

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
(DOKTORA TEZİ)

BUĞDAYDA SARI PASA DAYANIKLILIK GENLERİNE
İLİŞKİN MOLEKÜLER MARKÖRLERİN ARAŞTIRILMASI

M. ALP FURAN

Tarla Bitkileri Anabilim Dalı
501.12.01

Sunuş Tarihi: 16.10.2007

Tez Danışmanı: Prof.Dr. Süer YÜCE

Bornova - İZMİR

M. Alp FURAN'ın **DOKTORA TEZİ** olarak hazırladığı “**Buğdayda Sarı Pasa Dayanıklılık Genlerine İlişkin Moleküler Markörlerin Araştırılması**” adlı bu çalışma, E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 16/10/2007 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oy birliği ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri

imza

Jüri Başkanı : Prof. Dr. Süer YÜCE

Raportör Üye: Prof. Dr. Güldehen BİLGEN

Üye : Prof. Dr. İsmail TURGUT

Üye : Prof. Dr. Metin ALTINBAŞ

Üye : Prof. Dr. Muzaffer TOSUN

ÖZET

BUĞDAYDA SARI PASA DAYANIKLILIK GENLERİNE İLİŞKİN MOLEKÜLER MARKÖRLERİN ARAŞTIRILMASI

FURAN M. ALP
Doktora Tezi, Tarla Bitkileri Bölümü
Tez Yöneticisi: Prof. Dr. Süer YÜCE
Ekim 2007, 198 sayfa

Tahıllar dünyada kültürü yapılan bitkiler içerisinde en fazla ekim alanına ve üretime sahiptir. İnsan ve hayvanlar tarafından tüketilen yıllık protein miktarının oldukça büyük bir kısmı tahıllar tarafından karşılanmaktadır ve tahıllar içerisinde buğday, oldukça önemli bir besin kaynağı olarak tüketilen proteinin de büyük bir kısmını karşılamaktadır. Tarımsal üretimde verimi arttıran çevre faktörleri çoğu zaman ona zarar veren mikroorganizmaların da gelişmesi için uygun koşulları sağlamaktadır. Bu nedenle verimi ve ürünün kalitesini yükseltmek için bu mikroorganizmaların yol açtığı hastalıklarla mücadele etmek zorunludur.

Bu çalışmada amaç, sarı pasa dayanıklı ve duyarlı bazı ekmeklik buğday genotipleri arasında pasa dayanıklılık açısından DNA düzeyinde genetik farklılıkların ve benzerliklerin araştırılarak genetik uzaklığın saptanmasıdır. Sarı pasa dayanıklı ve duyarlı olan bu genotiplerin arasındaki genetik ilişki SSR (Simple sequence repeat) ve RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) markörlerinin kullanılması ile incelenerek belirlenmeye çalışılmıştır.

Araştırmada sarı pasa duyarlı üç yerli çeşit ile üç dayanıklı tek gen hat melezlenmiş, ebeveynler ile bunların F_1 ve F_2 dölleri üzerinde RAPD ve SSR moleküler markörleri kullanılarak genetik analizleri yapılmıştır. Çalışmanın RAPD analizleri kısmında ebeveynlerde 40 , F_1 ve F_2 dölllerinde ise 10 primer kullanılmıştır. .Çalışmanın SSR analizleri ise forward ve reverse olmak üzere 5 SSR primeri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Yapılan her iki moleküler markör analizi sonucunda sarı pasa duyarlı çeşitler ile dayanıklı hatlar arasındaki genetik benzerlik ve farklılıklar moleküler düzeyde ortaya konmuştur.

Ayrıca bu çalışmayla moleküler markör kullanımının dayanıklılık ıslahındaki önemi ve gerekliliği birkez daha vurgulanmıştır.

Anahtar Kelimeler: RAPD markörleri , SSR markörleri, buğday, sarı pas

ABSTRACT

RESEARCH ON MOLECULAR MARKERS RELATED TO IDENTIFIED STRIPE RUST RESISTANCE GENES IN WHEAT

FURAN M. ALP

Ph. D. Thesis. Field Crops Department

Supervisor: Prof. Dr. Süer YÜCE

October 2007, 198 sayfa

Cereals have greatest planting area and production within the plants that are cultivated in the world. An important amount of the yearly protein need of humans and animals are supplied by the cereals and among them wheat stands as a resource of food providing protein with the humans. The environmental factors that increase the efficiency of the agricultural production also provide the proper conditions for the development of the microorganism that often destructs the wheat. Therefore, in order to increase the efficiency and the quality of the product, the diseases caused by such microorganisms must be fought.

The aim of this study to determine genetic distance and differences search at the DNA level according to resistance and susceptible to stripe rust between some of bread wheat genotypes. The genetic relationship between of resistance and susceptible genotype is going to be worked on determine using molecular analysis.

In this research project, three susceptible to stripe rust local variety was crossed with three resistance single gene lines and, genetic analysis

were made using the RAPD and SSR markers on parents with their F₁ and F₂ offsprings. In the part of the RAPD analysis of this study , 40 primers were used for parents and 10 primers for F₁ and F₂ offsprings to. on the other hand 5 primers were used to be forward and reverse in the part of SSR analysis.

As a result of either molecular markers analysis were displayed differences and similarities between susceptible vareties and resistance lines to stripe rust

Furthermore had been to emphasized importance of using molecular marker thanks to this study

Key Words: RAPD markers, SSR markers, wheat, yellow rust

TEŞEKKÜR

Beni öğrencisi olarak kabul edip, bana kendisiyle birlikte alıŐma Őansını tanıyan ve bu sũre içerisinde bilgi ve deneyimlerini sevgi ve anlayıŐıyla harmanlayarak her tũrlũ desteği sağlayan sayın hocam Prof. Dr. Sũer Yũce'ye, çalıŐmamın laboratuvar aşamasında karŐılaŐtıđım gũlũklerde sabırlı ve sevecen yaklaŐımıyla yardımlarını esirgemeyerek değerli fikirlerini benimle paylaŐan , sayın Prof. Dr. Gũldehen Bilgen'e, teknik detaylarda yũnlendirici fikirlerinden dolayı Doç. Dr. Hũlya İlbi'ye tezimin her aşamasında bana yardımcı olan çalışma arkadaŐlarıma ve koşullar ne olursa olsun beni desteklemekten vazgeçemeyen aileme ve dostlarıma teŐekkũr ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	V
ABSTRACT.....	VII
TEŞEKKÜR.....	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	XV
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	XVIII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	XIX
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	6
2.1. Dayanıklılık Islahı.....	6
2.2. Pas Hastalıkları	10
2.2.1. Etmenin Tanımı ve Yaşayışı	10
2.2.2. Hastalığın Belirtileri, Ekonomik Önemi ve Yayılışı.....	12
2.2.3. Konukçuları.....	13
2.2.4. Mücadelesi.....	14
2.2.4.1. Kültürel Önlemler.....	14
2.2.4.2. Uygulamanın Değerlendirilmesi.....	14
2.3. Sarı Pas.....	22
2.4. Moleküler Markörler.....	32
2.4.1. RAPD.....	36
2.4.2. SSR (Mikrosatellitler)	48

İÇİNDEKİLER (Devam)

3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	54
3.1. Materyal.....	54
3.1.1. Bitki Materyali.....	54
3.1.2. Deneme Yerinin Özellikleri.....	61
3.1.3. İklim Durumu.....	63
3.2. Yöntem.....	65
3.2.1. Bitkilerin yetiştirilmesi	65
3.2.2. Melezlemeler.....	65
3.2.3. DNA Analizleri.....	74
3.2.3.1. DNA İzolasyonu.....	75
3.2.3.2. DNA Miktar Tayini.....	76
3.2.3.3. PCR İşlemi (Polimeraz Zincir Reaksiyonu).....	77
3.2.3.4. RAPD Markörleri	78
3.2.3.4.1. Agaroz Jel Elektrofrezisi	80
3.2.3.4.2. Agaroz Jelin Boyanması.....	82
3.2.3.4.3. Fotoğraf Çekimi	82
3.2.3.4.4. DNA bantlarının değerlendirilmesi.....	82
3.2.3.5. SSR Markörleri.....	84

İÇİNDEKİLER (Devam)

3.2.3.5.1. Agaroz Jel Elektroforezi	85
3.2.3.5.2. Agaroz Jelin Boyanması	87
3.2.3.5.3. Fotoğraf Çekimi	87
3.2.3.5.4. DNA bantlarının değerlendirilmesi.....	87
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	89
4.1. Ebeveynlere ait DNA Analizleri.....	90
4.1.1. Cumhuriyet-75 x 02 nolu hat (Lee) kombinasyon generasyonlarına (F ₁ ve F ₂) ait DNA Analizleri	118
4.1.2. F ₂ generasyonunun RAPD sonuçları	119
4.1.2. F ₂ generasyonunun SSR sonuçları	163
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	180
KAYNAKLAR DİZİNİ	185
ÖZGEÇMİŞ.....	198

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1...: buğday yaprağın da sarı pas enfeksiyon tipleri	19
Şekil 2.2. pas sporlarının doğadaki gelişimi ve yayılımı.....	20
Şekil: 2.3. pas sporlarının yaprak üzerindeki şiddetinin % 'lik oranları	21
Şekil:2.4:Sarı pas sporlarının yaprak ve başak üzerindeki görünümleri	24
Şekil:2.5: Sarı pas sporlarının yaşam çemberi.....	25
Şekil 2.6 Genetik Markörler (Köhler, 1997'den değiştirilerek)	35
Şekil 3.1: Deneme tarlasının genel görünümü (orijinal)	62
Şekil 3.2: Melezlemede tozlama aşaması (orijinal).....	67
Şekil 3.3: Melezlemede tozlama aşaması (orijinal).....	68
Şekil 3.4: Melezlemede tozlama aşaması (orijinal).....	68
Şekil 3.5: Araştırma materyalinin serada yetiştirilmesi (orijinal)	69
Şekil 3.6: Araştırma materyalinin serada yetiştirilmesi (orijinal)	70
Şekil 3.7: Araştırma materyalinin serada yetiştirilmesi (orijinal).....	70
Şekil 3.8:Yaprak örneklerinin ependorf tüplerinde – 20 ⁰ C de muhafazası(orijinal).....	72
Şekil 3.9: DNA kalite ölçümleri için %1'lik agaros jel elektroforezi (orijinal).....	73
Şekil 3.10 DNA kalite ölçümleri için %1'lik agaros jel elektroforezi (orijinal).....	73
Şekil 3.11 : λ DNA Hind III /Eco R1	81
Şekil 3.12 : 100bp. DNA ladder	86
Şekil 4.1: Ebeveynlere ait DNA Kalitesi	92
Şekil 4.2: OPA-14 primerinin RAPD sonuçları	
Şekil 4.3: OPA-15 primerinin RAPD sonuçları	
Şekil 4.4: OPA-17 primerinin RAPD sonuçları	93
Şekil 4.5: OPA-18 primerinin RAPD sonuçları	
Şekil 4.6: OPA-19 primerinin RAPD sonuçları	94
Şekil 4.7: OPA-20 primerinin RAPD sonuçları	
Şekil 4.8 OPB-01 primerinin RAPD sonuçları.....	95
Şekil 4.9: OPB-02 primerinin RAPD sonuçları	
Şekil 4.10: OPB-03 primerinin RAPD sonuçları.....	96
Şekil 4.11: OPB-04 primerinin RAPD sonuçları	
Şekil 4.12: OPB-05 primerinin RAPD sonuçları.....	97

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 4.13: OPB-11 primerinin RAPD sonuçları	
Şekil 4.14: OPB-12 primerinin RAPD sonuçları	98
Şekil 4.15: OPB-14 primerinin RAPD sonuçları	
Şekil 4.16: OPB-17 primerinin RAPD sonuçları	99
Şekil 4.17: OPC-01 primerinin RAPD sonuçları	
Şekil 4.18: OPC-03 primerinin RAPD sonuçları	100
Şekil 4.19: OPC-05 primerinin RAPD sonuçları	
Şekil 4.20: OPC-06 primerinin RAPD sonuçları	101
Şekil 4.21: OPC-07 primerinin RAPD sonuçları	
Şekil 4.22: OPC-08 primerinin RAPD sonuçları	102
Şekil 4.23: OPD-12 primerinin RAPD sonuçları	
Şekil 4.24: OPD-15 primerinin RAPD sonuçları	103
Şekil 4.25: OPE-07 primerinin RAPD sonuçları	
Şekil 4.26: OPF-03 primerinin RAPD sonuçları	104
Şekil 4.27: OPG-01 primerinin RAPD sonuçları	
Şekil 4.28: OPG-02 primerinin RAPD sonuçları	105
Şekil 4.29: OPG-13 primerinin RAPD sonuçları	
Şekil 4.30: OPQ-12 primerinin RAPD sonuçları	106
Şekil 4.31: OPQ-15 primerinin RAPD sonuçları	
Şekil 4.32: OPR-02 primerinin RAPD sonuçları	107
Şekil 4.33: OPT-20 primerinin RAPD sonuçları	
Şekil 4.34: OPU-07 primerinin RAPD sonuçları	108
Şekil 4.35: OAC-12 primerinin RAPD sonuçları	
Şekil 4.36: OAE-10 primerinin RAPD sonuçları	109
Şekil 4.37: OAF-20 primerinin RAPD sonuçları	
Şekil 4.38: OAG-04 primerinin RAPD sonuçları	110
Şekil 4.39: OAG-18 primerinin RAPD sonuçları	
Şekil 4.40: OAN-08 primerinin RAPD sonuçları	111
Şekil 4.41: OAN-12 primerinin RAPD sonuçları	112
Şekil 4.42: Ebeveyn genotiplerine ait dendrogram	113
Şekil 4.43: OPB-01 primerinin RAPD sonuçları I	120
Şekil 4.44: OPB-01 primerinin RAPD sonuçları II	121
Şekil 4.45: OPB-01 primerinin RAPD sonuçları III	122
Şekil 4.46: OPB-01 primerinin RAPD sonuçları IV	123

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 4.47: OPB-03 primerinin RAPD sonuçları I	124
Şekil 4.48: OPB-03 primerinin RAPD sonuçları II	125
Şekil 4.49: OPB-03 primerinin RAPD sonuçları III.....	126
Şekil 4.50: OPB-03 primerinin RAPD sonuçları IV	127
Şekil 4.51: OPB-05 primerinin RAPD sonuçları I	128
Şekil 4.52: OPB-05 primerinin RAPD sonuçları II	129
Şekil 4.53: OPB-05 primerinin RAPD sonuçları III	130
Şekil 4.54: OPB-05 primerinin RAPD sonuçları IV	131
Şekil 4.55: OPB-11 primerinin RAPD sonuçları I	132
Şekil 4.56: OPB-11 primerinin RAPD sonuçları II	133
Şekil 4.57: OPB-11 primerinin RAPD sonuçları III	134
Şekil 4.58: OPB-11 primerinin RAPD sonuçları IV	135
Şekil 4.59: OPC-07 primerinin RAPD sonuçları I	136
Şekil 4.60: OPC-07 primerinin RAPD sonuçları II	137
Şekil 4.61: OPC-07 primerinin RAPD sonuçları III	138
Şekil 4.62: OPC-07 primerinin RAPD sonuçları IV	139
Şekil 4.63: OPD-12 primerinin RAPD sonuçları I	140
Şekil 4.64: OPD-12 primerinin RAPD sonuçları II	141
Şekil 4.65: OPD-12 primerinin RAPD sonuçları III	142
Şekil 4.66: OPD-12 primerinin RAPD sonuçları IV	143
Şekil 4.67: OPG-02 primerinin RAPD sonuçları I	144
Şekil 4.68: OPG-02 primerinin RAPD sonuçları II.....	145
Şekil 4.69: OPG-02 primerinin RAPD sonuçları III	146
Şekil 4.70: OPG-02 primerinin RAPD sonuçları IV	147
Şekil 4.71: OPAG-04 primerinin RAPD sonuçları I	148
Şekil 4.72: OPAG-04 primerinin RAPD sonuçları II.....	149
Şekil 4.73: OPAG-04 primerinin RAPD sonuçları III	150
Şekil 4.74: OPAG-04 primerinin RAPD sonuçları IV	151
Şekil 4.75: OPAE-10 primerinin RAPD sonuçları I.....	152
Şekil 4.76: OPAE-10 primerinin RAPD sonuçları II	153
Şekil 4.77: OPAE-10 primerinin RAPD sonuçları III.....	154
Şekil 4.78: OPAE-10 primerinin RAPD sonuçları IV.....	155
Şekil 4.79: OPAN-12 primerinin RAPD sonuçları I	156

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 4.80: OPAN-12 primerinin RAPD sonuçları II	157
Şekil 4.81: OPAN-12 primerinin RAPD sonuçları III	158
Şekil 4.82: OPAN-12 primerinin RAPD sonuçları IV	159
Şekil 4.83 Cumhuriyet-75 x 02 nolu hat kombinasyonunun F_1 ve F_2genotiplerine ait RAPD dendrogramı	162
Şekil 4.84: WMC-24(F+R) primerinin sonuçları I	164
Şekil 4.85: WMC-24(F+R) primerinin sonuçları II	165
Şekil 4.86: WMC-24(F+R) primerinin sonuçları III	166
Şekil 4.87: WMC-24(F+R) primerinin sonuçları IV	167
Şekil 4.88: WMC-25(F+R) primerinin sonuçları I	168
Şekil 4.89: WMC-25(F+R) primerinin sonuçları II	169
Şekil 4.90: WMC-27(F+R) primerinin sonuçları I	170
Şekil 4.91: WMC-27(F+R) primerinin sonuçları II	171
Şekil 4.92: WMC-41(F+R) primerinin sonuçları I	172
Şekil 4.93: WMC-41(F+R) primerinin sonuçları II	173
Şekil 4.94: WMC-41(F+R) primerinin sonuçları III	174
Şekil 4.95: WMC-43(F+R) primerinin sonuçları I	175
Şekil 4.96: WMC-43(F+R) primerinin sonuçları II	176
Şekil 4.97: WMC-43(F+R) primerinin sonuçları III	177
Şekil 4.98 Cumhuriyet-75 x 02 nolu hat kombinasyonunun F_1 ve F_2 . genotiplerine ait SSR dendrogramı	179

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 3.1: Sarı pasa dayanıklı tek gen hatlar	54
Çizelge 3.2: Araştırma Yeri Toprağının Bazı Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	63
Çizelge 3.3: Bornova iklim verileri (2003-2006 yılları ve çok yıllık .ortalamaları)	64
Çizelge 3.4: DNA İzolasyon Tamponu [Doyle and Doyle (CTAB)	75
Çizelge 3.5: PCR Reaksiyonunda Kullanılan RAPD Primerleri ve Baz Dizilişleri	78
Çizelge 3.6: RAPD için PCR Amplifikasyonu döngüleri	80
Çizelge 3.7: PCR Reaksiyonunda Kullanılan SSR Primerleri ve Baz Dizilişleri	84
Çizelge 3.8: SSR için PCR Amplifikasyonu döngüleri	85
Çizelge 4.1 RAPD bantları bakımından ebeveynlerin benzerlik oranları	115
Çizelge 4.2 RAPD bantları bakımından ebeveynlerin farklılık oranları	116

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

Açıklama

bp	Base pair-baz çifti
°C	Santigrad derece
cM	Centimorgan
cm	Santimetre
g	Gram
kg	Kilogram
kg/da	Kilogram/dekar
l	Litre
M	Molarite (Mol)
mA	Miliamper
Mbp	Mega base pair
ml	Mililitre
mM	Mili molar
µl	Mikrolitre
ng	Nanogram
pg	Pikogram
ppm	Part per million - milyonda bir kısım
rpm	Rotation per minute - dakikadaki dönüş sayısı
V	Volt
v/v	Volume/volume
W	Watt

Kısaltmalar

Açıklama

A	Adenin
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
ALP	Amplicon Length Polymorphism
AP-PCR	Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction
AS-PCR	Allele Specific Polymerase Chain Reaction
BSA	Bulk Segregant Analysis
C	Cytosin
CAPS	Cleaved Amplified Polymorphic Sequence
CIMMYT	International Maize and Wheat Improvement Center

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (Devam)

Kısaltmalar Açıklama

CTAB	Hexadecyltrimethylammonium bromide
DAF	DNA Amplification Fingerprinting
DNA	Deoxyribonucleic Acid
dNTP	Dinucleotide triphosphate
G	Guanin
ISA	Inter-Simple Sequence Repeat Amplification
Lr	Leaf rust
MAS	Marker Assisted Selection
MP-PCR	Microsatellite Primed Polymerase Chain Reaction
MW	Molecular Weight
NIL	Near Isogenic Line
QTL	Quantitative Trait Loci
PCR	Polymerase Chain Reaction
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
SCAR	Sequence Characterized Amplified Regions
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
Sr	Stripe rust
SSR	Simple Sequence Repeat
STS	Sequence-Tagged Site
T	Thymin
TBE	Tris-Borik asit-EDTA
Tc	Thatcher
TE	Tris-EDTA

1.GİRİŞ

Tahıllar dünyada kültürü yapılan bitkiler içerisinde en fazla ekim alanına ve üretime sahiptir. İnsan ve hayvanlar tarafından tüketilen yıllık protein miktarının yaklaşık % 50'sini karşılamaktadırlar (Çölkesen, 1995). Tahıllar içerisinde buğday, tüketilen proteinin yaklaşık % 40'ını sağlamaktadırlar .

Tarımsal üretimde verimi arttıran çevre faktörleri çoğu zaman ona zarar veren mikroorganizmaların da gelişmesi için uygun koşulları sağlamaktadır. Örneğin ülkemizde yüksek yağış verimin artmasını sağlayan en önemli etkidir. Ancak hastalık etmenleri de nemli ortamlarda daha iyi geliştiğinden, yüksek yağıştan dolayı beklenen verim artışı çoğu zaman gerçekleşmemektedir. Bu nedenle verimi ve ürünün kalitesini yükseltmek için bu mikroorganizmaların yol açtığı hastalıklarla mücadele etmek zorunludur.

Bugün için hastalıklarla savaşın en ekonomik, en kesin yolu dayanıklı çeşitler geliştirilerek, bunların üretilmesidir. Çeşit ıslahında yüksek verim, yüksek kalite, kışa ve kurağa dayanıklılığın yanında hastalıklara karşı dayanıklılık en önemli hedefler arasında yer almaktadır. Ancak herhangi bir hastalığa karşı dayanıklı olarak geliştirilen bazı çeşitler bir süre sonra hastalanabilmektedir. Bunun nedeni başka ortamlardan aynı hastalığın değişik ırklarının taşınması veya o bölgede mutasyon ve rekombinasyonla farklı ırkların oluşması ve bu çeşidin bu yeni ırklara karşı dayanıklılık geni taşımamasıdır. Bu nedenle dayanıklılık ıslahı çalışmaları devamlı olmalı ve hastalık etmeninin fizyolojik değişimi yakından izlenmelidir. Yeni dayanıklı çeşitler geliştirilmeli veya yüksek verimli mevcut çeşitlere dayanıklılık geni aktarılmalıdır

Hastalık ve zararlılar epidemisi yıllarında tarım ürünlerinde büyük zararlar yapmakta, hatta tarım ürünlerinin yok olmasına neden olmaktadır. Bunun dışında normal koşullarda da yine belirli oranlarda ürün kaybı görülmektedir. Bu nedenle her ıslahçı kendi programlarında bir veya birkaç hastalığa karşı dayanıklılık çalışmalarına yer verir (Demir ve ark. 1999 a).

Kültür bitkilerini çeşitli hastalık ve zararlılardan korumak için bir çok yöntem bulunmasına rağmen bakteri ve fungus kökenli hastalıkların oluşturduğu tehdit oldukça büyük boyutlardadır. Kültür bitkilerinin ıslahı çalışmalarında benzer genetik materyalin kullanılması bitkiyi hastalığa dayanıksız duruma getirerek zararın boyutunu arttırmaktadır. Hastalıklardan dolayı meydana gelen ürün kaybının dünyadaki toplam ürün içerisindeki payının %12 civarında olduğu ve bu kaybın parasal olarak yıllık yaklaşık 42 milyar dolar civarında olduğu sanılmaktadır (Kazan ve Gürel 2001).

Bitki patojenlerine karşı savaşta, patojenlerin yaşam şekli ve bitkiye nasıl enfekte olduklarının bilinmesi yapılan mücadelede nasıl bir yöntem uygulanması gerektiğine karar verilmesi açısından oldukça büyük önem arz etmektedir.

Dünyada patojenin genetiği hakkında ilk bilgi 1905 yılında buğdayda sarı pasa aittir. Sarı pasa dayanıklı ve duyarlı çeşitler aralarında melezlenince F₂ generasyonunda 3 duyarlı ve 1 dayanıklı biçimde açılma görülmüştür. Bunu izleyen generasyonlarda yapılan gözlemlere dayanarak buğdayda sarı pasa karşı dayanıklılığın bir tek resesif gen tarafından belirlendiği ortaya konmuştur (Demir ve ark. 1993).

1767 de İtalyan Fontana ve Tozzetti birbirlerinden bağımsız olarak kara pasla ilgili ilk detaylı raporu net bir şekilde açıklamışlardır. 1797 de Persoon buğday kara pasına neden olan organizmayı *Puccinia graminis*

olarak isimlendirmiştir. 1946'da Chester paslar üzerine yayınlanmış ilk detaylı literatür tarihçesini sunmuştur. Dünyadaki ilk kayıtlarda buğday yaprak pası kara pastan ayırt edilememiştir. Bununla beraber 1815'de Candolle buğday yaprak pasının farklı bir mantardan kaynaklandığını göstermiş ve bunu *Uredo rubigo-vera* olarak tarif etmiştir. Patojenin ismi 1956'da Cummins ve Caldwell'in *P. recondita* önerisine kadar değişmemiştir ki bu günümüzde de genel olarak kullanılan terminolojidir. 1777'de buğday sarı pasını ilk Gadd belirlemiş olmasına rağmen 1896'da, Eriksson ve Henning sarı pasın farklı bir patojenden kaynaklandığını göstermişler ve onlar *P. striiformis* olarak yeniden adlandırmışlardır (Roelfs et al., 1992).

Ülkemizde en yaygın olan pas hastalığı sarı pas hastalığıdır. Epidemi olduğu yıllarda özellikle hastalığa hassas çeşit ekildiğinde %30-40'lara varan verim kaybına neden olmaktadır. Verim kaybının yanında tanelerin kırışık ve cılız olmasına yol açtığı için kalite değerini de azaltmaktadır. Kıştan sonra havaların yağışlı, rutubetli ve serin geçtiği yerlerde daha fazla zarar yapar.

En etkili ve ekonomik kontrol şekli dayanıklı çeşit kullanımındır. Kimyasal kullanımı pahalı bir yoldur ancak genetik bir materyalin korunması amacıyla uygulanabilir.

Bu nedenle dayanıklı ıslah çeşitlerinin geliştirilmesi büyük önem taşımaktadır.

Bitki ıslahında genetik çalışma materyalinin tanımı büyük önem taşımaktadır. İşte bu noktada moleküler markörler bitki ıslahında kalitatif ve kantitatif karakterler için yapılacak markörlere dayalı seleksiyonda geniş bir kullanım alanına sahiptir. Ayrıca bu markörlerden genetik ve linkage

haritalamalarında, çeşit tanımlanmasında, F₁ hibrid tohumluklarının safiyet kontrolünde, genotipler arası genetik uzaklıkların ve çeşitliliğin belirlenmesinde yararlanılmaktadır (Demir ve ark. 1999a).

Kalıtım şekilleri, morfolojik, biyokimyasal ve DNA düzeyinde izlenebilen karakterlere genetik markörler denir. Bu karakterlerin markör olarak isimlendirilmesinin sebebi, incelenen organizmadaki ilgilenilen diğer özellikleri hakkında dolaylıda olsa bilgi sağlamalarıdır. Moleküler markörler DNA'nın aktif bölgeleri olan genlerden veya kodlama fonksiyonu bulunmayan DNA dizilerinden geliştirilebilirler (Yıldırım ve Kandemir, 2001).

Teorik olarak genomun her noktasını temsil eden DNA markörleri yardımıyla günümüzde birçok kültür bitkisinin linkage haritası çıkarılmıştır. Böylelikle arzulanan genlerin takibi ve seleksiyonu mümkün hale gelmiştir (Yıldırım ve Kandemir, 2001).

Moleküler DNA markörlerinin bitki ıslahına entegrasyonu, arzulanan genlerin çeşitler veya türler arasındaki hareketini hızlandırmasının yanı sıra akraba yabancı türlerden yeni genlerin aktarılmasına izin vermiş ve çok gen tarafından idare edilen karmaşık karakterlerin incelenmesini mümkün kılmıştır. Ayrıca genlerin klonlanmasını kolaylaştırmış ve birbiriyle çaprazlanamayan bitkiler arasındaki genetik ilişkileri açığa çıkarmıştır (Yıldırım ve Kandemir, 2001).

Moleküler markör tekniklerinden biri olan ve Williams et al.(1990) tarafından geliştirilen RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) metodu, çeşitlerin DNA parmak izlerinin çıkarılmasında kolaylık

sağlamaktadır. Prensipte olarak rastgele bir primerin DNA'nın farklı bölgelerinin çoğaltılması esasına dayanan bu metod sonucunda genotiplere özgü bant desenleri elde edilmektedir. Bu bant desenleri çeşitlere özgü olması nedeniyle çeşitlerin safiyetlerinin saptanmasında, genotiplerin tanımlanmasında ve genetik uzaklıkların hesaplanmasında kullanılmaktadır. Bir diğer PCR temelli moleküler DNA markörü olan SSR (Simple Sequence Repeat) basit dizi tekrarları olarak da adlandırılmaktadırlar. SSR veya mikrosatelitler ökaryotik genomlar boyunca dağılmış bulunan ve ardışık olarak tekrarlanmakta olan 2-6 nükleotid gruplarından oluşmaktadır. Mikrosatelitleri çevreleyen DNA dizileri genellikle aynı türün bireyleri arasında korunmuş olduklarından, farklı genotiplerde çalışan SSR'ların PCR primerleri ile çoğaltılarak seçimine izin vermektedir. (Yıldırım ve Kandemir, 2001). Tekrarlanan DNA dizileri çok yakın tür ve çeşitler arasında dahi tekrar sayıları olarak, değişikliğe yol açan mutasyonlar sebebiyle farklılıklar göstermektedir (Gupta et al., 1994). Ortaya çıkan bu polimorfizm, SSR'ları çevreleyen korunmuş DNA dizilerinin primer olarak kullanılmasına imkan tanımakta ve PCR metodu vasıtasıyla bir lokustaki farklı alleller tespit edilebilmektedir.

Bu çalışmanın amacı; CIMMYT'den temin edilmiş sarı pasa dayanıklı hatlar ile sarı pasa duyarlı 3 ticari çeşit arasında, ekmeklik buğdaylarda pasa dayanıklılık açısından DNA düzeyinde genetik farklılıkların ve benzerliklerin araştırılarak genetik uzaklığın saptanmasıdır. Pedigrileri bilinen dayanıklı hatlar ve duyarlı olan bu çeşitlerin aralarında yapılacak melezlemeler ile F₂ populasyonuna kadar götürülecek olan genetik analizlerde sarı pasa dayanıklı hatlar ve duyarlı çeşitler arasındaki genetik ilişki moleküler düzeyde RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) ve

SSR (Simple Sequence Repeat) markörlerinin kullanılması ile incelenerek belirlenmeye çalışılmıştır.

2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1 Dayanıklılık Islahı

Dünyanın hemen her yerinde bitki patojenleri tahıl üretimini sınırlayıcı en önemli etmenler arasındadır. Tarımcılar bunlardan kaynaklanan önemli ürün kayıplarını en aza indirmek amacıyla hastalık kontrol mekanizması geliştirmeye yönelik yoğun çalışmalar yapmışlardır. Hastalığın üç temel belirleyicisinden (patojen, konukçu ve çevre) yalnızca konukçunun özellikleri ve bir dereceye kadar çevre değiştirilebilir. Bu nedenle hastalık kontrolü mekanizması esas olarak iki kategoriye ayrılır: 1) çevrede değişiklik yaparak patojen için daha az uygun hale getirmek (zehirli kimyasal madde kullanmak, yetiştirme tekniklerini değiştirmek vb.) 2) bitkinin genetik yapısını değiştirerek (ıslah yöntemleriyle) onu konukçu olarak daha az uygun hale getirmek.

Tahıl pasları ile bunların konukçuları arasındaki interaksiyon, patojen ile konukçu arasında, hastalığın görüntüsüne de yansıyan çok yakın bir ilişkinin varlığını ve hastalık nedeniyle olabilecek ürün kayıplarının bitki ıslahı yoluyla düşük bir düzeye indirebilme olasılığı olduğunu göstermektedir. Geniş olarak düşünüldüğünde entegre kontrol planlarının güçlü bir dayanıklılık temeli üzerine kurulabileceği görülmektedir.

Tahıllarda hastalıklara neden olan bir çok organizma içinde en önemli ve verimi sınırlayıcı olanlar patojenik mantarlardır. Bunlardan

puccinia (pas), ustilago (rastık), tilletia (sürme), erysiphe (külleme) septoria (septorya), alternaria (alternarya), helminthosporium (helmintosporium), fusarium (fuzaryum) ve pythium (pityum) en yaygın olanlardır. Sık görülürler ve dünya çapında potansiyel tehlikedirler. Bu hastalıkların dağılışı ve nispi önemi üzerinde yapılan çalışmalar, özellikle buğdayda olmak üzere pasların diğerlerinden daha fazla önemli olduğunu göstermiştir. *Puccinia graminis* (sap pası yada kara pas), *Puccinia recondita* (yaprak pası yada kahverengi pas), *Puccinia striiformis* (şeritli pas yada sarı pas) *Puccinia hordei* (yaprak pası, bodurlaşma yapar) ve *Puccinia coronata* (taç pası) düzenli olarak buğday, arpa, yulaf ve çavdarda önemli kayıplara neden olmaktadır. Dünyanın önemli tahıl üretici ülkelerinde verimliliği kısıtlamadaki büyük rolleri nedeniyle paslar özel ve detaylı bir dikkat gerektirmektedir (Kınacı, 1992).

Ekosistem içinde patojen çok farklı bitki genotipleri ile karşı karşıyadır. Diğer taraftan bitkinin vegetatif dokuları da çok çeşitlidir. Bu nedenle patojen, konukçu bitkinin büyüme çemberine uyum göstermelidir. Patojenin konukçuya uyum sağlaması için patojenin özelleşmesi gerekir ve bitkinin koruma sistemini kırabilmelidir. Bu uyum olayında patojen az veya çok özelleşir. Az özelleşmesi halinde patojenin çok sayıda konukçusu vardır ve bunların teker teker konukçulara etkinliği azdır. Yüksek derecede özelleşmede ise çok yakın akraba olan konukçuları hastalandırır ve onlar da obligatif parazittir ve bunların parazit etkinliği yüksektir. Bunların hepsi patojenle konukçunun birbirine karşı koevolusyonudur.

Koevolusyon derecesi değişir. Bitkilerin bazı koruma mekanizmaları patojenlerin adaptasyonu ile diğerlerinden daha çabuk

yıkılır. Kimyasal koruma sistemleri morfolojik olanlardan daha çabuk ortadan kalkar. Yıkılmayan koruma mekanizması yok gibidir.

Mukavemet ve patojenitenin sınıflandırılması konukçu ve patojenin mukavemet ve saldırganlık durumuna ve onların özelleşme seviyelerine bağlıdır. Mukavemet ve patojenitenin derecesi hastalık olayı ile hastalık şiddetine bağlıdır ve bitkide zarar tespiti diğer yöntemlerle saptanır. Bir denemede çok sayıda patojenle enfekte edilirse ortaya çıkan genetik varyasyon ya bağımlı veya bağımsız olur. Mukavemette bağımlı varyasyon bitkinin mukavemetinde kullanılan izolata bağlıdır. Bu durumda çeşitli izolatlar arasında sıkı bir interaksiyon vardır. Bağımsız genetik varyasyonda ise çeşitle izolatlar arasında bir interaksiyon yoktur. Çeşitlerin mukavemeti izolatlardan etkilenmez. Bağımlı genetik varyasyon spesifik varyasyon, bağımsız genetik varyasyon ise spesifik olmayan varyasyondur. Bu aynı zamanda ırka spesifik ve ırka spesifik olmayan Patojenitedir. dikey ve yatay mukavemet terimleri özelleşmiş ve özelleşmemiş mukavemet terimleriyle aynı anlama gelir (Demir 1993).

Bitkilerde hastalık oluşturan fungus kökenli etmenlerin bitki hücrelerini enfekte etme yolları da bir fungustan ötekine değişim gösterir. Bazı fungal hastalık etmenleri bitki yüzeyindeki yaralanmış bölgelerden bitki içine girerken, bazıları doğrudan epidermis dokusunu delerek bitki içine girer. Hastalık etmeni funguslar bu bakımdan nekrotrof ve biyotrof olmak üzere iki gruba ayrılır. Nekrotrof grubuna giren patojenler kendi sentezledikleri enzim ve toksinleri kullanarak genelde hücreler arası boşluklara yerleşir. Bu gruba giren patojenler bitki hücre ve dokularını kısa sürede öldürerek nekrotik bölgelerin ortaya çıkmasına neden olurlar.

Biyotrof olan patojenler (pas, külleme veya solgunluk hastalığı etmenleri gibi) doğrudan bitki epidermis dokusunu delerek veya stomaları kullanarak hücreleri enfekte ederler. Bu tür patojenlerin enfeksiyon esnasında salgıladığı enzimler bitki hücre duvarının yapısını eritici niteliktedir. Hücre içine giren hastalık etmeni, bitkiden karbonhidrat ve öteki besin maddelerini alarak beslenir. Bununla beraber biyotrofik patojenler bitki besin maddelerini kendi beslenmelerinde kullandıkları için enfeksiyonun erken dönemlerinde bitki hücrelerini hemen öldürme yolunu da özellikle seçmezler.

Genetik mühendisliği yoluyla patojenlere dayanıklı bitki üretmek için şu genel yöntemler uygulanır:

1. Normalde o bitkide bulunmayan ve patojenlere karşı doğrudan toksik etkide bulunacak genlerin bitkiye aktarılması
2. Normalde bitkide bulunan ve patojen saldırısı sırasında uyarılan savunma genlerinin bitkiye aktarılarak daha yüksek düzeyde ifade edilmesi.
3. Özellikle fitoaleksinin sentezi aşamasında gerekli olan enzimleri kodlayan genlerin bitkiye aktarılması.
4. Patojenin salgıladığı ürünleri (toksinler, hücre duvarını yıkıcı enzimler vb.) yok edici proteinleri sentezleyecek yeni genlerin bitkiye aktarılması (Kazan ve Gürel. 2001).

2.2. Pas Hastalıkları

2.2.1. Etmenin Tanımı Ve Yaşayışı

a. Sarı pas: Etmenin üredosporları (yazlık sporlar) yuvarlak veya oval, çeperleri dikenli, üç veya dört adet olan poruslar (delik) ise yüzey üzerine dağılmıştır. teliosporlar (kışlık spor) ise uzunca, hücre çeperi kalın ve düz iki hücreli, bu hücreler arası hafif boğumludur. Hastalık buğday tarlalarında ilkbaharda hava sıcaklığının 10-15°C (optimum: 11 °C) olduğu zaman görülmeğe başlar. Yaprakların üst yüzeylerinde makina dikişine benzer şekilde püstüller oluşur. Sıra veya sıralar üzerine dizilmiş noktacıklar biçiminde olan bu püstüllerin içinde etmenin yazlık sporları meydana gelir. Bu püstüller limon veya portakal rengindedir. İlkbaharda bu püstüllerden oluşan milyonlarca yazlık spor rüzgarla çevreye dağılır. Uygun koşullarda taşındığı buğday bitkilerini enfekte ederek yeni püstüller oluştururlar. Enfeksiyonların oluşumunda sıcaklık ve nem çok önemlidir. Üredosporların çimlenip konukçuya giriş yapabilmesi için % 100'e yakın orantılı neme veya yağışa gereksinimi vardır. Mevsim sonunda üredosporların yataklarından aynı püstüllerde teliosporlar oluşur. Etmen yazı, yüksek rakımlı bölgelerde canlı kalan yabancı buğdaygillerde, kışı ise güzlük ekilen buğdaylar üzerinde ürediospor veya ürediomisel halinde geçirir. Mantarın inkübasyon süresi 12-14 gündür. Ara konukçusu bilinmemektedir. Kışlık sporların hayat devresinde bir önemi bulunmamaktadır. b) Kahverengi pas: Etmenin yazlık ve kışlık sporları genelde sarı pasinkilere benzerler. Hastalık etmeni kışı ılıman geçen bölgelerde ve sahillerde ürediomisel veya üredospor halinde güzlük ekinlerde ve yaz ortasında taze yaprak veren yabancı graminelerde geçirir. İlkbaharda yazlık sporlarını oluşturarak

çoğalır ve rüzgarla yayılan sporlar, uygun koşullarda (yüksek nem ve 10-18°C sıcaklık) yeni enfeksiyonlara neden olurlar. Bu hayat devresinde kışlık sporların bir rolü yoktur. Bu etmenin yaşam çemberine bazan arakonukçu da girer. Bunlar *Isopyrum* (şeytan minaresi) ve *Thalictrum* (çayır sedefi) adındaki bitkilerdir. Kışı geçiren kışlık sporlar, ilkbaharda çimlenerek basidiosporları oluştururlar. Bunlar rüzgarla arakonukçulara ulaşarak onları enfekte ederler. Yapraklarda piknit ve esidiler meydana gelir. Esidilerde (*Aecia*) oluşan esiosporlar rüzgarla dağılarak buğdayları enfekte ederler ve sonra oluşan üredosporlarla yeni enfeksiyonlara neden olurlar. c. Kara pas: Hastalık etmeninin üredosporları elips şeklinde olup çevresi dikenlidir. Koyu portakal sarısı renklidir. Spor üstündeki porus denilen çimlenme delikleri karşılıklıdır. Kışlık sporu ise uzunca, iki hücreli, çeperi düz ve bir sapçık üzerindedir. Kara pas etmeni kışı hastalıklı bitki parçacıkları üzerinde kışlık spor (teliospor) formunda geçirir. Bunlar ilkbaharda (optimum 22°C sıcaklık ve % 96 üzerinde orantılı nemde) çimlenerek basidiosporları oluştururlar. Basidiosporlar, kara pasın arakonukçusu *Berberis* veya *Mahonia* bitkisi yapraklarına ulaştığında çimlenerek enfeksiyon yapar. Bir süre sonra yaprağın üst yüzünde piknia (*pycnia*) , alt yüzünde *aecia* adlı organları oluştururlar. *Aecia*'dan meydana gelen esiosporlar rüzgarla tahıl yaprak ve sapsarı üzerine taşınarak uygun koşullarda (5-18°C sıcaklık, % 100 civarında nem) çimlenerek, üredospor yatağı ve içinde yazlık sporlar meydana getirirler. Bu sporlar da tahıllara taşınarak uygun çevre koşullarında (5-25 °C çimlenme, 20°C enfeksiyon % 100 nem) onları hastalandırırlar. Yazlık sporlar uygun koşullarda devamlı çoğalarak epidemilere (salgınlara) neden olurlar. Buğday bitkilerinin olgunluk dönemine doğru,

sap ve yaprak dokuları üzerinde, siyah renkte kışlık sporlar oluşmaya başlar.

2.2.2. Hastalığın Belirtileri, Ekonomik Önemi ve Yayılışı

a. Sarı pas: En erken görülen pas türüdür. Tahılların yaprak, sap ve başaklarında görülebilirse de, esas görüldüğü yer yapraklardır. Yaprakların üst yüzeyinde makina dikişi şeklinde ve sarı renkte püstüller oluşur. Bu püstüllerin dizilişi bir çizgiyi andırdığı için bu pasa çizgi pası da denilir. Püstüller yazlık sporların üretildiği yerlerdir. Mevsim sonuna doğru yazlık sporların yerini siyah renkli kışlık sporlar alır. Hastalığın şiddetli olduğu yıllarda sporlar başakların kavuz ve kılçıkları üzerinde de görülebilir.

b.Kahverengi pas: Genellikle yapraklarda görülür ve bu nedenle yaprak pası olarak da isimlendirilir. Yazlık sporların içinde bulunduğu püstüller yaprak yüzeyine gelişi güzel dağılmış noktacıklar şeklindedir. Bunlar portakal sarısı veya yanık kahverengindedir. Hastalığın ilerlemesi ile püstüller üzerindeki epidermis parçalanır, ancak bu durum kara pas'taki kadar belirgin değildir. Bazan bu pas'ta bir esas püstül etrafında çepeçevre bir veya iki daire halinde daha küçük püstüller oluşur ki bu belirti özellikle kahverengi pas'ın tanımında önemlidir. Bu pas genellikle bitkilerde sarı pastan sonra karapastan önce görülür.

c.Kara pas: Buğdayın yaprak, sap ve başaklarında görülen bir hastalıktır. İlk belirtiler yaprak ve saplarda oldukça büyük, oval veya uzunca koyu portakal, çoklukla kiremit kırmızısı renkte püstüllerdir. Püstüllerin çevresindeki epidermis yırtılmış beyazımsı bir yaka şeklini almıştır. Dayanıklı çeşitlerde püstüller küçük ve çevreleri klorotik bir saha ile kaplanmışken, duyarlı çeşitlerde çoğu kere birbiriyle birleşmiş

bir çizgi görünümünde dir. Mevsim sonunda yazlık sporlar yerine koyu kahverenginden siyaha kadar değişen renkte kışlık sporlar oluşur.

2.2.3.Konukçuları

Buğday pas hastalığı etmenlerinin konukçuları kültür ve yabancı buğdaygil (özçimenler) bitkileridir. (Örneğin, san pasın konukçuları buğday dışında arpa, çavdar, özçimenler, kahverengi pasın konukçuları ise buğday dışında arpa ve özçimenlerdir. Bu ana konukçular yanında kahverengi ve kara pasın arakonukçuları da bulunmaktadır.

2.2.4.Mücadelesi

2.2.4.1.Kültürel Önlemler

Sık ekim yapılmamalıdır. Yabancı ot mücadelesi zamanında yapılmalı ve tarlaya normalin üzerinde azotlu gübre verilmemelidir. Paslara karşı dayanıklı buğday çeşitleri varsa tesbit edilip üretime verilmelidir. Tarla içinde ve çevrede paslarda yeni ırkların oluşumunda önemli bir etken olan arakonukçu bitkiler (Berberis. v.b.) tesbit edilerek imha edilmelidir.

2.2.4.2. Pas Uygulamasının Değerlendirilmesi:

Tarlanın köşegenleri doğrultusunda yürünerek, tesadüfen 100 bitkinin üstten itibaren üçüncü veya ikinci yaprağı alınır. Bu yaprakların her biri aşağıdaki 0-6 skalasına (geliştirilmiş Cobb skalası) göre incelenerek sınıflandırılır.

0 : Sağlam

1 : Yaprığın % 5'i püstüllerle kaplı

2 : Yaprığın % 10'u püstüllerle kaplı

3 : Yaprığın % 25'i püstüllerle kaplı

4 : Yaprığın % 40'ı püstüllerle kaplı

5 : Yaprığın % 65'i püstüllerle kaplı

6 : Yaprığın % 100'ü püstüllerle kaplı

Tarladaki başarının saptanmasında, sayım sonuçlarıyla toplanan bilgiler birlikte irdelenmelidir (Anonim)

Pas mantarı genel olarak obligat (zorunlu) parazitlerdir. Canlı konukçu bitki olmadan hayat çemberini tamamlayamazlar. Hayat çemberleri, değişik spor tipleri ve çoğu kez ikinci konukçu bitki değiştirmeyi içeren karmaşık bir yapıya sahiptir. Belirtilmesi gereken bir nokta iki değişik konukçu ve beş spor tipini kapsayan çember , nispeten özel bazı çevre şartları dışında pek görülmemektedir. Çevre koşullarının uygun olduğu bir çok yerde mantar, üründe yada akraba bitki türlerinde eşeysiz ürediospor safhasında çoğalır. Tam hayat çemberine esas ürün yada otsu konukçularla ara konukçunun birbirine çok yakın iç içe bulunduğu az sayıda yörede rastlamak mümkündür.

Pas mantarlarının familyalar ve genuslar içinde sınıflandırılması, teliosporlarının morfolojik özelliklerine ve genus içindeki türlerin konukçu dağılımı ve ürediospor özellikleri esasına dayandırılmaktadır. Puccinia genusunda yüksek oranda konukçuya özelleşme vardır ve konukçu dağılımı esasına göre tür içinde bir çok alt tür bulunmaktadır (f. sp. = Formae specialis). Alt türler saldırdıkları esas konukçuya göre isim alırlar ; her alt tür aynı zamanda konukçuya yakın akraba olan otsu bazı bitkilere de saldırabilmektedirler. Her bir forma specialis (alt tür) içinde de patojenler, fizyolojik ırklara ve/veya biyotiplere ayrılabilirler. Bir biyotip, genotip olarak aynı bireylerden meydana gelen bir populasyon olarak, fizyolojik ırk ise morfolojik yönden benzer fakat fizyolojik, biyokimyasal, patolojik veya diğer karakterlerce farklı biyotipler grubu olarak tanımlanmaktadır. Fizyolojik ırklar ırk numaraları ile belirtilir ve seçilmiş konukçulara verdikleri ayırıcı reaksiyonlara göre saptanırlar. Bu sistem sınıflandırma yönünden çok kullanışlı olmasına rağmen herhangi bir pas koleksiyonunu tam olarak tanımak için kullanılamaz. Paslarda fizyolojik ırkların tanınması, saflaştırılmış pas kültürleri kullanarak farklı buğday ve arpa çeşitlerinin

reaksiyonlarını belirlemek esasına dayanır. Bunun için belirli bazı çeşitlerin fideleri kullanılır ve eğer koşullar optimum ise belirtiler 10-15 gün içinde tam olarak ortaya çıkar. Konukçu reaksiyonuna dayanan sınıflandırmada bir ırk numarası; ya daha önce yayınlanmış raporlara göre saptanır, yada eğer yeni bir ırk izole edilmişse yeni bir numara verilir (Kınacı. 1992)

Pas hastalıkları bilinen en eski ve üzerinde en çok çalışılan bitki hastalıkları arasında yer alır. Buğdayda üç çeşit pas hastalığı görülür: kara pas, kahverengi pas ve sarı pas. Bu hastalıkların her birisine pas fungusunun özel türleri sebep olmaktadır. Pas hastalıkları konukçu oldukları bitkilerde benzer semptomlar oluştururlar ve bitkide yapacakları enfeksiyonlar için benzer gereksinimleri vardır (Marsalis and Goldberg, 2006).

Buğdaydaki 3 pas hastalığı genel olarak yaprak yada kahverengi pas olarak anılır. Yaprak şeridi oluşmasına rağmen uygun koşullar altında ekstra duyarlı çeşitler ve yüksek bulaşma uygunluğunda yaprak kını da enfekte olabilir. Mevsim sonunda gövde pasının teliosporları sıklıkla azalma gösterir bunun sonucunda siyah gövde lezyonlarından ziyade yaprak yüzeyi alanı üzerindeki teliadan kaynaklanan yaprak pası teliosporları üretildiğinde bunlar epidermal hücrelerle çevrili olarak kalırlar. Hastalık 10 ile 30 °C arasında hızla gelişir. Nem stresiyle beraber şiddetli epidemik durumlarda dane oluşumu azalır. Erken gelişen epidemilerde nadir genotiplerde sürgünler ve bitkiler ölür. Yaprak pası sebebiyle oluşan kayıplar genelde %10 dan küçüktür fakat %30 ve daha fazla şiddette de olabilir.

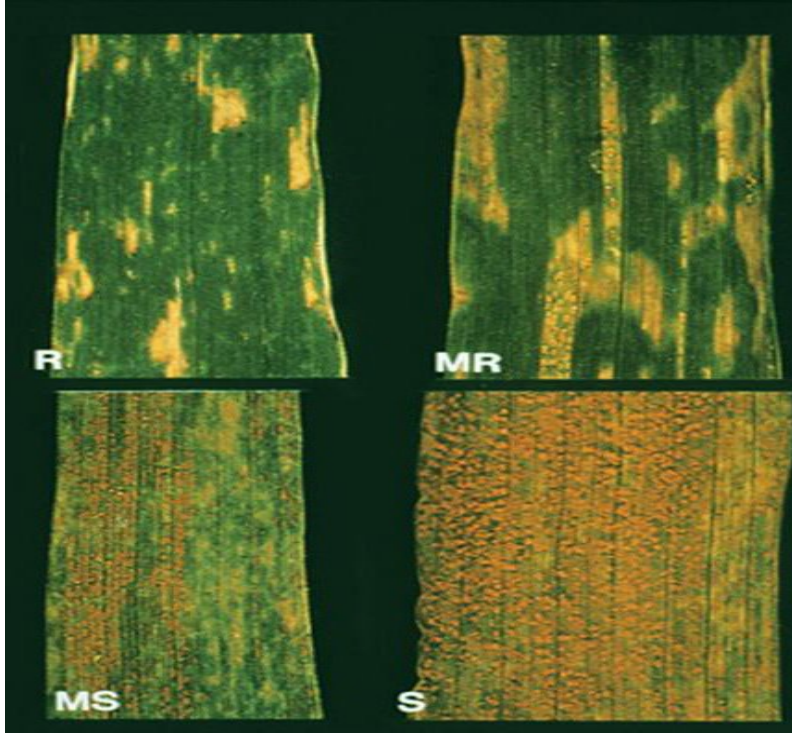
Parlak siyah teliosporların bolca üretilmesiyle oluşan gövde pası siyah pas yada yaz pası olarak ta anılır ki bu da uygun olmayan koşullarda yada mevsim sonundaki uredinium formudur. Gövde pası nemli koşulları ve 15-35 °C arasındaki sıcaklıkları tercih eder. Pas hastalıklarının en çok hasar

verici olanıdır ve gelişmesi için uygun koşulları bulduğunda 1 ayda % 50 kayba sebep olabilmektedir. Duyarlı çeşitlerde % 100 kayıp da oluşabilmektedir. Çizgi yada sarı pas daha serin iklimlerde (2-15 °C) yetiştirilen buğdayın başlıca hastalığıdır. Bunlar genelde daha yüksek yerlerde , kuzey enlemlerde yada daha soğuk yıllarla ilgili olarak ortaya çıkarlar. Bunlar sarı renkli urediniosporlardan üreyen uredinia'nın karakteristik çizgisinden isimlerini alırlar.Hastalığın erken saldırısıyla kavruk ve zayıf bitkiler oluşur. Hasar görmüş sürgünler ve azalan daneyle beraber kayıplar % 50 şiddetinde olabilir. Ekstrem durumlarda sarı pas % 100 kayba da neden olabilmektedir. Dünya üzerinde birkaç alanda pas şiddetli kayıplara sebep olur. Diğer alanlarda ise çevresel faktörler bu hastalık için marjinal uygunluktadır. Bu alanlarda hastalık sadece: 1- genelin dışında koşulların 2- duyarlı çeşitlerin yetiştirildiği 3- kültürel denemelerde değişikliğe gidildiği yıllarda ve her üç kombinasyonun bir arada olduğu senelerde oluşur. Pasa bağlı olarak sıcak alanlardaki serbest nemle birlikte 1-3 saat içinde buğday pası uredinio sporları çimlenmeye başlar. Urediniosporlar çok fazla sayıda üretilirler ve rüzgarla çok büyük mesafelere taşınabilirler. Bununla beraber çoğu urediniospor yerçekiminin etkisiyle kendi kaynağına yakın yere bırakılır. Urediniosporların havadayken hızları yaklaşık saniyede 1 cm dir. Yaklaşık denklemsel hesaplamalara göre spor konsantrasyonu kaynağından 1 ile 100 m arasında azalma gösterir. Bu hastalığın oluşumunda spor taşınımı muhtemelen en önemli mekanizmadır. Kaynaktan en uzak mesafelerde çoğu urediniospor yağmurla yıkanınca dek havada kalır. Urediniosporlar birkaç haftalık periyotlarda konukçu bitkiden uzakta tarlada nispeten uzun ömürlü olarak hayatta kalabilirler. Eğer nem içeriği % 20-30'un altındaysa urediniosporlar çok soğuklara dayanabilmektedirler. Nem içeriği % 50 den fazla olduğunda canlılıklarını

hızla kaybetmeye başlarlar. Uredinosporların uzak mesafelere yayılmalarında çoklukları ve rüzgar çeşidi etkilidir. Genelde sporlar yeryüzü ekseninin dönme yönüne bağlı olarak gelişen rüzgarlar yoluyla batıdan doğuya doğru taşınırlar.

Konukçu patojen ilişkisi en azından spesifik ve spesifik olmayan şeklinde iki kategoriye ayrılabilir. Aynı çevrede aynı konukçuyla diğerlerinden ayrı olarak tek bir patojen tek bir konukçu genotipinde farklı bir hastalık tepkisi oluşturduğunda spesifik ilişki ortaya çıkar. Konukçu genotipi üzerindeki tüm hastalık tepkileri benzer olduğunda spesifik olmayan (nonspecific) ilişki oluşur. Bir ıslah programında en iyi dayanıklılığı oluşturmak için nonspecific dayanıklılık teorisi geliştirilir. Bununla beraber nonspecificiteyi kanıtlamak için patojen popülasyonundaki her birey evrimini tamamlamış olmalıdır ki şüphesiz bu mümkün değildir (Roelfs et al., 1992).

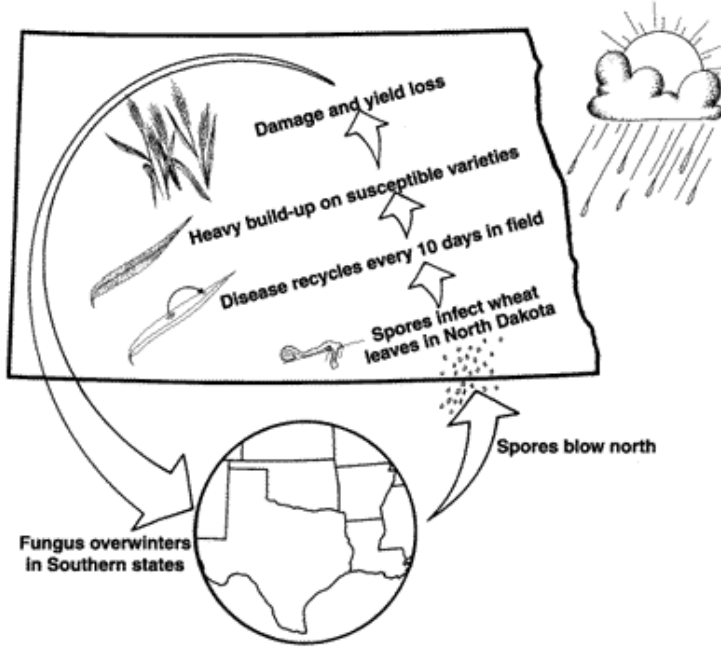
Puccinia triticina mantarının sebep olduğu buğday yaprak pası uygun hava koşullarında pas gelişmesi ve yayılmasıyla duyarlı çeşitlerde verim kaybına yol açar. Yaprak pasının göze çarpan en önemli enfeksiyon belirtisi kırmızımsı-turuncu spor güruhunun yaprak yüzeyinde ortaya çıkmasıdır. Bu spor grupları püstüller yada uredinia diye adlandırılır. Buğday yaprak pası enfeksiyonunun oluşması için olması gereken faktörler şöyledir; duyarlı yada orta duyarlı buğday bitkileri ve yapraklar üzerinde 6 ila 8 saat kadar nem oluşturacak çiğ ve uygun sıcaklıklar (15-26 °C) ki bunlar nispeten soğuk geceler ve sıcak gündüz kombinasyonu şeklindeki günlerde hastalığın gelişmesi için mükemmel koşullardır. Uygun çevresel koşullar altında pas sporları çimlenir ve buğday yaprağından içeri girer. Mantar buğday yaprağından gelen besinle beslenir ve 1 haftayla 10 gün içerisinde daha fazla mantar sporu üretir ve yaprak yüzeyi boyunca püskürür



Şekil:2.1.: Buğday yaprağında sarı pas enfeksiyon tipleri
(Marsalis et al 2006)

Bu yeni üretilen sporlar rüzgarla diğer buğday yapraklarına yada ürünlere taşınır. Dayanıklı ve duyarlı buğdaylar enfeksiyona farklı reaksiyon gösterir. Eğer çeşit dayanıklıysa mantar yaprak içinde öldürülür yada gelişmesi geriletilir ve enfeksiyon durdurulur. Dayanıklı çeşitlerde sporun giriş yaptığı kısımda sarımsı beyaz benekler gelişebilir (şekil:2.1). Orta dayanıklı çeşitlerde etrafı sarı-beyaz halkayla çevrilmiş kırmızımsı turuncu püstüller gelişir (şekil:2.1). Duyarlı çeşitler mantarı büyümeyi geriletme yeteneğinde değildirler. Mantar yayılarak büyür ve nispeten büyük püstüller şeklinde çoğalır ki günlük yaklaşık 1000 spor kadar çoğalabilirler ki her biri, buğdaylarda yeni enfeksiyonlar yapabileme kabiliyetindedirler (şekil:2.1).

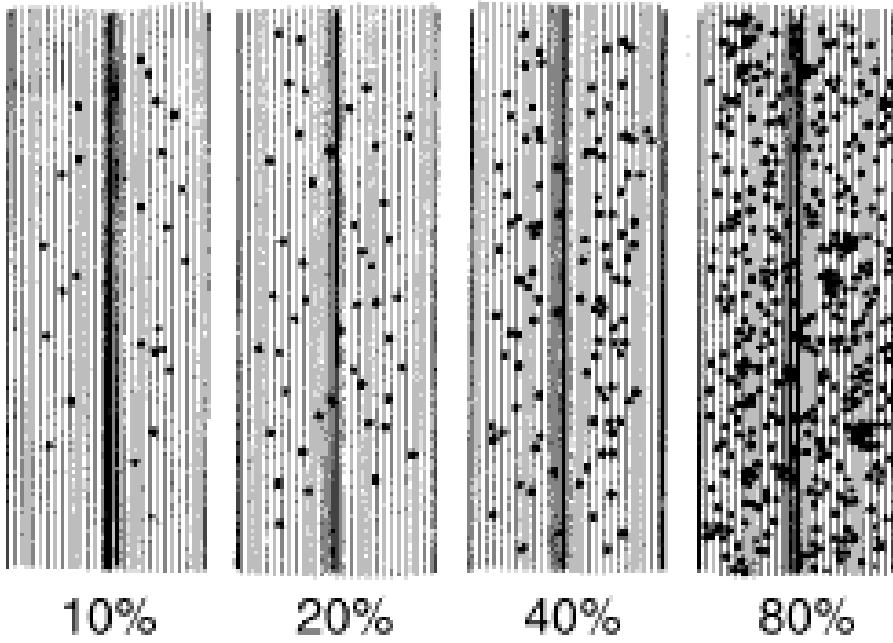
On günde tekrarlanan çember sonucunda büyüme mevsimi süresince bir çok spor teşekkül eder ve bu sporlar çok uzak mesafelere hava akımıyla taşınabilirler.



Şekil:2.2: Pas sporlarının doğadaki gelişimi ve yayılımı

Bu yüzden bu hastalık pas gelişmesi için uygun olan koşulların hüküm sürdüğü ve duyarlı çeşitlerin yetiştirildiği her yerde hızla artabilmekte ve bulaşıcı olabilmektedir. Yaprak pasının sebep olduğu büyük ürün kayıpları, enfeksiyon süresine ve şiddetine bağlıdır. Eğer fide döneminden olgunlaşmaya kadar bitkide şiddetli pas bulaşması söz konusu olursa çok büyük ürün kayıpları oluşur. Pasla kaplanmış yaprak alanı miktarı, oluşan bulaşma şiddetinin yüzdesini ortaya koyar ki buda sporların miktarı, buğday çeşidi ve hava durumuna bağlı olarak değişiklik

gösterir.



Şekil: 2.3. Pas sporlarının yaprak üzerindeki şiddetinin % 'lik oranları

Ürün kaybı özellikle bayrak yapraktaki hastalığın şiddetine bağlı olarak değişir.

Buğday yaprakları karbonhidrat ve diğer besinleri üretir. Dane dolumu için gerekli besinlerin başlıca kaynağı bayrak yaprağıdır. Bayrak yaprak alanının pas dan gördüğü zararın büyüklüğü oranında geriye kalan küçük yaprak alanı dahi tıknaz danelerin oluşması için ihtiyaç duyulan besinleri üretmeye yetmektedir. Başlangıç enfeksiyonları yüksek neme daha uzun süre olanak sağlayan daha alt yaprakların olduğu yerde görülür. Bitki gelişip olgunlaştıkça yaprak pası bitkinin daha üst yapraklarında da ortaya çıkarak şiddetini artırır. Duyarlı çeşitlerde bayrak yaprağındaki hasar % 40 ile

yaklaşık %100'lük alanı kapsayacak şiddette olabilir (Şekil 2.3). Yaprak pasının en mükemmel kontrolü genetik olarak kalıtılmış dayanıklılıktır.

Dayanıklılık enfeksiyonu sınırlar ve spor oluşumu ve mantarın büyümesini geriletir. Dayanıklılık derecesi buğday sınıfları arasında ve sınıf içindeki çeşitler arasında farklılık gösterir. Çeşitler dayanıklılığın derecesine göre, R= dayanıklı, MR= orta dayanıklı, MS= orta duyarlı ve S= duyarlı olacak şekilde sınıflandırılırlar. Duyarlı çeşitlerde çevre koşulları uygun olduğunda ve spor mevcudiyetinde önemli ölçüde ürün kaybı oluşur. Orta duyarlı reaksiyon gösteren çeşitler çevre koşullarının uygunluğun da dikkatli kullanılmalıdır. Hatta doğal yaprak pası popülasyonu sürekli bir değişimle virülens yada yeni ırkları oluşturabilir (McMullen and Rasmussen., 2002).

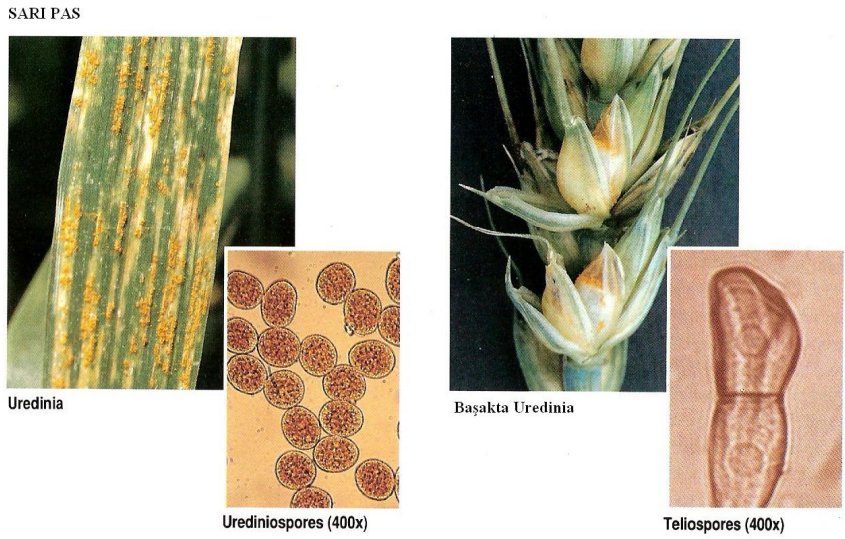
2.3. Sarı Pas

Sarı pas ilk kez 1777 yılında Gadd ve Bjenkander tarafından belirlenmiştir. 1794 yılında İsveç'te çeltikte epidemiyeye sebep olduğu bildirilmiştir. 1827'de ise Schmidt tarafından *uredo glumarum* olarak tarif edilmiştir. 1854'de ise Westendorp sarı pası çeltik patojeni *Puccinia striaeformis* olarak tarif etmiştir. Eriksson ve Henning yaptıkları kapsamlı taksonomik çalışmalarında *P. glumarium* ismini seçmişlerdir. Hylander ve arkadaşları ile Cummins ve Stevenson hala kullanımda olan *P. striiformis* west. ismini göz önüne çıkarmışlardır.

Buğdayda çizgi yada sarı pasa neden olan *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* gövde pası kadar hasar verebilir. Bununla beraber sarı pas dünya üzerindeki bir çok alanda çok düşük sıcaklık sınırlarında optimum bir gelişme göstermektedir. Sarı pas kış boyunca yada erken bahar dönemlerinde ve yüksek alanlarda buğdayın önemli bir hastalığıdır. Buğday sarı pası arpada da sarı pasa neden olabilir. Buğdaydaki üç pas patojeni

içerisinde en düşük sıcaklığa ihtiyaç duyan *P. striiformis* dir. Sarı pas enfeksiyonu için minimum, optimum ve maksimum sıcaklıklar 0, 11 ve 23 °C dir. *P. striiformis* kışı geçirebilirse kışlık ekili buğdaylar üzerinde sıklıkla aktif haldedir. Yaz süresince pas miktarı konukçu buğday miktarına bağlıdır ki bu da mevsim sonu nem miktarı ile nöbetleşe bir fonksiyona sahiptir. Uredinosporlar daha sonra kışlık buğdaylara taşınır. Kuzeybatı Avrupa da kışı geçirebilen Urediniomyceller canlı yaprak dokusunda -4°C ye kadar sınırlı olarak yaşarken sporulasyon lezyonları ölecektir. Latent lezyonlar eğer yaprak canlılığını sürdürürse hayatta kalmaya devam edecektir. Dünyanın diğer bölgelerinde kar düşük sıcaklıklarda spor lezyonlarını soğuklardan izole edebilir , şöyleki -4°C derecenin altındaki soğuklarda pas lezyonları elemine olmaktadır. Kış süresince sarı pas için latent periyot 118 güne kadar çıkabilir ve karla kaplı olduğunda bunun 150 güne kadar artacağı düşünülmektedir. Ultraviole ışığa duyarlılıkları dolayısıyla sarı pas uredinosporlarının kahverengi ve kara pas kadar uzak mesafelere canlılıklarını koruyarak taşınmaları mümkün olmamaktadır. Yapılan çalışmalar sarı pas uredinosporlarının ultraviole ışığa kara pastan 3 kat daha duyarlı olduklarını ortaya koymuştur. Rapor edilmiş bazı çalışmalara göre sarı pasın kış koşullarında 800 km den daha fazla mesafelere taşınımında canlılığını koruduğu bildirilmiştir. Avustralya'nın buğday sarı pasıyla ve Kolombiya'nın ise arpa sarı pası ile tanışması insan jet seyahatleri ile mümkün olmuştur. Bununla beraber Avustralya'dan YeniZelanda'ya kadar olan 2000 km lik mesafede sarı pasın yayılması uredinosporların havayolu taşınımıyla mümkün olmuştur. *Puccinia striiformis* buğday, arpa, triticale ve çeltik gibi tahıl patojenidir. Sarı pas başlangıç enfeksiyon noktasının ötesinde sürekli bir yayılma gösteren tek buğday pasıdır. Sarı pasa dayanıklılık enfeksiyon periyotları yada ilave

sporlar olmaksızın enfeksiyon sayısındaki azalma yada azalma gösteren her uredinium sporu sonucunda patojenin yayılma kabiliyeti tarafından meydana gelebilir. Sarı pasın sadece telial ve uredinial safhaları bilinmektedir (Roelfs et al., 1992).



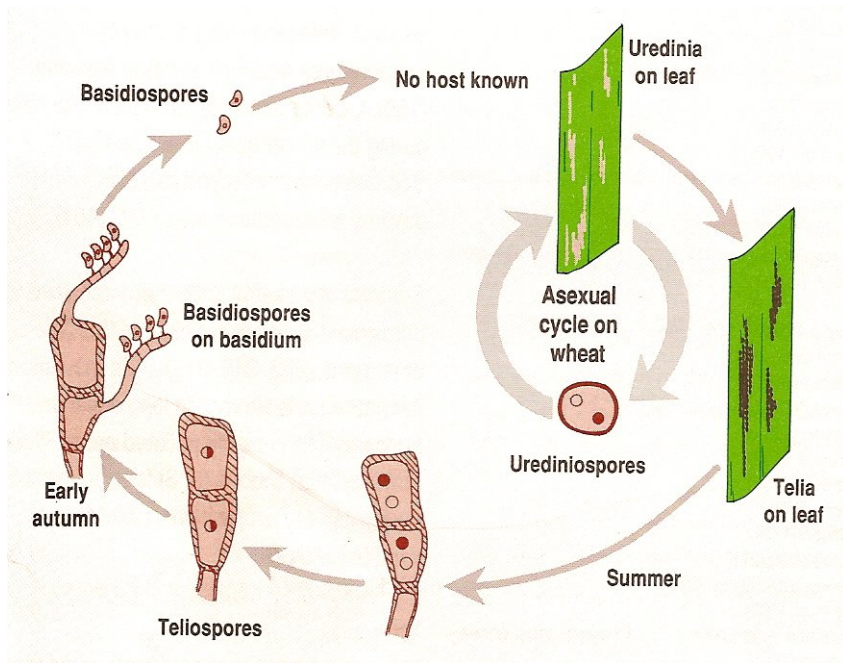
Şekil:2.4:Sarı pas sporlarının yaprak ve başak üzerindeki görünüşleri
(Roelfs et al 1992)

Puccinia striiformis Westend. f. sp. *tritici* Eriks., in sebep olduğu sarı pas dünya genelinde buğdayda en büyük zararı oluşturan hastalıktır. Dayanıklı çeşit ıslahı, bu hastalık yoluyla oluşacak kayıpları minimize etmede ve fungusit kullanımını elemine etmek için en etkili yaklaşımdır. Bununla beraber kültürü yapılan buğdayda sarı pasa karşı dayanıklılık için belirlenmiş başlıca genlerin çoğu, tek olarak kullanıldığında bilinen ırkların bir yada daha fazlası için inaktif hale gelmiştir. Dünyada buğday

yetiştirilen alanların hepsinde virülens ırklar adım, adım artış göstermiştir. Hatta dayanıklı gen kombinasyonlarını bile sıklıkla çökertmektedir. Kültürü yapılan buğdayda sarı pasa karşı etkili dayanıklı genlerin tükenmesi yabancı buğdaylar arasında yeni dayanıklılık genlerinin araştırılmalarına neden olmaktadır (Sun et al., 1997).

Özellikle tüm kültürü yapılan buğdayların atası olan yabancı buğday *Triticum dicoccoides* Korn sarı pasa karşı dayanıklılık için ümit verici bir kaynaktır. Bu yabancı türler 1910 da Aaronsohn tarafından kuzey İsrailde keşfedilmiştir ki bunlar birkaç hastalığa karşı dayanıklılığın yanı sıra buğday gelişimi için değeri giderek artan bir kaynaktır (Nevo, 1983, 1995; Nevo and Beiles, 1989;).

P. striiformis daha çok pasın hemiformu gibidir ki bu yaşam çemberinde sadece uredinial ve telial safhalarının görülebilir olmasıdır.



Şekil:2.5: Sarı pas sporlarının yaşam çemberi (Roelfs et al 1992)

Sarı pas populasyonunun mevcut virülensinde değişiklikler olabilir ve alternatif bir konukçudan bağımsız olarak epidemi oluşturabilir. Uredinosporlar buğdayda tek inokulant kaynağı olarak bilinirler ve bildirilen 9-13 °C optimum sıcaklıklardan daha da düşük sıcaklıklarda çimlenebilir ve enfekte olabilirler. Bu sıcaklıklar ortalama sarı pas için yaklaşık 10 °C nin altında olması nedeniyle yüksek irtifalarda ve daha kuzeyde veya güney enlemlerde sarı pas etkin bir hastalıktır. Sporlaşan uredinia – 4 °C sıcaklıkta hayatta kalabilir ve başlangıç enfeksiyonları konukçu yaprakla birlikte uzun süre hayatta kalabilir. Donmanın az altında yada yakın sıcaklıklarda enfeksiyonlar oluşabilmektedir. Avrupada kış boyunca 188 günden fazla latent durumda kalabilir, spor oluşturma ve enfeksiyon gün ışığında sıcaklığın 5 °C ye ulaşmasıyla oluşabilmektedir.

Puccinia striiformis f. sp. *tritici* in sebep olduğu sarı pas, kuzey Afrika, batı Asya ve orta Asya'yı da içine alan buğday yetiştirilen oldukça geniş bir bölgede buğdayın önemli bir hastalığıdır. Bu hastalığın kontrolü için dayanıklı çeşitlerin kullanılması güvenli çevre ve çiftçi için masrafsız olması nedeniyle en iyi stratejidir. Tarihsel olarak dayanıklı çeşit ıslahı için ırka özel büyük genler kullanılmıştır. Günümüzde ise 30 tane gen kataloga alınmıştır. Irka özel tek gen yada ikili kombinasyonlardan oluşan önemli bazı dayanıklı çeşitler, geçmiş yıllarda sarı pasın tehdit oluşturmuş olduğu yada büyük kayıplara sebep olduğu ülkelerde oldukça geniş alanlarda hala hazırda yetiştirilmektedir (Singh et al., 2001).

Fahima et al., (1998) genetik haritalamada kullanılabilecek uygun ebeveynleri belirlemek amacıyla daha önceden sarı pasa dayanıklılıkları

bilinen bazı *Triticum dicoccoides* aksesyonları arasında genetik farklılığı ölçümlenmiştir. 19'u sarı pasa dayanıklı, 2'si duyarlı toplam 21 aksesyon kullanan araştırmacılar 23 buğday mikrosatelit markörü kullanarak bu aksesyonlar arasında DNA polimorfizmini belirlemişlerdir. Çalışmalarına bu materyale ek olarak 2 *T. durum* ve 1 *T. aestivum* hattını da dahil etmişlerdir. Kullandıkları 23 buğday mikrosatelit markörü 23 kromozom kolunda lokalize olmuş ve toplam 30 allele A ve B genomlarının 14 kromozomunu göstermişlerdir. Markör başına 5 ile 18 allel belirleyen araştırmacılar ortalama allel sayısını da 10 olarak belirtmişlerdir. Genotiplere ait genetik farklılık verilerini kullanarak aksesyonlar arasında da dendrogram elde etmişlerdir.

Gold et al., (1999) *Lr35* ve *Sr39* dayanıklılık genlerini taşıyan bazı Thatcher yakın izogenik hatları ile bu genleri taşımayan ve tekrarlanan ebeveyn olarak kullanılan Thatcher hattı arasında polimorfik ISSR bantları saptamışlardır. Bu 2 gen *Aegilops speltoides*'den aktarılan kromozom segmentinde lokalize olmuş ve linkage durumunda olan genlerdir. Açılma gösteren bir populasyonu inceleyen araştırmacılar ISSR primerlerinden bir tanesinin bu iki genin her ikisi ile de linkage durumunda olduğunu saptamışlardır. Söz konusu primeri SCAR primerine dönüştürmüşlerdir. *Aegilops speltoides*'den aktarılan kromozom segmentinde *Lr35* ve *Sr39* genlerini taşıyan 6 buğday hattında bu primerin markörünü belirlemişlerdir.

Chague et al., (1999) buğdayda sarı pasa dayanıklılığı sağlayan *Yr15* genine ait markörleri belirlemek için mikrosatelit ve RAPD markörlerini kullanmışlardır. Yakın izogenik hatları ve bu hatların melezlerinden elde edilen F₂ populasyonunda dayanıklılık için fenotipik

gözlemleri kullanan araştışıcılar *Yr15* genine bağlı bir mikrosatelit ve bir de RAPD markörü belirlemişlerdir. Ayrıca RAPD markörlerini belirlemek için Bulk Segregant analizini de kullanmışlardır. Bu yöntemi kullanarak 2 RAPD markörü saptayan araştışıcılar F₂ populasyonunda MAPMAKER linkage analizi ile *Yr15* geninden 12 cM uzaklıkta 2 çok yakın markör elde etmişlerdir. Bu çalışma ile dayanıklılık geni *Yr15*'in PCR markörleri ile çevrelenmiş olduğunu, UBC199₇₀₀ ve GWM33 markörlerinin bu genin her iki taraftan 5 cM uzaklığında bulunduğunu belirtmişlerdir.

Singh et al., (2000) buğdayda sarı pasa dayanıklılık genlerini belirlemek için [*T. turgidum* L. x *Ae. tauschii* (Coss.) Schmal.] x *T. aestivum* L. cv. 'Opata 85' melezinden geliştirilen rekombinant kendilenmiş hatlardan oluşan bir RFLP haritalama populasyonunu fide enfeksiyonu için serada üç inokülasyon testi ile, ergin bitkilerin reaksiyonunu ise dört farklı tarla inokülasyon testi ile değerlendirmişlerdir. *Ae. tauschii*'den gelen ve belirlenmeyen gen *Yr28* olarak dizayn edilmiş ve 4DS kromozomunda yer almaktadır. *Yr28* geni fide dayanıklılığını güçlü bir şekilde etkilemesine rağmen iki lokasyonun sadece daha sıcak kısımlarında ergin bitkilerde de dayanıklılık sağladığını belirtmişlerdir. Diğer ikinci bir geni fide testlerinde 7DS kromozomunda bulunan *Yr18* ergin bitki dayanıklılık genine yakın markör allelleri bulunan Opata dayanıklılığı ile ilişkili olarak yüksek seviyede çevreden etkilenen bir gen olarak bildirmişlerdir. Opata'da bulunduğu bilinen *Yr18* geninin tarla denemelerinde hastalığa tepkiyi azalttığını ve bu genin *Lr34* ile çok yakın linkage durumunda olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca 3BS, 3DS ve 5DS kromozomlarında bulunan ve

Opatadan gelen diğler üç bölgenin ergin bitki dayanıklılığı ile ilişkisi olduğunu vurgulamışlardır.

Ma et al., (2001) hem sarı pasa hem de külleme hastalığına dayanıklılık sağlayan buğday-*Haynaldia villosa* 6AL.6VS translokasyon hatlarından R55 ile duyarlı çeşit Yumai 18 arasında yapılan melezin F₂ populasyonunu kullanmışlardır. Sarı pasa dayanıklılığın tek bir dominant gen tarafından idare edildiğini ve bu genin *Yr26* olduğunu düşünen araştırmacılar söz konusu genin lokasyonunu 6VS olarak belirtmişlerdir. Bulk Segregant Analizi ve mikrosatelit primerlerini kullanarak belirtilen F₂ populasyonunda 1B mikrosatelit lokus markörlerini (*Xgwm11*, *Xgwm18*, *Xgwm413*) *Yr26*'ya çok yakın olduğunu belirmişlerdir. *Yr26*, *Xgwm11/Xgwm18* markörlerinden 1.9 cM uzaklıkta, *Xgwm413*'den de 3.2 cM uzaklıkta lokalize olmuştur. Sonuç olarak *Yr26* geninin 1B kromozomunun kısa kolunda lokalize olduğunu saptamışlardır. Ayrıca *Yr26* geninin orjinini ve dağılımını incelemek için kalıtımını ve moleküler markör analizini araştırmışlar ve *Yr26* geninin *T. turgidum* L.'den geldiğini belirtmişlerdir. PCR'a dayalı mikrosatelit markörlerinin açılma gösteren bir populasyonda *Yr26* genini belirlemek için çok etkili bir yöntem olduğunu ve buğday ıslahında uygulanabileceğini saptamışlardır.

Boukhatem et al., (2002) sarı pasa sürekli dayanıklılığın kantitatif özellik lokuslarını (QTL) haritalamak için 20 yıldan daha uzun bir süre dayanıklılık sağlayan kışlık buğday Camp Remy ile duyarlı Michigan Amber arasında yaptıkları melezin 98 F₈ rekombinant kendilenmiş hattını kullanmışlardır. Ayrıca ITMI (International Triticace Mapping Initiative)'den 114 rekombinant kendilenmiş hattı içeren populasyonunu

(Opata85xsentetik buğday melezinden elde edilmiş) kullanarak sarı pasa ergin bitki dayanıklılığının QTL'ini haritalamışlardır. Bu populasyonlardan sırasıyla 2 ve 5 QTL belirlemişlerdir. Bu çalışma ile sarı pasa sürekli dayanıklılıkta 2B kromozomunun sentromerik, 2A ve 7DS kromozomlarının ise telomerik bölgelerinin önemini ortaya koyan araştırmacılar ayrıca aynı kromozom bölgelerinin diğer patojenlere dayanıklılığı da kapsayan bölgeler olduğunu vurgulamışlardır.

William et al., (2003) *Lr46* geninin tam olarak lokasyonunu belirlemek ve bu lokusun sarı pas ergin dönem dayanıklılığı ile bir ilişkisinin olup olmadığını saptamak amacıyla duyarlı Avocet S ile dayanıklı Pavon 76 arasında yaptıkları melezin 146 F₅ bitkisinin ve bunların F₆ hatlarının 3 mevsim boyunca kahverengi ve kara pasa karşı reaksiyonlarını ölçmüşlerdir. Araştırmacılar eklemeli gen etkisinin bulunduğu 2 genin kahverengi pasa, 2-3 genin de kara pasa dayanıklılık sağladığını saptamışlardır. Bulk Segregant Analizi ve AFLP markörünü kullanarak buğday 1B kromozomunun uzun kolunda *Lr46* geninin lokasyonunu belirlemişlerdir. *Lr46* geni ile linkage durumunda bulunan bir genin sarı pasa orta derecede ergin dönem dayanıklılığı sağladığını ve *Yr29* geni olarak dizayn edildiğini bildirmişlerdir.

Imtiaz et al., (2004) 'Otane' ekmeçlik buğday çeşidinde bulunan sürekli ergin bitki dayanıklılığına ait mikrosatelit markörlerini belirlemeyi amaçlamışlardır. 'Otane'x Tiritea çeşitleri arasında yapılan melezden geliştirilen double haploid populasyonunu sera ve tarla koşullarında hastalıkla inoküle ederek değerlendirmişlerdir. Bu populasyonda en azından 3 dayanıklılık lokusunun ergin bitki dayanıklılığını kontrol ettiğini belirtmişlerdir. OTL haritalama

sonuçlarının bunlardan 2 tanesini gösterdiğini; bir tanesinin 7DS kromozomunda bulunduğunu ve *Yr18* geni olabileceğini, diğerinin 5DL kromozomunda bulunduğunu ve Otane'den geldiğini belirtmişlerdir. Geri kalan diğer lokusun ise 7BL kromozomunda bulunduğunu ve duyarlı Tiritea kùltivarının lokusu olduğunu saptamışlardır. 'Otane' dayanıklılık segmentinin 7DS kromozomunun sentromer bölgesine yakın olduğunu ve SSR markörü Gwm44'den 7 cM uzaklıkta bulunduğunu belirtmişlerdir. Bu QTL'in iki çevrede stabilitesinin tartışılır olduğunu ancak Gwm44 markörünün sürekli dayanıklılık geni *Yr18* için ıslah programlarında potansiyel bir aday markör olduğunu saptamışlardır.

Xia et al., (2007) 98 Çin buğday kùltivarında ve geliştirilmiş hatlarda sarı pas fide dönemi dayanıklılık genlerinin bulunduğunu varsayarak 26 farklı *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* izolatının reaksiyonlarını incelemişlerdir. Elde ettikleri sonuçlardan 42 kùltivar ve hatta *Yr9* dayanıklılık geninin bulunduğunu, bu genin ya yek başına dayanıklılık sağladığını ya da diğer dayanıklılık genleri ile bir dayanıklılık gösterdiklerini belirtmişlerdir. 19 aksesyonun ya *Yr24* ya da *Yr26* genini taşıdıklarını saptamışlardır. 7 kùltivar test edilen 26 izolata dayanıklılık gösterirken kùltivardan ve hatlardan 6'sı bütün izolatlara duyarlılık göstermişlerdir. *Yr10*, *Yr15*, *Yr24* ve *Yr26* genlerinin Çin sarı pas izolatlarına etkili bir şekilde dayanıklılık sergilediğini belirten araştırmacılar *Yr1* ve *Yr6* genlerinin bütün izolatlara duyarlılık gösterdiklerini saptamışlardır. SSR markörleriyle yaptıkları çalışmalarında Xgwm498 ve Xwms273 markörlerinin Çin buğday kùltivarı Chuanmai'de bulunan *YrCH42* genine sırasıyla 1,6 cM ve 2,7 cM uzaklıkta bulduklarını belirlemişlerdir. *YrCH42*, *Yr24* ve *Yr26*

genlerinin reaksiyon şekillerine, kromozom lokasyonlarına ve orijinlerine göre muhtemelen yaygın genler olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca buğday hattı Zhou 8425B’de yeni bir sarı pas dayanıklılık geninin bulunduğunu ve bunun 7BL kromozomunda lokalize olduğunu vurgulamışlardır.

2.4. Moleküler Markörler

Genetik ve bitki ıslahı için buğdayın (*T. aestivum* L. Em. Thell) genetiğinin ve genom organizasyonu, kullanılan moleküler markörlerin oldukça önemli bir değere sahip olduğunu göstermektedir. A,B ve D olmak üzere ve %80’den fazla repetitive DNA’sı ile (16×10^9 bp/1C) 3 büyük genoma sahiptir ve ($2n = 6x = 42$) allohexaploiddir. Buğdayın 7 homolog grubunun tamamı için fiziksel haritaları ve detaylı RFLP (restriction fragment length polymorphism) linkage haritaları çıkarılmıştır. Tüm bunlara rağmen buğdayın genetik haritasının yapılandırılmasındaki işlemler durağan kalmıştır. Gen haritalandırmasında RFLP(restriction fragment length polymorphism) markörünün kullanımı, buğdaydaki polimorfizm seviyesinin çok sınırlı olması sebebiyle yavaş olmuştur. Gen ve genom haritalaması kapsamlı yapılmış melezlemelerden elde edilen populasyonların kullanımını gerektirir. Bununla beraber agronomik açıdan önemli birçok gen veya QTL (Quantitative trait loci)’in haritalanması bitki ıslahında başlıca hedeftir ve intraspesifik anlamda markör bilgisi gerektirir. Bu özellikle MAS (marker assisted selection) için geçerlidir. (Röder et al.,1998)

T. dicoccoides’in G-25 aksasyonu 6 ülkeden toplanmış 20 sarı pas ırkına karşı yüksek dayanıklılık göstermiştir. Sonraki çalışmalar bu dayanıklılığın Yr15 dominant geni tarafından sağlandığını göstermiştir. (Sun et al., 1997)

CIMMYT’de üretilen bazı Amerikan buğday çeşidi Anza ve Bezostaja gibi kışlık buğdaylar ki bunlar sarı pasa karşı orta seviyede dayanıklılık göstermektedirler ve yapılan son çalışmalar bu dayanıklılığın Yr18 geninin kontrolü altında olduğunu göstermiştir. Bu gen tamamıyla Lr34 genine bağlıdır. Dayanıklılık seviyesi tek başına genelde yeterlilik göstermez. Bununla beraber Yr18 ve ek olarak 2-4 yavaş paslanma genleri sonucu çoğu, çevrede yeterli dayanıklılık seviyesi sağlar (Singh, et al.,2001).

Bitki hastalığına karşı sürekli bir dayanıklılık, hastalığa elverişli bir çevredeki yaygın yada uzun dönem yetiştirilen bir çeşidin sürekli dayanıklı kalabilmesi demektir. Sarı pas için bazı çeşitlerin temel dayanıklılıklarında, ticari olarak geliştirildiklerinde yapılan ıslah çalışmalarından dolayı hatalar oluşur. Bu oluşum ticari olarak yetiştirilen buğday çeşitlerinin kullanımı esnasında bitkinin tüm yaşamı boyunca ve fide dönemindeki bilinen tüm dayanıklılık genlerinden kaynaklanır. Hatta Yr11, Yr12, Yr13 ve Yr14 gibi bazı genler vardır ki fidelerde etkili değildirler. Fakat yetişkin bitkide çok daha etkin hale gelirler. Hatta bazı genler hem fide döneminde hem de sonrasında yada yaşam çemberinin daha sonraki safhalarda etkilidirler ki bunlar ırka özel olarak tarif edilebilirler (Johnson 2001).

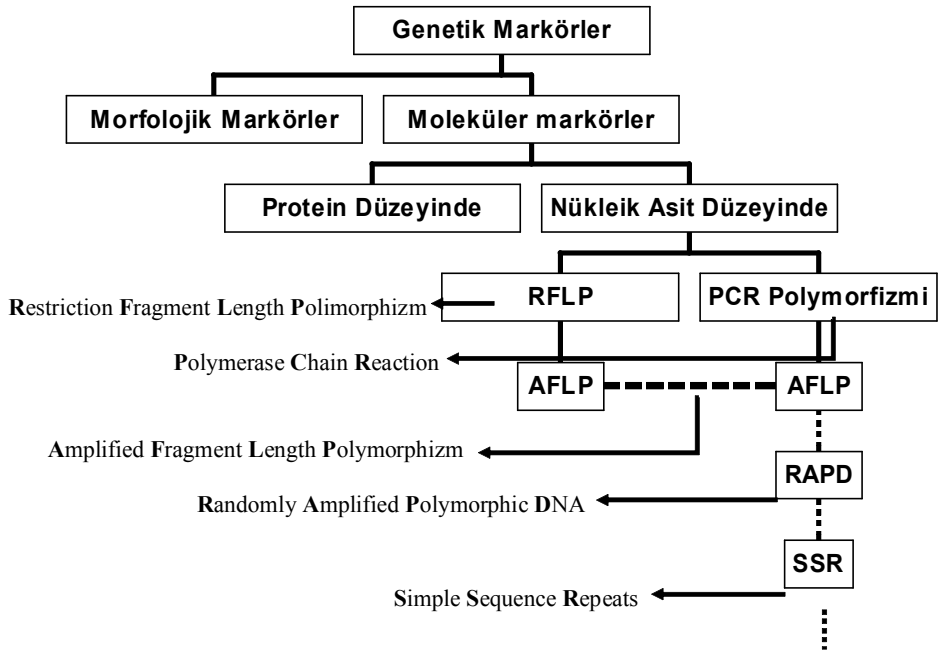
Ticari varyetelerde hastalığa dayanıklılığın sürekliliği ve arzu edilen seviyede başarılabilmesi için sağlam bir seleksiyon teknolojisinin kullanılabilirliği esastır. Tüm dünyada hastalığa dayanıklılığın kabul edilebilir seviyeleriyle genotipleri seçmek için hem doğal enfeksiyon

hem de yapay düzenlenmiş salgın koşulları altında tarla değerlendirmeleri yapılmaktadır. Düşük pas tepkisine bağlı markör kullanımı, fenotipik seleksiyon için alternatiftir. Bunlar morfolojik markörleri, protein markörleri, DNA markörlerini ve hastalığa dayanıklılık genlerine bağlı markörleri içine alır. Son zamanlarda pas hastalıkları için moleküler markörler geliştirilmektedir. Farklı markör geliştirme teknolojileri (restriction fragment length polymorphism) RFLP, (amplified fragment length polymorphism) AFLP, (microsatellite/simple sequence repeat polymorphism) SSR ve (sequence characterised amplified regions) SCAR'ları içermektedir (Bariana H. S. 2001).

Biyokimya alanındaki gelişmeler son yıllarda markörler konusunda önemli gelişmelere sebep olmuştur. Öncelikle enzimlerin (izoenzimler) veya depo proteinlerinin markör olarak kullanılabilmesi ortaya konmuştur. Sonraki gelişmelerle DNA'nın kendisinin doğrudan markör olarak kullanılma fikri ortaya çıkmıştır. Teorik olarak ele alındığında DNA markörleri, sonsuz sayıdadırlar ve genomun her noktasını temsil etme yeteneğine sahiptirler. Moleküler DNA markörleri ile yapılan linkage haritaları birçok kültür bitkisi için geliştirilmiş ve arzulanan genlerin doğrudan takibi ve seleksiyonu mümkün hale gelmiştir. Çevrenin etkisinden bağımsız olarak işleyen bu işlem genlerin kolayca takip edilebilen markörlerle bağlantı durumları incelenerek yapılabilmektedir (Yıldırım ve Kandemir, 2001).

Bir çok alanda kullanılan genetik markörlerin bitki ıslahında kullanımı da oldukça etkindir. Bitki ıslahında çoğunlukla genetik uzaklık ve benzerlik araştırmalarında, germplazm organizasyonlarında, QTL

analizlerinde, hastalıklara dayanıklılık ve genetik çalışma materyalinin tanımı gibi kalitatif ve kantitatif karakterler için yapılacak markörlere dayalı seleksiyonda, DNA parmakizi çalışmalarında, genetik ve linkage haritalamalarında, çeşit tanımlamasında ve F₁ hibrit tohumluklarının kontrolünde kullanılmaktadır (Staub and Serquen, 1996).



Şekil 2.6 Genetik Markörler (Can, 2005)

DNA üzerindeki nukleotid sıralanışına dayalı olarak görünür hale getirilen polimorfizm genotipler arasında fenotipik olarak izlenemeyen veya çevre koşulları etkisi altında gizli kalan bütün genotipik farklılıkların ortaya çıkarılmasına olanak vermektedir.

Bitki ıslahında en çok kullanılan DNA markörleri: RFLP, RAPD, AFLP ve SSR markörleridir. RFLP markörleri dışındaki PCR'a dayalı bu teknikler genellikle hızlı ve güvenilir bir performans gösterirler. PCR'a dayalı markörler avantajlı olarak çok az miktarda DNA ile çalışabilmeyi mümkün kılmaktadır. Markör seçimi; çalışmanın materyaline, bütçesine, süresine ve en önemlisi de amacına uygun olarak yapılmalıdır. Örneğin; RFLP ve SSR teknikleri pahalı, zahmetli, zaman alıcı ve sekans bilgisi gerektirir. AFLP markörleri de teknik açıdan zordur. RAPD ise daha ucuz, uygulaması kolay ve kısa sürede yüksek polimorfizm elde edilebilen bir yöntemdir (Sørensen, 2002).

Türlerden izole edilen genlerin dizi analizleri ve moleküler evrim çalışmaları için çok yararlı olabilir. PCR ile çoğaltılmış, direkt olarak klonlanabilir ve sekanslanabilir bu gen dizilerinin ortaya konulması gen izolasyonu ve karakterizasyonunu basitleştirebilir (D'Ovidio et al., 1991).

2.4.1. RAPD

Bitki ıslahında hastalıklara dayanıklılık çalışmaları oldukça büyük bir öneme sahiptir. Moleküler markörler, genetik çalışma materyalinin tanımı gibi kalitatif ve kantitatif karakterler için yapılacak markörlere dayalı seleksiyonda kullanım olarak oldukça etkin bir şekilde yer almaktadır. Genetik ve linkage haritalamalarında, çeşit tanımlamasında, F₁ hibrit tohumluklarının kontrolünde, genotipler arası genetik uzaklıkların ve çeşitliliğin belirlenmesinde moleküler markörlerden yararlanılmaktadır.

Bitki ıslahında marköre dayalı seleksiyonda kullanılan başlıca teknikler proteinler, izoenzimler, RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) ve SSR (Simple Sequence Repeat) markörleridir (Staub and Serquen, 1996).

Williams et al., (1990) tarafından geliştirilen RAPD metodu çeşitlerin DNA parmak izlerinin çıkartılmasında kolaylık sağlamaktadır. Prensipte rastgele bir primerin DNA'nın farklı bölgelerinin çoğaltılması esasına dayanan bu metod sonucunda genotiplere özgü bant desenleri elde edilebilmektedir. Bu bant desenlerinin çeşitlere özgü olması nedeniyle, çeşitlerin safiyetinin saptanmasında, genotiplerin tanımlanmasında ve genetik uzaklıkların hesaplanmasında kullanılmaktadır.

Genetik markörler DNA düzeyinde izlenebilen moleküler markörlerin yanı sıra çiçek rengi gibi morfolojik markörleri ve izoenzimler gibi biyokimyasal markörleride içine almaktadır. Moleküler markörler DNA'nın aktif bölgelerinden veya genetik kodlama fonksiyonuna sahip olmayan DNA dizilerinden geliştirilebilir. PCR'a dayalı markör sistemlerinin geliştirilmesinde temel olarak 3 strateji kullanılmıştır (Staub and Serquen, 1996):

1. PCR'da tek primerlerin kullanımıyla amplifikasyon gerçekleşir. Buradaki polimorfizm primer sekansı veya uzunluğundaki varyasyondan ve primerin 5' veya 3' ucundaki nükleotidlerin genomik DNA'ya bağlanma bölgesinden kaynaklanan polimorfizmdir (RAPD, SPAR, DAF, AP-PCR, SSR-anchored PCR).

2. İkinci stratejide ise markörler PCR'da 2 primer ile seçici olarak çoğaltılırlar. Bu seçicilik PCR boyunca genomik DNA'ya bağlanan primerlerin 3' ucundaki 2 ile 4 bazın diziliminden kaynaklanır (AFLP).

3. Markörler PCR'da yine 2 primer ile çoğaltılırlar. Bu spesifik primerlerin oluşturulmasında çoğunlukla klonlamaya veya sekanslamaya başvurulur. Elde edilen polimorfizm 2 primer arasında yer alan genomik DNA'daki farklılıklardan kaynaklanır (AMP-FLP, STR VE SSR).

PCR'a dayanan metodlar içerisinde RAPD metodu kullanılan ve genellikle 10 baz uzunluğunda olan primerlerin çoğaltılarak tesadüfen DNA üzerinde homolog sekanslarını bulup bağlanmasıyla ve iki inverted (tersine çevrilmiş) bölge arasında yer alan 200 ile 2000 baz uzunluğundaki DNA parçalarının çoğaltılması esasına dayanır.

İstatistiki olarak her milyon baz çiftinde bir defa DNA'ya bağlanan primer ve hedef DNA kompleksi, (Jones et al., 1997) DNA polimeraz enziminin genomik DNA'yı 3' ucundan kopyalaması için kullanılırlar (Staub and Serquen, 1996). PCR işlemi sayesinde farklı büyüklükteki fragment grupları yeteri kadar çoğaltılır ve DNA bant şablonlarında molekül ağırlıklıklarından dolayı farklılıklar oluştururlar.

Genellikle genomlarda farklı uzunluklarda bulunan 5 ile 10 arasında orta büyüklükteki fragment grubu çoğaltılır. Burada polimorfizmin kaynağını, genomdaki sekans varyasyonunun primerin bağlanma bölgelerini değiştirmesi oluşturur (Jones et al., 1997).

Sun et al., (1998) *T.aestivum*, *T.aestivum* ssp. *tibenatum* ve *T.spelta* türleri arasında ve içinde genetik benzerliği ve farklılığı saptamak amacıyla Toplam 46 genotipte 32 primer denemişler ve RAPD markörlerini kullanmışlardır. Denenen primerlerden 26'sı toplam 182

polimorfik bant vermiştir. *T.spelta* ve *T.aestivum* ssp. *tibenatum* tür içinde *T.aestivum*'dan çok daha fazla polimorfizm göstermişlerdir. *T.aestivum* ve *T.aestivum* ssp. *tibenatum* arasında ise genetik farklılık düşük çıkmıştır. Yapılan kümeleme analizi 46 genotipi iki grupta sınıflandırmış ve birinci grup *T.spelta* hatlarını kapsarken ikinci grup *T.aestivum* aksesyonlarını içine almıştır. Bu sonuçlar RAPD markörlerinin buğday tür ve alttürleri arasında filogenetik çalışmalar için üstün bir markör olduğunu göstermiştir.

Mackill (1995) sıcak ve yüksek bölgelerde yetişen bazı Japonica çeltik alt türlerinin RAPD markörleri ile sınıflandırılması için yapılan çalışmada 10 Operon primeri 134 Japonica çeşidinde ve iki yabancı türünde kullanmış ve 30 polimorfik bant elde edilmiştir. Yapılan Cluster analizi sonucunda Japonica ve İndica alt türleri kesin olarak 2 grupta toplanırken, Japonica alttüründe net bir sınıflandırma yapılamamıştır. Tropikal Japonica türleri genellikle bir kümede yer alırken tropikal ve sıcak bölge tipleri arasında kesin bir sınır bulamamıştır. Birbirine çok yakın tiplerde ek olarak 11 primer kullanılmış ve daha iyi bir ayırım elde edilmiştir. Bu çalışmayla RAPD markörlerinin çeltik çeşit ve alt türlerini sınıflandırılmasında yararlı olduğunu saptamıştır.

De Bustos et al., (1998) İspanya'da yetişen *Hordeum* genusunun 6 taksonomik ünitesine ait 102 yabancı popülasyonunda 10 baz dizilişli 64 primeri kullanarak RAPD varyasyonunu tayin etmişlerdir. Polimorfizm gösteren 10 primerden toplam 250 bant elde etmişlerdir. Taksonomik üniteler arasında polimorfizm seviyesi primer kullanımına ve bitki üreme sistemine bağlı olarak değişmiştir. UPGMA metoduna göre yapılan diyagramda *H. marinum* ve *H. secalinum* alttürleri aynı grupta yer

alırken *H. murinum* alttürleri farklı bir gruba girmiştir. 3. grup ise *H. bulbosum* olarak ayrılmıştır.

Yanlış sınıflandırıldığı düşünülen *Triticum* aksesyonlarını yeniden gruplandırmak için RAPD analizinin etkinliği araştırılmış ve yapılan çalışmada, fenotiplerine dayanarak yanlış sınıflandırıldığı düşünülen 12 *macha* veya *vavillovii* aksesyonu ile 6 *triticum* aksesyonunu materyal olarak kullanılmıştır. Çalışmada yer alan 20 primerden 12 tanesi 101 RAPD polimorfizmi göstermiştir. Bu çalışmanın sonucunda *T. aestivum* olarak kabul edilen 12 aksesyondan 6'sı *T. monococcum*, 5'i *T. turgidum* ssp. *dicoccum* ve 1 tanesinin de *T. timopheevii* grupları içinde yer aldığı görülmüştür. Elde edilen sonuçlar sitogenetik analizlerle desteklenmiş ve RAPD markörlerinin *Triticum* türlerinin ayrılmasında kullanılabileceğini saptamışlardır (Cao et al., 1999).

Soya (*Glycine max* L.) ticari çeşitlerinin genetik temellerini taşıyan 18 soya atası ile USDA soya germplazm koleksiyonundan temin edilen 17 bitki introduksiyonu arasındaki farklılığın RAPD markörleri ile belirlenmesi üzerine yaptıkları çalışmada, Operon teknolojisinden 169 primer kullanmışlar ve bunlardan 125'ini değerlendirmeye almışlardır. Toplam 833 çoğaltılmış fragmentin 281'inin polimorfik olduğu gözlenmiş ve elde edilen polimorfik bantlar 4 farklı cluster gruplandırması ile değerlendirilmiş ve bu değerlendirmelerin sonucunda kullanılan bütün metodlar benzer sonuçları vermiştir. Thompson et al., (1998)

Skoula et al., (1999) 3 farklı *Salvia fruticosa* popülasyonunu temsil eden 48 klonda uçucu yağ profilleri ile genetik farklılık değerlerini karşılaştırmak için RAPD metodunu uygulayarak Operon teknolojisinden

11 tesadüfi primer kullanmışlar ve bunlardan 10'u polimorfik bant vermiştir. Görüntülenen 155 bantın büyüklükleri 250-1460 baz arası uzunluklarda değişmiştir. Populasyon içi ve populasyon arası değerlendirmelerde uygulanmış olan RAPD ve uçucu yağ analizlerinin her ikisinde de araştırmaya alınmış her 3 populasyon arasında varyasyonu tespit etmişlerdir.

Fuentes et al., (1999) izoenzim, RAPD ve AFLP metodlarını kullanarak 18 ticari çeltik çeşidinin genetik uzaklıklarını incelemişlerdir. Polimorfizmi 4 izoenzim, 21 RAPD ve 4 AFLP kombinasyonlarında belirlemişlerdir. Farklı çeşitler arasındaki genetik varyabilitenin düşük çıkmasına rağmen, RAPD ve AFLP markörlerinin her ikisinin de çeltik genotiplerinde genetik farklılığın tayin edilmesi için etkili metodlar olabileceğini saptamışlardır.

Lazo et al., (1994) *G. hirsutum* ve *G. barbadense* arasında interspesifik melezlemelerle elde edilen melezlerde lif dayanıklılığına bağlı RAPD markörlerini saptamışlardır. TM-1, 3-79 ebeveynleri ile bunların F₁ ve F₂ bireylerinde fenotipik karakterleri ve 85 RAPD primerini değerlendirmişlerdir. 173 F₂ populasyonunun tüm analizler sonucunda farklılık gösterdiği çalışmada türler arası F₁ monosomik ve monotelodisomik TM-1 pamuk hatlarında kromozom 16 ile ilişkili 25 RAPD fragmentini saptamışlardır.

Nebauer et al., (2000) yapmış oldukları çalışmada *Digitalis* ssp. genusunun 6 türünde interspesifik varyasyonu tespit etmek amacıyla kullandıkları RAPD markörleri sayesinde 42 bireyde 10 mer'lik 4 primer ile uzunlukları 400-3700 baz arasında değişen bantlar elde etmişler ve bu bantların çoğunluğunun (%98,9) türler arasında polimorfik olduğunu

gözlemlemiştir. . *Digitalis* genusunda RAPD markörleri ile yapılan bu çalışmanın sonucunda varılan gözlemlerin morfolojik özellikler kullanılarak elde edilen sonuçlarla tamamen uygun çıktığını belirtmişlerdir. Ayrıca bulunan genetik benzerlik seçilen PCR jellerinde Southern-blot analizleri ve sekanslanan bazı amplifikasyon ürünleri ile de teyit edilmiştir.

Mailer and May (1999) *Brassica napus* L.'in 4 ticari çeşidinden elde edilen 50'şer bitkide RAPD polimorfizmini araştırmışlardır. 10 baz uzunluğunda 4 primer kullanmış oldukları Çalışmada Rainbow çeşidinin Oscar, Dunkeld ve Narendra çeşitlerinden oldukça farklı olduğu sonucuna ulaşmışlardır. Bireylerin karışımından elde edilen bant şablonlarında da bireylerin en az % 15'inde ait oldukları çeşitlere özgü RAPD bant desenleri görülmüştür.

Kelly and Miklas (1998) Fasulye *P. vulgaris* L.'de hastalıklara dayanıklılık ıslahında RAPD markörlerinin rolünü saptamışlardır. Fasulyenin 7 önemli patojenine dayanıklılık sağlayan 15 gen ile sıkı bir linkage halinde bulunan 23 RAPD ve 5 SCAR markörü belirlemişler ve bunları QTL'de kayıt altına almışlardır. Sonuçta RAPD markörlerine dayalı indirekt seleksiyonun hastalıklara dayanıklı fasulyelerin geliştirilmesinde kullanılabileceğini göstermişlerdir.

Hu et al., (1997) *T. aestivum* L. em Thell'de küfe dayanıklılığı sağlayan PM 1 genine bağlı RAPD markörlerini araştırmak amacıyla hastalığa duyarlı Clark ticari çeşidi ile dayanıklı Zhengzhau 871124'ün melezlenmesinden elde edilen genotipleri ve bunlardan elde edilen sonraki generasyonları materyal olarak kullanmışlardır. 10 mer'lik 1300 primerini kullanan araştırmacılar, PM 1 genin taşıyan farklı bir buğday

hattında 2 RAPD markörünün (UBC 320₄₂₀–UBC 638₅₅₀) hastalığa dayanıklılıkta birlikte açılım gösterdiğini saptamışlardır. 3 RAPD markörü OPF 12₆₅₀ de belirleyerek dayanıklılık geninden 5.4±1.9 cM uzakta olduğunu saptamışlardır. Sonuçlarla RAPD markörlerinin buğday ıslahında seleksiyonu kolaylaştırabileceğini ve küfe dayanıklılıkta gen piramidleşmesine imkan verdiğini göstermişlerdir.

N. plumbaginifolia X *N. longiflora* melezinin 99 F₂ bitkisinde 69 RFLP ve 102 RAPD ayırımına dayanarak bu ebeveynlerin linkage haritalarının oluşturulduğu çalışmada 60 RFLP ve 59 RAPD lokusunu taşıyan 9 önemli linkage grubundan oluşan harita 1062 cM'lık bir yer kaplamıştır. Daha önceki çalışmalarda 20 RFLP markörü ile haritalanan *N. sylvestris* taksonomik olarak *N. plumbaginifolia* ile *Alatae* bölümünde yer almıştır. Her iki haritada da ortak olarak dağılan markörler karşılaştırılmış ve bu iki türde evrim boyunca genom organizasyonunun olduğu görülmüştür (Lin et al., 2001).

Laporte et al., (1998) *Beta vulgaris* ssp. *maritima*'da mitokondrial H haplotipinin sitoplazmik erkek kısırlık (CMS) ile ilişkisini incelemişlerdir. Seksüel fenotip bir açılma ile mitotip H dölünü, erkek fertilitiyi restore eden bir geni (R1H) saptamak için kullanmışlardır ve bu lokusa bağlı 9 RAPD markörü belirlemişlerdir. R1H geninin pozisyonunu tam olarak belirlemek için aynı linkage grubu içinde 4 RFLP lokusunu, açılma döllerinde haritalamışlar ve böylece RFLP, RAPD ve R1H lokuslarını içeren bölgenin bir linkage haritasını oluşturmuşlardır.

Komatsuda et al., (1997) *Hordeum vulgare* L.'de başakçık sayısını belirleyen v lokusuna bağlı RAPD markörlerini araştırmışlardır. 2 sıralı

(KNG) ve 6 sıralı (AZ) ebeveynlerin melezlerini tekrarlanan ebeveyn olarak AZ ile geri melezleyerek rekombinant arpa hatları elde etmişlerdir. Bu hatlar arasında 888 primer kullanılarak 8 RAPD markörü belirlemişlerdir. OPJ-09₈₅₀ ve OPP-02₇₀₀ fragmentleri v lokusuna 1.4 cM uzaklıkta iken CMNA-38₇₀₀ rekombinant frekansı 0 ile bağlı çıkmıştır ve böylece v lokusu etrafında 3 RAPD lokusunu kümelemişlerdir.

Brunell et al., (1999) *Secale cereale* L.'de biyotik strese dayanıklı birkaç geni taşıyan 2R kromozomunun *T. aestivum* L.'in 2B kromozomuna translokasyonu çalışmasında homozigot buğday hatlarında 2RS.2BL ve 2BS.2RL merkezi translokasyonları için 489 RAPD primerini değerlendirmişler ve 69'undan tam sonuç almışlardır. 2RS kromozom kolu üzerinde 17, 2RL kolu üzerinde 15 ve 2B üzerinde de 33 markör elde etmişlerdir. Haritalama çalışmalarının bir başlangıcı olan bu araştırmanın buğday-çavdar kromozomlarında translokasyon kıvrım noktalarının lokalizasyonu için yararlı olacağı sonucuna ulaşmışlardır.

Arnholdt-Schmitt (2000) *H. perforatum* L.'nin üreme şekilleri üzerindeki çalışmalar için RAPD parmak izi analizinin yararlı olup olmayacağını araştırmıştır. Bir yabancı popülasyon ve 2 aksesyonda 6 primeri değerlendirmiştir. Bu çalışma RAPD parmak izi analizinin *H. perforatum* popülasyonlarında üreme şekillerini tespit etmek için yararlı olduğunu ortaya koymuştur.

Fahima et al., (1999) İsrail ve Türkiye'den toplanan 11 *T. dicoccoides* popülasyonundan progenitor olarak kullanılan 110 yabancı tetraploid buğday genotipinde RAPD polimorfizmini araştırmışlardır. Kullandıkları 100'ün üzerinde primerlerden 10'u polimorfik bantlar vermiştir. Değerlendirilen 59 bantın 48'i polimorfik 11'i monomorfik

bulunmuştur. RAPD genotiplemesine dayalı diskiriminant analizleriyle genotiplerin % 95,5'ini orijin bölgesi içinde sınıflandırmışlardır. Populasyonlar içindeki genetik uzaklığın populasyon orjin bölgeleri arasındaki coğrafik uzaklık ile hiçbir ilişkisini bulamamışlardır. Elde edilen sonuçlar RAPD markörlerinin *T. dicoccooides*'de genetik farklılığın ölçülmesinde ve populasyon haritalarının geliştirilmesinde uygun ebeveynlerin saptanması için yararlı olduğunu göstermiştir.

RAPD markörleri yabancı ve tetraploid buğday çeşitleri arasındaki polimorfizmi tayin etmede öncelikle kullanılmaktadır (Joshi and Nguyen, 1993a;1993b). İsrail, Türkiye ve Ürdün'de yabancı buğdayların farklı aksesyonları arasında tarımı yapılan durum buğdaylarından daha yüksek düzeyde polimorfizm elde edilmiştir. Joshi and Nguyen (1993b)'in İsrail'den 6 lokasyondan ve Türkiye ve Ürdün'den 3 lokasyondan toplanan *T. dicoccooides*'lerin sadece 17 genotipini içeren çalışması, bu türler içinde bulunan genetik varyasyonun sadece küçük bir kısmını göstermektedir.

Vierling and Nguyen (1992), *T. monococcum* ve *T. urartu* diploid buğday türlerinin genetik farklılığını PCR ve tasadüfi primerler kullanarak incelemişler ve elde ettikleri sonuçlar *T. monococcum* genotipleri arasında *T. urartu*'dan daha fazla bir benzerlik olduğunu göstermiştir. Verilerinin analizi, RAPD metodunun genotipler arasındaki genetik ilişkileri saptamada elverişli bir yöntem olduğunu ortaya koymuştur.

Hu et al., (1997) *T. aestivum* L. em Thell'de küfe dayanıklılığı sağlayan PM 1 genine bağlı RAPD markörlerini araştırmışlardır. RAPD

markörlerinin buğday ıslahında seleksiyonu kolaylaştırabileceğini ve küfe dayanıklılıkta gen pramidleşmesine imkan verdiğini göstermişlerdir.

Demir vd., (1999a) arpa, buğday, hibrit mısır çeşitleri ve biber hatlarını moleküler düzeyde tanımlamışlar ve DNA parmak izlerini çıkarmışlardır. RAPD markörlerinin kullanıldığı araştırmada en fazla polimorfik bant veren primerler; arpa çeşitlerinde OPQ-14, buğday çeşitlerinde OPR-05, hibrit mısır çeşitlerinde OPQ-09 olmuştur. Bu primerler bireylerin tanımlanmasında ve genetik polimorfizmin saptanmasında başarılı olmuştur.

Demir vd., (1999b) genetik köken olarak birbirinden farklı bitkisel ve hayvansal objelerde RAPD parmak izlerini çıkararak, genotiplere ait genetik benzerlik ve farklılıkları saptamışlardır. Makarnalık buğday, arpa, hibrit ayçiçeği ve bıldırcınlarda materyallere göre farklı sayıda 10 mer'lik primerler kullanmışlardır. Sonuçta RAPD yöntemi ile bireylere özgü DNA parmak izlerinin çıkarılması başarılı olmuş ve genetik benzerlik ve farklılıkları hesaplamışlardır.

Akçalı (2005) sekiz ticari makarnalık buğday (Ege-88, Yavaros-79, Atlar-84, Kunduru-1149, Kızıltan-91, Gediz-75, Salihli-92 ve Chen S) ile yabani tetraploid *Triticum dicoccoides* buğdayını melezlemiş ve ebeveynler ile bunların F₁, F₂ ve F₃ döllerinde bazı agronomik ve morfolojik özelliklerle birlikte protein oranı, bu özelliklerin heterosis ve heterobeltiosis değerlerini ve de ayrıca RAPD markörleri ile ebeveynler ve bunların döllerinde yüksek protein içeriği ilişkilerini incelemiştir. İstatistiki analiz sonuçlarına göre; 2001-02 yılı F₂ populasyonunda tek bitki tohum ağırlığı, kardeş sayısı, başakta tane ağırlığı ve başakta tane sayısı özellikleri bakımından tüm

kombinasyonlar, 2002-03 yılı F₂ populasyonunda bu özellikler yanında protein oranı bakımından tüm kombinasyonlar ve 2002-03 F₃ populasyonunda tek bitki tohum ağırlığı, kardeş sayısı ve başakta tane ağırlığı bakımından tüm kombinasyonlar, protein oranı bakımından da Yavaros-79 x *T. dicoccoides*, Atlas-84 x *T. dicoccoides* ve Kızıltan x *T. dicoccoides* kombinasyonları yüksek (Coefficient of Variation) değerleri vermiştir.

Bhutta et al., (2005) *Triticum aestivum L.* 'in 10 farklı çeşidinde, RAPD analiziyle, genetik farklılıkları belirlemiştir. Bu çalışmada toplam 25 tane 10 baz'lık primer kullanılmıştır. Her primer ortalama 7.6 band oluşturmuştur. Bantların % 44.64'ünün polimorfik olduğu gözlenmiştir. Bu çalışmanın sonucunda RAPD markörlerinin buğdayların genetik tanımlamasında yeterli olduğu gözlenmiştir.

Son yıllarda ülkemizde DNA markörleri üzerine yapılan oldukça fazla sayıdaki araştırmada, araştırmacılar açısından daha kolay, ekonomik ve kısa sürede sonuç alınabilir olması nedeniyle RAPD markörleri etkin bir şekilde kullanılmaktadır.

2.4.2. SSR (Mikrosatellitler)

SSR veya mikrosatellitler ökaryotik genom boyunca dağılmış bulunan ve ardışık olarak tekrarlanmakta olan 2-6 nükleotid gruplarından oluşmaktadır. Bu gruplar örneğin (AT)_n, (AG)_n, (ATT)_n veya (GACA)_n şeklinde gösterilmekte ve n ardışık tekrar sayısını belirtmektedir. Mikrosatellitleri çevreleyen DNA dizileri genellikle aynı türün bireyleri arasında korunmuş olduklarından, farklı genotiplerde çakışan SSR'ların PCR primerleri ile çoğaltılarak seçimine izin vermektedir. Ardışık SSR tekrarlarının sayısındaki farklılık PCR sonucu farklı uzunlukta parça

çoğaltımıyla sonuçlanır. Bu tekrarlar çok yakın tür ve çeşitler arasında dahi tekrarlanan ünitelerin sayısında değişikliğe yol açan mutasyonlar neden ile oldukça polimorfiktir. SSR'ları çevreleyen korunmuş DNA dizileri primer olarak kullanılarak PCR metodu vasıtasıyla bir lokustaki farklı alleller tespit edilebilir. SSR tekniğinin bitkilerde genetik haritalama çalışmalarındaki kullanımı avantajlarından ötürü her geçen gün artmaktadır. SSR'lar yüksek oranda polimorfik olduklarından bitkilerde oldukça fazla bilgi verici bir özelliğe sahiptirler. Ayrıca eşbaskın markör vermesi ve PCR kolaylığına sahip olması da kullanım oranını artırmaktadır. Son olarak, SSR'lar bitki genomlarında oldukça bol olup üniform bir dağılıma sahiptirler. (Yıldırım ve Kandemir, 2001).

Tüm ökaryotların genomları mikrosatellit yada SSR (simple sequence repeat) olarak ifade edilen bir sekans sınıfı içerir, 6 bp den küçük temel bir motif oluşturan tandem dizilime sahip mikrosatellitler bir çok ökaryotik genom için genomun her yerinde rastlanabilen genetik markör olarak önemli bir kaynak olarak belirlenmiştir. Mikrosatellit analizleri PCR (polymerase chain reaction) dayanır. RFLP analizlerinden çok daha kolay uygulanır ve otomasyon uyumluluğu oldukça yüksektir. Bitkilerde mikrosatellitler yüksek oranda bilgi sağlayıcıdır. Multiallelik olmaları sebebiyle birçok bitkide lokusa özel markörlerdir. Evrim çalışmalarında yüksek potansiyele sahiptirler ve filogenetik çalışmalar için kullanılmaktadırlar. Mikrosatellitler hexaploid ekmeklik buğdayda diğer Markör sistemlerinden çok daha yüksek polimorfizm seviyesi gösterirler ve daha fazla bilgi sağlayıcıdır. Bununla beraber genom büyüklüğünden dolayı buğdayda mikrosatellitlerin geliştirilmesi ekstra zaman kullanımına ve yüksek maliyete gereksinim gösterir. Bu

gibi markörler çoğunlukla kodominant kalıtım gösterir ve çoğu durumda kromozoma özeldir. Bu özellik hexaploid genom için faydalıdır. Hexaploid ekmeklik buğday dünyadaki en önemli bitkilerden biridir ve intraspesifik polimorfizm çok düşüktür. Çalışmada büyük buğday genomu için yüksek polimorfik mikrosatellit markörler kullanılarak prosedür optimize edilmiştir, 279 mikrosatellitle çevrili 7 homolog kromozom grubunu içeren buğday genomunun genetik bir haritası ve geliştirilen 230 polimorfik primer seti sunulmuştur. Buğday genomunun hipometillenmiş bölgelerinden elde edilen klonları kapsayan mikrosatellit izolasyonu kullanışlı markörlerin oranını artırmıştır. Geliştirilmiş primer setlerinin çoğu (%80) genom spesifiktir ve ekmeklik buğdayın 3 büyük genomunun (A,B ve D) sadece birindeki tek bir lokusu belirler. Birden fazla lokusu markörlerin sadece %20'si belirler. 230 primer seti kullanılarak toplam 279 lokus çoğaltılarak International Triticeae Mapping Initiative (ITMI) Opata 85 X W7984 ün önceden RFLP ile haritalanmış referans populasyonunun genetik çatisi üzerinde yer almıştır. 65 mikrosatellit haritalanmış ve 214 mikrosatellit çok yakın mesafelerde belirlenmiştir. 93 lokus A genomunda, 115 B genomunda ve 71 D genomunda haritalanmıştır. Markörler birkaç sentrometrik bölgedeki gruplandırma ile linkage haritası boyunca tesadüfi dağıtılmıştır (Röder et al., 1998).

Buğday genotipleri arasında DNA polimorfizminin araştırılmasında, genotiplerin tanımlanmasında ve genetik farklılıkların tahminlenmesinde mikrosatellit markörlerinin kullanılabilirliğini incelemek için 55 elit buğday genotipi ve 20 buğday mikrosatellit markörünü kullandıkları çalışmada 21 lokusta 155 allelin tümü

araştırılmış, lokus başına düşen allel sayısı 1-13 arasında dağılım göstermiş, ortalama allel sayısı 7.4 olarak bulunmuştur. Sonuçlar mikrosatellit markörlerinin çok kullanışlı olduğunu göstermiştir.

Elit buğday materyalinde genetik varyabilitenin bulunması, buğday üretiminin artırılması için amaçlanan her ıslah programında önceden gereklidir (Prasad et al. 2000,).

Buğday mikrosatellitlerinde $(GA)_n$ için ortalama dinükleotid sayısı ve MS (Mikrosatellit) bütünü yaklaşık olarak eşit olması sebebiyle karşılaştırılabilirler (Plaschke et al.,1995). Farklı allellerin sayılarını belirlemek için MS in tamamının $(GA)_n$ tekrarlarından 1-3 kat daha uzun olduğu belirlenmiştir. Her tekrar allel için daha az $(GT)_n$ tekrarı belirlenmiştir fakat ortalama olarak daha kısadır. Tekrar sayıları ve allel sayıları arasında doğrusal bir korelasyon varsayılırsa $(GA)_n$ mikrosatellitlerin $(GT)_n$ lerden daha polimorfik olduğu anlamına gelir.

Araştırmacılar, avrupa buğday çeşitlerinin mikrosatellit temelli veritabanı analizleri ve yapılandırılması için yaptıkları çalışmada, 19 mikrosatellit ve 1 sekans spesifik marker kullanılmıştır. Özellikle kışlık tipler olmak üzere 502 Avrupa buğday çeşidinin yer aldığı bir veritabanı kurmuşlardır. Fragment analizleri için en az iki ayrı laboratuarda farklı teknikler kullanılarak veri noktaları üretilmiştir. %99.5 doğruluk seviyesinde başarı elde edilmiş ve dublikasyonlar haricinde tüm çeşitler arasında 199 allel belirlenerek tanımlanan ebeveynlerden çeşitler türetilmiştir. Güneydoğu Avrupa da heterojenitenin üst seviyelerde olması nedeniyle çeşitlerin yaklaşık olarak % 25 inde bazı heterojenik unsurlar gözlenmiş ve yüksek seviyede genetik farklılık ile çok sayıda farklı allel bulunmuştur. Sonuç olarak farklı coğrafik bölgelerde birçok

mikrosatellit için relativ allel frekansı çeşitlendirilmiştir(Röder, et al., 2002).

Basit Dizilim Tekrar (SSR) DNA belirleyicileri ya da Mikrosatellitler, ökaryot genomlarında bulunan di-, tri-, tetra-nükleotit tekrar üniteleridir. Bu belirleyici lokuslarının popülasyonların bireyleri arasında oldukça polimorfik olmaları, tekrar ünitelerinin sayılarındaki değişimden kaynaklanmaktadır. Her SSR lokusu, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) kullanılarak ve tekrar ünitelerinin dışındaki bölgelerin DNA dizisinin bilinmesi sayesinde özgün bir şekilde çoğaltılabilir. Bu belirleyicilerin kullanılmasındaki tek kısıtlayıcı faktör, lokusa özgün primerlerin tasarımı için DNA dizilimlerinin bilinmesi gerekliliğidir. Ekonomik önemi olan organizmalar ve bunlara genetik olarak yakın olan diğerleri için bu kısıtlama, primer dizilerinin ve PCR koşullarının yayınlanmış olması nedeni ile azalmıştır. Bununla birlikte rapor edilen PCR amplifikasyon koşulları çalışmamızda uygulandığında (buğday mikrosatellitlerinden WMS30 ve WMS46 markörleri ile) bazı kontaminasyon bantları görülmüştür. Bunun nedeni büyük olasılıkla farklı laboratuvar koşullarından kaynaklanmaktadır. Bu çalışmada buğday mikrosatellitlerinden WMS30 ve WMS46'nın PCR koşullarının optimizasyonu sunulmaktadır. En önemli parametrelerin primer bağlanma ısısı ve Mg^{2+} iyonu derişimi olduğu bulunmuştur. (Doğrar ve Akkaya, 2001)

Mikrosatellitler genom içerisinde, mono, di, tri yada tetra nükleotid permutasyonların her hangi bir formu şeklinde tandem olarak tekrarlanan (tandem repeated) ve polimorf özellik gösteren kısa DNA sekanslarıdır. Bir çok omurgalı genomunda görülen mikrosatellitlerin temel motifi

(CA)n dir. Mikrosatellit tekniğiyle yapılan marker destekli seleksiyon, doğumla beraber uygulanması mümkün yaşa ve cinsiyete bağımlı olmaksızın uygulanabilen bir yöntemdir. Bu açıdan genetik ilerleme formülünde kullanılan faktörleri etkileyerek daha etkin ve güvenilir bir seleksiyon uygulamasını mümkün kılmaktadır (Ün vd., 2000).

Aykut (2007) kahverengi pas dayanıklılık geni *Lr13*'e ait moleküler markörleri geliştirmek amacıyla CIMMYT'ten temin edilmiş ve her biri farklı bir kahverengi pas dayanıklılık geni taşıyan 41 adet Thatcher yakın izogenik hattında ve duyarlı yerli çeşit İzmir 85 ile *Lr13* genini taşıyan 12 No'lu dayanıklı hat (Tc*6/Frontana) arasında yapılan melezin F₁ generasyonunda AFLP ve SSR markörlerini incelemiştir. Thatcher yakın izogenik hatlarından oluşturulan DNA ve DNA bulklarında 246 AFLP primer kombinasyonu kullanmış ve bunlardan 28 adedinin 12 No'lu hatta toplam 33 farklı polimorfik bant deseni sergilediği belirtilmiştir. Çalışmanın SSR analizleri kısmında 7 primer kombinasyonu kullanan araştırmacı bunlardan sadece 2 tanesinin DNA ve DNA bulklarında polimorfizm oluşturduğunu belirtmiştir. Polimorfik bant deseni sergileyen AFLP ve SSR primerlerini yakın izogenik hatlarda ve ebeveynlerle birlikte F₁ generasyonunda tekrar incelemiştir. Elde edilen sonuçlardan 6 adet AFLP primer kombinasyonu (E34 M70, E45 M67, E43 M75, E49 M67, E47 M64 ve E57 M69) ile mikrosatelit primeri Wms 630'un sadece 12 No'lu hatta spesifik bantlar verdiğini gözlemiş ve bu primerlerin incelenen materyalde *Lr13* genine aday markörler verebileceğini belirlemiştir. Bu çalışma ile ayrıca ekmeklik buğdayda AFLP ve SSR tekniklerinin kahverengi pas dayanıklılık genlerini araştırmada yararlı olduğunu saptamıştır. Farklı dayanıklılık

genleri taşıyan Thatcher yakın izogenik hatlarının kendi içlerinde dar bir genetik çerçeveye sahip oldukları ve bu nedenle de ilgilenilen dayanıklılık genini belirlemede iyi bir odaklanma sağlayabileceği kanısına varmıştır.

3.MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Bitki materyali

Çalışmanın materyalini aşağıda belirtilen, CIMMYT' den temin edilmiş sarı pasa (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*) dayanıklı 16 buğday hattı ile Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsünden temin edilmiş sarı pasa duyarlı 3 buğday çeşidi ve bu ebeveynlerden türetilmiş melez generasyonları (F₁, F₂) oluşturmaktadır. Ebeveynlerden yerli, duyarlı çeşitler anaç olarak kullanılmıştır. İnokülasyonda kullanılmış olan sarı pas (*Puccinia striiformis*) inokülantları yine Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsünden temin edilmiştir . materyal çizelge 3.1 de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1:Sarı pasa dayanıklı tek gen hatlar

1	Chinese 166	Yr-1
2	Lee	Yr-7
3	Heines Kolben	Yr 6 + Yr 1
4	Vilmorin 23	Yr-3a, Yr 4a
5	Moro	Yr-10
6	Strubes Dickopf	St-Dc (iki +)
7	Suwan 92 x Omar	SuxOm (1?)
8	Clement	Yr 9+1
9	Hybrid 46	Yr 3b, Yr 4b
10	Reicherberg 42	Yr 7 + bir
11	Heines Peko	Yr 6 + bir
12	Nord Desprez	Yr 3a, Yr 4a
13	Compair	Yr- 8
14	Carstens V	Yr-32
15	Spaldings Prolific	Sp.P.
16	Heines VII	Yr 2+1

Sarı pasa duyarlı çeşitler

1 Kaşifbey

2 Cumhuriyet 75

3 Seri 82

Çalışmada kullanılan dayanıklı tek gen hatlar ve duyarlı çeşitlerin özellikleri aşağıda belirtilmiştir.

Dayanıklı tek gen hatlar

Chinese 166

- Genom lokalizasyonu 2A.
- Barındırdığı dayanıklılık geni Yr-1
- Orijinal kaynağı Chinese 166 dır.
- Düşük enfeksiyon tipi gösterir, enfeksiyon okuma değerleri çimlenme(1) erişkin (1)
- Yakın izogenik olup test hattı olarak kullanılmaktadır.
- Gen referansı (Lupton, FGH and Macer, RCF, Trans Br Mycol Soc 45:21-45)

Lee

- Genom lokalizasyonu 2BL.
- Barındırdığı dayanıklılık geni Yr-7
- Orijinal kaynağı *Triticum turgidum* dur.
- Linkage durumunda olduğu diğer genler Sr9g
- Test hatlarındaki diğer genler Le1, Le2
- Düşük enfeksiyon tipi gösterir, enfeksiyon okuma değerleri çimlenme(2) erişkin (2)

-
- Yakın izogenik olup test hattı olarak kullanılmaktadır.
- Gen referansı (Macer, RCF, Hereditas Suppl 2:127-142)

Heines Kolben

- Genom lokalizasyonu 7BS.
- Barındırdığı dayanıklılık geni Yr-6, Yr-1
- Orijinal kaynağı Heines Kolben dir.
- Düşük enfeksiyon tipi gösterir, enfeksiyon okuma değerleri çimlenme(4) erişkin (4)
- Test hatlarındaki diğer genler HK, 2
- Yakın izogenik olup test hattı olarak kullanılmaktadır.
- Gen referansı (Macer, RCF, Hereditas Suppl 2:127-142)

Vilmorin 23

- Genom lokalizasyonu 6A.
- Barındırdığı dayanıklılık geni Yr-3a, Yr-4a
- Orijinal kaynağı Vilmorin 23
- Düşük enfeksiyon tipi gösterir
- Test hatlarındaki diğer genler 3a
- Yakın izogenik olup test hattı olarak kullanılmaktadır.
- Gen referansı (Chen, XM and Line, RF, Personal communication)

Moro

- Genom lokalizasyonu 1BS.
- Barındırdığı dayanıklılık geni Yr-10
- Orijinal kaynağı Moro
- Düşük enfeksiyon tipi gösterir, enfeksiyon okuma değerleri çimlenme(1) erişkin (1)

- Test hatlarındaki diğer genler (Mor)
- Yakın izogenik olup test hattı olarak kullanılmaktadır.
- Gen referansı (Macer, RCF, Trans Br Mycol Soc 65:351-374)

Strubes Dickopf

- Genom lokalizasyonu D.
- Barındırdığı dayanıklılık geni Yr-2,3,4
- Orijinal kaynağı Strubes Dickopf
- Düşük enfeksiyon tipi gösterir.
- Yakın izogenik olup test hattı olarak kullanılmaktadır.
- Gen referansı (Stubbs, RW, Personal communication)

Suwan 92 x Omar

- Genom lokalizasyonu 2B.
- Barındırdığı dayanıklılık geni Su92
- Orijinal kaynağı Suwan92\Omar
- Düşük enfeksiyon tipi gösterir.
- Yakın izogenik olup test hattı olarak kullanılmaktadır.
- Gen referansı (Chen, XM and Line, RF, Personal communication)

Clement

- Genom lokalizasyonu 4B.
- Barındırdığı dayanıklılık geni Yr-9+1
- Orijinal kaynağı Clement
- Düşük enfeksiyon tipi gösterir.
- Test hatlarındaki diğer genler 9
- Yakın izogenik olup test hattı olarak kullanılmaktadır.
- Gen referansı (Chen, XM and Line, RF, Personal communication)

Hybrid 46

- Genom lokalizasyonu 1B-6B.
- Barındırdığı dayanıklılık geni Yr-3b, Yr-4b
- Orijinal kaynağı Hybrid 46
- Düşük enfeksiyon tipi gösterir. Enfeksiyon okuma değerleri çimlenme (2) erişkin (1-2)
- Test hatlarındaki diğer genler 4b, 3b, H46
- Yakın izogenik olup test hattı olarak kullanılmaktadır.
- Gen referansı (Lupton, FGH and Macer, RCF, Trans Br Mycol Soc 45:21-45)

Heines Peko

- Genom lokalizasyonu 7B.
- Barındırdığı dayanıklılık geni Yr-6+
- Orijinal kaynağı Heines Peko
- Düşük enfeksiyon tipi gösterir.
- Yetişkin bitkilerde gözlenmektedir.
- Yakın izogenik olup test hattı olarak kullanılmaktadır.
- Gen referansı (Stubbs, RW, Personal communication)

Nord Desprez

- Genom lokalizasyonu 4A.
- Barındırdığı dayanıklılık geni Yr 3a, Yr 4a
- Orijinal kaynağı Nord Desprez
- Düşük enfeksiyon tipi gösterir.
- Test hatlarındaki diğer genler 3a
- Yakın izogenik olup test hattı olarak kullanılmaktadır.

- Gen referansı (Chen, XM and Line, RF, Personal communication)

Compair

- Genom lokalizasyonu 5B.
- Barındırdığı dayanıklılık geni Yr- 8
- Orijinal kaynağı Compair
- Düşük enfeksiyon tipi gösterir.
- Test hatlarındaki diğer genler 8, Yr-19
- Yakın izogenik olup test hattı olarak kullanılmaktadır.
- Gen referansı (Luo et al. 2005 Phytopathology 95:1266-1270)

CarstensV

- Genom lokalizasyonu 2AS.
- Barındırdığı dayanıklılık geni Yr-32
- Orijinal kaynağı CarstensV
- Düşük enfeksiyon tipi gösterir.
- Test hatlarındaki diğer genler CV1-CV2-CV3
- Yakın izogenik olup test hattı olarak kullanılmaktadır.
- Gen referansı (Luo et al. 2005 Phytopathology 95:1266-1270)

Spaldings Prolific

- Genom lokalizasyonu 2B.
- Barındırdığı dayanıklılık geni Sp. P.
- Orijinal kaynağı Spaldings Prolific
- Düşük enfeksiyon tipi gösterir.
- Yakın izogenik olup test hattı olarak kullanılmaktadır.
- Gen referansı (Chen, XM and Line, RF, Personal communication)

Heines VII

- Genom lokalizasyonu 7B.

- Barındırdığı dayanıklılık geni Yr- 2+1
- Orijinal kaynağı Heines VII
- Düşük enfeksiyon tipi gösterir. Enfeksiyon okuma değerleri çimlenme (4) erişkin (4)
- Test hatlarındaki diğer genler HVII
- Yakın izogenik olup test hattı olarak kullanılmaktadır.
- Gen referansı (Lupton, FGH and Macer, RCF, Trans Br Mycol Soc 45:21-45) (Ma et al. 2001 Euphytica 120:219-226)

Duyarlı çeşitler

Kaşifbey-95

- Species : *Triticum aestivum* L. (2n=42)
- Tip : yazlık
- Çeşit lokalizasyonu: İzmir-Türkiye
- Gen ve alleller: Glu-A1b,Glu-B1i,Glu-D1d[3184]
- Statü: 1995 yılı tescillenmiş çeşit
- Pedigrisi:
HORK(SIB)/YAMHILL//KALYANSONA/BLUEBIRD[1610]

Cumhuriyet-75

- Species : *Triticum aestivum* L. (2n=42)
- Varyete: erythropermum[228][761];graecum[541][113]
- Tip : yazlık
- Çeşit lokalizasyonu: İzmir
- Gen ve alleller: Glu-A1b,Glu-B1i,Glu-D1d[3184]
- Statü: 1975 yılı tescillenmiş çeşit

- Pedigrisi: SONORA-64*2//TEZANOS-PINTOS-
PRECOZ/YAQUI-54/3/ANDES-64-
A/4/2*FROCOR//YAQUI/KENTANA[667][114][144][2406];

Seri-82

- Species : *Triticum aestivum* L. (2n=42)
- Varyete: erythrospermum[761];graecum[113][541]
- Tip : yazlık
- Çeşit lokalizasyonu: Meksika
- Gen ve alleller:
Rht1[116][1788][2850];Lr23,Lr26[1204][1484];lr13[706];Sr31[1484];Sr9g,Sr31[2636];T1RS.1BL[1372][1688][1788];Yr2,Yr7
,Yr9[1484][1654];Glu-A1a,Glu-B1c,Glu-D1d[2404];
- Statü: 1982 yılı tescillenmiş çeşit
- Pedigrisi:
KAVKAZ/(SIB)BUHO//KALYANSONA/BLUEBIRD[114][144];

(Anonim, <http://genbank.vurv.cz/wheat/pedigree/pedigree.asp>)

3.1.2 Deneme yerinin özellikleri

Bu araştırmanın tarla denemeleri 2003-2006 yıllarında Bornova ekolojik koşullarında yürütülmüş, tarla ve sera denemeleri Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü deneme tarlası ve serasında kurulmuştur. Deneme tarlasının görünümü ve toprağın fiziksel

ve kimyasal özellikleri sırasıyla Şekil 3.1 ve Çizelge 3.2’de gösterilmiştir.



Şekil 3.1: Deneme tarlasının genel görünümü (orijinal)

Çizelge 3.2: Araştırma Yeri Toprağının Bazı Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Özellikler	Örnek Derinliği (cm)	
	0-20	20-40
Kum (%)	24,72	32,72
Kil (%)	32,56	30,56
Mil (%)	42,72	36,72
Bünye	Milli-Kil	Killi-Tın
pH	8,2	7,8
Eriyebilir Toplam Tuz (%)	0,095	0,075
Kireç (%)	21,52	18,64
Organik Madde (%)	1,130	1,150
Toplam Azot (%)	0,101	0,123
Faydalı Fosfor (ppm)	0,40	0,40
Faydalı Potasyum (ppm)	400	300

Ekim öncesinde dekara saf olarak 8 kg N, 8 kg P₂O₅ , ayrıca kardeşlenme ve sapa kalkma başlangıcında toplam 10 kg N verilmiştir.

3.1.3 İklim durumu

Deneme yerine ait iklim verileri (2003-2006 vegetasyon dönemi) Bornova Meteoroloji istasyonundan temin edilmiştir. Bu verilere ait iklim değerleri Çizelge 3.3'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.3: Bornova iklim verileri (2003-2006 yılları ve çok yıllık ortalamalar)

	2003				2004				2005				2006				Uzun yıllar ortalaması			
	OHS	TY	OON	OGS	OHS	TY	OON	OGS	OHS	TY	OON	OGS	OHS	TY	OON	OGS	OHS	TY	OON	OGS
Ocak	11,1	112,6	62,4	3,0	7,1	189,1	65,6	3,1	9,4	111,4	59,9	4,0	6,1	56,5	56,7	4,3	8,1	109,7	68,0	4,0
Şubat	4,9	153,3	60,1	4,3	8,2	26,8	55,9	4,6	7,8	191,8	62,9	4,6	8,8	98,6	59,8	3,4	8,6	89,8	67,0	4,5
Mart	8,6	12,1	52,1	7,1	12,2	12,9	49,2	6,5	11,6	71,5	58,3	5,5	11,6	129,7	60,6	4,9	10,8	72,3	65,0	5,9
Nisan	12,7	109,7	61,0	5,4	15,7	29,6	50,0	6,2	15,9	13,8	50,1	7,8	16,8	27,0	55,2	6,0	15,0	48,9	62,0	7,1
Mayıs	21,3	8,5	52,5	9,0	20,3	10,7	48,4	8,8	21,1	71,7	51,6	8,0	21,0	-	44,3	9,1	20,2	32,2	58,0	9,1
Haziran	27,2	0,8	37,5	11,8	26,5	1,6	45,1	10,4	24,9	40,0	40,4	11,6	26,2	19,2	37,9	9,4	25,0	8,2	50,0	11,3
Temmuz	28,6	-	37,3	12,3	29,0	1,8	37,3	12,0	29,1	0,3	45,1	11,4	28,5	-	35,8	10,9	27,6	3,6	47,0	12,3
Ağustos	28,5	-	38,2	11,1	27,8	-	45,6	10,3	28,5	0,5	45,6	10,9	29,2	-	39,8	10,6	27,0	2,1	50,0	11,5
Eylül	22,5	-	46,9	9,2	23,8	-	49,0	9,1	23,5	5,5	50,9	9,0	23,4	133,5	48,0	8,3	22,2	17,0	56,0	9,9
Ekim	19,7	68,5	51,8	6,8	19,8	1,6	54,2	7,5	17,1	9,2	52,6	7,1					18,0	46,8	63,0	7,3
Kasım	13,1	18,0	62,3	5,8	13,2	72,6	56,8	4,9	12,3	129,8	59,9	4,4					13,2	80,3	68,0	5,1
Aralık	9,5	95,6	65,3	3,0	10,7	45,7	57,5	3,5	11,1	54,3	54,7	3,1					9,9	122,3	70,0	3,7
Ort-Top	17,3	579,1	52,3	7,4	17,9	392,4	51,2	7,2	17,7	699,8	52,7	7,3	19,1	464,5	48,7	7,4	17,1	633,2	60,3	7,6

OHS: Ortalama Hava Sıcaklığı (°C)

TY: Toplam Yağış (mm)

OON: Ortalama Oransal Nem (%)

OGS: Ortalama Güneşlenme Süresi (saat/gün)

3.2 Yöntem

3.2.1 Bitkilerin yetiştirilmesi

Sarı pasa dayanıklı 16 buğday hattı ve anaç olarak seçilen duyarlı çeşitler 4 m uzunluğunda tek sıralar halinde ve melezleme işlemlerinde uygulanacak emaskulasyon ve tozlama çalışmalarına müsaade edecek ölçüde 60 cm'lik sıra aralığıyla ekilmiştir.

3.2.2. Melezlemeler

Araştırma projesi çerçevesinde, çiçeklenme dönemlerinin uygunluğu göz önünde bulundurularak eş zamanlı gelişim göstermiş, baba olarak kullanılan 3 adet tek gen hat (Lee, Compair ve Carstens V) ile anaç olarak seçilen duyarlı çeşitler 2003-2006 üretim yıllarında yetiştirilmiş ve aşağıdaki melez kombinasyonlarından F₁ ve F₂ tohumları elde edilmiştir:

I. kombinasyon

Cumhuriyet 75 x Lee

Cumhuriyet 75 x Compair

Cumhuriyet 75 x Carstens V

II. kombinasyon

Seri 82 x Lee

Seri 82 x Compair

Seri 82 x Carstens V

III. kombinasyon

Kaşifbey x Lee

Kaşifbey x Compair

Kaşifbey x Carstens V

2003-2004 üretim yılı

Melezlemelerde baba olarak kullanılacak sarı pasa (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*) dayanıklı 16 buğday hattı ile anaç olarak kullanılan duyarlı çeşitler (Seri 82, Cumhuriyet 75 ve Kaşifbey) 11.11.2003 tarihinde kurulan melez bahçesine sarı pas'a dayanıklı 16 hat'ın ve 3 duyarlı çeşidin, uygun çiçeklenme zamanlarını yakalamak amacıyla önceden planlandığı şekle uygun olarak 3 farklı ekim zamanı uygulamasının 1. ekim zamanı şeklinde yukarıda belirtilen tarihte ekimi yapılmış ve daha sonra ise diğer iki ekim zamanı 29-12-2003 ve 16-01-2004 tarihlerinde kurulu olan melez bahçesine, ilk ekimde olduğu gibi emaskulasyon işlemlerinde kolaylık sağlayacağı düşünülerek 60 cm sıra aralığı uygulanarak ikişerli sıralar oluşturmak suretiyle ekimleri gerçekleştirilmiştir. Yöreeye has mevsim koşullarında meydana gelen ekstrem şartlar nedeniyle oluşan soğuk zararı 02.03.2004 tarihinde yapılan gözlemlerle tespit edilmiş, ön görülen melezleme çalışmalarının gerçekleştirilebilmesi ve zarar görmüş çeşitlerin telafisi amacıyla anne olarak kullanılacak olan duyarlı çeşitler için ek olarak 4. zaman ekimleri de 23.03.2004 tarihinde yapılmıştır.

15.04.2004-07.05.2004 tarihlerinde melez bahçesindeki anne olarak kullanılacak üç duyarlı çeşit buğdayı başaklarında emaskulasyon (anterlerin uzaklaştırılması) yapılmış (Şekil 3.3 ve 3.4) ve başaklar izole edilmiştir. Daha sonra da baba olarak kullanılan Tek gen hatlar ile tozlama yapılmıştır. F2 jenerasyonu bitkilerine kaynak teşkil edecek olan F1 jenerasyonu bitki tohumlukları elde edilmesi amacıyla her bir duyarlı çeşit çiçeklenme dönemlerinin uygunluğu göz önünde bulundurularak baba olarak kullanılması planlanan 16 tek gen hattan eş

zamanlı gelişim göstermiş 3 adet tek gen hat (Lee, Compair ve Carstens V) tozlayıcı olarak seçilmiş ve anaç bitkilerin emaskülasyonunu takiben izole edilen başaklara 2-3 gün içinde seçilen tozlayıcı bitkilerden uygun olarak alınan başaklar twirl yöntemine göre tozlanmış ve tekrar izole edilmiştir (Şekil 3.2, 3.3ve 3.4).



Şekil 3.2: Melezlemede tozlama aşaması (orijinal)



Şekil 3.3: Melezlemede tozlama aşaması (orijinal)



Şekil 3.4: Melezlemede tozlama aşaması (orijinal)

11-29.06.2004 tarihlerinde melez ve ebeveyn başakları ayrı ayrı hasat edilip daneleme işlemleri yapılmıştır.

Lee, Compair ve Carstens V hatları ile anaç olarak kullanılan Seri82, Cumhuriyet75 ve Kaşifbey çeşitlerinde başarı sağlanmış diğer kombinasyonlardan melez tohum elde edilememiştir

2004-2005 üretim yılı

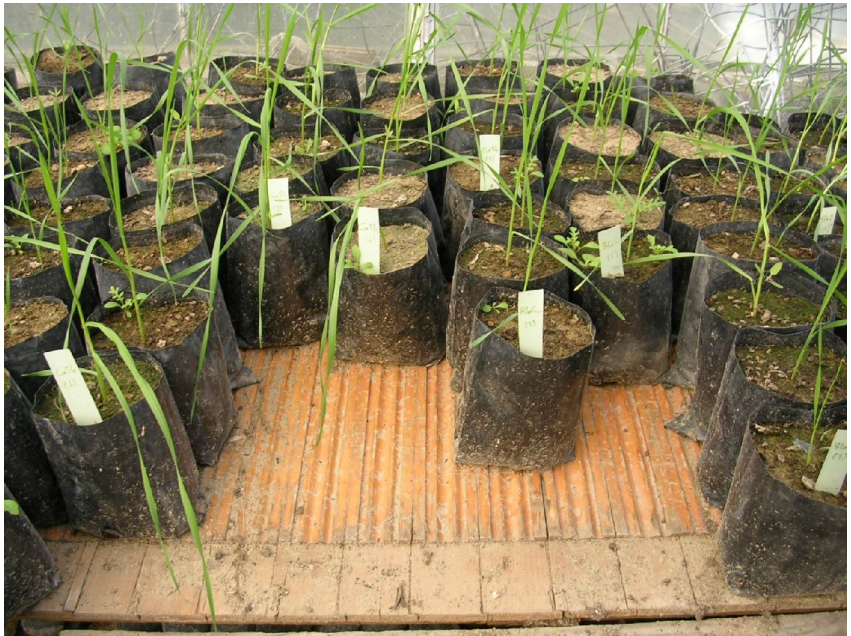
F2 generasyonu bitkilerine tohumluk sağlayacak F1 generasyonu bitkilerinin ve ebeveyn olarak kullanılan tek gen hatlar (Lee, Compair ve Carstens V) ile duyarlı çeşitlerin (Seri82, Cumhuriyet75 ve Kaşifbey) ekimi, çimlenmeyi garantilemek amacıyla önceden hazırlanmış olan gübre ve torf karışımı fide torbalarına 21.12.2004 tarihinde yapılmıştır ve ekim yapılan fide torbaları sera koşullarında çimlendirmeye alınmıştır.



Şekil 3.5: Araştırma materyalinin serada yetiştirilmesi (orijinal)



Şekil 3.6: Araştırma materyalinin serada yetiştirilmesi (orijinal)

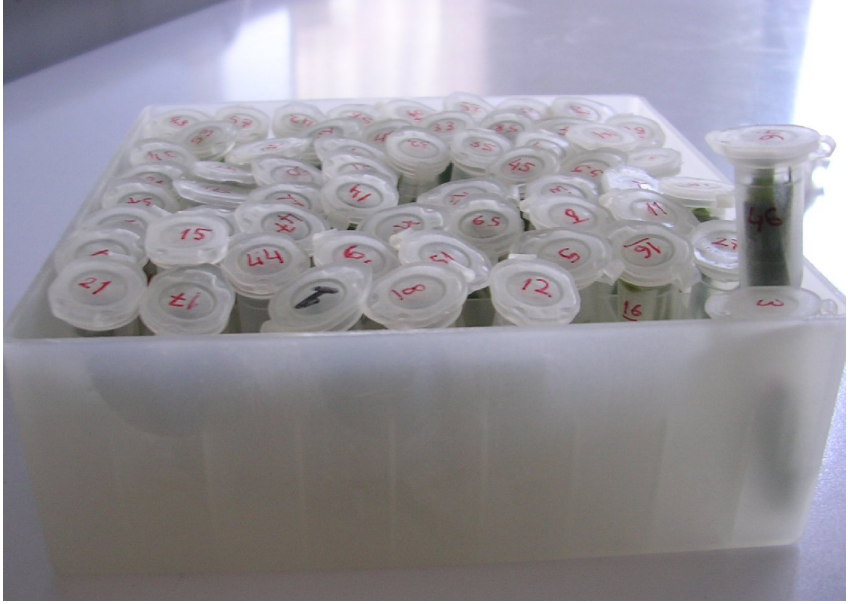


Şekil 3.7: Araştırma materyalinin serada yetiştirilmesi (orijinal)

Daha sonra gelişen F₁ jenerasyonu bitkilerinin ve ebeveynlerden baba olarak kullanılan tek gen hatların ekimi ön hazırlıkları tamamlanmış olan deneme alanlarına şaşırtmak suretiyle 10.03.2005 tarihinde gerçekleştirilmiştir. Aynı zamanda ana olarak kullanılan duyarlı çeşitlerin oluşturduğu ebeveynlerin tarlaya ekimi de belirtilen tarihlerde yapılmıştır. Daha sonra belirtilen ebeveyn ve F₁ bitkilerinden DNA izolasyonuna materyal teşkilini garantilemek amacıyla önceden belirlenmiş olan ve ebeveyn olarak kullanılan 3 adet tek gen hat (Lee, Compair ve Carstens V) ile duyarlı çeşitlerin (Seri 82, Cumhuriyet 75 ve Kaşifbey) arasında tekrar eden melezlemeler 25-29.05.2005 tarihlerinde yapılmıştır .

2005-2006 üretim yılı

F₂ jenerasyonu bitkilerinin elde edilmesi ve F₂ populasyonlarının oluşturulması için F₂ tohumluklarından seçilerek tek bitki elde etmek amacıyla önceden hazırlanmış olan gübre ve torf karışımı fide torbalarına 03.04.2006 tarihinde F₂ jenerasyonu tohumlukları tek, tek olmak koşuluyla torbalara ekim yapılmış ve ekimi yapılan fide torbaları sera koşullarında çimlenmeye alınmıştır. Çimlenen tek F₂ bitkilerinden DNA izolasyonunda kullanılmak üzere yeter miktarda taze yaprak örneği uygun olarak ependorf tüplerinde sıvı azot içerisinde bekletmek koşuluyla toplanmış ve sonrasında kullanılmak üzere -20 C⁰ derecede muhafaza altına alınmıştır.

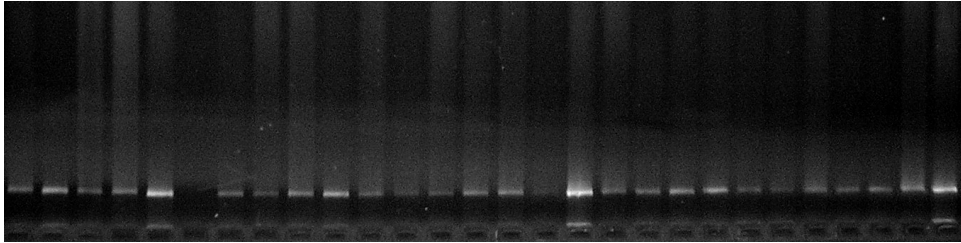


Şekil 3.8:Yaprak örneklerinin ependorf tüplerinde – 20⁰C de muhafazası(orijinal)

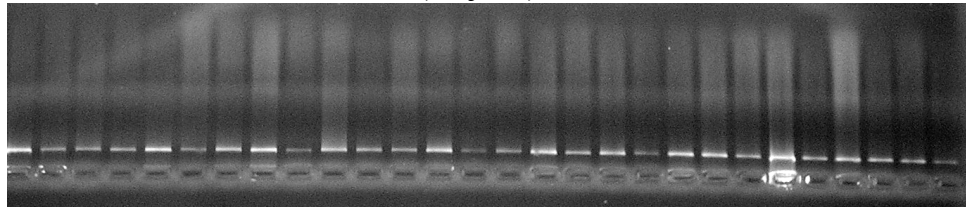
Daha sonraki aşamalarda genotipik açılma göstermiş olan F2 bitkilerinde yapılacak olan seleksiyonda, önemli bir kriter olan inokülasyon işlemi uygun iklim ve koşullar göz önünde bulundurularak, sarı pas (*Puccinia striiformis*) inokülanları kullanılmak suretiyle gerçekleştirilmiştir. Yapılan inokülasyon işleminden beklenen başarı elde edilememiş ve kullanılan inokülant ırklarında herhangi bir çoğalma tespit edilememiş olup daha sonradan fenotipik seleksiyonda örnek teşkil edecek olan F2 bitkilerinde herhangi bir hastalık reaksiyonuyla karşılaşılmamıştır.

2006-2007 üretim yılı

Önceden alınarak -20 C^0 derecede saklanan ebeveynler ve bunlara ait F1 ve F2 jenerasyonu bitki örneklerinden daha sonraki aşamalarda yürütülecek olan DNA analizlerinde kullanılmak üzere DNA izolasyonları gerçekleştirilmiş ve elde edilen DNA'lar da miktar tayini ve uygun seyreltme işlemleri için spektrofotometre de bu örneklerin ölçümleri yapılmıştır. Yapılan ölçümlerden elde edilen OD sonuçlarından hesaplanan DNA miktarlarına göre PCR analizi için μl 'de 5 ng olacak şekilde TE (Tris-EDTA) tamponu ile seyreltilmiştir. Stok ve uygun seyreltmeler sonucu elde edilmiş seyreltik DNA örneklerinde kalite tayini için %1'lik agarose jel de elektroforez işlemi gerçekleştirilmiş ve örneklerin uygun kalitede oldukları gözlenmiştir.



Şekil 3.9: DNA kalite ölçümleri için %1'lik agaros jel elektroforezi
(Orijinal)



Şekil: 3.10: DNA kalite ölçümleri için %1'lik agaros jel elektroforezi
(Orijinal)

3.2.3. DNA analizleri

DNA analizleri Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü'ne ait Uygulamalı Moleküler Genetik Laboratuvarında yürütülmüştür. Çalışmada ebeveyn olarak kullanılan duyarlı çeşitler ve tek gen hatlar ile bunlardan türetilmiş F1 ve F2 generasyonu bitkileri materyalinde; araştırmanın amacı doğrultusunda ebeveyn ve melez döllerini karakterize etmek üzere çalışmaya konu olan tüm melez kombinasyonları içinden Ege Bölgesinin en önemli çeşitleri arasında yer alan Cumhuriyet75'in 02 nolu tek gen hat (Lee) ile olan melez kombinasyonu seçilmiş, DNA analizleri ebeveynler de 10 baz uzunluğunda 40 tesadüfi primer (OPA-14, OPA-15, OPA-17, OPA-18, OPA-19, OPA-20, OPB-01, OPB-02, OPB-03, OPB-04, OPB-05, OPB-11, OPB-12, OPB-14, OPB-17, OPC-01, OPC-03, OPC-05, OPC-06, OPC-07, OPC-08, OPD-12, OPD-15, OPE-07, OPF-03, OPG-01, OPG-02, OPG-13, OPQ-12, OPQ-15, OPR-02, OPT-20, OPU-07, OPAC-12, OPAE-10, OPAF-20, OPAG-04, OPAG-18, OPAN-08 ve OPAN-12) denenmiş ve seçilen melez kombinasyonundan türetilmiş F1 ve F2 generasyonu bitkilerinde ise ebeveynlerde denenmiş 40 primer içerisinden seçilmiş 10 RAPD primeri (OPAE-10, OPB-01, OPB-03, OPB-05, OPB-11, OPC-07, OPD-12, OPG-02, OPAG-04, ve OPAN-12) kullanılarak RAPD analizi yapılmıştır. Ayrıca incelenmek üzere seçilen melez kombinasyonun da ve buna ait F1 ve F2 döllerinde SSR markörleri kullanılarak 5 adet forward ve reverse primeri (WMC-24-F, WMC-24-R, WMC-25-F, WMC-25-R, WMC-27-F, WMC-27-R, WMC-41-F, WMC-41-R, WMC47-F ve WMC47-R) kullanılarak DNA analizleri gerçekleştirilmiştir.

3.2.3.1. DNA izolasyonu

DNA'ların elde edilmesinde Doyle and Doyle (1987) metoduna göre CTAB (hexadecyltrimethylammonium bromide) izolasyon yöntemi kullanılmıştır.

10-15 cm boyundaki genç buğday fidelerinin taze yapraklarından yaklaşık 0.2 gr olacak şekilde alınan örnekler, her ependorf tüpleri içerisinde sıvı azot içerisinde daldırılarak dondurulduktan sonra yine tüpler içerisinde sıvı azot damlatılmak suretiyle toz haline gelinceye kadar ezme çubukları kullanılarak iyice ezilmiş ve tüplere 700 µl DNA izolasyon tamponu eklenerek daha önceden 65 °C'ye ayarlanmış su banyosunda inkübasyona alınmıştır. Örneklerin su banyosunda DNA izolasyon tamponu (Çizelge3.4) ile 30 dakika inkübasyonu sırasında her 10 dakikada bir yavaşça çalkalanmıştır.

Çizelge 3.4: DNA İzolasyon Tamponu [Doyle and Doyle (CTAB)]

Tris HCL, pH: 8.0	100 mM
EDTA	20 mM
NaCL	1.4 M
CTAB	% 2
Na ₂ S ₂ O ₅	% 1
β-mercaptoethanol	% 0.2

Bu işlemin sonunda tüpler su banyosundan çıkartılıp 700µl soğuk 24:1 oranında kloroform + isoamil alkol (CIA) karışımı eklenmiş ve

yaklaşık 5 dakika hafifçe çalkalandıktan sonra mikro santrifüjde 10.000 devirde 4 °C'de 10 dakika süre ile santrifüje konulmuştur. Burada oluşan üst sıvı faz alınarak yeni bir tüpe aktarılmış, üzerine tekrar 600 µl CIA eklenerek 5 dakika elle hafif çalkalandıktan sonra 10.000 rpm'de 4 °C'de 10 dakika süre ile santrifüj işlemi tekrarlanmıştır. Bu işlemlerin sonrasında oluşan üst faz yeni bir tüpe aktarılmış ve 50µl NH₄OAc (10M) ve 60µl NaOAc (3M, pH:5.5) eklenerek yavaşça karıştırılmış , sonrasında ise 500µl soğuk 2-propanol eklenmiştir. Tüpler yavaşça ters düz edilerek DNA görülür hale gelmiştir. Daha sonra mikro santrifüjde 4000 rpm de 4 dk. santrifüje alınan tüplerde çöktülenen DNA'lardan üst faz mikro pipet kullanılarak uzaklaştırılmış ve örneklerle ait DNA'ların bulunduğu her bir tüpe 200µl yıkama solüsyonu (90 ml %70 ethanol, 100 µl 10 M'lık amonyum asetat, 10 ml H₂O) eklenerek 10 dakikadan az olmamak kaydıyla bekletilerek yıkamaya alınmıştır. Daha temiz DNA elde etmek amacıyla yapılmış olan bu muameleden sonra yıkama solüsyonu mikro pipet ile uzaklaştırılmış ve alkolün tamamen buharlaşıp uzaklaşması için tüple 37 °C'de inkübatörde bekletilmiştir. Tamamen buharlaşmanın sağlanıp kurutma işlemi sonlandıktan sonra DNA pelletleri 100 - 200 µl TE tamponu (10mM Tris, 1mM EDTA, pH 8.0) eklenerek çözüldükten sonra -20 °C'de saklanmıştır.

3.2.3.2.DNA Miktar Tayini

PCR reaksiyonunda her örnekten eşit miktarda DNA kullanılması gerekmektedir. Bu nedenle yukarıda açıklanan prosedürde izole edilen DNA miktarının tayini gereklidir.

İzole edilen çift iplikli DNA miktarının tayini spektrofotometrede (Pye unicam SP6-500 UV) yapılmış ve OD sonuçlarından hesaplanan DNA miktarlarına göre PCR analizi için RAPD markörlerin de kullanılmak üzere μl 'de 5 ng ve SSR markörleri için ise μl 'de 10 ng olacak şekilde TE (Tris-EDTA) tamponu ile seyreltilmiştir.

3.2.3.3. PCR İşlemi (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

PCR, oligonükleotid primerler tarafından sınırlandırılan belirli bir DNA parçasının enzimatik olarak çoğaltılmasını sağlayan in vitro bir yöntemdir. Bu işlemde söz konusu DNA parçası milyonlarca kez çoğaltılabilir.

PCR yöntemi aşağıda belirtilen aşamalardan oluşur:

- Kalıp DNA molekülünün yüksek sıcaklık derecelerinde (94°C) denaturasyonu
- Oligonükleotid primerlerin tek iplikli DNA molekülleri üzerinde kendilerini komplementer bölgelere bağlaması ($35-65^{\circ}\text{C}$)
- DNA polimeraz enzimi, uygun tampon ve dört çeşit deoksiribonükleozid trifosfat (dNTP) ortamında primerin 3' hidroksil ucundan polimerizasyonu ve böylece kalıp DNA ipliğine tamamlayıcı olan yeni DNA molekülünün sentezlenmesi (72°C).

Yukarıda açıklanan döngünün birçok kez tekrarlanması (denaturasyon, primerin bağlanması ve yeni DNA ipliğinin sentezi) aşamalarıyla her döngüde DNA iki katına çıkar. Böylece DNA, PCR işleminde geometrik dizi biçiminde çoğaltılmış olur (2^n)

3.2.3.4.RAPD Markörleri

Her tüpte toplam hacim 15 µl olacak şekilde; 25 ng genomik DNA, her bir dNTP'den 100 µM (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 15 ng primer (Operon Teknolojisi), 1xTaq DNA polimeraz tamponu (100 mM Tris-HCL, pH: 8.3, 500 mM KCL, 15 mM MgCl₂ ve % 0.01 jelatin), 1 ünite Taq DNA polimeraz enzimi (Sigma) bulunmaktadır.

PCR işlemi için her biri 10 baz uzunluğundaki Operon Teknolojisine ait 40 farklı primer kullanılmıştır. Kullanılan primerler ve baz dizilişleri Çizelge 3.5'de verilmiştir.

Çizelge 3.5: PCR Reaksiyonunda Kullanılan RAPD Primerleri ve Baz Dizilişleri

Primer İsmi	Baz Dizilişi
OPA-14	5'-TCTGTGCTGG-3'
OPA-15	5'-TTCCGAACCC-3'
OPA-17	5'-GACCGCTTGT-3'
OPA-18	5'-AGGTGACCGT-3'
OPA-19	5'-CAAACGTCCG-3'
OPA-20	5'-GTTGCGATCC-3'
OPB-01	5'-GTTTCGCTCC-3'
OPB-02	5'-TGATCCCTGG-3'
OPB-03	5'-CATCCCCCTG-3'
OPB-04	5'-GGACTGGAGT-3'
OPB-05	5'-TGCGCCCTTC-3'
OPB-11	5'-GTAGACCCGT-3'
OPB-12	5'-CCTTGACGCA-3'
OPB-14	5'-TCCGCTCTGG-3'
OPB-17	5'-AGGGAACGAG-3'

OPC-01	5'-TTCGAGCCAG-3'
OPC-03	5'-GGGGGTCTTT-3'
OPC-05	5'-GATGACCGCC-3'
OPC-06	5'-GAACGGACTC-3'
OPC-07	5'-GTCCCGACGA-3'
OPC-08	5'-TGGACCGGTG-3'
OPD-12	5'-CACCGTATCC-3'
OPD-15	5'-CATCCGTGCT-3'
OPE-07	5'-AGATGCAGCC-3'
OPF-03	5'-CCTGATCACC-3'
OPG-01	5'-CTACGGAGGA-3'
OPG-02	5'-GGCACTGAGG-3'
OPG-13	5'-CTCTCCGCCA-3'
OPQ-12	5'-AGTAGGGCAC-3'
OPQ-15	5'-GGGTAACGTG-3'
OPR-02	5'-CACAGCTGCC-3'
OPT-20	5'-GACCAATGCC-3'
OPU-07	5'-CCTGCTCATC-3'
OPAC-12	5'-GGCGAGTGTG-3'
OPAE-10	5'-CTGAAGCGCA-3'
OPAF-20	5'-CTCCGCACAG-3'
OPAG-04	5'-GGAGCGTACT-3'
OPAG-18	5'-GTGGGCATAC-3'
OPAN-08	5'-AAGGCTGCTG-3'
OPAN-12	5'-AACGGCGGTC-3'

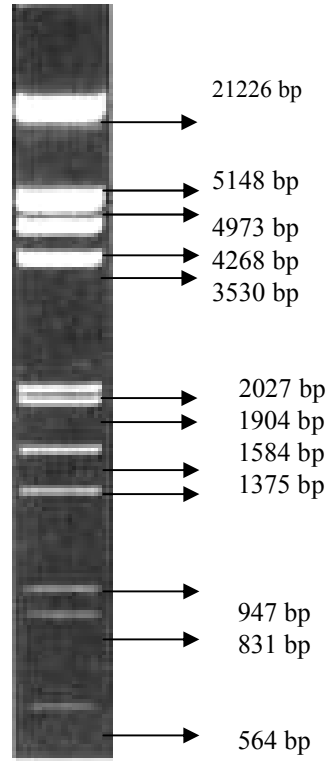
PCR işlemi thermocycler (Eppendorf Mastercycler gradient) cihazında 35 döngüden oluşan çizelge 3.6'da gösterilen programa göre gerçekleştirilmiştir:

Çizelge 3.6: RAPD için PCR Amplifikasyonu döngüleri

Başlangıç	94 °C	30 saniye
denatürasyonu		
Denatürasyon	94 °C - 25 saniye	
Yapışma	35 °C - 45 saniye	
Uzama	72 °C - 60 saniye	35 Döngü
Uzama	72 °C - 5 dakika	
	4 °C	∞

3.2.3.4.1. Agaroz Jel Elektroforezi

PCR işleminden sonra amplifiye olan DNA'lar % 1.5'luk agaroz jelde elektroforetik analize tabi tutulmuşlardır. Jel ve elektrot tampon çözeltisi için 50xTAE (242 g Tris, 57.1 ml asetik asit, 37.2 g EDTA pH 8.5 destile su ile 1litreye tamamlanır) kullanılmıştır. Elektroforez işlemi Fisher Biotech, FB-LSU-1 cihazında gerçekleştirilmiştir. Örnekler 3 µl yükleme tamponu ile boyanarak jeldeki gözlere pipet yardımıyla yerleştirilmiştir. Standart markör olarak 27000 bp'lik λ DNA Hind III /Eco R1 kullanılmıştır. (Şekil 3:11)



Şekil 3.11 : λ DNA Hind III /Eco R1

3.2.3.4.2. Agaroz Jelin Boyanması

Elektroforez işleminden sonra DNA'nın görünür hale getirilip değerlendirilebilmesi için ethidium bromide ile boyanmıştır. Ethidium bromide'in stok çözelti konsantrasyonu 10 mg/ml olacak şekilde hazırlanmıştır. Jel 2 µg/ml ethidium bromide içeren saf suda 20 dakika çalkalanarak boyanmış ve daha sonra fazla boyayı uzaklaştırmak için 15 dakika saf suda yıkanmıştır.

3.2.3.4.3. Fotoğraf Çekimi

Bantların değerlendirilebilmesi için jeller ethidium bromide ile boyama işleminden sonra UV ışık altında incelenmiş ve Nikon coolpix-3200 dijital fotoğraf makinası ile fotoğrafları çekilmiştir.

3.2.3.4.4. DNA bantlarının değerlendirilmesi

Genotipler arasındaki genetik benzerlik ve genetik uzaklık değerleri, RAPD bantlarının varlığında 1 yokluğunda 0 olacak şekilde hazırlanmış olan veri matrisinden yararlanarak Nei and Li (1979)'nin aşağıdaki formülüne göre hesaplanmış ve NTSYS-pc (Rohlf, 1998) istatistik paket programında genotiplere ait dendrogram elde edilmiştir.

$$F=2 M_{xy}/(M_x+M_y)$$

F: Benzerlik oranı

M_{xy} : İki genotip arasındaki ortak bant sayısı

M_x : Birinci genotipin toplam bant sayısı

M_y : İkinci genotipin toplam bant sayısı

1-F= Polimorfizm oranı

3.2.3.5.SSR Markörleri

Her tüpte toplam hacim 15 µl olacak şekilde; 50ng genomik DNA, her bir dNTP'den 200 µM (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), F+R 1+1 pmol/µl primer, 10xPCR tamponu (750 mM Tris-HCL, pH: 8.8, 200 mM (NH₄)₂ SO₄, - MgCl₂ ve % 0.1 Tween20), 25mM MgCl₂ , 5U/µl Taq DNA polimeraz enziminden (Sigma) oluşmaktadır.

PCR işlemi için forward ve reverse olmak üzere 22 baz uzunluğunda 5 (F+R) farklı SSR primeri kullanılmıştır. Kullanılan primerler ve baz dizilişleri Çizelge 3.4'de verilmiştir.

Çizelge 3.7: PCR Reaksiyonunda Kullanılan SSR Primerleri ve Baz Dizilişleri

Primer İsmi	Baz Dizilişi
WMC24-F	5'-GTGAGCAATTTTGATTATACTG-3'
WMC24-R	5'-TACCCTGATGCTGTAATATGTG-3'
WMC25-F	5'- TCTGGCCAGGATCAATATTACT -3'
WMC25-R	5'- TAAGATACATAGATCCAACACC -3'
WMC27-F	5'- AATAGAAACAGGTCACCATCCG -3'
WMC27-R	5'- TAGAGCTGGAGTAGGGCCAAAG -3'
WMC41-F	5'- TCCCTCTTCCAAGCGCGGATAG -3'
WMC41-R	5'- GGAGGAAGATCTCCCGGAGCAG -3'
WMC43-F	5'- TAGCTCAACCACCACCTACTG -3'
WMC43-R	5'- ACTTCAACATCCAAACTGACCG -3'

PCR işlemi thermocycler (Eppendorf Mastercycler gradient) cihazında 30 döngüden oluşan aşağıdaki programa göre gerçekleştirilmiştir: (Çizelge 3.8)

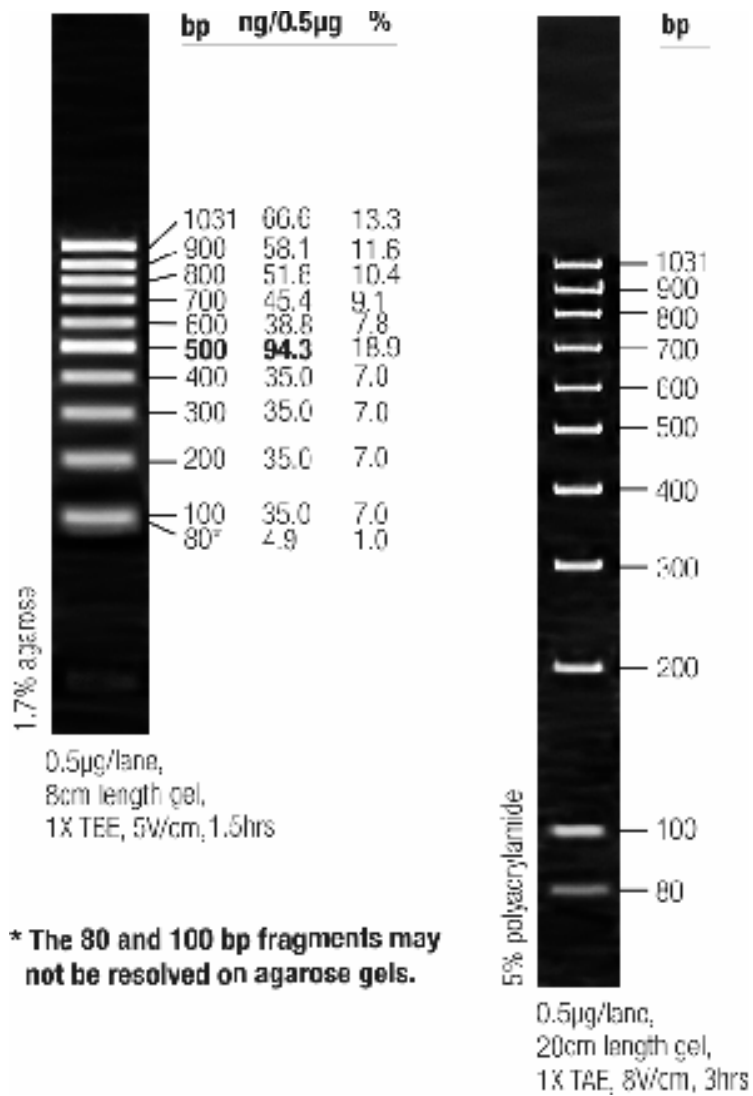
Çizelge 3.8: SSR için PCR Amplifikasyonu döngüleri

Başlangıç denatürasyonu

	94 °C	2 dakika
Denatürasyon	94 °C - 30 saniye	
Yapışma	50 °C - 30 saniye	30 Döngü
Uzama	72 °C - 60 saniye	
Final Uzama	72 °C	10 dakika

3.2.3.5.1. Agaroz Jel Elektroforezi

PCR işleminden sonra amplifiye olan DNA'lar elektroforezde % 2'lik agaroz jelde yürütülmüştür. Jel ve elektrot tampon çözeltisi için 10xTBE (216 gr Tris, 110 gr borik asit, 80 ml 0.5M EDTA pH 8.0 destile su ile 2litreye tamamlanır) kullanılmıştır. Elektroforez işlemi Fisher Biotech, FB-LSU-1 cihazında gerçekleştirilmiştir. Örnekler 5 µl yükleme tamponu (49ml %98 formamid, 50 µl 1M EDTA pH 8.0, 0.125gr %0.25 bromphenol blue, 0.125 gr %0.25 xylene cyanol destile su ile 50 ml'ye tamamlanır.) ile boyanarak jeldeki gözlere pipet yardımıyla yerleştirilmiştir. Standart markör olarak GeneRuler 100 bp'lik DNA ladder (Şekil 3.12) kullanılmıştır.



Şekil 3.12 : 100bp. DNA ladder

3.2.3.5.2. Agaroz Jelin Boyanması

Elektroforez işleminden sonra DNA'nın görünür hale getirilip değerlendirilebilmesi için ethidium bromide ile boyanmıştır. Ethidium bromide'in stok çözelti konsantrasyonu 10 mg/ml olacak şekilde hazırlanmıştır. Jel 2 µg/ml ethidium bromide içeren saf suda 20 dakika çalkalanarak boyanmış ve daha sonra fazla boyayı uzaklaştırmak için 15 dakika saf suda yıkanmıştır.

3.2.3.5.3. Fotoğraf Çekimi

Bantların değerlendirilebilmesi için jeller ethidium bromide ile boyama işleminden sonra UV ışık altında incelenmiş ve Nikon coolpix-3200 dijital fotoğraf makinası ile fotoğrafları çekilmiştir.

3.2.3.5.4. DNA bantlarının değerlendirilmesi

Genotipler arasındaki genetik benzerlik ve genetik uzaklık değerleri, SSR bantlarının sayılması ve varlıklarına göre bant adetlerinin rakamsal olarak değerlendirilmesi ile hazırlanmış olan veri matrisinden yararlanarak Nei and Li (1979)'nin aşağıdaki formülüne göre hesaplanmış ve NTSYS-pc (Rohlf, 1998) istatistik paket programında genotiplere ait dendrogram elde edilmiştir.

$$F=2 M_{xy}/(M_x+M_y)$$

F: Benzerlik oranı

M_{xy} : İki genotip arasındaki ortak bant sayısı

M_x : Birinci genotipin toplam bant sayısı

M_y : İkinci genotipin toplam bant sayısı

$1-F$ = Polimorfizm oranı

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Tarımsal üretimde verimi arttıran çevre faktörleri çoğu zaman ona zarar veren mikroorganizmaların da gelişmesi için uygun koşulları sağlamaktadır. Bu nedenle verimi ve ürünün kalitesini yükseltmek için bu mikroorganizmaların yol açtığı hastalıklarla mücadele etmek zorunludur. (Demir ve Turgut. 1999).

Dünya üzerindeki ilk kayıtlar buğdaydaki hastalık belirtilerinin eski dönemlerde küf, küflenme ve püskürme olarak adlandırıldığını göstermektedir. Ancak bizler şimdi bu belirtilerin pas olabileceğini farz etmekteyiz. Aristotle (İ.Ö.384-322) pas'ın epidemi yıllarında sıcak buharlaşmayla oluştuğunu ve zarara neden olduğunu yazmıştır. Theophrastus ise pas'ın tahıllarda baklagiller den daha şiddetli olduğunu rapor etmiştir. İsrail deki kazılar yaklaşık İ.Ö. 1300 tarihlerinde kara pas'ın urediniospores larının varlığını ortaya koymuştur (Roelfs et al., 1992).

Ülkemizde en yaygın olan pas hastalığı sarı pas hastalığıdır. Epidemi olduğu yıllarda özellikle hastalığa hassas çeşit ekildiğinde %30-40'lara varan verim kaybına neden olmaktadır. Bu nedenle dayanıklı ıslah çeşitlerinin geliştirilmesi büyük önem taşımaktadır.

Bitki ıslahında genetik çalışma materyalinin tanımı büyük önem taşımaktadır. İşte bu noktada moleküler markörler bitki ıslahında kalitatif ve kantitatif karakterler için yapılacak markörlere dayalı seleksiyonda geniş bir kullanım alanına sahiptir.

Buğdayda *Puccinia striiformis.sp. tritici* tarafından oluşturulan sarıpas hastalığı dünyanın çeşitli yörelerinde epidemi yaparak büyük verim kayıplarına neden olmaktadır. Bu hastalık son yıllarda Türkiye'de iklimin de uygun gitmesi sonucu epidemiler yaparak büyük bir ekonomik kayba neden olmuştur (Yıldırım ve ark. 1999). Bu durum muhtemelen yaygın olarak

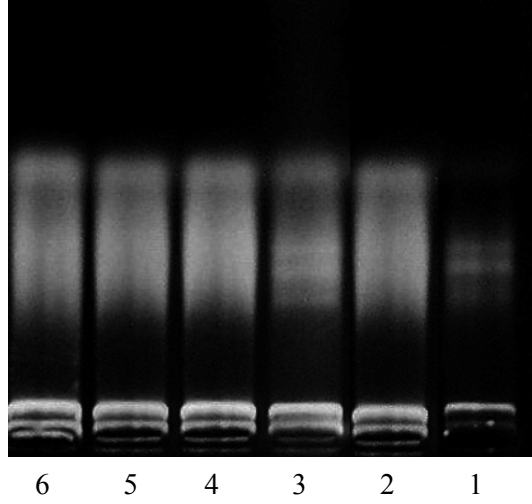
yetiştirilen buğday çeşitlerinin sahip oldukları dayanıklılık genlerinin patojen tarafından aşılmasının bir sonucudur. Patojenin genetik yapısını çok hızlı ve kolayca değiştirebilme yeteneğinde olması, hastalıkla sürekli ve kararlı bir mücadeleyi zorunlu kılmaktadır. Bu amaçla patojen çok yakından takip edilerek kalıcı dayanıklılık sağlayan yeni genlerin hızlı bir şekilde buğday çeşitlerine aktarılması gerekmektedir. Ayrıca bir çok farklı dayanıklılık geni aynı genotipte toplanarak gen piramidlerinin oluşturulması sarı pas zararını önleyecek veya en az düzeye indirecektir. Bu amaçla modern seleksiyon tekniklerinin kullanımı başarılı ıslah çalışmaları için zorunludur. Bu tekniklerin yaygın olarak kullanılanları kromozom bantlaması ve genomik *in situ* hibridizasyonu gibi sitolojik tekniklerle, moleküler markörlerle oluşturulan genetik haritalardır.

Yapılan bu çalışmada hedeflenen amaca uygun olarak ekmeklik buğdaylarda sarı pasa dayanıklı hatlar ile sarı pasa duyarlı ticari çeşitler arasında, pasa dayanıklılık açısından DNA düzeyinde genetik farklılıklar ve benzerlikler incelenmiş ve genetik benzerlik ve farklılıkların saptanması için moleküler düzeyde RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) ve SSR (Simple sequence repeat) markörlerinden faydalanılmıştır.

4.1. Ebeveynlere ait DNA Analizleri

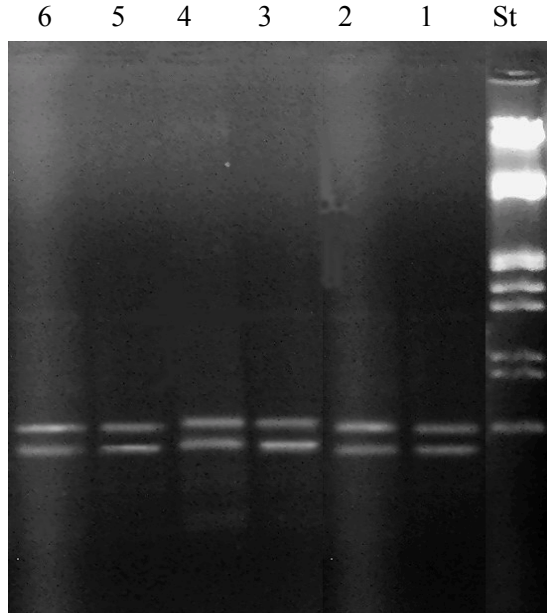
Araştırmada kullanılan 40 primerin (OPA-14, OPA-15, OPA-17, OPA-18, OPA-19, OPA-20, OPB-01, OPB-02, OPB-03, OPB-04, OPB-05, OPB-11, OPB-12, OPB-14, OPB-17, OPC-01, OPC-03, OPC-05, OPC-06, OPC-07, OPC-08, OPD-12, OPD-15, OPE-07, OPF-03, OPG-01, OPG-02, OPG-13, OPQ-12, OPQ-15, OPR-02, OPT-20, OPU-07, OPAC-12, OPAE-10, OPAF-20, OPAG-04, OPAG-18, OPAN-08 ve OPAN-12) vermiş olduğu değerlendirilebilir bantlar ve bu primerlerin

RAPD sonuçları sırası ile Şekil4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 4.10, 4.11, 4.12, 4.13, 4.14, 4.15, 4.16, 4.17, 4.18, 4.19, 4.20, 4.21, 4.22, 4.23, 4.24, 4.25, 4.26, 4.27, 4.28, 4.29, 4.30, 4.31, 4.32, 4.33, 4.34, 4.35, 4.36, 4.37, 4.38, 4.39, 4.40 ve 4.41’de verilmiştir. Üç dayanıklı hat ve üç duyarlı çeşide ait DNA kalitesi %1’lik agaroz jelde yürütülerek elde edilmiş ve Şekil 4.1’de verilmiştir.



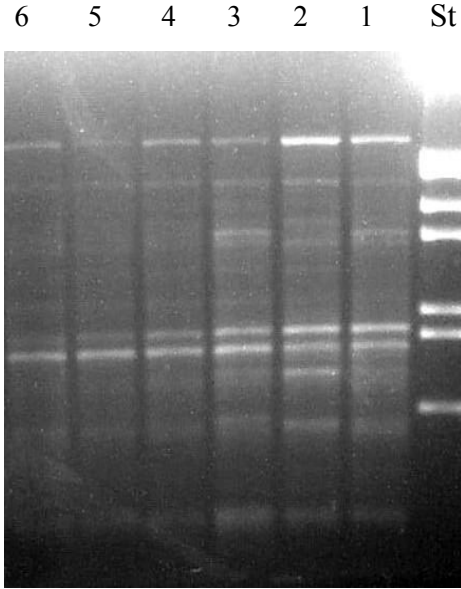
Şekil 4.1: Ebeveynlere ait DNA Kalitesi:

1: Cumhuriyet-75 , 2: Seri-82, 3: Kaşifbey-95, 4: 02 nolu hat, 5: 13 nolu hat, 6: 14 nolu hat.



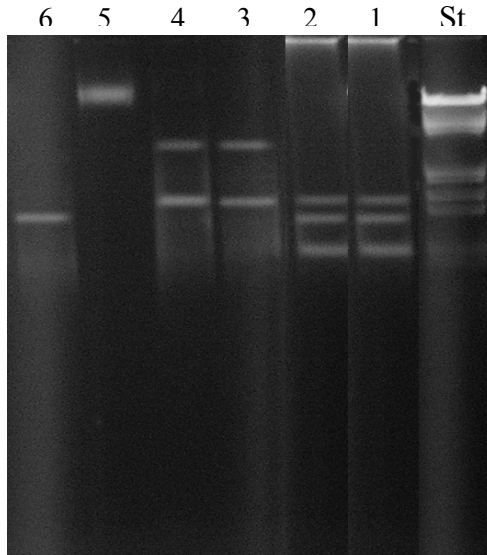
Şekil 4.2: OPA-14 primerinin RAPD sonuçları.

St: Standart markör, 1: Cumhuriyet-75 , 2: Seri-82, 3: Kaşifbey-95, 4: 02 nolu hat, 5: 13 nolu hat, 6: 14 nolu hat



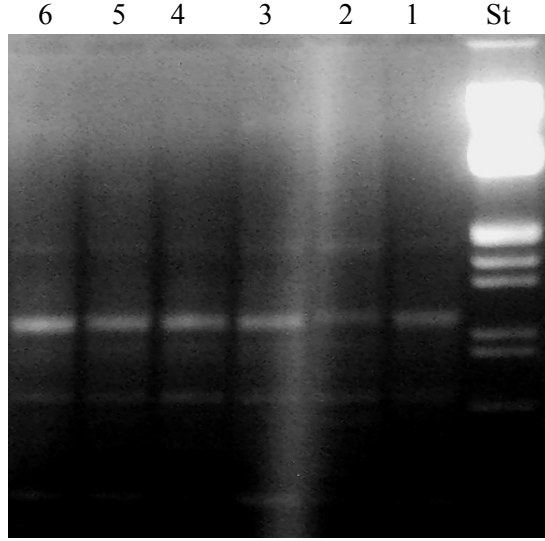
Şekil 4.3: OPA-15 primerinin RAPD sonuçları.

St: Standart markör, 1: Cumhuriyet-75 , 2: Seri-82, 3: Kaşifbey-95, 4: 02 nolu hat, 5: 13 nolu hat, 6: 14 nolu hat



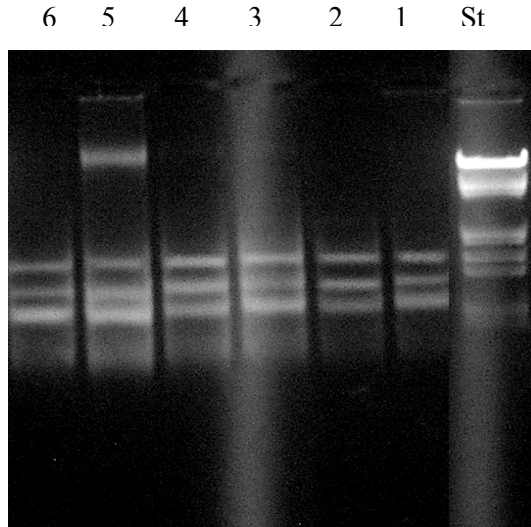
Şekil 4.4: OPA-17 primerinin RAPD sonuçları.

St: Standart markör, 1: Cumhuriyet-75 , 2: Seri-82, 3: Kaşifbey-95, 4: 02 nolu hat, 5: 13 nolu hat, 6: 14 nolu hat



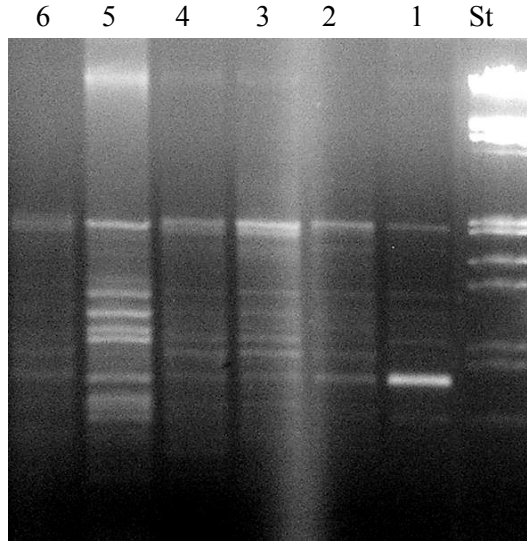
Şekil 4.5: OPA-18 primerinin RAPD sonuçları.

St: Standart markör, 1: Cumhuriyet-75 , 2: Seri-82, 3: Kaşifbey-95, 4: 02 nolu hat, 5: 13 nolu hat, 6: 14 nolu hat



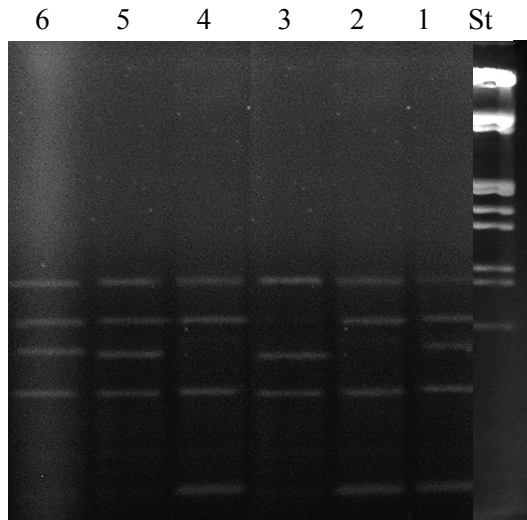
Şekil 4.6: OPA-19 primerinin RAPD sonuçları.

St: Standart markör, 1: Cumhuriyet-75 , 2: Seri-82, 3: Kaşifbey-95, 4: 02 nolu hat, 5: 13 nolu hat, 6: 14 nolu hat



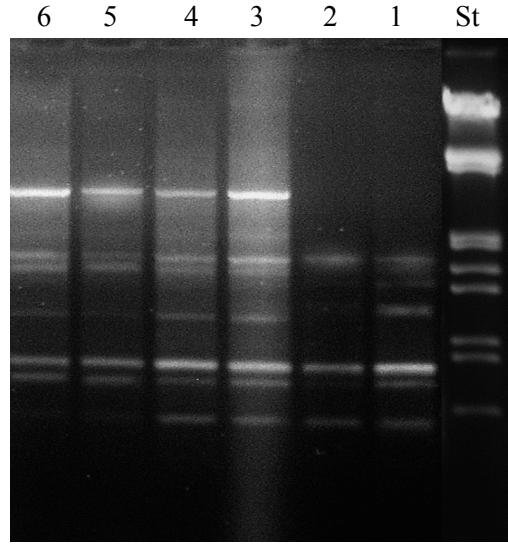
Şekil 4.7: OPA-20 primerinin RAPD sonuçları.

St: Standart markör, 1: Cumhuriyet-75 , 2: Seri-82, 3: Kaşifbey-95, 4: 02 nolu hat, 5: 13 nolu hat, 6: 14 nolu hat



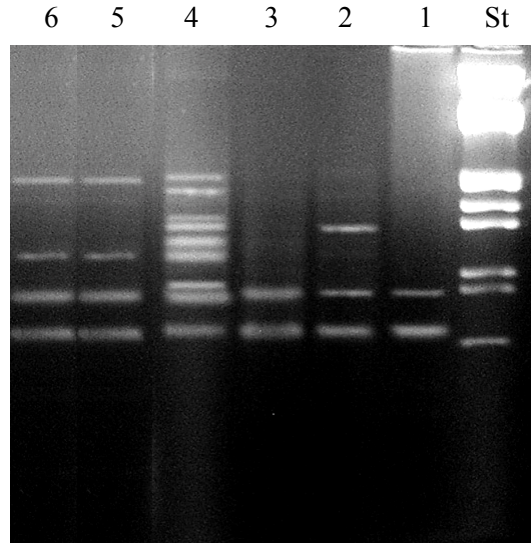
Şekil 4.8 OPB-01 primerinin RAPD sonuçları.

St: Standart markör, 1: Cumhuriyet-75 , 2: Seri-82, 3: Kaşifbey-95, 4: 02 nolu hat, 5: 13 nolu hat, 6: 14 nolu hat



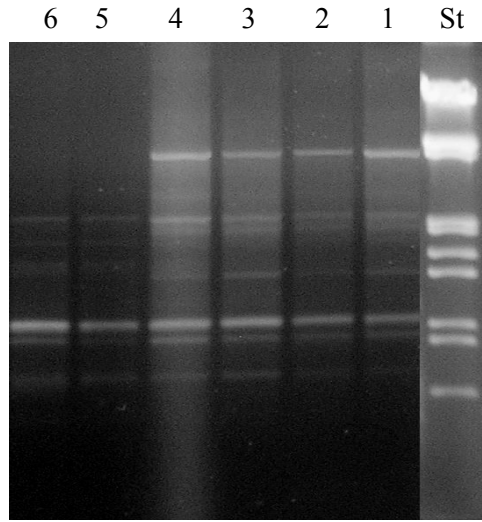
Şekil 4.9: OPB-02 primerinin RAPD sonuçları.

St: Standart markör, 1: Cumhuriyet-75 , 2: Seri-82, 3: Kaşifbey-95, 4: 02 nolu hat, 5: 13 nolu hat, 6: 14 nolu hat



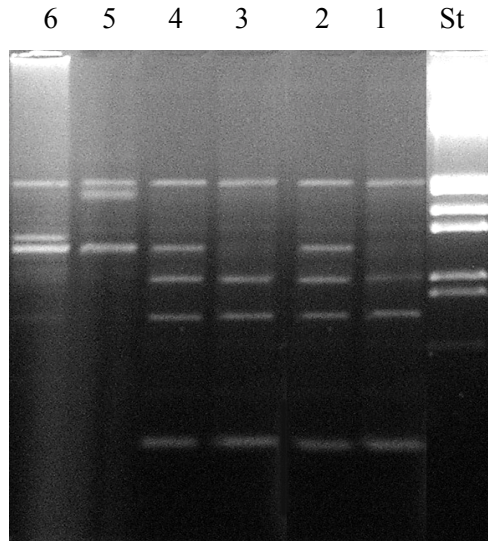
Şekil 4.10: OPB-03 primerinin RAPD sonuçları.

St: Standart markör, 1: Cumhuriyet-75 , 2: Seri-82, 3: Kaşifbey-95, 4: 02 nolu hat, 5: 13 nolu hat, 6: 14 nolu hat



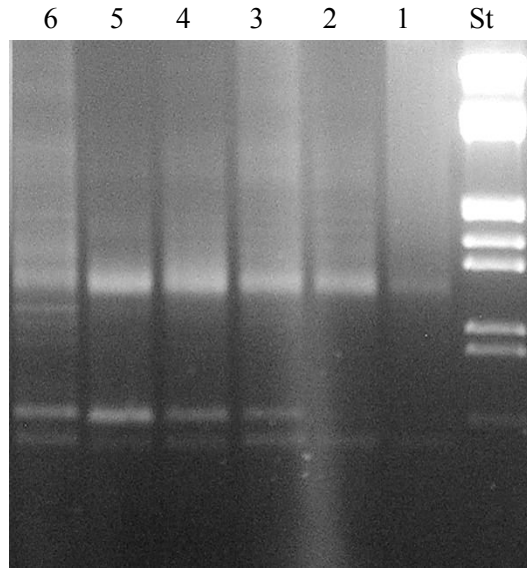
Şekil 4.11: OPB-04 primerinin RAPD sonuçları.

St: Standart markör, 1: Cumhuriyet-75 , 2: Seri-82, 3: Kaşifbey-95, 4: 02 nolu hat, 5: 13 nolu hat, 6: 14 nolu hat



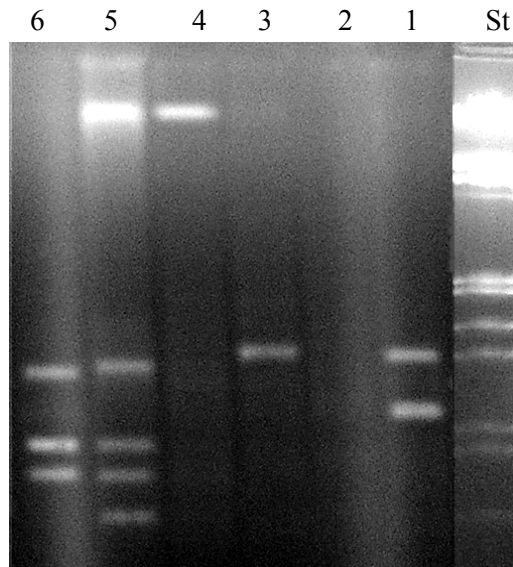
Şekil 4.12: OPB-05 primerinin RAPD sonuçları.

St: Standart markör, 1: Cumhuriyet-75 , 2: Seri-82, 3: Kaşifbey-95, 4: 02 nolu hat, 5: 13 nolu hat, 6: 14 nolu hat



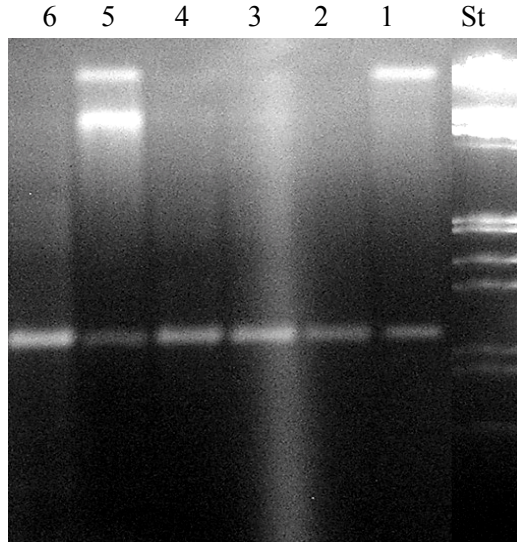
Şekil 4.13: OPB-11 primerinin RAPD sonuçları.

St: Standart markör, 1: Cumhuriyet-75 , 2: Seri-82, 3: Kaşifbey-95, 4: 02 nolu hat, 5: 13 nolu hat, 6: 14 nolu hat



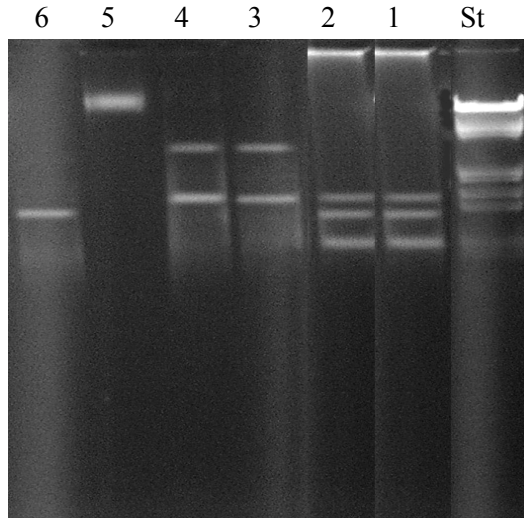
Şekil 4.14: OPB-12 primerinin RAPD sonuçları.

St: Standart markör, 1: Cumhuriyet-75 , 2: Seri-82, 3: Kaşifbey-95, 4: 02 nolu hat, 5: 13 nolu hat, 6: 14 nolu hat



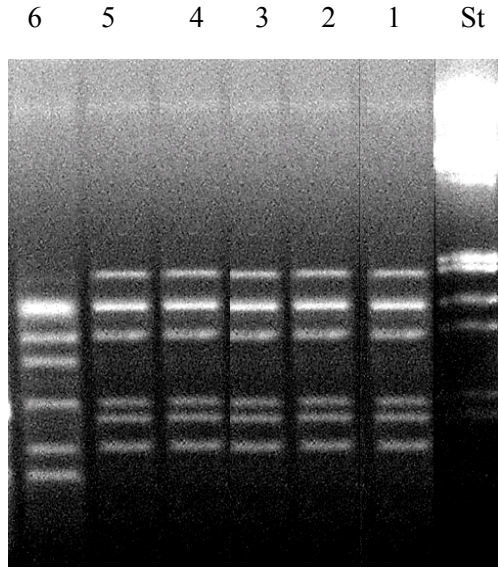
Şekil 4.15: OPB-14 primerinin RAPD sonuçları.

St: Standart markör, 1: Cumhuriyet-75 , 2: Seri-82, 3: Kaşifbey-95, 4: 02 nolu hat, 5: 13 nolu hat, 6: 14 nolu hat



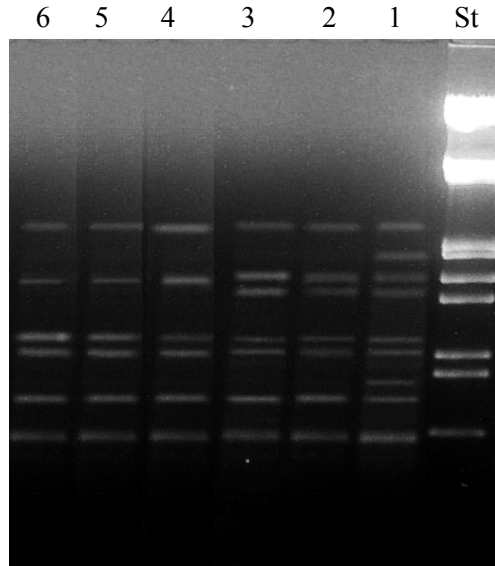
Şekil 4.16: OPB-17 primerinin RAPD sonuçları.

St: Standart markör, 1: Cumhuriyet-75 , 2: Seri-82, 3: Kaşifbey-95, 4: 02 nolu hat, 5: 13 nolu hat, 6: 14 nolu hat



Şekil 4.17: OPC-01 primerinin RAPD sonuçları.

St: Standart markör, 1: Cumhuriyet-75 , 2: Seri-82, 3: Kaşifbey-95, 4: 02 nolu hat, 5: 13 nolu hat, 6: 14 nolu hat

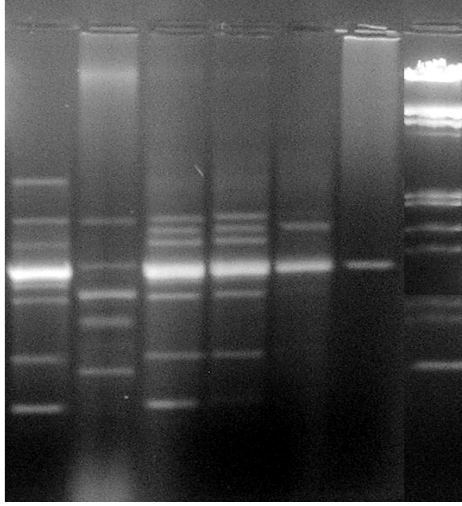


Şekil 4.18: OPC-03 primerinin RAPD sonuçları.

St: Standart markör, 1: Cumhuriyet-75 , 2: Seri-82, 3: Kaşifbey-95, 4: 02 nolu hat, 5: 13 nolu hat, 6: 14 nolu hat

6 5 4 3 2 1 St

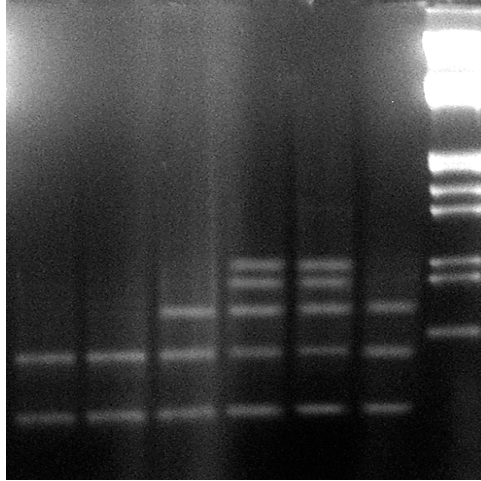
101



Şekil 4.19: OPC-05 primerinin RAPD sonuçları.

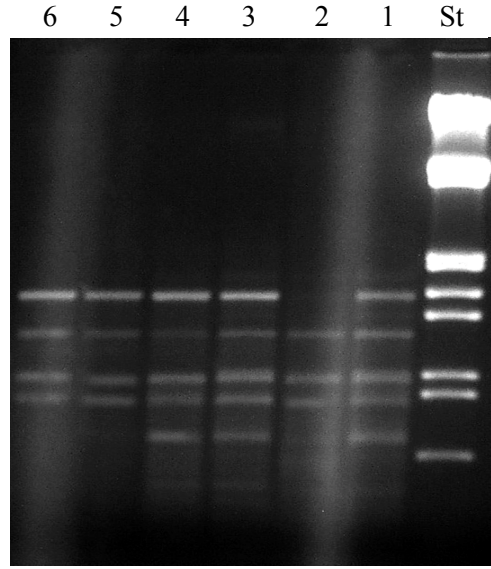
St: Standart markör, 1: Cumhuriyet-75 , 2: Seri-82, 3: Kaşifbey-95, 4: 02 nolu hat, 5: 13 nolu hat, 6: 14 nolu hat

6 5 4 3 2 1 St



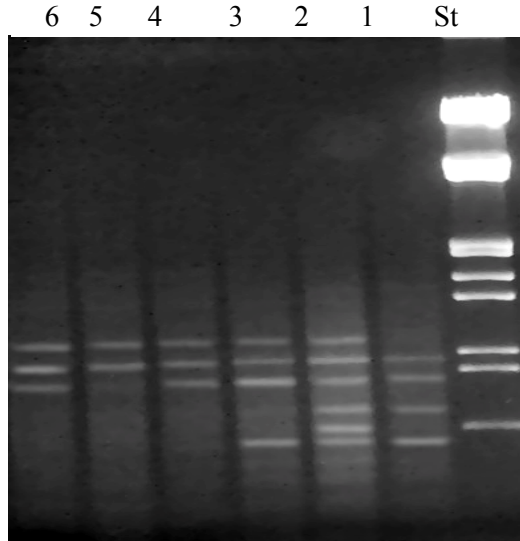
Şekil 4.20: OPC-06 primerinin RAPD sonuçları.

St: Standart markör, 1: Cumhuriyet-75 , 2: Seri-82, 3: Kaşifbey-95, 4: 02 nolu hat, 5: 13 nolu hat, 6: 14 nolu hat



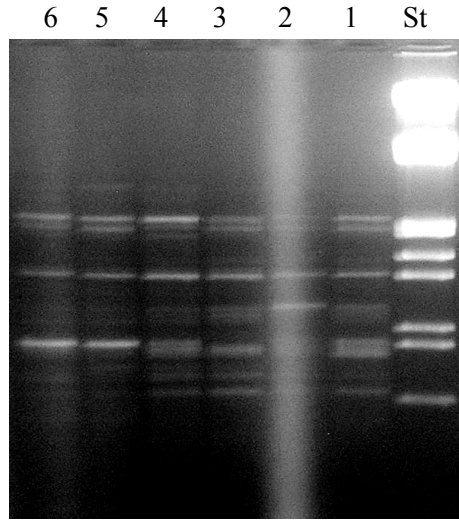
Şekil 4.21: OPC-07 primerinin RAPD sonuçları.

St: Standart markör, 1: Cumhuriyet-75 , 2: Seri-82, 3: Kaşifbey-95, 4: 02 nolu hat, 5: 13 nolu hat, 6: 14 nolu hat



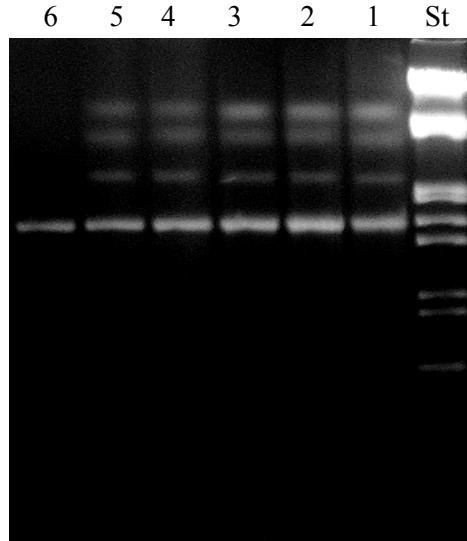
Şekil 4.22: OPC-08 primerinin RAPD sonuçları.

St: Standart markör, 1: Cumhuriyet-75 , 2: Seri-82, 3: Kaşifbey-95, 4: 02 nolu hat, 5: 13 nolu hat, 6: 14 nolu hat



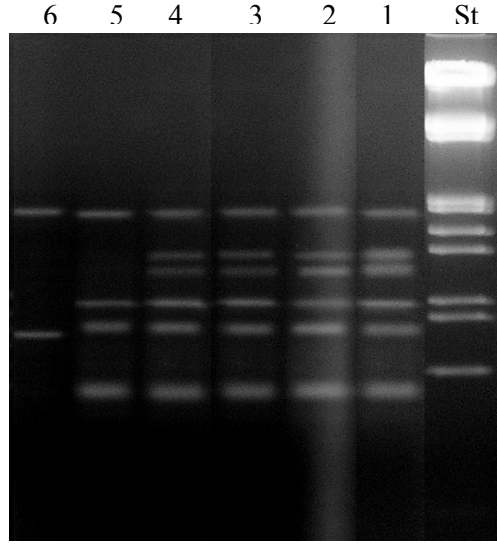
Şekil 4.23: OPD-12 primerinin RAPD sonuçları.

St: Standart markör, 1: Cumhuriyet-75 , 2: Seri-82, 3: Kaşifbey-95, 4: 02 nolu hat, 5: 13 nolu hat, 6: 14 nolu hat



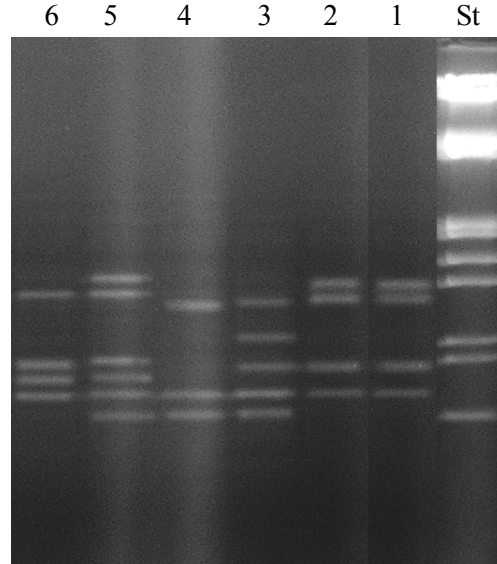
Şekil 4.24: OPD-15 primerinin RAPD sonuçları.

St: Standart markör, 1: Cumhuriyet-75 , 2: Seri-82, 3: Kaşifbey-95, 4: 02 nolu hat, 5: 13 nolu hat, 6: 14 nolu hat



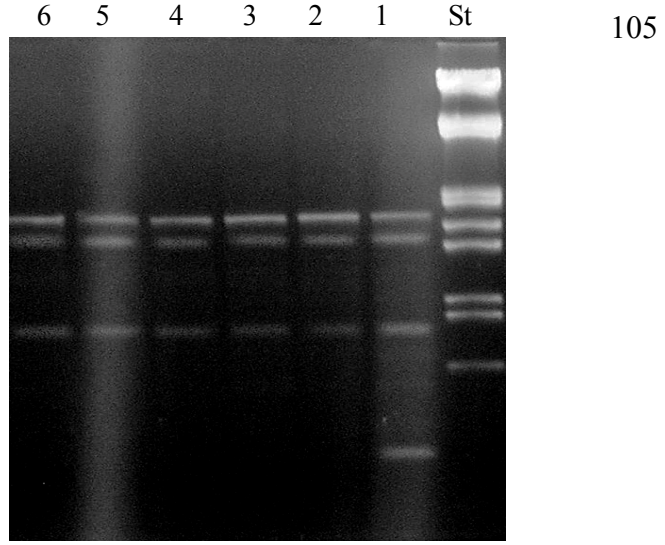
Şekil 4.25: OPE-07 primerinin RAPD sonuçları.

St: Standart markör, 1: Cumhuriyet-75 , 2: Seri-82, 3: Kaşifbey-95, 4: 02 nolu hat, 5: 13 nolu hat, 6: 14 nolu hat



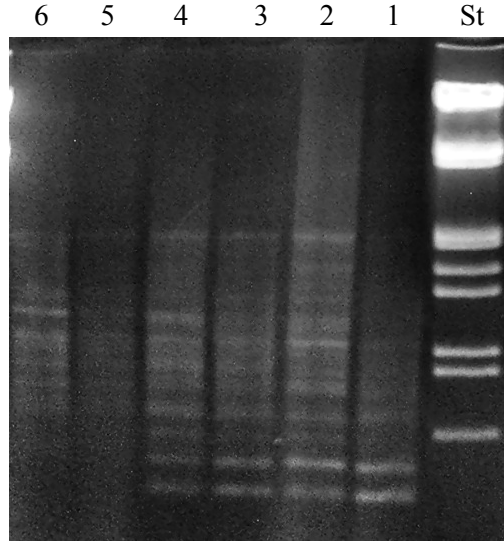
Şekil 4.26: OPF-03 primerinin RAPD sonuçları.

St: Standart markör, 1: Cumhuriyet-75 , 2: Seri-82, 3: Kaşifbey-95, 4: 02 nolu hat, 5: 13 nolu hat, 6: 14 nolu hat



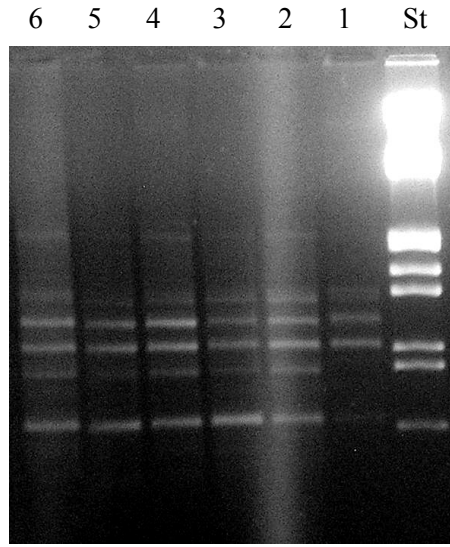
Şekil 4.27: OPG-01 primerinin RAPD sonuçları.

St: Standart markör, 1: Cumhuriyet-75 , 2: Seri-82, 3: Kaşifbey-95, 4: 02 nolu hat, 5: 13 nolu hat, 6: 14 nolu hat



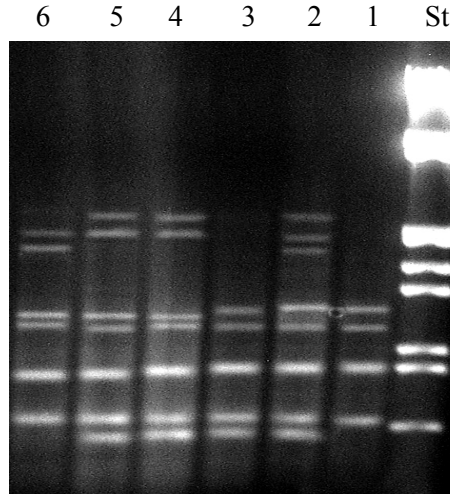
Şekil 4.28: OPG-02 primerinin RAPD sonuçları.

St: Standart markör, 1: Cumhuriyet-75 , 2: Seri-82, 3: Kaşifbey-95, 4: 02 nolu hat, 5: 13 nolu hat, 6: 14 nolu hat



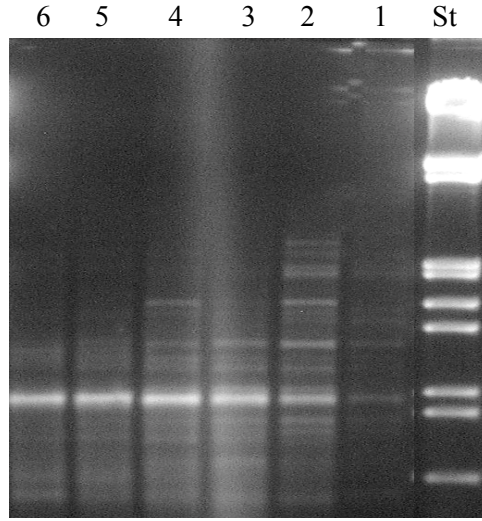
Şekil 4.29: OPG-13 primerinin RAPD sonuçları.

St: Standart markör, 1: Cumhuriyet-75 , 2: Seri-82, 3: Kaşifbey-95, 4: 02 nolu hat, 5: 13 nolu hat, 6: 14 nolu hat



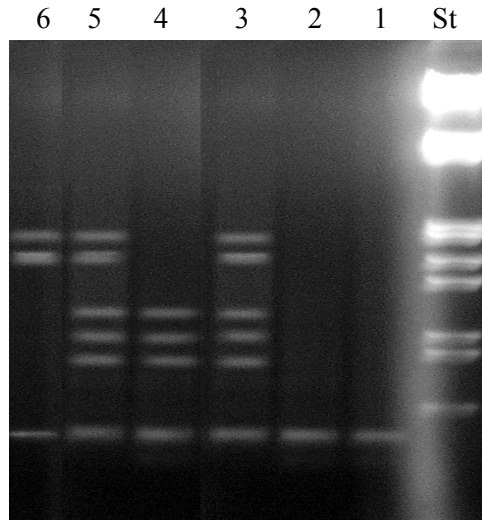
Şekil 4.30: OPQ-12 primerinin RAPD sonuçları.

St: Standart markör, 1: Cumhuriyet-75 , 2: Seri-82, 3: Kaşifbey-95, 4: 02 nolu hat, 5: 13 nolu hat, 6: 14 nolu hat



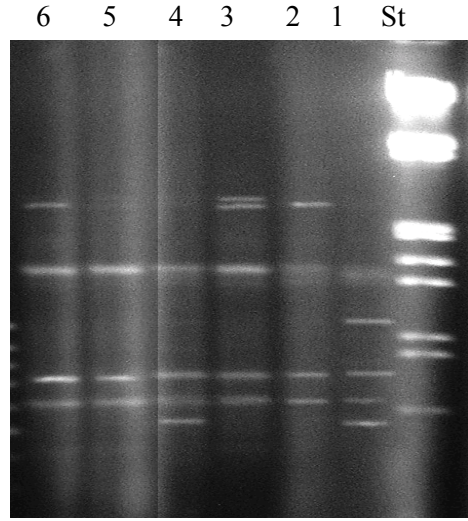
Şekil 4.31: OPQ-15 primerinin RAPD sonuçları.

St: Standart markör, 1: Cumhuriyet-75 , 2: Seri-82, 3: Kaşifbey-95, 4: 02 nolu hat, 5: 13 nolu hat, 6: 14 nolu hat



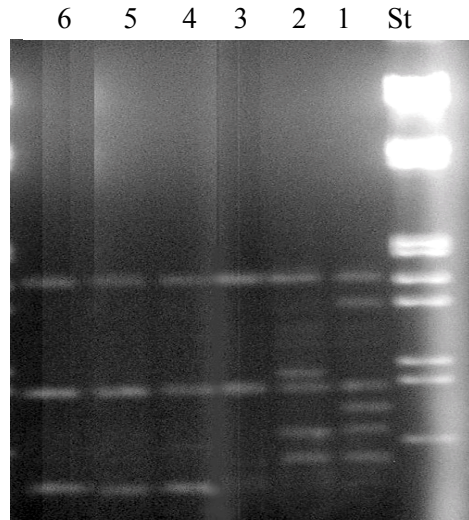
Şekil 4.32: OPR-02 primerinin RAPD sonuçları.

St: Standart markör, 1: Cumhuriyet-75 , 2: Seri-82, 3: Kaşifbey-95, 4: 02 nolu hat, 5: 13 nolu hat, 6: 14 nolu hat



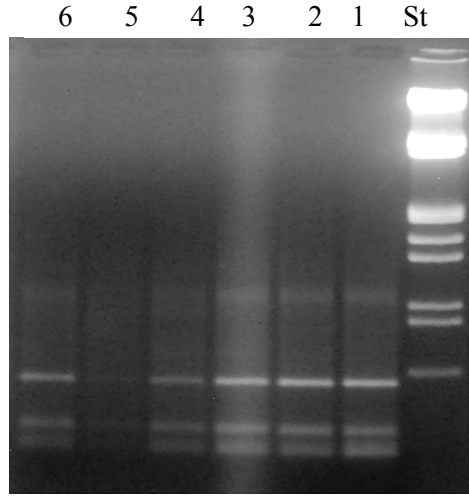
Şekil 4.33: OPT-20 primerinin RAPD sonuçları.

St: Standart markör, 1: Cumhuriyet-75 , 2: Seri-82, 3: Kaşifbey-95, 4: 02 nolu hat, 5: 13 nolu hat, 6: 14 nolu hat



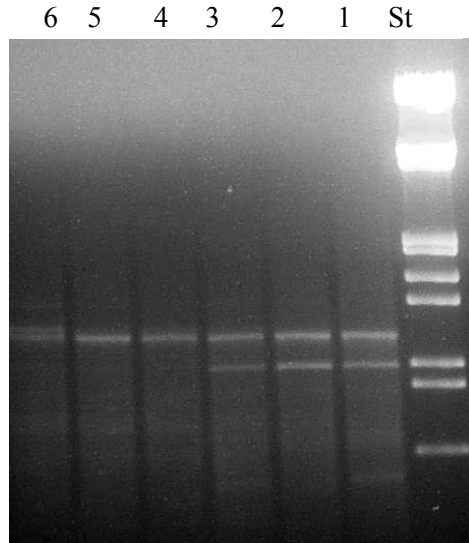
Şekil 4.34: OPU-07 primerinin RAPD sonuçları.

St: Standart markör, 1: Cumhuriyet-75 , 2: Seri-82, 3: Kaşifbey-95, 4: 02 nolu hat, 5: 13 nolu hat, 6: 14 nolu hat



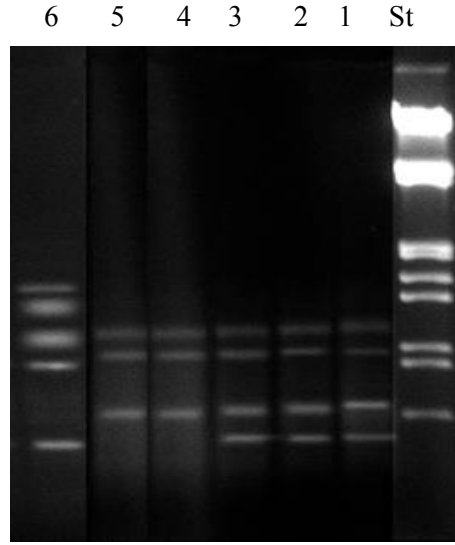
Şekil 4.35: OPAC-12 primerinin RAPD sonuçları.

St: Standart markör, 1: Cumhuriyet-75 , 2: Seri-82, 3: Kaşifbey-95, 4: 02 nolu hat, 5: 13 nolu hat, 6: 14 nolu hat



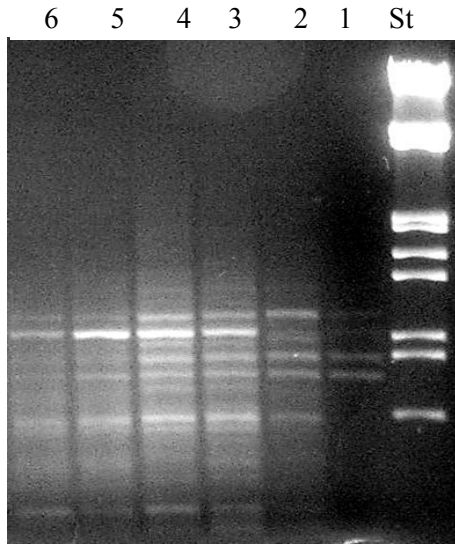
Şekil 4.36: OPAE-10 primerinin RAPD sonuçları.

St: Standart markör, 1: Cumhuriyet-75 , 2: Seri-82, 3: Kaşifbey-95, 4: 02 nolu hat, 5: 13 nolu hat, 6: 14 nolu hat



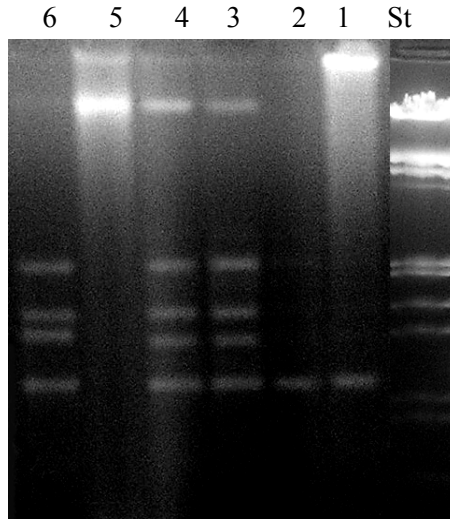
Şekil 4.37: OPAF-20 primerinin RAPD sonuçları.

St: Standart markör, 1: Cumhuriyet-75 , 2: Seri-82, 3: Kaşifbey-95, 4: 02 nolu hat, 5: 13 nolu hat, 6: 14 nolu hat



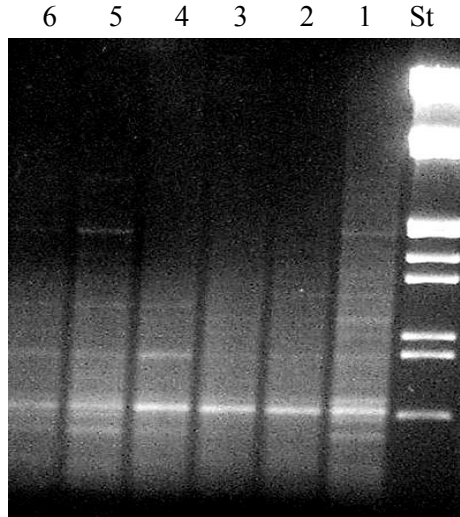
Şekil 4.38: OPAG-04 primerinin RAPD sonuçları.

St: Standart markör, 1: Cumhuriyet-75 , 2: Seri-82, 3: Kaşifbey-95, 4: 02 nolu hat, 5: 13 nolu hat, 6: 14 nolu hat



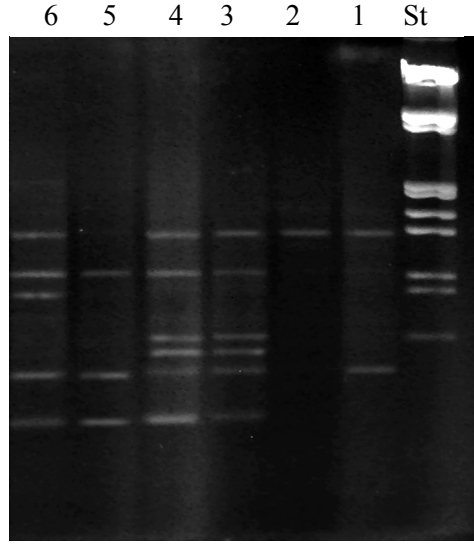
Şekil 4.39: OPAG-18 primerinin RAPD sonuçları.

St: Standart markör, 1: Cumhuriyet-75 , 2: Seri-82, 3: Kaşifbey-95, 4: 02 nolu hat, 5: 13 nolu hat, 6: 14 nolu hat



Şekil 4.40: OPAN-08 primerinin RAPD sonuçları.

St: Standart markör, 1: Cumhuriyet-75 , 2: Seri-82, 3: Kaşifbey-95, 4: 02 nolu hat, 5: 13 nolu hat, 6: 14 nolu hat



Şekil 4.41: OPAN-12 primerinin RAPD sonuçları.

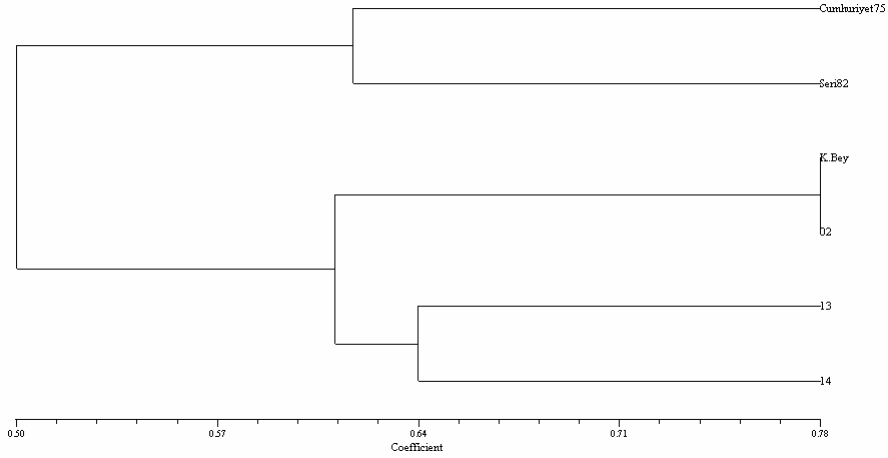
St: Standart markör, 1: Cumhuriyet-75 , 2: Seri-82, 3: Kaşifbey-95, 4: 02 nolu hat, 5: 13 nolu hat, 6: 14 nolu hat

RAPD analizi sonucunda değerlendirmeye alınan 40 primer toplam 980 adet bant vermiştir. Elde edilen bantların 914 adedinin polimorfik 66 adedinin monomorfik bantlar olduğu gözlenmiştir.

Bant ortalamaları incelendiğinde; primer başına ortalama polimorfik bant sayısı 22.8, ortalama monomorfik bant sayısı 1.6 ve birey başına düşen RAPD bant sayısı 163.3 olarak hesaplanmıştır.

Primerler değerlendirmeye alındığında; en fazla bant veren primer OPA-15, en az bant veren primer ise OPB-12 primeri olarak gözlenmiştir. En fazla polimorfik bant veren primer OPC-05, en fazla monomorfik bant veren primer OPA-15 olarak belirlenmiştir. OPA-14, OPA-17, OPB-03, OPB-05, OPB-12, OPC-01, OPC-03, OPE-07, OPF-03, OPG-02, OPR-02, OPAG-18, VE OPAN-12 primerlerinde ise hiç

monomorfik bant gözlenmemiştir. Ebeveynlere ait dendrogram Şekil 4.42’de verilmiştir.



Şekil 4.42: Ebeveyn genotiplerine ait RAPD dendrogram.

Dendrogram incelendiğinde ebeveynlerin başlıca 2 ana gruba ayrıldığı gözlenmektedir. Birinci grupta Cumhuriyet-75 ve Seri-82 çeşitleri yer almıştır. İkinci grupta Kaşifbey-95, 02 nolu hat(Lee), 13 nolu hat(Compair) ve 14 nolu (CarstensV) hatlar yer almıştır. İkinci grup kendi içinde iki alt gruba ayrılmış, bu alt gruplardan ilkinde Kaşifbey-95 ve 02 nolu hat bir arada yer alırken 13 ve 14 nolu hatlar ikinci alt grubu oluşturmuşlardır.

Araştırmada kullanılan ebeveyn genotiplerinin birbirleriyle bant bazında benzerlik ve farklılık oranları Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1 incelendiğinde ebeveynlere ait genetik benzerlik oranları 0.62-0.87 arasında varyasyon göstermiştir. Ebeveynlere ait ortalama benzerlik oranı 0.76 (toplam monomorfizm/karşılaştırma sayısı) olarak saptanmıştır. 13 ile 02 nolu hatlar arasındaki benzerlik 0.87 oranı ile birbirine en benzer genotipler olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.2 incelendiğinde ebeveynlere ait genetik farklılık oranları 0.13-0.38 arasında değişmiştir. Ebeveynlere ait ortalama farklılık oranı 0.24 (toplam polimorfizm/karşılaştırma sayısı) olarak saptanmıştır. Cumhuriyet-75 ile 14 nolu hat 0.38 oranı ile genetik bakımından birbirinden en farklı genotipler olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.1 RAPD bantları bakımından ebeveynlerin genetik benzerlik oranları.

	Seri-82	Kaşibey-95	02	13	14
Cumhuriyet-75	0.81	0.83	0.70	0.63	0.62
Seri-82		0.81	0.79	0.70	0.70
Kaşibey-95			0.84	0.73	0.68
02				0.87	0.80
13					0.85

Çizelge 4.2 RAPD bantları bakımından ebeveynlerin genetik farklılık oranları.

	Seri-82	Kaşibey-95	02	13	14
Cumhuriyet-75	0.19	0.17	0.30	0.37	0.38
Seri-82		0.19	0.21	0.30	0.30
Kaşibey-95			0.16	0.27	0.32
02				0.13	0.20
13					0.15

Çizelgeler incelendiğinde görüldüğü gibi genel olarak benzerlik oranları yüksek değerlere dayanıklılık genini taşıdığı bilinen hatlar arasında rastlanırken yine aynı şekilde en yüksek farklılık oranları bu dayanıklı hatlar ile yerli çeşitler arasında gözlenmiştir. Bu sonuç dayanıklılık genini taşıdığı bilinen hatlar ile sarı pasa duyarlı çeşitler arasındaki genetik farklılığı desteklerken yine aynı şekilde dayanıklılık genini taşıyan hatlar arasındaki benzerliği de ortaya koymuştur. Ancak bu farklılığı daha net bir şekilde ortaya koyabilmek ve kesin bir markör tayininde bulunabilmek, yapılacak olan DNA analizlerinde kullanılacak yönteme bağlı olarak da değişkenlik gösterecektir. Tüm bu belirleyici faktörlerin yanı sıra genetik polimorfizmi daha geniş boyutlarda elde edebilmek için fenotipik gözlemler yapılmalı ve kullanılan primer sayısının artırılmasının yanı sıra SSR, AFLP gibi diğer yöntemlerin de kullanılması zorunluluğunu ortaya koymuştur.

Singh et al., (2000) buğdayda sarı pasa dayanıklılık genlerini belirlemek için [*T. turgidum* L. x *Ae. tauschii* (Coss.) Schmai.] x *T. aestivum* L. cv. ‘Opata 85’ melezinden geliştirilen rekombinant kendilenmiş hatlardan oluşan bir RFLP haritalama popülasyonunu fide enfeksiyonu için serada üç inokülasyon testi ile, ergin bitkilerin reaksiyonunu ise dört farklı tarla inokülasyon testi ile değerlendirmişlerdir. *Ae. tauschii*’den gelen ve belirlenmeyen gen *Yr28* olarak dizayn edilmiş ve 4DS kromozomunda yer almaktadır. *Yr28* geni fide dayanıklılığını güçlü bir şekilde etkilemesine rağmen iki lokasyonun sadece daha sıcak kısımlarında ergin bitkilerde de dayanıklılık sağladığını belirtmişlerdir. Diğer ikinci bir geni fide testlerinde 7DS kromozomunda bulunan *Yr18* ergin bitki dayanıklılık genine yakın

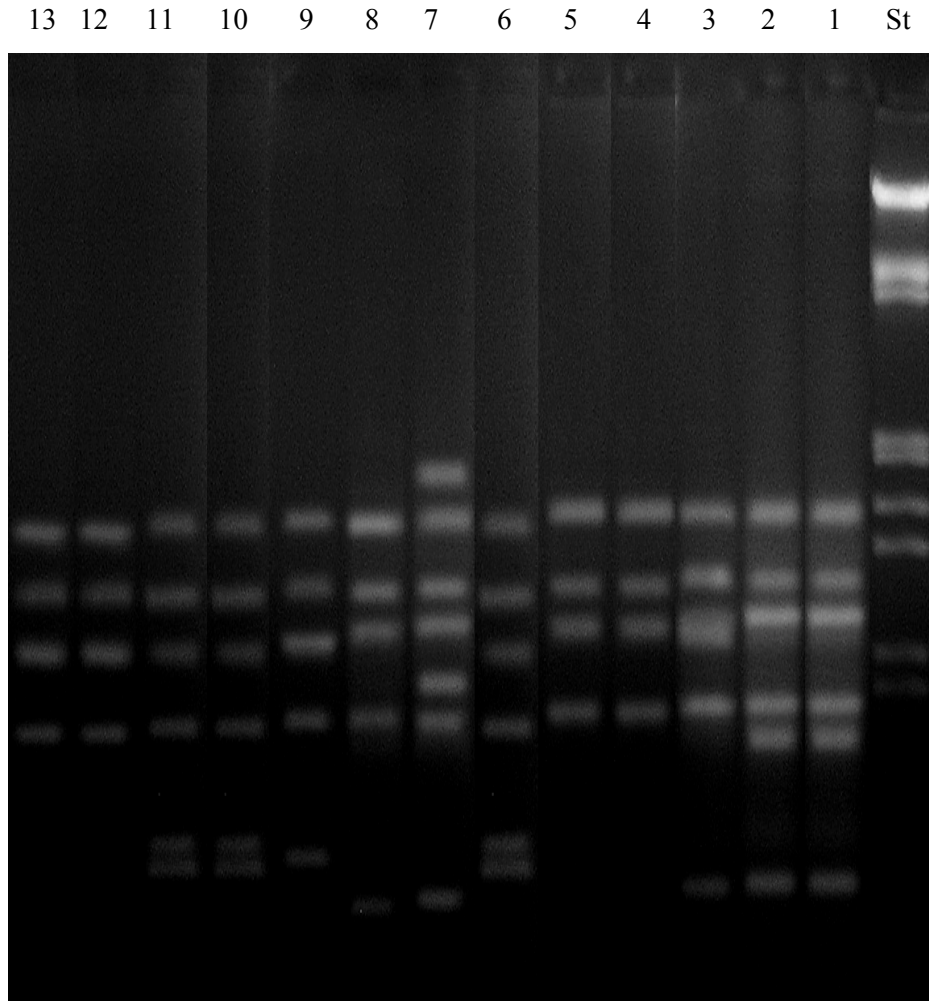
markör allelleri bulunan Opata dayanıklılığı ile ilişkili olarak yüksek seviyede çevreden etkilenen bir gen olarak bildirmişlerdir. Opata'da bulunduğu bilinen *Yr18* geninin tarla denemelerinde hastalığa tepkiyi azalttığını ve bu genin *Lr34* ile çok yakın linkage durumunda olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca 3BS, 3DS ve 5DS kromozomlarında bulunan ve Opata'dan gelen diğer üç bölgenin ergin bitki dayanıklılığı ile ilişkisi olduğunu vurgulamışlardır.

4.1.1. Cumhuriyet-75 x 02 nolu hat (Lee) kombinasyon generasyonlarına (F₁ ve F₂) ait DNA Analizleri

Cumhuriyet-75 x 02 nolu hat kombinasyonunda ebeveynler, F₁ generasyonu ve F₂ generasyonuna ait 40 genotip DNA'ları RAPD analizi ile incelenmiştir. Ebeveynlerin RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) ve SSR (Simple sequence repeat) analizlerinden elde edilen sonuçlara göre polimorfik ve değerlendirilebilir bantlar veren primerlerden 10 adet RAPD primeri ve 5 adet SSR primeri (forward + Reverse olmak üzere) incelenen melez kombinasyonunun analizi için kullanılmıştır. Kullanılan 10 RAPD primeri (OPB-01, OPB-03, OPB-05, OPB-11, OPC-07, OPD-12, OPG-02, OPAG-04, OPAE-10 ve OPAN-12) ve 5 adet SSR primeri (forward + Reverse) (WMC-24-F, WMC-24-R, WMC-25-F, WMC-25-R, WMC-27-F, WMC-27-R, WMC-41-F, WMC-41-R, WMC43-F ve WMC43-R) değerlendirilebilir bantlar vermiştir.

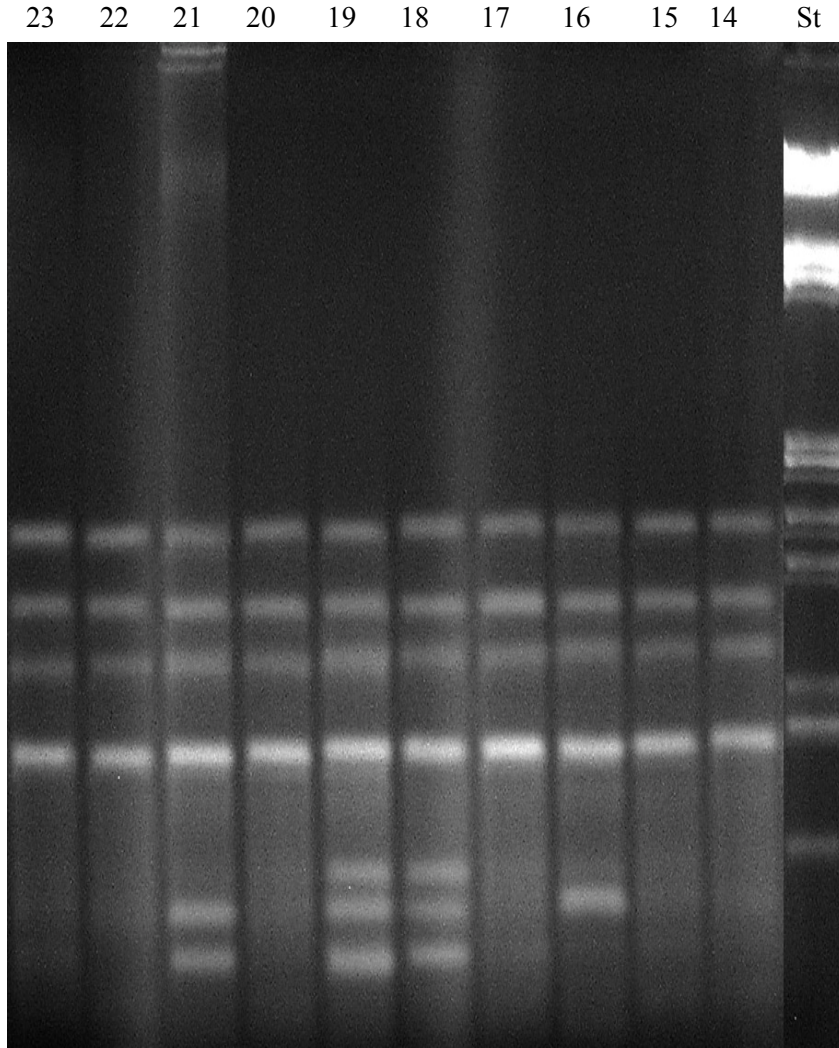
4.1.2. Cumhuriyet-75 x 02 nolu hat kombinasyonunda F₁ ve F₂ generasyonunun RAPD sonuçları

Cumhuriyet-75 x 02 nolu hat kombinasyonunda 10 primere ilişkin ebeveyn, F₁ ve F₂ generasyonlarına ait RAPD sonuçları sırası ile Şekil 4.43, 4.44, 4.45, 4.46, 4.47, 4.48, 4.49, 4.50, 4.51, 4.52, 4.53, 4.54, 4.55, 4.56, 4.57, 4.58, 4.59, 4.60, 4.61, 4.62, 4.63, 4.64, 4.65, 4.66, 4.67, 4.68, 4.69, 4.70, 4.71, 4.72, 4.73, 4.74, 4.75, 4.76, 4.77, 4.78, 4.79, 4.80, 4.81 ve 4.82'de verilmiştir.



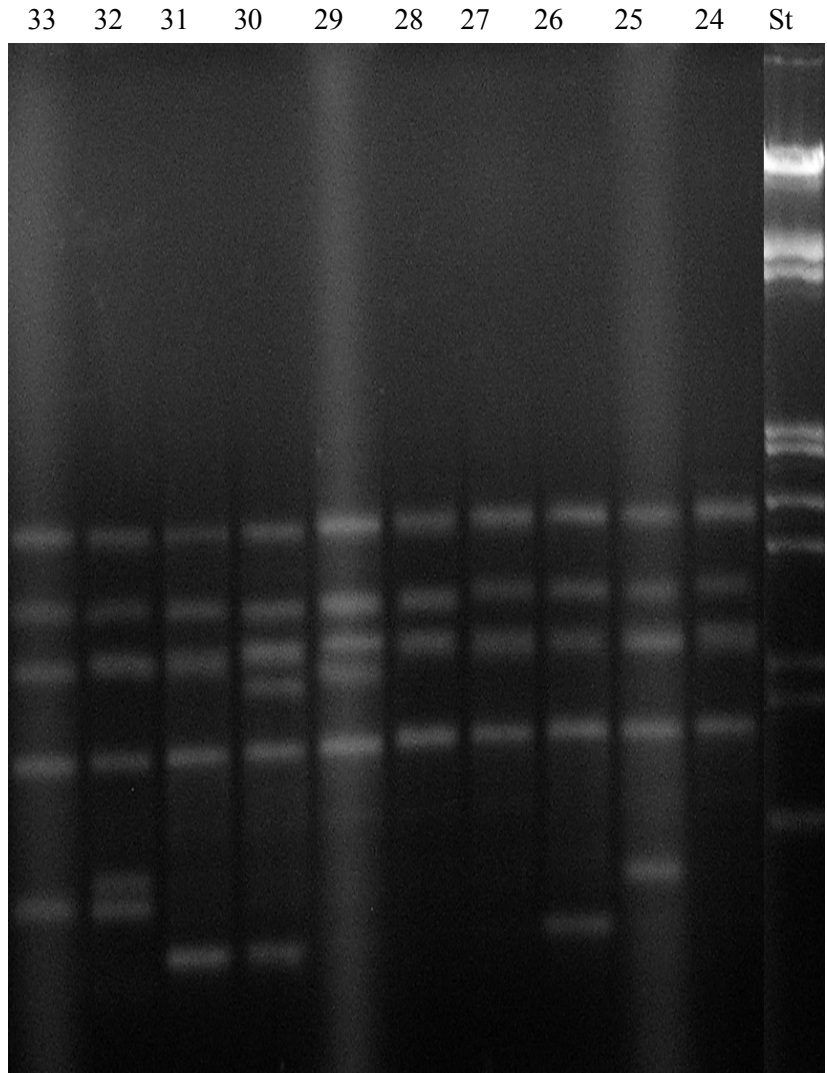
Şekil 4.43: OPB-01 primerinin RAPD sonuçları I.

St: Standart markör, 1: Cumhuriyet-75, 2: 02 nolu hat, 3: Cumhuriyet-75x 02 F₁,
4-13: Cumhuriyet-75x 02 F₂ genotipleri .



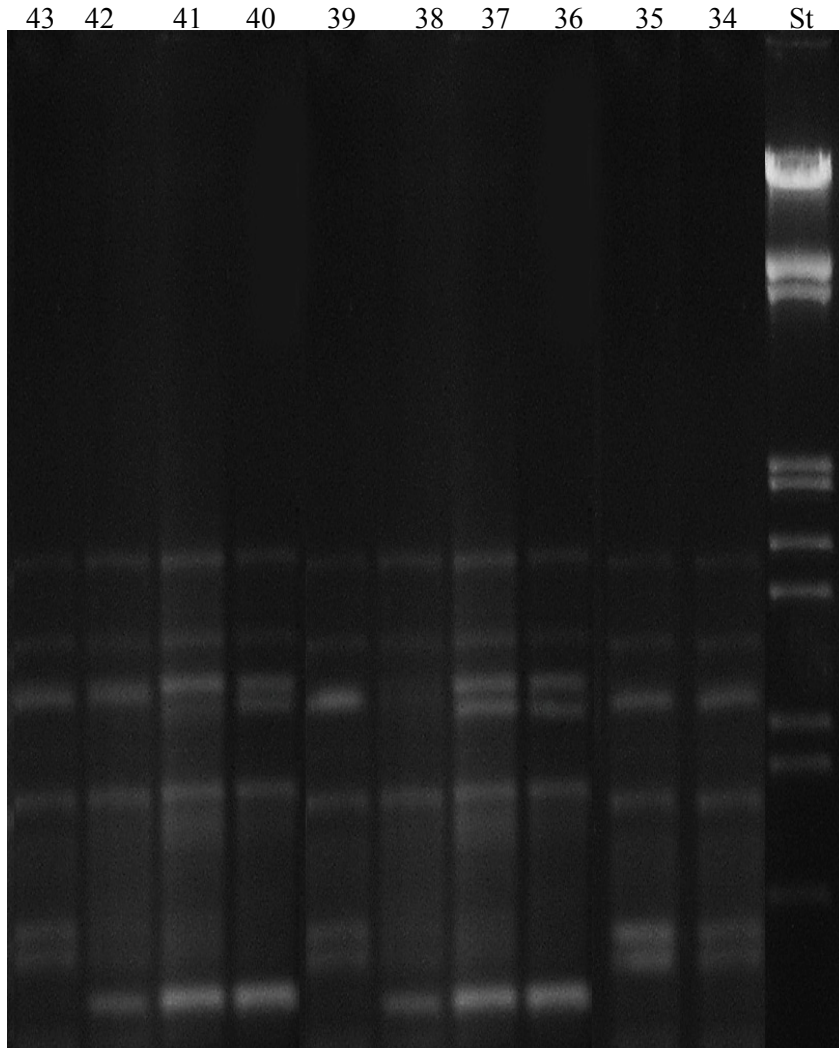
Şekil 4.44: OPB-01 primerinin RAPD sonuçları II.

St: Standart markör, 14-23: Cumhuriyet-75x 02 F₂ genotipleri .



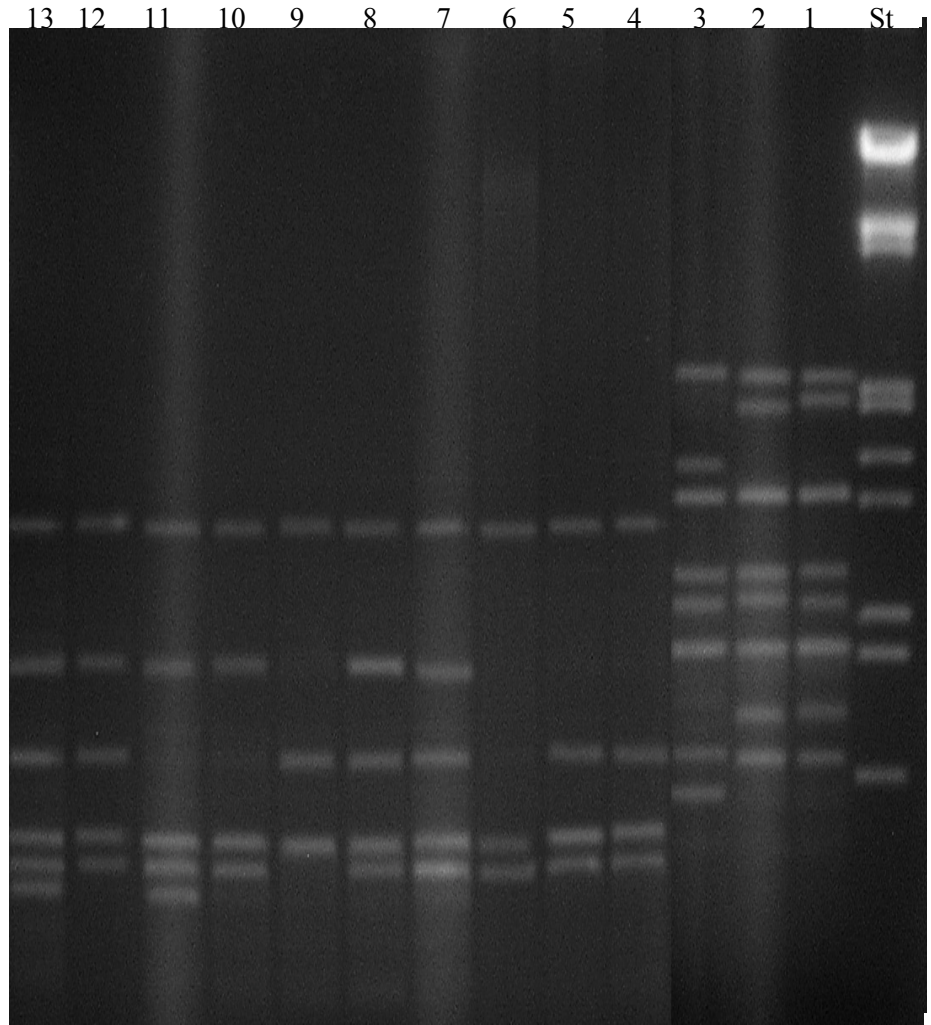
Şekil 4.45: OPB-01 primerinin RAPD sonuçları III.

St: Standart markör, 24-33: Cumhuriyet-75x 02 F₂ genotipleri .



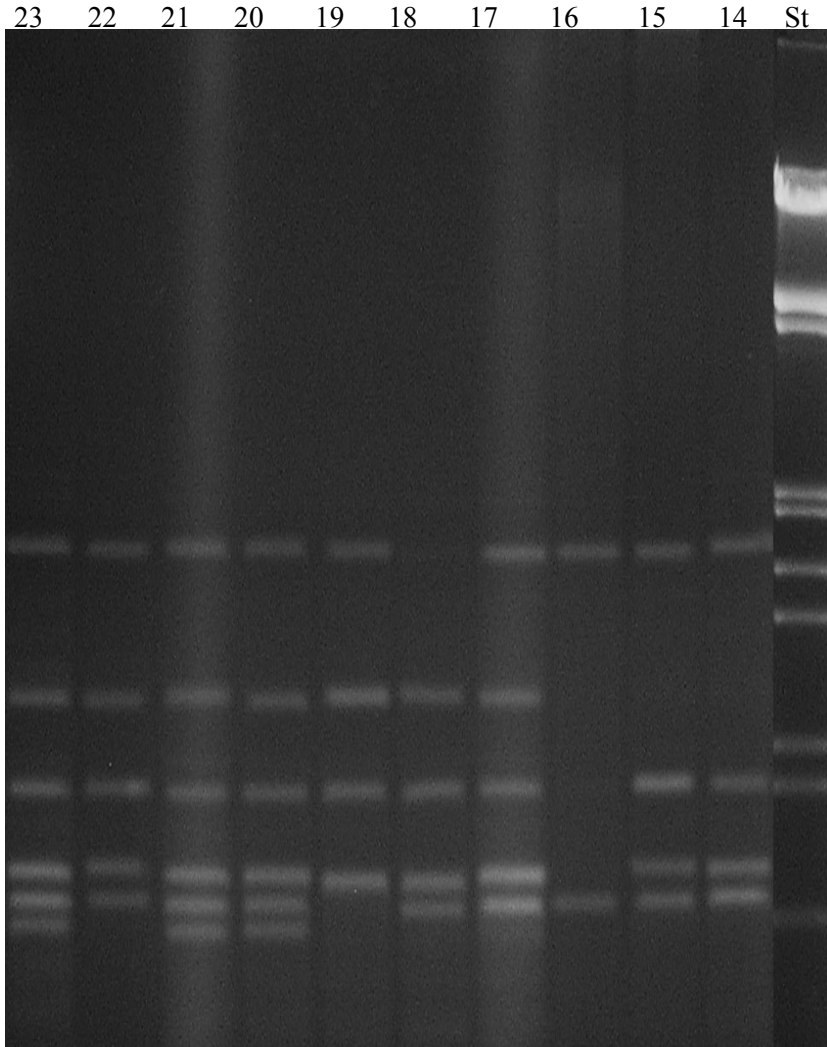
Şekil 4.46: OPB-01 primerinin RAPD sonuçları IV.

St: Standart markör, 34-43: Cumhuriyet-75x 02 F₂ genotipleri .



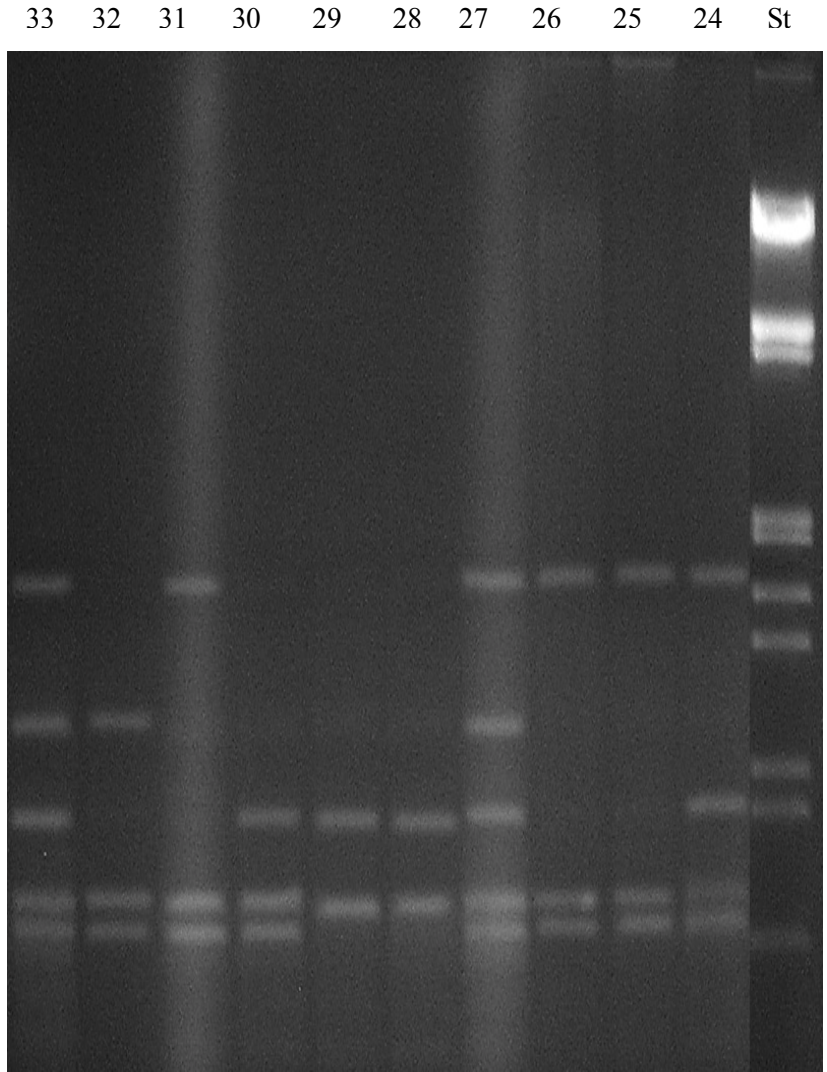
Şekil 4.47: OPB-03 primerinin RAPD sonuçları I.

St: Standart markör, 1: Cumhuriyet-75, 2: 02 nolu hat, 3: Cumhuriyet-75x 02 F₁,
4-13: Cumhuriyet-75x 02 F₂ genotipleri .



Şekil 4.48: OPB-03 primerinin RAPD sonuçları II.

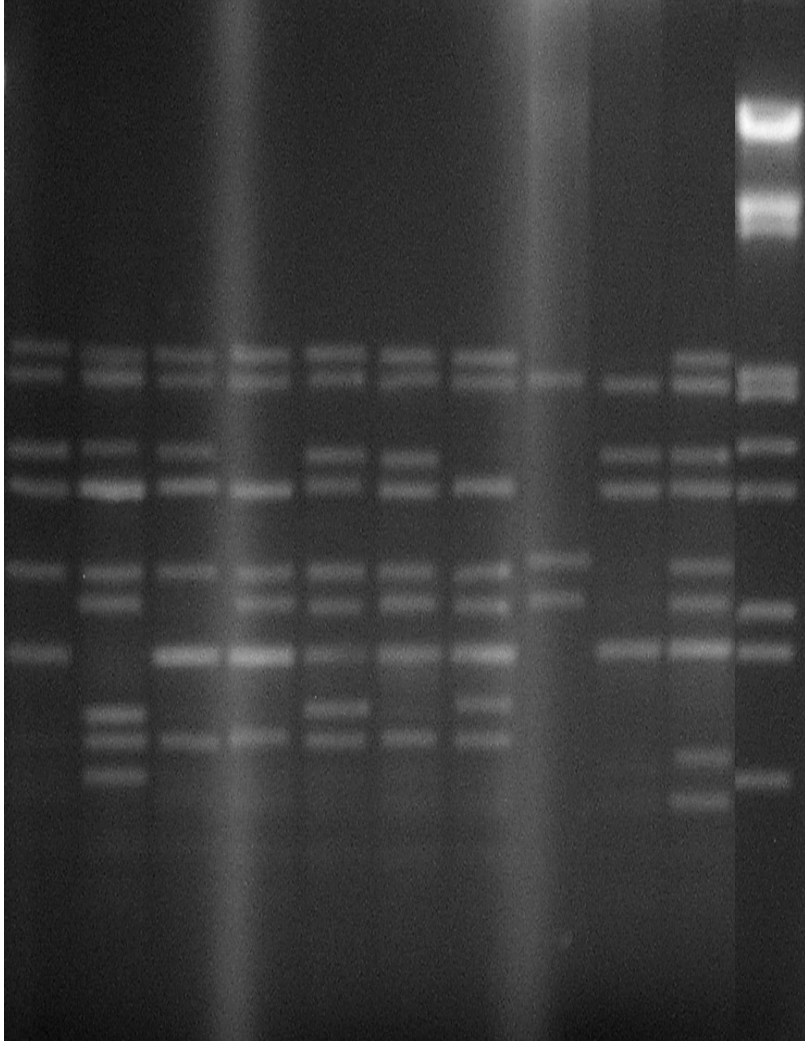
St: Standart markör, 14-23: Cumhuriyet-75x 02 F₂ genotipleri .



Şekil 4.49: OPB-03 primerinin RAPD sonuçları III.

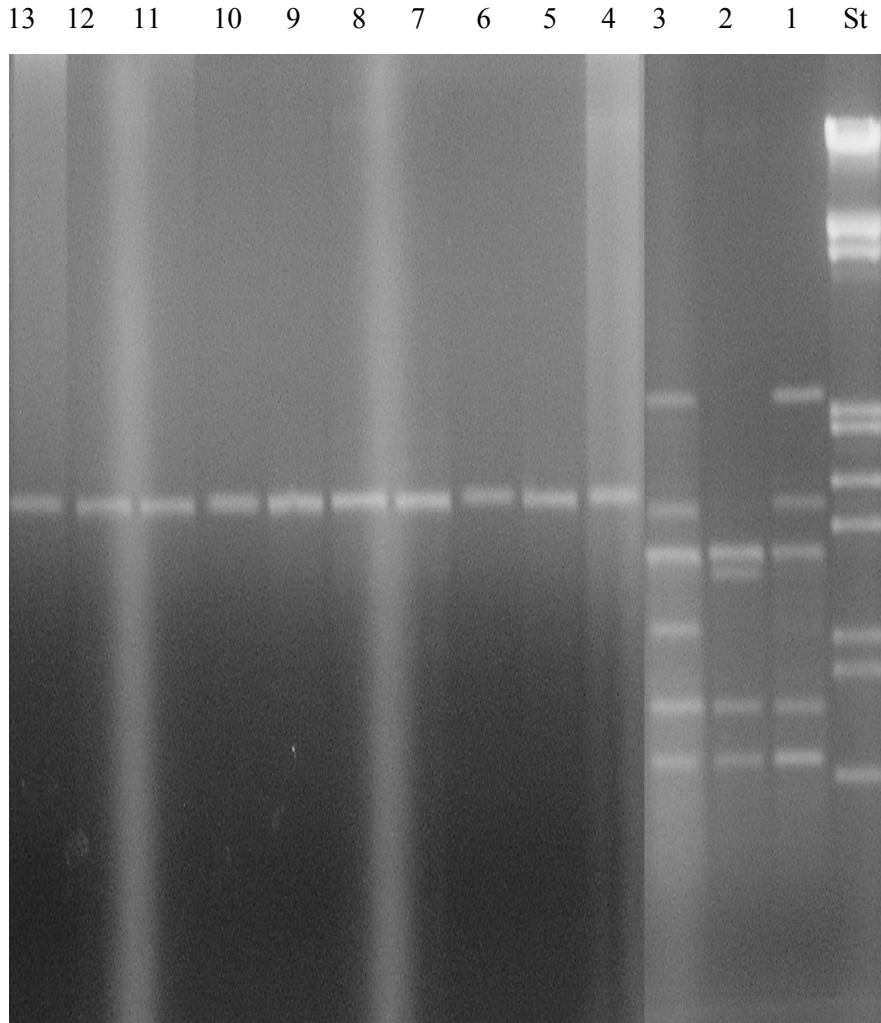
St: Standart markör, 24-33: Cumhuriyet-75x 02 F₂ genotipleri .

43 42 41 40 39 38 37 36 35 34 St



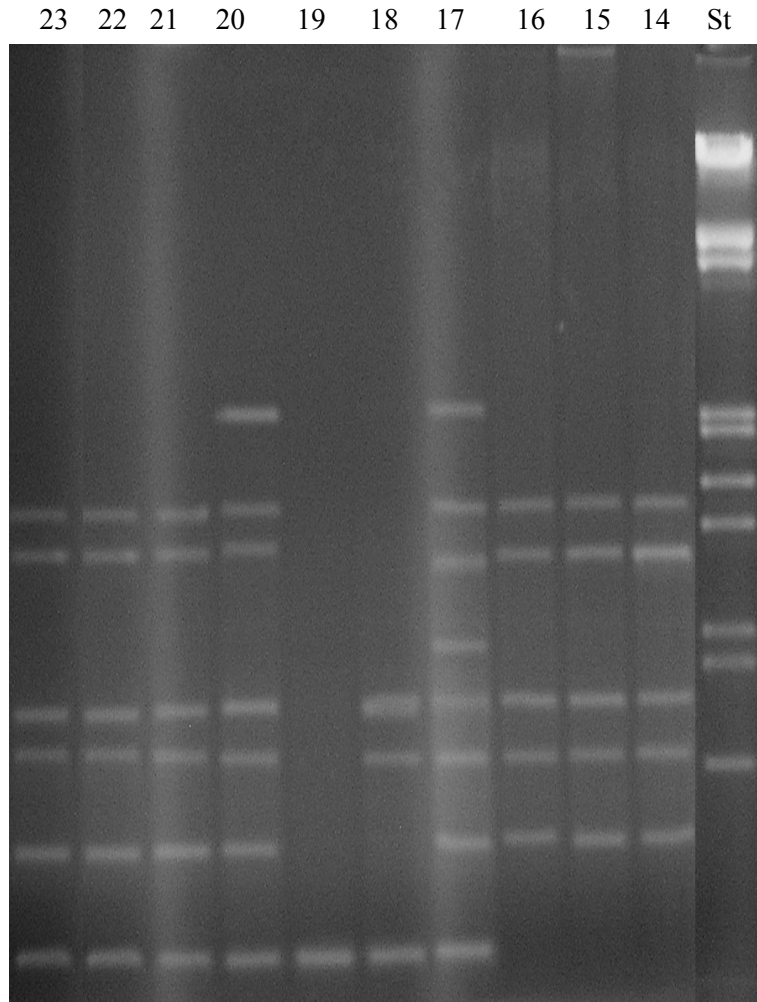
Şekil 4.50: OPB-03 primerinin RAPD sonuçları IV.

St: Standart markör, 34-43: Cumhuriyet-75x 02 F₂ genotipleri .



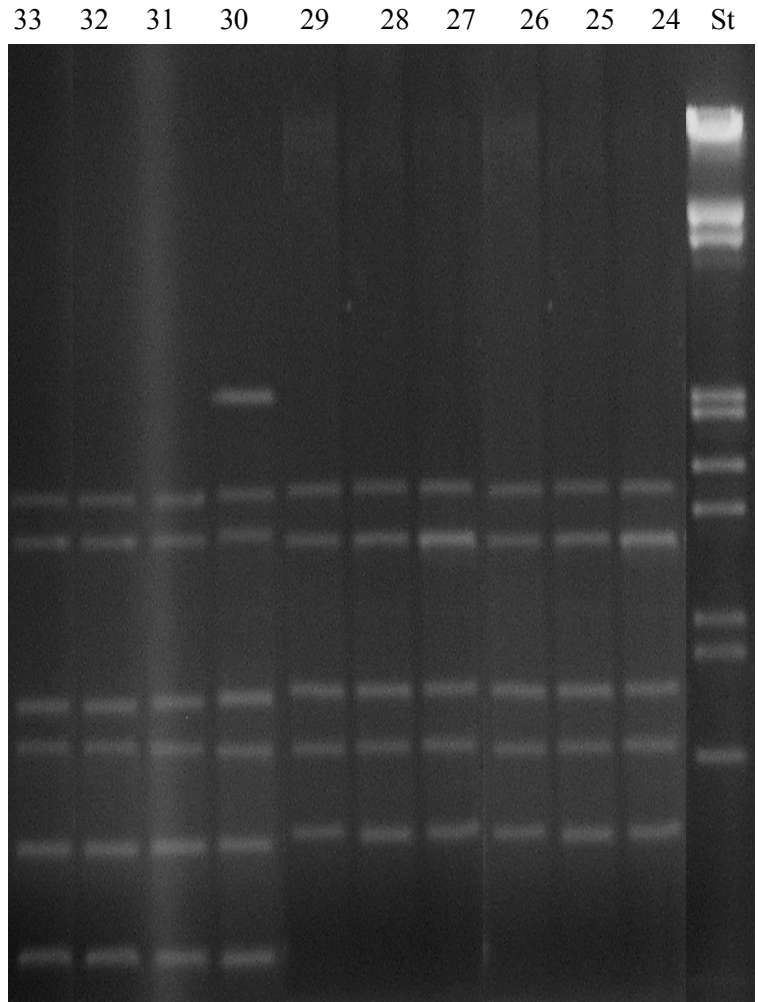
Şekil 4.51: OPB-05 primerinin RAPD sonuçları I.

St: Standart markör, 1: Cumhuriyet-75, 2: 02 nolu hat, 3: Cumhuriyet-75x 02 F₁,
4-13: Cumhuriyet-75x 02 F₂ genotipleri .



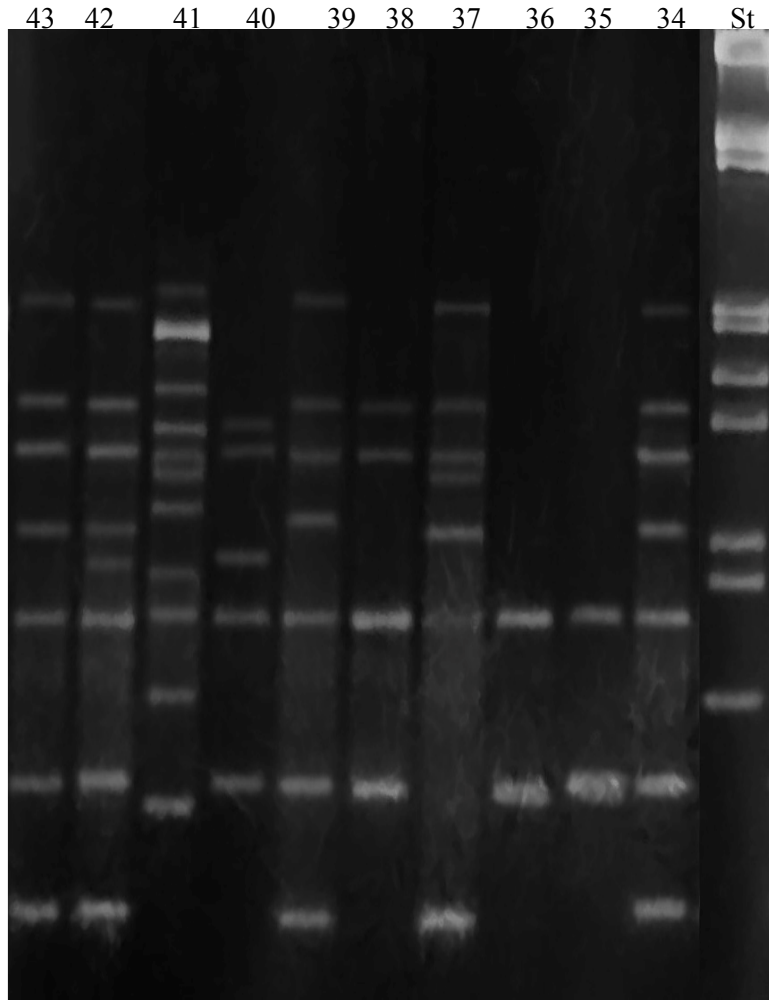
Şekil 4.52: OPB-05 primerinin RAPD sonuçları II.

St: Standart markör, 14-23: Cumhuriyet-75x 02 F₂ genotipleri .



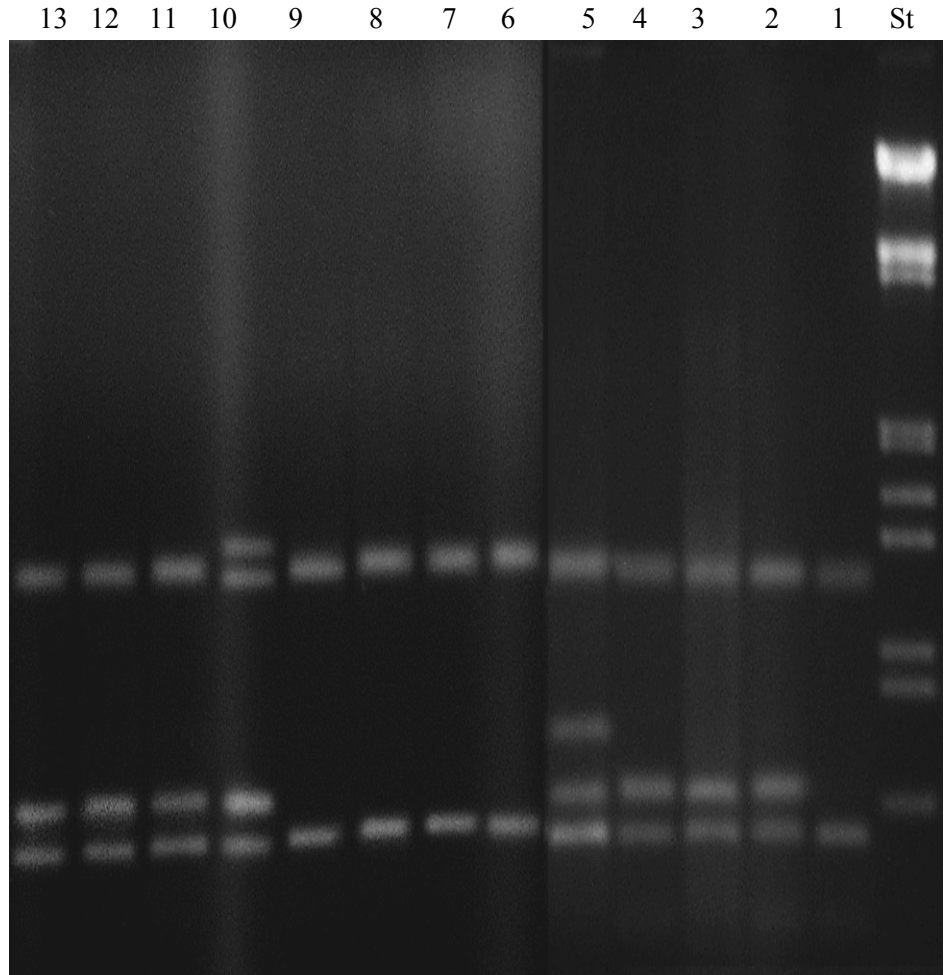
Şekil 4.53: OPB-05 primerinin RAPD sonuçları III.

St: Standart markör, 24-33: Cumhuriyet-75x 02 F₂ genotipleri .



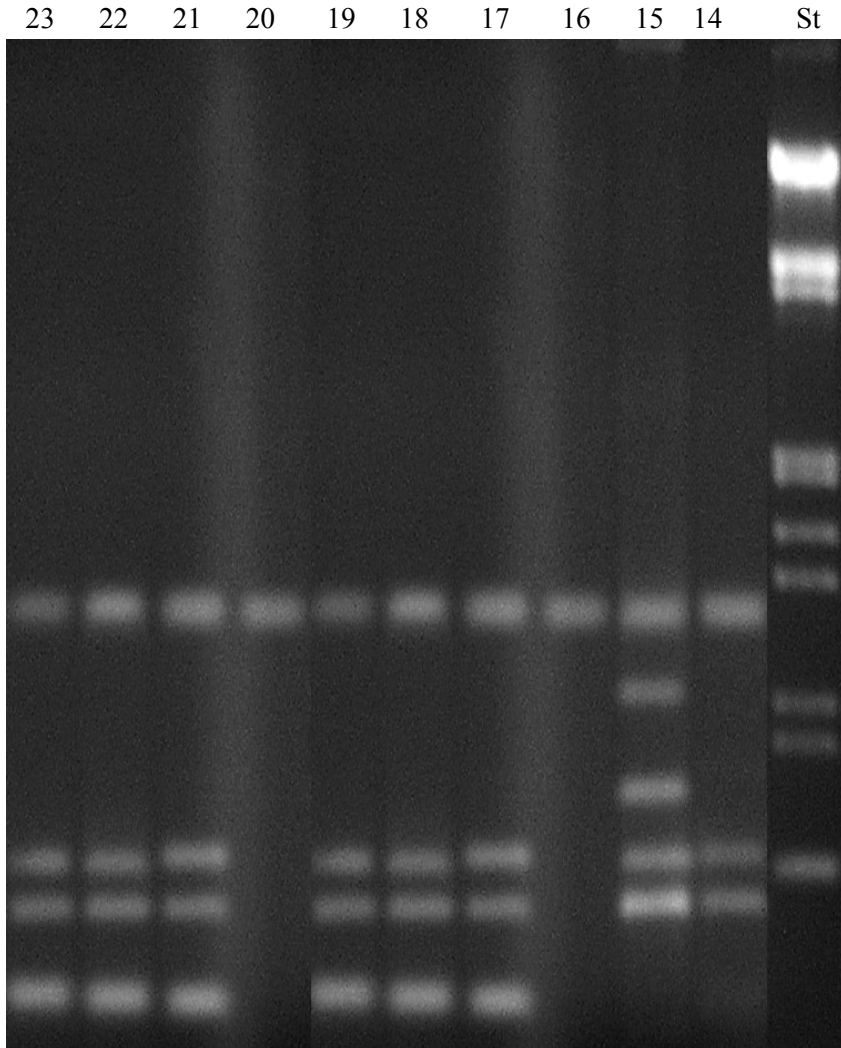
Şekil 4.54: OPB-05 primerinin RAPD sonuçları IV.

St: Standart markör, 34-43: Cumhuriyet-75x 02 F₂ genotipleri .



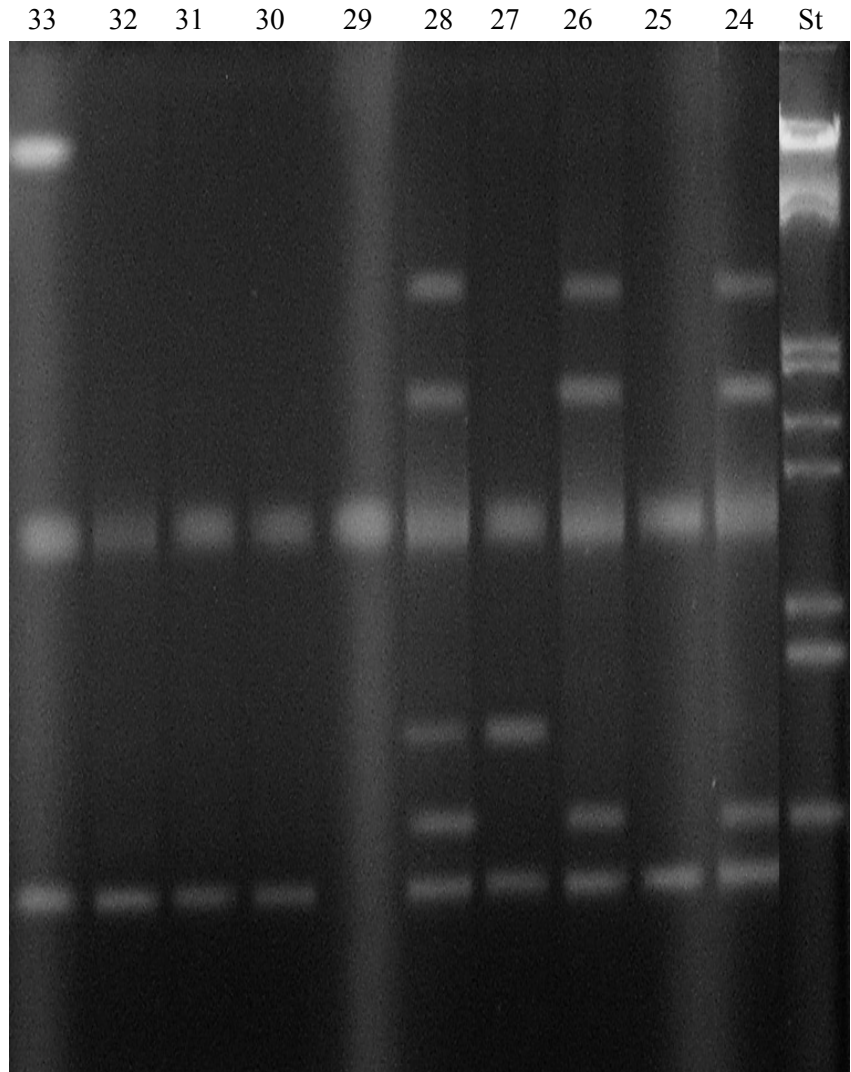
Şekil 4.55: OPB-11 primerinin RAPD sonuçları I.

St: Standart markör, 1: Cumhuriyet-75, 2: 02 nolu hat, 3: Cumhuriyet-75x 02 F₁, 4-13: Cumhuriyet-75x 02 F₂ genotipleri .



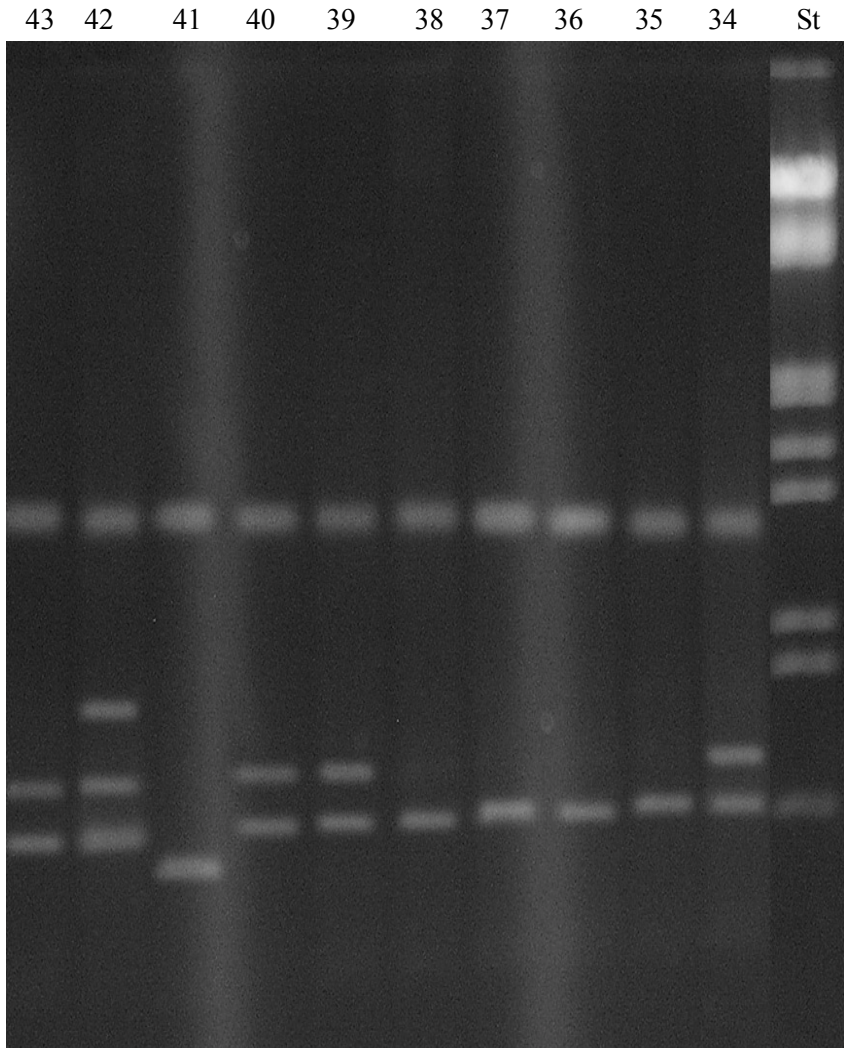
Şekil 4.56: OPB-11 primerinin RAPD sonuçları II.

St: Standart markör, 14-23: Cumhuriyet-75x 02 F₂ genotipleri .



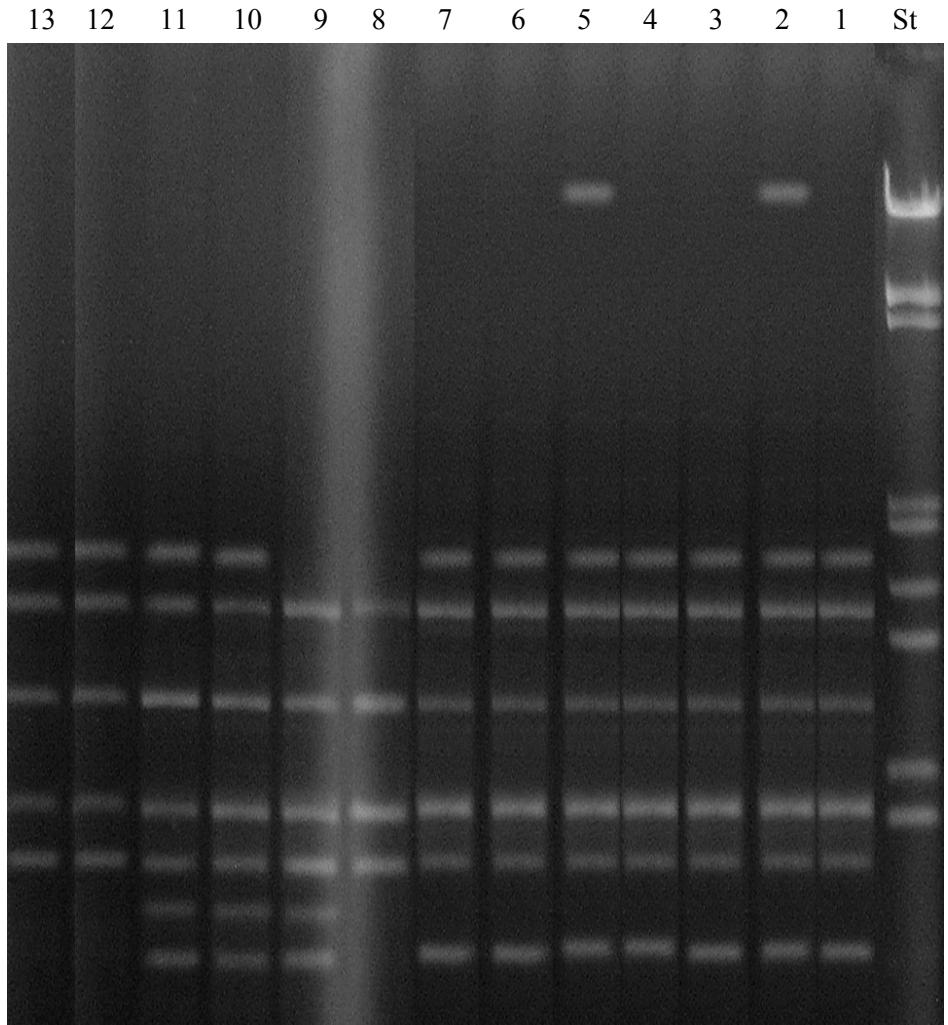
Şekil 4.57: OPB-11 primerinin RAPD sonuçları III.

St: Standart markör, 24-33: Cumhuriyet-75x 02 F₂ genotipleri .



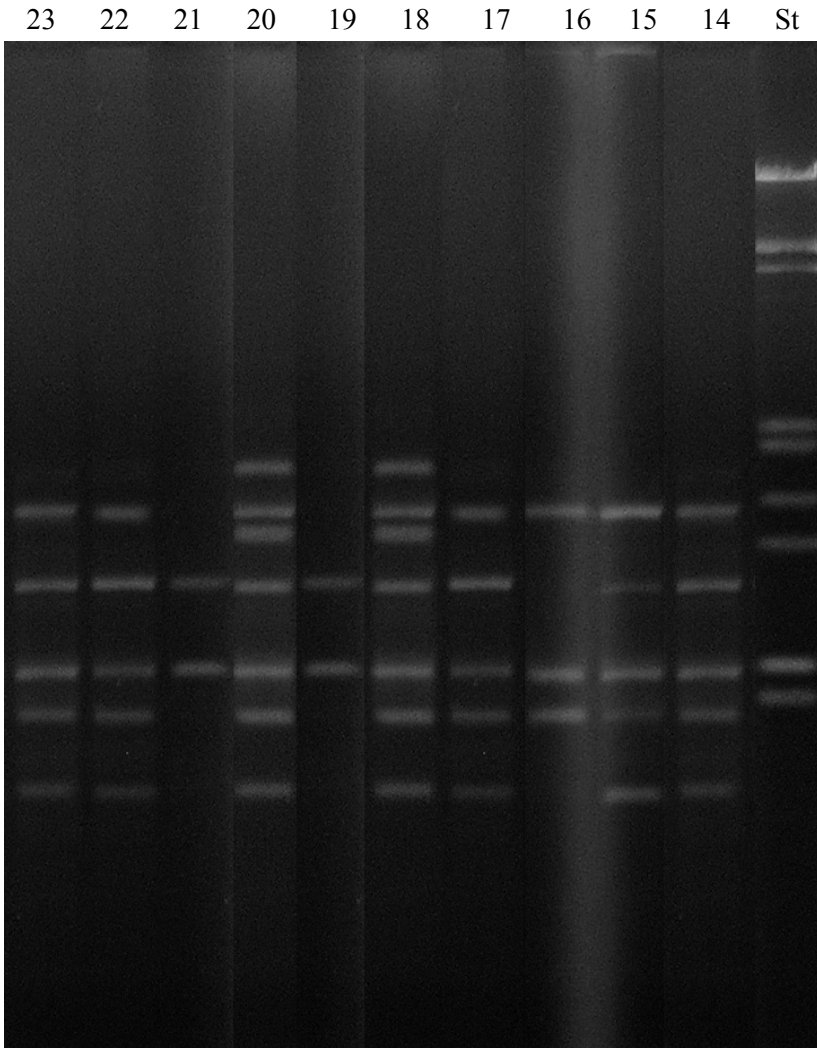
Şekil 4.58: OPB-11 primerinin RAPD sonuçları IV.

St: Standart markör, 34-43: Cumhuriyet-75x 02 F₂ genotipleri .



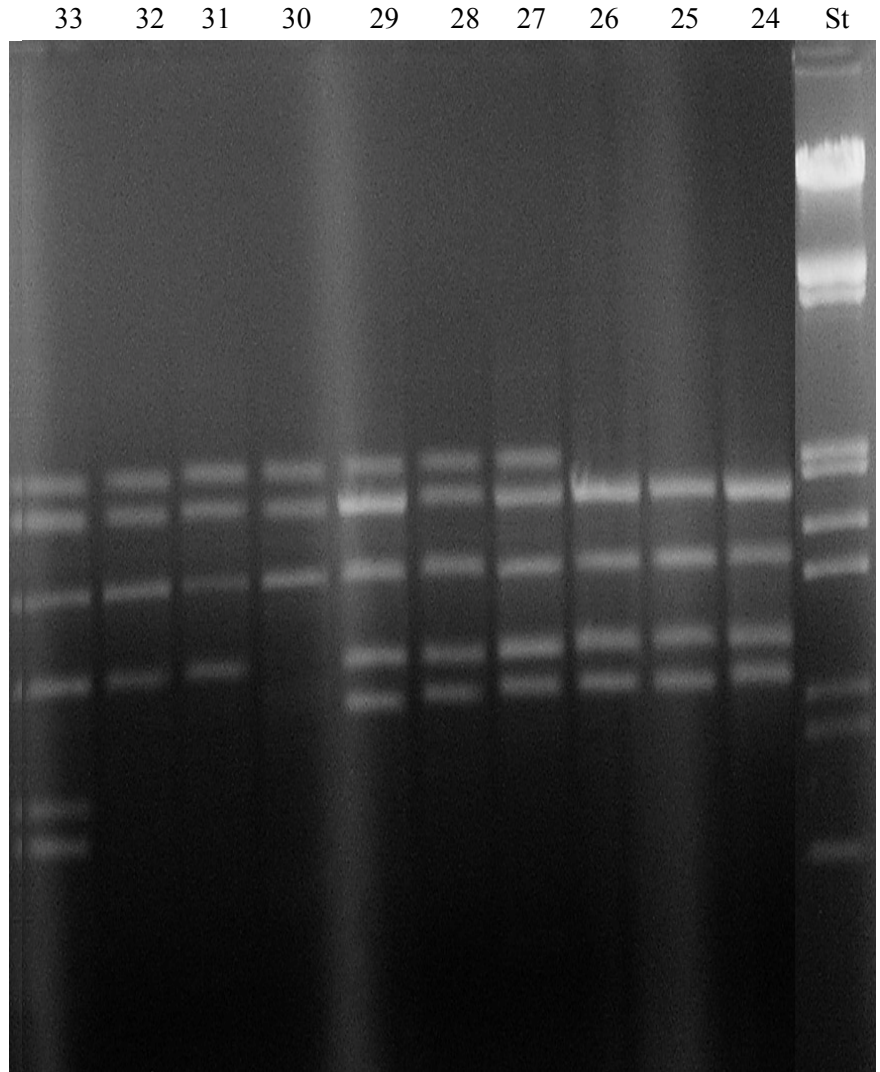
Şekil 4.59: OPC-07 primerinin RAPD sonuçları I.

St: Standart markör, 1: Cumhuriyet-75, 2: 02 nolu hat, 3: Cumhuriyet-75x 02 F₁, 4-13: Cumhuriyet-75x 02 F₂ genotipleri .



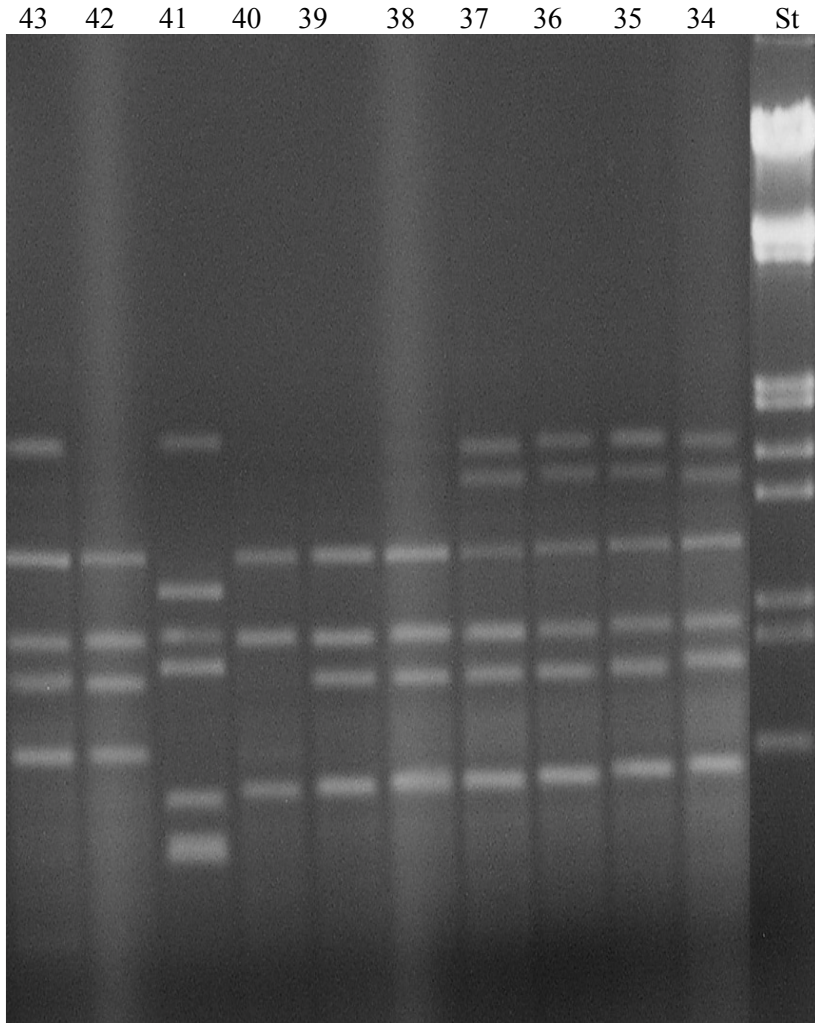
Şekil 4.60: OPC-07 primerinin RAPD sonuçları II.

St: Standart markör, 14-23: Cumhuriyet-75x 02 F₂ genotipleri .



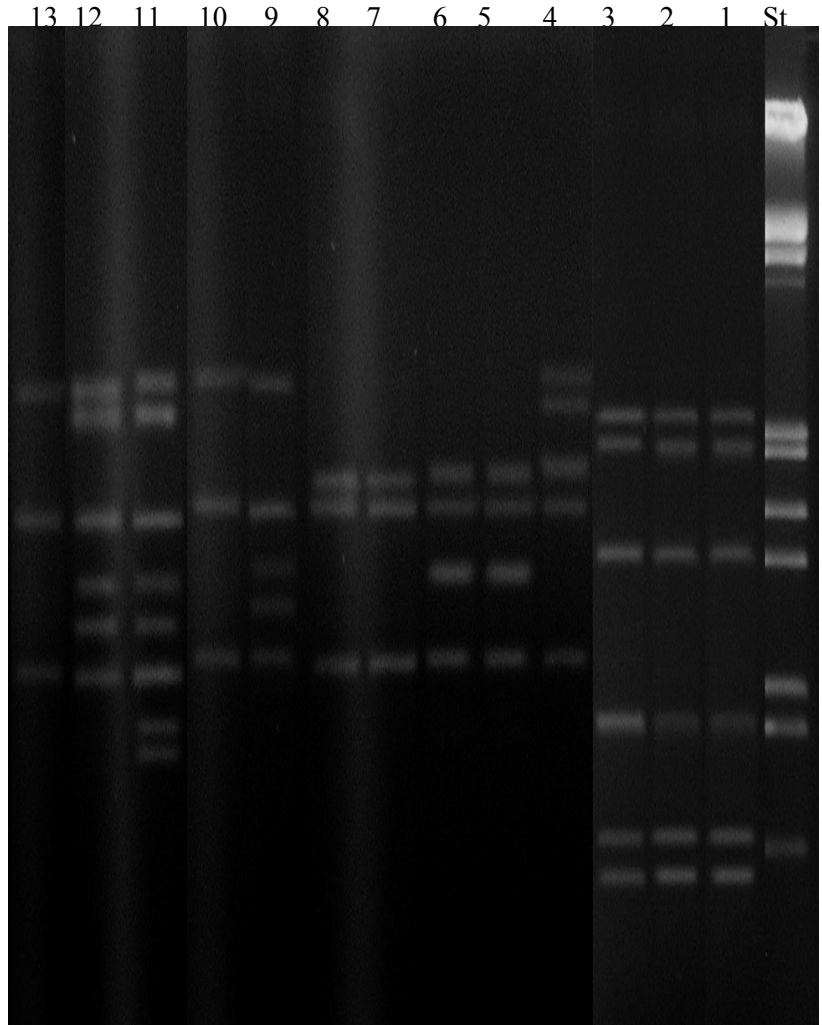
Şekil 4.61: OPC-07 primerinin RAPD sonuçları III.

St: Standart markör, 24-33: Cumhuriyet-75x 02 F₂ genotipleri .



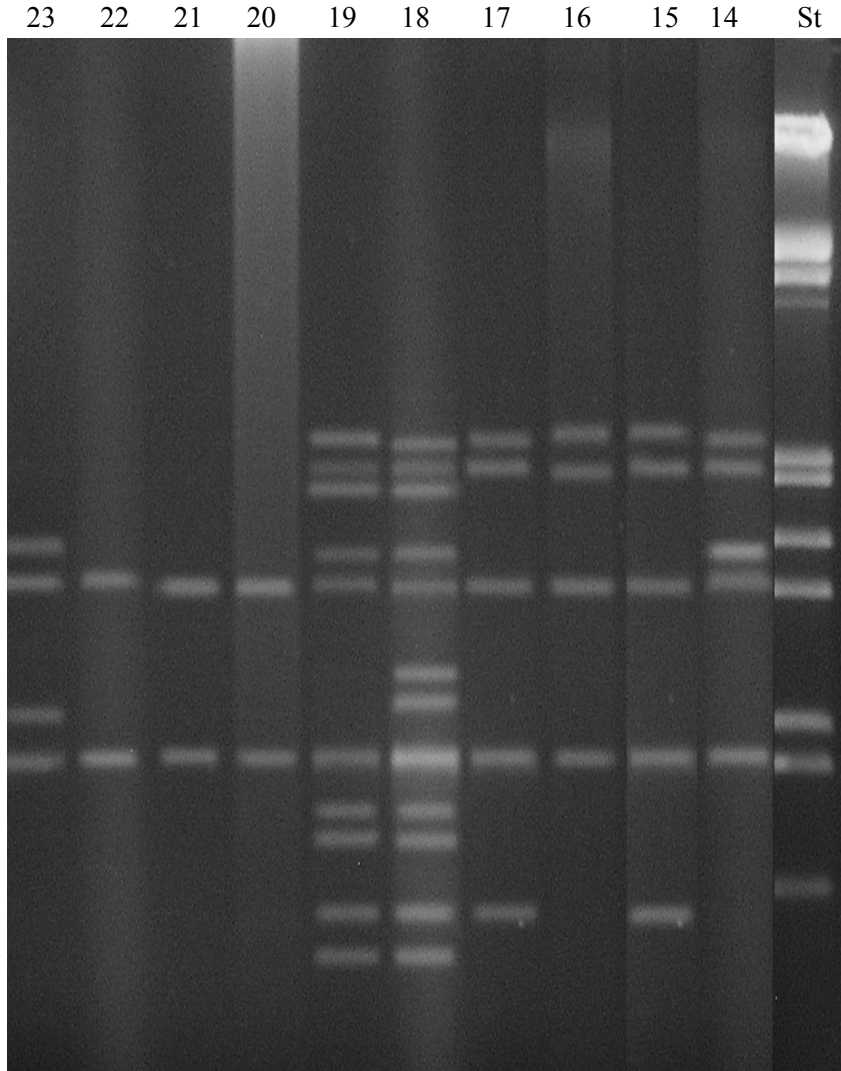
Şekil 4.62: OPC-07 primerinin RAPD sonuçları IV.

St: Standart markör, 34-43: Cumhuriyet-75x 02 F₂ genotipleri .



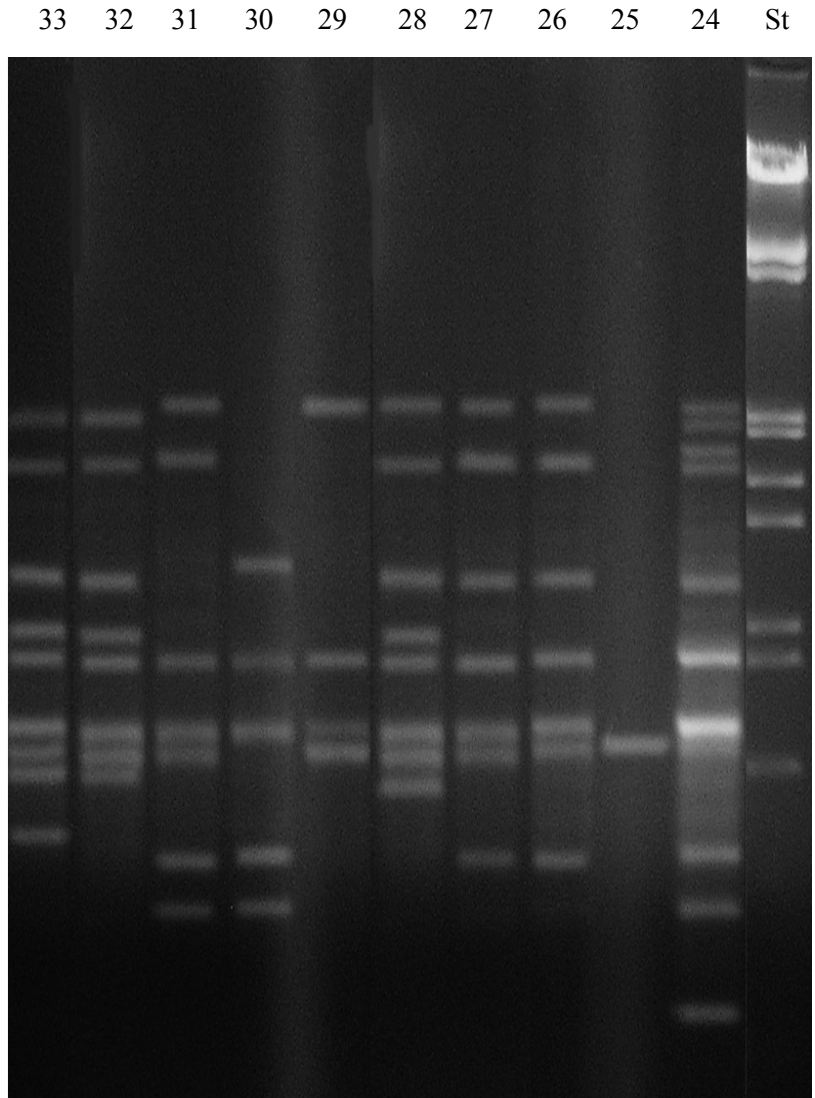
Şekil 4.63: OPD-12 primerinin RAPD sonuçları I.

St: Standart markör, 1: Cumhuriyet-75, 2: 02 nolu hat, 3: Cumhuriyet-75x 02 F₁, 4-13: Cumhuriyet-75x 02 F₂ genotipleri .



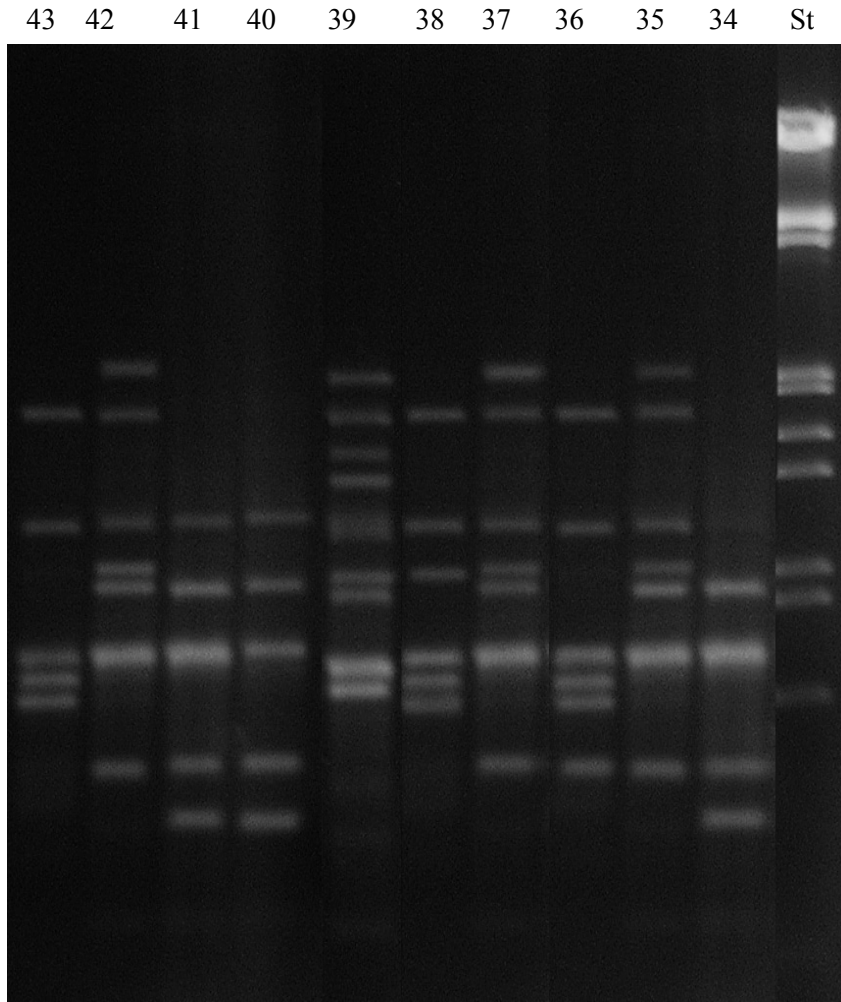
Şekil 4.64: OPD-12 primerinin RAPD sonuçları II.

St: Standart markör, 14-23: Cumhuriyet-75x 02 F₂ genotipleri .



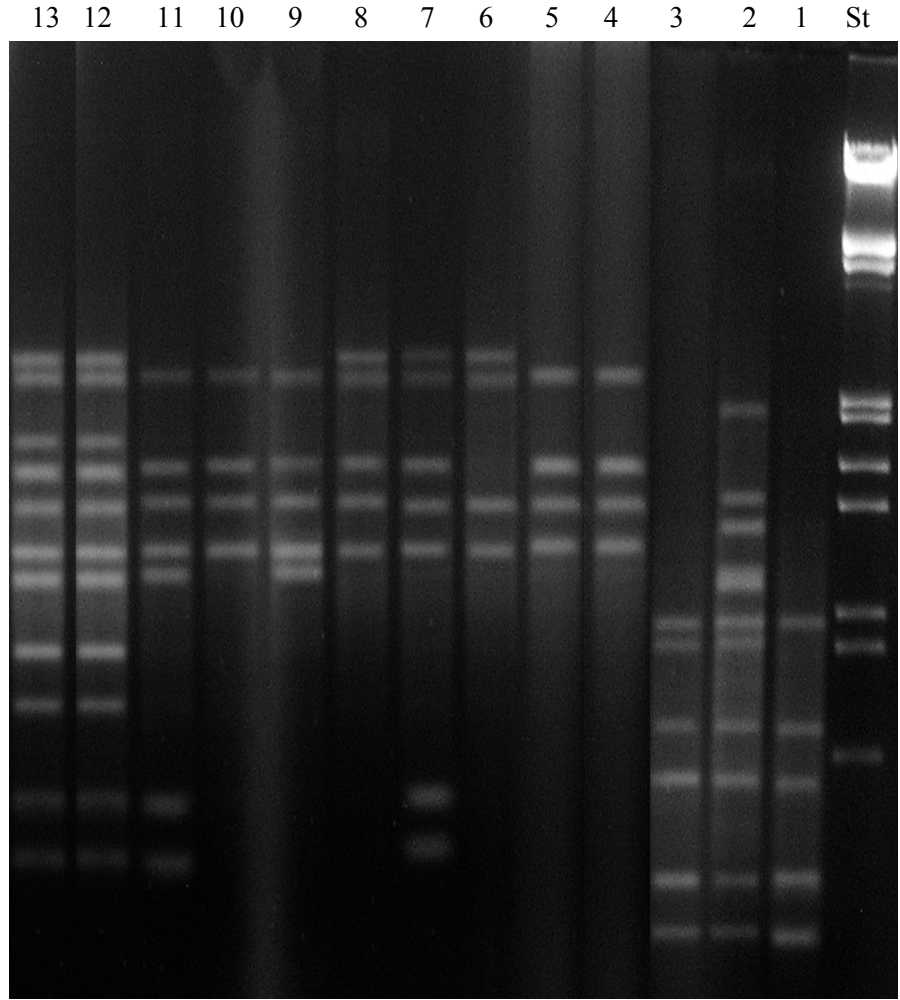
Şekil 4.65: OPD-12 primerinin RAPD sonuçları III.

St: Standart markör, 24-33: Cumhuriyet-75x 02 F₂ genotipleri .



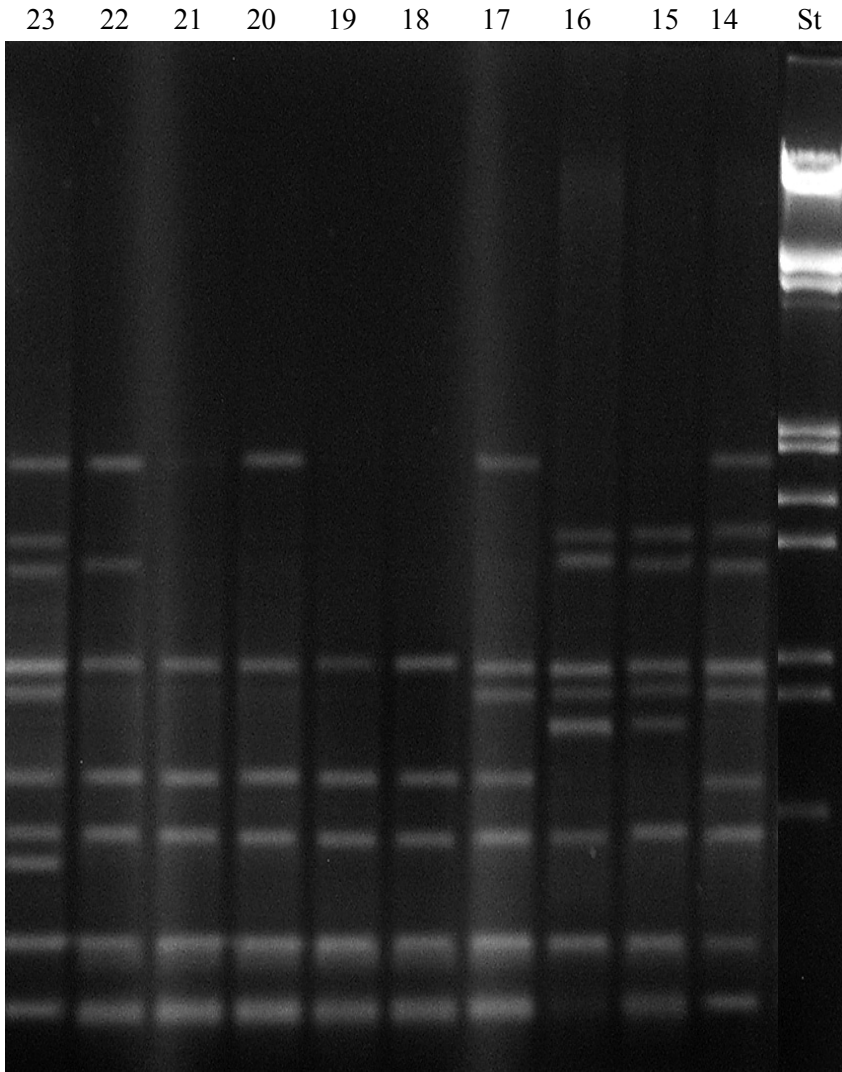
Şekil 4.66: OPD-12 primerinin RAPD sonuçları IV.

St: Standart markör, 34-43: Cumhuriyet-75x 02 F₂ genotipleri .



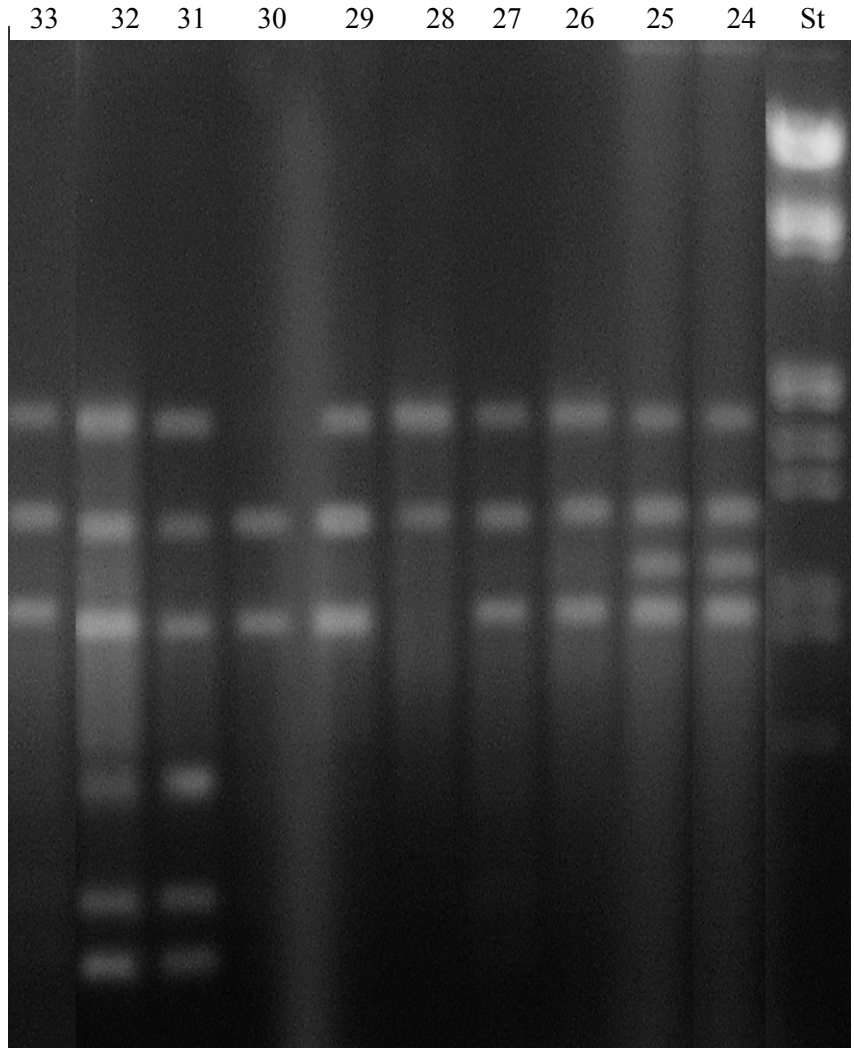
Şekil 4.67: OPG-02 primerinin RAPD sonuçları I.

St: Standart markör, 1: Cumhuriyet-75, 2: 02 nolu hat, 3: Cumhuriyet-75x 02
F₁, 4-13: Cumhuriyet-75x 02 F₂ genotipleri



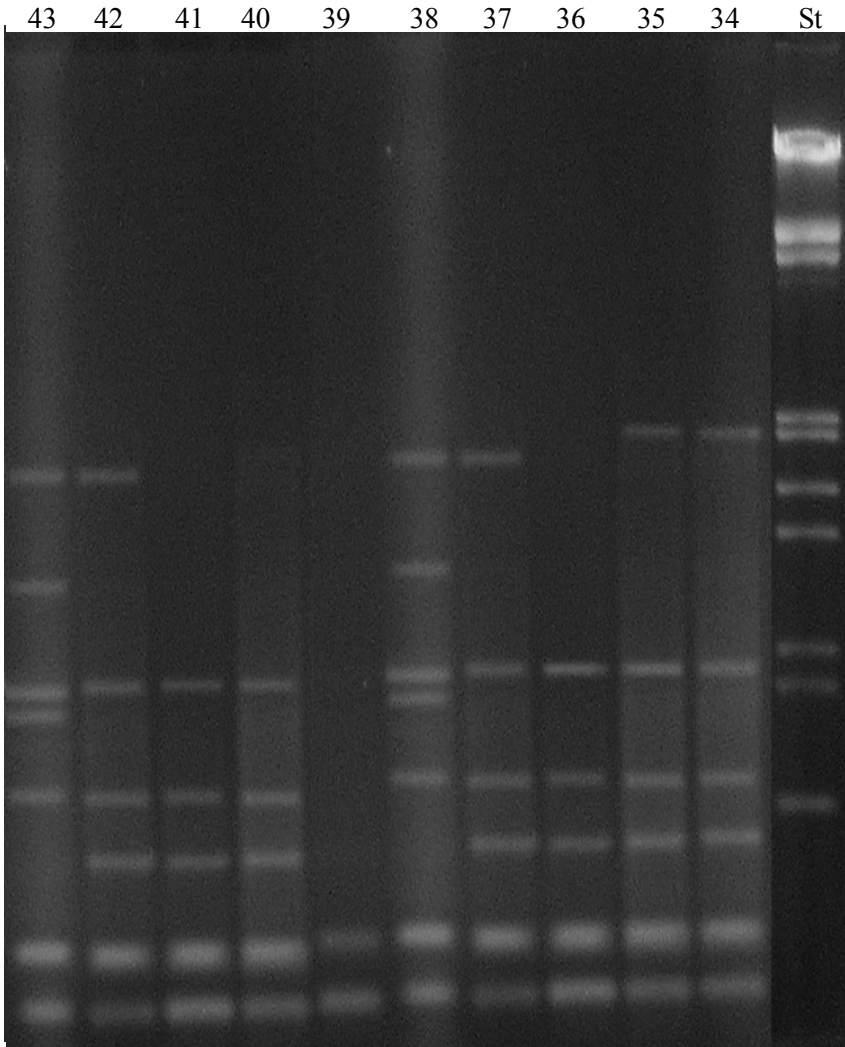
Şekil 4.68: OPG-02 primerinin RAPD sonuçları II.

St: Standart markör, 14-23: Cumhuriyet-75x 02 F₂ genotipleri .



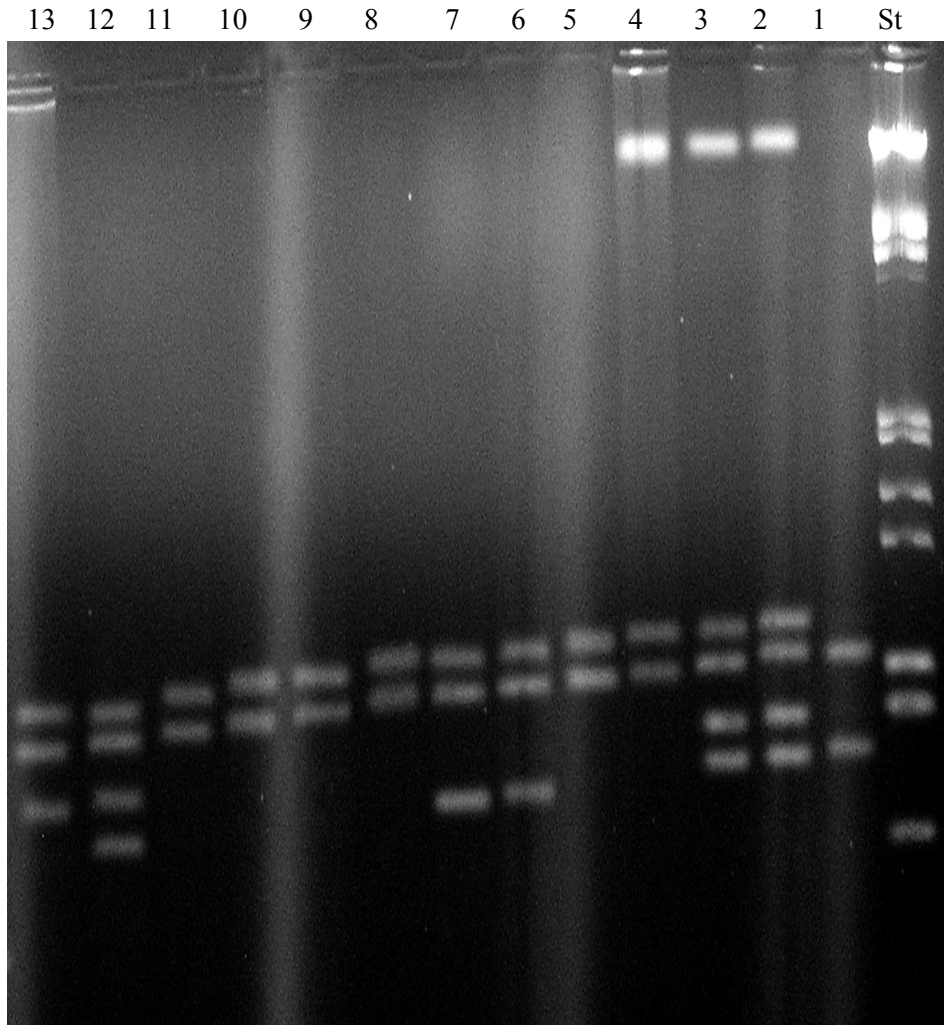
Şekil 4.69: OPG-02 primerinin RAPD sonuçları III.

St: Standart markör, 24-33: Cumhuriyet-75x 02 F₂ genotipleri .



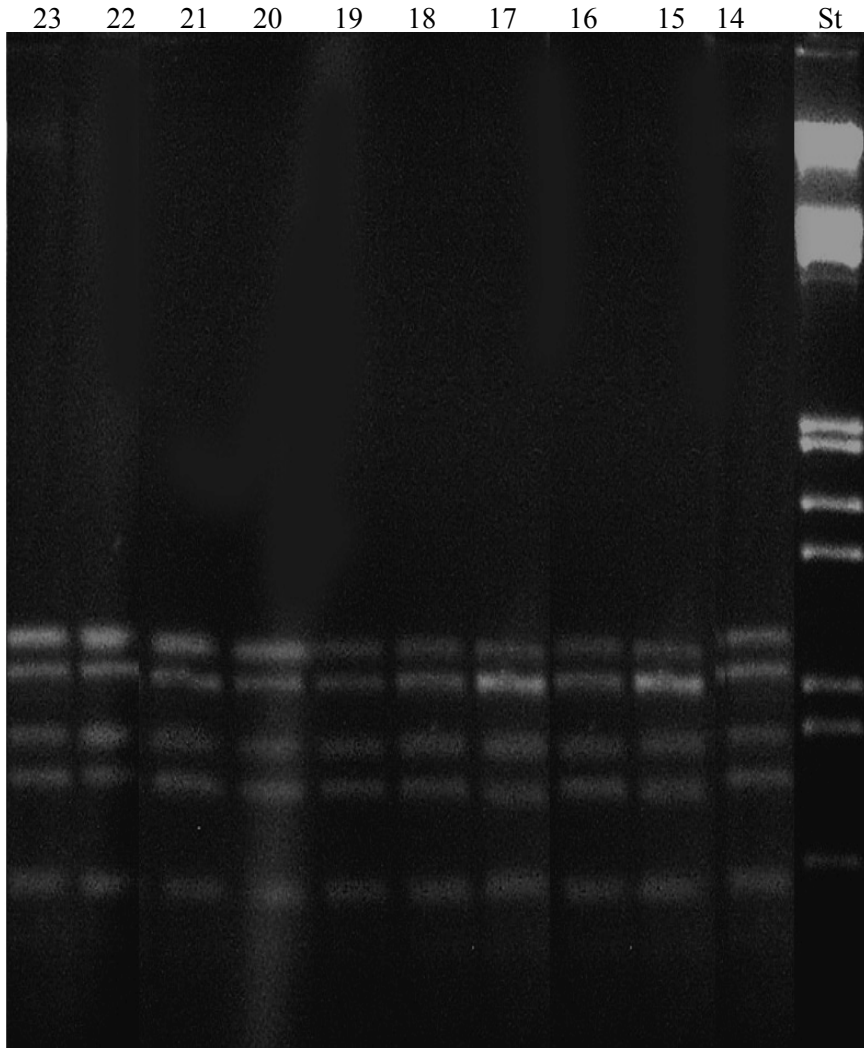
Şekil 4.70: OPG-02 primerinin RAPD sonuçları IV.

St: Standart markör, 34-43: Cumhuriyet-75x 02 F₂ genotipleri .



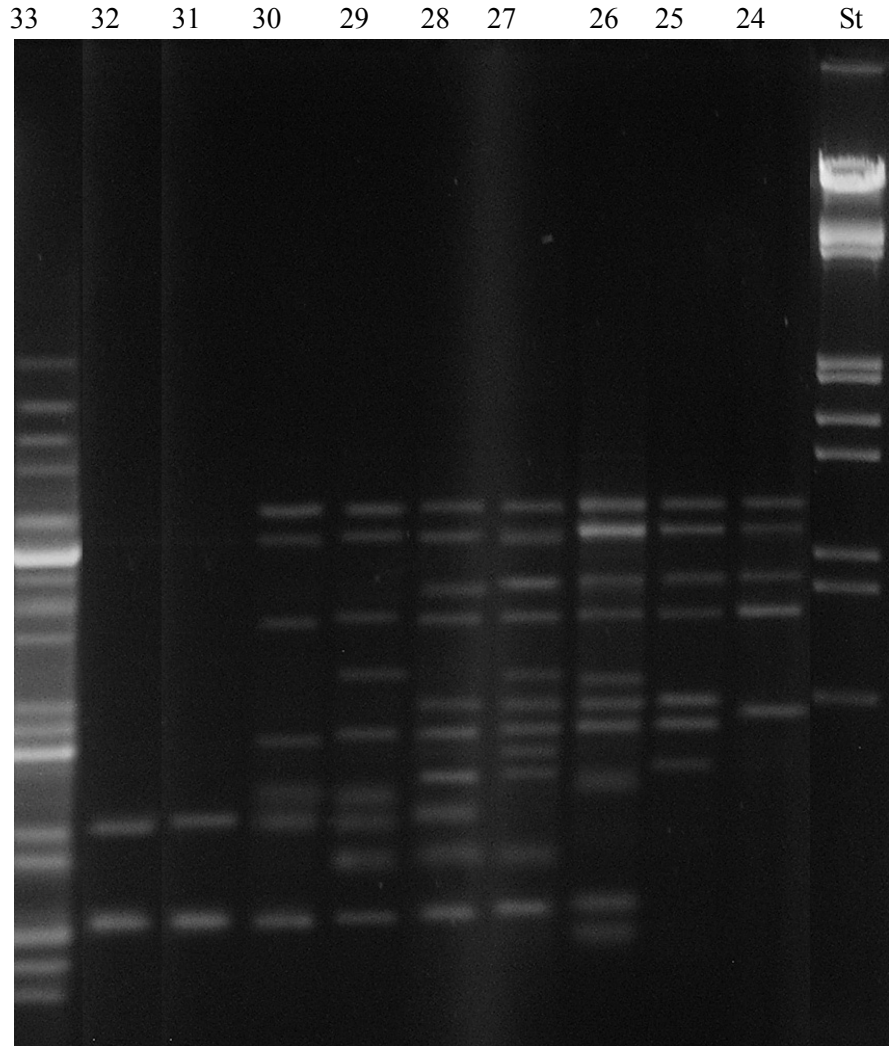
Şekil 4.71: OPAG-04 primerinin RAPD sonuçları I.

St: Standart markör, 1: Cumhuriyet-75, 2: 02 nolu hat, 3: Cumhuriyet-75x 02 F₁,
4-13: Cumhuriyet-75x 02 F₂ genotipleri .



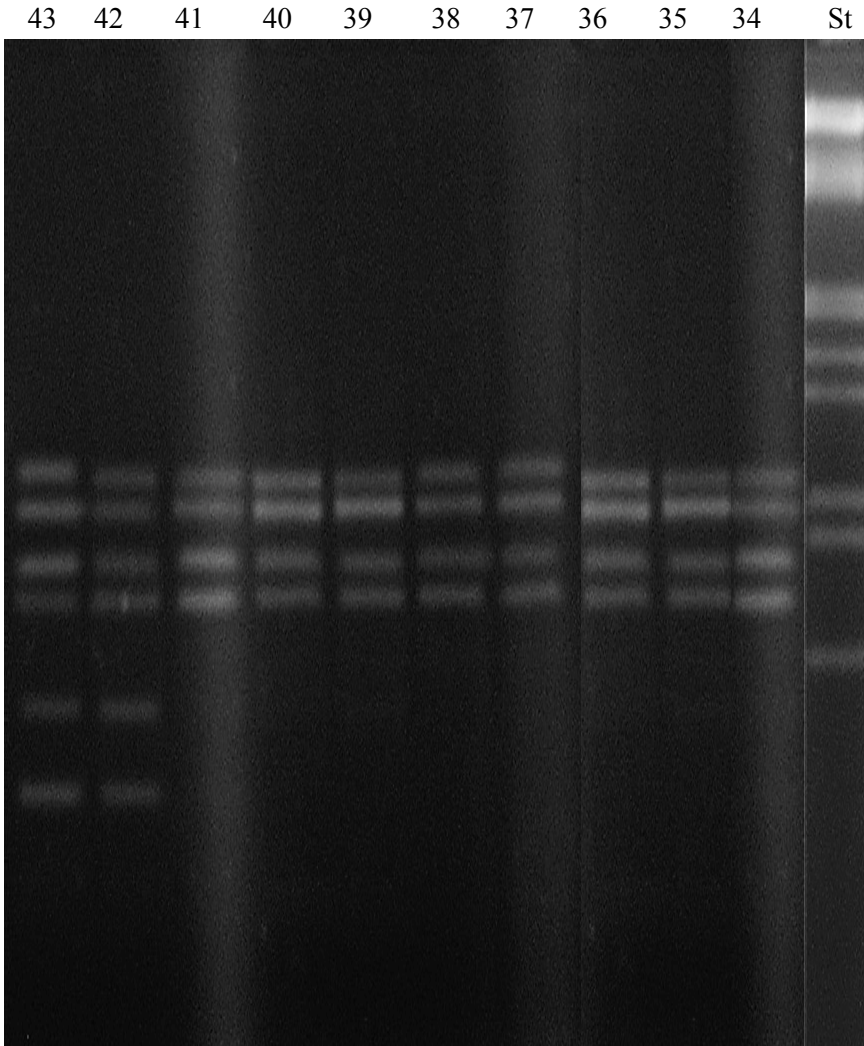
Şekil 4.72: OPAG-04 primerinin RAPD sonuçları II.

St: Standart markör, 14-23: Cumhuriyet-75x 02 F₂ genotipleri .



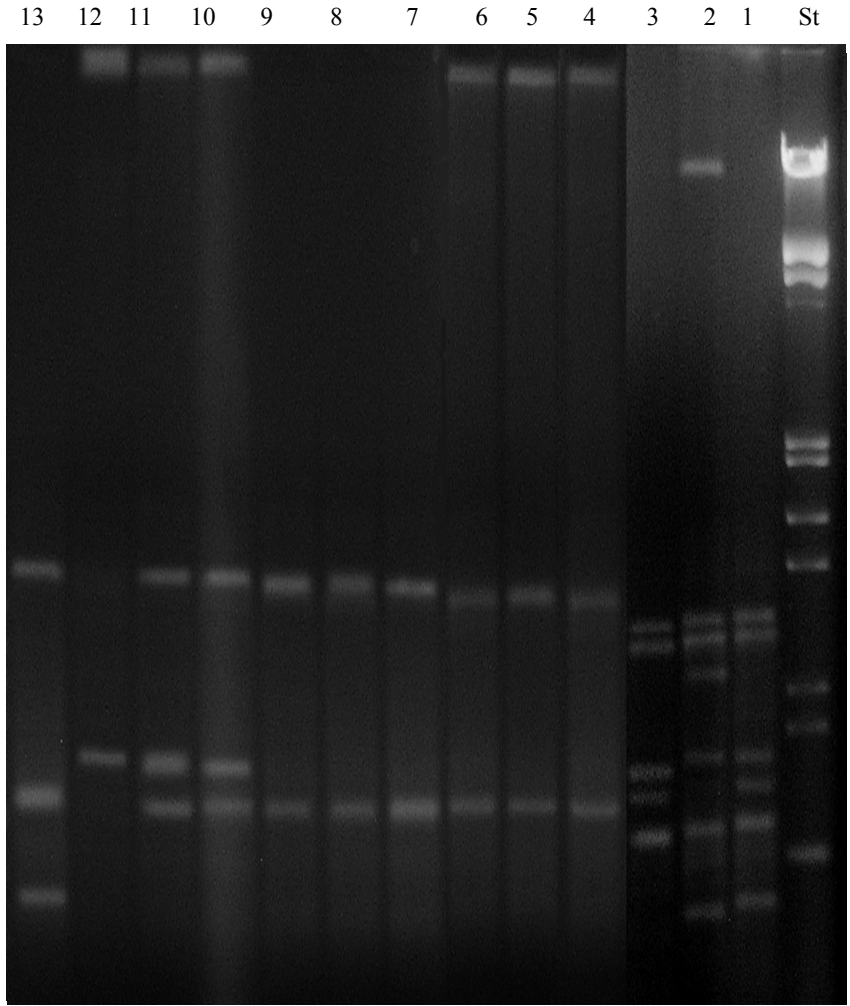
Şekil 4.73: OPAG-04 primerinin RAPD sonuçları III.

St: Standart markör, 24-33: Cumhuriyet-75x 02 F₂ genotipleri .



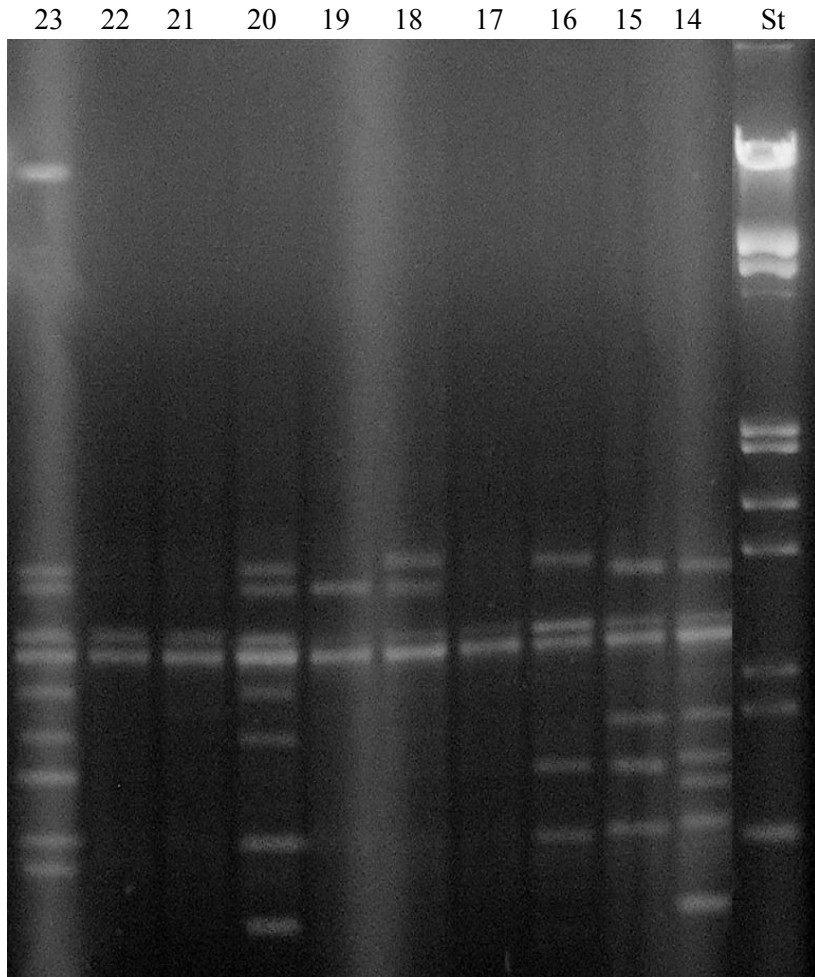
Şekil 4.74: OPAG-04 primerinin RAPD sonuçları IV.

St: Standart markör, 34-43: Cumhuriyet-75x 02 F₂ genotipleri .



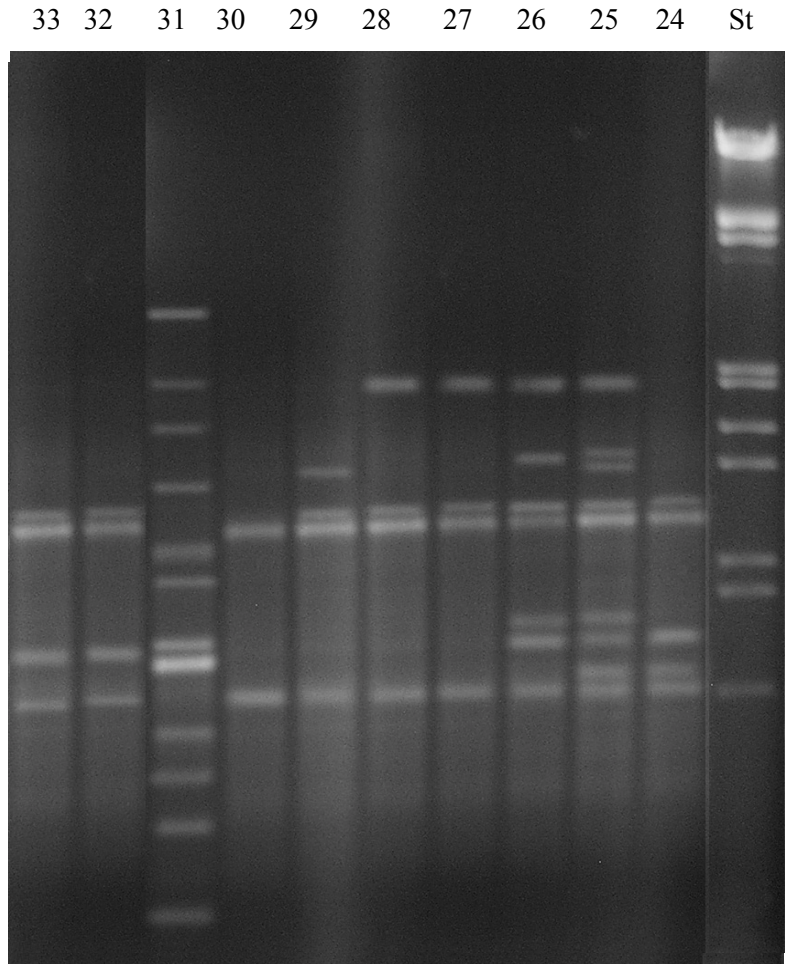
Şekil 4.75: OPAE-10 primerinin RAPD sonuçları I.

St: Standart markör, 1: Cumhuriyet-75, 2: 02 nolu hat, 3: Cumhuriyet-75x 02 F₁, 4-13: Cumhuriyet-75x 02 F₂ genotipleri .



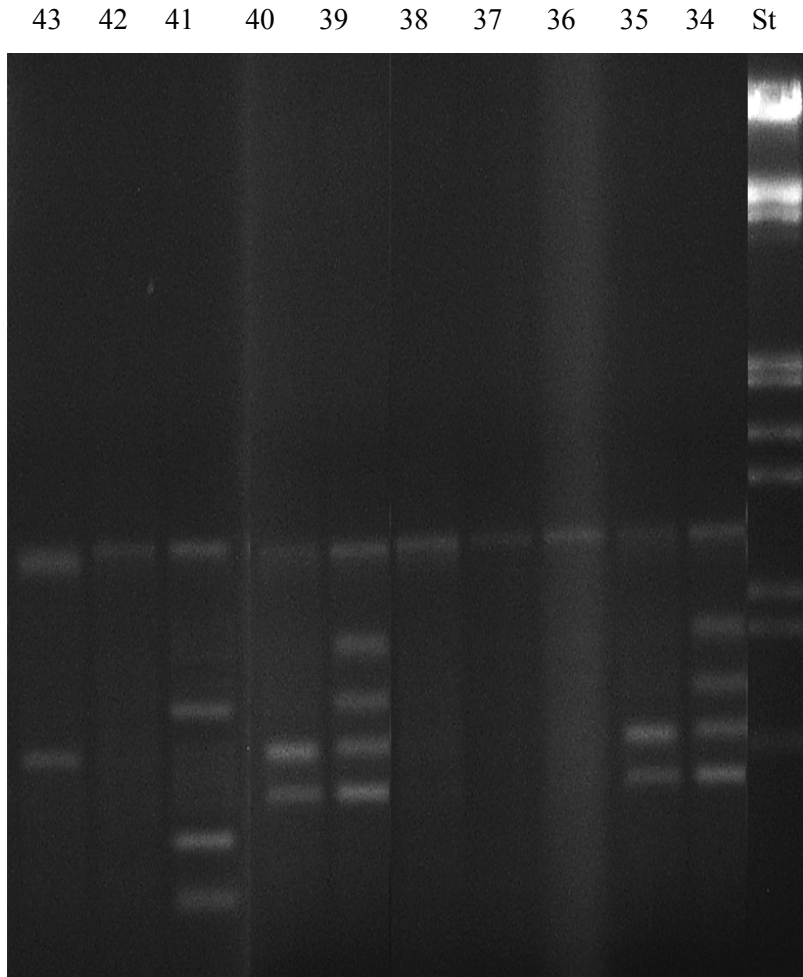
Şekil 4.76: OPAE-10 primerinin RAPD sonuçları II.

St: Standart markör, 14-23: Cumhuriyet-75x 02 F₂ genotipleri .



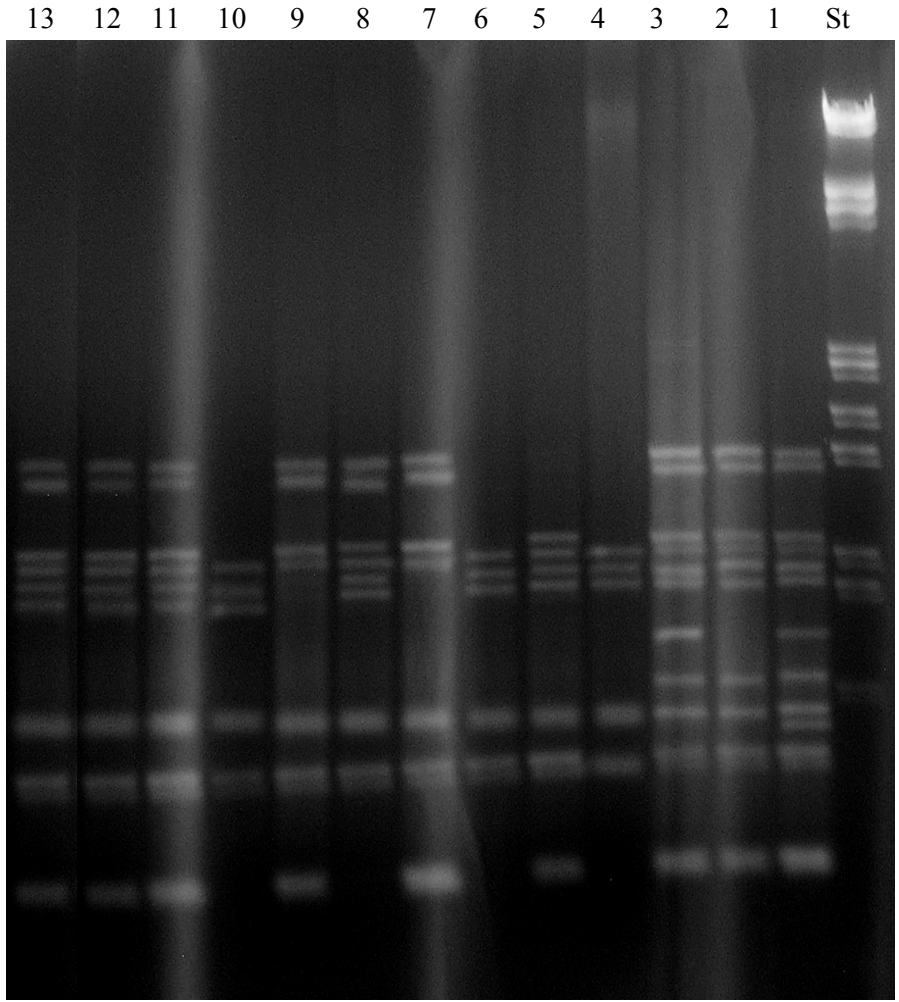
Şekil 4.77: OPAE-10 primerinin RAPD sonuçları III.

St: Standart markör, 24-33: Cumhuriyet-75x 02 F₂ genotipleri .



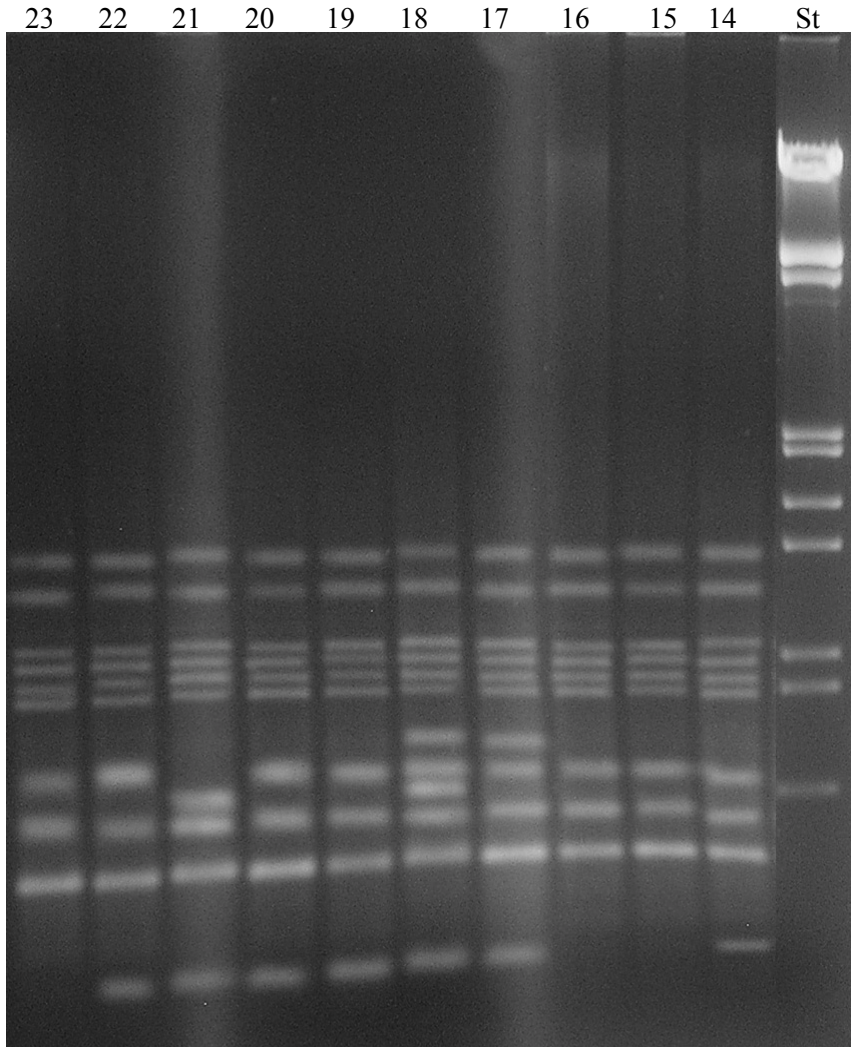
Şekil 4.78: OPAE-10 primerinin RAPD sonuçları IV.

St: Standart markör, 34-43: Cumhuriyet-75x 02 F₂ genotipleri .



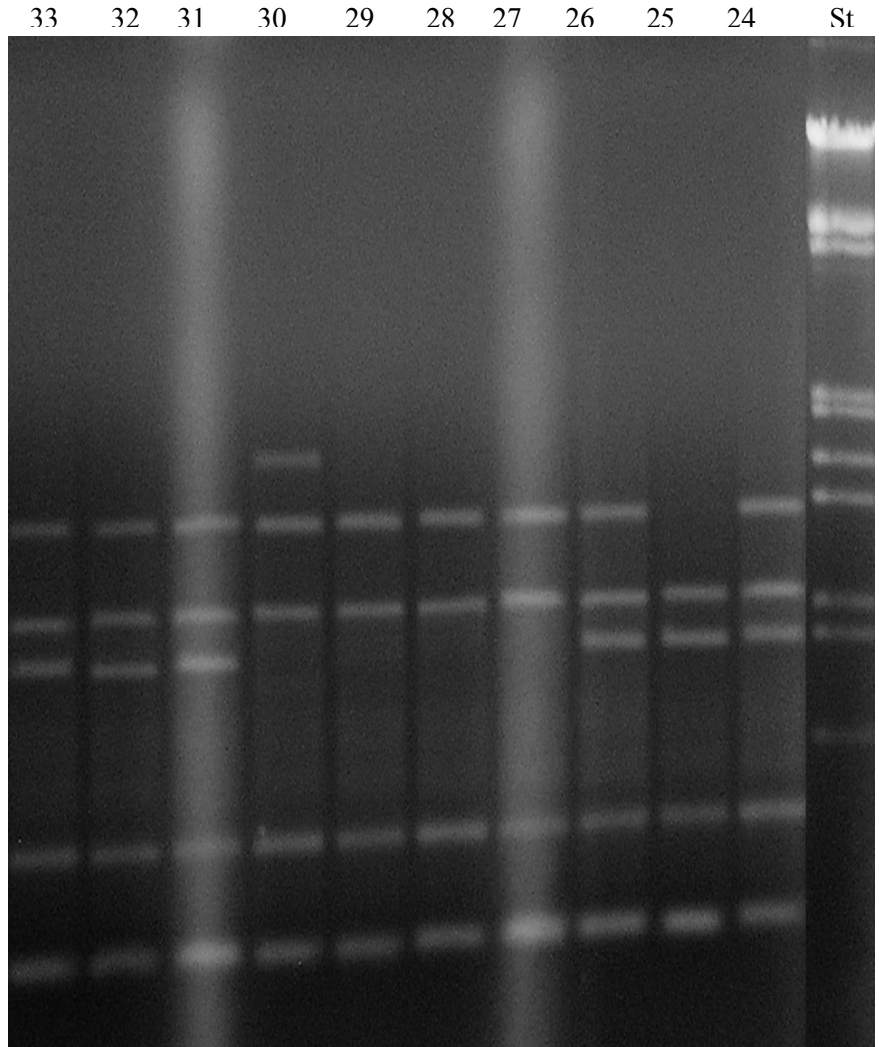
Şekil 4.79: OPAN-12 primerinin RAPD sonuçları I.

St: Standart markör, 1: Cumhuriyet-75, 2: 02 nolu hat, 3: Cumhuriyet-75x 02 F₁, 4-13: Cumhuriyet-75x 02 F₂ genotipleri .



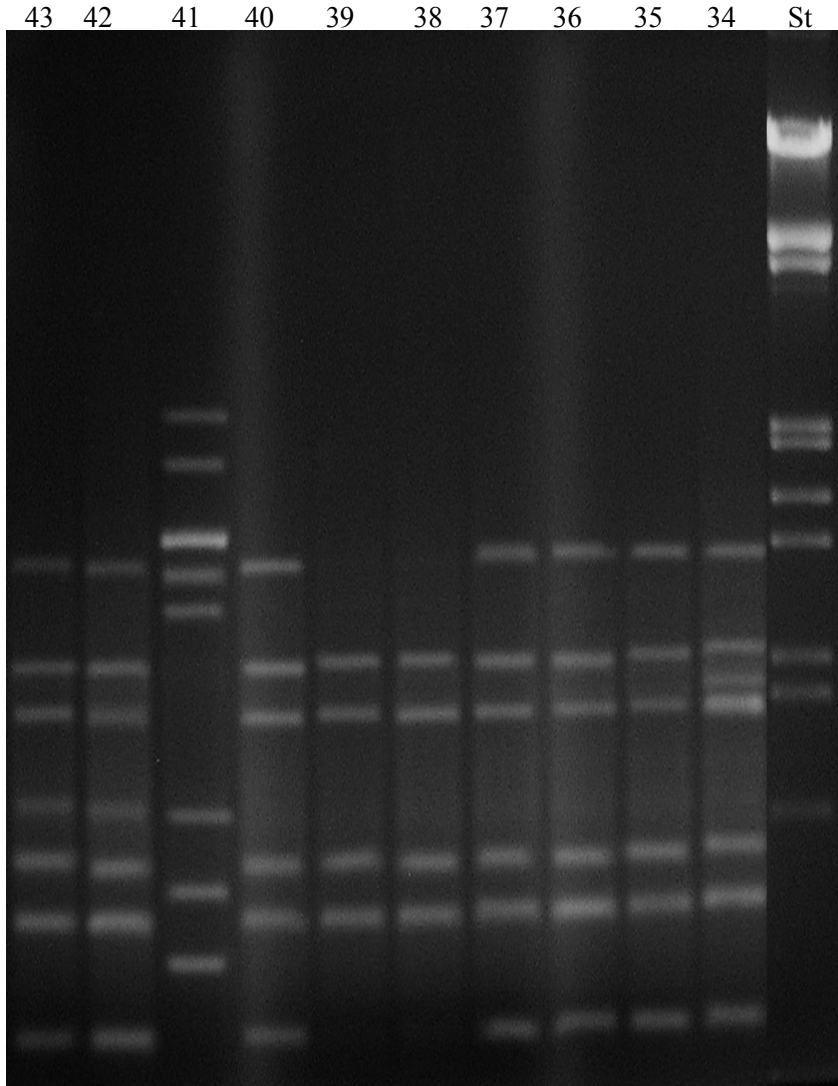
Şekil 4.80: OPAN-12 primerinin RAPD sonuçları II.

St: Standart markör, 14-23: Cumhuriyet-75x 02 F₂ genotipleri .



Şekil 4.81: OPAN-12 primerinin RAPD sonuçları III.

St: Standart markör, 24-33: Cumhuriyet-75x 02 F₂ genotipleri .

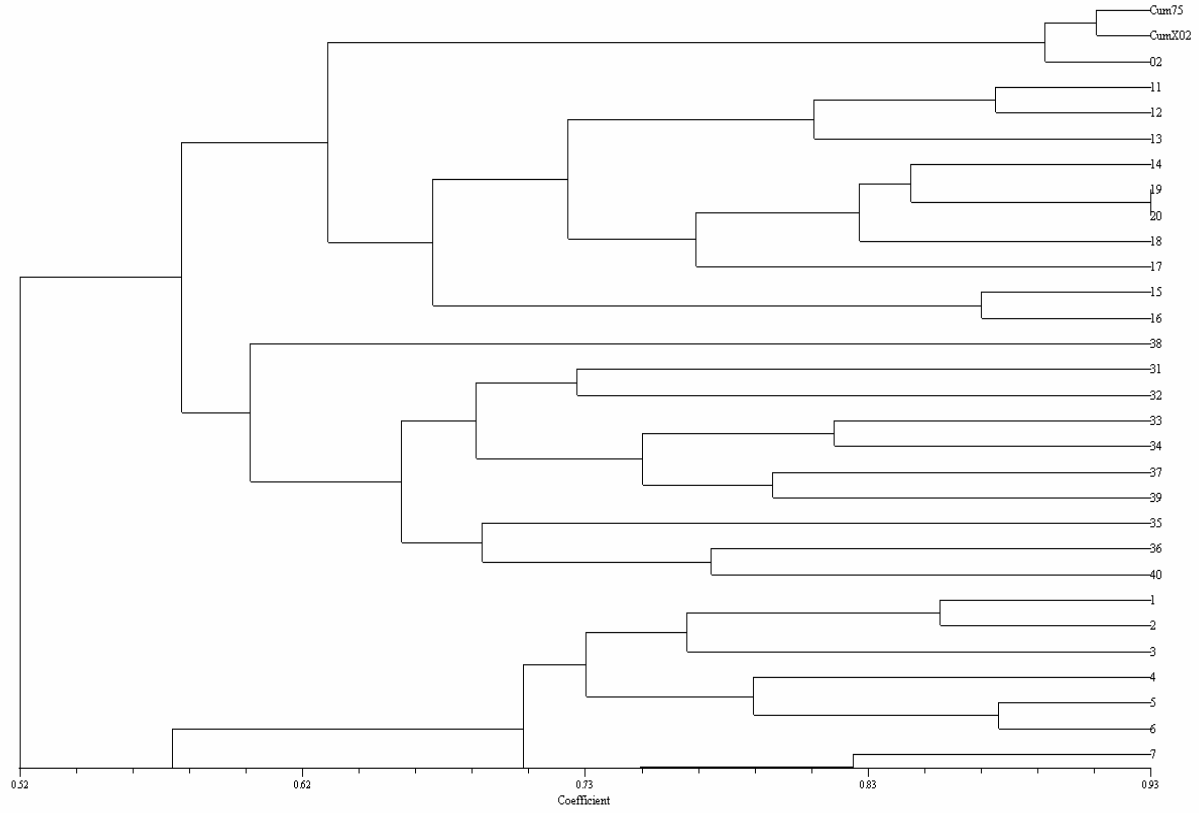


Şekil 4.82: OPAN-12 primerinin RAPD sonuçları IV.

St: Standart markör, 34-43: Cumhuriyet-75x 02 F₂ genotipleri .

Cumhuriyet-75 x 02 nolu hat kombinasyonunda ebeveyn, F_1 ve F_2 popülasyonunu içeren dendrogram Şekil 4.83’de verilmiştir. Dendrogram incelendiğinde genotiplerin başlıca 3 ana gruba ayrıldığı gözlenmektedir. Ebeveynlerden Cumhuriyet-75 ve donör olarak kullanılan 02 nolu dayanıklı hattın birinci grupta yer aldığı gözlenirken F_2 generasyonuna ait bitkilerin çoğunlukla 2. ana grup altında toplanmak koşuluyla 2 ve 3. ana gurupları oluşturduğu. Birinci ana grup altında toplanan alt guruplar incelendiğinde bu ana gurup içerisindeki nihayi alt grup ele alındığında ebeveynlerden Cumhuriyet-75 ile Cumhuriyet-75x02 F_1 melezinin donör olarak kullanılan 02 nolu dayanıklı hat’dan ayrı bir grup içerisinde oldukları görülmüştür. Ebeveynler arasındaki bu farklılık her ne kadar ana guruplar olarak değerlendirildiğinde göze çarpmıyor olsa da, daha detaylı bir ayrımlanmanın olduğu alt guruplar içerisinde belirgin bir şekilde ortaya çıkmıştır. RAPD yönteminde kodominant kalıtım gözlenememesine rağmen dayanıklılık genini taşıdığı bilinen 02 nolu hat ile duyarlı çeşit Cumhuriyet-75 arasındaki fark farklı alt guruplarda yer almalarından dolayı gözlenebilmiştir. Yine aynı şekilde F_1 generasyonu iki ebeveynin karışımını gösterdiği için iki ebeveyn arasında yer alması beklenir. Dendrogram incelendiğinde F_1 melezinin anaç olarak kullanılan Cumhuriyet-75 ile aynı grup içinde yer almasına rağmen donör olarak kullanılmış dayanıklılık genini taşıyan 02 nolu hat’ta en yakın grupta yer aldığı göze çarpmaktadır. F_2 popülasyonunu oluşturan bitkilerin ana guruplar bazında incelendiğinde ebeveynler ile aynı guruplar içerisinde yer almasının yanı sıra farklı gurupları da teşkil etmiş olmasının, popülasyonu

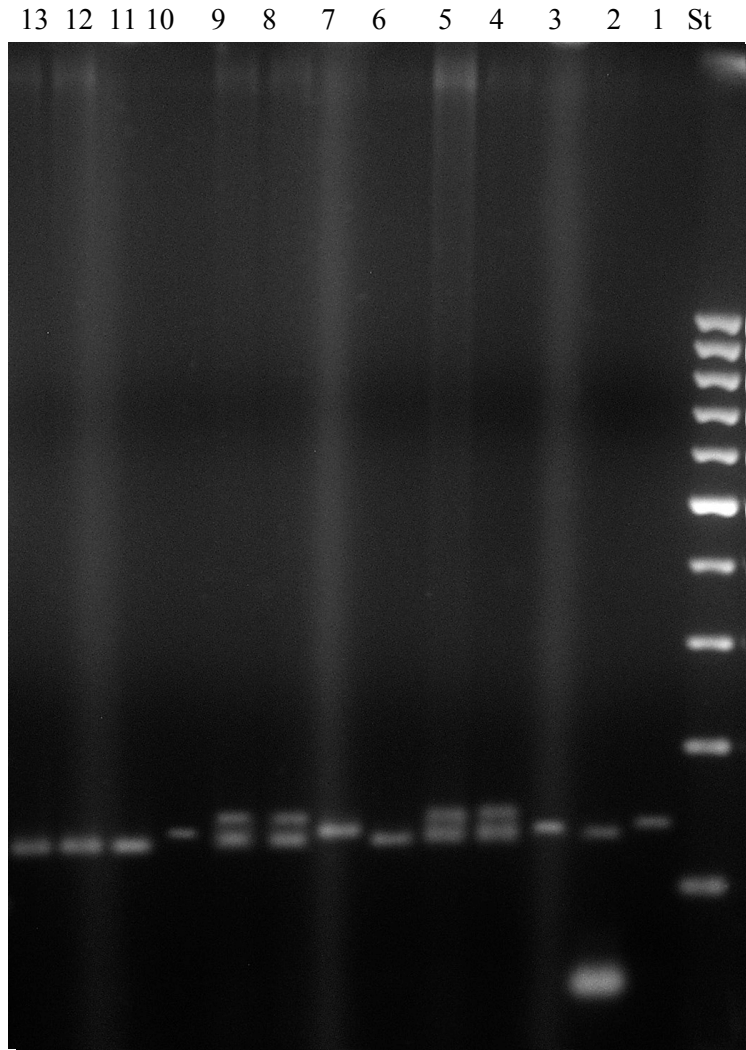
oluřturan F_2 bitkilerinde meydana gelen açılmadan kaynaklandığı dūřünülmektedir.



Şekil 4.83 Cumhuriyet-75 x 02 nolu hat kombinasyonunun F_1 ve F_2 genotiplerine ait RAPD dendrogramı.

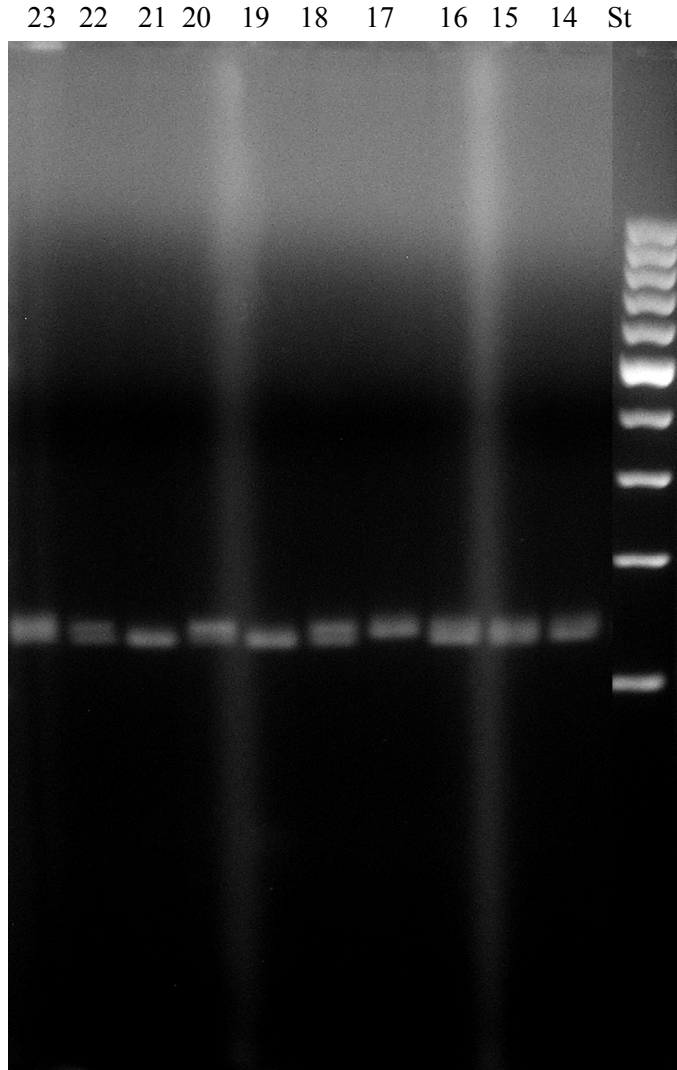
4.1.3. Cumhuriyet 75 X 02 nolu hat (Lee) kombinasyonunda F₁ ve F₂ generasyonunun SSR sonuçları

Cumhuriyet-75 x 02 nolu hat kombinasyonunda 5 SSR (F+R) primerine ilişkin ebeveyn, F₁ ve F₂ generasyonlarına ait sonuçlar sırası ile Şekil 4.84, 4.85, 4.86, 4.87, 4.88, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496 ve 497’de verilmiştir.



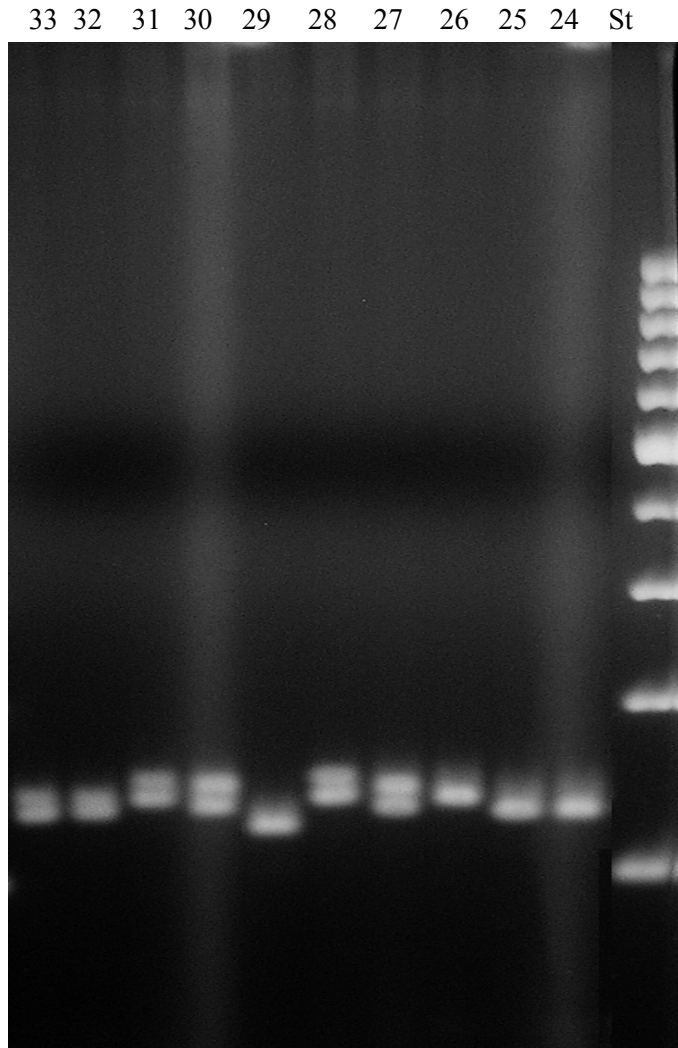
Şekil 4.84: WMC-24(F+R) primerinin sonuçları I.

St: Standart markör, 1: Cumhuriyet-75, 2: 02 nolu hat, 3: Cumhuriyet-75x 02 F₁, 4-13: Cumhuriyet-75x 02 F₂ genotipleri .



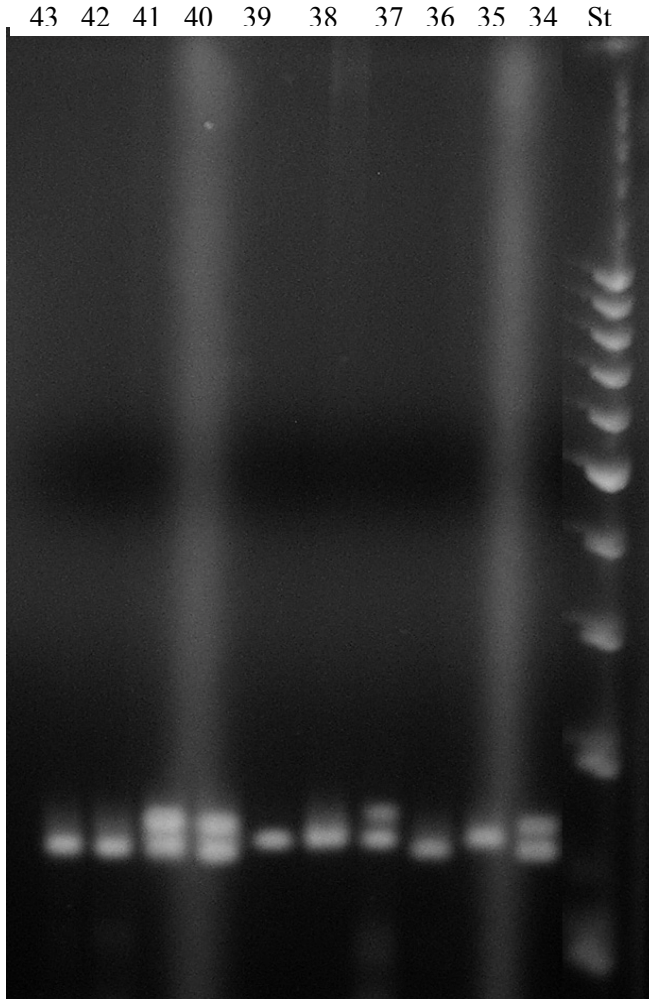
Şekil 4.85: WMC-24(F+R) primerinin sonuçları II.

St: Standart markör, 14-23: Cumhuriyet-75x 02 F₂ genotipleri .



Şekil 4.86: WMC-24(F+R) primerinin sonuçları III.

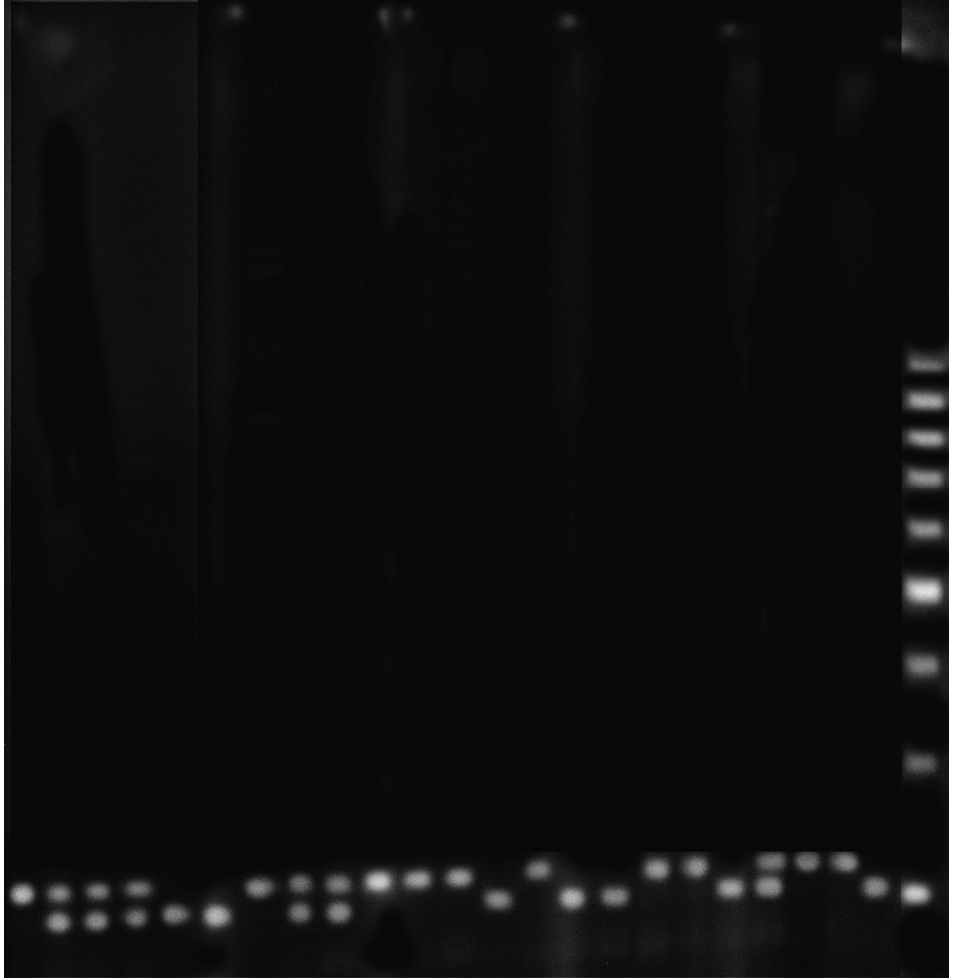
St: Standart markör, 24-33: Cumhuriyet-75x 02 F₂ genotipleri



Şekil 4.87: WMC-24(F+R) primerinin sonuçları IV.

St: Standart markör, 34-43: Cumhuriyet-75x 02 F₂ genotipleri

23 22 21 20 19 18 17 16 15 14 13 12 11 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1 St



Şekil 4.88: WMC-25(F+R) primerinin sonuçları I.

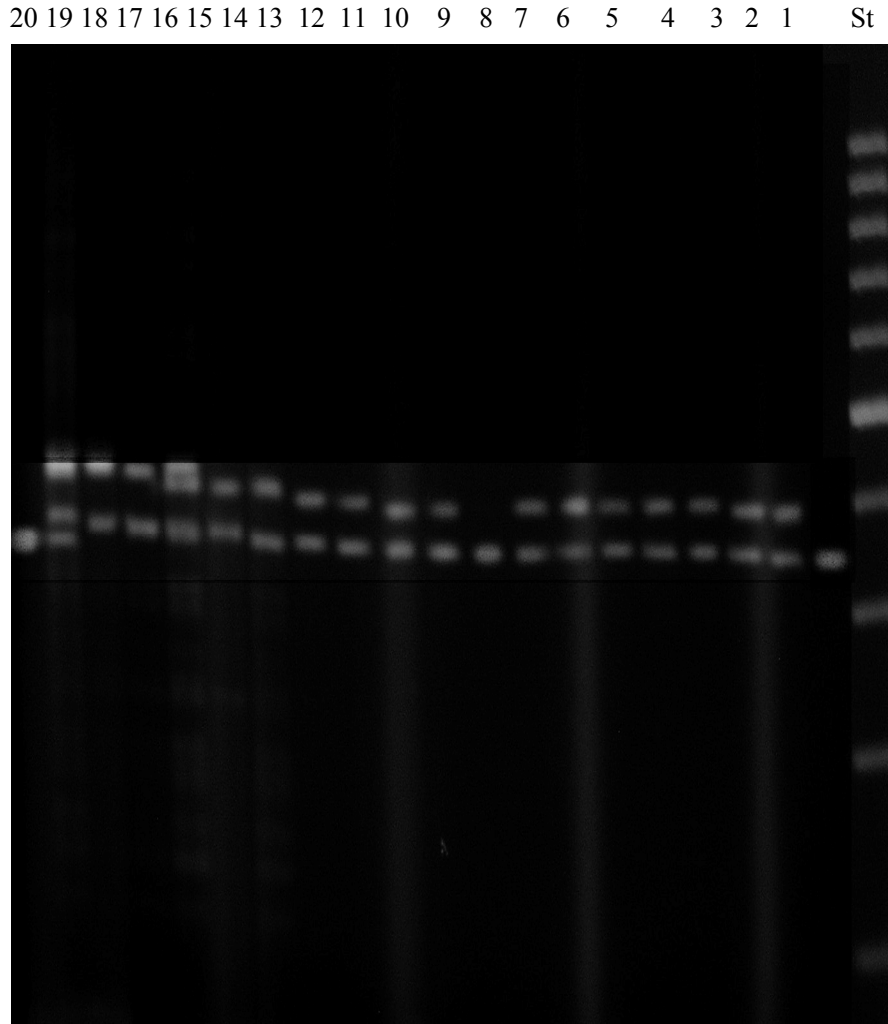
St: Standart markör, 1: Cumhuriyet-75, 2: 02 nolu hat, 3: Cumhuriyet-75x 02 F₁, 4-23: Cumhuriyet-75x 02 F₂ genotipleri

43 42 41 40 39 38 37 36 35 34 33 32 31 30 29 28 27 26 25 24 St



Şekil 4.89: WMC-25(F+R) primerinin sonuçları II.

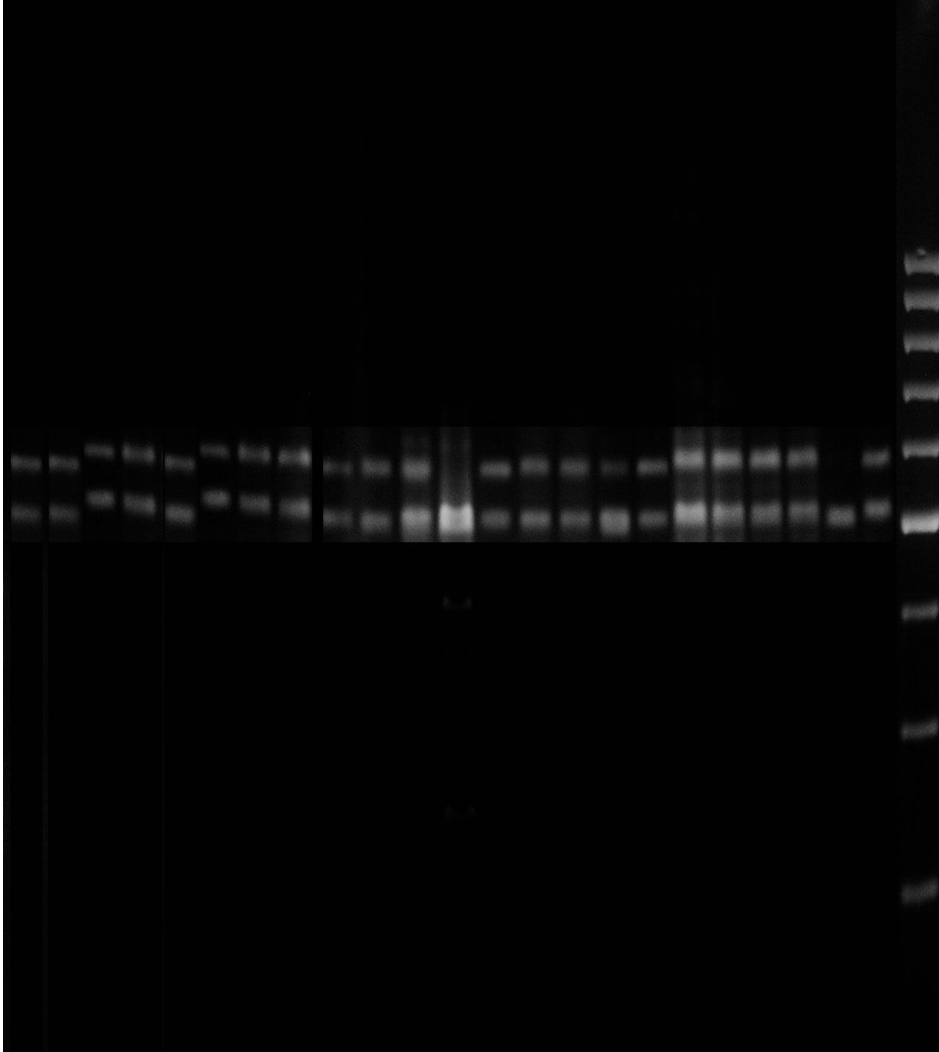
St: Standart markör 24-43: Cumhuriyet-75x 02 F₂ genotipleri



Şekil 4.90: WMC-27(F+R) primerinin sonuçları I.

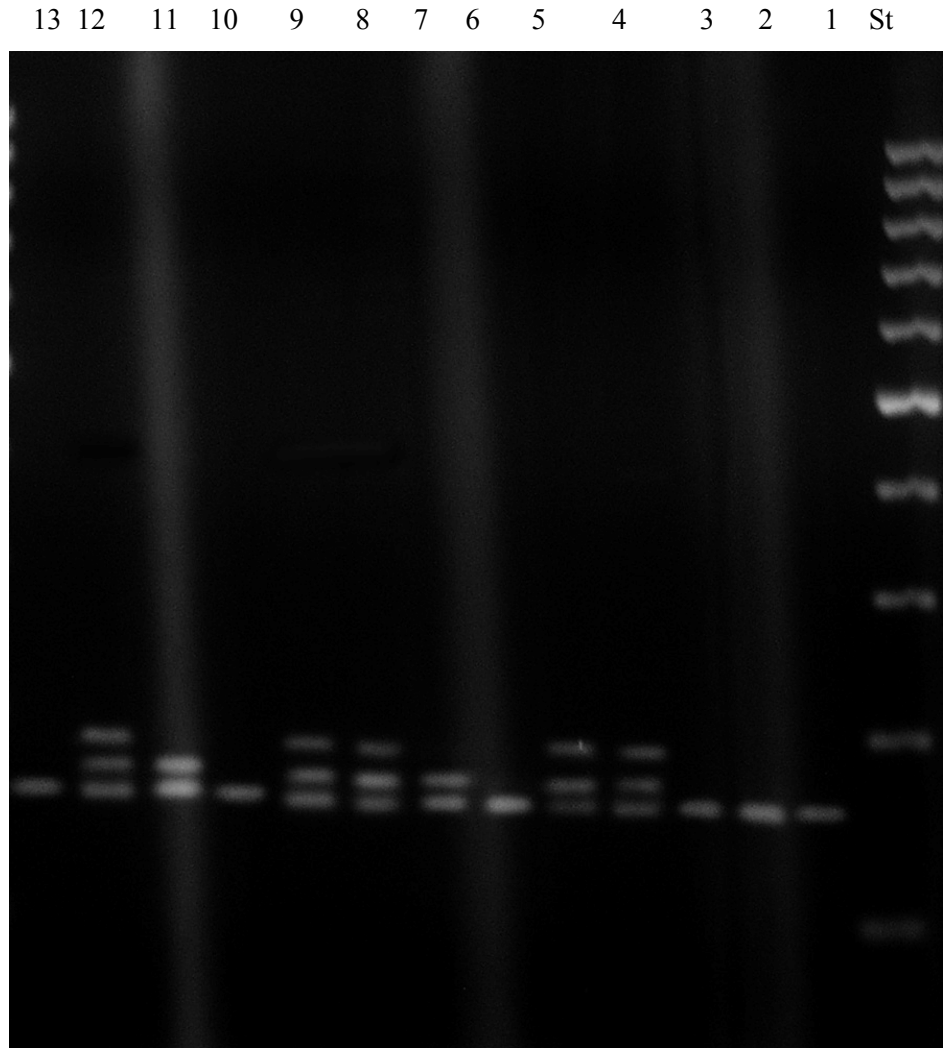
St: Standart markör, 1: Cumhuriyet-75, 2: 02 nolu hat, 3: Cumhuriyet-75x 02 F₁, 4-20: Cumhuriyet-75x 02 F₂ genotipleri

43 42 41 40 39 38 37 36 35 34 33 32 31 30 29 28 27 26 25 24 23 22 21 St



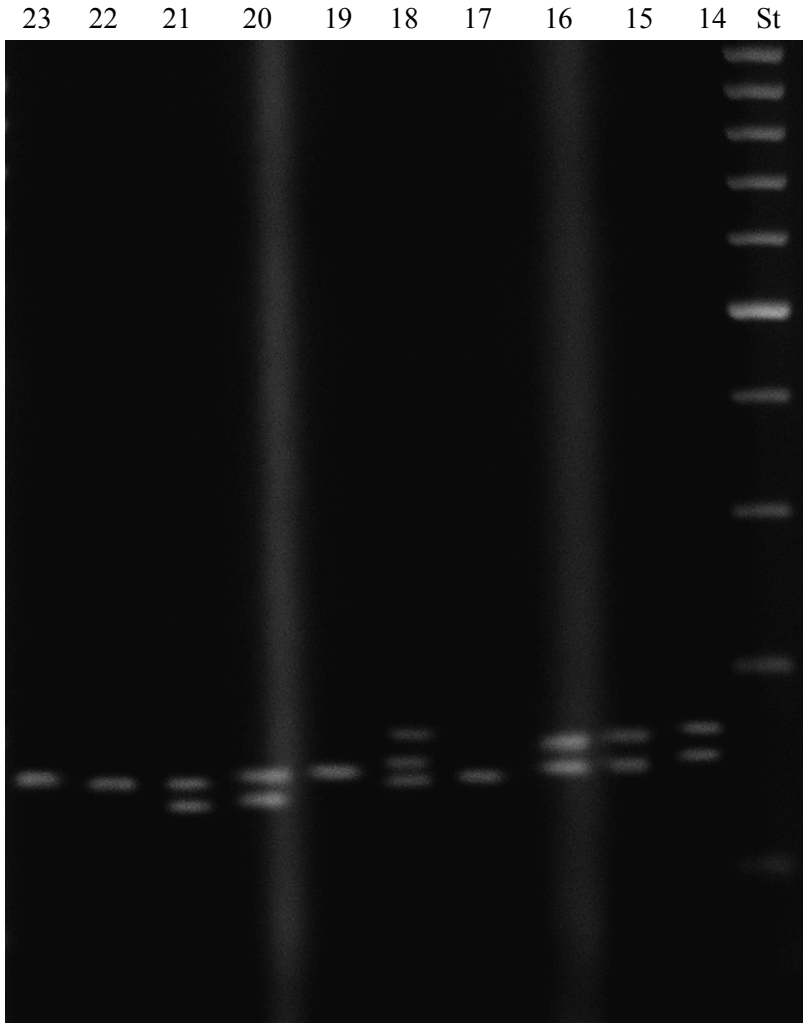
Şekil 4.91: WMC-27(F+R) primerinin sonuçları II.

St: Standart markör, 21-43: Cumhuriyet-75x 02 F₂ genotipleri



Şekil 4.92: WMC-41(F+R) primerinin sonuçları I.

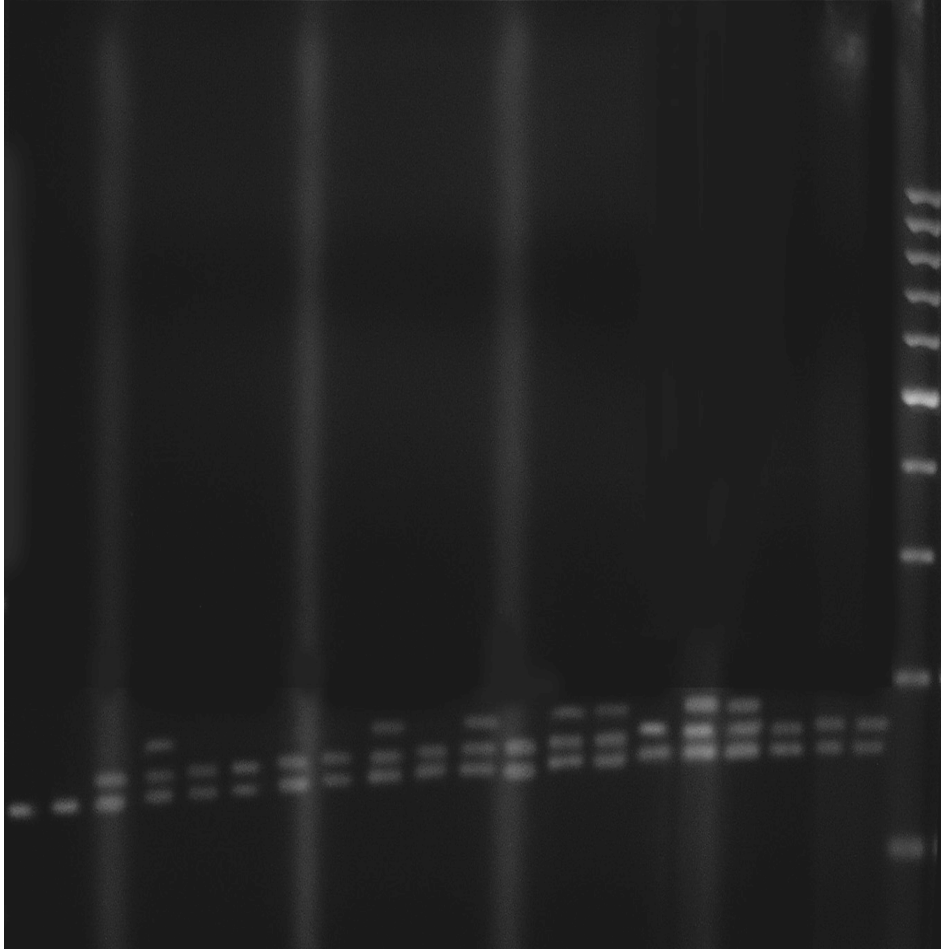
St: Standart markör, 1: Cumhuriyet-75, 2: 02 nolu hat, 3: Cumhuriyet-75x 02 F₁, 4-13: Cumhuriyet-75x 02 F₂ genotipleri



Şekil 4.93: WMC-41(F+R) primerinin sonuçları II.

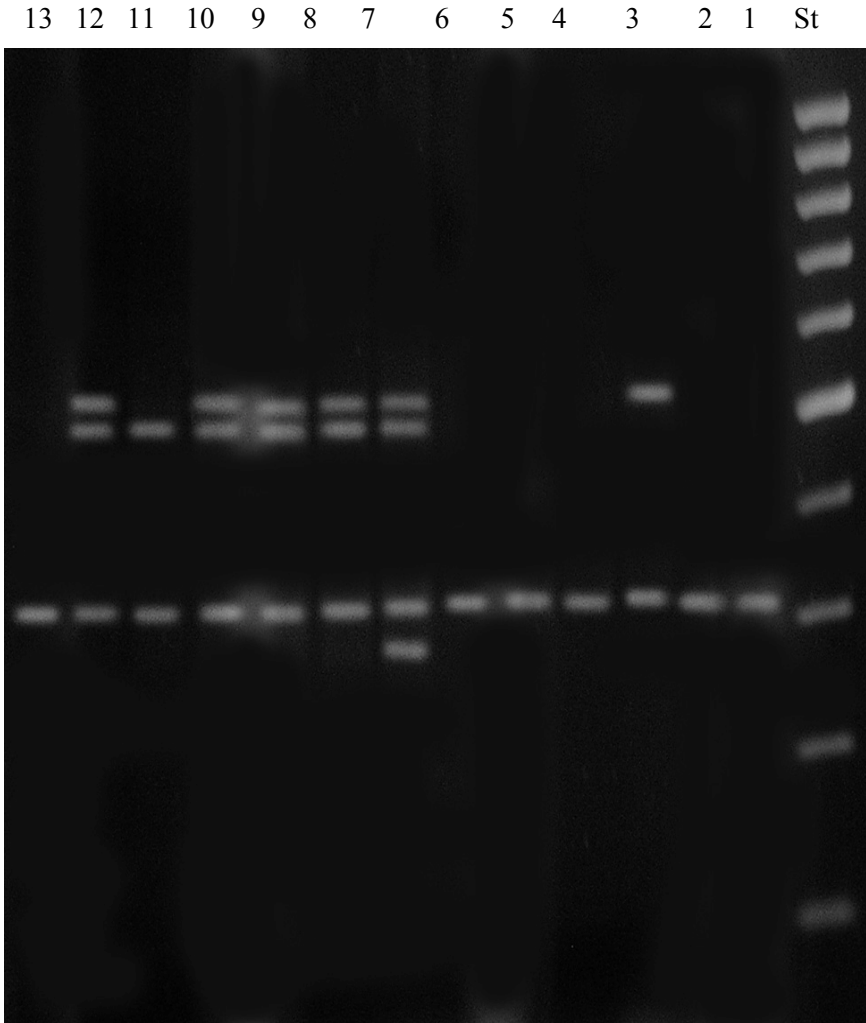
St: Standart markör, 14-23: Cumhuriyet-75x 02 F₂ genotipleri

43 42 41 40 39 38 37 36 35 34 33 32 31 30 29 28 27 26 25 24 St



Şekil 4.94: WMC-41(F+R) primerinin sonuçları III.

St: Standart markör, 24-43: Cumhuriyet-75x 02 F₂ genotipleri



Şekil 4.95: WMC-43(F+R) primerinin sonuçları I.

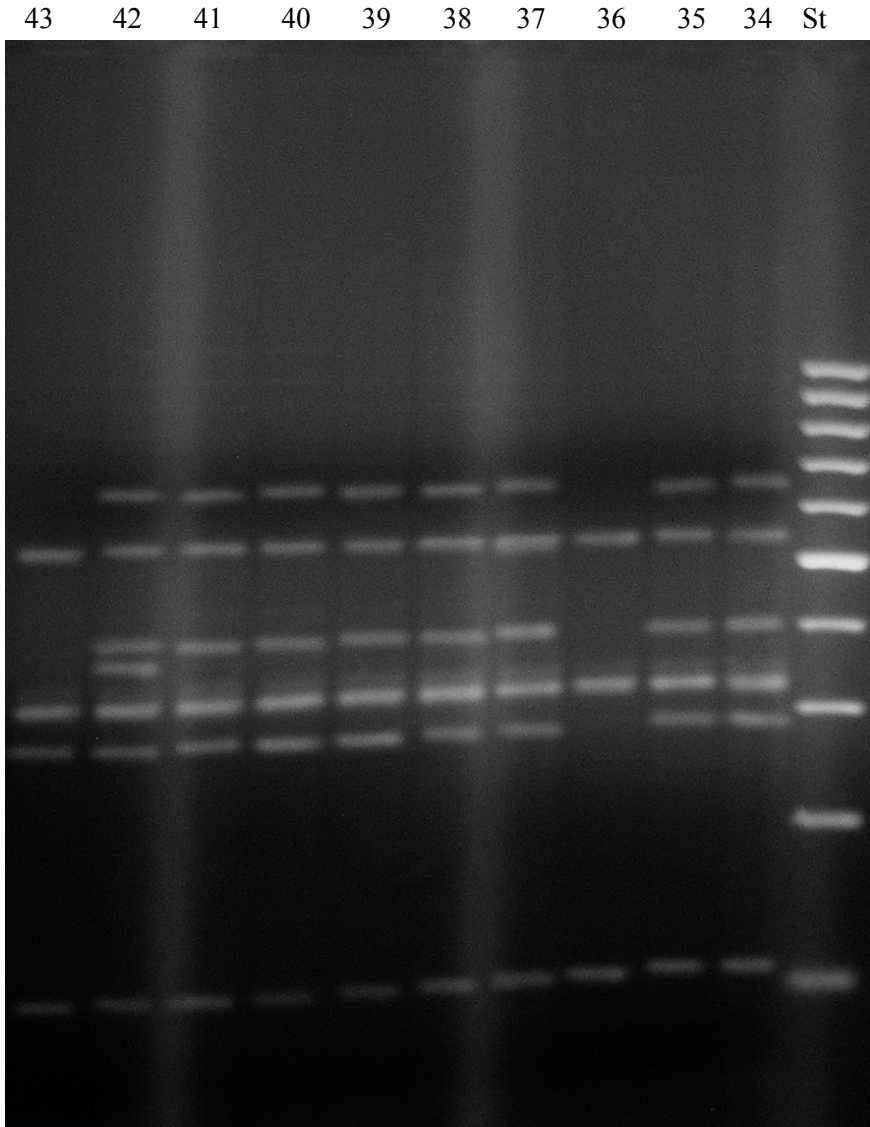
St: Standart markör, 1: Cumhuriyet-75, 2: 02 nolu hat, 3: Cumhuriyet-75x 02 F₁, 4-13: Cumhuriyet-75x 02 F₂ genotipleri

33 32 31 30 29 28 27 26 25 24 23 22 21 20 19 18 17 16 15 14 St



Şekil 4.96: WMC-43(F+R) primerinin sonuçları II.

St: Standart markör, 14-33: Cumhuriyet-75x 02 F₂ genotipleri

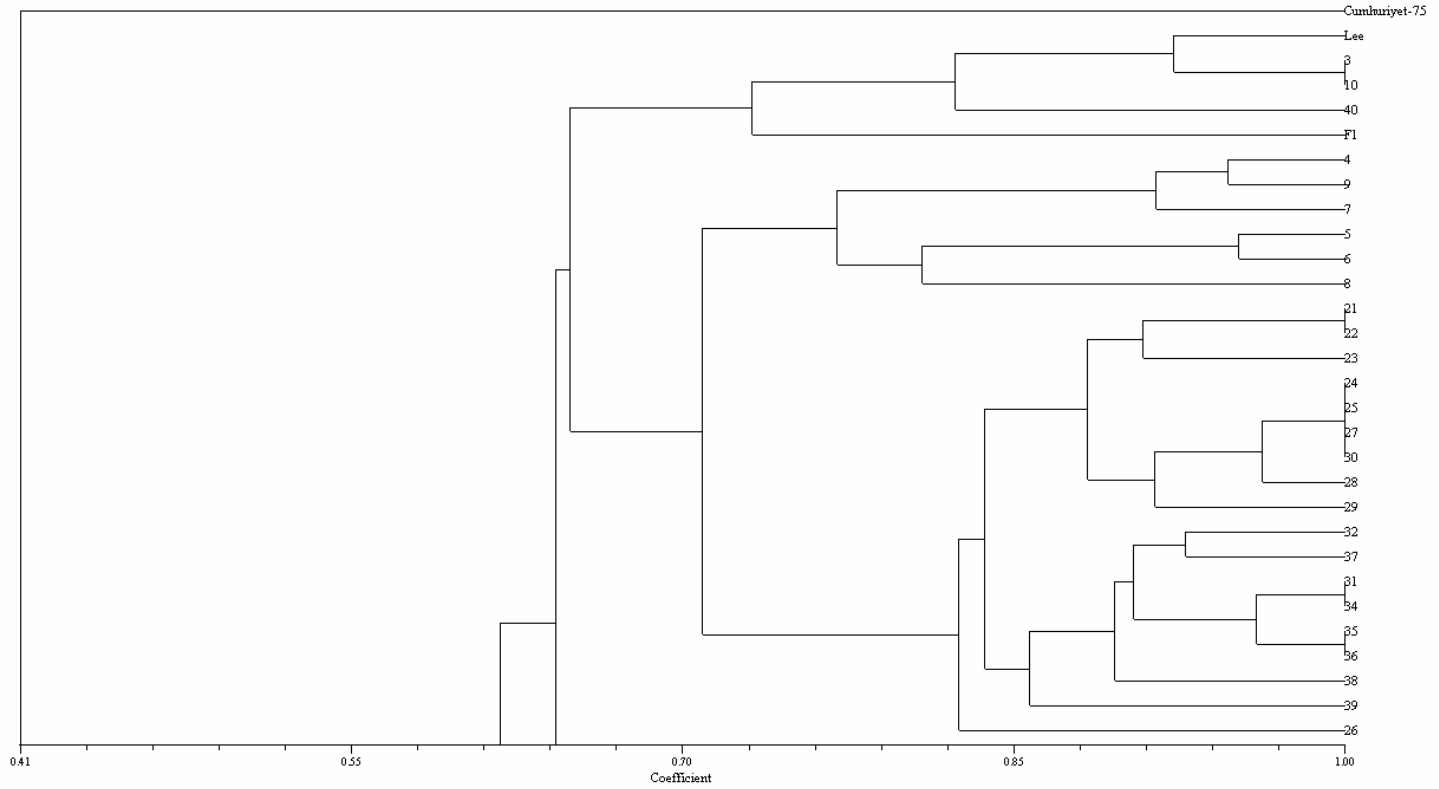


Şekil 4.97: WMC-43(F+R) primerinin sonuçları III.

St: Standart markör, 34-43: Cumhuriyet-75x 02 F₂ genotipleri

Cumhuriyet-75 x 02 nolu hat kombinasyonunda ebeveyn, F_1 ve F_2 popülasyonunu içeren dendrogram Şekil 4.98’de verilmiştir. Dendrogram incelendiğinde genotiplerin başlıca 2 ana gruba ayrıldığı gözlenmiştir. Ebeveynlerden Cumhuriyet-75 ve donör olarak kullanılan 02 nolu(Lee) dayanıklı tek gen hattın iki farklı grupta yer aldığı gözlenirken F_1 generasyonu bitkisinin anaç olarak kullanılan Cumhuriyet-75 çeşidinden ayrı grup içerisinde yer aldığı gözlenmiş, F_2 generasyonuna ait bitkilerin de 3 ayrı ana grup altında toplandığı görülmüştür

Birinci ana grup altında toplanan alt gruplar incelendiğinde Cumhuriyet-75x02 F_1 melezinin donör olarak kullanılan 02 nolu dayanıklı hat’ile aynı grup içerisinde oldukları görülmüştür. Ancak F_1 ve tozlayıcı olarak kullanılan 02 nolu Lee tek gen hattının aynı grup içerisinde yer alması ve ebeveynler arasındaki farklılığın ana gruplar bazında öncelikle göze çarpması RAPD ve SSR analizlerinin sonuçları arasındaki farklılığı ortaya koymuştur. SSR yönteminin RAPD marköründen farklı olarak kodominant kalıtım sergilemesi ve tekrarlanabilirliğinin yüksek olması öne çıkan bu farklılığın sebebi olarak düşünülebilmektedir.



Şekil 4.98 Cumhuriyet-75 x 02 nolu hat kombinasyonunun F₁ ve F₂ genotiplerine ait SSR dendrogramı

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Geniş bir adaptasyon yeteneğine sahip olması nedeniyle buğday insan beslenmesinde kullanılan kültür bitkileri arasında dünyada ekiliş ve üretim bakımından ilk sırada yer almaktadır. Besleme değeri, saklama ve işlenmesindeki kolaylıklar nedeniyle buğday bitkisi temel besin durumundadır.

Buğdayın en yaygın hastalığı olan pas türleri arasında, en önemli pas hastalığı sarı pastır ve epidemi yaptığı yıllarda büyük verim kayıplarına neden olmaktadır. Sarı pasla en etkin ve en ekonomik mücadele şekli dayanıklı çeşit kullanılmasıdır.

Bitki ıslahında hastalıklara dayanıklılık çalışmaları oldukça büyük bir öneme sahiptir. Moleküler markörler genetik çalışma materyalinin tanımı gibi kalitatif ve kantitatif karakterler için yapılacak markörlere dayalı seleksiyonda kullanım olarak oldukça etkin bir şekilde yer almaktadır. Genetik ve linkage haritalamalarında, çeşit tanımlamasında, F₁ hibrit tohumluklarının kontrolünde, genotipler arası genetik uzaklıkların ve çeşitliliğin belirlenmesinde moleküler markörlerden yararlanılmaktadır.

Ticari varyetelerde hastalığa dayanıklılığın sürekliliği ve arzu edilen seviyede başarılabilmesi için sağlam bir seleksiyon teknolojisinin kullanılabilirliği esastır. Tüm dünyada hastalığa dayanıklılığın kabul edilebilir seviyeleriyle genotipleri seçmek için hem doğal enfeksiyon hem de yapay düzenlenmiş salgın koşulları altında tarla değerlendirmeleri yapılmaktadır. Düşük pas tepkisine bağlı markör kullanımı, fenotipik seleksiyon için alternatiftir. Bunlar morfolojik markörleri, protein markörleri, DNA markörlerini ve hastalığa dayanıklı

genlere bağlı markörleri içine alır. Son zamanlarda pas hastalıkları için moleküler markörler geliştirilmektedir. Farklı markör geliştirme teknolojileri restriction fragment length polymorphism (RFLP), amplified fragment length polymorphism (AFLP), microsatellite/simple sequence repeat polymorphism (SSR) ve sequence characterised amplified regions (SCAR)'ları içermektedir (Bariana H. S. 2001).

Moleküler DNA markörleri ile yapılan linkage haritaları birçok kültür bitkisi için geliştirilmiş ve arzulanan genlerin doğrudan takibi ve seleksiyonu mümkün hale gelmiştir. Çevrenin etkisinden bağımsız olarak işleyen bu işlem genlerin kolayca takip edilebilen markörlere bağlantı durumları incelenerek yapılabilmektedir (Yıldırım ve Kandemir, 2001).

Bitki ıslahında marköre dayalı seleksiyonda kullanılan başlıca teknikler proteinler, izoenzimler, RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) ve SSR (Simple Sequence Repeat) markörleridir (Staub and Serquen, 1996).

Bu nedenle söz konusu bu çalışmada CIMMYT' den temin edilmiş sarı pas patotiplerine karşı taşıdığı dayanıklılık genleri bilinen Lee, Compair ve Carstens-V tek gen hatları ile yaygın olarak ekimi yapılan Seri82, Cumhuriyet75 ve Kaşifbey yerli çeşitleri arasında yapılan melez kombinasyonları ve bunları döllerinde dayanıklılık genlerinin belirlenmesine ilişkin moleküler markörler kullanılarak DNA analizlerinin gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır.

Ebeveynler ve elde edilen döl generasyonları dayanıklılık genleri bakımından analiz edilmiş ve ilerki moleküler markör kullanımıyla güçlendirilmiş mukavemet ıslahı çalışmalarına ışık tutacak nitelikte

analizler gerçekleştirilmiştir. Çalışmada ebeveyn olarak kullanılan duyarlı çeşitler ve tek gen hatlar ile bunlardan türetilmiş F1 ve F2 generasyonu bitkileri materyalinde yapılan RAPD analizlerinde ebeveynlerde 40 ve F1 ve F2 bitkilerinde ise kullanılan primerler arasından 10 RAPD primeri kullanılmış ve bu primerlerin vermiş olduğu değerlendirilebilir bantlar sonucunda polimorfizm gözlenmiştir. Yapılan RAPD analizi sonucunda ebeveynlerde toplam 980, F1 ve F2 döllerinde ise toplam 1695 bant değerlendirmeye tabi tutulmuş, ebeveynlerde 914 F1 ve F2 döllerinde ise 1690 polimorfik bant analiz edilmiştir. Primerler değerlendirmeye alındığında; en fazla bant veren primer OPA-15, en az bant veren primer ise OPB-12 primeri olarak gözlenmiştir. En fazla polimorfik bant veren primer OPC-05, en fazla monomorfik bant veren primer OPA-15 olarak belirlenmiştir. Ebeveynler üzerinde yapılan RAPD analizleri sonucunda dayanıklı tek gen hatlar ile duyarlı çeşitler arasındaki genetik farklılık yapılan cluster analiziyle ortaya konmuştur. Çalışmada yapılmış melezleme kombinasyonları arasından seçilen Cumhuriyet-75 x 02 nolu (Lee) tek gen hat kombinasyonunun F1 ve F2 döllerinde incelenen RAPD analizlerinde OPAE-10, OPB-01, OPB-03, OPB-05, OPB-11, OPC-07, OPD-12, OPG-02, OPAG-04, ve OPAN-12 primerleri değerlendirilmiş, genotiplerin başlıca 3 ana gruba ayrıldığı gözlenmiştir. Dayanıklılık genini taşıdığı bilinen 02 nolu hat ile duyarlı çeşit Cumhuriyet-75'in farklı alt gruplarda yer aldığı gözlenmiştir. F₁ melezi anaç olarak kullanılan Cumhuriyet-75 ile aynı grup içinde yer almış, ancak aynı zamanda baba olarak kullanılmış olan dayanıklı 02 nolu (Lee) tek gen hat'tına en yakın grupta yer almıştır.

Çalışmanın SSR analizleri seçilen Cumhuriyet-75 x 02 nolu (Lee) tek gen hat kombinasyonunun F1 ve F2 döllerinde yapılmış, 5 adet SSR primeri (forward + Reverse) (WMC-24-F, WMC-24-R, WMC-25-F, WMC-25-R, WMC-27-F, WMC-27-R, WMC-41-F, WMC-41-R, WMC47-F ve WMC47-R) kullanılmıştır. Toplam 441 bant değerlendirmeye tabi tutulmuş, en fazla bant veren primer WMC-43, en az bant veren primer ise WMC-25 primeri olarak gözlenmiştir .

Özet olarak PCR a dayalı bir yöntem olan SSR markörleri genellikle ko-dominant kalıtım gösterirler ve RAPD markörleriyle kıyaslandıklarında stabiliteleri mükemmellik arz etmektedir. Bunun ötesinde mikrosatelit için kullanılan PCR yöntemi diğer ko-dominant kalıtım gösteren moleküler markörler ile kıyaslandığında ise daha kolay, daha hızlı, daha ucuz ve daha az DNA ya ihtiyaç göstermektedir.

Çalışma materyali olarak kullanılan ticari çeşitler ve donör olarak kullanılan dayanıklı tek gen hatlar DNA markörleri bakımından incelenmiştir. Pas inokülasyonlarından beklenen başarı elde edilememiş olması sebebiyle de çeşitler arasında dayanıklılık genini belirleyici görev üstlenebilecek bir markör net olarak belirlenememiştir. Ancak çalışma, kullanılan genetik markörlerin kıyaslanması açısından faydalı olmanın yanısıra modern ıslah çalışmalarında moleküler markörlerin kullanımının sağlıklı sonuçlar elde edebilmek açısından önemi ortaya konmuş, diğer taraftan yapılacak olan dayanıklılık ıslahı çalışmalarında kullanılacak olan moleküler markör yöntemlerinin gerekliliği ve faydaları vurgulanmaya çalışılmıştır. Ayrıca çalışma ileriki zamanlarda sonraki generasyonlar üzerinden devam ettirilebilir olması ve yapılacak olan sera koşulları altındaki inokülasyon çalışmaları ve fenotipik gözlemlerin de

eklenmesiyle birlikte sarı pas'a dayanıklılık markörünün belirlenebilmesi amacına yönelik olarak da ayrı bir önem arz etmektedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

Akçalı, R.R., 2005, *Triticum durum* ile *Triticum dicoccoides* Melezlerinde Genetik Analizler Ve Moleküler Markörler Üzerinde Bir Araştırma, Doktora Tezi, 155s, Bornova-İZMİR.

Arnholdt-Schmitt, B., 2000, RAPD analysis:a method to investigate aspects of the reproductive biology of *Hypericum perforatum* L., *Theor. Appl. Genet.*, 100:906-911.

Aykut, F., 2007, Buğdayda Kahverengi Pasa Dayanıklılık Genleri ile İlgili Moleküler Markörler Üzerinde Araştırmalar, Doktora Tezi, 213s, Bornova-İZMİR.

Bariana H.S., 2001, Marker-Assisted selection for rust resistance in wheat in Australia: Meeting the challenge of yellow rust in cereal crops: Proceedings of the first regional conference on yellow rust in the central and west Asia and North Africa region, 8-14 may , Karaj, Iran.

Bhutta, W.M., Akhtar, J., Ibrahim, M., and Shahzad, A., 2005, Genetic Variation Between Pakistani Wheat (*Triticum aestivum* L.) Genotypes as Revealed by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers, *South African Journal of Botany* 72 280-283.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

Brunell, M.S., Lukaszewski, A.J. and Whitkus, R., 1999, Development of arm specific RAPD markers for rye chromosome 2R in wheat, *Crop Science*, 39:1702-1706.

Boukhatem, N., Baret, P.V., Mingot, D. and Jacquemin, J.M., 2002, Quantitative Trait Loci for Resistance Against Yellow Rust in Two Wheat-derived Recombinant Inbred Line Populations, *Theor. Appl. Genet.*, 104:111–118.

Cao, W., Scoles, G., Hucl, P. and Chibbar, R.N., 1999, The use of RAPD analysis to classify Triticum accessions, *Theor. Appl. Genet.*, 98:602-607.

Chague, V., Fahima, Dahan, T.A., Sun, G.L., Korol, A.B., Ronin, Y.I., Grama, A., Röder, M.S. and Nevo, E., 1999, Isolation of Microsatellite and RAPD markers Flanking the Yr15 Gene of Wheat Using NILs and Bulk Segregant Analysis, *Genome* 42:1050-1056.

Çölkesen, M., 1995, Harran ovasında buğday tarımı ve sorunları üzerine yapılan araştırma ve gözlemler, Harran Üniversitesi, Zir.Fak.Der., 1(1): 117-131.

Demir, İ., 1993, Mukavemet ıslahı, lisansüstü ders notları, Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü, Bornova İzmir.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

Demir, İ., Yüce, S., Bilgen, G., Tanyolaç, B. ve Akçalı Can, R., 1999a, Arpa, buğday ve mısır çeşitleri ve biber hatlarının RAPD markörleri ile tanımlanması üzerine bir araştırma, E.Ü. Araştırma Fonu Projesi, Proje No:98-ZRF/018/1, E.Ü.Z.F. Tarla Bitkileri Bölümü, Bornova/İzmir, 29s

Demir, İ., Yüce, S., Bilgen, G., Tanyolaç, B. ve Oğuz, İ., 1999b, Bazı genotiplerin tanımlanmasında DNA parmak izlerinin kullanılması üzerine araştırmalar, DPT Projesi, Proje No:97-DPT-06, E.Ü.Z.F. Tarla Bitkileri Bölümü, Bornova/İzmir, 34s

Demir, İ. ve İ. Turgut, 1999, Genel Bitki Islahı, E.Ü.Z.F. Yayınları No:496, Pp: 451. Bornova- İzmir.

De Bustos, A., Casanova, C., Soler, C. and Jouve, N., 1998, RAPD variation in wild populations of four species of the genus *Hordeum* (Poaceae), *Theor. Appl. Genet.*, 96:101-111.

Doğrar, N. ve Akkaya, M.S., 2001, Optimization of PCR Amplification of Wheat Simple Sequence Repeat DNA Markers Turk J Biol. 25 (2001) 153-158 TÜBİTAK

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

Doyle J.J. and Doyle J.L., 1987, A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissues, *Phytochemical Bulletin*, 19(1):11-15.

D'Ovidio, R., Tanzarella, O.A. and Porceddu, E., 1991, Cloning and sequencing of a PCR amplified gamma-gliadin gene from durum wheat (*Triticum turgidum* (L.) Thell. *Conv. durum* (Desf.) MK.), *Plant Science*, 75 229-236.

Fahima, T., Röder, M.S., Grama A. and Nevo, E., 1998, Microsatellite DNA Polymorphism Divergence in *Triticum dicoccoides* Accessions Highly Resistant to Yellow Rust. *Theor. Appl. Genet.*, 96: 187-195.

Fahima, T., Sun, G.L., Beharav, A., Krugman, T., Beiles, A. and Nevo, E., 1999, RAPD polymorphism of wild emmer wheat populations, *Triticum dicoccoides*, in Israel, *Theor. Appl. Genet.*, 98:434-447.

Fuentes, J.L., Escobar, F., Alvarez, A., Gallego, G., Dugue, M.C., Ferrer, M., Deus, J.E. and Tohme, J.M., 1999, Analyses of genetic diversity in Cuban rice varieties using isozyme, RAPD and AFLP markers, *Euphytica*, 109:107-115.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

Gold, J., Harder, D., Townley-Smith, F., Aung T. and Procunier, J., 1999, Development of a Molecular Marker for Rust Resistance Genes *Sr39* and *Lr35* in Wheat Breeding Lines, *EJB Electronic Journal of Biotechnology* Vol:2, No:1, Issue of April 15.

Gupta, R.B., Paul, J.G., Cornish, G.B., Palmer, G.A., Bekes, F., and Rathjen, A.J., 1994, Allelic variation at glutenin subunit and gliadin loci, *Glu-1*, *Glu-3* and *Gli-1*, of common wheats. I. Its additive and interaction effects on dough properties *J. Cereal Sci.* 19:9-17.

Hu, X.Y., Ohm, H.W. and Dweikat, I., 1997, Identification of RAPD markers linked to the gene *PM1* for resistance to powdery mildew in wheat, *Theor. Appl. Genet.*, 94:832-840.

Imtiaz, M., Ahmad, M., Cromey, M.G., Griffin, W.B. and Hampton, J.G., 2004, Detection of Molecular Markers Linked to the Durable Adult Plant Stripe Rust Resistance Gene *Yr18* in Bread Wheat (*Triticum aestivum* L.), *Plant Breeding* 123, 401-404.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

Johnson, R., 2001, “Prospects for Achieving Durable Resistance to Yellow Rust in Wheat in the 21st Century”, Meeting the Challenge of Yellow Rust in Cereal Crops. Proceedings of the First Regional Conference On Yellow Rust In The Central And West Asia And North Africa Region, 8-14 May Karaj.Iran

Joshi, C.P. and Nguyen, H.T., 1993a, RAPD (random amplified polymorphic DNA) analysis based intervarietal genetic relationships among hexaploid wheats, *Plant Science* 93: 95-103p.

Joshi, C.P. and Nguyen, H.T., 1993b, Application of the random amplified polymorphic DNA technique for the detection of polymorphism among wild and cultivated tetraploid wheats, *Genome*, 36: 602-609p.

Jones, N., Ougham, H. and Thomas, H., 1997, Markers and mapping:we are all geneticists now, *New Phytol.*, 137:165-177.
<http://www.genfys.slu.se>

Kazan, K. Ve Gürel, E., 2001 Hastalıklara dayanıklılığın artırılması, 261-287, Bitki biyoteknolojisi II. Genetik mühendisliği ve uygulamaları, S.Özcan, E.Gürel ve M.Babaoğlu (Derl.), Selçuk Üniversitesi Yayınları, Konya, 456s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

Kelly, J.D. and Miklas, P.N., 1998, The rol of RAPD markers in breeding for disease resistance in common bean, *Molecular Breeding*, 4:1-11.

Kınacı, E., 1992, Tahıl hastalıkları metodları kılavuzu, Milletler arası kışlık hububat araştırma merkezi müdürlüğü, Konya

Komatsuda, T., Kawasaki, S., Nakamura, I., Takaiwa, F., Taguchi Shiobara, F. and Oka, S., 1997, Identification of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers linked to the ν locus in barley, *Hordeum vulgare L.*, *Theor. Appl. Genet.*, 95:637-642.

Köhler, H., 1997, Genetische Marker in der Pflanzenruchtung. 05-17 Mayıs 1997 Bornova-İzmir Seminer Notları (yayınlanmamış).

Laporte, V., Merdinoğlu, D., Saumitou-Laprade, P., Butterlin, G., Vernet, P. and Cuguen, J., 1998, Identification and mapping of RAPD and RFLP markers linked to a fertility restorer gene for a new source of cytoplasmic male sterility in *Beta vulgaris ssp. Maritima*, *Theor. Appl. Genet.*, 96:989-996.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

Lazo, G.R., Park, Y.H. and Kohel, R.J., 1994, Identification of RAPD markers linked to fiber strength in *Gossypium hirsutum* and *G. Barbadense* interspecific crosses, *Biochemistry of Cotton Workshop*, syf:1-11.

Lin, T.Y., Kao, Y.T., Lin, S., Lin, R.F., Chen, C.M., Huang, C.H., Wang, C.K., Lin, Y.Z. and Chen, C.C., 2001, A genetic linkage map of *Nicotiana plumbaginifolia*/*Nicotiana longiflora* based on RFLP and RAPD markers, *Theor. Appl. Genet.*, 103:905-911.

Ma, J., R. Zhou, Y. Dong, L. Wang, X. Wang and J. Jia, 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, 2001.

Mackill, D.J., 1995, Classifying japonica rice cultivars with RAPD markers, *Crop Science*, 35:889-894.

Mailer, R.J. and May, C.E., 1999, Heterogeneity of random amplified polymorphic DNA sequences in individual seedlings and bulked samples of four cultivars of *Brassica napus*, *Plant Breeding*, 118:465-470.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

Marsalis, M.A. and Goldberg, N.P., 2006, Leaf, Stem and Stripe Rust Diseases of Wheat, New Mexico State University NMSU and the U.S. Department of Agriculture cooperating, Guide A-415, http://cahe.nmsu.edu/pubs/_a/A-415.pdf.

McMullen, M., and Rasmussen, J., 2002, Wheat Leaf Rust. PP589 (revised), July 2002
<http://www.ag.ndsu.edu/pubs/plantsci/smgrains/pp589w.htm>

Nei, M., and Li, W.H., 1979, Mathematical model for studying variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 76:5269-5273.

Nevo, E., 1983, Genetic resources of wild emmer wheat: Structure, evolution and application in breeding. In: *Proceedings of the 6th Intl. Wheat Genetics Symposium* (December, 1983). S. Sakamoto(ed.). Kyoto University, Kyoto, Japan, pp. 421-431.

Nevo, E., 1995, Genetic resources of wild emmer *Triticum dicoccoides* for wheat improvement: News and views. In: Li ZS, Kin ZY (eds) *Proc 8th Int Wheat Genet Symp.* Agricultural Sciencetech Press, Beijing, pp 79-87.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

Nevo, E. and Beiles, A., 1989, Genetic diversity of wild emmer wheat in Israel and Turkey: Structure, evolution and application in breeding. *Theor. Appl. Genet.* 77:421-455.

Nebauer, S.G., Castillo-Agudo, L.del and Segura, J., 2000, An assessment of genetic relationships within the genus *Digitalis* based on PCR-generated RAPD markers, *Theor. Appl. Genet.*, 100:1209-1216.

Plaschke, J., Ganal, M.W., and Röder, M.S., 1995, Detection of genetic diversity in closely related breads wheat using microsatellite markers. *Theoretical and Applied Genetic* 91:1001-1007

Prasad, M., Varshney, R.K., Roy, J.K., Balyan, H.S., and Gupta, P.K., 2000, The use of microsatellites for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity in wheat, *Theor. Appl. Genet.*, 100:584-592.

Roelfs, A.P., Singh, R.P. and Sari, E.E., 1992, Rust Diseases of Wheat: Concepts and method of disease management. Mexico, D.F.: CIMMYT. 81 pages.

Rohlf, F.J., 1998, *NTSYS-pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Version 2.0, User's Guide*. New York: Exeter Software.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

Röder, M.S., Korzun,V., Wendehake, K., Plaschke, J., Tixier, M-H., Leroy, P., and Ganal, M.V., 1998. A microsatellite map of wheat. *Genetics Society of America* 149: 2007-2023 August

Röder, M.S., Wendehake, K., Korzun,V., Bredemeijer, G., Laborie, D., Bertrand, L., Isaac, P., Rendel, S., Jackson, J., Cooke, R.J., Vosman, B. and Ganal, M.W., 2002, Construction and analysis of a microsatellite-based database of European wheat varieities *Theor. Appl. Genet.* 106:67-73 August

Singh, R. P., J. C. Nelson and M. E. Sorrells, 2000, Mapping *Yr28* and Other Genes for Resistance to Stripe Rust in Wheat, *Crop Sci.* 40:1148-1155.

Singh, R.P., Huerta-Espino, J., and William, M., 2001, Additive genes for durable resistance to yellow rust in wheat: genetics, molecular mapping and breeding at CIMMYT: Meeting the challenge of yellow rust in cereal crops: Proceedings of the first regional conference on yellow rust in the central and west Asia and North Africa region, 8-14 may 2001, Karaj, Iran.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

Skoula, M., El Hilali, I. and Makris, A.M., 1999, Evaluation of the genetic diversity of *Salvia fruticosa* Mill. clones using RAPD markers and comparison with the essential oil profiles, *Biochemical Systematics and Ecology*, 27:559-568.

Sun, G.L., Fahima, T., Korol, A.B., Turpeinen, T., Grahama, A., Ronin, Y.I. and Nevo, E. 1997, Identification of molecular markers linked to the Yr15 stripe rust resistance gene of wheat originated in wild emmer wheat, *Triticum dicoccoides Theor Apply Genet.* (1997) 95: 622-628

Sun, O., Ni, Z., Liu, Z., Gao, J. and Huang, T., 1998, Genetic relationships and diversity among Tibetan wheat, common wheat and European spelt wheat revealed by RAPD markers, *Euphytica*, 99:205-211.

Staub, J.E. and Serquen, F.C., 1996, Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding, *Hort Science*, 31(5):729-740.

Sørensen, K.K., 2002, DNA markers in plant breeding, 33-36, *Quantitative Genetics and Efficient Breeding*, 28th Nordic Postgraduate Course in Plant Breeding, Sweden.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

Thompson, J.A., Nelson, R.L. and Vodkin, L.O., 1998, Identification of diverse soybean germplasm using RAPD markers, *Crop Science*, 38:1348-1355.

Ün, C., Wimmers, K., Ponsuksili, S., Schmoll, F. and Schellander K., 2000, Mikrosatelitler ve kullanım alanları, *Hayvansal Üretim* 41: 9-14

Vierling, R.A. and Nguyen, H., 1992, Use of RAPD markers to determine the genetic diversity of diploid, wheat genotypes, *Theor Appl Genet* 84:835-838p.

Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V., 1990, DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers, *Nucleic Acids Research*, 18(22):6531-6535.

William, M., Singh, R.P., J. Huerta-Espino, S. Ortiz Islas and D. Hoisington, 2003, Molecular Marker Mapping of Leaf Rust Resistance Gene *Lr46* and its Association with Stripe Rust Resistance Gene *Yr29* in Wheat, *Phytopathology*, 93(2):153-159.

Xia, X.C., Li, Z.F., Li, G.Q., He, Z.H. and Singh, R.P., 2007, Stripe Rust Resistance in Chinese Bread Wheat Cultivars and Lines, *Wheat Production in Stressed Environments*, 77–82.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devamı)

Yıldırım, A., Gökmen, S., Braun, H.J., Ketata, H. ve Ekiz, E. 1999, Buğdayda sarı pas hastalığının Türkiye açısından önemi ve ıslah çalışmaları. 8-11 Haziran Hububat Sempozyumu 158-163 Konya

Yıldırım, A. ve Kandemir, N., 2001, Genetik markörler ve analiz metodları, 334-363, Bitki Bitoteknolojisi II-Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları, S.Özcan, E.Gürel ve M.Babaoğlu (Derl.), Selçuk Üniversitesi Yayınları, Konya, 456s.

http://www.cdl.umn.edu/res_gene/wstr_loc.html Wheat Stripe Rust Resistance Genes: Source, Genome Location, Low Infection Type and Tester Lines. 2001, Euphytica 120:219-226

<http://genbank.vurv.cz/wheat/pedigree/pedigree.asp> Wheat Pedigree On Line - Result

BUĞDAY PAS HASTALIKLARI Sarı pas (*Puccinia striiformis* West) Kahverengi pas (*P. recondita tritici* Rob. et Desm.) Kara pas (*P. graminis tritici* Eriks. et Henn.)

ZİRAİ MÜCADELE TEKNİK TALİMATI

http://www.kkgm.gov.tr/birim/bitkikoruma/teknik_talimat/hububat/bugday_pas_hast.pdf

6 ÖZGEÇMİŞ

M. Alp Furan 1970 tarihinde Van'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Van'da tamamladı. 1990-91 öğrenim yılında girdiği 100. Yıl Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümünden 1994 yılında mezun oldu.

1996-97 öğrenim yılında Yüzüncü Yıl Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Anabilim Dalı Çayır-Mer'a ve Yem Bitkileri Bilim Dalında Yüksek Lisans öğrenimine başladı aynı yıl bölümünde Araştırma Görevlisi olarak çalışmaya başladı ve 1998 yılında yüksek lisansını tamamladıktan sonra vatani görevini yerine getirmek üzere başladığı askerlik hizmetini 1999 yılında tamamladı. 2001 yılında Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Anabilim Dalı Bitki Islahı ve Genetiği Bilim Dalında Doktora öğrenimine başladı.