG3' 5'GAYGTNAARCCIGARAA3'
Xwgp-32	Pto kin2/NLRR-INV1	5'AGGGGGACCACCACGTAG3' 5'TTGTCAAGCCAGATACCC3'

Çizelge 3.4 *Xwgp-17* ve *Xwgp-18* resistant gen analog polimorfizm belirteçlerine dayalı dizayn edilen dizisi etiketlenmiş alanlar (STS) belirteçleri

STS BELİRTEÇLERİ	PRİMER ÇİFTİ (5'-3')	PRİMER DİZİSİ
YR5STS	5/6	5'GGAAGACGACACTCGCTAGAAAAG3' 5'GGAGGCCAGCACACTTCCTTGC3'
YR5STS	7/8	5'GTACAATTCACCTAGAGT3' 5'GCAAGTTTTCTCCCTATT3'
YR5STS	9/10	5'AAAGAATACTTTAATGAA3' 5'CAAACCTATCAGGATTAC3'
YR5STS	11/13	5'GTGTACAATTCACCTAGAGTTAAAG3' 5'CATCACAAACATAAGTTGGCAT3'
YR5STS	5/8	5'GGAAGACGACACTCGCTAGAAAAG3' 5'GCAAGTTTTCTCCCTATT3'
YR5STS	5/12	5'GGAAGACGACACTCGCTAGAAAAG3' 5'CATCACAAACATAAGTCGGCAT3'
YR5STS	5/13	5'GGAAGACGACACTCGCTAGAAAAG3' 5'CATCACAAACATAAGTTGGCAT3'
YR5STS	5/16	5'GGAAGACGACACTCGCTAGAAAAG3' 5'GAGCTTTAGATCACAAACATAAGT3'
YR5STS	7/12	5'GTACAATTCACCTAGAGT3' 5'CATCACAAACATAAGTCGGCAT3'
YR5STS	7/13	5'GTACAATTCACCTAGAGT3' 5'CATCACAAACATAAGTTGGCAT3'
YR5STS	7/16	5'GTACAATTCACCTAGAGT3' 5'GAGCTTTAGATCACAAACATAAGT3'

YR5STS	9/12	5'AAAGAATACTTTAATGAA3' 5'CATCACAAACATAAGTCGGCAT3'
YR5STS	9/13	5'AAAGAATACTTTAATGAA3' 5'CATCACAAACATAAGTTGGCAT3'
YR5STS	9/16	5'AAAGAATACTTTAATGAA3' 5'GAGCTTTAGATCACAAACATAAGT3'
YR5STS	11/8	5'GTGTACAATTCACCTAGAGTTAAAG3' 5'GCAAGTTTTCTCCCTATT3'
YR5STS	11/12	5'GTGTACAATTCACCTAGAGTTAAAG3' 5'CATCACAAACATAAGTCGGCAT3'
YR5STS	11/14	5'GTGTACAATTCACCTAGAGTTAAAG3' 5'ATCACAAACATAAGT3'

Çizelge 3.5 Basit dizi-tekrar belirteçleri (SSR veya Microsatellitler)

MİKROSATELLİT BELİRTEÇLERİ	PRİMER ÇİFTİ	PRİMER DİZİSİ
Xgwm16	16F 16R	5' GCTTGGACTAGCTAGAGTATCATAC 3' 5' CAATCTTCAATTCTGTGCGACGG 3'
Xgwm47	47F 47R	5' TTGCTACCATGCATGACCAT 3' 5' TTCACCTCGATTGAGGTCCT 3'
Xgwm191	191F 191R	5' AGACTGTTGTTTGCGGGC 3' 5' TAGCACGACAGTTGTATGCATG 3'
Xgwm382	382F 382R	5' GTCAGATAACGCCGTCCAAT 3' 5' CTACGTGCACCACCATTTTG 3'
Xgwm388	388F 388R	5' CTACAATTCGAAGGAGAGGGG 3' 5' CACCGCGTCAACTACTTAAGC 3'
Xgwm501	501F 501R	5' GGCTATCTCTGGCGCTAAAA 3' 5' TCCACAAACAAGTAGCGCC 3'
Xgwm526	526F 526R	5' CAATAGTTCTGTGAGAGCTGCG 3' 5' CCAACCCAAATACACATTCTCA 3'
Xgwm120	120F 120R	5' GATCCACCTTCCTCTCTCTC 3' 5' GATTATACTGGTGCCGAAAC 3'
Xwmc51	51F 51R	5'TTATCTTGGTGTCTCATGTGAG3' 5'TCGCAAGATCATCAGAACAGTA3'
Xwmc175	175F 175R	5'GCTCAGTCAAACCGCTACTTCT3' 5'CACTACTCCAATCTATCGCCGT 3'
Xwmc332	332F 332R	5' CATTTACAAAGCGCATGAAGCC3' 5' GAAAACTTTGGAACAAGAGCA 3'
Xwmc441	441F 441R	5' TCCAGTAGAGCACCTTTCATT 3' 5' ATCACGAAGATAAACAACGG3'
Xwmc498	498F 498R	5' CGATGAAGAGAGCCATCAAAA 3' 5' TGACATTCCGGTAGGTCAGTT3'
Xwmc500	500F 500R	5' ATAGCATGTTGGAACAGAGCAC 3' 5' CTTAGATGCAACTCTATGCGGT 3'
Xwmc627	627F 627R	5' GATCCGAGAAGGGCAATGGTAG 3' 5' AGCAACAGCAGCGTACCATAAA 3'
Xwmc149	149F 149R	5' ACAGACTTGTTGGTGCCGAGC3' 5' ATGGGCGGGGGTGTAGAGTTTG3'

Yr5 sarı pas (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*) dayanıklılık geni ile ilişkili olarak kombinasyonları oluşturan ebeveyn çeşitler arasında polimorfizm gösteren moleküler belirteçler bulmak amacıyla ile PCR'a dayalı moleküler belirteç analizlerine başlandı. PCR uygulamasında 0,5 ml'lik tüpler kullanıldı ve çoğaltım "Eppendorf Mastercycler Gradient" cihazında 25 µl hacimde gerçekleştirildi. Uygulamada 12 adet genotip için her bir tüpte son konsantrasyon 1X Taq Buffer (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl pH 9.0, 1% Triton X-100) 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, 2 µM ileri primer, 2 µM geri primer ve 1U Taq polimeraz (Katalog No: M186A Promega) olacak şekilde karışım hazırlandı.

3.3 Dayanıklı ve Hassas Kışlık Ekmeklik Buğday Çeşitlerinde Yr5 Geni İle İlişkili RGAP ve STS Belirteçlerinin Araştırılması

Yr5 sarı pas (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*) dayanıklılık geninin 12 adet resistant gen analog polimorfizm belirteçleri (RGAP) ve 18 adet dizisi etiketlenmiş alanlar (STS) belirteçlerinin PCR ile taranmasında tüpler; başlangıç denatürasyonu için 94°C'de 3 dakika bekletildi. Genomik DNA'nın denatürasyonunun sağlanması için 94°C'de 1 dakika, primerin DNA'ya bağlanabilmesi için 55°C'de 45 saniye, enzim reaksiyonu için 72°C'de 2 dakika bekletilip 45 döngü tamamlandıktan sonra, 72°C'de 7 dakika tutularak PCR tamamlandı.

3.4 Dayanıklı ve Hassas Kışlık Ekmeklik Buğday Çeşitlerinin Kromozom 2BL'de Yer Alan Mikrosatellit Belirteçler İle Araştırılması

Yr5 sarı pas (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*) dayanıklılık geninin basit dizisi tekrarlı primerler ile taranmasında primer çiftlerine özgü Tm sıcaklık dereceleri dikkate alınarak tüpler; başlangıç denatürasyonu için 94°C'de 3 dakika bekletildi. Genomik DNA'nın denatürasyonunun sağlanması için 94°C'de 1 dakika, primerin DNA'ya bağlanabilmesi için primer çiftine göre 50°C' veya 60°C'de 45 saniye, enzim reaksiyonu için 72°C'de 2 dakika bekletilip 45 döngü tamamlandıktan sonra ise 72°C'de 7 dakika tutularak PCR tamamlandı.

3.5 PCR Ürünlerinin İncelenmesi

3.5.1. PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezinde İncelenmesi

Yr5 Sarı pas (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*) dayanıklılık geninin PCR ile çoğaltımından elde edilen örnekler agaroz jel elektroforezinde incelendi. PCR ürünlerinin analizi için %2'lik agaroz jel kullanıldı, 2 gr agaroz (Sigma Katalog.no:A-7002) 100 ml 0.5X TBE

(Çizelge 3.6) tamponunda çözülerek mikrodalga fırında eritildi. Oda sıcaklığına gelen jele 5 µl etidyum bromür çözeltisi eklenip karıştırıldı ve yatay elektroforez kasetine döküldü. Jelin polimerize olması için oda sıcaklığında 30 dakika bekletilen elektroforez kaseti, 0.5X TBE tamponu, içeren elektroforez tankına yerleştirildi. PCR ürünleri 3 µl yükleme tamponu (Çizelge 3.6), ile karıştırılarak 20 µl hacimde jel kuyularına yüklendi. PCR ürünlerinin boyutunu belirleyebilmek için 100 bp plus marker (GeneRuler 100bp Plus, Katalog No:SM0323 Fermentas), DNA ladder mix (GeneRuler DNA ladder mix, Katalog No: SM0338 Fermentas) kullanıldı. 70 Voltta yürütülen PCR ürünlerinin UV ışık altında (Vilber Lourmat) incelenen PCR ürünlerinin, Sony UPP-110HG Type V High Glossy Printing Paper film üzerinde fotoğrafı çekildi.

Çizelge 3.6 Agaroz jel elektroforezinde kullanılan çözeltiler

Çözeltinin İsmi	İçeriği	Konsantrasyonu
TBE Tamponu (10 X)	Trisma Base EDTA Borik Asit	890 mM 20 mM 890 mM
Yükleme Tamponu (6 X)	Bromofenol Mavisi Sukroz	%0,25 (w/v) % 40 (w/v)
Etidyum Bromür	Etidyum Bromür	10 mg/ml

3.5.2 PCR Ürünlerinin Poliakrilamid Jel Elektroforezinde (PAGE) İncelenmesi:

Yr5 sarı pas (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*) dayanıklılık geni ile ilişkili belirteçlerin agaroz jel elektroforezinde incelenmesi sonucu elde edilen polimorfik bantlar göz önünde tutularak, belirlenen yüksek polimorfik bantlara sahip örnekler poliakrilamid jel elektroforezinde incelendi. Monomorfik bantlara sahip örnekler ise poliakrilamid jele yüklenmeden elenirken, sadece tek bant polimorfizmine sahip örnekler doğrudan agaroz jelden geri kazanılarak dizi analizine alındı. Poliakrilamid jel elektroforezinde incelenecek olan PCR ürünleri için PAGE Jel elektroforezi yapıldı (Şekil 3.1 a, b, c, d, e).

PAGE Jel elektroforez işlemi şu aşamalardan oluşmaktadır:

1-Page Jel Hazırlığı

2-Örnek Hazırlığı

3-Jelin Denatürasyonu

4-Örnek Yükleme

5-Yürütme

6-Boyama

Poliakrilamid jelin döküleceği camlar temizlendi. Camlar yıkanarak durulandı. Saf sudan geçirilerek filtre kağıdı yerleştirilmiş bir yüzeye yatay durumda yerleştirildi. Sistemin her iki plaka yüzeyi bidistile su ile silindi. Daha sonra her iki plaka yüzeyi saf etanol ile silindi. Bir beher içerisinde 950 ml saf etanol, 50 ml asetik asit ve 3 µl bağlanma solüsyonu (γ-methacryloxypropyl-trimethoxysilane) (Sigma Katalog no:A-2917) karıştırıldı. Bu karışım pipetle noktalar halinde cam yüzeyin üzerine damlatıldı. Düzgün yüzeyi olan kağıt havlu ile solüsyon hafifçe tüm yüzeye dağıtıldı ve silindi. Sigmacote (Sigma Katalog no:088H4371) noktalar halinde plastik yüzeye bağlı cam kısma döküldü ve yüzeye dikey hareketlerle yayıldı, kuruması beklendi. Jel solüsyonu için 40,56 gr üre, 10 ml bidistile su, 18 ml 5XTBE, 11,5 ml %40 akrilamid (19:1 akrilamid;bisakrilamid) (Sigma Katalog no:B-3005) bir beherde manyetik karıştırıcı ile hafifçe ısıtılarak karıştırıldı. Çözünen karışımın oda ısısına gelmesi beklendi ve üzerine bidistile su ilave edilerek 90ml'ye tamamlandı. Sistem hazırlığı için "spacer"lar saf etanol ile silindi. Plastik ve cam kısımları birleştirecek olan mandallar temizlendi. Spacerlar plastik bölümdeki yerlerine yerleştirildi. Cam olan yüzey plastik yüzeyli plakanın üzerine konularak bağlanma solüsyonu ve sigmacote sürülen yüzeyler birleştirildi. Mandallar her iki yüzey bölümünün ortasında tutularak takıldı. Sistemin taban kısmı takıldı. Şırınga hortumu sisteme bağlandı. 0,12 gr amonyum persülfat 500 µl ultra saf su ile çözülerek ependorf tüpüne konuldu. Oda sıcaklığına gelen ve hacmi 90mL'ye tamamlanan jel karışımı 30'ar saniye ikişer kez vakumlandı. 90 µl APS (amonyum per sülfat) (Sigma Katalog no: A-9164) daha sonra ise 90 µl TEMED (N, N, N', N' Tetra metil etilen diamin, Sigma) jel solüsyonuna eklendi ve hava kabarcığı oluşmasını engellemek amacıyla yavaşça dökme işlemine geçildi. Karışım şırınga içine konuldu ve şırınga yavaşça yükseltildi. Jel cam kısmın üst yüzeyine geldiğinde şırınganın mandalı takıldı. Tarak iki camın arasına fazla ileri gitmeden düz kısmı jel tarafına gelecek şekilde yerleştirildi. Jelin donması için 30 dakika beklenildi. Ertesi gün 2 L 1XTBE hazırlandı. 350 ml jelin yürütüleceği tankın alt kısmına döküldü. İki cam yüzey arasındaki boşluğa kalan 1XTBE yukarıdan eklendi. Jel tarağı çıkarılarak dişlerinin olduğu taraf jele girecek şekilde tekrar takıldı. Jel denatürasyonu için örnek yüklenmeden önce 70 watt akımda 30 dakika yürütüldü.

1,5 µl page yükleme tamponu (9,8 ml formamid, 200 µl 500 mM EDTA, 2,5 mg bromo fenol blue, 2,5 mg xilenecyanol) 5 µl PCR ürünü ile karıştırıldı. 95 °C'de 5 dakika denatüre edildi. Örnekler ve marker (ladder) buza alınarak 6,5 µl jel kuyucuklarına yüklendi. Sistemin üst kapağı kapatıldı. -:-,+:+ kutba gelecek şekilde elektrotlar yerleştirildi. 70 watt akımda yaklaşık 4 saat yürütüldü.

Gümüş Boyama: Boyama aşaması için 3 tip solüsyon kullanıldı. Sistem plakaları dikkatli bir şekilde birbirinden ayrıldıktan sonra üzerinde jel olan cam plaka 2L sabitleme solüsyonun (Çizelge 3.7) içerisine konuldu ve daha sonra jel ortasındaki mavi renk kaybolana kadar çalkalandı. 3 defa ultra saf su ile 2’şer dakika yıkandı. 30 dakika boyama solüsyonunda (Çizelge 3.7) bekletildi. Soğutulmuş olan görüntüleme solüsyonunun (Çizelge 3.7) 1 L’si başka bir karıştırma kabına konuldu. Boyama süresi sonunda başka bir kap içinde 5 saniye ultra saf suda bekletildi. Jel son olarak 1L’lik görüntüleme solüsyonuna konuldu ve ilk bantlar çıkana dek hafifçe sallanarak sonuç gözlemlendi. Bantlar belirlemeye başlayınca ve görüntüleme solüsyonun rengi koyulaşınca jel temiz olan diğer 1L’lik görüntüleme solüsyonuna aktarıldı. Tüm bantlar görünür olana kadar bu solüsyonda bekletildi. Jel, durdurma solüsyonuna (Çizelge 3.7) konuldu (yaklaşık 2-3 dakika.) ve içinde ultra saf su bulunan temiz bir kaba transfer edildi. 2 kez 2 dakika ultra saf suda bekletildi. Jel 1 gece boyunca kuruması için bekletildi ve daha sonra jel görüntüsü tarayıcı ile bilgisayar ortamına aktarıldı.

Çizelge 3.7 Page jel elektroforezinde kullanılan solüsyonlar ve hazırlanışı

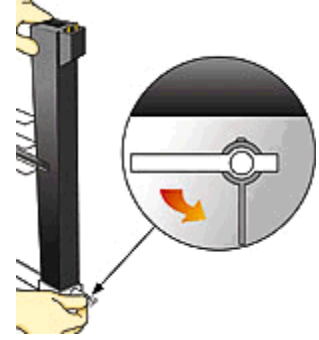
Page için Kullanılan Solüsyonlar	İçerik ve Hazırlanışı
Sabitleme/Durdurma Solüsyonu	10% Acetik acid (200ml Asetik+1800ml distile su)
Boyama Solüsyonu	2gr Silver Nitrat+2L Distile Su karışımına %37’lik Formaldehit İlavesi
Görüntüleme Solüsyonu	260gr Sodyum Karbonat+2L Distile Su karışımına 400 µl Sodyum Tiyosülfat



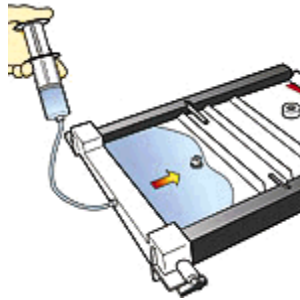
(a)



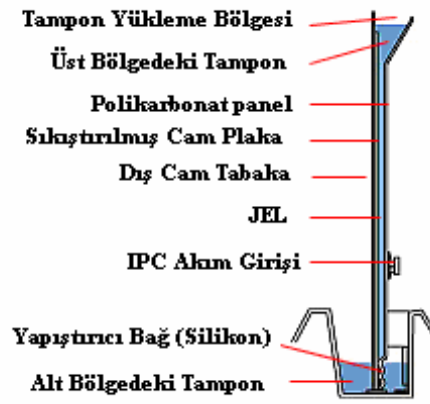
(b)



(c)



(d)



(e)

Şekil 3.1 PAGE sistemi (<http://www.bio-rad.com>)

3.6 Örneklerin Agaroz Jelden Geri Kazanılması:

50 µl'lik PCR ürünleri %1'lik agaroz jele yüklenerek 70 volt akımda 1,5 saat yürütüldü. UV ışık altında elde edilecek bantlar çevresinden steril bisturi ile kesilerek hazırlanan tüplerine aktarıldı. Jelden geri kazanım için kit (Wizard Sv Gel and PCR Clean-Up System-PROMEGA, Katalog No:#A9281) kullanıldı. Tüpün içerisinde ağırlığı belirlenen jel parçalarının üzerine 10 mg'a 10 µl olacak şekilde membran bağlama solüsyonu eklendi. Tüpler 60°C'de ısıtıcı blokta (Bioer Mixing Block) bekletilerek jelin tam olarak çözülmesi sağlandı. Bu işlem sırasında 2-3 dakika aralıklarla homojenizasyonun sağlanması için tüpler karıştırma işlemine tabi tutuldu. Örnekler spin edildi. Kit içindeki kolon ve örnek biriktirme tüpü iç içe konuldu. Homejenizasyonu sağlanmış olan örnekler kolonlara aktarıldı ve 1 dakika oda sıcaklığında bekletildi. 14000 rpm'de 1 dakika santrifuj edildikten sonra biriktirme tüpünün içindeki sıvı atıldı. Kolon 700 µl membran yıkama solüsyonu ile yıkandı ve 14000 rpm'de 1 dakika santrifuj edildi. Altta biriken sıvı atıldı. Kolon 500 µl membran yıkama solüsyonu ile yıkanarak 14000 rpm'de 5 dakika santrifuj edildi ve altta kalan sıvı atıldı. Sıvının kurumması ve ortamda etanol kalmaması için tüp kapakları açık şekilde 14000 rpm'de 1 dakika santrifuj edildi. Sıvı döküldükten sonra kolon temiz 1,5 ml'lik eppendorf tüpüne aktarıldı. 40 µl nükleaz içermeyen su eklenerek 1 dakika oda sıcaklığında bekletildi. 14000 rpm'de 1 dakika santrifüj sonrası DNA örneği içeren alt kısım eppendorf tüplerinde biriktirildi. Dizi analizinde kullanılacak örnekler -20 °C'de saklandı.

4. SONUÇLAR

4.1. Dayanıklı ve Hassas Kışlık Ekmeklik Buğday Çeşitlerinde Yr5 Geni İle İlişkili Moleküler Belirteçlerin Araştırılması

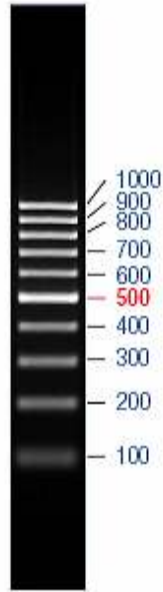
Yr5 geni ile ilişkili olarak RGAP belirteçleri, bu belirteçlerden temel alınan STS belirteçleri mikrosatellit belirteçler sarı pas hastalığına dayanıklı ve hassas bazı kışlık ekmeklik buğday çeşitlerinde analiz edilmiştir. Bu amaçla, kromozom 2BL’de yer alan ve bu gene belli uzaklıklarda bulunan değişik tipteki belirteçleri çoğaltan toplam 46 adet primer çifti (12 çift RGAP, 18 çift STS, 16 çift mikrosatelit) kullanılarak PCR yapılmıştır. Bu çalışmada, 4 dayanıklı (PI178383, Altay2000, İzgi01, Sönmez2001) ve 3 hassas kışlık ekmeklik buğday çeşidi (Aytın98, ES14, Harmankaya99) ile beraber kontrol amaçlı olarak Yr5/6*AVS (NIL2) izogenik genotipi kullanıldı.

Tüm bireyler, Yr5 sarı pas dayanıklılık geni ile ilişkili belirteçlerin belirlenmesi amacıyla RGAP, STS ve mikrosatellit primerleri ile taranmıştır (Çizelge 2.5, 2.6, 2.7). Monomorfik ve polimorfik bantlar veren belirteçler (Çizelge3.1)görülmektedir.

Çizelge 4.1 Çalışmada kullanılan belirteçlerin polimorfizm sonuçları

BELİRTEÇ	Primer Adı	Amplifikasyon	Polimorfik	Polimorfizm gösteren kombinasyonlar
RGAP	Xwgp17	+	+	PI178383 x Harmankaya99 Sönmez2001 x Aytın98
	Xwgp19	+	+	Altay2000 x Harmankaya99 Sönmez2001 x Aytın98 PI178383 x Harmankaya99
	Xwgp21	+	+	İzgi01 x ES14
	Xwgp22	+	+	PI178383 x Harmankaya99
	Xwgp24	+	-	
	Xwgp25	+	-	
	Xwgp26	+	+	Sönmez2001 x Aytın98
	Xwgp27	+	+	Sönmez2001 x Aytın98
	Xwgp28	+	+	İzgi01 x ES14
	Xwgp29	+	+	Sönmez2001 x Aytın98
	Xwgp31	+	-	
	Xwgp32	+	-	
STS	STS 5/6	+	-	
	STS 7/8	+	+	Sönmez2001 x Aytın98
	STS 9/10	+	+	Sönmez2001 x Aytın98
	STS 11/13	+	+	Sönmez2001 x Aytın98
	STS 5/8	+	+	Sönmez2001 x Aytın98
	STS 5/12	+	+	Sönmez2001 x Aytın98 PI178383 x Harmankaya99
	STS 5/13	+	+	Sönmez2001 x Aytın98
	STS 5/16	+	+	Sönmez2001 x Aytın98
	STS 7/12	+	+	Sönmez2001 x Aytın98 PI178383 x Harmankaya99 Altay2000 x Harmankaya99
	STS 7/13	-	-	
	STS 7/16	+	+	Sönmez2001 x Aytın98
	STS 9/12	+	-	
	STS 9/13	+	+	Sönmez2001 x Aytın98
	STS 9/16	+	+	Sönmez2001 x Aytın98
	STS 11/8	+	+	Sönmez2001 x Aytın98
	STS 11/12	+	+	Sönmez2001 x Aytın98
	STS 11/14	+	+	Sönmez2001 x Aytın98
	STS 15/8	+	-	
MİKROSATELLİT	Xgwm16	+	-	
	Xgwm47	-	-	
	Xgwm191	-	-	

	Xgwm382	+	+	Sönmez2001 x Aytn98 PI178383 x Harmankaya99 İzgi01 x ES14 Altay2000 x Harmankaya99
	Xgwm388	+	-	
	Xgwm501	-	-	
	Xgwm526	+	+	Altay2000 x Harmankaya99
	Xgwm120	-	-	
	Xwmc51	-	-	
	Xwmc175	+	+	Sönmez2001 x Aytn98 İzgi01 x ES14
	Xwmc332	+	+	Sönmez2001 x Aytn98
	Xwmc441	+	-	
	Xwmc498	-	-	
	Xwmc500	-	-	
	Xwmc627	+	+	İzgi01 x ES14 Sönmez2001 x Aytn98
	Xwmc149	-	-	

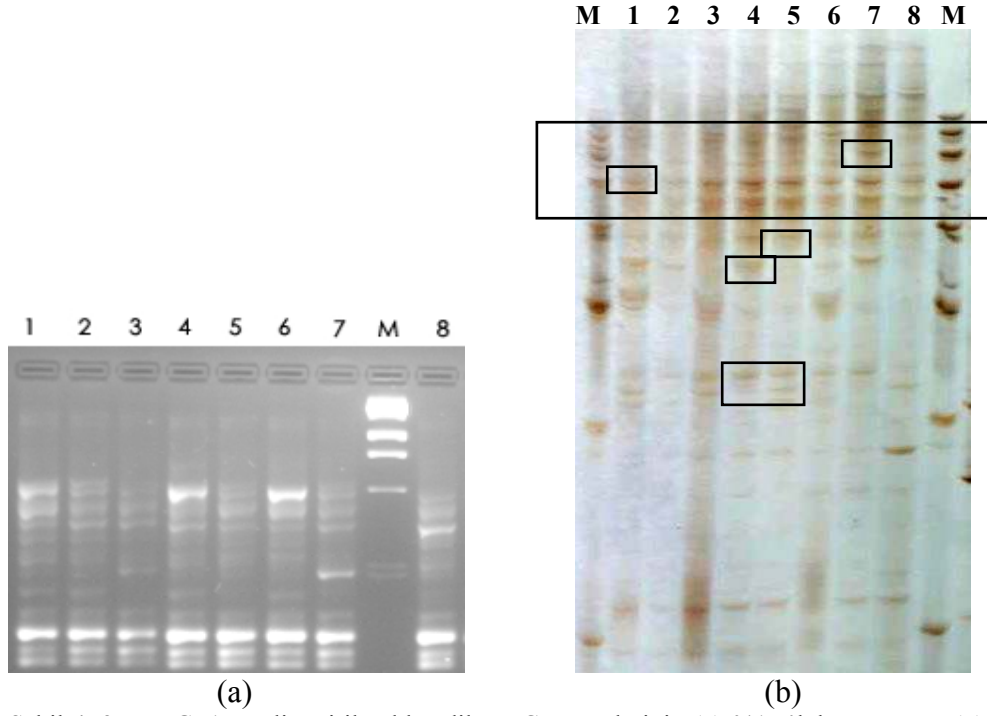


Şekil 4.1 Kullanılan DNA Uzunluk Belirleyici
(Fermentas DNA ladder plus)

4.1.1. RGAP BELİRTEÇLERİ KULLANILARAK ELDE EDİLEN POLİMORFİK BANTLARIN AGAROZ VE POLİAKRİLAMİD JEL ELEKTROFOREZİNDE İNCELENMESİ

4.1.1.1. Xwgp17 Belirteci ile Elde Edilen Sonuçlar

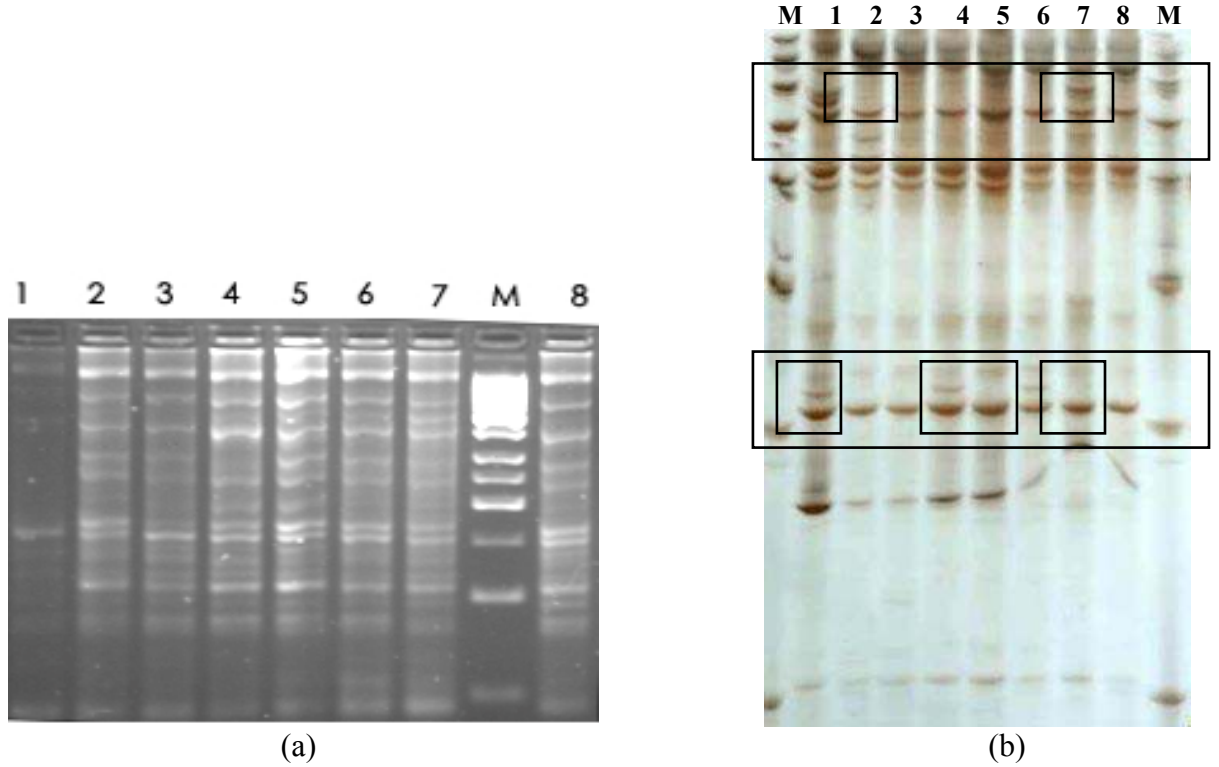
PI178383 x Harmankaya99 ve Sönmez2001 x Aytın98 çeşitleri arasında polimorfizm gözlenmiştir. (Şekil 3.1)



Şekil 4. 2. XWGP17 Belirteci ile elde edilen PCR ürünlerinin (a) %1,5'luk agaroz ve (b) %8'lik poliakrilamid jeldeki görünüşleri. M. 100 bp DNA ladder, 1. P.I.178383, 2. Altay2000, 3. İzgi01, 4.Sönmez2001, 5. Aytın98, 6. ES14, 7. Harmankaya99, 8. (Yr5/6*AVS)

4.1.1.2. Xwgp19 Belirteci ile Elde Edilen Sonuçlar

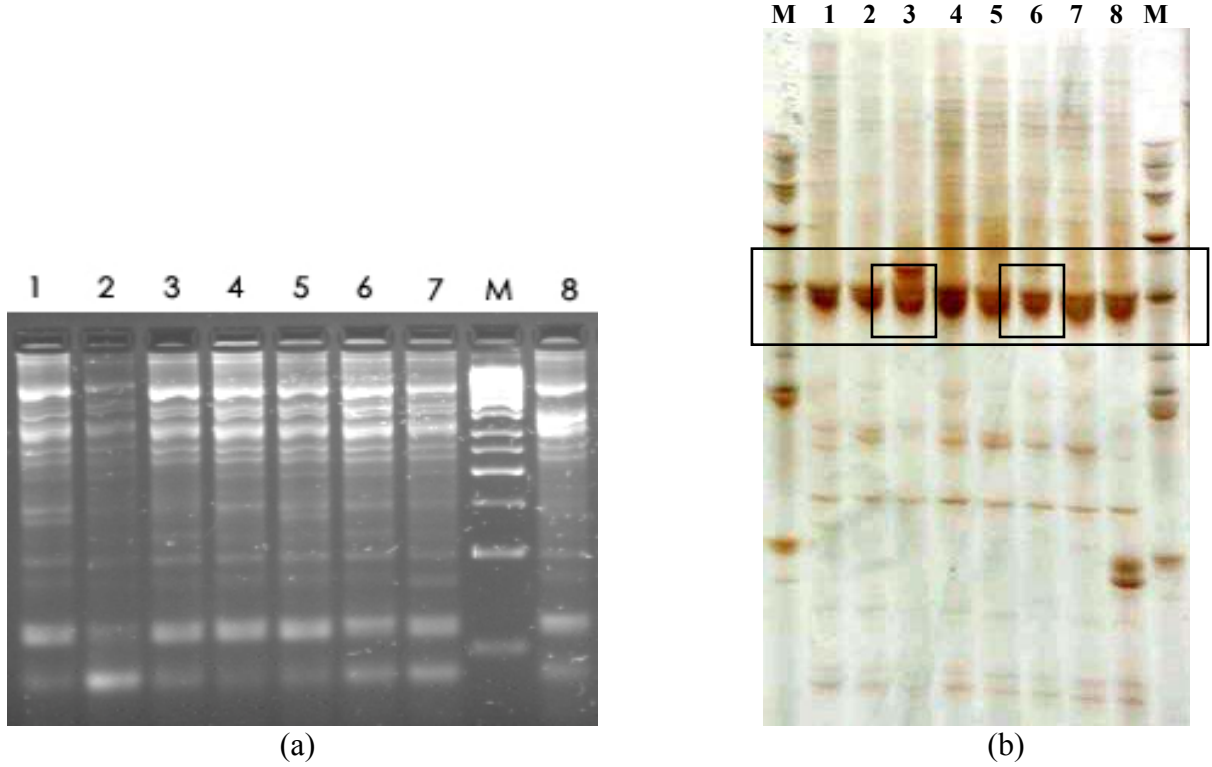
Altay2000 x Harmankaya99, Sönmez2001 x Aydın98 ve PI178383 x Harmankaya99 çeşitleri arasında polimorfizm gözlenmiştir.



Şekil 4.3. Xwgp19 Belirteci ile elde edilen PCR ürünlerinin (a) %1,5'luk agaroz ve (b) %8'lik poliakrilamid jeldeki görünüşleri. M. 100 bp DNA ladder, 1. P.I.178383, 2. Altay2000, 3. İzgi01, 4.Sönmez2001, 5. Aydın98, 6. ES14, 7. Harmankaya99, 8. (Yr5/6*AVS)

4.1.1.3. Xwgp21 Belirteci ile Elde Edilen Sonuçlar

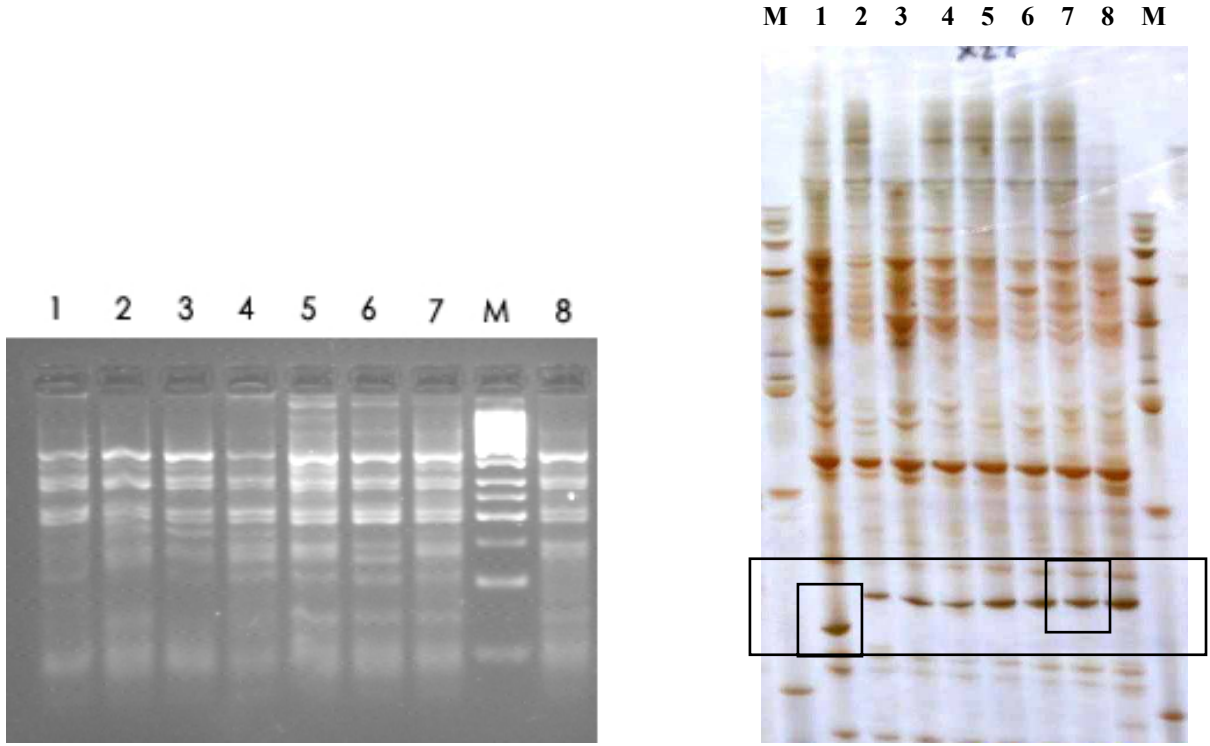
İzgi01 x ES14 çeşitleri arasında polimorfizm gözlenmiştir.



Şekil 4.4 XWGP21 Belirteci ile elde edilen PCR ürünlerinin (a) %1,5'luk agaroz ve (b) %8'lik poliakrilamid jeldeki görünüşleri. M. 100 bp DNA ladder, 1. P.I.178383, 2. Altay2000, 3. İzgi01, 4.Sönmez2001, 5. Aytn98, 6. ES14, 7. Harmankaya99, 8. (Yr5/6*AVS)

4.1.1.4. Xwgp22 Belirteci ile Elde Edilen Sonuçlar

PI178383 x Harmankaya99 çeşitleri arasında polimorfizm gözlenmiştir.



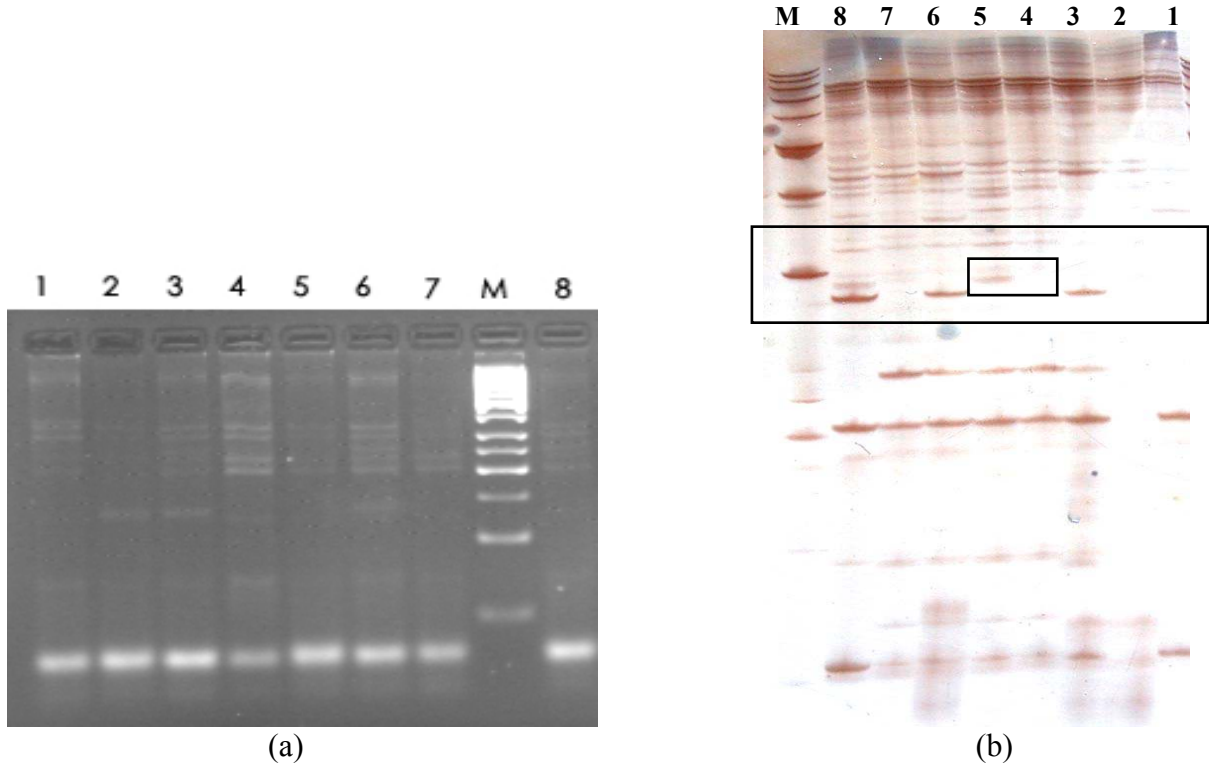
(a)

(b)

Şekil 4. 5 *XWGP22* Belirteci ile elde edilen PCR ürünlerinin (a) %1,5'lik agaroz ve (b) %8'lik poliakrilamid jeldeki görünüşleri. M. 100 bp DNA ladder, 1. P.I.178383, 2. Altay2000, 3. İzgi01, 4.Sönmez2001, 5. Ayın98, 6. ES14, 7. Harmankaya99, 8. (Yr5/6*AVS)

4.1.1.5. Xwgp26 Belirteci ile Elde Edilen Sonuçlar

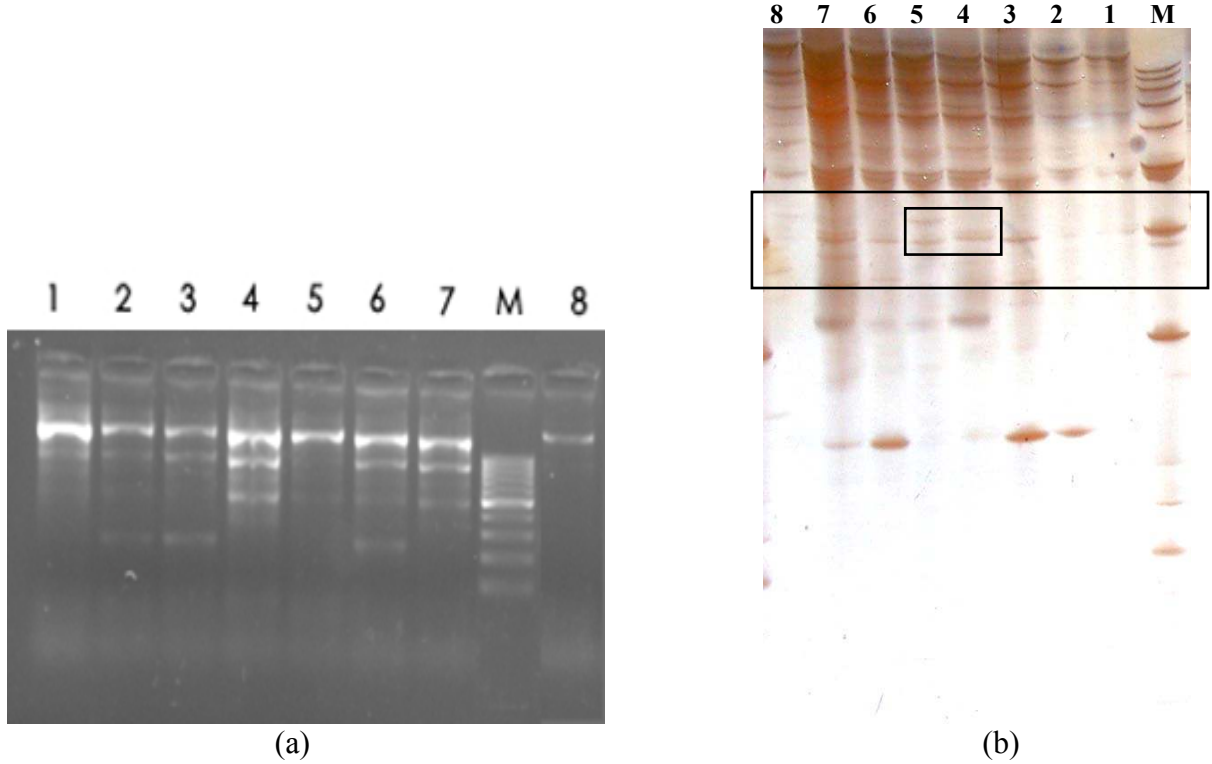
Sönmez2001 x Aydın98 çeşitlerinde polimorfizm gözlenmiştir.



Şekil 4. 6 XWGP26 belirteci ile elde edilen PCR ürünlerinin (a) %1,5'luk agaroz ve (b) %8'lik poliakrilamid jeldeki görünüşleri. M. 100 bp DNA ladder, 1. P.I.178383, 2. Altay2000, 3. İzgi01, 4.Sönmez2001, 5. Aydın98, 6. ES14, 7. Harmankaya99, 8. (Yr5/6*AVS)

4.1.1.6. Xwgp27 Belirteci ile Elde Edilen Sonuçlar

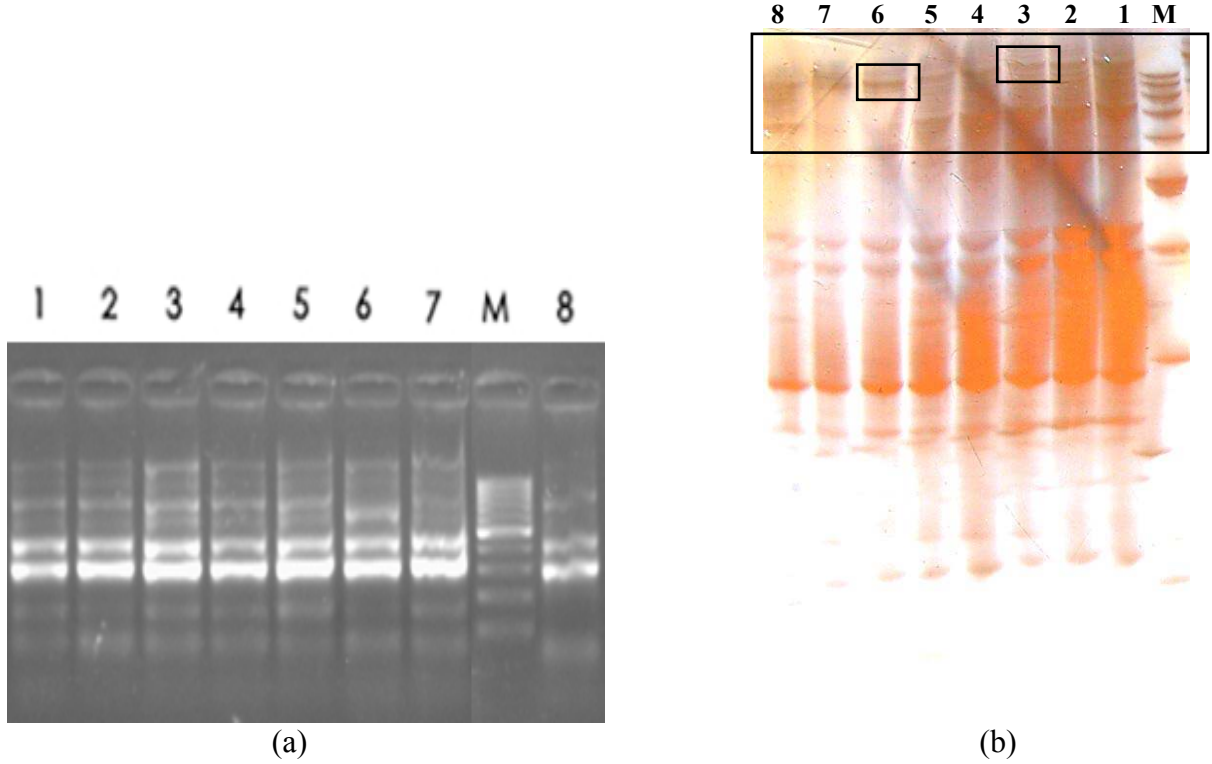
Sönmez2001 x Aytn98 çeşitlerinde polimorfizm gözlenmiştir.



Şekil 4. 7 *XWGP27* belirteci ile elde edilen PCR ürünlerinin (a) %1,5'lik agaroz ve (b) %8'lik poliakrilamid jeldeki görünüşleri. M. 100 bp DNA ladder, 1. P.I.178383, 2. Altay2000, 3. İzgi01, 4.Sönmez2001, 5. Aytn98, 6. ES14, 7. Harmankaya99, 8. (Yr5/6*AVS)

4.1.1.7. Xwgp28 Belirteci ile Elde Edilen Sonuçlar

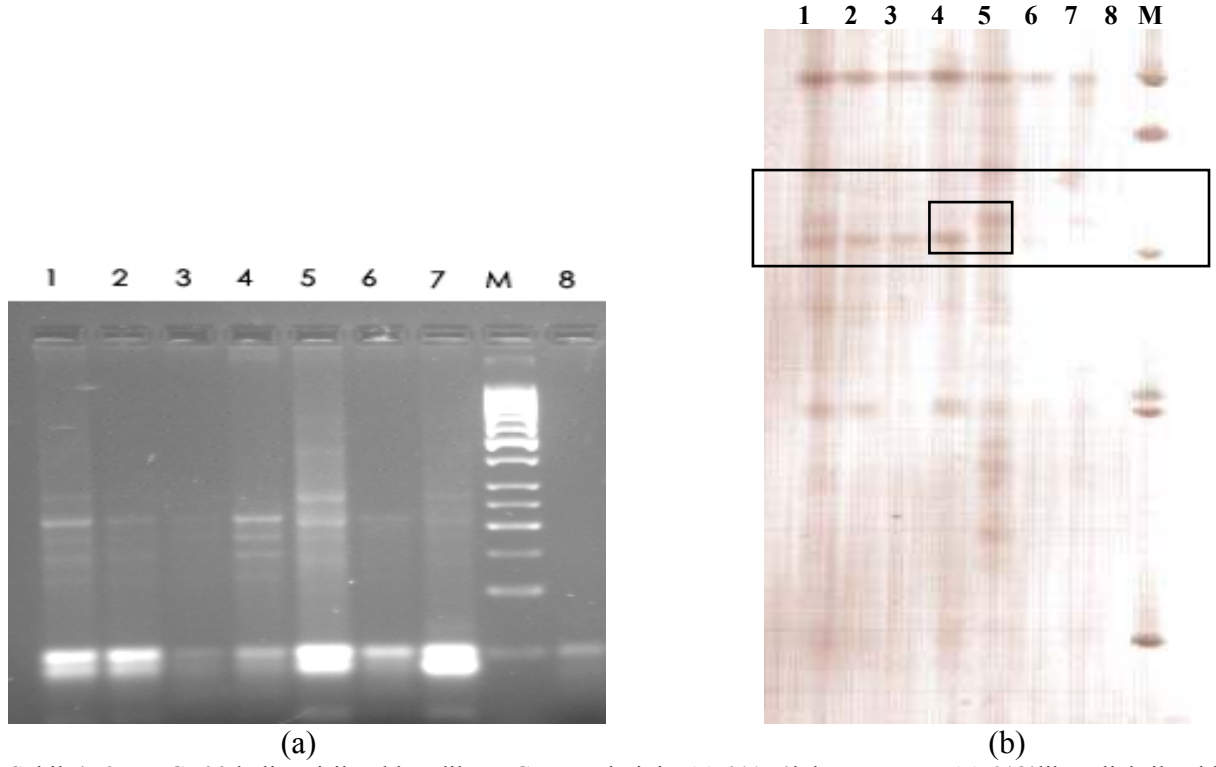
İzgi01 x ES14 çeşitlerinde polimorfizm gözlenmiştir.



Şekil 4. 8 *XWGP28* belirteci ile elde edilen PCR ürünlerinin (a) %1,5'luk agaroz ve (b) %8'lik poliakrilamid jeldeki görünüşleri. M. 100 bp DNA ladder, 1. P.I.178383, 2. Altay2000, 3. İzgi01, 4.Sönmez2001, 5. Aytn98, 6. ES14, 7. Harmankaya99, 8. (Yr5/6*AVS)

4.1.1.8. Xwgp29 Belirteci ile Elde Edilen Sonuçlar

Sönmez2001 x Aykın98 çeşitlerinde polimorfizm gözlenmiştir.

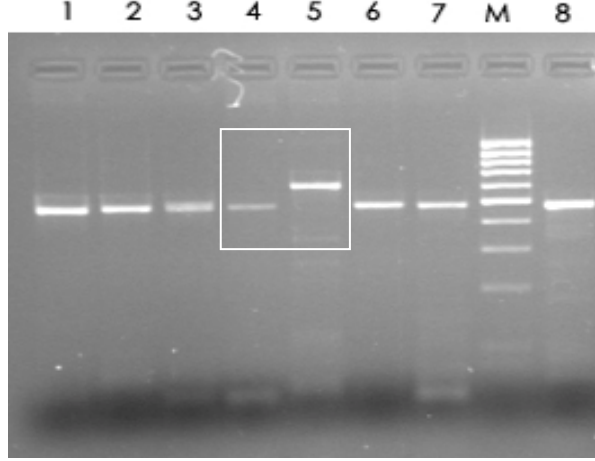


Şekil 4. 9 *XWGP29* belirteci ile elde edilen PCR ürünlerinin (a) %1,5'luk agaroz ve (b) %8'lik poliakrilamid jeldeki görünüşleri. M. 100 bp DNA ladder, 1. P.I.178383, 2. Altay2000, 3. İzgi01, 4.Sönmez2001, 5. Aykın98, 6. ES14, 7. Harmankaya99, 8. (Yr5/6*AVS)

4.1.2. STS BELİRTEÇLERİ KULLANILARAK ELDE EDİLEN POLİMORFİK BANTLARIN AGARÖZ VE POLİAKRİLAMİD JEL ELEKTROFOREZİNDE İNCELENMESİ

4.1.2.1 *STS7/8* Belirteci ile Elde Edilen Sonuçlar

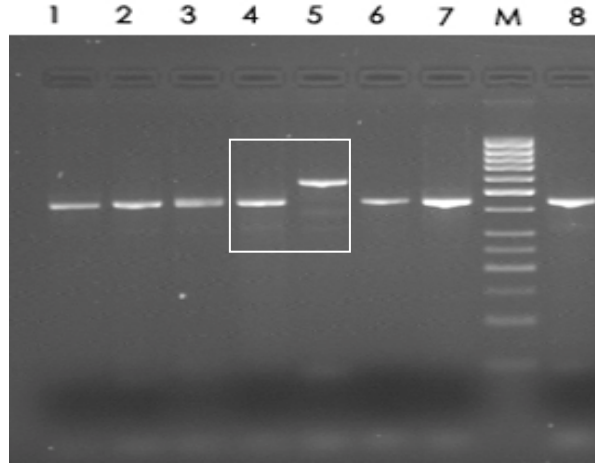
Sönmez2001 x Aytn98 çeşitlerinde polimorfizm gözlenmiştir



Şekil 4. 10 *STS7/8* Belirteci ile yapılan PCR ürünlerinin %1,5'luk agaroz jeldeki görünüşleri. M. 100 bp DNA ladder plus, 1. P.I.178383, 2. Altay2000, 3. İzgi01, 4.Sönmez2001, 5. Aytn98, 6. ES14, 7. Harmankaya99, 8. (Yr5/6*AVS)

4.1.2.2 *STS9/10* Belirteci ile Elde Edilen Sonuçlar

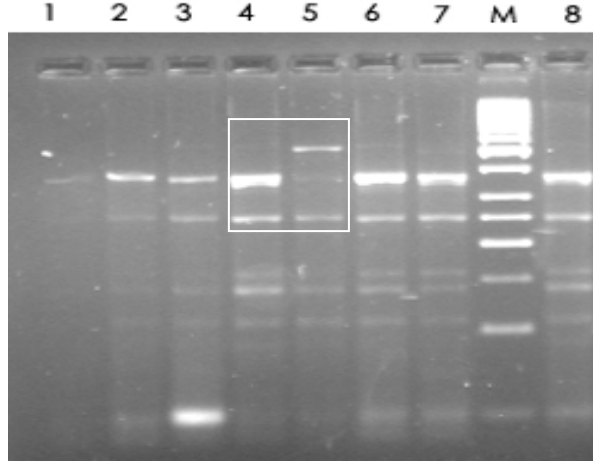
Sönmez2001 x Aytn98 çeşitlerinde polimorfizm gözlenmiştir



Şekil 4. 11 *STS9/10* Belirteci ile yapılan PCR ürünlerinin %1,5'luk agaroz jeldeki görünüşleri. M. 100 bp DNA ladder plus, 1. P.I.178383, 2. Altay2000, 3. İzgi01, 4.Sönmez2001, 5. Aytn98, 6. ES14, 7. Harmankaya99, 8. (Yr5/6*AVS)

4.1.2.3 *STS11/13* Belirteci ile Elde Edilen Sonuçlar

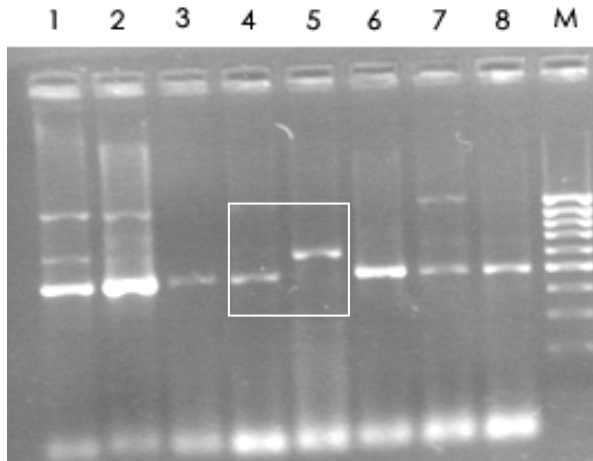
Sönmez2001 x Aytn98 çeşitlerinde polimorfizm gözlenmiştir



Şekil 4. 12 *STS 11/13* Belirteci ile yapılan PCR ürünlerinin %1,5'luk agaroz jeldeki görünüşleri. M. 100 bp DNA ladder plus, 1. P.I.178383, 2. Altay2000, 3. İzgi01, 4.Sönmez2001, 5. Aytn98, 6. ES14, 7. Harmankaya99, 8. (Yr5/6*AVS)

4.1.2.4. *STS5/8* Belirteci ile Elde Edilen Sonuçlar

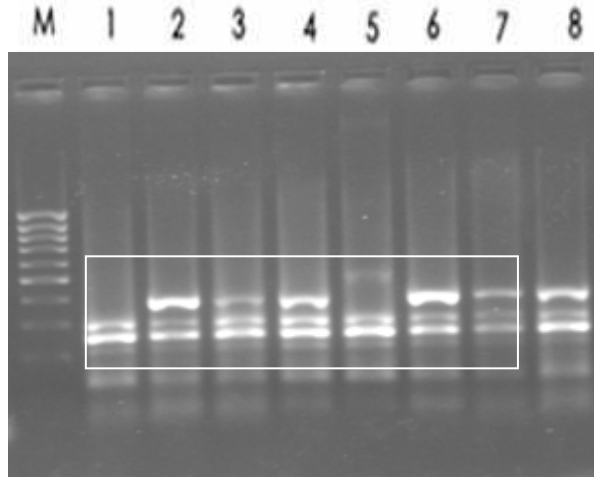
Sönmez2001 x Aytn98 çeşitlerinde polimorfizm gözlenmiştir.



Şekil 4. 13 *STS5/8* Belirteci ile yapılan PCR ürünlerinin %1,5'luk agaroz jeldeki görünüşleri. M. 100 bp DNA ladder plus, 1. P.I.178383, 2. Altay2000, 3. İzgi01, 4.Sönmez2001, 5. Aytn98, 6. ES14, 7. Harmankaya99, 8. (Yr5/6*AVS)

4.1.2.5 *STS5/12* Belirteci ile yapılan PCR Sonucu

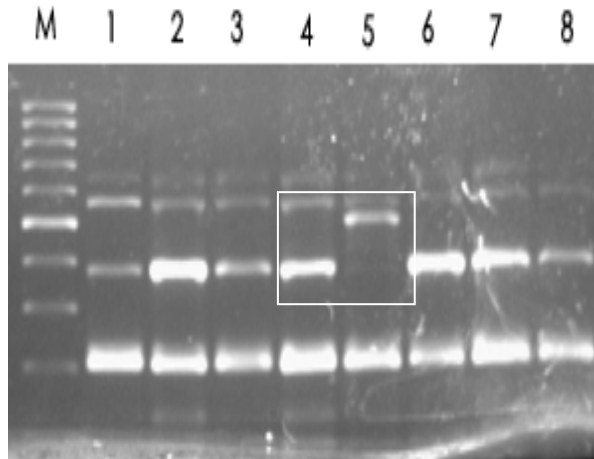
PI178383 x Harmankaya99 Sönmez2001 x Aykın98 çeşitlerinde polimorfizm gözlenmiştir.



Şekil 4. 14 *STS5/12* Belirteci ile yapılan PCR ürünlerinin %1,5'luk agaroz jeldeki görünüşleri. M. 100 bp DNA ladder plus, 1. P.I.178383, 2. Altay2000, 3. İzgi01, 4.Sönmez2001, 5. Aykın98, 6. ES14, 7. Harmankaya99, 8. (Yr5/6*AVS)

4.1.2.6 *STS5/13* Belirteci ile Elde Edilen Sonuçlar

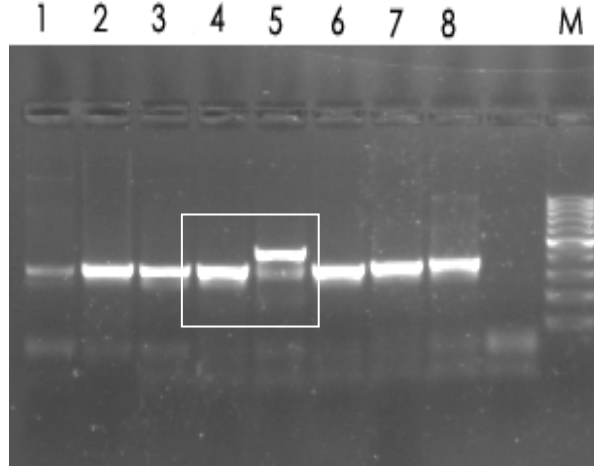
Sönmez2001 x Aykın98 çeşitlerinde polimorfizm gözlenmiştir.



Şekil 4. 15 *STS5/13* Belirteci ile yapılan PCR ürünlerinin %1,5'luk agaroz jeldeki görünüşleri. M. 100 bp DNA ladder plus, 1. P.I.178383, 2. Altay2000, 3. İzgi01, 4.Sönmez2001, 5. Aykın98, 6. ES14, 7. Harmankaya99, 8. (Yr5/6*AVS)

4.1.2.7 *STS5/16* Belirteci ile Elde Edilen Sonuçlar

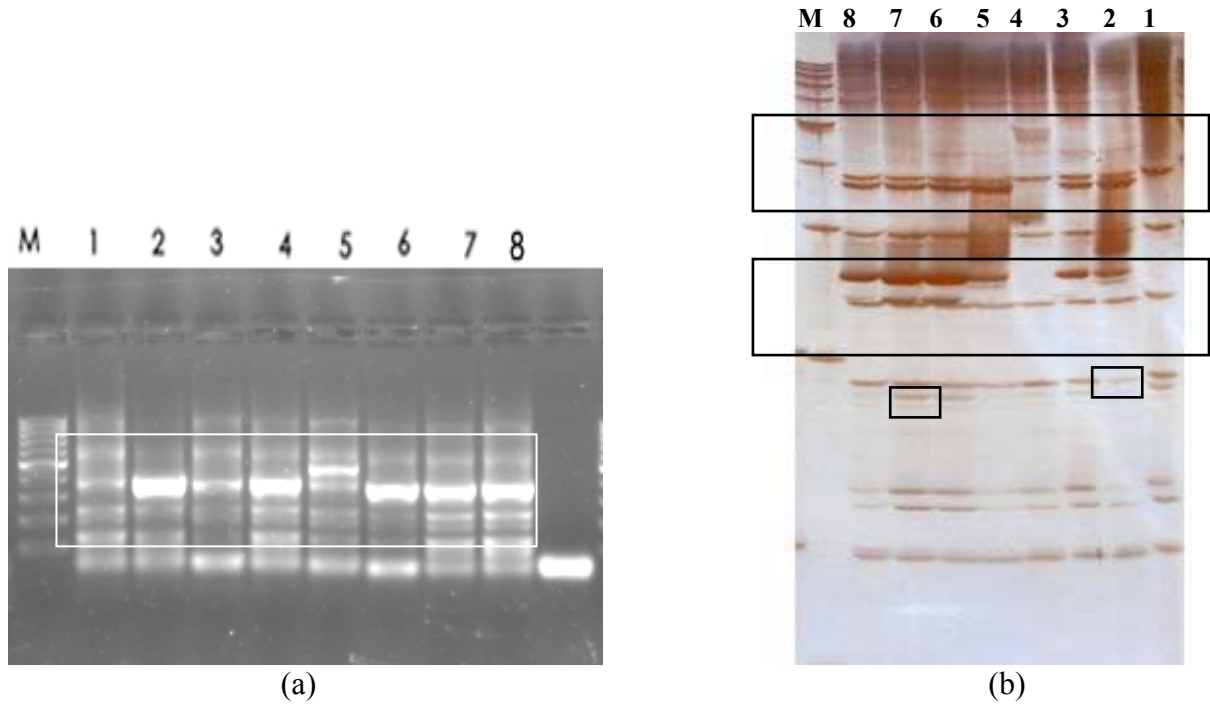
Sönmez2001 x Aytn98 çeşitlerinde polimorfizm gözlenmiştir.



Şekil 4. 16 *STS5/16* Belirteci ile yapılan PCR ürünlerinin %1,5'luk agaroz jeldeki görünüşleri. M. 100 bp DNA ladder plus, 1. P.I.178383, 2. Altay2000, 3. İzgi01, 4.Sönmez2001, 5. Aytn98, 6. ES14, 7. Harmankaya99, 8. (Yr5/6*AVS)

4.1.2.8 *STS7/12* Belirteci ile Elde Edilen Sonuçlar

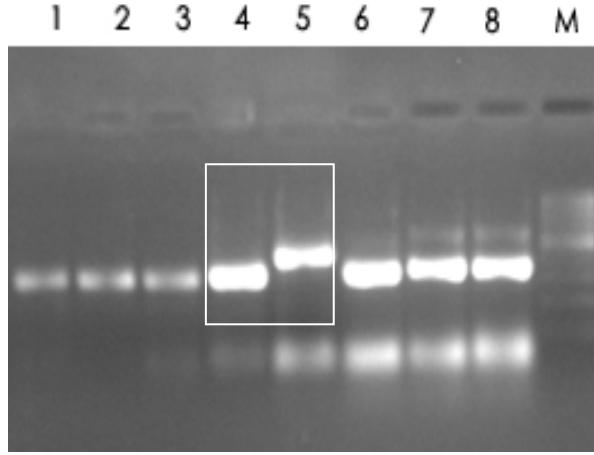
Sönmez2001 x Aytn98, PI178383 x Harmankaya99 ve Altay2000 x Harmankaya99 çeşitlerinde polimorfizm gözlenmiştir.



Şekil 4. 17 *STS7/12* belirteci ile elde edilen PCR ürünlerinin (a) %1,5'luk agaroz ve (b) %8'lik poliakrilamid jeldeki görünüşleri. M. 100 bp DNA ladder, 1. P.I.178383, 2. Altay2000, 3. İzgi01, 4.Sönmez2001, 5. Aytn98, 6. ES14, 7. Harmankaya99, 8. (Yr5/6*AVS)

4.1.2.9 *STS7/16* Belirteci ile Elde Edilen Sonuçlar

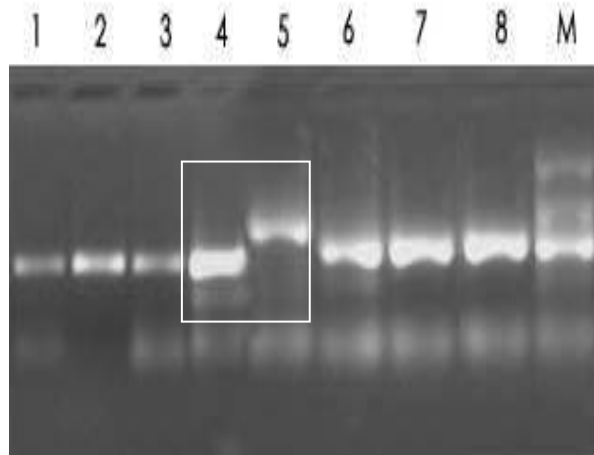
Sönmez2001 x Aydın98 çeşitlerinde polimorfizm gözlenmiştir.



Şekil 4. 18 *STS 7/16* Belirteci ile yapılan PCR ürünlerinin %1,5'luk agaroz jeldeki görünüşleri. M. 100 bp DNA ladder plus, 1. P.I.178383, 2. Altay2000, 3. İzgi01, 4.Sönmez2001, 5. Aydın98, 6. ES14, 7. Harmankaya99, 8. (Yr5/6*AVS)

4.1.2.10 *STS9/13* Belirteci ile Elde Edilen Sonuçlar

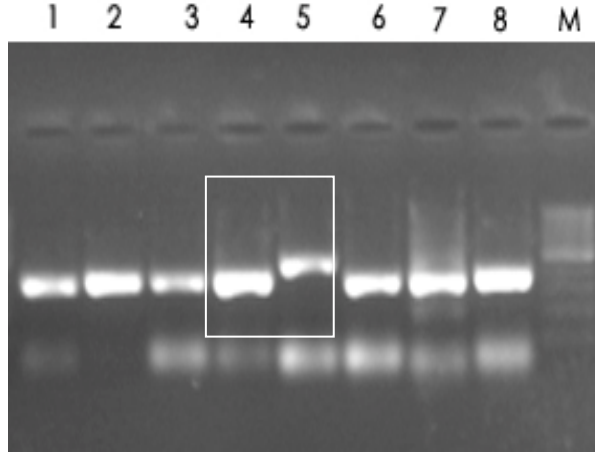
Sönmez2001 x Aydın98 çeşitlerinde polimorfizm gözlenmiştir.



Şekil 4. 19 *STS 9/13* Belirteci ile yapılan PCR ürünlerinin %1,5'luk agaroz jeldeki görünüşleri. M. 100 bp DNA ladder plus, 1. P.I.178383, 2. Altay2000, 3. İzgi01, 4.Sönmez2001, 5. Aydın98, 6. ES14, 7. Harmankaya99, 8. (Yr5/6*AVS)

4.1.2.11 *STS9/16* Belirteci ile Elde Edilen Sonuçlar

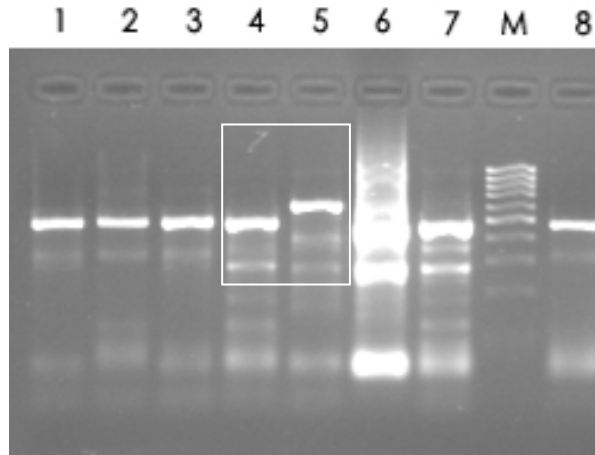
Sönmez2001 x Aytn98 çeşitlerinde polimorfizm gözlenmiştir.



Şekil 4. 20 *STS 9/16* Belirteci ile yapılan PCR ürünlerinin %1,5'luk agaroz jeldeki görünüşleri. M. 100 bp DNA ladder plus, 1. P.I.178383, 2. Altay2000, 3. İzgi01, 4.Sönmez2001, 5. Aytn98, 6. ES14, 7. Harmankaya99, 8. (Yr5/6*AVS)

4.1.2.12 *STS11/8* Belirteci ile Elde Edilen Sonuçlar

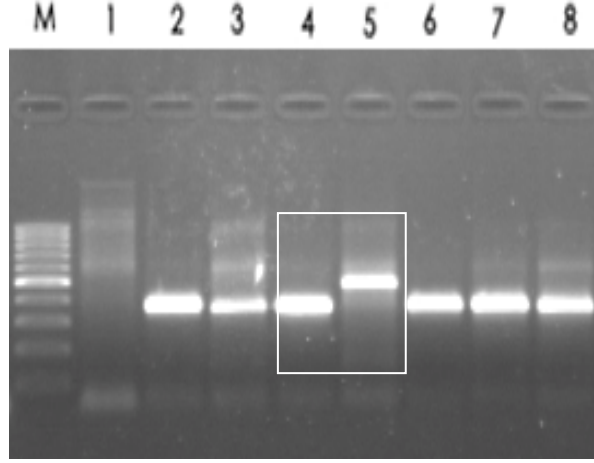
Sönmez2001 x Aytn98 çeşitlerinde polimorfizm gözlenmiştir.



Şekil 4. 21 *STS 11/8* Belirteci ile yapılan PCR ürünlerinin %1,5'luk agaroz jeldeki görünüşleri. M. 100 bp DNA ladder plus, 1. P.I.178383, 2. Altay2000, 3. İzgi01, 4.Sönmez2001, 5. Aytn98, 6. ES14, 7. Harmankaya99, 8. (Yr5/6*AVS)

4.1.2.13 *STS11/12* Belirteci ile Elde Edilen Sonuçlar

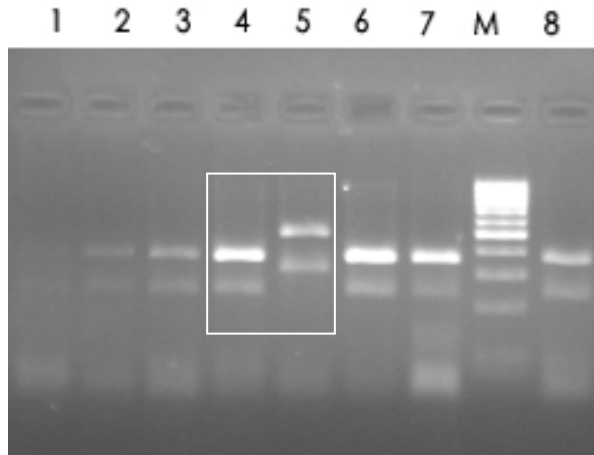
Sönmez2001 x Aytn98 çeşitlerinde polimorfizm gözlenmiştir.



Şekil 4. 22 *STS 11/12* Belirteci ile yapılan PCR ürünlerinin %1,5'luk agaroz jeldeki görünüşleri. M. 100 bp DNA ladder plus, 1. P.I.178383, 2. Altay2000, 3. İzgi01, 4.Sönmez2001, 5. Aytn98, 6. ES14, 7. Harmankaya99, 8. (Yr5/6*AVS)

4.1.2.14 *STS11/14* Belirteci ile Elde Edilen Sonuçlar

Sönmez2001 x Aytn98 çeşitlerinde polimorfizm gözlenmiştir.

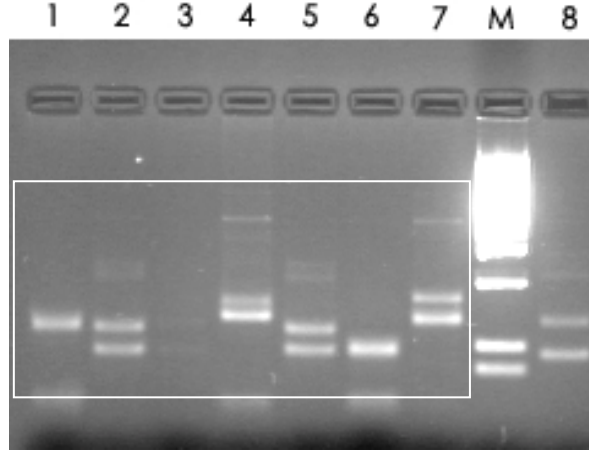


Şekil 4. 23 *STS 11/14* Belirteci ile yapılan PCR ürünlerinin %1,5'luk agaroz jeldeki görünüşleri. M. 100 bp DNA ladder plus, 1. P.I.178383, 2. Altay2000, 3. İzgi01, 4.Sönmez2001, 5. Aytn98, 6. ES14, 7. Harmankaya99, 8. (Yr5/6*AVS)

4.1.3. MİKROSATELLİT BELİRTEÇLERİ KULLANILARAK ELDE EDİLEN POLİMORFİK BANTLARIN AGAROZ VE POLİAKRİLAMİD JEL ELEKTROFOREZİNDE İNCELENMESİ

4.1.3.1 *XGWM382* Belirteci ile Elde Edilen Sonuçlar

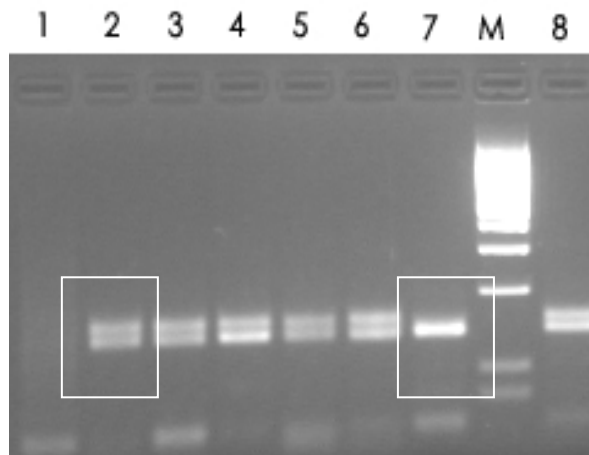
Sönmez2001 x Aytn98, PI178383 x Harmankaya990, İzgi01 x ES14 ve Altay2000 x Harmankaya99 çeşitlerinde polimorfizm gözlenmiştir.



Şekil 4. 24 *XGWM382* Belirteci ile yapılan PCR ürünlerinin %1,5'luk agaroz jeldeki görünüşleri. M. 100 bp DNA ladder plus, 1. P.I.178383, 2. Altay2000, 3. İzgi01, 4.Sönmez2001, 5. Aytn98, 6. ES14, 7. Harmankaya99, 8. (Yr5/6*AVS)

4.1.3.2 *XGWM526* Belirteci ile Elde Edilen Sonuçlar

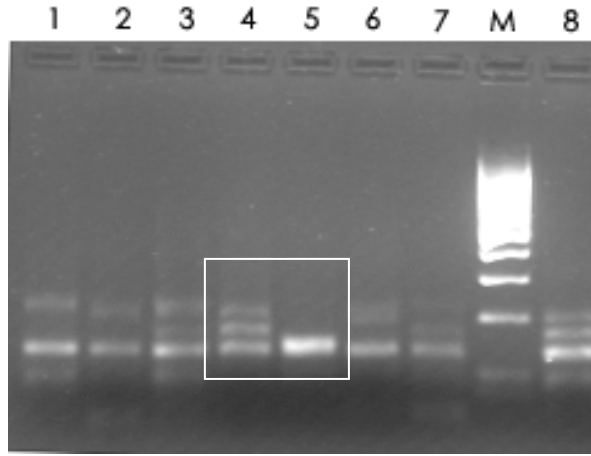
Altay2000 x Harmankaya99 çeşitlerinde polimorfizm gözlenmiştir.



Şekil 4. 25 *XGWM526* Belirteci ile yapılan PCR ürünlerinin %1,5'luk agaroz jeldeki görünüşleri. M. 100 bp DNA ladder plus, 1. P.I.178383, 2. Altay2000, 3. İzgi01, 4.Sönmez2001, 5. Aytn98, 6. ES14, 7. Harmankaya99, 8. (Yr5/6*AVS)

4.1.3.3 XGWM332 Belirteci ile Elde Edilen Sonuçlar

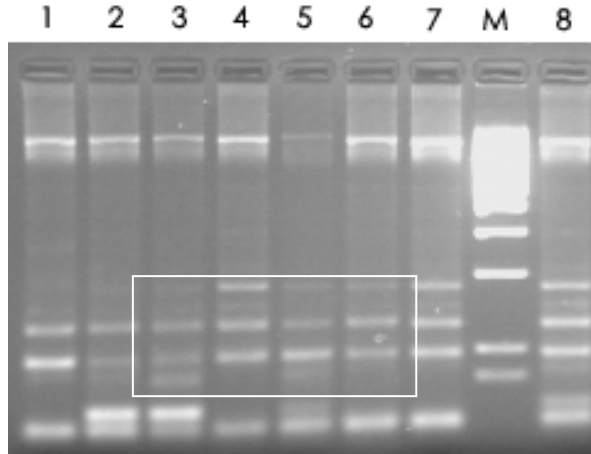
Sönmez2001 x Aydın98 çeşitlerinde polimorfizm gözlenmiştir.



Şekil 4. 26 XWMC332 Belirteci ile yapılan PCR ürünlerinin %1,5'luk agaroz jeldeki görünüşleri. M. 100 bp DNA ladder plus, 1. P.I.178383, 2. Altay2000, 3. İzgi01, 4.Sönmez2001, 5. Aydın98, 6. ES14, 7. Harmankaya99, 8. (Yr5/6*AVS)

4.1.3.4 XGWM627 Belirteci ile Elde Edilen Sonuçlar

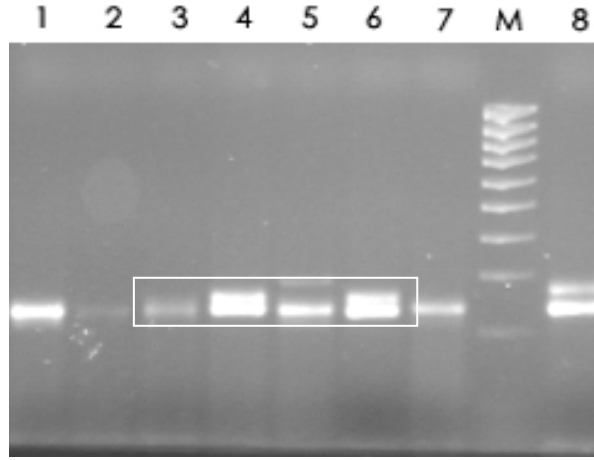
İzgi01 x ES14 ve Sönmez2001 x Aydın98 çeşitlerinde polimorfizm gözlenmiştir.



Şekil 4.27 XWMC627 Belirteci ile yapılan PCR ürünlerinin %1,5'luk agaroz jeldeki görünüşleri. M. 100 bp DNA ladder plus, 1. P.I.178383, 2. Altay2000, 3. İzgi01, 4.Sönmez2001, 5. Aydın98, 6. ES14, 7. Harmankaya99, 8. (Yr5/6*AVS)

4.1.3.5 *XWMC175* Belirteci ile Elde Edilen Sonuçlar

Sönmez2001 x Aydın98 ve İzgi01 x ES14 çeşitleri arasında polimorfizm gözlenmiştir.



Şekil 4. 28 *XWMC175* Belirteci ile yapılan PCR ürünlerinin %1,5'luk agaroz jeldeki görünüşleri. M. 100 bp DNA ladder plus, 1. P.I.178383, 2. Altay2000, 3. İzgi01, 4.Sönmez2001, 5. Aydın98, 6. ES14, 7. Harmankaya99, 8. (Yr5/6*AVS)

5. TARTIŞMA VE DEĞERLENDİRME

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

Bu çalışmada, 7 farklı kışlık ekmeklik buğday çeşidi (P.I.178383, Altay2000, Aytın98, ES14, Harmankaya99, İzgi01 ve Sönmez2001) ile kontrol amaçlı kullanılan Yr5/6*AVS izogenik genotipi kullanıldı. Tüm bireyler, Yr5 sarı pas dayanıklılık geni ile ilişkili belirteçlerin belirlenmesi amacıyla RGAP, STS ve Mikrosatellit primerleri ile tarandı. Yr5 sarı pas dayanıklılık genine ait sonuçlar Çizelge 4.1 incelendiğinde RGAP Belirteçlerinden XWGP17, XWGP19, XWGP21, XWGP22, XWGP26, XWGP27, XWGP28 ve XWGP29'un polimorfik bantlar verdiği saptanmıştır. Agaroz jel elektroforezinin ayırım gücü sebebi ile poliakrilamid jel elektroforezinde incelenen RGAP belirteçlerinin Sönmez2001 x Aytın98 PI178383 x Harmankaya99, İzgi01 x ES14 ve Altay2000 x Harmankaya99 eşleşmelerine spesifik bantlar verdiği gözlenmiştir. Xwgp 17 ve Xwgp 19 belirteçlerine dayalı dizayn edilen STS belirteçlerinden STS 7/8, STS9/10, STS11/13, STS5/8, STS5/12, STS5/13, STS5/16, STS7/16, STS9/13, STS9/16, STS11/8, STS11/12 ve STS11/14'nin Sönmez2001 x Aytın98 kombinasyonuna ait tek bant polimorfizm verdiği belirlenmiştir ve bu belirteçlerin belirteç yoluyla seleksiyon çalışmalarında uygun birer belirteç adayları olduğu düşünülmektedir. STS7/12 belirtecinin Poliakrilamid jel elektroforezi incelemesi sonucunda ise net bir şekilde Sönmez2001 x Aytın98, PI178383 x Harmankaya99 ve Altay2000 x Harmankaya99 çeşitlerinde polimorfizm gözlenmiştir. SSR belirteçlerinin lokus spesifik, kodominant, tekrarlanabilir özellikte ve oldukça polimorfik olmaları sebebi ile belirlenen genotipler bu belirteçler ile de taranmıştır. Mikrosatellit belirteçlerinden Xgwm382, Sönmez2001 x Aytın98, PI178383 x Harmankaya99, İzgi01 x ES14 ve Altay2000 x Harmankaya99 çeşitlerinde polimorfizm göstermektedir. Xgwm526, Altay2000 x Harmankaya99 çeşidinde, Xwmc175, Sönmez2001 x Aytın98, İzgi01 x ES14 çeşitlerinde, Xwmc332, Sönmez2001 x

Aytın98 çeşidinde ve Xwmc627 ise İzgi01 x ES14 ve Sönmez2001 x Aytın98 çeşitlerinde polimorfizm göstermektedir. Bu sonuçlar karşılaştırıldığında STS Belirteçlerinin Kışlık ekmeklik buğday (*Triticum aestivum* L.)’da Yr5 sarıpas (*Puccinia striiformis* f.sp. *tritici*) dayanıklılık geni araştırmasında tek bant polimorfizm vermeleri sebebi ile uygun belirteç adayları olarak tanımlanmaktadır. Sönmez2001 x Aytın98 çeşitlerinde RGAP, STS ve Mikrosatellit belirteçleri ile yapılan çalışmada bu çeşitlerin Yr5 geni açısından yüksek oranda farklılık verdiği tespit edilmiştir.

Bitkinin fide döneminde sarı pas hastalığına dayanıklılık sağlayan Yr5 geni açısından polimorfizm gösteren bant yapıları etkin belirteç adayları olarak gözlemlendi. Bu polimorfik yapıdaki belirteçlerin F₂ populasyonlarında incelenerek ve “belirteç yardımıyla seçim” yoluyla bitki ıslah çalışmalarında, dayanıklı buğday genotiplerinin seçiminde kullanılması hedeflenmektedir. Kombinasyonları oluşturan ebeveynler arasında elde edilen ve Yr5 geni ile ilişkili olduğu düşünülen polimorfik yapıdaki bantların, sarı pas hastalığı ile olan bağlantısını kesinleştirmek ve doğrulamak amacıyla bu kombinasyonlara ait dayanıklı ve duyarlı F₂ bitkilerinin bu belirteçler ile taranması şeklinde ilerleyen çalışmalarda yapılacaktır.

KAYNAKLAR

- “Biyoteknoloji ve Bitki Islahı”, 17-19 Nisan 1995, Gebze / Kocaeli, Bildiriler, Can Ofset, İzmir, 227-236.
- BİLGİN VE KORKUT, 2005 2(3) Bazı Ekmeklik Buğday (*Triticum aestivum* L.) Çeşit ve Hatlarının Genetik Uzaklıklarının Belirlenmesi
- CHAGUE, V., FAHIMA, T., DAHAM, A., SUN, G. L., KOROL, A. B., RONIN, Y., NEVO, E., GRANA, A. & ROY DER, M. S. (1999). Isolation of microsatellite and RAPD markers flanking the Yr15 gene of wheat using NILs and bulked segregant analysis. *Genome* 42, 1050–1056.
- CHEN, X.M., 2005, Epidemiology and control of stripe rust [*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*] on wheat, *Can. J. Plant Pathol*, 27, 314–337
- CHEN, X.M., LINE, R.F., JONES, S.S., 1995, Chromosomal location of genes for stripe rust in spring wheat cultivars Compair, Fielder, Lee, and Lemhi and interactions of aneuploid wheats with races of *Puccinia striiformis*. *Phytopathology*, 85, 375–381
- CHRISTIANSEN, M. J., FEENSTRA, B., SKOVGAARD, I.M., ANDERSEN, S.B., 2006, Genetic analysis of resistance to yellow rust in hexaploid wheat using a mixture model for multiple crosses, *Theor Appl Genet*, 112, 581–591
- CURTIS, B.C., MACPHERSON, H.G., RAJARAM, S., 2002, *Bread Wheat Improvement and Production*, Food and Agriculture Organization of the united nations, 9251048096
- DIAMOND, J. 1997. Location, Location, Location: The First Farmers. *Science*, 278: 1243-1244.
- DODDS, J.H. AND WATANABE, K. 1990. Biotechnological tools for plant genetic
- DODDS, J.H. AND WATANABE, K. 1990. Biotechnological tools for plant genetic resources management. *Diversity*, 6: 317-28.
- DÜŞÜNCELİ, F., ÇETİN, L., ALBUSTAN, S., 1999, Orta Anadolu buğday ekilişlerinde pas hastalıklarının (*Puccinia* spp.) yaygınlığı, önemi ve alınması gereken tedbirler, *Hububat tarımının sorunları ve çözüm yolları sempozyumu*, 8-11 Haziran 1999, Konya
- ERIKSSON, J., HENNING, E., 1896, *Die Getreideroste*, Norsteadt & Soner, Stockholm
- [FAOSTAT](#), 2005. Crops Primary data last updated July 14, 2005, Food Supply Data last updated Aug 27, 2004.
- HALWARD, T., STALKER, T., LARUE, E. AND G., KOCHERT, 1992. Use of single-primer DNA amplification in genetic studies of peanut (*Arachis hypogaeae* L.). *Plant Mol. Bio.*, 18: 315-325.
- HANCOCK, JAMES F. (2004) *Plant Evolution and the Origin of Crop Species*. CABI Publishing. [ISBN 0-85199-685-X.](#)

HEUN, M., R. SCHAFER-PREGL, D. Klawan, R. CASTAGNA, M. ACCERBI, B. BORGHİ AND F. SALAMİNİ. 1997. Site of Einkorn Wheat Domestication Identified by DNA Fingerprinting. *Science*, 278: 1321-1314

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

I. Ulusal Çevre Kongresi, 5-7 Ekim, 1993, İzmir, E.Ü. Fen Fakültesi

JONES N, OUGHAM H and THOMAS H (1997) Markers and mapping: we are all geneticists now. *New Phytol.* (1997), 137, 165-177

JOPPA, L.R., 1993, Chromosome engineering in tetraploid wheat, *Crop Science*, 33, 908-913

KORZUN, V., 2003, Molecular markers and their applications in cereals breeding, *Marker assisted selection: A fast track to increase genetic gain in plant and animal breeding?*, 17-18 Ekim 2003 Turin, The University of Turin, Food and Agriculture Organization of the United Nations

KUMAR LS (1999) DNA markers in plant improvement: An overview. *Biotechnology Advances* 17, 143–182

KÜN, E., 1996. Tahıllar- I (Serin İklim Tahılları). 3. Baskı. A. Ü. Ziraat Fakültesi Yayın No: 1451, Ankara. 322 s.

L.A BOYD, 2005 *Journal of Agricultural Science* (2005), 143, 233–243. f2005 Cambridge University Press 233

LEV-YADUN, A., A. GOPHER AND S. ABBO. 2000. The Cradle of Agriculture. *Science*. 288; 1602-1603.

MA, J., ZHOU, R., DONG, Y., WANG, L., WANG, X. & JIA, J. (2001). Molecular mapping and detection of the yellow rust resistance gene Yr26 in wheat transferred from *Triticum turgidum* L. using microsatellite markers. *Euphytica* 120, 219–226.

MACER, R. C. F., 1966: The formal and monosomic genetic analysis of stripe rust (*Puccinia striiformis*) resistance in wheat. In: J. Mackey (ed.), *Proc. 2nd Int. Wheat Genet. Symp.*, Lund, Sweden, 1963. *Hereditas Suppl.* 2, 127—142

MURAT ÖZGEN, M. SAİT ADAK, GÖKHAN SÖYLEMEZOĞLU, HAKAN ULUKAN) 1995 BİTKİSEL GEN KAYNAKLARININ KORUNMA VE KULLANIMINDA YENİ YAKLAŞIMLAR

NESBITT, M. (2001) “Wheat evolution: integrating archaeological and biological evidence” in

NESBIT, M. AND SAMUEL, L. 1998. Wheat Domestication, Archeobotanical Evidence. *Science*. 279: 1433.

ÖZGEN, M. VE TÜRET, M. 1995. Bitki ıslahı ve gen aktarma teknolojisi. Workshop

ÖZGEN, M. VE AKAR, T. 1994. Yabani gen kaynaklarının bitki ıslahında kullanımı.

ÖZGEN, M. VE AKAR, T. 1994. Yabani gen kaynaklarının bitki ıslahında kullanımı. I. Ulusal Çevre Kongresi, 5-7 Ekim, 1993, İzmir, E.Ü. Fen Fakültesi Dergisi, Seri B, 16 (1): 1423-1437.

PENG, J. H., FAHIMA, T., ROEDER, M. S., LI, Y. C., GRAMA, A. & NEVO, E. (2000). Microsatellite high-density mapping of the stripe rust resistance gene YrH52 region on chromosome 1B and evaluation of its marker-assisted selection in the F2 generation in wild emmer wheat. *New Phytologist* 146, 141–154.

resources management. *Diversity*, 6: 317–28.

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

SHI, Z. X., CHEN, X. M., LINE, R. F., LEUNG, H. & WELLINGS, C. R. (2001). Development of resistance gene analog polymorphism markers for the Yr9 gene resistance to wheat stripe rust. *Genome* 44, 509–516.

SINGH, R. P., NELSON, J.C. & SORRELLS, M. E. (2000). Mapping Yr28 and other genes for resistance to stripe rust in wheat. *Crop Science* 40, 1148–1155.

SMITH, P. H., KOEBNER, R.M.D. & BOYD, L. A. (2002). The development of a STS marker linked to a yellow rust resistance derived from the wheat cultivar Moro. *Theoretical and Applied Genetics* 104, 1278–1282

STUBBS, R.W., PRESCOTT, J.M., SAARI, E.E., DUBIN, H.J., 1986, *Cereal Disease Methodology Manual*, Centro Internacional de Mejoramiento de maiz y trigo (CIMMYT), Mexico

SUENAGA, K., SINGH, R. P., HUERTA-ESPINO, J. & WILLIAM, H. M. (2003). Microsatellite markers for genes Lr34/Yr18 and other quantitative trait loci for leaf rust and stripe rust resistance in bread wheat. *Phytopathology* 93, 881–890.

SUN, Q., WEI, Y., NI, Z., XIE, C. & YANG, T. (2002). Microsatellite marker for yellow rust resistance gene Yr5 in wheat introgressed from spelt wheat. *Plant Breeding* 121, 539–541.

UNCUOĞLU, A.A., 2001, *Arpa (Hordeum vulgare L.) ve buğday (Triticum aestivum L.)'da kuraklığa dirençli bitkilerin biyoteknolojik yöntemlerle tanımlanması*, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi

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

Wheat Taxonomy: The Legacy of John Percival, *The Linnean Special Issue 3*, The Linnean Society of London, Academic Press, London, GB pp.37–59.

YAN, G. P., CHEN, X. M., LINE, R.F. & WELLINGS, C.R. (2003). Resistance gene-analog polymorphism markers co-segregating with the Yr5 gene for resistance to wheat stripe rust. *Theoretical and Applied Genetics* 106, 636–643.

www.wsu.edu:8080/~wheaties/rustpic.html

<http://pvo.planteinfo.dk>

<http://www.cdl.umn.edu/gallery/images.html>

<http://www.shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi>

www.bitkisagligi.net

ÖZGEÇMİŞ

Doğum tarihi 17.02.1980

Doğum yeri İstanbul

Lise 1994-1997 Sabri Çalışkan Lisesi

Lisans 1999-2004 Uludağ Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi
Biyoloji Bölümü

Yüksek Lisans 2004-2007 Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyomühendislik Anabilim Dalı

Çalıştığı kurum ve kuruluşlar

ACIBADEM HASTANESİ LABMED LABORATUVAR 2005-2007 BİYOLOG

KİTSAN TIBBİ ÜRÜNLER LTD.ŞTİ 2007- TEKNİK SERVİS DIŞ İLİŞKİLER SORUMLUSU

TÜBİTAK GEN MÜHENDİSLİĞİ VE BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ/MAM
BURSİYER/ARAŞTIRICI 2006-2007